

令和 3 年 6 月 27 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17763

研究課題名(和文) 手掌足底における悪性黒色腫の癌幹細胞の特定と分子治療法開発

研究課題名(英文) The identification of cancer stem cell in acral melanoma and the development of a novel molecularly target therapy

研究代表者

吉岡 勇輔 (Yoshioka, Yusuke)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・非常勤講師

研究者番号：00835770

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：申請者らはすでに末端黒子型悪性黒色腫においてはAMPK関連キナーゼのNUAK2がその発症と進展に関与していることを示しているが、今回の検討ではさらに末端黒子型悪性黒色腫細胞内におけるLKB1-AMPKs系やDKK1-WNT/b-catenin系シグナル伝達路の解析から、臨床検体を用いた末端黒子型悪性黒色腫・癌幹細胞の検索、シグナル伝達路を阻害する腫瘍抑制に有効な薬剤の特定を進めた。本研究結果は今後の末端黒子型悪性黒色腫に関する発症機序の解析および新規分子標的治療開発のための基盤データになると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果では、末端黒子型悪性黒色腫内におけるLKB1-AMPKs系とNUAK2のシグナル伝達路の相互関係につき解析を進め、NUAK2が末端黒子型悪性黒色腫において掌蹠の汗腺線体部に発現されていることを確認。さらにAMPK-NUAK2系を阻害して細胞増殖を抑制する作用のある薬剤としてメトホルミンにつき検討を加えた。本邦において悪性黒色腫の約半数は末端黒子型悪性黒色腫が占めており、有効な新規治療の開発を進めることは重要な社会的意義を有するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)： We have already shown that AMP-related kinase NUAK2 participates in the development and progression of acral melanomas. In this study, we analyzed signaling pathways of both LKB1-AMPKs and DKK1-WNT/b-catenin in acral melanoma cells, explored cancer stem cells of acral melanoma using clinical specimens, and attempted to identify an inhibitor targeting NUAK2 pathways. The results of this study can be a foundation for both exploration of acral melanomagenesis and the development of a novel molecularly target therapy.

研究分野：悪性黒色腫

キーワード：悪性黒色腫

1. 研究開始当初の背景

最近になり掌蹠における色素幹細胞が汗腺内に存在していることが見出され徐々に詳細な解析が進められている[1]。また AMPKs 遺伝子群の1つである NUAK2 遺伝子は末端黒子型悪性黒色腫の発症に重要な役割をしていると考えられる[2]。これらを含めて LKB1-AMPKs 系の掌蹠色素幹細胞における腫瘍化メカニズムの解明は重要と示唆される。一方、掌蹠においては WNT/ β -catenin 系の ligand である DKK1 の発現が亢進しており[3]、DKK1-WNT/ β -catenin 系は色素幹細胞腫瘍化に重要と推察される[4]。また末端黒子型悪性黒色腫発症に関わる NUAK2 自体の解析も徐々に進んでおり CDK2 を介した発症機序の解明が行われ[5]、さらに NUAK2 は悪性黒色腫以外の皮膚腫瘍での関与も分かってきており発癌での重要性が示唆される[6]。

2. 研究の目的

本研究においては色素幹細胞内・末端黒子型悪性黒色腫細胞内での LKB1-AMPKs と DKK1-WNT/ β -catenin を解析することで悪性黒色腫の癌幹細胞の特定につなげ腫瘍発症の機序を解明することにより、より有効な分子標的治療開発に発展させる研究基盤を作ることとする。申請者はすでに末端黒子型悪性黒色腫の予後と強く相関する遺伝子として NUAK2 を特定しており、本研究計画では悪性黒色腫細胞内における LKB1-AMPKs 経路と NUAK2 がどのように相互作用して細胞増殖に働いているのか、実際に臨床検体においてはどのようにしているのか、このシグナル伝達路を有効に阻害できる薬剤の検討などを行った。

本研究において計画し遂行できた具体的な研究項目としては、

末端黒子型悪性黒色腫内での LKB1-AMPKs 系および DKK1-WNT/ β -catenin 系シグナル伝達路の解析

臨床検体を用いた末端黒子型悪性黒色腫・癌幹細胞の検索

シグナル伝達系を阻害し腫瘍抑制に有効な薬剤の特定

の3つであり悪性黒色腫の新規発症機序を解明し新規分子標的治療を開発するための研究基盤を固めることができた。

3. 研究の方法

1) 細胞・RNA 抽出

悪性黒色腫細胞として末端黒子型悪性黒色腫由来細胞を使用。RNAはmiRNeasy Mini Kit(QIAGEN)にて抽出。

2) ウェスタンブロット

ウェスタンブロットは過去に記載した方法に準じて施行[2,7]。抗体は抗 AMPK α 抗体、抗 pAMPK α (Thr172)抗体、抗 NUAK1 抗体、抗 NUAK2 抗体、抗 β -actin 抗体を使用。

3) マイクロアレイ解析

RNAを抽出後、NanoDrop ND-100にてRNAを定量。100ngのRNAをラベルとした。ラベルした600ngのcRNAをDNA Microarray Hybridization Oven内にてマイクロアレイ(SurePrint 3G Human GE 8x60K ver3.0)に17時間のハイブリダイゼーションを行いデータ取得。Gene Set Enrichment Analysisにて解析とした。

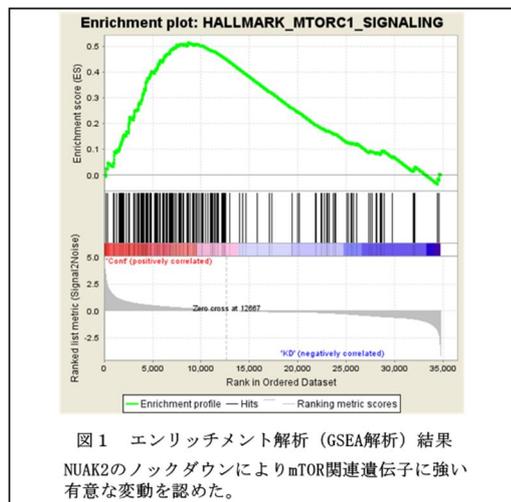
4) 免疫染色

免疫組織染色は過去に記載した方法に準じて施行[2,5]。抗体は抗 NUAK2 ポリクローナル抗体を使用した。

4. 研究成果

1) 末端黒子型悪性黒色腫内での LKB1-AMPKs 系および DKK1-WNT/ β -catenin 系シグナル伝達路の解析

掌蹠における汗腺内に色素幹細胞が位置しており悪性黒色腫の発症のための起始細胞となっている可能性が示唆されている。また NUAK2 は NUAK1 や AMPK などの AMPK 関連遺伝子群と相互作用を持ちながら制御されていることも分かっている。このため、まずマイクロアレイを用いた網羅的遺伝子解析にて NUAK2 をノックダウンすることでどのような遺伝子変動が末端黒子型悪性黒色腫内で起きているかを検討とした。NUAK2 のノックダウンにより mTOR 経路の変動が強い有意差をもって認められており(図1)、E2F 経路の変動も強い有意差をもって認められていたため NUAK2 による細胞増殖は mTOR から E2F を介した経路に制御されている可能性が示唆された。また NUAK2 の強制発現による AMPK



系の変動につきウェスタンブロットを用いてタンパクレベルにて解析。NUAK2 の発現にて AMPK は Thr172 でのリン酸化が抑制されることが示された (図 2)。これらの結果より NUAK2 は AMPK 系と密接な関連を持っていると推測される。今後は DKK1-WNT/ β -catenin 系シグナル伝達路についても検討進めていく予定している。

3) 臨床検体を用いた末端黒子型悪性黒色腫・癌幹細胞の検索

末端黒子型悪性黒色腫の臨床検体を用いて免疫染色により NUAK2 を染色とした。その結果、NUAK2 は悪性黒色腫細胞の存在する表皮基底層から汗腺導管部から腺体部に至る位置に発現されており、手掌足蹠に位置する汗腺腺体部に色素幹細胞が存在し悪性黒色腫の起始細胞になりうるという報告[1]を敷衍する結果が得られたと考えた。

4) シグナル伝達系を阻害し腫瘍抑制に有効な薬剤の特定

NUAK2 を阻害する薬剤として糖尿病薬でもあるピグアナイド系薬剤があるが、このうちで最も代表的な薬剤のメトホルミンの悪性黒色腫細胞増殖の抑制作用につき検討とした。悪性黒色腫細胞数を抑制する最適な濃度を 20mM と決定。Day0 から Day4 までの時間軸にてメトホルミン処理による悪性黒色腫細胞数の検定を施行。その結果、Day0 から Day4 までで悪性黒色腫細胞数は著明に減少しておりメトホルミンによる悪性黒色腫細胞数の抑制効果が示された (図 3)。

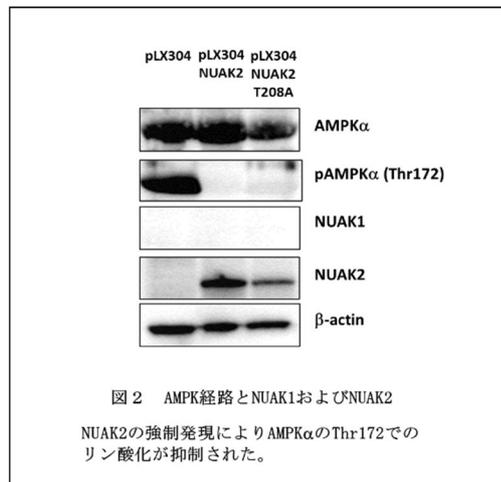


図 2 AMPK経路とNUAK1およびNUAK2
NUAK2の強制発現によりAMPK α のThr172でのリン酸化が抑制された。

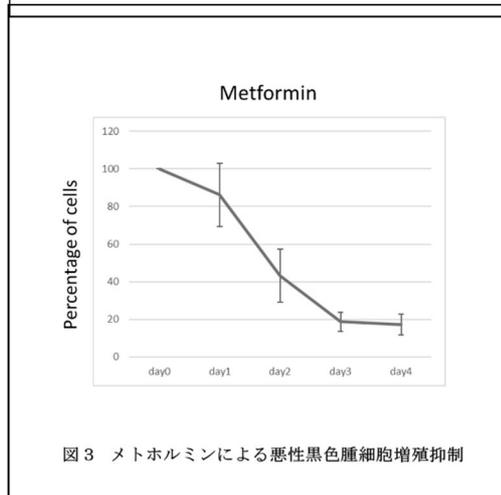


図 3 メトホルミンによる悪性黒色腫細胞増殖抑制

< 引用文献 >

- Okamoto N, Aoto T, Uhara H, Yamazaki S, Akutsu H, Umezawa A, Nakauchi H, Miyachi Y, Saida T, Nishimura EK; A melanocyte-melanoma precursor niche in sweat glands of volar skin. *Pigment Cell Melanoma Res* 27, 1039-1050 (2014).
- Namiki T, Tanemura A, Valencia JC, Coelho SG, Passeron T, Kawaguchi M, Vieira WD, Ishikawa M, Nishijima W, Izumo T, Kaneko Y, Katayama I, Yamaguchi Y, Yin L, Polley EC, Liu H, Kawakami Y, Eishi Y, Takahashi E, Yokozeki H, Hearing VJ; AMP kinase-related kinase NUAK2 affects tumor growth, migration, and clinical outcome of human melanoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 108, 6597-602 (2011).
- Yamaguchi Y, Itami S, Watabe H, Yasumoto K, Abdel-Malek ZA, Kubo T, Rouzaud F, Tanemura A, Yoshikawa K, Hearing VJ; Mesenchymal-epithelial interactions in the skin: increased expression of dickkopf1 by palmoplantar fibroblasts inhibits melanocyte growth and differentiation. *J Cell Biol* 165, 275-285 (2004).
- Yamaguchi Y, Passeron T, Hoashi T, Watabe H, Rouzaud F, Yasumoto K, Hara T, Tohyama C, Katayama I, Miki T, Hearing VJ; Dickkopf 1 (DKK1) regulates skin pigmentation and thickness by affecting Wnt/beta-catenin signaling in keratinocytes. *FASEB J* 22, 1009-1020 (2008).
- Namiki T, Yaguchi T, Nakamura K, Valencia JC, Coelho SG, Yin L, Kawaguchi M, Vieira WD, Kaneko Y, Tanemura A, Katayama I, Yokozeki H, Kawakami Y, Hearing VJ; NUAK2 amplification coupled with PTEN deficiency promotes melanoma development via CDK activation. *Cancer Res* 75, 2708-2715 (2015).
- Al-Busani H, Al-Sobaihi S, Nojima K, Tanemura A, Yaguchi T, Kawakami Y, Matsumura H, Nishimura EK, Yokozeki H, Namiki T; NUAK2 localization in normal skin and its expression in a variety of skin tumors with YAP. *J Dermatol Sci* 97, 143-151 (2020)
- Watabe H, Valencia JC, Yasumoto KI, Kushimoto T, Ando H, Muller J, Vieira WD, Mizoguchi M, Appela E, Hearing VJ. Regulation of tyrosinase processing and trafficking by organellar pH and proteasome activity. *J Biol Chem* 279, 7971-7981 (2004)

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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------