

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19790774
 研究課題名（和文） 悪性黒色腫の進展・転移のメカニズムーケモカイン受容体の制御因子に関する研究
 研究課題名（英文） Mechanisms of progression in skin cancers

研究代表者
 氏名（アルファベット） 柿沼 誉（KAKINUMA TAKASHI）
 所属機関・所属部局名・職名 東京大学・医学部附属病院・講師
 研究者番号 30332604

研究成果の概要：

平成 19 年度から 20 年度の研究により、悪性黒色腫ではケモカイン受容体 CXCR4,CCR10 は原発巣、転移巣ともに発現は軽度であり進展には関与していないことが分かった。一方、皮膚有棘細胞癌（SCC）では CCR10 - CCL27 が腫瘍細胞で共発現しており、他の皮膚悪性腫瘍ではみられない興味深い結果を得た。SCC 細胞株を用いても同様の結果であり、SCC では CCR10-CCL27 が腫瘍の成長に関与している可能性が示唆された。悪性黒色腫の進展についてはマウスを用いて更に検討を行い、細胞接着因子 beta7-integrin ノックアウトマウス皮膚に B16 メラノーマを接種するとコントロール群と比べ成長が促進し、接着因子 beta7 が皮膚でのメラノーマの成長に関与している可能性が示唆された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
19年度	2,000,000	0	2,000,000
20年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	390,000	3,690,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：皮膚科学

キーワード：皮膚悪性腫瘍、CXCR4,CCR10,CCL27

1. 研究開始当初の背景

悪性黒色腫は皮膚悪性腫瘍の中でも予後不良であり、進展、転移のメカニズムの解明が待たれる。近年ケモカインーケモカイン受容体の相互作用が腫瘍の進展に関与していることが明らかになった。例えば乳癌や前立

腺癌ではかなり研究が進み、CXCR4 が腫瘍の増殖、転移に関与していることが明らかとなった。一方、悪性黒色腫をはじめとする皮膚悪性腫瘍ではケモカインーケモカイン受容体の相互作用が癌の浸潤転移にどの程度かわっているかについてはあまり解明され

ていない。

2. 研究の目的

上記のようにケモカイン受容体はそのリガンドと協調して癌の進展、転移に関与していると考えられている。今回の研究では皮膚悪性腫瘍において2つのケモカイン受容体CXCR4,CCR10が腫瘍の成長にどう関わっているかを明らかにするために研究を行った。CXCR4については他の悪性腫瘍でその関与が重要視されていること、またCCR10については皮膚特異的ケモカインCCL27の受容体であることから今回の中心の受容体として選択した。

3. 研究の方法

はじめに、ヒト悪性黒色腫細胞株(WM115,WM793b、1205Lu、WM1552c)を用いてケモカイン受容体の発現パターンをreal-time PCR、FACSにて検索した。更に病変部検体を用いて、皮膚悪性黒色腫のケモカイン受容体の発現を免疫組織学的に検討した。

次に、他の皮膚悪性腫瘍である有棘細胞癌(SCC)、基底細胞癌(BCC)、Bowen病について検索を行った。まず、各々の癌の病変部検体を用いてCCR10,CCL27の免疫組織学染色を行い、差を比較検討した。次にSCCの細胞株A253を用いてCCR10の発現、CCL27の産生をそれぞれFACS,ELISAを用いて測定した。

最後にメラノーマの進展、転移に関与している因子は何であるかをより検討するために、接着因子であるbeta7インテグリン欠損マウスを用いた研究を行った。Beta7は近年、皮膚免疫において重要な接着因子であることが明らかとなりつつある。今回はbeta7インテグリン欠損マウスの耳皮下に

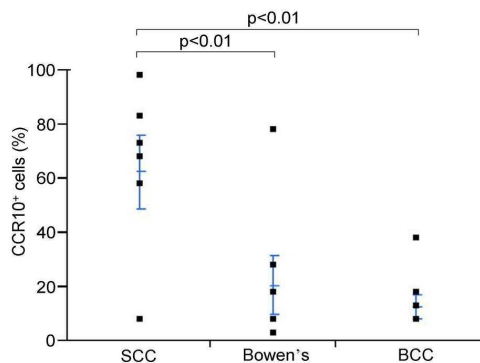
modified-B16メラノーマを皮膚に接種し、腫瘍の進展を観察した。

4. 研究成果

ヒト悪性黒色腫では、ケモカイン受容体CXCR4が原発巣のWM115,WM793bと比較して、よりaggressiveな細胞株である1205Luにて若干の発現亢進をFACSにて認めたが(12% vs 18%)統計学的な有意差はみられなかった。一方CCR10はいずれの細胞株においても発現は認められなかった。次に悪性黒色腫病変部切片を用いてCXCR4,CCR10の免疫組織染色を行った。ケモカイン受容体CXCR4は原発巣、転移巣いずれにおいても強く染色され悪性黒色腫のどのステージでも認められる結果となった。一方,CCR10は原発、転移ともに発現は軽度であった。進展には関与していないことが分かった。

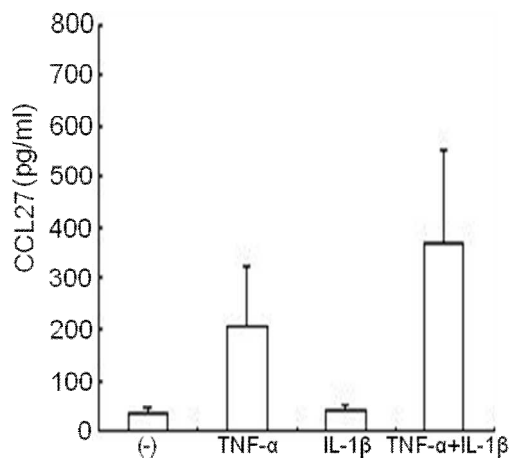
一方、SCC、BCC、Bowen病についても腫瘍細胞におけるCCR10の発現を免疫組織学的に検討した。その結果、特にSCCでは腫瘍細胞の多くがCCR10陽性であり、ボーエン病やBCCと比較して有意に発現が増強していた(図1)。またCCL27についても同様に免疫組織学的検討を行い、やはりSCCにおいて陽性細胞の割合が有意に上昇していた。

(図1)



更に CCL27 が実際に腫瘍細胞から産生されるものかを検討するため、SCC の細胞株 A253 における CCL27 の産生を ELISA を用いて検討した。A253 は TNF- α , IL-1 β の刺激下で産生が著明に増強し、このことから実際の in vivo においても SCC から CCL27 が産生される可能性が示唆された(図 2)。以上のことから SCC においては、CCR10-CCL27 が腫瘍の成長に関与している可能性が示唆された (International Journal of Cancer 投稿中)。これまでの報告では CCL27 はその発現の減弱が浸潤、転移に関係するとされているが、今回の結果では CCR10-CCL27 の相互作用によってむしろ SCC 病変の維持あるいは成長に関わっているのではないかと考えられた。この点では新知見が得られたと考えている。

(図 2)



次に、CCR10 や CXCR4 は実際のヒト悪性黒色腫では進展、転移にはさほど重要とは言えない結果になったため、我々は一体どの因子が癌細胞にとって重要であるかを更に検討を行うこととした。細胞接着因子は主に炎症の場において様々な細胞が炎症の場へ入り込んでいく際に重要な働きをする。近年 beta7 が皮膚での炎症において重要な働きを

有することが明らかとなりつつある。我々は beta7-integrin ノックアウトマウスを用いて耳に modified-B16 細胞を接種し腫瘍の成長を検討することとした。Modified-B16 細胞を通常の wild type マウスの耳に接種した場合、腫瘍免疫が働くことにより、約 70-80% のマウスでは腫瘍が成長してこない (Kakinuma T et al. 2007)。このことを利用して、実際に beta7 インテグリン欠損マウスでは wild type マウスと比較して腫瘍の成長に差がみられるか週数を追って検討を行った。接種 2 週間後には wild type 群、ノックアウト群では腫瘍細胞の成長は認められなかったが、4 週後ではノックアウト群において 10 匹中 6 匹において径 2mm-4mm 大の腫瘍が形成された。一方 wild type では 10 匹中 2 匹のみで径 2mm 大の腫瘍を認めたのみであった。更に週数を追うと 6 週目ではノックアウト群 10 匹中 7 匹において腫瘍の存在が確認されたのに対し、wild type では 10 匹中 3 匹に認められた。腫瘍のサイズでは 4 週目において有意差を認めたが ($p < 0.05$)、6 週目では明らかな差は認められなかった。次に病理組織学的に検討を行った。各々のマウス耳に腫瘍接種 4 週後に腫瘍形成をきたしたマウス耳を用いて HE 染色を施行したところ、wild type マウスでは、腫瘍塊内に多数の浸潤細胞 (tumor infiltrating cells) を認めたが、ノックアウトマウスでは腫瘍塊内への浸潤細胞は少数であった。なお、各々の群で肉眼的腫瘍が認められたマウスについて、頸部リンパ節を取りだして肉眼的転移についても検討したが明らかな腫瘍塊はいずれの群においても認められなかった。以上のことから、beta7 インテグリンは皮膚悪性黒色腫において転移そのものには直接的な働きはしていないものの、tumor infiltrating 細胞をコントロールすることによって腫瘍の成長

に関わっている可能性があることが示唆された。今後、この tumor infiltrating 細胞の phenotype を明らかにしていくことにより、beta7 インテグリンの腫瘍免疫における役割がより明確となっていくと期待される。

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. Interferon -18 gene polymorphism -137 G/C is associated with susceptibility to psoriasis vulgaris but not with atopic dermatitis in Japanese patients.

Kato T, Tsunemi Y, Saeki H, Shibata S, Sekiya T, Nakamura K, Kakinuma T, Kagami S, Fujita H, Tada Y, Sugaya M, Tamaki K. J Dermatol Sci. 2009;53:162-3.

2. IL -17F single nucleotide polymorphism is not associated with psoriasis vulgaris or atopic dermatitis in the Japanese population. Shibata S, Saeki H, Tsunemi Y, Kato T, Nakamura K, Kakinuma T, Kagami S, Fujita H, Tada Y, Sugaya M, Tamaki K. J Dermatol Sci. 2009;53:163-5.

3. Juvenile pustular psoriasis associated with steroid withdrawal syndrome due to topical corticosteroid. Saeki H, Watanabe A, Tada Y, Kakinuma T, Komine M, Ihn H, Asahina A, Etoh T, Kitanaka S, Sato U, Kano H, Igarashi T, Tamaki K. J Dermatol 2008;35:601-3.

[学会発表](計 0 件)

[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]

6 . 研究組織

(1)研究代表者

柿沼 誉 (KAKINUMA, TAKASHI)
東京大学・医学部附属病院・講師
研究者番号 ; 3 0 3 3 2 6 0 4

(2)研究分担者

(3)連携研究者