

【目的】 悪性黒色腫は悪性腫瘍の中でも特に悪性度が高い腫瘍として知られている。我々は末端黒子型悪性黒色腫のゲノム異常解析より予後と強く相関する遺伝子として *NUAK2* をすでに特定している。さらに *in vitro* および *in vivo* の解析より悪性黒色腫の細胞増殖および細胞遊走に強く関わっていることを示している。しかしながら *NUAK2* をターゲットとした新規治療法は未だに開発途上である。本研究計画では、*NUAK2* をターゲットとした新規治療法の開発を進めるための研究基盤を確立するため *NUAK2* の詳細な細胞増殖制御機構を解明し、*NUAK2* の機能を抑制可能な薬剤の特定および解析のモデルとなるトランスジェニックマウスの作出と解析を進めていく。

【方法】 本研究では、レンチウイルスベクターである pLKO.1 に *NUAK2* に対する shRNA を挿入した 2 種類のベクターを *NUAK2* のノックダウンに使用。*NUAK2* のノックダウン後に悪性黒色腫細胞より RNA を抽出しマイクロアレイ解析とした。マイクロアレイは SurePrint G3 Human GE 8×60K ver3.0 を使用。

【結果】 1. *NUAK2* に制御される mTOR 関連遺伝子の検討：マイクロアレイを用いて網羅的遺伝子解析を施行し *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 SM2-1 細胞を使用してエンリッチメント解析 (Gene Set Enrichment Analysis : GESA 解析) を施行し統計学的有意差 ($P \leq 0.05$) を示した mTOR 経路を含めた 12 の経路を特定 (図)。さらに mTOR 経路の下流に位置する遺伝子 (S6K および S6) の発現およびそのリン酸化につき検討。*NUAK2* のノックダウンにて S6K のリン酸化の抑制が見られた (図)。また PI3K 経路を Ly294002 にて抑制し mTOR 経路にどのような作用があるのかも検討。Ly294002 で処理した SM2-1 細胞は S6K の発現が減少 (図)。これらの結果より、*NUAK2* と PI3K は双方ともに mTOR 経路を制御するもののその制御作用は異なることが判明した。2. *NUAK2* をより特異的に阻害できる薬剤の検討：*NUAK2* を阻害する薬剤として糖尿病薬でもあるメトホルミンにつき、その悪性黒色腫細胞数の抑制作用を検討しメトホルミン処理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を作製した。

mTOR 経路のエンリッチメント解析の結果および mTOR 経路下流の遺伝子変動

