

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月15日現在

機関番号：31201

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21791090

研究課題名（和文）悪性黒色腫における PRAME の蛋白質の発現分子機構と免疫療法への応用

研究課題名（英文）Application to the molecular mechanism and immunotherapy of PRAME protein in a malignant melanoma.

研究代表者

櫻井 英一（SAKURAI EIICHI）

岩手医科大学・医学部・助教

研究者番号：30509013

研究成果の概要（和文）：

基礎研究の一部については雑誌論文に投稿を行い、既に受理・公表された。しかし、大震災の影響で標本・検体やデータの一部を喪失してしまい、当初の予定よりも研究は大幅に遅延している状態である。今後も検体の収集ならびに免疫療法開発に向けての基礎実験を展開していくことにしている。

研究成果の概要（英文）：

About a part of basic research was already accepted to the journal article and announced officially.

Unfortunately, it is in the state that some of specimens, samples and data were lost under the influence of a great earthquake. So research is sharply behind schedule.

We are going to continue to conduct the basic experiment for immune therapy development and collect samples.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	42,900,000

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：遺伝子、癌卵巣抗原、ゲノム、miRNA、PRAME

1. 研究開始当初の背景

早期に浸潤・転移をきたし、化学・放射線療法の奏効率の低い悪性黒色腫において、免疫療法は他の治療との合併療法の開発において重要なツールとして認知されている。が

ん免疫療法は、第一世代の BRM 療法から、第二世代のサイトカイン療法、第三世代の非特異的免疫細胞療法を経て、第四世代の樹状細胞やがんワクチンによる「がん標的免疫療法」の開発の段階に入っている。

現在、悪性黒色腫において開発の進んでいる免疫療法の癌抗原は、MART-1、チロシナーゼ、MAGE などがある。なかでも MAGE は cancer-testis antigen と呼ばれ、癌組織でのみ発現し、他の体細胞組織で発現が認められない抗原であることから格好の免疫療法の標的分子となっている。PRAME 遺伝子は、Ikeda らによって単離され、MAGE と同様の cancer-testis antigen であることが報告された。その後、急性白血病では免疫療法の標的分子として研究が進んでいたが、意外にも悪性黒色腫では注目度が低く、数報を見るのみである。

申請者は、大学院の研究期間内に「悪性黒色腫における PRAME 遺伝子発現の epigenetic な制御機構の解明」をテーマとして研究を展開し、以下の研究成果を得た。

- 1) 正常メラノサイトでは PRAME 遺伝子のプロモーター領域は DNA メチル化が高頻度に生じているが、約半数の悪性黒色腫培養細胞株においてプロモーター領域の脱メチル化が生じ、mRNA の発現と相関していた (研究業績 1)。
- 2) 全ての悪性黒色腫培養細胞株では PRAME mRNA を過剰発現しているものの、その内の 3 割では PRAME 蛋白質の発現は減弱していた。

このことは、悪性黒色腫における PRAME 蛋白質の発現には転写制御だけでは説明のつかない、post-transcriptional な発現抑制が関与している可能性を示唆するものであった。

そこで、申請者は以下の仮説をたて研究展開を企っている。

「悪性黒色腫の PRAME 蛋白質の発現は、DNA メチル化の解除によって mRNA の転写は更新

するものの、その翻訳抑制には post-transcriptional な発現抑制機構として、microRNA(miRNA) が関与している。」

miRNA は、18-25 塩基ほどの non-coding RNA であり、mRNA の 3' 非翻訳領域に結合し蛋白質の翻訳抑制を行う分子である。これまでの解析結果で以下の自験データを得た。

- ヒトの悪性黒色腫細胞 (7 株) と正常表皮メラニン細胞 (3 株) において PRAME 遺伝子を標的とした miRNA を解析し、悪性黒色腫における miR-211 と PRAME タンパク質の間に有意の逆相関をみた (図 1)。
- ヒト悪性黒色腫細胞 (G-361) および transfection 効率の高い HEK293 細胞に miR-211 を導入し、PRAME protein の抑制を確認した (図 2a-b)。

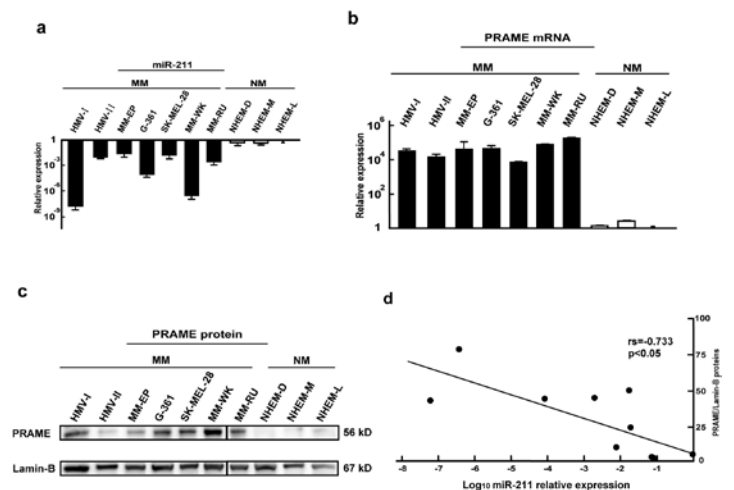


図 1 miR-211 と PRAME mRNA/protein の発現

- a. miR-211 は正常メラノサイトに比較して悪性黒色腫で有意に発現低下していた。
- b. PRAME mRNA の発現は悪性黒色腫ではすべての培養細胞株で上昇していたが、その蛋白質発現とは必ずしも一致しなかった (c)。PRAME 蛋白質と miR-211 の発現は、逆相関を示して

いた(d)。

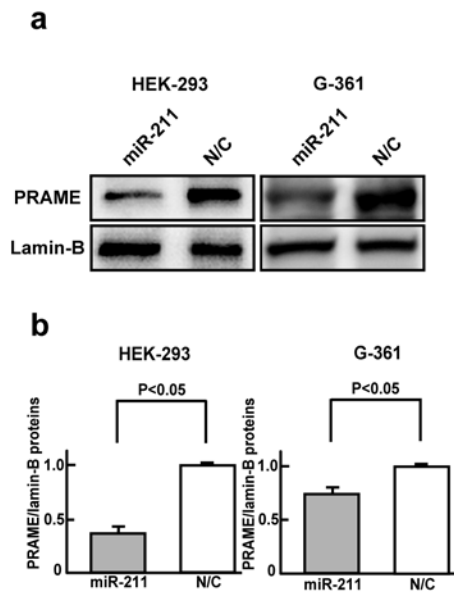


図2
miR-211のinductionによるPRAME蛋白の発現抑制
miR-211導入によるPRAME蛋白質の発現変化。N/C(コントロールmiRNAに比較して有意の発現低下が認められる)。図には示していないが、reporter assayにより、PRAME 3' -UTRへのmiR-211の直接結合を確認している。

PRAMEは、悪性黒色腫を始め、多くの悪性腫瘍において異常発現が報告されている。近年、PRAMEがレチノイン酸-レチノイン酸受容体系のモジュレーターとして作用し、細胞の正常な分化・アポトーシスを阻害する、「いわゆる癌遺伝子」であることが報告された(Epping MT et al, 2005 cell)。PRAME遺伝子が治療の標的になりえることはすでに報告されており(Epping MT et al, 2006 cancer Res)、PRAMEを標的とする免疫療法も試みられつつある(Li L et al, 2006 Int J Oncol)。

2. 研究の目的

悪性黒色腫における新たな免疫療法の標的抗原 preferentially expressed

antigen of melanoma (PRAME)について、

1. PRAME 遺伝子のエピジェネティックな発現機構の解析
2. ヒト PRAME 蛋白に対する特異度の高い抗体の作製
3. がんワクチン療法の開発に向けた基礎研究

を行い、cancer-testis antigen である PRAME 蛋白を標的とした免疫・抗体療法についての基礎研究を展開する。

3. 研究の方法

当該研究課題では、上記の問題をふまえて以下のステップに従って研究を展開したい。

Step 1: 腫瘍原発巣・転移巣における DNA メチル化と miR-211 の解析
(平成 21 年度終了予定)

Step 2: PRAME 特異的モノクローナル抗体の作製による、悪性黒色腫原発巣の PRAME 蛋白質の発現解析ならびに PRAME 蛋白を標的とした抗体療法の可能性の検討
(平成 21-22 年度)

Step 3: PRAME 蛋白を標的としたがんワクチン療法開発への基礎的検討
(平成 22-23 年度)

●平成 21 年度

●STEP1→悪性黒色腫切除検体における PRAME プロモーター領域ならびに miR-211 の発現解析

● 検体: 1997~2006 年までに岩手医科大学皮膚科学講座で切除し、予後調査および遺伝子解析の許可のとれた悪性黒色腫 49 例。

● 中性ホルマリン固定、パラフィン包埋剤より DNA/RNA を抽出する。ABI 社製の RecoverAll™ Total Nucleic

Acid Isolation Kit for FFPEおよびTaKaRa DEXPAT®を使用する。

- DNA のメチル化解析は DNA Modification Kit, Methylamp (Epigenetek 社) を使用し、bisulfite genome sequence 法で 10 個のコロニーを解析する (研究業績 1)。
 - miR-211 の定量: Taqman microRNA Assay ABI および PRISM 7500 用いて解析し、 $\Delta\Delta CT$ 法による定量を行う。
 - DNA/miRNA の解析結果は、PRAME mRNA の定量結果と比較する。
- STEP2→PRAME 特異的モノクローナル抗体の作製
- モノクローナル・ポリクローナルの作製はすべて外注とする (ベックス社)。大腸菌発現系による N-末、C-末の抗体をそれぞれ 2 種類ずつ作製する。ベックス社では成功報酬方式での受託を今年度より開始し、モノクローナル抗体で 70 万円、ポリクローナル抗体で 30 万円と安価な価格で確実な抗体の作製が可能である。ペプチドおよび GST-fusion 蛋白はすでに準備してある。
 - 予後の確認ができてい、悪性黒色腫 49 例について Ventana 社製の自動染色機を使用し免疫染色を試行する。
 - 免疫染色にあたっては、腫瘍細胞周囲の単核球についてリンパ球の表面マーカーの染色を行い、CTL 担当細胞の集簇の程度を評価する。
 - PRAME 蛋白の発現と臨床病理学的事項との相関を検討する。
- STEP3→22 年以降の免疫療法開発 (step 3)

に向けての基礎実験の準備。

●平成 22 年度

●STEP1→悪性黒色腫切除検体における PRAME プロモーター領域ならびに miR-211 の発現解析

●STEP2→PRAME 特異的モノクローナル抗体の作製

● 作製した抗体を用いて引き続き解析を行う。

● PRAME 蛋白質は、レチノイン酸レセプター (RAR-RXR) シグナルを抑制的に制御しているとの報告があり、その下流の p21 あるいは S-100 蛋白質との発現についても免疫組織学的に評価する。何らかの相関が窺えるようであればさらに分子生物学的解析も追加する。

● PRAME 抗体を用いて、RA 刺激によるレチノイン酸レセプター (RAR-RXR) シグナルへの影響を検討する。レチノイン酸は腫瘍細胞を p21 などの分子を介して cell cycle arrest に導くことが報告されているが、PRAME はこれに抑制的に働くと考えられている。我々は、レチノイン酸と PRAME 抗体の combination therapy が悪性黒色腫の治療に有効ではないかと考えている。

●STEP3→平成 22 年以降の免疫療法開発 (step 3) に向けての基礎実験の準備。

● Quintarelli C et al (2008, Blood) に準じて HLA-A*02 拘束性のプラムペプチドを合成する。

● 悪性黒色腫 (n=10) および健常人の末梢血 (n=10) から分離採取した単核球分画について、Quintarelli らの方法に

準じて刺激培養を行い、培養上清のサイトカイン濃度、ELISPOT法で評価する。

- 刺激培養したリンパ球を悪性黒色腫培養細胞株と混合培養し、細胞障害性について検討する。

●平成23年度

- STEP2→PRAME 特異的モノクローナル抗体の作製

- レチノイン酸と PRAME 抗体の combination therapy の妥当性について結果が出た場合、論文を作成し公表する。

- STEP3→22年以降の免疫療法開発(step 3)に向けての基礎実験の準備。

- In vitro で有効な結果のえられたペプチドについて、xenograft での腫瘍抑制効果を検討する。

4. 研究成果

未曾有の大震災の影響もあり、保存検体の一部およびデータを失ってしまい、まだ十分に公表できるデータが蓄積されていない状態である。
途中までの研究結果については、下記雑誌論文に投稿し受理された。

今後は引き続き検体収集と、免疫療法開発に向けての基礎実験を展開していく予定である。

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 1 件)

[Downregulation of microRNA-211 is involved in expression of preferentially expressed antigen of melanoma in melanoma cells.](#)

Sakurai E, Maesawa C, Shibazaki M, Yasuhira S, Oikawa H, Sato M, Tsunoda K, Ishikawa Y, Watanabe A, Takahashi K, Akasaka T, Masuda T.

Int J Oncol. 2011 Sep;39(3):665-72.

[学会発表] (計 件)

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計◇件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者 ()

研究者番号：

(2) 研究分担者 ()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：

