

## 新規メラノーマ診断マーカーと分子標的治療法の開発

名古屋大学大学院 医学系研究科  
環境労働衛生学 助教 矢嶋伊知朗  
名古屋大学大学院 医学系研究科  
環境労働衛生学 教授 加藤昌志

### 【背景】

近年、世界中で皮膚癌の発症数が増加傾向にあるが、これは地球温暖化やオゾン層の破壊がもたらす紫外線量の増大が原因と考えられている。皮膚癌の中でもメラノーマ（悪性黒色腫）は悪性度が極めて高く、5年生存率も低いことから、早期診断マーカーや治療法の早急な開発が望まれている。これまでメラノーマの診断には、血清腫瘍マーカーとしてS100、5-S-cysteinyl-dopa（5-S-CD）、6-hydroxy-5-methoxyindole-2-carboxylic acid（6-H-5-MI-2CA）等が使用されているが、いずれも進行期の患者に有効であり早期診断に用いるのは難しいとされている。また、未だに効果的な治療薬は存在せず、メラノーマ治療には数多くの問題が残されている。

### 【目的】

申請者の予備的研究により、新たなメラノーマ発症関連分子がヒトメラノーマ発症に重要な役割を果たしている可能性を見出した。本研究ではこの新たなメラノーマ発症関連分子のメラノーマ発症メカニズムへ関与を解析し、これまで存在しなかった早期診断マーカー及び効果的な分子標的治療法の開発に寄与することを目的とする。

### 【方法】

新規分子との相互作用を行う分子を探索するため、メラノーマ細胞から抗体による免疫沈降法により相互作用する分子を分離、電気泳動によるタンパク分離後、高速液体クロマトグラフ質量分析計（LC-MS）を用いて同定を行った。また、FLAG融合タンパクをメラノーマ細胞に遺伝子導入によって強制発現させ、FLAGに対する免疫沈降法を用いることでより効率的な探索も行った。

遺伝子発現レベルでの相互作用を明らかにするために、ヒトメラノーマ細胞株への siRN 導入によるノックダウン法、強制発現ベクターによる遺伝子導入法を用い、新規分子の発現量を変化させ、様々なメラノーマ関連遺伝子の発現量を解析した。この解析により関連

が認められた場合には、さらなる解析を行った。

#### 【結果・考察】

FLAG 融合タンパクの強制発現を行い、FLAG に対する免疫沈降後、得られたサンプルを SDS-PAGE 法により電気泳動した。その後、銀染色法により染色を行ったところ、相互作用の可能性のある複数のバンドが検出された。これらのバンドを切り出し、LC-MS による解析を行ったところ、相互作用の可能性が考えられる分子が複数同定された。現在その相互作用について、直接的な免疫沈降法を行うことで確認を行っている。

また、ヒトメラノーマ細胞株への siRNA 導入によるノックダウン法、強制発現ベクターによる遺伝子導入法を行った結果、複数のメラノーマ関連分子の発現に変化が観察された。その1である G protein  $\gamma$ 2 subunit (Gng2/GNG2)は、近年我々の研究により見出されたメラノーマ関連分子であり、メラノーマで発現が低下し、メラノーマの増殖を抑制することを報告している。今回、新規分子との関連性が明らかになったことから、GNG2 のメラノーマ浸潤能に関する解析を行った。ヒトメラノーマ細胞株の一つである SK-Mel28 細胞は GNG2 をほとんど発現していないため、GNG2 発現ベクターを構築、SK-Mel28 細胞へ遺伝子導入し、GNG2 安定発現株を樹立した。この安定発現株を用いて Wound healing assay、migration assay、invasion assay を行った。Wound healing assay、migration assay では、GNG2 安定発現株では細胞移動の低下が認められ、invasion assay では浸潤能の低下が観察された。これらの変化が細胞内シグナルの変化によるものなのかを明らかにするため、細胞移動能、浸潤能に強く関連している focal adhesion kinase (FAK) の活性化に着目して解析を行った。FAK は自身のリン酸化によって活性化するため、FAK のリン酸化を GNG2 安定発現株で測定したところ、リン酸化レベルが有意に低下していることが明らかとなった。また、ヒトメラノーマ細胞株 A375 細胞から派生した A375P、A375M 細胞株は同じ細胞起源でありながら、浸潤能が異なることから、この2つの細胞株での GNG2 の発現量を測定したところ、浸潤能の低い A375P 細胞のほうが浸潤能の高い A375M 細胞株より GNG2 の発現量が有意に高いことが明らかとなった。我々は GNG2 の発現量の変化がこの浸潤能の差に寄与していると考え、A375P 細胞株に対して siRNA をトランスフェクションすることで GNG2 をノックダウンし、A375P の浸潤能に変化が生じるかどうかを解析した。migration assay、invasion assay の結果は、GNG2 のノックダウンは A375P の浸潤能を大きく活性化していることが明らかとなった。また、GNG2 ノックダウンによって FAK のリン酸化レベルも上昇していた。これらの結果は、新規分子に関連する GNG2 がメラノーマの浸潤能に大きく関与していることを示しているものであり、我々が着目した新規分子がメラノーマ発症及び悪性化に深く関与している可能性を示している (Yajima I., et al. 2014)。

Yajima I, Kumasaka MY, Yamanoshita O, Zou C, Li X, Ohgami N, Kato M. : GNG2 inhibits invasion of human malignant melanoma cells with decreased FAK activity. *Am J Cancer Res.* 4(2):182-8. 2014.