

平成 21 年 5 月 14 日現在

研究種目：基盤研究(B)
 研究期間：2006～2008 年度
 課題番号：18390476
 研究課題名（和文） 形態形成遺伝子導入による悪性黒色腫の新たな治療法の開発に向けて
 研究課題名（英文） Development of novel therapy for malignant melanoma by morphogenetic gene transfer
 研究代表者
 山本 有平(YAMAMOTO YUHEI)
 北海道大学・大学院医学研究科・教授
 研究者番号：70271674

研究成果の概要：

われわれがこれまでに行ってきた研究では、形態形成遺伝子である *PAX4* および *PAX9* の発現が、悪性黒色腫において低下していることが確認されている。本研究では形態形成遺伝子のひとつである *PAX9* 遺伝子を、悪性黒色腫細胞に強制発現させ、その生物学的意義を検討したが、*PAX9* 遺伝子単独では、悪性黒色腫細胞の増殖抑制に寄与しない可能性が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	5,700,000	1,710,000	7,410,000
2007 年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2008 年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
年度			
年度			
総計	15,200,000	4,560,000	19,760,000

研究分野：医師薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・形成外科学

キーワード：悪性黒色腫、形態形成遺伝子、遺伝子導入

1. 研究開始当初の背景

悪性黒色腫は各種治療法に対して抵抗性がある、極めて予後不良な皮膚悪性腫瘍の一つであり、わが国でも徐々に発生病数は増加しつつある。

一方、形態形成のマスター調節遺伝子としてホメオボックス遺伝子(形態形成遺伝子)が知られているが、この形態形成遺伝

子は、形態形成プログラムを空間位置情報に変換し、細胞接着因子や細胞間情報伝達物質の発現を調節しながら形成を進めていく。

生命予後に大きく関与する癌の浸潤・転移および組織構築の異常を発生生物学的に考察すると、基本的には細胞の持つ固有の空間的位置情報の変化が原因と捉える

ことができる。つまり形態形成遺伝子が強く関わっていると考えられ、現在まで癌細胞においても多くの形態形成遺伝子が発現していることが明らかにされている。

これまでに、われわれの研究室では、形態形成遺伝子と癌との関連に着目し、主に、新たな診断法の開発において成果を生み出してきた。(平成13~15年度 基盤研究(B): 悪性黒色腫の転移・浸潤に関するマスター遺伝子の解析、平成16~17年度 基盤研究(B) 形態形成遺伝子の発現パターン解析による新しい悪性黒色腫の診断・治療戦略)。そして、これまでの成果を、新たな治療法の開発へと発展させることを主眼においた研究を実行したいと考えた。

2. 研究の目的

(1) 今回の研究では、悪性黒色腫細胞に、形態形成遺伝子である *PAX* 遺伝子を導入・強発現させ、形態形成遺伝子による悪性黒色腫細胞増殖抑制作用機構を解明することを目的とする。

(2) *in vitro* での研究結果により、*PAX* 遺伝子導入悪性黒色腫細胞をヌードマウスに移植して、*in vivo* における悪性黒色腫細胞の臓器転移や転移巣における増殖能の変化を探ることで、遺伝子治療の臨床応用への可能性を探り、*PAX* 遺伝子の悪性黒色腫細胞における増殖抑制作用機序を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 悪性黒色腫細胞への *PAX9* 遺伝子導入

われわれはまず、*PAX9* 発現ベクターを作成し、種々の悪性黒色腫細胞株のうちで *PAX9* を内因性にほとんど発現していない細胞株 C8161 に抗生物質ハイグロマイシンにてセレクション、*PAX9* 遺伝子発現ベクター導入細胞、お

よび対照となる空ベクター導入細胞を得た。これらの細胞を用いて RT-PCR を行い、*PAX9* 遺伝子導入細胞において mRNA レベルにおいて *PAX9* が発現していることを確認した。

(2) 細胞増殖能の検討

悪性黒色腫における *PAX9* の発現低下の生物学的意義を検討するために、*PAX9* 遺伝子発現ベクター導入細胞、および空ベクター導入細胞を用いて、MTT assay を行い細胞増殖能の変化を検討した。

(3) 臨床検体における病理組織学的検討

皮膚悪性黒色腫3例、色素歳母斑4例について *PAX9* 発現形態に関する病理組織学的検討を行った。皮膚悪性黒色腫3例からは、癌組織3検体と非癌部皮膚組織3検体を採取している。すべての検体において、HE染色および *PAX9* 免疫染色を行った。

4. 研究成果

(1) 悪性黒色腫細胞における *PAX9* の内因性発現を RT-PCR により確認した(図1)。その結果、C8161細胞における内因性発現がほとんどないことが確認された。この結果より、C8161に *PAX9* 遺伝子発現ベクターを導入することとした。

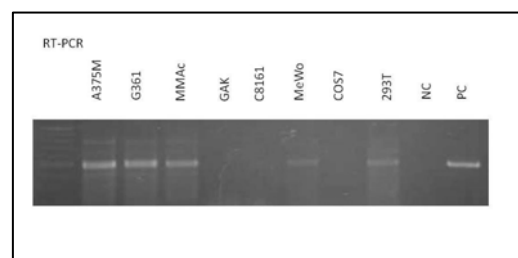


図1: RT-PCR

(2)

リポフェクション法により C8161 に *PAX9* 遺伝子発現ベクターを導入した。ハイグロマイ

シンを添加した培養液において細胞培養を行い、*PAX9* 遺伝子発現ベクター導入細胞、および対照となる空ベクター導入細胞を得ることができた (図 2)。

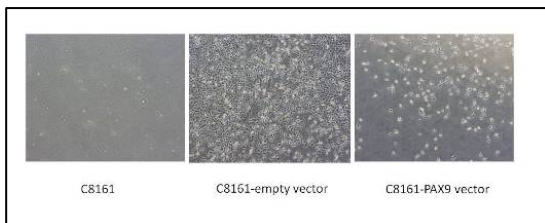


図 2 : C8161 へ遺伝子導入後 14 日後.

(3)
PAX9 遺伝子発現ベクター導入細胞、および対照となる空ベクター導入細胞を用いて RT-PCR を行い、*PAX9* 遺伝子導入細胞において *PAX9* が強発現していることが確認された (図 3)。

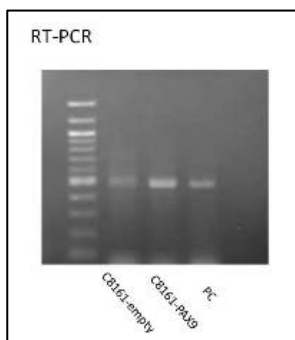


図 3: RT-PCR

(4)
MTT assay により細胞増殖能の検討をおこなった。*PAX9* 遺伝子導入細胞の増殖能が最も低くなることが予想されたが、実際には空ベクター導入細胞の増殖能が低く、期待された結果は得られなかった (図 4)。

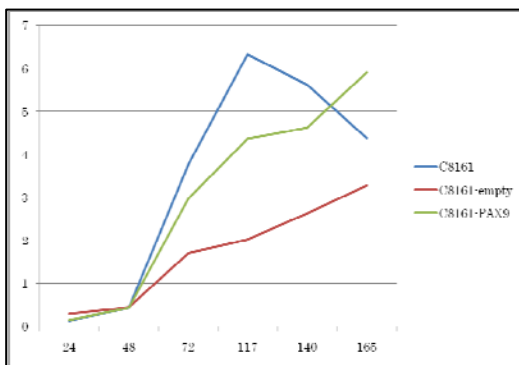


図 4 : MTT assay

(5)

皮膚悪性黒色腫 3 例から、癌組織 3 検体と非癌部皮膚組織 3 検体、および色素性母斑 4 検体を採取し、免疫組織学的な検討を行った (図 5)。しかし、これらの検体において *PAX9* 発現様式に明らかな差異を見出すことはできなかった。

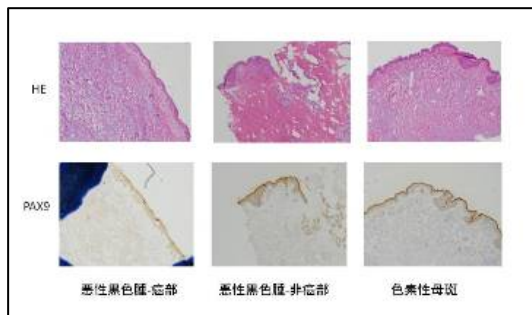


図 5: 病理組織学的検討

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 1 件)

- ① Shinya Hata, Jun-ichi Hamada, Kazuhiko Maeda, Taichi Murai, Mitsuhiro Tada, Hiroshi Furukawa, Arata Tsutsumida, Akira Saito, Yuhei Yamamoto, Tetsuya Moriuchi. PAX4 has the potential to function as a tumor suppressor in human melanoma. International Journal of Oncology 33; 1065-1071, 2008. 査読有

[学会発表] (計 1 件)

- ① 畠真也、浜田淳一、守内哲也、堤田新、古川洋志、齋藤亮、山本有平：色素性母斑および悪性黒色腫における *PAX* 遺伝子の発現. 第 8 回メラノーマ研究会、札幌市、2006. 9. 2

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 有平 (YAMAMOTO YUHEI)
北海道大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：70271674

(2) 研究分担者

守内 哲也 (MORIUCHI TETSUYA)
北海道大学・遺伝子制御研究所・教授
研究者番号：20174394

古川 洋志 (FURUKAWA HIROSHI)
北海道大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号：00399924

関堂 充 (SEKIDO MITSURU)
筑波大学・大学院人間総合科学研究科・教授
研究者番号：40373355

佐々木 了 (SASAKI SATORU)
北海道大学・大学院医学研究科・非常勤講師
研究者番号：40301907

堤田 新 (TSUTSUMIDA ARATA)
北海道大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号：00374489

(3) 連携研究者

なし