

機関番号：13601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20591318

研究課題名（和文） 肢端黒色腫の分子標的治療

研究課題名（英文） Research on Molecular Target therapy for Acral Melanoma

研究代表者

村田浩（MURATA HIROSHI）

信州大学・医学部・助教

研究者番号：70262722

研究成果の概要（和文）：個々の黒色腫症例に応じた分子標的治療薬を選択する方法の確立を目指し、1. 各症例の KIT 受容体遺伝子変異を検索し、28 例中 2 例の転移性腫瘍で活性型変異を認め、その変異の内の一つ D820Y 変異を持つ細胞株では Sutent®が有効であることを示した。2. 抗ヒト HMW-MAA 抗体を用いて黒色腫患者の末梢血より黒色腫細胞が抽出できること、その腫瘍細胞の BRAF 遺伝子変異が確認した。3. 腫瘍原発巣内でも BRAF 活性型変異がある細胞と無い細胞が混在していることを証明した。

研究成果の概要（英文）：To personalize the therapy with molecular targeting therapy for melanoma, we showed that: 1. two of 28 case had activating mutation of KIT gene and one of these mutation, D820Y, was sensitive to the sunitinib. 2. Circulating melanoma cells could extract by using anti-HMW-MAA antibody and we detect the BRAF mutation states from them. 3. We showed polyclonality of melanoma cells on BRAF mutation states.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬系

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、末梢血循環腫瘍細胞、BRAF 変異検査、KIT 遺伝子変異検査、個別化治療、薬剤耐性機序、腫瘍細胞の多様性

1. 研究開始当初の背景

黒色腫は易転移性の腫瘍であり化学療法や放射線治療にも抵抗性を示すため、遠隔転移を生じた患者の予後は極めて悪い。また、黒色腫は免疫原性の強い腫瘍であり、これまでに種々の免疫療法が試みられてきたが、現

在のところただちに臨床に還元しうるような際立った成果は得られていない。

一方、近年の研究により黒色腫におけるシグナル伝達系の異常が明らかにされ、シグナル阻害剤による分子標的治療の開発に期待が寄せられている。白人のメラノーマの主要

病型である表在拡大型では RAS/RAF/MEK/ERK シグナル経路の主要な構成遺伝子である NRAS または BRAF 癌遺伝子の活性化型変異が 75% と高率に認められ、このシグナル経路の活性化の指標である ERK 蛋白のリン酸化はほぼ 100% に検出される。この研究成績を踏まえ、欧米ではすでに cRaf 阻害剤の Sorafenib をはじめとするいくつかのシグナル阻害剤の臨床試験が開始されている。

しかし、日本人のメラノーマの過半数を占める肢端黒色腫では NRAS または BRAF 癌遺伝子の変異は少なく、cyclin D1, hTERT, CDK4 など特定の遺伝子の増幅が認められるなど白人に多い表在拡大型黒色腫とは異なる遺伝子異常を示すとされる[1]。我々も信州大学の症例においてこの事実を確認したが、さらなる検討により NRAS/BRAF 変異の無い肢端黒色腫の大多数例に ERK 蛋白のリン酸化が生じていることを見出し、肢端黒色腫においても RAS/RAF/MEK/ERK シグナル経路を標的とした治療が有用である可能性を示した[2]。さらにごく最近、肢端型メラノーマの原発腫瘍では、表在拡大型ではほとんど消失する KIT 受容体蛋白が保たれており、この KIT 遺伝子の変異や増幅が高頻度に認められることが報告された[3]。この成績は、KIT 受容体阻害剤が肢端黒色腫に有効である可能性を示唆するものであり注目される。

[1]Curtin JA et al. N Engl J Med 2005;353:2135-47
[2]Takata M et al. J Invest Dermatol 2005;125:318-22
[3]Curtin JA et al. J Clin Oncol 2006;24:4340-6

2. 研究の目的

- (1). 肢端黒色腫細胞株を用いて数種類の RAS/RAF/MEK/ERK シグナル阻害剤の細胞増殖抑制効果を検討し、肢端黒色腫に最も適した RAS/RAF/MEK/ERK シグナルの阻害剤を見出す。さらにその作用機序を解明し、複数のシグナル阻害剤の併用またはシグナル阻害と抗癌剤の併用などによる、より有効な治療戦略を見出す。
- (2). 肢端黒色腫細胞株における Gleevec® の腫瘍増殖抑制作用を検討するとともに、患者から得られた腫瘍における KIT 蛋白の発現、リン酸化の有無および遺伝子の変異を検討する。
- (3). 上記の分子標的治療の適応を決めるためのバイオマーカーを選定し、その検査法を確立する。この目的のために末梢血を循環する黒色腫細胞の分離とその解析法を確立する。

3. 研究の方法

肢端黒色腫細胞株を用いて RAS/RAF/MEK/ERK シグナル阻害剤 (Gleevec®, U0126, PD0332991, Roscovitine) の増殖抑制作用を検討し、Western Blot および PCR array を用いてその作用機序を詳細に検討する

また、肢端黒色腫および粘膜黒色腫の転移巣における KIT 受容体の発現を免疫組織学的に、さらにそのリン酸化を Western Blot で調べ、KIT 遺伝子変異と KIT 受容体の活性化の関係を検討する。さらに進行期黒色腫患者の末梢血から High Molecular Weight Melanoma Associated Antigen (HMW-MAA) に対する抗体を用いて末梢血を循環するメラノーマ細胞を分離し、その遺伝子解析を行うことで、分子標的治療を行う上でのバイオマーカーの検出法を確立する。

4. 研究成果

肢端部および粘膜部のメラノーマ 28 例(原発 4 例、転移 24 例)における KIT 蛋白の発現と KIT 遺伝子変異を検索した。免疫組織染色では 13 例に中等度以上の KIT 受容体の発現が認められた。KIT 遺伝子変異の hot spot であるエクソン 11, 13, 17 および 18 のダイレクトシーケンスでは 2 例の転移腫瘍に K642E および D820Y 変異が検出された。Real-time PCR 法を用いた KIT 遺伝子のコピー数解析では K642E 変異を示す 1 例を含む 4 例に KIT 遺伝子コピー数の増加が認められた。さらに凍結組織 13 例を用いた Western blot 法解析では 8 例に KIT 受容体のリン酸化が確認された。リン酸化は KIT 遺伝子の変異や増幅を認めない 5 例にもみられ、これらの症例では黒色腫細胞および間質細胞に KIT のリガンドである stem cell factor (SCF) の発現が見られた。さらに肢端黒色腫細胞を用いて KIT を標的とする分子標的薬である Gleevec® と Sutent® の増殖抑制効果を検討した結果、D820Y 変異を持つ SM3 株に対して Gleevec® は無効であったが Sutent® は強い増殖抑制効果を示した。一方、SCF 依存性に KIT の活性化を示す SLYM-PRGP 株に対しては双方ともに増殖抑制効果が認められ、Sutant® で強い抑制が見られた。

個々の症例に応じた分子標的薬を的確に診断する簡便な検査法を目指し、黒色腫患者の末梢血循環腫瘍細胞 (Circulating tumor cells; CTCs) の分離と癌遺伝子変異の検出を試みた。抗ヒト HMW-MAA マウス抗体と抗マウス IgG 抗体結合磁気ビーズで分離した細胞から抗 CD45 抗体磁気ビーズでリンパ球を除去し、得られた細胞を MART-1 抗体で免疫染色して黒色腫細胞を同定した。この方法で試行した 8 例全例で 1~40 個の CTCs の分離に成功した。KIT は 8 例中 3 例、BRAF は 5 例中 5 例で遺伝子変異解析が可能であった。8 例中 6 例で原発巣、転移腫瘍、CTCs のいずれか

に BRAF または KIT の変異が検出されたが、3 者の変異パターンはすべての例で異なっており、進行期黒色腫細胞の多クローン性が示された。

現在、国際的にも BRAF V600E 変異特異的な分子標的治療薬 PLX4032 が注目されているが、その欠点として奏功期間があまり長くないことが挙げられている。この薬剤耐性の一部は BRAF を経由せずに下流の Rb 蛋白をリン酸化することによると考えられている。そこで下流の詳細を検討したところ、黒色腫では cyclin D、cyclin E ともに BRAF の下流にあり、そのどちらか一方を阻害しても Rb のリン酸化を抑えられなかった。BRAF 特異的阻害剤に耐性が生じた症例ではほかのシグナル系をターゲットにする方が良いと考えられた。Roscovitine で増殖抑制が認められたが、CDK2 阻害によるものではないという結果であったので、蛋白合成阻害は一つの候補となると考えられた。

今回の研究で、近年黒色腫治療の現場で注目されている PLX4032 の問題点として、奏功期間が平均 7 か月にとどまること、適応の決定に過去の手術検体を用いる必要があり、初診時すでに進行例の場合、適応を決めるためだけに生検が必要なこと、BRAFV600E の無い症例では適応がないことなどが挙げられている。それらに対する回答として、初めから BRAFV600E 変異院生の腫瘍細胞が混在していること、現時点で患者体内に循環している腫瘍細胞の BRAF 変異ステータスを末梢血から同定できること、KIT 変異に対する現存治療薬の適応拡大の可能性や現在治験段階にある薬剤の治療拡大の可能性など、多くの興味深い新知見を発表することができた。今後、新たに登場してきた分子標的薬の初期の適応だけでなく、耐性が出てきているかどうかなど各時点での適応をリアルタイムに検討する手段を提供しており、臨床の場において重要な成果を上げたと考える。

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 9 件)

- ① Lin J, Goto Y, Murata H, Sakaizawa K, Uchiyama A, Saida T, Takata M. Polyclonality of BRAF mutations in primary melanoma and the selection of mutant alleles during progression. Br J Cancer. 104: 464-468, 2011. 査読有
- ② Takata M, Murata H, Saida T: Molecular pathogenesis of malignant melanoma: a different perspective from the studies of melanocytic nevus and acral melanoma. Pigment Cell Melanoma Res, 23:61-74, 2010. 査読有

- ③ Ashida A, Takata M, Murata H, Kido K, Saida T: Pathological activation of KIT in acral and mucosal melanomas. Int J Cancer, 124:862-868, 2009. 査読有
 - ④ Yamaura M, Mitsushita J, Furuta S, Kiniwa Y, Ashida A, Goto Y, Shang WH, Kubodera M, Kato M, Takata M, Saida T, Kamata T: NADPH oxidase (Nox) 4 contribute to transformation phenotype of melanoma cells by regulating G2-M cell cycle progression. Cancer Res, 69:2647-2654, 2009. 査読有
 - ⑤ Lin J, Takata M, Murata H, Goto Y, Kido K, Ferrone S, Saida T: Polyclonality of BRAF mutations in acquired melanocytic nevus. J Natl Cancer Inst, 101: 1423-1427, 2009. 査読有
 - ⑥ Lin J, Koga H, Takata M, Saida T: Dermoscopy of pigmented lesions on mucosa and mucocutaneous junction. Br J Dermatol, 161:1255-61, 2009. 査読有
 - ⑦ Uhara H, Koga H, Takata M, Saida T. The whiteboard marker as a useful tool for the dermoscopic "furrow ink test". Arch Dermatol 145:1331-1332, 2009. 査読有
 - ⑧ 高田実, メラノーマの新規治療の展望. 癌と化学療法 35 巻 588-590, 2008 査読無
 - ⑨ 高田実, メラノーマ幹細胞と分子標的治療-メラノーマの治療を目指して. 医学のあゆみ 226 巻 227-230, 2008 査読無 [学会発表] (計 4 件)
 - ① 村田浩, 芦田敦子, 後藤康文, 木藤健治, 高田実. メラノーマでは、RAS/RAF/MEK/ERKシグナルはcyclin D、cyclin Eの双方を制御する. 第 68 回日本癌学会学術総会 2009 年 10 月 3 日横浜市
 - ② 村田浩, 悪性黒色腫における分子標的治療: 臨床の落胆. 第 61 回日本皮膚科学会中部支部学術大会 2009 年 9 月 11 日. 大阪市
 - ③ 高田実, 皮膚悪性腫瘍のトピックス. 第 108 回日本皮膚科学会総会 2009 年 4 月 26 日, 福岡市
 - ④ Ashida A, Takata M, Murata H, Kido K, Saida T. Pathological activation of KIT is common in acral and mucosal melanomas. 5th International Melanoma Research Congress 2008 年 5 月 8 日札幌市
6. 研究組織
(1) 研究代表者
村田浩 (MURATA HIROSHI)
信州大学・医学部・助教
研究者番号: 70262722

(平成22年1月31日に村田浩に代表者交替)
高田実 (TAKATA MINORU)
岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・非常
勤研究員
研究者番号：20154784