

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K16221

研究課題名（和文）エピゲノム情報に注目した悪性黒色腫の新しい治療標的分子の解明

研究課題名（英文）new therapeutic target molecules for malignant melanoma focusing on epigenomic information

研究代表者

山本 洋輔（Yamamoto, Yosuke）

千葉大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号：40645628

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：悪性黒色腫の臨床検体を対象として、遺伝子のDNA異常メチル化に着目することにより患者群が層別化され、臨床症状との相関も見られた。またそれら層別化に相関する遺伝子異常についても同定された。それらの遺伝子についても悪性黒色腫細胞株を用いたノックダウン実験を通じて機能解析を行った。ある遺伝子ではノックダウンにより細胞増殖、細胞浸潤の亢進が見られた。これらより特定の遺伝子はDNAの異常メチル化などにより発現が減少し、それが腫瘍増殖に関与し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

悪性黒色腫に対する化学療法は免疫チェックポイント阻害薬と分子標的薬が上市されているが、免疫チェックポイント阻害薬の奏効率は約44%であり、分子標的薬に関しては適応となる患者が日本人では25%とまだこれら薬剤の恩恵にあずかれない患者も多い。

我々の研究では腫瘍のエピゲノム情報に注目することにより、新たな治療対象となりうる遺伝子を探索した。その結果いくつかの候補遺伝子が得られ、機能解析にて表現型に寄与しうる遺伝子を同定することができた。

研究成果の概要（英文）：In clinical samples of patients with malignant melanoma, the group of patients was stratified by focusing on aberrant DNA methylation of genes and correlated with clinical symptoms. Genetic abnormalities correlating with these stratifications were also identified. Functional analysis of malignant melanoma cell lines revealed that knockdown of certain genes increased cell proliferation and invasiveness. These findings suggest that the expression of specific genes may be decreased due to abnormal DNA methylation, which may be involved in tumor growth.

研究分野：皮膚科学

キーワード：悪性黒色腫 エピゲノム DNAメチル化

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍においては高頻度に遺伝子のプロモーターがメチル化されることで下流の腫瘍抑制遺伝子を不活化することががん発生に深く関わっている。悪性黒色腫においてもゲノム変異として癌遺伝子 BRAF の活性化型変異(V600E)や、エピゲノム変異として DNA メチル化、ヒドロキシメチル化の関与が報告されている。悪性黒色腫での BRAF の異常な活性化に対し、BRAF キナーゼ阻害剤の有効性が報告されるなど、これらのゲノム変異は治療標的を含めて臨床応用が可能な重要な情報となりうる。

我が国の悪性黒色腫は BRAF 変異が少ないとされる四肢末端部や粘膜に発生する例が多く、BRAF 活性化変異陽性率は 20-30%とされており、欧米に比べ陽性率は低い。また、BRAF 変異陰性例に対しても、ニボルマブなどの抗 PD-1 抗体をはじめとする免疫チェックポイント阻害薬が用いられているが、ニボルマブでの客観的奏効率率は 15-30%いえない。

### 2. 研究の目的

そこで本研究は、エピゲノム状態およびゲノム・エピゲノム相関に着目した新たな治療標的分子を解明することを目的に悪性黒色腫におけるゲノム・エピゲノム変異解析研究として解析を行う。切除不能な悪性黒色腫に対する現在の薬物療法は、ドライバー遺伝子である BRAF 阻害薬と免疫チェックポイント阻害薬が主であるが、BRAF 変異が少ないとされる四肢末端の悪性黒色腫が、日本人では悪性黒色腫患者の半数を占めるために、日本人は欧米人に比べ BRAF 阻害薬の恩恵を受けることが少ない。エピゲノム解析について、網羅的メチル化解析からプロモーター領域のメチル化に注目した独自の患者層別化をし、それぞれの群のゲノム解析との相関より特異的かつ重要な分子異常を同定し発癌機序を解明する。これまで悪性黒色腫においてなされていなかった独創的な解析による分子治療標的を同定する。それにより新たな治療概念、治療薬の開発を目指す。

### 3. 研究の方法

- (1). 臨床検体より DNA を採取する。
- (2). 採取した DNA より網羅的メチル化解析にてエピゲノム情報を、全エクソンシーケンスにてゲノム情報を取得する。
- (3). 取得したエピゲノム情報から患者の層別化をし、臨床情報との相関を解析する。
- (4). 解析より層別化に影響を与える遺伝子を抽出し発現解析を行う。

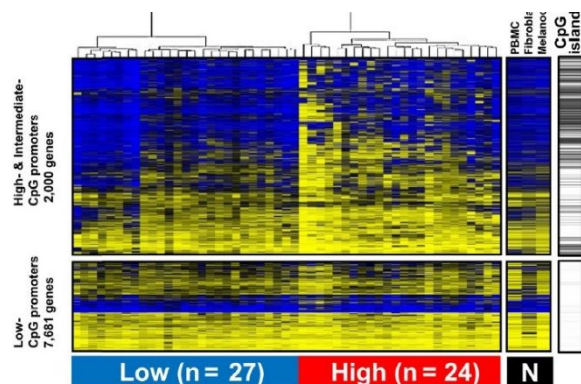
### 4. 研究成果

(1). 約 6 年間で当施設にて加療した悪性黒色腫患者 173 例を対象とした。手術検体のホルマリオン固定標本より DNA を抽出した。

(2). 対象患者のうち解析に足る DNA 収量を得た 77 例について、エピゲノムに関して Illumina 社の Infinium HumanMethylation450 BeadChip (Infinium 450k)を用いて、ゲノム全体の CpG アイランドの 96%をカバーする約 45 万か所の CpG サイトの DNA メチル化の定量解析を施行した。ゲノム変異に関して Qiagen 社の Comprehensive cancer panel を用いて 275 種類のがん関連遺伝子のターゲットエクソン解析を施行した。

(3). エピゲノム情報に基づき患者は高メチル化群と低メチル化群の 2 群に層別化された。高メチル化群では腫瘍の厚さが有意に厚く(右図) 生存率が低かった。エクソンシーケンスによる変異が 2 群間で差があるか解析した。低メチル化群に有意に高頻度に変異がみられる遺伝子が同定された。

(4-1). 2 群の層別化に寄与する遺伝子を同定するために高メチル化群でのみメチル化している遺伝子に注目した。いくつかの候補遺伝子が同定され、The Cancer Genome Atlas の公



共

開しているコホートのエピゲノムデータを用いても、自験集団と類似する傾向の DNA メチル化が観察された。同定された遺伝子のうち自験例ないし公開データベースで予後など表現型の差に關与しうる遺伝子について機能解析を行った。

(4-2). 上記の候補遺伝子について悪性黒色腫株を用いて機能解析を行った。shRNA をウイルスベクターを用いて細胞に導入しノックダウンし、mRNA とタンパク発現の減少を見た。特定の遺伝子のノックダウン細胞では細胞増殖速度が亢進し、より大きなコロニーを形成した。マトリゲルを用いて浸潤アッセイでもノックダウン細胞は浸潤の亢進が見られた。

上記の結果より悪性黒色腫のエピゲノム情報に基づき、腫瘍の厚さなどに関与する可能性のある治療方針の候補たりえる遺伝子が同定された。しかしこれらエピゲノム異常が起こるメカニズムに関しては遺伝子パネル検査によりいくつかの遺伝子変異が示唆されるもののさらなる研究の余地が残った。

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1件

1. 著者名 山本洋輔、金田篤志、他	4. 発行年 2021年
2. 出版社 株式会社日本臨牀社	5. 総ページ数 517
3. 書名 日本臨床79巻増刊号2 皮膚悪性腫瘍(第2版)上	

〔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
---------	---------