

平成22年5月31日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20790797

研究課題名（和文）免疫不全マウスに移植したヒト悪性黒色腫をもちいた抗腫瘍免疫応答の研究

研究課題名（英文） Research on the anti-tumor immunity against human malignant melanoma transplanted in a immune-deficient mice.

研究代表者 谷岡未樹（TANIOKA MIKI）

京都大学・医学研究科・講師

研究者番号：00402842

研究成果の概要（和文）：申請者は、本研究を通して、免疫不全マウスにヒト悪性黒色腫を移植する実験系を確立した。この系を用いて、ヒト悪性黒色腫患者の免疫細胞のもつ抗腫瘍免疫応答について評価を行った（Tanioka M, et al in preparation）。また、ヒト悪性黒色腫患者の末梢血における制御性T細胞の役割について、詳細に検討した。さらに、申請者は、進行期ヒト悪性黒色腫において、確立された化学療法がないことに着目し、*in vitro*での抗癌剤感受性試験を確立した（Tanioka M, et al. 2010）。

研究成果の概要（英文）：I established a experiment method to transplant human melanoma in immune-deficient mice. In this method, I examined the anti-tumor immunity against human malignant melanoma (Tanioka M, et al). In addition, I studied the role of regulatory T cells in peripheral blood mononuclear cells of patients with malignant melanoma. I also established the in vitro method to evaluate chemosensitivity of melanoma to anti-cancer drugs.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：悪性黒色腫、腫瘍免疫、制御性T細胞、抗癌剤感受性試験

## 1. 研究開始当初の背景

悪性黒色腫は治療法が乏しい疾患であり、その免疫応答については詳細が不明であった。これまで、制御性T細胞のマスタ-遺伝子はFOXP3遺伝子とされており、抗腫瘍免疫抑制に関してもFOXP3陽性細胞が重要な抑制機能を有していると考えられてきた。我々は、FOXP3遺伝子の発現レベルによりその機能に差があるのではないかと考えた。また、悪性黒色腫に対する有効な化学療法が確立されていない現実がある。元来、放射線治療に対する感受性が乏しいことに加えて、進行期の悪性黒色腫に対して、選択できる化学療法がないので、患者に勧めるべき治療法の選択が難しい状況であった。また、皮膚悪性腫瘍は消化器癌や乳癌に比べて稀な疾患であるため大規模臨床試験が組みにくく、エビデンスの高い治療方法は確立されていない。

悪性黒色腫にもっとも有効とされているダカルバジンは生体内で分解されることにより抗腫瘍効果を発揮する薬剤であるため、*in vitro*の系では評価不能であり、よりヒト生体内に近い評価系が必要であると認識した。さらに、申請者は抗腫瘍免疫を抑制している制御性T細胞の役割に着目し、抗腫瘍免疫そのものを増強させるのではなく、抗腫瘍免疫を制御する機構に着目した進行期皮膚悪性腫瘍に対する治療法が開発可能であると着想した。

## 2. 研究の目的

悪性黒色腫に対する免疫応答を制御性T細胞に着目して検討する。さらに、悪性黒色腫に対する抗癌剤感受性試験を*in vitro*の方法で確立することを目的とした。

## 3. 研究の方法

患者の末梢血および腫瘍から制御性T細胞を抽出しその機能解析をおこなった。FOXP3陽性の細胞は制御性T細胞と考えられており、これまでさまざまな癌種で、担癌患者においては末梢血でも腫瘍周囲においても、その陽性細胞が増加することが知られていた。我々は、FOXP3の発現レベルにより、制御性T細胞の分画をさらに細分化して評価することにより、FOXP3陽性細胞がすべて制御性T細胞でない可能性を検討した。

さらに、collagen droplet drug sensitivity test (CD-DST)法をもちいて、*in vitro*での抗癌剤感受性試験を立ち上げた。

ヒト悪性黒色腫は培養することが難しい腫瘍であるため、コラーゲンゲルの足場の中で初代培養を行うことで、その培養成功率を高めようと考えた。さらに、抗癌剤の濃度系列

と比較し、最適な抗癌剤の投与量を推定するとともに、特殊な画像処理を用いて、生きた細胞のみを検出することで正確な感受性を導きだそうとした。

## 4. 研究成果

ヒト悪性黒色腫に対する*in vitro*での抗癌剤感受性試験を確立した。現在、本邦で使用されている代表的な抗癌剤はダカルバジン、塩酸ニムスチン、ビンクリスチンである。しかし、悪性黒色腫にもっとも有効とされているダカルバジンは生体内で分解されることにより抗腫瘍効果を発揮する薬剤であるため、*in vitro*の系では評価不能であり、よりヒト生体内に近い評価系が必要であると判明した。さらに、代表的な薬剤の他にアドリアマイシンやシスプラチンについても評価を行ったが、悪性黒色腫は非常に抗癌剤に対する感受性が低く、どの薬剤も残念ながら、効果があるとは判定できなかった。また、ある抗癌剤を使用後に再発した悪性黒色腫は、その抗癌剤に対して耐性を確立していた。このことは、悪性黒色腫が抗癌剤感受性が低いだけでなく、抗癌剤の耐性を化新たに獲得する能力が高い腫瘍であることを意味している。

抗腫瘍免疫については、制御性T細胞のステージごとの変化を患者で明らかにした。患者の末梢血および腫瘍局所において、FOXP3陽性の制御性T細胞の割合が増加していることを明らかにした。さらに、この傾向は臨床病期が進行するにつれ顕著になった。

これまでFOXP3は制御性T細胞のマスタ-遺伝子と考えられており、その発現を認めることはすなわちその細胞が制御性T細胞であると考えられてきた。しかし、FOXP3陽性細胞を、その発現レベルにより4つにわけて検討したところ、FOXP3陽性細胞の中には、制御性T細胞以外にもエフェクター細胞などのさまざまな機能を持つ細胞群が混在している可能性が示唆された。

ヒト正常細胞の移植が可能な重症免疫不全マウス(NOD/shi-*scid*, IL-2Ry<sup>null</sup>, 以下NOGマウス。)に、ヒト悪性黒色腫を移植することが可能であることを確認した。申請者は、患者ごとにこのモデルマウスを作成することにより、皮膚悪性腫瘍に対する治療効果をオーダーメイドに評価することができる実験系を確立することを目指している。また、この系を用いて、患者ごとに、悪性黒色腫に対する免疫応答をマウスの中で再現することを可能にした。

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 1 件)

- ① Hayashi Y, Tanioka M, Kore-eda S, Utani A, Miyachi Y. (Corresponding author) MM derived from CIN ***Clin Exp Dermatol in press*** 査読有
- ② Tanioka M, et al. Evaluation of the chemosensitivity of primary cultured malignant melanoma cells using the collagen gel droplet-embedded culture drug sensitivity test. ***Experimental and Therapeutic Medicine*** 2010. 査読有
- ③ Minato H, Nishikiori M, Tanioka M, Miyachi Y, Utani A. Scleroderma with diffuse pigmentation. ***J Eur Acad Dermatol Venereol*** 24(1): 100-1, 2010. 査読有
- ④ Utani A, Tanioka M, Yamamoto Y, Taki R, Araki E, Tamura A, Miyachi Y. Relationship between the distribution of pseudoxanthoma elasticum skin and mucous membrane lesions and cardiovascular involvement ***J Dermatol*** 37: 130-136, 2010. 査読有
- ⑤ Tanioka M, Aya Miyagawa-Hayashino, Toshiaki Manabe, Toichi E, Miyachi Y, Takahashi K. Circumscribed palmar or plantar hypokeratosis: a disease with two subtypes. ***J Invest Dermatol*** 129(4): 1045-7, 2009. 査読有
- ⑥ Tanioka M, Miyachi Y. Camouflage for vitiligo (Review Article) ***Dermatol ther*** 22(1): 90-93, 2009. 査読有
- ⑦ 10, Tanioka M, Takahashi K, Miyachi Y. Narrow band ultraviolet B therapy for inflammatory vitiligo with raised borders associated with Sjogren syndrome. ***Clin Exp Dermatol*** 34(3): 418-20, 2009. 査読有
- ⑧ Tanioka M, Yamada H, Doi M, Bando H, Yamaguchi Y, Nishigori C, Okamura H. Molecular clocks in mouse skin. ***J Invest Dermatol*** 129(5): 1225-31, 2009. 査読有
- ⑨ Tanioka M, Matsumura Y, Utani A, Tanaka M, Miyachi Y. Occupation-related pigmented macules on the sole with parallel-ridge pattern on dermatoscopy. ***Clin Exp Dermatol*** 34(5): e31-3, 2009. 査読有
- ⑩ Tanioka M, Yamamoto Y, Kato M, Takahashi K, Miyachi Y. Vitiligo vulgaris and autoimmune diseases in Japan: a report from Vitiligo Clinic in Kyoto University Hospital. ***Dermato-Endocrinology*** 1(1): 43-5, 2009. 査読有
- ⑪ Tanioka M, Maruta N, Nakagawa Y, Nakanishi G. Pigmented wart due to human papilloma virus type 60 showing parallel ridge pattern in dermoscopy ***Euro J Dermatol*** 19(6): 523-4, 2009. 査読有

⑫ Michigami M, Tanioka M, Nakamura M, Miyagawa-Hayashino A, Manabe T, Utani A, Miyachi Y. (Corresponding author) Pruritic red papules on the knees. ***Clin Exp Dermatol*** 34(6): 739-40, 2009.

査読有

⑬ Funabiki M, Tanioka M, Araki E, Miyachi Y, Utani A. Sudden onset of calciphylaxis: painful violaceous livedo in a patient with peritoneal dialysis. ***Clin Exp Dermatol*** 34(5): 622-4, 2009.

査読有

⑭ Endo Y, Tanioka M, Kore-eda S, Utani A, Miyachi Y. (Corresponding author) Splenic actinomycosis presenting as subcutaneous abscess.

***Eur J Dermatol*** 19(5): 523-4, 2009.

査読有

⑮ Kobashi-Katoh R, Tanioka M, Takahashi K, Miyachi Y. (Corresponding author) Skin metastasis of prostate cancer to glans penis showing no correlation with serum prostate-specific antigen level.

***J Dermatol*** 36(2): 106-8, 2009. 査読有

⑯ Funabiki M, Tanioka M, Araki E, Miyachi Y, Utani A. Anetoderma accompanying microscopic panniculitis in a patient with antiphospholipid syndrome and systemic lupus erythematosus.

***Clin Exp Dermatol*** 34(2): 259-61, 2009.

査読有

⑰ Araki E, Momota Y, Togo T, Tanioka M, Hozumi K, Nomizu M, Miyachi Y, Utani A. Clustering of syndecan-4 and integrin beta1 by laminin alfa3 chain-derived peptide promotes keratinocyte migration. ***Mol Biol Cell*** 20(13): 3012-24, 2009.

査読有

⑱ Miyagawa-Hashimoto A, Matsumura Y, kawakami F, Asada H, Tanioka M, Yoshizawa A, Mikami Y, Kotani H, Nakashima Y, Miyachi Y, Manabe T.

High ration of IgG4-positive plasma cell infiltration in cutaneous plasmacytosi – is this a cutaneous manifestation of IgG4-related disease.

***Hum Pathol*** 40(9):1269-77, 2009.

査読有

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

谷岡未樹 (TANIOKA MIKI)  
京都大学・医学研究科・講師  
研究者番号：00402842