

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 8 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21591428

研究課題名(和文) ダーモスコピーと遺伝子発現解析による皮膚腫瘍の非侵襲的術前迅速診断法の開発

研究課題名(英文) Noninvasive preoperative skin tumor diagnosis by the gene expression analysis and dermoscopy

研究代表者

斎田 俊明 (SAIDA TOSHIAKI)

信州大学・医学部・特任教授

研究者番号：10010381

研究成果の概要(和文)：

MART-1, MAGEA3, FABP7, Gli-1, GPR49, KRT1, KRT5, CD10, VEGF, CXCR4; P27KIP1, P53, GAPDH の PCR マーカー発現をメラノーマ 50 例、色素細胞母斑 16 例、基底細胞癌 25 例、脂漏性角化症 3 例、汗孔腫 3 例、正常皮膚 23 例について検討した。次に詳細なダーモスコピー所見を調べその結果を基に各所見をパラメータとして疾患ごとに多変量解析を行い、導きだされたデンドログラムから各疾患の診断に有用なダーモスコピー所見を選択した。以上の結果を統合し、本非侵襲的術前迅速診断法において有用な陽性所見を決定した。

研究成果の概要(英文)：

We examined PCR marker expressions for 50 melanoma, 16 pigment cell nevus, 25 basal cell carcinoma, 3 seborrheic keratosis, 3 poroma and 23 normal skin. We performed multivariate analysis with the PCR results and frequency of dermoscopic characteristics for each skin tumor. Finally we proposed specific criteria for this noninvasive diagnostic method.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：皮膚科学

科研費の分科・細目：皮膚腫瘍学

キーワード：ダーモスコピー、デンドログラム、メラノーマ、基底細胞癌、脂漏性角化症、色素細胞母斑、迅速診断

## 1. 研究開始当初の背景

わが国では近年の人口の高齢化に伴い、皮膚腫瘍患者が急増している。皮膚にはその悪性度が大きく異なる様々な腫瘍が発生するので、個々の症例の治療方針を適切に決定するためには正確な術前診断が不可欠である。現在、術前診断にはダーモスコピーが広く用いられているが、その精度は必ずしも満足のものではなく、新たな手法を加えた迅速かつ

非侵襲的な診断法の確立が急務である。

## 2. 研究の目的

日常診療において頻度が高く、かつ診断に苦慮することの多い悪性黒色腫、色素細胞母斑、基底細胞癌、脂漏性角化症、エクリン汗孔腫、エクリン汗孔癌を対象とし、ダーモスコピーと針生検による遺伝子診断を組み合わせた非侵襲的迅速術前診断法を開発する。

### 3. 研究の方法

(1) 組織内各種腫瘍マーカー発現量の計測  
①腫瘍に 5ml シリンジを付けた 23G 針を穿刺する。

②23G 針の中の微量の組織から RNeasy Fibrous Tissue(キアゲン)を用いて RNA を抽出する。

③RNA を cDNA (MMRV) にして、15 種類のマーカーで real time PCR を行う。

検討した PCR マーカーは以下の通りである  
メラノーマ、色素細胞母斑 : MART-1、MAGEA3、FABP7

脂漏性角化症 : P27KIP1

基底細胞癌 : Gli-1、GPR49、KRT1、KRT5、CD10

ポローマ/ポロカルチノーマ : P53、CD10

その他 : VEGF、CXCR4、Ki67、GAPDH

#### (2) ダーモスコピー所見の抽出

これまで文献的に報告されている各皮膚主要の特異的なダーモスコピー所見の有無を、全症例について検討した。検討したダーモスコピー所見は以下の 31 項目である。

- pigment network
- dots/globules
- streaks
- blue pigmentation
- milia-like cysts
- comedo-like openings
- finger-like structures
- cerebriform pattern
- arborizing vessels
- leaf-like structures
- ovoid nests
- blue-gray globules
- spoke-wheel areas
- ulceration
- red-blue lacnae
- red-bluish homogeneous areas
- delicate pigment network
- white scar-like patch
- hairpin vessels
- comma-like vessels
- crown vessels
- dotted vessels
- linear-irregular vessels
- polymorphous vessels
- glomerular vessels
- erythema
- milky-red globules/areas
- blue whitish veil
- regression structures
- hypopigmented areas
- blotch

### 4. 研究成果

#### (1) 遺伝子診断

総検体数は腫瘍 97 例、正常皮膚 23 例の計 120 例であった。その内訳は、メラノーマ 50 例、色素細胞母斑 16 例、脂漏性角化症 3 例、基底細胞癌 25 例、ポローマ/ポロカルチノーマ 3 例。

1 回の穿刺で採取できる RNA 量は 3~7ug で安定していた。

RealtimePCR の結果から、各マーカーのカットオフ値を統計学的に求めた。検討の結果、いくつかのマーカーは下記の理由で使用できないことが判明した；

P27 KIP-1:正常で出すぎていて有意な差がないので使えない。

CK1 :正常で出すぎていて有意な差がないので使えない。

CK5 :正常で出すぎていて有意な差がないので使えない。

CD10 :BCC で上がっておらず Poroma で下がっていないので使えない。

P53 :正常で出すぎていて有意な差がないので使えない。

以下の表が最終的に残った 8 種類のマーカー発現率のまとめである。

(%)	MART-1	MAGEA3	FABP7	Gli-1	GRP49	CXCR4	Ki-67	VEGF
BCC	12	16	4	76	80	36	4	76
MM	44	46	14	0	0	24	24	60
Nevus	6	0	19	0	0	0	13	6
Poroma/ porocarcinoma	0	33	0	0	0	33	0	33
Sebo kera	14	0	0	0	0	0	57	29
Normal Skin	0	0	0	0	0	0	0	0

この結果より、臨床的に意義のあるマーカーとして、赤字で示したものの選択した。

(%)	MART-1	MAGEA3	FABP7	Gli-1	GRP49	CXCR4	Ki-67	VEGF
BCC	12	16	4	76	80	36	4	76
MM	44	46	14	0	0	24	24	60
Nevus	6	0	19	0	0	0	13	6
Poroma/ porocarcinoma	0	33	0	0	0	33	0	33
Sebo kera	14	0	0	0	0	0	57	29
Normal Skin	0	0	0	0	0	0	0	0

#### (2) ダーモスコピー診断

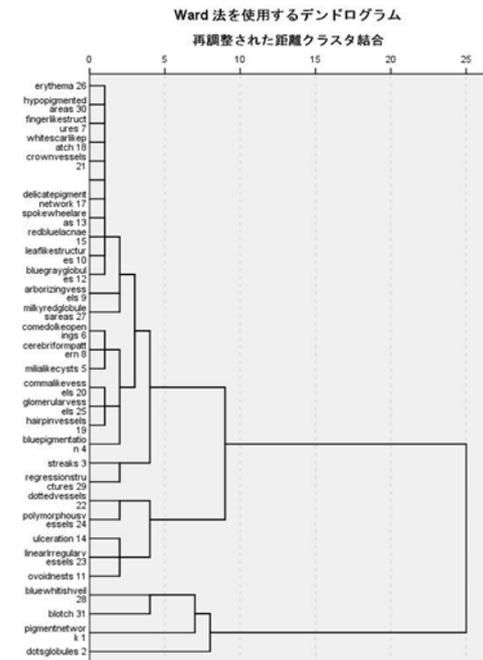
総検体数は 353 例であった。その内訳は、メラノーマ 48 例、色素細胞母斑 102 例、脂漏性角化症 73 例、基底細胞癌 109 例。

以下に 1 例としてメラノーマで観察されたダーモスコピー所見一覧を示す。赤字で示したものが高頻度で認められた所見である。

メラノーマ ダーモスコピーまとめ

pigment network	26/48	54.2%
dots/globules	20/48	41.7%
streaks	5/48	10.4%
blue pigmentation	3/48	6.3%
milia-like cysts	3/48	6.3%
comedo-like openings	2/48	4.2%
finger-like structures	0/48	0.0%
cerebriform pattern	1/48	2.1%
arborizing vessels	2/48	4.2%
leaf-like structures	0/48	0.0%
ovoid nests	4/48	8.3%
blue-gray globules	1/48	2.1%
spoke-wheel areas	0/48	0.0%
ulceration	5/48	10.4%
red-blue lacnae	0/48	0.0%
red-bluish homogeneous areas	0/48	0.0%
delicate pigment network	0/48	0.0%
white scar-like patch	0/48	0.0%
hairpin vessels	3/48	6.3%
comma-like vessels	1/48	2.1%
crown vessels	0/48	0.0%
dotted vessels	6/48	12.5%
linear-irregular vessels	6/48	12.5%
polymorphous vessels	9/48	18.8%
glomerular vessels	2/48	4.2%
erythema	0/48	0.0%
milky-red globules/areas	3/48	6.3%
blue whitish veil	19/48	39.6%
regression structures	5/48	10.4%
hypopigmented areas	0/48	0.0%
blotch	12/48	25.0%

色素細胞母斑、脂漏性角化症、基底細胞癌についても同様の検討を行なった。引き続き、これらの全所見についてクラスター解析を行い、各疾患に意義のあるダーモスコピー所見の選定を行なった。以下にメラノーマについてのクラスター解析結果を示す。



クラスター解析に結果から、診断上意義のあるダーモスコピー所見としてメラノーマ; pigment network, dots/globules, blue whitish veil, blotch 脂漏性角化症; comedo-like openings, cerebriform pattern, hairpin vessels 基底細胞癌; arborizing vessels, ovoid nests, blue-gray globules, ulceration 色素細胞母斑; dots/globules の計12項目が選択された。

(3) 遺伝子診断とダーモスコピー診断の多変量解析

① (1) (2) の結果より、皮膚腫瘍鑑別のための候補遺伝子とダーモスコピー所見は以下の通りとなった。

メラノーマ:

MART-1・MAGEA3・FABP7・CXCR4・VEGF・pigment network・dots/globules・blue whitish veil・blotch

色素細胞母斑:

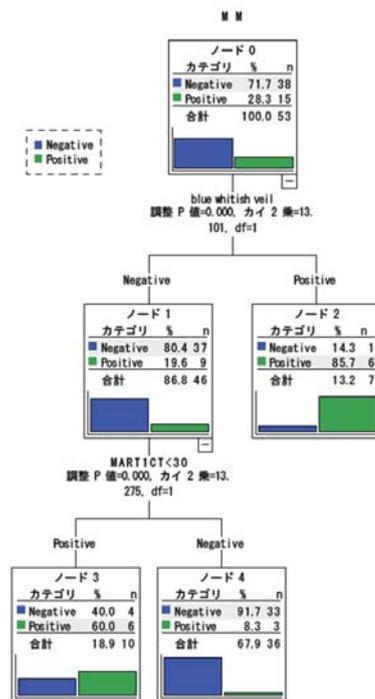
FABP7・dots/globules・pigment network・comma-like vessels

基底細胞母斑:

MAGEA3・Gli-1・GRP49・CXCR4・VEGF・arborizing vessels・ovoid nests・blue-gray globules・ulceration

脂漏性角化症: Ki-67・comedo-like openings・cerebriform pattern・hairpin vessels

② 上記項目について、Decision Tree による予測モデルを検討した。以下にメラノーマにおける解析結果を示す。



以上の解析より、  
メラノーマ：blue whitish veil、MART1  
色素細胞母斑：FABP7、VEGF、pigment network、  
comma-like vessels  
基底細胞癌：GRP49、ovoid nests、blue-gray  
globules  
脂漏性角化症：comedo-like openings、  
cerebriform pattern、hairpin vessels  
の各陽性所見が本非侵襲的術前迅速診断法  
において有用であることが導き出された。

## 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)

[学会発表] (計1件)

後藤康文、針生 検と遺伝子発現解析による皮  
膚主要の非侵襲的迅速診断、第111回日本皮  
膚科学会総会、2012年6月3日、京都

[その他]

ホームページ等

[http://www.shinshu-u.ac.jp/faculty/medi  
cine/chair/i-hifu/kenkyu.html](http://www.shinshu-u.ac.jp/faculty/medicine/chair/i-hifu/kenkyu.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

齋田 俊明 (SAIDA TOSHIAKI)

信州大学・医学部・特任教授

研究者番号：10010381

### (2) 研究分担者

古賀 弘志 (KOGA HIROSHI)

信州大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30419361

横川 吉晴 (YOKOKAWA YOSHIHARU)

信州大学・医学部・准教授

研究者番号：50362140

後藤 康文 (GOTO YASUFUMI)

信州大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60467181

(H22 →H23 研究分担者)

高田 実 (TAKATA MINORU)

信州大学・医学部・准教授

研究者番号：20154784

(H22 研究分担者)