

令和 6 年 6 月 2 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16236

研究課題名（和文）組織透明化法による乳房外パジェット病の立体構造の解析

研究課題名（英文）Analysis of the three-dimensional structure of Extramammary Paget's disease using the tissue clearing method

研究代表者

中村 善雄（Nakamura, Yoshio）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・講師

研究者番号：20528244

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：複数の乳房外パジェット病（EMPD）の原発巣の検体を組織透明化法の技術を用いて、Paget細胞の増殖様式や真皮内への浸潤、周囲の免疫細胞の分布を解析を試みた。EMPDでは腫瘍が飛石状に分布することがあるが、腫瘍辺縁では小さな腫瘍巣がスキップして分布している様子が観察された。解像度、透明化に要する時間に関する問題が残っており、今後解決が必要である。本研究に関連して、EMPDの疾患進行とアンドロゲン受容体発現との関連を明らかにした。また、EMPDの間質浸潤に伴い統計学的に優位に失活するペプチドAおよびペプチドBを明らかにし、現在研究内容について論文投稿中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

皮膚病理組織において組織透明化を用いた研究開発は進んでおらず、組織透明化による病理の三次元構造の観察が明らかになることで病理組織の包括的な断端評価や腫瘍の分布、さらには腫瘍を取り巻く微小環境が明らかになる。これが簡便に行えれば病理診断にも実用化できる可能性が期待できるという意味で学術的・社会的意義は大きいものと考えられる。乳房外パジェット病（EMPD）の浸潤、進展様式は明らかになっておらず、これらに関わる分子生物学的な機序が明らかになることで、治療標的となりうる可能性がある。希少がんであるEMPDの治療開発は企業主体では進みにくい現状があり、アカデミアが治療標的候補を見出す意義も大きい。

研究成果の概要（英文）：Using the tissue transparency technique, we attempted to analyze the proliferative patterns of Paget's cells, their invasive patterns in the dermis, the dynamics of anti-tumor immunity, and the vascular invasive patterns of Paget's cells in primary lesions of multiple extramammary Paget's disease (EMPD). Problems related to resolution and time required for transparency remain, which will need to be resolved in the future. In connection with this study, we clarified the relationship between disease progression of EMPD and androgen receptor expression (Pathol Res Pract. 2023 Sep;249:154775.). We have also identified peptide A and peptide B, which are statistically predominantly inactivated with stromal invasion of EMPD, and are currently submitting a paper on our research.

研究分野：皮膚科学

キーワード：乳房外パジェット病 組織透明化

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

組織透明化は、ヒトの皮膚組織を一塊の状態、且つ個々の細胞の位置情報と抗原性を保持したままの状態ですべて的に解析することが期待できる手法であり、これまでに行われていた二次元標本の連続切片を3次元化する等の手法では得難かった組織の微細な構築を解析できる可能性があります。本研究ではCUBIC法を元にした透明化検体で、腫瘍細胞及び皮膚を構成する正常細胞の抗原性が保持されているのか免疫組織化学染色により検討し、これらの細胞の局在性が一連の過程を経ても安定的に解析可能となる至適条件を決定し、乳房外Paget病の進展様式、浸潤様式、抗腫瘍免疫の動態について解析を行う。

2. 研究の目的

乳房外パジェット病は、病変部を形成するPaget細胞が独特の浸潤様式を呈することもあり、臨床所見からは予測し得ない切除後の残存病変や術後の再発転移をきたす可能性を有し、腫瘍細胞の浸潤様式を立体的に把握・理解する必要性の高い皮膚腫瘍である。また、組織透明化法はヒトの皮膚組織を一塊の状態、且つ個々の細胞の位置情報と抗原性を保持したままの状態ですべて的に解析することが期待できる技術である。本研究はヒトの皮膚において組織透明化の手法を確立したうえで、乳房外パジェット病の原発巣における腫瘍細胞の増殖様式を立体的に可視化することを目的とする。

3. 研究の方法

令和3年度は同意の得られた複数の乳房外パジェット病の原発巣の検体を対象にCUBIC法による組織透明化を実施し、その過程で組織に含有するメラニン顆粒を脱メラニン化する。その後、解析する蛋白質を標的とした抗体と反応させ、光発色処理を経た後に光シート顕微鏡で標的とする細胞や蛋白質の分布を解析する。透明化や脱メラニン化の過程では、組織を構成する細胞の位置情報や構成蛋白質の抗原性が部分的に失われる可能性があるため、処理後は表皮細胞、腫瘍細胞、血管内皮細胞、各種血球細胞、基底膜等のマーカーとなる諸蛋白質の抗原性が保持されているのかを免疫組織化学染色によって検討し、これらの細胞の局在性が一連の過程を経ても安定的に解析可能となる至適条件を決定する。免疫組織化学染色に用いる各構成細胞および組織のマーカーとしては、Paget細胞:GCDFP15、基底膜;IV型コラーゲン、血管内皮細胞:CD31、T細胞リンパ球:CD3、CD4、CD8等、B細胞リンパ球:CD20等を予定している。令和4年度は前年度に得られた組織の三次元解析の諸条件をもとに、検体数を10例以上に拡大したうえで、以下に例示するような検討を行い、Paget細胞の動態を明らかにする。1)Paget細胞と表皮基底膜の二重染色によって表皮内におけるPaget細胞の増殖様式や真皮内への浸潤様式を解析。2)Paget細胞と諸々のT細胞の二重染色によってPaget細胞に対する抗腫瘍免疫の動態を解析。3)Paget細胞と血管内皮細胞の二重染色によってPaget細胞の脈管浸潤様式を解析。4)上記1)~3)等の検討より得られたPaget細胞の三次元的な動態の情報を、該当する部位の皮疹の所見や術後の再発・転移等の臨床情報と比較検討し、患者の術後経過や予後を予測し得るようなPaget細胞が三次元下で呈する病理組織学的な所見を見出す。また、これらの検討の過

程で臨床に反映可能な有益な情報が多数得られた場合には、対象を乳房外パジェット病に限ることなく、多様な皮膚腫瘍や皮膚炎症性疾患に拡大して解析を行う予定である。

4. 研究成果

複数の乳房外パジェット病(EMPD)の原発巣の検体を対象に CUBIC 法による組織透明化を実施し、透明化法によって腫瘍の 3 次元構造の理解を試みた。EMPD では臨床的にしばしば飛石状にスキップしてみえるが、透明化・抗体標識した病理組織を光シート顕微鏡での腫瘍の観察を行うと腫瘍辺縁では非連続性に進展している様子が観察された。その他の細胞の抗原性も保持が確認されたが解像度の問題点、透明化に長時間を要するなどの問題点があり、今後問題点を解決し結果公表を目指す。本研究に関連して、EMPD の浸潤に関わる分子として、アンドロゲン受容体(AR)の発現との関連に注目し、実際に 108 例の病理検体にて染色を行い、AR 染色と疾患進行との関係性を検討し、統計学的に優位な関係性があることを示した (Pathol Res Pract. 2023 Sep;249:154775.)。また、EMPD の浸潤とペプチド A およびペプチド B の関係性についての 97 例の病理検体を用いて解析を行い、ペプチド A および B が表皮内ではそれぞれ陽性率 100% で発現しているものの、浸潤病変では陽性率が優位に低下することを明らかにした (論文投稿中)。これらの研究に関する免疫染色等においても、一部本研究費が寄与した。また、EMPD の家族例における MET 遺伝子の関与に関する報告(Clin Exp Dermatol. 2024 Mar 19:11ae081. doi: 10.1093/ced/11ae081.)の免疫染色等においても一部本研究費が寄与した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Junko Kuramoto, Kenta Kobayashi, Ikuko Hirai, Yoshio Nakamura, Takeru Funakoshi, Yae Kanai	4. 巻 249
2. 論文標題 Clinicopathological significance of androgen receptor expression in extramammary Paget disease: An analysis of 92 patients	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Pathol Res Pract.	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.prp.2023.154775.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Yuki Kobayashi, Yoshio Nakamura, Umi Tahara, Kohei Nakamura, Kuniaki Nakanishi, Akihiro Miyagawa, Hiroto Horikawa, Kenta Kobayashi, Takeru Funakoshi, Kokichi Sugano, Mineko Ushima, Teruhiko Yoshida, Toyoko Inazumi	4. 巻 0
2. 論文標題 Identification of a rare MET variant in a familial case of extramammary Paget's disease	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Clin Exp Dermatol.	6. 最初と最後の頁 1-5
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/ced/llae081.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------