

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07377

研究課題名(和文) 悪性黒色腫におけるシグナル伝達阻害薬と合成致死効果を有する新規分子の探索研究

研究課題名(英文) Research on signal transduction inhibitors and novel molecules with synthetic lethal effects in melanoma

研究代表者

前沢 千早 (Maesawa, Chihaya)

岩手医科大学・医歯薬総合研究所・教授

研究者番号：10326647

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、悪性黒色腫のドライバー経路と補完関係にあり、合成致死をもたらす可能性を持つパートナー分子を特定する事を目的として、USP4阻害によるJNK活性化ならびにMITF/BCL2 familyの発現抑制によるアポトーシス誘導経路、および生存促進性のautophagy阻害の経路について解析を行った。悪性黒色腫ではDUSP4への生存依存性が顕著であることが明らかとなった。DUSP4の破壊は、転写後のプロセスによるDUSP6の上昇を引き起こし、DUSP6を負に制御することでERK1/2活性を維持する役割を果たしていることが明らかとなった。DUSP4/6は悪性黒色腫の新規治療戦略分子と考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、従前の他がん種の報告で見過ごされてきた、悪性黒色腫特異的な生存機構に着目した点で、独自性・独創性がある。本研究の成果は、未だ治療法の確立していない半数の進行悪性黒色腫患者の新規治療法の開発につながる視点を持った意義のある研究である。

研究成果の概要(英文)：We aim to identify partner molecules that have a complementary relationship with the driver pathway of malignant melanoma and have the potential to cause synthetic lethality, and to develop methods to enhance the effects of signal transduction inhibitors or overcome resistance. We conducted analyses on the pathway of apoptosis induction through USP4 inhibition, resulting in JNK activation and suppression of MITF/BCL2 family expression, as well as the pathway of inhibition of survival-promoting autophagy. Database research revealed a prominent survival dependency on DUSP4 in malignant melanoma. The depletion of DUSP4 reduced the phosphorylation of ERK1/2, but it did not affect the phosphorylation of c-Jun kinase. The disruption of DUSP4 resulted in an increase in DUSP6 levels via a post-transcriptional process, demonstrating that DUSP4 plays a role in maintaining ERK1/2 activity by negatively regulating DUSP6. DUSP4/6 was considered as a novel therapeutic target for malignant melanoma.

研究分野：実験病理

キーワード：悪性黒色腫 DUSP4 DUSP6 JUN MAPK

### 1. 研究開始当初の背景

進行期悪性黒色腫の治療成績は、シグナル伝達阻害薬、および免疫のチェックポイント阻害薬の出現により激変した。しかし、シグナル伝達阻害薬は治療開始直後の奏功率は高いものの、薬剤耐性を獲得し、無増悪生存期間が短くなるという課題がある。また、免疫のチェックポイント阻害薬は、治療開始直後の奏功率は低い、長期生存が見込まれる例がある一方で、どの程度の観察期間をもって奏功率を判定すべきかという難しい判断を迫られている。さらに、両者を併用しても、未だ過半数の症例で長期生存を実現することはできていない。特に、悪性黒色腫のドライバー経路である BRAF/MEK 阻害薬の効果は、耐性獲得により長期間持続しないという大きな問題がある。

主に BRAF/MEK 阻害薬に関して RAS MAPK 経路の耐性獲得には、標的および標的外の分子の変異、別の経路の活性化による生存シグナルの増強が関与しているとされている。これまでに、NRAS/MEK/IGFR/PDGF/COT/PTEN など、複数の経路において構成遺伝子の異常が報告されている。我々も BRAF 阻害薬であるベムラフェニブ耐性株で、AKT の活性化が生じている事を報告した<sup>1)</sup>。更に、その耐性克服に、HMG-CoA 還元酵素阻害薬であるスタチンの併用が相乗殺細胞効果を持つ事も示した<sup>1)</sup>。また、生存促進性の autophagy 経路をクロロキンで阻害すると、RAS MAPK の異常を持つ悪性黒色腫や膵癌に合成致死をもたらす事が相次いで報告された<sup>2,3)</sup>。糖尿病薬や抗マalaria薬のような既存で安価な薬剤を併用する事で、新規シグナル伝達阻害薬の効果持続/増強が可能になれば、進行期黒色腫患者にとって大きな福音となる。

本研究は、黒色腫のドライバー経路と補完関係にあり、合成致死をもたらす事が可能なパートナー分子を特定し、シグナル伝達阻害薬の効果増強/耐性の克服法を開発する事を目的として研究を開始した。

### 2. 研究の目的

進行期悪性黒色腫の治療成績改善には、ドライバー経路に作用する BRAF/MEK 阻害薬の効果延長が命題となっている。本研究では、悪性黒色腫のドライバー経路と補完関係にあり、合成致死をもたらす可能性を持つパートナー分子を特定し、シグナル伝達阻害薬の効果増強/耐性の克服法を開発する。本研究では、DUSP4 阻害による、JNK 活性化ならびに MITF BCL2 family の発現抑制によるアポトーシス誘導経路、および生存促進性の autophagy 阻害の経路に着目し、これらの分子動態ならびに阻害薬が BRAF/MEK 阻害薬と合成致死効果を持つか検証し、新たな悪性黒色腫治療のプラットフォームの作成に寄与する。

### 3. 研究の方法

データベース検索により以下の2経路を対象にする事にした。

(1) DUSP4 阻害による、JNK 活性化ならびに MITF BCL2 family の発現抑制によるアポトーシス誘導経路

Depmap portal (<https://depmap.org/portal/>) は、BROAD institute の運営するサイトで、1500 以上の培養細胞株の背景遺伝子異常と薬剤感受性のデータを公開し、がんゲノム医療の推進に貢献している。中でも遺伝子の CRISPER/shRNA による、網羅的遺伝子の破壊/発現抑制の結果は、dependency score (DS)として公開されている。このデータベースから、悪性黒色腫特異的に DS が低下する遺伝子、DUSP4 に着目した(図1)。

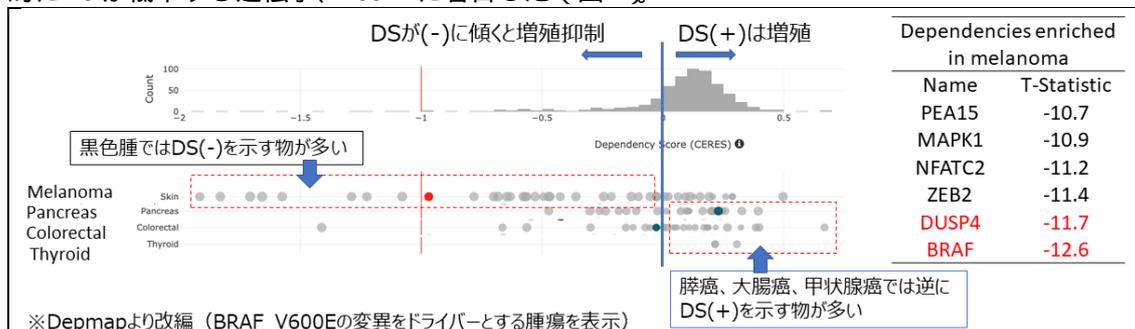
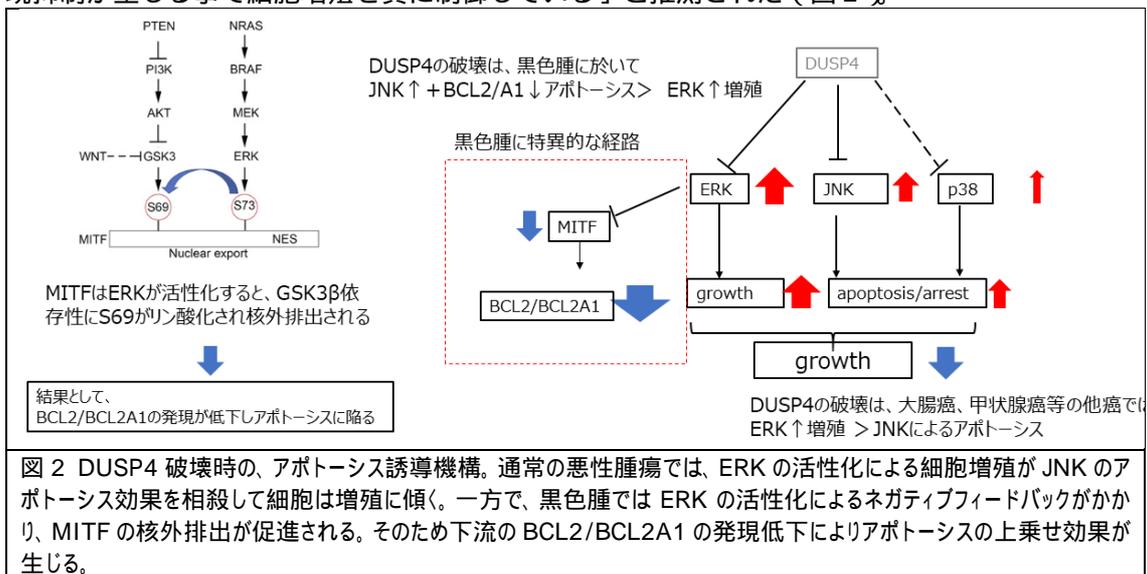


図1 Depmap に於ける、DUSP4 の dependency score(DS)分布。膵癌、大腸癌、甲状腺癌では DS(+)の物が多いが、黒色腫では極端に生存が落ちる細胞株が多い。BRAF の破壊と同程度の効果が得られる。

DUSP (dual-specific phosphatase)は、二重特異性フォスファターゼであり、標的タンパク質中の近接したリン酸化セリン/スレオニンとリン酸化チロシンを共に脱リン酸化するフォスファターゼ群である。DUSPs は、細胞周期制御の主要コンポーネントである Cdc25 に類似ドメインを持つホスファターゼでいずれかの MAP キナーゼを基質とする。DUSP4 は ERK>JNK>p38 の順で脱リン酸化作用が強いとされ、活性型の BRAF 変異を持つがん種では、DUSP4 の抑制は、ERK の細胞増

殖を促進する。従って、その阻害薬は開発の対象外であった。しかし、Depmap のデータからは、悪性黒色腫で増殖を抑制する事が示されていた。DUSP4 の悪性黒色腫特異的な動態は、「色素細胞特異的転写因子 MITF とのクロストークが大きな要因となっている」との仮説を立てるに至った。MITF との関連は、「ERK のリン酸化亢進は GSK3 依存性に色素性細胞でのみ作用する MITF をリン酸化し、核外排出を加速させる。結果として、抗アポトーシス因子 BCL2 ファミリーの発現抑制が生じる事で細胞増殖を負に制御している」と推測された(図2)。



## (2) 生存促進性の autophagy 阻害の経路

生存促進性の autophagy 経路をクロロキンで阻害すると、RAS MAPK の異常を持つ黒色腫や膀胱癌に合成致死をもたらす事が報告されている(2,3)。我々もこの追試を行ったが、細胞株によっては合成致死を誘導できなかった。この経路の検証にあたっては、BRAF/MEK 阻害薬とクロロキン併用有効例を選択する為の適切なバイオマーカー検索を行った。

## (3) 実験に使用した細胞株ならびに薬剤、解析方法

DUSP4 発現抑制系の確立。DUSP4-DS-high (SK-MEL-24, C32)株と、-low (A375)株を用いて、DUSP4 inducible clone を作出する。通常の sh-, si-RNA による抑制に加え、オーキシングロン(AID)、ドキシサイクリンを用いた抑制系を作成した。

DUSP4 発現抑制と BRAF/MEK 阻害薬の相乗効果の検証は、DUSP4 inducible clone を用いて、BRAF/MEK 阻害薬(vemurafenib/ trametinib)存在下での細胞増殖能を、ATP assay, colony formation assay で解析した。また、flow cytometer を用い細胞周期/アポトーシスの有無に関しても検証した。各種蛋白質の動態に関しては、Western blot, real-time PCR を使った。

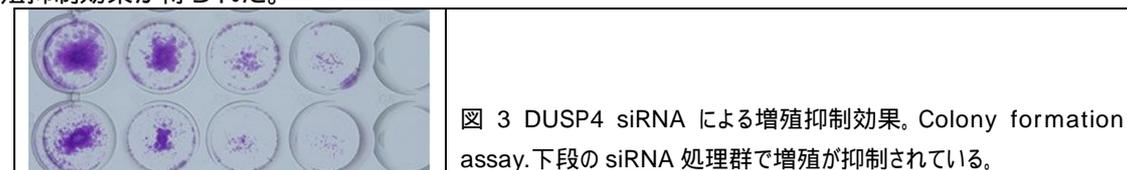
DUSP4 発現抑制に関する仮説経路-1(MITF の核外排出)、ならびに仮説経路-2(JNK のリン酸化亢進)のモニタリングについては、色素細胞特異的な type M の MITF-M/GFP コンストラクトを作成し、細胞内局在ならびに、リン酸化部位の変異体を作成した。ERK/JNK の活性評価には既報の Kinase translocation reporter (KTR)システムを用いた(4)。DUSPs 阻害薬(NSC 150117)と BRAF/MEK 阻害薬との相乗/相加効果の検証については、上記の細胞株に加えて、21株(Depmap 登録8株)ならびに Vemurafenib 耐性株3株を用いて感受性試験を実施した(ATP assay, colony formation assay)。

BRAF/MEK 阻害薬(vemurafenib/trametinib)、クロロキン併用時の感受性の評価については、ATP assay ならびに colony formation assay を用いた。クロロキン添加により殺細胞効果の増強する細胞株のスクリーニングを実施する。既報の陽性コントロールとして、膀胱癌株 PIAPaCa-2 を用いた。

## 4. 研究成果

### (1) DUSP4 抑制による細胞増殖効果の検討。

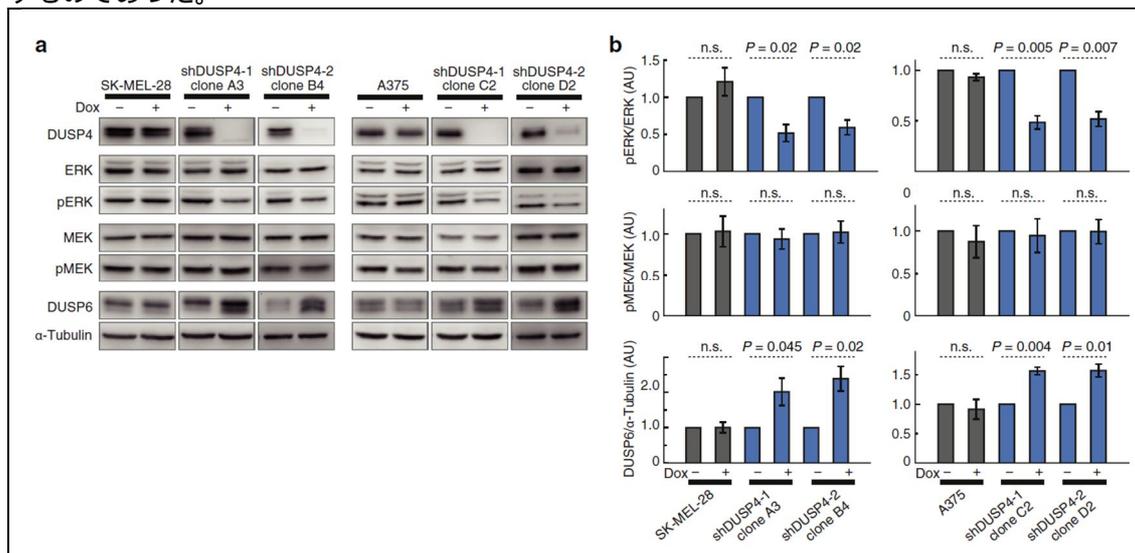
図3に示すとおり、DUSP4 ノックダウン/ NSC 150117 阻害薬処理で明らかな悪性黒色腫の増殖抑制効果が得られた。



### (2) DUSP4 抑制による細胞増殖効果に関する分子経路の解析

DUSP4 の破壊は、アポトーシスを顕著に誘導することなく悪性黒色腫の細胞増殖を阻害した。

興味深いことに、イムノブロットングおよびキナーゼ転座レポーターのデータにより、DUSP4の枯渇は ERK1/2 リン酸化の減少を誘導するが、c-Jun N 末端キナーゼのリン酸化にはほとんど影響を及ぼさないことが明らかになった。ERK も c-Jun N 末端キナーゼも DUSP4 の直接的な標的ではなかった。DUSP4 の破壊は、転写後プロセスを通じて DUSP6 レベルの増加をもたらす事が明らかとなった。悪性黒色腫では、DUSP4 が DUSP6 を負に制御することによって高い ERK1/2 活性を維持する役割を果たし、それによって黒色腫細胞の生存と増殖に寄与していることを示すものであった。



(3) 悪性黒色腫治療分子として DUSP4/6 阻害薬のスクリーニング。既存の DUSP4 阻害薬がライブラリーの中に見つからず、代用経路としての DUSP6 の抑制について検討した。DUSP6 は悪性黒色腫の増殖抑制に深く関与し、阻害薬候補について 2 種類の候補物質の検証に至った (候補 A, B)。候補 A, B とも同程度の IC50 を示したが、ゼブラフィッシュを用いた in vivo の検証では LD50 が高く、治療戦略への転換を断念した。DUSP6 の阻害は悪性黒色腫の有効な治療手段とはならず、DUSP4 特異的な阻害物質の探索が必要と考えられた。

(4) autophagy 阻害の経路に関しては、既報の実験結果を再現できず、この経路に関してはこれ以上の探索を断念した。

#### <引用文献>

- 1) Nishiya M, Yasuhira S, Maesawa C. *Anti Cancer Drugs* 2019, 30: 451-7.
- 2) Conan G. et. Al. *Nature Med* 2019, 25: 620-7.
- 3) Verikios S, et al. *Br. J Dermatol* 2018, 180: 346-356.
- 4) Miura H, et al. *Cell Reports* 2018, 24: 2658-68.
- 5) Ngeow KC, et. Al. *PNAS* 2018, 115: E8668-77.

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 Kamada Hirofumi、Yasuhira Shinji、Shibazaki Masahiko、Amano Hiroo、Maesawa Chihaya	4. 巻 in press
2. 論文標題 DUSP4 Inactivation Leads to Reduced Extracellular Signal?Regulated Kinase Activity through Upregulation of DUSP6 in Melanoma Cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Investigative Dermatology	6. 最初と最後の頁 126-9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jid.2022.02.007	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
研究 分 担 者	安平 進士  (Yasuhira Shinji)  (90311729)	岩手医科大学・医歯薬総合研究所・講師     (31201)	

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