

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09760

研究課題名(和文) 末端黒子型悪性黒色腫に対する分子標的治療の開発

研究課題名(英文) Development of a novel molecular targeted therapy against acral melanomas

研究代表者

並木 剛 (NAMIKI, Takeshi)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・准教授

研究者番号：50401352

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：AMPK関連キナーゼのNUAK2が悪性黒色腫の増殖と遊走に関与していることが知られているが、今回の検討ではarray-CGHデータを用いてNUAK2増幅と相関する遺伝子異常としてPTEN欠失を特定。またAktリン酸化の上昇がNUAK2発現とも相関することを末端黒子型悪性黒色腫において示した。NUAK2のノックダウンによりCDK2発現が減少し、CDK2阻害剤だけでも十分にNUAK2増幅およびPTEN欠失を伴う悪性黒色腫細胞の増殖を抑制できることを示した。

研究成果の概要(英文)：Previous studies indicate that AMP-related kinase NUA2 participates in the proliferation and migration of melanoma cells. In this study, we identified the deletion of PTEN as a genetic aberration associated with the amplification of NUA2. Furthermore, we showed that an increased expression of phospho-Akt(S473) was associated with NUA2 expression. This study also showed that knockdown of NUA2 reduces the expression of CDK2 and a CDK2 inhibitor sufficiently suppresses proliferation of NUA2-amplified and PTEN-deleted melanoma cells.

研究分野：悪性黒色腫

キーワード：悪性黒色腫 分子標的治療

1. 研究開始当初の背景

申請者らは 2005 年に本邦悪性黒色腫臨床検体を用いた Comparative Genomic Hybridization (CGH) による解析にて第 1 番染色体長腕と第 6 番染色体短腕の増幅が悪性黒色腫の予後と相関することを示し (Namiki et al. Cancer Genet Cytogenet 2005)、これら領域の内で第 1 番染色体長腕上に位置する NUA2 遺伝子が末端黒子型悪性黒色腫の予後と強く相関する (P=0.0036) 遺伝子であることを特定し、in vitro においても NUA2 の阻害により悪性黒色腫細胞の増殖が抑えられることを示した (Namiki et al. PNAS 2011)。NUA2 は AMP kinase (AMPK) family 遺伝子の 1 つである。AMPK family の各遺伝子は細胞内エネルギーの変化を AMP を介してモニタリングするセンサーの役割を担っており、さらにシグナルを細胞周期制御機構に伝達することにより細胞増殖をコントロールしている。このため AMPK family の各遺伝子の異常は発癌に深く関わっており、いろいろな癌腫での異常が示されてきている。

2. 研究の目的

申請者は最近、末端黒子型悪性黒色腫の予後と相関する遺伝子として NUA2 を特定した。本研究は悪性黒色腫細胞内での NUA2 下流のシグナル伝達路を解明し、そのシグナル伝達路を阻害することによる治療応用への研究基盤を確立することを目的とする。

計画している具体的な研究項目は、(1) NUA2 と協調して悪性黒色腫細胞の増殖をコントロールしている遺伝子の特定、(2) NUA2 が細胞周期をコントロールするのに必要なシグナル伝達路の解明、(3) シグナル伝達路を有効に阻害する薬剤の特定、(4) 薬剤を有効に臨床応用とするための悪性黒色腫の各病理組織型および色素細胞性母斑における NUA2 発現の解析、の 4 つである。

3. 研究の方法

本研究計画では、末端黒子型悪性黒色腫の

予後と強く相関する (P=0.0036) 遺伝子である NUA2 の下流のシグナル伝達路を解明し、そのシグナル伝達路を阻害することによる治療応用への研究基盤を確立することを目的とする。

本研究計画では以下の研究項目につき進めていく予定である。

(1) NUA2 と相関すると予想される PI3K pathway の活性化について主に臨床検体を用いて解析。

(2) NUA2 の下流シグナル伝達路を mTOR と CDK2 を中心にさらに詳細に解析する。

(3) 細胞増殖以外にアポトーシス・細胞遊走能・細胞浸潤能などにつき検討を加える。

(4) NUA2 の下流シグナル伝達路を有効に阻害する薬剤を特定し in vitro と in vivo の双方にてその効果を評価する。

NUA2 と PI3K pathway 活性化の検討 (平成 27 年度)

NIH Array-CGH public database の解析により NUA2 と強く相関する (P=0.0004) 遺伝子として PTEN が特定されている。PTEN の下流シグナル伝達路である PI3K pathway の活性化を p-AKT(S473)の発現をみることにより解析とする。解析対象として 124 例の悪性黒色腫原発巣および 43 例の良性色素細胞性母斑の臨床検体をすでに確保しており NUA2・PTEN・p-AKT の発現を免疫染色にて検討する。

NUA2・PTEN・p-AKT の発現と臨床各パラメーターを比較。悪性黒色腫検体は予後情報も確保してあるため全生存期間と無再発生存期間につき関連性を検討していく。

NUA2 の下流シグナル伝達路の解析 (平成 27 年度)

上記の検討で PI3K pathway が NUA2 と協調して腫瘍化に働いていることが明確になったなら、悪性黒色腫細胞株を用いて NUA2 と PI3K pathway のシグナル伝達路の詳細な

る解析とその相互作用につき検討とする。まず shRNA を用いた NIAK2 の knockdown と薬剤 (Ly294002) を用いた PI3K pathway の不活性化を使い、NIAK2 と PI3K pathway を個別にまたは同時に阻害することにより細胞周期への影響を FACS にて解析する。次に細胞周期に關与する各遺伝子の変動につきウェスタンブロットを用いて検討とする。NIAK2 の下流シグナル伝達路と想定される mTOR・JNK・HIF・cadherin・Rho-Roc pathway につき実際のどのシグナル伝達路が動いているかを主にウェスタンブロットを用いて検討する。

アポトーシス・細胞遊走能・細胞浸潤能の検討

NIAK2 と PTEN の増幅が異なる悪性黒色腫細胞株を数種類用いて in vitro にてアポトーシス・細胞遊走能・細胞浸潤能につき検討とする。NIAK2 の概略的な結果はすでに報告している (Namiki et al PNAS2011)。今回はさらに詳細に NIAK2 と PTEN の遺伝子異常による違いを含めて検討する。NIAK2 は sRNA の knockdown、PTEN は Ly294002 を用いた PI3K pathway の不活性化を行い、アポトーシスを Annexin assay、細胞遊走能・浸潤能は Matrigel assay と scratch assay にて検討とする。

NIAK2 の下流シグナル伝達路を阻害する薬剤の特定

予備的研究によりすでに 2 種類の候補薬剤まで絞っているが、この 2 種類の薬剤につき NIAK2 および PTEN 遺伝子異常の異なった組み合わせをもつ数種類の悪性黒色腫細胞株を用いてその細胞増殖抑制能を検討する。この時に in vitro での至適濃度や細胞周期への影響などを検討する。もしこの 2 種類の薬剤で不十分な結果しか得られない場合に

は、さらに他の薬剤についても検討していく予定。

In vitro にて最適な薬剤を絞れたらマウスを用いた in vivo の実験にて動物モデルでの効果を検討する。NIAK2 と PTEN 遺伝子異常のもつ細胞株ともたない細胞株をそれぞれ nude mice に移植し xenograft 系での薬剤の抗腫瘍活性評価を行う。

悪性黒色腫の各組織型の NIAK2 発現の検討すでに NIH Array-CGH public database の解析により粘膜型悪性黒色腫では高率に NIAK2 が増幅している結果を予備的研究の段階で得ているが、この結果を発現レベルでも確認するために各粘膜領域の粘膜型悪性黒色腫を用いて免疫染色にて NIAK2 の発現を検討する。臨床検体としてはすでに 32 例の粘膜型悪性黒色腫原発巣を確保している。また同時に良性の色素細胞性母斑を検討に含めて悪性黒色腫との差異を検討する予定である。

4. 研究成果

(1) CGH array database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gro/>; Series GSE2631)を用いて NIAK2 と悪性黒色腫関連遺伝子との相関性を検討したところ PTEN 欠失のみに $P=0.0004$ と高い有意な相関性を認めた (図 1 a)。PTEN 下流に位置する Akt のリン酸化 (p-Akt) を臨床検体を用いた免疫組織染色にて NIAK2 との相関性を検討したところ $P<0.001$ と強い相関を認めた (図 1 b)。さらに予後解析にて、末端黒子型悪性黒色腫のみにて NIAK2 と p-Akt の双方を発現する症例にて無再発生存率が $P=0.002$ と有意な減少を認めた (図 2)。

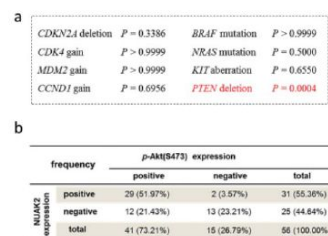


図1 アレイCGHデータと悪性黒色腫関連遺伝子異常および末端黒子型悪性黒色腫におけるNIAK2発現とphospho-Akt発現の相関 (Cancer Res 75:2708-15, 2015)

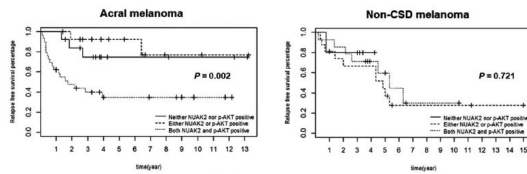


図2 NUAK2およびphospho-Akt (S473) の発現と無再発生存率 (Cancer Res 75:2708-15, 2015)

(2) NUAK2 増幅と PTEN 欠失を有する悪性黒色腫細胞を用いて (図 3 a) NUAK 2 のノックダウンを行ったところ有意な細胞数の減少を認めた (図 3 b)。細胞周期関連遺伝子の変動を調べたところ CDK2 の減少が認められ、PI3K pathway を阻害する薬剤である Ly294002 の処理においても同様に CDK2 の発現低下を認めた (図 4)。これらより CDK2 の制御が細胞周期に重要な役割を示すと考えられたため siRNA を用いて CDK2 をノックダウンしたところ細胞数の減少が認められた (図 5)。

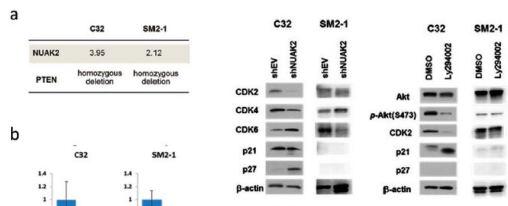


図3 C32およびSM2-1悪性黒色腫細胞はNUAK2増幅とPTEN欠失をもち、NUAK2のノックダウンにより細胞増殖が抑制される。(Cancer Res 75:2708-15, 2015)

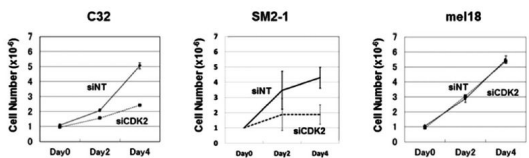


図4 NUAK2ノックダウンおよびPI3K pathway阻害による細胞周期関連遺伝子の発現変化。(Cancer Res 75:2708-15, 2015)

図5 CDK2ノックダウンによる細胞数解析 (Cancer Res 75:2708-15, 2015)

(3) CDK2 をターゲットとした悪性黒色腫に対する治療法の可能性を探るため CDK 阻害剤の中でも CDK2 をより優位に抑制するとされている Roscovitine の効果を NUAK2 増幅および PTEN 欠失を有する悪性黒色腫細胞 (C32) を用いて検討とした。高濃度 (25 μ M) では C32 もコントロール (mel18) とともに細胞増殖は抑制されたが、低濃度 (5 μ M) では C32 のみで細胞増殖が抑制された (図 6)。さらに xenograft モデルを用いた in vivo での検討を行ったところ NUAK2 増幅および PTEN 欠失を有する悪性黒色腫細胞 (C32 および SM2-1) にて腫瘍増殖抑制効果が認められた (図 7)。

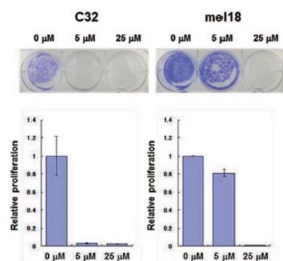


図6 CDK阻害剤による細胞増殖アッセイ。(Cancer Res 75:2708-15, 2015)

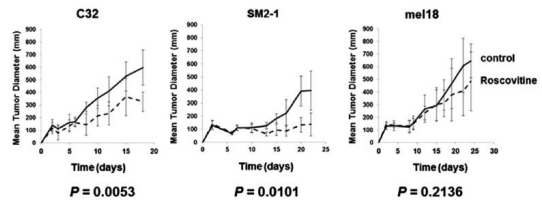


図7 異種移植マウスモデルによるCDK阻害剤の悪性黒色腫増殖抑制効果。(Cancer Res 75:2708-15, 2015)

<引用文献>

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* 2015; Jul 75(13):2708-2715. (査読有) doi: 10.1158/0008-5472

並木 剛; 末端黒子型悪性黒色腫発症の分子機構解明と分子標的治療開発。加齢皮膚医学セミナー (in press)

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 2 件)

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* 2015; Jul 75(13):2708-2715. (査読有) doi: 10.1158/0008-5472

並木 剛; 末端黒子型悪性黒色腫発症の分子機構解明と分子標的治療開発。加齢皮膚医学セミナー (in press)

〔学会発表〕(計 10 件)

並木 剛; 末端黒子型悪性黒色腫発症の分子機構解明と分子標的治療開発、13 回加齢皮膚医学研究会、2017 年 4 月 (受賞講演)

Namiki T, Nojima K, Funazumi M, Ishikawa M, Kaneko Y, Tanemura A, Katayama I, Mori T, Yamazaki N, Yokozeki H, Hearing VJ: The significance of over-expression of NUAK2 on the survival of patients with acral melanomas and its relevance with DNA copy number gain, The 41th Annual Meeting of the Japanese Society for

Investigative Dermatology, Sendai, 2016年12月(国際学会、Concurrent)
Namiki T, Nojima K, Funazami M, Ishikawa M, Kaneko Y, Tanemura A, Katayama I, Mori T, Yamazaki N, Yokozeki H, Hearing VJ: Over-expression of NUA2 has a significant impact on the survival of acral melanomas patients and a relevance with DNA copy number gain, The 27th Annual Meeting of the Japanese Society for Pigment Cell Research, Gifu, 2016年11月(国際学会)
Namiki T, Funazami M, Nojima K, Ishikawa M, Tanemura M, Katayama I, Mori T, Yamazaki N, Yokozeki H, Hearing VJ: Overexpression of NUA2 has a significant impact on the survival of acral melanoma patients, 46th Annual Meeting of the European Society for Dermatologic Research MUNICH 2016, 2016年9月(国際学会)
並木 剛; 末端黒子型悪性黒色腫に対する分子標的治療の開発、56回湯島皮膚科談話会、2016年7月(特別講演)
並木 剛; 末端黒子型悪性黒色腫に対する分子標的治療の開発、115回日本皮膚科学会総会、2016年6月
Namiki T, Nakamura K, Kawaguchi M, Tanemura A, Katayama I, Yokozeki H, Kawakami Y, Hearing VJ: The significance of over-expression both of NUA2 and of phosphor-Akt(S473) on patient's survival of acral melanomas, The 40th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, 2015年12月(国際学会、Concurrent)
Namiki T, Yaguchi T, Nakamura K, Kawaguchi M, Kaneko Y, Tanemura A,

Katayama I, Yokozeki H, Kawakami Y, Hearing VJ: NUA2 amplification coupled with PTEN deficiency promote melanoma development via CDK activation, The 26th Annual Meeting of the Japanese Society for Pigment Cell Research, Sapporo 2015年11月(国際学会)
Namiki T, Yaguchi T, Nakamura K, Kaneko Y, Tanemura A, Katayama I, Kawakami Y: NUA2 amplification coupled with PTEN deficiency promote melanoma development via CDK activation. The 75th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, 2015年10月(国際学会、Concurrent)
Namiki T, Yaguchi T, Nakamura K, Kawaguchi M, Tanemura A, Katayama I, Yokozeki H, Kawakami Y, Hearing VJ: NUA2 amplification coupled with PTEN deficiency promote melanoma development via CDK activation, 45th Annual Meeting of the European Society for Dermatologic Research ROTTERDAM 2015, 2015年9月(国際学会、Plenary)

{図書}(計 0件)

{産業財産権}

出願状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:

取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

並木 剛 (NAMIKI, Takeshi)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究
科・准教授
研究者番号：50401352

(2) 研究分担者

河上 裕 (KAWAKAMI, Yutaka)
慶應義塾大学・医学部・教授
研究者番号：50161287

(3) 連携研究者

谷口 智恵 (YAGUCHI, Tomonori)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号：40424163

横関 博雄 (YOKOZEKI, Hiroo)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究
科・教授
研究者番号：90210608

片山 一郎 (KATAYAMA, Ichiro)
大阪大学・医学研究科・教授
研究者番号：80191980

種村 篤 (TANEMURA, Atsushi)
大阪大学・医学研究科・講師
研究者番号：50457016

金子 安比古 (KANEKO, Yasuhiko)
埼玉県立がんセンター・臨床腫瘍研究所・
統括参与
研究者番号：50373387

(4) 研究協力者

()