

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19674

研究課題名(和文)皮膚有棘細胞癌関連線維芽細胞の解析と治療への応用

研究課題名(英文) Analysis of cutaneous squamous cell carcinoma (cSCC) associated fibroblasts and its application to treatments of cSCC

研究代表者

安田 正人 (YASUDA, MASAHIITO)

群馬大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：10451709

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：皮膚有棘細胞癌(cSCC)は主要な皮膚悪性腫瘍である。本研究では、癌細胞の増殖、維持に關与するcSCC関連線維芽細胞から特異的に分泌される因子の同定を試みた。cSCC関連線維芽細胞と周囲の正常線維芽細胞から抽出したRNAの遺伝子発現を解析し、その発現を比較することでcSCC関連線維芽細胞に優位に発現する61遺伝子を同定した。さらにcSCC関連線維芽細胞において重要と考えられる4遺伝子に絞り込んだ。それらの4因子について、蛋白レベルでの発現を検討し、thrombomodulin がcSCC関連線維芽細胞から優位に分泌され、cSCC周囲の間質に強く発現していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：cSCC is one of the major skin cancers. In this study, we tried to identify some clones specifically expressed by cSCC associated fibroblasts which could affect the proliferation and maintenance of cSCC cells. The expression of RNAs extracted from cSCC associated fibroblasts and normal dermal fibroblasts was analyzed and compared by the cDNA microarray. Sixty one clones dominantly expressed by cSCC associated fibroblasts were identified. We selected 4 clones based on past reports associated with cancer-associated fibroblasts. Thrombomodulin, one of 4 clones, was dominantly expressed in cSCC associated fibroblasts and localized in the stroma around cSCC cells by Western blotting and immunohistochemistry.

研究分野：皮膚科学

キーワード：癌関連線維芽細胞 皮膚有棘細胞癌

1. 研究開始当初の背景

皮膚有棘細胞癌(cSCC)は皮膚における主要な悪性腫瘍の1つであり、その患者数は増加してきている。多くは早期の症例であり外科的切除により治癒に至るものの、進行した症例では依然確立した治療法はなく予後不良であり、cSCCの分子機構、転移機序の解明は、進行症例の治療法の開発を目指す上でも必要不可欠である。近年、癌組織内の癌幹細胞の存在が脚光を浴びており、数多くの研究成果が報告されている¹⁾。研究代表者も2012年5月まで在籍したコロラド大学デンバー校再生医療・幹細胞生物学講座において、cSCCの癌幹細胞に関する研究を行い、cSCC原発組織内のアルデヒドデヒドロゲナーゼ1陽性細胞が自己複製能、分化能を有することを明らかにし、2012年度の米国研究皮膚科学会において報告を行った²⁾。癌の根治のためには癌幹細胞を根絶させる治療が必要となるが、癌幹細胞を直接傷害する治療を確立するためには、癌幹細胞に特異的に発現する因子を標的とする必要がある。しかしながら、癌幹細胞に発現するマーカーの多くは正常の幹細胞にも発現していることが多く、それらを標的とする治療は正常幹細胞をも傷害する可能性が高い。そこで、直接癌幹細胞を標的とするのではなく間接的に傷害する方法も模索する必要がある。癌幹細胞は、その維持、増殖に周囲の微小環境が重要であることが知られている。cSCCの癌幹細胞の同定を試みる過程において、研究代表者も癌幹細胞と周囲の微小環境との相互作用の重要性を再認識した。免疫不全マウスへのヒトcSCC細胞移植モデルでは、cSCC細胞の単独移植では生着率が非常に低く、事前にヒト線維芽細胞を移植し、周囲間質をヒト化することにより生着率が劇的に向上する。ヒト悪性黒色腫細胞などでは単独移植でも十分な生着率が得られることから、特にcSCCの腫瘍形成においては周囲の間質との相互作用が非常に重要であることが示唆される。

2. 研究の目的

先に示したようにcSCCにおいては、癌細胞の増殖と維持に周囲の微小環境が非常に重要なことは明らかである。そのため、本研究では、cSCCにおいて癌周囲の微小環境を構成する主な細胞である線維芽細胞、cSCC関連線維芽細胞の解析を行う。cSCC関連線維芽細胞から特異的に分泌され、癌細胞の増殖、維持に関与する因子を同定し、その因子が治療の標的となりうるかどうかをcSCCの免疫不全マウス移植モデルを用いて検証する。

3. 研究の方法

(1) cSCC関連線維芽細胞の培養

手術を行うcSCC患者に対し十分なインフォームド・コンセントを得て、癌組織と正常組織検体を採取し、コラゲナーゼ、ト

リプシン処理を行うことで各々から癌関連線維芽細胞と正常線維芽細胞を単離培養する。

(2) cSCC関連線維芽細胞と正常線維芽細胞のcDNAマイクロアレイ法による遺伝子発現解析

各々培養細胞群からRNAを抽出し、cDNAを作成した上で、Whole Human Genome オリゴ DNA マイクロアレイ (Agilent technologies)を用いてcDNA マイクロアレイ法により、遺伝子プロファイリングを行う。

(3) cSCC関連線維芽細胞に特異的に発現する遺伝子の抽出

正常線維芽細胞での発現と比較して、cSCC関連線維芽細胞において2倍以上強い発現強度のある因子を選択する。異なる患者から単離された培養細胞群に共通して、cSCC関連線維芽細胞に優位に発現している因子をさらに絞り込む。

(4) 抽出した因子の蛋白レベルでの発現解析

絞り込んだ因子についてウェスタンブロット法、cSCC腫瘍組織に対する免疫組織化学により蛋白レベルでの発現の違いを解析する。

(5) 抽出した因子を強制発現させるレンチウイルスベクターの作成

蛋白レベルでもcSCC関連線維芽細胞に優位に発現し、cSCC腫瘍組織周囲に局在していることが確認された因子について、レンチウイルスベクターに組み込み、真皮線維芽細胞に強制発現させることにより、表皮角化細胞や有棘細胞癌細胞株との共培養により、その増殖能やコロニー形成能などへの影響を確認する。

4. 研究成果

(1) cSCC患者5名より同意を得て、cSCC周囲の間質から単離したcSCC関連線維芽細胞と正常皮膚から単離した正常線維芽細胞の培養を試みたが、進行したcSCCは潰瘍化し、多数の細菌、真菌感染を併発しており、最終的に単離培養に成功した2症例4検体について解析を進めた。

(2) 4検体について、cDNAマイクロアレイ法を用いて、cDNAプロファイルを解析した。cSCC関連線維芽細胞に2倍以上発現している遺伝子を抽出し、さらに2症例で共通して発現が増えている遺伝子を抽出したところ、全61遺伝子に絞り込むことができた。

(3) さらに、癌関連線維芽細胞の論文報告や蛋白構造の解析により、cSCC関連線維芽細胞に重要な遺伝子として、thrombomodulin (THBD)、insulin-like growth factor binding protein 6 (IGFBP6)、interleukin 24 (IL24)、cadherin 26 (CDH26)の4因子に絞り込む

- だ。
- (4) 絞り込みを行った4因子について単離した cSCC 関連線維芽細胞における蛋白レベルの発現をウェスタンブロット法で解析した。THBD は正常線維芽細胞に比べて、cSCC 関連線維芽細胞において優位に発現していた (図 1)

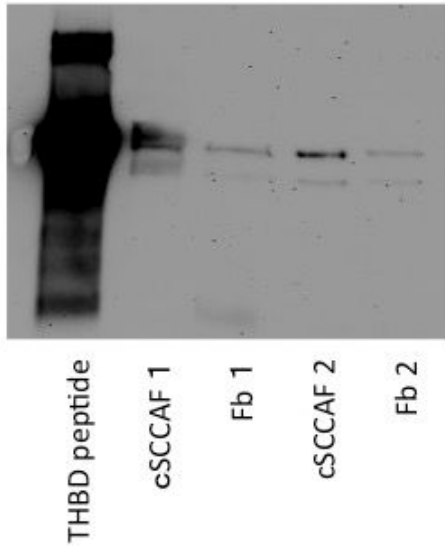


図 1. Western blotting for THBD.

- (5) さらに複数の cSCC の切除検体を用いた免疫組織化学により、THBD の局在を確認した。THBD は腫瘍細胞間にも淡く染色されるものの、主として腫瘍細胞巣周囲の間質に強く発現していた (図 2)。

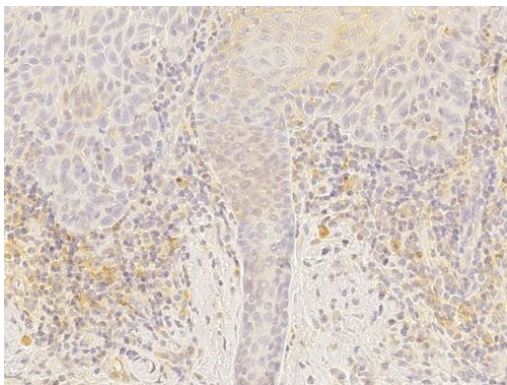


図 2. THBD 免疫組織化学 (cSCC)

また、cSCC 以外の悪性腫瘍でも検討を行ったところ、皮膚悪性黒色腫や肝細胞癌の周囲間質では THBD の発現はあまりみられなかった。現在、その他の癌腫についても解析を行っているが、THBD は cSCC の微小環境に重要な役割を果たしている可能性がある。

- (6) さらに、THBD の cSCC 微小環境での機能を解析するため、THBD 遺伝子を強制発現させるためのレンチウイルスベクターを作成しているところであり、今後真皮線維芽細胞に遺伝子導入を行い、癌細胞との相互作用について解析を行う予定である。

参考文献

- (1) Patel GK, Yee CL, Terunuma A, et al. Identification and characterization of tumor-initiating cells in human primary cutaneous squamous cell carcinoma. *J Invest Dermatol* 2012;132:401-9.
- (2) Yasuda M, Chen J, Robinson SE, et al. Aldehyde dehydrogenase activity is cancer stem cell marker in human cutaneous squamous cell carcinoma. *Society for Investigative Dermatology*, 2012.5.9-12. Raleigh

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 0 件)

〔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

6. 研究組織

- (1) 研究代表者

安田 正人 (YASUDA, Masahito)
群馬大学医学部附属病院皮膚科・講師
研究者番号：10451709

(2)研究分担者
なし

研究者番号：

(3)連携研究者
なし

研究者番号：

(4)研究協力者
なし