

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591640

研究課題名(和文) 世界初の新規樹立細胞株による基礎的研究：乳房外ページェット病の抗男性ホルモン療法

研究課題名(英文) Establishment of extramammary Paget's disease derived cell line: Experimental research of the effect of anti-androgen reagents on extramammary Paget's disease cell line.

研究代表者

辛島 正志 (Karashima, Tadashi)

久留米大学・医学部・講師

研究者番号：70211175

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：乳房外ページェット病は細胞生物学的な解析がなく多くの点が不明である。申請者らは本疾患患者病変部由来の細胞株の樹立を世界に先駆けて成功した(EMPE cell)。今回、EMPE cellを用いて細胞生物学的な検討、特に増殖因子について検討した。EMPE cellは男性ホルモンレセプター(AR)を発現し、EMPE cellは男性ホルモン依存性の増殖を示した。またEGFが強い増殖促進効果を示した。EMPE cellにおいてはEGFなどの増殖因子による別経路のリガンド非依存的なARの活性化が主経路である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We established Extramammary Paget's disease cell line (EMPE cell), and characterized their growth behavior. EMPE cells expressed androgen receptor (AR) and androgen enhanced their growth. EGF also enhanced their growth, but EGF receptor was not expressed in EMPE cell. It is suggested EGF may play a role of ligand-independent of AR activation pathway in EMPE cell.

研究分野：皮膚科学

キーワード：乳房外ページェット病 乳房外ページェット病由来細胞株 男性ホルモン 男性ホルモンレセプター EGF

1. 研究開始当初の背景

乳房外ページェット病は皮膚がんである。高齢者に好発し、近年の高齢化にともないその罹病率は上昇の傾向にある。しかし乳房外ページェット病は、その由来や、その他細胞生物学的な解析が現在まで多くの点が不明である。その理由として、がん研究に必須である、細胞株がこれまで存在しなかったことが大きな原因である。申請者らは本疾患患者病変部由来の細胞株を樹立することに世界に先駆けて成功した (EMPE cell)。現在のところ本疾患はアポクリン腺由来の腺がんとしてされており、乳がんもしくは腺がんに基づいた抗がん剤を用いる化学療法がなされている。しかし、乳がんその他腺がんには有効な抗がん剤は本疾患に対しては有効率が低いことが問題となっている。すなわち、本疾患は腺がんのなかでも、その他の腺がんとは異なる特異な性質をもつがんと考えられる。

乳房外ページェット病は、これまで切除標本を用いてなされた組織化学・免疫組織化学的検索のみがなされてきた。しかしいまだにその由来も不明であり、乳房外ページェット病の腫瘍細胞の細胞生物学的性状に関する研究はこれまで皆無である。その理由は明快である。これまで乳房外ページェット病病変部から樹立された細胞株が存在しなかったためである。がん研究においては、各種がんそれぞれの固有の細胞株や動物レベルのモデルが必須である。われわれは、数年前に世界初となる乳房外ページェット病病変部皮膚から細胞株を得た (2009年、日本研究皮膚科学会にて発表、論文作成中)。この細胞株は、82歳の男性の陰部の乳房外ページェット病病変部から樹立された。この症例は下床のがんを伴わない、皮膚原発の症例である。腫瘍部皮膚を酵素処理した後、マイトマイシン処理をしたNIH 3T3細胞をフィーダーとして、EGF存在下の高カルシウム培養液で培養を開始した。培養開始後から、正常表皮細胞とは明らか

かに形態が異なる細胞が増殖してきた。培養後、半年後には正常表皮細胞が増殖を停止し、腫瘍細胞由来と思われる細胞のみが増殖した。その後、数回のクローニングを経て、安定に増殖する細胞株を数種類得ることができた。各細胞株は樹立後数年間経た現在なお、安定に増殖している。経代数代目でフィーダー細胞は不要となった。細胞は付着性で敷石状に増殖し、細胞密度が飽和すると、細胞集塊を形成し半浮遊性に増殖する。乳房外ページェット病での免疫組織化学的検索でこれまで報告されている細胞マーカーであるCEA陽性、単層上皮型ケラチンのK15陽性である。細胞はPAS陽性で、ジアスターゼ消化性である。透過型電子顕微鏡による検索では細胞内小器官が発達し、細胞質内に電子密度の高い、大きな嚢胞を有する。細胞間の接着装置は未熟である。これらの所見は、これまでに患者病変部皮膚において、国内外で報告されてきた所見に合致する。すなわち、本細胞株は、乳房外ページェット病の腫瘍細胞由来の細胞株であると考えられる。近年、乳房外ページェット病の病変部の腫瘍細胞は、男性ホルモンレセプター (アンドロゲン・リセプター: AR) を発現しているとする報告が相次いでなされている。われわれは本細胞株のARの発現の検討を免疫組織化学的検索および全細胞抽出サンプルを用いたウエスタンブロットによる検索をおこなった。その結果、本細胞株が、ARを発現していることが明らかとなった。

現在のところ、乳房外ページェット病に有効な抗がん剤は見いだされていない。乳房外ページェット病は、皮膚の付属期であるアポクリン腺に由来する腺がんのひとつとしてされており、臨床の現場では、乳がんもしくは腺がんに基づいた抗がん剤を用いる化学療法がなされている。しかし、乳がんその他腺がんには有効な抗がん剤は乳房外ページェット病に対しては有効率が低いことが問題となっている。乳房外ページェット病と同じく、高

齢者に好発するがんのひとつに、前立腺がんがある。前立腺がんは、以前から腫瘍細胞において AR の発現がみられることや、細胞レベルでの男性ホルモン依存性の細胞増殖が確認され報告されてきた。そして前立腺がんの治療のひとつとして、抗男性ホルモン療法が確立し、臨床の現場で用いられている。われわれが確認した細胞レベルでの乳房外ページェット病における AR の発現は、1. 乳房外ページェット病腫瘍細胞が男性ホルモン依存性に増殖する可能性、2. 抗男性ホルモン薬により、乳房外ページェット病腫瘍細胞の増殖阻害がおこる可能性がありうることを示唆する。すなわち、乳房外ページェット病における新たな、かつ有効な治療法の開発の糸口を見いだすことができる可能性が十分期待される。

2. 研究の目的

今回、われわれが樹立した乳房外ページェット病細胞株を用いてその細胞生物学的な検討、特に増殖因子について検討をおこなった。本疾患はその一部の症例では男性ホルモンリセプター(AR)が発現しており、EMPE cellもARを発現している。そのため *in vitro* の系で EMPE cell における男性ホルモンの増殖活性の有無について検討した。

(1) 乳房外ページェット病腫瘍細胞の男性ホルモン依存性についての検討：われわれが樹立した乳房外ページェット病由来細胞株が、細胞培養系において男性ホルモン依存性の増殖を示すか否かを検討する。乳がんと異なり、乳房外ページェット病は免疫組織化学的にエストロゲン・リセプターの発現はないか、あっても陽性率は低いことがすでに報告されている。われわれの細胞株でエストロゲン・リセプターの発現を免疫組織化学的とウエスタン・プロットにて検索をしたが、本細胞株はエストロゲン・リセプターの発現は認めなかった。そのため、男性ホルモンに着目して検

討をおこなった。われわれが樹立した乳房外ページェット病由来細胞株の男性ホルモン依存性について細胞培養系で検討し、乳房外ページェット病腫瘍細胞の男性ホルモン依存性について検討した。

(2) 乳房外ページェット病腫瘍細胞に対する男性ホルモン阻害剤の増殖阻害作用についての検討：われわれが樹立した乳房外ページェット病由来細胞株を用い、細胞培養系にて男性ホルモン阻害剤の腫瘍細胞の増殖阻害効果があるかどうかを検討する。これら1と2の実験により、乳房外ページェット病腫瘍細胞における男性ホルモンの及ぼす影響が細胞生物学的に明らかとなりうる。

3. 研究の方法

(1) 乳房外ページェット病腫瘍細胞の男性ホルモン依存性についての検討

前立腺がんにおいて男性ホルモンが腫瘍増殖性をもち、男性ホルモン阻害剤が、抗腫瘍作用を示すことが明らかとなり、すでに臨床応用されている。われわれが樹立した世界初の乳房外ページェット病腫瘍細胞株を用い、*in vitro* および *in vivo* の系における乳房外ページェット病腫瘍細胞に対する男性ホルモンの増殖活性の有無について検討した。

具体的には、まず、*in vitro* の系では本細胞株を DHT(0.0001nM-1mM) 存在下に培養し、各々の DHT 濃度での増殖曲線を得、増殖能を検討する。また、フローサイトメーターをもちいて細胞周期を測定し、併せて検討する。さらにウエスタンプロット法により、細胞周期関連タンパク質の発現動態を経時的に定量し、詳細な検討をおこなった。

(2) 乳房外ページェット病腫瘍細胞に対する男性ホルモン阻害剤の増殖阻害作用についての検討

前年度に得られた結果を考察し、本年度は

おもに乳房外ページェット病腫瘍細胞株における男性ホルモン阻害剤の増殖阻害作用について検討する。具体的には、まず、*in vitro* の系では本細胞株を DHT(0.0001nM-1mM)存在下または非存在下に培養する。この系に男性ホルモン阻害薬を各々加えたのち増殖曲線を得、増殖能・増殖抑制能を検討した。また、フロサイトメーターをもちいて細胞周期を測定し、男性ホルモン阻害薬による細胞周期の変化を計測し、さらに細胞周期関連タンパク質の発現動態をウエスタンブロット法にて経時的に定量してより詳細な検討をおこなった。

すでに前立腺がん細胞株で報告され、実際の臨床の現場で問題となっているのが、前立腺がんにおける、男性ホルモン反応性の差異である。これは AR の遺伝子変異が大きな原因のひとつであることが指摘されてきた。また近年、前立腺がんの男性ホルモン不応性腫瘍において、男性ホルモン以外の増殖因子による増殖機構の存在が明らかにされた。これらの事実と、前年度の実験結果を踏まえて、本細胞株について前年度と本年度に最初におこなう男性ホルモン反応性の検討に加え、他の増殖因子による増殖制御効果についても検討した。

4. 研究成果

今回、われわれが樹立した乳房外ページェット病細胞株を用いてその細胞生物学的な検討、特に増殖因子について検討をおこなった。本疾患はその一部の症例では男性ホルモンリセプター(AR)が発現しており、EMPE cell も AR を発現している(図1)。

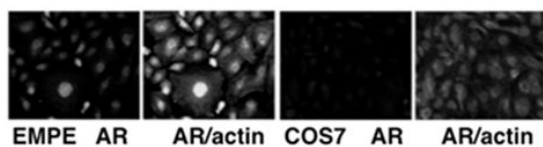


図1

そのため *in vitro* の系で EMPE cell におけ

る男性ホルモンの増殖活性の有無について検討した。その結果、EMPE cell は、細胞培養系において男性ホルモン 25nM~100nM の濃度において濃度依存性の増殖を示すことが確認された。また、男性ホルモンの阻害薬である flutamide は 10 μ M で増殖阻害効果を示した(図2)。

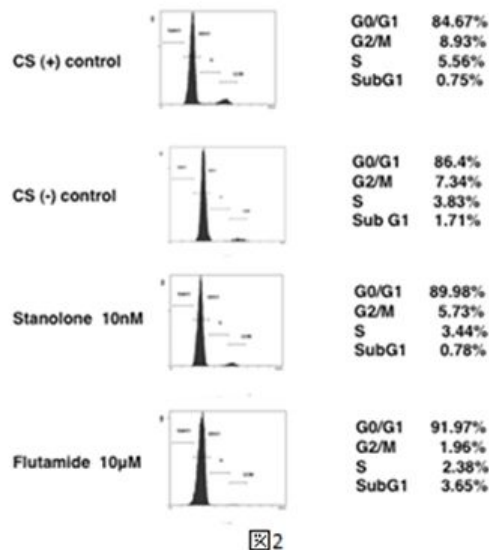


図2

EMPE cell は男性ホルモン依存性の増殖を示す一方、他の増殖因子、EGF について検討した結果、EMPE cell は EGF の主たるレセプターである EGF レセプターの発現がないにもかかわらず、EGF は強い増殖促進効果を示した。AR はリガンドである男性ホルモンにより活性化されるが、それとは別経路で、EGF などの増殖因子がリガンド非依存的に AR の活性化を起こすことが知られており、EMPE cell においては EGF などの増殖因子による別経路のリガンド非依存的な AR の活性化が主経路である可能性が示唆された。

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 0 件)

[学会発表](計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

辛島 正志 (KARASHIMA Tadashi)

久留米大学・医学部・講師

研究者番号 : 70211175

(2)研究分担者

橋本 隆 (HASHIMOTO Takashi)

久留米大学・皮膚細胞生物学研究所・教授

研究者番号 : 20129597

古村 南夫 (FURUMURA Minao)

久留米大学・医学部・准教授

研究者番号 : 10315070