

機関番号：24601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20591325

研究課題名（和文）

悪性黒色腫の転移におけるコネキシン 26 の役割の研究と転移阻害薬の開発

研究課題名（英文）

Study of the role of connexin 26 in metastasis of malignant melanoma and development of metastasis inhibitor

研究代表者

浅田 秀夫 (ASADA HIDEO)

奈良県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：60252681

研究成果の概要（和文）：悪性黒色腫は早期に転移をきたす予後不良の腫瘍である。これまでにわれわれは悪性黒色腫の転移においてコネキシン 26 (Cx26) が重要な役割を担っていることを見いだした。本研究では悪性黒色腫の転移を抑制する分子標的治療薬の開発を目指して、Cx26 分子の細胞外ドメインに対する抗体の作製を試み、マウス悪性黒色腫転移モデルを用いて、この抗体の転移阻止効果を調べた。その結果、作製した抗体は不完全ではあるが悪性黒色腫の転移抑制作用を示した。

研究成果の概要（英文）：Malignant melanoma is a tumor of the poor prognosis in which the metastasis is caused at the early stage. We previously found that connexin 26 (Cx26) took an important role in the metastasis of malignant melanoma. I aimed at the development of a molecular target medicine controlling the metastasis of malignant melanoma in this study, and tried making the antibodies for the extracellular domains of the Cx26 molecule, and examined the metastasis controlling effect of the antibodies using a malignant melanoma metastasis mouse model. As a result, the antibodies showed metastasis control action although it was not strong.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
20 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
21 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
22 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：皮膚科学

キーワード：悪性黒色腫、コネキシン 26、ギャップ結合、転移

1. 研究開始当初の背景

(1) 悪性黒色腫は早期にリンパ行性・血行性に身体の各所に転移をきたすことから、皮膚癌のうちでも、最も予後不良の悪性腫瘍のひとつとして知られている。しかし、この腫瘍の転移のメカニズムについては今なお不明な点が多い。

(2) コネキシン (Cx) はギャップ結合を構成する細胞膜タンパクファミリーであるが、このギャップ結合はイオンや低分子量タンパク質の細胞間での輸送に関わっており、細胞の増殖、分化に重要な役割を担っていることが知られている。しかし、悪性腫瘍におけるコネキシンの役割については腫瘍の増殖を抑制するという報告や、逆に増殖を促進させるという報告があり一定の見解は得られていない。

(3) 我々はマウス悪性黒色腫細胞 B16 を同一起源とする高転移性 BL6 株、低転移性 F10 株の遺伝子発現を比較し、Cx26 の発現が BL6 において増強していることを見出し、この遺伝子を F10 株に過剰発現させると、低転移型から高転移型に変化することを明らかにした (J Clin Invest 105, 1189-1197, 2000)。さらに、ヒト悪性黒色腫において、悪性黒色腫細胞のみならず、腫瘍近傍の内皮細胞においても Cx26 の発現が誘導されることをみだし、さらに培養細胞を用いて、悪性黒色腫細胞と内皮細胞とのギャップ結合を介する

コミュニケーションを明らかにした (Cancer 110, 1162-1172, 2007)。

2. 研究の目的

悪性黒色腫細胞と内皮細胞との間の Cx26 を介したギャップ結合形成が、悪性黒色腫の転移の鍵を握っていると考えられることから、Cx26 分子を標的としてその働きを阻害し、悪性黒色腫の転移を阻止する治療薬の開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) Cx26 に対する抗体の作製

① Cx26 特異抗原の選定と合成：マウス Cx26 のアミノ酸配列から細胞外ドメインと予測される部位を 2 か所選定し、各々の部位について、抗原として最適と思われるペプチド配列を決定し合成した。

② 合成ペプチドに対する精製抗体の作製：合成したペプチドにキャリアー蛋白として KLH を結合させ、これらを抗原としてウサギを免役し、採取した抗血清から各ペプチドに対するアフィニティ精製抗体を得た。

③ 抗 Cx26 精製抗体の抗体価測定：Cx26 ペプチド抗原を 96 穴プレートに固相化した ELISA プレートを用いて、作製した精製抗体の抗体価を測定した。

(2) 抗 Cx26 抗体による悪性黒色腫の転移阻止実験

① 悪性黒色腫の自然転移モデルの作製：高転移型悪性黒色腫細胞株 BL6 を C57/BL6 マウスならびにヌードマウスの footpad に皮下注射し (2×10^5 細胞/マウス)、約 2 週間後に局所で増殖した腫瘍は切除し、その後 4 週目に悪性黒色腫の肺への転移をコロニー数のカウントにより評価した。

② 抗 Cx26 抗体による転移阻止実験：上述の悪性黒色腫の自然転移モデルを用いて、このマウスに今回作製した抗 Cx26 抗体を、様々なタイミングで尾静脈から静注あるいは腹腔内注射し (100ug/マウス)、悪性黒色腫細胞の肺への転移を経時的に評価し、抗体による悪性黒色腫転移阻止効果を検討した。

4. 研究成果

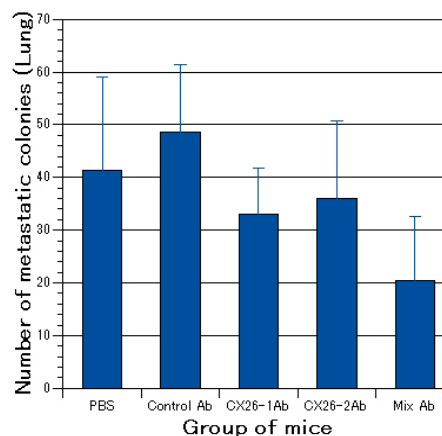
(1) マウス Cx26 細胞外ドメインに対するアフィニティ精製抗体の作製と抗体力価の検定

2 種類のペプチド (CX26-1:12AA、CX26-2:13AA) の各々でウサギを複数回免疫して得た血清からアフィニティ精製にて抗体を精製し、この抗体の力価を ELISA 法にて検定した結果、抗 CX26-1 抗体、抗 CX26-2 抗体はともに、64,000 倍以上の抗体価を有していた。

(2) 抗 Cx26 抗体の悪性黒色腫細胞転移抑制活性

BL6 をマウスの足底に移植し、肺転移した悪性黒色腫のコロニー数を、抗 Cx26 抗体投与群と、コントロール群で比較したところ、

移植前から抗体投与を開始し、その後も毎週 1 回投与した場合、悪性黒色腫の肺への転移が、コントロール群よりも減少する傾向がみられた。特に抗 Cx26-1 抗体、抗 Cx26-2 抗体の両者を同時に投与することにより腫瘍転移抑制効果が増強する傾向が見られたことから、両者が腫瘍の転移阻止に協動的に働いている可能性が示唆された (図)。但し、現在のところ抗 Cx26 抗体投与群とコントロール群との間に統計学的な有意差は得られていないため、今後 Cx26 の他のエピトープについても抗体を作製し、より効率的に転移を阻害する抗体のスクリーニングを進めてゆきたい。



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

① Noda T, Takahashi A, Kondo N, Mori E, Okamoto N, Nakagawa Y, Ohnishi K, Zdzenicka MZ, Thompson LH, Helleday T, Asada H, Ohnishi T: Repair pathways independent of the Fanconi anemia nuclear

core complex play a predominant role in mitigating formaldehyde-induced DNA damage. *Biochem Biophys Res Commun*, 有査読, 404, 206-10, 2011

② 森戸啓統、泉敦子、井本恭子、福本隆也、小林信彦、浅田秀夫、宮川幸子、浅川勇雄、榎本美生、多田英之：下肢の生じた Stewart-Treves 症候群の 1 例 *皮膚臨床* 51, 1065-8, 2009

[学会発表] (計 5 件)

① Fukumoto T, Daikoku N, Kuwahara T, Kobayasi N, Asada H: Pigmented lesion on the right sole, nodular melanoma with massive regression. *Professor Mihm's Dermatopathology (Tokyo)* 2010

② 大黒奈津子、伊東由美子、長谷川文子、飯岡弘至、福本隆也、浅田秀夫：青色母斑や pigmented epithelioid melanocytoma との鑑別が問題となった melanoma の 1 例、第 74 回日本皮膚科学会東部支部学術大会（宮城）2010

③ 飯岡弘至、長山功佑、小川浩平、九鬼千夏、真名子英理、野田太一、桑原理充、福本隆也、浅田秀夫：腹部皮下に発生した悪性末梢神経腫瘍の 1 例、第 26 回日本皮膚悪性腫瘍学会学術大会（東京）2010

④ 福本隆也、小川浩平、中野さち子、森戸啓統、北村華奈、浅田秀夫：大腿部の褐色結節、第 60 回日本皮膚科学会中部支部学術大会（京都）2009

⑤ 福本隆也、白山純実、真柴久美、桑原理充、岡崎愛子、浅田秀夫：大腿部の黒褐色腫

瘍、第 59 回日本皮膚科学会中部支部学術大会（名古屋）2008

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他] なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浅田 秀夫 (ASADA HIDEO)

奈良県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：60252681

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

伊藤 彰彦 (ITO AKIHIKO)

近畿大学・医学部・教授

研究者番号：80273647