

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860865

研究課題名(和文)皮膚腫瘍における癌遺伝子の変異解析とオーダーメイド治療への応用

研究課題名(英文)Analyses of mutations in cancer-related genes in skin tumors for the development of personalized medicine

研究代表者

六戸 大樹 (Rokunohe, Daiki)

弘前大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：50436036

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：各種皮膚腫瘍における癌関連遺伝子の変異検索のため、遺伝子それぞれの変異hot spotを効率的に検索可能なSNaPshot法を導入した。本システムにより複数遺伝子の変異を同時に解析可能である。有棘細胞癌 29検体、Bowen22検体を解析し、2例(3.9%)からKRAS変異を検出した。悪性黒色腫では32例中7例(31%)にBRAF、KRAS、HRASの変異が検出された。毛母腫と表皮様嚢腫のHybrid cystにおけるβ-カテニン遺伝子変異についても検討した。本研究により種々の皮膚腫瘍における癌関連遺伝子変異の情報が得られた。これは将来の新薬開発に有用な情報となろう。

研究成果の概要(英文)：We used the SNaPshot method in order to efficiently detect the mutation hot spots in the tumor related genes in various skin tumors. The SNaPshot enabled us to analyze multiple genes simultaneously. We detected KRAS mutations in 2 out of 51 non melanoma skin cancer samples. Then, we found 7 mutations in 7 out of 31 melanoma samples (31%) in the cancer-related genes analyzed (BRAF, HRAS and KRAS). Furthermore, we did a mutation analysis for beta-catenin gene CTNNB1 in a hybrid cyst in which a pilomatricoma and an epidermoid cyst coexisted, and detected a missense mutation at the phosphorylation site of beta-catenin. In this study, we obtained useful data about mutations in cancer-related genes in various skin tumors and it will be helpful for developing new drugs in the future.

研究分野：皮膚科学

キーワード：皮膚腫瘍 遺伝子変異 皮膚癌

## 1. 研究開始当初の背景

細胞外の情報を核に伝えるのがシグナル伝達システムであり、その中で MAPK シグナル伝達経路(図1)は、細胞増殖、分化等に重要な役割を演じ、その活性化は厳格に調節されている。しかし逆に、MAPK シグナル伝達経路の破綻により、細胞の癌化や転移が起こる。たとえば、転移を生じたメラノーマの約 50% が、MAPK シグナル伝達経路にある、*BRAF* (*V600E*) 変異を有するとされており、この変異により MAPK 経路が常に活性化され、メラノーマの増殖、転移が促進されている(図1)。

近年 BRAF 阻害剤 vemurafenib による治療が、進行期メラノーマの治療に効果があることが示されたが、この治療を受けた患者には、有棘細胞癌(SCC)、ケラトアクトノーマ(KA)といった表皮角化細胞由来の腫瘍が新たに生じやすい(15-30%)ことが明らかとなった(Flaherty KT *et al.* N Engl J Med 2010)。また、これら角化細胞腫瘍の 60% に *RAS* の変異が関与することが報告された(Su F *et al.* N Engl J Med 2012)。

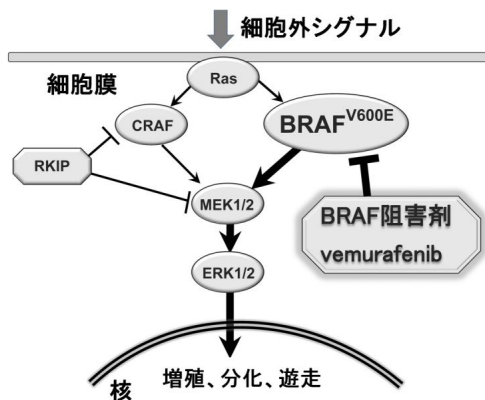


図1 MAPKシグナル伝達経路

## 2. 研究の目的

2011年、上記のように進行期メラノーマ患者に対する BRAF 阻害剤 vemurafenib が欧米で承認され、2015年からは本邦においても臨床での使用が始まった。しかし、その一方で副作用として皮膚有棘細胞癌が生じることが明らかとなり、その発生に表皮細胞における、癌遺伝子 *RAS* の変異が関与していることが報告されている。しかし、これまで皮膚腫瘍における *RAS* 変異率との詳細な解析をした報告はない。そこで、種々の皮膚腫瘍および前癌病変における癌関連遺伝子変異を検索

することと、ほかの皮膚腫瘍における遺伝子変異を検索することを目的として本研究を計画した。

## 3. 研究の方法

既に弘前大学医学部附属病院皮膚科では、過去の手術や生検で摘出した種々の皮膚腫瘍検体を所有している。その中から主に表皮角化細胞に関連した悪性腫瘍をピックアップし、それぞれの検体のホルマリン固定パラフィン包埋ブロックあるいは大きな腫瘍の場合は保存されていた凍結組織から genomic DNA を抽出した。抽出した genomic DNA を用いて直接シーケンス法あるいは multiplex PCR を併用する SNaPshot 法を用いて変異を解析した。SNaPshot 法は、複数の遺伝子変異の hot spot を効率的に検索でき感度も高いため採用した。

## 4. 研究成果

皮膚悪性腫瘍から抽出した *KRAS*, *NRAS*, *BRAF*, *PIK3CA* 遺伝子の変異を検索した。SCC 29 検体、Bowen 病 22 検体を解析した結果、SCC 1 検体と Bowen 病 1 検体から *KRAS* c.35G>A の変異を検出した(2/51, 3.9%, 図2)。今回検索しえた検体において、検出部位も検討したところ、SCC は外陰部、Bowen 病は腰部であった。しかし、変異の検出数が少ないことから、変異と腫瘍の発生部位との間に統計学的な相関を見出すことはできなかった。

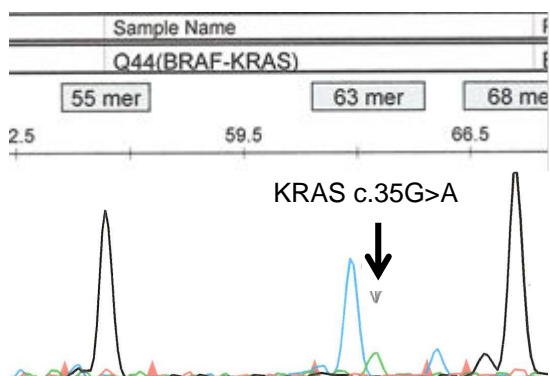


図2 SNaPshot 解析データ . SCC 検体において *KRAS* c.35G>A の変異を検出した。

次にメラノーマ 32 検体でも検討した結果、最も多かったのは、*BRAF* 遺伝子 Exon15 にある Hot spot におけるものであり、V600E が 4 検体、K601Q が 1 検体であった。ほかの遺伝

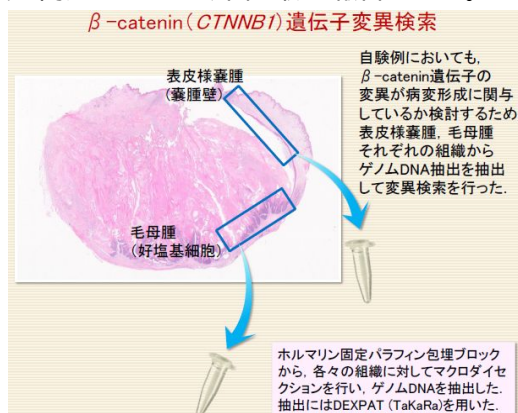
子変異は少なく、KRAS c.35G>A が 1 検体、NRAS c.182A>G が 1 検体であった。BRAF に変異が同定された 5 例はすべて非露光部位からの腫瘍発生であり(5/14, 36%)、一方、KRAS 変異は日本人に多い足底原発例(1/10, 10%)、NRAS 変異は手指の爪部原発例(1/6, 17%)で同定された(表 1)。

以上の結果より、非露光部原発のメラノーマにおいては、36%の症例で BRAF 変異が同定され、癌の発症に関与している可能性が示唆された。

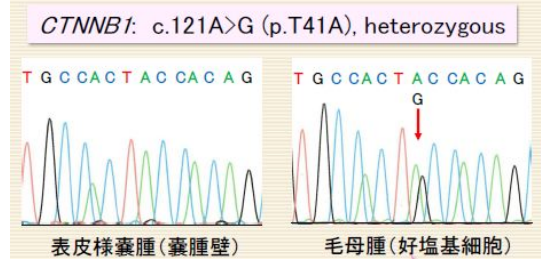
**表 1 メラノーマの遺伝子変異検索結果のまとめ**

遺伝子変異	露光部位	非露光部位	掌蹠	爪母	計
検体数	2	14	10	6	32
BRAF V600E	0	4 (29%)	0	0	4
BRAF K601Q	0	1 (7%)	0	0	1
KRAS c.35G>A	0	0	1 (10%)	0	1
NRAS c.182A>G	0	0	0	1 (17%)	1
変異検出数	0	5	1	1	7

また、別な皮膚腫瘍である毛母腫においては、 $\beta$ -カテニン(*CTNNB1*)遺伝子変異が多いとの報告がある。当科で経験した表皮嚢腫と毛母腫の follicular hybrid cyst において、毛母腫病変部から抽出した genomic DNA のみにおいて、 $\beta$ -カテニン(*CTNNB1*)のリン酸化部位に変異(c.121A>G (p.T41A), heterozygous)を同定した(図 3)。リン酸化部位に変異がある場合、細胞質内に  $\beta$ -カテニンが蓄積、核内移動後に転写活性を増加して本腫瘍形成に関与していた可能性が高い。Hybrid cyst において  $\beta$ -カテニン遺伝子の変異を同定したのは今回が初の報告である。



### 遺伝子変異検索結果



**図 3 Hybrid cyst における  $\beta$ -カテニン (*CTNNB1*)遺伝子変異の検出。**

以上より、皮膚悪性腫瘍および一部の良性脾腫腫瘍における癌関連遺伝子の変異に関するデータが得られた。近年発展がめざましい変異遺伝子をターゲットとした分子標的治療開発のための有用な情報となることが期待される。

### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 3 件)

Rokunohe D, Nakano H, Akasaka E, Toyomaki Y, Sawamura D. Rubinstein-Taybi syndrome with multiple pilomatricomas: The first case diagnosed by CREBBP mutation analysis. J Dermatol Sci. 査読有, 2016 (in press).

Kaneko T, Korekawa A, Akasaka E, Rokunohe D, Nakano H, Sawamura D. Primary amelanotic rhabdoid melanoma: a case report with review of the literature. Case Rep Dermatol, 査読有, 2015;7:292-297. doi: 10.1159/000441347.

Akasaka E, Okawa Y, Nakano H, Takiyoshi N, Rokunohe D, Toyomaki Y, Sawamura D, Sueki H: Two Japanese familial cases of punctate palmoplantar keratoderma caused by a novel AAGAB mutation, c.191\_194delCAAA. J Dermatol Sci, 査読有, 2015;78(2):156-158. doi:10.1016/j.jdermsci.2015.02.004.

[学会発表](計 3 件)

六戸大樹、金子高英、牧田瑛子、櫻庭裕佑、萩原千尋、中野 創、澤村大輔: Symplastic glomus tumor の 1 例. 日本皮膚科学会岩手地方会第 373 回例会、

2016.2.6-7. マリオス (岩手県・盛岡市)

六戸大樹、金子高英、松井彰伸、牧田瑛子、黒川景子、金城千尋、是川あゆ美、六戸亜希子、中野創、澤村大輔：HPV16を検出した外陰部 Bowen 癌の 1 例～当科で経験した外陰部原発有棘細胞癌および Bowen 病の HPV 検索結果を含めて～ . 第 67 回日本皮膚科学会西部支部学術大会、2015.10.17-18. 長崎ブリックホール/長崎新聞文化ホール (長崎県・長崎市)

六戸大樹：当科で治療した皮膚腫瘍症例について 第 121 回弘前皮膚科専門医会、2015.9.17. ホテルナクアシティ弘前 (青森県・弘前市)

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

六戸 大樹 (ROKUNOHE, Daiki)  
弘前大学・大学院医学研究科・助教  
研究者番号：5 0 4 3 6 0 3 6