

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591322

研究課題名(和文) 皮膚紫外線発癌における表皮角化細胞 Stat3 シグナルの関与

研究課題名(英文) Constitutive activation of Stat3 reveals a critical role in UVB-induced epithelial carcinogenesis

研究代表者

横川 真紀 (YOKOGAWA MAKI)

高知大学・教育研究部医療学系・助教

研究者番号：40346721

研究成果の概要(和文)：近年、皮膚癌をはじめとする多くのヒト悪性腫瘍で Stat3 シグナルの活性化が明らかにされている。我々は、Stat3 が恒常的に活性化されているマウスに紫外線誘発性皮膚癌を発生させ、Stat3 シグナル阻害剤である STA21 を塗布した。その結果、STA21 塗布により紫外線誘発性皮膚癌の発生や進行が抑制されることが示された。Stat3 シグナル阻害剤は、紫外線により誘発されるヒト日光角化腫や有棘細胞癌の新たな治療法となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Constitutive activation of Stat3 has been found in many human malignancies including skin cancer. Here we examined whether inhibition of Stat3 signaling affected the progression of UVB-induced cancer in Stat3-constitutive active mice (K5.Stat3C). We used a small compound Stat3-inhibitor, named STA-21 (ochromycinone). Pretreatment of topical STA-21 application delayed the appearance of UVB-induced cancer. Furthermore, STA-21 markedly inhibited the growth of cancer at the progressive stage, whereas vehicle-treated control mice developed invasive cancer. These results indicated that Stat3 inhibition decreased the UVB-induced carcinogenic process, and therefore, could be a novel therapy for actinic keratosis and SCC.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：紫外線、発癌、表皮角化細胞、Stat3

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、本邦における高齢人口比率上昇に伴い、皮膚疾患においては高年者が罹患する日光角化症、有棘細胞癌が増加傾向にあり、予防医学的見地からより早期に発見、治療することが喫緊の課題であり医療資源的にも有意義である。

(2) また、近年、多くの悪性腫瘍で細胞内のシグナリング異常が明らかになっている。特にチロシンリン酸化のシグナルカスケードが発癌機構に関与していることが明らかになり、それを阻害する「分子標的療法」が癌治療の新たなトレンドとなっている。なかでも Stat3 活性化によるシグナリングがヒトの

乳癌、頭頸部癌、菌状肉腫、リンパ腫など様々な悪性腫瘍において報告され、続いて有棘細胞癌を始めヒト皮膚癌においても Stat3 の活性化が明らかにされた。

(3) 最近、分担研究者の佐野らは、皮膚化学発癌系において Stat3 シグナルが発癌のための initiation, promotion, progression, invasion のすべてのステップで必須であることを初めて報告し、このシグナルを阻害することが皮膚癌発症の予防、治療に有用である可能性を示唆した。さらに佐野らは、Stat3 が紫外線照射後の表皮角化細胞の生存に重要な働きをしており、Stat3 遺伝子ノックアウトマウスでは紫外線照射によって容易にアポトーシスが誘導されることを示した。逆に、表皮角化細胞 Stat3 の恒常的に活性化されたマウス (K5.Stat3C) において、表皮は紫外線照射抵抗性を示し、照射後の細胞分裂が強く誘導された。このことから、紫外線発癌は化学発癌と同様に Stat3 シグナルに依存している可能性が示唆される。

2. 研究の目的

(1) 一般に、紫外線暴露によつての核 DNA に障害が生じた表皮角化細胞は細胞死により排除される運命にある。一方、Stat3 が過剰に活性化した状況では細胞死から救済されて生き残る確率が高まる、すなわち initiation を受けたクローンとして残存しうると思われる。またさらなる紫外線照射により異常クローンの増殖が起こり (promotion)、結果的に発癌への道筋をたどるものと予想される。本研究の目的は、このように紫外線による表皮角化細胞の発癌が細胞内シグナルの異常にもとづくものであるという仮説を証明することにある。またそのシグナルを是正あるいは阻害することが新規の治療法となりうる可能性を実験的に確認したい。

(2) 具体的には、紫外線誘発系における表皮角化細胞の発癌過程に必要な Stat3 の役割をまず明らかにする。次に Stat3 活性化型トランスジェニックマウス (K5.Stat3C) が対照マウスに比べて、化学発癌系同様、紫外線照射後より早く、より数多くの表皮腫瘍を発症し、その中でも癌化してくる腫瘍の割合が高いか検討する。さらに、Stat3 デコイオリゴヌクレオチドあるいは他の特異的阻害薬の投与により Stat3 シグナルの阻害が化学発癌の系で示されたと同様、紫外線発癌の抑制あるいは治療に有用であるか検討する。

3. 研究の方法

(1) 紫外線発癌系における表皮角化細胞 Stat3 の役割

剃毛後のマウス皮膚に UVB を反復照射し、生じた表皮の腫瘍芽 (tumor buds) について表

皮角化細胞の Stat3 の活性化の有無を免疫組織学的に検討する。また同時に組織 RT-PCR あるいは Western 法により Stat3 下流の分子、例えば c-Myc, cyclinD1, Bcl-xL などのレベルを解析する。次に、Stat3 デコイオリゴヌクレオチドあるいは Stat3 シグナルを阻害する小分子 STA21 を外用投与することにより tumor bud 形成にいかなる影響を与えるか確かめる。すなわち Stat3 活性化の程度、表皮肥厚の変化および下流の分子など発現レベルの変化を組織学的、mRNA、あるいは蛋白レベルでそれぞれ解析する。さらに、UVB 反復照射により発生した皮膚腫瘍に対し、上記 Stat3 阻害物質を外用投与しその効果を上記同様に解析する。

(2) 表皮 Stat3 活性化型マウス (K5.Stat3C) を用いた紫外線発癌実験

分担研究者佐野らによつて、K5.Stat3C マウスは表皮角化細胞の Stat3 が恒常的に活性化状態にあり、化学発癌ではより早期に腫瘍が出現し、しかもすべて癌として発症、浸潤傾向があり遠隔転移も来しやすいことが明らかになっている。このマウスにおいて紫外線反復照射により発生する腫瘍を正常マウスと比較する。紫外線照射による発癌機構は initiation, promotion いずれも兼ねており、2段階化学発癌系と同様の結果が得られるものと予想する。解析は上記同様に免疫組織学的、RT-PCR、Western などにて解析する。多発する紫外線誘発性皮膚癌モデルがこのマウスで確立されたなら、Stat3 阻害剤外用が発症抑制および治療法としても有効かを検討する。

(3) 化学・紫外線発癌実験

皮膚化学発癌実験では tumor initiation, tumor promotion の2段階のそれぞれ処理は、化学物質 DMBA

(7,12-dimethylbenzanthracene) の1回塗布、TPA

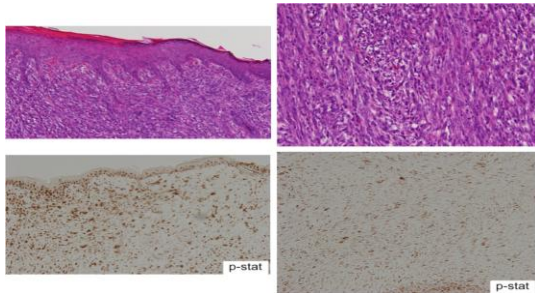
(12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate) の反復塗布による方法が用いられている。紫外線発癌はこの2段階を含むと想定される。臨床的によく見られる日光角化症、ポーエン病、有棘細胞癌は日光露光部に好発する傾向があるため、mutagen としての化学物質の曝露がまずあり (initiation)、その後 tumor promoter として紫外線刺激が働くと考えるのが合理的である。これを証明するために、マウス皮膚にまず DMBA 塗布を行ったのち紫外線を反復照射して発癌する過程を再現する。ここでは化学発癌系および紫外線単独刺激による発癌過程を対照として比較検討する。ここで生じた皮膚癌について Stat3 活性化等の検討をしたい。方法は上述に準じる。

4. 研究成果

(1) 紫外線発癌系における表皮角化細胞

Stat3 の役割

①正常マウス背部を剃毛し、耳介と背部に紫外線(UVB)2kJ/m²を週3回反復照射した。照射22週までは腫瘍は発生しなかったが、30週照射にて約40%の個体に耳介腫瘍(spindle cell tumor)が発生することが明らかとなった。これら腫瘍細胞の一部でStat3活性化を確認し、Stat3シグナルが関与した腫瘍であると推測した。



②紫外線反復照射にて発生した耳介腫瘍にStat3シグナルを阻害する小分子STA21を週3回塗布し、その治療効果を検討したが、有意な腫瘍の消退は得られなかった。腫瘍細胞(spindle cell)の性質について免疫組織化学的に詳細な検討を行ったところ、Stat3活性化の程度に個体差があり、それが治療効果の不均一性に反映されたのではないかと考えた。

③まず紫外線反復照射のみを、引き続いてSTA21塗布と紫外線照射を平行して行い、STA21の発癌予防効果を検討した。先行する25週間は紫外線反復照射のみを、続く5週間はSTA21塗布と紫外線照射を平行して行ったところ、STA21を塗布した右耳介に腫瘍は発生しなかったが、塗布していない対側の左耳介に有意差を持って spindle cell tumor が発生した。

Ear tumors in FVB irradiated for 30 weeks



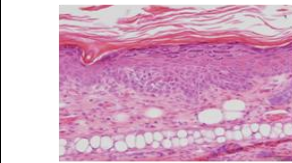
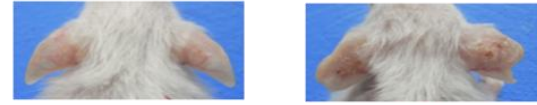
Spindle cell tumor incidence
4* / 9 (p<0.05) 0 / 9

以上より、正常マウスにおいて紫外線によりStat3シグナルが関与する腫瘍が発生し、STA21塗布によりその発生が抑制されることが明らかとなった。

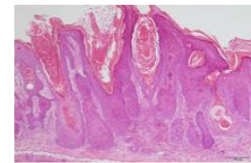
(2) 表皮 Stat3 活性化型マウス(K5.Stat3C)を用いた紫外線発癌実験

①K5.Stat3Cマウス背部を剃毛し、耳介と背部に紫外線(UVB)2kJ/m²を週3回反復照射

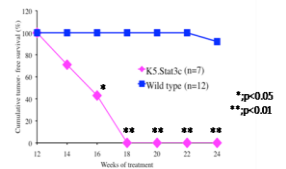
した。K5.Stat3Cマウスでは、照射12週頃より背部皮膚および耳介に皮膚腫瘍が発生し、14週~16週頃より皮膚癌に明らかに進展した。腫瘍を病理組織学的に検索しStat3活性化を伴う皮膚癌であることを確認した。



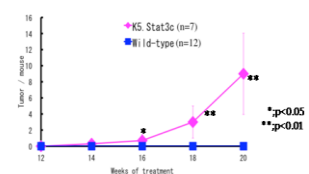
Precancerous lesions
12 wks of UVB irradiation



SCCs
16 wks of UVB irradiation

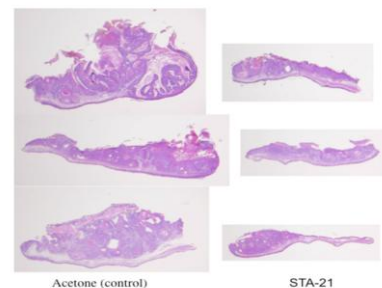


Percentage of mice without skin tumors

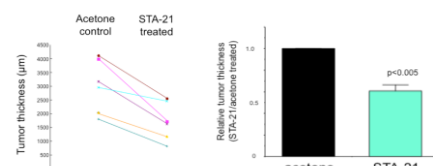


Average number of skin tumors per mouse

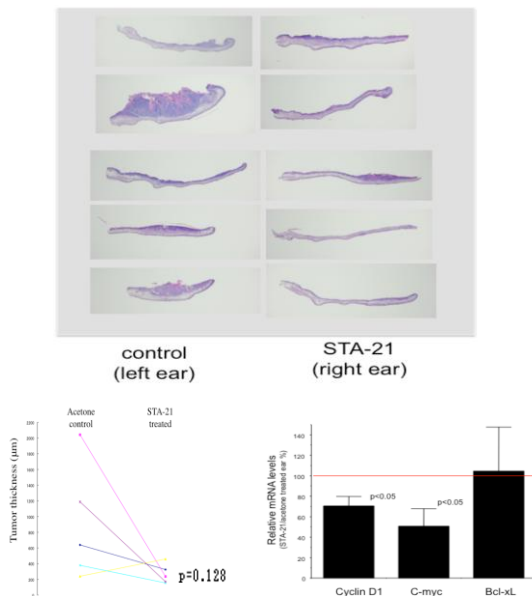
②紫外線反復照射を異なる期間行い、マウス耳介に皮膚癌、早期皮膚癌および前癌病変を発生させた。各々の病変にSTA21を週3回塗布し、STA21の治療効果を検討した。前癌病変および早期皮膚癌においては、STA21塗布により一定の進行抑制効果は得られたが、病変を消退させるには至らなかった。18週間紫外線を反復照射して発生させた皮膚癌に4週間STA21を週3回塗布したところ、STA21を塗布していない対側の耳介において有意に皮膚癌の進展がみられ、STA21による紫外線誘発皮膚癌の進行抑制効果が示唆された(下図)。しかし、いずれのステージの病変においても、組織RT-PCRによるStat3下流の分子(c-Myc、cyclinD1、Bcl-xL)の発現レベル解析では、個体差が大きく一定の傾向を見いだせなかった。



Acetone (control) STA-21



③STA21 塗布と紫外線照射を平行して行い、その予防効果を検討した。17 週間 STA21 塗布と紫外線照射を平行して行ったところ、発癌抑制効果が示唆され、組織 RT-PCR による Stat3 下流の分子 (c-Myc、cyclinD1、Bcl-xL) の発現レベルの解析では Bcl-xL の発現が有意に増強していた。



以上より、紫外線照射による発癌機構は initiation, promotion いずれも兼ねており、2 段階化学発癌系と同様に紫外線発癌系においても表皮角化細胞の Stat3 の活性化が必要であることが示唆された。そして、紫外線誘発性皮膚癌モデルをこのマウスで確立することができた。さらに、Stat3 シグナル阻害薬が紫外線発癌の予防あるいは治療に有用であり、「分子標的療法」となりうる可能性が示された。

(3) 化学・紫外線発癌実験

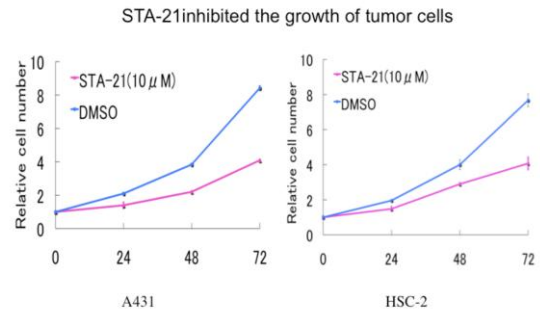
正常マウスと K5. Stat3C マウス背部を剃毛し、まず DMBA 塗布を行った後、紫外線 (UVB) 2kJ / m² を週 3 回反復照射した。腫瘍の発生は、上記 (1) および (2) とほぼ同時期であり、進展した皮膚癌は Stat3 活性化を伴っていた。

(4) in vitro 実験

①核内で Stat3 活性化が確認されているヒト子宮頸癌由来の腫瘍細胞株 SKG-II 細胞に STA21 を加えて培養した。それにより、核内における Stat3 の活性化が阻害され、Western 法による解析にて Stat3 下流の分子である c-Myc と cyclinD1 発現レベルが抑制された。

②ヒト有棘細胞癌由来の腫瘍細胞株 A431 と HSC2 を用いて、STA21 による増殖抑制効果を

MTS assay にて検討したところ、STA21 濃度依存性に増殖が抑制された。



③K5. Stat3C マウスに紫外線 (UVB) 2kJ / m² を週 3 回反復照射し発生させた皮膚癌から腫瘍細胞株を樹立した。そして、この細胞に対する STA21 による増殖抑制効果を MTS assay にて検討したところ、STA21 濃度依存性に増殖が抑制された。

以上より、STA21 により腫瘍細胞の増殖が抑制されることが示された。

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 1 件)

①横川真紀、佐野栄紀、日光角化症におけるイミキモドの抗腫瘍作用：モデルマウスを用いた解析、加齢皮膚医学セミナー、査読無、in press

[学会発表] (計 4 件)

① 横川真紀、Topical treatment with imiquimod suppressed UVB-induced skin carcinogenesis、The 40th Annual ESDR Meeting、2010年9月10日、ヘルシンキ (フィンランド)

②横川真紀、日光角化症におけるイミキモドの抗腫瘍作用：モデルマウスを用いた解析、第6回加齢皮膚医学研究会、2010年7月3日、新潟

③横川真紀、Topical treatment with a Stat3 inhibitor suppressed UVB-induced skin carcinogenesis、第34回 日本研究皮膚科学会、2009年12月5日、福岡 (福岡県)

④横川真紀、Constitutive activation of Stat3 reveals a critical role in UVB-induced epithelial carcinogenesis、The 39th Annual ESDR Meeting、2009年9月11日、ブダペスト (ハンガリー)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横川 真紀 (YOKOGAWA MAKI)

高知大学・教育研究部医療学系・助教

研究者番号：40346721

(2)研究分担者

三好 研 (MIYOSHI KEN)
高知大学・教育研究部医療学系・助教
研究者番号：20274392
平成20年4月～平成23年3月末

佐野 栄紀 (SANO SHIGETOSHI)
高知大学・教育研究部医療学系・教授
研究者番号：80273621
平成20年4月～平成23年3月末

寺石 美香 (TERAISHI MIKA)
高知大学・医学部附属病院・医員
研究者番号：40437736
平成20年8月26日～平成23年3月末

志賀 建夫 (SHIGA TAKEO)
高知大学・教育研究部医療学系・助教
研究者番号：70444768
平成20年4月～平成20年8月26日

池田 光徳 (IKEDA MITSUNORI)
高知県立大学・健康長寿センター・教授
研究者番号：70212785
平成20年4月～平成21年3月末

高石 樹朗 (TAKAISHI MIKIRO)
高知大学・教育研究部医療学系・助教
研究者番号：10303223
平成21年4月～平成23年3月末