

## 論文内容の要旨

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おける浸潤肥満細胞  
に関する研究

(大西 正純)

(岩手医学雑誌 68 巻, 1 号 平成 28 年掲載)

### I. 研究目的

Toll-like receptor7 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, interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), matrix metalloproteinase (MMP)-2/9 の発現を免疫染色, RT-PCR で解析する.

### II. 研究対象ならび方法

ヘアレスマウスの背部に ultraviolet-B (UVB) を照射して紫外線誘発性日光角化症, 有棘細胞癌を発症せしめ, 紫外線照射終了後のマウス背部にイミキモドを塗布し, 観察を行った. 対照薬としては白色ワセリンを用い, 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. 腫瘍病変の増殖率の評価を外用薬塗布開始時から塗布中止後までに背部に生じた腫瘍, 角化性紅斑のサイズと個数をスコア化し, その面積を腫瘍面積として解析した. 日光角化症と有棘細胞癌の組織学的確認 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皮膚生検を施行した. 生検組織を HE 染色し, それぞれ日光角化症および有棘細胞癌であることを確認した.

腫瘍細胞および浸潤細胞の免疫組織学的検索 肥満細胞の同定に抗 tryptase 染色, MMP-9 同定に抗 MMP-9 染色, MMP-2 同定に抗 MMP-2 染色を用いた. 免疫染色陽性細胞数の計測は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  $\mu$ m の真皮浅層までの範囲1画面視野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1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.

RT-PCR 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, 腹部正常皮膚をマウス1匹につき2箇所生検し, RNA を抽出した. RNA の品質を検定した後, c-DNA に逆転写し, MMP-9, MMP-2, INF- $\gamma$ ,  $\beta$ -Actin の DNA 定量を RT-PCR で行い,  $\beta$ -Actin 遺伝子を内部標準として補正をかけた.

統計的解析 それぞれのデータは平均±標準誤差で示し, 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イ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. 研究結果

#### 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

ヘアレスマウスに UVB を照射し日光角化症と有棘細胞癌を発症せしめ、 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確認した。

#### 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

腫瘍スコア、腫瘍面積は経過とともに増加したが、イミキモド塗布群では治療開始 4~6 週に腫瘍スコア、腫瘍面積が減少し、塗布 6 週で白色ワセリン塗布群と有意に差が生じた。休薬後は増加傾向のまま両群の腫瘍スコア、腫瘍面積の差は平行に推移した。

#### 3. 日光角化症および有棘細胞癌の浸潤肥満細胞数

浸潤肥満細胞数は腹部正常皮膚に比較し、有棘細胞癌で増加した。また、日光角化症、有棘細胞癌ともにイミキモド塗布群で白色ワセリン塗布群に比較し有意に増加した。

#### 4. 日光角化症および有棘細胞癌の IFN- $\gamma$ 表出

PCR 法で検出した IFN- $\gamma$  量はイミキモド塗布群で日光角化症、有棘細胞癌ともに白色ワセリン塗布群に比較し増加した。

#### 5. 日光角化症および有棘細胞癌の MMP-9 発現

①RT-PCR 日光角化症、有棘細胞癌ともに著明な MMP-9 mRNA の有意の発現増加がみられ、イミキモド塗布により日光角化症で増加、有棘細胞癌で減少した。

②免疫染色 イミキモド塗布により腫瘍細胞における MMP-9 陽性細胞比率は有棘細胞癌では変化せず、日光角化症で増加した。一方、間質細胞においては有棘細胞癌、日光角化症ともに低下がみられた。

#### 6. 日光角化症および有棘細胞癌の MMP-2 発現

①RT-PCR 日光角化症、有棘細胞癌ともに MMP-2 mRNA の増加がみられ、イミキモド塗布により日光角化症、有棘細胞癌ともに減少した。

②免疫染色 イミキモド塗布により腫瘍細胞における MMP-2 陽性細胞比率は有棘細胞癌、日光角化症ともに変化はみられなかったが、間質細胞では有棘細胞癌、日光角化症ともにイミキモド塗布により MMP-2 陽性細胞数は減少した。

### IV. 結 語

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- $\gamma$  を誘導することで抗腫瘍効果を発揮することを示した。さらに 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。

## 論文審査の結果の要旨

### 論文審査担当者

主査 教授 赤坂 俊英 (皮膚科学講座)

副査 教授 増田 友之 (病理学講座:機能病態学分野)

副査 教授 前沢 千早 (医歯薬総合研究所:腫瘍生物学研究部門)

本研究は、ヘアレスマウス皮膚に実験的に誘発した紫外線誘発癌を用いて、イミキモドの作用機序に肥満細胞が関与することを明らかにした。イミキモド外用により日光角化症と有棘細胞癌など紫外線誘発皮膚癌の腫瘍増殖率が低下するとともに、腫瘍周囲の浸潤肥満細胞数の増加およびインターフェロン $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) の表出が増加することが示された。これらの結果からイミキモドにより肥満細胞浸潤が誘導され、さらに肥満細胞がマクロファージやリンパ球を腫瘍局所に誘導し、これらの浸潤細胞から分泌される IFN- $\gamma$  が抗腫瘍効果を発揮することが示唆された。一方、腫瘍増殖に関与する matrix metalloproteinase (MMP) 9 及び 2 ともにその表出は日光角化症で僅かに、有棘細胞癌で著明な表出の亢進がみられ、イミキモドによりその表出は腫瘍細胞で変化はみられないが、間質細胞では抑制される結果であった。この結果からイミキモドは間質の MMP の表出を抑制するが有棘細胞癌の腫瘍細胞由来の MMP は表出量が多いため表出抑制までには至らないことが示唆された。日光角化症では浸潤肥満細胞数がイミキモド外用療法の効果予測因子であることを示唆しており、学位に値する。

### 試験・試問の結果の要旨

イミキモドの免疫学的作用機序、および日光角化症の発症機序について試問を行い、適切な解答を得た。学位に値する学識を有していると考えられる。また、英語の試験にも合格した。

### 参考論文

1) A case of angioleiomyoma with epithelioid granuloma (Onishi Masazumi, 他 4 名と共著).

Case Reports in Dermatology 3 巻, 3 号 (2011):170-174.

2) 尿道、膣への浸潤を認めた外陰部悪性黒色腫の 1 例 (大西正純、他 5 名と共著). 臨床皮膚科 69 巻, 8 号 (2015) : 574-578.

3) 大きな陥凹を有した色素性アポクリン腺癌 (大西正純、他 7 名と共著). 皮膚科の臨床 56 巻, 6 号 (2014) 815-818.