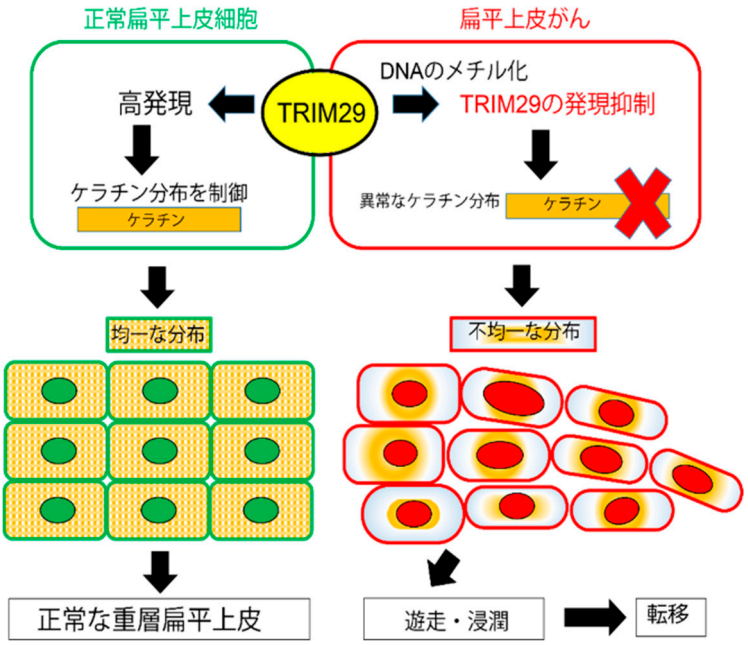
| 209　皮膚有棘細胞癌におけるTRIM29分子の機能解析 | 柳　輝希 |
|---|---|

**【目的】**TRIM ファミリー分子の一つ TRIM29 は種々の癌との関連が示唆されていたが、重層扁平上皮での機能は不明であった。本研究では、皮膚および口腔粘膜における TRIM29 の機能を解析した。

**【方法】**1. Public database を用いて、扁平上皮において高発現する TRIM ファミリー分子を検討した。2. TRIM29 分子の発現を、正常表皮・有棘細胞癌・良性表皮由来腫瘍（脂漏性角化症・尋常性疣贅）・正常舌上皮・舌癌などで検討した。また RNA レベルでの検討、DNA メチル化解析を実施した。3. shRNA による TRIM29 ノックダウン扁平上皮細胞株を樹立し、その増殖能・遊走能・転移能などを検討した。4. 免疫沈降法と質量分析によって、TRIM29 結合分子を網羅的に探索した。5. TRIM29 の細胞内分布、結合分子との局在の検討を行った。

**【結果】**Public database の解析の結果、重層扁平上皮において TRIM29 分子が高発現であることが判明した。皮膚および口腔粘膜の臨床検体を解析した結果、正常扁平上皮（表皮、口腔粘膜上皮）では TRIM29 の高発現が認められたが、癌部（有棘細胞癌、舌癌）では、DNA のメチル化によって TRIM29 発現が抑制されていた。培養細胞にて TRIM29 発現を抑制すると、扁平上皮細胞の遊走・浸潤・転移が促進され、逆に TRIM29 を過剰に発現させると細胞の遊走、浸潤は低下した。TRIM29 の結合分子を探索するために、免疫沈降法と質量分析を行ったところ、TRIM29 は細胞骨格分子ケラチンと結合していた。培養細胞において TRIM29 の発現を抑制すると、細胞内ケラチン分布が核周囲に変化し、臨床検体においても TRIM29 低発現腫瘍検体ではケラチンの分布異常を認めた。以上より、TRIM29 は扁平上皮において、ケラチンと結合することにより細胞遊走を調整しており、扁平上皮癌では TRIM29 の発現量が低下し、浸潤能・転移能を獲得していると考えられた。

扁平上皮細胞における TRIM29 のモデル



# 209. 皮膚有棘細胞癌における TRIM29 分子の機能解析

柳　輝希

北海道大学 大学院医学研究院 皮膚科学教室

Key words：皮膚がん，扁平上皮癌，TRIM ファミリー，ケラチン，細胞遊走

## 緒　言

TRIM（Tripartite motif-containing protein）ファミリー分子は、RING finger domain、B-box zinc finger domain、coiled-coil region を共通に持つ分子群であり、これまで 70 以上が報告され、蛋白の分解や転写の調節など、細胞の重要な機能を制御する。とくに発癌機構において、TRIM ファミリー分子の機能が注目されている［1，2］。皮膚悪性腫瘍のうちの一つ「皮膚有棘細胞癌（SCC：squamous cell carcinoma）」は紫外線発癌などが関与する頻度の多い皮膚癌であり、進行すると浸潤・転移能を持つ。日本は超高齢化社会を迎えており、SCC は今後増加が予想され、その発生予防・進行予防は重要な課題である。本研究では TRIM ファミリー分子の発現を、皮膚有棘細胞癌で検討するとともに、特に重要なもの（TRIM29）について詳細な機能を解明した［3，4］。

Public database の解析の結果、重層扁平上皮において TRIM29 分子が高発現であることが判明した。皮膚および口腔粘膜の臨床検体を解析した結果、正常扁平上皮（表皮、口腔粘膜上皮）では TRIM29 の高発現が認められたが、癌部（有棘細胞癌、舌癌）では、DNA のメチル化によって TRIM29 発現が抑制されていた。培養細胞にて TRIM29 発現を抑制すると、扁平上皮細胞の遊走、浸潤、転移が促進され、逆に TRIM29 を過剰に発現させると細胞の遊走、浸潤は低下した。TRIM29 の結合分子を探索するために，免疫沈降法と質量分析を行ったところ、TRIM29 は細胞骨格分子ケラチンと結合していた。培養細胞において TRIM29 の発現を抑制すると、細胞内ケラチン分布が核周囲に変化し、臨床検体においても TRIM29 低発現腫瘍検体ではケラチンの分布異常を認めた。以上より、TRIM29 は扁平上皮において、ケラチンと結合することにより細胞遊走を調整しており、扁平上皮癌では TRIM29 の発現量が低下し、浸潤能、転移能を獲得していると考えられた。本研究の内容は、下記の論文にて英文発表した。

Yanagi T, Watanabe M, Hata H, Kitamura S, Imafuku K, Yanagi H, Homma A, Wang L, Takahashi H, Shimizu H, Hatakeyama S.
Loss of TRIM29 alters keratin distribution to promote cell invasion in squamous cell carcinoma.
Cancer Res. 2018 Dec 15;78（24）:6795-6806. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-18-1495.

## 方　法

### 1.　臨床検体を用いた発現解析

北海道大学病院皮膚科にて治療を行った各種皮膚有棘細胞癌（浸潤癌、リンパ節転移部、表皮内がん）、皮膚良性腫瘍（尋常性疣贅、ケラトアカントーマ）、検体などを用いて、TRIM29 の発現解析（免疫組織染色）を行った。併せて、口腔がんや舌癌などの耳鼻科領域でのがん組織の染色を行った。

### 2.　TRIM29 の発現低下機構の解析

皮膚悪性腫瘍臨床検体での RNA 解析を実施した。凍結組織検体から、RNeasy plus mini kit を用いて、RNA を抽出し、SYBR Green を用いた定量的 PCR 法にて RNA 量を比較した。

### 3. DNA のメチル化解析

臨床検体よりゲノム DNA を抽出し（DNA mini kit、QIAGEN）、TRIM29 の CpG 領域のメチル化について検討した。DNA methylation gold kit（ZYMO 社）にて Bisulfate 処理し、TA cloning sequencing, pyrosequencing を実施した。

### 4. TRIM29 ノックダウン細胞、TRIM29 過剰発現細胞の樹立

GIPZ システム（ダーマコン）によるレンチウイルス - shRNA によって TRIM29 のノックダウン細胞を樹立した。A431、DJM1 皮膚 SCC 細胞、および HaCaT 不死化角化細胞、舌癌 SAS 細胞を使用した。細胞のセレクションはピューロマイシンを使用した。また、TRIM29 恒常的過剰発現細胞を、レトロウイルス発現系にて作製した（pQCXIP-vector）。

### 5. 細胞遊走能、浸潤能、転移能の検討

細胞遊走能は、100%コンフルエントの 6 センチ Dish を用いて実施した。200 μL 用チップにて、細胞を剥離し、剥離部分の遊走を 4～24 時間まで観察した。細胞浸潤能については、Corning BioCoat Matrigel invasion chamber with 8.0～ mm pore size（Corning 354480）を使用して、72 時間後に浸潤した細胞を染色して評価した。異種移植モデルを用いた転移能の検討については、免疫不全ヌードマウス（Nu／Nu マウス）を使用した。ルシフェラーゼ標識した皮膚有棘細胞癌株を尾静脈から投与し、IVIS システムを用いて、3 週後まで肺転移について観察した。

### 6. TRIM29 結合分子の同定

A431 皮膚 SCC 細胞および HaCaT 細胞に FLAG-tagged TRIM29 を安定発現させ、細胞抽出液をマウスモノクローナル Anti-FLAG 抗体にて免疫沈降し、マススペクトル法にて結合蛋白の同定を行った。候補分子について、免疫沈降法と免疫染色によって、共沈・共局在を検討した。

## 結果および考察

### 1. TRIM29 は正常表皮・粘膜上皮で高発現している

研究の初めに、public database（human protein atlas）を用いて、扁平上皮に高発現している TRIM ファミリー分子を同定した。TRIM ファミリーのうち TRIM29 は、皮膚、扁桃、食道に高発現しており、重層扁平上皮にて機能している可能性が考えられた。

### 2. TRIM29 は扁平上皮癌病変部にて発現が低下している

次に、各種皮膚疾患において TRIM29 の発現を免疫組織染色にて検討した。抗体はサンタクルズ社の抗 TRIM29（ATDC、A-5）マウスモノクローナル抗体を用いた。その結果、TRIM29 は皮膚有棘細胞癌部において、正常表皮部と比較して、発現が低下していた。同様の結果を口腔内扁平上皮癌でも認めた。一方、良性腫瘍である脂漏性角化症や尋常性疣贅では TRIM29 の発現は維持されていた。扁平上皮癌病変部について、凍結検体を用いて RNA レベルの解析を行ったところ、病変部では TRIM29 の RNA 発現が低下していた。また、TRIM29 の CpG アイランド部のメチル化解析を実施したところ、有棘細胞癌病変部では同部位のメチル化が認められた。

### 3. TRIM29 は細胞の遊走・浸潤を制御する

TRIM29 の細胞内での機能を解析するために、レンチウイルスによって TRIM29 に対する shRNA を導入し、ノックダウンし細胞を樹立した（HaCaT 表皮細胞、A431 有棘細胞癌細胞株、DJM1 有棘細胞癌細胞株、SAS 舌癌細胞株）。これらを解析したところ、TRIM29 のノックダウンは細胞増殖能には影響を与えず、細胞遊走能・浸潤能・転移能を亢進させた。逆に TRIM29 過剰発現細胞株は、遊走能・浸潤能が低下した。

### 4. 異種転移モデルにおいて、TRIM29 ノックダウンは SCC 細胞の肺転移を増加させる

皮膚 SCC の浸潤能亢進を生体レベルで確認するために肺転移モデルにて検討した。5 週齢の免疫不全マウス（Nu／Nu mice）に対して、A431 細胞（ノックダウンコントロールおよび TRIM29 ノックダウン細胞 2 種類、それぞれ N＝6）を尾静脈から 500,000 個／100 μL（DMEM）にて投与し、IVIS システムにて時間別に肺転移を観察した。その結果、TRIM29 ノックダウン A431 細胞はコントロールに比べて肺転移が増加していた。

**5.　TRIM29 は細胞質に発現し、ケラチンと複合体を形成する**

TRIM29の細胞内での分子機能を解析するために、TRIM29結合分子を網羅的に解析した。まず、FLAG標識TRIM29恒常発現細胞を 2 種類樹立した（HaCaT 細胞、A431 細胞）。その細胞抽出物を抗 FLAG 抗体にて免疫沈降し、質量分析を行った。その結果、結合分子の上位にケラチン結合分子 FAM83H を認めた。HaCaT 細胞抽出物にて、免疫沈降法を行ったところ、内在性発現レベルにて、TRIM29 は FAM83H、ケラチン 5、ケラチン 14 と結合していた。共焦点レーザー顕微鏡を用いた解析でも、これらの分子は細胞質内にて共局在していた。

**6.　TRIM29 はケラチン分布を制御し、細胞の遊走・浸潤と関与する**

TRIM29 がケラチンに与える影響を解析するために、siRNA によるノックダウン実験を行った。HaCaT 細胞にTRIM29に対するノックダウンを行ったところ、細胞内ケラチン分布が核周囲に変化した（図1）。同様の結果を、shRNAを含む A431 細胞を用いた尾静脈肺転移モデルでも認めた。さらに臨床検体において TRIM29 高発現腫瘍と低発現腫瘍を比較したところ、低発現腫瘍においてケラチンの細胞内分布が異常になっていた。以上から、1. TRIM29 は扁平上皮において正常なケラチン分布に関与すること、2. 扁平上皮癌ではTRIM29 発現低下のために、浸潤能、転移能を獲得していることが示唆された。

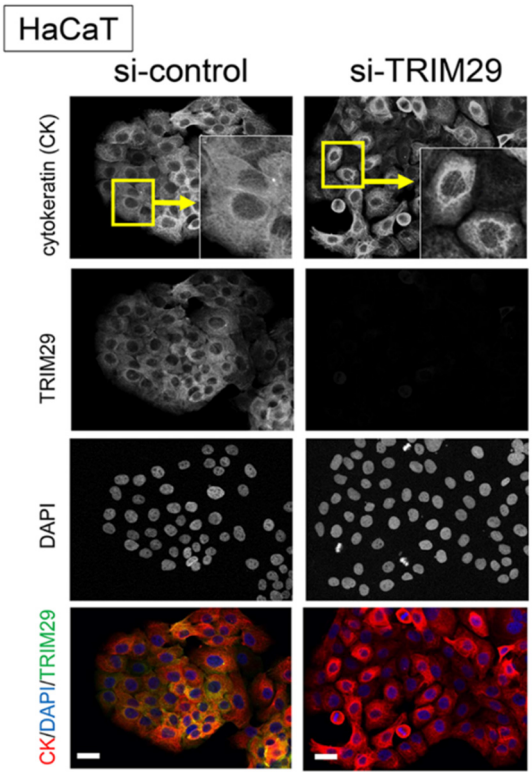



図 1. TRIM29 のノックダウンは細胞内のケラチン分布を変化させる（Yanagi T, et al. Cancer Res 2018 より引用）
左）pooled control siRNA 導入時、右）TRIM29 に対する pooled siRNA 導入時。スケールバー ＝ 20 μm。

以上より、TRIM29 は扁平上皮において、ケラチンと結合することにより細胞遊走を調整しており、扁平上皮癌ではTRIM29 の発現量が低下し、浸潤能・転移能を獲得していると考えられた。本研究では、皮膚（特に表皮）・粘膜（粘膜上皮）における TRIM29 分子機能、TRIM29 発現制御機構などを解明した。TRIM29 は扁平上皮系腫瘍のバイオマーカー・治療ターゲットに応用できる可能性が示唆された。

## 共同研究者・謝辞

本研究は、北海道大学大学院医学研究科医化学講座の渡部昌講師、畠山鎮次教授、皮膚科学教室の秦洋郎診療講師、耳鼻咽喉科・頭頸部外科学教室の本間明宏教授との共同研究で実施したものである。ここに深謝申し上げます。

## 文　献

1) Hatakeyama S. TRIM proteins and cancer. Nat Rev Cancer. 2011 Oct 7;11(11):792-804. doi: 10.1038/nrc3139.
2) Hatakeyama S. TRIM Family Proteins: Roles in Autophagy, Immunity, and Carcinogenesis.Trends Biochem Sci. 2017 Apr;42(4):297-311. doi: 10.1016/j.tibs.2017.01.002. Epub 2017 Jan 22. Review.
3) Masuda Y, Takahashi H, Sato S, Tomomori-Sato C, Saraf A, Washburn MP, Florens L, Conaway RC, Conaway JW, Hatakeyama S. TRIM29 regulates the assembly of DNA repair proteins into damaged chromatin. Nat Commun. 2015 Jun 22; 6: 7299. doi: 10.1038/ncomms8299.
4) Hatakeyama S. Early evidence for the role of TRIM29 in multiple cancer models.Expert Opin Ther Targets. 2016 Jul;20(7):767-70. doi: 10.1517/14728222.2016.1148687. Epub 2016 Feb 15.