

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 21 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461701

研究課題名(和文) 悪性黒色腫細胞の生存、増殖、遊走、浸潤における脂肪組織の役割とその制御機構の解明

研究課題名(英文) Malignant melanoma cell kinetics is modulated by adipocyte-cancer cell interaction.

研究代表者

青木 茂久 (Aoki, Shigehisa)

佐賀大学・医学部・准教授

研究者番号：10448441

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)：悪性黒色腫は最も悪性度の高い皮膚癌であり、進行すると有効な治療法がなく、致死的である。近年、悪性黒色腫の罹患率の増加と皮下、内臓脂肪組織の増加を基盤とする肥満との関連が疫学的に示唆されているが詳細は不明であった。我々が確立した脂肪組織のコラーゲン・ゲル器官培養系を用いた検討では、皮下脂肪組織が、悪性黒色腫細胞の増殖を高度に促進することを見出した。さらに、内臓脂肪組織は悪性黒色腫細胞の浸潤能とメラニン産生に寄与する可能性を見出した。本研究により、脂肪組織は悪性黒色腫の細胞動態に深く寄与することが明らかとなった。その制御機構の解明によって新規分子標的治療薬の開発が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Malignant melanoma is the most aggressive skin cancer. The effective treatment for advanced cancer patients has not been established. In recent years, the association between obesity and malignant melanoma has been focused in epidemiological studies, but it remains to be elucidated. In the study we used the collagen gel organ culture system utilized with the adipose tissue, and demonstrated that subcutaneous adipose tissue promotes the proliferation of malignant melanoma cells. In addition, the visceral fat tissue may contribute to the invasive ability and melanin production of malignant melanoma cells. According to the present study, adipose tissue was found to contribute deeply to the cell kinetics of malignant melanoma. This organ culture system could be a promising tool for the development and evaluation of new molecular targeted therapies for malignant melanoma.

研究分野：病理学

キーワード：皮膚科学 悪性黒色腫 脂肪細胞

1. 研究開始当初の背景

悪性黒色腫(メラノーマ)は最も悪性度の高い皮膚癌であり、進行すると有効な治療法がなく、致死的である。近年、悪性黒色腫の罹患率の増加と皮下、内臓脂肪組織の増加を基盤とする肥満との関連が疫学的に示唆されているが、脂肪組織が悪性黒色腫にどのような影響を与えているか、その詳細は不明である。一般に、悪性黒色腫は皮膚表皮内で発生し、真皮 → 皮下脂肪組織へと浸潤し、全身諸臓器へ転移する。それ故に、脂肪組織が悪性黒色腫細胞の生存、増殖、遊走、浸潤、転移に活発に影響していると予想される。しかし、皮下及び内臓脂肪組織が悪性黒色腫細胞に与える直接的な影響を解析した研究は国内外にはなく、その詳細は不明である。

これまで、脂肪組織を培養することは困難であった。我々は初めて脂肪組織のコラーゲン・ゲル器官培養系を確立し、脂肪組織の長期維持、脂肪酸、アディポカイン産生を見出した(。さらに、尿管上皮や心筋細胞 - 脂肪組織解析モデルを考案し、脂肪組織が尿管上皮の極性化、機能分化、グリコーゲン産生を促進し、細胞死を抑制することや、心筋細胞に脂肪毒性(脂肪滴蓄積・細胞死促進、機能分化抑制)を誘導することを見出した。以上により、脂肪組織が悪性黒色腫細胞に与える直接的な影響を解析することが初めて可能となった。

2. 研究の目的

悪性黒色腫細胞の生存、増殖、遊走、浸潤における脂肪組織の役割とその制御機構を解明する。

1) 皮下、内臓脂肪組織が、悪性黒色腫細胞の生存、増殖、遊走、浸潤に与える影響とその相違を初めて解明できる。さらに、その制御因子を同定することにより、悪性黒色腫の新規分子標的治療薬の開発が期待できる。

2) 肥満における悪性黒色腫の発症、進展機構を解明するために、メタボリック症候群を標的にした病的脂肪組織と悪性黒色腫細胞の解析研究に発展できる。

3) 本研究は、有棘細胞、メラノサイト、メルケル細胞、毛包細胞などの細胞増殖・分化や皮膚のホメオスタシスにおける脂肪組織の役割とその制御機構の解明にも応用できる。

3. 研究の方法

悪性黒色腫細胞 - 脂肪組織解析モデルを用いて、免疫組織化学、Western blot、real-time RT-PCR、ELISA等を用いて解析し、癌細胞の生存、増殖、遊走、浸潤における皮下、内臓脂肪組織の影響とその相違を解析した。

1) 材料: 悪性黒色腫細胞: KHm-1(原発巣から樹立されたヒト細胞株)、HMY-1(リンパ節転移巣から樹立されたヒト細胞株)、B16(マウス悪性黒色腫細胞株)を用いた。

脂肪組織: 6, 12週齢マウス、ラット及び剖検例や手術症例のヒト皮下、内臓脂肪組織を細切した脂肪組織片を用いた。

2) 培養システム: 悪性黒色腫細胞 - 脂肪組織解析モデルを用いた。外皿に、0.5-1mm径に細切した脂肪組織片(0.5ml)を5mlのI型コラーゲン・ゲル内に包埋し、1日間培養した。同時に、底面がニトロセルロース膜から成る内皿に1mlのコラーゲン・ゲル層を作製し、そのゲル層上に癌細胞(10万個)を播種し1日間培養した。その後、内皿を、外皿に入れ培養した。対照は、癌細胞の単独培養とした。脂肪組織が癌細胞に与える影響の特異性を検証するために、外皿に内皮細胞(MS-1細胞株)を培養した系で、内皿に癌細胞を培養した。培養1, 2, 3週で、癌細胞 - 脂肪組織解析モデルで再現された現象を、ホルマリン固定標本ならびに細胞から抽出した蛋白、遺伝子と細胞培養液を用いて解析した。

3) 癌細胞の形態、生存、増殖の解析: 癌細胞の形態をヘマトキシリン・エオジン(H&E)染色、電顕で、アポトーシスをssDNAの免疫染色で、増殖を24時間ウリジン(BrdU)摂取率で比較検討した。

4) 癌細胞の情報伝達分子の解析: 本研究では、脂肪組織関連分子として、酸化ストレスシグナル: NF- κ B, ERK-1/2, p38、小胞体ス

トレス分子（アポトーシス促進シグナル：IRE1 α 、JNK の発現を、免疫組織化学、Western blot、real-time RT-PCR で比較検討する。さらに、悪性黒色腫の重要な情報伝達分子（RAS/MAP kinase pathway, PI3K/AKT pathway, PTEN, cyclin D1, CDK4 の発現を同様に比較検討した。

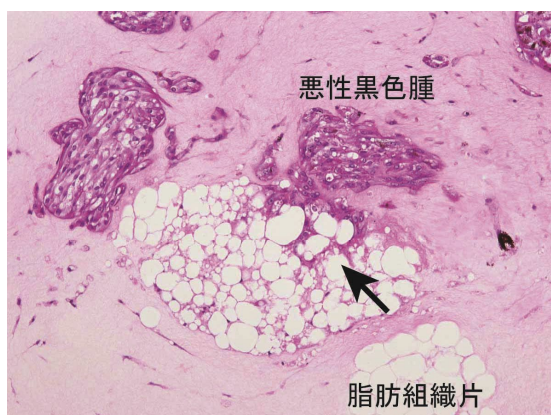
4. 研究成果

1) 新たな3次元培養法の確立

我々が従来用いていた二重皿培養法は2種類の細胞間の相互作用ならびに浸潤性を解析するのに適した方法である。一方、それぞれの細胞種における蛋白質ならびに遺伝子発現を解析するには、足場となるコラーゲンを異なる細胞種で共用しているため、解析が困難である。そこで我々は細胞種ごとにコラーゲンをういた組織ディスクを作成し、近接ないし接着させて培養することで、蛋白・遺伝子発現を解析可能な3次元培養系を確立した。

2) 脂肪組織は悪性黒色腫の増殖・浸潤を促進する

3次元組織ディスク培養系を用い解析した結果、脂肪組織との混合培養条件下では、培養10日目において、対照群と比較して、悪性黒色腫細胞の増殖率（BrdU 取り込み率）が上昇した。一方、内皮細胞との混合培養条件下では有意差は認められなかった。3次元組織ディスク培養の組織切片を用いた解析では、培養10日目において、悪性黒色腫細胞は脂



脂肪組織内に浸潤する悪性黒色腫（矢印）脂肪組織が存在するコラーゲン内に浸潤し、一部では脂肪組織片内への浸潤が認められた。

脂肪組織から出現する間葉系細胞も悪性黒色腫が包埋されたコラーゲンディスク内への侵入が一部で見られた。一方、血管内皮細胞との混合培養では、悪性黒色腫の浸潤像は見られず、血管内皮細胞の悪性黒色腫側への侵入像は見られなかった。

3) 脂肪組織は悪性黒色腫の MAPK 経路を活性化する

脂肪組織ないし内皮細胞との混合培養下での MAPK pathway を解析した。

脂肪組織は悪性黒色腫細胞の ERK, MEK および AKT の発現を亢進する傾向がみられた。一方、内皮細胞は ERK, MEK, AKT いずれの発現もコントロールと比較し、有意な差を認めなかった。今回の検討では、NF- κ B, ERK-1/2, p38, IRE1 α , JNK ならびに PTEN, cyclin D1, CDK4 に関して、各実験群間において有意差を認めなかった。

4) 内皮細胞は悪性黒色腫のメラニン産生を調節する

悪性黒色腫細胞は血管内皮細胞との混合培養によってメラニン産生の亢進傾向がみられた。一方、脂肪組織、線維芽細胞との混合培養では悪性黒色腫細胞でのメラニン産生の亢進はみられなかった。



以上の結果より、本研究において我々は、新規の培養方法を確立することで、脂肪細胞組織が悪性黒色腫の増殖、浸潤に関与することを明らかにした。この作用は MAPK pathway を介すると予想される。また、脂肪組織をはじめとして、間葉系細胞は、その種類によっ

て悪性黒色腫に対し特異的な作用を有する可能性があることを *in vitro* で示すことが出来た。本研究の進展により、脂肪組織の悪性黒色腫に与える制御因子の同定や悪性黒色腫の新規分子標的治療薬の開発が期待できる。

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 3件)

1. Aoki S, Takezawa T, Ikeda S, Narisawa Y, Oshikata-Miyazaki A, Miyauchi S, Hirayama H, Sawaguchi T, Chimuro T, Toda S. A new cell-free bandage-type artificial skin for cutaneous wounds. *Wound Repair Regen.* 2015; 23(6):819-29. (査読有り)
2. Shigehisa Aoki, Toshiaki Takezawa, Ayumi Miyazaki-Oshikata, Satoshi Ikeda, Kotaro Nagase, Shinichii Koba, Takuya Inoue, Kazuyoshi Uchihashi, Aki Nishijima-Matsunobu, Nahoko Kakihara, Hiroshi Hirayama, Yutaka Narisawa, Shuji Toda. Collagen vitrigel membrane: a powerful tool for skin regeneration. *Inflammation and Regeneration Vol. 34* (2014) No. 3 p. 117-123 (査読有り)
3. Aoki S, Takezawa T, Oshikata-Miyazaki A, Ikeda S, Kuroyama H, Chimuro T, Oguchi Y, Noguchi M, Narisawa Y, Toda S. Epithelial-to-mesenchymal transition and slit function of mesothelial cells are regulated by the cross talk between mesothelial cells and endothelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2014;306(1):F116-22. (査読有り)

[学会発表](計 0件)

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

特記無し

6. 研究組織

(1)研究代表者

青木 茂久 (AOKI, Shigehisa)

佐賀大学・医学部病因病態科学講座・准教授

研究者番号: 10448441

(2)研究分担者

戸田 修二 (TODA, Shuji)

佐賀大学・医学部病因病態科学講座・教授

研究者番号: 80188755

(3)研究分担者

三砂 範幸 (MISAGO, Noriyuki)

佐賀大学・医学部皮膚科学講座・准教授

研究者番号: 90199977