

平成 21 年 5 月 11 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19790780

研究課題名（和文） 悪性黒色腫の浸潤転移における BRAF 変異と TWIST の関与

研究課題名（英文） The correlation between TWIST expression and BRAF mutation
in melanoma progression

研究代表者

藤本 晃英（FUJIMOTO AKIHIDE）

金沢大学・医学系・協力研究員

研究者番号：40334776

研究成果の概要：

本研究は、悪性黒色腫発生および腫瘍が浸潤・転移していく過程におけるBRAF変異遺伝子とTWISTの発現の関連を調べた。TWISTは脱メチル化された状態で、mRNAレベル、蛋白レベルとともに高度に発現していた。BRAF変異遺伝子の有無とTWISTmRNAレベル、蛋白レベルの発現量との関連は認められなかった。

原発腫瘍と転移性腫瘍においてTWISTmRNAレベルに明らかな違いは認めなかったが、蛋白レベルでは転移腫瘍でTWIST発現量が高い傾向が見られた。原発腫瘍において転移をきたした例と転移を認めていない例ではTWIST発現量に明らかな違いは認めなかった。

以上の結果から悪性黒色腫ではTWISTのpromotor領域は脱メチル化されTWISTが比較的高頻度に発現されている。TWISTは転移を促進する方向へ作用するが、悪性黒色腫は転移をきたしやすい腫瘍であり、その転移腫瘍でTWISTの高発現を認めた今回の結果は悪性黒色腫の高転移能を説明すると思われる、ただし良性腫瘍の色素性母斑でもTWISTの発現が見られており、TWISTの発現以外に何らかの調節機構が働いていると思われる。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
2007 年度	2, 100, 000	0	2, 100, 000
2008 年度	1, 000, 000	300, 000	1, 300, 000
年度			
年度			
年度			
総 計	3, 100, 000	300, 000	3, 400, 000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：悪性黒色腫 BRAF TWIST

1. 研究開始当初の背景

BRAF は細胞の増殖、分化、アポトーシスを制御する RAS/RAF/MAPK pathway の調節因子

のひとつであり、RAS 蛋白に結合することで、MAPK カスケードを活性化し細胞増殖を促進する。黒色腫では 5-33%に N-RAS の変異がみられることが知られていたが、最近、黒色腫

細胞株において高頻度(>80%)に BRAF の変異が認められ、さらにその変異の 80%がエクソン 15 の V599E という活性化型変異であることが明らかにされた (Davies et al. Nature 2002)。BRAF の変異は結果的に持続性の細胞増殖を引き起こすため、黒色腫の発生に BRAF の変異が重要な役割を果たしていることが示唆されている。しかし、おなじ色素細胞由来の良性腫瘍である母斑においても高頻度の変異が報告され (Pollock et al. Nat Genet. 2003)、黒色腫の発生には BRAF の変異にさらに他の癌関連遺伝子の異常が加わることが必要と示唆される。

悪性黒色腫はいったん転移をきたすと有効な治療が乏しいため、転移をいかに防ぐかが疾患をコントロールする鍵となる。腫瘍が転移する過程においてはさまざまな分子が関与するとされ、その機能を解析することで黒色腫の転移を制御しうる可能性がある。

乳癌において転移・浸潤を調節する遺伝子として TWIST が注目されている (Cell. 2004;117:927-39, Nat Med. 2004;10:777-8)。

Epithelial-mesenchymal transition (EMT) は腫瘍が転移・浸潤能を獲得する上で重要な過程であるが、TWIST は Snail とともに E-cadherin の発現抑制を介して EMT を制御する重要な因子で、その発現レベルは promotor 領域のメチル化によって規定されている。乳癌や胃癌では TWIST のメチル化が腫瘍の転移能と関連することが示されているが、悪性黒色腫の浸潤・転移における TWIST の関与はまだ明らかにされていない。

TWIST は乳癌の浸潤・転移における EMT の過程で重要な役割を果たし、その発現レベルが患者の予後とも相関するとされている。悪性黒色腫の転移における TWIST の関与はまだ明らかにされていないが、本研究によって悪性黒色腫における TWIST の発現と転移との関係が明らかになれば、患者の予後決定因子としてだけでなく、その阻害により悪性黒色腫の転移を抑制できる可能性を秘めている。BRAF は悪性黒色腫において現在全世界で精力的に研究されている分野である。その成果はわが国における黒色腫の治療法の改善やその標準化に寄与することは間違いないものと思われる。BRAF 変異により活性化される MAPK カスケードを抑える阻害剤を用いた黒色腫の治療法の開発も行われており、黒色腫における BRAF 変異が患者予後に与える影響を調べることは有意義である。黒色腫において BRAF と TWIST の関係が明らかになれば、将来のオーダーメイド化学療法および分子標的治療の有用なターゲットとなりうると期待される。

2. 研究の目的

本研究は、悪性黒色腫における BRAF 変異遺伝子と TWIST の発現の関連を調べ、黒色腫発生における BRAF 変異遺伝子の役割および腫瘍が浸潤・転移していく過程での TWIST の役割を調べる。

(1) BRAF 変異遺伝子が TWIST 発現に及ぼす影響

(2) 黒色腫非浸潤病変と浸潤・転移病変での TWIST 発現量の比較

(3) 黒色腫培養細胞におけるメチル化、脱メチル化による TWIST 発現量の変化

(4) BRAF 変異および TWIST の発現と臨床データ (生存期間、リンパ節転移・遠隔転移の有無など) との関連

3. 研究の方法

金沢大学医学部附属病院皮膚科において過去 10 年間に外科的治療を受けた悪性黒色腫約 50 例およびを対象とした。

1) 黒色腫における BRAF 変異の検出

当病院で切除され、保存されている黒色腫のパラフィン包埋組織から患者の同意を得られたものについて DNA を抽出し、遺伝子変異検出キット Mutector™ (TrimGen), ダイレクトシーケンス法にて BRAF の遺伝子変異の種類、頻度について検索する。

2) TWIST 免疫組織化学

悪性黒色腫のパラフィン切片を用いて TWIST の免疫組織化学染色を行い、タンパクレベルでの発現頻度、強度およびパターン (細胞質、核) を検討する。

3) TWIST Methylation-specific PCR

悪性黒色腫の腫瘍 DNA を sodium bisulfite で処理し非メチル化 C を U に変換する。TWIST の promotor 領域の CpG サイトのメチル化、非メチル化 DNA 配列それぞれに特異的な primer を設計し、sodium bisulfite 処理をした腫瘍 DNA をテンプレートとして PCR にて増幅する。アガロースゲル電気泳動にてメチル化および非メチル化 PCR 産物のバンドを確認し TWIST の promotor のメチル化の状態を調べた。

4) TWIST mRNA 発現解析

悪性黒色腫の凍結組織およびパラフィン包埋組織から腫瘍の RNA を抽出し、cDNA を合成する。TWIST の mRNA の発現量を RealTimePCR (ABI PRISM 7000 を使用) を用いて定量的に解析した。

5) 血清腫瘍マーカーの測定

悪性黒色腫の腫瘍マーカーとして有用とされている Melanoma-Inhibitory Activity (MIA)の血清値を ELISA 法にて測定した。

6) 臨床データ解析

上記実験にて得られた BRAF 変異、TWIST の発現量、メチル化の情報を原発腫瘍と転移性腫瘍、原発腫瘍で転移をきたしたものと転移を認めなかったもので比較した。臨床データ（生存期間、リンパ節転移・遠隔転移の有無、血清腫瘍マーカーMIA の上昇の有無など）との関係を調べた。

4. 研究成果

1) TWIST 免疫組織化学

悪性黒色腫の原発腫瘍 13 例、転移腫瘍 13 例のパラフィン切片を用いて TWIST の免疫組織化学染色を行い、タンパクレベルでの TWIST の発現頻度を調べた。原発腫瘍では強陽性 3 例、中等度陽性 9 例、弱陽性 1 例で転移をきたしたものと転移をきたさなかったもので明らかな違いは認めなかった。転移腫瘍では強陽性 5 例、中等度陽性 8 例、弱陽性 0 例で原発腫瘍より発現が強い傾向が見られた。

また対象として色素細胞の良性腫瘍である色素性母斑においても TWIST の発現頻度を調べたが、悪性黒色腫と同様、高発現を認めた。

2) TWIST Methylation-specific PCR

悪性黒色腫の腫瘍 DNA を用い TWIST の Methylation-specific PCR を行い TWIST の promotor のメチル化の状態を調べた。2 種類の primer を設計したが、悪性黒色腫原発腫瘍 6 例、転移腫瘍 12 例のいずれにもメチル化は検出できなかった。

3) TWISTmRNA 発現量の解析

悪性黒色腫において TWIST の mRNA レベルでも高度に発現しており、免疫組織化学によるタンパクレベルでの TWIST の高発現の結と矛盾しなかった。

4) BRAF 変異遺伝子と TWIST 発現量の関連

Shifted Termination Assay による遺伝子変異検出キット MutectorTM(TrimGen), にて検出した BRAF の遺伝子変異陽性の 6 例と陰性 16 例において TWIST 発現量を比較したが関連は認められなかった。

5) 血清腫瘍マーカーの測定

画像検査などにて転移を検出できる時点で 80% (12/15) の症例で MIA の値が 11.0 を超

えていた。

6) 臨床データ解析

原発腫瘍と転移性腫瘍において TWIST mRNA 発現量に明らかな違いは認めなかった。原発腫瘍において転移をきたした例と転移を認めていない例でも TWISTmRNA 発現量に明らかな違いは認めなかった。

TWISTmRNA 発現量と患者の生存期間との関連も認めなかった。

一方、タンパクレベルでの TWIST の発現量では転移腫瘍でより発現が強い傾向が見られた。

また対象として色素細胞の良性腫瘍である色素性母斑においても TWIST の発現頻度を調べたが、悪性黒色腫と同様、高発現を認めた。

血清腫瘍マーカーMIA との関連の検討では転移発見時の MIA の上昇の有無と TWIST 発現量、BRAF 遺伝子変異の有無に関連は認めなかった。

以上の結果から悪性黒色腫では TWIST の promotor 領域のメチル化は認められず、あるとしても低頻度と思われ、TWIST の promotor 領域が脱メチル化されているため、悪性黒色腫では TWIST が恒常的に発現されている。TWIST は E-cadherin の発現を抑制することで、腫瘍細胞の EMT を促進し、腫瘍に浸潤・転移能を与える重要な因子で転移を促進する方へ作用するとされている。悪性黒色腫は転移をきたしやすい腫瘍であり、その転移腫瘍で TWIST の高発現を認めた今回の結果は悪性黒色腫の高転移能を説明すると思われる、ただし良性腫瘍の色素性母斑でも TWIST の発現が見られており、TWIST の発現以外に何らかの調節機構が働いていると思われる。

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 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〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤本 晃英 (FUJIMOTO AKIHIDE)
金沢大学・医学系・協力研究員
研究者番号：40334776

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし