

岩手医科大学
審査学位論文
(博士)

実験的紫外線誘発日光角化症および有棘細胞癌の イミキモド外用治療に浸潤肥満細胞が関与する

大西正純, 高橋和宏

岩手医科大学医学部, 皮膚科学講座

(Received on June 7, 2015 & Accepted on August 16, 2015)

要旨

TLR-7 アゴニストであるイミキモド外用薬の抗腫瘍機序を解明するため, マウスを用い実験的に誘導した紫外線誘発性皮膚癌の肥満細胞, MMP-2/9 の発現を免疫組織学, RT-PCR で解析した. イミキモド塗布により日光角化症と有棘細胞癌の増殖率は腫瘍スコア・面積ともに有意に抑制された. 腫瘍周囲の浸潤肥満細胞数はイミキモド塗布により日光角化症と有棘細胞癌で有意に増加し, IFN- γ の表出量はイミキモド

塗布により日光角化症と有棘細胞癌ともに増加した. イミキモドは有棘細胞癌および日光角化症における肥満細胞浸潤を促進し, IFN- γ を誘導することで抗腫瘍効果を発揮することを示した. 一方, イミキモド塗布により MMP-2/9 は間質細胞において抑制されたが, 腫瘍細胞では変化がみられず, イミキモドを介した腫瘍免疫監視機構に MMP-2/9 の関与は弱いと考えた.

Key words : *imiquimod, actinic keratosis, squamous cell carcinoma, mast cell, MMP-9, MMP-2*

I. 緒 言

日光角化症, 基底細胞癌, 表皮内悪性黒色腫などの表在性皮膚癌の標準的な免疫治療薬としてイミキモド (Imiquimod) が推奨されている. Imidazochinoline imiquimod は分子量 240.3 Da で, 化学式 [C₁₄ H₁₆ N₄, 1-(2-methylpropyl)-1H-imidazo-[4,5-c]quinolin-4-amine] の合成アミン分子で, 5% クリームの外用薬として用いられ, 強力な抗ウイルス作用や抗腫瘍効果を持つとされる Toll-like receptor7 (TLR-7) agonist である¹⁾. 本邦では外陰部の尖圭コンジローマおよび日光角化症に対してすでに保険適応が認められている. イミキモドの抗腫瘍効果は腫瘍細胞の caspase 産生亢進および adenosine 伝達系の抑制による直接的アポトーシス惹起作用と真皮の樹状細胞 (dendritic cell) の TLR-7 にイミキモドが作用し interferon 放出を誘導し²⁾, 間

接的に自然免疫と獲得免疫の双方の経路を強化する³⁾ ことによって腫瘍細胞のアポトーシスを誘導する 2 経路が知られている.

日光角化症は日光の慢性紫外線照射によって生じる表皮内癌で, p53 遺伝子の変異を高率に認め⁴⁾, 変異を持つ細胞はアポトーシスの誘導が傷害され, 紫外線による DNA 損傷を抱えたまま生き残り発癌へと進行することが知られている⁵⁾. イミキモドは, 日光角化症の p53 遺伝子の変異をもつ細胞のアポトーシスを誘導することで病変部を改善させうると考えられ, その完全消失率約 50%^{6,7)} あるいは 70%⁸⁾ とされている.

最近, 腫瘍周囲に浸潤する肥満細胞の TLR-7 にイミキモドが作用し, 形質細胞様樹状細胞 (plasmacytoid dendritic cell) を腫瘍周囲に集合させ, これらの細胞から interferon が放出

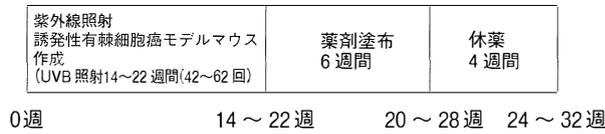


図1. 実験系の概略

され腫瘍細胞のアポトーシスを惹起することが明らかになっている⁹⁾。一方, イミキモドにより肥満細胞の monocyte chemoattractant protein-1(MCP-1/CCL-2) 表出が亢進するとともに matrix metalloproteinase (MMP)-2/9 の産生も亢進し, 腫瘍の血管新生や増殖が亢進するとの相反する作用がある¹⁰⁾。日光角化症は有棘細胞癌に進行する可能性があり¹¹⁾, またその周囲に肥満細胞の浸潤がみられ, 肥満細胞および腫瘍から分泌された MMP-2/9 は腫瘍周囲の組織再生や腫瘍増生の制御に関与している¹²⁾。

しかし, 日光角化症は表在性の表皮内癌にもかかわらずイミキモドの効果がみられない場合や日光角化症が一旦, 浸潤癌である有棘細胞癌に進行すると腫瘍抑制効果がみられない理由は明らかにされていない。そこで, 本研究ではマウスを用いて紫外線照射により日光角化症と有棘細胞癌を実験的に発症させ, イミキモド外用の効果が無い場合の機序, および有棘細胞癌に進展するとイミキモド外用の効果が減弱する機序を明らかにする目的で, イミキモド外用後の日光角化症の浸潤肥満細胞と MMP-2/9 が腫瘍の消失あるいは増大に関与しているかを免疫組織学および RT-PCR を用いて解析した。

II. 実験材料および方法

1. 実験材料と日光角化症および紫外線誘発有棘細胞癌モデルマウスの作成

本動物実験は岩手医科大学動物実験委員会による動物実験規定に基づき, 承認番号 25-022 の承認を受けた。

雌性ヘアレスマウス (HOS:HR-1, 日本エスエ

表1. 腫瘍病変スコア

病変サイズ	病変数	スコア
> 1mm	1 個	1
	0 ~ 1 個	0
	2 ~ 10 個	0.5
< 1mm	11 ~ 20 個	1
	21 個以上	1.5

ルシー) の6週齢を用いた。同マウスの背部に紫外線照射機 (ヤヨイ社) で UVB (波長 315 ~ 280nm) を1回照射量 80mJ/cm² (5分30秒) 週3回の頻度で14 - 22週間照射して日光角化症を発症せしめた。日光角化症発症までに要する総照射量には個体差があり, 角化性紅斑が目視できるまで UVB を照射した。UVB 照射中止後も, 日光角化症は増大し一部は有棘細胞癌に進行し, これを紫外線誘発性有棘細胞癌とした。

2. 試験部位とイミキモドの使用法 (図1)

試験部位は UVB の照射部位である背部とした。紫外線照射期間終了後のマウスの背部にベセルナクリーム 5%[®] (一般名: イミキモド, 持田製薬株式会社) を週3回 (1回/日, 80mg/1回, 8cm² の範囲に単純塗布) で合計6週間外用塗布し, これをイミキモド塗布群とした。イミキモドの塗布部位は, あらかじめマーキングし同一部位に薬剤を塗布した。また, 外用薬塗布中止後も4週間種々の観察を行った。対照薬としてはベセルナクリーム 5%[®] の基剤と考えられた白色ワセリン (日興製薬社) を用い, イミキモドと同様に塗布し, これを白色ワセリン塗布群とした。さらに, 紫外線照射および外用薬塗布が行われない両群の腹部を対照部位とした。

3. 腫瘍病変増殖の評価 (表1)

紫外線誘発日光角化症および有棘細胞癌モデルマウスをイミキモド塗布群5例, 白色ワセリン塗布群8例を対象とした。腫瘍病変の増殖率の評価はマウス背部のデジタル画像を撮影

し、イミキモド、白色ワセリン外用薬塗布開始時から塗布中止後4週までの10週間に背部に生じた腫瘍、角化性紅斑のサイズと個数を表1の如くスコア化した。また、画像解析ソフトはImageJ^{13, 14)}を用いてマウス背部に生じた腫瘍、角化性紅斑の部位を境界化させ、その面積を腫瘍面積として解析した。

4. 病理組織学的検索

イミキモド塗布前後と塗布1ヶ月後にマウス背部の角化性紅斑、腫瘍と腹部正常皮膚よりデルマパンチ3mm[®](マルホ社)による皮膚生検をマウス1匹につきそれぞれ1箇所ずつ施行した。採取した組織は10%ホルマリンにて24時間固定した後、パラフィン包埋し、マイクロトーム(カールツアイス製、ドイツ)を用いて薄切片を3 μ mの厚さで作製し、以下の各種染色に供した。

1) 日光角化症と有棘細胞癌の組織学的確認
UVB照射終了後とイミキモド、白色ワセリン塗布開始6週目にマウス背部の角化性紅斑および腫瘍を生検した組織をhematoxylin-eosin染色して、それぞれ日光角化症および有棘細胞癌であることが確認できた皮膚組織を免疫染色、RT-PCRによる検索に使用した。

2) 腫瘍細胞および浸潤細胞の免疫組織化学的検索

免疫染色はAvidin-biotin-peroxidase complex method (ABC法)で行った。標本は脱パラフィンを行った後に3%過酸化水素水で15分処理し内因性ペルオキシダーゼの除去を行った。その後PBSで充分洗浄した後に沸騰させた1mM EDTA(pH9.0)の中に標本を入れ、その後圧力鍋を用いて10分間加熱し抗原の賦活化を行った。室温まで戻した後にブロッキング試薬として10%ヤギ正常血清を滴下し10分反応させた。その後一次抗体を滴下し、4℃で一晩反応させた(MMP2のみ室温)。二次抗体は(ビオチン標識抗マウスIgG+ウサギIgG抗体(動物種:ヤギ))(ヒストファインSAB-

PO(MULTI)キット、ニチレイ)を用いた。10分反応させPBSで洗浄。その後ペルオキシターゼ標識ストレプトアビジンを5分反応させ洗浄後にDABで発色させた。2%ギムザ希釈液で核染した後に封入、検鏡した。一次抗体は肥満細胞の同定にPolyclonal antibody to tryptase (Cloud-Clone Corp社)を50倍希釈、MMP-9の同定にMMP-9 polyclonal antibody (Abnova社)を100倍希釈、MMP-2の同定にMMP-2 polyclonal antibody (Abnova社)を200倍希釈して用いた。

3) 免疫染色陽性細胞数の計測

有棘細胞癌は上皮癌であり、日光角化症はその表皮内癌であることから以下の染色は上皮腫瘍部分と間質に分けて計測した。すなわち、抗tryptase染色、抗MMP-9、抗MMP-2染色の計測は1標本につき無作為に2箇所、表皮基底層直下から深さ約100 μ mの真皮浅層までの範囲の1画面視野(面積40000 μ m²)の間質細胞における免疫染色陽性細胞数を算出し比較検討した。さらに腫瘍細胞の抗MMP-9、抗MMP-2染色計測も同様に、1標本につき無作為に2箇所で行い、顕微鏡倍率200倍の一画面視野で、腫瘍細胞における免疫染色陽性細胞の割合を計測した。

5. RT-PCR

日光角化症および紫外線誘発有棘細胞癌モデルマウスをイミキモド、対照薬外用開始6週目にマウス背部の角化性紅斑および腫瘍、腹部正常皮膚をデルマパンチ3mm[®]でマウス1匹につき2箇所生検した。RNeasy kit (QIAGEN社)を用いてRNAを抽出し、Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies社)でRNAの品質を検定した。Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche社)により、c-DNAに逆転写し、PCRプライマー対、加水分解プローブはUniversal ProbeLibraryからの情報によりデザインした。そのうえで、MMP-9、MMP-2、 β -ActinのDNA定量



図2. 紫外線誘発性有棘細胞癌モデルマウス臨床像

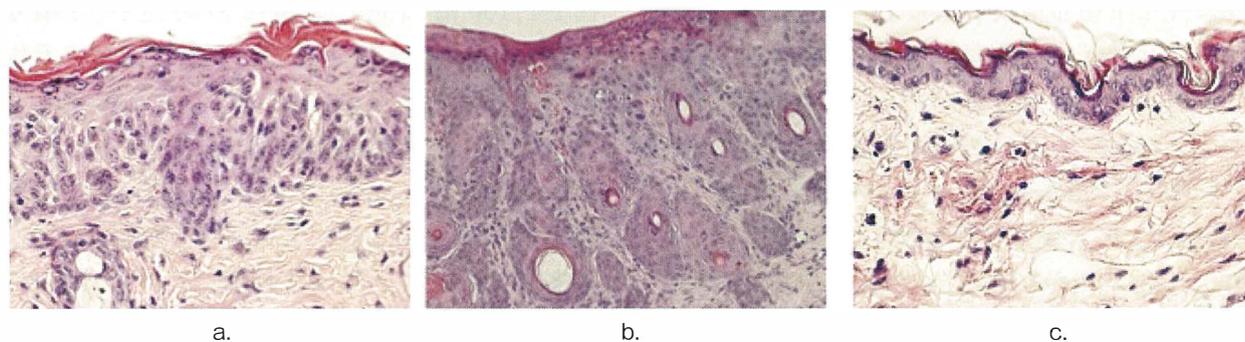


図3. 紫外線誘発性有棘細胞癌モデルマウス病理組織像(H.E染色, 400倍)
a) 日光角化症 b) 有棘細胞癌 c) 腹部正常皮膚

を LightCycler TaqMan Master (Roche 社) を用い, LightCycler にて RT-PCR を行い, β -Actin 遺伝子を内部標準として補正をかけた. PCR の施行条件は酵素活性化を 95°C, 10 分, 熱変性を 95°C, 10 秒間, アニーリング, 伸長反応を 60°C, 30 秒間シグナル所得を 72°C, 1 秒間, 冷却を 40°C, 30 秒で 45 サイクルとした. 得られたサンプルデータは Second Derivative Maximum による定量分析を行った. 各遺伝子を特異的に検出するプライマー対, 加水分解プローブは以下の通りである.

MMP-9 Use probe #19 (cat. no. 04686926001)

Left: acgacatagacggcatcca

Right: gctgtggttcagttgtggtg

MMP-2 Use probe #29(cat. no.04687612001)

Left: aactttgagaaggatggcaagt

Right: tgccaccatggttaacaa

β -Actin Use probe #27 (cat. no.04687582001)

Left: gccaccctgtctgatgaact

Right: actttcagaggaggtcctggt

6. 統計的解析

それぞれのデータは平均 \pm 標準誤差で示した. 統計的解析は Excel 2004 for Mac ver.11.5.3 (Microsoft) と Statcel3(OMS 出版) を用いて行った. 結果はその分布が正規分布しているかを解析し, 正規分布しているときには t 検定を行い, 正規分布していないときはウィルコクソン符号付順位和検定で行った. $p < 0.05$ を統計学的に有意の差と判定した.

III. 結 果

1. 実験的日光角化症および有棘細胞癌モデルマウス作成の検証

雌性ヘアレスマウスの背部に紫外線照射機で UVB (波長 315 ~ 280nm) を 1 回照射量 80mJ / cm² (5 分 30 秒) で週 3 回照射し日光角化症と有棘細胞癌を発症せしめた. 日光角化症発症までに要する総照射量には個体差があり, 14 ~ 22 週間の照射時間を要した. UVB 照射中止後も, 日光角化症は増大し一部は有棘細胞癌に

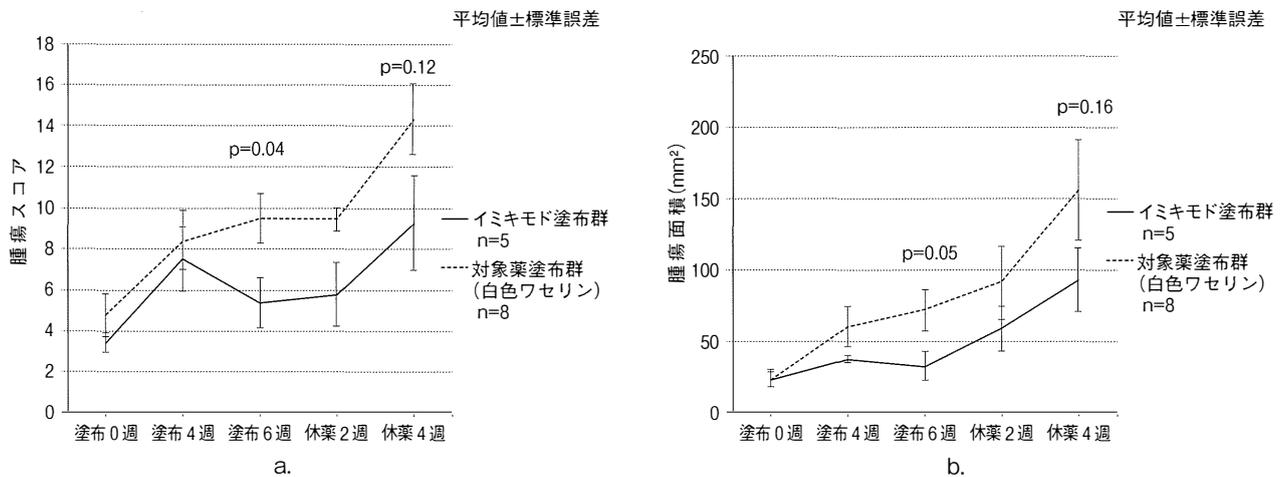


図4. 日光角化症および有棘細胞癌の腫瘍病変増殖率の変化
a) 腫瘍スコア b) 腫瘍面積

進行し、これを紫外線誘発性有棘細胞癌とした(図2).

日光角化症と有棘細胞癌はHE標本でそれぞれ表皮内癌と浸潤癌であることを病理組織学的に観察して確認した(図3a,b,c). 日光角化症は過角化と表皮肥厚を認め、表皮は基底層から2~3層まで異型細胞が占めていた(図3a). 有棘細胞癌は過角化、錯角化を認め異型細胞が占める不規則な胞巣は真皮に向かい不規則塊状の増殖を示した(図3b). 正常腹部皮膚の表皮は正常角化を示していた(図3c).

2. イミキモド塗布による日光角化症および有棘細胞癌の腫瘍病変増殖率の変化

腫瘍病変増殖率は腫瘍スコア(図4a)および腫瘍面積(図4b)の推移で示した. 腫瘍スコアは経過とともに増加するが、イミキモド塗布4週から6週まで対照である白色ワセリン塗布群とで有意($p < 0.05$)に差が生じ、塗布6週でイミキモド塗布群 5.4 ± 1.219 、白色ワセリン塗布群 9.5 ± 1.199 であった. 特にイミキモド塗布4~6週に腫瘍スコアが減少し、以後、休薬した4週間は増加傾向のままイミキモド塗布群と白色ワセリン塗布群の腫瘍スコアの差は平行に推移した.

腫瘍面積は経過とともに増加し、イミキモド

塗布直後から6週まで対照である白色ワセリン塗布群とで有意($p \leq 0.05$)に差が生じ、塗布6週でイミキモド塗布群 $32.869 \text{mm}^2 \pm 10.195$ 、白色ワセリン塗布群 71.894 ± 14.205 であった. 以後、休薬した4週間はイミキモド塗布群と白色ワセリン塗布群との腫瘍スコアの差はほぼ平行に推移した.

腫瘍スコアおよび腫瘍面積の推移からイミキモド塗布初期から日光角化症および有棘細胞癌の腫瘍病変の増殖を抑制することが示された.

3. 日光角化症および有棘細胞癌の腫瘍病変の浸潤肥満細胞数

有棘細胞癌、日光角化症および対照である腹部正常皮膚の浸潤肥満細胞の tryptase 染色を示す. 日光角化症では真皮の表皮直下に tryptase 染色陽性細胞を散見した(図5a). 有棘細胞癌では真皮の表皮直下、腫瘍胞巣辺縁に tryptase 染色陽性細胞をやや多くみた(図5b). 腹部正常皮膚では真皮浅層ごく僅かの肥満細胞を認めるのみであった(図5c).

単位面積あたりの腫瘍直下の浸潤肥満細胞数(図5d)は対照である腹部正常皮膚に比較し日光角化症の白色ワセリン塗布群で 1.22 ± 0.41 と有意差なく同程度であった. 有棘細胞癌の白色ワセリン塗布群で 6.45 ± 1.77 と有意に多

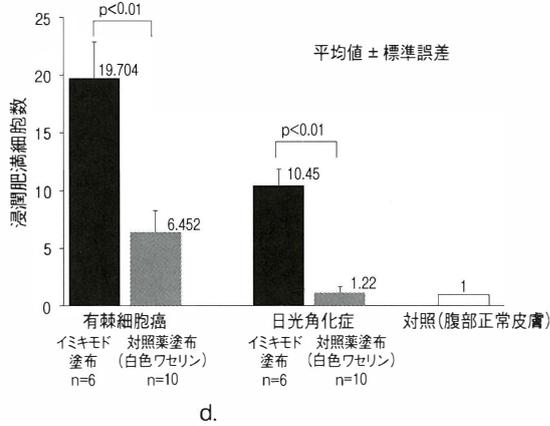
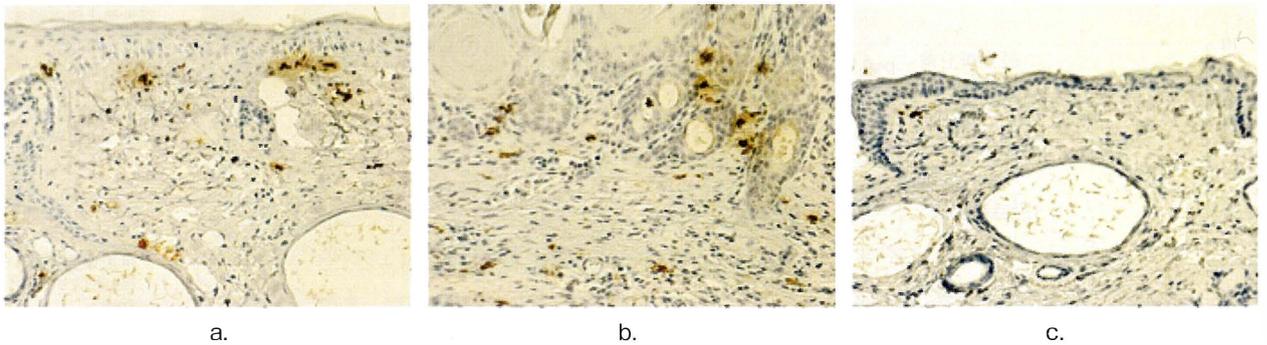


図5. 腫瘍病変の浸潤肥満細胞
 a) 日光角化症 (抗 tryptase 染色, 200 倍)
 b) 背部: 有棘細胞癌 (抗 tryptase 染色, 200 倍)
 c) 腹部正常皮膚 (抗 tryptase 染色, 200 倍).
 d) 日光角化症および有棘細胞癌の間質細胞における浸潤肥満細胞数の比較

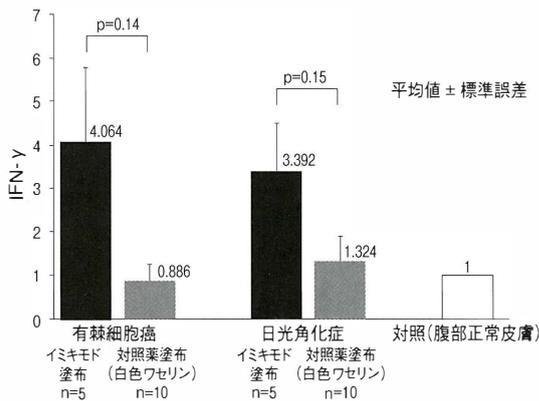


図6. 日光角化症および有棘細胞癌の腫瘍病変における IFN- γ 発現量の比較 (RT-PCR)

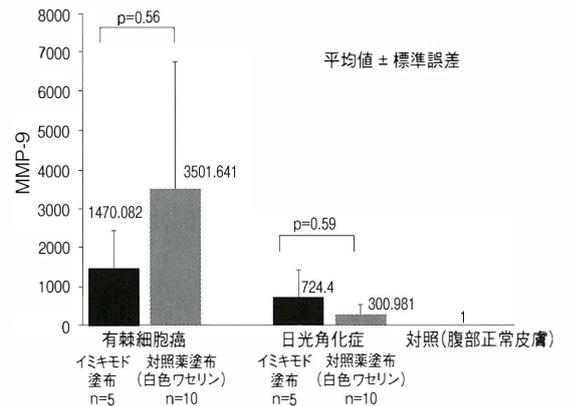


図7. 日光角化症および有棘細胞癌の腫瘍病変における MMP-9 発現量の比較 (RT-PCR)

く、浸潤癌である有棘細胞癌で浸潤肥満細胞数が増加することが示された。さらに、日光角化症のイミキモド塗布群で 10.45 ± 1.39 と白色ワセリン塗布群に比較し有意 ($p < 0.01$) に増加していた。また、有棘細胞癌のイミキモド塗布群で 19.70 ± 3.11 と白色ワセリン塗布群に比較し有意 ($p < 0.01$) に増加していた。

以上の結果から日光角化症の真皮上層の肥満細胞浸潤は正常皮膚と同じく少数で、有棘細胞癌では肥満細胞浸潤が多くみられた。さらに、イミキモド塗布により腫瘍周囲の浸潤肥満細胞数は日光角化症で約9倍に、有棘細胞癌では約3倍に増数し、イミキモドが有棘細胞癌および日光角化症の病巣に肥満細胞をリクルートすることが示された。

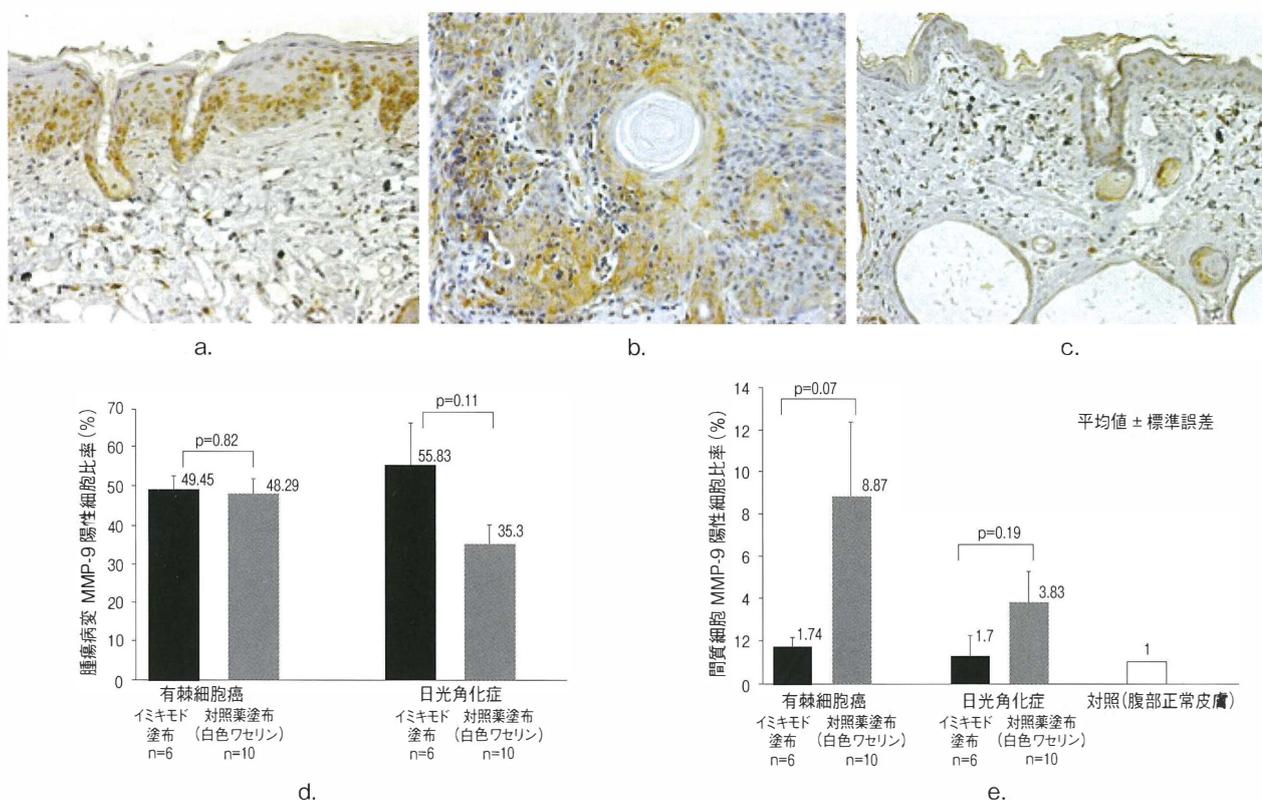


図8. 腫瘍病変, 間質の MMP-9 陽性細胞
 a) 日光角化症 (抗 MMP-9 染色, 200 倍)
 b) 有棘細胞癌 (抗 MMP-9 染色, 200 倍)
 c) 腹部正常皮膚 (抗 MMP-9 染色, 200 倍)
 d) 日光角化症および有棘細胞癌の腫瘍病変における比較
 e) 日光角化症および有棘細胞癌の間質細胞における比較

4. 日光角化症および有棘細胞癌の腫瘍病変のインターフェロン γ (IFN- γ) の表出 (図 6)
 PCR 法で検出した IFN- γ 量は正常腹部皮膚を 1 として換算した結果, 日光角化症の白色ワセリン塗布群で 1.32 ± 0.57 , 有棘細胞癌の白色ワセリン塗布群で 0.89 ± 0.35 と正常皮膚とほぼ同様に低値であった. 一方, 日光角化症のイミキモド塗布群 3.39 ± 1.11 と白色ワセリン塗布群に比較 ($p = 0.15$) し増加していた. また, 有棘細胞癌のイミキモド塗布群で 4.06 ± 1.72 と白色ワセリン塗布群に比較 ($p = 0.14$) し増加していた. 以上の結果から日光角化症と有棘細胞癌ともに IFN- γ の表出は正常皮膚と同様に低値であった. しかし, イミキモド塗布により日光角化症と有棘細胞癌ともに有意差はないものの IFN- γ の表出量が著明に亢進した.

5. 日光角化症および有棘細胞癌の腫瘍病変の Matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) の表出

PCR 法で検出した MMP-9 量は正常腹部皮膚を 1 として換算した結果, 日光角化症の白色ワセリン塗布群で 300.98 ± 225.55 , 有棘細胞癌の白色ワセリン塗布群で 3501.64 ± 3257.72 と正常皮膚と比較し著明に増加していた. 一方, 日光角化症のイミキモド塗布群で 724.40 ± 694.61 と白色ワセリン塗布群に比較し増加 ($p = 0.59$) していた. また, 有棘細胞癌のイミキモド塗布群で 1470.08 ± 956.21 と白色ワセリン塗布群に比較 ($p = 0.56$) し減少していた (図 7).

抗 MMP-9 染色像を示す (図 8a-c). 日光角化症は表皮基底層から 2~3 層が陽性に染色され, 真皮上層にも肥満細胞, 血管内皮細胞, 線維芽

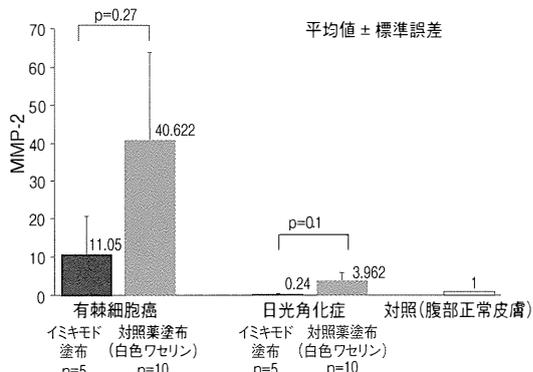


図9. 日光角化症および有棘細胞癌の腫瘍病変における MMP-2 発現量の比較 (RT-PCR)

細胞などが陽性を示した (図 8a). 有棘細胞癌では腫瘍巣全体が陽性を示し, 間質の陽性細胞も散見した (図 8b). 正常腹部皮膚では表皮基底層のみ陽性で, 真皮の陽性間質細胞が散見した (図 8c).

腫瘍細胞あるいは表皮に局限して観察した有棘細胞癌の MMP-9 染色陽性細胞はイミキモド塗布群 $49.45\% \pm 3.31$, 白色ワセリン塗布群 $48.29\% \pm 3.78$ と陽性細胞割合に変化はみられず ($p=0.82$), 日光角化症ではイミキモド塗布群 $55.83\% \pm 10.43$, 白色ワセリン群 $35.3\% \pm 4.34$ ($p=0.11$) とイミキモド塗布群で陽性細胞の比率が高かった (図 8d). 一方, 単位面積あたりの腫瘍あるいは表皮直下の間質に局限した MMP-9 陽性細胞は対照である腹部正常皮膚と比較し, 有棘細胞癌では白色ワセリン塗布群で 8.87 ± 3.48 と著増しているのに対し, イミキモド塗布群では 1.74 ± 0.41 と微増のみであった ($p=0.07$). さらに, 日光角化症では白色ワセリン塗布群で 3.83 ± 1.42 と増加していたが, イミキモド塗布群は 1.7 ± 0.56 と微増のみであった ($p=0.19$) (図 8e).

以上の結果より日光角化症病変で僅かの, 有棘細胞癌では著明な MMP-9 の表出がみられた. イミキモド塗布により日光角化症で MMP-9 の表出は腫瘍細胞で亢進するが, 間質細胞においては逆に抑制され, さらに有棘細胞

癌では腫瘍細胞においてはイミキモド塗布で MMP-9 の産生に変化はみられないが, 間質細胞においては日光角化症同様に MMP-9 の表出量が抑制される結果であった.

6. 日光角化症および有棘細胞癌の腫瘍病変の Matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) の表出

PCR 法で検出した MMP-2 量は正常腹部皮膚を 1 として換算した結果, 日光角化症の白色ワセリン塗布群で 3.96 ± 2.00 , 有棘細胞癌の白色ワセリン塗布群で 40.62 ± 23.52 と正常皮膚に比較し双方ともに著明に増加していた. 一方, 日光角化症のイミキモド塗布群で 0.24 ± 0.08 と白色ワセリン塗布群に比較し減少 ($p = 0.1$) していた. また, 有棘細胞癌のイミキモド塗布群で 11.05 ± 9.70 と白色ワセリン塗布群に比較 ($p = 0.27$) し減少していた (図 9).

抗 MMP-2 染色像を示す (図 10a-c). 日光角化症は表皮内の腫瘍細胞の一部が陽性に染色され, 真皮上層にも肥満細胞, 血管内皮細胞, 線維芽細胞などが陽性を示した (図 10a). 有棘細胞癌では腫瘍巣の一部で陽性を示し, 間質の陽性細胞も散見した (図 10b). 正常腹部皮膚では表皮細胞は一部のみ陽性で, 真皮の陽性間質細胞が散見された (図 10c).

有棘細胞癌の腫瘍細胞における抗 MMP-2 染色陽性細胞ではイミキモド塗布群 $28.68\% \pm 5.25$, 白色ワセリン塗布群 $24.9\% \pm 4.5$ と陽性細胞割合に変化はみられなかったが ($p=0.59$), 日光角化症においてはイミキモド塗布群 $37.97\% \pm 3.63$, 白色ワセリン群 $30.41\% \pm 1.75$ ($p=0.19$) とイミキモド塗布群では陽性細胞の発現を多く認めた (図 10d). 一方, 単位面積あたりの表皮ならびに腫瘍直下の間質における MMP-2 陽性細胞は対照である腹部正常皮膚と比較し日光角化症では白色ワセリン塗布群で 3.15 ± 1.13 と増加していたが, イミキモド塗布群は 1.18 ± 0.51 と変化がみられなかった ($p=0.14$). さらに有棘細胞癌では白色ワセリ

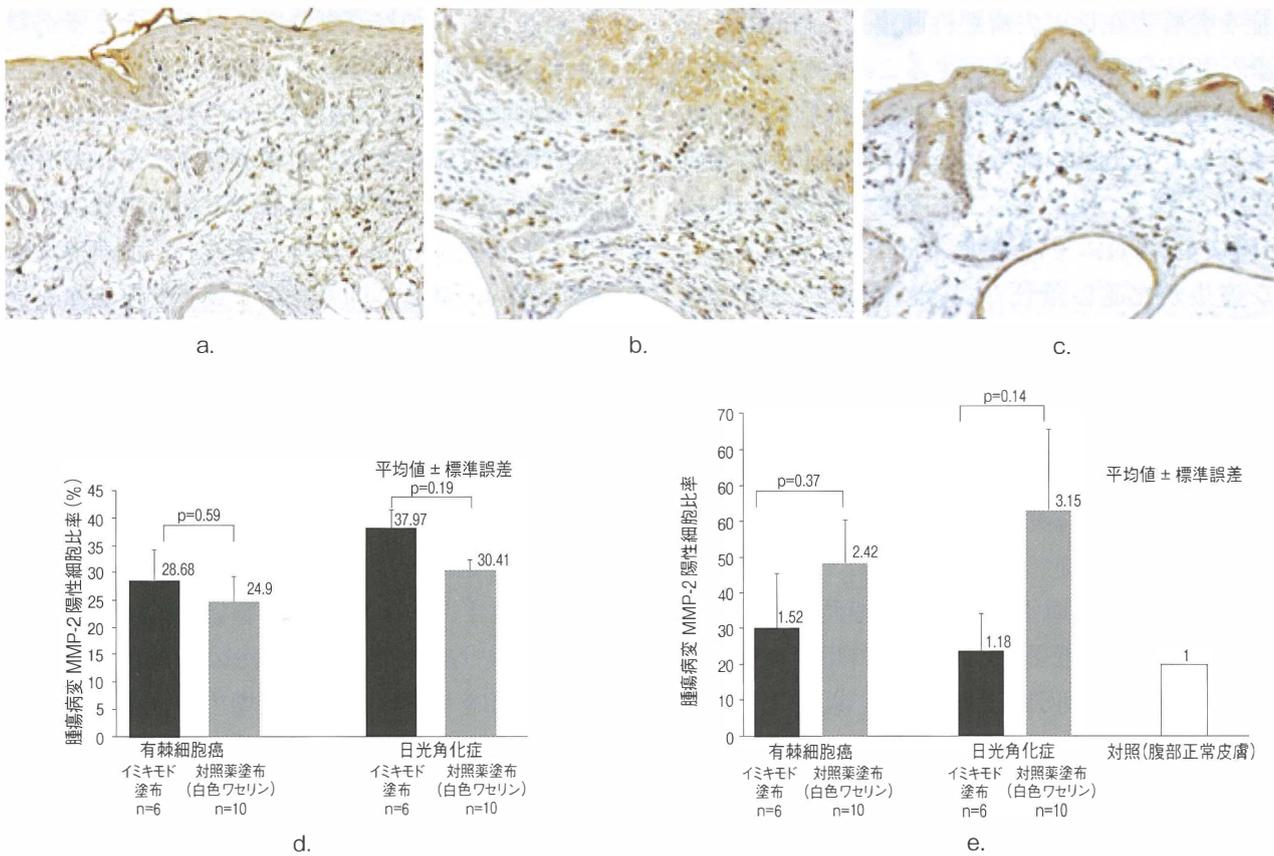


図 10. 腫瘍病変、間質の MMP-2 陽性細胞
 a) 日光角化症 (抗 MMP-2 染色, 200 倍)
 b) 有棘細胞癌 (抗 MMP-2 染色, 200 倍)
 c) 腹部正常皮膚 (抗 MMP-2 染色, 200 倍)
 d) 日光角化症および有棘細胞癌の腫瘍病変における比較
 e) 間質細胞における陽性細胞の比較

ン塗布群で 2.42 ± 0.6 , イミキモド塗布群では 1.52 ± 0.75 とイミキモド塗布群と比較して白色ワセリン群で増加傾向がみられた ($p=0.37$) (図 10e).

以上の結果から MMP-2 の表出は日光角化症、有棘細胞癌で増加がみられたが、MMP-9 と比較して軽度であり、腫瘍からの表出はイミキモド塗布群、白色ワセリン塗布群に大きな差はなく、発現量も少なかった。間質細胞においては有棘細胞癌、日光角化症ともにイミキモド塗布群で白色ワセリン塗布群と比較して MMP-2 の表出が抑制された。

IV. 考 案

日光角化症は、慢性紫外線照射によって中高年齢者、特に白色人種の日光露出部位に好発する多発性表皮内癌である¹⁵⁾。よって、本研究でもマウス背部に紫外線を照射し多発性の日光角化症と有棘細胞癌を作成した。

多因子解析による 1 個の日光角化症が浸潤癌に進展する可能性は年間 0.25% から 20%¹⁶⁾ とされ、残りの日光角化症は腫瘍免疫によって変化せず現状のまま、あるいは稀に自然消退することを意味している。

一方、イミキモドは免疫調節薬であり、疣贅ウイルス性病変の治療において局所への強い IFN- γ の誘導がみられ¹⁷⁾、さらに日光角化

症を含む表在性の皮膚悪性腫瘍にも TLR-7 を介して抗腫瘍効果を発現することが知られている^{18, 19)}。真皮の形質細胞様樹状細胞の TLR-7 を介して nuclear factor-kappa B (NF- κ B) が活性化されることで、これらの細胞から IL-12, IFN- α , TNF- α などの前炎症性サイトカイン産生が亢進し^{20, 21)}、このサイトカインにより CD4, CD8 陽性の T リンパ球の動員と活性化が起こり、さらに活性化した T 細胞から IFN- γ の産生が亢進する。この IFN- γ の働きにより活性化した NK 細胞や killer T 細胞によって腫瘍細胞のアポトーシスなど抗腫瘍効果が惹起される²²⁾。

本研究でもマウス背部の紫外線誘発性日光角化症と有棘細胞癌がイミキモド外用で増殖が抑制されることを示した。しかし、腫瘍消褪までには至らなかった理由はすでに有棘細胞癌が混在し、イミキモドの効果がない腫瘍があったためと考えられる。また、低値であった腫瘍病巣の IFN- γ はイミキモド外用で有棘細胞癌と日光角化症ともに表出が著明に増加した。即ち、イミキモド外用により真皮の形質細胞様樹状細胞の動員と活性化が生じ、さらに T リンパ球が活性化し、これらの細胞から IFN- γ の分泌が亢進し抗腫瘍効果を示すことを確認した。しかし、実際はイミキモドが効果を示すのは表在性の表皮内有棘細胞癌あるいは特殊例に限られる²³⁾。また日光角化症の一部にイミキモド無効例あること、浸潤性有棘細胞癌に無効であること、イミキモドの抗腫瘍効果の先駆けとなる真皮の形質細胞様樹状細胞を動員するのは何か、などの未解明な問題点がある。

IFN の分泌や後の免疫反応を誘導する腫瘍周囲の浸潤形質細胞様樹状細胞数は本来少なく、また形質細胞様樹状細胞数と癌患者の予後は相関せず²⁴⁾、さらにその活性程度も低いため続く T 細胞性免疫を誘導できない²⁵⁾とされる、そこで本研究では抗腫瘍効果を含めた自然免疫に重要で、なおかつ TLR-7 を表出する肥満細胞⁹⁾

に注目し、その浸潤細胞数を計測した。その結果、浸潤肥満細胞数は日光角化症では少なく、有棘細胞癌で多くみられた。これらはイミキモド外用で日光角化症、有棘細胞癌ともに有意に増加した。すなわち、本研究は塗布されたイミキモドが腫瘍周囲の真皮に浸透し肥満細胞の腫瘍周囲への動員、即ち浸潤を促進することを明らかにした。イミキモドが TLR-7 に結合して活性化した浸潤肥満細胞がさらに chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2) を分泌し²⁶⁾、形質細胞様樹状細胞を腫瘍周囲に集めると考えた。肥満細胞は炎症反応、血管増生による免疫反応の調整、組織再生や修復および癌の増殖に関与している^{27, 28)}。すなわち、腫瘍周囲に浸潤する肥満細胞は炎症反応や腫瘍免疫を増強させて抗腫瘍効果を示す場合と血管増生を亢進させ腫瘍増殖効果を示す場合の生体にとって良悪の2つの側面を有する²⁹⁾とされ、実際、食道の有棘細胞癌では浸潤肥満細胞数が多いほど予後不良であるとの報告³⁰⁾と逆に乳癌では肥満細胞浸潤が多いほど予後が良い³¹⁾とされる。皮膚悪性腫瘍の増殖や消褪に関しても肥満細胞が関与³²⁾することが知られ、有棘細胞癌では浸潤肥満細胞数が多いほど侵襲性が高い³³⁾、浸潤肥満細胞は正常皮膚と比較し口唇有棘細胞癌で優位に増加する^{34, 35)}、などの報告がある。一方、口唇有棘細胞癌と白板症で浸潤肥満細胞数が減少するとの報告³⁶⁾もある。加えて、肥満細胞浸潤は紫外線照射で誘発される³⁷⁾ことが知られている。本研究で用いた日光角化症と有棘細胞癌は UVB 照射で誘発したものであるが、浸潤肥満細胞数計測時期が紫外線照射中止後6週間経過しているため、紫外線照射が浸潤肥満細胞数への影響はないと考えた。イミキモド外用が肥満細胞の腫瘍周囲への浸潤を動員し、さらに肥満細胞が形質細胞様樹状細胞を動員すると考えた。従って、もとより肥満細胞浸潤が少ない場合はイミキモドの抗腫瘍効果が出現しない可能性が示唆される。しかし、もともと浸潤肥

満細胞数が多い有棘細胞癌はイミキモド外用により浸潤肥満細胞数がさらに増数するにもかかわらず、イミキモドの抗腫瘍効果が見られない理由は明らかにできなかった。浸潤肥満細胞の働きは日光角化症と有棘細胞癌では異なる可能性がある。

皮膚に遊走した肥満細胞は表皮細胞、線維芽細胞、血管内皮細胞などから分泌される stem cell factor (SCF) や c-kit tyrosine kinase III growth factor receptor (CD117) によって浸潤誘導および分化^{38, 39)}し、TLR, c-kit, interleukin (IL)-3, IL-4, IL-9, nerve growth factor (NGF) などによって活性が制御される⁴⁰⁾。また、肥満細胞の腫瘍周囲への遊走は腫瘍から分泌される SCF の濃度と肥満細胞の c-kit 表出程度に依存する⁴¹⁾。活性化した肥満細胞は種々の炎症性サイトカインの他、血管新生や腫瘍増殖に寄与する MMP-2 と MMP-9 を分泌する⁴²⁾。本研究で MMP-9 の表出は正常皮膚に比較し日光角化症で 300 倍、有棘細胞癌で 3500 倍に増加していた。イミキモド外用により日光角化症では 724 倍にその表出が増加し、有棘細胞癌では逆に 1470 倍に表出が抑制された。免疫染色では腫瘍細胞の MMP9 陽性細胞数は有棘細胞癌ではイミキモド塗布で変化なく、日光角化症ではイミキモド塗布で MMP-9 陽性細胞数の増加を認めた。一方、間質細胞においては有棘細胞癌と日光角化症ともに MMP 表出増加を認めたもののイミキモド塗布による MMP-9 陽性細胞数に著変なく、有棘細胞癌における MMP-9 増加の大部分は腫瘍細胞からの表出に伴うものであるが、イミキモド塗布により間質細胞からの MMP-9 産生が抑制されたと考えた。MMP-2 陽性細胞数は有棘細胞癌、日光角化症ともに増加したが、イミキモド塗布群によりともに陽性細胞数が著明に減少した。腫瘍細胞における MMP-2 陽性細胞数はイミキモド塗布群で増加していたが、MMP-9 と比較してその増加率は乏しく、間質細胞からの MMP-2 陽性細胞数は有棘細胞癌、

日光角化症ともにイミキモド塗布群で減少が見られたことから、有棘細胞癌、日光角化症腫瘍組織における MMP-2 発現の差は間質細胞からの表出が主であり、MMP-9 同様にイミキモド塗布により抑制されると考えた。

MMP は亜鉛およびカルシウム依存性の蛋白分解酵素で細胞外基質を分解する⁴³⁾。このうち MMP-9 と MMP-2 は gelatinase で基底膜成分である type II collagen など多くの基質成分を分解し、血管新生や腫瘍の増殖と転移に重要な成分である⁴⁴⁾。しかし、これらの MMP 分泌は炎症病巣の肥満細胞のみならず線維芽細胞、マクロファージ、血管内皮細胞からも分泌⁴⁵⁾され、加えて上皮系腫瘍細胞からも分泌される。本研究では紫外線誘発による日光角化症および有棘細胞癌の MMP-9 と MMP-2 の表出が増加し、特に有棘細胞癌で著明な表出の増加を明らかにした。日光角化症と有棘細胞癌の MMP の表出量の差から MMP-9 と MMP-2 の多くは腫瘍由来であったと考えられ、同様の有棘細胞癌での MMP-9 と MMP-2 の表出量の増加の報告⁴⁵⁾が散見される。本研究で、表出が増加した有棘細胞癌の MMP-9 と MMP-2 はイミキモド外用で表出が抑制された。その抑制の機序は、腫瘍周囲に放出された IFN- γ と TNF- α は MMP-9 と MMP-2 遺伝子の表出を抑制する^{46, 47)}ことが知られ、本研究のイミキモド外用で IFN- γ 表出亢進と符合する。本研究で日光角化症の MMP-9 と MMP-2 は正常皮膚に比較し表出量が増加していたが、有棘細胞癌に比較し表出量が少ない理由は、日光角化症は表皮内癌であるため腫瘍細胞の総量が少なく、MMP-9 と MMP-2 の表出も少ないと考えられ、肥満細胞を含め日光角化症周囲の炎症反応が主な MMP-9 と MMP-2 の表出源である可能性がある。一方、日光角化症でイミキモド外用により MMP-2 表出量は抑制されたが、MMP-9 の表出量はむしろ増加していた。イミキモド外用による MMP-9 と MMP-2 発現量の

差異の理由は不明であるが, イミキモドそのものが MMP-9 と MMP-2 の mRNA 発現量を抑制するが, その抑制程度に差がある⁴⁸⁾と考えられている。また, 有棘細胞癌の MMP-2 はイミキモドの抗腫瘍効果の結果表出が減弱し, 乳癌では MMP-9 と MMP-2 の表出量は腫瘍の進行度で異なり初期に MMP-9 の晩期に MMP-2 の表出が増すとされ⁴⁹⁾, さらに MMP-2 は癌の転移に関与する⁵⁰⁾などの報告もあることから, MMP-9 と MMP-2 の表出は平行したものではなく, また腫瘍の進行度や腫瘍の種類によって双方の表出量が異なる可能性がある。日光角化症では炎症過程での真皮内細胞からの MMP-9 が少なく, イミキモド外用によって肥満細胞などからの MMP-9 の表出のみが増加したと考えられる。また, 有棘細胞癌の MMP-9 と

MMP-2 の過剰表出がイミキモドで抑制されても実際にはこれらの腫瘍が消退しない理由は, 有棘細胞癌ではこれらの一連の反応が起こったとしても腫瘍細胞数が多いため腫瘍の MMP-9 と MMP-2 の表出が減弱したとしても腫瘍縮小につながらないと考えられた。

以上より, 日光角化症における腫瘍間質の浸潤肥満細胞数はイミキモド外用療法が効果を示す予後の指標となり得る。一方, 有棘細胞癌では MMP の表出の亢進と浸潤肥満細胞数増加が予後不良の指標となると考えた。

利益相反: 本研究は被験薬を販売している持田製薬株式会社との共同研究として行った。

References

- 1) **Younan AS, Ernest CB, Charles EW, et al.**: Inhibition of murine tumor growth by an interferon-inducing imidazoquinolinamine1. *Cancer Research* **52**, 3528-3533, 1992.
- 2) **Palamara F, Meindl S, Holcman M, et al.**: Identification and characterization of pDC-like cells in normal mouse skin and melanomas treated with imiquimod. *J Immunol* **173**, 3051-3061, 2004.
- 3) **Schön MP and Schön M**: TLR7 and TLR8 as targets in cancer therapy. *Oncogene* **27**, 190-199, 2008.
- 4) **Ree JL and Healy E**: Molecular genetic approaches to non-melanoma and melanoma skin cancer. *Clin Exp Dermatol* **21**, 253-262, 1996.
- 5) **Ziegler A, Jonason AS, Leffell DJ, et al.**: Sunburn and p53 in the onset of skin cancer. *Nature* **372**, 773-776, 1994.
- 6) **Falagas ME, Angelousi AG and Peppas G**: Imiquimod for the treatment of actinic keratosis: a meta-analysis of randomized controlled trials. *J Am Acad Dermatol* **55**, 537-538, 2006.
- 7) **Hadley G, Derry S and Moore RA**: Imiquimod for actinic keratosis: systematic review and meta-analysis. *J Invest Dermatol* **126**, 1251-1255, 2006.
- 8) **前田文彦, 赤坂俊英**: イミキモド 薬剤の特性と日光角化症治療への意義. *癌と化学療法* **36**, 577-581, 2009.
- 9) **Heib V, Becker M, Warger T, et al.**: Mast cells are crucial for early inflammation, migration of Langerhans cells, and CTL responses following topical application of TLR7 ligand in mice. *Blood* **110**, 946-953, 2007.
- 10) **Ribatti D and Crivellato E**: Mast cells, angiogenesis, and tumour growth. *Biochim et Biophys Acta* **1822**, 2-8, 2012.
- 11) **van der Waal I**: Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; terminology, classification and present concepts of management. *Oral Oncol* **45**, 317-323, 2009.
- 12) **Souza Freitas V, de Andrade Santos PP, de Almeida Freitas R, et al.**: Mast cells and matrix metalloproteinase 9 expression in actinic cheilitis and lip squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endoc* **112**, 342-348, 2011.
- 13) **Rasband, WS**: ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2012.
- 14) **Schneider CA, Rasband WS and Eliceiri KW**: "NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis". *Nature Methods* **9**, 671-675, 2012.
- 15) **Eggert S and Helmut K**: Guidelines for the management of actinic keratosis. *Eur J Dermatol*

- 16, 599-606, 2006.
- 16) **Callen JP, Bickers DR and Moy RL:** Actinic keratosis. *J Am Acad Dermatol* **36**, 650-653, 1997.
 - 17) **Slade HB, Owens ML, Tomai MA, et al.:** Imiquimod 5% cream (Aldara™). *Exper Opin Investig Drugs* **7**, 437-449, 1998.
 - 18) **Tyring S, Conant M, Marini M, et al.:** Imiquimod; an international update on therapeutic uses in dermatology. *Int J Dermatol* **41**, 810-816, 2002.
 - 19) **Vender RB and Goldberg O:** Innovative uses of imiquimod. *J Drugs Dermatol* **4**, 58-63, 2005.
 - 20) **Hemmi H, Kaisho T, Takeuchi O, et al.:** Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MYD88-dependent signaling pathway. *Nat Immunol* **3**, 196-200, 2002.
 - 21) **Sheila JG, Jana ML, Tony RR, et al.:** Plasmacytoid dendritic cells produce cytokines and mature in response to the TLR7 agonists, imiquimod and resiquimod. *Cellular Immunol* **218**, 74-86, 2002.
 - 22) **Watford WT, Moriguchi M, Morinobu A, et al.:** The biology of IL-12: coordinating innate and adaptive immune responses. *Cytokine Growth Factor Rev* **14**, 361-368, 2003.
 - 23) **Hengge UR and Schaller J:** Successful treatment of invasive squamous cell carcinoma using topical imiquimod. *Arch Dermatol* **140**, 404-406, 2004.
 - 24) **Treilleux I, Blay JY, Bendriss-Vemare N et al.:** Dendritic cell infiltration and prognosis of early stage breast cancer. *Clin Cancer Res* **10**, 7466-7474, 2004.
 - 25) **Zou W, Machelon V, CoulombL'Hermin A, et al.:** Stromal-derived factor-1 in human tumors recruits and alters the function of plasmacytoid precursor dendritic cells. *Nat Med* **7**, 1339-1346, 2001.
 - 26) **Drobits B, Holcman M, Amberg N, et al.:** Imiquimod clears tumors in mice independent of adaptive immunity by converting pDCs into tumor-killing effector cells. *J Clin Invest* **122**, 575-585, 2012.
 - 27) **Galli SJ, Kalesnikoff J, Grimbaldston MA, et al.:** Mast cells as "tunable" effector and immunoregulatory cells: recent advances. *Annu Rev Immunol* **23**, 749-786, 2005.
 - 28) **Beaven MA:** Our perception of mast cells from Paul Ehrlich to now. *Eur J Immunol* **39**, 11-25, 2009.
 - 29) **Coussens LM, Raymond WW, Bergers G, et al.:** Inflammatory mast cells up-regulate angiogenesis during squamous epithelial carcinogenesis. *Genes Dev* **13**, 1382-1397, 1999.
 - 30) **Fakhrjou A, Niroumand-Oscoei SM, Somi MH, et al.:** Prognostic value of tumor-infiltrating mast cells in outcome of patients with esophagus squamous cell carcinoma. *J Gastrointest Cancer* **45**, 48-53, 2014.
 - 31) **Kankkunen JP, Harvima IT and Naukkarinen A:** Quantitative analysis of tryptase and chymase containing mast cells in benign and malignant breast lesions. *Int J Cancer* **72**, 385-388, 1997.
 - 32) **Ch'ng S, Wallis RA, Yuan L, et al.:** Mast cells and cutaneous malignancies. *Mod Pathol* **19**, 149-159, 2006.
 - 33) **Claudatus JC Jr, d'Ovidio R, Lospalluti M, et al.:** Skin tumors and reactive cellular infiltrate: further studies. *Acta Derm Venereol* **66**, 29-34, 1986.
 - 34) **Costa NL, Oton-Leite AF, Cheim-Junior AP, et al.:** Density and migration of mast cells in lip squamous cell carcinoma and actinic cheilitis. *Histol Histopathol* **24**, 457-465, 2009.
 - 35) **Rojas IG, Spencer ML, Martinez A, et al.:** Characterization of mast cell subpopulations in lip cancer. *J Oral Pathol Med* **34**, 268-272, 2005.
 - 36) **Oliveira-Neto HH, Leite AF, Costa NL, et al.:** Decrease in mast cells in oral squamous cell carcinoma: possible failure in the migration of these cells. *Oral Oncol* **43**, 484-490, 2007.
 - 37) **Iddamalgoda A, Le QT, Ito K, et al.:** Mast cell tryptase and photoaging: possible involvement in the degradation of extra cellular matrix and basement membrane proteins. *Arch Dermatol Res* **300** (Suppl 1), 69-76, 2008.
 - 38) **Kitamura Y, Go S and Hatanaka K:** Decrease of mast cells in W/W^v mice and their increase by bone marrow transplantation. *Blood* **52**, 447-452, 1978.
 - 39) **Kitamura Y and Hirotab S:** Kit as a human oncogenic tyrosine kinase. *Cell Mol Life Sci* **61**, 2924-2931, 2004.
 - 40) **Brown JM, Wilson TM and Metcalfe DD:** The mast cell and allergic diseases: roles in pathogenesis and implications for therapy. *Clin Exp Allergy* **38**, 4-18, 2008.
 - 41) **Huang B, Lei Z, Zhang GM, et al.:** SCF-mediated mast cell infiltration and activation exacerbate the inflammation and immunosuppression in tumor microenvironment. *Blood* **112**, 1269-1279, 2008.
 - 42) **Blair RJ, Meng H, Marchese MJ, et al.:** Human

- mast cells stimulate vascular tube formation: tryptase is a novel potent angiogenic factor. *J Clin Invest* **99**, 2691-2700, 1997.
- 43) **Egeblad M** and **Werb Z**: New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* **2**, 161-174, 2002
- 44) **Coussens LM, Tinkle CL, Hanahan D, et al.**: MMP-9 supplied by bone marrow-derived cells contributes to skin carcinogenesis. *Cell* **103**, 481-490, 2000.
- 45) **Souza Freitas V, de Andrade Santos PP, de Almeida Freitas R, et al.**: Mast cells and matrix metalloproteinase 9 expression in actinic cheilitis and lip squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **112**, 342-348, 2011.
- 46) **Ma ZI, Qin H** and **Benveniste EN**: Transcriptional suppression of matrix metalloproteinase-9 gene expression by IFN-gamma and IFN-beta: critical role of STAT-1alpha. *J Immunol* **167**, 5150-5159, 2001.
- 47) **Qin H, Moellinger JD, Wells A, et al.**: Transcriptional suppression of matrix metalloproteinase-2 gene expression in human astrogloma cells by TNF-alpha and IFN-gamma. *J Immunol* **161**, 6664-6673, 1998.
- 48) **Sidbury R, Neuschler N, Neuschler R, et al.**: Topically applied imiquimod inhibits vascular tumor growth in vivo. *J Invest Dermatol* **121**, 1205-1209, 2003.
- 49) **Rha SY, Yang WI, Kim JH, et al.**: Different expression patterns of MMP-2 and MMP-9 in breast cancer. *Oncol Rep* **5**, 875-879, 1998.
- 50) **Azzam HS, Arand G, Lippman ME, et al.**: Association of MMP-2 activation potential with metastatic progression in human breast cancer cell lines independent of MMP-2 production. *J Natl Cancer Inst* **85**, 1758-1764, 1993.

Density of infiltrated mast cells influences
the anti-tumor effects on actinic keratosis in a
mouse model treated with imiquimod

Masazumi ONISHI and Kazuhiro TAKAHASHI

Department of Dermatology, School of Medicine,, School of Medicine,
Iwate Medical University, Morioka, Japan

(Received on June 7, 2015 & Accepted on August 16, 2015)

Abstract

To determine the role of infiltrated mast cells in ultraviolet radiation-induced actinic keratosis in a mouse model treated with imiquimod, we analyzed the density of mast cells by immunostaining and the expression of MMP-2/9 by RT-PCR. The number of infiltrated mast cells increased after imiquimod application in actinic keratosis and squamous cell carcinoma, and imiquimod was found to promote the infiltration of mast cells. MMP-2/9 was expression

noted slightly in solar keratosis, and remarkably in the squamous cell carcinoma. However, after imiquimod application MMP-2/9 expression decreased in squamous cell carcinoma, and MMP-9 expression increased and MMP-2 decreased in actinic keratosis. Imiquimod may control MMP-2/9 expression of mast cells in actinic keratosis. However, increased MMP-2/9 overexpression of the tumor may mask the MMP-2/9 expression of mast cells in invasive cancer.
