

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：13401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17313

研究課題名(和文) 硬化性萎縮性苔癬における細胞外基質への免疫異常を発端とした新たな癌化機構の解明

研究課題名(英文) A novel pathomechanism of carcinogenesis caused by immune dysregulation to extracellular matrix molecules in lichen sclerosis.

研究代表者

宇都宮 夏子 (Utsunomiya, Natsuko)

福井大学・学術研究院医学系部門(附属病院部)・医員

研究者番号：50792090

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：硬化性苔癬の病変部皮膚では、基底膜の接着分子4型/7型コラーゲン、ラミニン332の発現が不規則に断裂や肥厚しており、真皮血管壁の4型コラーゲンが膨化や2重化していた。多くの本症の血清中には抗extracellular matrix protein 1 (ECM1)抗体が存在し、その抗体価は疾患の重症度や局所の癌化と相関することが指摘されているが、7型コラーゲンとECM1タンパクが直接結合することを抗原特異的なELISA法で確認した。ECM1をsiRNA法でノックダウンしたヒト線維芽細胞をcDNAマイクロアレイで解析したところ、基底膜抗原の他に上皮-間葉転換関連分子の発現レベルが変化していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

国内外の共同研究では、硬化性苔癬血清中の抗ECM1抗体を用いた癌化評価の医学的ニーズは高い。得られた研究成果が癌間質分子を標的とする創薬に結び付けば、癌自体を標的とする既存の抗癌剤との併用も可能な機序であり、相乗効果や耐性の獲得を一層回避できる治療戦略を構築できる。ECM1は固形癌や転移巣で過剰発現したり、ECM1機能異常がTh2タイプの気道過敏性を減弱させるなど、アレルギーや発癌などの多様性を担う。液性免疫異常を基盤に発症すると考えられる硬化性苔癬を基盤にして、ECM1が皮膚老化や発癌イベントの上流に位置する分子、他の疾患にもトレースし得るバイオマーカーの可能性を支持する結果につながる。

研究成果の概要(英文)：In the lesional skin of lichen sclerosis, the expression of major adhesion molecules, such as type IV/VII collagens and laminin 332 in the basement membrane was irregularly notched or thickened, and that of type IV collagen in the dermal vessel wall was swollen or duplicated. As anti-extracellular matrix protein 1 (ECM1) antibodies are present in the serum from a majority of patients, their antibody titer has been shown to correlate with disease severity and local tumorigenesis. Normal human fibroblasts with siRNA knockdown specific for ECM1 were analyzed by cDNA microarray. The expression levels of epithelial-mesenchymal transition-related molecules, as well as some basement membrane antigens, were altered.

研究分野：自己免疫性皮膚疾患

キーワード：硬化性苔癬 細胞外基質 ECM1 laminin 332 collagen 4 collagen 7 皮膚線維芽細胞

1. 研究開始当初の背景

皮膚の細胞外基質は炎症、老化や発癌、さらには癌細胞自体の進展に関与している重要な分子群である。特に、皮膚老化に伴う発癌や癌の進展には、癌周囲の炎症や細胞外基質ネットワークのバランス破綻が関与している。この微小環境に依存する癌制御機構は、薬剤の臓器特異性や耐性の成立にも影響する重要な免疫応答を担うことが分かってきた。多種に及ぶ基質成分の中でも、これらの生体内イベントと密接に相関し、その程度や病勢を評価できる疾患感受性基質やバイオマーカーの新規発掘が望まれている。細胞外基質の1つである extracellular matrix protein 1 (ECM1) は皮膚や諸臓器に幅広く分布し、本分子を標的とするヒトの遺伝性皮膚疾患(皮膚粘膜ヒアリノーシス)および自己免疫異常状態(硬化性苔癬)は、いずれも加齢に伴って皮膚の光老化や皮膚癌を高率に生じる。これらのイベントは ECM1 単一分子の機能障害が引き金になるが、皮膚における他の細胞外基質や構造分子の発現異常や接着障害が介在することで、障害の程度が規定される。

その一方、個々の基質成分の重要性の位置付けに関する知見はいまだ希薄であり、上述した皮膚の発癌イベントごとに異なることが予想される感受性因子や病勢のバイオマーカーとしての有用性の評価と確立が重要な課題である。

2. 研究の目的

本研究では、我々が以前から取り組んできた硬化性苔癬(ヒト ECM1 免疫異常)の病変部皮膚において、ECM1 の生体内における機能が他の細胞外基質や構造分子との相互作用に与える影響、炎症・発癌の誘導過程を解析することを目的とする。

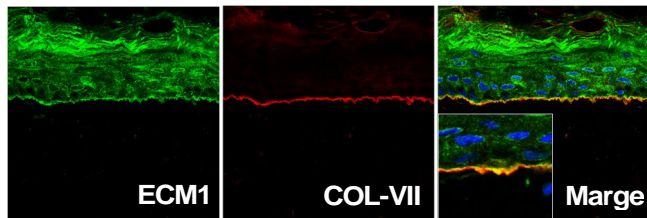
すなわち、ECM1 依存的な皮膚癌の運動機能転換および免疫回避能と連動する癌微小環境の変化を解析し、ECM1 の「癌間質制御マスター分子」としての可能性を検討する。さらに ECM1 の挙動と連動する細胞外基質を特定し、これらを標的とした新たな皮膚癌の治療応用への展開を図る。本研究は、ECM1 を介して特定の細胞外基質のもつ、皮膚の癌微小環境の恒常性、癌細胞の寛容化の獲得と運動機能シフト、という多面性に迫る研究テーマである。得られた結果を基盤として、周辺間質分子の標的治療を視野にいれた臨床応用の基盤を構築することを目的とする。

3. 研究の方法

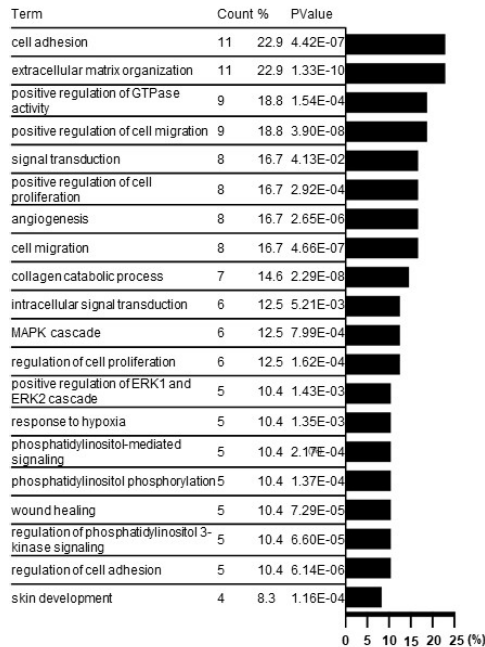
硬化性苔癬患者の病変部皮膚を用いて、様々な基底膜含有抗原に対する特異的抗体で免疫染色とレーザー共焦点顕微鏡での観察を行った。さらに、膠原線維と弾性線維を染め分けて、本症の病変の主座である真皮線維の客観的な変性所見を同定した。基底膜における主たる接着分子 4 型および 7 型コラーゲン、ラミニン 332 の発現様式を検討した。7 型コラーゲンと ECM1 タンパク自体が直接 *in vitro* で結合することを抗原特異的な ELISA 法で評価した。次に、*in vitro* で ECM1 の細胞生物学的な機能を検討すべく、ECM1 分子を siRNA 法でノックダウンしたヒト線維芽細胞を作成し、cDNA マイクロアレイで遺伝子発現を網羅的に解析した。

4. 研究成果

硬化性苔癬の病変部皮膚では、表皮真皮境界部の基底膜の主要な接着分子のうち、4 型および 7 型コラーゲン、ラミニン 332 の発現が不規則に断裂や肥厚しており、真皮血管壁に発現する 4 型コラーゲンが膨化や 2 重化していた。本症の多くの血清中には抗 extracellular matrix protein 1 (ECM1) 抗体が存在し、その抗体価は疾患の重症度や将来的な局所の癌化と相関することが指摘されている。この抗体が標的とする ECM1 分子と、上述した硬化性苔癬特異的に発現形態が異なる主要な抗原との反応性を、抗原特異的 ELISA 法で検討した。その結果、7 型コラーゲンと ECM1 タンパクが *in vitro* で濃度依存的に直接結合すること、さらには 7 型コラーゲンと ECM1 の発現が皮膚基底膜において一致していることをレーザー共焦点顕微鏡で確認した(下図)。



すなわち、7型コラーゲンと ECM1 タンパクの微小な局在が一致することで、皮膚基底膜の構造的強度を維持しながら、表皮と真皮との分子相互作用を仲介している可能性を示していると考えられる。



次に、ECM1 分子の主たる真皮構成要素である線維芽細胞における重要性を評価すべく、本分子を siRNA 法で特異的にノックダウンしたヒト線維芽細胞を作成した。得られた細胞群と正常の線維芽細胞から抽出した cDNA の発現レベルをマイクロアレイで網羅的に解析した。

その結果、ECM1 欠損によって、線維芽細胞の細胞接着や遊走能、他の細胞外基質の発現調節や分布に関わる遺伝子群の発現が亢進していた。これらの発現変化があった遺伝子を詳細に調べた結果、基底膜抗原の他に上皮 - 間葉転換関連分子の発現レベルが変化していた。

この結果は、線維芽細胞には ECM1 分子自体の発現変化に応じて他の細胞外基質の発現をコントロールするシステムが存在すること、ECM1 が他の細胞外基質のマスター分子になっている可能性があることを示唆している。細胞外基質の発現の増減は、皮膚を初めとする多くの固

形がんの進展や治療抵抗性にもつながることが分かっている。上記の結果は、ECM1 ががん関連細胞外基質の発現調節の上流に位置する分子である可能性を指摘するものである。

国内外の共同研究では、硬化性苔癬血清中の抗 ECM1 抗体を用いた癌化評価の医学的ニーズは依然として高い。今後の展望として、得られた研究成果が癌間質分子を標的とする創薬に結び付けば、癌自体を標的とする既存の抗癌剤との併用も可能な機序であり、相乗効果や耐性の獲得を一層回避できる治療戦略を構築できる。

ECM1 は固形癌や転移巣で過剰発現したり、ECM1 機能異常が Th2 タイプの気道過敏性を減弱させるなど、アレルギーや発癌などの多様性を担う。液性免疫異常を基盤に発症すると考えられる硬化性苔癬を基盤にして、ECM1 が皮膚老化や発癌イベントの上流に位置する分子、他の疾患にもトレースし得るバイオマーカーの可能性を支持する結果につながると予想される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Utsunomiya Natsuko, Utsunomiya Akira, Chino Takenao, Hasegawa Minoru, Oyama Noritaka	4. 巻 100
2. 論文標題 Gene silencing of extracellular matrix protein 1 (ECM1) results in phenotypic alterations of dermal fibroblasts reminiscent of clinical features of lichen sclerosus	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Dermatological Science	6. 最初と最後の頁 99 ~ 109
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jdermsci.2020.06.010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Kasamatsu H, Chino T, Hasegawa T, Utsunomiya N, Utsunomiya A, Oyama N, Yamada M, Hasegawa M
2. 発表標題 A calpain inhibitor ALLN attenuates bleomycin-induced skin fibrosis in a mice model
3. 学会等名 46th Annual Meeting, Japanese Society for Investigative Dermatolgy (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kasamatsu H, Chino T, Hasegawa T, Utsunomiya N, Utsunomiya A, Oyama N, Yamada M, Hasegawa M
2. 発表標題 A calpain inhibitor ALLN alleviates bleomycin-induced skin fibrosis via antagonizing TGF-β/Smad signaling pathway
3. 学会等名 79th Annual Meeting, Society for Investigative Dermatology (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔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
---------	---------