

令和 3 年 6 月 28 日現在

機関番号：31201

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17812

研究課題名（和文）乳房外Paget病におけるCOX2、HDAC6の相互作用の解析

研究課題名（英文）Studies for the COX-HDAC6 axis in extra-mammary Paget disease

研究代表者

角田 加奈子 (Tsunoda, Kanako)

岩手医科大学・医学部・講師

研究者番号：10611030

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：乳房外Paget病でHDAC6-COX2関連分子を解析し、浸潤・転移に関する役割を共培養系/免疫染色を用いて解析した。培養系の検討は、腫瘍と周囲の癌関連線維芽細胞(CAF)で形成される微小環境において、HDAC6-COX2が重要な役割を担っている可能性が示唆された。免疫染色では、HDAC6が腫瘍先進部で過剰発現し周囲にSMA陽性のCAFと見られる線維芽細胞が集積していた。HDAC6陽性の細胞は集塊を形成しcollective cell invasionの動態を示していた。PGEの分泌はHDAC6の過剰発現に関与し、浸潤・転移能の獲得に関与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

進行期の乳房外Paget病に対して有効な化学療法は無く、新たな治療薬の開発が切望されている。炎症性の症状を思わせる、乳房外Paget病の患者は、比較的多く、自分の研究テーマであるHDAC6とCOX2が極めて近い位置関係で作用している事が明らかになった。既にCOX2阻害薬は臨床応用されちえおり、HDAC6阻害薬も臨床試験に入っている。本研究の基礎データは、今後の乳房外Paget病の治療に対して重要な意義を持つと思われる。

研究成果の概要（英文）：For the effective treatment in advanced extramammary Paget disease, we analyzed HDAC6-COX2-related molecules and studied their role in invasion and metastasis. Activation of HDAC6-COX2-PGE2 was examined in co-culture systems as well as by immunostaining in human tumors. HDAC6-COX2 may play an important role in the microenvironment formed by tumor cells and surrounding cancer-related fibroblasts (CAFs). Immunostaining revealed that HDAC6 was overexpressed in extramammary Paget's disease in the advanced stage, and many fibroblasts that appeared to be SMA-positive CAF were found around it. These HDAC6-positive cells formed agglomerates and showed the dynamics of collective cell invasion. It was suggested that the secretion of PGE in extramammary Paget's disease is involved in the induction of overexpression of HDAC6 and may be involved in the acquisition of infiltration / metastatic ability.

研究分野：皮膚科学

キーワード：HDAC6 乳房外Paget病 COX2 浸潤 転移

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

乳房外 Paget 病は外陰部に好発し、本邦を含めた東アジア地区に多い皮膚悪性腫瘍である。腫瘍細胞の大部分は表皮内に留まり、浸潤・転移を示す例は少数であるが、一旦浸潤・転移の生じた進行期症例乳房外 Paget 病の治療は、困難を極めることが多い¹⁾。その理由は、水平方向の進展範囲が広範囲におよび、泌尿・生殖器が混在する複雑な解剖学的構造が根治切除の障壁となっている。また、その希少性から効果的な薬物療法の開発臨床試験は単独施設では困難であり、大規模臨床試験も進んでいない現状が影響している。現在は、可能な限りの局所切除に加え、残存腫瘍に関しては抗がん薬を併用した薬物療法や、放射線療法が試みられている。しかし、多くは治療抵抗性であり予後不良な症例が多い¹⁾。

我々は、これまでに悪性黒色腫の浸潤・転移機構に関して、細胞質内 histone deacetylase (HDAC) である HDAC6 関連分子が重要な役割を担っていることを明らかにしてきた。HDAC6 は、細胞質内において複数の蛋白質の翻訳後修飾に関与し、特に細胞骨格分子の微小管構成蛋白である α -tubulin (TUBB3) の脱アセチル化による微小管安定化を誘導し、細胞運動能に影響を与える事が明らかとなった²⁾。また HDAC6 は、cortactin (CTNN1) の脱アセチル化を介してラメリポディアの構造変化をもたらす、浸潤・転移能に影響を与える事も明らかにした²⁾。HDAC6 は、腫瘍細胞の運動、浸潤能に関連した制御蛋白の一つと言える。

一方、乳がんでは ERBB2 の過剰発現が、COX2 の誘導を介して腫瘍内の血管新生や浸潤・転移に関わる事が以前から繰り返し報告されている³⁾。COX2 は、prostaglandin E2 を介して各種腫瘍細胞の epithelial-mesenchymal transition (EMT) を加速させ、浸潤転移に関与する事も報告されている³⁾。腫瘍内の cancer associated fibroblast (CAF) は、HDAC family の制御下で腫瘍免疫抑制性に作用する制御性 T 細胞 (Treg) あるいは骨髄由来免疫抑制細胞 (MDSC) のホーミングに関与している⁴⁾。CAF に於ける HDAC6 の過剰発現は、STAT-COX2 系を介して腫瘍免疫抑制性のがん微小環境を形成していることも報告されている⁴⁾。

これらのことは、浸潤性乳房外 Paget 病において HDAC6-COX2 axis によって形成されたがん微小環境は、炎症性発癌の 1 つと考えられる乳房外 Paget 病の病巣進展に寄与しており、格好の治療標的分子となるのではないかという学術的問いを抱負せるのに十分な情報源となった。

本研究では、乳房外 Paget 病の浸潤・転移機構に、腫瘍細胞と周囲の癌関連線維芽細胞 (CAF) で形成されるがん微小環境において、HDAC6-COX2 axis が重要な役割を担う事を明らかにする。さらに、COX2 および HDAC6 阻害剤の臨床応用の可能性について基礎実験を立案した。

2. 研究の目的

進行期乳房外 Paget 病に対する効果的な薬物療法開発のために、HDAC6-COX2 関連分子の動態を解析し、Paget 細胞の浸潤・転移機構に関する役割を明らかにする。さらに、HDAC6 および COX2 阻害薬が、浸潤・転移の抑制効果を有するか xenograft モデルを用いた基礎実験を行う。

3. 研究の方法

(1) 培養細胞系を用いた、HDAC6-COX2-PGE₂ 関連分子の動態解析

培養細胞株：Paget 細胞株は入手が困難なため、ERBB2 陽性乳がん細胞株 (SKBR3, MDA-MB-435) を用いた実験を実施した。また、HDAC6 ノックアウトマウスの MEF を用いて共培養実験を実施した。両者の共培養系では collective cell invasion の証明に係る実験を実施した。また、倫理委員会に申請・承認後、同意取得の上、進行期 Paget 病患者の原発巣からの培養細胞樹立も目指した。

解析対象分子：HDAC6、ERBB2、COX2、STAT3、SOCS3、PGE₂、PGE2-EP1/2/3/4、MMP2/9 を対象分子とした。

解析方法：各分子の発現は real-time PCR/ western blot で評価し、リン酸化状態の評価には特異的リン酸化抗体を用いた。培養上清中の PGE₂ の濃度は ELISA にて計測した。細胞の運動能・浸潤能については、Matrigel invasion assay、増殖能に関しては ATP assay で評価した。細胞骨格分子 (F/G actin, 微小管) の変動に関しては蛍光抗体法を用いて免疫染色し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。標的分子の発現抑制、過剰発現にはそれぞれ siRNA/shRNA、あるいは mammalian expression vector による強制発現系を使った。

(2) ヒト腫瘍組織に於ける免疫組織解析

対象：2010 の先行研究から 7 年分の岩手医科大学皮膚科学講座で加療しフォローアップ可能な乳房外 Paget 症例 18 例について免疫組織学的方法を用いて解析した。ブロックの使用に関しては包括同意を既に得ているが、今回改めて倫理委員会に申請、同意取得の上実施した。解析方法：標的蛋白質について sABC 法を用いて免疫染色を実施した。ERBB2 については必要に応じて FISH 解析も行った。染色性の判定は、2 名の評価者 (申請者および病理専門医) で実施し、スコアリングによる定量化を実施した。臨床病理学的事項との関連検討には、ANOVA、Kruskal-Wallis 解析を用いた。

Xenograft モデルにおける HDAC6/ COX2 阻害薬の浸潤転移、増殖に与える影響の解析：同意

取得の上、進行期 Paget 患者の原発巣からサンプルを採取し、ヌードマウス皮下における Xenograft の作製を目指した。Xenograft モデルにおける HDAC6/ COX2 阻害薬の浸潤転移、増殖に与える影響の解析は、tubastatin A (HDAC6), celecoxib (COX2)、投与方法は、Zhang らの方法に準じた⁵⁾。解析項目は、腫瘍増殖の抑制効果、摘出腫瘍の(免疫)組織学的観察、分子生物学的解析(real-time PCR/ western blot など)を用いて関連分子の動態を解析した。増殖曲線を算出し、相乗、相加効果の有無について検討した。

期間内の研究計画に関して、以下の表にまとめ、それに沿った形で研究成果を報告する。

STEP	実験系	明らかにする内容
1	培養細胞系を用いた、HDAC6-COX2-PGE ₂ 関連分子の動態解析	<ul style="list-style-type: none"> ✓ 培養細胞系に於いてHDAC6 ERBB2 COX2 PGE2系の発現制御が成立しているかの検証。 ✓ HDAC6 knockout線維芽細胞との共培養系確立による、Paget-CAF間の腫瘍間質相互作用が、浸潤・転移能に影響を与えるか検証する。
2	ヒト腫瘍組織に於ける免疫組織解析	<ul style="list-style-type: none"> ✓ 原発巣・転移巣に於ける発現解析により、上記の細胞生物学的実験結果が裏付けられるか検証する。
3	Xenograft モデルにおけるHDAC6/COX2 阻害薬の浸潤転移、増殖に与える影響の解析	<ul style="list-style-type: none"> ✓ 進行期Paget病原発巣から樹立したxenograftを用いて、HDAC6/COX2阻害薬の浸潤・転移および増殖能の抑制効果の有無を検証する。

4. 研究成果

(1) STEP1: 希少癌である乳房外 Paget 病の培養細胞株は市販ベースで入手できないため、ERBB2 強陽性の乳癌細胞株 SKBR3 を用いて HDAC6 knockdown の実験を行い、以下の結果を得た。siHDAC6 処理により ERBB2 膜蛋白の発現を減少させた(図 1)。COX2 の発現減少も確認された。上記の発現低下機構は、ERBB2 を refolding して再生する HSP90 蛋白の hyperacetylation により蛋白分解が亢進した事が原因と考えられた。

さらに、PGE1/2/3 の mRNA 発現上昇が認められた細胞株では HDAC6 とその関連分子の発現増加も誘導されていた。一方、ERBB2 陽性細胞株からの PGE2 の分泌は mRNA レベルでの増加を認めたものの培養上清の ELISA で検出可能なレベルでの発現増加は確認出来なかった。COX2/ HDAC6 過剰発現がん細胞では、細胞増殖、ならびに浸潤能が 20%程度亢進していることが明らかとなった。

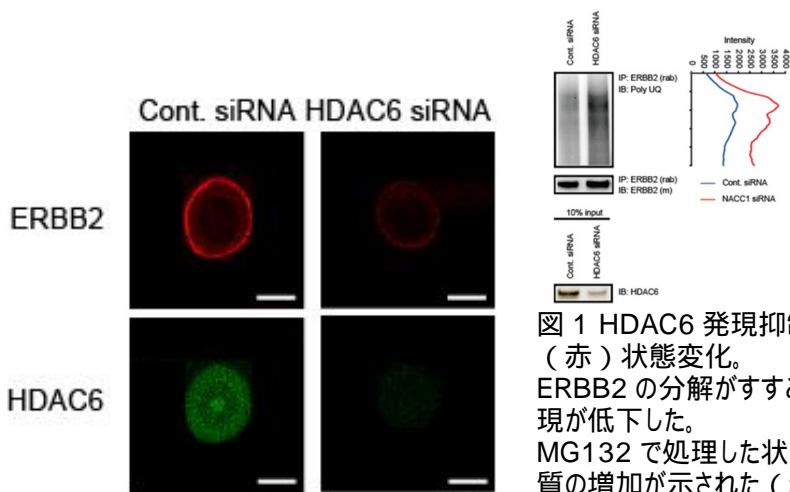


図 1 HDAC6 発現抑制による ERBB2 蛋白 (赤) 状態変化。ERBB2 の分解がすすみ、膜表面の ERBB2 の発現が低下した。MG132 で処理した状態での IP-Western で蛋白質の増加が示された(赤)。

(2) STEP2: 乳房外 Paget 病の免疫組織学的検討では、6 割(24/40, 60%)で乳がんと同様に ERBB2 遺伝子の増幅、蛋白質の過剰発現を認めた。これらの腫瘍では HDAC6、COX2 過剰発現を共に認め、浸潤転移例が有意に多かった(図 2)。図 2 の様な強陽性像は進行期の乳房外 Paget 病の浸潤先端部で確認され、周囲には SMA 陽性の CAF と見られる線維芽細胞が多数認められた。これらの HDAC6 陽性の細胞は集塊を形成し collective cell invasion の動態を示していた。

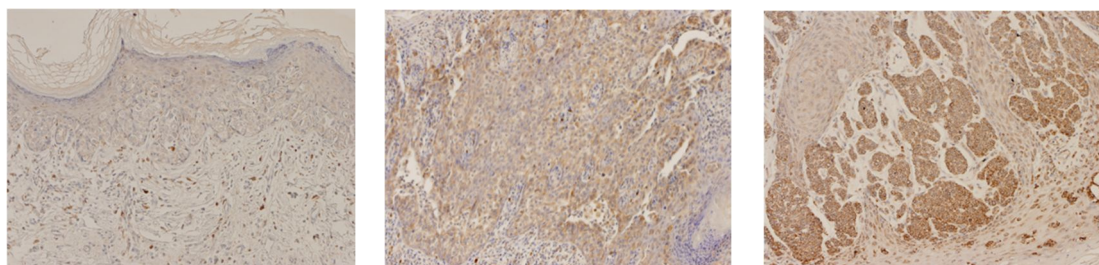


図 2 乳房外 Paget 病に於ける COX2 の発現 6

強発現を示す症例（右）は HDAC6 過剰発現を示していた。

(3) STEP3：進行期乳房外 Paget 病の患者さんの同意が得られず、Xenograft の作製目的の組織採取が出来なかった。研究期間内に阻害剤[tubastatin A (HDAC6)、celecoxib (COX2)]による乳房外 Paget 病治療法確立のための基礎実験に至らなかった。

(4)研究開始にあたり、以下の様なモデルを考えた。大部分の乳房外 Paget 症例は、緩徐な増殖動態を呈し上皮内癌で留まるものの、広範な上皮内進展のために外科切除困難例や局所再発例が多くなる (first explosion)。一方、浸潤・転移巢の組織学的特徴は、悪性黒色腫に見られる EMT (epithelial-mesenchymal transition)を基調とした single cell invasion/ metastasis ではなく、複数の腫瘍細胞が集塊を形成して移動する、collective cell invasion/metastasis である。浸潤する Paget 細胞の周囲に細胞質内ヒストン脱アセチラーゼ (HDAC6) 蛋白を過剰発現し、形質転換した癌関連線維芽細胞 (cancer-associated fibroblast, CAF) は COX2 誘導により、MMP9 等のメタロプロテアーゼを分泌し、collective cell invasion を示す腫瘍細胞の周囲において細胞外マトリクスを分解し、間葉アモイブ様転換 (mesenchymal-amoeboid transition: MAT) をアシストする。COX2 によって局所で過剰分泌された prostaglandin (PG) は、CAF に於ける MMP の産生を誘導する。

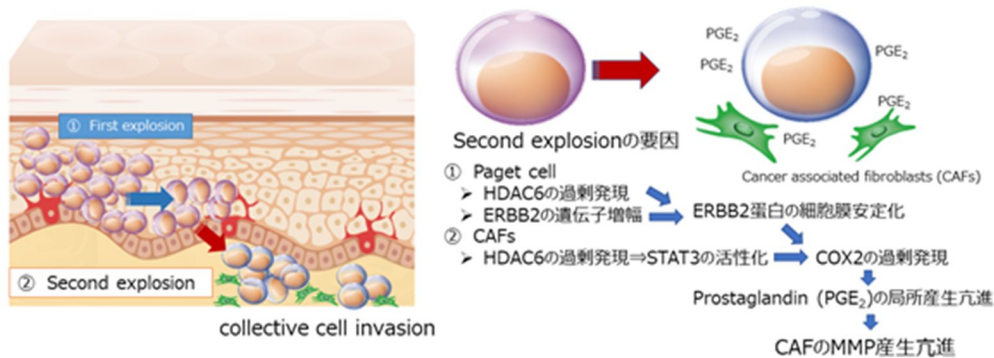


図 3 乳房外 Paget 病に於ける COX2 の発現と HDAC6 の関連に係る作業仮説

(1) ~ (3) の研究成果では、この作業仮説を証明するには至らなかった。中でも、阻害薬による CAF と Paget cell との微小環境を介した相互作用の阻害実験の実施に至らなかった事が大きな要因である。一方で、免疫染色の結果は浸潤先進部での CAF の存在を示唆しており更なる解析が必要と考えられた。

<引用文献>

- 1) Morris CR, Hurst EA. Extramammary Paget's Disease: A Review of the Literature Part II: Treatment and Prognosis. *Dermatol Surg* 2020 Mar;46(3):305-311.
- 2) Tsunoda K, Oikawa H, Tada H, Tatemichi Y, Muraoka S, Miura S, Shibazaki M, Maeda F, Takahashi K, Akasaka T, Masuda, Maesawa C. Nucleus accumbens-associated 1 contributes to cortactin deacetylation and augments the migration of melanoma cells. *J Invest Dermatol* 2011 Aug;131(8):1710-9.
- 3) Gasparini G, Longo R, Torino F, Morabito A. Therapy of breast cancer with molecular targeting agents. *Ann Oncol* 2005 May;16 Suppl 4:iv28-36.
- 4) Wang KH, Kao AP, Chang CC, Lee JN, Hou MF, Long CY, Chen HS, Tsai EM. Increasing CD44+/CD24(-) tumor stem cells, and upregulation of COX-2 and HDAC6, as major functions of HER2 in breast tumorigenesis. *Mol Cancer* 2010 Nov 2;9:288.
- 5) Zhang G, Gan YH. Synergistic antitumor effects of the combined treatment with an HDAC6 inhibitor and a COX-2 inhibitor through activation of PTEN. 2017 Nov;38(5):2657-2666.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Onishi Masazumi, Tsunoda Kanako, Maeda Fumihiko, Moriwaki Shinichi, Amano Hiroo	4. 巻 12
2. 論文標題 Angiosarcoma of the Auricle in a Patient with Xeroderma Pigmentosum Variant	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Case Reports in Dermatology	6. 最初と最後の頁 144 ~ 149
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000508884	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Tsunoda K, Onishi M, Miura S, Amano H	4. 巻 100
2. 論文標題 Effectiveness of Combined Anti-programmed Death-ligand 1 Therapy and Radiotherapy for Metastatic Merkel Cell Carcinoma: Two Case Reports	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Acta Dermato Venereologica	6. 最初と最後の頁 00237 ~ 00237
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2340/00015555-3593	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Tsunoda K, Onishi M, Maeda F, Akasaka T, Sugai T, Amano H	4. 巻 99
2. 論文標題 Evaluation of Sentinel Lymph Node Biopsy for Eccrine Porocarcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Acta Dermato Venereologica	6. 最初と最後の頁 691 ~ 692
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2340/00015555-3173	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------