

令和 2 年 5 月 12 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15204

研究課題名(和文) 悪性黒色腫におけるメラニン合成系を介した免疫寛容誘導機序の解析

研究課題名(英文) The analysis of the role of melanogenesis in the anti-tumor immunity of malignant melanoma.

研究代表者

日高 高德(Hidaka, Takanori)

東北大学・大学病院・特任助手

研究者番号：80781575

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：悪性黒色腫はメラニン色素産生に特徴される予後不良の腫瘍である。近年その治療において腫瘍を攻撃する細胞障害性T細胞の機能抑制の解除が重要であることが明らかにされたが、メラニン色素合成系とT細胞の機能抑制の関連についてはよく分かっていない。今研究により、メラニン色素合成系の代謝物が腫瘍周囲の細胞障害性T細胞のAryl hydrocarbon receptorと呼ばれる分子を活性化して、その機能の抑制に関与していることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は悪性黒色腫に特異的なメラニン色素合成系と同腫瘍の病態に重要な細胞障害性T細胞の関係を解明したものである。このことはAryl hydrocarbon receptor活性の調整が、既存の治療薬と比較して悪性黒色腫に対してより特異的(副作用が少なく)かつ治療効果は劣らない加療法の開発につながる可能性を示唆している。

研究成果の概要(英文)：Malignant melanoma is the tumor of poor prognosis and being characterized by a melanogenic property. Though it has been recently revealed important to derepress the function of anti-tumor cytotoxic t cells, the relationship between melanogenesis and the immune-suppression of cytotoxic t cells remains unknown. We revealed that one of the metabolites of melanogenesis activates aryl hydrocarbon receptor of cytotoxic t cells besides malignant melanoma that leads to the suppression of cytotoxic t cells.

研究分野：皮膚科学

キーワード：悪性黒色腫 細胞障害性T細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

悪性黒色腫はメラニン合成能を有することに特徴されるメラノサイト由来の予後不良な腫瘍である。近年、悪性黒色腫による腫瘍抗原特異的 T 細胞に対する免疫寛容誘導を解除することが同腫瘍に罹患した患者の予後を改善することが明らかとされた。しかし、悪性黒色腫に特異的な免疫寛容の誘導機序の詳細は分かっていない。Aryl hydrocarbon receptor (AhR) は多環芳香族炭化水素をリガンドとし、一般的にリガンドが結合すると CYP1A1 や CYP1B1 を含む第 1 相解毒代謝酵素群の発現を誘導する受容体型転写因子として知られている。加えて、AhR は T 細胞において免疫抑制性 (Treg) と炎症誘導性 (Th17) の形質転換を制御する機能を有する受容体型転写因子としても知られ、実際に様々な多環芳香族炭化水素が結合すると T 細胞において免疫抑制が誘導されることが明らかとされている。悪性黒色腫はメラニンを合成するが、メラニンの中間代謝物には多種の多環芳香族炭化水素が含まれる。また、臨床的に腫瘍免疫が働く際には腫瘍においてメラニンが消失する現象がしばしば経験される。以上から、悪性黒色腫細胞が合成したメラニン中間代謝物が腫瘍周囲の T 細胞の AhR を活性化することで、腫瘍に対する免疫寛容を誘導しているとの仮説を立てた。

2. 研究の目的

1. 研究開始当初の背景に記載した仮説を検証するため、メラニン合成系における中間代謝物が T 細胞において AhR 依存的に免疫寛容を誘導し得るか、また同現象が実際に生体における悪性黒色腫の病態に関与しているかを検証する。

3. 研究の方法

- (1) メラニン中間代謝物が T 細胞において AhR 依存的に免疫寛容を誘導し得るかを検証するため、ヒト T 細胞細胞株である Jurkat 細胞株にメラニン中間代謝物を添加することで、AhR の標的遺伝子である *Cyp1a1* および *Cyp1b1*、悪性黒色腫の腫瘍免疫において重要とされる PD-1 分子の遺伝子である *Pdcd1* が誘導されるかを調べた。加えて、実際に悪性黒色腫におけるメラニン合成系が周囲の T 細胞に作用し得るかを検討するため、ヒトまたはマウス悪性黒色腫細胞株である HMV-II および B16 細胞株を Jurkat 細胞株とフィルターを介して分離培養し、悪性黒色腫細胞株側に Melanocyte stimulating hormone (MSH) を添加してメラニン合成系を活性化した時に、Jurkat 細胞株の *Cyp1a1*、*Cyp1b1* および *Pdcd1* の発現が亢進するかを検証した。
- (2) ヒトの悪性黒色腫において悪性黒色腫のメラニン合成能と腫瘍に浸潤している CD8 陽性 T 細胞の AhR 活性および PD-1 分子の発現強度の関連を調べるため、悪性黒色腫の臨床検体を用いてメラニン合成能の指標として Tyrosinase を、AhR 活性の指標として CYP1A1 を、腫瘍免疫寛容の指標として PD-1 を免疫染色して、それぞれの分子の発現強度の相関関係を検証した。
- (3) 悪性黒色腫に浸潤した T 細胞における PD-1 分子の発現が AhR に依存するかを検討するために、T 細胞特異的に AhR を欠失させた *Ahr^{fl/fl}Lck-Cre* マウスおよび *Ahr^{fl/fl}* マウスにメラノーマ細胞株 B16 を皮下移植し、2 週後に腫瘍を採取して、腫瘍に浸潤している CD8 陽性 T 細胞における PD-1 分子の発現について免疫染色で検討した。

4. 研究成果

- (1) メラニン中間代謝物を投与した Jurkat 細胞株では、投与していない Jurkat 細胞株と比較して *CYP1A1* および *CYP1B1*、*PDCD1* の発現は有意に増強していた。またフィルターを介した分離培養の実験系においても、悪性黒色腫側に MSH を添加した群では添加していない群と比較して、Jurkat 細胞株の *CYP1A1*、*CYP1B1*、*PDCD1* の発現が増強する傾向を認めた。
- (2) 悪性黒色腫細胞における染色強度を検討したところ、*CYP1A1* と Tyrosinase 分子の染色強度に正の相関関係を認めた。加えて、同検体を用いて腫瘍内に浸潤している CD8 T 細胞における *CYP1A1* および PD-1 分子の発現を免疫染色で確認したところ、悪性黒色腫腫瘍巢の *CYP1A1* 発現強度と腫瘍内に浸潤する *CYP1A1* 陽性および PD-1 陽性の CD8 T 細胞数に正の相関が認められた。
- (3) *Ahr^{fl/fl}* マウスにおいては腫瘍内に多数の PD-1 陽性 CD8 陽性 T 細胞が浸潤していたが、*Ahr^{fl/fl}Lck-Cre* マウスでは有意に浸潤している CD8 陽性 T 細胞数が減少していた。

以上の結果から *in vitro* において、メラニン中間代謝物は実際に T 細胞の AhR を活性化し、

PD-1 分子の発現を亢進させることが分かった。加えて *in vivo* の検証により、メラニン中間代謝物が関与しているかについては更なる検証を要するものの、悪性黒色腫のメラニン合成能の亢進と腫瘍に浸潤している CD8 陽性 T 細胞における AhR 活性化および PD-1 発現増強が関連していることを示した。これらの成果は AhR が受容体型転写因子であることを鑑みると、AhR リガンドによる悪性黒色腫の抗腫瘍免疫能調整を介した新たな加療法の探索につながる知見であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hidaka Takanori, Fujimura Taku, Aiba Setsuya	4. 巻 6
2. 論文標題 Aryl Hydrocarbon Receptor Modulates Carcinogenesis and Maintenance of Skin Cancers	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Medicine	6. 最初と最後の頁 194
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmed.2019.00194	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Hidaka T, Fujimura T, Aiba S.
2. 発表標題 Melanogenic property of melanoma is associated with aryl hydrocarbon receptor-induced suppression of anti-melanoma immune response.
3. 学会等名 49th Annual Meeting of European Society for Dermatological Research. (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----