

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 8 日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461706

研究課題名(和文) 悪性黒色腫遺伝子変異誘導機構の解明と新規予防法の開発

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of mutagenesis in malignant melanoma

研究代表者

中村 元信 (NAKAMURA, MOTONOBU)

産業医科大学・医学部・教授

研究者番号：30303837

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝子変異誘導蛋白AID(activation-induced deaminase)の発現を免疫染色で検討したところ、悪性黒色腫16例中10例でAIDが高発現していた。悪性黒色腫AID高発現10例中、9例にBRAF遺伝子に変異がみられ、うち8例はリンパ節、他臓器への転移症例であった。AID発現ベクターを人メラノサイトにトランスフェクションし、紫外線照射を行ったところ、8クローン中2クローンでBRAF遺伝子に変異が見られた。これらの結果から、AIDを強発現している悪性黒色腫症例は予後が悪い可能性が示唆され、今後悪性黒色腫の予後を占うマーカーの1つにAIDが用いられることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Activation-induced cytidine deaminase (AID), a member of a cytidine deaminase family acts as a genome mutator that contributes to malignancy. BRAF-activating somatic mutations often exist in malignant melanoma. To explore the correlation between the AID expression and BRAF mutations, we performed the immunohistochemical study for 16 Japanese melanoma patients. Nine out of 10 malignant melanoma specimens with high AID expression contained BRAFV600E mutation. Eight out of 10 malignant melanoma patients with high AID expression developed multi-organ metastases and/or multiple lymph node metastases afterwards. To further examine a role of AID in melanocytes, we stably transfected normal human melanocytes with plasmids expressing AID. Sequence analysis revealed the existence of BRAFV600E mutations in two independent clones with forced expression of AID and UV irradiations. Taken together, AID may play roles in inducing BRAFV600E mutation and become a marker for prognosis of melanoma.

研究分野：皮膚科学

キーワード：悪性黒色腫 変異 予後

1. 研究開始当初の背景

(1) 悪性黒色腫では色素細胞が癌化し、MAPK (mitogen activated protein kinase) 経路の活性化が病態に重要な役割を果たしている。この MAPK 経路の活性化に関わる *BRAF*、*NRAS*、*KIT* などの遺伝子変異が悪性黒色腫細胞で発見され、さらにこれらの分子をターゲットとした分子標的薬も臨床応用が始まっている。しかしながら、このような遺伝子変異がおこる分子メカニズムについては不明な点が多い。紫外線は皮膚の細胞における変異誘発因子として広く知られているが、紫外線による障害を受けない部位に生じた日本人の悪性黒色腫でも 55.2%に *BRAF* 遺伝子変異が存在すると報告されており(引用文献 1)、紫外線以外の因子が *BRAF* 遺伝子変異を誘発している可能性が示唆される。

(2) AID (activation-induced deaminase)は免疫グロブリン遺伝子のクラススイッチや体細胞遺伝子突然変異に必須な役割を果たす分子として 2000 年に発表された遺伝子変異を誘発する蛋白である(引用文献 2)。その後、AID が胃癌や肝臓癌にも高発現していることが明らかになり、発癌にも関与していることが示唆されるようになった。我々も産業医科大学で成人 T 細胞白血病・リンパ腫 (ATLL: adult T cell leukemia/lymphoma)、メルケル細胞癌、ポーエン様丘疹症などで AID が高発現し、悪性化に関わっている可能性を示した(引用文献 3-5)。

2. 研究の目的

(1) 悪性黒色腫の *BRAF* 遺伝子などの変異の有無と AID の発現の上昇との相関を検討する。

(2) 正常色素細胞に AID 遺伝子を遺伝子導入し、高発現させ、遺伝子変異誘導の有無

を検討する。

3. 研究の方法

(1) 16 名の悪性黒色腫患者標本を抗 AID 抗体で染色し、AID の発現を検討する。

(2) 16 名の悪性黒色腫患者標本の *BRAF* 遺伝子などの変異の有無を検討する。

(3) 悪性黒色腫組織より、RNA 抽出キットを用いて RNA を精製する。cDNA 合成キットを用いて、cDNA を合成し、PCR 法にて AID、*APOBEC3B* cDNA を増幅させる。直接 DNA シークエンス法にて塩基配列が正しいことを確認する。この cDNA をプラスミドの pcDNA3.1CMV プロモーター下流に挿入し、プラスミドを大腸菌内で増やし、プラスミド DNA 抽出キットによりプラスミド DNA を精製する。

(4) 遺伝子変異誘導蛋白 AID、*APOBEC3B* 発現プラスミドを制限酵素で切断し、遺伝子導入キットによりヒト色素細胞に遺伝子導入する。プラスミドにはネオマイシン耐性遺伝子もつながれており、薬剤耐性を持つかどうかにより、染色体にプラスミドが挿入された色素細胞クローンを選別する。さらに、プラスミドが本当に細胞に導入されているかどうかを PCR 法で検証する。

(5) 色素細胞トランスフェクタントから DNA を精製し、直接 DNA シークエンス法にて *BRAF* 遺伝子変異の有無について塩基配列解析を行う。

4. 研究成果

(1) 16 名の悪性黒色腫患者標本を抗 AID 抗体で染色したところ、10 名の患者で AID が高発現していた。

(2) AID が高発現している 10 名の悪性黒色腫患者のうち、9 名で BRAF 遺伝子に変異があった。

(3) AID が高発現し BRAF 遺伝子に変異があった 9 名の悪性黒色腫患者のうち、8 名でリンパ節あるいは他臓器がみられた。

(4) 恒常的に AID を強発現している細胞を得るために AID 発現ベクターを人メラノサイトにトランスフェクションし、紫外線照射を行ったところ、8 クローン中 2 クローンで BRAF 遺伝子に変異が見られ、AID が BRAF 遺伝子変異に関与している可能性が考えられた。これらの結果から、AID を強発現している悪性黒色腫症例は予後が悪い可能性が示唆され、今後悪性黒色腫の予後を占うマーカーの 1 つに AID が用いられることが期待される。

引用文献

① Sakaizawa K, Ashida A, Uchiyama A, Ito T, Fujisawa Y, Ogata D, Matsushita S, Fujii K, Fukushima S, Shibayama Y, Hatta N, Takenouchi T, Uehara J, Okuyama R, Yamazaki N, Uhara H. Clinical characteristics associated with BRAF, NRAS and KIT mutations in Japanese melanoma patients. *J Dermatol Sci* 80, 2015, 33-37

DOI:10.1016/j.jdermsci.2015.07.012

② Muramatsu M, Kinoshita K, Fagarasan S, Yamada S, Shinkai Y, Honjo T. Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell* 102, 2000, 553-563

PMID:11007474

③ Nakamura M, Sugita K, Sawada Y, Yoshiki

R, Hino R, Tokura Y. High levels of activation-induced cytidine deaminase expression in adult T-cell leukaemia/lymphoma. *Br J Dermatol* 165, 2011, 437-439

DOI:10.1111/j.1365-2133.2011.10342.x

Watabe R, Nakamura M. Expression of activation-induced cytidine deaminase in adult Merkel cell carcinoma with lymph-node metastasis. *Eur J Dermatol* 23, 2013, 539-540

DOI:10.1684/ejd.2013.2078

Yamaguchi T, Nakamura M. Expression of activation-induced cytidine deaminase in Bowenoid papulosis. *Eur J Dermatol* 23, 2013, 729-730

DOI:10.1684/ejd.2013.2125

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 20 件)

1. Saito-Sasaki N, Sawada Y, Ohmori S, Omoto D, Haruyama S, Yoshioka M, Nishio D, Nakamura M. A possible role of IL-23 producing cell in a patient with psoriasiform drug eruption due to tazobactam and piperacillin hydrate: A case and literature review. *Eur J Dermatol*, 査読有, Vol.27, No.1, 2017, pp. 88-89.

DOI: 10.1684/ejd.2016.2883

2. Mashima E, Sawada Y, Yamaguchi T, Ohmori S, Haruyama S, Yoshioka M, Okada E, Nakamura M. Eosinophilic cellulitis possibly due to mosquito bite with high IL-5 production. *J Investig Allergol Clin Immunol*, 査読有, Vol.27, No.2, 2017, pp. 149-150.

DOI: 10.18176/jiaci.0142

3. Oda T, Sawada Y, Yamaguchi T, Ohmori S, Omoto D, Haruyama S, Yoshioka M, Okada E, Nakamura M. Psoriatic erythroderma caused by terbinafine: A possible pathogenetic role of IL-23. *J Investig Allergol Clin Immunol*, 査読有, Vol.27, No.1, 2017, pp. 63-64.

DOI: 10.18176/jiaci.0116

4. Oda T, Sawada Y, Yamaguchi T, Ohmori S, Omoto D, Haruyama S, Yoshioka M, Okada E, Nakamura M. Drug eruption caused by rosuvastatin. *J Investig Allergol Clin Immunol*, 査読有, Vol.27, No.2, 2017, pp. 140-141.

DOI: 10.18176/jiaci.0136

5. Nonaka T, Toda Y, Hiai H, Uemura M, Nakamura M, Yamamoto N, Asato R, Hattori Y, Besho K, Minato N, Kinoshita K. Involvement of activation-induced cytidine deaminase in skin cancer development. *J Clin Invest*, 査読有, Vol.126, No.4, 2016, pp. 1367-1382

DOI: 10.1172/JCI81522

6. Saito-Sasaki N, Sawada Y, Yamaguchi T, Ohmori S, Omoto D, Haruyama S, Yoshioka M, Okada E, Nakamura M. A possible pathogenetic role of IL-23/IL-17A axis in patients with lupus miliaris disseminatus faciei. *Clin Immunol*, 査読有, Vol.171, No.1, 2016, pp. 36-37.

DOI: 10.1016/j.clim.2016.08.007

7. Saito-Sasaki N, Sawada Y, Yamaguchi T, Ohmori S, Omoto D, Haruyama S, Yoshioka M, Okada E, Nakamura M. A possible pathogenetic role of IL-23/IL-17A axis in rheumatoid nodules in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Immunol*, 査読有, Vol.170, No.1, 2016, pp. 20-21.

DOI: 10.1016/j.clim.2016.07.002

8. Saito-Sasaki N, Sawada Y, Ohmori S, Omoto D, Haruyama S, Yoshioka M, Nishio D, Nakamura M. First case of acute generalized exanthematous pustulosis caused by pitavastatin: A possible pathogenetic role of IL-36. *Eur J Dermatol*, 査読有, Vol.26, No.1, 2016, pp. 106-107.

DOI: 10.1684/ejd.2015.2694

9. Saito-Sasaki N, Sawada Y, Ohmori S, Omoto D, Haruyama S, Yoshioka M, Nishio D, Nakamura M. Multiple fixed drug eruption caused by ropinirole in a patient with Parkinson's disease. *Allergol Int*, 査読有, Vol.65, No.2, 2016, pp. 221-222.

DOI: 10.1016/j.alit.2015.12.003

10. Saito-Sasaki N, Sawada Y, Ohmori S, Omoto D, Haruyama S, Yoshioka M, Nishio D, Nakamura M. Maculopapular type drug eruption caused by fosphenytoin. *Eur J Dermatol*, 査読有, Vol.26, No.5, 2016, pp. 502-503.

DOI: 10.1684/ejd.2016.2824

11. Sakuragi Y, Sawada Y, Hara Y, Ohmori S, Omoto D, Haruyama S, Yoshioka M, Nishio D, Nakamura M. Acute generalized exanthematous pustulosis caused by faropenem: A possible pathogenetic role for IL-23. *Acta Derm Venereol*, 査読有, Vol.96, No.2, 2016, pp. 265-266.

DOI: 10.2340/00015555-2225

12. Sakuragi Y, Sawada Y, Hara Y, Ohmori S, Omoto D, Haruyama S, Yoshioka M, Nishio D, Nakamura M. Increased circulating Th17 cell in a patient with tinea capitis caused by *Microsporum canis*. *Allergol Int*, 査読有, Vol.65, No.2, 2016, pp. 215-216.

DOI: 10.1016/j.alit.2015.10.003

13. Sakuragi Y, Inoue A, Mashima E, Yamaguchi T, Sasaki N, Hara Y, Omoto D, Ohmori S, Haruyama S, Sawada Y, Yoshioka M, Nishio D, Nakamura M. Dome-shaped metastatic lesion on the scalp from a uterine smooth muscle tumor of uncertain malignant potential (STUMP). *Eur J Dermatol*, 査読有, Vol.26, No.2, 2016, pp. 193-194.

DOI: 10.1684/ejd.2016.2790

14. Mashima E, Sawada Y, Ohmori S, Omoto D, Haruyama S, Yoshioka M, Nishio D, Nakamura M. Annular erythematous eruption with a high response to mosquito bite. *J Dermatol*, 査読有, Vol.43, No.11, 2016, pp. 1378-1380.

DOI: 10.1111/1346-8138.13393

15. Hamada K, Sawada Y, Ohmori S, Omoto D, Haruyama S, Yoshioka M, Nishio D, Nakamura M. Photosensitivity due to tocilizumab presenting with erythema multiforme-like lesions. *Eur J Dermatol*, 査読有, Vol.26, No.5, 2016, pp. 503-504.

DOI: 10.1684/ejd.2016.3015

16. Inoue A, Sawada Y, Ohmori S, Omoto D, Haruyama S, Yoshioka M, Nishio D, Nakamura M. Photoallergic drug eruption caused by certolizumab pegol. *Acta Dermato Venereol*, 査読有, Vol.96, No.5, 2016, pp. 710-711.

DOI: 10.2340/00015555-2334

17. Inoue A, Sawada Y, Ohmori S, Omoto D, Haruyama S, Yoshioka M, Nishio D, Nakamura M. Maculopapular type drug eruption caused by silodosin. *Allergol Int*, 査読有, Vol.65, No.2, 2016, pp. 219-220.

DOI: 10.1016/j.alit.2015.11.008

18. Inoue A, Sawada Y, Ohmori S, Omoto D, Haruyama S, Yoshioka M, Nishio D, Nakamura M. CD30 positive cutaneous pseudolymphoma caused by tocilizumab in a patient with rheumatoid arthritis: Case report and literature review. *Acta Dermato Venereol*, 査読有, Vol.96, No.4, 2016, pp. 570-571.

DOI: 10.1016/j.alit.2015.11.008

19. Inoue A, Sawada Y, Ohmori S, Omoto D, Haruyama S, Yoshioka M, Nishio D, Nakamura M. Lichenoid drug eruption caused by limaprost alfadex. *Acta Dermato Venereol*, 査読有, Vol.96, No.7, 2016, pp. 997-998.

DOI: 10.2340/00015555-2435

20. Okura R, Yoshioka H, Yoshioka M, Hiromasa K, Nishio D, Nakamura M. Expression of AID in malignant melanoma with BRAF(V600E) mutation. *Exp Dermatol*, 査読有, Vol.23, No.5, 2014, pp. 347-348

DOI: 10.1111/exd.12402

〔学会発表〕(計3件)

1. Nakamura M、Nail psoriasis、10th Asian Dermatological Congress、2016年10月14日、ムンバイ国際会議場(インド ムンバイ市)

2. 中村 元信、皮膚悪性腫瘍の発症メカニズム、第13回南九州地区合同皮膚科地方会、2016年6月19日、宮崎観光ホテル(宮崎県 宮崎市)

3. Nakamura M, Mashima E, Sakuragi Y, Saito N, Yamaguchi T, Watabe R, Yoshioka H, Omoto D, Hiromasa K, Haruyama S, Kubo R, Yoshioka M, Nishio D、Expression of activation induced deaminase and BRAF(V600E) mutation in malignant

melanoma 、 23rd World Congress of
Dermatology、2015年6月12日、バンクー
バー国際会議場(カナダ バンクーバー市)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

中村 元信 (NAKAMURA Motonobu)

産業医科大学 医学部 教授

研究者番号:30303837