

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591619

研究課題名(和文)末梢血を循環するメラノーマ幹細胞の解析

研究課題名(英文)Analysis of circulating melanoma-initiating cells

研究代表者

高田 実(Minoru, Takata)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・非常勤研究員

研究者番号：20154784

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：患者の末梢血を循環するメラノーマ細胞(CTC)の分離と遺伝子解析に成功し、分子標的治療の適応を決定するための指標としての有用性を示した。一方、センチネルリンパ節におけるメラノーマ幹細胞マーカーの発現解析を行い、ABCB5が最も特異性が高く有用なマーカーである可能性が示唆した。さらにCTCにおけるABCB5の定量的発現解析を試みたが、CTCの回収効率が低く解析が困難であった。

研究成果の概要(英文)：We have isolated circulating melanoma cells from peripheral blood of patients, and identified mutations in BRAF and KIT genes, which are molecular targets for oral kinase inhibitors. Quantitative expression analysis of several molecules implicated as melanoma-initiating cell markers in sentinel lymph nodes revealed ABCB5 as the most promising marker. However, expression analysis of ABCB5 in peripheral blood was difficult due to the low yields of melanoma-initiating cells.

研究分野：医歯薬

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 悪性黒色腫 がん幹細胞 血液循環がん細胞

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 1 日現在

1. 研究開始当初の背景

がんは始めに特定の臓器に限局した腫瘍として発生するが、多くの場合比較的早期から血行性転移を来し、遠隔臓器に播種する。遠隔転移の形成には原発部位から血管に浸潤し、血流に入って全身を循環するがん細胞が重要な役割を演ずる。近年の技術的な進歩により、このような血液循環がん細胞 (circulating tumor cells; CTC) を検出することが可能になった。末梢血の採取は容易であり、同一の患者から経過を追いながら繰り返し検体を得られるので、CTC の定量的なモニタリングが可能である。また、CTC を分離・採取しその遺伝子解析も行うことができる。このように、CTC の解析は患者の予後の推定や、治療効果の評価、さらには化学療法や分子標的治療のリアルタイムなバイオマーカーとして極めて有用である。

一方、近年、癌幹細胞の存在とその発がん・進展の過程における重要性が明らかにされており、メラノーマにおいてもそのような癌幹細胞の存在を示唆する報告が相次いでいる。メラノーマの進展・転移の過程においてメラノーマ幹細胞が血管に浸潤、侵入し、CTC として末梢血を循環し血行性転移の形成に重要な役割を演じている可能性が極めて高い。したがって、メラノーマ患者の末梢血を循環するメラノーマ幹細胞を同定し、その生物学的性状を明らかにすることは、予後の推定や個別治療の治療方針の決定、さらに新しい治療法の開発に極めて重要であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、メラノーマ患者のセンチネルリンパ節および CTC におけるメラノーマ幹細胞マーカーの発現を調べ、その臨床的意義を検証して、これが予後の推定や個別化治療の治療方針決定のためのバイオマーカーとなり得るか否かを検討する。さらに、患者の末梢血から分離されたメラノーマ幹細胞の網羅的遺伝子解析や in vivo における造腫瘍性の検討を行い、その生物学的性状を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) センチネルリンパ節におけるメラノーマ幹細胞の検出

岡山大学皮膚科で採取したセンチネルリンパ節の cDNA, 50 検体を用いてこれまでメラノーマ幹細胞のマーカーとして報告されている CD271, JARID1B, ABCB5, CD133, nestin, nodal の 6 つの遺伝子 mRNA の発現量を定量的

PCR を用いて調べる。得られた成績と患者の臨床情報その臨床的意義を検証する。

(2) CTC の分離と遺伝子解析およびメラノーマ幹細胞の検出

AJCC, stage II 以上のメラノーマ患者から末梢血 10ml を採取し、HMW-MAA 抗体カクテルと免疫ビーズを用いて CTC を分離する。末梢血は検査 (CT, PET など) や治療 (手術、化学療法など) の前後に同一患者から複数回採取する。分離された細胞の BRAF および KIT 遺伝子変異を検出するとともに、mRNA を抽出し定量的 PCR 法で 6 種類のメラノーマ幹細胞マーカーの発現量を検討する。

(3) メラノーマ患者の血漿に漏出する腫瘍由来の DNA 断片 (circulating tumor DNA, ctDNA) の癌遺伝子変異の検出特異的 1 塩基伸長反応と飛行時間型質量分析計 (MALDI-TOF MS) を組み合わせた MassARRAY[®] 分析システムと皮膚がん変異解析パネル MelaCarta[®] を用いてメラノーマの患者の血漿に漏出する ctDNA の癌遺伝子変異スクリーニングを試みる。MassARRAY[®] 分析システムは微量の DNA から BRAF, NRAS, KIT, AKT3 など 20 種類の既知のメラノーマの癌遺伝子の 72 種類の点突然変異を変異アレル比率 5 % までの高感度で迅速に検出できる。

4. 研究成果

(1) 正常リンパ節、転移陽性センチネルリンパ節、転移陰性センチネルリンパ節における発現の検討から、6 つのメラノーマ幹細胞マーカーのうち ABCB5 が最も特異性が高く、有用と考えられた。経過観察中に再発した 8 例は全例 HE/IHC で転移陽性、うち 7 例は分化マーカーが 3 つとも陽性、4 例が ABCB5 陽性であり、ABCB5 の発現が与後にも影響を与える可能性が示唆された。

(2) CTC を効率的に捕捉する方法を検討し、数種類の HMW-MAA 単クローン抗体のカクテルを用い、混在した白血球を CD45 結合磁気ビーズを用いて取り除くことにより、純粋なメラノーマ細胞を得ることが可能であることを見出した。stage I のメラノーマ患者 8 例の末梢血 5ml と抗ヒト HMW-MAA マウス抗体を反応させ、次いで抗マウス IgG 抗体結合磁気ビーズでメラノーマ細胞を分離した。さらに、抗 CD45 抗体結合磁気ビーズを用いて混入したリンパ球を除去し、得られた細胞を MART-1 抗体で免疫染色して、メラノーマ細胞を確実に同定した。これらのメラノーマ細胞をレーザーマイクロダイセクションで回収し、DNA を抽出して PCR で増幅し、BRAF および KIT 遺伝子のシーケンスを行った。この方法に

より、8例全例の末梢血から1~40個のCTCsの分離に成功した。CTCsの遺伝子変異解析は、KITは8例中3例、BRAFは5例全例で可能であった。CTCのKIT遺伝子はwild-typeが2例、V569G変異1例、BRAF遺伝子はwild-typeが3例、V600E変異1例、V600E/V600K変異1例であった。8例中6例で原発腫瘍・転移腫瘍・CTCsのいずれかにBRAFまたはKITの変異が検出されたが、興味深いことに3者の変異パターンはすべての例で異なっており、進行期メラノーマにおける腫瘍細胞クローンの多様性が示唆された。一方、CTCの回収効率は低く、その幹細胞マーカーの定量的発現解析は困難であった。

(3)血漿ctDNAの遺伝子変異に関しては、まず対照として腫瘍組織の癌遺伝子変異をMassARRAY®システム MelaCarta®を用いて解析した。8例の解析を行い、BRAF V600E変異を5例に、NRAS Q61R変異、EPHB6 G404S変異をそれぞれ1例に検出した。本システムは効率、感度ともに優れた変異のスクリーニング法であることを確認した。次いで、メラノーマ患者の血漿からQIAmp circulating nucleic acid kitを用いて微量のctDNAを分離抽出した。これまでに9例の血漿ctDNAの抽出を終え、現在、MassARRAY®システムによる解析を施行中である。

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 10 件)

Takata M*: Identifying BRAF and KIT mutations in melanoma. *Expert Rev Dermatol*, (査読有) 8: 171-6, 2013. DOI: 10.1586/EDM.12.78

高田 実: メラノーマの遺伝子異常とシグナル阻害薬、癌と化学療法 (査読無) 40: 453-457, 2013

Sakaizawa K, Goto Y, Kiniwa Y, Uchiyama A, Harada K, Shimada S, Saida T, Ferrone S, Takata M, et al. Mutation analysis of BRAF and KIT in circulating melanoma cells at the single cell level. *Br J Cancer*, (査読有) 106: 939-46, 2012. DOI: 10.1038/bjc.2012.12

高田 実: メラノーマは手術で治せるか? プログレーションモデルからみたメラノーマの手術療法の再評価、日本皮膚科学会雑誌 (査読有) 122: 2077-84, 2012

[学会発表](計 6 件)

Takata M., Pathogenesis of acral melanoma, Joint Conference of the 2nd KNUH Melanoma Symposium & the 8th Symposium of

the Korean Society of Skin Cancer, 2013年2月16日、テグ市、大韓民国

高田 実 メラノーマの分子標的治療、日本皮膚科学会西部支部総会学術大会、2012年10月27日、広島市

高田 実 メラノーマの遺伝子異常と分子標的治療、日本皮膚科学会中部支部総会学術大会、2012年9月13日、大阪市

高田 実 末梢血メラノーマ細胞の遺伝子解析、フェロンメラノーマカンファレンス、2012年5月26日、東京

高田 実 メラノーマは手術で治せるか? 日本皮膚外科学会、2011年8月20日、富山市

鈴木規弘、高田 実 原発腫瘍およびセンチネルリンパ節における melanoma initiating cell marker の発現「難治性悪性腫瘍に対する標準治療確立のための多施設共同研究(課題番号 23-A-22)」2011年度第2回班会議、2011年11月5日、東京

[図書](計 3 件)

高田 実: メラノーマの遺伝子異常と今後の分子標的治療、宮地良樹(編) WHAT'S NEW in 皮膚科学 2014-2015、メディカルレビュー社、東京、2014、pp132-133

Takata M.: Genetic/epigenetic biomarkers: Distinction of melanoma from other melanocytic neoplasms. In: Murph M (ed), *Diagnostic and prognostic biomarkers and therapeutic targets in melanoma*, Springer, NY, 2012, pp69-77

Takata M.: Acral melanoma: Clinical, biological and molecular genetic characteristics. In: Murph M (ed), *Melanoma in the clinic- Diagnosis, management and complication of malignancy*, Intech, Rijeka, Croatia, 2011, pp3-14

[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

高田 実 (TAKATA MINORU)

岡山大学大学院医歯薬総合研究科非常勤研究員

研究者番号: 20154784

(2)研究分担者

山崎 修 (YAMASAKI OSAMU)

岡山大学大学院講師

研究者番号：90294462

大塚 正樹 (OTSUKA MASAKI)

岡山大学大学病院助教

研究者番号：80452572

鈴木 規弘 (SUZUKI NORIHIRO)

岡山大学大学病院医員

研究者番号：10600281

(H23~24年度)