

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：12501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659543

研究課題名(和文) 悪性黒色腫の単一細胞解析によるがん多様性の研究

研究課題名(英文) A study to establish system to evaluate diversities of cell populations of melanoma

研究代表者

松江 弘之 (Hiroyuki, Matsue)

千葉大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：10250424

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：がんは一つのがん細胞に由来する細胞集団ではなく、幹細胞に由来する多様性のある細胞集団である。がん根治療法はこれらの細胞すべてを標的とする必要がある。この挑戦的萌芽研究では、悪性黒色腫の幹細胞を含む遺伝子変異の多様性を持ったがん細胞を包括的、網羅的な解析方法を確立することを目的とした。第一段階として皮膚由来細胞を次世代シーケンサーで解析し、個人差・再現性などの種々の解析結果の意義を検討している。

研究成果の概要(英文)：Cancer is not a group composed of tumor cells derived from a single malignant cell, but a group of the cells possessing accumulated genetic diversities derived from a cancer stem cell. To eradicate cancer, all malignant cells forming cancer must become therapeutic targets. The purpose of this proposed pilot feasibility study was ultimately to establish a reliable method to analyze genetic diversities of malignant melanoma using next-generation sequencing. The first step was to evaluate individual differences and reproducibility of the method from the results of skin-derived cells.

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：がん 悪性黒色腫 がん幹細胞

1. 研究開始当初の背景

がんは正常細胞の染色体(遺伝子)に変異が入ることで発生したがん細胞が増殖して形成されると考えられてきた。すなわち、がんは均一ながん細胞の集団(クローン)と見なされ、それを標的に多くのがん治療の戦略が立てられてきた。

しかし、近年、がん細胞の中にはがんの発生や再発の原因となる“がん幹細胞”という親玉が存在しているという説が提唱されている。この“がん幹細胞仮説”は、がん組織のがん細胞の中に少数存在するがんの幹細胞ががん細胞を供給する親玉であり、自己複製能を持ち、がん組織中の大多数のがん細胞は、その幹細胞から分化・増殖した多様性に富む細胞であるという考え方である(Cancer Res 66:9339, 2006, 米国がん学会での議論に基づいた総説)。

この仮説が正しいとすれば、これまでのがん治療(化学療法、放射線治療、分子標的薬、抗体治療、免疫療法など)は、がん組織のすべてのがん細胞を標的としていない可能性が高い。すなわち、それらの治療法は、理論的に根治的ではなく、また再発や転移の可能性を残すものである。

2. 研究の目的

本萌芽研究の申請当初の目的は、がん組織の“がん幹細胞”を含むメラノーマ細胞をまず細胞集団レベルで、次に単一細胞レベルで、遺伝子発現プロファイル miRNA プロファイル 遺伝子の欠損・重複、コピー数 エピジェネティクスなどを網羅的に検討する。クローン細胞集団解析と単一細胞解析の結果の統計学的信頼性を評価する実験系を確立することであった。まず、皮膚由来の細胞を用いたサンプルで次世代シーケンサーを用いた種々の遺伝子解析を試み、様々な解析方法で個人差・再現性などを検討する。

3. 研究の方法

末端黒子型メラノーマ患者の原発巣でも表皮に病変がある Tis, T1 の外科的切除標本、著明な 垂直方向の浸潤をきたした T3, T4 の切除標本、肉眼的リンパ節転移や多臓器転移(皮膚を含む)の切除腫瘍巢から調整した single cell suspension から、幹細胞培地とメラノーマ細胞培地で腫瘍細胞を培養する。同時に単一細胞から増幅 cDNA を調整する。それぞれの培地で増殖した細胞を limiting dilution 法でクローン化する。

以上は当初の計画であったが、まず、そのサンプルの比較の再現性に次世代シーケンサーによる解析が重要となり、その検討のため生命倫理審査承認後、正常者とある疾患患者の表皮由来細胞の従来網羅的遺伝子解析と次世代シーケンサーを用いた比較検討解析を施行する。

4. 研究成果

がんは一つのがん細胞に由来する細胞集団ではなく、いわゆる“がん幹細胞”から分化・増殖し、その過程で遺伝子変異の蓄積を獲得した多様性のあるヘテロな細胞集団であるという“がん幹細胞仮説”が提唱されている。皮膚科領域で最も悪性度の高い悪性黒色腫のがん幹細胞に関しては存在しないという報告や、がん細胞の約30%を占めるといふ報告がありコンセンサスは得られていない。理論的には「がん根治療法」はがん幹細胞を含むこのヘテロな細胞集団すべてをターゲットとする必要がある。この挑戦的萌芽研究では、このように混乱しているメラノーマ幹細胞を含む遺伝子変異の多様性を持ったがん細胞を包括的、網羅的な解析をすることを目的とした。

当機関の生命倫理審査に“悪性黒色腫のがん細胞の多様性”として申請し受理された。同時に別の皮膚細胞由来の遺伝子を解析するための生命倫理を通し、正常皮膚由来細胞

を含めある疾患の遺伝子の解析を開始したが、従来の網羅的解析から、次世代シーケンサーが出現したため、方法の変更と結果の検討を行っている。次世代シーケンサーでは、遺伝子配列の解読を RNA sequence で可能なので、変更点を生命倫理審査委員会に提出し受理された。

我々は、実験系を確立する目的で別プロジェクトで提出された生命倫理審査と同意を得た皮膚由来の細胞を用いたサンプルで次世代シーケンサーを用いた種々の遺伝子解析を試み、様々な解析方法で個人差・再現性などを現在検討している。その間、ベムラフェニブは欧米の悪性黒色腫の半数以上で変異が認められる BRAF 変異をターゲットとした分子標的薬で高い効果が報告された (Chapman, P.B. et al., *N. Engl. J. Med.* 364:2507, 2011)。

しかし、日本人では足や爪部など四肢末端部の悪性黒色腫 (末端黒子型) が多く、その BRAF 変異を伴わないことが多く、この分子標的治療の適応にならない症例が多いと予想されている。日本人に多い末端黒子型の特異的分子標的薬のターゲットの探索は、非常に重要な課題であるので、ここ数年で非常に進歩を遂げた次世代シーケンサーを用いたよりターゲットを絞った研究を進める予定であり、平成 26 年度厚生労働科学研究委託費 (革新的がん医療実用化研究事業) 研究計画書 (新規申請用) に “ゲノム・遺伝子解析による日本人特有の悪性黒色腫の分子標的となる体細胞変異の同定” を平成 26 年 2 月 13 日に応募した。

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)

Satoh T, Kambe N, Matsue H.
NLRP3 activation induces
ASC-dependent programmed necrotic

cell death, which leads to neutrophilic inflammation. *Cell Death Dis.* 査読有、4: e644. (2013) doi: 10.1038/cddis.2013.169.

Akita F, Kambe N, Nakano M, Satoh T, Iwasawa M, Togawa Y, Matsue H. Novel R218X mutation in the fumarate hydratase gene in a patient with Reed's syndrome. *J Dermatol.* 査読有、40(1):58-9. (2013) doi: 10.1111/1346-8138.12002.

Nakagomi D, Suzuki K, Hosokawa J, Kobayashi Y, Suto A, Takatori H, Watanabe N, Matsue H, Murphy TL, Murphy KM, Shimada S, Nakajima H. Therapeutic potential of B and T lymphocyte attenuator expressed on CD8+ T cells for contact hypersensitivity. *J Invest Dermatol.* 査読有,133(3):702-11. (2013) doi: 10.1038/jid.2012.396

Iwasawa MT, Togawa Y, Akita F, Kambe N, Matsue H, Yaguchi T, Nishimura K.(2012) Kerion celsi due to *Arthroderma incurvatum* infection in a Sri Lankan child: species identification and analysis of area-dependent genetic polymorphism. *Med Mycol.* 査読有、50: 690-8. doi: 10.3109/13693786.2012.671968

Kambe N, Satoh T, Nakamura Y, Iwasawa M, Matsue H. Autoinflammatory diseases and the inflammasome: mechanisms of IL-1 beta activation leading to neutrophil-rich skin disorders. *Inflammation Regeneration* 査読無, 31: 72-80. (2011) http://www.jsir.gr.jp/journal/pdf/09_S4.pdf

[学会発表](計 8 件)

Satoh T, Kambe N, Matsue H. (2013) Programmed necrosis by CAPS-associated NLRP3. (7th International Congress of FMF and AIDs, May 22 -26, Lausanne, Switzerland)

Satoh T, Kambe N, Matsue H. (2013) Programmed cell death induced by

CAPS-associated mutant NLRP3 features necrosis that leads to *in vivo* neutrophilic inflammation. (International Investigative Dermatology 2013, May 8-11, Edinburgh, UK)

山本洋輔, 末廣敬祐, 丸 裕吾, 鎌田憲明, 神戸直智, 松江弘之 (2013) 千葉茨木県境より受診した皮膚悪性腫瘍の進行例(第81回日本皮膚科学会茨城地方会, 3月9-10日, つくば市)

外川八英, 丸 裕吾, 中野倫代, 鎌田憲明, 神戸直智, 大津玉緒, 太田 聡, 松江弘之 (2013) 尋常性白斑に合併し, メラノーマとの鑑別を要した黒色斑の1例 (第76回日本皮膚科学会東京支部学術大会, 2月16-17日, 東京)

Satoh T, Kambe N, Matsue H. (2012) Programmed necrotic cell death caused by NLRP3 activation is dispensable for TLR stimulation (第41回日本免疫学会学術集会, 12月5-7日, 神戸市)

Satoh T, Kambe N, Matsue H. (2012) Programmed necrotic cell death caused by NLRP3 activation is dispensable for TLR stimulation (42nd Annual ESDR Meeting, 2012. Sep 19-22, Venice, Italy)

山本洋輔, 末廣敬祐, 鎌田憲明, 神戸直智, 松江弘之 (2012) 当施設において過去2年間に施行した悪性黒色腫術後DAV-Feron療法における副作用調査 (日本皮膚科学会第844回東京地方会, 9月8日, 千葉市)

Satoh T, Kambe N, Matsue H. (2011) Homopolymerization of ASC using FKBP12 chimeric protein induced rapid cell death accompanied with IL-1 beta processing (41st Annual ESDR Meeting, 2011. Sep 7-10, Barcelona, Spain)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 1 件)

名称: 三次元培養皮膚モデルの製造方法及びその利用(届出時: 毛包角化細胞由来三次元表皮の作製方法)
発明者: 鎌田憲明、松江弘之
権利者: 同上
種類: 特許
番号: 特願 2013-105359 号
出願年月日: 平成 25 年 5 月 27 日
国内外の別: 国内

取得状況 (計 0 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
<http://www.m.chiba-u.ac.jp/class/dermatology/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松江 弘之 (MATSUE, Hiroyuki)
千葉大学・大学院医学研究院・教授
研究者番号: 10250424

(2) 連携研究者

鎌田 憲明 (KAMATA, Noriaki)
千葉大学・医学部附属病院・講師
研究者番号: 00334186

外川 八英 (TOGAWA, Yaei)
千葉大学・大学院医学研究院・助教
研究者番号: 90361427

小原 收 (OHARA, Osamu)
(財)かずさDNA研究所・ヒトゲノム研究部・部長
研究者番号: 20370926