

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 16 日現在

機関番号：13701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23658261

研究課題名（和文） リンパ球の皮膚離脱関連分子に着目した上皮向性リンパ腫に対する革新的治療概念の構築

研究課題名（英文） A concept on innovative treatments to epitheliotropic lymphoma targeting to molecules associated with segregation of lymphocytes from lesional skin

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

研究成果の概要（和文）：

本研究の結果から、犬の上皮向性リンパ腫（cECL）における皮膚特異的な腫瘍化リンパ球の集積は、皮膚指向性を有するケモカイン受容体（CCR4、CCR7、CCR10 および CXCR3）の発現に起因している可能性が示された。また、cECL の病態においては、末梢血に存在する細胞傷害性 T 細胞が皮膚へ積極的に動員されている可能性も示唆された。したがって、これらの皮膚指向性ケモカイン受容体は cECL におけるリンパ球遊走制御に着目した新規治療戦略の標的分子になり得ると思われる。

研究成果の概要（英文）：

The present results indicated that the skin-homing property of CCR4, CCR7, CCR10 and CXCR3 may contribute to the development of specific accumulation of neoplastic lymphocytes in the skin, which is the new concept of involvement of active skin migration of cytotoxic T-cells from blood circulation of cECL. These chemokine receptors could be therapeutic targets by regulating the migration of neoplastic lymphocytes in cECL.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・臨床獣医学

キーワード：内科

## 1. 研究開始当初の背景

犬上皮向性リンパ腫（cECL）がその他のリンパ腫と大きく異なる点は、皮膚に存在するリンパ球が腫瘍化することである。本疾患は治療に対する反応性が低く、発症してからの平均生存期間はわずか数ヶ月である。予後不良の原因として、皮膚において増殖した上皮向性リンパ球が容易に全身へ転移することが挙げられる。したがって、本疾患に対する有効性の高い治療法を実践するためには、転移を効率よく抑制する分子標的治療薬を

開発する必要がある。しかしながら、獣医学領域においては、既存の化学療法の組み合わせによる治療効果の評価は行われているものの、分子病態に基づいた新規治療法開発の試みは皆無である。

腫瘍細胞が転移するためには①細胞外基質の破壊→②原発病変からの離脱→③脈管浸潤という過程を経る必要がある。そこで腫瘍細胞の転移メカニズムを解明する足掛かりとして、cECL 症例の皮膚病変部における上記①～③の過程に関与する分子群（離脱関

連分子)の遺伝子発現解析を実施した。その結果、特定の分子群(マトリックスメタロプロテアーゼ [MMPs]、リンパ球ホーミング受容体 [CCR7]、血管接着因子 [CD62L] など)の mRNA 転写量が高値を示すことが明らかになった。この予備的研究の結果から、これらの離脱関連分子の機能を阻害すれば、腫瘍細胞の転移抑制が可能になると考え、さらなる病態解明を目的として本研究を立案した。

## 2. 研究の目的

リンパ球の皮膚からの離脱に関連した分子を標的とした cECL に対する新たな治療概念を構築することである。

## 3. 研究の方法

(1)病変部におけるケモカインおよびサイトカイン遺伝子の転写解析

cECL と診断した犬 (7 頭) および健常犬 (5 頭) の皮膚からトータル RNA を抽出した。その後、リアルタイム RT-PCR によって、ケモカイン (CCL17, CCL19, CCL21, CCL22, CCL27, CCL28, CXCL10)、ケモカイン受容体 (CCR4, CCR7, CCR10, CXCR3)、タイプ 1 サイトカイン (IFN- $\gamma$ , IL-12p35, IL-12p40, LT- $\alpha$ )、タイプ 2 サイトカイン (IL-4, IL-13) および細胞傷害性因子 (perforin, granzyme B) の遺伝子転写量を定量した。各分子の転写量に関する cECL 群および健常群との間の有意差は Mann-Whitney 検定を用いて解析した。

(2)末梢血におけるケモカインおよびサイトカイン遺伝子の転写解析

cECL と診断した犬 (10 頭) および年齢分布の一致した健常犬 (10 頭) の末梢血からトータル RNA を抽出した。その後、リアルタイム RT-PCR によって、ケモカイン受容体 (CCR4, CCR7, CCR10, CXCR3)、タイプ 1 およびタイプ 2 サイトカイン (IL-4, IL-12p35, IL-12p40, IL-13, IFN- $\gamma$ , LT- $\alpha$ ) および細胞傷害性因子 (perforin, granzyme B) の遺伝子転写量を定量した。cECL 群および健常群との間の有意差は Mann-Whitney 検定を用いて解析した。

## 4. 研究成果

(1)病変部におけるケモカインおよびサイトカイン遺伝子の転写解析

cECL の皮膚病変部における CCL19, CXCL10, CCR4, CCR7, CCR10 および CXCR3 の転写量は正常皮膚におけるものに比較して有意に高値を示したが、CCL27 は有意に低値を示した ( $p < 0.05$ ) (表 1、図 1-3)。

表 1 ケモカイン、ケモカイン受容体、サイトカインおよび細胞傷害因子の遺伝子転写量の平均値

Target gene	Relative quantity (Mean $\pm$ SEM)		P value (Lesional vs Normal)
	Lesional skin	Normal skin	
CCL17	$0.52 \pm 3.4 \times 10^{-1}$	$0.06 \pm 2.3 \times 10^{-2}$	0.3718
CCL19	$0.45 \pm 1.4 \times 10^{-1}$	$0.005 \pm 8.4 \times 10^{-4}$	0.0045
CCL21	$0.60 \pm 1.3 \times 10^{-1}$	$0.29 \pm 5.5 \times 10^{-2}$	0.1675
CCL22	$1.19 \pm 3.8 \times 10^{-1}$	$0.55 \pm 1.9 \times 10^{-1}$	0.3718
CCL27	$0.13 \pm 8.2 \times 10^{-2}$	$1.22 \pm 2.8 \times 10^{-1}$	0.0045
CCL28	$0.62 \pm 3.7 \times 10^{-1}$	$0.79 \pm 2.3 \times 10^{-1}$	0.0882
CXCL10	$0.38 \pm 1.3 \times 10^{-1}$	$0.02 \pm 7.4 \times 10^{-3}$	0.0045
CCR4	$1.45 \pm 1.4 \times 10^{-1}$	$0.32 \pm 7.5 \times 10^{-2}$	0.0045
CCR7	$1.07 \pm 3.8 \times 10^{-1}$	$0.02 \pm 6.8 \times 10^{-3}$	0.0045
CCR10	$1.17 \pm 3.6 \times 10^{-1}$	$0.09 \pm 2.8 \times 10^{-2}$	0.0118
CXCR3	$0.82 \pm 9.8 \times 10^{-2}$	$0.03 \pm 8.9 \times 10^{-3}$	0.0045
IL-4	$0.09 \pm 6.3 \times 10^{-2}$	$0.22 \pm 1.6 \times 10^{-1}$	0.4881
IL-12p35	$0.61 \pm 3.2 \times 10^{-1}$	$0.11 \pm 1.9 \times 10^{-2}$	0.0284
IL-12p40	$0.78 \pm 2.2 \times 10^{-1}$	$0.02 \pm 6.5 \times 10^{-3}$	0.0045
IL-13	$0.11 \pm 3.7 \times 10^{-2}$	$0.60 \pm 3.8 \times 10^{-1}$	0.0882
IFN- $\gamma$	$0.47 \pm 1.3 \times 10^{-1}$	$0.04 \pm 3.1 \times 10^{-2}$	0.0118
LT- $\alpha$	$0.60 \pm 2.0 \times 10^{-1}$	$0.02 \pm 7.3 \times 10^{-3}$	0.0045
Perforin	$1.04 \pm 2.9 \times 10^{-1}$	$0.05 \pm 1.3 \times 10^{-2}$	0.0045
Granzyme B	$0.47 \pm 1.9 \times 10^{-1}$	$0.003 \pm 1.9 \times 10^{-3}$	0.0074

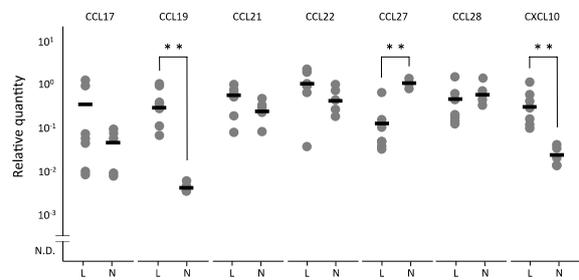


図 1 ケモカイン遺伝子転写量 (L:病変部; N:健常部)

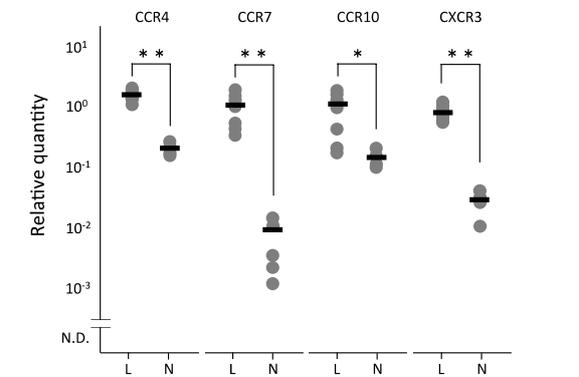


図 2 ケモカイン受容体遺伝子転写量 (L:病変部; N:健常部)

cECL の皮膚病変部におけるタイプ 1 サイトカインおよび細胞傷害性因子の転写量は正常皮膚と比較して有意に高値を示した。これらの結果から、cECL の皮膚病変部では皮膚指向性、上皮指向性およびリンパ節へのホーミングに関与するケモカインおよびケモカイン受容体の発現が亢進していることが示唆された。さらに、集積する腫瘍化リンパ球のサブセットはタイプ 1 細胞傷害性 T 細胞 (Tc1) である可能性が示唆された (図 3-5)。

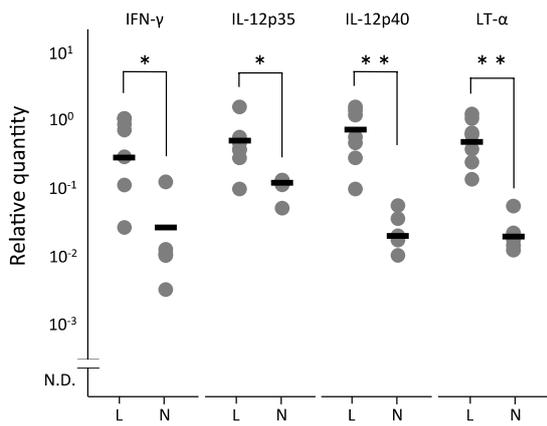


図3 1型サイトカイン遺伝子転写量 (L:病変部; N:健常部)

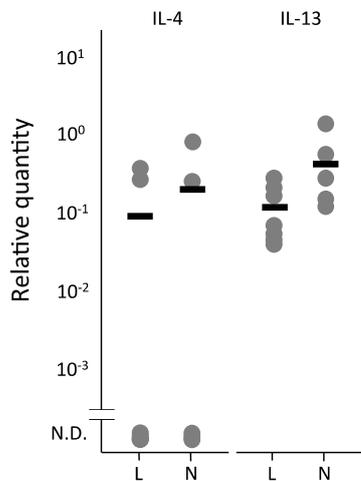


図4 2型サイトカイン遺伝子転写量 (L:病変部; N:健常部)

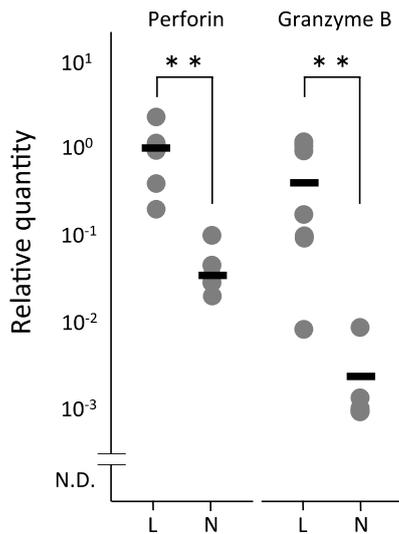


図5 細胞傷害因子遺伝子転写量 (L:病変部; N:健常部)

(2)末梢血におけるケモカインおよびサイトカイン遺伝子の転写解析

cECLの末梢血におけるCCR4、CCR7、CXCR3、LT- $\alpha$ 、perforinおよびgranzyme Bの転写量は正常末梢血と比較して有意に低値を示した ( $p < 0.05$ )。このことから、cECL末梢血中では細胞傷害性T細胞の表現型を有する細胞数が減少している可能性が示唆された (表2および図6-9)。

表2 ケモカイン、ケモカイン受容体、サイトカインおよび細胞傷害因子の遺伝子転写量の平均値

Target gene	Relative quantity (Mean $\pm$ SEM)		P value (cECL vs normal)
	cECL	normal	
CCR4 *	$3.4 \times 10^{-1} \pm 1.2 \times 10^{-1}$	$4.9 \times 10^1 \pm 4.7 \times 10^2$	0.0312
CCR7 **	$5.2 \times 10^1 \pm 1.3 \times 10^1$	$1.4 \times 10^0 \pm 1.3 \times 10^1$	0.0010
CCR10	$1.7 \times 10^{-1} \pm 3.1 \times 10^{-2}$	$1.7 \times 10^1 \pm 1.5 \times 10^2$	0.9097
CXCR3 *	$1.3 \times 10^1 \pm 2.1 \times 10^2$	$3.3 \times 10^1 \pm 7.1 \times 10^2$	0.0140
IL-4	$3.8 \times 10^1 \pm 3.8 \times 10^1$	$4.5 \times 10^4 \pm 3.1 \times 10^4$	0.1860
IL-12p35	$5.8 \times 10^1 \pm 1.4 \times 10^1$	$7.5 \times 10^1 \pm 1.1 \times 10^1$	0.2413
IL-12p40	$3.6 \times 10^7 \pm 1.0 \times 10^7$	$7.6 \times 10^7 \pm 5.3 \times 10^7$	0.6205
IL-13	$2.2 \times 10^2 \pm 1.3 \times 10^2$	$7.4 \times 10^2 \pm 3.0 \times 10^2$	0.1258
IFN- $\gamma$	$5.8 \times 10^3 \pm 3.2 \times 10^3$	$8.9 \times 10^3 \pm 3.9 \times 10^3$	0.3621
LT- $\alpha$ *	$1.6 \times 10^1 \pm 5.6 \times 10^2$	$3.4 \times 10^1 \pm 7.2 \times 10^2$	0.0211
Perforin **	$1.1 \times 10^1 \pm 1.5 \times 10^2$	$2.4 \times 10^1 \pm 2.6 \times 10^2$	0.0017
Granzyme B *	$6.4 \times 10^1 \pm 9.9 \times 10^2$	$1.3 \times 10^0 \pm 2.6 \times 10^1$	0.0173

\*:  $p < 0.05$  \*\*:  $p < 0.01$

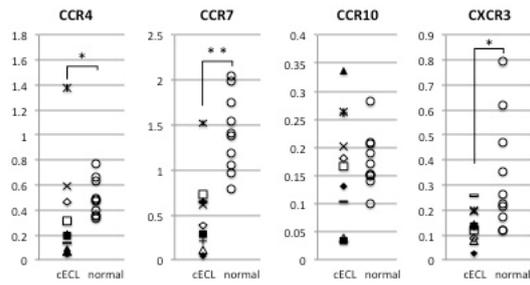


図6 ケモカイン受容体の遺伝子転写量

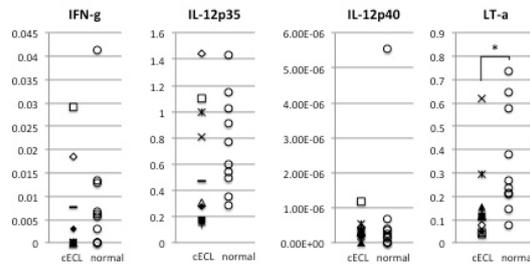


図7 1型サイトカイン遺伝子転写量

研究者番号：20588917

(3) 連携研究者  
なし

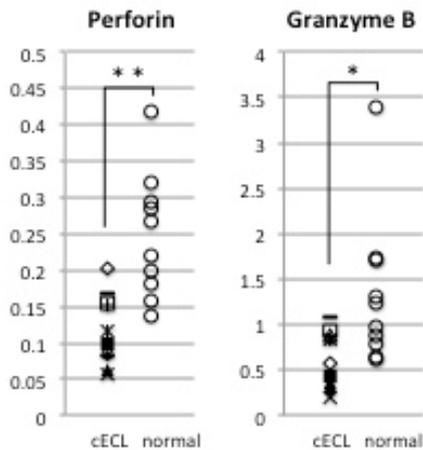


図8 2型サイトカイン遺伝子転写量

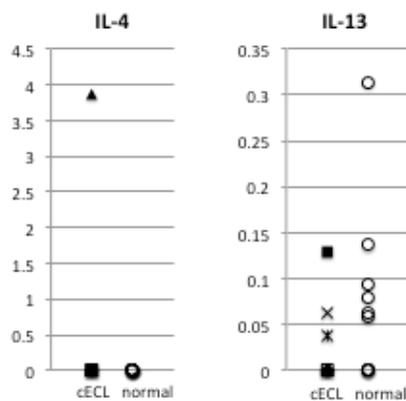


図9 細胞傷害因子遺伝子転写量

## 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.Chimura, N., Kondo, N., Shibata, S., Kimura, T., Mori, T., Hoshino, Y., Murayama, N., Nagata, M., Ide, K., Nishifuji, K., Kamishina, H., Maeda, S.: Gene transcription analysis in lesional skin of canine epitheliotropic cutaneous lymphoma using quantitative real-time RT-PCR. Vet. Immunol. Immunopathol. 査読有, 144: 329-36, 2011  
DOI: S0165- 2427(11)00331- X [pii] 10.1016/j.vetimm.2011.08.012

## 6. 研究組織

### (1) 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

### (2) 研究分担者

柴田 早苗 (SHIBATA SANAE)  
岐阜大学・応用生物科学部・助教