

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：13401

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16206

研究課題名（和文）悪性黒色腫の病態に関わるdermokineの役割の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the role of Dermokine in the Malignant Melanoma

研究代表者

宇都宮 慧（Utsunomiya, Akira）

福井大学・学術研究院医学系部門・特別研究員

研究者番号：20792104

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000 円

研究成果の概要（和文）：悪性黒色腫は皮膚腫瘍の中でも悪性度が高く、予後が極めて悪い皮膚疾患の1つである。今回、我々は臨床研究と基礎研究から、Dermokine（DMKN）が悪性黒色腫に及ぼす影響について研究を行った。臨床研究の結果、悪性黒色腫患者の血清中DMKN濃度は一般的に総じて低く、黒色腫の重症度、病勢、治療反応性を反映するバイオマーカーとしての有用性を示さなかった。しかし、DMKN欠損マウスを使用した研究で、皮下にB16F10悪性黒色腫細胞株を接種し、野生型と比較した結果、CD206陽性細胞の腫瘍組織内浸潤細胞数が減っていた。DMKN蛋白質が、腫瘍免疫になんらかの影響を与えている可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

悪性黒色腫は皮膚腫瘍の中でも悪性度が高く、本邦で新たに診断される人数は、高齢になるにつれて罹患率は高くなる。今後、高齢化が進むにあたり罹患患者数は増加することが容易に推測できる。また、BRAF阻害剤では薬剤性の獲得が問題となっており、抗PD-L1抗体や抗CTLA-4抗体などの免疫チェックポイント阻害剤による治療でも長期的な寛解率は10-30%に留まっている。今回、我々は、独自に作成した2種類のDMKN欠損マウスを使用して、世界で初めて、悪性黒色腫の増殖抑制のメカニズム解明に挑んだ。本課題は、DMKNをより詳細に解明することで、悪性黒色腫の治療薬の開発にブレークスルーをもたらす可能性を有している。

研究成果の概要（英文）：The malignant melanoma has high malignancy in a skin tumor, and convalescence is one of the extremely bad skin diseases. We studied the influence that Dermokine (DMKN) gave to a malignant melanoma from a clinical study and fundamental study in this time. Unfortunately, serum DMKN density of the malignant melanoma patient was generally low and, as a result of clinical study, did not show use characteristics as the biomarker which reflected disease severity, the condition of a patient of the melanoma, treatment reactivity. However, as a result of inoculating B16F10 malignant melanoma cells subcutaneously using the DMKN KO mice in vivo, and having compared it with the wild type, the number of CD206-positive cells in the tumor tissue decreased. The possibility that DMKN protein had some kinds of influence on tumor immunity was suggested. I am going to push forward an elucidation of a more detailed mechanism in future.

研究分野：皮膚

キーワード：デルモカイン 悪性黒色腫

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、研究者個人に帰属します。

## 1 . 研究開始当初の背景

悪性黒色腫は皮膚腫瘍の中でも悪性度が高く、本邦で新たに診断される人数は、1 年間に 100 万人あたり約 10 ~ 20 人であり、男女とも 60 歳代から高齢になるにつれて罹患率は高くなる。今後、高齢化が進むにあたり罹患患者数は増加することが容易に推測できる。BRAF 阻害剤では薬耐性の獲得が問題となっており、抗 PD-L1 抗体や抗 CTLA-4 抗体などの免疫チェックポイント阻害剤による治療でも長期的な寛解率は 10-30% に留まっている。現状では、半数以上の症例が治療に難渋する状況にあり、新たな治療法の探索が急務である。

我々は、これまでデルモカイン ( Dermokine:DMKN ) に注目し、研究に従事してきた。Dermokine / ( DMKN- / ) は表皮顆粒層に発現する蛋白で、我々はこれまでに炎症や表皮角化細胞の増殖を抑制して皮膚の恒常性維持に働いていることを発見した。また、数々の DMKN に関する研究成果を、国際学会発表や論文投稿で周知してきた。DMKN に関係した実験に熟知しており、独自に作製した DMKN- / / や - / / 欠損したマウスも有している。また、これまでの予備検討では、悪性黒色腫周囲に DMKN の発現亢進を確認している。

今回の検討では皮膚悪性黒色腫患者の DMKN の血清中の濃度、腫瘍細胞や周囲の組織での発現を確認し、腫瘍細胞の増殖能、局所浸潤、遠隔転移などとの相関関係を明らかにしたい。また、当施設で所有する DMKN- / KO マウスと DMKN- / / KO マウス に悪性黒色腫の細胞を皮下、経静脈投与し、野生型と比較することにより DMKN の悪性黒色腫の増殖・転移に対する作用を詳細に検討し、治療ターゲットとしての可能性を追求する。

## 2 . 研究の目的

当教室は日常的に皮膚疾患の臨床業務に従事しているため、皮膚疾患のサンプルを入手しやすく、臨床研究への多角的な展開も視野にいられている。まずは、DMKN の組織での発現と悪性黒色腫細胞の腫瘍細胞の悪性化、増殖能、局所浸潤、遠隔転移などの相関関係を明らかにしたい。さらに予備実験の段階ではあるが、ヒト炎症性皮膚疾患の重症度と血中 DMKN 濃度が相関していることを我々は既に確認しており、同様の手法を用いて DMKN の血中濃度と悪性黒色腫の進行、治療効果、予後などとの相関関係も明らかにしていくものである。

また、今回、当教室で独自に作製した 2 種類の DMKN KO マウスを使用し、動物実験を行う。DMKN 欠損マウスは、我々の知る限りでは当教室を含めて世界に 2 施設しか存在せず、さらに当施設には 3 系統有している。その内、我々が独自に作製した DMKN / 欠損マウスと DMKN / / 欠損マウスの 2 系統を使用し研究を行う。このため、我々のグループが作成した遺伝子欠損マウスを使用するという点だけでも、非常に独創的な研究テーマとなる可能性が高い。DMKN 欠損マウスへの皮下投与により B16F10 悪性黒色腫細胞株を接種し、野生型と比較して DMKN の有無が in vivo における悪性黒色腫の担癌状態や転移能に与える影響について評価する。原発巣や転移巣の腫瘍径、腫瘍の増大速度や浸潤性、転移能力を比較し、生存率や周囲組織における浸潤細胞の性状なども比較する。

## 3 . 研究の方法

( 実験方法 )

( 1 ) 当施設で加療した黒色腫患者の血清中 DMKN 濃度を ELISA 法で定量化する。さらに、血清中の DMKN が、黒色腫の重症度、病勢、治療反応性を反映するバイオマーカーとしての有用性示すか解析を行った。( 福井大学倫理委員会 : 20170060、20170063 )

( 2 ) 腫瘍周囲に発現する DMKN と、組織中の悪性黒色腫細胞の関係性を、組織学的に検討する。( 手技 ) DMKN / の免染 ( 赤 ) と Melanin 分染 ( 青 ) の 2 重染色を行い検討した。

( 3 ) 動物実験。DMKN 欠損マウスへの皮下に B16F10 悪性黒色腫細胞株を接種し、野生型と比較して DMKN の有無が in vivo における黒色腫の担癌状態と与える影響について評価する。我々が 独自に作製した DMKN / 欠損マウスと DMKN / / 欠損マウスを使用し、動物実験を行う。CD8 陽性 T 細胞や PD-1 細胞、腫瘍関連抗原の認識を含めた一連の抗腫瘍免疫作用を担う細胞の浸潤を免疫染色法で検討した。

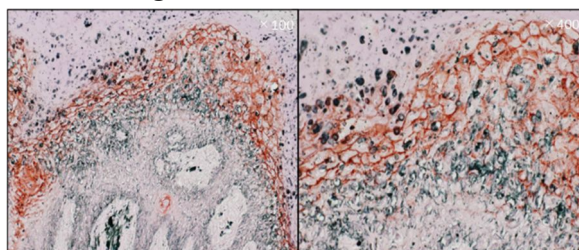
## 4 . 研究成果

( 1 ) 当施設を受診した黒色腫患者の血清中 DMKN 濃度を ELISA 法で定量化を行った。しかし、これまでの臨床データから、悪性黒色腫患者の血清中 DMKN 濃度は一般的に総じて低く、高値の患者がいても皮膚炎などと合併していることが多く、悪性黒色腫の重症度、病勢など相関している証拠は得られなかった ( 図 1 )。ただ、アトピー性皮膚炎と尋常性乾癬、水疱症は、血清中 DMKN 濃度と病勢との相関性を強く示唆した ( 図 1 )。さらにアトピー性皮膚炎の梢血好酸球数、血清 LDH、血清 IgE、血清 TARC との相関性を示唆した ( data not shown )。

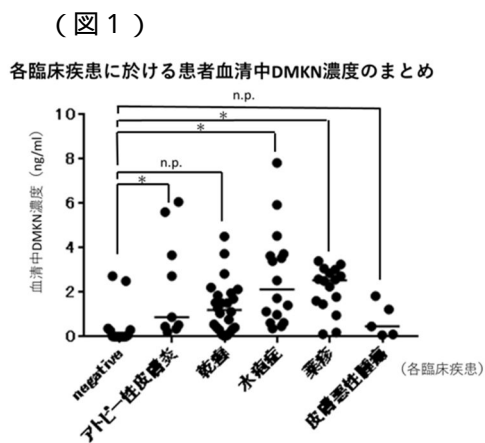
しかし、局所表皮・組織内の DMKN 発現量と悪性黒色腫の重症度、病勢などが相関している可能性はまだ否定できないと考えている。表皮内の DMKN 発現量を定量することはかなり困難と予想されるが、DMKN の免疫染色などで定量化を行い、悪性黒色腫との相関性を明らかにしたい。

(2) 腫瘍周囲に発現する DMKN が、組織中の悪性黒色腫細胞と、どのような関係性があるのか、組織学的に検討した。DMKN / の免染(赤)と Melanin 分染(青)の2重染色を行った(図2-1)。強拡大像では、メラニン陽性(緑)腫瘍細胞の樹状突起が、DMKN を発現している顆粒層/有棘層まで達しており、DMKN 蛋白と直接接している像が得られた

(図2-2)。DMKN 蛋白が、腫瘍細胞に直接作用している可能性が示唆された。しかし、組織学的にはっきりした関係性は明らかにできなかった。今後、DMKN とメラノーマ細胞のマーカー(HMG45、MelanA など)による2重染色を行い、さらなる検討を行う予定である。(図2) Malignant Melanoma 病変部の DMKN / 免染と Melanin 分染



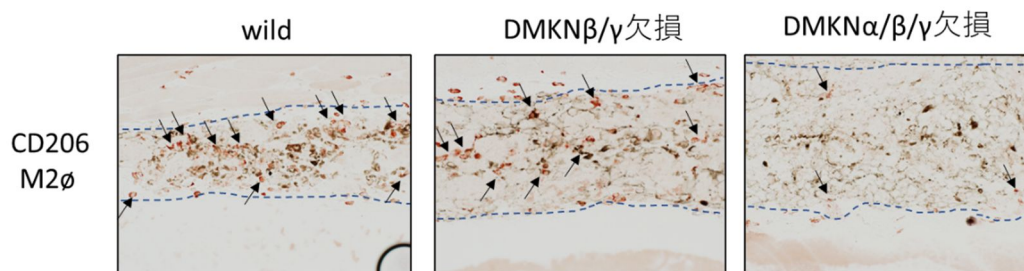
(図2-1) 弱および中等度拡大像



(図2-2) 強拡大像。メラニン陽性(緑)腫瘍細胞の樹状突起が、DMKN を発現している顆粒層/有棘層まで達していた。

(3) DMKN 欠損マウスへの皮下に B16F10 悪性黒色腫細胞株を接種し、野生型と比較して DMKN の有無が in vivo における黒色腫の担癌状態与える影響について組織免疫染色で評価した。我々が独自に作製した DMKN / 欠損マウスと DMKN / / 欠損マウスを使用し、動物実験を行った。B16F10 悪性黒色腫細胞  $2.0 \times 10^5$  細胞を皮下投与し、5 日目に組織を回収した。CD4/8 陽性 T 細胞や PD-1 細胞、CD206 細胞を免染し、腫瘍関連抗原の認識を含めた一連の抗腫瘍免疫作用を担う細胞の浸潤を免疫染色法で検討した。CD4/8 陽性 T 細胞や PD-1 陽性細胞の腫瘍組織内浸潤細胞数に著変はなかったが、CD206 陽性細胞の腫瘍組織内浸潤細胞数は、野生型と比較して、DMKN 欠損マウスで減少していた。今後、N 数を増やすと同時に再現性を確認する予定である。

(図3)



5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6 . 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7 . 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------