

論文内容の要旨

Mutations of the *KEAP1* and *NRF2* genes in human melanomas
(ヒト悪性黒色腫における *KEAP1* 及び *NRF2* 遺伝子の変異)

(影下雄一, 赤坂俊英, 前沢千早)

(Oncology Letters (投稿審査中))

I. 研究目的

皮膚悪性黒色腫は、予後不良の皮膚悪性腫瘍であり、その発生には複数の要因が関与している。なかでも紫外線及び炎症による慢性的なストレス暴露が知られおり、reactive oxygen species (ROS) 産生に伴う酸化ストレスは、腫瘍発生の大きな要因とされている。*Kelch-like ECH-associated protein 1 (KEAP1)-Nuclear factor E2-related factor 2 (NRF2)* 経路は、ROS や親電子性物質に対する防御機構の主要な経路である。

本研究では、ヒト悪性黒色腫において *KEAP1*, *NRF2* 遺伝子の変異を解析し、NRF2 蛋白の活性化によって誘導される NRF2 蛋白の核内集積像、および臨床病理学的事項との関連について検討した。

II. 研究対象ならび方法

岩手医科大学皮膚科学講座で経験した 28 症例(1998-2012 年)の悪性黒色腫患者について、NRF2 蛋白を Ventana 社 (Tuscon, AZ, USA) 製の自動免疫染色装置を使用し、labeled streptavidin-biotin 法にて染色した。NRF2 蛋白活性化は、核集積像の有無で判定した。QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen Hilden, Germany) を用い、パラフィン切片 (10 μ m 厚, 1~7 枚) から腫瘍部の DNA を抽出した。*KEAP1* (exon 2-6), *NRF2* (exon 1-5), ならびに NRF2 蛋白の活性化を誘導する *BRAF* (exon 15) 遺伝子の変異を PCR-direct sequence にて解析した。NRF2 蛋白の核内集積と *KEAP1*, *NRF2*, *BRAF* の変異ならびに臨床病理学的事項の相関解析には、Fisher's exact test を用い、有意水準を $p < 0.05$ とした。

III. 研究結果

1. 遺伝子変異の頻度は *KEAP1*, *NRF2*, *BRAF* で、各々 10%(3/28), 4%(1/28), 4%(1/28) であった。
2. *KEAP1* 遺伝子の変異は、*NRF2* 活性化を促進する 1518delC 欠失変異と、その近位に認められた g.1509G>T (M503I) のミスセンス変異であった。
3. *NRF2* 遺伝子の変異は、g.1770G>A (V177I) のミスセンス変異であり、KEAP1 蛋白質との結合ドメイン外に認められた。
4. NRF2 蛋白の核内集積像は 36%(10/28) に陽性で、*KEAP1*, *NRF2*, *BRAF* 変異との関連は認められなかった。
5. NRF2 蛋白の核内集積と臨床病理学的事項との間に有意な相関はなかった。

IV. 結 語

NRF2 蛋白の核内集積像は比較的高頻度 21%(6/28)であったにも関わらず、*KEAP1*、*NRF2* 遺伝子変異は低頻度であった。このことは悪性黒色腫の抗酸化ストレス作用における *NRF2* の活性化が、同遺伝子及び *KEAP1* 遺伝子変異以外の分子によって誘導される可能性を示すものであった。

V. 学位申請後経過

- ※1 最終審査終了後、Oncology Letters 10 卷 3 号に 2015 年 7 月掲載予定となった。
- ※2 査読による内容の変更は不要であった。

論文審査の結果の要旨

論文審査担当者

主査 教授 古山 和道 (生化学講座：分子医化学分野)

副査 教授 増田 友之 (病理学講座：機能病態学分野)

副査 教授 佐藤 孝 (病理学講座：機能病態学分野)

皮膚悪性黒色腫は予後不良の皮膚悪性腫瘍であり、細胞内の活性酸素種産生に伴う酸化ストレスが主要な発生病因とされている。本研究論文では、酸化ストレスに対する細胞内の防御機構の一つである *Kelch-like ECH-associated protein 1 (KEAP1)-Nuclear factor E2-related factor 2 (NRF2)* 経路に着目し、悪性黒色腫患者においてこれらの経路を構成する分子の遺伝子変異の有無について検討し、さらに腫瘍細胞における *NRF2* の活性化の有無を免疫組織染色により核内への集積を指標として検出した。その結果、28 例の悪性黒色腫の症例中 *KEAP1* の遺伝子変異を 3 例 (10%)、*NRF2* の変異を 1 例 (4%)、*BRAF* 遺伝子の変異を 1 例 (4%) に同定した。また、*NRF2* タンパク質の核内集積は 10 例 (36%) で認められた。しかしながら、各遺伝子の変異と *NRF2* の核内集積、そして臨床病理学的事項の間には有意な関連は認められなかった。これらの結果から、悪性黒色腫において *NRF2* の活性化は比較的高頻度に認められるものの、その活性化の機序は *KEAP1* や *NRF2* の遺伝子変異とは異なる要因によるものと推察された。

本論文は、悪性黒色腫における *NRF2* 活性化の頻度を初めて明らかにしたのみならず、その活性化機序に関する今後の研究の方向性について示唆に富む内容を含んでおり、学位に値する論文である。

試験・試問の結果の要旨

悪性黒色腫の診断・治療についての知識及び実験手法などについて試問を行ない、いずれも適切な解答を得た。学位に値する学識を有していると考えられる。

参考論文

- 1) A somatic mutation of the *KEAP1* gene in malignant melanoma is involved in aberrant *NRF2* activation and an increase in intrinsic drug resistance (悪性黒色腫における *KEAP1* 遺伝子の体細胞変異は *NRF2* の異常な活性化及び内因性薬剤耐性の増加に関与する) (三浦慎平 他 11 名と共著) *Journal of Investigative Dermatology*, 134 巻, 2 号 (2014) : p553-556.
- 2) 大腸癌皮膚転移の 1 例 (森志朋 他 4 名と共著) *臨床皮膚科*, 68 巻, 7 号, (2014) : p540-544.
- 3) 抗リン脂質抗体症候群を併発した男性全身性エリテマトーデスの 1 例 (森志朋 他 5 名と共著) *臨床皮膚科*, 68 巻, 12 号 (2014) : p951-956.