

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16024

研究課題名（和文）Runx3の下流遺伝子群の解析による悪性黒色腫に対する新規治療標的の創出

研究課題名（英文）Evaluation of the effects of BTC and Slc17a6 on malignant melanoma

研究代表者

佐藤 勇樹（Sato, Yuki）

信州大学・学術研究院医学系（医学部附属病院）・助教

研究者番号：60532033

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,900,000円

研究成果の概要（和文）：悪性黒色腫細胞株にRunx3を過剰発現もしくは発現抑制した際のマイクロアレイのデータを用いて、悪性黒色腫の病勢や悪性度の評価の指標となる遺伝子の候補を選定した。その結果、BTCとSlc17a6が候補として挙げられた。悪性黒色腫患者の検体（原発巣と転移巣）や色素性母斑（ほくろ）の検体を用いて、候補遺伝子の発現をRT-PCRや免疫染色で評価を行った。結果としては、Slc17a6は実際の悪性黒色腫の検体では発現が認められなかった。BTCについては発現が認められたが、病期による一定の変動はなく、免疫染色でも母斑と悪性黒色腫に明らかな発現の差異は認めなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

上記のRT-PCRや免疫染色の結果から、候補遺伝子として挙げたBTC、Slc17a6は、予想された悪性黒色腫の病勢や予後の予測マーカーとしては有用性は低いと判断された。この結果からは直接的な学術的意義や社会的意義を得ることはできなかったが、この研究を通して、得ることができた知見と結果もとに、今後はRunx3とは異なる遺伝子に注目し、悪性黒色腫の病勢や予後の予測マーカーとして有用な遺伝子を模索していくことを予定している。

研究成果の概要（英文）：Microarray data obtained when Runx3 was overexpressed or suppressed in malignant melanoma cell lines were used to select candidate genes that can be used as an index for evaluation of malignant melanoma disease state and malignancy. BTC and Slc17a6 were picked as candidates.

Expression of candidate genes was evaluated by RT-PCR and immunostaining using samples of malignant melanoma patients (primary and metastatic lesions) and samples of pigmented nevus.

Slc17a6 was not expressed in actual melanoma specimens. Expression of BTC was observed, but there was no constant change depending on the stage of the disease, and immunostaining did not reveal a clear difference in expression between nevus and malignant melanoma.

研究分野：皮膚科学

キーワード：悪性黒色腫 Runx3 BTC Slc17a6

1. 研究開始当初の背景

(1) 悪性黒色腫は高率に再発や転移を起こすことが特徴であり、進行期では治療が困難である。しかし、早期病変では良性色素性母斑との鑑別が難しく、受診時にはすでに病気が進行している症例も少なくない。進行期悪性黒色腫に対する治療の確率が長年の命題であったが、30 余年にわたって進行期の悪性黒色腫の標準的治療は、化学療法剤のダカルバジンのみであった。その奏効率は 10-20% と低い。近年、抗 PD-1 抗体(ニボルマブ)に代表される免疫 checkpoint 阻害薬が悪性黒色腫の治療に用いられ、その有用性が報告されている。しかし、その奏効率は 20-30% と高くなく、効果不十分な症例も依然として多い。ニボルマブの医療費に占める免疫 checkpoint 阻害薬の金額は莫大であり、今後も他癌腫への適応拡大も見込まれることから、その負担は大きくなっていくことが予想される。既存の治療では、効果不十分な症例は多く、新たな治療標的の創出は悪性黒色腫患者の予後改善において重要であると考えられる。また、新たな治療標的を創出することはニボルマブに代表される免疫 checkpoint 阻害薬による、医療費の増大を抑制可能性が考えられた。

(2) Runx3 は Runt ファミリー転写因子の 1 つで、神経発生や免疫細胞の分化にかかわる遺伝子である。疫学的に Runx3 陰性の悪性黒色腫は陽性のものと比較して予後が不良であることが報告されている。

2. 研究の目的

本研究は、下記方法で得られた候補遺伝子が悪性黒色腫の悪性度や転移能に与える影響を明らかにすることを目的とする。また、病期の違いによる発現度を評価することにより、悪性化の指標になるかどうかを検討することを目的とする。本研究で得られる知見は、悪性黒色腫に対する新規の治療標的、免疫 checkpoint 阻害薬に対する反応性の予後因子や病勢を反映するバイオマーカーの創出に寄与することも期待される。

3. 研究の方法

(1)

Runx3 を過剰発現させたマウス悪性黒色腫細胞と siRNA で Runx3 の機能を抑制したマウス悪性黒色腫細胞において下流で、発現が増減する分子群をマイクロアレイで解析した。その結果、Runx3 の下流で変動し、悪性黒色腫の悪性度に寄与する可能性のある候補遺伝子を策定する。

(2)

悪性黒色腫と良性色素性母斑(ほくろ)検体を用いて、候補遺伝子の発現を RT-PCR で確認する。RT-PCR で評価が困難な場合には、蛍光免疫染色を行い、組織での発現を評価する。両者間で明らかな発現の差異が認められたり、検体の病期や予後に遺伝子の発現が連動しているなどの有意な結果が得られた場合には、さらに検体数を増やして詳しく検討することに加えて、患者の病期・臨床経過・治療への反応が発現量と関連するかを後ろ向きに解析する免疫 checkpoint 阻害薬投与前後での、候補遺伝子の発現変化について、皮膚転移巣など採取が容易な部位を用いて、評価を行う予定とした。

4. 研究成果

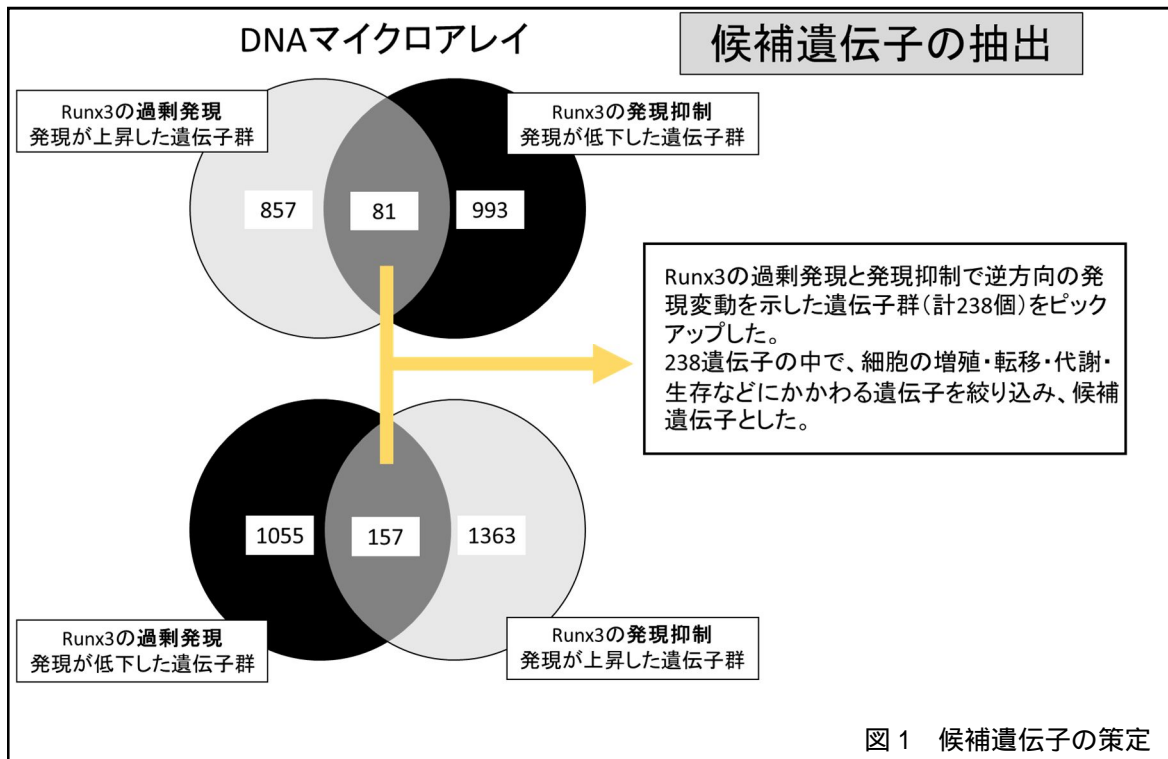
(1) 候補遺伝子の策定

マウス悪性黒色腫細胞株である B16F10 に対して、レトロウィルスベクターを用いて、Runx3 の過剰発現・発現抑制を行った。それぞれのサンプルを DNA マイクロアレイにて、網羅的に解析した。

マイクロアレイで、悪性黒色腫細胞で Runx3 を過剰発現した際に発現が上昇した遺伝子(条件 1) は計 857 個であった。また、Runx3 の発現抑制で発現が低下した遺伝子(条件 2) は計 993 個であった。条件 1 と条件 2 を同時に満たす遺伝子を Runx3 の下流で正方向に発現がコントロールされている遺伝子の候補とした。この遺伝子は計 81 個あった。

また、悪性黒色腫細胞で Runx3 を過剰発現した際に発現が低下した遺伝子(条件 3) は計 1055 個であった。また、Runx3 の発現抑制で発現が上昇した遺伝子(条件 4) は計 1363 個であった。条件 3 と条件 4 を同時に満たす遺伝子を Runx3 の下流で負方向に発現がコントロールされている遺伝子の候補とした。この遺伝子は計 157 個あった。

上記の 81 個の遺伝子と 157 個の遺伝子を併せて、計 258 個の遺伝子を Runx3 によりコントロールされている遺伝子の候補とした。細胞の増殖・転移・代謝・生存に関わる機能を持つ遺伝子を絞り込むことによって、Runx3 の下流で、悪性黒色腫の悪性度に影響を与える遺伝子の候補とした。(図 1)



(2) 候補遺伝子

マイクロアレイの結果から Ptpre、Tmsb4x、BTC、Slc17a の4つの遺伝子が候補遺伝子として考えられた。さらにこの4つの遺伝子から、既存の癌遺伝子データベースの情報を用いて絞りこみ、最終的に下記の2つの遺伝子を候補とした。

BTC：表皮成長因子(EGF)ファミリーのタンパク質をコードする。様々なEGF受容体に結合する。ヒトの乳癌の予後と関連が報告されている。膵臓癌・肝細胞癌・頭頸部SCCにおいて発現が上昇することが報告されている。

Slc17a6：グルコースおよび他の糖、胆汁酸塩および有機酸、金属イオンおよびアミン化合物および神経科学の輸送に関連する。神経細胞への糖の取り込みに関与している。近年グルコーストランスポーターはがん細胞の生存や増殖に影響することが報告されている。

(3) 悪性黒色腫の検体を用いた候補遺伝子のRT-PCR

同一患者の悪性黒色腫の初期の検体(原発巣)と病状が悪化したあとの検体(転移巣)から、RNAを抽出して、cDNAを合成し、RT-PCRを用いて、候補遺伝子の発現を測定した。

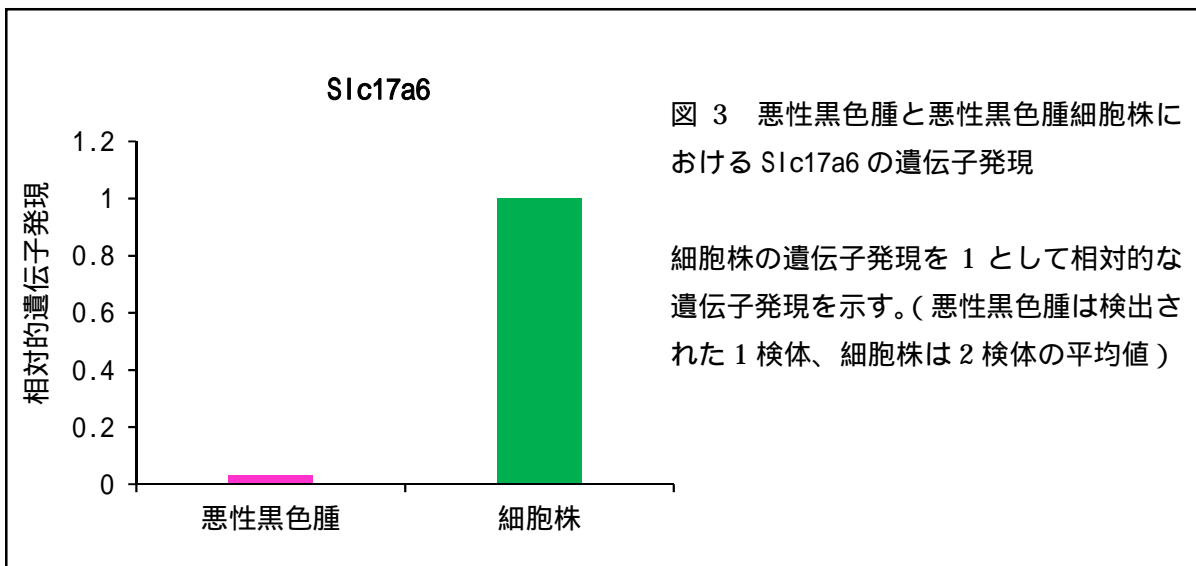
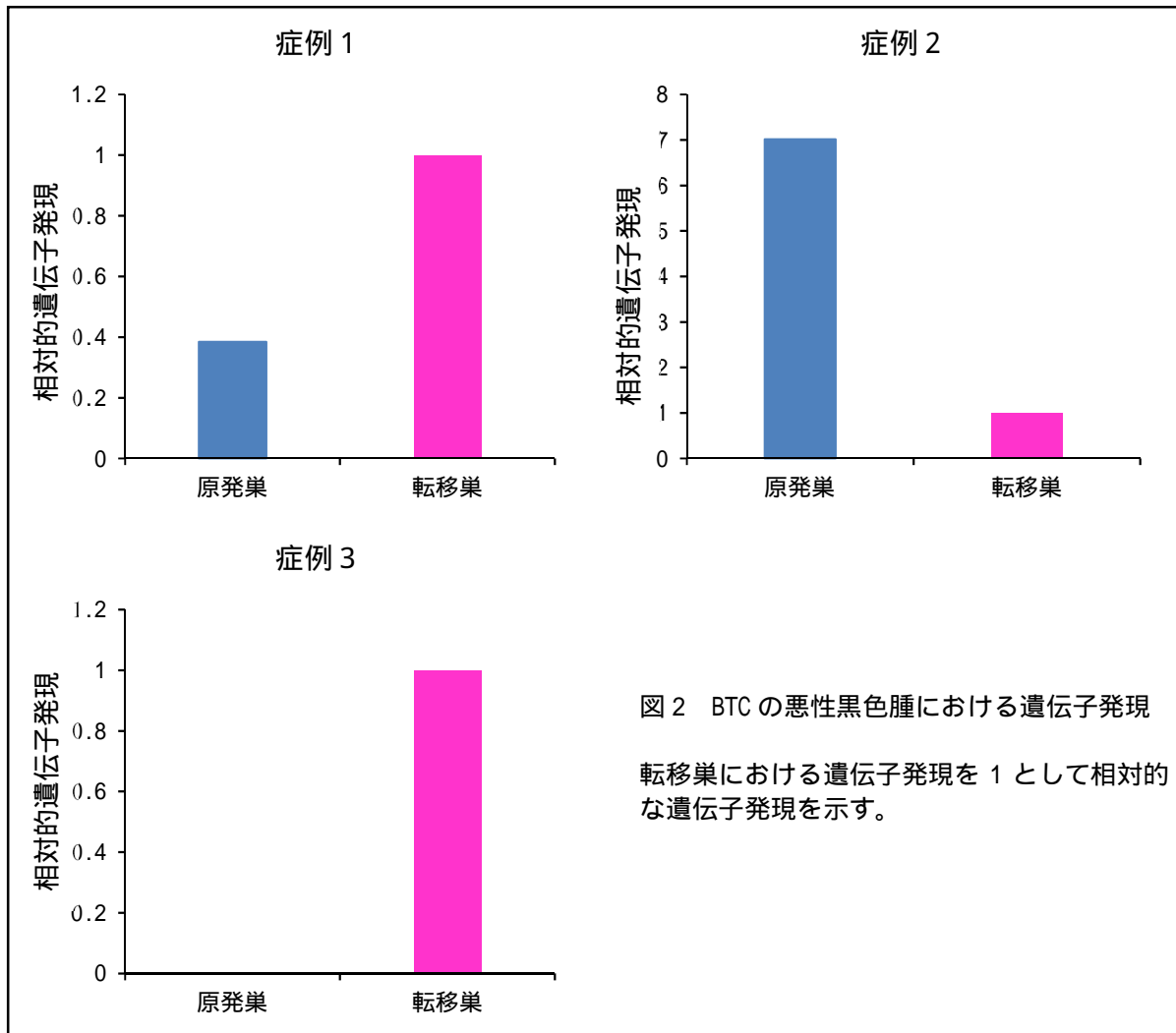
BTCの遺伝子発現の測定と評価

患者1では原発巣より転移巣で発現がやや上昇していた。(図2)患者2においては、発現転移巣で、発現が著明に低下していた。(図2)患者3では、転移巣において発現が上昇していたが、原発巣においては、発現がほとんど認められなかった。(図2)これは、検体の保存状態などが影響している可能性も考えられた。

これらの結果からは病状による発現変化は一定の方向性を認めないと判断した。

Slc17a6の遺伝子発現の測定と評価

BTCの遺伝子発現の測定と同じ患者の検体を用いて、RT-PCRを行った。しかし、すべての検体で遺伝子発現を検出することができなかった。この結果については、実験に用いたプライマーの不備などの可能性もあるため、悪性黒色腫細胞株から抽出したcDNAを陽性コントロールとして、別の4人の患者の悪性黒色腫から抽出したcDNAを用いて、再度RT-PCRを行った。結果は、4人中3人はSlc17a6の遺伝子発現を認めることができなかった。一方で、陽性コントロールとして測定した、悪性黒色腫細胞株では発現が強く認められた。(図3)この結果から、Slc17a6は、実際の悪性黒色腫の細胞では、発現がほとんど認められない可能性が示唆され、同時にSlc17a6の発現は悪性黒色腫細胞株に見られる特徴である可能性が示唆された。



(4) 免疫染色による BTC、SLC17A6 の発現の評価

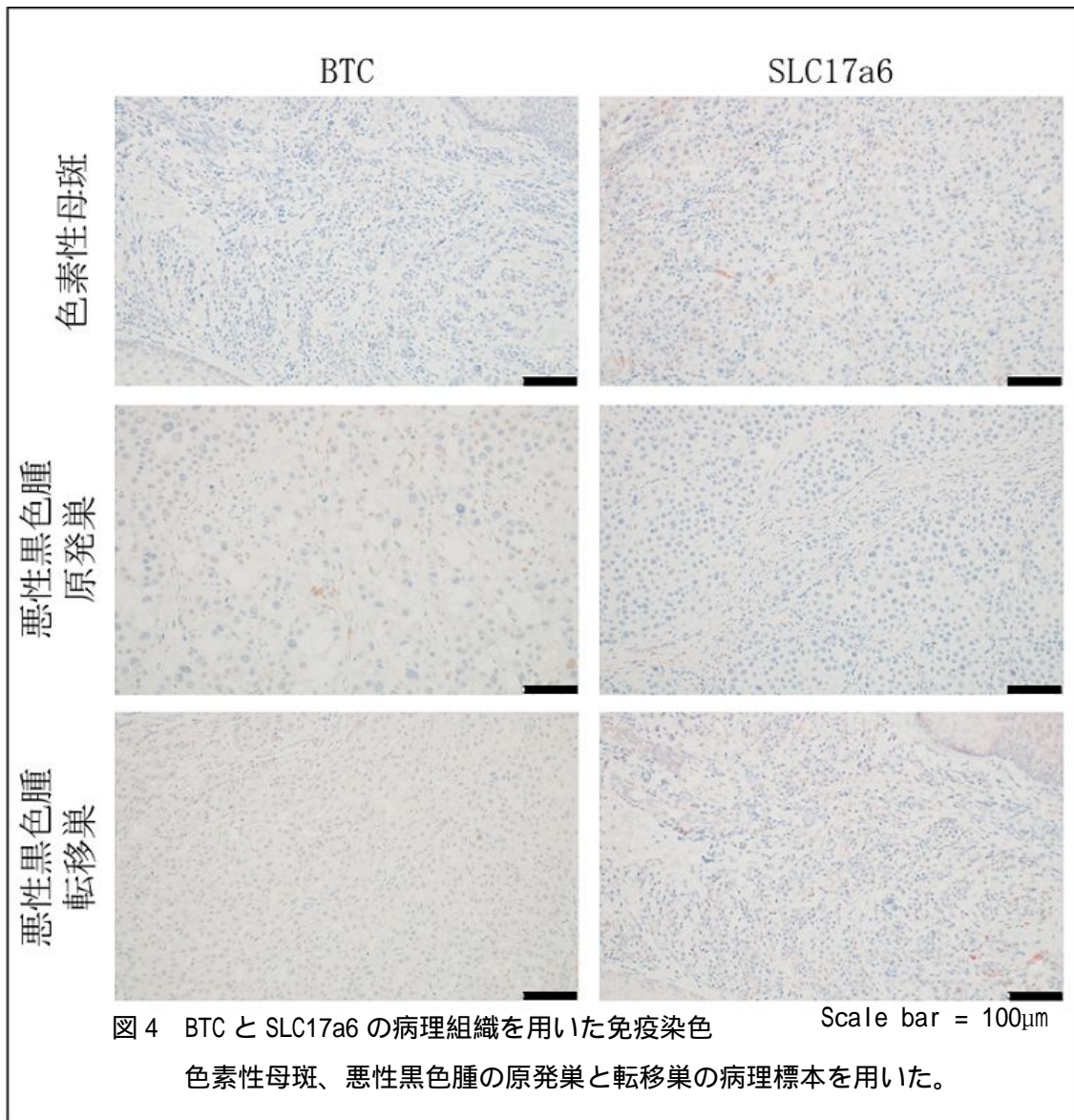
上記 PR-PCR では検出が困難であったために、SLC17A6 については、病理組織を用いて、免疫染色を行った。また、良性の色素病変である色素性母斑(ほくろ)についても、免疫染色で評価を行った。

BTC の評価

色素性母斑の標本では、母斑細胞はほとんど染色が認められなかった。悪性黒色腫の原発巣では、一部の細胞に染色が認められたが、大部分は染色されなかった。転移巣でも同様であった。(図 4)

Slc17a6 の評価

色素性母斑、悪性黒色腫の原発巣、悪性黒色腫の転移巣の標本すべてにおいて、染色が認められなかった。(図4)



(5) まとめ

BTC は RTPCR では悪性黒色腫で発現が認められたが、病期における発現の変化が一定のしなかった。また検体によっては発現自体がほとんど認められなかったものもあった。さらに、免疫染色の結果からも、色素性母斑と悪性黒色腫の細胞における染色性も大きな差を認めなかった。SLC17a6 については、RT-PCR、免疫染色ともに発現を確認することができなかった。このことは、候補遺伝子を策定する際に悪性黒色腫細胞株を用いたことから、実際の悪性黒色腫の細胞と悪性黒色腫細胞における遺伝子発現の差異であると推察した。

以上の結果から、候補遺伝子 BTC、Slc17a6 は、予想された悪性黒色腫の病勢や予後の予測マーカーとしての有用性は低いと判断された。

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〕

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----