

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08264

研究課題名(和文) NUA2を標的とした悪性黒色腫の分子標的治療開発

研究課題名(英文) The development of novel molecularly target therapy against melanomas by targeting NUA2

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) 3,400,000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、今回の検討ではマイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析を行うことで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経路を特定し解析を進めた。さらにNUAK2機能への阻害作用を有する薬剤として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も検討を加えた。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、末端黒子型悪性黒色腫の予後と強く相関する遺伝子でもあるNUAK2の悪性黒色腫細胞増殖に働く機序につき説明を進め、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NUAK2を標的とした新規分子標的治療開発のために必須となる色素細胞に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。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 NUA2 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 using microarray. We further examined downstream pathways of mTOR in detail. We also examined the effect of metformin, as a drug inhibiting NUA2 functions, on the suppression of the proliferation of melanoma cells. We generated a transgenic mouse with melanocytes in which NUA2 was expressed and examined an increased cell number of melanocytes.

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

わが国において末端黒子型悪性黒色腫は悪性黒色腫全体の約半数を占めるがその特有な発症機序の解明は十分でない。またニボルマブとイピリムマブ併用での奏効率が白人などに多い表在拡大型での50%前後に比べて末端黒子型悪性黒色腫では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。このため有効な新規治療開発が望まれている。次世代シーケンサーによる悪性黒色腫のゲノム異常解析から末端黒子型では表在拡大型や他の病型とは異なる特有のゲノム異常が明らかになっており、個々の遺伝子異常でもKIT遺伝子の増幅や変異およびCCND1遺伝子の増幅など末端黒子型に頻度の高い遺伝子異常が明らかになっている。しかしながら、これらの遺伝子をターゲットとした分子標的治療の効果は乏しく有効な治療法とは言えない。このため予後と強く相関する遺伝子による末端黒子型悪性黒色腫の発症機序の詳細を解明することで有効な新規治療開発につなげていく必要がある。

申請者は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た[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関与することを示した[3]。

2. 研究の目的

本研究においては悪性黒色腫の新規の発症機序を解明することで、より有効な分子標的治療開発に発展させることを目的とする。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作製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遂行できた具体的な研究項目としては、

- NUAK2に制御されるmTOR関連遺伝子検討
- NUAK2をより特異的に阻害できる薬剤の検討
- Dct-NUAK2 KIマウスにおける悪性黒色腫発症の検討
- Dct-NUAK2およびPTEN欠失を有するマウスの作製

の4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・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。

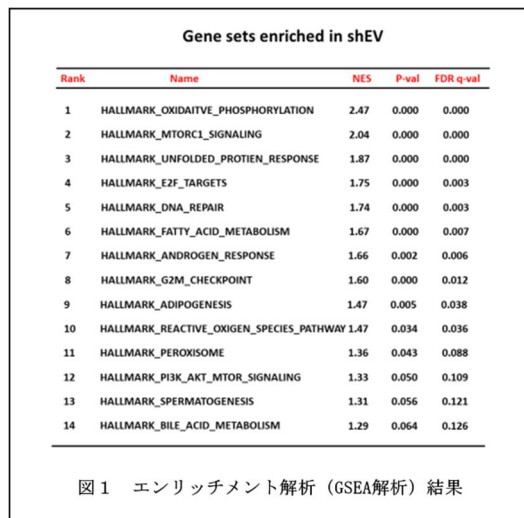
3) ウェスタンブロット

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

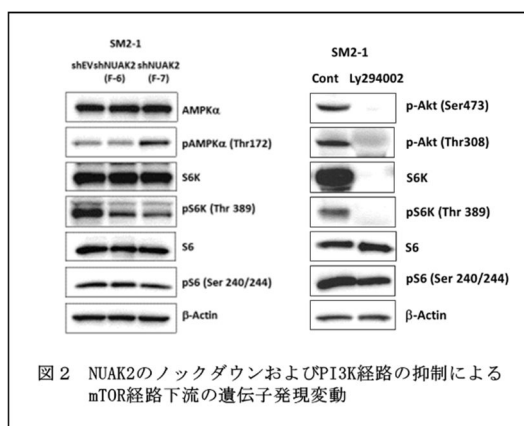
1) NUAK2 に制御される mTOR 関連遺伝子検討

マイクロアレイを用いて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。NUAK2 をノックダウンした悪性黒色腫細胞 (shNUAK2) とコントロール (shEV) を用いて Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) 解析を行った。統計学的有意差を示した 12 の経路を特定できた。この解析による強い有意差を示した上位 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 の mTOR を介した細胞増殖の制御に関する機能を示唆する結果とも言える (図 1)。さらに mTOR 下流の遺伝子変動をウェスタンブロットで解析したところ NUAK2 のノックダウンにて S6K のリン酸化の減少が見られており、NUAK2 は mTOR 経路を介して S6K のリン酸化に作用することにより機能している可能性が示唆された (図 2)。



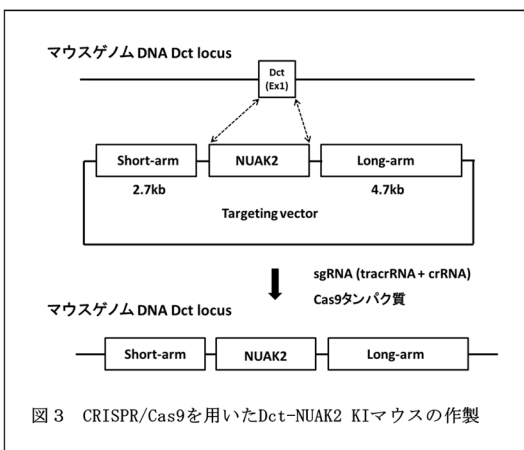
2) NUAK2 をより特異的に阻害できる薬剤の検討

NUAK2 阻害作用を有するメトホルミンを用いて悪性黒色腫細胞数の抑制作用につき検討を加えた。まず悪性黒色腫細胞数を抑制するメトホルミンの最適濃度を 20mM と決定。Day0 から Day4 につきメトホルミン処理による悪性黒色腫細胞数につき検討を行った。Day2 から Day4 にかけて悪性黒色腫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 マウスにおける悪性黒色腫発症の検討

色素細胞における NUAK2 の機能を in vivo にて検討するためメラニン生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 CRISPR/Cas9 のシステムを用いることでトランスジェニックマウス (Dct-NUAK2 KI マウス) を作製した (図 3)。抗 KIT 抗体および抗 COL17A1 抗体を用いて免疫染色を施行し表皮内・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 および Pten 欠失を有するマウスの作製

Dct-NUAK2 KI マウスと flox-Pten KI マウスおよび Tyr-CreERT2 マウスを交配することで Dct-NUAK2 KI と Pten 欠失を有するマウスを作製。現在、増数を試みている。

< 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1件（うち査読付論文 1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 並木 剛	4. 巻 13
2. 論文標題 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	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 加齢皮膚医学セミナー	6. 最初と最後の頁 35-40
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 並木 剛、松村寛之、谷口智憲、河上 裕、横関博雄、西村栄美
2. 発表標題 悪性黒色腫細胞におけるマイクロアレイを用いたNUAK2下流シグナル伝達路の検討
3. 学会等名 第35回日本皮膚悪性腫瘍学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Namiki T, Matsumura H, Yaguchi T, Kawakami Y, Nishimura EK, Yokozeeki H
2. 発表標題 NUAK2 promotes melanoma development by regulating mTOR pathway
3. 学会等名 International Investigative Dermatology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Namiki T
2. 発表標題 Development of novel therapeutics targeting NUAK2 against acral melanomas
3. 学会等名 The 75th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔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
研究 分担者	河上 裕 (Kawakami Yutaka) (50161287)	国際医療福祉大学・医学部・教授 (32206)	
研究 分担者	西村 栄美 (Nishimura Emi) (70396331)	東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授 (12602)	

	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
連携 研究者	谷口 智憲 (Yaguchi Tomonori) (40424163)	慶應義塾大学・医学部・講師 (32612)	
連携 研究者	松村 寛行 (Matsumura Hiroyuki) (70581700)	東京医科歯科大学・難治疾患研究所・助教 (12602)	

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