

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09764

研究課題名(和文) 皮膚有棘細胞癌の新規分子標的療法の開発に関する基礎研究

研究課題名(英文) Identification of new therapeutic targets against cutaneous squamous cell carcinoma

研究代表者

三井 広 (MITSUI, Hiroshi)

山梨大学・大学院総合研究部・講師

研究者番号：60372504

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：我々はLCM法を用いた皮膚有棘細胞癌(SCC)組織中の遺伝子発現リストにより、転写因子E2F4が日光角化症、表皮内癌、浸潤癌において正常表皮より高発現していることを見出した。次に、様々な表皮増殖性疾患におけるE2F4の発現を免疫染色法で確認した。SCCでは癌細胞の核を染色したが、基底細胞癌、脂漏性角化症、尋常性乾癬ではほとんど発現を認めなかった。SCCの腫瘍細胞株であるHSC-5やA431では、恒常的にE2F4が発現することをmRNA及び免疫細胞化学法を用いて確認した。E2F4を核内に発現するHSC-5細胞は線維芽細胞様の形態を示し、EMTへの関与が示唆された。

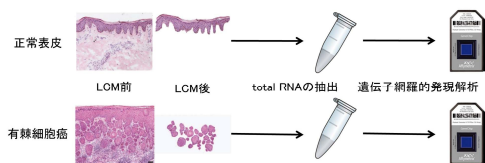
研究成果の概要(英文)：We have been studying SCC on the basis of differentially expressed gene list generated by the combination of LCM and cDNA microarray technology. One transcription factor that was significantly upregulated in actinic keratosis and SCC compared to normal epidermis was E2F4. E2F4 is a member of the E2F family of transcription factors that have a critical role in the control of cellular proliferation and apoptosis. In this study, we aimed to elucidate the functions of E2F4 in development and progression of cutaneous SCC. We first evaluated the expression of E2F4 in various skin conditions by immunohistochemistry. The specific expression of E2F4 in the nucleus of SCC tissues but not in other skin conditions, such as basal cell carcinoma, seborrheic keratosis, and psoriasis was confirmed. E2F4 was detected in SCC cell lines (A431 and HSC-5) at mRNA and protein levels. Our results suggest that E2F4 may have important roles in development and progression of cutaneous SCC.

研究分野：皮膚科

キーワード：有棘細胞癌 転写因子 E2F4

1. 研究開始当初の背景

皮膚有棘細胞癌は基底細胞癌について2番目に頻度の高い皮膚癌である。遠隔転移を起こす能力を有し、報告により差はあるが、他臓器転移を来した症例では5年生存率は30%以下であるとの報告もある。多くは手術で治療可能であるが、転移を伴う進行期癌や切除不能例に対する有効な分子標的療法を含む化学療法は現在のところ確立されていない。Laser capture microdissection (LCM)法とは、顕微鏡下に研究者の興味の対象となる任意の細胞もしくは細胞集塊を採取する方法である。代表者はLCM法を用いて、ヒト腫瘍組織から腫瘍細胞巢を選択的に採取し、total RNAを抽出し、遺伝子の網羅的発現解析を行った。[1]



代表研究者が用いたLCM法による検体採取と遺伝子網羅的発現解析

この方法により得られた腫瘍組織と正常表皮の遺伝子profileを比較する事により作成された遺伝子発現リストは、皮膚では正常表皮に比べ腫瘍細胞に非常に選択的である。この方法は以下の点で、従来の腫瘍細胞株を使った研究に比べ、大きな利点を有する。

- (i) *in vitro*で培養された細胞株の遺伝子発現に比べ、より生体内での腫瘍の生物学的特性を反映する。
- (ii) 細胞株の樹立されていない腫瘍での研究も可能である。
- (iii) ヒトの組織での解析が可能であり、マウス等の疾患モデル動物の解析と比べ、得られた知見はより直接的にヒトの疾患メカニズムの理解へと反映する事が可能である。

2. 研究の目的

分子標的療法とは、ある特定の分子を標的とし、その機能を制御することにより治療を行う方法である。多くの皮膚腫瘍は手術にて切除可能であるが、再発、転移、局所破壊などに手術不能例で有効な化学療法は確立されていない。腫瘍細胞に特異的な分子の発現を明らかにし、その機能を解析する事は、癌の増殖、浸潤、転移の機序の解明にとどまらず、新規の治療方法の開発にも有用である。研究代表者は米国留学中に皮膚腫瘍の遺伝子発現の網羅的解析を行った。本研究では、その内容を発展させていくことを目的とする。作製された遺伝子発現リストの中から将来的に標的療法の開発へと発展しうる分子を特定する為の基礎的研究を行う。

3. 研究の方法

(1) ヒト皮膚癌における研究対象となる分子の選定

研究代表者が作製した癌組織特異的遺伝子リストには、サイトカイン、ケモカイン、細胞増殖因子、接着因子など癌の増殖、浸潤に関与する様々な分子が含まれている。また、癌細胞が発現する receptor tyrosine kinase や cancer testis antigen 等を標的とする、分子標的療法は近年癌に対する新たな治療戦略として注目され、成功を収めている。これらの分子の中から、過去の論文を詳細に検討し、新規の治療の標的と成りうる分子を選定する。この際、生体内の正常細胞での発現が低い分子を選択する。それにより、治療に際し、標的分子に対する阻害薬(抗体、分子標的薬など)による副作用を低減できると考えられる。

(2) 候補分子の発現が組織内において腫瘍に特異的であるかの検討

候補分子の疾患特異性は、他の皮膚疾患(尋常性乾癬やアトピー性皮膚炎などの炎症性疾患や基底細胞癌などの他の皮膚腫瘍)との発現の比較を、免疫組織染色法による蛋白レベルで評価する。免疫組織染色に用いられる検体は、山梨大学医学部附属病院で切除され、ホルマリン固定された状態で保存されている腫瘍組織を用いて行う。癌の微小環境は様々な細胞(癌細胞、免疫細胞、表皮および血管やリンパ管などの上皮系細胞、間質細胞など)により構成されている。選定した分子の腫瘍細胞における特異性は、腫瘍細胞および各種ヒト皮膚由来正常細胞から抽出した total RNA を用い、reverse transcribe polymerase chain reaction (RT-PCR)法にて、発現レベルを比較する。また、ELISA 法や FACS 法を用いて、蛋白レベルでの発現も確認する。

(3) 腫瘍細胞株の入手

皮膚有棘細胞癌には悪性度の異なるヒト腫瘍細胞株が存在する。A431細胞は局所浸潤傾向の強い、高悪性度の細胞である。反対に、SCC13細胞は悪性度の比較的低い細胞である。コントロール細胞としてはHaCaT細胞を用いる。それらの腫瘍細胞株はJA Carucci博士から供与される予定である。また、日本人由来の皮膚有棘細胞癌の腫瘍細胞株は独立行政法人医薬基盤研究所 JCRB 細胞バンクから購入する。

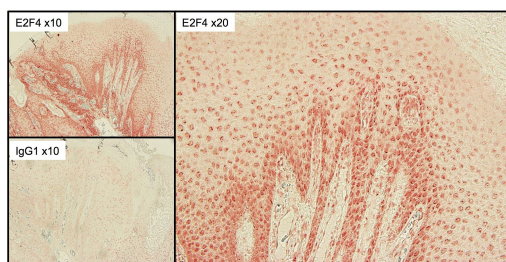
4. 研究成果

- (1) 皮膚有棘細胞癌組織では様々な転写因子(transcription factor: TF)が発現している。

Symbol	日光角化症 (前癌病変)		有棘細胞癌 (表皮内癌)		有棘細胞癌 (浸潤癌)	
	FCH	FDR	FCH	FDR	FCH	FDR
E2F4	15.49	<10 ⁻⁴	15.50	<10 ⁻⁴	16.08	<10 ⁻⁴
RUNX1	10.47	<10 ⁻⁴	18.69	<10 ⁻⁴	24.26	<10 ⁻⁴
PITX1	8.36	<10 ⁻⁴	11.90	<10 ⁻⁴	15.25	<10 ⁻⁴
SPDEF	7.95	<10 ⁻⁴	7.69	<10 ⁻⁴	7.40	<10 ⁻⁴
NR4A3	6.87	<10 ⁻⁴	4.68	<10 ⁻⁴	7.03	<10 ⁻⁴
PAX8	6.84	<10 ⁻⁴	5.93	<10 ⁻⁴	8.54	<10 ⁻⁴
SPDEF	6.74	<10 ⁻⁴	6.70	<10 ⁻⁴	6.49	<10 ⁻⁴
NR4A1	5.87	<10 ⁻⁴	2.56	0.01	3.25	<10 ⁻⁴
RELB	5.50	<10 ⁻⁴	3.50	<10 ⁻⁴	6.08	<10 ⁻⁴
FOXE1	5.41	<10 ⁻⁴	9.97	<10 ⁻⁴	5.20	<10 ⁻⁴

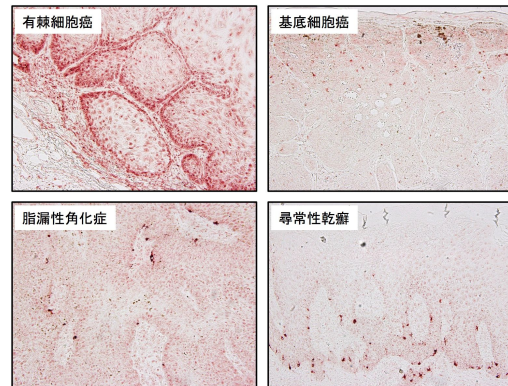
表は研究代表者が米国留学中に作成した、ヒト皮膚有棘細胞癌の遺伝子発現リストの結果の一部である。今回の研究では、まず最初に日光角化症（代表的な紫外線による皮膚の前癌病変）病変から発現に変化の見られる遺伝子の中で、特に転写因子に着目した。転写因子とはDNAのプロモーター領域に結合し、RNAへの転写過程を促進、あるいは抑制する。したがって、正常細胞と異なる転写因子の発現、作用は細胞の形質の変化、増殖性の変化に重要であり、癌遺伝子や癌抑制遺伝子の一つに転写因子は含まれる。日光角化症の組織内で正常表皮と比べ、最も発現が上昇していたのがE2F4であった。その発現は有棘細胞癌の表皮内癌、浸潤癌との間でも発現レベルに明らかな変化はなく、表皮内癌、浸潤癌においてもRUNX1について2番目の発現上昇であった。そこで本研究ではまず、E2F4の発現を有棘細胞癌を含む、様々なヒト皮膚組織とヒト皮膚角化細胞由来の細胞株を用いて比較検討した。

(2) 転写因子 E2F4 はヒト有棘細胞癌の癌細胞に発現する



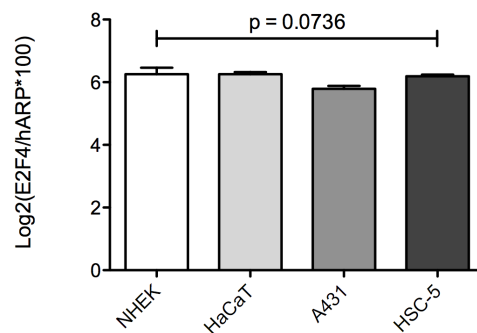
次に我々は転写因子 E2F4 のヒト有棘細胞癌組織での発現を、免疫組織化学法で確認した。抗 E2F4 抗体は有棘細胞癌の核を染色するが、コントロール抗体 (IgG1 抗体) では染色は認めなかった。つまり、ヒト皮膚有棘細胞癌では転写因子 E2F4 蛋白レベルで発現することが確認された。

(3) 転写因子 E2F4 の発現はヒト有棘細胞癌組織に特異的である



次に E2F4 の発現の疾患特異性を見るために、様々な表皮増殖性の皮膚疾患における E2F4 の発現を調べた。先ほどとは異なる有棘細胞癌の組織においても、E2F4 が細胞の核優位に強く発現することが確認できた。基底細胞癌では癌細胞には明らかな発現をなかった。腫瘍巢内に強く染色される樹枝状の胞体を持つ細胞が確認された。メラノサイトは恒常的に E2F4 を発現することが知られており、これらの細胞はメラノサイトであると考えられた。脂漏性角化症と尋常性乾癬の代表的な表皮増殖性良性皮膚疾患においてもメラノサイトには強い染色を認めるが、角化細胞の細胞質、核ともにその発現はほとんどないか極弱いものであった。これらの結果から E2F4 の発現は他の表皮増殖性皮膚疾患と比較し、有棘細胞癌に特異的であると推察された。

(4) 有棘細胞癌の腫瘍細胞株は E2F4 mRNA を発現する

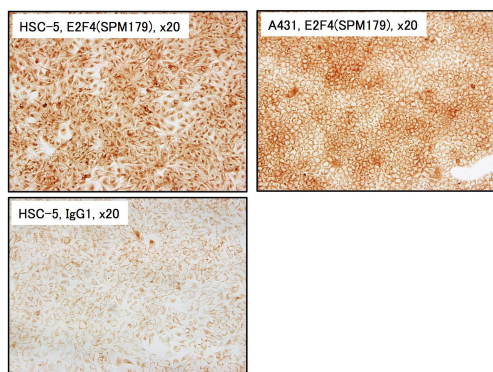


NHEK: 正常ヒト表皮角化細胞
 HaCaT: 不死化ヒト表皮角化細胞
 A431: 皮膚有棘細胞癌腫瘍細胞株
 HSC-5: 皮膚有棘細胞癌腫瘍細胞株

次に各種の角化細胞由来の細胞株における E2F4 mRNA の発現を定量 RT-PCR 法にて確認した。HaCaT 細胞は不死化したヒト表皮角化細胞で A431 は皮膚有棘細胞癌由来の腫瘍細胞株である。HSC-5 細胞は日本人由来の有棘細胞

胞癌腫瘍細胞株である。いずれの細胞においても E2F4 mRNA は発現することが確認できたが、細胞間に有意差は認められなかった。

(5) 有棘細胞癌の腫瘍細胞株は E2F4 をタンパクレベルで発現する



次に HSC-5、A431 細胞における E2F4 のタンパクレベルでの発現を免疫細胞化学法で検討した。アイソタイプコントロールの IgG1 と比較し、HSC-5 細胞で E2F4 は強く陽性初見を示した。そのパターンは核に優位であった。興味深いことに A431 においては E2F4 は細胞質優位に染色された。いずれにしろ、有棘細胞癌の腫瘍細胞株における E2F4 のタンパクレベルでの発現が確認された。E2F4 を核内に発現する HSC-5 細胞は線維芽細胞様の形態を示し、Epithelial to Mesenchymal transition への関与が示唆された。

参考文献

[1] Mitsui H, et al. Gene expression profiling of the leading edge of cutaneous squamous cell carcinoma (SCC): IL-24 driven MMP-7. (2014) *J Invest Dermatol.* 134

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 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

三井 広、皮膚有棘細胞癌の発生における転写因子 E2F4 の役割の解明、第 13 回加齢皮膚医学研究会、2017

Hiroshi Mitsui, Comparative analysis of the expression of a transcription factor, E2F4, in skin tumors, The 42nd Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, 2017

Hiroshi Mitsui, Analysis of the expression of a transcription factor, E2F4, in cutaneous squamous cell carcinoma (SCC), The 47th Annual Meeting of ESDR, 2017

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三井 広 (MITSUI, Hiroshi)
山梨大学・大学院総合研究部・講師
研究者番号：60372504

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()