

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 30 日現在

機関番号：12501
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2010～2011
 課題番号：22791055
 研究課題名（和文） 乳房外パジェット病の遺伝子発現プロファイルと表面マーカーの同定および細胞株の樹立
 研究課題名（英文） The gene expression profiling of the extramammary Paget's disease, identification of a surface marker and establishment of a cell line.
 研究代表者
 外川 八英（Togawa Yaei）
 千葉大学・大学院医学研究院・助教
 研究者番号：90361427

研究成果の概要（和文）：

乳房外パジェット病の微少浸潤と進行期病変との鑑別に、パジェット細胞を CEA 染色（二次抗体に Alexa Fluor® 594）、リンパ管は D2-40 染色（同じく Alexa Fluor® 488）、細胞核は Hoechst 33342® で多重染色し、蛍光顕微鏡で観察する手法を考案し、その有用性につき学会報告を行った。また、高齢女性において進行期で転移巣のパジェット細胞が HER2 レセプターを強発現した際のトラスツズマブ単剤療法の有効性について、副作用が少なく、高齢者にも安全に行える治療法として国内外で初の学会・論文報告した。

研究成果の概要（英文）：

We reported the efficacy for an observation technique of the Paget's cell with a fluorescence microscope in order to identify advanced lesion and small invasive lesion of extramammary Paget's disease. It was the technique based on histological staining of CEA (Paget's cell), D2-40 (lymph vessel) and Hoechst (nucleus). We also reported the first case of 68-year-old Japanese woman with metastatic HER2-positive extramammary Paget's disease that showed the validity of trastuzumab monotherapy. Trastuzumab has few side effects and is well tolerated for elderly patients. It may become a new choice of the adjuvant therapy of this disease.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医師薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：皮膚腫瘍学

1. 研究開始当初の背景
 内臓悪性腫瘍の領域ではヒューマングenom プロジェクトによるゲノム解析が終了とな

った 2001 年頃より主に中村らにより DNA マイクロアレイを用いて胃や膵臓等、消化器悪性腫瘍を中心にさまざまな悪性腫瘍の特異

的な遺伝子発現をみる解析が行われている。その中で、癌細胞を周囲の間質と分けて組織を採取する際にレーザーマイクロダイセクションの手技が用いられおり、例えば腺癌では95%以上の精度で癌組織のみ取り出すことに成功し、抽出したmRNAよりcDNAマイクロアレイを利用し遺伝子解析に成功している

(Nakamura T. et al. *Oncogene* 2004;23:2385-2400)。私たちはこの点に着目し、同様の手技で乳房外パジェット病の遺伝子プロファイルと表面マーカーの同定さらには細胞株の樹立を行うことができると考えた。

乳房外パジェット病は外陰部に好発する皮膚悪性腫瘍の約8%を占める腫瘍である。その細胞はアポクリン腺を母地とする説が有力だが、いまだはっきりと証明されていない。また、我々は以前リンパ節の転移巣で扁平上皮化生を生じた症例を経験しており(Miyakawa T, et al. *Clin Exp Dermatol* 2004;29(1):71-3)、表皮細胞そのものや表皮内の pluripotent stem cell に由来する可能性も考えている。この癌は他の皮膚固形癌と異なり多中心性に出現することがあり、組織学的にも腫瘍の個々の胞巣が表皮内に散在性に存在し水平方向への拡大傾向が強い。また湿疹類似の外観を呈することから早期発見が遅れることも多く、しかし一度基底膜を破り、浸潤癌になり転移した際には有効な化学療法は少なく予後不良である。

遺伝子異常に関しては、以前乳管癌に発現がみられた c-erbB-2 遺伝子の過剰発現(Meissner K, et al. *American J. Pathol.* 1990;137:1305-9)、上皮系の apoptosis に関連すると考えられる PIG/TITAF 遺伝子の変異(Matsumura Y, et al. *Int J Cancer* 2004;111:218-23)の異常が報告された。近年では上皮系癌の発生や癌の進展に関わる p-Stat3, cyclinD1, Bcl-xL の発現(Liu HJ, et al. *Br J Dermatol* 2006;154:926-32)や Sp1 および VEGF の過剰発現(Chen S. Y, et al. *Int J Dermatol* 2008;47:562-66)が報告されたが、これら遺伝子異常に関してはいまだ数例の報告があるのみであり、いまだ遺伝子プロファイルは明らかにされていない。

2. 研究の目的

本症では合併症や高齢などの制限、また好発部が private parts であることから外科的切除以外に有効な抗がん剤などの治療が求められる場合が多いが、実際には有効な化学療法剤は少ない。現時点では培養系も確立しておらず、抗がん剤の in vitro での抗腫瘍効果の判定もなされていない。当科では昨年度も28名と多くの症例を経験している。そこで本研究を立案し、データの蓄積を行うこととした。

3. 研究の方法

平成21年度

乳房外パジェット病の遺伝子プロファイルと表面マーカーの同定

乳房外パジェット病の患者より外科的切除で得られた組織のホルマリン固定パラフィン標本よりスライド標本作製(H&E染色)を行い、①正常表皮組織、②アポクリン腺組織、③乳房外パジェット病の in-situ 病変、④同進行期病変(基底膜を破壊して浸潤した腫瘍)、⑤リンパ節転移組織、⑥正常リンパ節組織に関して、それぞれの組織をレーザーマイクロダイジェクション(パルム社製)を使用しておのおの細胞1000個以上切除し、RNA溶解緩衝液にてmRNAを抽出する(Specht K et al. *Am J Pathol* 2001)。mRNAは少ない場合RNA増幅キットなどを使用し増幅する

(T7-based amplification)。逆転写によりcDNAを合成し、I①と②、II①と③、III②と③、IV①と④、V②と④、VI③と④、VII③と⑤、VIII④と⑤、IX⑤と⑥のペアに関してマイクロアレイを利用し、アレイスキャナーで遺伝子の発現を確認・比較(表1)し解析する

(Nakamura T et al. *Oncogene* 2000)。マイクロアレイを利用した各組織の遺伝子発現プロファイルの比較に関してはアフィメトリス社の GeneChip®Human Gnome U133 Plus 2.0 Array を用い4,7000以上の遺伝子発現を解析する。同時に腫瘍より抽出したDNAを用い、同社の GeneChip®Human Mapping 500K Array Set で全ゲノム上の50万以上のSNPsを解析し、染色体の欠損、重複を解析する。Gnome U133 と Mapping 500K 両者の結果を染色体上の物理的地図上に並べ、公開遺伝子データベースを参考にし、染色体異常で発現の異常が見られる遺伝子を同定する。これにより in-situ, invasive, metastatic それぞれのパジェット細胞と正常組織の遺伝子発現プロファイルの違いを明らかにする。またパジェット病細胞の表面マーカーとなるような膜タンパクや接着分子を発現する遺伝子の発現を調べ、特異的な表面マーカーの同定を試みる。発現頻度の異なる遺伝子に関しては、upregulate ないしは downregulate している遺伝子の中から既存のデータから生物学的に重要性があると思われる遺伝子を選出しリアルタイムPCRを行ない、その発現量を健常組織のものと比較し解析する。さらにアポクリン腺組織や正常表皮とパジェット病との接着分子を含む遺伝子発現プロファイルの違いからその由来を考察する。との違いについてその評価を行なう。

腫瘍組織標本からのレーザーマイクロダイジェクションの手技を利用し、取り出したmRNAからのcDNAの合成を行うとともに、マイクロアレイを利用し同症における遺伝子発現プロファイルを決定し、アポクリン腺組織との比較からその由来を考察する。またパ

ジェット病細胞の表面マーカーとなるような膜タンパクや接着分子を発現する遺伝子を調べ、特異的な表面マーカーの同定を試みる。また手術標本から細胞懸濁液を用い、同定した表面マーカーを用いFACSにてソーティングを行ない、得られたパジェット細胞をIn vitroで継代培養し、細胞株を樹立する。

平成22年度

細胞株の樹立と遺伝子発現プロファイル解析

乳房外パジェット病患者の外科的切除で得られたin-situ病変、同進行期病変、リンパ節転移組織を無菌操作で細かく分割し、ディスパーゼあるいはコラゲナーゼ等の消化酵素で処理し、メッシュを通し数回洗って未消化の組織片を取り除きSingle cell suspensionを調製する。得られた細胞は特異性の高い糖タンパクであるGCDP-15抗体で染色を行い確認するが、前年に表面マーカーが同定できた場合には利用可能であればその抗体を用いた染色も行う。その後FACSを利用しソーティングを行い、得られたパジェット細胞はそれぞれ無血清培地を含む種々の培養液中で培養を試みる。培養表皮細胞のコンディション培地による培養や、移植片培養、表皮細胞をフィーダー細胞としco-cultureを行い培養の成功後にパジェット細胞を分画することも検討する。増殖した細胞をIn vitroで継代培養し、細胞株を樹立させる(細胞株はセラムチューブに入れ凍結保存も行う)。その後培養前の組織と、樹立した細胞株における遺伝子発現プロファイルの違いに関して前述のマイクロアレイを用いた解析法で比較し厳密にクローニングを行う。

4. 研究成果

本研究に際しまず乳房外パジェット病の生検標本、手術標本についてin-situ病変と進行期病変を鑑別することに主眼をおき、各種免疫染色を行った。In-situ病変と基底膜より真皮内に1mm以内の浸潤は微小浸潤と定義され、その予後はほぼin-situと同等である(Lam&Funaro *Dermatol Clin* 2010; 28: 807-826)。しかし微小浸潤があるか否かをHE標本のみで鑑別することは難しい。パジェットの浸潤部は表皮内病変に比べki-67とcyclinD1の高い発現があり、浸潤部の評価に有用であるとの報告(Aoyagi et al. *J Dermatol Sci* 2008; 50:177-184)を踏まえて、40歳男性で微小浸潤を伴い後に内臓転移した症例について検討した。

Mib-1染色ではin-situよりinvasiveの病変の方がindex、scoreが明らかに高かった。また

CD-1も同様に浸潤病変ではスコアが高く、かつ自験例では腫瘍のthickness最大で0.5mmと薄いものの、広範囲での微小浸潤があると考えた。また、過去の報告において1mm以内の微小浸潤における転移の報告例は極めて稀であり。海外で3例のみ報告があり、いずれもリンパ節転移であった(Ewing et al.

Gynecologic oncology 2004, 755-8. Feuer et al. *Gynecologic oncology* 1990, 24-7. Fine et al. *Gynecologic oncology* 1995, 262-5)。自験例は術後7年でリンパ節転移を生じたが、初期にリンパ管浸潤があった可能性は否定できず抗D2-40抗体による免疫染色でリンパ管浸潤評価が有用(Yamada et al. *Pathol Int* 2008; 58:114-117)との報告をもとに同染色を施行した。しかし実際には通常の免疫染色では炎症細胞やコントラストが弱く、周囲の炎症細胞浸潤の影響もあり、その評価は困難であった。そこでパジェット細胞を抗CEA抗体、二次抗体にAlexa Fluor® 594(緑色蛍光)で標識、リンパ管は抗D2-40抗体、二次抗体にAlexa Fluor® 488(赤色蛍光)、細胞核はHoechst 33342®(青色蛍光)で多重染色を行ない蛍光顕微鏡にて評価した。その結果、リンパ管内に明らかなパジェット細胞の浸潤は認められなかった。その後この手法の有効性について学会報告を行っている(2011年、11月27-28日、日皮会長崎地方会第312例会)。

さらに68歳の進行期乳房外パジェット病の女性において、転移巣のパジェット細胞がHER2レセプターを強発現した際のトラスツマブ単剤療法の有効性について学会、論文報告を行った。乳がん準じ、トラスツマブを8mg/kgで初回点滴静注を行い以後3週毎に8mg/kgで計10コース投与を行ったところほぼCRの状態まで転移巣は縮小した。副作用として中等度の頭痛や顔面の紅潮が見られたが、イブプロフェンやd-クロルフェニラミンの内服にて軽快したため問題は認めず、計17コースの投与にてCRを得た。同症の高齢者においてトラスツマブ単剤療法は副作用がなく十分耐えうる治療であると考えた。

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)

Dramatic Clinical Response of Relapsed Metastatic Extramammary Paget's Disease to Trastuzumab Monotherapy

S. Wakabayashi, Y. Togawa, K. Yoneyama, K. Suehiro, N. Kambe, and H. Matsue. Case reports in dermatological medicine, (doi:10.1155/2012/401362, 査読あり)

[学会発表] (計2件)

①微少浸潤を認め術後7年後に多臓器転移を来した乳房外 Paget 病の1例

外川八英、秋田 文、中野倫代、末廣敬祐、米山恭子、塚本利郎、鎌田憲明、神戸直智、松江弘之

(日本皮膚科学会長崎地方会第312回例会 宇谷厚志教授就任記念、2011年、11月27-28日、長崎)

②多発転移に対して trastuzumab が著効した外陰部 Paget 病の1例

若林正一郎、末廣敬祐、米山恭子、及川真喜子、中野倫代、外川八英、鎌田憲明、松江弘之

(第27回日本皮膚悪性腫瘍学会学術大会、2011年、6月3-4日、東京)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

外川 八英 (Togawa Yaei)

千葉大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号：90361427