

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2011～2015

課題番号：23592583

研究課題名(和文) 上皮間葉系移行を標的とした脈絡膜悪性腫瘍の浸潤・転移抑制治療の開発

研究課題名(英文) The development of the epithelial-mesenchymal transition invasion and metastasis suppressive therapy of choroidal malignant tumor that target

研究代表者

田中 オー (TANAKA, SAICHI)

和歌山県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：60316106

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍細胞の組織内への浸潤や遠隔転移には、腫瘍細胞の上皮-間葉系移行(EMT)が関与する。EMTにはしてトランスフォーミング成長因子ベータ(TGF $\beta$ )が関与する。培養実験では細胞をTGF $\beta$ 1(1 ng/ml)で処理すると、各種シグナル伝達の中でもSmad2/3とp38のリン酸化の亢進が著明であった。細胞質と一部核に検出された。EMTマーカー検索ではビメンチンとI型コラーゲンの発現増強が検出された。TGF $\beta$ 1で細胞が死滅する事は無かった。B16細胞は、TGF $\beta$ 1で部分的なEMTを起こすと言える。TGF $\beta$ 1に関連するシグナル伝達の制御による浸潤、転移抑制をターゲットとした患者予後改善効果が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Local invasion or metastasis of neoplastic cells derived from choroidal malignant melanoma reportedly depends on epithelial-mesenchymal transition (EMT), that is promoted by a growth factor, transforming growth factor  $\beta$  (TGF $\beta$ ). In cell culture study adding TGF $\beta$ 1 (1 ng/ml) activates Smad2/3 and p38 signals, but not Erk and JNK signals. Phosphorylated proteins of Smad2/3 and p38 were detected both in the cytoplasm and nuclei of B16 cells. Observation of expression pattern of EMT markers indicated that adding exogenous TGF $\beta$ 1 accelerated expression of collagen type I and vimentin, but not  $\alpha$ -smooth muscle actin and fibronectin, suggesting TGF $\beta$ 1 promotes partial EMT in B16 cells. Exposure to TGF $\beta$ 1 did not induce cell death, although TGF $\beta$ 1 reportedly induces apoptosis or cell proliferation inhibition in neoplastic epithelial cell types. Modulating TGF $\beta$ 1-related signals and resultant EMT process could be beneficial in improving prognosis of the patients with choroidal malignant melanoma

研究分野：眼科

キーワード：悪性黒色腫 上皮間葉系移行

## 1. 研究開始当初の背景

眼科に領域に発生した悪性黒色腫のうち、ぶどう膜悪性黒色腫は特に肝転移が多く、生存率は1年で約70%、2年で約40%と、非常に予後不良であり新しい治療方法の開発が必要である。腫瘍細胞が上皮内癌から浸潤癌に変化するときには、腫瘍細胞がEMTを起こすこと明らかになっており、個体発生時の中胚葉誘導、ともに癌の病気の進行にも深く関わっている。悪性黒色腫のEMTに関する有無について検討を行うこと、癌転移の初期過程における細胞接着分子を介する癌細胞と標的の組織との接着反応の検討、癌細胞の増殖、浸潤、転移には間質に存在する細胞外マトリックスの役割などについて、in vivo、in vitro の両面から探索の必要性が考慮された。

## 2. 研究の目的

悪性黒色腫は皮膚のみならず眼悪性腫瘍の中でも遠隔転移しやすく、生命予後が最も不良な悪性腫瘍の代表であり、したがって遠隔転移の阻止する方策を研究開発する必要がある。細胞外マトリックス(ECM)成分であるルミカン、オステオポンチン、テネイシンなどが悪性腫瘍細胞の遊走に関与しており、悪性腫瘍の局所浸潤、遠隔転移の原因の一つである。また、これら局所浸潤、遠隔転移に悪性腫瘍細胞の形質転換である上皮-間葉系移行(EMT)が関与していると報告されている。悪性黒色腫の細胞増殖やEMTのメカニズムを解明することにより、腫瘍細胞の浸潤および転移を抑える新しい治療法を開発することに主眼をおくことを目的とする。

## 3. 研究の方法

悪性黒色腫の局所浸潤、遠隔転移もEMTなので、これらのノックアウトマウスの皮下に悪性黒色腫の培養細胞株を移植して、局所浸潤、遠隔転移の検討

各種マトリックスのコートした培地における悪性黒色腫の培養細胞株の挙動とシグ

## ナルの検討

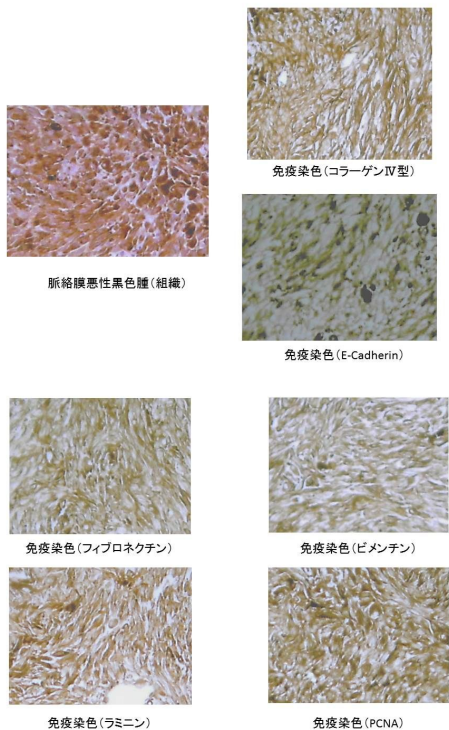
悪性黒色腫の培養細胞株でのsiRNAノックダウンで内因性のこれらのマトリックスの挙動とシグナルでの役割についての解明

## 脈絡膜悪性黒色腫よりの各種組織検討

## 4. 研究成果

脈絡膜悪性黒色腫例の摘出6症例より、パラフィン切片で免疫染色をおこなった。使用した1次抗体は、Eカドヘリン、ビメンチン、フィブロネクチン、 $\alpha$ 型コラーゲン、PCNA、リン酸化Smad2であった。脈絡膜悪性黒色腫標本では、腫瘍内での比較的分化度の高い領域と紡錘型に新調した細胞が増殖している比較的分化度の低い細胞の領域が判別できる標本が4症例であった。1例の脈絡膜悪性黒色腫では分化型の細胞の集簇からなる組織像を呈しており、1例では、約80%が無色素性の細胞の集簇を呈した。分化度の低い部分(細胞が伸張している領域)では高い領域と比較して細胞内のビメンチン、細胞間のフィブロネクチンの染色が強い傾向を示していた。 $\alpha$ 型コラーゲンは正常の組織の血管や基底膜領域の染色が観察されたが、腫瘍内では細血管と思われる部位に染色が観察された。分化度の低い細胞が線維芽細胞様の領域に血管様構造が多いように観察された。同様に、pSmad2とPCNAもともに分化度の低い細胞が線維芽細胞様の領域で腫瘍細胞の核に一部染色性を認めた。網膜剥離下に散布されている円形の黒色細胞(腫瘍細胞とおもわれる細胞)はビメンチンには染色されなかった。 $\beta$ -カテインの染色も施行した。腫瘍の発生過程にはTGF- $\beta$ /Smad系が関与しているがそれとクロストークすると考えられるWnt/ $\beta$ -カテニンの発現が考えられる。Wnt/ $\beta$ -カテニン経路は脊椎動物と無脊椎動物の発生における細胞の運命の決定を調節することも知られている。Wnt/ $\beta$ -カテニン経路は、多くの異なる型の細胞や組織において、レチノイン酸、FGF、TGF- $\beta$ 、およびBMPなどの多

くの系統からのシグナルを集約しているものでもあり、腫瘍の発生において関係することも示唆されている。今回のすべての黒色腫の症例で  $\beta$ -カテインの発現が認められた。このことにより Wnt/ $\beta$ -カテニンが腫瘍発生に関与することが示唆されると考えられ、腫瘍の発生や治療方針を予想する有用な分子マーカーになると考えられた。

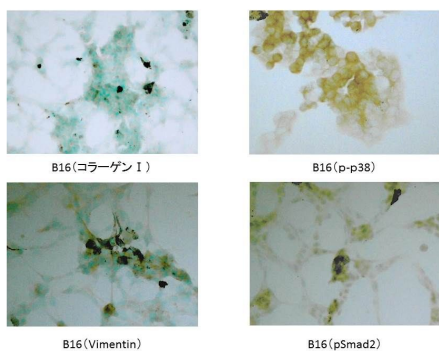


ルミカン、オステオポンチン、テネイシンなどのノックアウトマウスおよびワイルドタイプマウスの皮膚下に悪性黒色腫の培養細胞を移植した。皮膚下に発症した腫瘍径を計測し、経時的变化を観察した。また、その腫瘍と周辺の組織を摘出し、パラフィン切片を作成し、免疫組織学的検討をおこなった。抗体は、細胞外マトリックス(オステオポンチン、テネイシン C、テネイシン X、フィブロネクチン、インテグリン)、増殖系シグナルのマーカー(Erk-1 および BrdU) および各種サイトカイン(TGF- $\beta$ 、Smad 2、Smad 3、Smad 4、Smad 7、pSmad 3C、pSmad 3L、pSmad 2C など)である。血管形成に対する影響は抗 CD 31 抗体で評価した。その結果、皮膚に現れた腫瘍は平均 5 mm と増大傾向をしめして

いた。また、すべての症例において上皮間葉系移行がおこなっていたので、腫瘍の組織に陽性所見をしめしていた。それと腫瘍の免疫染色にて上皮細胞と考えられる部位には S100 陽性所見がみとめられ、細胞質内に HMB 4 5 陽性所見が認められ、また、抗 Melan 抗体陽性所見を認めたためにこれらに腫瘍は悪性黒色と同定できた。抗 CD 31 抗体を用いて血管内皮細胞検出したところ腫瘍組織中の新生血管の著明な現象がみられた。腫瘍から total RNA を抽出し、real-time RT-PCR で各種遺伝子発現について成長因子関連を中心に検討した。発現パターンに変化が検出された RNA についてはジゴキシゲニンを使用した in situ ハイブリダイゼーションで組織内の発現パターンを評価した。その結果、Eカドヘリンの発現の抑制が認められた。また、上皮間葉転換を惹起する Snail の発現は抑制されており、間葉系のマーカーである  $\alpha$ -smooth muscle actin の発現は低下していた。

インテグリンあるいは各種細胞外マトリックス添加群、非添加群の遠沈培養液から増速に関する種々のサイトカインタンパク量を ELISA で測定する。両遠沈培養液を一定期間の培養後、細胞の血管新生、リンパ管形成に関するサイトカインの mRNA を細胞からタンパクを上清で検討した。さらに上清を添加した血管内皮細胞培養で形成された管腔を CD31 の染色により評価した結果血管新生の更新がみられた。インテグリンや細胞外マトリックスによるリンパ管形成の影響に関して免疫染色を施行し、陽性所見が認められた。悪性黒色腫の B16 悪性黒色腫細胞株をコンフルエントに培養し、以下の細胞の検討を行った。B16 悪性黒色腫細胞株は網目状に増殖した。トランスフォーミング成長因子 (1 ng/ml) 添加の無い状態では有意なリン酸化 Smad2 とリン酸化 p38 は検出されなかった。トランスフォーミング成長因子 (1 ng/ml) 添加後、30 分、60 分、120 分でのシグナル伝

達の活性化を検討した。Smad2 と p38 のリン酸化が促進されたが、JNK と Erk のリン酸化の亢進は観察されなかった。DAB 発色免疫組織化学的にリン酸化 Smad2 とリン酸化 p38 は、主に細胞質に、一部細胞核に検出された。トランスフォーミング成長因子 (1 ng/ml) に 48 時間暴露した B16 悪性黒色腫細胞株ではビメンチンと I 型コラーゲンの発現が増強したが、アルファ平滑筋アクチンの発現誘導は観察されなかった。ファイブロネクチンの発現亢進は観察されなかった。上皮細胞系では、トランスフォーミング成長因子 が細胞増殖を抑制し、細胞死を誘導する場合は有る事が報告されているが、B16 悪性黒色腫細胞株ではトランスフォーミング成長因子 (1 ng/ml)、48 時間暴露においてアポトーシスに落ち込んで死滅する事は無かった。B16 悪性黒色腫細胞株では、トランスフォーミング成長因子 が部分的な上皮 間葉系移行が誘導されると思われたが、筋線維芽細胞の誘導に至る事はないと考えられた。



## 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 4 件)

(1) Saika S, Yamanaka O, Okada Y, Sumioka T. Modulation of Smad signaling by non-TGF components in myofibroblast generation during wound healing in corneal stroma. *Exp Eye Res.* 2016;142:40-8

(2) Saika S. Preface the 2nd Wakayama symposium: current concepts in ocular cell biology. *BMC Ophthalmol.* 2015 17;15 Suppl 1:164.

(3) Yamanaka O, Yuan Y, Coulson-Thomas VJ, Gesteira TF, Call MK, Zhang Y, Zhang J, Chang SH, Xie C, Liu CY, Saika S, Jester JV, Kao WW. Lumican binds ALK5 to promote epithelium wound healing. *PLoS One.* 2013 Dec 18;8(12):e82730

(4) 角結膜上皮内癌の組織学的検討：北野愛、白井久美、岡田由香、雑賀司珠也。臨床眼科 65 巻 10 号 Page1625-1629

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

田中才一 (TANAKA SAIICHI)

和歌山県立医科大学 医学部 講師

研究者番号：60316106

### (2) 研究分担者

雑賀司珠也 (SAIKA SHIZUYA)

和歌山県立医科大学 医学部 教授

研究者番号：40254544

### (3) 連携研究者

岡田由香 (Okada Yuka)

和歌山県立医科大学 医学部 准教授

研究者番号：50264891