

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07031

研究課題名(和文)メラノーマにおけるがん遺伝子産物MITFのSUMO化機構の解明と標的治療への応用

研究課題名(英文) Inhibition of the MITF transcriptional activity by histone deacetylase 4 through SUMOylation

研究代表者

村上 秀樹 (MURAKAMI, HIDEKI)

愛知医科大学・医学部・教授

研究者番号：90303619

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：MITFはメラノサイトの系譜を存続させるがん遺伝子であり、MITFの転写活性はリン酸化、ユビキチン化あるいはSUMO化などにより制御されている。我々はヒストン脱アセチル化酵素の一つであるHDAC4がMITFのSUMO化を介してMITFの転写活性を抑制することを見出した。メラノーマ検体や細胞株において、HDAC4の発現とMITFのSUMO化には相関が認められた。カルシウム/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼシグナル伝達の活性化によりHDAC4は細胞質に移行し、MITFとの結合は低下した。CaMK阻害剤を用いたMITFのSUMO化の促進は、有効な抗メラノーマ治療戦略になる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

悪性黒色腫は悪性度の高い皮膚腫瘍で、転移した場合は予後は極めて不良である。根治切除不能のメラノーマの対してはBRAFおよびMEK阻害剤などの有効性が確認されているが、薬剤耐性などにより持続的な効果が得られないことがある。BRAF阻害に対する耐性機構の一つとして転写因子MITF遺伝子の増幅などによる活性化が関与している。本研究ではHDAC4がMITFのSUMO化を促進することにより活性化に抑制的に働くことを明らかにした。HDAC4はCaMKによるリン酸化により局在が制御されており、CaMK阻害によるHDACを介したMITFの活性制御がBRAF阻害剤耐性に有効である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The MITF is a lineage-specific oncogene in melanoma. The transcriptional activity of the MITF is regulated by post-translational modifications, including phosphorylation, ubiquitination and SUMOylation. In this study, we show that HDAC4 represses the transcriptional activity of the MITF through enhanced SUMOylation. Expression of HDAC4 was correlated with SUMOylation of MITF in melanoma specimens and cell lines. Activation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase (CaMK) signaling promoted disrupting MITF-HDAC4 complexes and stimulating HDAC4 nuclear export. The upregulation of MITF sumoylation via the use of inhibitors of CaMK pathway could represent a valid anti-melanoma strategy.

研究分野：外科病理

キーワード：メラノーマ MITF SUMO化

## 1. 研究開始当初の背景

メラノーマは悪性度の高い皮膚腫瘍で、早期の病変で外科的に切除された場合は完治が期待できるが、転移（リンパ節、他臓器）した場合、予後は極めて不良である（ステージ III, IV の 5 年生存率はそれぞれ 50%, 10% 程度）。近年、BRAF および MEK 阻害剤、免疫チェックポイント阻害剤などの有効性が確認され、根治切除不能メラノーマに対する治療には急速な進歩がみられている。しかしながら効果のみられる患者が限定的であり、持続的な効果が得られない（薬剤耐性）など、十分に改善されたとはいえない。メラノーマの腫瘍形成分子メカニズムを明らかにし、更なる治療成績の向上を目指した治療への応用が望まれている。

Microphthalmia Transcription Factor (MITF) は塩基性ヘリックス・ループ・ヘリックス-ロイシンジッパー (bHLH-LZ) 構造を有する転写因子であり、メラノサイトや網膜色素上皮細胞の発生や分化を制御する。また様々な細胞の生存 (BCL-2, HIF1- $\alpha$ )、細胞周期 (CDK2) に関与する遺伝子の発現を増加させメラノサイトの増殖に関与することが明らかになっている。メラノーマでは MITF 遺伝子領域 (Chr3p13) の増幅が原発性の 10% 程度、転移性の 21~23% で検出されることが報告されており、MITF 遺伝子増幅は化学療法抵抗性、予後不良因子とされている。

MITF の転写活性はリン酸化、SUMO 化などの翻訳後修飾により制御され、メラノサイトでは c-KIT などのシグナル伝達経路に応答して MITF の 73 番目のセリン残基が MAP kinase によりリン酸化され転写が活性化されることが明らかにされている。一方、転写の抑制機構としては MITF の主として 316 番目のリジン残基が SUMO 化され MITF の転写活性が制御されることを報告してきた。家族性、散発性メラノーマや腎がんを伴うメラノーマの症例において MITF の SUMO 化部位近傍の生殖細胞変異 (E318K) が検出され、この SUMO 化障害変異 (活性化変異) がメラノーマや腎細胞がんのリスクを高めることが報告された。MITF はメラノサイトの系譜を存続させるがん遺伝子 (lineage-specific oncogene) であり、MITF の活性を阻害する分子標的治療の開発が望まれるが、未だに転写活性の制御機構については十分に明らかになっていない。

## 2. 研究の目的

BRAF 変異を有するメラノーマにおいて、BRAF 阻害剤の耐性機構に MITF の活性化が関与することが報告されている。我々は MITF の転写制御におけるヒストン脱アセチル化酵素の関与に注目し解析を行い、クラス IIa ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC4,5) が MITF と結合、SUMO 化を促進することで MITF の転写活性に抑制的に働くことを見出してきた。本研究ではヒトメラノーマ検体におけるクラス IIa ヒストン脱アセチル化酵素の発現、MITF の SUMO 化について明らかにし、メラノーマにおける MITF の活性制御による新規治療への応用を目的とする。

## 3. 研究の方法

以下の 3 点についての解析を行う。

- ① 臨床検体での HDAC、MITF の発現、MITF の SUMO 化
- ② メラノーマ細胞株での HDACs の生理学的役割
- ③ 小分子化合物の腫瘍形成に与える影響

① 臨床検体での HDAC、MITF の発現、MITF の SUMO 化；ヒトのメラノーマ組織標本を用いて HDAC4, 5, 9 および MITF の発現を免疫組織化学染色法により解析する。HDAC の発現低下がみられた症例では FISH (fluorescence in situ hybridization) 法により遺伝子欠失の有無を調べる。BRAF の変異については変異特異的抗体 (BRAF V600E mutation-specific antibody) による免疫組織化学染色により評価する。MITF の SUMO 化は MITF 抗体および SUMO-1 抗体を用いた proximity ligation assay により相互作用を検出し、SUMO 化の程度、局在を評価する。

② メラノーマ細胞株における HDAC の機能解析；メラノーマ細胞株で HDAC4 遺伝子のホモ欠失が報告されていることから、HDAC4 の腫瘍における役割について解析を行っていく。色素性メラノーマ細胞株 MM-426 (BRAF:V600E, MITF 遺伝子増幅(-), HDAC4:ホモ欠失) と無色素性メラノーマ細胞株 SK-MEL-28 (BRAF:V600E, MITF 遺伝子増幅(+), HDAC4:野生型) の 2 つの細胞株を用いて HDAC4 を発現あるいはノックダウンさせ、生理学的な役割 (細胞増殖、運動能、足場非依存性増殖、メラニン色素の産生) についての解析を行う。

③ 小分子化合物の腫瘍形成に与える影響；CAMK 阻害剤の MITF の SUMO 化に与える影響、細胞の増殖に与える影響について解析する。BRAF あるいは MEK 阻害剤との併用の効果について解析する。

## 4. 研究成果

- ① 臨床検体での HDAC、MITF の発現、MITF の SUMO 化

皮膚メラノーマ 45 症例の免疫組織化学染色を行った。HDAC4, HDAC9, SUMO-1, MITF, SOX10,

BRAF V600E, NRAS Q61R 抗体を用い、染色強度を 4 段階評価した。MITF, SOX10, SUMO-1, HDAC9 はほとんど全症例で陽性 (2+以上) であった。BRAF V600E は 20 症例 (約 45%)、NRASQ61R は 4 症例 (約 9%) の症例で陽性であった (図 1)。HDAC4 は 13 症例 (約 29%) で発現が低下しており、内 3 症例では発現が認められなかった。

### メラノーマにおけるHDAC4およびHDAC9の発現

45 症例 (♂ : ♀; 15:30、平均年齢 65.4歳)

IHC score	HDAC4	HDAC9	SUMO-1	MITF	SOX10	BRAF V600E	NRAS Q61R
3+	4	44	40	33	43	9	2
2+	28	1	5	11	1	11	2
1+	10	0	0	1	1	4	4
0	3	0	0	0	0	21	37
Total	45	45	45	45	45	45	45

図 1

FISH 解析を行い、1 症例で HDAC4 領域のホモ欠失が確認された (図 2)。BRAFV600E, NRASQ61R と HDAC4 発現との関連は認められなかった。Breslow thickness との関連も検出されなかった。

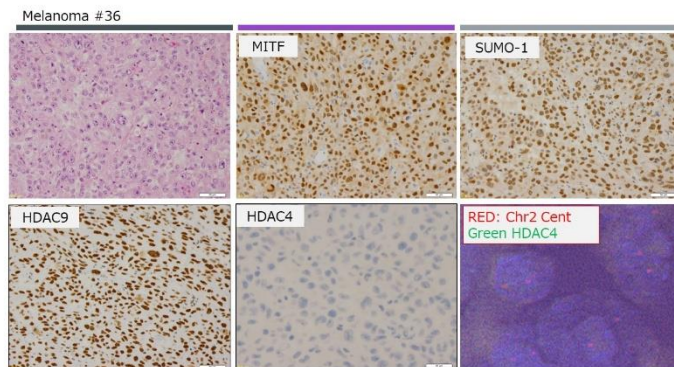


図 2

細胞での 1 細胞当たりのドット数の平均) を行い比較した。HDAC4 発現の低い症例 (免疫組織染色 0 もしくは 1+) では HDAC4 高発現群と比較して MITF の SUMO 化は低かった (図 3)。

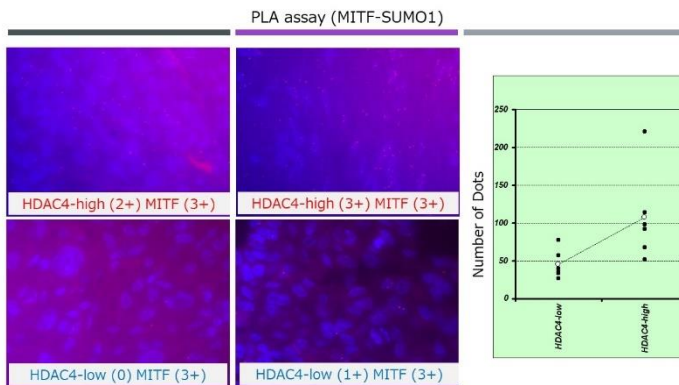
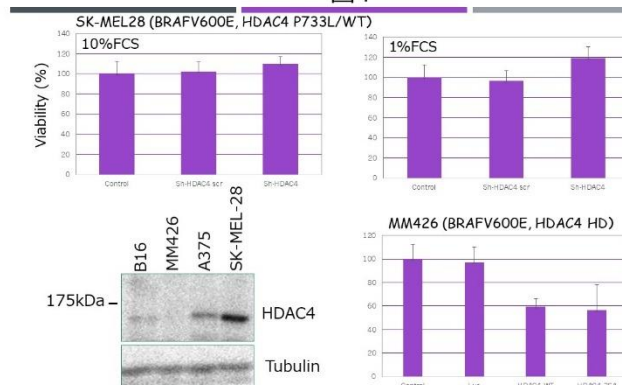


図 3

IHDAC の一つである HDAC4 は MITF の SUMO 化に関与していることが示唆された。

### ② メラノーマ細胞株での HDACs の生理学的役割

図 4



HDAC4 はメラノーマの細胞増殖に関与しており、メラノーマにおける腫瘍抑制遺伝子の可能性が

発現のみられない 3 症例で

HDAC5 については免疫組織染色で利用できる抗体が無く解析は試行しなかった。HDAC7 はほぼ全例で発現は検出されなかった。

MITF の SUMO 化について抗 MITF (マウスモノクローナル抗体) と抗 SUMO-1 (ウサギモノクローナル抗体) を用いた PLA 法を行って評価した。PLA 法ではシグナルは主に核内で検出された。HDAC4 発現のみられる症例 7 症例と発現低下している症例 7 症例で PLA 法を行い、シグナル定量 (100

メラノーマ細胞株 SK-MEL28 (MITF 増幅、HDCA4 発現(+)) で MITF の SUMO 化を PLA 法では、主に核、一部細胞質でシグナルが検出された。HDAC4 を ShRNA によりノックダウンすると MITF の SUMO 化の低下がみられた。抗 MITF と抗 HDAC4 による PLA 法では核および細胞質で検出された。HDAC4 遺伝子のホモ欠失しているメラノーマ細胞株 MM426 では MITF の SUMO 化は細胞質で検出され、核ではほとんど検出されなかった。以上の結果より class

メラノーマ細胞株 SK-MEL28 (MITF 増幅、HDCA4 発現(+)) で MITF の SUMO 化を PLA 法では、主に核、一部細胞質でシグナルが検出された。HDAC4 を ShRNA によりノックダウンすると MITF の SUMO 化の低下がみられた。抗 MITF と抗 HDAC4 による PLA 法では核および細胞質で検出された。HDAC4 遺伝子のホモ欠失しているメラノーマ細胞株 MM426 では MITF の SUMO 化は細胞質で検出され、核ではほとんど検出されなかった。以上の結果より class

HDAC4 遺伝子のホモ欠失しているメラノーマ細胞株 MM426 にレンチウイルス発現系を用いて HDAC4 を発現させ、細胞増殖に与える影響を調べたところ HDAC4 発現により増殖の抑制がみられた。SK-MEL28 で HDAC4 をノックダウンすると軽度の細胞増殖の増加がみられたが、有意な効果ではなかった (図 4)。MM426 は色素性メラノーマ細胞株で HDAC4 の発現によるメラニン色素産生に与える影響を調べたが、変化はみられなかった。

考えられた。

### ③ 小分子化合物の腫瘍形成に与える影響

Class IIa HDACs は CaMK によりリン酸化され核から細胞質に移行することが知られている。活性化型 CaMK IV の発現により HDAC4 は細胞質に移行し、MITF との結合が低下することが確認された。HDAC4 の CaMK のリン酸化部位変異体では、活性化型 CaMK IV の発現による細胞質への移行は認められなかった (図 5)。



図5

レポーターアッセイでは、活性化型 CaMK IV の発現により HDAC4 による転写抑制効果が低下した。

CaMKK 阻害剤 (STO-609)、CaMKII 阻害剤 (KN-93) のメラノーマの増殖に与える影響を調べた。SK-MEL28 を KN-93 あるいは STO-609 処理 (10  $\mu$ M 72 時間処理) による細胞増殖に与える影響を調べ、KN-93 では軽度の増殖抑制 (20% 程度) が認められた。STO-609 では明らかな増殖抑制は観察されなかった。

SK-MEL-28 細胞 (BRAF V600E, MITF 遺

伝子増幅) では BRAF 阻害剤単独処理でも増殖抑制 (30%程度) がみられたが、BRAF 阻害剤と STO-609 の 2 剤処理より強い増殖抑制 (75%) が観察された。

BRAF 変異陽性メラノーマに対する BRAF 阻害剤と CaMK 阻害剤併用の治療への可能性が示唆された。今後ヌードマウスの腫瘍移植モデルでの効果の検証が必要であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Wahiduzzaman Md, Karnan Sivasundaram, Ota Akinobu, Hanamura Ichiro, Murakami Hideki, Inoko Akihito, Rahman Md Lutfur, Hyodo Toshinori, Konishi Hiroyuki, Tsuzuki Shinobu, Hosokawa Yoshitaka	4. 巻 110
2. 論文標題 Establishment and characterization of CRISPR /Cas9 mediated human mesothelial cell line: Molecular insight into fibroblast growth factor receptor 2 in malignant pleural mesothelioma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 180 ~ 193
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.13871	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Karnan Sivasundaram, Ota Akinobu, Murakami Hideki, Rahman Md Lutfur, Hasan Muhammad Nazmul, Wahiduzzaman Md, Hanamura Ichiro, Quang Vu Lam, Inoko Akihito, Hyodo Toshinori, Konishi Hiroyuki, Tsuzuki Shinobu, Hosokawa Yoshitaka	4. 巻 6
2. 論文標題 Identification of CD24 as a potential diagnostic and therapeutic target for malignant pleural mesothelioma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Death Discovery	6. 最初と最後の頁 1-14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41420-020-00364-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔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
---------	---------