

令和元年6月1日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16339

研究課題名(和文) 悪性黒色腫のエピゲノム解析および免疫治療におけるバイオマーカーの検討

研究課題名(英文) Epigenomic analysis of malignant melanoma and examination of biomarkers in immunotherapy

研究代表者

藤原 進 (Fujiwara, Susumu)

神戸大学・医学研究科・助教

研究者番号：40645389

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：悪性黒色腫は色素細胞ががん化した悪性度の高い皮膚がんです。メチル化というDNAの修飾は悪性黒色腫の発症に関与していることが知られています。メチル化を検討する場合、正常な細胞と悪性細胞を比較することが必要であり、同じ患者さんから得られたものを比較することが最も正確で望ましいと考えられます。正常な色素細胞を得ることは難しかったのですが、新たな方法で可能となりました。そこでメチル化の検討を行った結果、悪性黒色腫においてメチル化に変化を示す遺伝子が多数見つかりました。とくにNPM2という遺伝子は、正常な色素細胞や黒子では認められますが、黒色腫では認められなくなることが新たにわかりました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

黒色腫と正常色素細胞のメチル化の状態に差異があることは以前から知られていましたが、今回同じ患者さんから得られた黒色腫と色素細胞の解析結果からは新たな発見が多数あり、過去知られていた事実と異なる点も見えてきました。このことからメチル化を研究する場合、同じ患者さんからの細胞を検討することがやはり重要であるといえます。またその解析結果から、悪性黒色腫を診断できる可能性のある新たなマーカーが見つかりました。今後その分子に着目することで悪性黒色腫がどのように発症するのかを検討することが出来ます。さらに新たな治療につながる可能性もあります。

研究成果の概要(英文)：DNA methylation is considered the primary epigenetic mechanism underlying the development of malignant melanoma. Since DNA methylation can be influenced by environmental factors, it is preferable to compare cancer and normal cells from the same patient. We employed a novel epidermal sheet cultivation technique to isolate normal melanocytes from unaffected sites of melanoma patients. Our analysis discovered methylation at several novel loci (KRTCAP3, AGAP2, ZNF490). Subsequent studies revealed that NPM2 was hypermethylated and downregulated in melanomas. In many normal melanocytes, NPM2 showed distinct immunohistochemical staining, while its expression was lost in malignant melanoma cells. In particular, intraepithelial lesions of malignant melanoma, an important challenge in clinical practice, could be distinguished from benign nevi. NPM2 immunoreactivity could be used to differentiate melanomas from normal melanocytes or benign disease.

研究分野：皮膚腫瘍

キーワード：悪性黒色腫 色素細胞 母斑 エピジェネティック メチル化 NPM2 病理 マーカー

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

高齢化、オゾン層破壊、生活様式の変化に伴って、悪性黒色腫患者数は全世界的に急激に増加している。これまでに悪性黒色腫の発症に関連する遺伝子がいくつか報告されているが、最近では、エピジェネティックな変化の発がんへの関与が注目されている。臨床的に骨髄異形成症候群の脱メチル化剤による治療が大成を収めているし、悪性黒色腫においてもエピジェネティックな変化が重要であることは多数報告されており (Cell. 2012 Sep 14;150(6):1135-46)、実際の治療条件において脱メチル化剤の有用性も報告されており (PNAS.2014 Aug 11(32):11774-79) (J Invest Dermatol. 2016 Sep, 10.1016/j.jid.2016.08.024)。制御性 T 細胞 (Treg) や骨髄由来抑制細胞 (MDSC) といった腫瘍免疫に重要な抑制性細胞にも影響を与えることが示されている。

これまでも悪性黒色腫のメチル化の解析については、新たに樹立した悪性黒色腫細胞株を用いて脱メチル化剤使用前後による DNA のメチル化状態の網羅的解析 (BMC Med Genomics. 2010 Feb 9;3:4.) や、悪性黒色腫と他患者由来の色素細胞のメチル化状態の比較 (Genome Res. 2009 Aug;19(8):1462-70.) が報告されている。しかし、最も重要と考えられる同一個体由来の正常色素細胞と黒色腫細胞との比較はほとんど行われていない。それは高齢患者から解析に必要な正常色素細胞量を分離することが困難なためと考えられる。悪性黒色腫は外環境の影響を密に受ける腫瘍であるため、紫外線を中心とした外的因子によりメチル化状態に大きな影響を受けていると考えられる。そのため、悪性黒色腫細胞の DNA のメチル化状態の意義を明確にするためには、同一個体で特に同一部位由来の正常色素細胞との比較解析が非常に重要と考えた。我々が検索した限りでは、過去に一例のみ同一個体由来の黒色腫細胞および正常色素細胞を比較した報告が認められる (J Cell Physiol. 2006 Jun;207(3):697-705.) が、この報告は転移巣の悪性黒色腫細胞と色素細胞を比較したもので、同一部位由来ではない。この経緯から、同一個体かつ同一部位由来の黒色腫細胞と正常色素細胞を比較した解析を行いたいと考え、本研究を遂行した。

また悪性黒色腫に対して古くから免疫療法が試みられてきた。腫瘍免疫賦活化処置と抑制性細胞の制御処置を組み合わせることにより、マウスモデルでは腫瘍拒絶の成功例が報告されている。最近我々は、C57BL/6 マウスに B16F10 悪性黒色腫細胞を接種し腫瘍塊を形成させたのち、正の補助刺激因子である OX40 agonist の全身投与を行っても抗腫瘍効果は誘導できないが、腫瘍内 CD4 陽性細胞の一過性除去と OX40 agonist 投与を組み合わせると、相乗的な抗腫瘍免疫反応を誘導しうることを示した (J Invest Dermatol.134:1884-92, 2014)。CD4 陽性細胞除去によって、腫瘍周囲に多数の CD8 陽性細胞障害性 T 細胞およびナチュラルキラー細胞が浸潤し、抗腫瘍性サイトカインの上昇、細胞障害性因子の上昇を認めた。しかし、その一方で、MDSC が腫瘍内に多数増加する現象を確認しており、その現象は CD8 陽性細胞障害性 T 細胞の腫瘍内浸潤に反応していることから、生体のホメオスタシスによる働きの一環と推測され、重要な反応の一つと考えている。これ等、黒色腫腫瘍免疫の基礎研究の集積により、分子標的薬をはじめとした新たな抗悪性腫瘍薬が多数生み出されてきており、負の補助刺激受容体である Programmed cell death 1 (PD-1) および Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 (CTLA-4) を阻害する薬剤が開発され 2 種の抑制性の免疫チェックポイント分子の両者を阻害する臨床試験では、高容量群で奏効率が 50% を超える良好な治療成績が示されており (N Engl J Med.369:122-33, 2013)、今後の治療に大きな期待が寄せられている。我々の上述のマウスモデルの研究結果から、ヒトの悪性黒色腫においても細胞障害性 T 細胞の腫瘍内浸潤に対抗する形で MDSC が増加し、抗腫瘍免疫反応に影響を及ぼしているのではないかと推測している。そのため、2015 年度から実施している課題番号 15K19691「悪性黒色腫の免疫治療における骨髄由来抑制細胞の動態・機能解析とその制御」に引き続き、悪性黒色腫の新規免疫治療薬である PD-1 阻害剤使用前後における臨床検体の腫瘍周囲環境における免疫細胞の動態やサイトカインなどの液性因子の推移に着目し、新規バイオマーカーの検索をしていきたいと考えた。

このように今後強く期待される免疫チェックポイント阻害剤であるが、前述の (PNAS.2014 Aug 11(32):11774-79) (J Invest Dermatol. 2016 Sep, 10.1016/j.jid.2016.08.024) で示されるごとく、その治療効果を阻害している因子として Treg や MDSC の存在があり、この抑制性細胞を制御し、より治療効果を高めるためにメチル化阻害剤の有効性が報告されている。そのため、本研究では申請者が以前から継続して行っている悪性黒色腫のエピゲノム解析および抗 PD-1 阻害剤を中心とした免疫治療におけるバイオマーカー解析の 2 点を並行して行うことを目的とした。

2. 研究の目的

1. エピゲノム関連

(1) 複数の悪性黒色腫症例において、同一個体かつ同一部位由来の正常色素細胞との DNA メチル化を比較解析する。同時にマイクロアレイを用いた遺伝子発現解析を加え、悪性黒色腫の発生・進展に重要と考えられる遺伝子を明らかにする。

(2) 上記(1)で絞り込んだ候補遺伝子について、病理組織にて免疫染色による検討および real time PCR の手法を用いてメチル化状態や遺伝子発現の状態の確認を行い、黒色腫細胞と正常色素細胞での発現の差異を確認し、病理組織診断における鑑別マーカーとしての可能性を探索する。

(3)上記(2)の候補遺伝子の発現状態について、メチル化による影響が疑われた場合には、脱メチル化剤による検討を加え、治療の標的分子としての可能性について明らかにする。

2. 腫瘍免疫関連

新規利用開始になった抗 PD-1 抗体の使用前後における患者腫瘍周囲環境におけるエフェクター細胞や MDSC、制御性 T 細胞などの浸潤細胞のサブタイプ解析を行う。また腫瘍組織および患者末梢血を用いて腫瘍免疫に関連したサイトカインなどの因子の発現解析を行う。

3. 研究の方法

本研究のもっとも重要な点は、同一患者の同一部位からの悪性黒色腫細胞および正常色素細胞でのメチル化状態を網羅的に比較することである。現在までに 4 例の高齢悪性黒色腫患者から正常色素細胞を十分量得ることに成功した。この検体を用いて、illumina HumanMethylation450, illumina HumanHT-12 マイクロアレイを用いて、網羅的なメチル化および遺伝子発現の状態を調べる。非常に大きなデータとなるため、解析手法としてメチル化および遺伝子発現解析 software を用いた総合的な解析を行う。4 例の悪性黒色腫に共通に認められる DNA メチル化を特定し、その遺伝子発現との相関を検討し、意味のあるメチル化 CpG 領域および遺伝子を絞り込む。4 例のみの解析であるため追加検体を用いた確認を行っていくことが必須であり、この基本となる解析結果を踏まえ以下の検討を加えていく。

(1)過去の標本および今後得られる悪性黒色腫の臨床検体 10 例程度のホルマリン固定パラフィン包埋サンプルを準備する。タカラバイオ株式会社の NucleoSpin® FFPE DNA などの抽出試薬を用いて DNA を抽出する。絞り込んだ候補メチル化部位 10 領域程度について、特異的なプライマーを作成する。Real time methylation specific PCR によってメチル化状態を定量的に確認する。

(2)当該患者の病理組織標本にて、上記(1)の候補メチル化を含む分子に対する免疫染色を行い発現を検討する。(3)上記(1),(2)の検討を行い、悪性黒色腫でのメチル化、もしくは脱メチル化、蛋白発現が確からしいと確認されたものについて、当施設に保管されている過去の黒色腫標本および実臨床において鑑別が問題となる色素細胞性母斑標本それぞれ 10 検体程度における検討を加え、診断における鑑別マーカーとしての可能性を探索する。

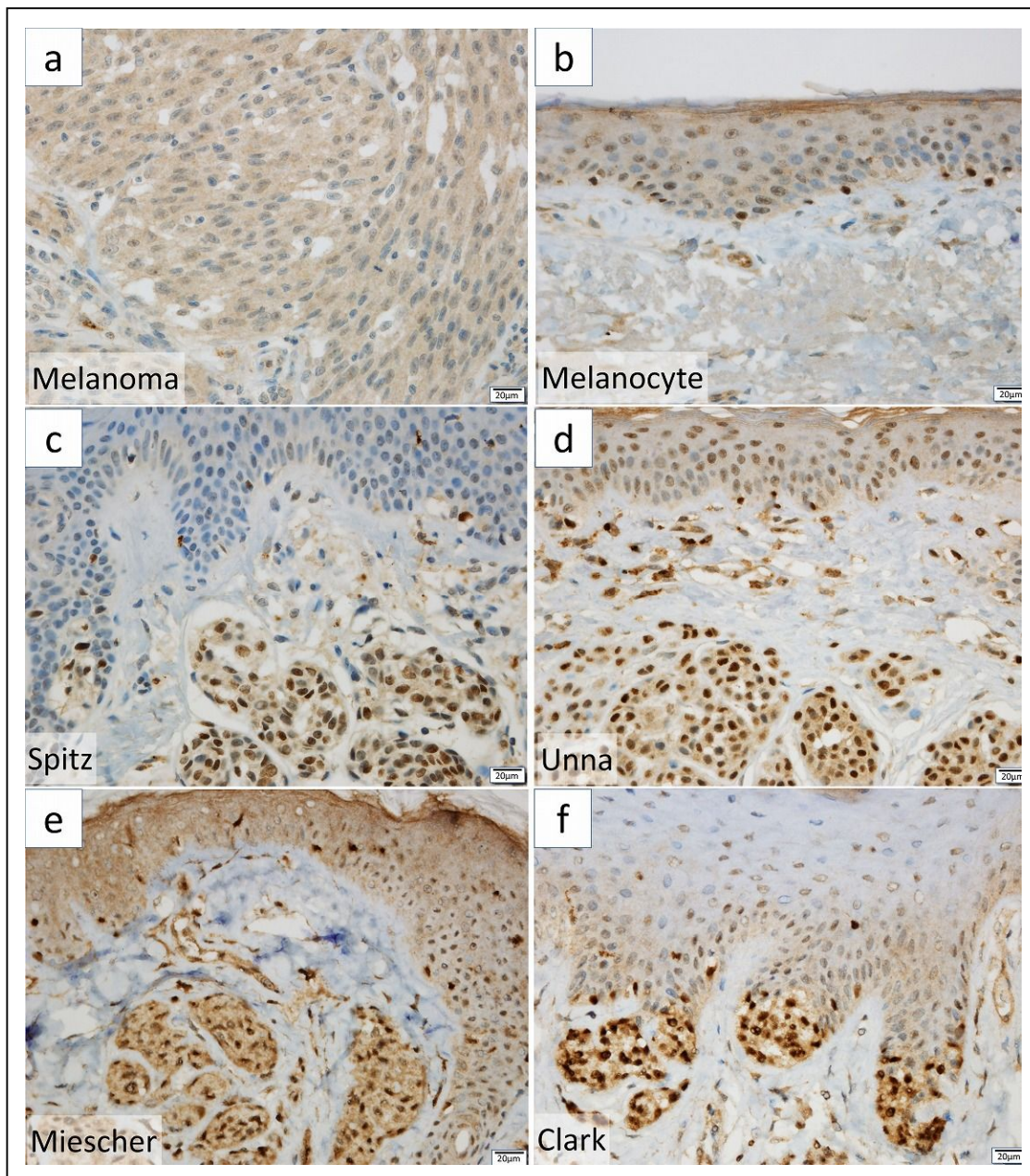
2. 腫瘍免疫関連

臨床検体での抗 PD-1 抗体使用前後における腫瘍周囲環境における免疫因子の解析準備を進める。ヒトサンプルを用いる研究となるため、まず初年度に臨床研究のための倫理規定基準に照らした当施設における実施計画審査を受ける。皮膚転移病巣を有する症例の場合などは、治療前後において腫瘍組織を得ることが可能と考えるが、そうした症例数は決して多くはないものと予測される。MDSC は腫瘍組織のみならずリンパ節や末梢血でも検出が報告されているため、抗 PD-1 抗体による治療例については、全例について治療前後の末梢血の解析も研究計画に盛り込むことを予定している。具体的な対象細胞としては、CD8 陽性 T 細胞 (CD3 陽性、CD8 陽性)、CD4 陽性 T 細胞 (CD3 陽性、CD4 陽性)、NK 細胞 (CD3 陰性、CD56 陽性)、制御性 T 細胞 (CD4 陽性、CD25 陽性、FOXP3 陽性)、MDSC (CD11b 陽性、CD14 陰性、CD33 陽性)、M2 マクロファージ (CD68 陽性、CD163 陽性、CD204 陽性、CD206 陽性) の浸潤程度をフローサイトメトリーで評価する。MDSC の浸潤を認めた場合、monocytic MDSC (CD11b 陽性、CD33 陽性、HLA-DR low、CD14 陽性、CD15 陰性)なのか、あるいは granulocytic MDSC (CD11b 陽性、CD33 陽性、HLA-DR 陰性、CD14 陰性、CD15 陰性)なのかも明らかにする。年間の解析症例数は 3 例以上、可能であれば 5 例程度を目標とする。臨床検体の場合、得られる腫瘍組織量に限りがあるため、腫瘍局所の免疫細胞の浸潤は免疫染色で評価を行い、液性因子の解析は腫瘍組織のリアルタイム PCR によって行う。interferon (IFN)-、tumor necrosis factor (TNF)-、interleukin (IL)-2、IL-12 などのサイトカイン、Granzyme B や Perforin などの細胞障害性因子の mRNA の発現レベルを検討するとともに、IL-10 や transforming growth factor (TGF)-、Arginase-1、inducible nitric oxide synthase (iNOS)、indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) などの抑制性因子や PD-1、PD-L1 などの負の T 細胞補助刺激分子についても発現を検討する。

4. 研究成果

申請者は中～高齢患者からでも、正常色素細胞を分離して得る手法を確立した。この手法を用いて 4 例の高齢悪性黒色腫患者から正常色素細胞も十分量得ることに成功し、他患者の色素細胞や悪性黒色腫の症例を加え、網羅的なメチル化状態の比較検討を行った結果、他報告では認められなかった特徴的なメチル化状態の遺伝子を複数認めた。それと同時に既報告でメチル化に差異が認められたと報告されていた COL1A2 や GPX3 は、今回のサンプルからは差が認められなかった。この結果から同一患者からフレッシュなサンプルを用いて解析しなければ、メチル化状態を正確に評価することが難しい可能性が示唆される。また同時に行ったマイクロアレイを用いた遺伝子発現解析を加え、悪性黒色腫において特に高いメチル化を示し、mRNA の発現が低下する遺伝子を候補遺伝子としてピックアップした。候補遺伝子について臨床標本を用いて免疫染色を行い、実際に悪性黒色腫と正常色素細胞の染色性に差を示す遺伝子を発見した。real time RT-PCR でも悪性黒色腫において発現が低下することが確認された。

NPM2 に関して悪性黒色腫 32 症例、良性母斑 42 症例、正常メラノサイト 67 例の染色を行った結果、臨床的に最も問題となる悪性黒色腫の in situ 病変および clark 母斑と良性の色素細胞との比較において染色性が異なることが示された。



今回の研究から色素性病変のメチル化状態や NPM2 の染色性を調べることで、良悪を判断できる可能性が示唆された。

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 1 件)

Fujiwara S, Nagai H, Jimbo H, Jimbo N, Tanaka T, Inoie M, Nishigori C. Gene Expression and Methylation Analysis in Melanomas and Melanocytes From the Same Patient: Loss of NPM2 Expression Is a Potential Immunohistochemical Marker for Melanoma. *Front Oncol*. 査読有. 2019 Jan 21;8:675. doi: 10.3389/fonc.2018.00675. eCollection 2018.

〔学会発表〕(計 3 件)

藤原 進、永井 宏、錦織 千佳子、田中 朋代、井家 益和

「同一患者由来の悪性黒色腫と正常色素細胞のエピジェネティクス解析および新規診断マーカー探索」

第 116 回皮膚科学会総会 2017 年

・ Susumu Fujiwara, Hiroshi Nagai, Haruki Jimbo, Tomoyo Tanaka, Masukazu Inoie, and Chikako Nishigori

「Genome-wide DNA methylation analysis in melanocytes and melanomas from the same individual」

International Pigment Cell Conference 2017

「同一患者由来の悪性黒色腫と正常色素細胞の遺伝子発現およびメチル化解析～診断マーカーとしての NPM2 の検討～」藤原 進、神保 晴紀、永井 宏、錦織 千佳子(神戸大学大学院医学研究科内科系講座皮膚科学分野) 神保 直江(神戸大学大学院医学研究科病理学講座病理診

断学分野) 田中 朋代、井家 益和 (株式会社ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング 研究開発部) 第 28 回日本色素細胞学会学術大会 2018 年

〔その他〕

ホームページ等

神戸大学皮膚科ホームページ

<http://www.med.kobe-u.ac.jp/dermat/touka/jisseki/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：錦織 千佳子

ローマ字氏名：(NISHIGORI, chikako)

研究協力者氏名：永井 宏

ローマ字氏名：(NAGAI, hiroshi)

研究協力者氏名：神保 晴紀

ローマ字氏名：(JIMBO, haruki)

研究協力者氏名：神保 直江

ローマ字氏名：(JIMBO, naoe)

研究協力者氏名：井家 益和

ローマ字氏名：(INOIE, masukazu)

研究協力者氏名：田中 朋代

ローマ字氏名：(TANAKA, tomoyo)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。