

機関番号：11101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20591313

研究課題名（和文） 皮膚有棘細胞癌における R a f キナーゼ抑制蛋白の抗腫瘍効果解析と、治療的応用の検討

研究課題名（英文） Analyses of suppressive effect of Raf kinase inhibitor protein on cutaneous squamous cell carcinoma progression, and consideration for therapeutic use.

研究代表者 六戸 大樹 (ROKUNOHE DAIKI)

弘前大学・医学部附属病院・助手

研究者番号：50436036

研究成果の概要（和文）：SCC 培養細胞を用いて RKIP を過剰発現あるいは減少させたが、ERK リン酸化（pERK）レベルは変化せず、細胞増殖能にも変化を与えなかった。SCC 症例（原発 53 例，転移リンパ節 11 例）の手術検体を用いて、免疫組織化学的に検討した結果、RKIP と pERK の間には有意な関連性は見られなかった。一方、分化度と RKIP 発現に注目したところ、高分化型では RKIP が強陽性となる一方で、未分化型では RKIP 減弱が観察され、RKIP 発現と分化度との間に有意な関連性が示された。RKIP の発現を検討することにより、SCC の悪性度や予後を推測できる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：In well- and moderately-differentiated SCCs, RKIP was broadly and strongly stained in the tumor nests, and RKIP staining was stronger in the keratinizing tumor cells. On the other hand, RKIP staining was only weak or negative in poorly-differentiated SCCs. These results suggest that RKIP is associated with differentiation of cutaneous SCC and assessing RKIP expression may yield important information to the prognosis of the cutaneous SCC patients.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：皮膚科学

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、シグナル伝達、細胞増殖、分化、転移

1. 研究開始当初の背景

皮膚有棘細胞癌（SCC）は皮膚の悪性腫瘍であり、進行するとリンパ節あるいは他臓器転移が生じ予後不良となる。近年、本邦において日光角化症を発生母地とする SCC が増加してきている。一方、乳癌や前立腺癌で、RKIP というタンパクが、癌に対して抑制的に働くことが報告されてきているが、皮膚の SCC に

おける RKIP の働きは未だ研究されていない。

2. 研究の目的

(1) RKIP 発現量変化が古典的 MAPK 経路に及ぼせる影響を与えるのか解析を行う。

(2) 培養 SCC 細胞で RKIP 発現量を増減させることにより、増殖、分化、浸潤能などの性

質が、どのように変化するか検討する。

(3) RKIP の発現量と、SCC の分化度、転移との関係を検討する。

3. 研究の方法

(1) テトラサイクリン誘導性 RKIP 発現ベクターとアンチセンス RKIP ベクターの構築。さらにそれらを SCC 培養細胞に遺伝子導入し、RKIP 発現量をコントロールする。

(2) 作成した細胞株を用いて、RKIP 増減が細胞機能（増殖、浸潤、分化）にいかん作用するか検討する。増殖能は、CellTiter システム、浸潤能は Matrigel を使用する。タンパク発現の変化や ERK リン酸化レベルはウエスタンブロット法で検討する。

(3) SCC において増加させた RKIP と MEK が結合することを免疫沈降法（共沈法）で確認する。

(4) SCC の病変部の標本における RKIP 発現の程度と、その腫瘍の分化度との関係を解析する。

4. 研究成果

(1) はじめに細胞内での RKIP の発現量を任意に調節するために、Tet システムを用いてベクターを構築した。作製したベクターを、SCC 由来の培養細胞株である HSC-1 および A431 に導入し、テトラサイクリン(TC)を添加することにより、細胞内 RKIP 発現を著明に増強できることを確認した。さらにこれらの細胞株で TC 調節性 RKIP 安定発現株を樹立し、以後の実験に用いた。まず、RKIP を発現増加させたが、古典的 MAP キナーゼ経路の下流にある ERK の活性化(リン酸化)は抑制されず、次に、増殖因子である EGF で刺激した場合にも抑制効果はみられなかった。次に、細胞内の RKIP 発現量を減少させて検討するため、RKIP アンチセンスベクターを SCC 細胞に導入し、安定発現細胞株の作成を試みたが、十分な RKIP 発現抑制には至らなかった。そこで、RKIP siRNA を導入した。その結果、RKIP 発現量は十分に減少したが、ERK のリン酸化レベルはコントロールと比較し有意な変化はみられなかった(図 1)。

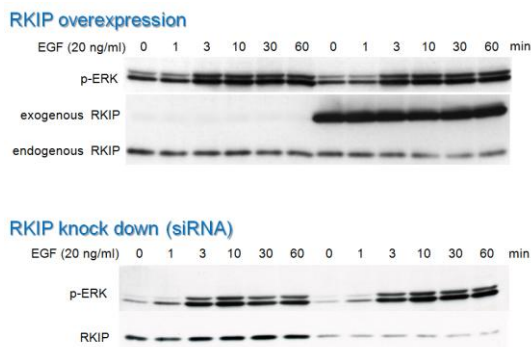


図 1. SCC 細胞株で RKIP を増加あるいは減少させた際の、EGF 刺激後の ERK リン酸化レベル。

(2) HSC-1 細胞で RKIP 発現量を増加あるいは減少させて、細胞増殖能への影響を検討した。RKIP を増加させても細胞増殖は抑制されず、逆に RKIP を減少させた場合も細胞増殖は亢進しなかった(図 2)。以上の結果より、培養細胞レベルでは、皮膚 SCC において RKIP による古典的 MAP キナーゼ経路抑制効果および細胞増殖抑制効果は確認されなかった。

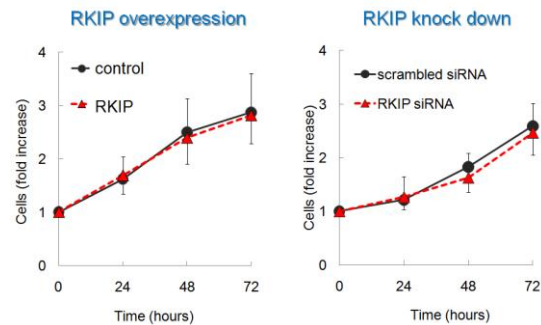


図 2. RKIP の増減による細胞増殖能への影響。

(3) HSC-1 細胞で RKIP 発現量を増加あるいは減少させて、癌細胞の浸潤能への影響を検討した。基底膜マトリックスのモデルである Matrigel を超えて浸潤した細胞数を比較したが、RKIP を増加させても細胞増殖は抑制されなかった (図 3)。

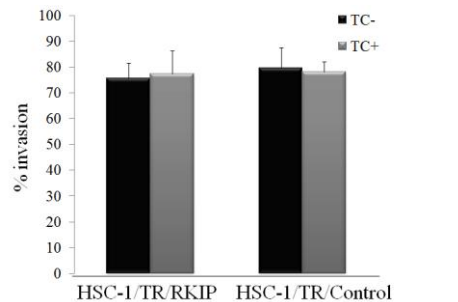


図 3. RKIP 増加による SCC 細胞の浸潤能への影響。

(4) 細胞内で増加させた RKIP-Myc が本来の MEK と結合する性質を維持していることを示すため、免疫沈降法を行った。図 4 のように、Myc 抗体で沈降させたタンパク内に、MEK が検出され、MEK との結合性は証明された。さらに、EGF 刺激により MEK との結合が解離し、結合蛋白量が減少しており、本来の結合、解

離の性質は有していることが示された。

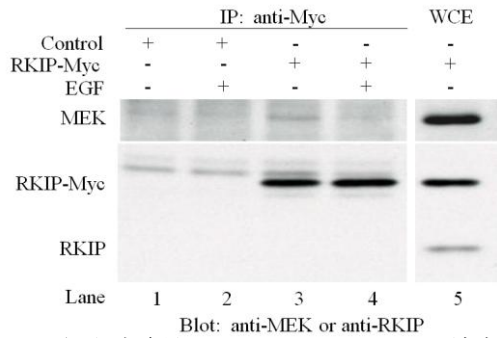


図 4.免疫沈降法による RKIP と MEK の結合の証明.

(5) SCC 症例(原発巣 53 例, 転移巣 11 例)の切除標本を用いて、生体内における RKIP および pERK の発現を免疫組織化学的に検討した結果、培養細胞での結果と同様に RKIP 発現と pERK の間には有意な関連性は見られず、RKIP 発現調節を介する SCC の治療は無効である可能性が示唆された。次に、SCC の場合、その分化度が腫瘍の悪性度と密接な関連があるため、分化度と RKIP 発現に着目したところ、高分化 SCC では特に角化周囲に RKIP が陽性となる一方で、未分化 SCC では RKIP 発現の明らかな減弱が観察され、RKIP 発現と分化度との間に有意な関連性が示された(図 5, 表 1)。

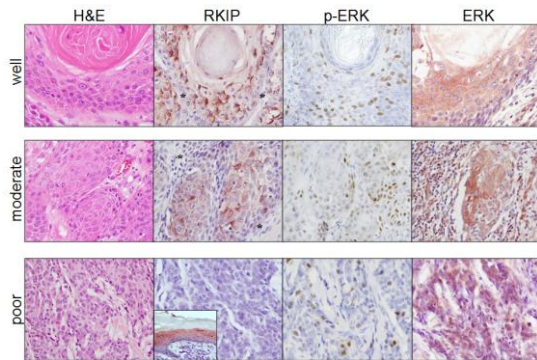


図 5. SCC における RKIP, p-ERK の染色態度と腫瘍分化度との比較.

表 1. SCC53 例の分化度と RKIP, p-ERK の染色強度の比較.

Differentiation	Cases (%)			
	Staining grade			
	1	2	3	4
RKIP**				
well	0 (0)	0 (0)	0 (0)	24 (100)
moderate	0 (0)	5 (25)	8 (40)	7 (35)
poor	6 (67)	3 (33)	0 (0)	0 (0)
p-ERK				
well	2 (8)	7 (29)	4 (17)	11 (46)
moderate	4 (20)	9 (45)	5 (25)	2 (10)
poor	1 (11)	4 (44)	2 (22)	2 (22)
ERK				
well	0 (0)	0 (0)	7 (29)	17 (71)
moderate	0 (0)	0 (0)	5 (25)	15 (75)
poor	0 (0)	0 (0)	2 (22)	7 (78)

(6) 同一症例内での、原発巣と転移リンパ節での RKIP, p-ERK の染色強度を比較したところ、統計学的には有意な変化を認めなかった。しかし、個々の症例をより深く検討したところ、図 6 のごとく、11 症例中 3 症例において、転移巣での RKIP 減少と p-ERK 増強が認められ、症例によっては RKIP の MAPK 経路抑制効果が残存している可能性が示唆された。

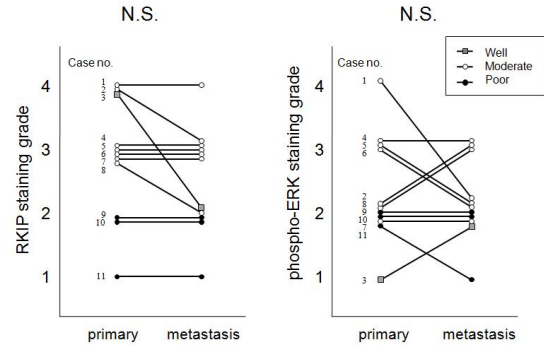


図 6. 症例ごとの原発巣と転移巣の比較

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 1 件)

Rokunohe D, Nakano H, Akasaka E, Kimura K, Takiyoshi N, Nakajima K, Aizu T, Kaneko T, Matsuzaki Y, Tsuchida S, Sawamura D. Raf kinase inhibitor protein expression correlates with differentiation but not with ERK phosphorylation in cutaneous squamous cell carcinoma. *J Dermatol Sci.* 2010; 60:199-201. 査読有

[学会発表] (計 3 件)

①Rokunohe D. Raf kinase inhibitor protein expression correlate with differentiation without affecting the MAPK pathway activity in cutaneous SCC. The 34th annual meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology. 2009. 12. 4-6, Fukuoka.

②六戸大樹. 古典的 MAP キナーゼ抑制タンパク RKIP の皮膚有棘細胞癌における役割. 第 25 回日本皮膚悪性腫瘍学会学術大会. 2009. 5. 22-23. 岡山市.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

六戸 大樹 (ROKUNOHE DAIKI)

弘前大学・医学部附属病院・助手
研究者番号：50436036

(2)研究分担者

中野 創 (NAKANO HAJIME)
弘前大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：90281922

松崎 康司 (MATSUZAKI YASUSHI)
弘前大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：50322946

(3)連携研究者

()

研究者番号：