

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03147

研究課題名(和文) ケモカイン受容体を標的とした犬の皮膚T細胞リンパ腫に対する革新的治療法の開発

研究課題名(英文) Development of Innovative Therapy for Canine Cutaneous T-Cell Lymphoma by Targeting Chemokine Receptors

研究代表者

前田 貞俊 (Maeda, Sadatoshi)

岐阜大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：50377694

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：犬の皮膚T細胞リンパ腫(CTCL)病変部のクローン解析から、皮膚以外の部位で不均一なクローン性が生じており、腫瘍細胞が全身に遊走している可能性が示された。CCR4またはCCR7遺伝子をノックアウトしたE0-1をマウスに移植したところ、皮膚結節および全身転移が抑制された。さらに、CCL17、CCL19、CCL21またはCCL22はE0-1の増殖を促進し、CCR4またはCCR7のノックアウトによってこれらの促進効果は消失した。以上の結果から、CCR4とCCR7は腫瘍細胞の遊走のみならず増殖も促進することが明らかとなり、犬CTCLの治療標的分子として有用であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ケモカインはヒトと同様に犬CTCLにおいても重要であることが明らかとなり、ケモカインに着目したヒトCTCLの新規診断または治療法開発において犬が有用な動物モデルであることが示された。また、CCR4のみならずCCR7も病態に関与していること、腫瘍細胞の遊走のみならず増殖にも関与していることなどが明らかとなり、治療標的分子として重要であることが示された。

研究成果の概要(英文)：Clonality analysis of canine cutaneous T-cell lymphoma (CTCL) lesions showed that heterogeneous clonality occurred outside the skin, indicating that tumor cells may be migrating systemically. Transplantation of E0-1 with knockout of the CCR4 or CCR7 genes into mice resulted in suppression of skin nodules and systemic metastasis. Furthermore, CCL17, CCL19, CCL21 or CCL22 promoted E0-1 proliferation, and knockout of CCR4 or CCR7 abolished these promoting effects. These results indicate that CCR4 and CCR7 promote not only tumor cell migration but also proliferation and are useful as therapeutic target molecules for canine CTCL.

研究分野：皮膚免疫

キーワード：皮膚リンパ腫 ケモカイン

1. 研究開始当初の背景

犬の皮膚T細胞リンパ腫(CTCL)においては、真皮で増殖した上皮性リンパ球(CTCL細胞)が表皮浸潤することによって重度のびらんが形成される(図1)。本疾患は皮膚に病変が形成されるが、全身臓器への転移を生じることから、外科治療の対象とならない。治療は既存の化学療法に依存しているのみで、病態に基づいた新規治療法開発の試みは皆無である。そのため、一般的なリンパ腫の平均生存期間が1年以上であるのに対し、CTCLは約3ヶ月と悪性度が極めて高い。この悪性度の高さはびらんによる感染や全身転移による多臓器不全に起因している。応募者がこれまでに行った犬アトピー性皮膚炎に関する研究結果から、炎症細胞は表皮由来ケモカインによって皮膚病変部へ誘導されており、ケモカインやケモカイン受容体が新規診断および治療法を確立する上での標的分子になることが明らかとなった(*Vet. Dermatol.* 28、16-e5、2017)。このように、細胞の皮膚への遊走はケモカインによって厳密に規定されているが、腫瘍細胞も例外ではない。すなわち、CTCL悪性度の二大要因である腫瘍細胞の表皮浸潤と全身転移はケモカインを介した細胞遊走を制御することによって克服可能と考え、一連の研究を実施してきた。CTCL自然発症例の網羅的遺伝子転写解析の結果、表皮浸潤と全身転移に関わるケモカイン受容体としてCCR4およびCCR7が関与していることが明らかとなった(*Vet. Immunol. Immunopathol.* 144、329-336、2011、*Vet. Dermatol.* 24、628-631、2013)。また、病態のさらなる解明を目的として、自然発症例よりCTCL細胞の株化を試み、これに成功した。確立した株化細胞(E0-1)の網羅的遺伝子転写解析の結果、その他の犬リンパ腫由来細胞株(CLKおよびUL-1)に比べて、CCR4およびCCR7の遺伝子転写量が有意に高値を示すことが明らかとなった(*J. Dermatol. Sci.* 88、254-256、2017)。さらに、本細胞株をNOD SCIDマウスに移植すると皮膚病変および全身転移を発症し、CTCL自然発症例と同様の表現型を示したことから(*Vet. Dermatol.* 29、517-e172、2018)(図2)、CCR4およびCCR7の機能を阻害できれば、びらんおよび転移を抑制できると考え、一連の研究を行った。

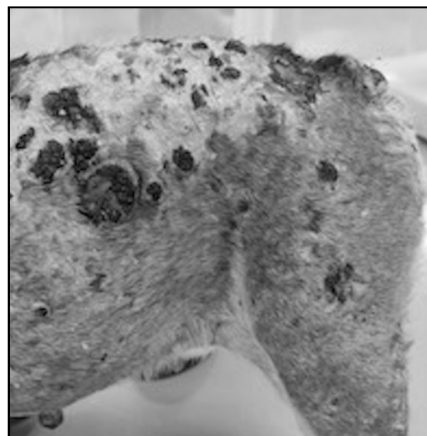


図1 症例外貌

2. 研究の目的

CTCLにおけるCCR4およびCCR7の役割を明らかにし、阻害による治療効果を評価すること。

3. 研究の方法

(1)犬CTCL皮膚病変部におけるクローン性解析

CTCLと診断した犬8頭から採取した25個のホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)病変部皮膚組織を使用した。TCR遺伝子を増幅するため、FFPE病変皮膚組織から抽出したゲノムDNAを鋳型としたPCRを行い、キャピラリー電気泳動によりPCR産物を解析した。

(2)発現解析用CCR7抗体の交差性

犬CCR7を恒常的に発現するNIH3T3細胞を用いて、市販されている抗ヒトまたは抗マウスCCR7抗体の犬CCR7に対する交差性を評価した。

(3)治療用CCR4抗体の交差性

犬CCR4を恒常的に発現するNRK細胞および犬のPBMCを用いて、ヒト治療用CCR4抗体(Mogamulizumab)の犬CCR4に対する交差性を評価した。

(4)犬CCL19-ヒトIgG-Fc融合蛋白(cCCL19-hIgG-Fc)の作製

イヌ全長CCL19 cDNAをpCAG-Neo hIgG1-Fc vectorに挿入し、HEK293A細胞にトランスフェクトした。培養上清からcCCL19-hIgG-Fcを回収し、犬CCR7を恒常的に発現するNIH3T3細胞のほか、CCR7の転写量の異なる3つの細胞株(E0-1、CLCおよびUL-1)を用いて、犬CCR7に対する特異性を評価した。

(5)CCR4およびCCR7ノックアウトE0-1細胞の作製

CRISPR/Cas9を用いてE0-1におけるCCR4またはCCR7遺伝子をノックアウトした。ノックアウト細胞のみをセルソーターによって選出し、ノックアウト細胞の割合が99%以上になるまで培養を継続した。

(6)CCR4 および CCR7 ノックアウト E0-1 細胞の移植

8 週齢の NOD SCID マウスの大腿部皮下に、野生型、CCR4 または CCR7 ノックアウト E0-1 を移植した。8 週間後に剖検して、各マウスにおける病変分布を評価した。さらに、マウス CCL17、CCL19、CCL21 または CCL22 の存在下における野生型、CCR4 または CCR7 ノックアウト E0-1 の増殖活性についても評価した。

4 . 研究成果

(1)皮膚病変部におけるクローン性解析

1 頭においては全てが同一であり (図 2-a)、4 頭において同一および不同が混在し (図 2-b)、3 頭においては全てのクローン性パターンが不同であり (図 2-c)、いずれの皮膚病変においても *rag1* mRNA は検出されなかった (図 3)。これらの結果から、犬 CTCL では皮膚以外の部位で不均一なクローン性が生じており、腫瘍細胞が全身に遊走している可能性が示された。

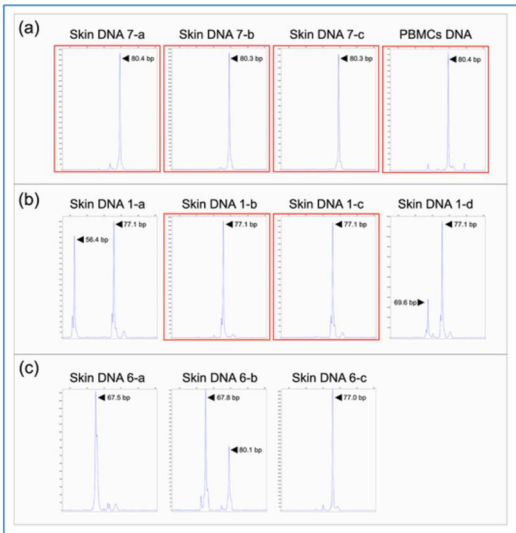


図 2 病変部におけるクローン性パターン



図 3 病変部における *rag1* mRNA の転写
1 : 陽性対照 ; 2-9 : 症例病変部

(2)解析用 CCR7 抗体の交差性

いずれの抗体も犬 CCR7 に対する交差性を示さなかった (図 4)。

(3)治療用 CCR4 抗体の交差性

いずれの細胞に発現する犬 CCR4 も認識しなかった (図 5)。

(4)犬 CCL19-ヒト IgG-Fc 融合蛋白(cCCL19-hIgG-Fc)の作製

培養上清から分子量約 37,000 の cCCL19-hIgG-Fc を精製した(図 6-a)。cCCL19-hIgG-Fc は CCR7 を恒常的に発現する NIH3T3 を認識したほか(図 6-b)、CCR7 の転写量依存的 (図 7-a) に E0-1 および CLC を認識したことから (図 7-b)、犬 CCR7 の検出に有用であることが示された。

Clone	Target species	Host species	Immunogen homology to canine CCR7	Source	Validation method	Cross-reactivity
Y59	Human	Rabbit	94.4%	Abcam, Cambridge, U.K.	ICC WB IA	N
4B12	Mouse	Rat	87.6%	BioLegend, San Diego, CA, U.S.A.	FCM	N
150503	Human	Mouse	91.0%	R&D Systems, Minneapolis, MN, U.S.A.	FCM	N
SR36-04	Human	Rabbit	87.1%	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, U.S.A.	ICC WB	N
Polyclonal	Human	Rabbit	96.3%	Abcepta, San Diego, CA, U.S.A.	FCM WB	N
Polyclonal	Mouse	Rabbit	88.6%	Bioss, Woburn, MA, U.S.A.	FCM WB	N

ICC: Immunocytochemistry, WB: Western blotting, IA: Inhibition assay, FCM: Flow cytometry, N: Negative

図 4 市販 CCR7 抗体の交差性

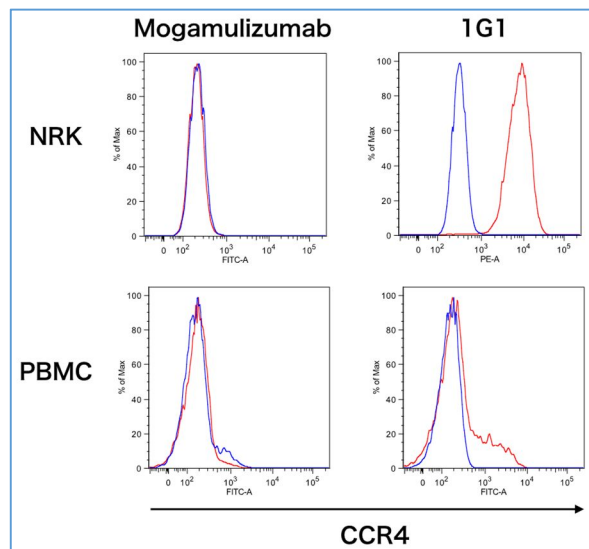


図 5 治療用 CCR4 抗体(Mogamulizumab)の交差性
1G1:陽性対照

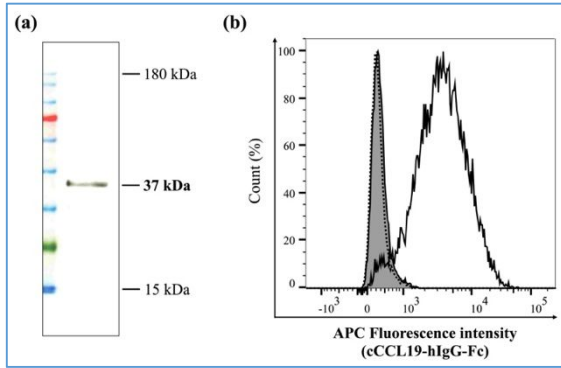


図 6 cCCL19-hlgG-Fc の作製

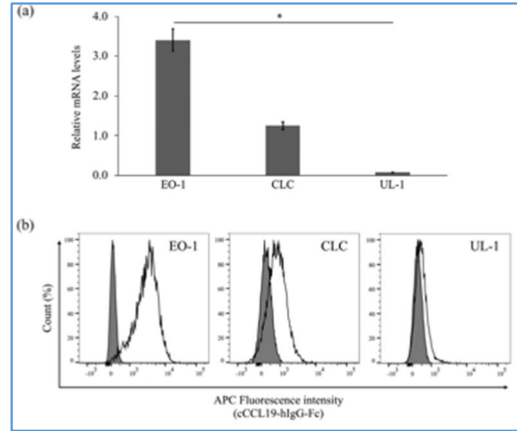


図 7 cCCL19-hlgG-Fc による犬 CCR7 の検出

(5) CCR4 および CCR7 ノックアウト EO-1 細胞の作製
 ノックアウト細胞の培養継続によって、99%以上の細胞が CCR4 または CCR7 発現陰性を示した (図 8)。

(6) CCR4 および CCR7 ノックアウト EO-1 細胞の移植
 CCR4 または CCR7 をノックアウトした EO-1 を移植したマウスにおいては全身播種が有意に抑制された (図 9)。また、移植部位における皮下結節の形成も有意に抑制された (図 10)。さらに、CCL17、CCL19、CCL21 または CCL22 は EO-1 の増殖を促進し (図 11-a)、CCR4 (図 11-b) または CCR7 (図 11-c) のノックアウトによってこれらの促進効果は消失した (図 11)。以上の結果から、CCR4 と CCR7 は腫瘍細胞の遊走のみならず増殖も促進することが示唆された。したがって、CCR4 および CCR7 は犬 CTCL の治療標的分子として有用であること示された。

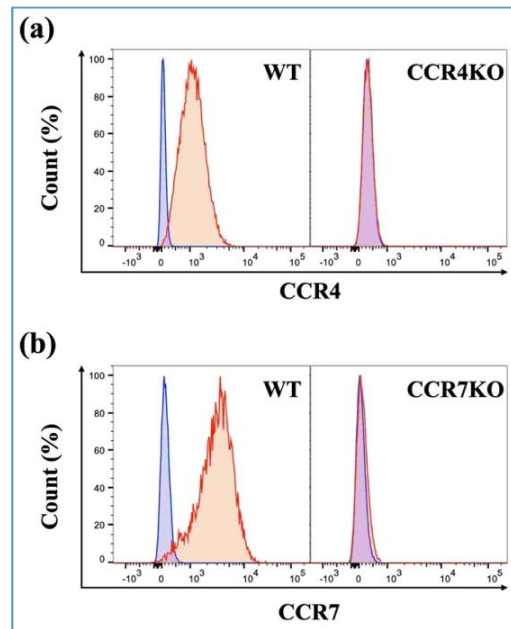


図 8 CCR4 および CCR7 ノックアウト EO-1 細胞の作製

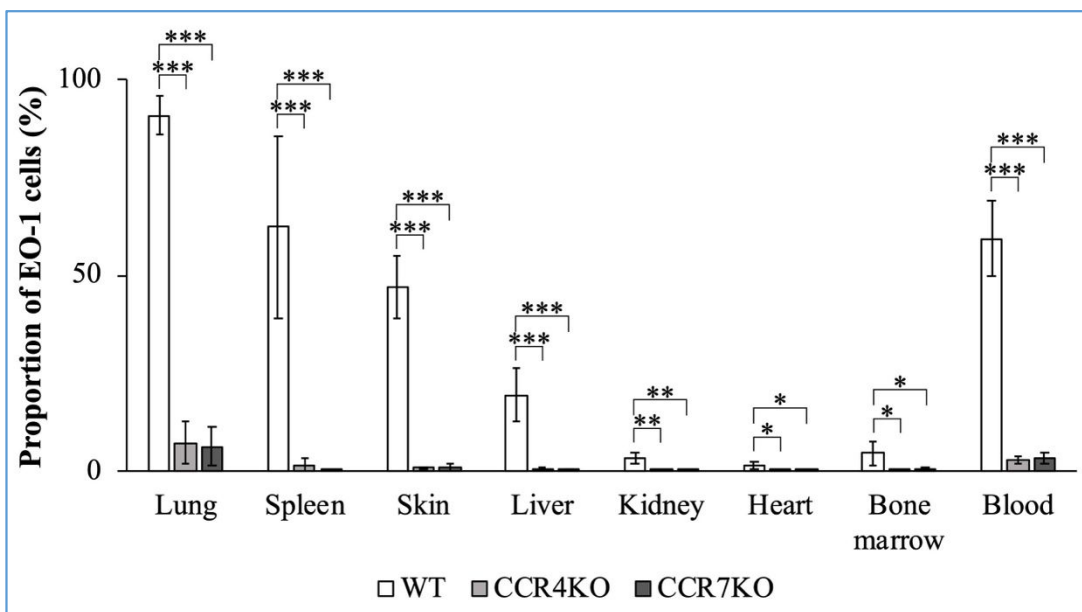


図 9 野生型、CCR4 ノックアウトまたは CCR7 ノックアウト EO-1 細胞を移植したマウスの各臓器における EO-1 細胞の割合

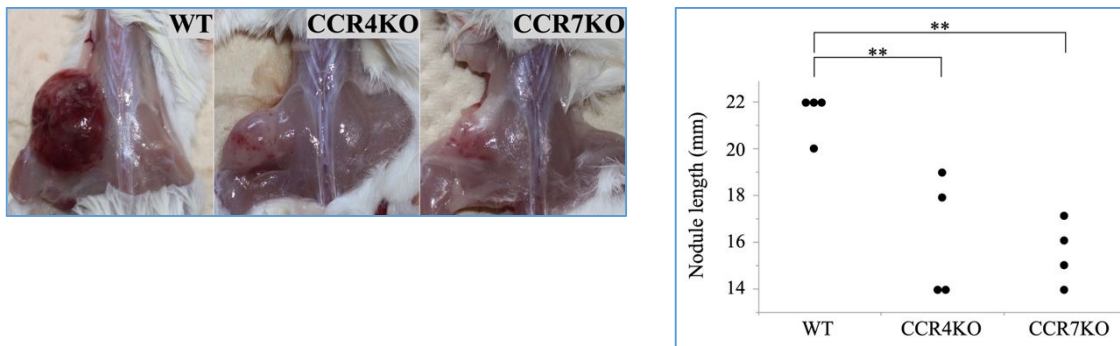


図10 野生型、CCR4 ノックアウトまたは CCR7 ノックアウト E0-1 細胞を移植したマウスにおける皮膚結節の大きさ

<引用文献>

Asahina R, Maeda S. A review of the roles of keratinocyte-derived cytokines and chemokines in the pathogenesis of atopic dermatitis in humans and dogs. *Vet Dermatol* 2017;28:16-e15.

Chimura N, Iio A, Ozaki E, Mori T, Ito Y, Murayama N *et al*. Transcription profile of chemokine receptors, cytokines and cytotoxic markers in peripheral blood of dogs with epitheliotropic cutaneous lymphoma. *Vet Dermatol* 2013;24:628-631, e155.

Chimura N, Kondo N, Shibata S, Kimura T, Mori T, Hoshino Y *et al*. Gene transcription analysis in lesional skin of canine epitheliotropic cutaneous lymphoma using quantitative real-time RT-PCR. *Vet Immunol Immunopathol* 2011;144:329-336.

Hara K, Iio A, Asahina R, Takahashi M, Mori T, Nishida H *et al*. Characterization of a novel canine T-cell line established from a dog with cutaneous T-cell lymphoma. *J Dermatol Sci* 2017;88:254-256.

Ikeuchi M, Asahina R, Nishida H, Kamishina H, Kitoh K, Sakai H *et al*. Phenotypic analysis of mice xenografted with canine epitheliotropic cutaneous T-cell lymphoma cells. *Vet Dermatol* 2018;29:517-e172.

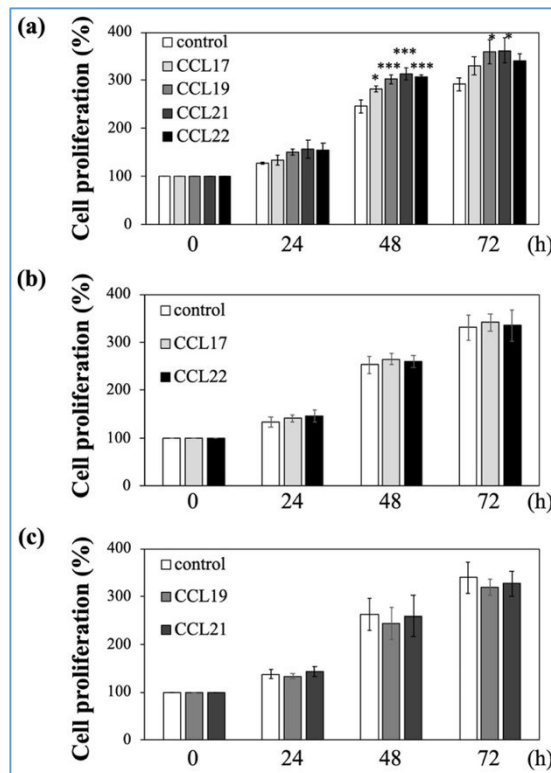


図11 CCR4またはCCR7をノックアウト CCR4およびCCR7ノックアウト E0-1細胞を移植したマウス皮膚結節の大きさ

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 KANEI Toshitaka, IWATA Munetaka, KAMISHINA Hiroaki, MIZUNO Takuya, MAEDA Sadatoshi	4. 巻 84
2. 論文標題 Expression and functional analysis of chemokine receptor 7 in canine lymphoma cell lines	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 25 ~ 30
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1292/jvms.21-0468	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 0件）

1. 発表者名 金井 俊貴、村上 麻美、岩田 宗峻、神志那 弘明、前田 貞俊
2. 発表標題 犬の上皮向性皮膚T細胞性リンパ腫におけるクローン性解析
3. 学会等名 第164回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------