

総説（教授就任記念講演）

皮膚発癌機構と分子標的治療薬

久保 宜明

徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部皮膚科学分野
(平成26年3月6日受付) (平成26年3月11日受理)

はじめに

近年の高齢化に伴って、皮膚癌は世界的に増加傾向にある。表皮角化細胞由来の有棘細胞癌 (squamous cell carcinoma, 以下 SCC と略す) とメラノサイト由来の悪性黒色腫 (メラノーマ) は代表的な皮膚癌であり、早期に発見し外科的に切除すれば予後良好だが、遠隔転移をきたした進行期 SCC・メラノーマは、現在の化学療法や放射線療法などに抵抗性で予後不良である。これまでの研究成果をもとに、SCC・メラノーマにおける発癌機構の最新知見、分子標的治療薬の現状、今後の新規分子標的治療薬の可能性について述べる。

皮膚発癌機構の概要

SCC・メラノーマは、正常表皮角化細胞・メラノサイトに遺伝子変異やアレルのコピー数の増減などのジェネティックな異常、DNAメチル化やクロマチン構造の変化などのエピジェネティックな異常が蓄積し発生する。またそれらの過程には周囲の間質細胞との相互作用も関与する。これらの中で遺伝子異常が代表的な異常と考えられている。

癌化に係る遺伝子は、細胞増殖亢進やアポトーシス抑制など腫瘍促進作用をもたらす癌遺伝子と、それらの作用を抑制する癌抑制遺伝子の2つに大別される。また、遺伝子異常は、アレルのコピー数の増減を示す比較的大きな異常と遺伝子変異を示す小さな異常の2つに大別される。SCC・メラノーマの遺伝子異常は、癌遺伝子領域のアレルのコピー数の増加、癌遺伝子の活性化変異、癌抑制遺伝子領域のアレルのコピー数の減少、癌抑制遺伝子の不活性化変異が蓄積したものと考えることができる。

遺伝子異常が正常表皮角化細胞・メラノサイトに蓄積し、他臓器の癌と同様に図1に示すような evolution という過程を経て、SCC・メラノーマが発生・進行すると考えられている¹⁾。すなわち、おそらく自己複製可能な正常細胞 (幹細胞など) を起源として、ある有意な遺伝子異常が入るとそのクローンが増え、そのうちの1個にまた別の有意な遺伝子異常が入るとさらにそのクローンが増え、それを繰り返していわゆる clonal expansion をおこし SCC・メラノーマが発生・進行すると推測される¹⁾。

最近の網羅的解析では、この癌細胞の evolution という考え方を裏付けるように、1つの SCC・メラノーマの全 DNA において、ある特定の遺伝子異常を持つ DNA の占める割合は、それぞれの遺伝子異常によってさまざまであることが示されている²⁻⁴⁾。1つの癌において、個々の癌細胞が持つ遺伝子異常は決して均一ではなく、いわゆる intratumor heterogeneity があり、1つの癌はさまざまな遺伝子異常を持った癌細胞の集合体であると考えられる。intratumor heterogeneity を説明するモデ

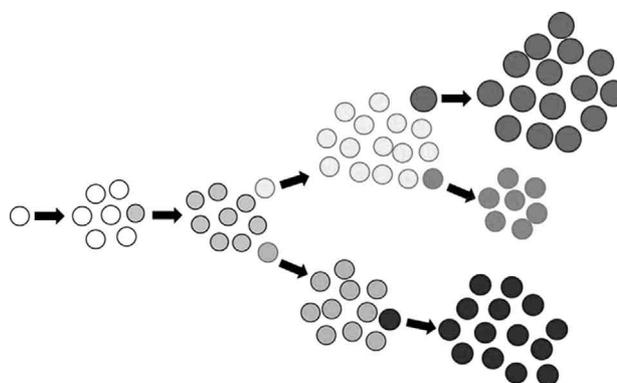


図1：癌細胞の evolution

ルとして、1つの癌を1つの木に見立てた Trunk and branch model (図2) が提唱されている⁵⁾。太い幹から次々と枝分かれする様は、driver 変異 (細胞増殖亢進やアポトーシス抑制などの腫瘍促進作用ももたらす癌化に有意な変異) の蓄積を象徴している。太い幹を形成する変異は、治療上最重要な標的と考えられ、actionable 変異と名付けられている⁵⁾。

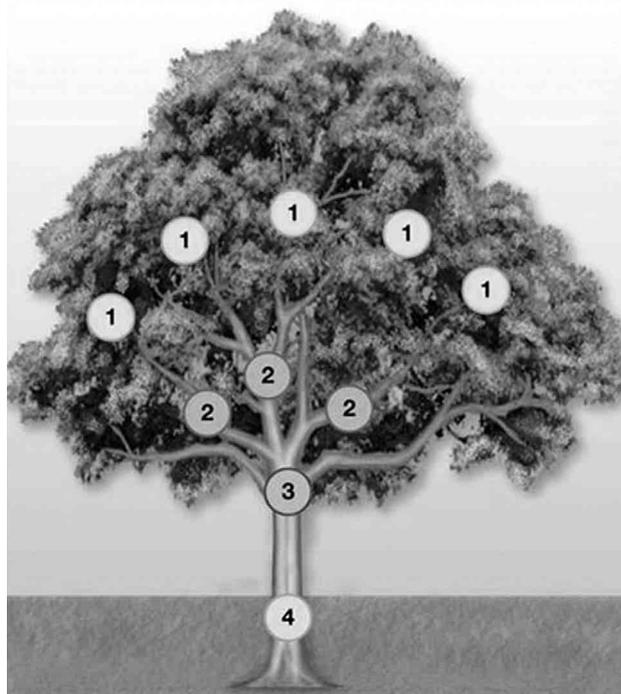


図2 : Trunk and branch model

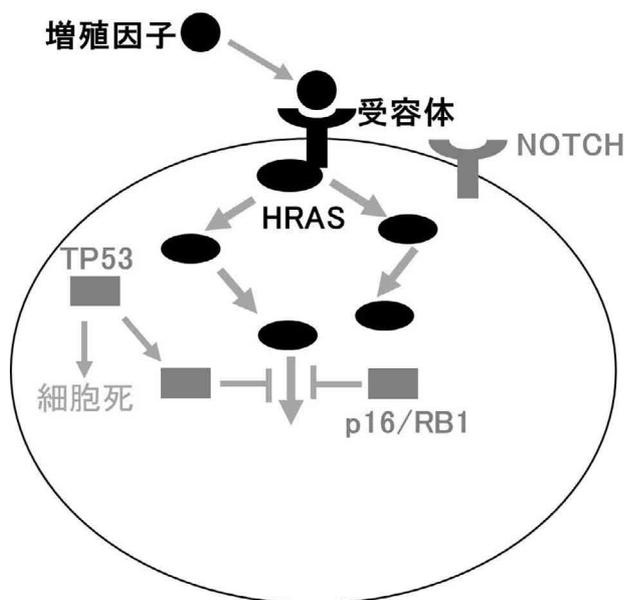
有棘細胞癌 (SCC)

SCC は、顔面などの日光暴露部や瘢痕などの前駆病変に好発し、紅色結節を呈することが多い⁶⁾。米国 UCSF のグループは2011年、8例の SCC と各人の正常組織において次世代シーケンサーを用いてゲノム DNA を網羅的に解析した²⁾。驚くことにエクソン部には、1つの SCC あたり約1,300個の1塩基変異が見つかった。見つかった変異の85%以上は、ピリミジン塩基が並ぶ部位のシトシン (C) からチミン (T) への変異であり、日光紫外線暴露による変異と考えられ、従来から知られている露光部に好発する SCC における日光紫外線の関与を裏付けている。彼らが調べたエクソン相当部は約40メガ (10⁶) 塩基なので、エクソン部約30,000塩基に1個の1塩基変異が存在していることになる。また、全ゲノムは約3ギガ (10⁹) 塩基なので、全ゲノムにわたりエクソンと同じ頻度で変異があると仮定すると、1つの SCC の全ゲノム内には約10万個の1塩基変異が存在することになる。メラノーマでも、ほぼ同じ数の変異が全ゲノム内に存在することが報告されており^{3,4)}、他臓器の悪性腫瘍と比べて、皮膚癌には変異数が多いことがわかってきた。おそらく大半の変異は passenger 変異 (癌化に明らかな意味の無い変異) であり、driver 変異の数は多くはないと推測される。現在 SCC における driver 遺伝子として、網羅的解析により再確認された TP53, CDKN2A, HRAS と新たに見出された NOTCH (表1)²⁾ などが挙げられる (図3)。

表1 : 主な遺伝子異常 (文献2の Table 1 を簡略化し、和訳)

性	年齢	部位	免疫状態	TP53	CDKN2A	NOTCH1	NOTCH2	NOTCH3	NOTCH4
1	男	76	頭	+	R248W	P135L	Q610X	W330X, R1838X	
2	男	87	頭	+	E285K		P1771S, R1595Q	P226S	
3	男	84	手背	+	E224 (Splice site)		C478F		R1333C
4	女	61	頬	+	Y220N				W309X
5	男	83	頬	+	H179Y, P278S		W1769X	Q1634X, T2278I	S1602F
6	男	85	こめかみ	+	P142N, H179Y	P133L	(Splice site)	S1836F, E297K	
7	男	58	耳介	-	E286K T329I, E349X		Q1924X	Q1616X, G488D	
8	男	63	下口唇	+					

太文字の変異は正常アレルの欠失を示す



癌遺伝子、癌抑制遺伝子

図3：SCCの主なdriver遺伝子

多くの癌腫と同様に、半数、もしくはそれ以上の SCC において TP53 変異がみられ、TP53 の局在する 17p には比較的高頻度にアレルの欠失がみられる⁶⁾。TP53 はゲノムの守護神と言われ⁷⁾、TP53 の機能を消失した細胞は、細胞増殖停止やアポトーシスに抵抗性となり、細胞増殖能が亢進するのに加えて、他の遺伝子異常が蓄積しやすくなると考えられる。網羅的解析 (表 1) でも SCC8 例中 7 例において TP53 が不活性化しており²⁾、TP53 は最も高頻度に異常がみられる driver 遺伝子と言える。

NOTCH の不活性化異常は TP53 と同様に高頻度で見られている (表 1)²⁾。NOTCH 1 は SCC において比較的高頻度にアレルの欠失がみられる 9q に局在し、表 1 の 8 例にさらに 3 例を加えた SCC11 例の解析では、SCC 11 例中 9 例に NOTCH1 の変異があり、そのうち 3 例には正常アレルの欠失、1 例には両アレルの変異がみられている⁸⁾。また、NOTCH 2, 3, 4 にも少なからず変異が同定されている⁸⁾。表皮角化細胞において、NOTCH は増殖抑制や分化誘導などの癌抑制機能があると報告されており⁹⁾、NOTCH は新規の driver 遺伝子と推測される。

CDKN2A は p14^{ARF} と p16^{INK4a} をコードし¹⁰⁾、主に共通する領域に不活性化異常がみられる。p14^{ARF} は HDM2 による TP53 の分解を阻害することから、p14^{ARF} の機能異常は、TP53 の分解を促進させ、TP53 の機能異常をもたらす。また、p16^{INK4a} は cyclin dependent kinase (CDK)

4, 6 に結合し、RB1 のリン酸化を防ぐことによって細胞周期を停止させる。p16^{INK4a} の機能異常により細胞増殖が亢進する。SCC において CDKN2A 変異率は比較的 low⁶⁾、網羅的解析 (表 1) でも SCC8 例中 2 例に CDKN2A の不活性化異常がみられる²⁾。

RAS は癌遺伝子の代表格であり、HRAS, NRAS, KRAS の 3 種がある。RAS は受容体型チロシンキナーゼにより活性化される蛋白で、RAF-MEK-ERK のいわゆる MAPK 経路や PI3K 経路などを活性化させる¹¹⁾。RAS の活性化によって、細胞増殖促進作用、アポトーシス抑制作用、核酸・蛋白合成など多くの腫瘍促進作用をもたらす。SCC における RAS の活性化の頻度は比較的 low⁶⁾、網羅的解析 (表 1) でも SCC8 例中 1 例にみられている²⁾。

レトロウイルスベクターを用いて driver 候補遺伝子を連続的に導入したヒト表皮角化細胞を使ってヒト皮膚を作製し、免疫不全マウス (SCID) の背部に移植する実験系により、HRAS^{G12V}-CDK4 の 2 つの遺伝子の組み合わせで組織学的に invasive SCC に合致するヒト SCC モデルを作製した¹²⁾。RAS の活性化により多くの腫瘍促進効果をもたらされ、CDK4 の導入により細胞増殖が促進されたと考えた (図 4)。実際に HRAS の活性化変異と CDKN2A の不活性化変異を持つ SCC も経験している (図 5)。また HRAS^{G12V}-CDK4 の組み合わせで、皮膚の SCC のみならず、咽・喉頭、食道、子宮頸部のヒト SCC モデルが作製され¹³⁾、HRAS の活性化と CDKN2A の不活性化は、SCC 一般において非常に重要な driver 遺伝子異常であることが判明した。

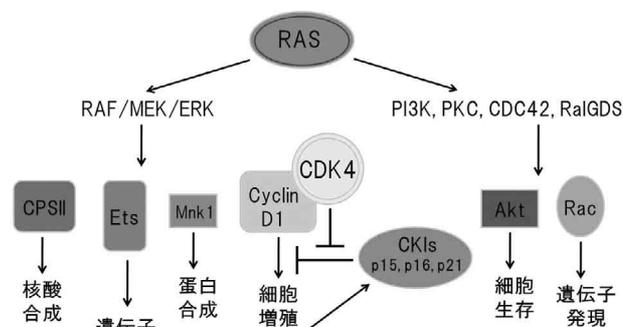


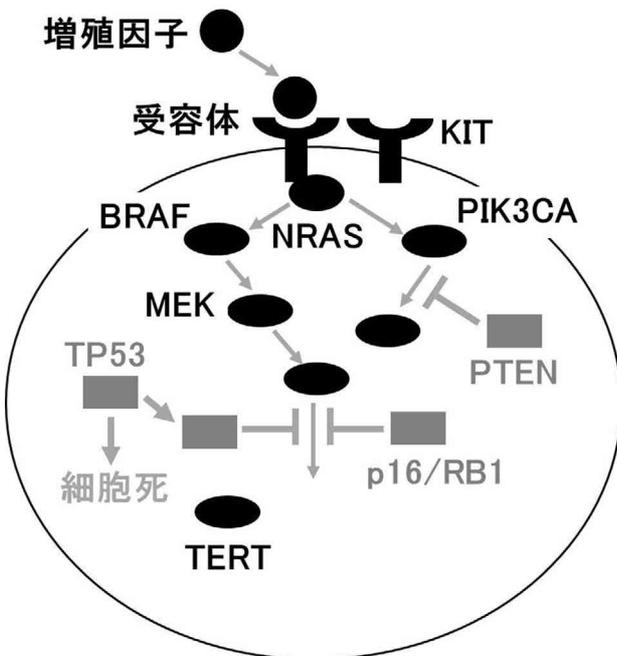
図4：HRAS^{G12V}-CDK4によるSCC発癌機構



図5：頭頂部の SCC

悪性黒色腫（メラノーマ）

メラノーマは最も予後の悪い皮膚癌であり、日本人ではメラニンを豊富に有し黒色班・結節を呈することが多い。SCCよりも病態の解析が進んでおり、図6のようなdriver 遺伝子が知られている¹⁴⁾。癌遺伝子として NRAS, BRAF, KIT など、癌抑制遺伝子として CDKN2A, PTEN, TP53などが挙げられる。CDKN2A は家族性メラノーマの原因遺伝子の1つであり、家系内に胚細胞性不活性化変



癌遺伝子、癌抑制遺伝子

図6：メラノーマの主な driver 遺伝子

異がみられる。NRAS や BRAF の活性化により MAPK 経路が活性化、PTEN の不活性化により PI3K 経路が活性化される。

皮膚粘膜のメラノーマは発症の分子機構の違いにより2006年、顔面など慢性的日光暴露部発症群 (chronic sun damaged : CSD), 体幹など慢性的日光暴露のない部位発症群 (Non-CSD), 手指足趾や足底などの末端部発症群 (acral), 粘膜発症群 (mucosal) の4群に分類された (図7)¹⁵⁾。全体として BRAF の活性化変異が最も高頻度で認められる。Non-CSD では、BRAF と NRAS の活性化変異が多いが、その他の群では KIT の活性化変異が比較的多い。日本人などアジアでは acral が最も多く、Non-CSD や CSD の多い欧米の白人とは好発する群が異なっている。

次世代シーケンサーを用いた網羅的なゲノム DNA 解析は、今までに十数報告されており、いままでの知見の確認に加えて、新規の driver 遺伝子が発掘されている^{3,4,16)}。あるグループは新規 driver 遺伝子として RAC1 を挙げ、メラノーマの約5%で RAC1の活性化変異がみられると報告している¹⁷⁾。RAC1の活性化変異により MAPK 経路が活性化する。さらに個々の変異頻度は少ないが、RAC1以外にも多くの MAPK 経路に關与する分子の活性化変異が見出されており、メラノーマにおいて MAPK 経路の活性化は一般的に生じていると考えられる。

SCC と同様、正常ヒトメラノサイトに driver 候補遺伝子を導入する方法でヒトメラノーマモデルが作製されてい

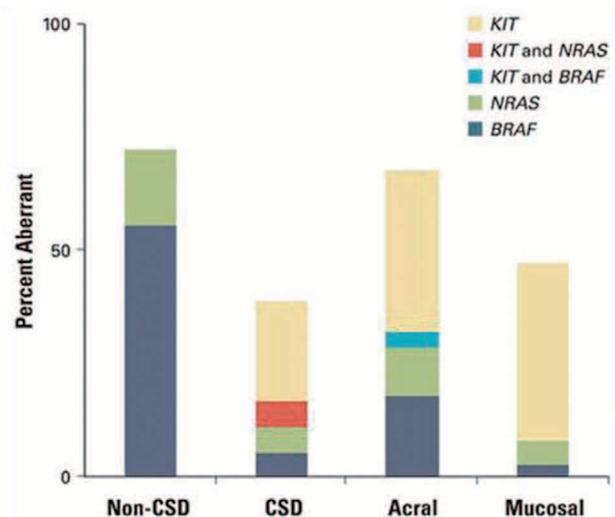


図7：メラノーマ4群における遺伝子変異率

る¹⁸⁾。遺伝子を導入したメラノサイトを正常ヒト表皮角化細胞と混ぜてヒト皮膚を作製し、免疫不全マウス (SCID) の背部に移植する実験系で、NRAS^{G12V}-CDK4^{R24C}-TERT, NRAS^{G12V}-TP53^{R248W}-TERT, PI3Kp110 α -CDK4^{R24C}-TP53^{R248W}-TERT の3つまたは4つの遺伝子の3パターンの組み合わせによりヒトメラノーマモデルが作製された¹⁸⁾。ヒト SCC モデルに類似しているが、ヒトメラノーマモデルにはテロメアーゼの逆転写酵素の TERT が必須であることが異なっていた。

最近、遺伝子導入によるヒトメラノーマモデルに合致する知見が報告された^{19,20)}。70例中50例 (71%) のメラノーマにおいて、TERT のプロモーター領域に変異が見つかり、その変異により TERT の転写活性が2~4倍に増強していた¹⁹⁾。TERT は新規の driver 遺伝子であると考えられる。

欧米では、抗 CTLA-4抗体や抗 PD-1抗体などを用いた免疫療法に加えて、driver 変異を標的とした分子標的治療薬の開発が盛んに行われている²¹⁾。有効性が示され、すでに承認されている薬剤もある。KIT 阻害剤は KIT の活性化変異を有するメラノーマの一部に有効性が示されている²²⁾。ベムラフェニブなどの BRAF 阻害薬は、BRAF の活性化変異を有するメラノーマの約半数に有効であることが示され²³⁾、本邦においても近く承認される予定である。しかし、欧米では BRAF 阻害薬を使用中に SCC などの二次発癌がみられており注意を要する²⁴⁾。BRAF の下流の MEK の阻害薬は、BRAF 阻害薬に比べ薬効が劣るものの二次発癌がみられないことから、BRAF 阻害薬と MEK 阻害薬の併用が注目されている²³⁾。また、NRAS の活性化変異を有するメラノーマには、MEK 阻害薬と CDK4阻害薬の併用が有効であることが報告されており²⁵⁾、ヒト SCC モデルから、HRAS の活性化変異を有する SCC にも同阻害薬の併用が有効だろうと推測される。

おわりに

皮膚発癌機構の解明は、進行期皮膚癌に対する新規分子標的治療薬の開発に直結することから、皮膚発癌機構の全容が今後さらに明らかになることが期待される。

文 献

1) Greaves, M., Maley, C. C.: Clonal evolution in cancer.

Nature, 481 : 306-313, 2012

- 2) Durinck, S., Ho, C., Wang, N. J., Liao, W., *et al.*: Temporal dissection of tumorigenesis in primary cancers. Cancer Discov., 1 : 137-143, 2011
- 3) Krauthammer, M., Kong, Y., Ha, B. H., Evans, P., *et al.*: Exome sequencing identifies recurrent somatic RAC1 mutations in melanoma. Nat. Genet., 44 : 1006-1014, 2012
- 4) Hodis, E., Watson, I. R., Kryukov, G. V., Arold, S. T., *et al.*: A landscape of driver mutations in melanoma. Cell, 150 : 251-263, 2012
- 5) Swanton, C.: Intratumor heterogeneity: evolution through space and time. Cancer Res., 72 : 4875-4882, 2012
- 6) Kubo, Y., Muraio, K., Matsumoto, K., Arase, S.: Molecular carcinogenesis of squamous cell carcinomas of the skin. J. Med. Invest., 49 : 111-117, 2002
- 7) Efeyan, A., Serrano, M.: p53: guardian of the genome and policeman of the oncogenes. Cell Cycle, 6 : 1006-1010, 2007
- 8) Wang, N. J., Sanborn, Z., Arnett, K. L., Bayston, L. J., *et al.*: Loss-of-function mutations in Notch receptors in cutaneous and lung squamous cell carcinoma. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 108 : 17761-17766, 2011
- 9) Dotto, G. P.: Notch tumor suppressor function. Oncogene, 27 : 5115-5123, 2008
- 10) Gil, J., Peters, G.: Regulation of the INK4b-ARF-INK4a tumour suppressor locus: all for one or one for all. Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 7 : 667-677, 2006
- 11) Pylayeva-Gupta, Y., Grabocka, E., Bar-Sagi, D.: RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web. Nat. Rev. Cancer, 11 : 761-774, 2011
- 12) Lazarov, M., Kubo, Y., Cai, T., Dajee, M., *et al.*: CDK4 coexpression with Ras generates malignant human epidermal tumorigenesis. Nat. Med., 8 : 1105-1114, 2002
- 13) Ridky, T. W., Chow, J. M., Wong, D. J., Khavari, P. A.: Invasive three-dimensional organotypic neoplasia from multiple normal human epithelia. Nat. Med., 16 : 1450-1455, 2010
- 14) Eggermont, A. M., Spatz, A., Robert, C.: Cutaneous melanoma. Lancet, 383 : 816-827, 2014
- 15) Curtin, J. A., Busam, K., Pinkel, D., Bastian, B. C.: So-

- matic activation of KIT in distinct subtypes of melanoma. *J. Clin. Oncol.*, **24** : 4340-4346, 2006
- 16) Kunz, M., Dannemann, M., Kelso, J. : High-throughput sequencing of the melanoma genome. *Exp. Dermatol.*, **22** : 10-17, 2013
 - 17) Krauthammer, M., Kong, Y., Ha, B. H., Evans, P., *et al.* : Exome sequencing identifies recurrent somatic RAC1 mutations in melanoma. *Nat. Genet.*, **44** : 1006-1014, 2012
 - 18) Chudnovsky, Y., Adams, A. E., Robbins, P. B., Lin, Q., *et al.* : Use of human tissue to assess the oncogenic activity of melanoma-associated mutations. *Nat. Genet.*, **37** : 745-749, 2005
 - 19) Huang, F. W., Hodis, E., Xu, M. J., Kryukov, G. V., *et al.* : Highly recurrent TERT promoter mutations in human melanoma. *Science*, **339** : 957-959, 2013
 - 20) Horn, S., Figl, A., Rachakonda, P. S., Fischer, C., *et al.* : TERT promoter mutations in familial and sporadic melanoma. *Science*, **339** : 959-961, 2013
 - 21) Garber, K. : Melanoma combination therapies ward off tumor resistance. *Nat. Biotechnol.*, **31** : 666-668, 2013
 - 22) Hodi, F. S., Corless, C. L., Giobbie-Hurder, A., Fletcher, J. A., *et al.* : Imatinib for melanomas harboring mutationally activated or amplified KIT arising on mucosal, acral, and chronically sun-damaged skin. *J. Clin. Oncol.*, **31** : 3182-3190, 2013
 - 23) Jang, S., Atkins, M. B. : Which drug, and when, for patients with BRAF-mutant melanoma? *Lancet Oncol.*, **14** : e60-69, 2013
 - 24) Su, F., Viros, A., Milagre, C., Trunzer, K., *et al.* : RAS mutations in cutaneous squamous-cell carcinomas in patients treated with BRAF inhibitors. *N. Engl. J. Med.*, **366** : 207-215, 2012
 - 25) Kwong, L. N., Costello, J. C., Liu, H., Jiang, S., *et al.* : Oncogenic NRAS signaling differentially regulates survival and proliferation in melanoma. *Nat. Med.*, **18** : 1503-1510, 2012

Molecular carcinogenesis of the skin for development of novel therapy

Yoshiaki Kubo

Department of Dermatology, Institute of Health Biosciences, the University of Tokushima Graduate School, Tokushima, Japan

SUMMARY

Skin cancers are considered to develop through accumulations of genetic and/or epigenetic events in normal cells of the skin. Among them, we focus on common skin cancers, including squamous cell carcinoma and melanoma. Many important molecules have been found to be involved in molecular carcinogenesis of these disorders, and some drugs targeting those molecules have been already developed. We review the updates on molecular carcinogenesis with our current works.

Key words : skin cancer, keratinocyte, melanocyte, squamous cell carcinoma, melanoma