

様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：基盤研究（C）（一般）
研究期間：2007～2008
課題番号：19591319
研究課題名（和文） 悪性黒色腫においてエピジェネティック発現制御を受ける細胞遺伝子の解析
研究課題名（英文） Analysis of epigenetically regulated cellular genes in malignant melanoma
研究代表者
山下 利春（YAMASHITA TOSHIHARU）
札幌医科大学・医学部・教授
研究者番号：50167706

研究成果の概要：メラノーマの治療にインターフェロン β が使用されているが無効例が存在する。インターフェロンが奏効しない原因として、インターフェロン誘導性のアポトーシス関連遺伝子の発現が抑制されている可能性が推測される。インターフェロン β 抵抗性の細胞株の一部はインターフェロン β と TRAIL によってアポトーシスが誘導されたことより、潜在的にアポトーシス誘導性が保持されていることが示唆された。メラノーマ組織の細胞遺伝子解析より、日本人に多い末端黒子型では *N-ras/BRAF* の構造変化は稀で、*N-ras/BRAF* 遺伝子下流のシグナル伝達系が活性化されている可能性が示唆された。メラノーマ細胞でメチル化制御されている細胞遺伝子 *RASSF1A*, *XAF1*, *IRF7*, *TRAIL R1* を発現するアデノウイルスベクターを作製し、アポトーシス誘導活性を検討した。一部のメラノーマ細胞のみがインターフェロン存在下で、これら組み換えアデノウイルス感染によってアポトーシスを起こした。この結果より、未知のインターフェロン誘導性・アポトーシス関連性細胞遺伝子がメチル化抑制によって発現制御されている可能性が示唆される。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：悪性黒色腫、インターフェロン、アポトーシス、メチル化

1. 研究開始当初の背景

悪性黒色腫（メラノーマ）は色素細胞（メラノサイト）の悪性化によって発生し、高率にリンパ節および遠隔転移を起こす予後不良の皮膚癌である。放射線療法や化学療法に対する感受性がきわめて低いため、遠隔転移を起こした進行期メラノーマはきわめて難治で、病期 IV メラノーマ患者の 5 年生存率は 10% 前後ときわめて低い。メラノーマ細胞は不死化、増殖能、転移能、免疫学的寛容、アポトーシス抵抗性など多数の悪性形質を獲得している。これらの生物学的悪性形質の発現に複数の分子およびシグナル伝達系が関与することが知られるようになった。しかし、現在のところ、メラノーマの増殖抑制やアポトーシス誘導に最も効果的な標的分子あるいはシグナル経路は明らかでない。欧米人に多い表在拡大型メラノーマでは *BRAF/N-ras* 変異が多く検出され、脈絡膜メラノーマと一部の末端黒子型メラノーマでは *c-kit* の変異が報告されている。しかし、*BRAF*-kinase 阻害薬の単独投与は進行期メラノーマに無効であったと報告された。一方、日本人の 50% 以上を占める末端黒子型メラノーマの一部に *c-kit* 阻害薬が有効とされるも、多くの症例に有効な化学療法や分子標的治療は未だ研究途上にある。

現在、エビデンスのある進行期メラノーマの治療薬として、抗癌剤のダカルバジンと生物製剤のインターフェロンが使用されている。インターフェロンは培養メラノーマ細胞にアポトーシスを誘導するが、細胞株によって感受性が異なる。また、症例によって、インターフェロンの有効性に差異があることが知られている。これらの分子生物学的背景として、メラノーマ細胞の MHC クラス I 分子の発現の減弱とインターフェロン誘導性のアポトーシス関連遺伝子の発現抑制が推測されている。われわれの研究より、インターフェロン α 、 β 、 γ のうち、インターフェロン β がメラノーマ細胞

に対するアポトーシス誘導活性が最も高いことが知られた。本研究は、実際のメラノーマ治療に使用されているインターフェロン β の生物活性を細胞生物学的、分子生物学的に詳細に解析し、個別化治療の確立を目指すものである。

2. 研究の目的

日本では、メラノーマの手術後の補助療法および病期 IV 患者に対する化学療法の一部に、あるいは全身療法として、インターフェロン β が使用されている。しかし、インターフェロン β を投与したメラノーマ患者においても、リンパ節転移の出現や転移の拡大がみられる例が多い。インターフェロンに対するメラノーマの低感受性はメラノーマ細胞の MHC クラス I 蛋白質の発現低下とメラノーマ細胞のインターフェロン感受性遺伝子の発現抑制が推測される。とくに発現抑制されている細胞遺伝子の中に、インターフェロン誘導性のアポトーシス関連遺伝子が含まれている可能性が考えられる。インターフェロンによってメチルトランスフェラーゼを直接、あるいは 5-AZA-deoxycytidine (5-AZA-dC) の存在下で効率よくアポトーシスを起こすメラノーマ細胞が存在することが知られている。メチル化されている細胞遺伝子を検索・同定し、インターフェロン存在下で候補遺伝子 cDNA を導入しアポトーシス誘導を確認することによって重要な遺伝子の同定を行う。しかし、メラノーマの組織型あるいは発生部位によって発現抑制されるインターフェロン関連遺伝子の数と種は異なっている可能性が高い。

以上の研究の背景と結果をふまえて、本研究は

- 1) 外科切除したメラノーマ組織より RNA を抽出しインターフェロン関連遺伝子の発現を解析し、
- 2) これまで同定されたインターフェロン関連遺伝子を発現するアデノウイルスベクターを作製しインターフェロンと遺伝子導入によりメラノーマ

細胞にアポトーシスができるかどうかを検討する。さらに、3) 日本人に多い末端黒子型メラノーマ由来の細胞株を用いて、インターフェロン β と5-AZA-dcによってアポトーシスを起こす細胞を用いて、メチル化抑制される細胞遺伝子のクローニングを試みる。本研究は、メラノーマにおいてメチル化によって抑制されるインターフェロン関連遺伝子を同定・解析し、メラノーマ症例におけるインターフェロンの有効性を予測する基礎データを得ることを目的とする。

3. 研究の方法

本研究は主に、1)メラノーマ細胞株におけるインターフェロン感受性とインターフェロン誘導性アポトーシス誘導遺伝子の解析、2)日本人メラノーマ組織における癌関連遺伝子およびインターフェロン関連遺伝子の構造と発現の解析、3)エピジェネティック修飾される細胞遺伝子再導入による細胞死誘導の検討を行い、悪性黒色腫においてエピジェネティックな発現制御を受ける細胞遺伝子を明らかにし、メラノーマ治療に貢献するものである。

メラノーマ細胞株 AK1, MeWo, MM418, TXM18, 70W, G361, MMIV, MMAc, SK-mel-23, SK-mel-24, SK-mel-118, および末端黒子型メラノーマ細胞5株のインターフェロン感受性とアポトーシス誘導の有無を検討した。インターフェロン β あるいはインターフェロン β +メチル化阻害剤5-AZA-dcによって、各種メラノーマ細胞株にアポトーシスが誘導されるか否かを検討した。フローサイトメトリーとアガロースゲル電気泳動により細胞DNAの断片化を検討し、カスパーゼ活性化検出キットおよびウェスタンブロット法により各種カスパーゼの活性化の有無を検討し、アポトーシスの評価を行った。外科手術で切除した新鮮なメラノーマよりDNAとRNAを抽出し、メラノーマRNAよりcDNAを合成し、インターフェロン関連遺伝子の発現を解析した。メラノーマ組織より得たゲノムDNAにより、BRAF, N-ras, c-kitの遺伝子変異の

有無を解析した。メチル化によって発現抑制される癌抑制遺伝子およびアポトーシス関連遺伝子として、これまでRASSF1A, XAF1, IRF7, TRAILR1が報告されている。これら細胞遺伝子をPCRによって全コード領域をカバーするcDNAを合成し、pAd-Bg1IIIベクターにクローニングし、E1AE1B欠損アデノウイルスゲノムを含むpJM17プラスミドとともに293細胞にトランスフェクトして、各cDNAを発現するアデノウイルスベクターを作製した。これらのアデノウイルス接種とインターフェロン存在下でこれら組み替えアデノウイルスを接種して、メラノーマ細胞にアポトーシスが誘導されるかどうかを検討した。インターフェロン β と5-AZA-dCの存在下で効率よくアポトーシスを起こす細胞を選択し、Methylated CpG island amplification (MCA)法によってメチル化されている遺伝子を検索した。

4. 研究成果

(1)インターフェロン β によるアポトーシスの誘導

メラノーマ細胞株 AK1, MeWo, MM418, TXM18, 70W, G361, MMIV, MMAc, SK-mel-23, SK-mel-24, SK-mel-118 にインターフェロン α , β , あるいは γ を添加し細胞障害の有無と程度を解析した。その結果約半数の色素性および無色素性メラノーマ細胞株に細胞死が誘導された。インターフェロンに感受性を示したメラノーマ細胞は、インターフェロン α , β , γ のうちインターフェロン β に最も強い細胞死誘導を示し、細胞数の比較からインターフェロン β はインターフェロン α の約2倍の細胞死誘導活性を有することが示唆された。フローサイトメトリーとカスパーゼ2, 3, 8, 9, 10の活性化を検討した結果、インターフェロン β による細胞死は細胞DNAの断片化とカスパーゼ3の活性化を伴うアポトーシスであることが確認された。インターフェロン β 抵抗性の細胞株の一部はインターフェロン β +TRAILによってアポトーシスが誘導された。以上の結果は、メラノーマ細胞株の

一部はインターフェロン β によるアポトーシス誘導に抵抗性を示すが、潜在的にアポトーシス誘導性を保持していることを示唆している。

(2) メラノーマ組織の細胞遺伝子の構造と発現

メラノーマ 10 例の切除後メラノーマ組織より DNA と RNA を精製し、細胞 DNA の *N-ras* 遺伝子変異 (Q61R), *BRAF* 遺伝子変異 (V600E), *c-kit* 遺伝子変異 (Y553N, V559A, N566D, L576P, R634W, K642E, D816H, A829P) を直接シーケンスにより解析した。メラノーマ組織型の内訳は、末端黒子型 6 例、結節型 3 例、粘膜型 1 例であった。10 例中 1 例の結節型メラノーマ患者に *N-ras* 変異があり、別の末端黒子型メラノーマ患者に *BRAS* 変異がみられた。他の 7 例にこれら細胞遺伝子に変異はみられなかった。以上の結果は、日本人に多い末端黒子型では、*N-ras/BRAF* の構造変化は稀であり、従って、*N-ras/BRAF* 遺伝子下流のシグナル伝達系が活性化されている可能性が示唆された。*c-kit* 遺伝子の変異は検出されなかったが、増幅による活性化の報告がありさらなる検討が必要と考える。

(3) インターフェロン感受性遺伝子の構造と発現

メラノーマ細胞でメチル化制御されている細胞遺伝子として、*RASSF1A*, *XAF1*, *IRF7*, *TRAIL R1* が報告されている。正常線維芽細胞 RNA から RT-PCR によって全コード領域をカバーする cDNA を合成し、pAd-BglIII ベクターにクローニングし、さらに E1AE1B 欠損アデノウイルスゲノムプラス pJM17 プラスミドとともに 293 細胞にトランスフェクトして、各 cDNA を発現するアデノウイルスベクターを作製した。一部のメラノーマ細胞は、インターフェロン存在下で、これら組み替えアデノウイルス感染によってアポトーシスを起こした。この結果は、*RASSF1A*, *XAF1*, *IRF7*, *TRAIL R1* 以外のインターフェロン誘導性・アポトーシス関連性細胞遺伝子がメチル化抑制によって発現制御されている可能性が推測される。

(4) 研究のまとめと今後の展望

現在、進行期メラノーマの全身療法に複数の抗

癌剤を組み合わせた DAC-Tam 療法かインターフェロンを併用する全身療法が使われることが多いが、いずれの全身療法によっても病期 IV メラノーマ患者の 5 年生存率が 20% を越える結果は得られていない。インターフェロンが奏効しない原因として、メラノーマではインターフェロン誘導性のアポトーシス関連遺伝子が発現抑制されている可能性が推測されている。AK1 メラノーマ細胞株に *XAF1* を発現させるとインターフェロンによってアポトーシスが誘導されることが報告された。しかし、日本人に多い末端黒子型メラノーマにおけるアポトーシス関連遺伝子のメチル化の程度、あるいはメラノーマの組織型によるメチル化アポトーシス関連遺伝子の種類の違いなどは明らかでない。将来、メラノーマの全身療法の 1 つとして、5-AZA-dc 投与によるエピジェネティック療法が試みられると思われる。各組織型のメラノーマにおいてエピジェネティックに修飾されるアポトーシス関連遺伝子が同定できれば、症例を選んだインターフェロン治療、あるいは 5-AZA-dc を併用するインターフェロン治療が可能になる。

現在、インターフェロン β と 5-AZA-dC の存在下で効率よくアポトーシスを起こすメラノーマ細胞を用いて、Methylated CpG island amplification (MCA) 法によってメチル化されている遺伝子の網羅的検索を行っている。

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 14 件)

- ① Sato M, Yamashita T, Ohkura M, Osai Y, Sato A, Takada T, Matsusaka H, Ono I, Tamura Y, Sato N, Sasaki Y, Ito A, Honda H, Wakamatsu K, Ito S, Jimbow K: N-Propionyl-Cysteaminylphenol-Magnetic Conjugate (NPrCAP/M) Is a Nanoparticle for the Targeted Growth Suppression of Melanoma Cells. J Invest

- Dermatol 2009. (in press) 査読有
- ② Yamashita T, Yoneta A, Hida T: Macrophage inhibitory cytokine-1: a new player in melanoma development. *J Invest Dermatol* 129: 262-264, 2009. 査読有
- ③ Kawakami A, Saga K, Ono I, Hida T, Jimbow K, Yamashita T: Spontaneous regression of bowenoid papulosis in a patient with acquired immunodeficiency syndrome after an increase in peripheral CD4+ T lymphocytes. *Int J Dermatol* 48: 210-212, 2009. 査読有
- ④ Toyota M, Suzuki H, Yamashita T, Hirata K, Imai K, Tokino T, Shinomura Y: Cancer epigenomics: implications of DNA methylation in personalized cancer therapy. *Cancer Sci* 100: 787-791, 2009. 査読有
- ⑤ Maruyama R, Akino K, Toyota M, Suzuki H, Imai T, Ohe-Toyota M, Yamamoto E, Nojima M, Fujikane T, Sasaki Y, Yamashita T, Watanabe Y, Hiratsuka H, Hirata K, Itoh F, Imai K, Shinomura Y, Tokino T: Cytoplasmic RASSF2A is a proapoptotic mediator whose expression is epigenetically silenced in gastric cancer. *Carcinogenesis* 29: 1312-1318, 2008. 査読有
- ⑥ Ishida T, Obata Y, Ohara N, Matsushita H, Sato S, Uenaka A, Saika T, Miyamura T, Chayama K, Nakamura Y, Wada H, Yamashita T, Morishima T, Old LJ, Nakayama E: Identification of the HERV-K gag antigen in prostate cancer by SEREX using autologous patient serum and its immunogenicity. *Cancer Immun* 8: 15, 2008. 査読有
- ⑦ Ito A, Fujioka M, Yoshida T, Wakamatsu K, Ito S, Yamashita T, Jimbow K, Honda H: 4-s-cysteaminylphenol-loaded magnetite cationic liposomes for combination therapy of hyperthermia with chemotherapy against malignant melanoma. *Cancer Science* 98: 424-430, 2007. 査読有
- ⑧ Yanagisawa K, Yasuda S, Kai M, Imai S, Yamada K, Yamashita T, Jimbow K, Kanoh H, Sakane F: Diacylglycerol kinase- α suppresses tumor necrosis factor- α -induced apoptosis of human melanoma cells through NF- κ B activation. *Biochimica Biophysica Acta* 1771: 462-474, 2007. 査読有
- ⑨ Kawakami A, Sakane F, Imai S, Yasuda S, Kai M, Kanoh H, Jin HY, Hirosaki K, Yamashita T, Fisher DE, Jimbow K: Rab7 regulates maturation of melanosomal matrix protein gp100/Pmel17/Silv. *J Invest Dermatol* 128: 143-150, 2007. 査読有
- ⑩ 山下利春, 黄倉真恵, 菊地梨沙, 佐藤牧人, 高田知明, 小野一郎, 神保孝一: 帯状疱疹患者の末梢血リンパ球における水痘帯状疱疹ウイルス核酸の検出. *西日本皮膚科* 69(4): 408-413, 2007. 査読有
- ⑪ Oshima Y, Sasaki Y, Negishi H, Idogawa M, Toyota M, Yamashita T, Wada T, Nagaya S, Kawaguchi S, Yamashita T, Tokino T: Antitumor effect of adenovirus-mediated p53 family gene transfer on osteosarcoma cell lines. *Cancer Biol Ther* 6: 1058-1066, 2007. 査読有
- ⑫ Akasaka Y, Ono I, Tominaga A, Ishikawa Y, Ito K, Suzuki T, Imaizumi R, Ishiguro S, Jimbow K, Ishii T: Basic fibroblast

growth factor in an artificial dermis promotes apoptosis and inhibits expression of alpha-smooth muscle actin, leading to reduction of wound contraction. Wound Repair Regen 15: 378-89, 2007. 査読有

⑬ Takada T, Yamashita T, Sato M, Kawakami Y, Tominaga A, Ono I, Jimbow M, Tsutsumi H, Jimbow K. Papulonecrotic tuberculid-like eruptions after Bacille Calmette-Guerin vaccination. J Dermatol. 34: 183-8, 2007. 査読有

⑭ Ono I, Akasaka Y, Kikuchi R, Sakemoto A, Kamiya T, Yamashita T, Jimbow K: Basic fibroblast growth factor reduces scar formation in acute incisional wounds. Wound Repair Regen 15: 617-23, 2007. 査読有

[学会発表] (計3件)

① Ohkura M, Hirosaki K, Yoneta A, Okui T, Nishigori C, Yamashita T: Rapid diagnosis of xeroderma pigmentosum group A by using an XP-A-expressing recombinant adenovirus. The International Investigative Dermatology 2008, Kyoto, Japan. May 14-17, 2008.

② Osai Y, Ohkura M, Tamura Y, Sato N, Ito A, Honda H, Wakamatsu K, Ito S, Yamashita T, Jimbow K: PP15-5 Intratumoral administration of melanomatargeting N-propinyl cysteaminyphenol induces in vivo anti-melanoma effect and tumor specific immunity. XXth International Pigment Cell Conference & Vth International Melanoma Research Congress, Sapporo, Japan. May 7-12, 2008.

③ Sato M, Yamashita T, Okura M, Sakemoto A, Takada T, Ono I, Tamura Y, Sato N,

Wakamatsu K, Ito A, Honda H, Ito S, Jimbow K: Magnetite-conjugated ysteaminyphenol as a novel nanoparticle vector for melanoma-directed drug delivery and therapy. 4th International Melanoma Congress, New York. Nov 14, 2007

[図書] (計3件)

① 山下利春. アデノウイルス科. 医学ウイルス学. 南江堂; 2009. pp325-327

② 山下利春. ポリオーマウイルス科・パピローマウイルス科. 医学ウイルス学. 南江堂; 2009. pp328-330

③ 山下利春. 凍瘡. 皮膚疾患最新の治療 2009-2010. 南江堂; 2009. p104

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他] ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山下 利春 (YAMASHITA TOSHIHARU)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号: 50167706

(2) 研究分担者

小野 一郎 (ONO ICHIROU)

札幌医科大学・医学部・准教授

研究者番号: 20125298

(3) 連携研究者

なし