

平成 29 年 5 月 17 日現在

機関番号：33916

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15414

研究課題名(和文)KITのSH3ドメイン機能獲得変異に着目した悪性黒色腫の新規治療標的分子の同定

研究課題名(英文)Identification of novel therapeutic target of melanoma with focus on gain-of-function mutation of SH3 domain of KIT

研究代表者

杉浦 一充 (SUGIURA, Kazumitsu)

藤田保健衛生大学・医学部・教授

研究者番号：70335032

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：KIT変異による悪性黒色腫の新規治療標的分子を同定することと新規KIT変異がSH3ドメインを創出する変異が否かについて結合するタンパク質の同定とともに解明することを目的とした。悪性腫瘍化変異、非悪性腫瘍化変異を恒常的に発現する無色素性メラノーマ由来細胞株を作成した。プロテオーム解析でc-kit 新規変異が細胞内領域にSH3ドメインを創出する変異であることを特異的に結合するタンパク質の同定とともに解明した。さらに悪性腫瘍化変異と非悪性腫瘍化変異恒常発現株の抽出液のタンパク質発現をプロテオーム解析で比較検討し、悪性腫瘍化変異恒常発現株に特異的に発現するタンパク質群を抽出した。

研究成果の概要(英文)：The aims of this study are to identify novel therapeutic targets of melanoma caused by KIT mutation, and to elucidate that a novel KIT mutation creates SH3 domain which binds to some proteins which have SH2 domain. Constitutive malignant KIT mutation expressed amelanotic melanocyte cell line, constitutive non-malignant KIT mutation expressed amelanotic melanocyte cell line, and constitutive wild type KIT expressed amelanotic melanocyte cell line were established. The novel kit mutation was proven to create SH3 domain by proteome analysis. Some binding proteins which bound to the KIT mutation were identified. Moreover, some proteins, which overexpressed in constitutive malignant KIT mutation expressed amelanotic melanocyte cell line, were also identified.

研究分野：皮膚科学

キーワード：悪性黒色腫 KIT SH3ドメイン

## 1. 研究開始当初の背景

Universal inherited melanodyschromatosis (UIM) (仮称：遺伝性全身性メラニン色素異常症)は常染色体優性遺伝形式の極めて稀な遺伝性皮膚疾患である(Rebora A et al. Arch Dermatol 1989)。幼少時から発症し、頬部などの顔面(図1)、陰部、肘、膝、手足などに褐色色素斑が多発する。



図1: 患者V-1、V-2 (一卵性双生児)の頬部褐色色素斑

内蔵病変を合併しない。本症は今までにイタリア人の1つの大家系の症例が報告されていたが、病因遺伝子は同定されていなかった。私たちは家族歴、臨床所見、病理所見、電顕所見より、本疾患患者と診断した本邦初の日本人大家系の患者6人の経過観察をしていた(図2)。

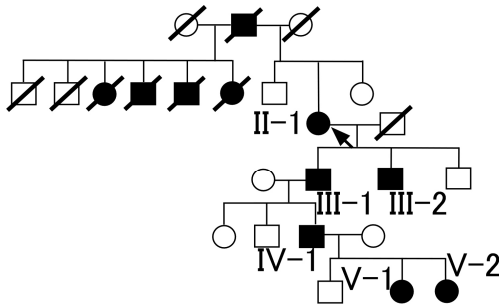


図2: UIMと診断した家系の家系図

私たちは遺伝性皮膚疾患の病因遺伝子変異の解析を精力的に実施し、研究開始当初までに22疾患、80家系において、病因遺伝子を明らかにしてきた。また、全エクソームシーケンス法を用いて網状肢端色素沈着症(北村)の原因遺伝子ADAM10を同定し報告した。私たちは電顕所見(図3)、文献検索などから病因遺伝子はメラノサイトにおいてメラニン合成に関与しているとの仮説をたてていた。全エクソームシーケンス法を用いてUIMの病因遺伝子として

KITの新規変異p.Ala829Proを同定した。KITの遺伝子産物c-kitはチロシンキナーゼ受容体であり、メラノサイト、肥満細胞、消化管間質細胞に発現している。KITの先天的な機能獲得変異は消化管の悪性腫瘍(ときに良性腫瘍)であるgastrointestinal stromal tumor (GIST)と、顔面と陰部などに色素斑を来す、家族性GIST症候群の病因である。KITの後天的な機能獲得突然変異は悪性黒色腫、あるいは孤発性のGISTを来す。興味深いことに、後天的に悪性黒色腫を来すKITの変異には家族性GIST症候群を来す変異と全く同じものがある。p.Ala829Pro変異はc-kitの細胞内領域にあり、Src homology 3 (SH3)ドメインが創出される機能獲得変異であることが

推測される。SH3ドメインはSH2ド

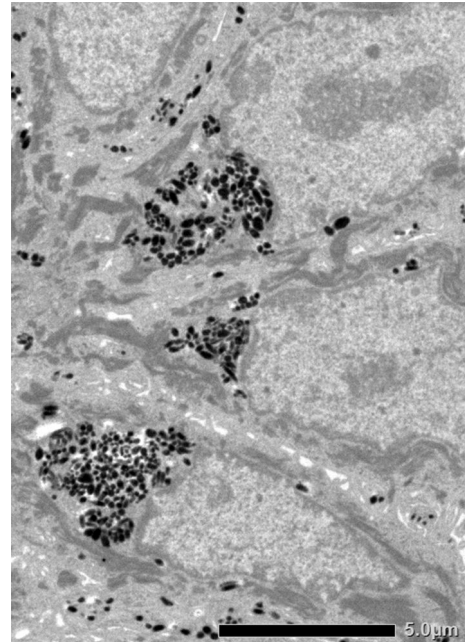


図3: 患者II-1の左手掌の褐色色素斑の電顕所見。メラノサイトにメラノソームが多数存在する。

ドメインと結合する。今回の変異ではc-kitの細胞内領域にSH3ドメインが創出されて、SH2ドメインをもつアダプタータンパク質が結合して色素産生のシグナルを促進していることが推測される。

## 2. 研究の目的

興味深いことに今回のUIMの家系ではGISTを来した患者はいない。このことから

p.Ala829Pro 変異はヒトで全く GIST を来さないことから、悪性腫瘍化は来さない変異であると考えられた。私たちはこの変異の性質を利用することにより、KIT 変異による悪性黒色腫の治療標的分子を同定することを目的とした。具体的には以下 3 つを目的とした。1.KIT p.Ala829Pro が SH3 ドメインを創出する変異か否かを結合タンパク質の同定とともに解明する。2.野生型と変異型 3 種の恒常発現無色素性メラノーマ細胞株の増殖能を比較検討する 3.悪性黒色腫を引き起こす KIT 変異株に特異的に発現するタンパク質群を抽出する。

### 3 . 研究の方法

(1) 悪性腫瘍化変異株と非悪性腫瘍化変異株を作成した。

悪性腫瘍化変異(c-kit p.Lys642Glu、c-kit p.Asp820Tyr cDNA)、非悪性腫瘍化変異(c-kit p.Ala829Pro cDNA)、野生型 c-kit cDNA をネオマイシン耐性のプラスミドに組み替えた。既に以下に述べる 8 種の c-kit 恒常発現細胞株を構築した。すなわち、無色素性のメラノーマ由来細胞株(A375 と SK-MEL28)それぞれに上記プラスミド 4 種類をトランスフェクションし、G418 にて選択し、8 つの恒常発現細胞株を構築した(c-kit p.Lys642Glu A375、c-kit p.Asp820Tyr A375、c-kit p.Ala829Pro A375、c-kit wild A375、c-kit p. Lys642Glu SK-MEL28、c-kit p.Asp820Tyr SK-MEL28、c-kit p.Ala829Pro SK-MEL28、c-kit wild SK-MEL28)。

(2) c-kit p.Ala829Pro が SH3 ドメインを創出する変異か否かを結合タンパク質の同定とともに解明した。

プロテオーム解析で同定する。c-kit p.Ala829Pro A375 と c-kit wild A375、な

らびに c-kit p.Ala829Pro SK-MEL28 と c-kit wild SK-MEL28 の細胞抽出液を用いて、抗 c-kit 抗体で免疫沈降をする。免疫沈降物を 2 次元電気泳動で展開する。c-kit p.Ala829Pro 恒常発現株と c-kit wild 恒常発現株それぞれの沈降物の泳動パターンの違いから、A375 と SK-MEL28 に共通する c-kit p.Ala829Pro に特異的に結合するタンパク質群を抽出する。SH2 ドメインをもつタンパク質を複数抽出することを予測している。免疫沈降と Western blot 法の組み合わせで結合の確認実験をして、特異的に結合するタンパク質群を同定した。

(3) 悪性腫瘍化株、非悪性腫瘍化株、野生型株の増殖能を比較検討した。

それぞれの細胞株の増殖能を BrdU ELISA 法にて比較検討する。悪性腫瘍化変異を恒常発現した悪性腫瘍化株が最も増殖能が高いと予測している。もし 4 種類ある悪性腫瘍化株が 1 つも高い増殖能を有していなかった場合は、悪性黒色腫で見いだされる KIT の別の変異を発現した細胞株数種を再度作成し、高い増殖能を有する細胞株が得られるまで続けた。

(4) 悪性黒色腫を引き起こす KIT 変異株に特異的に発現するタンパク質群を抽出した。

プロテオーム解析を実施する。A375 ならびに SK-MEL28 で作成した悪性腫瘍化株と非悪性腫瘍化株と野生型株それぞれの細胞抽出液を 2 次元電気泳動で展開する。泳動パターンの違いから悪性腫瘍化株に特異的に発現するタンパク質群を抽出した。Western blot 法で悪性腫瘍化株に特異的に発現するタンパク質群を確定した。

### 4 . 研究成果

8 つの恒常発現細胞株を構築した(c-kit p.Lys642Glu A375、c-kit p.Asp820Tyr A375、

c-kit p.Ala829Pro A375、c-kit wild A375、c-kit p. Lys642Glu SK-MEL28、c-kit p.Asp820Tyr SK-MEL28、c-kit p.Ala829Pro SK-MEL28、c-kit wild SK-MEL28)。c-kit p.Ala829ProがSH3ドメインを創出する変異か否かを結合タンパク質の同定とともに解明した。悪性腫瘍化変異株が非悪性腫瘍化変異株よりも高い増殖能を有することを明らかにした。最後に、悪性黒色腫を引き起こすKIT変異株に特異的に発現するタンパク質群を抽出した。

#### 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 16 件)

Saito-Sasaki N, Izu K, Sawada Y, Hino R, Nakano R, Shimajiri S, Nishimura I, Nakamura H, Sugiura K, Nakamura M.

Impetigo Herpetiformis Complicated with Intrauterine Growth Restriction Treated Successfully with Granulocyte and Monocyte Apheresis. *Acta Derm Venereol* 2017;97:410-411. 査読有

Fukaura R, Takeichi T, Okuno Y, Kojima D, Kono M, Sugiura K, Suga Y, Akiyama M. Striate palmoplantar keratoderma showing transgrediens in a patient harboring heterozygous nonsense mutations in both *DSG1* and *SERPINB7*. *Acta Derm Venereol*, 2017;97:399-401. 査読有

Kono M, Fukai K, Shimizu N, Nagao J, Takeichi T, Tsuruta D, Sugiura K, Akiyama M. Punctate Palmoplantar Keratoderma Type 1 with a Novel AAGAB Frameshift Mutation: intrafamilial phenotype variation due to aging. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2017;31:e175-e176. 査読有

Kono M, Nishida K, Takeichi T, Sugiura K,

Akiyama M. Ripple-pattern lichen amyloidosis in a case of ichthyosis vulgaris with a novel FLG mutation. *J Eur Acad Dermatol Venereol*

2017;31:e130-e132. 査読有

Kono M, Fukai K, Omura R, Sugawara K, Tsuruta D, Sugiura K, Akiyama M. A case of epidermolytic ichthyosis showing a very mild phenotype due to a novel tail extension mutation in KRT10. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 2017;31:e68-e69. 査読有

Takeichi T, Sugiura K, Nomura T, Sakamoto T, Ogawa Y, Oiso N, Futei Y, Fujisaki A, Koizumi A, Aoyama Y, Nakajima K, Hatano Y, Hayashi K, Akemi Ishida-Yamamoto A, Fujiwara S, Sano S, Iwatsuki K, Kawada A, Suga Y, Shimizu H, McGrath JA, Akiyama M. Pityriasis rubra pilaris type V as an auto inflammatory disease by CARD14 mutations. *JAMA Dermatol* 2017;153:66-70. 査読有

Takeichi T, Togawa Y, Taniguchi R, Okuno Y, Kono M, Matsue H, Sugiura K, Akiyama M. A newly revealed IL36RN mutation in sibling cases complements our IL36RN mutation statistics for generalized pustular psoriasis. *J Dermatol Sci* 2017;85:58-60. 査読有

Noda K, Takeichi T, Okuno Y, Takama H, Miura S, Kagami S, Hino H, Nakamura Y, Fujio Y, Konohana I, Otani A, Mukai H, Sugiura K, Akiyama M. Novel and recurrent ATP2A2 mutations in Japanese patients with Darier's disease. *Nagoya J Med Sci* 2016;78:485-492. 査読有

Takeichi T, Sugiura K, Nakamura Y, Konohana I, Akiyama M. Darier's disease complicated with schizophrenia caused by

a novel ATP2A2 mutation. *Acta Derm Venereol* 2016;96:993-994. 査読有

Nanbu A, Sugiura K, Sassa N, Akiyama M. Epididymitis with epididymal cysts indicating IgA vasculitis in an adult. *Acta Derm Venereol* 2016;96:985-986. 査読有

Sugiura K, Ohno A, Kono M, Kitoh H, Itomi K, Akiyama M. Hyperpigmentation over the metacarpophalangeal joints and the malleoli in a case of hyaline fibromatosis syndrome with *ANTXR2* mutations. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2016;30:e44-e46. 査読有

Kono M, Hasegawa-Murakami Y, Sugiura K, Ono M, Toriyama K, Miyake N, Hatamochi A, Kamei Y, Kosho T, Akiyama M. A 45-year-old woman with Ehlers-Danlos syndrome caused by dermatan 4-O-sulfotransferase-1 deficiency: implications of dermatan sulfate depletion on early aging. *Acta Derm Venereol* 2016;96:830-1. 査読有

Takeichi T, Sugiura K, Hsu CK, Nomura T, Takama H, Simpson MA, Shimizu H, McGrath JA, Akiyama M. Erythrokeratoderma variabilis caused by p.Gly45Glu in connexin 31: the importance of the first extracellular loop glycine residue for gap junction function. *Acta Derm Venereol* 2016;96:557-9. 査読有

Kaibuchi-Noda K, Sugiura K, Akiyama M. Lipodystrophia centrifugal abdominalis infantilis accompanied by idiopathic encephalopathy. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2016;30:862-4. 査読有

Kono M, Matsumoto F, Suzuki Y, Suganuma M, Saitsu H, Ito Y, Fujiwara S, Matsumoto K, Moriwaki S, Matsumoto N, Tomita Y, Sugiura K, Akiyama M.

Dyschromatosis symmetrica hereditaria and Aicardi-Goutières syndrome 6 are phenotypic variants caused by ADAR1 mutations. *J Invest Dermatol* 2016;136:875-8. 査読有

Muro Y, Sugiura K, Akiyama M. Cutaneous Manifestations in Dermatomyositis: Key Clinical and Serological Features-a Comprehensive Review. *Clin Rev Allergy Immunol* 2016;51:293-302. 査読有

[学会発表](計7件)

Kazumitsu Sugiura, Genetic background of generalized pustular psoriasis, International congress of human genetics, 2016年4月6日, 京都市(京都国際会館)

杉浦 一充, 意外な遺伝性皮膚疾患, 第276回日本皮膚科学会東海地方会, 2016年6月26日, 名古屋市(大正製薬(株)中日本支店)

Kazumitsu Sugiura, Genetic background of pustular psoriasis, Asia-Pacific Combined Dermatology Research Conference, 2016年8月27日, Noosa in Australia (Sofitel Pacific Resort Noosa Hotel)

杉浦 一充, 皮膚科の自己炎症性疾患; DITRA と CAMPS, 日本皮膚科学会愛媛地方会第64回学術大会, 2016年10月1日, 松山市(いよてつ会館)

Kazumitsu Sugiura, Genetic background of pustular psoriasis, 12th Meeting of the German-Japanese Society of Dermatology, 2016年10月15日, 東京都文京区(東京医科歯科大学)

杉浦 一充, 膿疱症と DITRA(deficiency of interleukin-36 receptor antagonist), 第32回日本臨床皮膚科医会 東海北陸ブロック総会, 2016年10月16日, 名古屋

市(キャッスルプラザ)

杉浦 一充, 稀でない遺伝性皮膚疾患,  
第 203 回愛知県皮膚科医会例会, 2016  
年 11 月 19 日, 名古屋市(中日パレスク  
ラフンホール)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

杉浦 一充 (SUGIURA, Kazumitsu)  
藤田保健衛生大学・医学部・教授  
研究者番号 : 70335032

(2)連携研究者

越川 直彦 (KOSHIKAWA, Naohiko)  
神奈川県立がんセンター臨床研究所・がん  
生物学部・部長  
研究者番号 : 70334282