

主論文の要旨

**Suppression of skin tumorigenesis
in CD109-deficient mice**

〔 CD109 欠損マウスで皮膚発癌が抑制される 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
病態外科学講座 腫瘍外科学分野

(指導：榑野 正人 教授)

砂川 真輝

【緒言】

皮膚扁平上皮癌の罹患率は、過去 30 年にわたり上昇し続けている。多くの皮膚扁平上皮癌は良好な予後を得ることができるが、1.5-2%の患者はこれにより死亡することが報告されている。また、皮膚扁平上皮組織の発癌に紫外線、パピローマウイルス感染、タバコや 7,12-ジメチルベンズアントラセン(DMBA)などの化学物質への暴露などとの関連が報告されている。

CD109 は CD34 陽性骨髄単核細胞、活性化 T 細胞、血小板および間葉系幹細胞で発現している GPI-アンカー型膜タンパク質で、 α_2 -マクログロブリンファミリーに属する。我々はこれまでに CD109 が正常組織において精巣および皮膚ケラチノサイトで発現していることを確認した。さらに CD109 ノックアウトマウスを作成し、CD109 ノックアウトマウスの真皮に炎症細胞浸潤を多く認め、乾癬との関連が示唆されると報告した。これまでに細胞株およびヒト組織において肺、食道、子宮および口腔内の扁平上皮癌で CD109 の発現を確認し、さらに口腔内病変で高分化な扁平上皮癌は正常の口腔粘膜および低分化な扁平上皮癌よりも CD109 の発現が上昇していることから癌関連因子であることが示唆された。しかし、腫瘍組織における CD109 の意義は解明されていない。

ヒトケラチノサイトにおいて CD109 は TGF- β を負に調節する因子であることが報告されている。一般的に TGF- β は前癌病変においては癌抑制因子として機能しているが、癌の進行とともに浸潤・転移に関与する癌促進因子として機能しているといわれている。我々は initiator である DMBA と promoter である 12-O-テトラデカノイルフォルボール-13 アセテート(TPA)を用いた最も多く有用されている 2 段階発癌モデルを用いて CD109 の皮膚発癌における役割を検討した。

【方法】

CD109 ノックアウトマウスを用いて皮膚組織において CD109 が与える影響を評価し、特にプライマリーケラチノサイトを回収し、その役割について比較検討を行った。

さらに皮膚癌の誘導を最も効率的に行うため当教室で作成した CD109 ノックアウトマウスを FVB/N マウスと繰り返し交配したのちバックグランドを FVB/N とし、DMBA および TPA による 2 段階皮膚発癌モデルを使用し発癌を誘導した。最後に initiator である DMBA を用いて炎症を惹起し、CD109 の発癌過程で皮膚に与える影響を比較検討した。

【結果】

はじめに CD109 ノックアウトマウスを用い、皮膚組織における CD109 の役割を検討した。CD109 を欠損させると、マウス皮膚において TGF- β_1 の発現の上昇を認めた (Figure 1A,B)。これまでの報告より CD109 ノックアウトマウスの真皮では慢性炎症が誘導されていることから炎症関連遺伝子の発現を検討したところ、*Tgfb1* の発現以外に *Csf2* および *Tnfa* の発現上昇を認めた (Figure 1C)。さらに F4/80 を用いてマウスマ

クロファージの細胞数を比較したところ、CD109 ノックアウトマウスの皮膚ではマクロファージの発現量が増加していた (Figure 1D)。

続いてプライマリーケラチノサイトを回収し、その DMBA の細胞毒性に対する抵抗性を検討した。まず、WST-1 を用いた増殖アッセイを用いて細胞増殖能を検討したところ、野生型に比べ CD109 を欠損させるとケラチノサイトの細胞増殖が抑制された。(Figure 2A)。DMBA で刺激すると CD109 欠損ケラチノサイトの細胞生存率は上昇していた (Figure 2B)。CD109 欠損ケラチノサイトでは TGF- β /p21/Nrf2 のシグナルパスウェイが活性化されており DMBA に対する解毒作用を増強することが明らかとなった (Figure 2C-E)。さらに CD109 欠損マウスの皮膚では Nrf2 の活性化を確認した (Figure 2F)。

発癌過程における CD109 の役割を検討するため 2 段階皮膚発癌モデルを用いた実験を行った (Figure 3A)。その結果、CD109 ノックアウトマウス群はコントロール群と比べて腫瘍の個数および腫瘍体積が減少していることが明らかとなった (Figure 3B-E)。また、形成されたパピローマで、細胞増殖マーカーである Ki-67 陽性細胞数が優位に増加していたが、アポトーシスマーカーの Cleaved caspase-3 の陽性細胞数には差を認めなかった (Figure 3F-G)。しかし、形成された腫瘍を検討した結果、良性腫瘍から悪性腫瘍への転換の頻度や組織型・深達度は両群間に差を認めなかった (Table 1)。

パピローマを形成する前段階では CD109 欠損マウスの皮膚では皮膚の肥厚が減弱していることが明らかとなった (Figure 4A)。さらに遺伝子特異的な PCR アッセイを用いて H-ras^(Q61L) の変異を DMBA/TPA 塗布後 9 週間後のマウス皮膚で検討したところ、CD109 ノックアウトマウスの皮膚では遺伝子変異が生じにくいことが明らかとなった (Figure 4B)。さらに DNA 損傷を誘発する DMBA を一回塗布すると、コントロール群と比較して Ki-67 陽性率には差を認めなかったが、細胞ストレスマーカーである p53、Cleaved caspase-3 の発現を CD109 ノックアウトマウスで多く認めた (Figure 5A-C)。さらにコントロール群より CD109 ノックアウトマウスの皮膚では軽度の DNA 損傷しか誘導されていなかった (Figure 5D)。

【考察】

CD109 ノックアウトマウスの皮膚で認められた TGF- β の発現を伴う慢性炎症は早期の腫瘍発生を抑制しているが、悪性腫瘍への転換頻度には影響を与えなかった。ある種のヒトの皮膚扁平上皮癌の進行には、CD109 を欠損させることで発生する慢性的な皮膚の炎症が腫瘍形成を抑制する可能性がある。また、TGF- β /p21/Nrf2 のシグナルパスウェイが皮膚の扁平上皮癌において抗酸化代謝に重要な役割をきたすことが報告されている。このことは我々のデータと一致しており、2 段階皮膚発癌モデルにおいて CD109 を欠損させることで同パスウェイを活性化 DMBA の解毒代謝を促進し、DMBA により誘導される H-ras の変異を減少させ、形成されるパピローマの数及び大きさに差を認めたと考えた。

【結語】

CD109 はマウスケラチノサイトにおいて TGF- β シグナル、さらに p21/Nrf2 のパスウェイを活性化させる。2段階皮膚発癌モデルにおいて DMBA により誘導される H-*ras* の遺伝子変異を減弱させることで、腫瘍形成を抑制している。