

平成 30 年 5 月 16 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19104

研究課題名(和文) 乾癬モデルマウスを用いた慢性炎症と皮膚発癌の関連解明

研究課題名(英文) Analysis of association between chronic inflammation and tumorigenesis in skin using psoriasis mouse model

研究代表者

三井 伸二(Mii, Shinji)

名古屋大学・医学系研究科・特任助教

研究者番号：80646505

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)：本研究では、我々の作製したCD109欠損マウスを用いて皮膚腫瘍形成実験を行い、癌関連遺伝子CD109の欠損により皮膚腫瘍の発生率が低下することを示した。また、その原因を探るためにマウス皮膚より得た初代培養ケラチノサイトを用いて検討したところ、CD109が欠損することでTGF- $\beta$ /SMAD/NRF2経路が活性化することで皮膚腫瘍の発生が抑えられている可能性が示唆された。以上のように、CD109が腫瘍発生において果たす役割について、本研究によりその一端が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the role of CD109 in skin tumorigenesis using a two-stage carcinogenesis model in CD109-deficient mice with chronic skin inflammation. Although no significant difference was found in conversion rates from papilloma to carcinoma between wild-type and CD109-deficient mice in the carcinogenesis model, we observed fewer and smaller papillomas in CD109-deficient mice than in wild-type mice. Additionally, immunofluorescence analysis showed that SMAD2 phosphorylation and NRF2 expression were enhanced in primary keratinocytes from CD109-deficient mice compared with in those from wild-type mice. These results suggest that CD109 deficiency suppresses skin tumorigenesis by enhancing TGF- $\beta$ /SMAD/NRF2 pathway activity.

研究分野：実験病理学

キーワード：CD109 皮膚発癌 扁平上皮癌 炎症性発癌

### 1. 研究開始当初の背景

慢性炎症が発癌に関与する、いわゆる炎症性発癌は種々の臓器で知られており、代表的なものとして *H. pylori* による胃癌、肝炎ウイルスによる肝細胞癌、炎症性腸疾患による大腸癌などが挙げられる。一方で、皮膚におけるある種の慢性炎症は必ずしも発癌リスクを高めるとはされておらず、特にアトピー性皮膚炎では皮膚癌をはじめとする発癌リスクが減少するとの報告もある。また、炎症性皮膚疾患の1つである乾癬についても、治療による皮膚発癌リスクは知られているものの、乾癬そのものによって皮膚癌が惹起されるとの明らかな証拠は知られていない。

2-マクログロブリン/C3,C4,C5 ファミリーに属する GPI アンカー型膜タンパク質 CD109 は、皮膚・肺・口腔・食道・子宮頸部の扁平上皮癌、肺腺癌、膀胱尿路上皮癌等で発現が増強していることが明らかとなっており、癌関連遺伝子と考えられている。また、ケラチノサイト細胞株において、CD109 は TGF- $\beta$  シグナルを負に制御するとの報告もあり、TGF- $\beta$  の共受容体とされている。

一方、我々が作出した CD109 ノックアウトマウスにおいて皮膚の乾癬様慢性炎症が観察されており、先述した慢性炎症と発癌の関連を解明する上で有用なモデルであると考えられた。

以上のことから、慢性炎症が発癌に与える影響を調べるために、皮膚発癌における CD109 の役割に着目し、CD109 ノックアウトマウスを用いた個体レベルでの解析を開始した。

### 2. 研究の目的

本研究では、皮膚における慢性炎症が、扁平上皮癌の発症にどのような影響を与えるかを明らかにするとともに、癌関連遺伝子である CD109 が扁平上皮癌の発症機序において具体的にどのように関与しているかを解明することを目的とする。

また、将来的には皮膚および皮膚以外の扁平上皮癌において、CD109 が治療標的として利用可能であるかを検討するための基礎的なデータを提供することを目指す。

### 3. 研究の方法

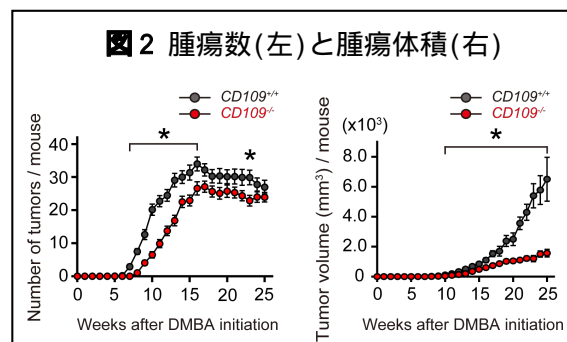
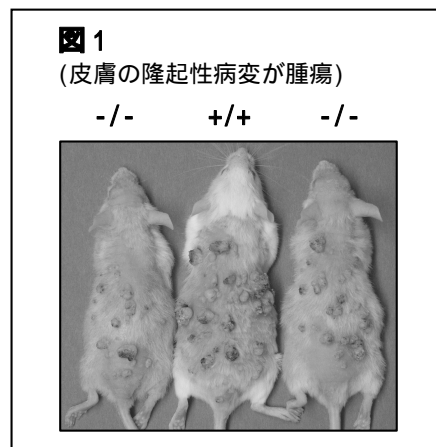
- (1) 野生型マウスおよび CD109 ノックアウトマウスを用いた皮膚発癌実験を行い、扁平上皮癌の発症および進展における CD109 の役割を検討する。  
具体的には、発癌イニシエーターとして、7,12-ジメチルベンズ[a]アントラセン (DMBA) を、プロモーターとして 12-O-テトラデカノイルホルボール 13-アセ

タート (TPA) を用いた二段階化学発癌モデルを用いて病理組織学的な検討を行う。

- (2) 慢性炎症が皮膚発癌にどのような影響を与えるか、特に CD109 と TGF- $\beta$  シグナル、あるいは CD109 と STAT3 経路の相関を中心に、(1) で得たマウス組織やマウスより得た初代培養ケラチノサイトを用いて、組織学的および細胞生物学的な解析を行う。
- (3) ヒトの扁平上皮癌についても免疫染色を含む組織学的な解析を行う。特に、扁平上皮癌の中でも、より予後が悪いことで知られる食道癌を対象とする。

### 4. 研究成果

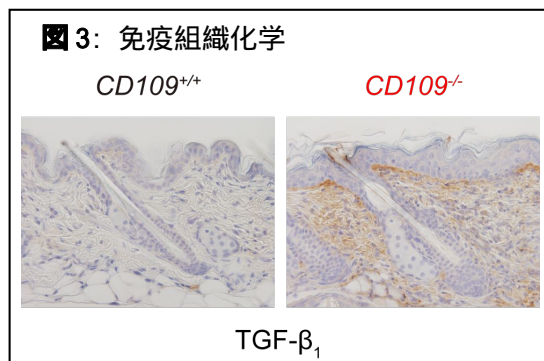
- (1) 野生型マウスおよび CD109 ノックアウトマウスを用いて DMBA/TPA による皮膚化学発癌実験を行ったところ、野生型に比べてノックアウトマウスでは皮膚腫瘍の発生数および腫瘍体積が有意に減少することが明らかとなった (図 1, 図 2)。



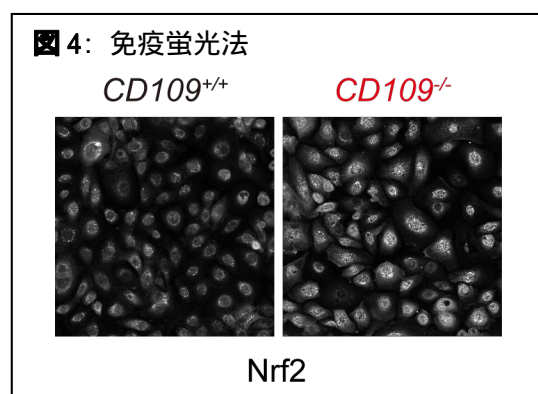
一方で、形成された皮膚腫瘍について病理組織学的な解析を行ったところ、発生した扁平上皮乳頭腫の組織像および悪性化率、扁平上皮癌の組織型・深達度・転移の頻度については両群間で有意な差はみられなかった。

これらの結果から、CD109 は皮膚においては、腫瘍の進展や転移よりも腫瘍の発生において重要な役割を果たしていることが示唆された。

- (2) 個体レベルで観察された(1)の結果を惹起した機序を調べるために、野生型マウスおよびCD109 ノックアウトマウスの皮膚を免疫組織化学的に検討した。特に、抗 TGF- $\beta$  抗体を用いた免疫染色を行ったところ、CD109 ノックアウトマウスの真皮において TGF- $\beta$  の間質への沈着量が、野生型マウスに比較して増加していた(図 3)。



続いて、マウス皮膚より初代培養ケラチノサイトを単離・培養し、細胞生物学的な解析を行った。各種抗体を用いた免疫蛍光法による解析により、CD109 ノックアウトマウスより得たケラチノサイトでは TGF- $\beta$  シグナル系の SMAD2 のリン酸化が亢進していたことに加え、TGF- $\beta$  /SMAD シグナルとの関連が知られている炎症抑制因子 NRF2 の活性化の亢進も認められた(図 4)。



さらに、DMBA 塗布後のマウス皮膚から抽出したゲノム DNA を用いて、DMBA による腫瘍発生の原因とされる H-ras<sup>(Q61L)</sup> 変異の頻度を PCR 法により解析したところ、CD109 ノックアウトマウスの皮膚では野生型マウスに比べ、H-ras 変異の頻度が有意に小さいことが明らかとなった。

(1)および(2)の結果から、CD109 の欠損により、皮膚腫瘍の発生が抑制されることが明らかとなり、その機序として、皮膚において TGF- $\beta$  /SMAD/NRF2 経路が活性化し、DMBA による H-ras 変異の発生が抑制されるという可能性が示唆された。

- (3) ヒト食道扁平上皮癌の手術材料を用いて、CD109 の発現を免疫組織化学的に評価し、予後との相関を含む臨床病理学的な解析を行ったが、今回用いたサンプル群では、統計学的に有意な相関を確認することはできなかった。これは、すでに手術されるまでに進展した腫瘍組織を用いて検討したために、有意な結果が得られなかった可能性を示すものであり、CD109 の発現が扁平上皮癌の進展に比べ、腫瘍発生により深く関与することを示唆する結果と考えられた。

## 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 7 件)

Weng L, Han YP, Enomoto A, Kitaura Y, Nagamori S, Kanai Y, Asai N, An J, Takagishi M, Asai M, Mii S, Masuko T, Shimomura Y, Takahashi M. Negative regulation of amino acid signaling by MAPK-regulated 4F2hc/Girdin complex. PLoS Biol. 査読有 2018.

10.1371/journal.pbio.2005090

Kuroda T, Yokoyama Y, Yuhara S, Okawa H, Hasegawa H, Yokote J, Tamaki S, Mii S. Giant biatrial myxoma with two different gross findings. Gen Thorac Cardiovasc Surg. 査読有 2018.

10.1007/s11748-017-0811-z

Shaniya A, Asai N, Enomoto A, Weng L, Kobayashi H, Wang X, Chen C, Mii S, Takahashi M. Essential role of Linx/Isir2 in the development of the forebrain anterior commissure. Sci Rep. 査読有 8: 7292 2018.

10.1038/s41598-018-24064-0

Inaba H, Yamakawa D, Tomono Y, Enomoto A, Mii S, Kasahara K, Goto H, Inagaki M. Regulation of keratin 5/14 intermediate filaments by CDK1, Aurora-B, and Rho-kinase. Biochem Biophys Res Commun. 査読有 498: 544-550 2018.

10.1016/j.bbrc.2018.03.016

Shiraki Y, Mii S, Enomoto A, Momota H, Han YP, Kato T, Ushida K, Kato A, Asai N, Murakumo Y, Aoki K, Suzuki H, Ohka F, Wakabayashi T, Todo T, Ogawa S, Natsume A, Takahashi M. Significance of perivascular tumour cells defined by CD109 expression in progression of glioma. J Pathol. 査読有 243: 468-480 2017. 10.1002/path.4981

Kuga D, Ushida K, Mii S, Enomoto A, Asai N, Nagino M, Takahashi M, Asai M. Tyrosine phosphorylation of an actin-binding protein Girdin specifically marks tuft cells in human and mouse gut. J Histochem Cytochem. 査読有 65: 347-366 2017. 10.1369/0022155417702586

Sunagawa M, Mii S, Enomoto A, Kato T, Murakumo Y, Shiraki Y, Asai N, Asai M, Nagino M, Takahashi M. Suppression of skin tumorigenesis in CD109-deficient mice. Oncotarget. 査読有 7: 82836-82850 2016. 10.18632/oncotarget.12653

Nogimori K, Hori T, Kawaguchi K, Fukui T, Mii S, Nakada H, Matsumoto Y, Yamauchi Y, Takahashi M, Furukawa K, Tetsuya O, Yokoi K, Hasegawa Y, Furukawa K. Increased expression levels of ppGalNAc-T13 in lung cancers: Significance in the prognostic diagnosis. Int J Oncol. 査読有 49: 1369-1376 2016. 10.3892/ijo.2016.3638

〔学会発表〕(計 10件)

白木 之浩 三井 伸二 浅井 直也 榎本 篤, 百田 洋之 夏目 敦至 若林 俊彦 高橋 雅英, The role of CD109 in PDGFB-induced glioma mouse model for sensitivity to Temozolomide. 第 76 回日本癌学会学術総会, 2017 年.

滝 哲郎 三井 伸二 榎本 篤 高橋 雅英, 肺腺癌における GPI アンカー型膜タンパク質 CD109 の機能解析. 第 14 回日本病理学会カンファレンス, 2017 年.

三井 伸二, 砂川 真輝, 榎本 篤, 村雲 芳樹, 棚野 正人, 高橋 雅英, 慢性皮膚炎症を伴う CD109 ノックアウトマウスにおいて皮膚腫瘍形成は抑制される. 第 106 回日本病理学会総会, 2017 年.

白木 之浩, 三井 伸二, 榎本 篤, 高橋 雅英, ヒト glioma における CD109 の発現. 第 106 回日本病理学会総会, 2017 年.

三井 伸二, 砂川 真輝, 榎本 篤, 村雲 芳樹, 棚野 正人, 高橋 雅英, Suppression of skin tumorigenesis in CD109-deficient mice with chronic skin inflammation. 第 75 回日本癌学会学術総会, 2016 年.

白木 之浩, 砂川 真輝, 三井 伸二, 浅井 直也, 榎本 篤, 百田 洋之, 夏目 敦至, 若林 俊彦, 高橋 雅英, Immunohistochemical analysis of CD109 expression in human lower grade glioma. 第 75 回日本癌学会学術総会, 2016 年.

三井 伸二, 白木 之浩, 下山 芳江, 榎本 篤, 浅井 直也, 高橋 雅英, 骨肉腫における新規免疫組織化学的マーカーとしての CD109 の可能性. 第 105 回日本病理学会総会, 2016 年.

榎本 篤, 前田 啓子, 浅井 直也, 三井 伸二, 高橋 雅英, 間葉系幹細胞およびペリサイトの新規マーカー Meflin の同定と機能解析. 第 105 回日本病理学会総会, 2016 年.

砂川 真輝, 三井 伸二, 棚野 正人, 高橋 雅英, 皮膚腫瘍形成における CD109 の役割の検討. 第 105 回日本病理学会総会, 2016 年.

白木 之浩, 加藤 琢哉, 砂川 真輝, 三井 伸二, 浅井 直也, 榎本 篤, 百田 洋之, 夏目 敦至, 若林 俊彦, 高橋 雅英, 脳腫瘍モデルマウスを用いた神経膠腫における CD109 の機能解析. 第 105 回日本病理学会総会, 2016 年.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.nagoya-u.ac.jp/patho2/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

三井 伸二 ( MII, Shinji )  
名古屋大学・大学院医学系研究科・特任助教

研究者番号: 80646505

### (2) 研究分担者

なし.