

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23591624

研究課題名(和文) 新たに見出した有棘細胞癌予後マーカー群の検証

研究課題名(英文) A search for candidate genes involved in invasion and metastasis of cutaneous squamous cell carcinoma

研究代表者

武居 公子 (TAKEI, Kimiko)

琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：90325861

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：皮膚有棘細胞癌のマウスモデル細胞株である低転移株と高転移株を用いて皮膚有棘細胞癌の転移のマーカーとなる候補分子を同定した。1978年から2012年の35年間に琉球大学医学部附属病院を受診した有棘細胞癌448例中、いずれも文書による同意が得られた転移症例11症例と年齢、性別が一致し、治療後4年間転移が確認されない11症例を非転移対照症例とし、候補分子の発現を解析した。

その結果、ケラチン8/18の発現およびmir-221/222の発現と皮膚有棘細胞癌の転移がそれぞれ統計的に有意な相関を示し、皮膚有棘細胞癌の転移とケラチン8/18およびmir-221/222発現との関連が明らかになった。

研究成果の概要(英文)：To search for biomarkers to identify patients with a high risk of cSCC, we compared protein and microRNA (miRNA) expression profiles between transformed mouse keratinocytes and its metastatic derivatives. MiR-221/222, keratin 8 (K8)/18 were upregulated in metastatic derivatives.

We then examined whether miR-221/222 and K8/18 could serve as markers to identify high-risk patients. Of the 448 patients diagnosed/treated between 1978 and 2012 at Ryukyu University Hospital, 19 (4.2%) were metastatic, and 11 of which could be enrolled. Thus, we compared miR-221/222 and K8/18 expression between 11 metastatic and 11 non-metastatic patients in a matched-pair case-control study.

MiR-221/222-double-positive staining and K8/18-double-positive staining were highly significantly associated with metastasis (each $p=0.004$, binomial exact test). To our knowledge, this is the first report on the potential utility of miR-221/222 and K8/18 as biomarkers for high-risk cSCCs.

研究分野：皮膚腫瘍学

キーワード：有棘細胞癌 転移 ケラチン マイクロRNA

1. 研究開始当初の背景

近年、高齢人口の増加にともなって皮膚悪性腫瘍症例も増加している。その中でも有棘細胞癌は高頻度にみられる。有棘細胞癌に限れば、その発生頻度は皮膚癌全体の 17% 程度だが、前癌状態 (表皮内癌) である光線角化症やボウエン病も含めると 48% 近くにはのぼる¹。近年は早期発見例が多くなっているが、深刻な状態で受診する例も少なからずあり、また高齢で再発し治療に難渋する症例もある。治療を困難にする要因として悪性腫瘍の浸潤・転移による局所再発や術後転移があげられる。有棘細胞癌の浸潤・転移能に関連するバイオマーカーがあれば、適切な術前術後の対応が可能となる。

2. 研究の目的

有棘細胞癌の浸潤・転移に関連する新規マーカーを同定する。

3. 研究の方法

(1) マウスモデル細胞株での候補分子同定

培養マウスケラチノサイト細胞株である Pam212 細胞 (低転移性株) と、娘細胞株 (LY-1, LY-2, LY-8, LU-1: 高転移性株) を用いて DNA チップによりメッセンジャー RNA (mRNA)、マイクロ RNA (micro RNA) の発現比較をおこなった。

(2) 臨床検体における候補分子の発現解析

1978 年から 2012 年までの 35 年間に琉球大学医学部附属病院皮膚科を受診し検査および治療を受けた有棘細胞癌症例 448 例 (男性 184 例、女性 264 例) 中、転移を生じたのは 19 例 (4.2%、男性 11 例、女性 8 例) であった。このうち文書による同意が得られた転移性有棘細胞癌症例 (11 例) と年齢、性別を合致させた非転移性有棘細胞癌症例 (11 例) を対象とした。尚、Brantsch らの有棘細胞癌大規模解析データ²に従い、術後 4 年間再発が認められない症例を「非転移症例」と定義した。切除後腫瘍における候補分子の発現を免疫染色および in situ hybridization 法で検討し、症例・対照研究による統計的解析をおこなった。in situ hybridization には EXIQON 社の miRCURY LNATM Detection probe をプローブとし、BioChain 社の IsHyb In Situ ハイブリダイゼーションキットを用いた。免疫染色には Santa Cruz 社の抗ケラチン 8 マウスモノクローナル抗体、抗ケラチン 18 マウスモノクローナル抗体を抗体とし、Dako 社の

LSABTM2 Kit を用いた。

4. 研究成果

(1) マウスモデル細胞株を用いたマイクロアレイ法による候補分子同定

mRNA マイクロアレイでは皮膚有棘細胞癌の浸潤・転移に関与する有力な候補分子として K8/18 (keratin 8/18)、VLDLR (very low density lipoprotein receptor)、Yap1 (Yes-associated protein 1)、Schip1 (schwannomin interacting protein 1)、microRNA マイクロアレイでは、メラノーマの進行を促進することが報告されている³ miR-221/222 が同定された。

(2) 臨床検体における新規マーカー解析

転移症例と非転移対照症例の手術検体における候補分子の発現解析をおこなった。マイクロ RNA の miR-221/222 およびケラチン 8/18 が有力な候補分子と考えられたので、それぞれ in situ hybridization 法、免疫染色法で発現を検討した。尚、VLDLR、Yap1、Schip1 についても免疫染色法による発現解析をおこなったが、転移例と非転移例での解析結果に統計的有意差は見られなかった。

転移例				
年齢・性別	K8	K18	miR-221	miR-222
50・女性	+	+	+	+
66・女性	+	+	+	+
73・女性	+	+	-	-
47・男性	+	+	+	+
54・男性	+	+	+	+
57・男性	+	+	+	+
68・男性	+	+	-	-
69・男性	+	+	+	+
81・男性	+	+	+	+
87・男性	+	+	+	+
94・男性	+	+	+	+
非転移例				
54・女性	-	+	-	-
67・女性	+	-	-	-
68・女性	-	-	-	-
51・男性	+	+	-	+
58・男性	-	+	-	-
60・男性	+	+	-	-
71・男性	+	-	-	+
73・男性	-	-	-	+
81・男性	+	-	+	-
82・男性	-	-	-	-
94・男性	+	+	+	+

表 1 転移症例と非転移症例におけるバイオマーカー発現解析結果

表 1 に転移症例と非転移症例における K8、K18 の免疫染色による発現解析と、miR-221、miR-222 の in situ hybridization による発現解析の結果を示した。上段に転移症例群、下段に対応する非転移例群を示し、陽性は「+」、陰性は「-」と表示した。転移例では 2 例を除いて全てのバイオマーカーが陽性であったが、非転移例では全てのバイオマーカーが陽性であったのは 1 例のみであった。

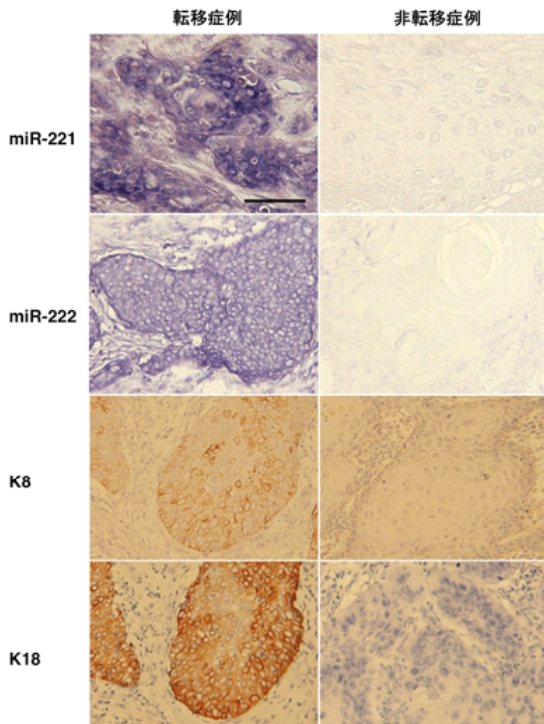


図 1. 転移症例と非転移症例における候補分子の発現解析

図 1 に代表的な染色結果を示した。左側の 4 枚は転移症例、右側の 4 枚は非転移症例、上段の 4 枚は miR-221/222、下段の 4 枚は K8/18 の検討結果である。スケールバーは 100 μm である。miR-221/222 の染色では、核染色は行なわなかった。K8/18 の免疫染色では、ヘマトキシリンによる対比染色を行ない、核が青色に染色されている。転移症例では miR-221/222 が細胞質に青紫色に、K8/18 が細胞質に茶色に強く染色されている (陽性) のに対し、非転移症例ではバックグラウンドの発色のみ (陰性) であった。

症例・対照研究による統計解析結果を表 2 に示した。2 項検定による統計解析の結果、miR-221/222 両方陽性、K8/18 両方陽性が皮膚有棘細胞癌の転移と統計的に有意な相関を示

した (それぞれ $p=0.004$)。

症例とバイオマーカー	転移症例	非転移症例	p 値
年齢の中央値 (幅)	68 (47-94)	68 (51-92)	
性別、人数 (%)			
男性	8 (73)	8 (73)	
女性	3 (27)	3 (27)	
miR-221/222、数 (%)			
両方陽性	9 (81)	1 (9)	0.004
miR-221陽性	9 (81)	2 (18)	0.008
miR-222陽性	9 (81)	3 (27)	0.063
両方陰性	2 (18)	7 (64)	
K8/18、数 (%)			
両方陽性	11 (100)	3 (27)	0.004
K8陽性	11 (100)	6 (55)	0.003
K18	11 (100)	5 (45)	0.016
両方陰性	0 (0)	3 (27)	

表 2. 転移症例と非転移症例における候補分子発現の統計解析

これまでに正常皮膚と有棘細胞癌の検体とで micro RNA 発現を比較した報告はあるが、転移症例と非転移症例における micro RNA の発現を比較した報告は無い。今回の研究で転移・非転移の明確な定義の下に miR-221/222 と有棘細胞癌の転移との相関が初めて明らかになった。micro RNA は様々な分子の発現を制御しており、標的分子検索サイトで検索すると 323 個の標的分子候補が挙げられる (TargetScan Release 6.2, <http://www.targetscan.org/>)。我々が行なった有棘細胞癌のマウスモデル細胞株を用いた mRNA マイクロアレイにおいて、高転移株における mRNA 発現と低転移株における mRNA 発現とを比較すると 59 分子の発現が 1/4 以下となっており、有力な候補分子と考えている。発現が 1/4 以下となっていた分子のうち 2 分子は miR-221 の標的分子候補であるため、これらは miR-221/222 の直接作用により転移を抑制している可能性があるため、更なる検討を行いたいと考えている。

K8/18 については、我々は K8/18 両方陽性が有棘細胞癌の浸潤に関与することを既に報告したが⁴、今回の解析により転移にも関与することが明らかになった。K8/18 は正常皮膚においては表皮ケラチノサイトでの発現はみられず、汗腺において発現がみられる。このことから、皮膚の免疫染色においては、同一標本内に陽性コント

ロールと陰性コントロールが同時に存在する為、染色結果の判定が明確にできるという利点を持つ優れたバイオマーカーであるといえる。

<引用文献>

1. Ishihara K et al., Statistical profiles of malignant melanoma and other skin cancers in Japan:2007 update. Int J Clin Oncol 13 2008, 33-41
2. Brantsch KD et al., Analysis of risk factors determining prognosis of cutaneous squamous-cell carcinoma: a prospective study. Lancet Oncol 9 2008, 713-20
3. Felicetti F et al., The promyelocytic leukemia zinc finger-microRNA-221/-222 pathway controls melanoma progression through multiple oncogenic mechanisms. Cancer Res 68 2008, 2745-54
4. Yamashiro Y et al., Ectopic coexpression of keratin 8 and 18 promotes invasion of transformed keratinocytes and is induced in patients with cutaneous squamous cell carcinoma. Biochem Biophys Res Commun 399 2010, 365-72.

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)

1. Enkhbaatar Ulziikhshig, Maitsetseg Bayarjargal, Kimiko Takei, Minoru Oshiro and Ken-ichi Kariya.

Phenotypic changes in a squamous cell carcinoma cell line induced by an effector kinase of a small G protein Rap2, Ryukyu Medical Journal, 査読有, Vol. 32, No.3, 4, 2013, pp. 89-94.

[学会発表] (計 1 件)

1. Kimiko Takei, Yoshito Yamashiro, Masato Umikawa, Tsuyoshi Asato, Minoru Oshiro, Yukiko Uechi, Kiyohito Taira, Ken-ichi Kariya and Hiroshi Uezato

A search for candidate genes involved in invasion and metastasis of cutaneous squamous cell carcinoma 日本研究皮膚科学会 第36回年次学術大会・総会. (2011.12.9-11). 国立京都国際会館 (京都府、京都市)

[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:
出願年月日:
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

武居公子(TAKEI, Kimiko)
琉球大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号:90325861

(2)研究分担者

上里 博(UEZATO, Hiroshi)
琉球大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号: 10137721

稲嶺 盛彦(INAMINE, Morihiko)

琉球大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号:90437989

(3)連携研究者

()

研究者番号: