

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461705

研究課題名(和文) 機能的アッセイによる悪性黒色腫の腫瘍関連遺伝子の同定と解析

研究課題名(英文) Identification and analysis of tumor-associated genes of melanoma by functional assay

研究代表者

山下 利春 (Yamashita, Toshiharu)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号：50167706

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：DNA脱メチル化剤5-aza-dC存在下でIFN- β によるアポトーシスが誘導されるメラノーマ細胞株を用いて、細胞死に関係するmiRNAを網羅的に解析した。発現抑制と上流配列のメチル化を認めた6種類のmiRNAを同定した。そのうちmiR-596は20株のメラノーマ細胞において上流配列に高度メチル化を認め、miR-596前駆体の導入によりメラノーマ細胞の増殖が抑制された。5-aza-dC + IFN- β によるメラノーマ細胞の増殖抑制はmiR-596が関与することが示唆された。外科切除したメラノーマ検体は色素性母斑に比べてmiR-596のメチル化レベルが高かった。

研究成果の概要(英文)：We aimed to examine the epigenetically silenced miRNA and its involvement in the induction of apoptosis of cultured melanoma cells. A screen for miRNAs induced by 5-aza-2'-deoxycytidine (5-aza-dC) and interferon-beta (IFN- β) in TXM18 melanoma cells identified six species of miRNAs including miR-7, miR-203, miR-215 and miR-596. The CpG island of the miR-596 gene was strongly methylated in all melanoma cell lines tested (n = 20) whereas methylation levels were limited in melanocytes (n=4). Transfection of a precursor of miR-596 into melanoma cells induced growth suppression, indicating that the effect of 5-aza-dC plus IFN- β is in part due to induction of miR-596. Methylation levels of miR-596 were significantly higher in clinical specimens of melanoma as compared to benign melanocytic nevi.

研究分野：皮膚科学・皮膚腫瘍学

キーワード：悪性黒色腫(メラノーマ) インターフェロン- β アポトーシス DNAメチル化 5-aza-2'-cytidine
microRNA (miR) 次世代シーケンス

1. 研究開始当初の背景

悪性黒色腫（メラノーマ）は転移し易く、遠隔転移のある進行期メラノーマの予後は極めて悪い。NRAS/MAPK 経路はメラノーマの発がんに重要で、欧米人メラノーマの70%以上に BRAF 変異が認められる。BRAF 変異のあるメラノーマに BRAF 阻害薬が使用できるようになったが、わが国の V600 変異メラノーマは 30%以下である。これまでメラノーマの転移に関係する細胞遺伝子産物として、Wnt, β -catenin/PTEN, Ski, 転写因子 AP-2, TGF- β ファミリーMIC-1 などが報告されている。しかし、日本人メラノーマの40~50%にみられる手足のメラノーマ（末端黒子型メラノーマ）の浸潤・転移に関わる分子は明らかではない。現在、進行期メラノーマの全身療法として、インターフェロン- β (IFN- β) とダカルバジンが使用され、一部の症例には細胞周期チェックポイント阻害薬 (CTLA-4 抗体, 抗 PD-1 抗体) が使用される。しかし、いずれの全身療法も腫瘍縮小効果あるいは延命効果は一部の症例に限られる。症例によって奏効性が異なる原因として、細胞傷害に関係する細胞遺伝子が発現抑制されている可能性が推測される。

メラノーマ細胞に対するアポトーシス誘導能はインターフェロンの中では IFN- β が最も強力で、アポトーシス過程に caspase 2 の活性化が認められる (Kamiya T et al: J Interferon Cytokine Res 30: 349, 2010)。IFN- β にアポトーシス抵抗性を示すメラノーマ細胞株では、メチル化により IFN- β 誘導性のアポトーシス関連遺伝子が発現抑制されていることが推測される。われわれは、DNA 脱メチル化剤 5-aza-2'-cytidine (5-aza-dC) および IFN- β の複合効果によってアポトーシスが誘導されるメラノーマ細胞株を用いて、細胞死に関係する miRNA を網羅的に解析した。上流配列に著名なメチル化を認めた mir-596 に注目し、細胞増殖抑制効果とメラノーマ検体におけるメチル化について検討した。

2. 研究の目的

メラノーマの全身療法に使用される IFN- β の臨床効果は症例によって異なるが、この原因として細胞傷害に関係する細胞遺伝子の発現抑制が推測される。細胞遺伝子の発現抑制は、ゲノム DNA のメチル化によることが多い。そこで、5-aza-dC 存在下で培養し IFN- β 添加により強い細胞傷害の誘導されるメラノーマ細胞を用いて、IFN- β + 5-aza-dC によって発現の亢進

する microRNA を同定する。本研究は、メラノーマの術後補助療法として、また、進行期メラノーマの全身療法として使用されている IFN- β による細胞傷害作用に抵抗性を与える miRNA を同定し、メラノーマの浸潤と転移における役割を明らかにし、薬剤感受性の予測を目指すものである。5-aza-dC と IFN- β の 2 剤によってアポトーシスが誘導されるメラノーマ細胞株 TXM-18 を用いて、5-aza-dC + IFN- β 処理を行い、発現が亢進し、かつ 5' 上流域の CpG island の高度メチル化のみられる 6 種類の miRNA を同定した。本研究は、これら microRNA のうち、メラノーマ細胞で抑制されている microRNA の生物学的活性とメラノーマにおける発現を詳細に検討する。なお、機能的アッセイ法ではないが、BRAF 以外に存在すると思われる日本人メラノーマのドライバー変異の解析も臨床検体を用いて行った。

3. 研究の方法

3.1. 細胞株と組織検体: メラノーマ細胞株 20, 正常メラノサイト細胞株 4, メラノーマ切除検体 56, 色素性母斑切除検体 19 を解析した。

3.2. 細胞増殖性の検討: メラノーマ細胞株をそれぞれ無処理, 5-aza-dC 処理 (1 μ M, 72 時間培養), IFN- β 処理 (48 時間無処理後 1,000 U/ml で 24 時間培養), および 5-aza-dC+IFN- β 処理 (48 時間 5-aza-dC 処理後 5-aza-dC+IFN- β で 24 時間培養) した後, MTT アッセイにより細胞数を計測した。

3.3. miRNA 発現プロファイリングと定量 RT-PCR: メラノーマ細胞における miRNA 発現を TaqMan MicroRNA Array v2.0 (Applied Biosystems) を用いて網羅的に解析した。5-aza-dC+IFN- β 処理したメラノーマ細胞株から RNA を精製し, miRNA 発現を TaqMan microRNA Assays (Applied Biosystems) を用いた RT-PCR により miRNA の発現量を解析した。

3.4. DNA メチル化解析: メラノーマ細胞, 正常メラノサイトおよび臨床検体のゲノム DNA を EpiTect Bisulfite Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて bisulfite 処理し, bisulfite 処理 DNA を用いてメチル化特異的 PCR (MSP) 法, バイサルファイトパイロシークエンス法およびバイサルファイトシークエンス法により, CpG island のメチル化解析を行った。

3.5. 遺伝子導入による miRNA の効果: Lipofectamine 2000 を用いて, メラノーマ細胞株 TXM18, AK-1, SK-mel-23, C32 に miRNA Precursor Molecule (Ambion)

あるいは negative control (100 pmol) を導入し、72 時間後に MTT アッセイを用いて細胞数を計測した。

3.6. 色素性母斑およびメラノーマにおける m iRNA のメチル化: パラフィンブロックより、RNA を調整しパイロシーケンス法を用いて解析した。

3.7. メラノーマのドライバー変異の解析: 原発腫瘍、転移腫瘍および末梢血単核球より細胞 DNA を精製し、409 遺伝子のエクソン変異を次世代シーケンスにより解析した。

なお、臨床検体の採取に関しては、本大学のゲノム委員会と倫理委員会承認を得ており、個人情報の管理は本学の個人情報保護規定に基づいて行われている。

4. 研究成果

4.1. m iRNA 発現プロファイリングによる m ir-596 の同定

TXM18 細胞において 5-aza-dC および IFN- β 処理によって発現変動する miRNA を TaqMan miRNA Array を用いて網羅的に解析した。664 種の miRNA のうち、コントロール群より、5-aza-dC + IFN- β によって 5 倍以上発現が亢進した miRNA は 23 種類であった。miRNA コード遺伝子を UCSC ゲノムブラウザで検討した結果、上流 5 kb 以内に CpG アイランドが存在したのは miR-203, miR-503, miR-618, miR-886, miR-941, miR-596 の 6 種類であった。腫瘍特異的かつ高頻度な CpG アイランドメチル化が認められた miR-596 を詳細に解析した。メラノーマの浸潤、転移、生存に関係する miRNA を 30 種類以上報告されているが、われわれの同定した miRNA は含まれていない (Segura MF et al: Carcinogenesis 100: 1, 2012)。

4.2. メラノーマ細胞株における m ir-596 の発現

メラノーマ細胞株 A375, AK-1, SK-mel-23, TXM18, WM266 において 5-aza-dC および IFN- β 処理による miR-596 の発現変動を解析した結果、全ての細胞において miR-596 発現の上昇が認められた。MSP およびパイロシーケンス法を用いて miR-596 の CpG island のメチル化を解析した結果、検討したすべてのメラノーマ細胞株において高度なメチル化が検出された (平均メチル化レベル 88.0%)。正常メラノサイト細胞ではメチル化は低レベルであった (平均メチル化レベル 17.3%)。パイサルファイトシーケンス法により miR-596 の CpG island メチル化を検討した結果、

メラノーマ細胞では全アレルが高度にメチル化されている一方、メラノサイトではメチル化は限定的であった。miR-596 およびコントロール RNA をメラノーマ細胞株に導入し細胞増殖に与える影響を検討した。miR-596 は TXM18, AK-1, SK-mel-23 の増殖を強く抑制した。これらの結果から、5-aza-dC および IFN- β 処理による miR-596 の発現誘導が抗腫瘍効果をもたらす可能性が示唆された。

4.3. 切除組織における m ir-596 の発現

色素性母斑およびメラノーマの切除検体における miR-596 のメチル化をパイロシーケンス法で検討した結果、メチル化レベルの平均値はそれぞれ 30.1%, 40.6%であった。近年の高解像度な染色体解析により、複数の癌細胞株において miR-596 を含む 8p23 領域の欠失が報告されている。メラノーマの進展と転移における miR-596 の役割については発生部位、組織型、病期との関係についての解析が必要である。

4.4. 日本人メラノーマのドライバー遺伝子変異

足底メラノーマ患者の原発腫瘍、リンパ節転移、末梢血リンパ球よりそれぞれ DNA を精製し、次世代シーケンスを用いて 409 遺伝子の変異解析を行った。その結果、原発腫瘍と転移腫瘍に共通に認められる変異遺伝子 11 種類を同定した。サンガー法で確認した結果、FLT3 と NF1 にアミノ酸変化を伴う変異を認めたことより、これら遺伝子が本症例のドライバー変異と考えられた。FLT3 と NF1 が日本人メラノーマの少なくとも一部のメラノーマのドライバー変異である可能性が推測される。

5. 主な発表論文等

雑誌論文 (計 23 件)

1. Ito A, Yamaguchi M, Okamoto N, Sanematsu Y, Kawabe Y, Wakamatsu K, Ito S, Honda H, Kobayashi T, Nakayama E, Tamura Y, Okura M, Yamashita T, Jimbow K, Kamihira M: T-cell receptor repertoires of tumor-infiltrating lymphocytes after hyperthermia using functionalized magnetite nanoparticles. Nanomedicine (Lond) 8: 891-902, 2013. (査読有)
2. Mizote Y, Wakamatsu K, Ito S, Uenaka A, Ohue Y, Kurose K, Isobe M, Ito A, Tamura Y, Honda H, Yamashita T, Nohara S, Oka M, Jimbow K, Nakayama

- E: TLR4 and NLRP3 inflammasome activation in monocytes by N-propionyl cysteaminyphenol-maleimide-dextran (NPCMD). *J Dermatol Sci* 73: 209-215, 2014. (査読有)
3. Kunimoto R, Jimbow K, Tanimura A, Sato M, Horimoto K, Hayashi T, Hisahara S, Sugino T, Hirobe T, [Yamashita T](#), Horio Y: SIRT1 regulates lamellipodium extension and migration of melanoma cells. *J Invest Dermatol* 134: 1693-1700, 2014. (査読有)
 4. Ito S, Ojika M, [Yamashita T](#), Wakamatsu K: Tyrosinase-catalyzed oxidation of rhododendrol produces 2-methylchromane-6,7-dione, the putative ultimate toxic metabolite: Implications for melanocyte toxicity. *Pigment Cell Melanoma Res* 27: 744-753, 2014. (査読有)
 5. Ito S, Gerwat W, Kolbe L, [Yamashita T](#), Ojika M, Wakamatsu K: Human tyrosinase is able to oxidize both enantiomers of rhododendrol. *Pigment Cell Melanoma Res* 27: 1149-1153, 2014. (査読有)
 6. Ito S, Okura M, Nakanishi Y, Ojika M, Wakamatsu K, [Yamashita T](#): Tyrosinase-catalyzed metabolism of rhododendrol (RD) in B16 melanoma cells: production of RD-pheomelanin and covalent binding with thiol proteins. *Pigment Cell Melanoma Res* 28: 295-306, 2015. (査読有)
 7. Okura M, [Yamashita T](#), Ishii-Osai Y, Yoshikawa M, Sumikawa Y, Wakamatsu K, Ito S: Effects of rhododendrol and its metabolic products on melanocytic cell growth. *J Dermatol Sci* 80: 142-149, 2015. (査読有)
 8. [Yamashita T](#), Okura M, Ishii-Osai Y, [Hida T](#): Diagnosis of eight groups of xeroderma pigmentosum by genetic complementation using recombinant adenovirus vectors. *J Dermatol* (in press). (査読有)
 9. Sawada T, Yamamoto E, [Suzuki H](#), Nojima M, Maruyama R, Shioi Y, Akasaka R, Kamimae S, Harada T, Ashida M, Kai M, Adachi Y, Yamamoto H, Imai K, Toyota M, Itoh F, Sugai T. Association between genomic alterations and metastatic behavior of colorectal cancer identified by array-based comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 52: 140-149, 2013. (査読有)
 10. Shimizu T, [Suzuki H](#), Nojima M, Kitamura H, Yamamoto E, Maruyama R, Ashida M, Hatahira T, Kai M, Masumori N, Tokino T, Imai K, Tsukamoto T, Toyota M. Methylation of a panel of microRNA genes is a novel biomarker for detection of bladder cancer. *Eur Urol* 63: 1091-1100, 2013. (査読有)
 11. Tahara T, Yamamoto E, Madireddi P, [Suzuki H](#), Maruyama R, Chung W, Garriga J, Jelinek J, Yamano HO, Sugai T, Kondo Y, Toyota M, Issa JP, Estécio MR. Colorectal carcinomas with CpG island methylator phenotype 1 frequently contain mutations in chromatin regulators. *Gastroenterology* 146: 530-538, 2014. (査読有)
 12. Suzuki R, Yamamoto E, Nojima M, Maruyama R, Yamano HO, Yoshikawa K, Kimura T, Harada T, Ashida M, Niinuma T, Sato A, Noshio K, Yamamoto H, Kai M, Sugai T, Imai K, [Suzuki H](#), Shinomura Y. Aberrant methylation of microRNA-34b/c is a predictive marker of metachronous gastric cancer risk. *J Gastroenterol* 49: 1135-1144, 2014. (査読有)
 13. [Suzuki H](#), Yamamoto E, Maruyama R, Niinuma T, Kai M. Biological significance of the CpG island methylator phenotype. *Biochem Biophys Res Commun* 455: 35-42, 2014. (査読有)
 14. Harada T, Yamamoto E, Yamano HO, Nojima M, Maruyama R, Kumegawa K, Ashida M, Yoshikawa K, Kimura T, Harada E, Takagi R, Tanaka Y, Aoki H, Nishizono M, Nakaoka M, Tuyada A, Niinuma T, Kai M, Shimoda K, Shinomura Y, Sugai T, Imai K, [Suzuki H](#). Analysis of DNA methylation in bowel lavage fluid for detection of colorectal cancer. *Cancer Prev Res (Phila)* 7: 1002-1010, 2014. (査読有)
 15. Ichimura N, Shinjo K, An B, Shimizu Y, Yamao K, Ohka F, Katsushima K, Hatanaka A, Tojo M, Yamamoto E, [Suzuki H](#), Ueda M, Kondo Y. Aberrant TET1 Methylation Closely Associated with CpG Island Methylator Phenotype in Colorectal Cancer. *Cancer Prev Res (Phila)* 8: 702-711, 2015. (査読有)
 16. Isosaka M, Niinuma T, Nojima M, Kai M, Yamamoto E, Maruyama R, Nobuoka T, Nishida T, Kanda T, Taguchi T, Hasegawa T, Tokino T, Hirata K, [Suzuki H](#), Shinomura Y. A Screen for Epigenetically Silenced microRNA Genes in Gastrointestinal Stromal Tumors. *PLoS One* 10: e0133754, 2015. (査読有)
 17. Kamimae S, Yamamoto E, Kai M, Niinuma T, Yamano HO, Nojima M, Yoshikawa K, Kimura T, Takagi R,

- Harada E, Harada T, Maruyama R, Sasaki Y, Tokino T, Shinomura Y, Sugai T, Imai K, Suzuki H. Epigenetic silencing of NTSR1 is associated with lateral and noninvasive growth of colorectal tumors. *Oncotarget* 6: 29975-29990, 2015. (査読有)
18. Hida T, Yamashita T. Pigmented mammary Paget's disease presenting with dermoscopic features of multiple dots. *Australas J Dermatol* 2014; 55: 260-262. (査読有)
 19. Hida T, Kase K, Hamada T, Matsuda M, Hashimoto T, Yamashita T. Ankyloblepharon -ectodermal defects-cleft lip/palate syndrome: a case with a novel p63 mutation associated with abnormal keratohyalin granules. *Eur J Dermatol* 2014; 24: 495-497. (査読有)
 20. Shiki M, Hida T, Yamashita T. Development of sarcoidosis during interferon- β therapy for melanoma. *J Dermatol* 2014; 41: 862-863. (査読有)
 21. Hida T, Okura M, Tanaka T, Yamashita T. A case of oculocutaneous albinism type 4: aberrant expression of SLC45A2 transcript with exon skipping. *J Dermatol* 2014; 41: 1019-1021. (査読有)
 22. Hida T, Okura M, Kamiya T, Yamashita T. Nagashima-type palmoplantar keratosis caused by compound heterozygous mutations in SERPINB7. *Eur J Dermatol* 2015; 25: 202-203. (査読有)
 23. Hida T, Yoneta A, Wakamatsu K, Yanagisawa K, Ishii-Osai Y, Kan Y, Kato J, Yamashita T. Circulating melanoma cells as a potential biomarker to detect metastasis and evaluate prognosis. *Australas J Dermatol* 2016; 57: 145-149. (査読有)
- cells. The Asian Society for Pigment Cell Research and the Australasian Society for dermatology Research 2013. May 17-19, 2013, Sydney, Australia.
3. Kumagai A, Kubo T, Yamashita K, Nagaya T, Yamashita T, Ichimiya S: DeltaNp63 controls sensitivities of keratinocytes to innate stimuli and thymic stromal lymphopoietin in atopic dermatitis. The 42th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology. Dec 11-13, 2013, Chiba, Japan.
 4. Yamashita T, Okura M, Ishii-Osai Y, Yoshikawa M, Sumikawa Y, Wakamatsu K, Ito S: Production of reactive oxygen species and anti-oxidative responses in rhododendrol-treated human melanocytes. The XXII International Pigment Cell Conference, Sep 4-7, 2014, Singapore.
 5. Hida T, Wakamatsu K, Yamashita T: Detection of circulating melanoma cells (CMCs) in melanoma patients. The XXII International Pigment Cell Conference, Sep 4-7, 2014, Singapore.
 6. Okura M, Ishii-Osai Y, Hida T, Yamashita T: Rapid diagnosis of xeroderma pigmentosum by using a set of recombinant adenoviruses. The XXII International Pigment Cell Conference, Sep 4-7, 2014, Singapore.
 7. 山下利春: シンポジウム「悪性黒色腫update—臨床から基礎へ—」メラノーマの今日的コンセプトと今日的診療. 第76回日本皮膚科学会東京支部学術大会, 2013年2月16-17日, 京王プラザホテル(東京都新宿区).
 8. 山下利春: 悪性黒色腫の臨床および基礎的研究の進歩の秘訣, S1-2 シグナル伝達系と治療のターゲット. 第31回日本皮膚悪性腫瘍学会シンポジウム, 2015年7月3-4日, 大阪国際会議場(グランキューブ大阪).

学会発表 (計8件)

1. Hida T, Yoneta A, Yamashita T: Dermoscopic findings of pigmented mammary Paget's disease. The 9th Asian Dermatological Congress. Jul 10-13, 2013, Hong Kong.
2. Ishii-Osai Y, Yamashita T, Tamura Y, Sato N, Ito A, Honda H, Wakamatsu K, Ito S, Nakayama E, Okura M, Jimbow K: The analysis of the molecular mechanism of the apoptosis induced by N-propionyl-4-S-cysteaminyphenol in melanoma

6. 研究組織

6.1 研究代表者

札幌医科大学医学部皮膚科学講座 教授
山下利春 (研究者番号: 50167706)

6.2.研究分担者

札幌医科大学医学部分子生物学講座 教授

鈴木 拓 (研究者番号：20381254)

札幌医科大学医学部皮膚科学講座 講師

肥田時征 (研究者番号：90464487)