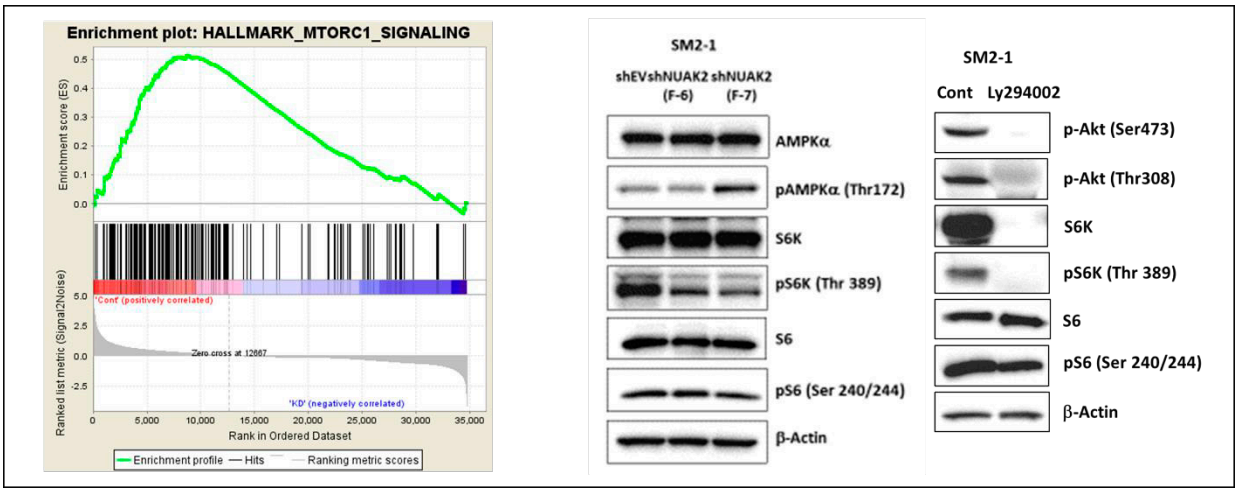
68　NUAK2を標的とした悪性黒色腫の新規治療法の開発	並木　剛

【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≦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合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



68. NUAK2 を標的とした悪性黒色腫の新規治療法の開発

並木　剛

東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 皮膚科学分野

Key words：悪性黒色腫，分子標的治療，NUAK2，阻害剤，PTEN

緒　言

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。近年は免疫チェックポイント阻害剤の開発などもあり治癒率の向上が見られるものの免疫チェックポイント阻害剤の 1 つとして代表的なニボルマブ単剤での奏効率が 40%前後でしかないなど依然として治療抵抗性の悪性黒色腫が大部分を占めており、その新規治療法の開発は急務となっている［1］。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［2〜4］。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［5］。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および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

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: AAACCCAGGGCTGCCTTGGAAAAG および AAB66-F-7: AAACCCAGGGCTGCCTTGGAAAAG）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≧7.0 の場合にマイクロアレイ解析とした。100 ng の RNA をラベルとし、ラベルした 600 ng の cRNA を DNA Microarray Hybiridizaiton Oven 内にてマイクロアレイ（SurePrint G3 Human GE 8×60K ver3.0）に 17 時間のハイブイ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［3，6］。抗体は NUAK2 に対するモノクローナル抗体を使用した［7］。

結果および考察

1. NUAK2 に制御される mTOR 関連遺伝子の検討。

マイクロアレイ（SurePrint G3 Human GE 8×60K ver3.0）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（shNUAK2 F-6 および

shNUAK2 F-7）および empty vector を導入したコントロールの SM2-1 細胞（shEV）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。統計学的有意差（P≦0.05）を示した 12 の経路を特定できた（図 1）。これらの経路は細胞周期制御や細胞増殖および細胞内代謝に関わる経路を主体としており、互いに関連する経路でもある。さらに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 経路から E2F の標的となる遺伝子のセットであり、NUAK2 の mTOR 経路から細胞増殖の制御に関与する機能を示唆する結果とも言える（図 2）。

Gene sets enriched in shEV

Rank	Name	NES	P-val	FDR q-val
1	HALLMARK_OXIDAITVE_PHOSPHORYLATION	2.47	0.000	0.000
2	HALLMARK_MTORC1_SIGNALING	2.04	0.000	0.000
3	HALLMARK_UNFOLDED_PROTIEN_RESPONSE	1.87	0.000	0.000
4	HALLMARK_E2F_TARGETS	1.75	0.000	0.003
5	HALLMARK_DNA_REPAIR	1.74	0.000	0.003
6	HALLMARK_FATTY_ACID_METABOLISM	1.67	0.000	0.007
7	HALLMARK_ANDROGEN_RESPONSE	1.66	0.002	0.006
8	HALLMARK_G2M_CHECKPOINT	1.60	0.000	0.012
9	HALLMARK_ADIPOGENESIS	1.47	0.005	0.038
10	HALLMARK_REACTIVE_OXIGEN_SPECIES_PATHWAY	1.47	0.034	0.036
11	HALLMARK_PEROXISOME	1.36	0.043	0.088
12	HALLMARK_PI3K_AKT_MTOR_SIGNALING	1.33	0.050	0.109
13	HALLMARK_SPERMATOGENESIS	1.31	0.056	0.121
14	HALLMARK_BILE_ACID_METABOLISM	1.29	0.064	0.126

図 1. エンリッチメント解析（GSEA 解析）結果
NUAK2 をノックダウンした SM2-1 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。強い有意差を示したシグナル伝達路のうち上位 14 の経路を図に示した。mTOR を含め細胞周期制御・細胞増殖および脂肪内代謝に関わる経路に有意差を示している。

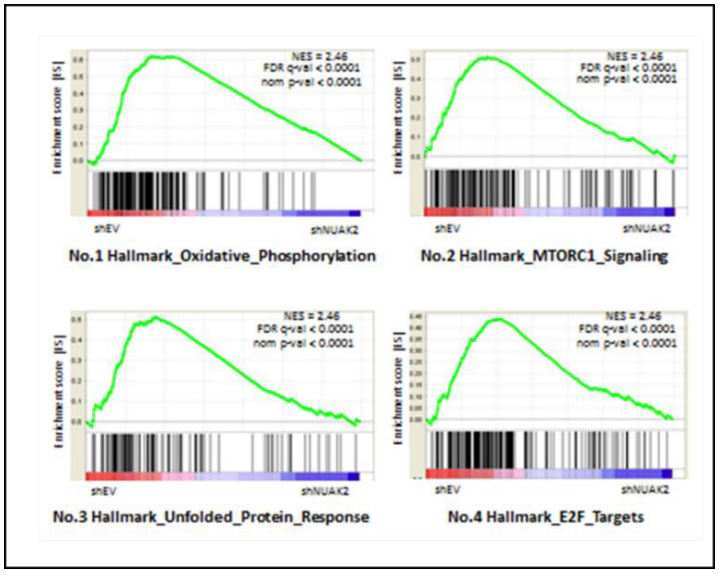


図 2. 各シグナル伝達路別のエンリッチメント解析（GESA 解析）の結果
強い有意差を示す上位 4 つのシグナル伝達路の解析結果を図に示した。

NUAK2 の mTOR 経路に対する制御をさらに検討するため mTOR 経路の下流に位置する遺伝子の検討を行った。S6K および S6 の発現およびそのリン酸化（S6K は Thr389 でのリン酸化を、S6 は Ser240/244 でのリン酸化）を検討とした。NUAK2 をノックダウン（shNUAK2 F-6 および shNUAK2 F-7）することでコントロール（shEV）と比較し S6K のリン酸化（pS6K Thr389）の抑制が見られたが、S6 のリン酸化（pS6 Ser240/244）については著明な変動は見られなかった（図 3）。これらの結果より 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。さらに悪性黒色腫細胞では NUAK2 に加えて PTEN の欠失が明らかとなっているため、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を検討とした。Ly294002 で処理した SM2-1 細胞はコントロールと比較して S6K の発現が減少しており、当然のことながら pS6K Thr389 の発現も減少していた。このことから PI3K 経路の抑制でも mTOR 経路が抑制されうるものの、この抑制は NUAK2 による抑制とは異なり S6K の発現レベルでの制御であることが明らかとなった。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。

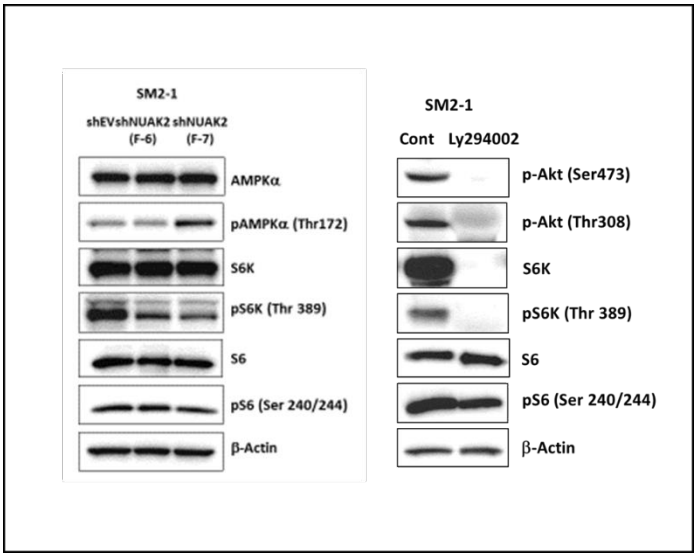


図 3. NUAK2 のノックダウンおよび PI3K 経路の抑制による mTOR 経路下流の遺伝子変動
NUAK2 をノックダウンした SM2-1 細胞（shNUAK2）とコントロール（shEV）および
Ly294002 処理での PI3K 経路抑制による、S6K および S6 のリン酸化の変動。

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ビグアナイド系薬剤がある。このうちで最も代表的なビグアナイド系薬剤でもあ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適切な濃度を決定するため 0 mM から 25 mM の濃度につき検討。最適濃度を 20 mM とし Day 0 から Day 4 にてメトホルミン処理による悪性黒色腫細胞数の検討を行った。Day 2 から Day4 にかけて悪性黒色腫細胞数は著明に減少しており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（図 4）。これらの結果より、メトホルミンは悪性黒色腫細胞を抑制する薬剤の一つとして候補になりえると考えた。

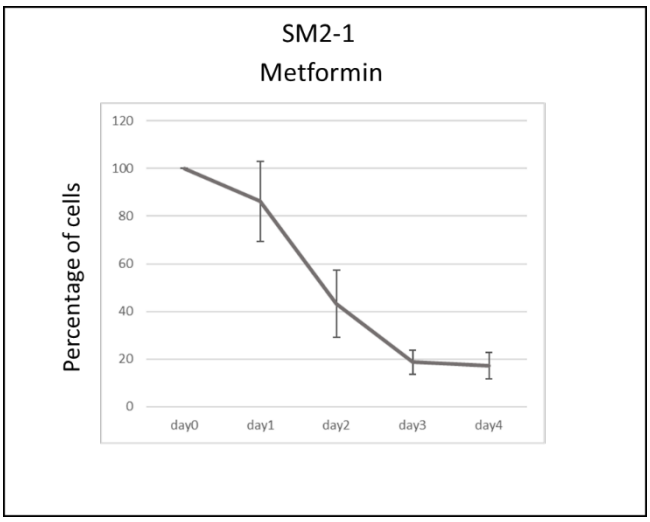


図 4. メトホルミンによる悪性黒色腫細胞の抑制
メトホルミンの処理（20 mM）により経時的に細胞数が減少する。

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合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 5）。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。

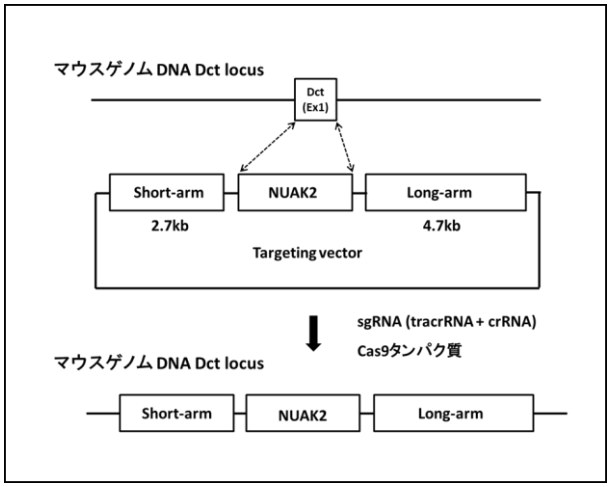


図 5. CRISPR/Cas9 を用いた Dct-NUAK2 KI マウス
Targeting vector の構成とマウスゲノムの関係を図示。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、東京医科歯科大学大学院難治疾患研究所幹細胞遺伝学分野の西村栄美先生および松村寛行先生、国際医療福祉大学大学院免疫学の河上裕先生および京都大学大学院医学研究科免疫ゲノム医学の谷口智憲先生である。

文　献

1) Robert C, Long GV, Brady B, Dutriaux C, Maio M, Mortier L, Hassel JC, Rutkowski P, McNeil C, Kalinka-Warzocha E, Savage KJ, Hernberg MM, Lebbe C, Charles J, Mihalcioiu C, Chiarion-Sileni V, Mauch C, Cognetti F, Arance A, Schmidt H, Schadendorf D, Gogas H, Lundgren-Eriksson L, Horak C, Sharkey B, Waxman IM, Atkinson V, Ascierto PA. N Engl J Med. 2015 Jan 22; 372(4):320-330. PMID: 25399552 DOI: 10.1056/NEJMoa1412082

2) Namiki T, Yanagawa S, Izumo T, Ishikawa M, Tachibana M, Kawakami Y, Yokozeki H, Nishioka K, Kaneko Y. Genomic alterations in primary cutaneous melanomas detected by comparative genomic hybridization with laser capture or manual microdissection: 6p gain may predict poor outcome. Cancer Genet Cytogenet. 2005 Feb; 157(1):1-11. PMID: 15676140 DOI: 10.1016/j.cancergencyto.2004.06.004

3) Namiki T, Tanemura A, Valencia JC, Coelho SG, Passeron T, Kawaguchi M, Vieira WD, Ishikawa M, Nishijima W, Izumo M, 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. 2011 Apr 19; 108(16):6597-6602. PMID: 21460252 DOI: 10.1073/pnas.1007694108

4) Namiki T, Coelho SG, Hearing VJ. NUAK2: an emerging acral melanoma oncogene. Oncotarget. 2011 Sep; 2(9):695-704. PMID: 21911917 DOI: 10.18632/oncotarget.325

5) 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 1; 75(13):2708-2715. PMID: 25832654 DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-13-3209

6) 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. 2004 Feb 27; 279(9):7971-7981. PMID: 14634018 DOI: 10.1074/jbc.M309714200

7) 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. 2020 Feb; 97(2):143-151. PMID: 32001115 DOI: 10.1016/j.jdermsci.2020.01.008