

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10258

研究課題名(和文)悪性黒色腫におけるMAPキナーゼ活性化制御分子の同定

研究課題名(英文)Identification of regulatory molecules which activates MAP kinase in melanoma

研究代表者

船坂 陽子 (Funasaka, Yoko)

日本医科大学・医学部・教授

研究者番号：30209150

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：研究期間中に新たに悪性黒色腫細胞株を3株、良性の母斑細胞培養株を9株樹立した。Pyrosequence法にてBRAFV600Eの変異を調べ、MPAK測定用抗体アレイを用いてMAPK関連分子の発現を検討した。母斑細胞でBRAFV600Eに変異があってもERK1/2、MEKのリン酸化が生じないように脱リン酸化の機構が働いている場合、これはcAMP inducerのIBMX、下垂体エキス、増殖刺激因子のbFGF、ET-1ではなく、TPAでのみ打ち消される事が判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

悪性黒色腫の治療にBRAFV600EとMEK阻害剤の併用療法が用いられている。今回我々は増殖制御がされている良性の母斑細胞ではBRAFV600Eの変異があってもMAPキナーゼのリン酸化が脱リン酸化作用により抑制されていること、そしてこの抑制はフォルボールエステル(TPA)により解除されることを示した。BRAFV600Eに変異を持つ黒色腫に対し、増殖のキースIGNALとなるERK1/2の活性化を抑制する新規治療薬を開発するのに役立つ研究成果であったと考える。

研究成果の概要(英文)：We have established three cultured melanoma cell lines and nine benign nevus cell lines. The mutation of BRAFV600E was analyzed by pyrosequence method and MAP kinase related proteins were assayed using Human MAPK Pathway phosphorylation Array C-Series (RayBiotech/abcam). Nevus cells which have mutation of BRAFV600E did not show phosphorylated state of ERK1/2 and MEK. cAMP inducer, IBMX, pituitary extracts, bFGF, ET-1, and TPA were added in these nevus cells and phosphorylated state of ERK1/2 was examined by Western blotting. Among these signal inducers, only TPA induced phosphorylated state of ERK1/2. These results indicate that nevus cells which have the mutation of BRAFV600E are regulated by phosphatase to keep ERK1/2 with dephosphorylated states, however this down regulation of phosphorylation of ERK1/2 are suppressed by TPA.

研究分野：皮膚科学

キーワード：悪性黒色腫 MAPキナーゼ 脱リン酸化 リン酸化 母斑細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

良性の色素細胞である母斑細胞においても黒色腫細胞より高率に *BRAFV600E* の変異があることが明らかにされている。申請者らはリン酸化 ERK1/2 を認識する抗体を用いた免疫組織染色と laser microdissection を使って *BRAFV600E* を direct sequencing により解析したところ、母斑細胞では *BRAFV600E* の変異があるにもかかわらず、ERK1/2 のリン酸化が黒色腫細胞のように増強されていないことを見いだした (Oyama S et al, 6 人中 2 番目, J Dermatol 42:477, 2015)。さらに、*BRAFV600E* に変異を有する母斑細胞培養株を我々は樹立し、Western blotting にて解析したところ、培養黒色腫細胞と異なり、母斑細胞では TPA (phorbol myristate acetate) を添加しない限り ERK1/2 のリン酸化増強が生じなかった。申請者らは黒色腫細胞で ERK1/2 の常時リン酸化が生じる要因として脱リン酸化酵素の抑制による可能性を考え、20 年前に培養黒色腫細胞を用いて正常メラノサイトとの比較で、当時見いだされていた一連の脱リン酸化酵素ファミリーの mRNA 発現を検討した。しかしながら、これら酵素はむしろ黒色腫細胞においてより発現が高く、ERK1/2 のリン酸化亢進に伴い、逆により高い発現が誘導されていた (Halaban R, Funasaka Y et al. 6 人中 4 番目, J Immunother 12:154, 1992)。

2. 研究の目的

リン酸化脱リン酸化は negative feedback で相互に制御し合っていることが考えられる。そこで *BRAF V600E* に変異を有する母斑細胞および黒色腫細胞を用いて ERK1/2 MAP キナーゼのリン酸化制御機構について網羅的に比較検討し、その機序を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

悪性黒色腫細胞株および良性の母斑細胞の細胞培養株を樹立した。さらにこれら細胞を用いて pyrosequence 法で *BRAFV600E* の変異を調べた。

またこれら細胞において *BRAFV600E* の変異のある細胞からタンパクを抽出し、MAPK pathway 関連分子のリン酸化を見るために、MPAK 測定用抗体アレイ Human MAPK Pathway phosphorylation Array C-Series (RayBiotech/abcam) を用いた Dot blot analysis にて 17 種類の MAPK 関連分子の検討を行った。

さらに *BRAFV600E* の変異のある細胞において ERK1/2 の活性化が打ち消されている良性の母斑細胞に種々の増殖刺激因子 (cAMP inducer の IBMX, 下垂体エキス、増殖刺激因子の bFGF, ET-1, TPA) を各々添加し、pERK を認識する抗体で Western blotting を施行し、どの増殖刺激因子が ERK1/2 のリン酸化の抑制を打ち消すかを検討した。

4. 研究成果

1) 実験期間中に新たに悪性黒色腫細胞株を 3 株、良性の母斑細胞の細胞培養株を 9 株樹立した。

2) これら樹立した培養細胞から DNA を抽出し、*BRAFV600E* の変異の有無を調べた。抽出した DNA を用い pyro sequence 法で検討したところ、黒色腫細胞株では 3 株の内 1 株に、母斑細胞株では 9 株中 3 株に *BRAFV600E* の変異が見られた。

3) *BRAFV600E* の変異のある黒色腫細胞 1 株、変異のない黒色腫細胞 1 株、*BRAFV600E* の変異のある母斑細胞 2 株、変異のない細胞 3 株より蛋白を抽出し、MAPK pathway 関連分子のリン酸化を見るために、MPAK 測定用抗体アレイ Human MAPK Pathway phosphorylation Array C-Series (RayBiotech/abcam) を用いて 17 種類の MAPK 関連分子の検討した。

BRAFV600E の変異のある黒色腫細胞株では ERK1/2, CREB, GSK3a, GSK3b, JNK, MEK, MKK3, MKK6, MSK2, mTOR, RSK1, RSK2 のリン酸化が亢進しているのに対し、*BRAFV600E* 変異のある母斑細胞株ではこれらのリン酸化が亢進していないことが判明した。また *BRAFV600E* 変異のない母斑細胞株と比較してもこれらリン酸化状態の亢進はみられなかった。特に *BRAFV600E* に変異があるにもかかわらず ERK1/2、MEK のリン酸化の亢進がみられなかったことより、母斑細胞では脱リン酸化の機構が働いていることが判明した。

4) *BRAFV600E* の変異のある母斑細胞株の培養液に種々の増殖刺激因子 (cAMP inducer の IBMX, 下垂体エキス、増殖刺激因子の bFGF, ET-1, TPA) を各々添加し、pERK を認識する抗体で Western blotting を施行したところ、TPA 刺激にて ERK のリン酸化が誘導されることがわかり、母斑細胞で *BRAFV600E* に変異があっても ERK1/2、MEK のリン酸化が生じないように脱リン酸化の機構が働いている場合、これは TPA で打ち消されている事が判明した。

以上より、*BRAFV600E* に変異があるにもかかわらず ERK1/2、MEK のリン酸化の亢進がみられない良性の母斑細胞では脱リン酸化の機構が働いていること、そしてその脱リン酸化作用は cAMP inducer の IBMX, 下垂体エキス、増殖刺激因子の bFGF, ET-1 ではなく、TPA による経路で抑制されることが判明した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----