

平成 21 年 6 月 16 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19591327

研究課題名（和文） 網羅的発現解析で同定した悪性黒色腫高発現遺伝子の病態解析と診断・治療への応用

研究課題名（英文） Functional analysis of molecules identified by comprehensive gene expressive analysis for development of diagnosis and treatment of melanoma

研究代表者

松崎 ゆり子 (MATSUZAKI YURIKO)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：40255435

研究成果の概要：

本研究では、DNA チップや SAGE 法などの網羅的遺伝子発現解析により、我々が同定したヒト悪性黒色腫で選択的或いは高発現する新規分子のうち KU-MEL-4、KU-MEL-5、KU-MEL-6、及び KU-MEL-7 について、癌細胞悪性形質への関与や免疫学的意義を明らかにし臨床応用の可能性を検討した。その結果、いずれの悪性黒色腫高発現遺伝子も悪性黒色腫の形成や転移などに関わる基本的悪性形質に関与していることが明らかとなり、診断マーカーや治療に応用できる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
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
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：皮膚腫瘍学、悪性黒色腫、網羅的遺伝子発現解析、癌悪性形質、RNA 干渉

## 1. 研究開始当初の背景

悪性黒色腫は、化学療法や放射線療法などの標準的治療の効果が低い難治癌であり、新しい診断法と治療法の開発が期待されている。悪性黒色腫において選択的に発現する新規分子の同定は、悪性黒色腫発症の解明に有用であるだけでなく、同定分子を標的とした悪性黒色腫に対する診断・治療の開発に臨床応用できる可能性が高い。研究代表者は、既に SAGE (Serial Analysis of Gene Expre-

ssion)法と DNA チップを用いた網羅的遺伝子発現解析で、新規悪性黒色腫抗原を多数同定しており (Matsuzaki et al., J. Immunother., 28:10, 2005; Inozume, Matsuzaki et al. Int. J. Cancer, 114:283, 2005; Goto, Matsuzaki et al., Cancer Res., 66:4443, 2006)、網羅的遺伝子発現解析で得た悪性黒色腫発現遺伝子が悪性黒色腫形成に関与しているかどうかについて今まで研究を行ってきた。

## 2. 研究の目的

本研究では、我々が網羅的遺伝子発現解析で同定したヒト悪性黒色腫で高頻度に発現する遺伝子のうち、KU-MEL-4, KU-MEL-5, KU-MEL-6, 及び KU-MEL-7 について、悪性形質への機能的関与と臨床応用に関する意義を明らかにする。悪性黒色腫細胞株でこれらの遺伝子の発現制御を行い、細胞増殖・分化能、細胞死、細胞接着・浸潤における表現型の変化を検討し、悪性黒色腫病態形成への関与が明らかにできれば、悪性黒色腫における癌形成機序の解明やそれらを標的とした診断や治療への臨床応用が期待できる。

## 3. 研究の方法

### (1)細胞株

悪性黒色腫細胞株である A375mel, 526mel, 888mel, 928mel, WM266mel は、Dr. Steven A Rosenberg (Surgery Branch and National Cancer Institute, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)より供与された。SKmel23, SKmel28 は、Dr. T Boon (Ludwig Institute for Cancer Research and Cellular Genetics Unit, Brussels, Belgium)より供与された。その他の細胞株については既に報告した論文を参照。これらの細胞株は、10% 非働化ウシ胎児血清含有 RPMI1640 培地 (SIGMA, USA) にペニシリン、ストレプトマイシンを添加し、37 °C、5%CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。

### (2)DNA チップ解析

Affymetrix 社 (Santa Clara, CA, USA) GeneChip U133A, B を用いた遺伝子発現については東京大学医学部先端科学技術センターゲノムサイエンス部門、油谷浩幸教授に解析をお願いした。解析法については、既に報告した論文を参照。

### (3)RNA 干渉実験及びプラズミド DNA 導入実験

siRNA もしくはプラズミド DNA 導入 24 時間前に各細胞株で至適条件として決定した細胞数 ( $1 \times 10^4$  -  $10^5$  個) で、24 穴プレートに抗生剤を含まない培地を用いて細胞を播種する。24 時間後各細胞株で適切化した siRNA 濃度 (10 - 60nM) もしくはプラズミド DNA 濃度 (0.7 - 1.0 µg) と、siLentFect (Bio-Rad, CA, USA) もしくは Lipofectamine 2000 (Invitrogen corp., CA, USA) を、それぞれ Opti-MEM 培地にて希釈混合し、20 分後に細胞に加えた。標的遺伝子及びネガティブコントロール siRNA オリゴヌクレオチドは、Invitrogen 社より購入した。導入細胞からの Total RNA 及び細胞内タンパク質の抽出は、siRNA 及びプラズミド DNA 導入後 2 日目に行った。

### (4) RNA 抽出及び定量 PCR

Total RNA を RNeasy kit (Qiagen, Germany) で抽出し、1 µg の RNA を oligo (dT)<sub>18-20</sub> (Invitrogen, USA)、AMV RTase XL (Takara, 京都)を用いて逆転写反応を行った。定量 PCR は、ABI Prism 7900HT sequence detection system (Applied Biosystems, USA)を用い、標的遺伝子を検出するためのプライマー、プローブセットは、Applied Biosystemsより購入し、TaqMan PCR Master Mix (Applied Biosystems, USA)を使用した。発現量は GAPDH により標準化し Ct 法を用いて解析した。

### (5)ウエスタンブロット解析

細胞溶解緩衝液 (20 mM Tris-HCl, 12.5 mM glycerophosphate, 2 mM EDTA, 10 mM NaF, 1 mM benzamide, 1% NP-40, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, protease inhibitor cocktail (complete, EDTA-free: Roche, Germany)) で溶解することにより細胞溶解液を調整した。蛋白電気泳動には、1 レーン当たり 10 - 20 µg の蛋白を使用し、泳動後ニトロセルロース膜に転写した。標的蛋白の特異抗体を一次抗体、HR-Phosphatase 結合抗 IgG 抗体を二次抗体として用い、SuperSignal WestFemto Maxi-mum Sensitivity Substrate (Pierce, USA) を用いて基質の発光を LumiVisionPRO HSII (TAITEC、埼玉) で検出した。

### (6) WST-1 Assay

トランスフェクション 2 日後の細胞を回収し、各細胞株で至適条件を検討後、96 穴プレートに  $2.5 - 8 \times 10^3$  個の細胞を播種した。3 日後に Premix WST-1 Cell Proliferation Assay System (Takara) を用いてマイクロタイタープレートリーダーにより 655nm に対する 450nm の波長を測定し、細胞増殖能を定量化した。

### (7) Matrigel invasion assay

siRNA 導入 2 日後の悪性黒色腫細胞を、 $1 \times 10^5$ /chamber で BioCoat Matrigel invasion chambers (BD, USA) に播種し、37 °C、5%CO<sub>2</sub> で 22 時間培養し、chamber 膜の下部表面に浸潤・付着した細胞を Diff-Quik (Sysmex, USA) にて固定・染色し顕微鏡にて細胞数を計数した。

### (8)細胞接着能アッセイ

トランスフェクション 2 日後の細胞をトリプシン処理で回収し、 $2 \times 10^4$ /100 µl 細胞培養液を 96 ウェルプレートの 3 - 6 ウェルに播種した。15 分後プレートを振盪機で 30 秒間強く攪拌し、培養上清液を除いた後、クリスタルバイオレット染色液 (1% クリスタルバイオレット、4.4% ホルムアルデヒド、10% エタノール) を 100 µl/well 添加後 30 分間染色。水洗後 30 分間風乾し、1% SDS 溶液に溶解後

570nm の波長を測定した。

#### (9) 統計学的解析

全ての統計学的解析には、unpaired Student's *t*-test を用いた。

#### 4. 研究成果

##### (1) 悪性黒色腫高発現遺伝子 KU-MEL-4 の発現解析と機能解析

KU-MEL-4 mRNA は、悪性黒色腫で高頻度の高発現した。

KU-MEL-4 mRNA の発現を、website 上の EST database を用いて解析したところ、47 ヒト正常組織では皮膚と子宮にのみ発現しており、27 ヒト悪性腫瘍組織で特に皮膚癌でのみ高発現していた。他の 2 種の KU-MEL-4 遺伝子ファミリーでは皮膚癌での発現はなかったことより、KU-MEL-4 mRNA は皮膚癌に特異的に高発現していることが明らかとなった。そこで 13 正常組織、5 正常細胞株、55 悪性腫瘍組織、105 悪性腫瘍培養細胞株を用いて、KU-MEL-4 mRNA の発現を RT-PCR 及び定量 PCR により解析した。その結果、正常組織では全く発現は認められず正常細胞株でも色素細胞にのみ発現を認めた。悪性腫瘍では、悪性黒色腫組織 9 例中 2 例で検出されたのに対し、悪性黒色腫以外の癌組織では全く検出されなかった。さらに悪性黒色腫細胞 27 株中 24 例で検出され、高頻度で高発現が認められた。他の癌細胞株では、脳腫瘍細胞株、乳癌細胞株、肺癌細胞株などで僅かに検出されたのみであった。従って KU-MEL-4 遺伝子は、悪性黒色腫に選択的に発現していることが確認された。

また KU-MEL-4 を高発現している悪性黒色腫細胞株 24 例中 18 例で KU-MEL-4 の受容体も高発現していることが RT-PCR 解析により明らかとなった。従って、KU-MEL-4 は、パラクラインだけでなくオートクラインにも機能している可能性が示唆された。

**KU-MEL-4 に対する siRNA を導入した悪性黒色腫細胞株では、細胞増殖能及び IL-10 の産生が低下した。**

KU-MEL-4 に対する siRNA を、KU-MEL-4 高発現悪性黒色腫細胞 3 株に導入して、KU-MEL-4 遺伝子の機能阻害実験を行った。siRNA 導入後の KU-MEL-4 発現を定量 PCR で確認したところ、3 株ともコントロール siRNA 導入細胞株に比べ、有意に KU-MEL-4 の発現が低下していた。それらの細胞株の増殖能を、WST assay により検討した結果、いずれの細胞株も有意な増殖能の低下を認めた。さらに siRNA を導入した 1 細胞株では、IL-10 の産生も抑制されていた。

さらに KU-MEL-4 合成ペプチドを悪性黒色腫細胞 1 株の培養系に添加したところ、細胞増殖に影響はなかったが、KU-MEL-4 受容体阻

害剤の添加により、増殖抑制を認めた。

以上の結果から、悪性黒色腫高で発現する KU-MEL-4 は、悪性黒色腫細胞の増殖能に關与していることが明らかとなり、悪性黒色腫の治療標的分子となり得る可能性が示唆された。

##### (2) 悪性黒色腫高発現遺伝子 KU-MEL-5 の発現解析と機能解析

KU-MEL-5 mRNA は、悪性黒色腫で高頻度の高発現していた。

GeneChip U133 を用いた KU-MEL-5 遺伝子発現解析の結果、KU-MEL-5 の発現は、正常組織 32 例のうち精巣と胎盤のみで見られたが、正常培養細胞株での発現は全く認められなかった。癌組織 32 例では悪性黒色腫、肝癌、小細胞肺癌、大腸癌で発現を認め、癌細胞株 56 例では悪性黒色腫細胞株、脳腫瘍細胞株、肝癌細胞株、肺癌細胞株、慢性骨髄性白血病細胞株、各 1 例ずつで発現を認めた。また RT-PCR 解析の結果、正常組織 13 例、培養細胞 5 例では精巣、胎盤、網膜のみで発現が検出された。悪性黒色腫細胞株では、26 例中 24 例で高頻度で発現が認められたのに対し、それ以外の癌細胞 35 株では肝癌細胞株 1 例、白血病細胞株 2 例のみで発現が検出された。

次に KU-MEL-5 を特異的に検出するプローブで正常組織、悪性黒色腫組織、大腸癌組織における定量 PCR を行った結果、正常組織では精巣、胎盤に低い発現が見られたのに対し、癌組織では特に転移性の悪性黒色腫組織で高発現であることが明らかとなった。

**KU-MEL-5 に対する siRNA を導入した悪性黒色腫細胞株では細胞増殖能及び接着能が低下した。**

KU-MEL-5 に対する siRNA 導入悪性黒色腫細胞 2 株での KU-MEL-5 の発現は、定量 PCR の結果、コントロール siRNA 導入細胞株に比べ、有意に低下していた。同時に、いずれの KU-MEL-5 siRNA 導入細胞株も細胞増殖能は低下し、また接着能の低下も認められた。

以上の結果より、悪性黒色腫細胞株において KU-MEL-5 特異的 siRNA を導入して発現を阻害すると細胞増殖能及び接着能が低下することが明らかとなった。

**悪性黒色腫細胞株では KU-MEL-5 を強制発現させることにより細胞増殖能及び接着能が亢進した。**

KU-MEL-5 遺伝子低発現悪性黒色腫細胞 1 株及び非発現細胞 1 株に KU-MEL-5 組換え発現プラズミドを導入することにより KU-MEL-5 を強制発現させたところ、RT-PCR により明らかにその発現量が増加し、有意に増殖能が亢進した。さらに接着能の増加も認められた。

以上の結果、悪性黒色腫高発現 KU-MEL-5

遺伝子は悪性黒色腫の増殖能及び接着能に関与することが明らかとなり、特に転移性悪性黒色腫の診断及び治療に応用できる可能性が示唆された。

### (3) 悪性黒色腫高発現遺伝子 KU-MEL-6 の発現解析と機能解析

KU-MEL-6 遺伝子は DNA GeneChip を用いて同定された遺伝子で、正常組織では甲状腺、精巣、子宮、正常培養細胞では血管内皮細胞、色素細胞で低い発現が認められた。癌細胞では悪性黒色腫で高発現が認められ、悪性黒色腫以外でも、胃癌、大腸癌、肝癌、食道癌・膀胱癌・卵巣癌に高発現を認めた。また RT-PCR 解析においては、正常組織 14 例中 2 例で精巣と前立腺に低い発現を認めた。癌組織及び培養細胞株においては、悪性黒色腫組織 5 例中 3 例で、悪性黒色腫培養細胞株 10 例中 7 例で高発現を認めた。それ以外では腎臓癌及び大腸癌でも発現を認めた。

KU-MEL-6 遺伝子の機能については現在検討中であるが、この遺伝子のプロモーター領域には TCF/LEF の結合部位が存在し、 $\beta$ -カテニンと結合することが最近報告され、Wnt シグナルを通じて癌化の要因となる可能性が考えられた。

さらに KU-MEL-6 組換え蛋白に対する IgG 抗体が悪性黒色腫患者血清中に認められたことから、悪性黒色腫の診断及び治療標的となる可能性が示唆された。

### (4) 悪性黒色腫高発現遺伝子 KU-MEL-7 の発現解析と機能解析

KU-MEL-7 遺伝子は、SAGE 法で色素細胞特異的発現分子として同定された分子である。DNA GeneChip を用いて発現解析した結果、正常組織 43 例中では網膜でのみ発現を認め、正常培養細胞株では全く発現を認めなかった。EST データベースを用いた解析では、正常組織 45 例中 3 例で皮膚、神経、眼で低い発現を認め、腫瘍組織 26 例中 3 例で皮膚癌、悪性リンパ腫及び子宮癌で発現を認めた。さらに RT-PCR 解析では、正常組織 10 例中精巣のみに認め、正常培養細胞株 4 例中線維芽細胞と色素細胞で低い発現が見られた。癌細胞株では、悪性黒色腫細胞株 10 例中 8 例で高頻度の高発現が認められた。

悪性黒色腫における KU-MEL-7 分子の機能については現在検討中であるが、最近、悪性黒色腫で腫瘍播種及び接着への関与が示唆されており、悪性黒色腫の診断に応用できる可能性が考えられることから、現在 KU-MEL-7 分子のポリクローナル抗体を作成して詳細な検討を進めている。

以上のように、本研究成果により、評価した悪性黒色腫高発現分子は悪性黒色腫の悪

性形質に関与することが明らかとなり、臨床応用への基盤を作ることができた。今後さらなる研究により、悪性黒色腫の診断・治療への臨床応用だけでなく、悪性黒色腫生物学にも貢献できると考える。

### 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 4 件)

Kawakami Y, and Matsuzaki Y. (他 13 名 1 番目) Dendritic cell based personalized immunotherapy based on cancer antigen research. *Front Biosci.* 査読有 2008, Jan 1;13:1952-1958.

Hayashi E, Matsuzaki Y, Kawakami Y. (他 6 名 2 番目) Identification of a novel cancer-testis antigen CRT2 frequently expressed in various cancers using representational differential analysis. *Clin Cancer Res.* 査読有 2007 Nov 1;13(21):6267-6274.

Inozume T, Matsuzaki Y, Kawakami Y. (他 4 名 4 番目) Dendritic cells transduced with autoantigen FCRLA induce cytotoxic lymphocytes and vaccinate against murine B-cell lymphoma. *J Invest Dermatol.* 査読有 2007 Dec;127(12):2818-2822.

Kawakami Y, Matsuzaki Y. (他 25 名 1 番目) Development of individualized immunotherapy based on the analysis on anti-tumor immune responses to the human tumor antigens identified using immunological and genetic methods. *Gene Therapy.* 240-248. 2007. 査読無

[学会発表](計 2 件)

藤田知信、松崎ゆり子、河上裕 他. KU-MEL-6 による細胞増殖とインテグリンを介した細胞接着によるヒト悪性黒色腫転移機構. 第 67 回日本癌学会総会. 2008 年 10 月 29 日. 名古屋.

柴垣直孝、松崎ゆり子、河上裕 他. Dendritic cells transduced with autoantigen FCRLA induce cytotoxic lymphocytes and vaccinate against B-cell lymphoma. 第 11 回基盤的癌免疫研究会. 2007/7/11. 東京

### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

松崎 ゆり子 (MATSUZAKI YURIKO)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号: 40255435

(2) 研究分担者

河上 裕 (KAWAKAMI YUTAKA)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号: 50161287