

機関番号：15501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659781

研究課題名(和文) 超早産児における皮膚成熟促進治療薬の開発を目指した基礎的研究

研究課題名(英文) Study for the establishment of the treatment to promote skin maturation in preterm labor infants

研究代表者

杉野 法広 (SUGINO, Norihiro)

山口大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：10263782

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：扁平上皮癌の腫瘍マーカーとして知られているSCC抗原が、扁平上皮細胞において、細胞間接着因子の産生を増加させ、扁平上皮の層構造を維持する作用を持つことを明らかにすることを目的とした。扁平上皮細胞の培養において、細胞外カルシウム濃度の増加によりSCC抗原発現の増加と共に、細胞間接着因子であるE-カドヘリン発現の増加と細胞同士が密着し一部重層化する形態変化を示したが、SCC抗原経路を抑制すると、これらの変化は阻止された。すなわち、SCC抗原は扁平上皮の層構造を維持することで皮膚のバリア機構に貢献している可能性があり、SCC抗原が皮膚の層構造を成熟させる治療法として発展する可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：This study was undertaken to investigate whether squamous cell carcinoma antigen (SCCA), which is well known as a tumor marker of SCC, has the abilities to stimulate production of cell-to-cell adhesion molecules and to maintain the structure of squamous epithelium. Expression of E-cadherin, a cell-to-cell adhesion molecule, was increased by incubation with calcium, accompanied by the morphological changes like epithelial cells in normal keratinocytes. These changes induced by calcium were abolished in the SCC cell lines in which SCCA expression was suppressed by transfection with the antisense cDNA of SCCA. These results suggest that SCCA contributes to the maintenance of the structure of squamous epithelium. The present study will be useful for the establishment of the novel treatment to promote skin maturation in preterm labor infants.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：皮膚 SCC 扁平上皮 E-カドヘリン

## 1. 研究開始当初の背景

近年、体外受精 - 胚移植などの生殖補助医療の進歩・普及により、早産児の増加が社会問題となっている。早産児に対する出生後の管理は目覚ましい進歩があり、多くの新生児の救命が可能となっている。しかしながら、超早産児はいまだに敗血症が原因で死亡の転帰となっている場合が多い。これは、皮膚のバリア構造が未成熟で、皮膚を介して全身的な感染症へと進展していることが原因であり、児の皮膚のケアには難渋しているのが現状である。皮膚には、細菌やウイルスの侵入に対する生体のバリアとしての働きがあり、そのひとつは、扁平上皮の厚い層構造という特徴であるが、この扁平上皮の層構造の維持機構の詳細は明らかにされていない。

SCC 抗原は扁平上皮癌の組織特異的な腫瘍マーカーとして広く利用されているが、正常扁平上皮においても存在する。扁平上皮は表層から順に角質層、顆粒層、有棘層、傍基底層および基底層より構成され、最終段階として角化する。興味深いことに、SCC 抗原は扁平上皮の中層領域である有棘層から顆粒層に局在しているが、傍基底層および基底層では発現はみられない。蛋白分解酵素である cathepsin L は顆粒層に存在する transglutaminase を活性化し、扁平上皮細胞の角化への移行を誘導する。我々は、これまでに SCC 抗原が serine proteinase inhibitor (SERPIN) family に属し蛋白分解酵素を実際に阻害する作用を持つことを明らかにした。すなわち、SCC 抗原は SERPIN として作用し cathepsin L を阻害するため、角化への移行を抑制することにより層構造の維持に關与する可能性が考えられる。また、扁平上皮では、組織中のカルシウム濃度の上昇に従い、上皮は分化し重層化する。我々は癌細胞で、SCC 抗原がカルシウム依存性の接着因子である

E - カドヘリンの発現を調節して細胞間の接着作用に影響を与えることを見出している。

生理的に SCC 抗原がどのくらいの時期から皮膚に発現するかは非常に興味をもたれるところであるが、妊娠週数における羊水中 SCC 抗原量を測定した我々の成績では、皮膚構造の未発達な時期（妊娠 16 週未満）では SCC 抗原の検出は著しく低い。妊娠週数が進み、胎児の皮膚の成熟に伴って SCC 抗原量の増加が認められる。さらに我々は、SCC 抗原遺伝子は脊椎動物の中でも魚類や爬虫類といった表皮が扁平上皮層構造を有さない種では SCC 抗原遺伝子は発現していないことを見出している。したがって、皮膚扁平上皮の形成・維持と SCC 抗原の発現には密接な関係があることが伺える。

## 2. 研究の目的

SCC 抗原が、生理活性物質として作用し、正常扁平上皮細胞において、E-カドヘリン発現増加を介して細胞間接着を増強することにより、皮膚の層構造の維持に關与することを明らかにする。

## 3. 研究の方法

正常扁平上皮細胞において、(1) 細胞外カルシウムの濃度変化にともなう細胞分化と細胞間接着因子の発現の変化、および(2) それに關わる SCC 抗原の役割を明らかにする。

(1) 細胞外のカルシウム濃度の増加に伴って、扁平上皮細胞の分化と共に SCC 抗原と細胞間接着因子の発現がどのように変化するかを調べる。

一般的に、カルシウム濃度の上昇に従い、正常扁平上皮は分化の傾向を示す。また、0.3 mM 以下では重層化せず、1.0 mM 以上では重層化することが報告されている。そこで、ヒトケラチノサイトを無血清培地で、培養上清中のカルシウム濃度を 0, 0.1,

0.5, 1.0, 2.0 mM に調整して培養し、以下の ~ の項目を検討する。

細胞形態や細胞動態(重層化・細胞凝集)を位相差顕微鏡で観察する。

細胞内における SCC 抗原の発現をウエスタンブロット法と real-time PCR で測定する。

培養液中(細胞外に放出される)の SCC 抗原の濃度を測定する。尚、SCC 抗原の測定には、アボット社製の IM X アナライザー(現有設備)を用いて測定する(確立済み)。

扁平上皮の分化の指標としてインボルクリンの発現をウエスタンブロット法と real-time PCR で測定する。

細胞間接着因子である E-カドヘリンとカテニンの発現をウエスタンブロット法で測定する。

(2)細胞外カルシウム濃度の変化にともなう細胞分化と細胞間接着因子の発現が、SCC 抗原の細胞内発現の増加および低下によって影響を受けるかを調べる。

SCC 抗原を過剰に発現させるために、SCC 抗原のセンス cDNA を含んだウイルスベクターをケラチノサイトに感染させ遺伝子導入する。逆に、SCC 抗原の発現を抑制するために SiRNA 法によって SCC 抗原遺伝子のノックダウンを行う。尚、ウエスタンブロット法により、SCC 抗原の発現程度を確認する。この両者の細胞を用いて、上記の実験計画(1)と同様に、種々のカルシウム濃度で培養し、~ の項目を検討する。

#### 4. 研究成果

(1) 細胞外カルシウムの濃度変化にともなう細胞分化と細胞間接着因子の発現の変化  
細胞形態と細胞動態について

カルシウム濃度が 0 mM では細胞の大きさは小型で細胞の増殖は遅く、細胞間の接着は粗であった。0.01 mM を超えると細胞形態は大きくなり、上皮細胞に特徴的な形態を

示すようになった。さらに、0.1 mM 以上で細胞間は近接する傾向となり、特に 1.0 mM では細胞同士が密着し、一部重層化を認めた。細胞増殖については、カルシウム濃度が 0.01 mM 以上で増殖が亢進した。(図 1、2)。

図1 Ca 濃度変化によるkeratinocyte の形態変化 (Day 5)

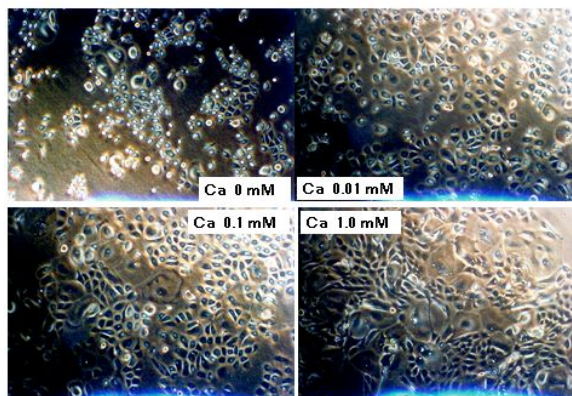
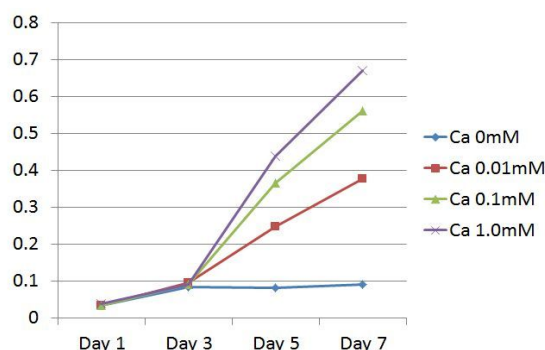


図2 Ca 濃度がkeratinocyte の増殖に与える影響



細胞内の SCCA 発現について

ウエスタンブロット法と real-time PCR で SCC 抗原の発現を検討した。カルシウム濃度が 0 mM では SCC 抗原は低発現であったが、0.01 mM 以上で SCC 抗原の発現上昇を認めたが、カルシウムの濃度依存性に SCC 抗原の発現上昇は認めなかった(図 3)。

培養液中の SCC 抗原の濃度

測定感度以下であった。

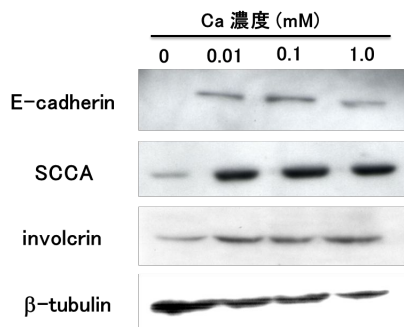
扁平上皮の分化マーカーであるインボルクリンの発現について

ウエスタンブロット法でインボルクリンの発現を検討した。インボルクリンの発現は、カルシウム濃度が 0 mM では低発現であったが、0.01 mM 以上で発現上昇を認めたが、カルシウムの濃度依存性にインボルクリン

の発現上昇は認めなかった(図3)。

E-カドヘリンの発現についてウエスタンブロット法でE-カドヘリンの発現を検討した。カルシウム濃度が0 mMではE-カドヘリンの発現を認めず、0.01 mM以上でE-カドヘリンの発現を認めたが、カルシウムの濃度依存性のE-カドヘリンの発現上昇は認めなかった(図3)。この結果は細胞間接着についての形態(カルシウム濃度0 mM)と矛盾ないと考える。

図3 Ca濃度変化による分化マーカーの発現



## (2) 細胞外カルシウムの濃度変化にともなう細胞分化と細胞間接着因子の発現の変化に関わる SCC 抗原の役割

SCC 抗原の発現抑制を目的として、安定的な発現抑制が得られるように SCC 抗原のアンチセンス cDNA を扁平上皮細胞に遺伝子導入することを試みた。しかしながら、リポフェクチン法による遺伝子導入後の薬剤によるセレクションで primary cell である扁平上皮細胞(ケラチノサイト)は、SCC 抗原のアンチセンス cDNA の遺伝子導入が困難であり、安定株が得られなかった。また、SCC 抗原の安定的過剰発現のために、SCC 抗原のセンス cDNA を遺伝子導入も試みたが、同様の結果であった。そこで、SCC 抗原と結合するタンパクである carbonyl reductase (CR) のアンチセンス遺伝子を子宮扁平上皮癌細胞に導入し安定株を得た。この細胞の機能解析を行ったところ、細胞間接着因子の E-カドヘリン産生の低下と同時に細胞の接着が疎となり遊走能を増加

させた(図4,5)。すなわち、SCC 抗原-CR系は、扁平上皮細胞の遊走を抑制し皮膚の層構造の肥厚促進作用を有することが示唆された。

図4 SCC抑制によるSiHa細胞の形態変化

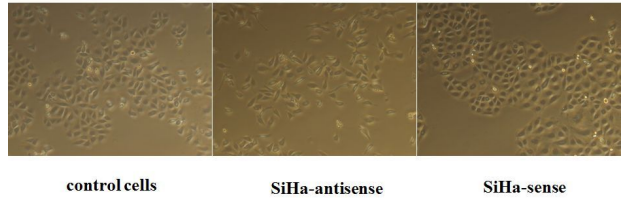
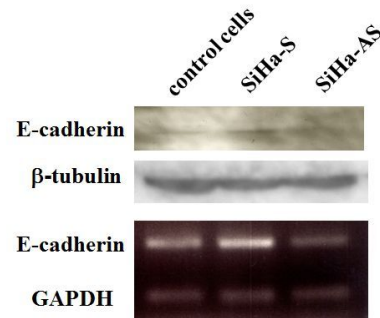


図5 SCC抑制によるE-カドヘリンの発現変化



## (3) 結論

本研究では、扁平上皮癌の腫瘍マーカーとして知られている SCC 抗原が、扁平上皮細胞において、細胞間接着因子の産生を増加させ、扁平上皮の層構造を維持する作用を持つことを明らかにすることを目的とした。扁平上皮では、組織中のカルシウム濃度の上昇に伴い上皮は分化して重層化する。まず本研究では、扁平上皮細胞において、細胞外カルシウム濃度変化に伴う細胞形態変化と細胞接着因子発現の変化を調べたところ、カルシウム濃度の増加により SCC 抗原発現の増加とともに、細胞間接着因子である E-カドヘリン発現の増加と細胞同士が密着し一部重層化する形態変化を示した。また、SCC 抗原系を抑制すると、細胞間接着因子の E-カドヘリン産生が低下し、細胞接着は疎となった。すなわち、SCC 抗原はカルシウム濃度の増加変化のもとで、細胞間接着因子の E-カドヘリン産生を増加させ、細胞同士を密着させ重層化する形態

変化を誘導する作用を有することが考えられた。SCC 抗原は扁平上皮の層構造を維持することで皮膚のバリア機構に貢献している可能性がある。本基礎研究の成果により、SCC 抗原が皮膚の層構造を成熟させる治療法として発展する可能性が示された。

## 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 21 件)

Yoshidomi K, Murakami A, Yakabe K, Sueoka K, Nawata S, Sugino N (2014) Heat shock protein 70 is involved in malignant behaviors and chemosensitivities to cisplatin in cervical squamous cell carcinoma cells. *J Obstet Gynaecol Res*, 40: 1188-1196. 査読有

Murakami A, Yakabe K, Yoshidomi K, Sueoka K, Nawata S, Yokoyama Y, Tsuchida S, Fahd Al-Mulla, Sugino N (2012) Decreased carbonyl reductase 1 expression promotes malignant behaviours by induction of epithelial mesenchymal transition and its clinical significance. *Cancer Lett* 323: 69-76. 査読有

Murakami A, Fukushima C, Yoshidomi K, Sueoka K, Nawata S, Yokoyama Y, Tsuchida S, Ismail E, Al-Mulla F, Sugino N (2011) Suppression of carbonyl reductase expression enhances malignant behaviour in uterine cervical squamous cell carcinoma: Carbonyl reductase predicts prognosis and lymph node metastasis. *Cancer lett* 311: 77-84. 査読有

Fukushima C, Murakami A, Yoshitomi K, Sueoka K, Nawata S, Nakamura K, Sugino N (2011) Comparative proteomic profiling in squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Proteomics Clin Appl* 5: 133-140. 査読有  
[学会発表](計 30 件)

A.Murakami, K. Yakabe, K. Sueoka, N. Sugino

Suppression of carbonyl reductase 1 promotes tumorigenesis and tumor-associated macrophage migration by induction of epithelial mesenchymal transition  
The International Gynecologic Cancer Society  
14th Biennial Meeting  
2012/10/13-16 Bancouver, Canada

K. Sueoka, A.Murakami, K. Yakabe, N. Sugino

Knockdown of heat shock protein 70 expression suppresses cell migration, invasion and proliferation activities in uterine cervical cancer cells.

The International Gynecologic Cancer Society  
14th Biennial Meeting  
2012/10/13-16 Bancouver, Canada

K. Yakabe, A.Murakami, K. Yoshidomi, K. Sueoka, S. Nawata, N. Sugino

Relationship between the human leukocyte antigen (HLA) class I expression and the pathogenesis of endometrial cancer.

The International Gynecologic Cancer Society  
14th Biennial Meeting  
2012/10/13-16 Bancouver, Canada

Murakami A, Yoshidomi K, Sugino N.

Decreased expression of carbonyl reductase is associated with epithelial mesenchymal transition and is a significant predictor of outcome in uterine endometrial cancer.

International Society of Oncology and Biomarker  
2011/10/15-19 Florence, Italia

Yoshidomi K, Murakami A, Sugino N.

Role of heat shock protein in cell migration, invasion and proliferation of uterine cervical squamous cell carcinoma cells.

International Society of Oncology and Biomarker

2011/10/15-19 Florence, Italia

〔図書〕(計 1 件)

Murakami A, Yoshidomi K, Sugino N

Involvement of squamous cell carcinoma antigen in invasion and metastasis of squamous cell carcinoma of uterine cervix. InTech open access book (出版社) *Squamous cell carcinoma* (書名), 2012; p302 (p153-160).

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

杉野 法広 (SUGINO, Norihiro)

山口大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：10263782

### (2)研究分担者

村上 明弘 (MURAKAMI, Akihiro)

山口大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：70379965