

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791168

研究課題名(和文) データベース化を目指したヒトメラノーマ特異的RNA干渉分子療法の開発

研究課題名(英文) Development of therapeutic RNA interference of human melanoma for the purpose of database design

研究代表者

中井 章淳(Nakai, Noriaki)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：80453108

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：メラノサイトとメラノーマの増殖と生存に関与する遺伝子 "Mitf" を標的にしたCRISPR/Cas9-Mitfを6種類合成した。CRISPR/Cas9-Mitf-4をヒトメラノーマ細胞株のHMV-IIに導入すると、生存能は約13%に抑えられた。定常状態でのMitfのメッセンジャーRNA発現レベルは、無色素性メラノーマ細胞株のSK-Mel 28と色素性メラノーマ細胞株のG361では低く、色素性メラノーマ細胞株のHMV-IIでは高かった。特定のヒトメラノーマ細胞株では、Mitfを抑制すれば抗腫瘍効果の得られる可能性がある。一方メラノーマ細胞株のMitf発現レベルは色素産生能に相関しない可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We synthesized 6 types of CRISPR/Cas9-Mitf corresponding to the Mitf sequence which is involved in melanin synthesis as well as differentiation of melanocyte and melanoma, and transfected them into human melanoma cell lines. CRISPR/Cas9-Mitf-4-mediated knockout of Mitf suppressed viability of HMV-II melanoma by 13% in comparison with control HMV-II melanoma. Low expression of Mitf mRNA in control amelanotic human melanoma SK-Mel 28 and in control melanotic human melanoma G361, and high expression of Mitf mRNA in control melanotic human melanoma HMV-II were confirmed. CRISPR/Cas9-mediated knockout of Mitf might suppress growth of certain types of human melanoma. While Mitf mRNA expression levels in human melanoma might not be associated with melanin production ability.

研究分野：皮膚悪性腫瘍

キーワード：メラノーマ 分子治療 Mitf ヒト

1. 研究開始当初の背景

(1) 進行期メラノーマは化学療法や放射線療法に抵抗性で死亡率は高い。手術不能の進行期の患者に対し、新規の有効な治療を開発することが切望されている。新しい治療法としては、メラノーマに特異的で重要な機能を担う分子を標的として、その機能を抑制することに照準を絞った戦略とすれば、副作用が少なく安全に投与できると考えられる。

(2) 研究代表者はメラノーマの増殖と生存に關与する可能性がある遺伝子として、microphthalmia-associated transcription factor (Mitf) に着目した。Mitf は、ベーシック・ヘリックス・ループ・ヘリックス-ロイシンジッパー (bHLH-LZ) 構造を有する転写因子である。Mitf には N 末端の異なる 7 つのアイソフォーム (Mitf-M, A, B, C, D, E, H) が存在するが、その中でも Mitf-M はメラノーマとメラノサイトに特異的に発現しているため、Mitf-M をターゲットに治療を行えばその安全性は高いと推測する。研究代表者は先の研究でマウス Mitf を標的とした siRNA を世界に先駆けてマウスメラノーマ細胞に導入し、メラノーマに対する新しい分子制御療法としての Mitf 遺伝子抑制の可能性について評価し、その抗腫瘍効果を確認した。すなわち、マウス Mitf に特異的な siRNA を合成し (Mitf-siRNA)、B16 メラノーマ細胞に in vitro と in vivo で導入し、メラノーマにアポトーシスを誘導することで抗腫瘍効果を確認した。

2. 研究の目的

(1) マウスにおいては Mitf-siRNA 治療による抗腫瘍効果が確認された。しかし、ヒトメラノーマ細胞においてヒト Mitf-siRNA で Mitf の発現を抑制するとメラノーマ細胞にアポトーシスが誘導されるか否かはまだ分かっていない。そこで、本研究内容では、ヒトにおいてメラノサイトとメラノーマに特異的に発現している Mitf-M を標的とした、治療上より有効で安全と考えられる siRNA (Mitf-M siRNA) を合成し、ヒトメラノーマ細胞に in vitro と in vivo で導入する。それによりヒトメラノーマ細胞においても抗腫瘍効果が確認されるか否かを検討する。さらに、腫瘍細胞の Mitf 発現レベルと治療効果に相関関係がみられれば、それをデータベース化し治療適応のある患者の選別が可能な新規創薬の開発に発展させる計画である。

3. 研究の方法

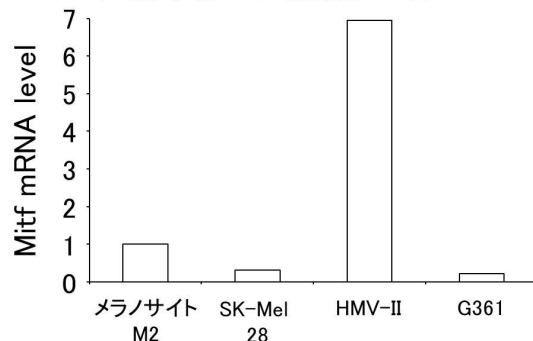
(1) ヒト色素性メラノーマ細胞株と無色素性メラノーマ細胞株の定常状態での Mitf の発現レベルを確認した上で、ヒト Mitf-M をターゲットにした siRNA を複数合成し、メラノーマ細胞株にカチオニック・リピッドを用いて in vitro 導入し、最もサイレンシング効果が高く抗腫瘍効果の高い siRNA を選択す

る。それら細胞株をマウスに皮下移植し樹立した腫瘍塊においても Mitf-M siRNA を導入することで遺伝子サイレンシングと抗腫瘍効果がみられることを確認し、さらに個々の細胞株の Mitf 発現レベルと治療効果に相関関係があることを検討する。申請者が樹立した患者由来メラノーマ細胞株を用いても遺伝子サイレンシングと抗腫瘍効果がみられ、それらが細胞株の Mitf 発現レベルと相関していることも確認する。この Mitf 発現レベルと抗腫瘍効果の関係を、治療適応となる患者の選別を行うための共有基盤データベースを作成する礎とする。

4. 研究成果

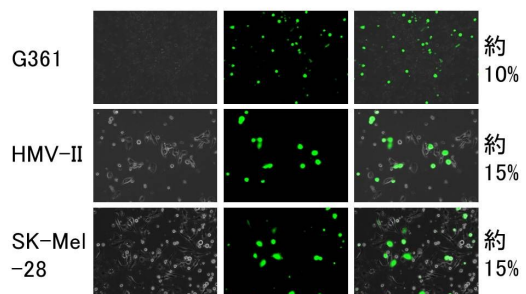
(1) 種々のヒトメラノーマ細胞株において、定常状態での Mitf のメッセンジャー RNA 発現レベルをヒトメラノサイト細胞株と比較した (図 1)。無色素性メラノーマ細胞株である SK-Mel 28 では発現が低く、色素性メラノーマ細胞株である HMV-II では発現が高かった。しかし、同じく色素性メラノーマ細胞株である G361 では発現が低かった。

図1 ヒトメラノーマ細胞株の定常状態における Mitf 発現レベル



(2) ヒト Mitf-M を標的にした siRNA の構築は不可能であった。そのため CRISPR/Cas9 システムを用いて Mitf をノックアウトする計画に変更した。Mitf を標的とした CRISPR/Cas9-Mitf を 6 種類合成し、リポフェクション法 (図 2) を用いて in vitro で導入した。細胞数と細胞ヴァイアビリティに有意な差はみられなかった (図 3)。そこで導入効率の高い電気穿孔法 (図 4) を用いて CRISPR/Cas9-Mitf を in vitro で導入した。CRISPR/Cas9-Mitf-4 を HMV-II に導入したと

図2 リポフェクションによるプラスミドGFPの導入効率



ころ、ヴァイアビリティはコントロール CRISPR/Cas9 の約 13%に抑えられた(図5)

図3

リポフェクション法によるCRISPR/Cas9-Mitf 導入後72時間のHMV-II細胞ヴァイアビリティ

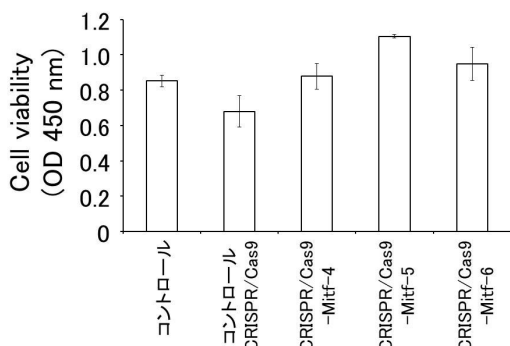


図4

電気穿孔法によるプラスミドGFPの導入効率 HMV-II

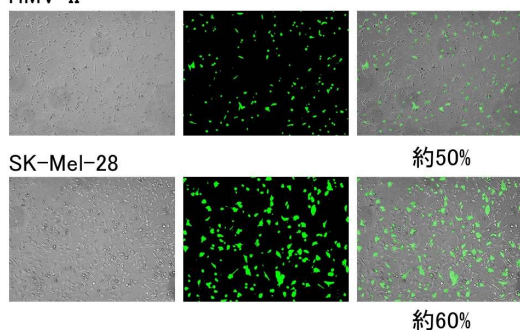
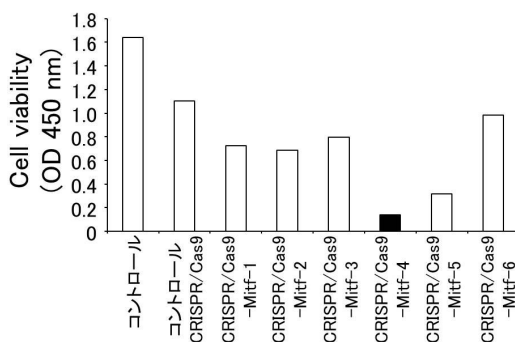


図5

電気穿孔法によるCRISPR/Cas9-Mitf導入後 48時間のHMV-II細胞ヴァイアビリティ



ヒトメラノーマにおいても Mitf を抑制することで、細胞株によっては抗腫瘍効果の得られる可能性はあると考えられた。一方、メラノーマ細胞株の Mitf の発現レベルは色素産生能によらない可能性もあると考えられた。

<引用文献>

Nakai N, Kishida T, Hartmann G, Kato h N, Imanishi J, Kishimoto S, Mazda O. Mitf silencing cooperates with IL

-12 gene transfer to inhibit melanom a in mice. *Int Immunopharmacol.*, 10: 540-545 (2010) [査読有] doi: 10.1016 /j.intimp.2009.12.015.

Nakai N, Kishida T, Shin-Ya M, Imani shi J, Ueda Y, Kishimoto S, Mazda O. Therapeutic RNA interference of mali gnant melanoma by electrotransfer of small interfering RNA targeting Mitf. *Gene Therapy.*, 14:357-365 (2007) [査読有] PMID:17024102

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7件)

Nakai N, Kishida T, Katoh N. Anti-tumor effect of Japanese herbal medicine Ninjinto in mouse melanoma: Efficacy of preventive treatment. *Traditional & Kampo Medicine.*, 2: 14-22 (2015) [査読有] DOI: 10.1002/tkm2.1010

Nakai N, Okuzawa Y, Katoh N. Clinical usefulness of Mohs' chemosurgery for palliative purposes in patients with cutaneous squamous cell carcinoma with risk factors or without indication for surgery: Three case reports. *J Dermatol.*, 42:405-7 (2015) [査読有] DOI: 10.1111/1346-8138.12767.

Nakai N, Katoh N. Melanoma arising from the epidermis overlying an acquired intradermal nevus on the forehead. *Indian J Dermatol Venereol Leprol.*, (2015 in press) [査読有]

Nakai N, Hagura A, Yamazato S, Katoh N. Mycosis fungoides palmaris et plantaris successfully treated with radiotherapy: case report and mini-review of the published work. *J Dermatol.*, 41:63-67 (2014) [査読有] DOI: 10.1111/1346-8138.12308.

Yamazato S, Nakai N, Katoh N. A case of cutaneous squamous cell carcinoma arising in an actinic keratosis on the face in a centenarian woman successfully treated with surgery.

Indian J Dermatol., 59:304-306 (2014)
[査 読 有] DOI:
10.4103/0019-5154.131425.

研究者番号 : 80453108

Isohisa T, Nakai N, Kishimoto M, Katoh N. Skin infiltration of nodal peripheral t-cell lymphoma-not otherwise specified identified by skin biopsy of faint eruptions. Indian J Dermatol., 58:247 (2013) [査読有] DOI: 10.4103/0019-5154.110899.

Yamamoto Y, Nakai N, Wakabayashi Y, Okuzawa Y, Asai J, Takenaka H, Katoh N. A case of advanced cutaneous squamous cell carcinoma of the lower eyelid that was successfully treated with tegafur-gimeraciloteracil potassium monotherapy. J Am Acad Dermatol., 67:e233-234 (2012) [査読有] DOI: 10.1016/j.jaad.2012.04.038.

〔学会発表〕(計3件)

中井章淳、大下彰史、中川有夏、澤田貴裕、田嶋佐妃、奥沢康太郎、加藤則人、皮膚がん患者に対する Mohs ペーストの有用性と適応：自験3例と文献的考察。第137回日本皮膚科学会宮崎地方会2014年3月9日 シェラトングランデオーシャンリゾート(宮崎市)

Nakai N, Katoh N. In vitro and in vivo evaluation of the antitumor effect of herbal medicine Ninjin-to in mouse melanoma. 9th Asian Dermatological Congress, 10-13 July 2013. Hong Kong (China).

中井章淳、山里志穂、羽倉麻美、加藤則人、Mycosis fungoides palmaris et plantaris の1例、第112回日本皮膚科学会総会、2013年6月14日-16日 パシフィコ横浜(横浜市)

〔図書〕(計1件)

中井章淳 : Chapter 5 患者からよく質問され、答えに難渋するもの Question 53 「アトピー性皮膚炎によくない食物について教えてください」と聞かれたら・・・、エキスパートが答える！アトピー性皮膚炎 Q&A 55. 加藤則人(編) 診断と治療社、142-143 (2014)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中井 章淳 (NAKAI, Noriaki)
京都府立医科大学・大学院医学研究科・皮膚科学・講師