

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23659554
 研究課題名（和文） ヒト悪性黒色腫における miRNA の機能解明と診断・治療法開発への応用
 研究課題名（英文） Investigation of roles of miRNA in the immunosuppression and clinical use for patients with melanoma
 研究代表者
 河上 裕 (KAWAKAMI YUTAKA)
 慶應義塾大学・医学部・教授
 研究者番号：50161287

研究成果の概要（和文）：

miR-222 はヒト悪性黒色腫細胞で高発現し、患者血清中に高頻度に検出され、進行例や転移例で高値を示すことから、血液バイオマーカーとなる可能性が示された。また悪性黒色腫細胞では、miR-222 高発現による STAT3 シグナル活性化を介した免疫抑制性サイトカインの産生促進、およびがん細胞から分泌される miR-222 含有エクソソームによる樹状細胞障害などが示され、miRNA-222 は悪性黒色腫の免疫抑制状態改善のための治療標的になる可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：

miR-222 is over-expressed in human melanoma cells, and may be a blood biomarker in melanoma patients because serum miR-222 is increased in patients particularly with advanced stage melanoma and metastasis. miR-222 may also be involved in the immunosuppression in melanoma patients through STAT3 dependent production of immunosuppressive cytokines, and miRNA containing exosome mediated dendritic cell dysfunction. Therefore, miR-222 may be an attractive target for diagnosis and treatment of melanoma patients.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

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：悪性黒色腫、miRNA、免疫逃避、バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

悪性黒色腫は、近年の臨床試験結果から、免疫療法の効果が期待できるがんであるこ

とが明らかになったが、まだその治療効果は十分でなく、その主原因として、悪性黒色腫による免疫抑制の誘導が考えられており、そ

の機序の解明と制御法の開発が期待されている。また悪性黒色腫では利用できる血液腫瘍マーカーに限られており、有用なバイオマーカーの同定も期待されている。最近、内在性 non-coding RNA である miRNA のがん病態への関与が明らかになり、診断や治療の標的として注目されている。研究申請者は、ヒト脳腫瘍では miR-222 が脳腫瘍細胞に高発現し、がん細胞の ICAM-1 低下などの機序により免疫抵抗性に関与すること、また血清中に検出されてバイオマーカーになる可能性を示してきたが、悪性黒色腫でも同様な miRNA の意義が考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、ヒト悪性黒色腫における miRNA、特に miR-222 の免疫抑制性や抵抗性への関与の解明と、患者血清中での検出による血液バイオマーカーとしての可能性を検討することを目的とした。miR-222 による免疫抑制性・抵抗性については、悪性黒色腫細胞自体の ICAM-1 低下などによる T 細胞認識障害だけでなく、悪性黒色腫細胞が分泌する miRNA 含有エクソソームを介した樹状細胞の免疫抑制作用を検討し、miRNA を治療標的とした悪性黒色腫細胞誘導性の免疫抑制の改善による新規治療法開発の可能性を検討した。また血清中 miRNA の悪性黒色腫における診断的意義を検討した。

3. 研究の方法

(1) ヒト悪性黒色腫細胞株における miR-222 の発現解析

多数のヒト悪性黒色腫細胞株において、成熟型 miRNA のみを検出できる miR-222 特異的プローブを用いて定量的 PCR 解析を行い、miR-222 発現を解析し、正常培養ヒト色素細胞での発現と比較した。

(2) 悪性黒色腫患者血清中 miR-222 の測定

各種ステージの悪性黒色腫患者、および健

常人血清から total RNA を抽出し、Taqman プローブを用いた定量 PCR 法により miR-222 を検出した。250 μ L の血清検体から、miR-222 と内在性コントロール miR-16 を測定可能である。

(3) 血清 miR-222 の存在形態の確認

悪性黒色腫患者血清および悪性黒色腫細胞株培養上清から、超遠心法や抗体を用いてエクソソームを分離し、エクソソームに含有される miRNA を定量 PCR 法により測定した。

(4) ヒト悪性黒色腫細胞に発現する miR-222 による免疫逃避機構の解析

miR-222 低発現ヒト悪性黒色腫細胞株に pre-miR-222 を導入して miR-222 を発現させ、逆に miR-222 高発現ヒト悪性黒色腫細胞株に anti-miR-222 inhibitor を作用させて miR-222 発現を低下させ、それぞれ免疫調節因子である ICAM-1, IL6, VEGF などの発現産生を、Flow cytometer や ELISA 法で検討した。さらに分子機構を解析するために、Western blot 法を用いて、SOCS3, STAT3, リン酸化 STAT3 などのタンパク量の変化を検討した。

がん細胞が分泌する miRNA 含有エクソソームによる免疫細胞の機能障害の可能性を検討するために、miR-222 高発現ヒトがん細胞の培養上清から濃縮した miR-222 高含有エクソソームを *in vitro* でヒト培養樹状細胞に添加し、樹状細胞上の ICAM-1 の発現を Flow cytometer で検討した。

4. 研究成果

(1) 悪性黒色腫細胞患者において miR-222 は血液バイオマーカーとなる可能性がある

ヒト悪性黒色腫細胞株における miR-222 の発現を検討するために、多数の悪性黒色腫細胞株で成熟型 miRNA のみを検出できる miR-222 特異的プローブを用いて miR-222 の定量的 PCR 解析を行ったところ、ヒト悪

性黒色腫細胞株では、正常培養ヒト色素細胞と比較して、miR-222 の発現が高いことが確認された。次に多数の悪性黒色腫患者血清を用いて、定量 PCR 法を用いて血清中 miR-222 を測定したところ、悪性黒色腫患者血清中には、健常人に比較して有意に高い miR-222 が検出され、またステージが進行するにつれて血清中 miR-222 が高くなる傾向、および遠隔転移が存在する患者血清中では miR-222 が高い傾向が認められた。したがって、miR-222 は悪性黒色腫患者における血液バイオマーカーとして利用できる可能性が示された。今後、さらなる臨床病理学的因子との相関解析により、血清 miR-222 の悪性黒色腫の診断標的としての意義を明確にする必要がある。

miR-222 低発現ヒト悪性黒色腫細胞株と miR-222 高発現悪性黒色腫細胞株の培養上清からエクソソームを抽出し、miR-222 含有量を測定すると細胞株での発現と相関した miR-222 がエクソソームに含まれることが判明した。したがって、血清中に miR-222 は少なくともエクソソームとして存在することが示され、また血清中 miR-222 は悪性黒色腫細胞の miR-222 発現を反映することが示された。

(2) ヒト悪性黒色腫細胞において miR-222 は免疫抑制誘導に関与する

ヒト脳腫瘍細胞では、miR-222 の高発現は、がん細胞の T 細胞による認識や樹状細胞の T 細胞活性化に重要な ICAM-1 の低下をきたすので、ヒト悪性黒色腫細胞で同様な検討を行った。しかし悪性黒色腫細胞では脳腫瘍と異なり、miR-222 の高発現はがん細胞上の ICAM-1 の低下を起こさなかった。

ヒト悪性黒色腫は各種免疫抑制性サイトカインを産生するので、次に代表的な免疫抑制性（樹状細胞機能抑制性）サイトカインで

ある IL-6 と VEGF の産生における miR-222 の意義を検討した。miR-222 低発現ヒト悪性黒色腫細胞株に pre-miR-222 を導入して miR-222 を発現させたところ、IL-6 と VEGF の産生が上昇し、逆に miR-222 高発現悪性黒色腫細胞株に anti-miR-222 inhibitor を作用させて miR-222 発現を低下させたところ、IL-6 と VEGF の産生が低下した。したがって、miR-222 はヒト悪性黒色腫細胞からの IL-6 や VEGF などの免疫抑制性サイトカインの産生を促進して、免疫抑制状態を誘導する可能性が示された。

in silico 解析により SOCS3 が miR-222 の標的となる可能性が示された。SOCS3 はサイトカインの産生制御に重要な JAK-STAT3 シグナルを抑制するので、miR-222 - SOCS3 - STAT3 - IL6 / VEGF の経路の存在が考えられた。そこで、上記と同様にヒト悪性黒色腫細胞株を用いた miR-222 の発現・低下実験を行い、Western blot 法で SOCS3 と STAT3、およびリン酸化 STAT3 の変化を検討したところ、SOCS3 タンパクには変化がみられなかったが、リン酸化 STAT3 は miR-222 の発現と相関して増加した。すなわちヒト悪性黒色腫細胞では、miR-222 は SOCS3 とは異なる経路を介して STAT3 シグナル活性化を制御し、IL6 や VEGF などの免疫抑制性サイトカインの産生に関与することが判明した。他のがんでの報告から、miR-222 は PTEN 発現低下を介して STAT3 の活性化や免疫抑制性サイトカイン産生を促進する可能性がある。

がん細胞から分泌される miR-222 含有エクソソームが樹状細胞などの免疫細胞に作用して機能障害を起こす可能性があるため、miR-222 含有エクソソームを含有する miR-222 高発現がん細胞の培養上清を *in vitro* で樹状細胞に加えたところ、樹状細胞

の T 細胞活性化能に重要な ICAM-1 の発現が軽度であるが低下したので、がん細胞が分泌する miRNA による免疫細胞機能障害の可能性が示唆された。今後、この現象の *in vivo* で の検討が必要である。

以上の結果から、本研究により、ヒト悪性黒色腫では、miR-222 が血液バイオマーカーになる可能性、および免疫抑制誘導に関与して治療標的になる可能性が明らかになった。

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 3 件)

1. 河上裕. 担がん生体における免疫病態. 医学のあゆみ. 244(9):745-750. 2013. 査読無
2. 河上裕, 川瀬芳恵, 大泉梓, 野路しのぶ, 桜井敏晴, 藤田知信. がん免疫療法のためのバイオマーカー. 日本臨床. 70(5):759-766. 2012. 査読無
3. 河上裕, 谷口智憲, 中村公子, 川瀬芳恵, 野路しのぶ, 大泉梓, 南雲春菜, 長谷川舞, 徐明利, 岡本正人, 桜井敏晴, 藤田知信. がん免疫病態と免疫動態の評価: 特集「がん免疫学と免疫療法の新展開」. 血液フロンティア. 22(8):1183-1190. 2012. 査読無

[学会発表] (計 8 件)

1. 河上裕, 悪性黒色腫に対する免疫療法の最近の進歩, 第 76 回日本皮膚科学会東京支部学術大会, 京王プラザホテル (東京), 2013/2/16
2. Yukata Kawakami, Mechanisms for cancer induced immunosuppression in tumor associated microenvironment and their reversal by targeting altered

signaling pathways in cancer cells and immune cells, CSH Asia/ICMS Joint Conference on Tumor Microenvironment, Suzhou, China, 2012/11/16

3. Yutaka Kawakami, Cancer induced immunosuppressive cascades in tumor associated microenvironment and their reversal by targeting altered signaling pathways in cancer cells and immune cells, IEIIS2012 Homeostatic Inflammation Symposium, National Center of Sciences Building, Tokyo, Japan, 2012/10/26
4. 河上裕, がん関連微小環境の免疫病態の解明と診断・治療への応用, 第 71 回日本癌学会, ロイトン札幌 (北海道), 2012/9/21
5. 宮崎潤一郎, 植田良, 谷口智憲, 藤田知信, 河上裕, miR-221 と miR-222 は免疫抑制性サイトカインの産生を介してヒト悪性黒色腫細胞による免疫抑制を促進する, 第 71 回日本癌学会, ロイトン札幌 (北海道), 2012/9/19
6. Yutaka Kawakami, Reversal of Multiple Cancer Induced Immunosuppressive Cascades by Molecular Targeted Therapy for Effective Immunotherapy, The 7th International Cancer Vaccine Symposium, Convitto Dlla Calza, Florence, Italy, 2012/9/11
7. 河上裕, がん患者における免疫病態とその制御-効果的ながん免疫療法開発を目指して-, 千里ライフサイエンスセミナー D3 「がん免疫療法の新展開」, 千里ライフサイエンスセンタービル 5 階ライフホール(大阪), 2012/9/7

8. Yutaka Kawakami, Mechanisms of Immunosuppression Caused by Human Cancer Cells and Their Control for Effective Immunotherapy, 9thChina-Japan Joint Conference of Cancer, Shanghai China, 2011/12/23

〔図書〕(計3件)

1. Kawakami Y, Yaguchi T, Sumimoto H, Kudo-Saito C, Tsukamoto N, Iwata-Kajihara T, Nakamura S, Nishio H, Satomi R, Kobayashi A, Tanaka M, Hoon Park J, Kamijuku H, Tsujikawa T, and Kawamura N. Cancer-induced immunosuppressive cascades and their reversal by molecular-targeted therapy. *Annals of the New York Academy of Sciences*. WILEY. in press
2. Kawakami Y, Yaguchi T, Sumimoto H, Kudo-Saito C, Tsukamoto N, Iwata-Kajihara T, Nakamura S, Nishio H, Satomi R, Kobayashi A, Tanaka M, Kamijuku H, Tsujikawa T, Kawamura N. Roles of signaling pathways in cancer cells and immune cells in generation of immunosuppressive tumor associated microenvironments. in "The Tumor Immunoenvironment" Eds, Michael Shurin, Anatoli Malyguine, Viktor Umansky, Springer Science. :307-323,2013
3. 河上裕. がん免疫療法開発における制御ポイント. 分子標的薬 --がんから他疾患までの治療をめざして. 日本臨床, 日本臨床社, 144-148. 2012.11.

〔その他〕

ホームページ: <http://keiocancer.com/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河上 裕 (KAWAKAMI YUTAKA)
慶應義塾大学・医学部・教授
研究者番号 : 50161287

(2) 研究分担者

大多 茂樹 (OHTA SHIGEKI)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号 : 20365406
谷口 智憲 (YAGUCHI TOMONORI)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号 : 40424163

(3) 連携研究者

天谷 雅行 (AMAGAI MASAYUKI)
慶應義塾大学・医学部・教授
研究者番号 : 90212563
木庭 幸子 (KINIWA YUKIKO)
信州大学・医学部附属病院・講師
研究者番号 : 20436893