

機関番号：16301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20592099

研究課題名（和文） 皮膚悪性腫瘍微小環境の新たな評価法：適切な再建と診断を目指して

研究課題名（英文） New procedure of evaluation of molecular mechanism in skin cancer :  
adequate diagnosis and reconstruction.

研究代表者

森 秀樹 (MORI HIDEKI)

愛媛大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60325389

研究成果の概要（和文）：

乳房外 Paget 病における血管新生は病期の進行に伴い増大するが、リンパ管新生は表皮内癌の段階で既に強ちに誘導され、病期の進行とともに増大するものではないことが明らかとなった。一方で浸潤癌においては N カドヘリン陽性を示す Paget 細胞が皮-間葉転換 (EMT) を来すことで、高い浸潤能を獲得することが示唆された。さらに、悪性度の高い Paget 細胞は EMT を来たして原発巣でリンパ管を活性化し、リンパ行性転移を促進していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

In extramammary Paget disease (EMPD), lymphangiogenesis appeared in an early stage. We found that Paget cells adopt an invasive phenotype during epithelial-mesenchymal transition (EMT) seen in tumor progression. We found that invasive Paget cells in patient N-cadherin, a mesenchymal marker indicative of EMT, suggesting a molecular mechanism underlying tumour invasion. EMT is reportedly required for invasive phenotypes of tumour cells of epithelial origin, including EMPD.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：皮膚科、形成外科

科研費の分科・細目：外科系臨床医学、形成外科学

キーワード：リンパ管新生、Paget 病

## 1. 研究開始当初の背景

がん組織における血管の重要性が強調される一方、リンパ管の局在及びその動態は不

明な点が多い。その理由は、リンパ管を肉眼的に捉える特異的マーカーが存在しなかったからである。しかし、分子生物学の発展により、リンパ管特異的に発現する複数の遺伝

子が同定された。Prox1、LYVE-1、podoplaninをはじめとするリンパ管特異的分子に対する抗体を用いることが可能になり、生体組織におけるリンパ管の詳細な分布が明らかとなった。さらに近年、リンパ管の発生と誘導を司る増殖因子が相次いで同定され、リンパ管内皮細胞に対して強力に作用する分子とその受容体システムの詳細が見出された。

皮膚悪性腫瘍では、悪性黒色腫においてリンパ管新生が予後不良因子であることが、ごく最近報告された。しかしながら、他の皮膚悪性腫瘍に関するリンパ管新生の評価及び意義は、未だ報告がない。

乳房外 Paget 病は、通常は紅斑の状態で長期経過をとるが、いったん浸潤癌 (Paget 癌) になると、高率にリンパ節及び遠隔臓器に転移し、極めて予後不良である。これら赤色を呈する病変やリンパ節転移は、本疾患の背景に血管及びリンパ管新生があることを示唆するものであるにも関わらず、これまでに乳房外 Paget 病を血管・リンパ管新生から評価した報告は未だ存在しない。

## 2. 研究の目的

(1) 乳房外 Paget 病における「血管・リンパ管新生」及び「上皮-間葉転換」を自験例において組織学的に評価・検討し、診断に役立つ新規予後不良因子として同定すること。

(2) Paget 癌 (リンパ節転移例) の腫瘍細胞と、腫瘍近傍のリンパ管内皮細胞の特性を明らかにすること。この結果に基づき、細胞相互に発現する「リガンド-受容体」を明らかにすべく解析し、腫瘍細胞の間質への浸潤及びリンパ管への侵入・転移機構を解明する。

## 3. 研究の方法

### (1) 「血管・リンパ管新生」の同定

乳房外 Paget 病/Paget 癌患者の皮膚病変部及び正常部より得たパラフィン切片に対して、第 VIII 因子 (血管) 及び podoplanin (リンパ管) に対する抗体を用いて蛍光二重染色を行う。

(2) 予後因子としての「血管リンパ管新生」血管またはリンパ管の密度、径、相対占有面積と患者予後の相関を Kaplan-Meier 生存曲線で改めて評価し、予後を占うカット・オフ値を血管またはリンパ管に関して詳細に同定する。

### (3) 増殖マーカーによる脈管新生の評価

(4) 既知血管及びリンパ管新生因子の同定 VEGF-A, -C, -D を、免疫酵素化学法により組織学的に同定する

### (5) VEGF 受容体の同定

VEGFR-2、VEGFR-3 両受容体の発現を、血管及びリンパ管に関する特異抗体を用いて蛍光二重染色により組織学的に同定する。

## 4. 研究成果

(1) 乳房外 Paget 病/Paget 癌患者の 87 症例の皮膚病変部及び正常部より得たパラフィン切片に対して、第 VIII 因子 (血管) 及

## 血管占有面積の比較(n=87)

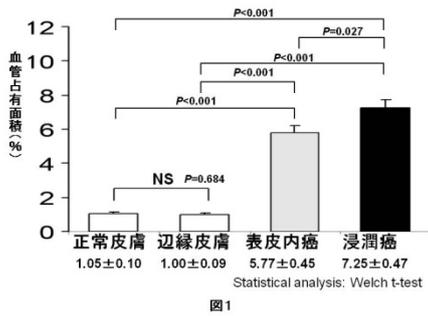


図1

び podoplanin (リンパ管) に対する抗体を用いて蛍光二重染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡 (Zeiss LSM510) で観察した。

これを画像ソフトウェアを用いて血管・リンパ管の単位面積あたりの管腔の相対占有面積 (BVA) を算出した。これを 1. 正常皮膚群、2. 病変部の辺縁正常皮膚群、3. 表皮内 (Stage IA)、4. 組織学的浸潤癌 (Stage IB-IV) の 4 群に分け、統計学的解析 (Welch

## リンパ管占有面積の比較(n=87)

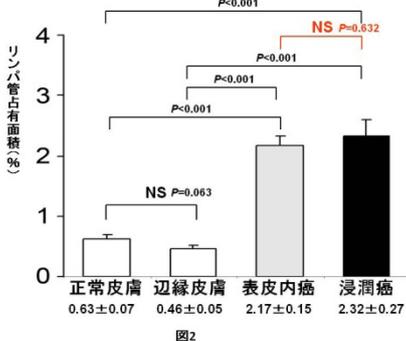


図2

の t 検定および  $\chi^2$  検定 : p 値が 0.05 未満で有意) を行った。表皮内癌ではリンパ管の相対占有面積 (LVA) は 2.17±0.15% であった。一方、浸潤癌では LVA は 2.32±0.27% であり、表皮内癌との間に明らかな差は同定し得なかった (P = 0.632)。一方、正常皮膚、及び手術摘出組織断端皮膚の LVA は各々 0.63±0.07%

0.46±0.05% であり、両者に有意差は認めなかった (P = 0.063)。正常皮膚と表皮内癌の LVA を比較すると、表皮内癌ではすでに LVA が顕著に増加していた (P < 0.001)。つまり病期の進行と乳房外 Paget 病における血管新生は病期の進行に伴い増大するが (図 1)、リンパ管新生は表皮内癌の段階で既に強力に誘導され、病期の進行とともに増大するものではないことが明らかとなった (図 2)

(2) 浸潤癌 43 例のうち浸潤度が高く、所属リンパ節転移陽性であった 14 例において、EカドヘリンおよびNカドヘリン抗体を用いた二重蛍光組織染色から (図 3)、これらの細胞が皮-間葉転換 (EMT) を来しており、腫瘍細胞の高い浸潤能が示唆された。さらに、

## EカドヘリンおよびNカドヘリン二重染色の典型的画像

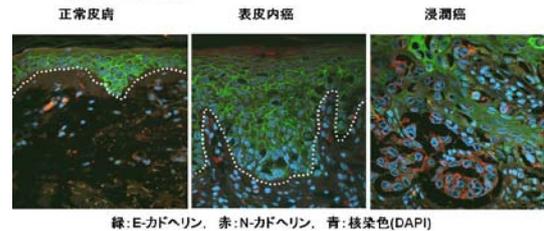


図3

悪性度の高い Paget 細胞はケモカイン受容体 CXCR4 を発現しており、さらに、原発巣で活性化したリンパ管は、CXCR4 の特異的リガンドである stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) を発現していた。

(3) がん細胞の間質の活性化線維芽細胞の細胞骨格には  $\alpha$ -SMA を発現することから、cancer-associated fibroblast (CAF) の同定に  $\alpha$ -SMA を用いて間質変化を評価した。その

### 腫瘍細胞間のα-SMA陽性率(n=87)

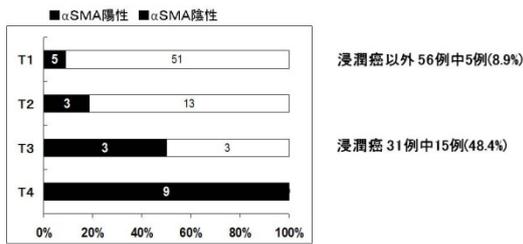


図4:α-SMA陽性率は、浸潤癌と有意に相関していた  
Statistical analysis: Chi-square test  $P<0.001$

結果、表皮内癌 56 例の内、腫瘍蜂巣内・SMA 陽性例は 5 例に止まるものの、組織学的浸潤癌 31 例では約半数にあたる 15 例で、腫瘍蜂巣内・SMA が陽性であった。すなわち、乳房外 Paget 病では間質変化が腫瘍細胞の浸潤度と有意に相関していることが示唆された(図 4)。

(4) 表皮内癌の段階で既に多発リンパ節転移をきたした 2 症例における蛍光二重染色で、

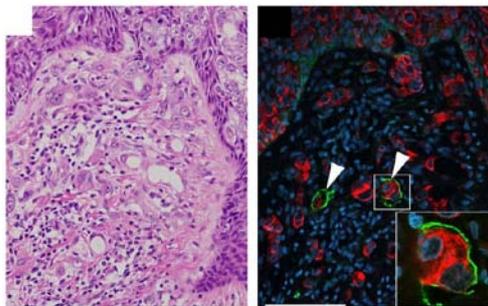


図5 蛍光二重染色  
緑のリンパ管内に赤い腫瘍細胞の浸潤がみられる

真皮内の拡張したリンパ管内に cytokeratin 7 を発現した腫瘍細胞の浸潤がみられた(図 5)。このことから、乳房外 Paget 病では、CXCR4-SDF-1 及び EMT を介したリンパ管侵襲が、表皮内癌の段階でもリンパ行性転移を促進している可能性が示唆された。

### 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)

[雑誌論文] (計 1 件)

S. Hirakawa, A. Tanemura, H. Mori, et al, Multiple lymphadenopathy as an initial sign of extramammary Paget disease, British Journal of Dermatology, 査読有、164 巻、2011、200-203

[学会発表] (計 1 件)

多発リンパ節転移をきたした低浸潤性乳房外 Paget 病の 1 例

森 秀樹、ほか、第 26 回日本皮膚悪性腫瘍学会学術大会、2010

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

### 6. 研究組織

#### (1) 研究代表者

森 秀樹 (MORI HIDEKI)

愛媛大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60325389

#### (2) 研究分担者

平川 聡史 (HIRAKAWA SATOSHI)

愛媛大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：50419511