

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：13501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670522

研究課題名(和文)革新的な簡便化皮膚癌遺伝子変異検索法の開発

研究課題名(英文)Development of an innovative, simple system to detect the critical gene mutations of skin cancers

研究代表者

島田 眞路 (SHIMADA, Shinji)

山梨大学・その他部局等・その他

研究者番号：10114505

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：皮膚癌の治療抵抗性に本質的に関わる遺伝子変化を同定する研究を簡単に行うシステムを以下のように構築した。細胞に強制発現させるとランダムに様々な遺伝子変異を引き起こす遺伝子(AID)をマウスメラノーマ細胞に安定導入する。それをマウスに接種し、抗がん剤や免疫療法で治療を行う。治療に抵抗して増殖した癌細胞を採取、遺伝子変異、発現プロファイルの変化を治療前と比較し、皮膚癌の治療抵抗性に関わる可能性がある多数の候補遺伝子を同定し、解析を進めた。例として、Nupr1の発現上昇が抗がん剤感受性低下に、Timp3の発現量低下がT細胞感受性に関与することが明らかとなり、当システムの有用性も示唆された。

研究成果の概要(英文)：We have developed simple system to identify the genetic changes that induced treatment resistances of skin cancers. We transduced AID gene, that is known to induce random mutations in the transduced cells, into B16 murine melanoma cells. Then, we treated mice bearing the tumor with anticancer drugs and a cancer vaccine. Grown tumors were collected, and the status of gene mutation and gene expression profiles were compared with pre-treatment tumor cells. In the result, we could identify many genetic changes as candidates for the factors of treatment resistance. For example, resistance to anticancer drugs was mediated by upregulation of Nupr1, and resistance to a cancer vaccine was mediated by downregulation of Timp3. These findings suggested usefulness of our system to identify the important factors that induce treatment resistances of skin cancers.

研究分野：皮膚免疫

キーワード：AID メラノーマ Nupr1 Timp3

1. 研究開始当初の背景

皮膚癌は世界的に発症が増加しており、進行期はもとより初期のものであっても発生部位によっては著しく患者 QOL を阻害する。それは、現状の治療方法が外科切除、化学療法、放射線療法に限定されることによる。近年、癌の進展に重要な役割を果たす分子のみを選択的に阻害することで効率よく癌を制御する分子標的薬が開発され、劇的な効果も報告されている。こうした標的分子の多くは臨床像、臨床経過が明らかな多数のヒト由来サンプルを解析して明らかにされてきたため、今後こうした解析は重要である。問題点はこうした解析が可能なのは患者を十分に集められる一部の施設に限られる点、倫理面の配慮が必要な点、サンプル採取量に制限がある点、などである。こうした問題点を克服した新しい研究システムを構築するのが今回の研究である。

2. 研究の目的

皮膚癌の増殖、転移、浸潤形態、免疫原性などに本質的に関わる遺伝子変異を網羅的解析により同定する研究を簡便化するシステムを構築する。細胞に強制発現させるとランダムに様々な遺伝子変異を引き起こす遺伝子 Activation induced cytidine deaminase (AID) を、レトロウイルスを用いてマウス各種癌細胞に安定導入、クローン化して、それぞれの in vivo での生物学的動向を観察し、増殖、転移、浸潤形態、免疫原性などにおいて動向が大きく異なるクローン間の遺伝子変異を比較し、原因遺伝子を同定する。

3. 研究の方法

(1) マウス AID 遺伝子の Open reading frame を単離するための PCR プライマーを公共遺伝子データベースの情報を参考にして作成した。

(2) マウス B 細胞から抽出した total RNA を用いた RT-PCR によって mouse AID の cDNA を単離し、レトロウイルスベクターを用いてマ

ウスメラノーマ細胞株 B16 に安定導入した。

(3) マウス AID 遺伝子を強制発現させた B16 メラノーマ (B16-AID) に in vitro での無血清培養というプレッシャーをかけ、mock 導入 B16 (B16-mock) と比較した。そしてプレッシャーをかける前後の B16-AID の遺伝子発現状況を GeneChip で比較、発現量の相違が大きかった遺伝子を単離して B16 に強制発現させて、その機能を解析した。

(4) B16-AID と B16-mock を B6 マウス皮下に接種し、3 日後に IL-12 産生自己癌細胞ワクチンで治療し、治療抵抗性の有無を確認した。そして治療に抵抗して増大した B16-AID をマウスから採取し、治療前の B16-AID との間で遺伝子発現状況を GeneChip で比較、発現量の相違が大きかった遺伝子を単離して B16 に強制発現させて、その機能を解析した。

4. 研究成果

(1) マウス B 細胞から抽出した total RNA より作成した cDNA を鋳型に、RT-PCR によってマウス AID の cDNA を単離し、レトロウイルスベクターを作成した。これを用いて、ウスメラノーマ細胞株 B16 にマウス AID 遺伝子を安定導入した。ウエスタンブロットで B16 はもともと AID 蛋白を発現しないが、B16-AID では強制発現されたことが確認できた。B16-AID と B16-mock は in vitro の通常培養条件では増殖速度に差がないことを MTT アッセイにて確認した (図 1)。

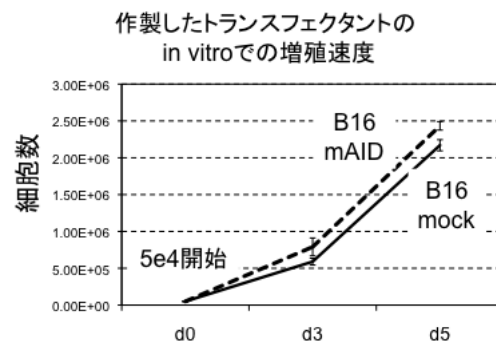


図1 B16メラノーマの遺伝子不安定性を増強する目的でAID遺伝子導入 B16メラノーマ細胞株を作製した

(2) B16-AID を *in vitro* で無血清培養すると、B16-mock と比較して生存が向上することを確認した。

(3) *in vitro* 無血清培養で増殖した B16-AID の遺伝子発現を GeneChip にて培養前の B16-AID と比較した。発現が2倍以上上昇した遺伝子は74個、1/2以下に減少した遺伝子は72個であった。

上昇した遺伝子の一つ、Nuclear protein 1 (Nupr1) は免疫染色を行ったヒトメラノーマ組織7つすべてにおいて、メラノーマ細胞の核に発現されていた。ヒト Nupr1 遺伝子を単離しレトロウイルスベクターを作成、ヒトメラノーマ細胞株に強制発現すると、*in vitro* でのダカルバジン抵抗性を獲得することを、MTT アッセイで確認した(図2)。

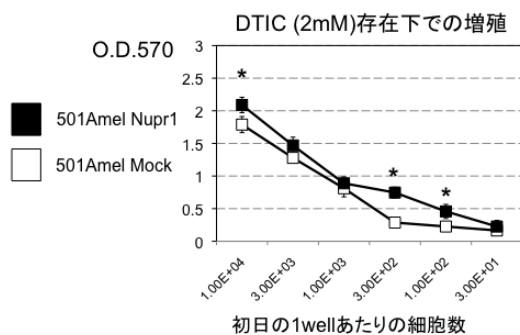


図2 Nupr1を強制発現させたヒトメラノーマはDTIC耐性を獲得する。(MTT assay、5日間培養)

(4) *in vivo* 癌ワクチン治療に抵抗して増殖した B16-AID の遺伝子発現を GeneChip にて *in vivo* 接種前の B16-AID と比較した。発現が2倍以上上昇した遺伝子は57個、1/2以下に減少した遺伝子は46個であった。減少した遺伝子の一つ、Tissue inhibitor of metalloproteinase-3 (Timp3) は免疫染色を行ったヒトメラノーマ組織7つすべてにおいて、メラノーマ細胞に発現されていた。予後良好群で強く発現される傾向が見られた。ヒト Nupr1 遺伝子を単離しレトロウイルスベクターを作成、ヒトメラノーマ細胞株に強制発現すると、*in vitro* でメラノーマ特異的キラーT細胞 (CTL) と共培養した際の、CTL からの認識が上昇することを、IFN 放出アッセイ (図3a) と細胞障害アッセイ (calcein AM release assay) (図3b) で確認した。

らの認識が上昇することを、IFN 放出アッセイ (図3a) と細胞障害アッセイ (calcein AM release assay) (図3b) で確認した。

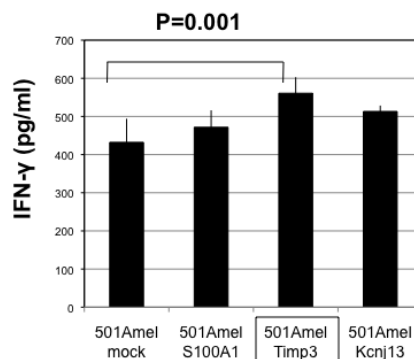


図3a Timp3を強制発現するとCTL感受性が上昇する

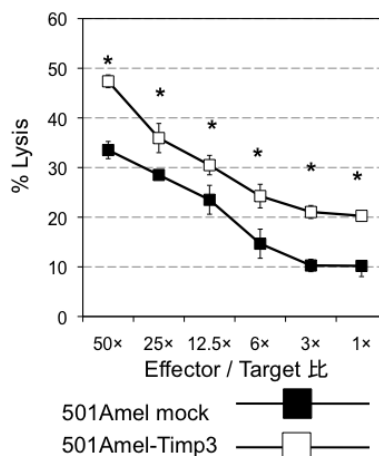


図3b Timp3を強制発現するとCTL感受性が上昇する

以上よりメラノーマ細胞上の Timp3 はメラノーマ細胞の T 細胞感受性を示唆する、Nupr1 はヒトメラノーマ細胞の抗がん剤感受性を示唆するバイオマーカーとなりうる可能性が示された。さらに、Timp3 の発現レベルを上昇させることでメラノーマの免疫療法感受性を増強させ、Nupr1 を阻害する事で抗がん剤感受性を増強させる、という治療戦略に結びつけることも可能と考えられた。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文) (計1件)

(1) Inozume Takashi, Yaguchi Tomonori, Furuta Junpei, Harada Kazutoshi, Kawakami Yutaka, Shimada Shinji. Melanoma Cells Control Antimelanoma CTL Responses via Interaction between TIGIT and CD155 in the

Effector Phase. J Invest Dermatol. 査読有、136,2016,255-63.DOI:10.1038/JID.2015.404

(学会発表) (計6件)

(1) Inozume Takashi, Tomonori Yaguchi, Kawakami Yutaka, Shimada Shinji. Co-blockade of TIGIT and PD-1 signals in tumor infiltrating cytotoxic T lymphocytes is an effective anti-melanoma therapy, The 40th annual meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, 2015年12月11日-13日、岡山コンベンションセンター、岡山県、北区

(2) 猪爪隆史、原田和俊、島田眞路、高頻度遺伝子変異導入システムを利用したメラノーマ治療の成否を左右する重要因子の検索、第114回日本皮膚科学会総会、2015年5月29日-5月31日、パシフィコ横浜、神奈川県、横浜市

(3) Inozume Takashi, Tomonori Yaguchi, Kawakami Yutaka, Shimada Shinji. Blockade for CD155-TIGIT interaction is an effective therapy for melanoma, Society for Investigative Dermatology The 40th annual meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, 2015年5月6日-9日、Hilton Atlanta, Atlanta (USA)

(4) 島田眞路、皮膚の免疫学 皮膚科よもやま話、第20回茨城皮膚、アレルギー懇話会(招待講演)、2015年2月4日、つくば国際会議場、茨城県、つくば市

(5) Inozume Takashi, Tomonori Yaguchi, Furuta Junpei, Kawakami Yutaka, Shimada Shinji. Blockade for CD155-TIGIT interaction elicits anti-melanoma T cell responded in vitro and in vivo, The 39th annual meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, 2014年12月12日-14日、ホテル阪急エキスポパーク、大

阪、吹田市

(6) Inozume Takashi, Tomonori Yaguchi, Furuta Junpei, Harada Kazutoshi, Kawakami Yutaka, Shimada Shinji. CD155-TIGIT interaction is an immune checkpoint regulating anti-melanoma immune responses, 2014 annual meeting of Society for Investigative Dermatology, 2014年5月7日-10日、Albuquerque Convention Center, Albuquerque (USA)

(図書) (計1件)

1) 猪爪隆史、島田眞路、南山堂、癌と免疫 第2部 15 がん免疫における共刺激分子、共抑制分子と免疫チェックポイント、2015、10ページ 120-129

(その他)

ホームページ等

<http://www.med.yamanashi.ac.jp/clinical/dermatol/>

6. 研究組織

(1) 代表研究者

島田 眞路 (SHIMADA Shinji)

山梨大学・総合研究部・教授

研究者番号：10114505

(2) 分担研究者

猪爪 隆史 (INOZUME Takashi)

山梨大学・総合研究部・講師

研究者番号：80334853

(3) 岡本 崇 (OKAMOTO Takashi)

山梨大学・総合研究部・助教

研究者番号：30402043