

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007～2009

課題番号：19790791

研究課題名（和文） Adipocytokine による皮膚有棘細胞癌の分化誘導療法

研究課題名（英文） Differentiation-induction therapy with adipocytokine for cutaneous squamous cell carcinoma

研究代表者

井上 卓也 (INOUE TAKUYA)

佐賀大学・医学部・講師

研究者番号：50380754

研究成果の概要（和文）：細胞培養条件において、ラット皮下脂肪細胞が皮膚有棘細胞癌細胞の分化を促進することを確認した。機序として、脂肪細胞が分泌するサイトカインによるものを考え、その一種である **adiponectin** を皮膚癌細胞の培養液に加えることで、癌細胞の増殖分化に対する影響を調べた。

研究成果の概要（英文）：We have shown that subcutaneous adipocytes of rats facilitate the differentiation of squamous cell carcinoma cells of the skin in vitro. We hypothesized that adipocyte-derived cytokines have a promoting effect on differentiation of carcinoma cells. We examined the effect of adiponectin on squamous cell carcinoma cells of the skin and investigated the role of adipocytokine on the growth and differentiation of the cancer cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	0	1,800,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
2009年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	450,000	3,750,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：皮膚腫瘍学・分化誘導療法

1. 研究開始当初の背景

癌の治療において、癌細胞を傷害して増殖を抑制するという従来行われてきた治療法と全く異なる治療法として、癌分化誘導療法が脚光を浴びてきている。癌分化誘導療法とは、癌細胞を分化させ、増殖停止とアポトーシスを引き起こして癌細胞を死滅させる方法である。皮膚有棘細胞癌においても分化誘導療法開発の試みが進んでおり、我々の研究

において、培養条件下で皮下脂肪細胞が皮膚有棘細胞癌細胞株の分化を促進するという知見を得ている。固形癌の癌分化誘導療法を開発する際には、癌細胞の細胞外基質の修飾と制御を念頭に置く必要があるといわれている。脂肪細胞は多くのサイトカイン(adipocytokine)を産生し、多くの近隣細胞の増殖と分化を調節している。近年、adipocytokine の一種である adiponectin が

抗癌作用を有することがわかり、その機序を突き止めるための研究が盛んに行われている。しかし、皮膚有棘細胞癌においては、肥満や adipocytokine との関連についての研究はなされていない。我々は、皮下脂肪細胞から分泌されるサイトカイン(adipocytokine)が皮膚有棘細胞癌の分化を促進したのではないかと考えた。

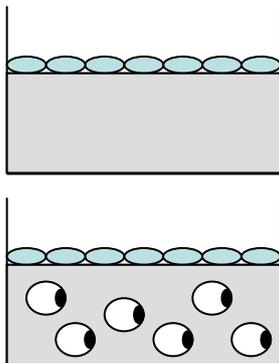
2. 研究の目的

近年抗癌作用を有することがわかった、adipocytokine の一種である adiponectin などのサイトカインが皮膚有棘細胞癌の増殖分化に与える影響を培養系において調べる。この研究を通じて、脂肪細胞が分泌する adipocytokine が、有棘細胞癌の増殖と分化に影響することを証明し、その機序を解明したい。それによって、皮膚有棘細胞癌の分化誘導療法の開発に役立つような知見を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

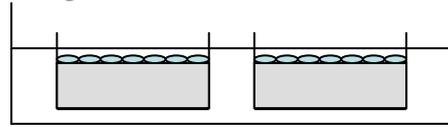
皮膚有棘細胞癌細胞株である DJM-1 細胞と HSC-1 細胞とを三次元コラーゲングル培養法を用いて培養する。DJM-1 細胞は、87 歳女性の背部に生じた有棘細胞癌より樹立された細胞株である。

細胞培養の方法は、径 35mm の底面が半透膜の皿(dish)にコラーゲングルを入れ、その上面に癌細胞を蒔いて培養する方法をとった。コラーゲングル内にラット皮下脂肪組織、または単離した皮下脂肪細胞を混和することによって、癌細胞との混合培養条件を設定した(図1)。

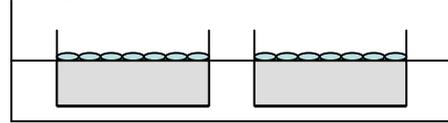


培養液はF12に10%の割合でFCSを混合したものを使用した。35mmの皿(内皿)は径90mmの皿(外皿)の中に置き、外皿の中に培養液を入れ、培養を行なう。内皿底面の膜はニトロセルロースよりなる半透膜であるため、培養液の通過は自由であり、内皿内の培養液の高さと外皿内の培養液の高さは常に一定である。培養液の量を変えることにより、内皿表面に存在する癌細胞層が培養液に覆われた培養条件(submerged condition)と空気に曝された培養条件(air exposed condition)との2つの条件を設定した。

Submerged condition



Air exposed condition

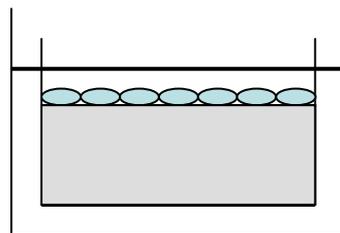


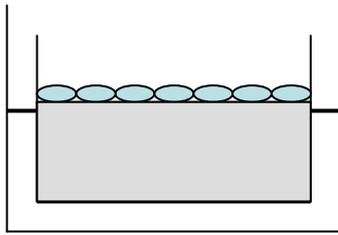
癌細胞はゲル上で重層化して増殖する。培養体(コラーゲングルとコラーゲングル表面の癌細胞とコラーゲングル内の細胞を含む)をホルマリン固定し、組織切片として顕微鏡観察を行う。

設定した培養条件は、以下の条件を設定した。

- 実験系 1-a: 皮膚有棘細胞癌のみ、submerged condition、
- 実験系 1-b: 皮膚有棘細胞癌のみ、air exposed condition、
- 実験系 2-a: 皮膚有棘細胞癌+ラット皮下脂肪組織、submerged condition、
- 実験系 2-b: 皮膚有棘細胞癌+ラット皮下脂肪組織、air exposed condition
- 実験系 3-a: 皮膚有棘細胞癌+ラット単離皮下脂肪細胞・submerged condition
- 実験系 3-b: 皮膚有棘細胞癌+ラット単離皮下脂肪細胞・air exposed condition
- 実験系 4-a: 皮膚有棘細胞癌 +adiponectin(2 μ g/ml)・air exposed condition
- 実験系 4-b: 皮膚有棘細胞癌 +adiponectin(4 μ g/ml)・air exposed condition
- 実験系 4-c: 皮膚有棘細胞癌 +adiponectin(10 μ g/ml)・air exposed condition

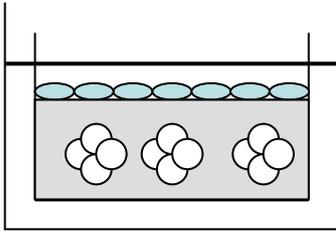
実験系 1





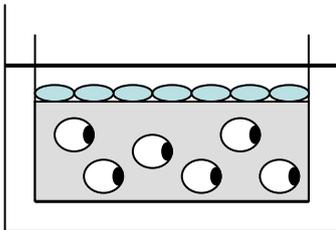
コントロール

実験系 2



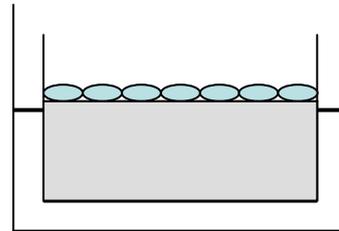
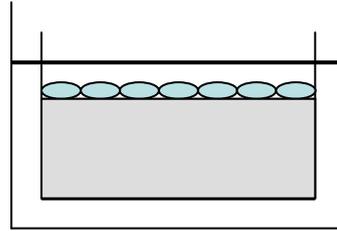
ラット皮下脂肪組織

実験系 3



ラット単離皮下脂肪細胞

実験系 4



Adiponectin 投与 (2, 4, 10 μ g/ml)

ラット皮下脂肪組織は、4週齢のWistarラットから採取した。ラットの皮下脂肪組織を深麻酔下で採取し、鋏でペースト状になるまで細切し、コラーゲンゲル内に混合して培養した。脂肪細胞の単離は、ペースト状の脂肪組織をコラーゲナーゼ処理して遠心分離処理を繰り返すことにより行った。

上記の実験系を用いて、皮下脂肪細胞が癌細胞に与える影響を観察することを最初の目標とした。

更に、培養液に adiponectin をを投与し、コントロールと比較することによって、癌細胞の増殖体に形態的な変化がないか観察した。また、BrdU を培養液に投与し、核内への取り込みを計測することで癌細胞の増殖活性についても評価を行った。

4. 研究成果

皮膚有棘細胞癌細胞株 DJM-1 細胞とラット皮下脂肪組織、単離ラット皮下脂肪細胞との混合培養の結果 (実験系 2、3)、ラット皮下脂肪組織、単離ラット皮下脂肪細胞との混合培養において、DJM-1 細胞は明瞭な層構造を形成した。この変化は、HSC-1 細胞では認められなかった。この細胞層において、ケラチンの発現に変化がないか表皮基底層に発現する CK5、CK14、表皮有棘層に発現する CK1、CK10 について免疫組織化学的手法を用いて検討したが、明らかな発現パターンの違いは認められなかった。この実験によって、ラット皮下脂肪細胞は、DJM-1 細胞に対して分化を促進する方向で影響を及ぼすことを確認したが、ケラチンの発現パターンの変化を証明することはできなかった。

Adiponectin を培養液に投与することにより、脂肪細胞との混合培養と同じ変化が DJM-1 細胞に認められるか検討した。Air exposed condition において、2 μ g/ml、4 μ

g/ml、10 μg/ml の濃度で adiponectin を培養液に投与して2週間まで培養して培養体の形態を観察した(実験系 4)。しかし、コントロールと比較して変化は認められなかった。BrdU の核への取り込み率にも差は認められなかった。

本研究において、ラット皮下脂肪組織または、単離ラット皮下脂肪細胞との混合培養において認められた DJM-1 細胞培養体の形態変化が adiponectin によるものであることを証明することは出来なかった。

しかしながら、培養条件下ではあるが、皮下脂肪細胞が皮膚有棘細胞癌細胞の増殖・分化に対して変化をもたらすことを再確認することはできた。

今後の adipocytokine による皮膚有棘細胞癌の分化誘導療法の開発の可能性を残すことが出来たと考える。

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

井上 卓也 (INOUE TAKUYA)

佐賀大学・医学部・講師

研究者番号: 50380754

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

研究者番号: