

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860894

研究課題名(和文) 癌精巣抗原が悪性黒色腫細胞のシグナル伝達と生物活性に及ぼす影響の検討

研究課題名(英文) Effects of cancer-testis antigens on the signaling and biological activity of the malignant melanoma cells

研究代表者

船越 建 (Funakoshi, Takeru)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：80365353

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：悪性黒色腫において脂質代謝を司る酵素である、Monoacylglycerol lipase (MAGL) が正常メラノサイトに比べて高発現していることを確認した。そこで当院で集積した悪性黒色腫症例を対象として組織におけるMAGLの発現を検討した。MAGLは原発巣よりも転移巣において優位に発現が増強しており、更に病期の進行とともにMAGLの発現強度が上昇することを確認した。MAGLが発現している症例において血管浸潤像を認める症例が多いことを示した。これらより、MAGLは悪性黒色腫細胞に発現し、腫瘍の病期進行のバイオマーカー、あるいは原発巣における血管浸潤のバイオマーカーとなり得る可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Monoacylglycerol lipase, an enzyme responsible for lipid metabolism in malignant melanoma, was confirmed to be highly expressed in malignant melanoma cells than in normal melanocytes. Then, we examined the expression of MAGL in tissue malignant melanoma cases which were integrated in our hospital as a target. MAGL is predominantly expressed in the metastatic lesions than the primary lesions. And it was confirmed that the expression strength of MAGL rises with the progression of the diseases. Additionally, MAGL showed that there are many cases to admit vascular invasion in cases that have been expressed. From these findings, it is suggested that MAGL has a potential as a biomarker of tumor progression or vascular invasion in the primary lesions.

研究分野：皮膚悪性腫瘍

キーワード：悪性黒色腫 癌精巣抗原 Monoacylglycerol lipase

1. 研究開始当初の背景

悪性黒色腫は免疫原性を有しやすい特性から過去に多くの免疫療法が試みられており、近年の研究成果により Stage4 の患者に抗 CTLA-4 抗体や抗 PD-1 抗体の投与が一部の症例において有意に予後を改善することが示されている。腫瘍細胞が免疫原性を獲得しやすい理由として、正常組織では発現が見られず腫瘍細胞特異的に発現する蛋白質（以下腫瘍特異抗原）が多く存在することが示唆されている。特に MART-1, gp100, tyrosinase, TRP-1, TRP-2 と言ったメラノソーム関連蛋白質が腫瘍特異抗原として研究され、実際これらのペプチドを用いたワクチン療法の臨床試験も数多く行われている。しかし、これらのワクチン療法や抗 CTLA-4 抗体、抗 PD-1 抗体を用いた治療で奏効するのは一部の症例に限られ、大多数の悪性黒色腫細胞は最終的に自身に対する免疫反応を克服する。この悪性黒色腫細胞が抗腫瘍免疫の影響を回避する機序や免疫反応を腫瘍促進的なものに変える機序についてはこれまでも種々の研究がなされてきているが、腫瘍特異抗原が悪性黒色腫の細胞自身に及ぼす直接的な影響については十分に検討されていない。そこで、申請者は腫瘍特異抗原の中でも癌精巣抗原 (Cancer Testis Antigen: CTA) という一群の蛋白質の中に腫瘍細胞のシグナル伝達経路に直接影響を及ぼすような蛋白質が存在すると考え研究を進めている。

CTA は精巣以外の正常組織では発現がなく、様々な腫瘍で様々な頻度で発現が認められる遺伝子群の総称である。しかし、近年の検討からこれら分子の発現はワクチン療法の標的分子としてだけでなく、抗癌剤の感受性との相関があること (Monte M et al. PNAS 2006)、患者の予後との相関性があること (Yang JY et al. Clin Cancer Res 2005)、癌の主要なシグナル伝達経路を活性化し腫瘍細胞の浸潤能を高めること (Chen L et al. Int J Oncol 2012) が、いくつかの悪性腫瘍で報告されている。悪性黒色腫においては、CTA はワクチン療法の標的分子という観点での研究がほとんどであり、腫瘍細胞自身に与える細胞生物学的な検討はほとんどなされていない現状がある。

2. 研究の目的

CTA 中の幾つかの蛋白質が悪性黒色腫患者における病期の進展や予後予測、治療反応性予測を行うためのバイオマーカーになり得ると考え、本研究計画では、新規のものも含めて、悪性黒色腫において優位に発現している CTA を探索することを第一段階と考えた。次に、得られた候補因子が悪性黒色腫において重要とされる RAS-MEK-ERK1/2 MAPK、PI3-AKT、JAK-STAT 等の各シグナル伝達経路の活性化や腫瘍細胞の増殖能・抗癌剤耐性能等にどのような影響を及ぼすのかを悪性黒色腫の細胞株における遺伝子発現

調節によって解析し、その機能を明らかにすることを目的とした。腫瘍促進的な機能をする CTA が得られたのち、臨床情報とリンクさせた腫瘍切除標本を免疫染色することで、当該因子の発現がバイオマーカーとなりうるかを検討するとともに、当該因子が治療標的となり得るかを検討することとした。

3. 研究の方法

まず、本学の倫理委員会で承認された臨床研究計画に基づき、患者腫瘍組織サンプル、血清サンプルを抽出し、研究使用できる体制を整えた。癌精巣抗原のスクリーニングを行う目的での患者血清を用いたプロテインアレイによる抗 CTA IgG スクリーニングでは、有意な結果が得られなかったため、候補となりうる CTA 及び炎症性腫瘍微小周囲環境関連遺伝子につき、悪性黒色腫の細胞株と正常メラノサイトから抽出した RNA を用いて PCR アレイスクリーニングを行うことで改めて候補因子を探索し、その結果をもとに免疫染色での検討を行って臨床データとの関連性について解析をした。

4. 研究成果

1) 悪性黒色腫細胞株における Monoacylglycerol lipase の発現上昇。

代表的な悪性黒色腫の細胞株である A375 と正常メラノサイトから抽出した RNA を用いて RT² Profiler-PCR Array にて各種遺伝子の発現度を検討したところ、脂質代謝を司る酵素である、Monoacylglycerol lipase (以下、MAGL) が A375 にて正常メラノサイトの 1139.9 倍発現していることが確認された (図 1)。

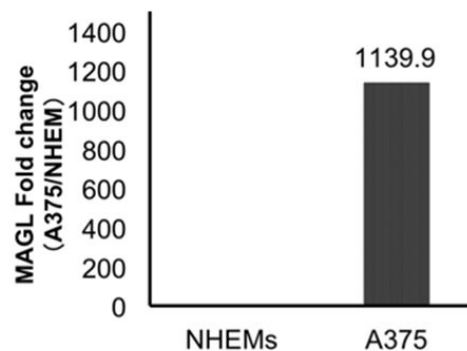


図 1. 正常メラノサイトと比較した A375 細胞株における MAGL 遺伝子の発現量

続いて、抗 MAGL 抗体を用いて複数の悪性黒色腫の細胞株および正常メラノサイトを対象に免疫細胞化学染色を施行した。その結果、A375、SK MEL-5、SK MEL-28、SB2 等多くの悪性黒色腫細胞において陽性所見が得られた一方、正常メラノサイト (NHEMs) は陰性であった (図 2)。

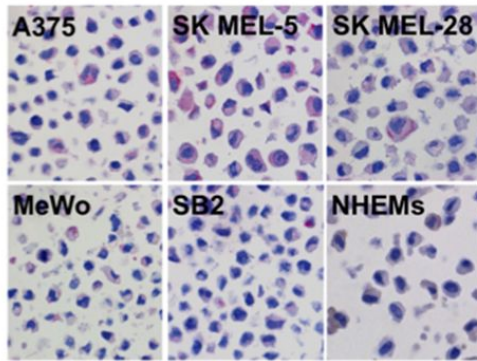


図2 メラノサイト系細胞におけるMAGLの発現

2) ヒト悪性黒色腫におけるMAGLの発現

当院で集積した悪性黒色腫症例を対象として組織におけるMAGLの発現を検討した。抗体の特異性を検討するためにMAGLが局在するとされる脂肪細胞の染色態度を評価した結果、図3右下の如く脂肪細胞において有意に染色された。悪性黒色腫の組織においては、腫瘍細胞に種々の程度で染色された。

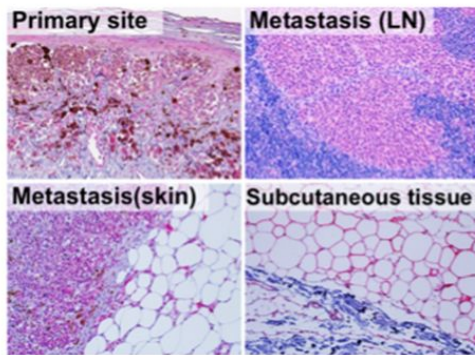


図3 各組織におけるMAGLの免疫染色像

3) 悪性黒色腫の病期と腫瘍細胞におけるMAGLの発現強度の相関

各症例の免疫染色の染色態度を図4のように染色強度によってスコア付けし、そのスコアを元に臨床情報との相関性を検討した。

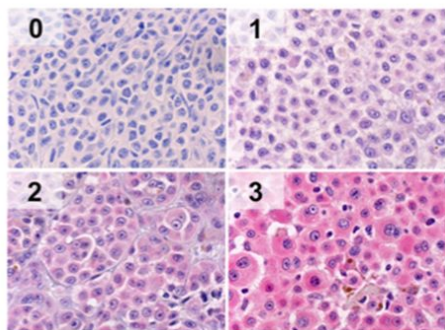


図4 染色強度のスコアリング

その結果、以下の図5の如くMAGLは原発巣（Primary）よりも転移巣（LN：リンパ節転移巣、Skin：皮膚転移巣）において優位に発現が増強しているという結果が得られた。更に、原発巣と転移巣の両方が得られた症例を解析したところ、10/17症例において、病期の進行とともにMAGLの発現強度が上昇することが確認された。

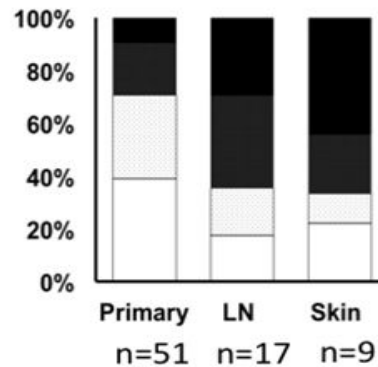


図5 原発巣および転移巣におけるMAGLの発現強度

4) 悪性黒色腫の原発巣における血管浸潤と腫瘍細胞におけるMAGLの発現の相関

原発巣におけるMAGLの発現の有無と血管およびリンパ管浸潤像の有無を検討したところ、以下の図6の如くMAGLが発現している症例において有意に血管浸潤像（vascular invasion）をきたしている症例が多いことが判明した。

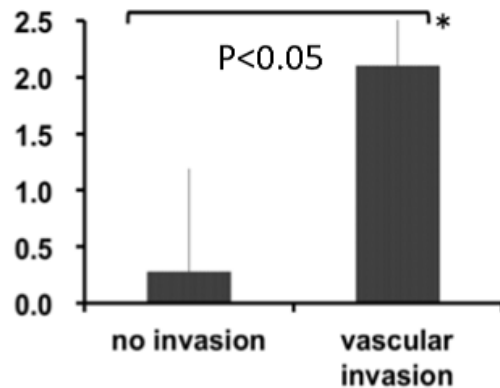


図6 原発巣におけるMAGLの発現強度および血管浸潤像の有無の比較検討。

以上の結果より、MAGLは悪性黒色腫細胞に発現し、腫瘍の病期進行のバイオマーカー、あるいは原発巣における血管浸潤のバイオマーカーとなり得る可能性が示唆された。

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0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

舩越 建 (TAKERU FUNAKOSHI)

慶應義塾大学・医学部・専任講師

研究者番号：80365353

(2)研究分担者

なし

(3)研究協力者

種瀬 啓士 (KEIJI TANESE)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：70464815

馬場 裕子 (YUKO BABA)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：10594591

天谷 雅行 (MASAYUKI AMAGAI)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：90212563

河上 裕 (YUTAKA KAWAKAMI)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：50161287