

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22791053

研究課題名(和文)皮膚悪性腫瘍におけるKeap1-Nrf2システム異常の検討

研究課題名(英文)Analysis of Keap1-Nrf2 system in skin cancers

研究代表者

古田 淳一(Furuta, Junichi)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：30436274

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：酸化・抗酸化のホメオスタシス維持のKeap1-Nrf2システムは、その異常が癌の伸展にも深く関与していることがいくつかの癌で知られていることから、本研究では皮膚悪性腫瘍における異常を変異、欠失、DNAメチル化に着目して検討した。悪性黒色腫、有棘細胞癌、基底細胞癌など合計72例の臨床手術材料を収集して対象とした。KEAP1の変異は1例のみに見られた。NRF2のKEAP1結合部位の変異とKEAP1座位の欠失は無かった。KEAP1のメチル化は72例中4例(6%)で見られたが、部分的な弱いメチル化に留まっていた。以上より、皮膚悪性腫瘍ではKeap1-Nrf2システム破綻の関与が少ないことがわかった。

研究成果の概要(英文)：Keap1-Nrf2 system is known as redox homeostasis system, and also involved carcinogenesis. In this study, disruption of Keap1-Nrf2 system in skin cancers was analyzed. Seventy-two skin cancer specimens were collected and analyzed. The mutation of KEAP1 was found in only 1 specimen, and the mutation of NRF2 and LOH in KEAP1 locus were not found. Aberrant methylation of KEAP1 was found in 4 of 72 (6%) specimens; however the methylations were weak to shut off the expression. In conclusion, disruption of Keap1-Nrf2 system in skin cancers is rare event.

研究分野：皮膚科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：癌 Keap1 Nrf2 DNAメチル化

1. 研究開始当初の背景

(1) Keap1-Nrf2 システムによる抗酸化機構

生体は、酸化-抗酸化(レドックス)のバランスを調節し、細胞内酸化還元状態を一定に維持している。酸化-抗酸化のバランスが酸化の方向に傾いた状態(酸化ストレス)は、様々な疾患に関与していることが知られている。ほ乳類におけるレドックスのホメオスタシス維持には Keap1-Nrf2 システムがその中心的役割を果たしている。

非ストレス下では、Nrf2(Nuclear factor erythroid-2 related factor 2)は細胞質アクチン細胞骨格に局在する Keap1(Kelch-like ECH-associated protein 1)に捕捉されユビキチン化されて分解される。親電子性物質、活性酸素、小胞体ストレスや血管ずり応力を感じることによって、Keap1の抑制を離れて核に移行する。Nrf2は核内で、抗酸化剤/親電子性物質応答配列に結合し、酸化ストレス防御遺伝子群、抗炎症性遺伝子群などを統一的に誘導し、酸化ストレスに対する恒常維持機構として働く。(伊藤健: 実験医学 25, 2007)

(2) Keap1-Nrf2 システムのがんにおける働き

上記の作用から、Keap1-Nrf2 システムは酸化ストレスによる炎症や発がんに抑制的に働くと考えられ、Keap1 を阻害したり、Nrf2 を活性化する薬剤は、創薬のターゲットとなっている。その反面、最近、ヒト肺がんにおいて *KEAP1* 遺伝子の Nrf 結合部位の体細胞変異や同遺伝子の欠失、DNA メチル化によるサイレンシングが報告されている。これは、*KEAP1* の機能喪失が *NRF2* を活性化することでがん細胞の発展に有利に働くことを示唆している。実際に、*NRF2* の活性化が肺がん細胞の酸化ストレス抵抗性を増し、より活発な増殖能や薬剤耐性をもたらすことが確認されている(鈴木隆史, 山本雅之: 実験医学 24, 2006, Hayes JD and McMahon M: Trends in Biochemical Sciences 34, 2009)。

つまり、Keap1-Nrf2 システムの亢進は、発がんには防御的に働くものの、ひとたび細胞ががん化した後には促進的に働く、という逆説的な役割を果たしている。がんの増殖、治療抵抗性を考えるとき、Keap1-Nrf2 システム異常に関する解析が必要になる。

(3) 皮膚悪性腫瘍における酸化ストレスの関与

肺は呼吸に伴う強い酸化ストレスにさらされているのと同様、皮膚も紫外線や種々の化学物質など強い酸化ストレスにさらされる臓器である。皮膚発がんにおいて紫外線や慢性炎症、外傷などの酸化ストレスが重要な危険因子であることはよく知られており、こ

れに対して抗酸化物質の予防効果 (Briganti S and Picardo M: Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology 17, 2003) や、Keap1-Nrf2 システムの働き (Beyer TA, et al.: Cell death and differentiation 14, 2007) も調べられている。

ところが、皮膚がんにおける Keap1-Nrf2 システム異常は全く調べられていないのが現状で、本研究申請時点で PubMed にて検索しても一つの報告も見つからなかった。

(4) 研究代表者のこれまでの業績との関連

研究代表者は、これまで悪性黒色腫や皮膚扁平上皮がんにおける DNA メチル化異常を中心に研究を進めてきた。DNA メチル化とはシトシンの 5 位がメチル化されることを指し、特に CpG アイランド(シトシン・グアニンの配列が密集している部位)ではほぼ一様にメチル化、あるいは非メチル化に制御されている。遺伝子の約半数は遺伝子のプロモーター領域に CpG アイランドを有しており、この CpG アイランドがメチル化されるとヒストンアセチル化と協働してクロマチン構造が緊密になり、転写複合体の結合が強く抑制される結果、その下流遺伝子の転写がほぼゼロに抑制される。すなわち、遺伝子プロモーター領域 CpG アイランドがメチル化されていることはその遺伝子のスイッチがオフになっている状態である、とすることができる。正常では発生や分化にあたって不必要な遺伝子が発現しないように制御するための仕組みとして存在していると考えられており、がんにおいてはがん抑制遺伝子の不活化機構として欠失、変異と並んで重要視されている。

研究代表者は、悪性黒色腫と皮膚扁平上皮がんにおいて、多数のがん抑制遺伝子とがんで高頻度にメチル化される遺伝子、がん精巣抗原のメチル化異常を網羅的に検索し報告した (Furuta J, et al.: Cancer Science 95, 2004)。また、悪性黒色腫抑制機能を持つ Trombosmodulin が実際に悪性黒色腫細胞株および臨床検体で DNA メチル化によって不活化されることを示した (Furuta, et al.: Melanoma Res. 2005)。正常メラノサイト培養細胞と悪性黒色腫細胞株のメチル化状態をゲノムワイドに比較することにより、抗酸化作用と細胞増殖抑制作用を持つ Peroxiredoxin 2 が悪性黒色腫において DNA メチル化により不活化されることを見いだした (Furuta, et al.: Cancer Res. 2006)。また、われわれの研究グループでは別の研究課題において、紫外線発がん Keap1-Nrf2 システムについて調べてきた (Kawachi, Furuta, et al.: J Invest Dermatol, 2008)。

このように、研究代表者を含むわれわれ研究グループはこれまでに、皮膚悪性腫瘍にお

けるがん抑制遺伝子の不活化機構，および皮膚悪性腫瘍と Keap1-Nrf2 システムについて検討してきた。これを融合させ，皮膚悪性腫瘍における Keap1-Nrf2 システム異常を DNA メチル化を含むがん抑制遺伝子の不活化機構の側面から検討することを着想した。

2. 研究の目的

皮膚悪性腫瘍における Keap1-Nrf2 システム異常の有無とその分子機構を検討する。具体的には，皮膚悪性腫瘍のなかでも頻度および悪性度の点から特に臨床的に重要な悪性黒色腫と扁平上皮がんに着目し，細胞株や臨床材料を用いて *KEAP1* の変異，欠失，DNA メチル化および，*NRF2* の *KEAP1* 結合部位の変異を検索する。

3. 研究の方法

(1)細胞株

悪性黒色腫細胞株は，われわれのこれまでの研究に用いてきた皮膚悪性黒色腫細胞株 13 種を用いた。一方，扁平上皮癌細胞株は皮膚由来のものは代表的 cell bank である ATCC や RCB でも保有しておらず入手できなかった。このため，細胞株での実験は悪性黒色腫細胞株のみで行った。正常対照として購入したヒトメラノサイトおよび表皮角化細胞初代培養細胞を使用した。常法に従って培養し収集した細胞ペレットは，DNA 抽出まで -80 °C で保存した。

(2)臨床検体

Keap1-Nrf2 システムの異常を検出するのに十分な症例数を用意する必要があった。肺の非小細胞がんでは，*KEAP1* の変異は 19%，LOH は 41% でみられたという報告がある (Singh A, et al.: PLoS Medicine, 2006)。これよりやや低頻度であったとしても十分に検出できることを期待し，症例数は悪性黒色腫，扁平上皮がんそれぞれ 25 例を目標として収集を開始した。最終的に，悪性黒色腫 18 例，有棘細胞癌 25 例，基底細胞癌 23 例，血管肉腫や隆起性皮膚線維肉腫などその他の皮膚がん 6 例の合計 72 例を収集した。

臨床検体ではホルマリン固定パラフィン包埋標本を基本とし，新鮮凍結標本も用いた。同時に収集した正常組織からもペアで DNA を抽出した。

(3)DNA 抽出

細胞株および臨床検体新鮮凍結標本からは，proteinase K で溶解した後にフェノール・クロロホルム抽出により DNA を抽出した。ホルマリン固定パラフィン包埋標本では，20 μm に薄切しスライドガラスにマウントし脱パラフィンした後に，実体顕微鏡観察下に 5 μm 厚 HE 染色標本を参照しながら，注射針を

用いて組織を掻き取った。腫瘍標本では腫瘍組織が大部分を占めるように掻き取った。掻き取った組織から WaxFree™ Paraffin Sample DNA Extraction Kit を用いて DNA を抽出した。いずれも，濃度を定量した後に，解析までは -20 °C で保存した。

(4)変異検索

抽出したゲノム DNA を用いて，*KEAP1* および *NRF2* の *KEAP1* 結合部位の塩基配列を決定し，ゲノムデータベースと比較して変異を検索した。差異が見つかった場合には，手術材料では正常組織のそれと比較することで多型か体細胞変異かを検討した。

(5)欠失検索(LOH アッセイ)

KEAP1 座位 (19p13.2) のマイクロサテライトマーカーを利用し，Applied Biosystems 3130 と GeneMapper ソフトウェアにより，手術材料と正常組織を比較した相対定量により LOH を検索した。

(6)DNA メチル化解析

KEAP1 プロモーター領域 CpG アイランドの DNA メチル化を，MSP (methylation-specific PCR) 法により解析した。MSP 法は，非メチル化シトシンをウラシルに変換することでメチル化状態の違いを塩基配列の違いに変換するバイサルファイト処理後，メチル化状態に特異的なプライマーを用いた PCR を行うことでメチル化状態を定性的に検討する方法である。

4. 研究成果

(1) DNA ライブラリの作成

以下の細胞や臨床検体から DNA を抽出し，本研究以降も活用しうる皮膚悪性腫瘍に関する DNA ライブラリが作成できた。それは，メラニン細胞初代培養細胞 3 種，表皮角化細胞初代培養細胞 3 種，悪性黒色腫細胞株 13 種，悪性黒色腫 18 例，有棘細胞癌 25 例，基底細胞癌 23 例，軟部肉腫 6 例からなる。

(2) *KEAP1* および *NRF2* の *KEAP1* 結合部位の変異検索

KEAP1 の変異は 72 例中 1 例のみで見いだされたが，極めて低率であった。その内訳は，悪性黒色腫 0/18，有棘細胞癌 1/25，基底細胞癌 0/23，軟部肉腫 0/6 であった。また，悪性黒色腫細胞株 13 種にも変異はなかった。

また，*NRF2* の *KEAP1* 結合部位の変異は見られなかった。

(3) *KEAP1* の欠失検索

KEAP1 座位 (19p13.2) の LOH アッセイでは，検索した 72 例の中では欠失はまったく検出できなかった。

(4)DNA メチル化解析

KEAP1 プロモーター領域 CpG アイランドの DNA メチル化は、72 例中 4 例(6%)で見られた。その内訳は、悪性黒色腫 1/18、有棘細胞癌 3/25、基底細胞癌 0/23、肉腫 0/6 であった。MSP 法では PCR 産物を示すバンドの濃さで半定量的にメチル化状態を観察できるが、得られた過剰メチル化を示すバンドは非メチル化のそれと比べてかなり弱く、部分的なメチル化に止まり mRNA 転写をシャットオフするには至らない程度であった。

このため、本来予定していた免疫染色による発現消失の確認は行わなかった。

(5)結論

以上より、皮膚悪性腫瘍では Keap1-Nrf2 システム破綻の関与が少ないことがわかった。

(6)派生的成果

本研究の中で派生的に、色素性母斑における悪性黒色腫抑制遺伝子 *RASSF1A* (*Ras association domain family member 1*)の DNA メチル化についても検討した。メラニン細胞の良性腫瘍である色素性母斑でも 43 例中 5 例(12%)で *RASSF1A* のプロモーター領域 CpG アイランドの DNA メチル化が見られた。そこで免疫染色による発現消失を調べたが、DNA メチル化の有無と蛋白発現の有無は相関しなかった。メチル化の程度が不完全であるためと考えた。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

丸山浩、古田淳一ほか 6 名、*RASSF1A protein expression despite DNA methylation in melanocytic nevi*、2014 年国際研究皮膚科学会、2013 年 5 月 8 日～11 日、エジンバラ国際会議場、エジンバラ (英国)

前田麻衣子、古田淳一ほか 3 名、*RASSF1A, a melanoma suppressor gene, is also methylated in melanocytic nevi*、第 41 回欧州研究皮膚科学会、2011 年 9 月 7 日～10 日、バルセロナ国際会議場、バルセロナ (スペイン)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

筑波大学医学医療系皮膚科ウェブサイトにて研究内容を紹介している

<http://www.md.tsukuba.ac.jp/clinical-med/derma/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

古田 淳一 (FURUTA, JUNICHI)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：30436274

(2)研究分担者

()
研究者番号：

(3)連携研究者

()
研究者番号：