

機関番号：20101

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20790808

研究課題名 (和文)

悪性黒色腫個別化治療を目指した薬剤感受性と遺伝子異常の関連解析

研究課題名 (英文)

Analysis of the drug sensitivity and the genetic alteration of melanoma

研究代表者

肥田 時征 (TOKIMASA HIDA)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：90464487

研究成果の概要 (和文)：本研究は悪性黒色腫の個別化治療を目指して、悪性黒色腫、特に日本人に多い末端黒子型悪性黒色腫の手術検体からの細胞培養法を確立する目的のもとに行われた。結果、同意の得られた19人の患者から手術検体を得、このうち14の検体から細胞培養を行い、3系統の悪性黒色腫細胞の培養に成功した。同時に採取した組織からDNA、RNAの抽出・解析を行い、*N-ras*、*BRAF*、*c-kit*の遺伝子変異を解析したが、末端黒子型悪性黒色腫にこれらの変異は認められなかった。手術検体から細胞培養、遺伝子解析を同時に行う本システムが確立されたことにより、今後症例を蓄積することによって腫瘍の薬剤感受性と遺伝子変異との関連が明らかになることが期待される。

研究成果の概要 (英文)：The purpose of this study was to establish a primary culture system of melanoma cells which derived from surgical samples of melanoma tissues, mainly from primary acral lentiginous melanoma. As a result, we obtained surgical samples from 19 patients, from which three lines of melanoma culture were obtained. Fresh frozen tissue samples were also collected from the same patients to examine melanoma-related genes and their expression. Hot spot mutations were not detected in *N-ras*, *BRAF* or *c-kit*. This system will allow us to examine the correlation between the behavior of melanoma cells, especially of their drug resistance, and their genetic profile, and to choose effective chemotherapeutic drugs for individual melanoma patients.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	700,000	210,000	910,000
2009年度	600,000	180,000	780,000
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学、皮膚科学

キーワード：癌

## 1. 研究開始当初の背景

悪性黒色腫は皮膚悪性腫瘍の中でも悪性度が高く、治療抵抗性の腫瘍である。近年の診

断技術の向上は早期診断による完全切除の可能性に大きく寄与しており、また、センチネルリンパ節生検の普及は所属リンパ節予防的郭清術適応症例の的確な選別に貢献し

ている。しかしながら、ひとたび所属リンパ節や多臓器へ転移をおこした症例においてはその後には非常に悪い。進行例に対する治療成績はここ 20 年間大きな進歩がなく、これは悪性黒色腫が全身化学療法に対して強い抵抗性を持つこと、および同一体内での腫瘍細胞の不均一性が原因であると考えられている。海外および本邦で広く使用されている化学療法剤、ダカルバジンの単剤奏効率は 20%以下、完全寛解率は 5%以下と限定的であり、他剤と併用したレジメンでもごく一部の病期の患者群で若干の奏効率の改善が得られるのみである。その他多数の化学療法剤が試みられてきたが、ダカルバジンを凌駕するエビデンスが示された薬剤がないのが現状である。しかし、実際の臨床の場合においては、化学療法に良好に反応する症例を経験することが少なからずあり、症例間において薬剤感受性に差があるものと思われる。

近年、悪性黒色腫の原因となる異常遺伝子、**melanoma susceptibility gene** の解析が進んでおり、さまざまな遺伝子異常が明らかにされてきた。欧米で頻度が高い亜型である表在拡大型悪性黒色腫においては、**NRAS**、**BRAF** などの **MAPK** 経路の遺伝子異常が多く見つかっているのに対し、本邦で最多の亜型である末端黒子型悪性黒色腫においては **cyclin D1**、**CDK4**、などのシグナル伝達経路やテロメラーゼ触媒サブユニットである **hTERT** の発現異常が高率に報告されている。これらの遺伝子発現の違いが化学療法剤の治療反応性や予後にどのような影響を及ぼしているかについては詳細に検討されていない。癌細胞の増殖・生存に関与する特異的分子を標的とした薬剤が次々に開発されていく中で、癌遺伝子変異および発現プロファイルと化学療法剤感受性との関連を調べ、その機序を解明することは、症例毎の腫瘍細胞の性質に応じたテーターメイド治療の実現に極めて重要である。

## 2. 研究の目的

悪性黒色腫原発巣および転移巣の手術切除組織から初代培養及び株化細胞の確立を行い、各種抗腫瘍薬に対する感受性を検討する。細胞培養と並行して新鮮組織から mRNA の抽出・保存を行い、悪性黒色腫で異常が報告されている遺伝子群の変異解析及び発現解析を行う。これらを細胞培養から得られた薬剤感受性データと比較照合することにより、薬剤感受性と遺伝子発現プロファイルとの関連を調べる。具体的には、悪性黒色腫細胞の培養法を確立し、それ以降は臨床サンプル数を増やして多角的な解析を行う。さらに、保存したサンプルを用いて cDNA マイクロアレイ解析を行い、薬剤感受性と相関して発

現変化する新規の遺伝子群を検索する。同一患者内の原発巣、転移巣の腫瘍細胞における薬剤感受性の空間・時間的差異を検討することによって、悪性黒色腫細胞の転移プロセスおよび化学療法抵抗性を理解するための貴重な知見が得られることが期待される

## 3. 研究の方法

1) 悪性黒色腫細胞培養法の確立：原発巣、転移巣の手術切除組織から初代培養、及び培養細胞株の確立を行う。末端黒子型悪性黒色腫原発巣からの腫瘍細胞株化は最近一例報告されたのみである。近年明らかになった Endothelin、Stem Cell Factor などの色素細胞増殖因子や Feeder cell などを用い、可能な限り生理的条件に近い培地条件で培養を試みる。この方法が確立するまでは、色素細胞の株化に頻用される Phorbol ester、Cholera Toxin を用いた細胞不死化を行う。

2) 薬剤感受性検査：1) で得られた初代培養細胞、株化細胞を用いて各種化学療法剤に対する感受性試験を行う。

3) 悪性黒色腫関連癌遺伝子・癌抑制遺伝子の変異解析・発現解析：悪性黒色腫の癌化・細胞増殖に関与しているといわれる遺伝子の変異および発現変化を調べる。細胞培養に使用した同一検体から mRNA を抽出し、cDNA



を作製する。

4) 症例が蓄積した段階で薬剤感受性検査の結果と変異遺伝子解析結果を照合してその関連を探る。

## 4. 研究成果

### 1) 臨床検体の収集

全研究期間を通して、19 人の悪性黒色腫から 19 個の手術切除検体を採取した。うち原発巣から採取したものは 14 個、転移巣から採取したものは 5 個であった。原発巣 14 個のうち、10 個は病理組織学的に末端黒子型悪性黒色腫 (図 1)、2 個は悪性黒子型悪性黒色

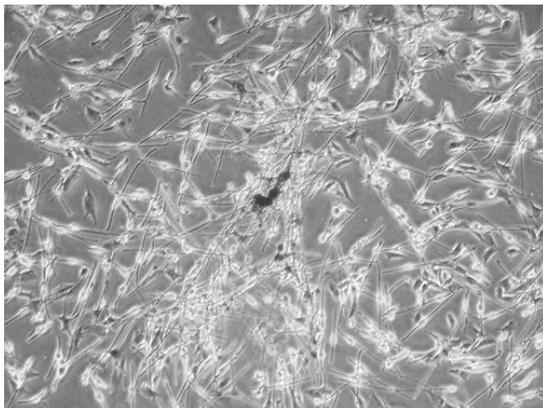
腫、1 個は表在拡大型悪性黒色腫、1 個は結節型悪性黒色腫であった。いずれも札幌医科大学臨床研究審査委員会の許可を得、ヒトゲノム・遺伝子解析研究許可を得、患者に説明し同意を得た上で検体採取を行った。

図 1 末端黒子型悪性黒色腫の 1 例。手術切除組織の色素斑辺縁部から検体を採取。

## 2) メラノーマ細胞の培養

得られた手術検体のうち 14 個から細胞培養を行った。新鮮切除組織を細胞培養液に保管し、術当日中に培養を開始した。症例毎にプロトコルを変えながら、培養条件の最適化を行った。最終的な方法としては、切除組織を 37°C で 1~1.5 時間トリプシン処理して表皮と真皮を分離し、それぞれを細切してあらかじめ播種しておいた feeder cell 上に蒔いた。数日で表皮角化細胞は脱落し、メラノーマ細胞、線維芽細胞が feeder cell とともに培養皿上に残存した。

メラノーマ細胞は二極性~三極性の胞体の少ない細胞と、分化した異型核をもつ細胞、の 2 種類がみられた。多くはメラニン色素を



含有しており、顕微鏡透過像、位相差像で確認することができた (図 2) が、色素を有しない細胞については DOPA 染色を行うことによってチロシナーゼの存在を証明することができた。表皮角化細胞が残存することはなかったが、線維芽細胞のコンタミネーションを完全に抑えることはできなかった。これを避けるためには、トリプシン処理によって表皮成分を真皮から完全に剥離することが重要と考えられた。また、コンタミネーションした線維芽細胞を除去する方法として、培養液への G418 添加を行ったが、メラノーマ細胞と線維芽細胞を十分に分離することはできなかった。培養を試みた検体のうち 5 系統からは継代培養が可能であったが、そのうち 2 系統は細菌のコンタミネーションにより失

われ、3 系統が残存した。今後、これらの培養からメラノーマ細胞のクローニングを行い、株化細胞とする予定である (図 3)。

図 2 図 1 の症例の手術検体からの初代培養。メラニン色素を有する細胞がコロニーを形成している。(位相差顕微鏡像)

図 3 クローニング中のメラノーマ細胞。feeder cell が小数混入している。(位相差顕微鏡像)

## 3) 遺伝子解析

得られた検体のうち 15 症例から遺伝子解析用検体を採取できた。うち 1 例について *N-ras* 遺伝子変異 (Q61R)、*BRAF* 遺伝子変異 (V600E)、*c-kit* 遺伝子変異 (Y553N、V559A、N566D、L576P、R634W、K642E、D816H、A829P) を直接シーケンスにより解析した。結果いずれの変異も認められなかった。我々の先行研究では、10 例の悪性黒色腫手術切除検体から DNA、RNA を抽出し解析を行ったが、1 例の検体に *N-ras*、他の 1 例の検体に *BRAF* 変異がみられたのみであった。以上から、日本人に多い末端黒子型では *N-ras/BRAF* の遺伝子構造変化は稀である可能性が示唆された。*c-kit* 遺伝子の変異は検出されなかったが、増幅による活性化の報告がありさらなる検討が必要と考えられる。今後の研究課題として、残存している保存検体から遺伝子解析を行うとともに、パラフィン切片から可能な遺伝子解析についても検討する。

## 4) 研究のまとめと今後の展望

本研究において、末端黒子型悪性黒色腫の原発巣からの細胞培養法が確立された。現在まで末端黒子型悪性黒色腫からの培養細胞の株化の報告は 1 例のみであり、既出の方法と比べて特殊な設備を要しないことが利点となる。しかしながら、培養の成功率がまだ低いことから、培養手技の向上、均一化が必要である。また、純粋な細胞株とするためには、確実なクローニングが必要であり、検討すべき課題である。

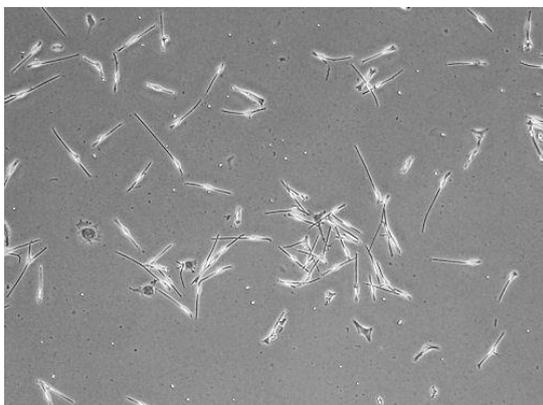
遺伝子解析の結果からは末端黒子型では *N-ras/BRAF* の遺伝子構造変化は稀である可能性が示唆されたが、今後さらに症例を集め解析する必要がある。採取したサンプルからは DNA、RNA の抽出を行っており、次期プロジェクトとして、悪性黒色腫細胞におけるエピジェネティックな変化の解析を行う予定である。

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5件)

- ① Hida T, Sohma H, Kokai Y, Kawakami A, Hirosaki K, Okura M, Tosa N, Yamashita T, Jimbow K: Rab7 is a critical mediator in vesicular transport of tyrosinase-related protein 1 in melanocytes. J Dermatol 38, 432-441, 2011. 査読有
- ② Hida T, Saga K, Kimura T: Cytokeratin expression patterns in multiple infundibulocystic basal cell carcinoma. J Cutan Pathol 38, 309-313, 2011. 査読有
- ③ Hida T, Wakamatsu K, Sviderskaya EV, Donkin AJ, Montoliu L, Lynn Lamoreux M, Yu B, Millhauser GL, Ito S, Barsh GS, Jimbow K, Bennett DC: Agouti protein, mahogunin, and attractin in pheomelanogenesis and melanoblast-like alteration of melanocytes: a cAMP-independent pathway. Pigment Cell Melanoma Res 22, 623-34, 2009. 査読有
- ④ Yamashita T, Yoneta A, Hida T: Macrophage inhibitory cytokine-1: a new player in melanoma development. J Invest Dermatol. 2009 Feb; 129(2): 262-4. 査読有
- ⑤ Kawakami A, Saga K, Ono I, Hida T, Jimbow K, Yamashita T: Spontaneous regression of bowenoid papulosis in a



patient with acquired immunodeficiency syndrome after an increase in peripheral CD4+ T lymphocytes. Int J Dermatol 48, 210-2,

2009. 査読有

[学会発表] (計1件)

- ① Yoneta A, Endo M, Mori S, Yanagisawa K, Hida T, Yamashita T: Efficacy and safety of 5% imiquimod cream for the treatment of skin cancers. The first eastern Asia Dermatology Congress, Fukuoka, Japan, Sep 30-Oct3, 2010

[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]

ホームページ等  
なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

肥田 時征 (HIDA TOKIMASA)  
札幌医科大学・医学部・助教  
研究者番号：90464487

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし