

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09798

研究課題名(和文) 乳房外ページェット病のアンドロゲン標的療法：世界初の樹立細胞株による基礎的研究

研究課題名(英文) Androgen receptor target therapy of extramammary Paget's disease

研究代表者

辛島 正志 (KARASHIMA, Tadashi)

久留米大学・医学部・講師

研究者番号：70211175

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：乳房外ページェット病は、その由来や細胞生物学的性質など多くの点が不明である。申請者らは本疾患病変部由来の細胞株を世界に先駆けて樹立した(EMPE cell)。乳がん等に有効な抗癌剤は本疾患には無効であり、本疾患は乳がん等の腺癌とは異なる性質をもつ。本疾患は一部の症例は男性ホルモンリセプター(AR)を発現しておりEMPE cellもARを発現している。今回、EMPE cellの男性ホルモンの増殖活性について検討したところ、EMPE cellは男性ホルモン依存性増殖を示した。また、EMPE cellはEGFレセプターの発現がないにもかかわらず、EGFは男性ホルモンよりも強い増殖促進効果を示した。

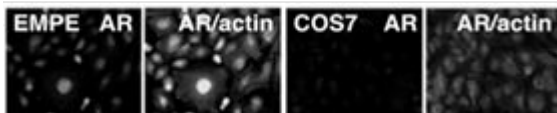
研究成果の概要(英文)：Although numerous cancer cell lines have already been established, to the best of our knowledge, the extramammary Paget's disease (EMPD) cell line has not been established. EMPD cells also express glandular differentiation markers including carcinoembryonic antigen. In this study, we established EMPD cell line (EMPE cell) from typical EMPD skin lesions of an 82-year-old male. Androgen receptor is expressed in EMPE cell, but not Her2/neu proteins. EMPE cell showed positive growth effect by androgen and also EGF. EMPE cells should be extremely useful in the future studies of EMPD.

研究分野：細胞生物学

キーワード：乳房外ページェット病 男性ホルモン アンドロゲン受容体 表皮成長因子受容体

1. 研究開始当初の背景

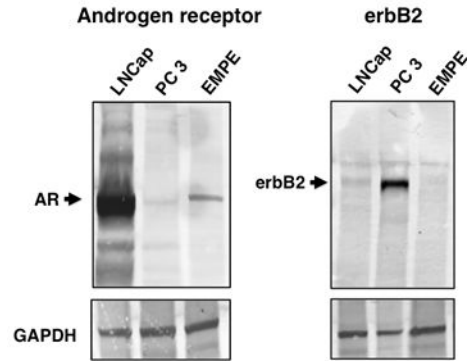
乳房外ページェット病は、これまで切除標本を用いてなされた組織化学・免疫組織化学的検索のみがなされてきた。しかしいまだにその由来も不明であり、乳房外ページェット病の腫瘍細胞の細胞生物学的性状に関する研究はこれまで皆無である。その理由は明快である。これまで乳房外ページェット病病変部から樹立された細胞株が存在しなかったためである。がん研究においては、各種がんそれぞれの固有の細胞株や動物レベルのモデルが必須である。われわれは、数年前に世界初となる乳房外ページェット病病変部皮膚から細胞株を得た (EMPE cell: 2009年、日本研究皮膚科学会にて発表、論文作成中)。この細胞株は、82歳の男性の陰部の乳房外ページェット病病変部から樹立された。この症例は下床のがんを伴わない、皮膚原発の症例である。腫瘍部皮膚を酵素処理した後、マイトマイシン処理をした NIH 3T3 細胞をフィーダーとして、EGF 存在下の高カルシウム培養液で培養を開始した。培養開始後から、正常表皮細胞とは明らかに形態が異なる細胞が増殖してきた。培養後、半年後には正常表皮細胞が増殖を停止し、腫瘍細胞由来と思われる細胞のみが増殖した。その後、数回のクローニングを経て、安定に増殖する細胞株を数種類得ることができた。各細胞株は樹立後数年間経た現在なお、安定に増殖している。経代数代目でフィーダー細胞は不要となった。細胞株のひとつを図1に示す。



【図1】ARは核に発現している

細胞は付着性で敷石状に増殖し、細胞密度が飽和すると、細胞集塊を形成し半浮遊性に増殖する。乳房外ページェット病での免疫組織化学的検索でこれまで報告されている細胞マーカーである CEA 陽性、単層上皮型ケラチンの K15 陽性である。細胞は PAS 陽性で、ジアスターゼ消化性である。透過型電子顕微鏡による検索では細胞内小器官が発達し、細胞質内に電子密度の高い、大きな嚢胞を有する。細胞間の接着装置は未熟である。これらの所見は、これまでに患者病変部皮膚において、国内外で報告されてきた所見に合致する。すなわち、本細胞株は、乳房外ページェット病の腫瘍細胞由来の細胞株であると考えられる。近年、乳房外ページェット病の病変部の腫瘍細胞は、男性ホルモンレセプター (アンドロゲン・リセプター: AR) を発現していると報告が相次いでなされている。われわれは本細胞株の AR の発現の検討を免疫組織化学的検索および全細胞抽出サンプルを用いたウエスタンブロットによる検索をおこなった。その結果、本細胞株が、AR を発現

していることが明らかとなった (図2)。



【図2】ARの発現

2. 研究の目的

乳房外ページェット病は皮膚がんである。高齢者に好発し、近年の高齢化にともないその罹病率は上昇の傾向にある。しかし乳房外ページェット病については未知の部分が多い。がん研究に必須の研究材料である細胞株がこれまで存在しなかったことが、研究の障害のひとつであった。近年われわれは、この乳房外ページェット病病変部皮膚より、世界にさきがけて乳房外ページェット病細胞株を樹立した。本研究では、この乳房外ページェット病由来細胞株について、その男性ホルモン依存性などの細胞生物学的な基礎研究をおこなう。この細胞株を用いた基礎研究により、乳房外ページェット病に対する治療法にあらたなる道を開くことができると期待された。

3. 研究の方法

1. 乳房外ページェット病腫瘍細胞の男性ホルモン依存性についての検討: われわれが樹立した世界初の乳房外ページェット病腫瘍細胞株を用い、*in vitro* の系における乳房外ページェット病腫瘍細胞に対する男性ホルモンの増殖活性の有無について検討した。細胞を無血清・増殖因子不含有の条件下で培養し、G1 期に細胞を同調させた後、男性ホルモンを各種濃度で添加し、経時的に細胞を回収して、細胞数およびフローサイトメーターによる細胞周期の解析をおこなった。
2. 乳房外ページェット病腫瘍細胞に対する男性ホルモン阻害剤の増殖阻害作用についての検討: *in vitro* の系における乳房外ページェット病腫瘍細胞に対する男性ホルモン阻害薬の増殖抑制活性の有無について検討した。細胞を無血清・増殖因子不含有の条件下で培養し、G1 期に細胞を同調させた後、男性ホルモンと男性ホルモン阻害剤であるスタノロンを各種濃度で培地へ添加し、経時的に細胞を回収し、細胞数およびフローサイトメーターによる細胞周期の解析をおこなった。
3. 乳房外ページェット病腫瘍細胞において男性ホルモンにより活性化される遺伝子に

についての検討：上記 1,2 で本細胞株の男性ホルモン感受性が認められたならば、本細胞株を男性ホルモン非存在下と存在下の各条件で培養したそれぞれの細胞における発現遺伝子の差異をマイクロアレイにより比較検討した。

4. 研究成果

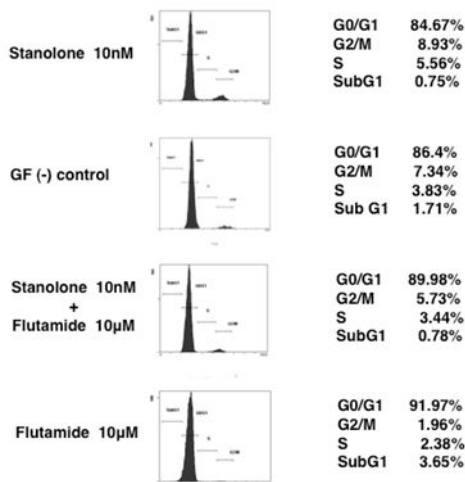
1. 乳房外ページェット病腫瘍細胞の男性ホルモン依存性についての検討：

今回、われわれは樹立した乳房外ページェット病細胞株を用いた細胞生物学的な検討、特に増殖因子についての検討をおこなった。本疾患は一部の症例は男性ホルモンリセプター (AR) を発現しているが、EMPE cell も AR を発現している。そこで今回、*in vitro* の系で EMPE cell における男性ホルモンの増殖活性の有無について検討した。その結果、EMPE cell は男性ホルモン依存性の増殖を示すことが確認された。

さらに検討した結果、EMPE cell は EGF の主たるレセプターである EGF レセプターの発現がないにもかかわらず、EGF は男性ホルモンよりも強い増殖促進効果を示した。AR はリガンドである男性ホルモンにより活性化されるが、それとは別経路で、EGF などの増殖因子がリガンド非依存的に AR の活性化を起こすことが知られている。EMPE cell においては EGF などの増殖因子によるリガンド非依存的な別経路の AR の活性化が主経路である可能性が示唆された。

2. 乳房外ページェット病腫瘍細胞に対する男性ホルモン阻害剤の増殖阻害作用についての検討：

われわれが樹立した EMPE cell を用い、細胞培養系にて男性ホルモン阻害剤に腫瘍細胞の増殖阻害活性があるかどうかを検討した。その結果、抗男性ホルモン薬のひとつであるフルタミドは、濃度依存性に EMPE cell の細胞増殖を抑制することが確認された (図 3)。



【図 3】細胞周期の解析

3. 乳房外ページェット病腫瘍細胞において男性ホルモンにより活性化される遺伝子についての検討：

EGF 存在下・非存在下における RNA マイクロアレイ実験を行った結果、予想に反し AR の活性化ではなく他分子を含む他の経路の活性化が示唆される結果を得、詳細を解析中である。

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 0 件)

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

辛島正志 (KARASHIMA, Tadashi)

久留米大学・医学部・講師

研究者番号：70211175

(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 ()