

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17342

研究課題名（和文）悪性黒色腫発症機序の解明と発症早期における癌幹細胞の特定

研究課題名（英文）The elucidation of melanomagenesis and the identification of cancer stem cell in early melanomas

研究代表者

西田 真紀子（Nihida, Makiko）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・特任講師

研究者番号：10736797

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NUAK2とPTENの機能異常が悪性黒色腫の発症と進展に重要であることをすでに示しているが、今回の検討ではマイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析の結果より悪性黒色腫細胞におけるNUAK2により制御される下流経路としてmTOR経路を特定した。さらにNUAK2機能への阻害作用を有する薬剤としていくつかのキナーゼ阻害剤およびビグアナイド系薬剤につきスクリーニングを行い最終的にメトホルミンの悪性黒色腫細胞の増殖抑制作用についての検討を行った。また色素細胞にNUAK2を強制発現させたトランスジェニックマウスを作製し、その色素細胞増数についても検討を加えた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果では、NUAK2とPTENの悪性黒色腫細胞増殖に対する機序につき解明を進め、マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子解析によりNUAK2により制御されるパスウェイとしてmTORを特定。NUAK2がmTORを制御することにより悪性黒色腫細胞増殖に働くことを示した。さらに色素細胞にNUAK2を強制発現させたトランスジェニックマウスを作製。その解析を進めた。悪性黒色腫の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 both NUA2 and PTEN participates in the development and progression of acral melanomas. In this study, we identified mTOR pathway, as a pathway of NUA2 target, in melanoma cells by comprehensive gene expression analysis. We performed a screening of kinase inhibitors and biguanides for the suppression of cell proliferation of melanoma cells, and further examined the effect of metformin. We generated a transgenic mouse with melanocytes in which NUA2 was expressed and examined an increased cell number of melanocytes.

研究分野：皮膚科学

キーワード：悪性黒色腫

## 1. 研究開始当初の背景

現在、わが国においてはニボルマブを含めた免疫チェックポイント阻害剤の導入が進み悪性黒色腫の予後は改善されつつあるものの、特にわが国での発症率の高い末端黒子型悪性黒色腫については白人などに多い表在拡大型での奏効率が50%前後と比較し25%前後とかなり低く免疫チェックポイント阻害剤による治療効果も限定的である。このため悪性黒色腫の発症機序の解明を進めることで有効な新規治療開発が望まれている。特に予後と強く相関する遺伝子を特定してその機能を明らかにすることは末端黒子型悪性黒色腫の発症機序の詳細を解明して有効な新規治療開発につなげていくために必須であると考えられる。

申請者らは以前の研究成果においてarray-Comparative Genomic Hybridization (CGH)法を利用したゲノム異常解析より末端黒子型悪性黒色腫の予後と強く相関する遺伝子(P=0.0036)としてNUAK2を特定、NUAK2阻害により悪性黒色腫細胞の細胞増殖能と細胞遊走能を抑えることができることを示している[1]。また末端黒子型悪性黒色腫にてNUAK2増幅と強く相関する遺伝子異常としてPTEN欠失を特定し、これらの遺伝子異常の相乗効果が末端黒子型悪性黒色腫だけでなく悪性黒色腫発症全般にも深く関わることを示した[2]。さらにNUAK2を制御するYAP/TAZが皮膚有棘細胞癌の一群でNUAK2と強い相関性がありその発症機序に關与することを示している[3]。

## 2. 研究の目的

本研究においては悪性黒色腫の発症早期においてNUAK2とPTENがどのようにしてその癌幹細胞形質と関わっているかを解明し、さらに臨床検体において癌幹細胞を特定することで、診断応用にもつながる基礎的な研究基盤を確立することを目的とする。申請者ら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NUAK2の下流シグナル伝達路を詳細に解明することによりNUAK2を標的とした新規分子標的治療の開発を進め、モデルとなるNUAK2を色素細胞に強制発現させたトランスジェニックマウスを解析することにより病態解明および新規分子標的治療開発をin vivoでも行えるようにすることを目的とする。

本研究において計画した具体的な研究項目としては、

NUAK2増幅とPTEN欠失がどのようなシグナル伝達系を用いて細胞増殖に働くかを細胞実験にて解明

Dct-NUAK2 KI マウスにて色素幹細胞がどのように増数してくるかを検討

Dct-NUAK2 KI マウスにて増数してきた細胞の色素幹細胞形質を検討

臨床検体を用いて悪性黒色腫の早期において幹細胞関連遺伝子がどのように発現しているかを検討

上記関連遺伝子を用いた悪性黒色種早期診断法開発の検討

の5つであり、さらに薬剤感受性の検討を含めて研究を行い悪性黒色腫の新規発症機序を解明し臨床応用を行う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・ベクター・RNA抽出

悪性黒色腫細胞としてSM2-1細胞を使用。レンチウイルスベクターであるpLKO.1にNUAK2に対するshRNA (AAB66-F-6: AAACCCAGGGCTGCCTTGAAAAG および AAB66-F-7: AAACCCAGGGCTGCCTTGAAAAG)を挿入したベクターをNUAK2のノックダウンに使用。コントロールにはpLKO.1ベクターを使用。miRNeasy Mini Kit (QIAGEN)にてRNAを抽出とした。

### 2) マイクロアレイ解析

NUAK2のノックダウン後に悪性黒色腫細胞よりRNAを抽出。NanoDrop ND-1000にてRNA定量後、2100 Bioanalyzerにて解析しRIN $\geq$ 7.0の場合にマイクロアレイ解析とした。100ngのRNAをラベルとし、ラベルした600ngのcRNAをDNA Microarray Hybridization Oven内にてマイクロアレイ(SurePrint G3 Human GE 8 $\times$ 60K ver3.0)に17時間のハイブリダイゼーションを行い、洗浄後にDNA Microarray Scannerにてデータ取得としGene Set Enrichment Analysisにて解析とした。

### 3) ウェスタンブロット

ウェスタンブロットはすでに論文に記載されている方法に準じて行った[1,4]。抗体はNUAK2に対するモノクローナル抗体を使用[3]。

## 4. 研究成果

### 1) NUAK2 増幅と PTEN 欠失によるシグナル伝達の検討

NUAK2 のノックダウン後にマイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を施行し NUAK2 のノックダウンによる遺伝子変動につき解析を行った。ノックダウン (shNUAK2) とコントロール (shEV) 処理した悪性黒色腫細胞から RNA を抽出。マイクロアレイを施行した後に Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) 解析を行った。統計学的有意差の得られた 12 の経路を特定。強い有意差が得られた上位 4 つの経路は mTOR から E2F の標的となる遺伝子のセットであり NUAK2 が mTOR を制御することで細胞増殖に作用することを示す結果であると考えられる (図 1)。この結果を敷衍するためウェスタンブロットを用いて mTOR の下流に位置する遺伝子の検討を行ったところ NUAK2 のノックダウンにより S6K のリン酸化が減少しており、NUAK2 による mTOR 経路の制御を示唆する結果となった (図 2)。

### 2) NUAK2 をより特異的に阻害できる薬剤の検討

NUAK2 はキナーゼであるためキナーゼ活性を有する化合物のスクリーニングを行い、また過去の文献より NUAK2 阻害作用を有するピグアナイド系薬剤の効果も検討としメトホルミンを用いた悪性黒色腫細胞数の抑制作用についても検討を加えた。これらの検討では、メトホルミン処理により悪性黒色腫細胞の細胞数は著明に減少し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。

### 3) Dct-NUAK2 KI マウスでの色素幹細胞増数の検討

申請者らはすでに色素細胞における NUAK2 の機能を検討するためメラニン生合成に枢要な遺伝子である Dct のプロモータ下に NUAK2 を挿入したトランスジェニックマウス (Dct-NUAK2 KI マウス) を作製している。このマウスを用いて抗 KIT 抗体による免疫染色にて色素幹細胞を検出。表皮内・毛包バルジ部および真皮内の色素細胞系列の細胞数のカウントを進めている。

### 4) Dct-NUAK2 KI マウスでの色素幹細胞形質の検討

Dct-NUAK2 KI マウスを用いた色素幹細胞数の検討に加えて、色素幹細胞の増殖コントロールに重要と考えられる Wnt およびエンドセリンの下流シグナル伝達に關与する遺伝子の検討と評価を進めている。

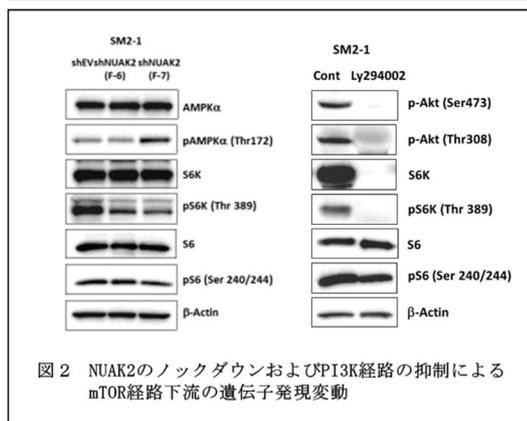
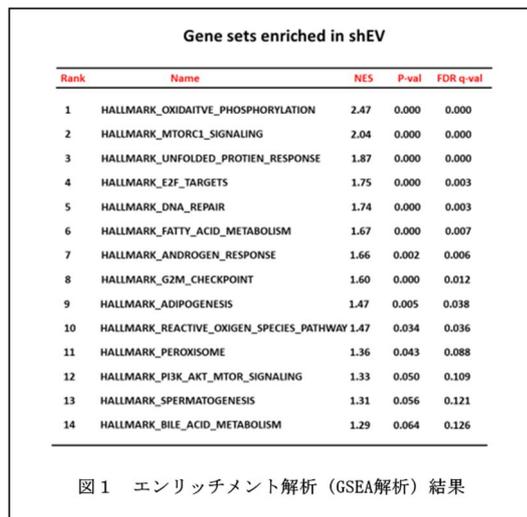
## <引用文献>

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).

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, 7971-798 (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
---------	---------