

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 24 日現在

機関番号：17201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860884

研究課題名(和文)メルケル細胞癌の生存、増殖、分化に対する有棘細胞癌の影響およびその修飾因子の解明

研究課題名(英文) Analysis of the interaction between Merkel cell carcinoma and squamous cell carcinoma in collagen gel matrix culture.

研究代表者

永瀬 浩太郎 (Kotaro, Nagase)

佐賀大学・医学部・講師

研究者番号：30549077

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：メルケル細胞癌は原発性皮膚癌のなかで最も予後不良なものの一つであり、その大部分の発症にメルケル細胞ポリオマウイルス(MCPyV)が関与しているとされる。今回、MCPyV陽性、陰性のメルケル細胞癌細胞株をコラーゲンゲル中で培養した。単独培養で通常2週間以上生存維持させることができるが、有棘細胞癌細胞株と混合培養することによりウイルス陽性のメルケル細胞癌細胞癌はその生存・増殖能が低下、アポトーシスは増加した。また逆に有棘細胞癌細胞も、MCPyV陽性メルケル細胞癌との混合培養で生存・増殖能が低下した。メルケル細胞癌細胞の制御機構に関与する因子を同定することで、治療のさらなる発展が期待出来る。

研究成果の概要(英文)：Merkel cell carcinoma (MCC) is a highly aggressive skin cancer linked to a contributory virus, Merkel cell polyomavirus (MCPyV). MCPyV DNA has been confirmed to be present in approximately 80% of MCCs. We had several extremely rare cases of MCC combined with Squamous cell carcinoma (SCC). All reported MCC combined with SCC were MCPyV-negative. Thus, we hypothesized that there are differences of the cell characteristics between MCPyV-positive and -negative MCCs in a coexistence environment with SCC. SCC cell line, DJM-1, inhibits proliferation of MCPyV-positive MCC cell line, MKL-1 cells, but not MCPyV-negative cell lines in collagen gel matrix culture. DJM-1 cells induce apoptosis of MKL-1 cells. MKL-1 cells inhibit proliferation of DJM-1 cells. This culture system shows the difference of biological behavior between MCPyV-positive MCC and MCPyV-negative MCC. It remains possible that MCPyV-positive and -negative MCC may develop through different tumorigenic pathways.

研究分野：メルケル細胞癌

キーワード：メルケル細胞癌 メルケル細胞ポリオマウイルス 有棘細胞癌 混合培養

1. 研究開始当初の背景

(1)メルケル細胞癌は皮膚の神経内分泌系細胞であるメルケル細胞を由来とする腫瘍であり、その悪性度は高く原発性皮膚癌の中で最も予後不良なものの一つとされる。稀な腫瘍ではあるものの、その年間発生率は急速に増加している。2008年にはメルケル細胞癌の腫瘍標本からメルケル細胞ポリオームウイルス(Merkel cell polyomavirus, MCPyV)が発見され(Feng H, et al. Science 319: 1096-100, 2008)、現在では約80%以上のメルケル細胞癌のゲノム上にウイルスDNAが組み込まれており、腫瘍の発症に強く関わっているとされる。MCPyV陽性のメルケル細胞癌細胞はウイルス由来の癌蛋白による免疫原性を有し、メルケル細胞癌患者の腫瘍の微小環境および血液中にMCPyV特異的に反応するCD4+/CD8+ T細胞が存在することも報告されている(Iyer JG, et al. Clin Cancer Res 17: 6671-6680, 2011)。メルケル細胞癌に自然消退例の報告がみられる(Val-Bernal JF, et al. Adv Anat Pathol 18: 174-177, 2011)こともその免疫原性に関連する可能性があり、現在活発に免疫療法の研究がすすんでいる。その一方でMCPyV陰性のメルケル細胞癌症例も一定の割合で存在し、未だその生物学的特性には不明な点が多く、その予後の悪さもよりさらなる治療の発展が期待されている。

(2)メルケル細胞癌には少なからず有棘細胞癌を中心とした他の上皮系腫瘍が併存することが知られており(図1)、メルケル細胞癌と上皮系腫瘍が相互に影響を与えている可能性が推測される。我々が調べ得た限り、上皮系腫瘍が併存したメルケル細胞癌の過去の報告例は全例MCPyV陰性であった。すなわち、MCPyV陽性のメルケル細胞癌と陰性のメルケル細胞癌の細胞動態において、特に他種の上皮系腫瘍との相互作用に関しての相違があることが示唆される。しかしその詳細はいまだ不明である。



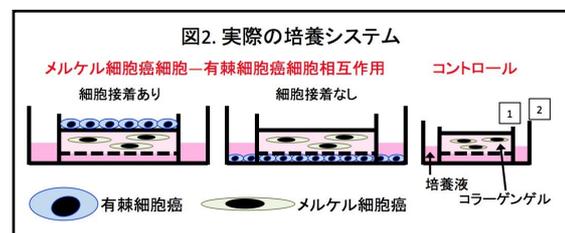
2. 研究の目的

以上の背景に基づき、今回われわれはメルケル細胞癌と有棘細胞癌の混合培養系を用いて有棘細胞癌がポリオームウイルス陽性および陰性それぞれのメルケル細胞癌に与える影響の検討を行った。

3. 研究の方法

培養細胞はメルケル細胞癌細胞としてMCPyV陽性メルケル細胞癌細胞株(MKL-1)とMCPyV陰性メルケル細胞癌細胞株(MCC13, UISO)を、有棘細胞癌細胞として有棘細胞癌細胞株(DJM-1)を用いる。底面がニトロセルロース膜から成る培養皿(直径30mm、ミリポア社製)に、メルケル細胞癌細胞(200万個)を1mlのI型コラーゲンゲル内に包埋したコラーゲンゲル層を作製する。その後ゲル上に、有棘細胞癌細胞(10万個)を播種する。これを内皿(図2[1])とし、この内皿を大型の培養皿(外皿(図2[2])、直径100mm)に入れ、外皿に培養液を10ml入れて培養する。(図2)この培養系では、癌細胞は空気暴露され、外皿の培養液が内皿のニトロセルロース膜(培養液の透過性は良好)を介してゲル層へ移行し、毛細管現象によりコラーゲンゲル層の上層まで到達し、細胞が栄養される。またこの培養系は、内皿(図2[1])のコラーゲンゲル層ではなく外皿(図2[2])にメルケル細胞癌細胞を培養することで、これらの癌細胞に細胞接着のある混合培養条件だけでなく、細胞接着のない培養系としても解析することが可能である。

これらの培養体は培養開始1週目(7日目)にホルマリン固定を行った。それから切片を作成し、H-E染色を用いて形態学的な評価を行った。また免疫組織学的検討には、メルケル細胞癌の特異的マーカーとしてサイトケラチン20(CK20)を用い、増殖能は24時間プロモデオキシウリジン(BrdU)の核内摂取にて、アポトーシスはcleaved caspase 3にて評価した。



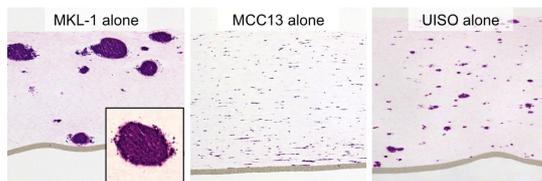
4. 研究成果

われわれの培養系では、メルケル細胞癌細胞株を単独培養で2週間以上生存維持させ

ることが可能であった(図3)。有棘細胞癌細胞株と混合培養することによりMCPyV陽性のメルケル細胞癌細胞は形態学的に変性/壊死が目立つようになり(図4)その生存・増殖能は低下(図5)アポトーシスは増加した(図5)これらの変化はMCPyV陰性メルケル細胞癌細胞株では確認できず、MCPyV陽性と陰性とでその細胞動態に明らかな差を認めた。また逆に有棘細胞癌細胞も、MCPyV陽性メルケル細胞癌との混合培養で生存・増殖能が低下した。今回の研究ではこの相互関係をきたす明らかな仲介因子の特定には至っておらず、これら2種の癌細胞が直接接触する環境そのものが影響している可能性がある。

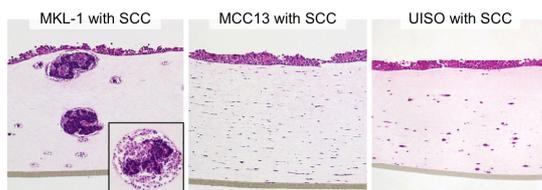
今回確立した培養法は種々の解析に有用であり、今後有棘細胞癌との混合培養以外にもさらにメルケル細胞癌細胞の培養条件を検討し、その制御機構に関与する因子を同定することで、治療のさらなる発展が期待出来る。

図3. メルケル細胞癌細胞株を用いた単独培養



培養開始1週の時点で、メルケル細胞ポリオマウイルス(MCPyV)陽性の細胞株であるMKL-1および陰性の細胞株であるMCC13とUIISOは生存が維持される。

図4. メルケル細胞癌細胞の有棘細胞癌細胞株との混合培養



メルケル細胞癌細胞単独での培養に比べ、MCPyV陽性のMKL-1に関しては形態学的に変性・壊死が目立つ。他のMCPyV陰性の細胞株に関しては明らかな変化はない。

図5. メルケル細胞癌細胞株のBrdU核内摂取率

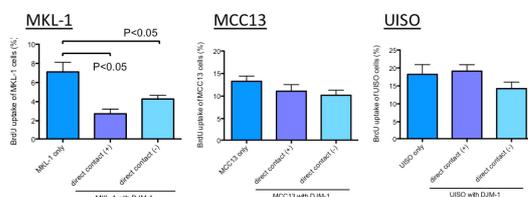
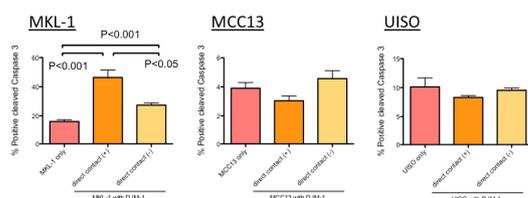


図6. メルケル細胞癌細胞株のcleaved caspase 3陽性率



< 引用文献 >

Feng, H., Shuda, M., Chang, Y. Moore, P. S. (2008). Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma. *Science (New York, NY)*, 319(5866), 1096–1100.

Iyer, J. G., Afanasiev, O. K., McClurkan, C., Paulson, K., Nagase, K., Jing, L., et al. (2011). Merkel Cell Polyomavirus-Specific CD8+ and CD4+ T-cell Responses Identified in Merkel Cell Carcinomas and Blood. *Clinical Cancer Research : an Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 17(21), 6671–6680.

Val-Bernal, J. F., García-Castaño, A., García-Barredo, R., Landeras, R., De Juan, A., & Garijo, M. F. (2011). Spontaneous complete regression in merkel cell carcinoma after biopsy. *Advances in Anatomic Pathology*, 18(2), 174–7; author reply 177.

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 3 件)

Nagase, K., Kimura, H., Ogawa, S., Tara-Hashimoto, A., Koba, S., Inoue, T., Narisawa, Y. Merkel cell carcinoma associated with stable chronic hemodialysis: A report of two cases. *The Journal of Dermatology*, 査読有, 43(11), 2016, 1336–1339.

Narisawa, Y., Koba, S., Inoue, T., Nagase, K. Histogenesis of pure and combined Merkel cell carcinomas: An immunohistochemical study of 14 cases. *The Journal of Dermatology*, 査読有, 42(5), 2015, 445–452.

Koba, S., Nagase, K., Ikeda, S., Aoki, S., Misago, N., Narisawa, Y. Merkel cell carcinoma with glandular differentiation admixed with sweat gland carcinoma and spindle cell carcinoma: histogenesis of merkel cell carcinoma from hair follicle stem cells. *The American Journal of Dermatopathology*, 査読有, 37(3), 2015, e31–6.

[学会発表](計 6 件)

Nagase, K., Kimura, H., Ogawa, S., Hashimoto, A., Koba, S., Inoue, T., Narisawa, Y.

Merkel cell carcinoma associated with stable chronic hemodialysis: A report of two cases. The 4th Eastern Asia Dermatology Congress. 2016年11月16-18日

該当なし

永瀬浩太郎、古場慎一、井上卓也、成澤寛、他種上皮系皮膚悪性腫瘍を合併したメルケル細胞癌における免疫組織学的検討、第115回日本皮膚科学会総会、2016年6月3-5日

永瀬浩太郎、メルケル細胞癌 UP TO DATE、第114回日本皮膚科学会総会、2015年5月29-31日

永瀬浩太郎、メルケル細胞癌：宿主と腫瘍のせめぎあい？、第67回日本皮膚科学会西部支部学術大会、2015年10月17-18日

Nagase K, Koba S, Misago N, Narisawa Y. CK7, TTF-1, p53 and CM2B4: A possible histologic indicator for divergent differentiation of Merkel cell carcinoma. 44th Annual ESDR meeting, 2014年9月10日

永瀬浩太郎、古場慎一、成澤 寛、メルケル細胞癌 最新の知見と治療方針、第113回日本皮膚科学会総会、2014年6月1日

〔図書〕(計 1 件)

永瀬浩太郎、メルケル細胞癌オーバービュー：腫瘍免疫の視点から WHAT'S NEW IN 皮膚科学 2016-2017 【腫瘍】メディカルレビュー社. 東京, 152-153, 2016

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

該当するものなし

6. 研究組織

(1)研究代表者

永瀬 浩太郎 (NAGASE, Kotaro)

佐賀大学・医学部・講師

研究者番号：30549077

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし

(4)研究協力者