

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：18001

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K16286

研究課題名（和文）斑状強皮症型基底細胞癌の高悪性度特性を規定する背景因子解明のための遺伝子発現解析

研究課題名（英文）Gene Expression Analysis to Identify Factors Contributing to the High Malignancy of Morphea-like Basal Cell Carcinoma

研究代表者

内海 大介（UTSUMI, DAISUKE）

琉球大学・医学部・特命講師

研究者番号：40551958

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：基底細胞癌のモルフェア型（斑状強皮症型）、結節型、毛芽腫、コーカソイドの結節型のそれぞれの病型の腫瘍組織を用いたトランスクリプトーム解析から、特にモルフェア型と結節型の間の特徴的な遺伝子ファミリーの発現変動がみられた。いずれも腫瘍関連抗原として報告されている遺伝子群であり、モルフェア型と結節型の表現型や予後の差異を説明する要因と推測される。さらに他の発現変動のみられた遺伝子がコードするタンパクに対する抗体を用い、免疫染色により組織学的にこれらの病型を鑑別するためのマーカーの発見につながると期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

基底細胞癌の中でも斑状強皮症型は、他の結節型や表在型と比較し、外科的切除後の再発率や遠隔転移の発生率が高く予後不良である。本研究課題では、斑状強皮症型基底細胞癌の腫瘍浸潤性や転移能などの病態に重要な役割を果たすことが予測されるいくつかの遺伝子を見出した。これらの遺伝子は斑状強皮症型の高悪性度を理解するための糸口となると考えられる。斑状強皮症型の基底細胞癌の正確な鑑別は、患者の予後に大きく関わるため、免疫染色による組織学的な診断に用いるマーカーが求められる。今回の我々の見出した斑状強皮症型基底細胞癌に特異的に発現しているタンパク質がそれらのマーカーの候補となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Transcriptome analysis using tumor tissues of morpheaform, nodular, and trichoepithelioma subtypes, as well as Caucasoid nodular subtypes of basal cell carcinoma, revealed characteristic gene family expression variations, particularly between morpheaform and nodular subtypes. These genes have been reported as tumor-associated antigens and are presumed to explain the differences in phenotype and prognosis between morpheaform and nodular subtypes. Additionally, it is expected that antibodies against proteins encoded by other differentially expressed genes will lead to the discovery of markers for histologically distinguishing these subtypes through immunostaining.

研究分野：皮膚科学関連

キーワード：基底細胞癌 斑状強皮症型 結節型 トランスクリプトーム解析

## 様式 C-19、F-19-1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

基底細胞癌は毛包間上皮や毛包上皮の基底細胞が由来とされている皮膚癌の一種である。本邦および欧米で最も頻度の高い皮膚癌であり、米国ではその患者数は年に 4-8%程度の増加傾向を示している。基底細胞癌は多彩な臨床像を呈し、1) 結節型、2) 表在型、3) 斑状強皮症(モルフェア)型の基本 3 病型に分類される。WHO 分類では予後に関連した浸潤様式をもとに、浸潤性の低い非 aggressive 型と浸潤性の高い aggressive 型の病理組織型に分類し、主に結節型、表在型の臨床型の基底細胞がんは非 aggressive に、斑状強皮症型は aggressive に分類される(基底細胞癌診療ガイドライン 2021)。本研究で主眼に置く斑状強皮症型基底細胞癌は、本邦では基底細胞癌全体の約 2%と稀であり、結節型・表在型とは大きく異なる臨床的、組織学的な特徴を有している。斑状強皮症型の腫瘍の正常皮膚との境界は不明瞭で、しばしば拡大・浸潤傾向を示し、局所破壊性が強い。斑状強皮症型は外科切除時の断端陽性率や局所再発率が高く、遠隔転移の頻度も高く予後不良である。

### 2. 研究の目的

基底細胞癌の中でも斑状強皮症型は、他の結節型や表在型と比較し、外科的切除後の再発率や遠隔転移の発生率が高く予後不良である。腫瘍組織は索状の胞巣を形成し、浸潤性が強く、間質の膠原線維の増加が特徴である。基底細胞癌発生には hedgehog 経路の活性化の重要性が強調されているが、特に斑状強皮症型の表現型を規定する分子生物学的要因は説明はなされていない。斑状強皮症型の高い悪性度など、その他の病型と大きく異なる生物学的性質を正確に理解するには、分離、独立させて研究、検証を行う必要がある。本研究課題では、斑状強皮症型基底細胞癌の腫瘍浸潤性や転移能などの病態に重要な役割を果たす遺伝子の網羅的な探索を、single cell RNA-seq を含めたトランスクリプトーム解析、全エクソーム解析により行い、その特徴的な腫瘍形成メカニズムを明らかにしたい。さらに得られた基礎的データをもとに有用な診断マーカーの発見、有効な治療薬選定、その由来となる細胞の同定につなげることを目標とする。

### 3. 研究の方法

本研究では、琉球大学病院皮膚科にこれまで蓄積された各病型の基底細胞癌腫瘍組織検体、および今後手術や生検などで得られる検体を用い、それらの遺伝子変異および遺伝子発現プロファイルを網羅的に解析することにより、基底細胞癌におけるモルフェア型の生物学的特理解につながる基礎的なデータ取得および解析を主目的とする。

#### (1) 検体およびデータの収集

解析に供する斑状強皮症型、結節型、表在型の各病型の基底細胞癌検体は、琉球大学病院皮膚科に保存されるホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 検体を用いる。全エクソーム解析用に DNA を、トランスクリプトーム解析用に RNA を抽出し、次世代シーケンサによるシーケンスデータ生成を行う。Single cell RNA-seq 解析には外科手術で得られる生検体を用いる。

#### (2) Bulk (バルク) RNA-seq

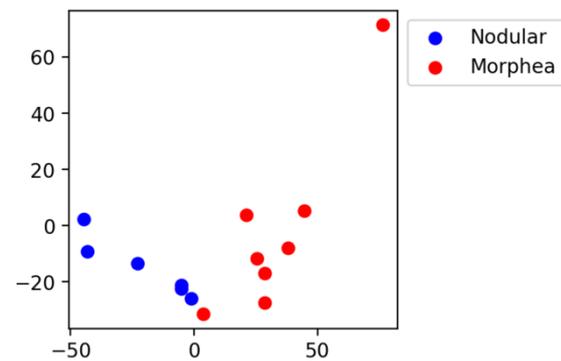
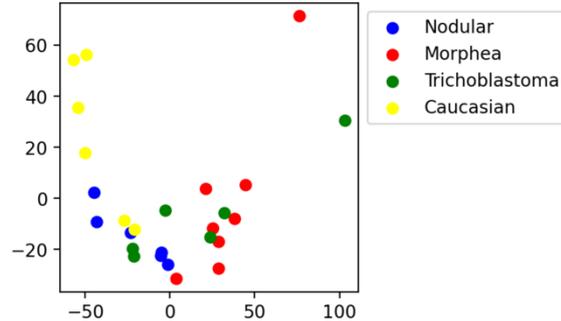
各病型で統計学的有意差をもった高発現、低発現遺伝子群を特定することで、各病型の表現型を特徴づける要因を絞り込む。また各種リポジトリに公開されている欧米の基底細胞癌データを取得することで、日本人と欧米人の基底細胞癌の間に遺伝子発現プロファイルの差異の有無を検証する。

#### 4. 研究成果

本研究課題の期間内に各種基底細胞癌の腫瘍組織検体を収集した。内訳は、モルフェア型基底細胞癌 8 例、結節型基底細胞癌 6 例、コーカソイド人種の結節型基底細胞癌 6 例、病理組織型が基底細胞癌に類似する毛芽腫 6 例であった。すべての腫瘍の FFPE 検体から RNA を抽出し、トランスクリプトーム解析を行った。

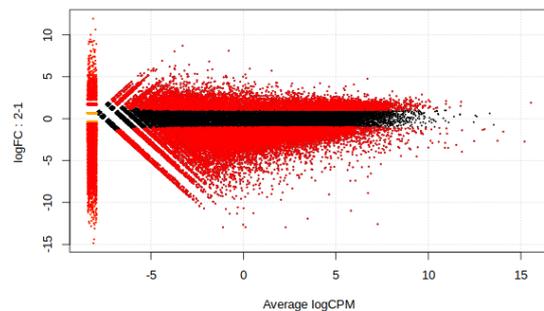
##### (1) 各基底細胞癌の遺伝子発現パターンに基づく分類

各基底細胞癌のトランスクリプトームをもとに、各病型が特徴的な遺伝子発現パターンを有するかを検証するために、主成分分析を行った。主成分分析では結節(Nodular)型、モルフェア(Morphea)型、毛芽腫(Trichoblastoma)、コーカソイド結節型(Caucasian)で、明白にクラスターが分類されなかったが、一定程度の傾向がみられた。これらの異なるフェノタイプの基底細胞癌に特徴的な遺伝子発現パターンを示すことが示唆された。これらの4つの病型のうち、結節型とモルフェア型に着目すると、2つの明らかなクラスターに分類され、これらが表現型を説明する異なる遺伝子発現パターンが存在することが示唆された。



##### (2) DESeq2 による遺伝子発現変動解析(モルフェア型、結節型)

モルフェア型および結節型のトランスクリプトーム解析のリードカウントデータをもとに、2群間で発現が変動している遺伝子を、DESeq2 を用いて検出した。4362 の遺伝子の発現に有意な差が見られた。そのうち上位500の遺伝子の中で、PRAME、GAGE、MAGEに属するいくつかの遺伝子が確認された。これらの遺伝子は、数多くの癌腫において強い発現がみられる腫瘍関連抗原として知られている。これらの腫瘍抗原に着目して、検証を進める。



##### (3) モルフェア型、結節型基底細胞癌の鑑別マーカーの探索

モルフェア型と結節型基底細胞癌はその予後の大きな差異から、その鑑別は臨床的には極めて重要である。遺伝子発現変動解析において検出された遺伝子のなかから、いくつかの遺伝子にターゲットを絞り、それらがコードするタンパクに対する抗体を用いて、教室内に保存されている2つの病型の腫瘍組織検体に対して免疫染色を進めている。これらの抗体のなかから、最も鑑別に適しているものを選択し、臨床応用が可能であるかの検証を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 1件）

1. 著者名 内海 大介	4. 巻 286
2. 論文標題 皮膚科学 顧みられない熱帯病 ブルーリ潰瘍.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 169-170
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 高橋 健造, 内海 大介	4. 巻 41
2. 論文標題 偏光フィルター下の光学顕微鏡観察によるネザートン症候群の新規診断手法	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 日本小児皮膚科学会雑誌	6. 最初と最後の頁 21-27
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山口さやか, 高橋健造, 内海大介, 深井恭子
2. 発表標題 ハンセン病既存検体を用いた遺伝子発現解析による各病型の発症機序の解明.
3. 学会等名 先端医学研究支援事業発表会
4. 発表年 2023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
---------	---------