

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 16 日現在

機関番号：33910

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22791092

研究課題名（和文）新規モデルマウスを用いたデノボメラノーマの病態解析と治療法の開発

研究課題名（英文）

Pathological analysis of de novo melanoma and therapy using novel melanoma model mice

研究代表者

熊坂 真由子（KUMASAKA MAYUKO）

中部大学・生命健康科学研究所・研究員

研究者番号：90469023

研究成果の概要（和文）：デノボメラノーマモデルマウスと、母斑関連メラノーマモデルマウスを用いて、デノボメラノーマと母斑関連メラノーマを病理学的手法、分子生物学的手法を用いて比較研究を行った。その結果、マウスデノボメラノーマで特徴的に発現量が低下する遺伝子の選択に至った。さらに、ヒトメラノーマ組織を用いた解析から、この遺伝子は、デノボメラノーマの発症に関わる E 遺伝子と関連しながらメラノーマ発症に関わる可能性が見出された。

研究成果の概要（英文）：We have performed a comparative study about de novo melanoma and nevus-associated melanoma which obtained from each model mice using pathological and biological method. As a result, a characteristic alteration of gene expression in de novo melanoma was found. By further analysis using human melanoma tissues, we suggest the possibility that this gene is associated with melanoma tumorigenesis in relation to *E*, which is involved in de novo melanoma tumorigenesis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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：メラノーマ、モデルマウス、色素細胞

1. 研究開始当初の背景

皮膚癌の一種であるメラノーマ（悪性黒色腫）は発症形式の違いによって2種類に分類される。母斑が前癌腫瘍を経て悪性腫瘍に転化、すなわち多段階に発癌する母斑関連メラノーマと、正常細胞から突然メラノーマが発症するデノボメラノーマである。メラノーマの75-80%は、デノボメラノーマと考えられている。デノボメラノーマは発症時には既に悪性腫瘍であるため、発症までの解析が非常

に難しい。また、デノボメラノーマと母斑関連メラノーマを科学的根拠に基づいて分ける方法はなく、両メラノーマが混同されることも少なくない。これらの理由から、メラノーマのほとんどを占めるデノボメラノーマの病態や発症の分子メカニズムについては不明な点が多く、メラノーマの治療を困難なものとしている。メラノーマの解析や治療法の開発にはモデルマウスの使用が有効であるが、デノボメラノーマを発症するマウスと

母斑関連メラノーマを発症するマウスを同時に使用できる環境はまれであるため、メラノーマの比較研究は困難であった。

2. 研究の目的

本研究室で新規に作製したデノボメラノーマモデルマウスから、デノボメラノーマの病態と遺伝子発現に関する情報を得る。その後、その情報をもとに、ヒトの検体を用いて、デノボメラノーマの病態、発症のメカニズムを組織学的、分子生物学的手法を用いて解明する。

3. 研究の方法

(1) 母斑関連メラノーマモデルマウスから得られたメラノサイト系良性腫瘍、母斑関連メラノーマ、デノボメラノーマモデルマウスから得られたデノボメラノーマの病態を、それぞれの組織切片を用いて、比較解析を行う。

(2) メラノーマモデルマウスから得られた、メラノサイト系良性腫瘍、母斑関連メラノーマ、デノボメラノーマを用いてマイクロアレイ法を用いた遺伝子発現の比較解析を進める。クラスター解析を行うことで、それぞれの組織の特徴化を進めると共に、デノボメラノーマの発症過程で発現量が増加、あるいは減少する遺伝子の選別を行う。これにより、ヒトデノボメラノーマの治療のターゲットとなりうる候補遺伝子をできるだけ多く同定する。

(3) 選別したデノボメラノーマ関連遺伝子の発現量の変化が、ヒトデノボメラノーマにおいても同様に生じているかを確認するために、ヒト由来のメラノサイト系良性腫瘍、母斑関連メラノーマ、デノボメラノーマの組織における発現解析を免疫染色法や Real-time PCR 法を用いて行う。また、この手法によって選別された遺伝子がメラノーマ発症過程のどのプロセスにどのように関わっているのかを培養細胞系を用いて調べる。

4. 研究成果

(1) デノボメラノーマの組織学的解析
母斑関連メラノーマモデルマウス、デノボメラノーマモデルマウス由来の腫瘍の病態を、抗 Ki67 抗体を用いて免疫染色することで、分裂期にある細胞数の比較を行った。この結果、良性腫瘍と比較すると、母斑関連メラノーマでもデノボメラノーマでも Ki67 陽性細胞が有意に増加し、どちらのメラノーマでも分裂速度が上昇していることが分かった。し

かしながら、2種類のメラノーマ間で有意な差は検出されなかった。

(2) デノボメラノーマの遺伝子発現解析
母斑関連メラノーマモデルマウス、デノボメラノーマモデルマウス由来の腫瘍から抽出した RNA を用いてマイクロアレイを行った。この結果をクラスター解析し、良性腫瘍と比べて、デノボメラノーマで発現量が変化、かつ、母斑関連メラノーマと比べて、デノボメラノーマで発現量が変化する遺伝子の選別を行った。これらの遺伝子に関して、Real-time PCR 法を用いて再現性の確認を行い、再現性が確認できた遺伝子をさらに選別した。その結果、デノボメラノーマにおいて発現量が非常に低下する P 遺伝子の選別に至った。

次に、P 遺伝子の発現量をデノボメラノーマ、母斑関連メラノーマと分類されたヒトメラノーマにおいて Real-time PCR 法を用いて発現解析を行ったが、デノボメラノーマ特徴的に発現量が低下する傾向は見られなかった。原因の1つとして、病理学的方法からは2種類のメラノーマの混同が避けられないことが挙げられる。そこで解析方法を変更し、デノボメラノーマの発症に関わる E 遺伝子との発現量の相関を調べたところ、非常に強い相関が検出された。このことから、P 遺伝子は、少なくとも E 遺伝子と関与することでメラノーマ発症に関わっていることが分かった。

(3) メラノーマで発現量が減少する GNG2 遺伝子の同定

上で行ったマイクロアレイの結果より、母斑関連メラノーマ、デノボメラノーマの両メラノーマの発症に関わる可能性がある遺伝子として GNG2 遺伝子を選別した。マイクロアレイの結果より、GNG2 遺伝子は、両種類のメラノーマにおいて良性腫瘍と比較して発現量が低下していた。また、GNG2 遺伝子に関して、複数のサンプルで再現性の確認を行ったところ、再現性が得られた。さらに、ヒトの検体においても同様の結果が得られ、GNG2 遺伝子がメラノーマ発症に関わる可能性が示唆された。そこで、この研究成果を、論文としてまとめた（発表論文-2）。

(4) 新規ヘアレスメラノーマモデルマウスの作製

本研究に用いた2種類のモデルマウスは、有毛であり、ヒトの皮膚とは異なっていた。そこで、ヘアレスマウスを交配に用いることで、毛のない皮膚にメラノーマを発症、つまりヒトのメラノーマにより近い形態でメラノーマを発症する、新しいメラノーマモデルマウスの作製に成功した。そこで、この研究成果

を論文としてまとめた（発表論文-4）。本研究で新たに作製したマウスは、母斑関連メラノーマを発症するマウスであるので、今後は同様の手法を用いてデノボメラノーマモデルマウスの作製につなげていく予定である。

（5）重金属と皮膚癌

皮膚癌を含めた癌の発症には、生活習慣や様々な環境因子が関わっている。本研究では、複数の重金属が相互作用することで、発癌のステップである、細胞の接着非依存性増殖能力、浸潤能力、アポトーシスに影響を及ぼすことを突き止めた。つまり、複数の重金属を多量に摂取することで、皮膚癌の発症を促進する可能性があることが分かった。そこで、この研究成果を論文としてまとめた（発表論文-1、3）。今後、デノボメラノーマ、母斑関連メラノーマの発症についても同様の現象が起きているか検討が必要である。

（6）マウスにおける、母斑関連メラノーマ、デノボメラノーマの両メラノーマの発症に関わる c-RET 遺伝子の発現解析をヒトメラノーマにおいて行ったところ、同様の結果が得られた。そこで、この研究成果を論文としてまとめた。

（発表論文-6）

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 7 件）

（1）Kumasaka MY, Yamanoshita O, Shimizu S, Ohnuma S, Furuta A, Yajima I, Nizam S, Khalequzzaman M, Shekhar HU, Nakajima T, Kato M. 2012. Enhanced carcinogenicity by coexposure to arsenic and iron and a novel remediation system for the elements in well drinking water. Arch Toxicol. 87(3): 439-447. 査読有.

（2）Yajima I, Kumasaka MY, Naito Y, Yoshikawa T, Takahashi H, Funasaka Y, Suzuki T, Kato M. 2012. Reduced GNG2 expression levels in mouse malignant melanomas and human melanoma cell lines. Am J Cancer Res. 2(3): 322-329. 査読有.

（3）Yajima I, Uemura N, Nizam S, Khalequzzaman M, Thang ND, Kumasaka MY, Akhand AA, Shekhar HU, Nakajima T, Kato M. 2012. Barium inhibits arsenic-mediated apoptotic cell death in human squamous cell carcinoma cells. Arch Toxicol. 86(6): 961-973. 査読有.

（4）Thang ND, Yajima I, Nakagawa K, Tsuzuki T, Kumasaka MY, Ohgami N, Ly TB, Iwamoto T, Watanabe D, Kato M. 2012. A novel

hairless mouse model for malignant melanoma. J Dermatol Sci. 65(3): 207-212. 査読有.

（5）Kato M, Takeda K, Hossain K, Thang ND, Kaneko Y, Kumasaka M, Yamanoshita O, Uemura N, Takahashi M, Ohgami N, Kawamoto Y. 2010. A redox-linked novel pathway for arsenic-mediated RET tyrosine kinase activation. J Cell Biochem. 110(2): 399-407. 査読有.

（6）Ohshima Y, Yajima I, Takeda K, Iida M, Kumasaka M, Matsumoto Y, Kato M. 2010. c-RET molecule in malignant melanoma from oncogenic RET-carrying transgenic mice and human cell lines. PLoS One. 5(4):e10279. 査読有.

（7）Kumasaka MY, Yajima I, Hossain K, Iida M, Tsuzuki T, Ohno T, Takahashi M, Yanagisawa M, Kato M. 2010. A novel mouse model for de novo Melanoma. Cancer Res. 70(1): 24-29. 査読有.

〔学会発表〕（計 5 件）

（1）矢嶋伊知朗、熊坂真由子、加藤昌志、「発癌リスクを亢進させる重金属複合汚染に有効な浄化剤の開発」、日本衛生学会第 83 回大会、2013 年 3 月 24-26 日、石川県（金沢大学）

（2）矢嶋伊知朗、熊坂真由子、加藤昌志、「メラノーマにおける GNG2 の機能」、日本色素細胞学会第 24 回学術大会、2012 年 11 月 23-25 日、滋賀県（長浜バイオ大学）

（3）熊坂真由子、矢嶋伊知朗、飯田真智子、加藤昌志、「新規メラノーマモデルマウスの樹立」、日本色素細胞学会第 23 回学術大会、2010 年 11 月 27 日、東京都（慈恵医大）

（4）熊坂真由子、矢嶋伊知朗、飯田真智子、加藤昌志、「A novel mouse model for de novo melanoma」、JSPS Asia-Africa Science Platform Program、2010 年 7 月 28 日、愛知県（中部大学）

（5）熊坂真由子、矢嶋伊知朗、飯田真智子、加藤昌志、「新規メラノーマモデルマウスの樹立と今後の展望」、日本衛生学会第 80 回大会、2010 年 5 月 10 日、宮城県（宮城国際センター）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

名称：浄化剤及び浄化方法

発明者：加藤昌志、山ノ下理、熊坂真由子、古田昭男

権利者：中部大学

種類：特許

番号：特願 2012-7741

出願年月日：2012 年 1 月 18 日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

中部大学生命健康科学研究所ホームページ

http://www.chubu.ac.jp/organization/institute/health_sciences/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

熊坂 真由子 (KUMASAKA MAYUKO)

中部大学・生命健康科学研究所・研究員

研究者番号：90469023