

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24700971

研究課題名(和文)新規に同定された変異型MITFは、がん特異的機能を有しているのか？

研究課題名(英文)What is the melanoma-specific function of novel mutant MITF?

研究代表者

横山 悟 (Yokoyama, Satoru)

富山大学・和漢医薬学総合研究所・助教

研究者番号：90613498

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：悪性黒色腫は、日本でも近年増加傾向にある悪性腫瘍であり、転移が見つかった患者の5年生存率が低いこと、化学療法・放射線療法が効きにくいことから、新規治療法の開発が重要である。申請者らは、家族性悪性黒色腫における新規変異型MITFを同定し、その機能の解析を行った。その過程で、MITFが薬剤耐性に関与すること、また天然化合物による悪性黒色腫への殺細胞効果などを同定した。

研究成果の概要(英文)：Melanoma only diagnosed less than 10% of all form of skin cancer; however, it is responsible for the majority of skin cancer related death. In 2013, it was estimated that 76,690 new cases of melanoma will be diagnosed in Unites States, and 9,480 people will die due to this disease. When diagnosed in early stage and limited to the skin, the prognosis of melanoma is curable. When it becomes metastatic melanoma, the prognosis is very poor with a 5 years survival rate less than 20%. By using the grant support, we determined the mechanism of drug-resistance in melanoma and of the suppression of melanoma growth by natural compounds.

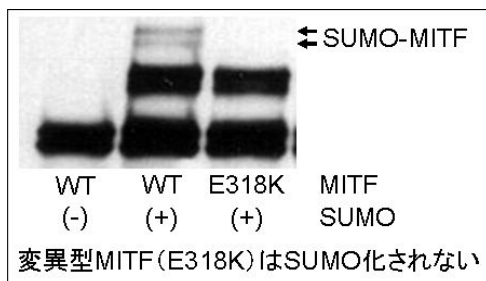
研究分野：腫瘍生物学・分子生物学

キーワード：悪性黒色腫 がん遺伝子 MITF

1. 研究開始当初の背景

悪性黒色腫は、日本でも近年増加傾向にある悪性腫瘍であり、転移が見つかった患者の5年生存率が低いこと(Stage III-50%, IV-10%以下)、化学療法、放射線治療が効きにくいことから、新規治療法の開発が重要である。

申請者らは、家族性悪性黒色腫の原因遺伝子として新たに転写因子 MITF を同定した (Yokoyama et al. Nature, 2011, In press)。これまでに CDKN2A と CDK4 が家族性悪性黒色腫の原因遺伝子として同定されていたが、これら二つの遺伝子以外の MITF の変異の存在を報告したことで、更なる家族性悪性黒色腫に関する研究が進展すると考えられる。申請者らは、MITF 変異 (E318K) がアミノ酸の置換により、その SUMO 化に影響を与え(下図参照)、転写活性を調節することを明らかにした。しかし、新規同定された変異型 MITF (E318K) と野生型 MITF における機能の違いについては、未だ理解されていない。



2. 研究の目的

申請者らは最近家族性悪性黒色腫の新規原因遺伝子として、転写因子 MITF を同定し、その変異 (E318K) が家族性悪性黒色腫の原因であることを新たに見出した (Yokoyama et al. Nature, 2011, In press)。本研究は変異型 MITF (E318K) または野生型 MITF の更なる機能解析を行い、MITF のがん特異的機能を明らかにすることが目的である。

(1) 変異型 MITF の過程で興味深い標的遺伝子である抗アポトーシス遺伝子 BCL2A1 を同定したことから、悪性黒色腫における

BCL2A1 の機能解析について検討した。

(2) 悪性黒色腫でがん遺伝子であるといわれた RAC1 が肺がんにおいても重要であるかについても検討した。

(3) 天然物由来化合物 resveratrol が悪性黒色腫の増殖に与える効果について検討した。

3. 研究の方法

(1) BCL2A1 の同定とその機能解析

in silico analysis

MITF の新規標的遺伝子を同定する目的で、公開されているデータを用いて、MITF の標的となりうる遺伝子を同定した。

細胞増殖

25nM の siRNA を導入し、72 時間後に CellTiter-Glo(Promega)を用いて検討した。

Western Blot

細胞抽出タンパク質をアクリルアミドゲルを用いて電気泳動し、各種抗体を用いて、タンパク質の発現を検討した。

クロマチン免疫沈降法

細胞をフォルムアルデヒドで固定し、各種抗体で DNA-タンパク質複合体を免疫沈降し、その後、脱クロスリンクし、免疫沈降された DNA を PCR で検出した。

リアルタイム PCR 法

Total RNA あるいはクロマチン免疫沈降法からえられた DNA について、各種プライマーを用いて RNA の発現量あるいは免疫沈降された DNA 量を検討した。

アポトーシスアッセイ

Annexin-V/7-AAD を用いて細胞を染色し、フローサイトメーターを用いて、アポトーシス細胞の定量を行った。

マウスへのがんの皮下移植

マウス nu/nu に 1×10^7 個の悪性黒色腫細胞を皮下移植し、その腫瘍計について 1 日後、12 日後に測定した。

(2) RAC1 阻害による肺がんの転移抑制

細胞増殖

細胞を gefitinib あるいは RAC1 阻害剤 NSC23766 などの各種阻害剤で 24 時間から 72 時間処理し、WST-1 試薬を加え、1 時間後に吸光度を測定した。

細胞運動能。

細胞運動は、wound healing assay あるいはトランスウェルチャンバーを用いた migration assay にて検討した。

マウスへのがんの皮下移植

C.B-17/lcrHsd-Prkdc^{scid} に 5×10^6 個の肺がん細胞を移植し、RAC1 阻害剤である NSC23766 (2.5mg/kg/day) を腹腔内に投与した。経時的に腫瘍計を測定した。

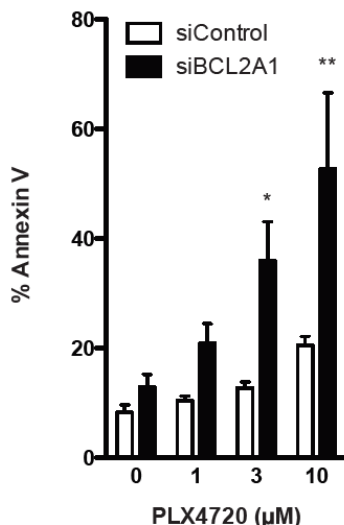
(3) resveratrol による抗悪性黒色腫効果の検討

マウスへのがんの皮下移植

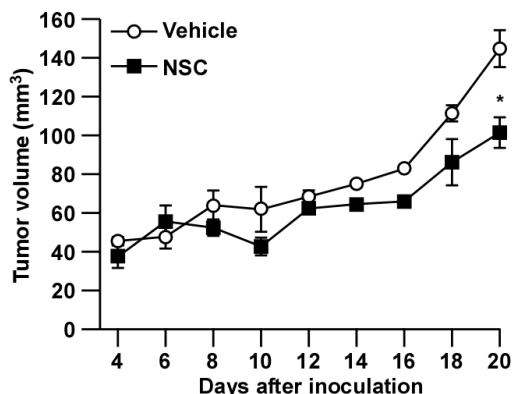
C57BL/6 マウスに 2.5×10^5 個のマウス悪性黒色腫細胞を皮下移植し、resveratrol (100mg/kg/day) を経口投与した。経時的に腫瘍計を測定した。

4. 研究成果

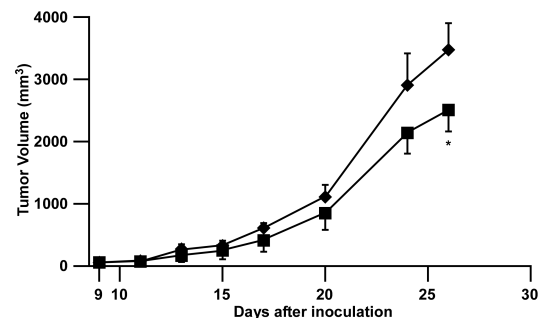
(1) 悪性黒色腫特異的がん遺伝子として、BCL2A1 を同定し、この BCL2A1 が MITF の標的遺伝子であること、さらには BCL2A1 の発現が悪性黒色腫に適応される BRAF 阻害剤である PLX4032 への感受性に寄与することを明らかにした。図は、siRNA を用いて、PLX4720 によるアポトーシスへの効果を検討したものである。



(2) RAC1 阻害剤が肺がん細胞の運動・増殖を抑制すること、さらには gefitinib 耐性を示す肺がんにおいても、RAC1 は細胞運動・増殖を抑制することを明らかにした。図は、 gefitinib 耐性肺がん細胞株である RPC-9 をマウスに移植し、NSC23766 を投与後、経時的に腫瘍サイズを測定した結果である。



(3) 天然物由来化合物 resveratrol が、survivin 遺伝子の発現抑制を介して悪性黒色腫の増殖を抑制することを明らかにした。図は、マウス B16-BL6 細胞を皮下移植し、Resveratrol () を投与後、経時的に腫瘍サイズを測定した結果である。



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 22 件)

Habibie, Yokoyama, S.*, Abdelhamed, S., Awale, S., Sakurai, H., Hayakawa, Y., Saiki, I. Survivin suppression through STAT3/ β -catenin is essential for

resveratrol-induced melanoma apoptosis.
Int. J. Oncol., 45, 895-901, 2014 *
corresponding author doi:
10.3892/ijo.2014.2480

Kaneto, N., Yokoyama, S.*, Hayakawa,
Y., Kato, S., Sakurai, H., Saiki, I. RAC1
inhibition as a therapeutic target for
gefitinib-resistant non-small-cell lung
cancer. Cancer Sci., 105, 788-794, 2014
* corresponding author doi:
10.1111/cas.12425.

Haq, R. *, Yokoyama, S.*, McHenry, K.,
Li, J., Porter, D., Duncan, L., Song, J.S.,
Fisher, D.E. BCL2A1 is an amplified
lineage-survival oncogene in melanoma
regulated by MITF. Proc Natl Acad Sci U
S A., 110, 4321-4326, 2013 * Contributed
equally to this work doi:
10.1073/pnas.1205575110.

〔学会発表〕(計 24 件)

横山 悟、Habibie、Abdelhamed Sherif、
Awale、Suresh、櫻井 宏明、早川 芳弘、
済木 育夫 Survivin の抑制がレスベラト
ロールによる悪性黒色腫のアポトーシスに
必須である 文部科学省新学術領域研究・が
ん支援「化学療法基盤支援活動」第3階シン
ポジウム：アカデミアからの抗がん剤創薬に
むけて 天然物の有効利用 2014年5月12
日 万国津梁館(沖縄・名護市)

Kaneto N, Kato S, Yokoyama S, Saiki I
RAC1 inhibitor suppresses
gefitinib-resistant NSCLC cell migration.
第72回 日本癌学会総会 2013年10月3日
5日 パシフィコ横浜(神奈川・横浜市)

Habibie, Abdelhamed S, Awale S,
Hayakawa Y, Saiki I, Yokoyama S.
Resveratrol induces apoptosis in melanoma
cells via downregulation of surviving
expression. 第72回 日本癌学会総会

2013年10月3日 5日 パシフィコ横浜(神
奈川・横浜市)

〔図書〕(計 1件)

横山 悟 日本生化学会 生化学第 85
巻第 6号 2013年 6ページ

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.inm.u-toyama.ac.jp/pb/gyosek
i/index.html](http://www.inm.u-toyama.ac.jp/pb/gyosek
i/index.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横山 悟 (Yokoyama Satoru)

富山大学・和漢医薬学総合研究所・助教

研究者番号：90613498