

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 30 日現在

機関番号：31201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860891

研究課題名(和文) 正常メラノサイトにおけるKEAP1突然変異の悪性黒色腫発生リスク増加に関する研究

研究課題名(英文) Significance of KEAP1 mutation in melanoma cells.

研究代表者

三浦 慎平 (Miura, Shinpei)

岩手医科大学・医学部・助教

研究者番号：30713226

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：KEAP1/NRF2系の異常が悪性黒色腫のドライバー変異となるか検証した。次世代シクエンサーを用いた網羅的解析では、8%の細胞株にKEAP1/NRF2の異常を認めた。これらの遺伝子異常は原発巣でも10%程度に見つかり、一定の頻度で悪性黒色腫に於いて生じていることがわかった。しかし、この遺伝子異常を導入しただけでは、ROSには抵抗性になりシスプラチンやダカルバジンの様な化学療法剤に抵抗性にはなるものの、正常細胞の造腫瘍性の獲得には繋がらなかった。KEAP1/NRF2の異常は、悪性黒色腫のドライバー変異とはならないことが判明した。

研究成果の概要(英文)：We identified KEAP1 inactivation mutation in both malignant melanoma cell lines and primary tumors. Mutations of the KEAP1 genes related to drug resistance (CDDP and dacarbazine). The ratio of reduced-to-oxidized glutathione (GSH/GSSG) was decreased by treatment with CDDP or DTIC in siNRF2-transfected cells. However, the mutation did not confer the tumorigenicity for xenografts. These results suggest that EAP/NRF2 inactivation could not be a driver mutation in melanoma cells.

研究分野：皮膚科学

キーワード：KEAP1 NRF2 CDDP ドライバー変異

### 1. 研究開始当初の背景

近年各種悪性腫瘍に於いて、腫瘍細胞に選択的増殖優位性あるいは細胞死回避能を付与する遺伝子変異が続々と同定され、ドライバー変異と呼ばれている。個々のがん細胞の生存は、このドライバー変異に強く依存するため、特定の変異や融合遺伝子を標的として開発された分子標的治療薬は、特異度が高く、強力な抗腫瘍効果と副作用の軽減が期待される。Hodis ら<sup>3)</sup>の次世代シーケンサーを用いた121個の黒色腫培養細胞株に於けるホールゲノム解析では、80%近い細胞株で活性型 BRAF/NRAS の変異が見つかり、この経路が黒色腫の主要なドライバー変異である事が確認された。さらに、BRAF 変移を標的とした vemurafenib や dabrafenib、MEK 阻害剤である trametinib はダカルバジンをベースとした標準化学療法の奏功率を凌駕し、既に臨床応用されている。一方で、日本人に多い末端黒子型黒色腫 (acral lentiginous melanoma; ALM) では、BRAF/NRAS の変異は希であり、欧米人に多い表在拡大型 (superficial spreading melanoma; SSM) とは異なる遺伝子異常を持つ事が報告されている。そこで、本邦における悪性黒色腫のドライバー変異の探索が必要と考え、日本人由来の悪性黒色腫細胞株 11 株で、次世代シーケンサーを用いたエクソーム解析を行った。

その結果、欧米で多い SSM 型の黒色腫では、BRAF/NRAS 変異によって誘導された MITF-PGC1 系の抑制は、好気性から嫌気性解糖系へのエネルギー代謝の変換現象を生じる。結果として黒色腫細胞は、低酸素やミトコンドリアで発生する ROS の細胞傷害活性に抵抗性を獲得し、腫瘍細胞の生存を勝ち取っている。

一方、「日本人に多い ALM 型の黒色腫では、BRAF/NRAS 変異依存性のエネルギー代謝経路の変換現象は、活性型 KEAP1/NRF2 変異

によって代償されている」という作業仮説を立てるに至った。

### 2. 研究の目的

本邦で発生頻度の高い肢端黒子型黒色腫 (acral lentiginous melanoma; ALM) に於いて、高頻度に検出される KEAP1-NRF2 系の活性型遺伝子変異が、悪性黒色腫の発生の素因 (predisposition) になり得るか、細胞生物学的に検証する。以下の2つのアプローチにより上記作業仮説の検証を試みる。正常メラノサイトへの活性型 KEAP1/NRF2 変異導入による腫瘍形成能の検証。悪性黒色腫で高頻度に生じている BRAF/NRAS 変異誘導型の酸化的リン酸化抑制機構が、活性型 KEAP1/NRF2 変異によって代償可能か検証する。そのために、以下の2つのアプローチにより作業仮説の証明を試みる。

### 3. 研究の方法

ヒト正常メラノサイト (NHEM-M, NHEM-D) にレンチウイルスベクター (pLVSIIN; Lenti-X™ HTX Packaging System TAKARA) を用いて遺伝子導入を行う。導入する遺伝子は、Haq ら (Cancer Cell. 2013 May 18;23(3):302-15.) の方法に準じて行う。BRAF 変異型と KEAP1/NRF2 変異型の表現型の比較のために、正常メラノサイトに hTERT/CDK4(R24C)/TP53(DD) の遺伝子導入を行った上で、各々 BRAFV600E, KEAP143719delC, NRF2D29G の変異体を各々導入した。

変異体細胞での細胞生物学的解には hTERT/CDK4(R24C)/TP53(DD) 株および、変異体株の細胞生物学的特性の比較を行うために、MITF/PGC1 とその標的分子 (TYR, DCT など)、KEAP1/NRF2、抗酸関連分子 (NQO1 など) western blot, real-time PCR, 必要に応じて細胞内局在の確認は共焦点レーザー顕微鏡で行った。グルコース代謝の解析に関しては細胞内 ATP 量, oxygen consumption rate

(OCR), lactate glucose 量(以上の解析 kit, BioVision Research Products)を計測した。ROS の 定 量 化 に は DCF-DA kit(Invitrogen), GSH : glutathione colorimetric detection kit (BioVision Research Products)をもちいた。低酸素, ROS ストレス下での上記関連分子の動態解析も必要に応じて行った。

BRAF/MEK 阻害薬 (PLX4032/PD0325901) 処理下での上記分子の動態解析も行った。細胞増殖は、増殖(MTT assay)および apoptotic assay (Annexin V/flow cytometry)および Soft agar コロニーフォーメーションアッセイをした・in vivo tumorigenicity に関してはヌードマウス皮下 xenograft, あるいは尾静脈静注による腫瘍形成能の比較を行った。

以上を以て, KEAP1/NRF2 変異導入による腫瘍形成能の検証, ならびに BRAFV600E 変異体との違いを, エネルギー代謝, 酸化還元能, 細胞増殖/アポトーシスの面から比較検討した。

さらに、悪性黒色腫原発巣で NRF2 の変異解析(PCR-direct sequence)と免疫染色を行う。これらの腫瘍での BRAF/NRAS status は既に確認済みである。各々の治療反応性, 生命予後はとの比較も行う。

#### 4. 研究成果

BRAF/NRAS の変異のない細胞株 2 株(18%)において, KEAP1 遺伝子の frame shift 変異を見出した。

NRF2 遺伝子の活性型変異を 1 株(9%)で見出した (KEAP1/NRF2 変異, 3/11=27%)。

ALM 原発巣 25 例中 3 例 (12%) で KEAP1 の変異が生じていた。上記の細胞株/原発巣は, 全て BRAF/NRAS 変異陰性であり, NRF2 の活性化が生じていた (図 1)。

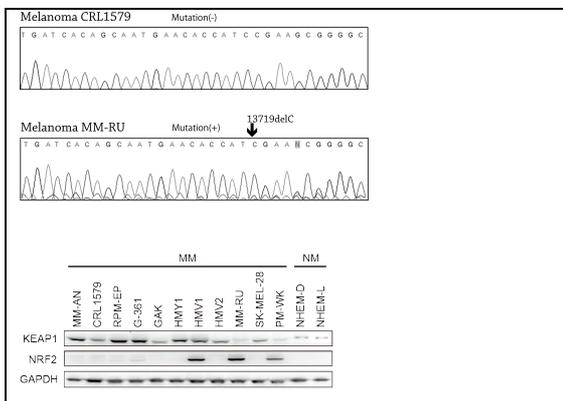


図 1

In vivo においても KEAP1 の変異を認められた (図 2)。

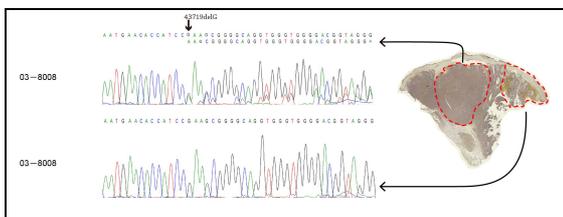
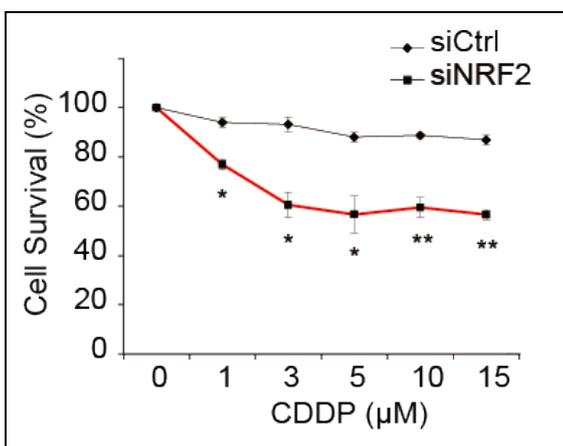


図 2

これらの変異株は、シスプラチンやダカルバジンなどの ROS 産生性の抗がん薬に対して強い耐性を示し、spheroid 様の増殖を示すものの、ヌードマウス皮下では造腫瘍性を持たなかった。免疫不全マウスとして NOD-SCID マウス等も用いたが造腫瘍性は確認できなかった (図 3)。



結論的に KEAP1/NRF2 変異は、悪性黒色腫のドライバー変異とはならないことが明らかとなった。

本研究の作業仮説は証明出来なかったが、

現在、KEAP1/NRF2 系の下流にある NQO1 の発現を modulate するバイオアクティベーターによる、抗がん薬増強の研究を展開する事に繋がった。

-Lapachone ( -lap) は、ノウゼンカズラ科植物パウダルコの木 (*Tabebuia avellanedae*) 由来の成分を有しており、樹皮から抽出される。南米先住民たちの間で数千年もの間、種々の疾患に効能がある伝承薬用植物として使用されている。

-lap は通常キノンの状態で存在しているが、NAD (P) H 1: Quinone Oxidoreductase-1 (NQO1) を仲介することによってセミキノン (フリーラジカル) に変換される。セミキノンは不安定であり、Reactive Oxygen Species (ROS) を産生することで癌細胞を死に至らせる。また、-lap のキノンとヒドロキノン間の無益なサイクルによって NQO1 と NADH の深刻な枯渇をもたらしてアポトーシスに至らす。Carnosic Acid (CA) は、ローズマリーから見つかったカテコール型求電子化合物である CA は、KEAP1 シス테인残基を S-アルキル化して KEAP1 / NRF2 経路を活性化する。KEAP1 は NRF2 を抑制する働きを担う。

本研究では副次的に、CA により NRF2 が活性化され、結果として NQO1 の発現が増強されることでキノンがセミキノンへ誘導され、細胞毒性が上がることを明らかにした。

## 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 2件)

1. Miura S, Maesawa C, Shibazaki M, Yasuhira S, Kasai S, Tsunoda K, Maeda F, Takahashi K, Akasaka T, Masuda T. Immunohistochemistry for histone h3 lysine 9 methyltransferase and demethylase proteins in human

melanomas. Am J Dermatopathol. 2014 Mar;36(3):211-6. doi: 10.1097/DAD.0b013e3182964e02.(査読有り)

2. Miura S, Shibazaki M, Kasai S, Yasuhira S, Watanabe A, Inoue T, Kageshita Y, Tsunoda K, Takahashi K, Akasaka T, Masuda T, Maesawa C. A somatic mutation of the KEAP1 gene in malignant melanoma is involved in aberrant NRF2 activation and an increase in intrinsic drug resistance. J Invest Dermatol. 2014 Feb;134(2):553-6. doi: 10.1038/jid.2013.343. Epub 2013 Aug 12. (査読有り)

[学会発表](計 0件)

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

[その他]  
ホームページ等  
該当なし

6. 研究組織  
(1)研究代表者  
三浦 慎平 (Miura Shinpei)  
岩手医科大学・医学部・助教  
研究者番号: 30713226

(2)研究分担者 ( )

研究者番号：

(3)連携研究者 ( )

研究者番号：

(4)研究協力者 ( )