

## 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 3月 7日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591437

研究課題名（和文） 有棘細胞癌の進展・浸潤機構の解明

研究課題名（英文） Elucidation of the mechanism for development and infiltration of cutaneous squamous cell carcinoma

研究代表者

古江 増隆 (FURUE MASUTAKA)

九州大学・医学研究院・教授

研究者番号：70134583

研究成果の概要(和文):皮膚有棘細胞癌(SCC)からのIL-1 $\alpha$ の産生により、間質線維芽細胞のCD10発現が誘導されることが明らかとなった。Substance Pはmetalloproteinaseの産生を誘導することで腫瘍の浸潤を促進させるが、間質CD10+線維芽細胞は、substance P濃度を低下させることで、SCCの浸潤能を抑制するということが明らかになった。

また、皮膚SCC周囲の間質線維芽細胞においてカテプシンKの発現が高くなっていた。カテプシンKは腫瘍からのIL-1 $\alpha$ の産生を介して誘導され、SCCと共培養すると、浸潤能を促進することも明らかとなった。これらの結果は、間質線維芽細胞が皮膚SCCの浸潤に積極的に関与する新しい機序として重要であると考えられた。

研究成果の概要(英文):We demonstrated that IL-1 $\alpha$  production by cutaneous squamous cell carcinoma (SCC) induced CD10 expression in the stromal fibroblast. The CD10-bearing fibroblast inhibited the invasive capacity of SCC by diminishing the microenvironmental concentration of substance P that supports tumor invasion via metalloproteinase induction.

Cathepsin K expression was detected in peritumoral fibroblasts around SCC, but not in those surrounding benign epidermal tumors. The CTSK-upregulated fibroblasts generated by SCC-derived IL-1 $\alpha$  augmented the matrigel invasive ability of SCC cells.

Taken together, these results highlighted the novel mechanism of stromal fibroblast playing important roles in cutaneous SCC invasion.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野: ライフサイエンス

科研費の分科・細目:

キーワード: 皮膚悪性腫瘍・CD10・Snail・EMT・線維芽細胞・SATB1・アルギナーゼ

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 悪性化した腫瘍細胞の進展を考える上で、細胞内シグナルの動態を検討することは、化学療法や標的治療を考える上で有用である。その腫瘍の進展を助ける温床の役割として、間質の関与が改めて注目されていた。しかしながら、皮膚悪性腫瘍における悪性化関連間質反応についての研究はほとんど報告されていない状況であった。

(2) その中で、CD10陽性間質細胞の腫瘍周囲性発現が最も再現性の高い現象ではないかと考えられた。CD10は非常に興味深い endopeptidase であり、substance P やenkephalin を分解する特殊な酵素であることが知られている。実際に、我々の研究結果では、乳房外パジェット病の真皮内浸潤とCD10陽性間質細胞の発現はみごとに相関すること(Br J Dermatol 2008 158:1389-91)が明らかになっていた。また、カテプシンKは、細胞内で発現して強力なコラーゲン融解能を有しているが、いくつかの悪性腫瘍において、間質細胞におけるカテプシンKの発現、役割についても注目されつつあった。

## 2. 研究の目的

(1) 正常皮膚、脂漏性角化症、有棘細胞癌におけるCD10の発現とその関連性、さらに metalloproteinase やカテプシン、CD10の発現を検討する。さらに、培養線維芽細胞におけるCD10の発現とサイトカインによる修飾機構を明らかにする。

(2) 正常皮膚、皮膚・軟部組織悪性腫瘍におけるカテプシンKの発現とその意義について明らか

にする。

## 3. 研究の方法

(1) SCC細胞株とnon-tumorigenic表皮細胞

HaCaT株をそれぞれ正常線維芽細胞(Fb)と共培養し、CD10発現への影響を検討する。ELISAやRT-PCRでサイトカインの産生を調べて、CD10発現を誘導する因子を同定する。線維芽細胞におけるCD10が、皮膚有棘細胞癌の浸潤にどのように関与しているかを明らかにするため、siRNAの導入によりCD10ノックダウン-Fbを作成し、CD10の基質であるsubstance Pへの影響とsubstance Pの腫瘍浸潤における役割を検討する。

(2) 免疫組織学的染色により、正常皮膚、皮膚・軟部組織悪性腫瘍におけるカテプシンKの発現を検討する。さらに、カテプシンKのSCC浸潤能への影響およびそのメカニズムを解明するため、matrigelを用いて、カテプシンK発現FbとSCC細胞株の共培養を行う。

## 4. 研究成果

1) 皮膚有棘細胞癌(SCC)が浸潤する際に、周囲間質の線維芽細胞にCD10を発現させること、そしてこの現象は脂漏性角化症、ボーエン病、日光角化症では認められなかった。SCC細胞株とnon-tumorigenic表皮細胞HaCaT株をそれぞれ正常線維芽細胞(Fb)と共培養したところ、HaCaTにくらべ、SCCとの共培養がFbに強くCD10を発現させた。SCC培養液にCD10誘導作用があることから、各種サイトカインでFbを刺激しCD10誘導能を検討したところ、IL-1 $\alpha$ とTNF- $\alpha$ に誘導活性を認めた。SCC培養液中には、TNF- $\alpha$ は検出で

きず、IL-1 $\alpha$ の産生がHaCaTに比べ有意に高値を示したことから、本培養系におけるCD10誘導能はIL-1 $\alpha$ に依存していると結論した。そこで、再度、脂漏性角化症とSCCにおけるIL-1 $\alpha$ の発現を免疫組織学的に検討したところ、IL-1 $\alpha$ の発現は脂漏性角化症では認められなかったが、SCCでは検出できた。この結果から、SCCからのIL-1 $\alpha$ により、間質線維芽細胞のCD10発現が誘導されることが示唆された。

(2) CD10+FbがSCCの浸潤にどのように関与しているかをさらに検討するため、SCC細胞株とnon-tumorigenic表皮細胞HaCaT株をそれぞれ正常線維芽細胞(Fb)と共培養して検討を行った。CD10の基質であるsubstance PはSCCおよびFbから産生され、MMP産生を介してmatrigelでの腫瘍浸潤を促進することがわかった。さらにsiRNAの導入により作成したCD10ノックダウン-Fbにおいては、substance Pが高値となって、SCCの浸潤能が高まった。以上の結果を合わせて考えると、SCC由来IL-1により誘導されるCD10+Fbは、substance P濃度を低下させることで、SCCの浸潤能をむしろ抑制するということが明らかになった。

(3) 皮膚有棘細胞癌(SCC)が浸潤する際に、周囲間質の線維芽細胞にカテプシンKが発現され、増殖能(Ki-67)と関連することを明らかにした。さらに悪性末梢神経鞘腫においては腫瘍に強発現し、神経線維腫との鑑別にも有用であることを報告した。カテプシンK発現FbとSCC細胞株の共培養も行い検討した。その結果、SCC株由来のIL-1 $\alpha$ がFbにおけるカテプシンK発現を誘導することがわかった。またFbのカテプシンKをノックダウンしたところ、SCCの浸潤能が抑制されたことから、FbにおけるカテプシンKがSCCの浸潤に重要な役割を果たしていることが示唆された。これらの結果は、今後カテプシンKを標的とする

ことで、SCCの治療法に繋がる可能性を示唆するものである。

#### 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8件)

① Xiaofeng Yan, Masakazu Takahara, Lining Xie, Yoshinao Oda, Takeshi Nakahara, Hiroshi Uchi, Satoshi Takeuchi, Yating Tu, Yoichi Moroi, Masutaka Furue. Stromal expression of cathepsin K in squamous cell carcinoma. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2011 Mar;25(3):362-5.

② Lining Xie, Masakazu Takahara, Takeshi Nakahara, Junna Oba, Hiroshi Uchi, Satoshi Takeuchi, Yoichi Moroi, Masutaka Furue. CD10-bearing fibroblasts may inhibit skin inflammation by down-modulating substance P. Arch Dermatol Res. 2011 Jan;303(1):49-55.

③ Xie L, Moroi Y, Takahara M, Tsuji G, Oba J, Hayashida S, Takeuchi S, Shan B, Uchi H, Furue M. CD10 expressed by fibroblasts and melanoma cells degrades endothelin-1 secreted by human keratinocytes. Eur J Dermatol. 2011 Jul-Aug;21(4):505-9.

④ Junna Oba, Takeshi Nakahara, Sayaka Hayashida, Makiko Kido, Lining Xie, Masakazu Takahara, Hiroshi Uchi, Shogo Miyazaki, Takeru Abe, Akihito Hagihara, Yoichi Moroi, Masutaka Furue. Expression of CD10 predicts tumor progression and unfavorable prognosis in malignant melanoma. J Am Acad Dermatol. 2011 65(6):1152-60.

⑤ Xie L, Moroi Y, Hayashida S, Tsuji G, Takeuchi S, Shan B, Nakahara T, Uchi H, Takahara M, Furue M. Cathepsin K-upregulation in fibroblasts promotes matrigel invasive ability of squamous cell carcinoma cells via tumor-derived IL-1 $\alpha$ . J Dermatol Sci. 2011 Jan;61(1):45-50.

⑥ Xie L, Moroi Y, Tsuji G, Liu M, Hayashida S, Takahara M, Fukagawa S, Takeuchi S, Shan B, Nakahara T, Uchi H, Yokomizo T, Furue M. CD10-bearing fibroblast inhibits matrigel invasive potency of interleukin-1 $\alpha$ -producing squamous cell carcinoma by diminishing substance P levels in the tumor microenvironment. Cancer Sci. 2010

Dec;101(12):2570-8.

⑦ Xiaofeng Yan, Masakazu Takahara, Long Dugu, Lining Xie, Chisato Gondo, Makoto Endo, Yoshinao Oda, Takeshi Nakahara, Hiroshi Uchi, Satoshi Takeuchi, Yating Tu, Yoichi Moroi, Masutaka Furue. Expression of cathepsin K in neurofibromatosis 1-associated cutaneous malignant peripheral nerve sheath tumors and neurofibromas J Dermatol Sci. 2010 Jun;58(3):227-9.

⑧ Xiaofeng Yan, Masakazu Takahara, Lining Xie, Yating Tu, Masutaka Furue. Cathepsin K expression: a useful marker for the differential diagnosis of dermatofibroma and dermatofibrosarcoma protuberans Histopathology 2010 Sep;57(3):486-8.

[学会発表] (計5件)

① 2010/10/1 Masakazu Takahara, Xiaofeng Yan, Lining Xie, Yating Tu, Masutaka Furue. Cathepsin K expression: a useful marker for the differential diagnosis of dermatofibroma and dermatofibrosarcoma protuberans. The first eastern Asian dermatology congress 福岡市

② 2010/11/14 Xiaofeng Yan、高原正和、Long Dugu、Lining Xie、小田義直、師井洋一、古江増隆 NF-1 に生じた悪性末梢神経鞘腫瘍と神経線維腫におけるカテプシン K 発現の検討 第 2 回日本レックリングハウゼン病学会学術大会 東京

③ 2011/5/28 Cathepsin K expression in skin tumors. Masakazu TAKAHARA, Xiaofeng YAN, Yoichi MOROI, Masutaka FURUE. 22nd World Congress of Dermatology, Seoul, Korea

④ 2010/11/6 師井洋一、謝立寧、古江増隆. 有棘細胞癌の間質に発現する CD10 の役割. 九州基礎皮膚科研究会, 福岡市

⑤ 2010/12/17 師井洋一、Xiaofeng Yan、高原正和、古江増隆. 悪性末梢神経鞘腫瘍と神経線維腫におけるカテプシン K 発現の検討. H22 神経皮膚症候群に関する調査研究班会議, 東京

[その他]

ホームページ:

<http://www.kyudai-derm.org/>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

古江 増隆(FURUE MASUTAKA)  
九州大学・医学研究院・教授  
研究者番号:70134583

### (2)研究分担者

高原 正和(TAKAHARA MASAKAZU)  
九州大学・大学病院・講師  
研究者番号:20398093

### (3)連携研究者

なし