

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591317

研究課題名(和文) 皮膚悪性腫瘍の発生におけるAIDの関与

研究課題名(英文) Activation-Induced Cytidine Deaminase (AID) Links epidermal Inflammation to malignant skin tumors

研究代表者

原田 和俊 (HARADA KAZUTOSHI)

山梨大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：20324197

研究成果の概要(和文)：

ゲノムに変異を導入し抗体の多様性獲得に関与する酵素 AID が皮膚悪性腫瘍の母地である扁平苔癬、萎縮性硬化性苔癬、DLE などの疾患に発現していることが解明された。さらに、これらの前癌病変で持続的に発現している TNF- α を表皮角化細胞株に添加することで、AID が誘導されることが確認された。これらの結果より、表皮の持続的な炎症により、AID が異所性に発現し、遺伝子へ変異を導入することで、皮膚悪性腫瘍が発生している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：

AID, a DNA mutagenic enzyme, was expressed in inflammatory skin disorders, including lichen planus, lichen sclerosis et atrophicus and DLE. The AID was not expressed in human keratinocyte cell line, however, addition of TNF- α , a inflammatory cytokine, induced the ectopic expression of AID in this cell line. These data suggested that sustained inflammation in skin yielded the ectopic expression of AID in keratinocytes. As a result of aberrant expression of AID, the enzyme induces DNA mutation and skin carcinogenesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

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：皮膚悪性腫瘍、慢性炎症、遺伝子変異、AID(activation induced deaminase)

1. 研究開始当初の背景

これまでの分子生物学や遺伝子工学を用いた研究より基底細胞癌、有棘細胞癌、悪性黒色腫などの皮膚悪性腫瘍を引き起こす遺伝子変異 (Ras, Raf, Ptc, PTEN など) が見出され、さらにこれらの遺伝子変異により腫瘍細胞が増殖抑制シグナルから逃れたり、アポトーシスからエスケープしたりすることが分子レベルで理解されるようになった。しかし、

どのようなメカニズムでこれらの遺伝子に変異が導入されるのか、その詳細な機序については不明のままである。DNA 損傷修復機転に異常を来たす色素性乾皮症や Muir-Torre 症候群のように genomic instability を伴う疾患では高率に DNA 変異を引き起こされるが、発生母地としてこれらの疾患が皮膚悪性腫瘍の総数に占める割合は決して高くない。また、日光露光部に関しては紫外線がピリミジンダイマ

一を形成し、その結果として癌抑制遺伝子 p53 に変異を引き起こすことはある程度解明されているものの、このメカニズムのみで全ての皮膚癌の発症メカニズムを説明するには不十分である。

一方、免疫グロブリンの IgM から IgG へクラススイッチを誘導する酵素として本庶らのグループによって発見された Activation induced cytidine deaminase

(AID)はその後の研究により、驚くべきことに抗体可変領域遺伝子の体細胞突然変異を導入する機能も持つことが示された。本庶らのグループによって発見された。本酵素によって抗体遺伝子へ高率に変異が導入されることで (somatic hypermutation : SHM) 、多彩な抗原に反応する抗体が B 細胞や形質細胞内で作られることとなる。しかしこの酵素は両刃の剣であり、DNA に変異を刻み込むということは、遺伝子変異を起こすことであり、AID の遺伝子発現の厳密なコントロール機構が破綻した場合、生体にとって極めて危険な状況となることが予想される。事実、本酵素を線維芽細胞などのリンパ球系以外の細胞に発現させると、通常は活性化 B 細胞にしか起こらない筈の SHM 活性が誘導されることが確認され、AID を全身に発現させたトランスジェニックマウスではリンパ腫や肺癌の発生が認められている。さらに興味深いことに、Helicobacter pylori による胃癌の発生に AID が関与していることを示唆する報告が最近発表された。

我々は、AID が皮膚悪性腫瘍の発生に関与している可能性を考えた。

2. 研究の目的

有棘細胞癌をはじめとする皮膚悪性腫瘍の発症メカニズムに AID が関与しているか否かを明らかにすることを目的とする。

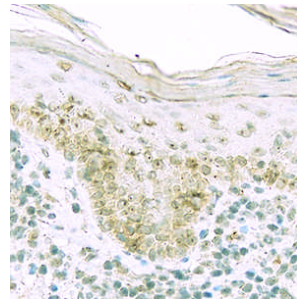
3. 研究の方法

- (1) 皮膚悪性腫瘍の母地となる慢性炎症疾患 (扁平苔癬、DLE、硬化性萎縮性苔癬、日光角化症など) における AID の発現を免疫組織学的に検討する。
- (2) 炎症性サイトカイン添加による角化細胞の AID 発現誘導を蛍光抗体法、ウエスタンブロット法などを用いて検討する。
- (3) AID 過剰発現させた角化細胞の樹立し、強制発現した AID が角化細胞の DNA へ変異を導

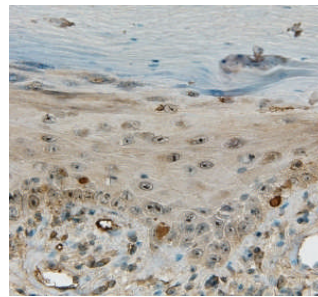
入するかどうかを検索する。

4. 研究成果

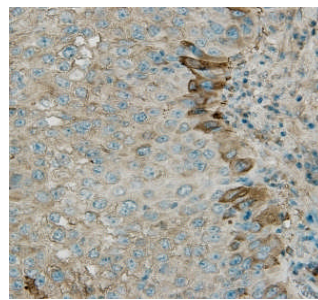
(1) 皮膚悪性腫瘍、特に有棘細胞癌の発生母地となる、扁平苔癬、DLE、LSA などの病変部に AID の発現が認められるかどうかを、免疫組織染色を行なうことで、検討した。使用した抗体は、リンパ節において、B 細胞を染色することを確認した。以下の図 1、図 2 のように、これらの慢性炎症性皮膚疾患で AID タンパクの発現が確認された。



(図 1) 有棘細胞癌の発生母地として重要な扁平苔癬において、AID の発現が確認された。



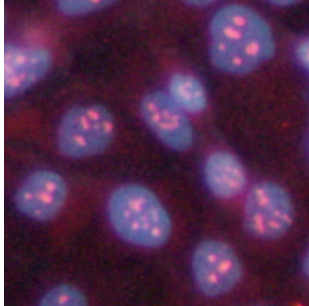
(図 2) 有棘細胞癌の発生母地として重要な DLE においても、AID の発現が確認された。



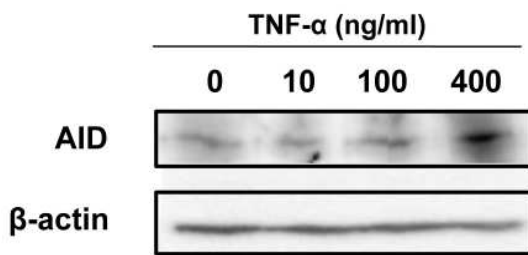
(図 3) 有棘細胞癌では、辺縁に AID の発現が認められる症例があった。

さらに、表皮由来の悪性腫瘍である有棘細胞癌や基底細胞癌を AID で免疫染色を行ったところ、有棘細胞癌の一部の症例で、AID の発現が確認された。発現パターンは腫瘍巣の辺縁に認められる事が多かった。その一方、基底細胞癌では、AID が発現している症例はなかった。

(2)炎症性サイトカインである TNF- α は NF- κ B の核内移行を誘導することで、下流に存在する AID の発現を引き起こすことが解明されている。そこで、表皮角化細胞株を TNF- α 、IFN- γ などの炎症性サイトカインで刺激することで、AID が異所性に発現するかどうかを検討した。



(図 4) 表皮角化細胞株における AID の免疫組織染色



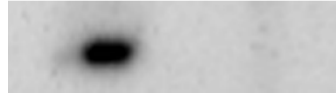
(図 5) TNF- α 添加による表皮角化細胞株における AID の発現誘導。TNF- α の濃度依存的に AID の発現の亢進が確認された。

その結果、炎症性サイトカイン TNF- α 添加により、表皮角化細胞株に AID が誘導されることが、蛍光抗体法を用いた免疫染色で確認された(図 4)。さらに、同様の結果が western blot 法でも確認され、AID の発現は炎症性サイトカインの濃度依存性に上昇することも示された(図 5)。今後は、AID 蛋白の発現の上昇が、NF- κ B シグナルを介しているかどうかを、NF- κ B 阻害薬や dominant negative 型 I κ B などを用いて、検討する予定である。さらに、紫外線照射により、AID の発現が亢進するかどうかも検討する予定である。

(3) AID は変異導入酵素であり、B 細胞のみではなく、消化管上皮細胞に発現した場合には、ゲノムに変異を導入することが示されている。そこで、皮膚表皮角化細胞株においても、同様に AID が DNA に変異を導入するかどうかを解析する為に、AID を強制的に発現させた細胞株の樹立を試みた。

HaCaT cell

AID(+) AID(-)



(図 4) 表皮細胞株における AID の発現

AID の cDNA をレトロウイルスベクターにクローニングし、表皮角化細胞株である HaCaT 細胞に導入したところ、AID タンパクの発現が確認できた(図 4)。この結果より AID を恒常的に発現する細胞を樹立できたので、今後、長期間培養し、発癌に関与する p53、H-Ras、p16 などの遺伝子に変異が導入されるかどうかを検討する予定である。

さらに、遺伝子に変異が導入された結果、HaCaT 細胞の増殖が亢進したり、apoptosis 抵抗性になったりする可能性がある。MTT assay や PI 染色、Annexin 染色などを行い、これらの変化を検出する。さらに、有棘細胞癌は悪性度が高くなると、形態が紡錘形に変化したり、遊走能が高くなったりする。免疫染色や wound healing assay を用いて、これらの表現系の変化を検討する予定である。

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 4 件)

(1) Okamoto T, Inozume T, Mitsui H, Kanzaki M, Harada K, Shibagaki N, Shimada S. Overexpression of GRIM-19 in cancer cells suppresses STAT3-mediated signal transduction and cancer growth. *Mol Cancer Ther.*、査読有、2010 9(8):2333-43.

(2) Aoki R, Mitsui H, Harada K, Kawamura T, Shibagaki N, Tsukamoto K, Murata S, Shimada S. A case of lymphoepithelioma-like carcinoma of the skin associated with Epstein-Barr virus infection. *J AM ACAD DERMATOL.*、査読有、2010 62(4):681-4.

(3) Scholl FA, Dumesic PA, Barragan DI, Harada K, Charron J, Khavari PA. Selective Role for Mek1 but not Mek2 in the Induction of Epidermal Neoplasia. *Cancer Res.*、査読有、2009 69(9):3772-8

(4) Nakagomi D, Harada K, Yagasaki A, Kawamura T, Shibagaki N, Shimada S. Psoriasisiform eruption associated with alopecia areata during infliximab therapy.

Clin Exp Dermatol. 、査読有、2009
34(8):923-4.

〔学会発表〕（計1件）

(1)原田和俊、島田眞路、遺伝子変異誘導酵素 AID の皮膚悪性腫瘍発生における役割の解明、第 108 回日本皮膚科学会総会、2009.4.25、福岡

6. 研究組織

(1)研究代表者

原田 和俊 (HARADA KAZUTOSHI)
山梨大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：20324197

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし