

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 20 日現在

機関番号：12601
 研究種目：研究活動スタート支援
 研究期間：2010～2011
 課題番号：22890044
 研究課題名（和文） 皮膚悪性リンパ腫におけるケモカイン、ケモカインレセプターの関与の検討
 研究課題名（英文） Investigation of involvement of chemokines and chemokine receptors in cutaneous lymphoma
 研究代表者
 宮垣 朝光 (MIYAGAKI TOMOMITSU)
 東京大学・医学部附属病院・助教
 研究者番号：50582003

研究成果の概要（和文）：CCL11 は CCR3 を発現している皮膚原発未分化大細胞型リンパ腫の腫瘍細胞と結合し、ERK1/2 のリン酸化を介して、その生存、増殖を促していた。CCL11 と CCR3 の結合を阻害することは、皮膚原発未分化大細胞型リンパ腫において新たな治療の選択肢になりうることを示唆された。また、菌状息肉症、セザリー症候群の病変部皮膚、血中では CCL20、CCL18 の発現が上昇しており、共にそれらのリンパ腫の重症度を反映しているマーカーと相関が見られた。

研究成果の概要（英文）：CCL11-CCR3 interactions induce cell survival and proliferation of CCR3+ anaplastic large cell lymphoma cells through constitutive phosphorylation of ERK1/2. Interactions of CCL11 and CCR3 may be a promising target for the development of future therapies for anaplastic large cell lymphoma. CCL20 and CCL18 expression is elevated in lesional skin and serum of mycosis fungoides and Sezary syndrome, and they correlated with disease severity markers of these diseases.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,230,000	369,000	1,599,000
2011 年度	1,130,000	339,000	1,469,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,360,000	708,000	3,068,000

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：皮膚悪性リンパ腫、CCL11、オートクリン、cell survival、CCL20、CCL18、disease marker、微小環境

1. 研究開始当初の背景

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、特に頻度の高い皮膚 T 細胞リンパ腫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。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、様々なサイトカインやケモカインがその病態に関与している。特に、リンパ球の遊走を促す液性因子であるケモカインがその受容体を持つ腫瘍細胞を皮膚に遊走させており、そのため腫瘍細胞が皮膚という特定の臓器にのみ限局していると考えられている。また、ケモカインによる腫瘍細胞の遊走といった直接作用のみならず、ケモカインとその受容体は Th1 や Th2 細胞の浸潤を制御することによって、リンパ腫周囲の微小環境をリンパ腫の増殖に適するように調整している可能性も示されている。さらに、近年、ケモカインは遊走作用以外に抗アポトーシス作用を有することが報告されている。これらのことからケモカインとケモカインレセプターは皮膚悪性リンパ腫の治療のターゲットとして有望視されている。

2. 研究の目的

前述のとおり、皮膚 T 細胞リンパ腫に対する治療は確立していない。本研究の目的は、臨床検体を用いた皮膚悪性リンパ腫の病変部における種々のケモカインとそのレセプターの発現の検討、およびヒトやマウスのリンパ腫細胞株とレコンビナントのケモカインを用いた *in vivo*、*in vitro* での遊走、細胞増殖、アポトーシス、細胞内シグナル、蛋白発現などの検討を行うことにより、ケモカインの皮膚 T 細胞リンパ腫における役割を明確にし、皮膚 T 細胞リンパ腫に対する新規治療法に結び付けることである。

3. 研究の方法

(1) CCR3 陽性の皮膚原発未分化大細胞型リンパ腫に対するそのリガンドである CCL11 の影響に関する検討

- ① CCR3 陽性のマウスのリンパ腫の細胞株である EL-4 細胞およびヒトの未分化大細胞型リンパ腫の細胞株である Ki-JK 細胞を、それぞれ CCL11 で刺激し、flow cytometry にて細胞の生存率を、細胞数を計測し増殖率を検討した。
- ② EL-4 細胞、Ki-JK 細胞を CCL11 で刺激したのち、タンパクを回収し、Western blot 法を施行し、CCL11 によるシグナル伝達系を検討した。細胞内 flow cytometry にてシグナル伝達系の検討を行った。さらに、シグナル阻害剤を用いて、CCL11

の CCR3 に対する影響を検討した。

- ③ B6 マウス、SCID マウスを使用して、*in vivo* における EL-4 細胞、Ki-JK 細胞の成長における CCL11 の影響を検討した。マウスを 2 群に分け、腹部を剃毛した。一方の群には EL-4 細胞あるいは Ki-JK 細胞を PBS に懸濁させ皮膚に注射し (以降 PBS 群と称す)、他方の群には前述の溶液に CCL11 を溶解したものを皮膚に注射した (以降 CCL11 群と称す)。細胞株を皮膚に注射した日を day 0 とした。以後、day 3、7、10、14 に PBS 群では PBS を、CCL11 群では CCL11 を同部位に注射した。腫瘍の大きさは day 3、7、10、14、17 に長径、短径を測定し、その積で判定した。
- ④ Ki-JK 細胞を CCL11 で刺激したのち、タンパクを回収し、Western blot 法を施行し、抗アポトーシス蛋白の発現を検討した。また、実際の皮膚原発未分化大細胞型リンパ腫の病変部皮膚の免疫組織化学染色にてもそれらの発現を検討した。

(2) 皮膚 T 細胞リンパ腫 (菌状息肉症、セザリー症候群) における CCL20 の関与の検討

- ① 皮膚 T 細胞リンパ腫 (菌状息肉症、セザリー症候群) の患者の血清及び病変部皮膚組織を用いて、ELISA 法、quantitative RT-PCR 法、免疫組織化学染色にて、CCL20 及びその誘導因子である IL-17、IL-22 の発現を検討した。また、同時に陽性対照として、乾癬患者の病変部皮膚組織を用いた。
- ② 血清中 CCL20 値と種々の臨床データとの相関について検討を加えた。

(3) 皮膚 T 細胞リンパ腫 (菌状息肉症、セザリー症候群) における CCL18 の関与の検討

- ① 皮膚 T 細胞リンパ腫 (菌状息肉症、セザリー症候群) の患者の血清及び病変部皮膚組織を用いて、ELISA 法、quantitative RT-PCR 法、免疫組織化学染色にて、CCL18 の発現を検討した。
- ② 血清中 CCL18 値と種々の臨床データ、サイトカイン値、ケモカイン値との相関について検討を加えた。

4. 研究成果

(1) CCR3 陽性の皮膚原発未分化大細胞型リンパ腫に対するそのリガンドである CCL11 の影響に関する検討

- ① CCL11はKi-JK細胞の無血清下での生存率を上昇させ、EL-4細胞の増殖を促した。

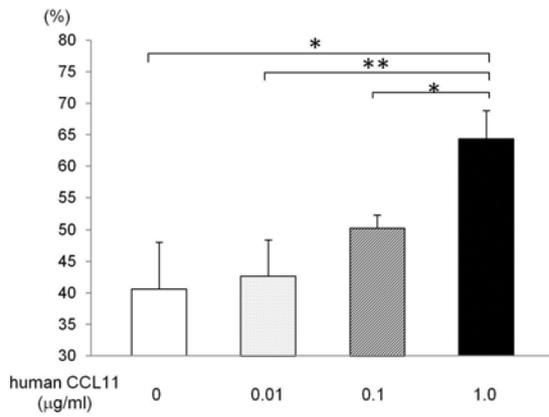


図1. Ki-JK細胞の生存率

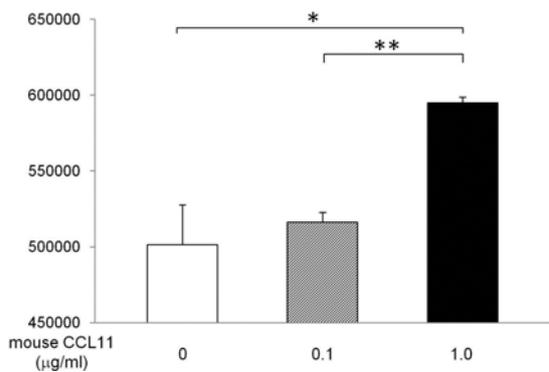


図2. EL-4細胞数

- ② Ki-JK細胞、EL-4細胞双方において、CCL11はERK1/2のリン酸化を誘導しており、それらの阻害剤を用いることによって、CCL11のKi-JK細胞、EL-4細胞への影響は抑制された。

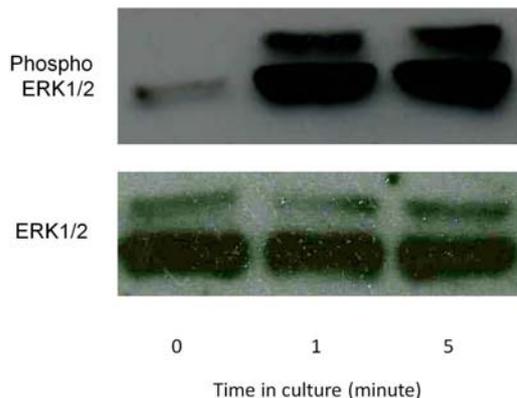


図3. Ki-JK細胞におけるERK1/2のリン酸化

- ③ CCL11はin vivoにおいても、EL-4細胞、Ki-JK細胞の腫瘍形成を促進した。また、それらの影響はERK1/2の阻害剤やCCL11

に対する中和抗体によって、抑制されることが確認された。

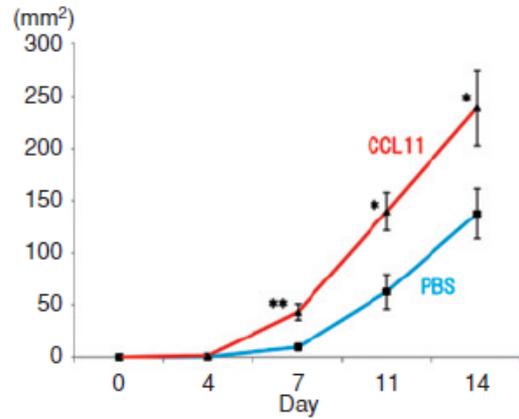


図4. In vivoでのEL-4細胞の腫瘍形成に対するCCL11の影響

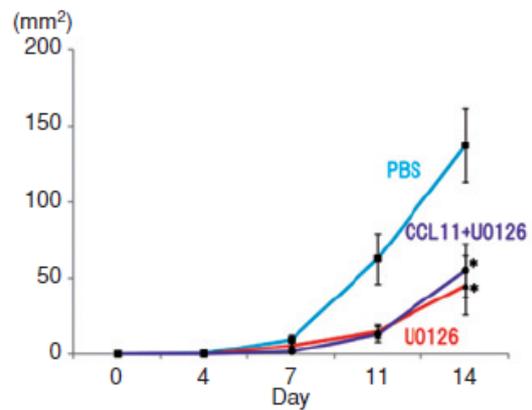


図5. In vivoでのEL-4細胞の腫瘍形成に対するERK1/2阻害剤U0126の影響

- ④ EL-4細胞ではCCL11刺激により、抗アポトーシス蛋白であるBcl-xL、サバイビンの発現が上昇し、実際の皮膚原発未分化大細胞型リンパ腫の腫瘍細胞でもそれらの発現が確認された。

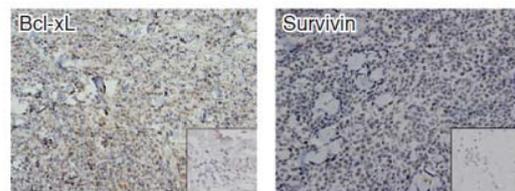


図6. 皮膚原発未分化大細胞型リンパ腫の腫瘍細胞におけるBcl-xL、サバイビンの発現

以上①～④の結果より、CCL11はCCR3を発現している皮膚原発未分化大細胞型リンパ腫の腫瘍細胞と結合し、ERK1/2のリン酸化、

Bcl-xL、サバイビンの発現上昇を介して、その生存、増殖を促していると考えられた。その結果として、CCL11 と CCR3 の結合を阻害することは、皮膚原発未分化大細胞型リンパ腫において新たな治療の選択肢になりうることが示唆された。

(2) 皮膚 T 細胞リンパ腫 (菌状息肉症、セザリー症候群) における CCL20 の関与の検討

① 皮膚 T 細胞リンパ腫 (菌状息肉症、セザリー症候群) の血清中、病変部皮膚組織において、CCL20 及びその誘導因子である IL-22 の発現は上昇していたが、同様に誘導因子である IL-17 の発現は上昇していなかった。

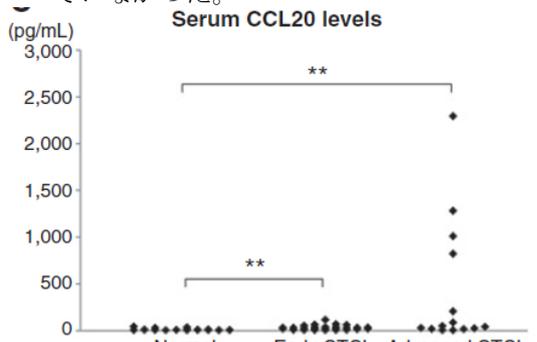


図 7. 早期、進行期の皮膚 T 細胞リンパ腫 (CTCL) の血清中 CCL20 値

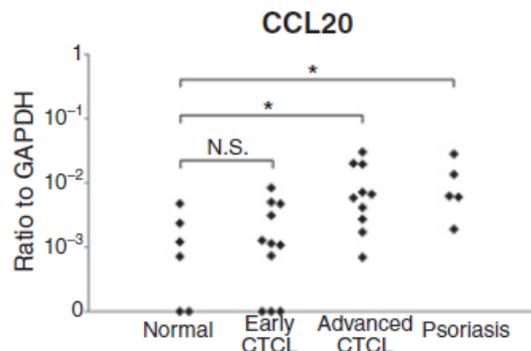


図 8. 早期、進行期の皮膚 T 細胞リンパ腫 (CTCL)、乾癬 (Psoriasis) の病変部皮膚組織での CCL20 mRNA の発現

② 血清中 CCL20 値は皮膚 T 細胞リンパ腫の disease marker である血清中 LDH 値と関連していた。

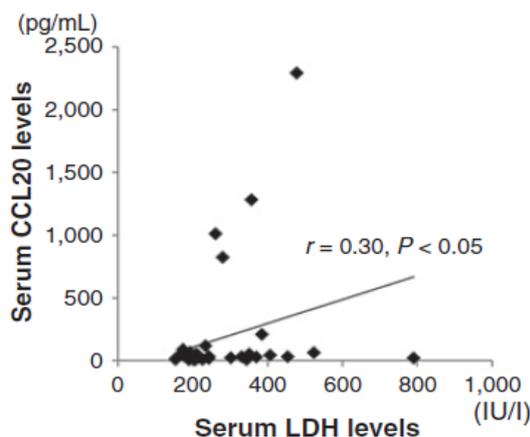


図 9. 血清中 CCL20 値と LDH 値の相関

以上①、②の結果より、CCL20 は皮膚 T 細胞リンパ腫 (菌状息肉症、セザリー症候群) の血清中、病変部皮膚で上昇しており、皮膚 T 細胞リンパ腫の重症度と関連していることが分かった。また、その誘導因子としては IL-17 ではなく、IL-22 が関与していることが考えられ、皮膚 T 細胞リンパ腫の病変部では Th17 細胞よりも Th22 細胞が優位な微小環境が形成されている可能性が示唆された。

(3) 皮膚 T 細胞リンパ腫 (菌状息肉症、セザリー症候群) における CCL18 の関与の検討

① 皮膚 T 細胞リンパ腫 (菌状息肉症、セザリー症候群) の血清中、病変部皮膚組織において、CCL18 の発現は上昇していた。

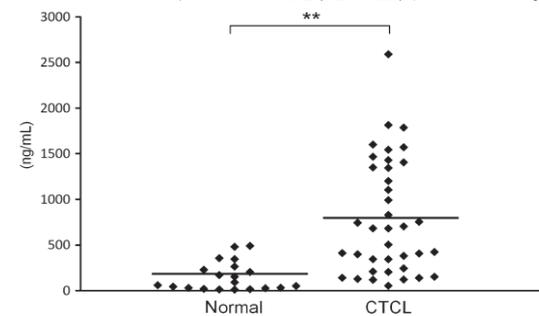


図 10. 皮膚 T 細胞リンパ腫 (CTCL) の血清中 CCL18 値

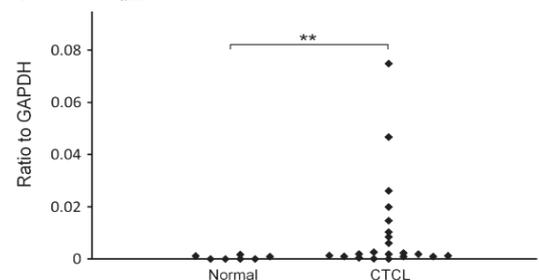


図 11. 皮膚 T 細胞リンパ腫 (CTCL) の病変部皮膚組織での CCL18 mRNA の発現

② 血清中 CCL18 値は皮膚 T 細胞リンパ腫の disease marker である mSWAT 値、血清中 sIL-2R 値、LDH 値、Th2 サイトカインである IL-4 値、IL-10 値、IL-31 値、Th2 ケモカインである CCL17 値、CCL26 値と関連していた。

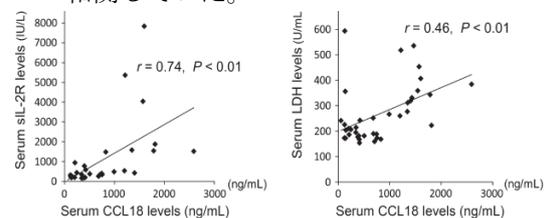


図 1 2. 血清中 CCL18 値と皮膚 T 細胞リンパ腫の disease marker の相関

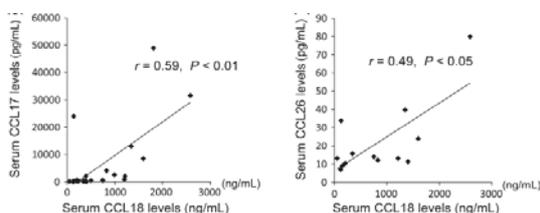


図 1 3. 血清中 CCL18 値と Th2 ケモカイン値の相関

以上①、②の結果より、CCL18 は皮膚 T 細胞リンパ腫（菌状息肉症、セザリー症候群）の血清中、病変部皮膚で上昇しており、皮膚 T 細胞リンパ腫の重症度と相関していることが分かった。また、血清中 CCL18 値は血清中 Th2 サイトカイン値、血清中 Th2 ケモカイン値と相関しており、これらの Th2 サイトカインによって誘導され、Th2 ケモカインと共同して、Th2 細胞を病変部に誘導し、皮膚 T 細胞リンパ腫の腫瘍細胞にとって有利な Th2 優位の微小環境が形成されている可能性が示唆された。

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 13 件）

- ① Miyagaki T, Sugaya M, Suga H, Ohmatsu H, Fujita H, Asano Y, Tada Y, Kadono T, Sato S. Increased CCL18 expression in patients with cutaneous T cell lymphoma: association with disease severity and prognosis. **J Eur Acad Dermatol Venereol**, 査読有、掲載予定
- ② Miyagaki T, Sugaya M, Suga H, Kamata M, Ohmatsu H, Fujita H, Asano Y, Tada Y, Kadono T, Sato S. IL-22, but not IL-17, Dominant Environment in Cutaneous T cell Lymphoma. **Clin Cancer Res**, 査読有、17 巻、2011、7529-7538
- ③ Miyagaki T, Sugaya M, Murakami T, Asano Y, Tada Y, Kadono T, Okochi H, Tamaki K, Sato S. Eotaxin-CC Chemokine Receptor 3 Interactions Promote Survival of Anaplastic Large Cell Lymphoma Cells via ERK1/2 Activation. **Cancer Res**, 査読有、71 巻、2011、2056-2065

〔学会発表〕（計 4 件）

- ① Miyagaki T. IL-22, but not IL-17, Dominant Environment in Cutaneous T cell Lymphoma. The 72nd Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology. Raleigh, NC, USA. May 10, 2012.
- ② Miyagaki T. Eotaxin-CCR3 interaction promotes survival of anaplastic large cell lymphoma cells via ERK1/2 activation. The 70th Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology. Atlanta, GA, USA. May 6, 2010.

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

なし

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・助教

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：