

令和 6 年 9 月 10 日現在

機関番号：37303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06556

研究課題名(和文)チロシナーゼ分解誘導化合物によるメラノーマ腫瘍形成抑制の分子機構解明

研究課題名(英文)Elucidation of the molecular mechanism of suppression of melanoma tumor formation by tyrosinase degradation-inducing compounds

研究代表者

藤田 英明(Fujita, Hideaki)

長崎国際大学・薬学部・教授

研究者番号：80291524

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：マウスにB16メラノーマを皮下移植し腫瘍を形成させ、3種類のチロシナーゼ分解誘導化合物を腹腔内投与することで抗腫瘍効果を評価したが、有意差を示す化合物を見つけることができなかった。膜結合型ユビキチンリガーゼRNF152が新規の新規色素調節因子であることを世界に先駆けて見出した。さらにユビキチンリガーゼMARCH8の抗ウイルス活性に関する研究を共同研究者とともに継続して行い報告した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではチロシナーゼ分解誘導化合物のメラノーマ治療薬への応用の可能性について検討を行った。このようなメラノーマ治療薬は、その作用機構は従来の治療薬とは異なるため、分子標的薬や免疫チェックポイント阻害薬と併用での相乗効果が期待できる。また、我々が報告した膜結合型ユビキチンリガーゼRNF152を標的としたメラニン合成調節化合物や、先述したチロシナーゼ分解誘導化合物の開発に繋がる可能性を秘めている。

研究成果の概要(英文)：B16 melanoma was implanted subcutaneously into mice to form a tumor, and three types of tyrosinase degradation-inducing compounds were administered intraperitoneally to evaluate the antitumor effect, but no compounds were found that showed a significant effect. There might be unknown problems with experimental techniques. We have to discuss this matter with collaborators and resume experiments as soon as possible. We were the first in the world to discover that membrane-bound ubiquitin ligase RNF152 is a novel pigment regulatory factor, and it was published in Membranes (IF=4.2). It was also published as the research thesis of co-experimenter Ryota Ueda, a graduate student. Together with collaborators, we continued research on the antiviral activity of ubiquitin ligase MARCH8, and the results were published in Cells (IF=6.0).

研究分野：細胞生物学

キーワード：メラノソーム メラニン メラノーマ チロシナーゼ リソソーム タンパク質分解 ユビキチン ユビキチンリガーゼ

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

メラノーマは皮膚メラノサイトががん化した腫瘍であり、その治療には外科手術や薬物療法などが行われている。しかしながら、耐性がん細胞の出現などによりその5年生存率はⅢ期で約50%、Ⅳ期では約10%と致死率の高いがんである。近年、免疫チェックポイント阻害薬が臨床応用され、患者の全生存期間延長が期待されているが、その奏効率は10~40%と低いことが問題となっている。そのためメラノーマに特異的で汎用性の高い治療薬の創出は患者の予後改善に大きく貢献できると考えられる。チロシナーゼはメラノサイトに特異的に発現しているメラニン合成酵素の一つであり、チロシナーゼ分解物がネオアンチゲンとして自己免疫を誘導することが報告されている。最近我々は、独自に有するチロシナーゼ分解誘導化合物がメラノーマに対して抗腫瘍効果を示し、免疫担当細胞であるT細胞の腫瘍内への浸潤を亢進させることを見出した。

2. 研究の目的

本研究ではチロシナーゼ分解誘導化合物のメラノーマに対する抗腫瘍効果とその分子メカニズムを明らかにし、新規メラノーマ治療薬の創出を目指して研究を行う。我々はこれまで新規美白剤の開発を目的に、メラノサイトにおけるチロシナーゼ分解を誘導する化合物について研究を行ってきた。本研究ではこれらチロシナーゼ分解誘導化合物のメラノーマ治療薬への応用の可能性について検討することを目的とする。

3. 研究の方法

① チロシナーゼ分解誘導化合物による抗腫瘍効果の解析 (研究分担者: 上田亮太助手)

マウスに B16 メラノーマを皮下移植し腫瘍を形成させ、その腫瘍に対してチロシナーゼ分解誘導化合物を直接塗布して、腫瘍サイズを測定することで抗腫瘍効果を評価する

② 化合物投与腫瘍組織へ浸潤する免疫細胞解析 (研究分担者: 藤井佑樹講師)

チロシナーゼ分解誘導化合物を塗布した腫瘍およびその周辺組織への T 細胞浸潤の有無、浸潤細胞の細胞種同定を抗体免疫染色・FACS などを用いて行う。

③ 新規チロシナーゼ分解誘導化合物のスクリーニングおよびその分子作用機構の解明 (研究分担者: 上田亮太助手)

・天然物由来化合物・合成有機化合物ライブラリーから、Cell-based ELISA 法による新規チロシナーゼ分解誘導化合物のスクリーニングを行う。得られた化合物によるチロシナーゼの分解にリソソームあるいはプロテアソームのいずれが関与するのかについて、それぞれの分解阻害剤を用いて明らかにする。

・カイク発現系を用いて発現・精製した組み替え型チロシナーゼと標的化合物との直接相互作用を、等温滴定型カロリメトリー (ITC) を用いて解析する。

4. 研究成果

(1) マウスに B16 メラノーマを皮下移植し腫瘍を形成させ、3種類のチロシナーゼ分解誘導化合物を腹腔内投与することで抗腫瘍効果を評価したが、現在のところ有意差を示す化合物を見つけることができなかった。予備的実験では腫瘍に直接化合物を接種することで、腫瘍形成阻害を確認していたが、再現性が得られなかった。以上の結果から、現時点では抗腫瘍効果を示す化合物の同定には至らなかった。理由として、マウス腫瘍形成実験については、経験値が不足していたことが挙げられる。共同研究者による直接指導がコロナ禍及び共同研究者の海外留学等の理由で、できていなかった。今後、共同研究者が帰国次第、実験手技の問題点について議論する。効果的な対策を検討し、できるだけ速やかに実験を行う。研究継続のため、科研費申請を行う予定である。

(2) チロシナーゼを分解に導く膜結合型ユビキチンリガーゼ RNF152 の作用分子機構について解析を行なった。3XFLAG-ユビキチン発現プラスミドを用いることで、感度よくチロシナーゼのユビキチン化を検出で切るようになった。その結果、チロシナーゼ分解には RNF152 の膜結合ドメインが必須であることを見出した。さらに B16 メラノーマ細胞において、RNF152 の siRNA を用いたノックダウン、および RNF152 発現プラスミドを用いた過剰発現の結果、RNF152 発現量とチロシナーゼ発現量およびメラニン産生量には逆相関が認められた。これらの結果から、RNF152 は新規の新規色素調節因子であると結論した。以上の結果は Membranes (インパクトファクター4.2) に掲載された。また、共同実験者の上田亮太 (助手・大学院生) の学位論文とした。今後、発展的に RNF152 の機能解析を継続して行うため、科研費申請を行う予定である。

(3) カイク個体を用いたヒトチロシナーゼおよびヒト Tyrp-1 の大量発現系を確立できた。アフィニティカラムを用いることで、ある程度精製でき、ヒトチロシナーゼについては活性測定が可能となった。マイクロカロリメーターを用いた化合物との相互作用測定にはもう少し精製純度を高める必要がある。マイクロカロリメーターが学内に設置されたので、これを用いて、ヒトチロシナーゼとチロシナーゼ分解誘導化合物との相互作用について測定する。一部化合物

についてはチロシナーゼとの結合部位が予測されているので、変異型チロシナーゼを用いてその予測について検証する。本研究成果により、ヒトチロシナーゼとの相互作用化合物のスクリーニングが可能となる。研究継続のため、科研費申請を行う予定である。

(4) 別の膜結合型ユビキチンリガーゼ MARCH8 の抗ウイルス活性に関する研究を共同研究者とともに継続して行った。その結果は Cells (インパクトファクター6.0) に掲載された。研究継続することで、膜結合型ユビキチンリガーゼの共通した機能発現の分子機構解明を目指していきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Zhang Yanzhao, Ozono Seiya, Tada Takuya, Tobiume Minoru, Kameoka Masanori, Kishigami Satoshi, Fujita Hideaki, Tokunaga Kenzo	4. 巻 10
2. 論文標題 MARCH8 Targets Cytoplasmic Lysine Residues of Various Viral Envelope Glycoproteins	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microbiology Spectrum	6. 最初と最後の頁 1 and 12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/spectrum.00618-21	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 該当する

1. 著者名 Ueda Ryota, Hashimoto Rina, Fujii Yuki, Menezes Jos? C. J. M. D. S., Takahashi Hirota, Takeda Hiroyuki, Sawasaki Tatsuya, Motokawa Tomonori, Tokunaga Kenzo, Fujita Hideaki	4. 巻 14
2. 論文標題 Membrane-Associated Ubiquitin Ligase RING Finger Protein 152 Orchestrates Melanogenesis via Tyrosinase Ubiquitination	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Membranes	6. 最初と最後の頁 43 ~ 43
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/membranes14020043	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 該当する

1. 著者名 Tada Takuya, Zhang Yanzhao, Kong Dechuan, Tanaka Michiko, Yao Weitong, Kameoka Masanori, Ueno Takamasa, Fujita Hideaki, Tokunaga Kenzo	4. 巻 13
2. 論文標題 Further Characterization of the Antiviral Transmembrane Protein MARCH8	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 698 ~ 698
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cells13080698	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 該当する

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藤田英明、上田亮太、藤井佑樹、高橋宏隆、竹田浩之、澤崎達也、本川智紀、徳永研三
2. 発表標題 膜結合型ユビキチンリガーゼRNF152によるメラニン産生調節機構
3. 学会等名 日本色素細胞学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 上田亮太、大園誠也、藤井佑樹、高橋宏隆、竹田浩之、澤崎達也、本川智紀、徳永研三、藤田英明
2. 発表標題 膜結合型ユビキチンリガーゼRNF152によるチロシナーゼのユビキチン化分子機構解明に関する研究
3. 学会等名 日本色素細胞学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 上田 亮太，大園 誠也，藤井 佑樹，高橋 宏隆，竹田 浩之，澤崎 達也，本川 智紀，徳永 研三，藤田 英明
2. 発表標題 膜結合型ユビキチンリガーゼRNF152によるチロシナーゼ分解の分子機構解明に関する研究
3. 学会等名 日本色素細胞学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 上田 亮太，大園 誠也，藤井 佑樹，高橋 宏隆，竹田 浩之，澤崎 達也，本川 智紀，徳永 研三，藤田 英明
2. 発表標題 膜結合型ユビキチンリガーゼRNF152によるメラニン産生調節機構に関する研究
3. 学会等名 日本薬学会九州支部大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 上田亮太、大園誠也、藤井佑樹、高橋宏隆、竹田浩之、澤崎達也、本川智紀、徳永研三、藤田英明
2. 発表標題 膜結合型ユビキチンリガーゼRNF152はチロシナーゼのユビキチン化を介して色素調節を行う
3. 学会等名 日本生化学会
4. 発表年 2023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	上田 亮太 (Ueda Ryota) (10881906)	長崎国際大学・薬学部・助手 (37303)	
研究分担者	藤井 佑樹 (Fujii Yuki) (80610063)	長崎国際大学・薬学部・准教授 (37303)	

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