

平成 30 年 5 月 16 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19709

研究課題名(和文)皮膚悪性リンパ腫の病態形成の包括的解析

研究課題名(英文)Comprehensive analysis of pathogenesis of cutaneous lymphoma

研究代表者

宮垣 朝光(Miyagaki, Tomomitsu)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：50582003

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：皮膚T細胞リンパ腫(CTCL)において、IL-25、cyclophilin AとCD147、CD137とCD137L、IL-10産生制御性B細胞について解析を行った。

CTCLにおいて、IL-25の発現は上昇しており、腫瘍細胞からのIL-13産生増強を促進していた。また、CTCLの腫瘍細胞はcyclophilin Aを産生し、自己が発現するCD147と結合を介して、自己増殖を誘導していた。さらに、CTCLの腫瘍細胞はCD137に加えて、CD137Lを異所性に発現しており、自己増殖を誘導していた。進行期菌状息肉症では、末梢血中のIL-10産生制御性B細胞は減少し、病勢マーカーと逆相関を認めた。

研究成果の概要(英文)：We examined the expression and involvement of IL-25, cyclophilin A, CD147, CD137, CD137L, and IL-10-producing regulatory B cells (Bregs) in cutaneous T-cell lymphoma (CTCL). We found that Th2 cytokines highly expressed in CTCL lesional skin induced IL-25 production by epidermal keratinocytes, which may in turn lead to formation of Th2-dominant microenvironment through the direct induction of IL-13 by tumor cells. We also found that interactions between CD147 expressed on the cell surface of CTCL tumor cells and CypA secreted by those cells promote CTCL development through promoting proliferation and survival of tumor cells. Moreover, in addition to CD137, aberrant CD137L expression was found on tumor cells of CTCL, and CD137-CD137L interactions promote cell proliferation and migration in CTCL cells. Furthermore, the development of IL-10-producing Bregs is impaired in patients with advanced mycosis fungoides and the number of Bregs was inversely correlated with disease severity markers.

研究分野：皮膚科

キーワード：皮膚悪性リンパ腫 菌状息肉症 セザリー症候群 IL-25 cyclophilin A CD147 IL-10産生制御性B細胞 CD137-CD137L

1. 研究開始当初の背景

(1) 皮膚悪性リンパ腫とは、初診の時点で皮膚以外の臓器に病変を認めないリンパ腫である。その大部分はT細胞が腫瘍化した皮膚T細胞リンパ腫 (cutaneous T cell lymphoma; CTCL) であるが、B細胞やNK細胞、形質細胞様樹状細胞のリンパ腫も存在する。治療法や予後は腫瘍細胞の種類や浸潤形態などで異なるが、多剤併用化学療法を含めた複数の治療に抵抗性であり、診断確定後数年以内に患者が死亡するケースも少なくない。また、徐々に進行するケースでも、原病や治療に伴う免疫抑制状態による感染症の合併、皮膚病変の潰瘍化などにより、患者のQOLの低下がしばしば見られる。それゆえ、皮膚悪性リンパ腫、特に頻度の高いCTCLの病態生理の解明と、それに基づいた有効性の高い新規治療薬の開発が望まれている。

(2) 癌細胞には免疫システムに認識される癌関連抗原が存在することが知られている。免疫監視機構から逃避して増殖し、顕在化した癌組織に対してはこのような癌抗原を標的とした免疫反応が存在することが予想される。しかしながら、実際に癌患者で認められる癌抗原に対する免疫反応は多くの場合極めて微弱である。その理由として、腫瘍細胞や腫瘍周囲のストローマ細胞、免疫担当細胞、それらによって産生されたサイトカインやケモカインなどの液性因子によって構成される腫瘍微小環境では免疫細胞の機能を抑制するメカニズムが存在することが近年の研究により明らかになった。皮膚悪性リンパ腫は、病初期は皮膚においてのみリンパ腫細胞が増殖するという特異な疾患であり、さらに様々なサイトカインやケモカイン、それらを産生する細胞がその病態に関与していることから、皮膚悪性リンパ腫においても同様の腫瘍微小環境が存在すると考えられており、その解明はCTCLの新たな治療開発の上で、極めて重要である。

2. 研究の目的

前述のとおり、CTCLに対する治療は確立していない。本研究の目的は、皮膚悪性リンパ腫患者の臨床検体、リンパ腫細胞株を用いた *in vitro* の系、リンパ腫細胞株と免疫不全マウスを用いた *in vivo* の系にて、腫瘍微小環境を形成する液性因子、B細胞について、それらの発現や数、機能について検討を行い、それらのCTCLにおける役割をさらに明確にすることである。また、細胞株を用いて、新たな自己分泌因子を同定し、周囲の細胞や自己への影響をリコンビナント蛋白、中和抗体、shRNAなどを用いて *in vitro*、*in vivo* 両方の系で検討を行うことにより、CTCLにおける新たな自己分泌因子の役割を解明することも目的とする。

3. 研究の方法

(1) CTCL患者におけるTh2誘導サイトカインであるIL-25の関与の検討

CTCLの患者の血清及び病変部皮膚組織を用いて、ELISA法、免疫染色法にて、IL-25の発現を検討した。

CTCLの細胞株、セザリー症候群患者の末梢血中腫瘍細胞を用いて、IL-25受容体 (IL-25R) の発現をフローサイトメトリー法で検討し、IL-25刺激によるTh2サイトカインの産生を調べた。

(2) 進行期菌状糸肉症 (mycosis fungoides; MF) 患者の末梢血中IL-10産生制御性B細胞の検討

MF患者よりヘパリン採血を行い、ficollを用いて密度勾配遠心分離法にて末梢血中単核球 (PBMC) を分離する。回収したPBMC上のCD19、CD24、CD27、CD38の発現をフローサイトメトリー法にて測定し、CTCL患者の末梢血中のB細胞分画を検討した。

上記と同様に回収したPBMCをCpG、抗CD40抗体で48時間刺激し、後半5-6時間でPMA、ionomycin+brefeldin Aを追加し、刺激して、IL-10の発現を誘導した。その後、細胞内フローサイトメトリー法にてIL-10の発現を検討した。

、得られたB細胞分画およびB細胞からのIL-10産生のデータと皮膚悪性リンパ腫の病態やTh2環境を反映する種々のマーカー、血中サイトカイン、ケモカイン値との相関を調べた。相関にはスピアマンの順位相関係数を用いた。

(3) CTCLにおけるCyclophilin A (CypA)-CD147の関与の検討

CTCLの細胞株を用いて、フローサイトメトリー法にてCD147の発現を、ELISA法にて上清中のCypA濃度を測定した。

CTCLの細胞株をCypA阻害剤あるいはCD147の中和抗体と共培養し、増殖へ与える影響を検討した。

CTCLの細胞株であるHH細胞を免疫不全マウスに接種し、*in vivo*におけるCypA阻害剤の治療効果を検討した。

(4) CTCLにおけるCD137-CD137 ligand (CD137L)の関与の検討

CTCLの細胞株を用いて、フローサイトメトリー法にてCD137、CD137Lの発現を検討した。

CTCL の細胞株を CD137、CD137L の中和抗体と共培養し、増殖、ケモカイン受容体である CXCR4 の発現へ与える影響を検討した。

CTCL の細胞株である HH 細胞を免疫不全マウスに接種し、*in vivo* における CD137L の中和抗体の治療効果を検討した。

4. 研究成果

(1) CTCL 患者における Th2 誘導サイトカインである IL-25 の関与の検討

CTCL 患者では健常人と比較して、表皮角化細胞からの IL-25 産生が上昇していた。

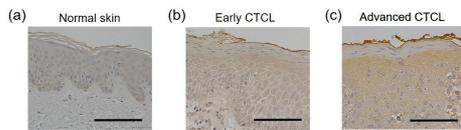


図1 .CTCL の病変部皮膚における IL-25 の発現

進行期 CTCL 患者では、血清中 IL-25 値が上昇しており、血清 LDH 値と正の相関を認めた。

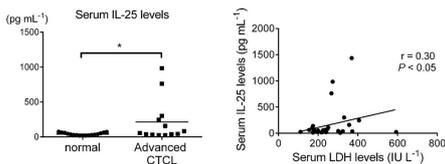


図2 . CTCL 患者の血清中 IL-25 値

MF の細胞株 MyLa 及び一部のセザリー症候群患者の末梢血腫瘍細胞は IL-25R を発現し、IL-25 刺激により IL-13 産生が増強された。

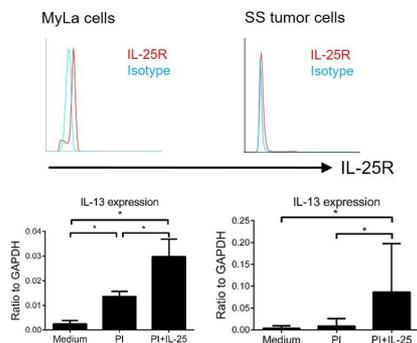


図3 .MyLa 細胞およびセザリー症候群患者の末梢血腫瘍細胞における IL-25R の発現および IL-25 刺激下における IL-13 産生

以上の結果から、CTCL における Th2 優位の腫

瘍微小環境の構築に IL-25 が関与していることが示唆された。

(2) 進行期菌状息肉症 (mycosis fungoides; MF) 患者の末梢血中 IL-10 産生制御性 B 細胞の検討

CTCL 患者では健常人と比較して、制御性 B 細胞を含む CD19(+)/CD24(hi)/CD27(+) B 細胞および CD19(+)/CD24(hi)/CD38(hi) B 細胞の割合が減少していた。

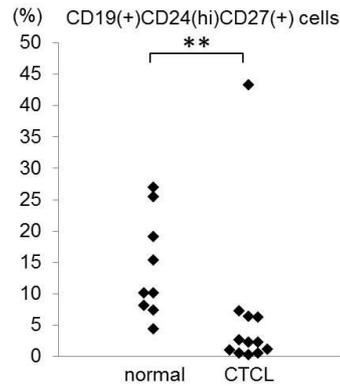


図4 . CD19(+)/CD24(hi)/CD27(+) B 細胞の割合

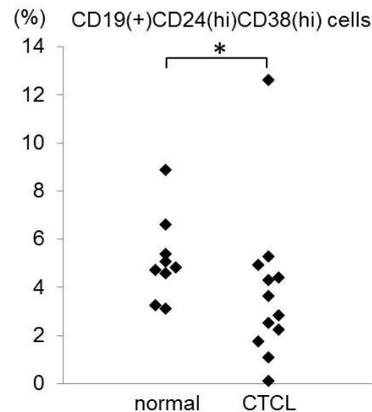


図5 . CD19(+)/CD24(hi)/CD38(hi) B 細胞の割合

CTCL 患者では末梢血中の IL-10 産生制御性 B 細胞の割合が減少していた。

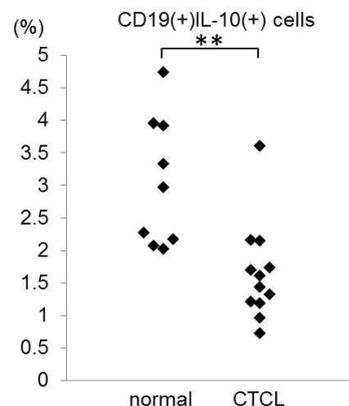


図 6 . CD19(+)/IL-10(+)/B 細胞の割合

CTCL 患者の末梢血中の CD19(+)/CD24(hi)/CD27(+)/B 細胞数、CD19(+)/CD24(hi)/CD38(hi)/B 細胞数、CD19(+)/IL-10(+)/B 細胞数は CTCL の血清マーカーである LDH と逆相関を認めた。

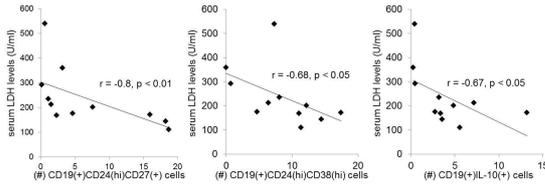


図 7 . 各種 B 細胞分画と血清 LDH 値の逆相関

以上の結果より、制御性 B 細胞が CTCL の病勢に関与している可能性が考えられた。

(3)CTCL における Cyclophilin A(CypA) -CD147 の関与の検討

CTCL の細胞株は CD147 を発現し、CypA を分泌していた。

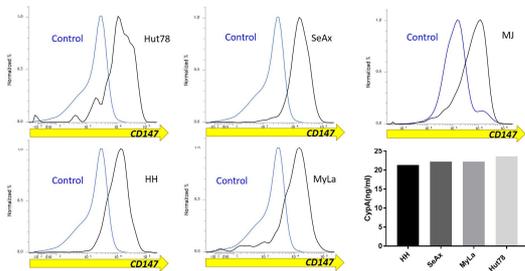


図 8 . CTCL 細胞株の CD147、CypA の発現

CypA の阻害剤、CD147 の中和抗体は in vitro における CTCL 細胞株の増殖を抑制した。

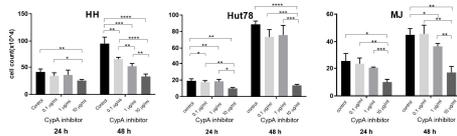


図 9 . CypA の阻害剤による CTCL 細胞株の増殖抑制効果

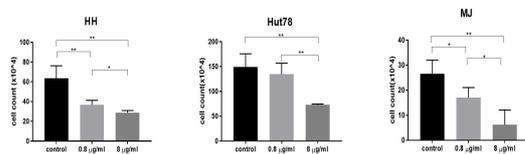


図 10 .CD147 の中和抗体による CTCL 細胞株の増殖抑制効果

CypA の阻害剤は in vivo における HH 細胞の増殖を抑制した。

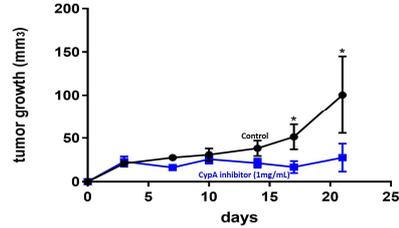


図 11 . CypA の in vivo における HH 細胞の成長抑制効果

以上の結果から、CTCL の腫瘍細胞は CypA を分泌し、自身の CD147 を介して、オートクリンに自己増殖を促していると考えられた。CypA-CD147 の相互関係を阻害することは CTCL の新たな治療法になることが示唆された。

(4)CTCL における CD137-CD137 ligand (CD137L) の関与の検討

CTCL の細胞株は CD137 と CD137L の両方を発現していた。

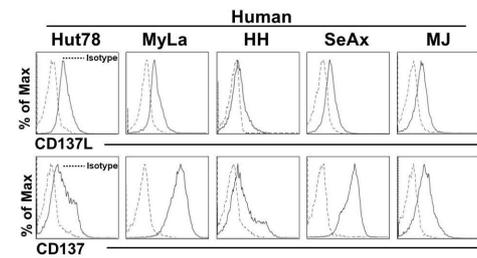


図 12 .CTCL の細胞株における CD137、CD137L の発現

CD137、CD137L の中和抗体は CTCL 細胞株の増殖、CXCR4 の発現を抑制した。

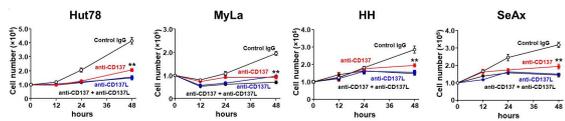


図 13 .CD137、CD137L の中和抗体による CTCL 細胞株の増殖抑制効果

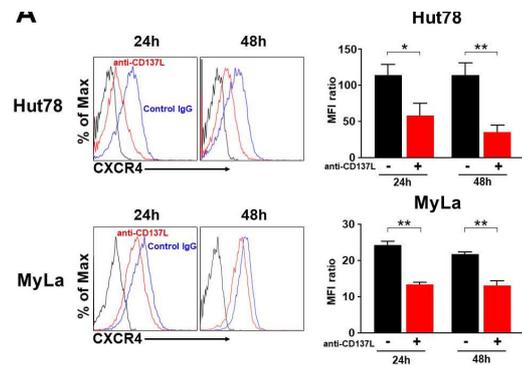


図 1 4 . CD137L の中和抗体による CTCL 細胞株上の CXCR4 発現抑制効果

CD137L の中和抗体は in vivo における HH 細胞の増殖を抑制した。

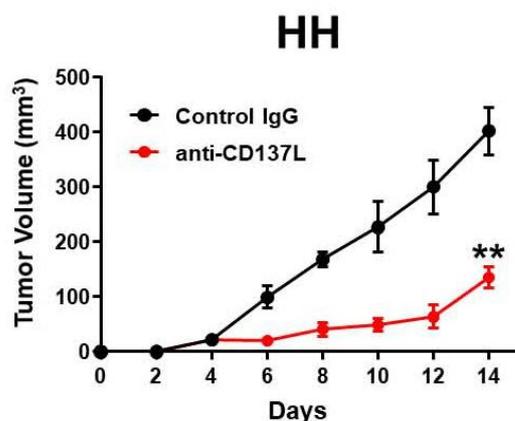


図 1 5 . CD137L の中和抗体の in vivo における HH 細胞の成長抑制効果

以上の結果から、CTCL の腫瘍細胞は CD137、CD137L の双方を発現し、それらの相互関係を介して、自己増殖および CXCR4 の発現を介した皮膚への遊走を促していると考えられた。CD137-CD137L の相互関係を阻害することは CTCL の新たな治療法になることが示唆された。

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 12 件)

1. Miyagaki T, Sugaya M, Oka T, Takahashi N, Kawaguchi M, Suga H, Fujita H, Yoshizaki A, Asano Y, Sato S: Placental growth factor and vascular endothelial growth factor together regulate tumour progression via increased vasculature in cutaneous T-cell lymphoma. *Acta Derm Venereol* 97: 586-592, 2017.

2. Senda N, Miyagaki T, Oka T, Ito Y, Katayama K, Kamiyama T, Sugaya M, Sato S: Case of Mycosis Fungoides with Gastric and Central Nervous System Involvement. *J Dermatol* 44: e166-e167, 2017.

3. Suzuki H, Miyagaki T, Otobe S, Nakajima R, Oka T, Takahashi N, Kabasawa M, Suga H, Yoshizaki A, Asano Y, Sato S, Sugaya M: Increased endocan expression in lesional skin and decreased endocan expression in sera in atopic dermatitis. *J Dermatol* 44: 1392-1395, 2017.

4. Sakamoto M, Miyagaki T, Kamijo H, Oka T, Takahashi N, Suga H, Yoshizaki A, Asano Y, Sugaya M, Sato S: Serum VEGF-A levels reflect itch severity in mycosis fungoides and Sézary syndrome. *J Dermatol* 45: 95-99, 2018.

5. Nakajima R, Miyagaki T, Hirakawa M, Oka T, Takahashi N, Suga H, Yoshizaki A, Fujita H, Asano Y, Sugaya M, Sato S: IL-25 is involved in CTCL progression by establishing Th2-dominant microenvironment. *Br J Dermatol* 2017 Dec 13, Epub ahead of print.

6. Oka T, Miyagaki T, Takahashi N, Nakajima R, Kamijo H, Suga H, Asano Y, Sugaya M, Sato S: Serum soluble CD48 levels as a prognostic marker in mycosis fungoides and Sézary syndrome. *J Invest Dermatol* 2018 Mar 29, Epub ahead of print.

7. Nakajima R, Miyagaki T, Morimura S, Fukasawa T, Oka T, Yoshizaki A, Sugaya M, Sato S: Exacerbated immune complex-mediated vascular injury in mice with heterozygous deficiency of Aryl hydrocarbon receptor through upregulation of Fcγ receptor III expression on macrophages. *J Invest Dermatol* 2018 Mar 29, Epub ahead of print.

8. Oka T, Miyagaki T, Isomura S, Ichimura Y, Kamata M, Mitsui H, Ishii N, Hashimoto T, Sato S: Linear IgA bullous dermatosis limited to oral mucosa associated with ulcerative colitis. *J Dermatol* 2018 Apr 14, Epub ahead of print.

9. Akatsuka T, Miyagaki T, Nakajima R, Kamijo H, Oka T, Takahashi N, Suga H, Yoshizaki A, Asano Y, Sugaya M, Sato S: Decreased IL-10-producing regulatory B cells in patients with advanced mycosis fungoides. *Eur J Dermatol* 2017 in press.

10. Oka T, Miyagaki T, Nakamura R, Funamizu K, Sugaya M, Ebisawa K, Koya J, Kurokawa M, Sato S: Methotrexate-associated lymphoproliferative disorder presenting as giant ulcers on the leg. *Clin Exp Dermatol* 2017 in press.

11. Senda N, Miyagaki T, Kamijo H, Nakajima R, Oka T, Takahashi N, Suga H, Yoshizaki A, Asano Y, Sugaya M, Sato S:

HMGB1 levels are increased in lesional skin and sera in patients with cutaneous T-cell lymphoma. Eur J Dermatol 2018 in press.

12. Numajiri H, Miyagaki T, Sugaya M, Sato S: A case of folliculotropic mycosis fungoides successfully treated with topical steroid treatment. J Cancer Res Ther 2018 in press.

〔学会発表〕(計 18 件)

1. Miyagaki T, Sugaya M, Oka T, Takahashi N, Kawaguchi M, Suga H, Fujita H, Yoshizaki A, Asano Y, Sato S: Vascular endothelial growth factor (VEGF)-A and placental growth factor (PlGF) regulate tumor progression via increased vasculature in cutaneous T cell lymphoma (CTCL). International Congress of Immunology 2016. Melbourne, Australia. Aug, 2016.

2. Miyagaki T, Sugaya M, Hayashi Y, Nakamura K, Takahashi N, Asano Y, Sato S, Koguchi A, Yamaguchi N, Ueda J, Shimizu J, Taoka K, Kurokawa M: Anaplastic large cell lymphoma involving skin and muscle associated with polymyositis. Asia-Pacific Combined Dermatology Research Conference 2016. Noosa, Australia. Aug, 2016.

3. Miyagaki T, Sugaya M, Hayashi Y, Nakamura K, Takahashi N, Asano Y, Sato S, Koguchi A, Yamaguchi N, Ueda J, Shimizu J, Taoka K, Kurokawa M: Anaplastic large cell lymphoma involving skin and muscle associated with polymyositis. Third World Congress of Cutaneous Lymphomas. New York, NY, USA. Oct, 2016.

4. Miyagaki T, Nakajima R, Oka T, Takahashi N, Hirakawa M, Suga H, Fujita H, Sugaya M, Sato S: Th2-dominant microenvironment by IL-25 in cutaneous T-cell lymphoma. The 76th Annual Meeting of the SID. Portland, OR, USA. April, 2017.

6. 宮垣 朝光, 岡 知徳, 高橋 菜穂美, 管 析, 菅谷 誠, 佐藤 伸一: 進行期菌状臍肉症患者における末梢血中制御性 B 細胞の解析. 第 45 回日本臨床免疫学会. 2017 年 9 月 28 日 ~ 30 日、東京.

7. Miyagaki T, Akatsuka T, Nakajima R, Kamiyo H, Oka T, Takahashi N, Suga H, Sugaya M, Sato S: Decreased

IL-10-producing regulatory B cells in advanced mycosis fungoides. The 42nd Annual Meeting of Japanese Society for Investigative Dermatology. Kochi, Japan. Dec, 2017.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮垣 朝光 (MIYAGAKI TOMOMITSU)
東京大学・医学部附属病院・講師
研究者番号 : 50582003

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号 :

(4) 研究協力者

なし