

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591630

研究課題名(和文) 遺伝子の異常メチル化による悪性黒色腫の早期鑑別診断

研究課題名(英文) Early differential diagnosis of malignant melanoma by abnormal DNA methylation

研究代表者

篠島 由一 (SHINOJIMA, Yui)

日本大学・医学部・研究員

研究者番号：80599928

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：病理組織診断において、悪性黒色腫と鑑別が困難である色素性母斑、Spitz母斑、異型母斑(dysplastic nevus)、および悪性黒色腫の表皮内癌(melanoma in situ)の患者検体15例よりレーザーマイクロダイセクションを用いてDNA、RNAの抽出を行い、マスアレイを用いたZAR1遺伝子のDNAメチル化解析を行った。しかし、レーザーマイクロダイセクションによるDNAの抽出が困難であり、抽出できた場合でもマスアレイによる解析が困難であり、メチル化解析を行うことができなかった。

研究成果の概要(英文)：In order to identify the early tumor marker of malignant melanoma, Sequenom MassARRAY quantitative methylation analysis using the MassARRAY Compact System was performed for the quantitative DNA methylation analysis of ZAR1 gene. Fifth surgical specimens (e.g. melanocytic nevus, Spitz nevus, dysplastic nevus, and melanoma in situ) that were similar to malignant melanoma by pathologic diagnosis were examined. DNA were collected by using Leica Laser Microdissection systems. However, the extraction of DNA and the quantitative DNA methylation analysis of ZAR1 gene using the MassARRAY were difficult, therefore we were not able to analyze.

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：皮膚科学 皮膚腫瘍学 癌 遺伝学 ゲノム

1. 研究開始当初の背景

悪性黒色腫は、悪性度が高く、しばしば予後不良な経過をとるので、他の疾患との鑑別に留意して速やかに正確な診断を下し、適切な治療を行う必要がある。しかしながら、悪性黒色腫は診断が最も難しい腫瘍の1つである。臨床的に鑑別を有するものとして、色素性母斑、Spitz 母斑、異型母斑 (dysplastic nevus)、などがあり、臨床的に診断が困難であれば、ダーモスコピーや病理組織学的に診断を進めるが、それでも鑑別が困難であることが多い。更に、テレビやインターネット等により、悪性黒色腫に対する社会的認知も深まり、その初期病変と思われる症例に遭遇し、診断に苦慮することがしばしば経験され、新たな診断法が求められている。

一般にがんでは遺伝子の変異(点突然変異、転座、染色体欠失、増幅など)が生じ、悪性黒色腫では NRAS、BRAF などの遺伝子の変異が報告されている (Takata M et al. J Invest Dermatol 125:318-22, 2005)。新規の遺伝子の変異の検索がなされている一方で、DNA の異常メチル化、ヒストンの修飾など DNA の塩基配列の変化を伴わないエピジェネティックな変化が報告されてきている。近年、悪性黒色腫においても多くの遺伝子がプロモーター領域の DNA メチル化により、発現が抑制されることが報告されてきている。

我々はマウス皮膚発癌モデルで同定された腫瘍特異的にメチル化の異なる領域 14 箇所と相同なヒトゲノム領域につき、悪性黒色腫患者検体 30 例、色素性母斑患者検体 10 例、悪性黒色腫細胞株 17 種類、その他の悪性腫瘍細胞株 51 種類、正常メラノサイト細胞株 4 種類、正常線維芽細胞株 3 種類を用い、飛行時間型質量分析計 MassARRAY Analyzer Compact MALDI-TOF MS (以下マスアレイ) によるメチル化の定量解析を行い、新規の早期診断マーカーの候補となる遺伝子の同定を行った。その結果、Zygote Arrest 1

(ZAR1) 遺伝子において、悪性黒色腫患者検体 30 例中 28 例、悪性黒色腫細胞株 17 種類中 16 種類でメチル化がみられ、色素性母斑患者検体 10 例と正常メラノサイト細胞株 4 種類では全てメチル化はみられなかった。更に、悪性黒色腫以外の悪性腫瘍細胞株 51 種類、正常線維芽細胞 3 種類についても同様に解析を行い、全ての悪性腫瘍細胞株でメチル化がみられたが、正常線維芽細胞では全てメチル化はみられなかった。この遺伝子はヒトでは卵巣と精巣に特異的に発現し、個体の発生に重要な働きを持つことが報告されている。

この解析により、ZAR1 遺伝子のメチル化が、新規の早期診断マーカーとなる可能性が示唆された (Shinojima Y et al. J Dermatol Sci 59: 98-106, 2010)。

2. 研究の目的

上記の学術的背景に基づき本研究では、臨床診断および病理組織診断において悪性黒色腫と鑑別が困難である色素性母斑、Spitz 母斑、異型母斑 (dysplastic nevus)、および悪性黒色腫の表皮内癌 (melanoma in situ) 等の患者検体を用いて ZAR1 遺伝子の DNA メチル化変化と遺伝子の発現解析を行い、良性組織と悪性組織の鑑別が可能か解析を行う。

3. 研究の方法

日本大学医学部付属板橋病院で皮膚腫瘍切除術を施行された症例から DNA、RNA の抽出を行う。表皮内腫など病変が小さい場合はレーザーマイクロダイセクションにより腫瘍を切り出し、DNA、RNA を抽出後にそれぞれメ

チル化の解析、mRNA の発現解析を行う。DNA はマスアレイを用いて定量的にメチル化を検討する。この方法により、少量のサンプルから一度に多数の検体のメチル化の変化を検出できる。ZAR1 遺伝子について作成したマスアレイ用の Primer を用いて各疾患でのメチル化解析を行う。また、RNA はリアルタイム RT-PCR を用いて ZAR1 遺伝子の発現解析を行い、DNA のメチル化の変化と合わせて、良性と悪性組織の鑑別が可能か解析を行う。

次に、各疾患において、ZAR1 遺伝子の DNA メチル化変化と、人種、性別、年齢、紫外線曝露、予後等に臨床相関があるか解析を行う。さらに、ZAR1 遺伝子のメチル化変化領域について、高感度メチル化解析を試みる。すなわち少量の DNA より癌特異的なメチル化が同定できるか検討し、臨床の場で診断に応用できるかを試みる。マスアレイは、高感度であり、既に母体血中より早期に胎児の遺伝子を同定し、遺伝性疾患や性別判定に利用されている。メチル化の解析では、バイサルファイト処理を行うため感度が下がるが、がん患者では一般に血中浮遊 DNA の濃度が上昇することより、診断に使用できる可能性がある。

更に、有棘細胞癌などの他の悪性腫瘍においても、患者検体、患者血液を用い、悪性黒色腫と同様 ZAR1 遺伝子のメチル化変化につき解析を行い、早期診断マーカーとなる可能性につき検討を行う。

4 . 研究成果

日本大学医学部付属板橋病院で皮膚腫瘍切除術を施行された症例の中で、病理組織診断において、悪性黒色腫と鑑別が困難であった色素性母斑、Spitz 母斑、異型母斑 (dysplastic nevus)、および悪性黒色腫の表皮内癌 (melanoma in situ) の患者検体計

15 例を用いて解析を試みた。病変が小さいため、

全例レーザーマイクロダイセクションを用いて DNA、RNA の抽出を行った。

しかし、レーザーマイクロダイセクションによる DNA の抽出が困難であり、抽出できた場合でもマスアレイによる解析が困難であり、メチル化解析を行うことができなかった。また、同様に RNA による発現解析も同様に行うことが困難であった。

今後は、引き続き症例を蓄積し、レーザーマイクロダイセクションによる DNA、RNA 抽出の精度を上げ、悪性黒色腫と鑑別が困難である皮膚腫瘍の ZAR1 遺伝子のメチル化解析を行っていく。また、各疾患において、ZAR1 遺伝子の DNA メチル化変化と、人種、性別、年齢、紫外線曝露等に相関があるが解析を行う予定である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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

篠島 由一 (SHINOJIMA, Yui)

日本大学・医学部・研究員

研究者番号 : 80599928

(2)研究分担者

照井 正 (TERUI, Tadashi)

日本大学・医学部・教授

研究者番号 : 30172109

(3)連携研究者 なし