



## $\alpha$ -Smooth Muscle Actin Expression in Tumor and Stromal Cells of Benign and Malignant Human Pigment Cell Tumors

塚本, 秀和

---

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

1993-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲1191

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1001191>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・(本籍)	つか もと ひで かず 塚 本 秀 和	(兵庫県)
博士の専攻 分野の名称	博士 (医学)	
学位記番号	博い第841号	
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当	
学位授与の日付	平成5年3月31日	
学位論文題目	$\alpha$ -Smooth Muscle Actin Expression in Tumor and Stromal Cells of Benign and Malignant Human Pigment Cell Tumors ヒト良性色素細胞腫瘍および悪性黒色腫における 腫瘍細胞・間質細胞内 $\alpha$ 平滑筋アクチン蛋白の発現動態	
審査委員	主査 教授 市橋正光	
	教授 片岡 徹	教授 本間守男

### 論文内容の要旨

#### 【序文】

近年、悪性黒色腫の転移メカニズムに関する研究が盛んに行なわれているが、そのひとつとして細胞骨格の変化は、腫瘍細胞の形態変化を通じ原発巣からの遊離・浸潤・他臓器への定着に関与すると考えられ、転移を規定する因子として重要視されている。

アクチン蛋白は、細胞骨格のミクロフィラメントの主要構成単位であり、非筋細胞に通常みられる $\beta$ 、 $\gamma$ アクチンのほか、心筋・骨格筋・平滑筋型 $\alpha$ アクチンなどの6種類に分類され、そのアイソタイプを認識する抗体が作成されている。そのアミノ酸配列は種族を越え、相同性が非常に高く、構造のよく保存された蛋白と考えられる。しかしながら、1988年谷口らにより、マウス黒色腫において、低転移株に存在する $\beta$ mと名付けられた新種アクチンが、高転移株では消失するが、そのcDNAを導入することにより、細胞骨格構築能が回復し低転移株に戻るという研究がなされた。即ち、 $\beta$ mアクチンは、細胞の変形性や運動性を低下させ、浸潤能や転移能を抑制したと考えられる。さらに、谷口・笹瀬らは1989年、ヒト色素細胞腫瘍におけるアクチン蛋白発現変化を生化学的に検索した結果、 $\beta$ mアクチンとは異なる $\beta$ 、 $\gamma$ アクチン以外の $\alpha$ アクチン様蛋白についても、マウス黒色腫における現象と同様に悪性化で消失する傾向を確認した。この $\alpha$ アクチン様蛋白はウエスタンプロット法により $\alpha$ 平滑筋アクチンであることが判明したが、生化学的方法ではいくつかの矛盾点を含んでいた。

本研究では、ヒト良性母斑細胞母斑、前癌性メラノーラシス、悪性黒色腫、及び腫瘍巣周辺における $\alpha$ 平滑筋アクチンの発現動態を、抗 $\alpha$ 平滑筋アクチン单クローン抗体を用い免疫組織学的に解析し、生化学的方法で検出された $\alpha$ アクチンの由来について検討を行なった。

## 【材料・方法】

### 1. 組織標本

すべての組織標本は、手術的に切除された組織より作成された。組織学的診断は、その H-E 標本によった。

### 2. 培養細胞

5種のヒト黒色腫細胞株は、結節型黒色腫あるいは表在拡大型黒色腫の転移巣より、本教室で細胞株として樹立された。5種のヒト正常メラノサイトは、成人包皮より樹立後、継代培養された。

### 3. 免疫組織化学染色

用いられた抗 $\alpha$ 平滑筋アクチン単クローニング抗体 (Sigma 社製) は、平滑筋、血管周囲細胞 (ペリサイト)、筋上皮細胞に特異的に反応する。染色法は通常の酵素抗体法 (LAB 法) を用い、3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) にて発色させた。

### 4. ウエスタンプロット法

アセトン処理組織から O'Farrell's lysis buffer を用いて抽出した蛋白  $80 \mu g$  を、Laemmli 法に従い 10% ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動し、ニトロセルロース膜上転写後抗 $\alpha$ 平滑筋アクチン抗体にて反応させ、4-chloro-1-naphthal にて発色させた。

## 【結果】

- 大部分の良性色素性母斑 (28/29 例)、前癌性メラノーシス (3/3 例)、悪性黒色腫 (16/17 例) の腫瘍細胞においては、 $\alpha$  平滑筋アクチンの発現は認められなかった。
- 悪性黒色腫腫瘍巣周囲、特に転移巣周囲では高率に (6/8 例)、 $\alpha$  平滑筋アクチン陽性の紡錘形平滑筋様間質細胞 (即ち myofibroblast) が、近位部において稠密に認められた。一方、良性母斑、及び前癌性局面では、周辺真皮乳頭層内ペリサイト以外には、 $\alpha$  平滑筋アクチンは観察されなかった。
- 培養黒色腫細胞では、5 例中 2 例に弱陽性を認めたが、培養正常メラノサイトは、すべて陰性であった。
- ウエスタンプロット法においては、正常皮膚真皮乳頭層部分、良性母斑、及び平滑筋様間質変化を伴う転移性黒色腫の抽出蛋白では、43kD の  $\alpha$  アクチンバンドが検出されたが、平滑筋様間質変化の伴わない原発性黒色腫抽出蛋白では陰性であり、免疫組織学的染色における間質の反応性の有無に対応した。

## 【考察】

ヒト色素細胞腫瘍において、生化学的方法によれば、良性母斑抽出蛋白に存在する $\alpha$  アクチン様蛋白 (即ち、 $\alpha$  平滑筋アクチン) が、黒色腫で消失傾向のあることが報告され、マウス黒色腫における $\beta$ m アクチンと同様の悪性化抑制因子と推測されていた。しかしながら、本研究において免疫組織学的方法により、細胞レベルにて詳細に $\alpha$  平滑筋アクチンの局在を検討した結果、良性母斑、及び前癌病変における $\alpha$  アクチンの由来は、腫瘍細胞そのものではなく、真皮乳頭層内の $\alpha$  平滑筋アクチン陽

性のペリサイトの混入であることが証明された。従って、 $\alpha$ 平滑筋アクチン発現には、マウス黒色腫における $\beta m$ アクチンのような細胞骨格構築回復による悪性化抑制因子としての役割は否定的である。

さらに、新たに悪性黒色腫周囲において、平滑筋様間質細胞の存在が発見され、黒色腫抽出蛋白における $\alpha$ アクチンは、これらの間質細胞に由来することが明らかとなった。平滑筋様間質細胞は、卵巣癌・乳癌などにおいても、腫瘍周囲間質に出現することが報告されており、電顕的・免疫組織学的に myofibroblast として定義されている。線維芽細胞を myofibroblast に分化させる因子は未知であるが、悪性腫瘍細胞の分泌するサイトカインによる誘導が推測されており、黒色腫転移巣周囲近位部でより密に出現している点からも、数多く報告されている黒色腫細胞産生因子の関与が示唆される。

間質細胞の平滑筋様変化の生物学的意義については明らかではないが、悪性細胞に対して結合織マトリックスを与えることにより、浸潤発育・転移を高める可能性が考えられる。反対に、宿主側の腫瘍浸潤に対する遮蔽効果も、マウス BL6 黒色腫を用いた実験にて報告されている。

例外的に認められた腫瘍細胞自体の $\alpha$ 平滑筋アクチン発現に関しては、オートクライインによる腫瘍細胞表面上の成長因子-受容体機構が働いているかもしれない。最近、bFGF や TGF- $\beta$  が予定外胚葉を中心胚葉へ誘導しうることが報告されており、脱分化状態にある黒色腫のような外胚葉由来黒色腫細胞が、何らかの刺激因子により筋細胞様分化することが考えられる。

#### 論文審査の結果の要旨

細胞骨格の変化は、腫瘍細胞の形態変化を通じ原発巣からの腫瘍細胞の遊離・浸潤・他臓器への定着に関与する因子として、重要視されている。近年、九大の谷口らにより、マウス B16 黒色腫において、新種のアクチン蛋白 ( $\beta m$  アクチン) が低転移株で発現し、高転移株で消失するが、その cDNA の高転移株への導入により、細胞骨格構築が回復し低転移株に戻ることが報告された。即ち、 $\beta m$  アクチン遺伝子は、細胞の変形性や運動性を低下させ、B16 黒色腫の悪性度を低下させる anti-metastasizing gene の役割をしていると考えられる。マウスでのアクチン研究に続き、ヒト色素細胞腫瘍においても生化学的検索により、 $\beta m$  アクチンとは異なる $\alpha$  アクチン様蛋白 (即ち、 $\alpha$  平滑筋アクチン) が、良性母斑には検出されるが、悪性黒色腫では消失傾向にあることがわかり、マウス黒色腫における現象と類似しているため興味が持たれていた。

本研究では、ヒト母斑細胞母斑、色素細胞の前癌症、悪性黒色腫、及び腫瘍巣周辺における $\alpha$  平滑筋アクチンの発現動態を抗 $\alpha$  平滑筋アクチン単クローン抗体を用い免疫組織学的に解析し、生化学的手法で検出された $\alpha$  アクチンの由来について検討した。その結果、1) 腫瘍細胞に関しては、大部分の良性色素性母斑、前癌病変、悪性黒色腫とも、 $\alpha$  平滑筋アクチンを発現しておらず、一方、2) 間質に関しては、良性母斑、及び前癌性局面では、周辺真皮乳頭層内の血管周囲細胞 (ペリサイト) にのみ $\alpha$  平滑筋アクチンが発現され、生化学的 $\alpha$  アクチンの由来と考えられ、さらに、3) 悪性黒色腫腫瘍巣周辺において $\alpha$  平滑筋アクチン陽性の紡錘形平滑筋様間質細胞 (myofibroblast) が稠密に存

在することが明らかになった。これらの平滑筋様間質細胞は、特に黒色腫転移巣周囲近位部で高率に認められ、卵巣癌・乳癌などにおいても、腫瘍巣周囲に出現することが報告されており、悪性腫瘍細胞の分泌する何らかのサイトカインによる誘導が推測される。さらに、間質細胞の平滑筋様変化が宿主-腫瘍間ににおいて、浸潤に対する遮蔽効果などの影響を与えていていることが示唆される。

本研究は、ヒト色素細胞腫瘍において生化学的手法により見い出された $\alpha$ アクチンの由来を、免疫組織学的に細胞レベルで明確にし、また黒色腫腫瘍巣周囲における平滑筋様間質細胞の出現を初めて明らかにしたもので価値ある集積と認める。よって本研究者は、博士（医学）学位を得る資格があると認める。