

令和 2 年 6 月 2 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K10159

研究課題名(和文) 表皮細胞のリプログラミングと腫瘍化プロセス

研究課題名(英文) Reprogramming of epidermal keratinocytes and the process of tumorigenesis

研究代表者

久保 宜明 (KUBO, Yoshiaki)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・教授

研究者番号：10260069

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：日光角化症(AK)とBowen病(BD)の凍結各2サンプルからタンパク質を抽出し、液体クロマトグラフィー質量分析を用いて計701個のタンパク質を同定したAKとBDそれぞれで高発現する12個のタンパク質を同定し、その中AKにおいてRCE1、CDC42、14-3-3 beta、14-3-3 zeta、BDにおいてDUSP1、PEDF、PTRFを選出した。AKとBDの標本を用いて各抗体で免疫染色を行ったが、AK/BD間の腫瘍細胞において発現が明らかに異なる分子を同定することができなかった。表皮内癌の凍結サンプルを用いた質量分析によるタンパク質発現解析は十分効果的に機能しなかったと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

皮膚癌は欧米の白人のみならず、日本においても患者数は増加傾向にあり、皮膚表皮細胞の腫瘍化プロセスを詳細に検討することは、学術的にも社会的にも意義がある。本研究では、皮膚癌の早期病変である表皮内癌の日光角化症とボーエン病において、網羅的なタンパク質発現解析を行った。研究期間中には各腫瘍細胞において発現が明らかに異なる分子を同定することはできなかったが、各病態に關与の可能性がある新規因子を複数同定することができた。今後の発癌分子機構解明や発癌予防に向けて一役を担えるものとする。

研究成果の概要(英文)：Proteins were extracted from 2 frozen samples of actinic keratosis (AK) and Bowen's disease (BD), and a total of 701 proteins were identified using liquid chromatography-mass spectrometry. Twelve proteins highly expressed in each of AK and BD were identified, and among them, RCE1, CDC42, 14-3-3 beta, and 14-3-3 zeta in AK and DUSP1, PEDF, and PTRF in BD were selected. Immunostaining with each antibody was performed using AK and BD specimens, but it was not possible to identify molecules with distinctly different expression in tumor cells between AK and BD. It is considered that protein expression analysis by mass spectrometry using a frozen sample of intraepithelial cancer did not function sufficiently effectively.

研究分野：皮膚科学

キーワード：表皮細胞 腫瘍化プロセス リプログラミング 日光角化症 Bowen病

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

表皮細胞は加齢などの内的因子や日光紫外線の暴露などの外的因子により種々の病態を生じる。代表的な病態である有棘細胞癌において研究代表者らはこれまでに、癌関連遺伝子の変異を同定し、これらの知見をもとに遺伝子導入によるヒト正常表皮細胞の発癌誘導実験により、Ras経路の活性化とRB1/p16経路の不活性化の組み合わせが有棘細胞癌の多段階発癌機構に重要であることを示した。次に、腫瘍関連遺伝子のプロモーター領域のDNAメチル化による遺伝子不活性化は有棘細胞癌に一般的なイベントであること、表皮内癌の日光角化症(AK)においてセネッセンスに陥った細胞が有棘細胞癌に比較し有意に多いこと、ヒストン脱アセチル化酵素SIRT1が特に表皮内癌のBowen病(BD)で高発現していること、HPVと関連したBDはTP53蛋白の発現低下と相関していることなどを示し、表皮細胞のエピジェネティックな制御異常が腫瘍化に深く関与することを明らかにしてきた。

一方、最近の網羅的ゲノム解析によると、1つの有棘細胞癌内には想像をはるかに超えた遺伝子異常数・腫瘍内不均一性があることがわかってきた。腫瘍内不均一性は癌一般の共通する特徴であり、外科的に切除不能な癌の根治が困難な主要因であると考えられる。腫瘍内不均一性の分子機構の1つとして表皮細胞のリプログラミングが考えられるが、その実態は未だ不明である。

2. 研究の目的

表皮細胞の腫瘍化プロセスにおいて、腫瘍の起源となる細胞は幹細胞である可能性が高いと考えられるが、幹細胞と完全に分化した細胞の中間の、単分化能を持つ前駆細胞(committed progenitor cell; CP細胞)がリプログラミングしている可能性もある。本研究では病理組織学的見地から、有棘細胞癌の前駆病変である表皮内癌の中でも、AKを幹細胞由来の表皮内癌、BDをCP細胞由来の表皮内癌と仮定し、表皮細胞のリプログラミングに関与する分子の同定を試みる。

3. 研究の方法

AKとBD各2つの凍結サンプルから、同面積・同厚さ(真皮上層まで)を切り取る。化学物質評価研究機構にて、同サンプルからタンパク質を抽出、酵素消化を行い、液体クロマトグラフィー質量分析にて、AKとBD間のタンパク質の定量比較解析を行う。AKサンプル間、およびBDサンプル間でタンパク質発現の程度が共通し、かつAKとBD間のタンパク質発現の差の大きい分子を選出する。さらにそれらの中でタンパク質の機能データより、細胞周期関連分子やセネッセンス関連分子など表皮細胞のリプログラミングに関与する可能性が示唆される分子を選出する。選んだ分子に対する抗体を用いてAKとBDの標本において免疫染色を行う。質量分析の結果を確認するとともに、標本内での腫瘍内不均一性の有無を検討する。

4. 研究成果

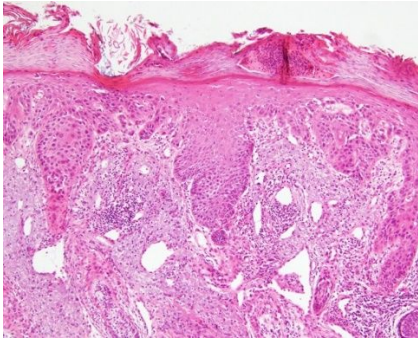
(1) 各表皮内癌の臨床・組織像を示す。

日光角化症(AK)

(臨床) 高齢者の露光部に生じる。鱗屑、痂皮を伴う境界不明瞭な紅斑や角化病変が形成される。



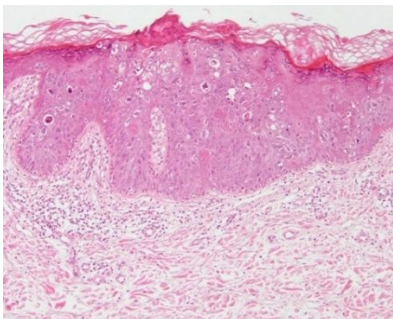
(組織像) 基底層を中心に大小不同で配列不整な角化細胞が増殖する。真皮への腫瘍細胞の浸潤はない。真皮には日光変性がみられる。



Bowen 病 (BD)
(臨床) 高齢者の非露光部に生じることが多い。境界明瞭な紅褐色～黒褐色局面を示す。



(組織像) 表皮全層に異型な角化細胞の増殖がみられ、異常角化細胞や clumping cells もみられる。真皮への腫瘍細胞の浸潤はない。



(2) 液体クロマトグラフィー質量分析

液体クロマトグラフィー質量分析により、計 701 個のタンパク質を同定した。AK と BD 2 サンプル間でタンパク質の定量比較解析を行い、AK で高発現する 12 個のタンパク質と BD で高発現する 12 個のタンパク質を同定した。

各 12 個のタンパク質について現在までに知られている情報を詳細に検討し、表皮細胞のリプログラミングや腫瘍化に重要と考えられるタンパク質を探索した。AK で高発現するタンパク質として RCE1、CDC42、14-3-3 beta、14-3-3 zeta の 4 つと、BD で高発現するタンパク質として DUSP1、PEDF、PTRF の 3 つを選出し、良質と思われる可能な限りの抗体を入手した。

(3) 免疫染色

質量分析に用いた各サンプルに複数追加した AK と BD のホルマリン固定パラフィン包埋切片において免疫染色を行った。一部の抗体においては、タンパク質の発現をうまく検出できなかった。その他の抗体では陽性コントロールではタンパク質の発現をうまく検出できたものの、AK と BD 間の腫瘍細胞において、タンパク質発現が明らかに異なる分子を同定することができなかった。この研究期間には腫瘍細胞以外のタンパク質発現について未だ十分に解析できていない。

(4) 考察

凍結サンプルにおける腫瘍細胞の占める割合が小さい表皮内癌では、質量分析を用いたタ

ンパク質発現解析が腫瘍細胞の解析に十分効果的に機能していなかった可能性が考えられる。

AK と BD の各病態に関与の可能性がある新規因子を複数同定することができた。これらの分子は、腫瘍細胞自体でないものの、間質や免疫担当細胞など腫瘍細胞以外の真皮内の何らかの病態に寄与している可能性があり、今後の発癌分子機構解明や発癌予防に向けて貢献できる可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	松立 吉弘 (MATSUDATE Yoshihiro) (80622729)	徳島大学・病院・講師 (16101)	