

## 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 4月30日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791065

研究課題名（和文） 末梢血循環腫瘍細胞と循環マイクロRNAによるテーラーメイド分子標的治療の開発

研究課題名（英文） The development of tailor-made molecular target therapy by circulating tumor cells and microRNAs in melanoma patients

研究代表者

後藤 康文（GOTO YASUFUMI）

信州大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：60467181

研究成果の概要（和文）：

進行期メラノーマ患者からのマイクロビーズと特異抗体を用いてメラノーマ細胞を分離する方法を確立し、さらに分離したメラノーマ細胞においてBRAF、KITの2つのマーカーを解析した。末梢血循環腫瘍細胞における遺伝子解析は、現在メラノーマ治療として最も注目されている変異BRAF阻害剤を用いた分子標的治療の際のバイオマーカーとして有用であった。

研究成果の概要（英文）：

We established the methods of isolating circulating tumor cells from melanoma patients by using the magnetic beads and melanoma specific antibodies. CTC genotyping may be useful as a biomarker of molecular-targeted therapy by using BRAF inhibitor for melanoma patients.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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

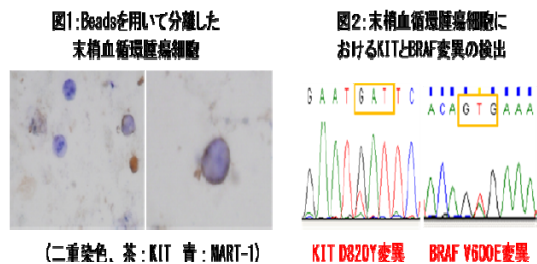
キーワード：皮膚腫瘍学

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 末梢血循環腫瘍細胞の分離と解析：これまで一部の抗癌剤以外にはほとんど効果がなかったメラノーマにおいても、有望な分子標的薬が数々開発されている。分子標的治

療においては特定の遺伝子変異や蛋白発現を解析することによって、個々の症例における治療薬の有効性をある程度予測することができる。標的遺伝子は日本人のメラノーマに変異が多いKITとBRAFとし、それらのホットスポットにおける変異を解析して、イマ

チニブ、スニチニブ、変異 BRAF 阻害剤などの適応を末梢からの採血だけで選択できるシステムの構築を目指す (図 1、図 2)。



中でも、KIT 阻害剤であるイマチニブやスニチニブは有望な分子標的薬であり、メラノーマに対して効果を示した症例が報告されている。イマチニブまたはスニチニブ治療においては、KIT 遺伝子の exon11 や一部の exon13 に変異が認められる場合にはイマチニブが有効であり、その他の変異に対してはスニチニブが有効であると考えられている。また、メラノーマに高頻度に見い出される BRAF 変異を標的にした PLX4032、RAF265、XL281 などの変異 BRAF 阻害剤も臨床治験中である。以上に述べたような分子標的治療の基盤となるバイオマーカーを解析するためには、腫瘍の切除標本、特に転移腫瘍の切除標本の遺伝子変異の解析が必要であるが、転移腫瘍は切除が困難であることが多い。原発腫瘍の遺伝子解析は多くの場合可能であるが、メラノーマではその進展に伴い腫瘍細胞クローンが変化することが稀でなく、原発腫瘍の遺伝子型が転移腫瘍のそれと異なることがしばしばある。これらはすべての癌に共通した問題であり、最近肺癌で血液を循環する腫瘍細胞を分離して、その EGFR 変異を検出することにより分子標的薬のゲフィチニブの適応を選択できることが報告された。研究代表者らもメラノーマの末梢血循環腫瘍細胞からの BRAF 遺伝子変異の検出が可能であることを報告をした。これらの報告された方法では

精度や特異度などを改良する必要があるが、採血により容易に検体が得られ、かつ個々の患者の分子標的治療の適応をリアルタイムで評価できる末梢血循環腫瘍細胞は、バイオマーカーとして今後も極めて有望であると考えられる。

(2) 末梢血循環 microRNA の抽出と解析：一方、新しいカテゴリーの RNA として注目されている microRNA は、癌においても多くの研究がなされ、発癌への機能的な関与のみならず予後因子、癌幹細胞との関係も注目されている。さらに薬剤耐性因子としても注目されており、シスプラチン、ドキシソルビシン、タモキシフェンへの薬剤耐性に関与する microRNA として mir214、mir21、mir221/222 などが報告されている。microRNA 研究における最近のトピックとして、microRNA は末梢血細胞の exosome に含まれており、RNAse が大量に存在する末梢血においても安定であると報告された。さらには、末梢血循環 microRNA を検出し、神経膠芽腫の腫瘍マーカーとして利用できることも報告されている。癌患者における末梢血の microRNA は癌原発巣のみならず転移巣や末梢血循環腫瘍細胞に由来するものも含まれると考えられ、薬剤耐性に関与する microRNA を検出できれば、生体内の癌細胞の薬剤耐性をよりリアルタイムに推定できる可能性がある。

## 2. 研究の目的

癌に対する化学療法や分子標的治療を効果的に行うためには、その適応を選択するための優れたバイオマーカーの開発が不可欠である。本研究では、進行期のメラノーマ患者の末梢血からメラノーマ細胞を分離し、その蛋白発現や遺伝子解析を行うことにより、分子標的治療を選択するためのバイオマーカー検査法を確立することを第 1 の目的とす

る。第2の目的として、新しいカテゴリーのRNAとして注目されているmicroRNAをメラノーマ患者の血漿から末梢血循環 microRNA として分離し、代表的な薬剤耐性 microRNA である mir214、mir21、mir221/222 の発現を解析する。末梢血循環腫瘍細胞の薬剤耐性と併せて評価することによって、薬剤耐性バイオマーカーとしての末梢血循環 microRNA の有用性を検討する。現在、再発メラノーマ患者の多くは有効な治療もないまま不幸な転帰をたどっている。この現状を打開するためには既存の抗癌剤や次々に開発される分子標的薬の中から、患者ごとに最適な治療薬を選択するテーラーメイド治療の確立こそ最重要であると考えた。

### 3. 研究の方法

5 m l のヘパリン血から末梢血循環腫瘍細胞を分離し、蛋白、遺伝子解析をする方法と血漿からの末梢血循環 microRNA の分離、発現量を解析する方法を計画した。この方法の最大の利点は、腫瘍組織を採取することなく採血のみで癌患者の治療を選択するために必要な情報（腫瘍細胞における遺伝子変異や薬剤耐性など）を得られることである。末梢血循環腫瘍細胞や末梢血循環 microRNA の分離方法、および末梢血循環腫瘍細胞と末梢血循環 microRNA の解析方法のモデルについては図3で示す。

図3: 末梢血循環腫瘍細胞の遺伝子解析と末梢血microRNA解析モデル



### 4. 研究成果

進行期メラノーマ患者からのマイクロビーズと特異抗体を用いてメラノーマ細胞を分離する方法を確立し、さらに分離したメラノーマ細胞においてBRAF、KITの2つのマーカーを解析し、特にBRAFは分子標的治療のバイオマーカーとして利用できる段階まで確立した。この結果を皮膚科分野における代表的な雑誌の一つである British Journal of Cancer に発表し、大きな反響を得られた。現在はピッツバーグ大学のフェローネ教授から新たなメラノーマ表面抗原を検出できる抗体の供与を受けて、感度と検出方法を改善させた方法により臨床応用に向けた共同研究を進めている。また、本研究から派生した研究として、日本人メラノーマ患者におけるBRAF、KIT変異を解析して、論文発表を行うことができた。microRNAの実験については、メラノーマ患者の血清、血漿からmicroRNAを分離し、RTを行った後にPCRで増幅できることが確認できた。また、約20例の健常人、患者においてmicroRNAを検出できた。しかし、検出感度においていまだ問題があり、今後も検出方法の改善の必要があり、現在は抗癌剤耐性microRNAである

mir214、mir21、mir221/222 の発現を解析するために抗がん剤治療を施行した患者血清・血漿を集めるとともに、より効率的な microRNA の増幅・検出のための方法の確立を目指し研究を続けている。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計6件)

- ①. Assessment of BRAF and KIT mutations in Japanese melanoma patients.  
Ashida A, Uhara H, Kiniwa Y, Oguchi M, Murata H, Goto Y, Uchiyama A, Ogawa E, Hayashi K, Koga H, Okuyama R. *J Dermatol Sci.* 査読有、2012 Apr 5. : 240-242
- ②. Mutation analysis of BRAF and KIT in circulating melanoma cells at the single cell level. Sakaizawa K, Goto Y, Kiniwa Y, Uchiyama A, Harada K, Shimada S, Saida T, Ferrone S, Takata M, Uhara H, Okuyama R. *Br J Cancer.* 査読有、2012 Feb 28;106(5):939-46. doi: 10.1038/bjc.2012.12.
- ③. Rapid progression of hidradenitis suppurativa in the lower leg of a patient with psoriasis vulgaris.  
Tanaka A, Goto Y, Iwade M, Uhara H, Okuyama R. *Acta Derm Venereol.* 査読有、2012 Jan;92(1):105-6.
- ④. Polyclonality of BRAF mutations in primary melanoma and the selection of mutant alleles during progression. Lin J, Goto Y, Murata H, Sakaizawa K, Uchiyama A, Saida T, Takata M. *Br J Cancer.* 査読有、2011 Jan 11 : 464-468
- ⑤. THAP5 is a DNA-binding transcriptional repressor that is regulated in melanoma

cells during DNA damage-induced cell death.

Balakrishnan MP, Cilenti L, Ambivero C, Goto Y, Takata M, Turkson J, Li XS, Zervos AS.

*Biochem Biophys Res Commun.* 査読有、2011 Jan 7;404(1):195-200.

⑥. Leg Ulcers Associated with Positive Lupus Anticoagulant in Two Cases of Klinefelter's Syndrome.

Goto Y, Uhara H, Murata H, Koga H, Kosho T, Yamazaki M, Takata M, Okuyama R.

*Acta Derm Venereol.* 査読有、2010 Oct 12 : 90-91

[学会発表] (計5件)

- ①. 後藤 康文、FABP7 gene expression during malignant melanoma progression: Utility as a prognostic molecular marker、第35回日本研究皮膚科学会総会、2010.12.3、和歌山
- ②. 後藤 康文、Activation of Toll-Like Receptor 4 on human melanoma cells induced cell proliferation and migration、Melanoma Congress2010、2010.11.4、シドニー
- ③. 後藤 康文、血液循環メラノーマ細胞におけるBRAFとKIT遺伝子の解析、メラノーマ班会議、2010.7.31、東京
- ④. 後藤 康文、爪甲メラノーマへの対応、109回日本皮膚科学会総会・教育講演、2010.4.16、大阪
- ⑤. 後藤 康文、抗リン脂質抗体症候群 (APS) を合併したKlinefelter症候群に生じた下腿潰瘍の2例、109回日本皮膚科学会総会、2010.4.16、大阪

[その他]  
ホームページ等  
<http://www.shinshu-u.ac.jp/faculty/medicine/chair/i-hifu/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

後藤 康文 (YASUFUMI GOTO)  
信州大学・医学部・非常勤講師  
研究者番号：60467181