

平成 22 年 5 月 14 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20790787

研究課題名（和文）特異的 DNA メチル化異常を応用した新規悪性黒色腫マーカーの開発

研究課題名（英文）Development of novel melanoma marker using tumor specific DNA methylation

研究代表者

古田 淳一（FURUTA JUNICHI）

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・講師

研究者番号：30436274

研究成果の概要（和文）：黒色腫特異的 DNA メチル化異常を黒色腫バイオマーカーとして応用する端緒を見いだすことを目的とした。悪性黒色腫及び色素性母斑の臨床材料を用いて、メチル化特異的 PCR 法により CpG アイランドのメチル化状態を調べた。*RASSF1A* は悪性黒色腫でも 36% でメチル化が検出されたが、色素性母斑でも 20% のメチル化が検出された。メラノサイト系腫瘍では良悪性にかかわらず *RASSF1* を含む *RAS* 系が重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：We aimed to find the seeds for melanoma molecular marker using melanoma specific DNA methylation. The methylation of *RASSF1A* was detected in 20% of melanocytic nevus specimens, whereas in 36% of malignant melanoma specimens. These result suggest that ras signaling pathway including *RASSF1* plays an important role in melanocytic tumors regardless malignant or benign.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
2008 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総 計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：皮膚腫瘍学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：癌，エピジェネティクス，悪性黒色腫，DNA メチル化，腫瘍マーカー

1. 研究開始当初の背景

(1) エピジェネティクスについて

生物の遺伝情報の核心は塩基配列であるが、塩基配列以外にも細胞分裂を経ても親細胞から娘細胞に伝達される遺伝情報がある。これをエピジェネティックな情報と呼ぶが、その代表が DNA メチル化である。シトシン 5 位のメチル化のことで、特に CpG アイランド（シトシン・グアニンの配列が密集している部位）ではほぼ一様にメチル化、あるいは非メチル化に制御されている。遺伝子の約半数は遺伝子プロモーター領域に CpG アイランドを持ち、それがメチル化されると下流遺伝子の転写が強く抑制される。発生や分化にあたって不必要な遺伝子をシャットオフするための仕組みと考えられている。

(2) 癌と DNA メチル化について

癌抑制遺伝子プロモーター領域 CpG アイランドのメチル化は癌抑制遺伝子不活化の分子機構として、突然変異、欠失と並んで重要である。癌の病理を解明するだけでなく、治療への応用も始まっている。たとえば、*in vitro* で脱メチル化剤処理がインターフェロン感受性遺伝子の不活化を解除して黒色腫細胞株のインターフェロンによるアポトーシス誘導性を回復させる。脱メチル化剤はすでに臨床応用されており、5-aza-2'-deoxycytidine は骨髄異形成症候群の治療薬として米国で認可されている。したがって、黒色腫におけるメチル化異常を調べることは、将来的に悪性黒色腫への脱メチル化剤の治療応用にもつながる。

(3) バイオマーカーとして DNA メチル化を応用する

DNA メチル化は化学修飾を経た PCR 法によって高感度に検出することができる。癌特異的 DNA メチル化は正常ではみられないことから、癌検出のバイオマーカーとしての応用が可能である。血液や喀痰、糞便から腫瘍由来の DNA メチル化を検出する試みが報告されている。皮膚悪性黒色腫においては、コピー数異常とメチル化異常、癌遺伝子の変異を網羅的に調べ、スピッツ母斑と悪性黒色腫の鑑別を試みた報告がある。

2. 研究の目的

これまでに得た皮膚悪性黒色腫特異的にメチル化される CpG アイランド群を候補とし、悪性黒色腫バイオマーカーとする。

3. 研究の方法

(1) 材料の収集

筑波大学附属病院において、倫理委員会で承認された手続きに基づいて患者の同意を文書で得て収集した、悪性黒色腫と色素性母斑、正常皮膚を材料とした。新鮮凍結標本およびホルマリン固定パラフィン包埋標本の両方

を用いた。

(2) DNA 抽出とバイサルファイト処理

収集したホルマリン固定パラフィン包埋標本あるいは新鮮凍結標本から、市販のキットを用いてゲノム DNA を抽出した。新鮮凍結標本から抽出した場合には制限酵素処理にて DNA 鎖長を短くし、ホルマリン固定パラフィン包埋標本から抽出した場合にはすでに断片化が進んでいるためそのまま、バイサルファイト処理を行った。

バイサルファイト（重亜硫酸）はシトシンをウラシルに変換するが、メチル化シトシンはほとんど変換しない。よってメチル化されていない CG（シトシン・グアニン）は UG となり、PCR 反応を介して TG となる一方、メチル化された CG は CG のままである。

(3) メチル化特異的 PCR 法

バイサルファイト処理 DNA をテンプレートとし、メチル化を調べたい部分で（非）メチル化特異的プライマーを設計し、アニーリング温度を最適化すれば、メチル化状態を（非）メチル化特異的プライマーセットでの PCR 産物の有無で定性的に示すことができる。これがメチル化特異的

PCR (methylation-specific PCR: MSP) 法である。

正しくメチル化状態を調べるためには MSP 法のプライマー設計、条件検討を十分に行って感度と特異度に優れたものを決めなければならない。このために、完全に非メチル化である対照 DNA として、末梢血から得たゲノム DNA を酵素増幅して得た DNA を用い、これを CpG メチル化酵素 *SssI* で修飾したものを完全メチル化対照 DNA として用意した。この両者を用いて、アニーリング温度と反応サイクル数を変化させ、最適な感度と特異度が得られる条件を決定した。ホルマリン固定パラフィン包埋標本では、DNA 断片化により増幅が不良であるため、決定したサイクル数から 4 サイクルを増やして行った。

悪性黒色腫でメチル化されると既に知られている遺伝子プロモーター領域 CpG アイランドにつき、悪性黒色腫と色素性母斑、正常皮膚を材料に MSP 法を用いてメチル化状態を調べた。

4. 研究成果

(1) 材料の収集

悪性黒色腫 40 例、正常皮膚 20 例、色素性母斑 20 例から、DNA を抽出しバイサルファイト処理を施した。本研究の材料として用いただけでなく、残りは今後行われる様々な研究にも使用できる貴重なライブラリーとなった。

(2) MSP 法至適条件の決定

悪性黒色腫で異常メチル化されることが既に知られている遺伝子プロモーター領域 CpG アイランドをマーカーの候補とした。そ

れらは、癌抑制遺伝子 19 個、癌抑制機能はないが高頻度にメチル化されるもの 4 個、黒色腫細胞株でメチル化されることが知られているもの 33 個の計 56 個であった。これら CpG アイランドに対するメチル化、非メチル化特異的 MSP プライマーの設計し、感度と特異度に優れた PCR 条件を決定した。

(3) メチル化解析の結果

MSP 条件検討と検体収集に時間を要したため、全てのメチル化状態を研究期間内に評価し終わることが出来ず、悪性黒色腫に多くメチル化されている CpG アイランドは見いだされてきたが、マーカーセットの検討を行うところまで完了させることが出来なかった。今後研究を継続して評価を終了し、有望なマーカーセットを抽出する予定である。

これまで得られた結果の中で興味深いものとしては、色素性母斑における *RASSF1A* の異常メチル化が挙げられる。*RASSF1A* は ras シグナル経路における主要な癌抑制遺伝子の一つで、胃癌、大腸癌、卵巣癌など多くの主要な癌で異常メチル化により不活化されることが知られている。皮膚悪性黒色腫でも比較的高頻度にメチル化されていることが報告されている。本研究では悪性黒色腫の 36% でメチル化がみられた一方、正常皮膚ではメチル化がみられず、これまでの報告と同じ結果が得られた。ところが良性腫瘍である色素性母斑においても 20% でメチル化がみられた (下図)。

同じ ras シグナル経路にかかわる癌抑制遺伝子 *BRAF* も、悪性黒色腫で高頻度に変異を起こしていることが知られている。これらのことから、悪性黒色腫では ras シグナル経路異常が発癌に重要な役割を果たしていると考えられている。ところで *BRAF* の変異は、当初は悪性黒色腫で高頻度にみられると報告されていたが、その後に色素性母斑でも少なくない頻度でみられることが知られてきた。これらは、メラノサイトの増殖では良悪性にかかわらず ras シグナル経路が重要であること示すと考えられている。

今回われわれは、初めて *RASSF1A* 遺伝子が色素性母斑でメチル化されていることを見いだした。本研究で用いた *RASSF1A* の MSP 法プライマーは、発現調節に重要な領域に設定され、研究代表者が以前に悪性黒色腫細胞株で発現状態とメチル化が関連することを示しているものである。よって、悪性黒色腫のみならず色素性母斑でもメチル化によって *RASSF1A* が不活化されていると考えられる。今後は蛋白レベルでの発現消失を確認するため、メチル化を解析したものと同一標本で *RASSF1A* の免疫染色を行う計画である。また、ras シグナル経路にかかわる他の遺伝子の異常や実際の蛋白発現を網羅的に解析し、メラノサイト系腫瘍の病態、そして良悪性の決定に関与する因子を明らかにすることもできるかもしれない。

(4) 関連した臨床研究

また本研究に用いた臨床症例において、肝転移に対してシスプラチン肝動注をおこなったところまれな腫瘍崩壊症候群を起こした症例を経験したため、共著者の 1 人として報告した。血液悪性腫瘍でよく見られるが、悪性黒色腫でも急激な腫瘍壊死が起こる状況ではアロプリノールの前投薬や十分な補液を要する点につき、注意を喚起する内容であった。

(5) 皮膚扁平上皮がんにおけるメチル化プロファイリング

さらに、本研究に用いた MSP プライマーを活用して皮膚扁平上皮がんにおけるメチル化プロファイリングを行った。悪性黒色腫とは異なり、また他臓器の扁平上皮がんと同様に、*E-cadherin* や *p16* のメチル化がみられる一方で *RASSF1A* や *MGMT* のメチル化はみられなかった。この成果については学会で発表し、論文作成中である。

NCN1 NCN2 NCN3 NCN4 NCN5 NCN6 NCN7 NCN8
U M U M U M U M U M U M U M U M

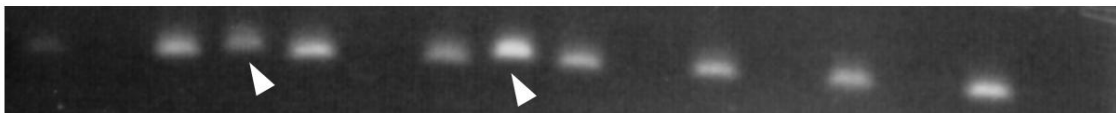


図 色素性母斑材料における *RASSF1A* 遺伝子プロモーター領域の MSP 法結果 (一部)

NCN1~8 は症例番号を示す。U および M は、その下に結果を示す PCR 法に用いたプライマーセットが非メチル化特異的およびメチル化特異的であることを示す。

示している 8 症例のうち、NCN2 および 4 ではメチル化特異的プライマーセットで PCR 産物が認められ、*RASSF1A* 遺伝子プロモーター領域 CpG アイランドのメチル化が示された。

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)

①Yoshiyuki Nakamura, Yasuhiro Nakamura, Enmi Hori, Junichi Furuta, Yoshiyuki Ishii, Takenori Takahashi, Yasuhiro Kawachi, Fujio Otsuka: Tumor lysis syndrome after transcatheter arterial infusion of cisplatin and embolization therapy for liver metastases of melanoma, International Journal of Dermatology, 査読有, 48(7), 763-7, 2009

〔学会発表〕(計2件)

①崎山真幸, 古田淳一, 多島新吾, 大塚藤男: 皮膚扁平上皮がんにおける DNA メチル化プロファイリング, 第25回日本皮膚悪性腫瘍学会, 2009年5月22日, 岡山

② Masayuki Sakiyama, Junichi Furuta, Yasuhiro Fujisawa, Yasuhiro Nakamura, Yoshiyuki Ishii, Yasuhiro Kawachi, Shingo Tajima, Fujio Otsuka: Promoter methylation profiling of 28 genes in human cutaneous squamous cell carcinoma, 39th Annual European Society for Dermatological Research Meeting, 12th September 2009, Budapest, Hungary

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古田 淳一 (FURUTA JUNICHI)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・
講師

研究者番号: 30436274