

機関番号：32202

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591326

研究課題名 (和文) 悪性黒色腫の進展に伴う宿主免疫抑制の機構と効果的な養子細胞移入療法の研究

研究課題名 (英文) Mobilization of myeloid-derived suppressor cells in the melanoma progression and the study of the effective adoptive immunotherapy

研究代表者

村上 孝 (MURAKAMI TAKASHI)

自治医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00326852

研究成果の概要 (和文)：

近年、腫瘍増大に伴う未熟な骨髄細胞集団が宿主免疫に影響することが注目され、それらは Myeloid-Derived Suppressor Cells (MDSCs) と呼ばれている。本研究では、1) メラノーマ腫瘍増大に伴う Gr1⁺CD11b⁺未熟骨髄細胞集団は Th2 型免疫反応によって誘導され易いこと、2) メラノーマ以外の腫瘍における新規ケモカイン CXCL17 /DMC/VCC-1 の過剰発現によってこれら Gr1⁺CD11b⁺未熟骨髄細胞集団が腫瘍局所で増数し、腫瘍内血管新生と密接に関連しすることを明らかにした。担がんマウスによる実験結果から、腫瘍型に依存した Gr1⁺CD11b⁺未熟骨髄細胞集団が集積し、固有の腫瘍進展につながる事が考えられた。

研究成果の概要 (英文)：

With melanoma, as with many other malignancies, the immune-suppressive tumor microenvironment is a hallmark of cancer and a major obstacle to immune therapy. Myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) contribute to immune dysfunctions induced by tumors both in experimental models and patients. While CD11b⁺Gr1⁺ myeloid cells are well-known markers for MDSCs in mice, only a limited number of literatures have been reported for drastic mobilization of CD11b⁺Gr1⁺ MDSCs in B16 melanoma-bearing C57BL/6 mice. To seek out mobilizing conditions of CD11b⁺Gr1⁺ MDSCs in C57BL/6 mice, the population size of CD11b⁺Gr1⁺ cells was investigated using some immunodeficient mice. Mobilization of CD11b⁺Gr1⁺ cells of B16 melanoma-bearing and melanoma-free mice was assessed by flow cytometric analysis. Moreover, achievement in mobilization of CD11b⁺Gr1⁺ cells was also evaluated using mice that formed interleukin (IL)-4-expressing B16 melanoma tumor. B16 melanoma in C57BL/6 wild-type mice less mobilizes CD11b⁺Gr1⁺ myeloid cells, but CD11b⁺Gr1⁺ cells were significantly mobilized in Rag1^{-/-} and Tbx^{-/-} mice that lack T and B cells and Th1-type immune response, respectively. Furthermore, IL-4-expressing B16 melanoma-bearing mice facilitated mobilization of CD11b⁺Gr1⁺ MDSCs in those immunodeficient mice in concomitant with the decrease of F4/80⁺ macrophages. Furthermore, we found that the latest member of the C-X-C-type chemokines, CXCL17 (DMC/VCC-1), recruited immature myeloid-derived cells and enhances early tumor progression. Our data suggest that aberrant expression of CXCL17 in tumor cells recruits immature myeloid-derived cells and promotes early tumor progression through angiogenesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：メラノーマ、免疫抑制、養子細胞移入療法、未熟骨髄由来細胞、ケモカイン

1. 研究開始当初の背景

悪性黒色腫（メラノーマ）に対する「がん抗原」の発見以来、がんワクチン療法に関する多くの臨床試験がなされてきた。しかしながら、米国がん研究所 Rosenberg らの報告では、メラノーマ患者を中心としたワクチン療法の臨床的応答性がわずか 2.6%でしかなく（Nature Med. 2004）、がんワクチン療法の限界すら暗示されていた。その一方で、この報告はがん免疫療法の改善すべきポイントを宿主側因子と腫瘍側因子の両面から再考の必要性を述べ、新しい視点での治療研究が多くの施設で開始されつつあった。

我々は、1) メラノーマの免疫感受性の回復・増幅方法の探索、2) 宿主免疫を効率よく活性化する抗原投与ルート of 検索、3) 患者個体で播種したメラノーマ細胞が年余にわたり腫瘍形成に至らず休眠状態で存在し続ける (tumor dormancy) の宿主制御機構について、マウスモデルを用いて研究を行ってきた。その結果、1) メラノーマの免疫感受性の回復方法として、包括的な遺伝子発現の修飾方法が有効であり、分子標的薬として期待されているヒストン脱アセチル化阻害剤の利用が有望であること (Kobayashi et al. Oncogene 2006)、2) 頸部リンパ節領域に至るリンパ流量と宿主免疫活性化の関係を明らかにし、3) メラノーマの tumor dormancy に極少数の宿主内腫瘍細胞が制御性 T 細胞 (Treg) の調節下に維持されることが必要であることを明らかにした (Kakinuma, et al. Cancer Immunol Immunother. 2007)。さらに、新規 IFN ファミリーに属する IFN- λ (IL-28/29) は NK 細胞を活性化することにより、B16 メラノーマ腫瘍の局所制御を可能にし、獲得免疫にも貢献することを示した (Sato et al. J Immunol 2006)。これらの研究結果から、メラノーマの進展に伴う宿主側因子の変化と腫瘍側因子の治療抵抗性を規定する要素を両面から考慮しなければな

らないことが強く示唆されていた。

2. 研究の目的

米国癌研究所実施した臨床試験の結果では、内在性リンパ球の存在が効率的な CTL の誘導を阻害していることが指摘され (Dudley et al., Science 2002)、その実体一つが CD4⁺CD25⁺制御性 T 細胞 (Treg) であることが判明していた。しかし、担がん状態にある患者個体 (及び実験動物) では、骨髓球由来の未熟なマクロファージ、好中球、樹状細胞が脾臓や腫瘍間質に蓄積する事実が報告され、現在 myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) として、その免疫抑制の役割が注目されていた (Gabrilovich et al, Cancer Res. 2007)。MDSCs 集団は不均一な細胞集団からなり、その性質も発生するがん種に依存する性質がある。本研究では、メラノーマ細胞やその他のがん細胞によるモデル動物の腫瘍進展に伴い出現する CD11b⁺ Gr1⁺MDSCs 集団の特徴付けとその増幅起点について研究を行なった。

3. 研究の方法

(1) メラノーマ抗原 (gp100/pm1) 特異的 T 細胞受容体 (TCR) を有するトランスジェニックマウス (Pm1) 個体におけるメラノーマ腫瘍増大と脾臓由来 CD11b⁺ Gr1⁺MDSCs 集団を FACS 解析し、免疫組織化学法にて腫瘍内 CD11b⁺ Gr1⁺MDSCs 集団の存在を検定した。

(2) 各種ヒトがん細胞株を免疫不全マウスに移植し、脾臓由来 CD11b⁺ Gr1⁺MDSCs 集団の特徴を FACS 解析した。またそれらの in vitro 走化性について Boyden Chamber 法にて検定した。

4. 研究成果

(1) メラノーマ抗原 (gp100/pm1) 特異的 T 細胞受容体 (TCR) を有するトランスジェニック

クマウス (Pmel) 個体において、マウス B16 メラノーマ細胞を C57BL/6 マウスの皮下に移植した。その結果、腫瘍特異的 TCR を有するマウスにもかかわらず、拒絶されずに腫瘍が増大することが判明した。また、Pmel^{+/+}Rag1^{-/-}マウスにおいても同様であることから本マウスモデルにおいて、制御性 T 細胞 (Treg) 生成に依存しない宿主因子の関与が示唆された。さらに当該腫瘍増大に伴う未熟骨髄細胞集団に注目し、Gr1⁺CD11b⁺細胞集団の増加について試験した。その結果、wild type (WT) C57BL/6 マウスおよび Pmel マウスにおいても B16 メラノーマ皮下腫瘍の増大に伴い Gr1⁺CD11b⁺細胞の増加が観察された。生成した Gr1⁺CD11b⁺細胞の一部は腫瘍組織内においても浸潤していることが免疫組織化学法により観察することができた。これらの Gr1⁺CD11b⁺細胞を Pmel マウス由来の活性化型 CD8⁺T 細胞のメラノーマ細胞傷害活性を *in vitro* で抑制することができた。次に、この Gr1⁺CD11b⁺細胞の増加起点を探る目的で、IL-4 もしくは IL-12cDNA を一過性に発現させた B16/F10 細胞を皮下に移植した。その結果、IL-4 発現によって Gr1⁺CD11b⁺細胞集団が顕著に誘導されることが判明した。マウスの遺伝学的背景に注目し、Th2 表現型が誘導されやすい Balb/c マウスに大腸がん細胞株 Colon26 を接種したところ、顕著な Gr1⁺CD11b⁺細胞の増加が観察され、IL-4 発現によってさらに促進された。これらの結果は、腫瘍増大に伴う Gr1⁺CD11b⁺未熟骨髄細胞集団は Th2 型免疫反応によって誘導されやすいことが強く示唆された。

(2) Gr1⁺CD11b⁺MDSCs の腫瘍局所での増数が腫瘍内血管新生と密接に関連することが報告されている。したがって、細胞遊走を誘導するケモカインに着目して腫瘍局所での MDSCs の遊走能を試験した。CXCL17 (DMC/VCC-1) は新規の CXC 型ケモカインであり、約 50 種類のヒトがん細胞株について CXCL17 の mRNA 発現を RT-PCR 法でスクリーニングした結果、乳がん細胞株と大腸がん細胞株において高い頻度で発現していることが判った。NIH3T3 細胞の DMC/VCC-1 過剰発現細胞をマウス皮下に移植した結果、コントロールとして LacZ を発現させた細胞に比べ顕著な造腫瘍性が観察された。また、CXCL17 過剰発現細胞によって形成された腫瘍内部の超音波解析では、LacZ 発現細胞由来の腫瘍よりも血流量が豊富であった。同腫瘍体積時における腫瘍内血管の免疫染色では PECAM-1 陽性血管数が CXCL17 発現細胞由来の腫瘍で顕著に増加していた。さらに免疫組織化学的検討を進めた結果、CXCL17 の高発現において Gr1⁺CD11b⁺細胞の腫瘍内浸潤が多く認められた。これらの結果から、CXCL17 が腫瘍局所に

における MDSCs の走化性因子として働く可能性が考えられた。

(3) Gr1⁺CD11b⁺未熟骨髄細胞集団は少なくとも T 細胞を欠損した免疫不全個体において顕著な増加が観察されるため、SCID マウスの脾臓と骨髄細胞を用いた。その結果、CXCL17 の容量に依存して応答する細胞の殆どは Gr1⁺CD11b⁺陽性 (92%) であり、百日咳毒素 (PTX) による G タンパク質の阻害や CXCL17 の熱変成によってそれらの走化性は完全に阻害することができた。対照実験として、これまで MDSCs の走化性に重要とされているリガンド CCL2 に反応する細胞集団とはその表現型も異なり、CXCL17 応答細胞は好中球様の形態を示すことが判明した。マウスの Gr1⁺CD11b⁺陽性細胞集団はヒト CXCL17 にも同様に応答することも示された。これまでの解析では、CXCL17 はヒト未熟樹状細胞に対して走化性を示すことが報告されてきた。今回、担がんマウスによる実験結果によって、Gr1⁺CD11b⁺未熟骨髄細胞集団が CXCL17 陽性腫瘍に集積し、腫瘍の進展に寄与する構図が想定された。

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) *すべて査読有り。

[雑誌論文] (計 18 件)

- ①. Feng L, Sun X, Csimazmadia E, Han L, Murakami T, Wang X, Robson SC, Wu Y. Vascular CD39/ENTPDI directly promotes tumor cell growth by scavenging extracellular ATP. *Neoplasia* 2011 Mar;13(3):206-16.
- ②. Miyagaki T, Sugaya M, Murakami T, Kadono T, Okochi H, Tamaki K, Sato S. CCL11-CCR3 interaction promotes survival of anaplastic large cell lymphoma cells via ERK1/2 activation. *Cancer Res.* 2011 Mar 15;71(6):2056-65.
- ③. Yamaguchi A, Murakami T, Takahashi M, Kobayashi E, Sugawara Y. Luminescence imaging of regenerating free bone graft in rats. *Plast Reconstr Surg* 2011 Jan;127(1):78-87.
- ④. Sun X, Wu Y, Gao W, Enjoji K, Csizmadia E, Muller CE, Murakami T, Robson SC. Adenosine generation by CD39/ENTPDI on CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cells dampens anti-tumor immunity. *Gastroenterology* 2010; 139 (3):1030-40.
- ⑤. Kimura M, Murakami T, Kizaka-Kondoh S, Itoh M, Yamamoto K, Hojo Y, Takano M, Kario K, Shimada K, Kobayashi E. Functional molecular imaging of

- integrin-linked kinase-Akt/PKB-mediated signaling and associated role of beta-parvin. *J Cell Sci.* 2010; 123: 747-55.
- ⑥. Murai K, Sakai D, Nakamura Y, Nakai T, Igarashi T, Seo N, Murakami T, Kobayashi E, Mochida J. Primary immune system responders to nucleus pulposus cells: evidence for immune response in disc herniation. *Eur Cells Mater.* 2010; 19:13-21.
- ⑦. Kobayashi M, Murakami T, Uchibori R, Chun NAL, Kobayashi E, Morita T, Ozawa K. Establishment and characterization of transplantable luminescence-labeled rat renal cell carcinoma cell lines. *J Urol.* 2010; 183(5): 2029-35.
- ⑧. Iwasaki J, Hata T, Hishikawa S, Fujimoto Y, Uemoto S, Murakami T, Kobayashi E. Use of rat segmental intestine for fetal pancreatic transplantation. *Microsurgery* 2010 May;30(4):296-301.
- ⑨. Ohsawa I, Murakami T, Guo L, Enosawa S, Ishibashi N, Isaji S, Uemoto S, Kobayashi E. Chemopreventive anti-cancer agent acyclic retinoid suppresses allogeneic immune responses in rats. *Int Immunopharmacol.* 2010;10(8):985-9.
- ⑩. Yanagisawa S, Kadouchi I, Yokomori K, Hirose M, Hakozaiki M, Hojo H, Maeda K, Kobayashi E, Murakami T. Identification and metastatic potential of tumor-initiating cells in malignant rhabdoid tumor of the kidney. *Clin Cancer Res.* 2009, 5(9): 3014-22.
- ⑪. Horie M, Sekiya I, Muneta T, Ichinose S, Matsumoto K, Saito H, Murakami T, Kobayashi E. Intra-articular Injected Synovial Stem Cells Differentiate into Meniscal Cells Directly and Promote Meniscal Regeneration Without Mobilization to Distant Organs in Rat Massive Meniscal Defect. *Stem Cells* 2009; 27(4): 878-7.
- ⑫. Kadouchi I, Sakamoto K, Tangjiao L, Murakami T, Kobayashi E, Hoshino Y, Yamaguchi Y. Latexin is involved in bone morphogenetic protein-2-induced chondrocyte differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2009; 378(3): 600-4.
- ⑬. Endo T, Ajiki T, Inoue H, Kikuchi M, Yashiro T, Nakama T, Hoshino Y, Murakami T, Kobayashi E. Implication of a neuropathic pain by enforced stepping exercise with aberrant axonal sprouting through brain-derived neurotrophic factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2009; 381(3):339-44.
- ⑭. Arao Y, Hakamata Y, Igarashi Y, Sato Y, Kayama Y, Takahashi M, Kobayashi E, Murakami T. Characterization of hepatic sexual dimorphism in Alb-DsRed2 transgenic rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2009; 382(1):46-50.
- ⑮. Kawarasaki T, Uchiyama K, Hirao A, Azuma S, Otake M, Shibata M, Tsuchiya S, Enosawa S, Takeuchi K, Konno K, Yoshino H, Hakamata Y, Wakai T, Ookawara S, Tanaka H, Kobayashi E, Murakami T. Profile of new green fluorescent protein (GFP)-transgenic *Jinhua* pigs as an imaging source. *J Biomed Opt.* 2009, Sep-Oct;14(5): 054017.
- ⑯. Hara M, Murakami T, Kobayashi E. *In vivo* bioimaging using photogenic rats: fate of injected bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *J Autoimmun* 2008; 30: 163-171.
- ⑰. Inoue H, Murakami T, Ajiki T, Hara M, Hoshino Y, Kobayashi E. Bioimaging assessment and effect of skin wound healing using bone marrow-derived mesenchymal stromal cells with the artificial dermis in diabetic rats. *J Biomed Opt.* 2008 Nov-Dec; 13(6): 064036.
- ⑱. Murakami T, Sato A, Chun NAL, Hara M, Naito Y, Kobayashi Y, Kano Y, Furukawa Y, Kobayashi E. Transcriptional modulation using HDACi depsipeptide promotes immune cell-mediated tumor destruction of murine B16 melanoma. *J Invest Dermatol* 2008; 28(6): 1506-1516.

[学会発表] (計 15 件)

- ①. Murakami T, Chun ALN, Matsui A, Sato A. Kinetics of brain metastasis in human melanoma cells using the bio-luminescent imaging. 第69回日本癌学会学術総会 大阪 2010年9月22-24日.
- ②. Matsui A, Chun ALN, Murakami T. Human cancer cell lines for in vitro and in vivo bio-luminescence assay. 第69回日本癌学会学術総会 大阪 2010年9月22-24日.
- ③. Ohsawa I, Murakami T, Guo L, Enosawa S, Ishibashi N, Isaji S, Uemoto S,

- Kobayashi E. Chemopreventive anti-cancer agent acyclic retinoid suppresses allogeneic immune responses in rats. 第 69 回日本癌学会学術総会 大阪 2010 年 9 月 22-24 日.
- ④. Masuyama J-I, Iwamoto S, Murakami T, Miyazaki A, Fujita S. Selective expansion of human NK cells from peripheral blood mononuclear cells costimulated with OKT3 and Campath-1H. 第 69 回日本癌学会学術総会 大阪 2010 年 9 月 22-24 日.
- ⑤. Murakami T, Chun AL N Takahashi M. Bio-luminescent imaging and characterization of organ-specific metastasis of human cancer in NOD/SCID mice. 第 16 回日本遺伝子治療学会年次学術集会. 栃木 (宇都宮) 2010 年 7 月 1-3 日.
- ⑥. 村上 孝. 株化ヒトがん細胞を用いた NOD/SCID マウス体内における転移動態の発光イメージング. 第 20 回日本サイトメトリー学会学術集会 (ワークショップ 3 : 生体内イメージングの現状と応用). 東京 (港区 : 東京慈恵医科大学). 2010 年 6 月 27 日.
- ⑦. Miyagaki T, Sugaya M, Kadono T, Murakami T, Okochi H, Tamaki K and Sato S. Eotaxin-CCR3 interaction promotes survival of anaplastic largecell lymphoma cells via ERK1/2 activation. The 70th Society for Investigative Dermatology. Atlanta, GA, May 5-8, 2010.
- ⑧. Murakami T. Bio-luminescent imaging and characterization of organ-specific metastasis of human cancer in NOD/SCID mice. "Reporters, Markers, Dyes, Nanoparticles, and Molecular Probes for Biomedical Applications"; SPIE Photonics West. January 23-28, 2010. San Francisco, CA, USA.
- ⑨. Murakami T. Bio-luminescent imaging and characterization of organ-specific metastasis of human cancer in NOD/SCID mice. The 34th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology. December 4-6, 2009. Fukuoka, Japan.
- ⑩. Murakami T, Chun AL N, Matsui A. Bio-luminescent imaging and characterization of organ-specific metastasis of human cancer in NOD/SCID mice. 第 68 回日本癌学会学術総会 横浜 2009 年 10 月 1-3 日.
- ⑪. Chun AL N, Matsui A, Murakami T. Bio-luminescent imaging of the brain metastasis in a xenogeneic tumor transplantation mouse model. 第 68 回日本癌学会学術総会 横浜 2009 年 10 月 1-3 日.
- ⑫. Matsui A, Chun AL N, Murakami T. Ultrasonographic analysis with Doppler in CXCL17/VCC/DMC-expressing tumor of mice. 第 68 回日本癌学会学術総会 横浜 2009 年 10 月 1-3 日.
- ⑬. Kobayashi M, Murakami T, Uchibori R, Ozawa K, Kobayashi E, Morita T. Establishment and characterization of transplantable luminescence-labeled rat renal cell carcinoma cell lines. 第 68 回日本癌学会学術総会 横浜 2009 年 10 月 1-3 日.
- ⑭. 村上 孝: 光イメージングが開く新しいトランスレーショナル研究・ツール. 教育講演. 第 6 回日本免疫治療学研究会学術集会 2009 年 2 月 21 日東京
- ⑮. Sato A, Murakami T, Kaneko R, Ohtsuki M, Hirabayashi M, Kobayashi E. Telomerase reverse transcriptase transgenic rats develop severe dermatitis. International Investigative Dermatology 2008, Kyoto, May14-17, 2008.

〔図書〕 (計 4 件)

- ①. Murakami T. Transcriptional modulation using histone deacetylase inhibitors for cancer immunotherapy. Chapter 14 in "Experimental and Applied Immunotherapy". Edited by Medin JA & Fower DH. 2010, Nov. 30 (pp 307-322). Humana Press, Springer (New York).
- ②. 村上 孝: 発光・蛍光タンパク質による細胞標識の基本的手法とその応用. Surgery Frontier. 2009. Vol. 16 (3): 97-102.
- ③. 村上 孝: 光イメージングが開く新しいトランスレーショナル・ツール. Medical Tribune. Vol. 42, No. 22: pp 84. 特別企画 p6. 2009 年 5 月 28 日
- ④. 村上 孝: 悪性黒色腫の転写修飾による免疫学的感受性の増強. 医薬の門. 48(4): 106-110, 2008.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村上 孝 (MURAKAMI TAKASHI)
自治医科大学・医学部 准教授
研究者番号 : 00326852