

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 22 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23791249

研究課題名（和文） 悪性黒色腫における骨髄由来抑制細胞の同定とその免疫抑制メカニズムの解析

研究課題名（英文） The effect of myeloid derived suppressor cells on the induction of peripheral tolerance

研究代表者

藤村 卓 (FUJIMURA TAKU)

東北大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：50396496

研究成果の概要（和文）：

我々は、マウスの抑制型マクロファージ、MDSC と Tregs による担癌体のトレランスの誘導の研究を行った。本プロジェクトにより我々は腫瘍内での抑制型マクロファージに関する 8 本の英文論文を発表した。さらに 5 本の英文論文が投稿中である。本プロジェクトを通して、我々は抑制型マクロファージのサブタイプを明らかにし将来的には癌患者においてこれらのマクロファージをターゲットとした、より理想的な治療法を確立することができる。

研究成果の概要（英文）：

We investigated mainly mouse immunosuppressive macrophages and myeloid derived suppressor cells, as well as regulatory T cells on the induction of peripheral tolerance in cancer patient and cancer bearing mouse. By this project, we have published 8 English papers concerned about the effect of immunosuppressive macrophages on cancer microenvironment. Another 5 English papers are still under submission. Through this project, we characterized the further subtypes of immunosuppressive macrophages, and in future, by targeting these macrophages in cancer patients, further optimal therapy might be established.

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	3,200,000	960,000	4,160,000

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：皮膚腫瘍学

1. 研究開始当初の背景

Myeloid derived suppressor cells (MDSC) は担癌生体内で増殖する未分化なマクロファージで、制御性 T 細胞と共に腫瘍内で免疫寛容を誘導することが報告されている (Fujimura et al. J Dermatol Sci 2010)。また、MDSC を担癌マウスに導入することにより腫瘍の転移を促進すること、MDSC の抑制機能の活性化に関わる S100A9 をノックアウトすることにより MDSC の活性化抑制と CD8 を介した抗腫瘍免疫により腫瘍の増殖が抑制

されることが報告されている (Cheng P et al. J Exp Med 2008)。すなわち MDSC の存在が悪性腫瘍における免疫寛容そのものである可能性が示唆される。また、MDSC はその存在下に制御性 T 細胞を誘導し、腫瘍内で免疫寛容を形成することが知られているが、制御性 T 細胞が MDSC のフェノタイプに与える影響に関しては今だ検討されていない。現在、MDSC をターゲットとした抗腫瘍療法の開発は卵巣癌、乳癌など多岐にわたる癌腫で進められ

ている (Gabrilovich et al. 2009 Nat Rev Immunol) (Fujimura et al. 2010 J Dermatol Sci)。実際にマウスを用いた研究では抗腫瘍効果誘導のための手法として、MDSC を直接化学療法で殺傷する手法 (Suzuki et al. 2005 Clin Cancer Res)、MDSC 抗原提示細胞に分化誘導する手法 (Nefedov et al. Cancer Res 2003) や MDSC の細胞活性シグナルを抑制する手法 (Rodriguez et al. 2005 J Exp Med)、血管新生抑制による MDSC の腫瘍内への遊走阻害により抗腫瘍効果を誘導する手法 (Melani et al. 2007 Cancer Res) などが報告されており、MDSC をターゲットにすることによる新規免疫療法の開発が期待される。今後腫瘍免疫の分野において MDSC は新たな治療のターゲットとして制御性 T 細胞とともにその重要性が増すものと推測される。さらに、近年、腫瘍内の抑制型マクロファージとして M2 マクロファージが注目され始めている。このマクロファージは腫瘍の血管新生、創傷治癒、Th2 免疫環境の誘導に関わることが知られており、最近の研究では Tumor associated macrophages のほとんどが、この M2 マクロファージであることが報告されている。興味深いことに、これら M2 マクロファージは未分化なマクロファージである MDSC から分化誘導されることが明らかにされはじめており、皮膚科分野においても、その腫瘍内での役割が注目されはじめています。

2. 研究の目的

本研究は初め悪性腫瘍内に浸潤してくる抑制型マクロファージの一種である Myeloid derived suppressor cells (MDSC) 上の免疫抑制分子 (B7 homing molecules) の発現とその免疫抑制機能の相関をマウス悪性黒色腫モデルを用いて検討する。また、制御性 T 細胞をマウス生体内で除去することの、MDSC における免疫抑制能への影響を *in vivo* で行うことにより、制御性 T 細胞が MDSC の機能を維持するのに必要か否かを検討する。更にこれらマウスの結果をふまえて、ヒト悪性黒色腫患者における MDSC の動向を腫瘍ステージ、治療前後で検討し、かつ生命予後との関わりを検討し、MDSC が悪性黒色腫の予後を決定する因子の一つであるかどうかを明らかにする。さらにこれらのヒトでの基礎データが多岐にわたる皮膚腫瘍モデルにおいて、汎用性があるか、各皮膚悪性腫瘍群において治療のターゲットとなりうるか否かを検討することを目的とする。

3. 研究の方法

ret および B16 担癌後、腫瘍、脾臓、リンパ節由来の CD11b+Gr1+MDSC 上の B7 homolog molecules や MDSC マーカーの発現をフローサイトメトリーや免疫染色を用いて検討する。次にこれら MDSC を分離し、CD4+、CD8+ T 細胞と共培養することにより、T 細胞増殖抑制能を検討する。さらに、これらの抑制メカニズムを検討するため、培養系に B7-H1 抗体を加え、この MDSC の抑制がどの経路により行われているのかを明らかにする。また、この培養上清より抑制型サイトカインの産生を調べる。次に制御性 T 細胞および MDSC の生体内での腫瘍増殖への影響を検討するため、それぞれ担癌前に各種抗体により除去し、腫瘍の成長速度を検討する。更に MDSC をターゲットとした治療モデルを作成するため、ビスフォスフォネート投与による腫瘍の成長速度を検討する。これら MDSC の存在をヒト悪性黒色腫患者においても確認し、疾患の進行度との相関性を統計学的に検討する。

4. 研究成果

抑制型マクロファージである MDSC はその存在下に制御性 T 細胞を誘導し、腫瘍内で免疫寛容を形成することが知られている。そのため、まずはじめに、ret melanoma モデルにおいて、腫瘍内に浸潤している MDSC は高頻度に抑制型の co-stimulate molecule である B7H homolog を発現していることを確認し、この中の B7H1 を介して MDSC が T 細胞の増殖を抑制していることを確認した。更に制御性 T 細胞の MDSC のフェノタイプに与える影響を、マウス悪性黒色腫モデルを用いて、検討した。その結果、ret melanoma モデルにおいては、制御性 T 細胞を除去すると、MDSC 上の B7H homolog の減弱が生じることを証明した (Fujimura et al. J Invest Dermatol 2012 : ref. 6)。更にこれらの MDSC の変化が MDSC の T 細胞増殖抑制能、抑制型サイトカインである IL-10 の産生能に関わることも確認した。また、異なるマウスの B16 melanoma モデルにおいても B7H1 の発現を確認し、この発現が現在臨床で使用されている種々の薬剤の影響を受けることを確認しつつある。これと平行して臨床検体を用いて皮膚悪性腫瘍全般における抑制型マクロファージの存在と疾患の病態に関する研究を行い、Merkel 細胞癌において CD163 陽性抑制型マクロファージが疾患予後に関与する可能性を示唆した (Shimada et al. Acta Derm Venereol 2012: ref. 8)。さらに、皮膚有棘細胞癌とケラトアクトノーマにおける、抑制型マクロファージの役割を示した論文 (Kabayashi et al.

Acta Derm Venereol 2012; ref. 2)、乳房外パジェット病における抑制型マクロファージのサブセットとその発癌での役割 (Fujimura et al. Acta Derm Venereol 2012; ref. 7) (Fujimura et al. Clin Dev Immunol 2013; ref. 6)に関する論文を発表した。さらに、抑制型マクロファージをターゲットとした血管肉腫に対する治療の有効性を示した論文も発表した (Kambayashi et al. Dermatology 2013; ref. 1)。他に、melanomaの亜系である Pigmented epithelioid melanocytoma における抑制型マクロファージの関わり (Sadayasu et al. 2013 Acta Derm Venereol; ref. 3) も行っている。これら一連の多岐にわたるヒトの皮膚癌における抑制型マクロファージである M2 マクロファージの存在は、骨髄由来の MDSC が皮膚腫瘍環境内でより組織に適合した Tumor associated macrophages に分化したことが推測される。現在、M2 マクロファージをヒト末梢血から誘導し、種々の腫瘍環境における免疫学的機能の解析を網羅的に行っており、その一部を2012年12月に第37回日本研究皮膚科学会で口演を行っている。また、MDSCからのM2マクロファージの誘導が可能か否かを現在、マウスB16メラノーマモデルで行っている。これら、B16 melanoma内のMDSCへの影響を、臨床で悪性黒色腫に使用している薬剤である、ダカルバジン、イミキモドの効果を確かめたところ、興味深いことにMDSCの抑制効果の機能的マーカーであるB7H1がイミキモド単独では強力に誘導されたのに対し、イミキモドにダカルバジンを併用することにより、このマクロファージの抑制機能の強化は解除されることが明らかになった。この結果は、2012年の9月に第42回 European Society for Dermatological Research および第37回日本研究皮膚科学会において英語で口演ならびにポスター発表を行っており、現在、投稿に向けて更なる追加実験を行っている。以上、マウスの基礎データからヒトの皮膚腫瘍における抑制型マクロファージの存在を確認できたため、これらをターゲットとした新規治療法の開発へとつながりうる成果をあげることができた。

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8件)

1. Y. Kambayashi, T. Fujimura, et al. Comparison of immunosuppressive cells and cytotoxic cells in angiosarcoma: the

development of a possible supportive therapy for angiosarcoma. Dermatology 2013, in press. 査読あり

2. Y. Kambayashi, T. Fujimura, et al. Comparison of immunosuppressive cells and immunomodulatory cells in keratoacanthoma and invasive squamous cell carcinoma. Acta Derm Venereol 2013, in press. doi: 10.2340/00015555-1597. 査読あり

3. A. Sadayasu, T. Fujimura, et al. Pigmented epithelioid melanocytoma: immunohistochemical profiles of tumor infiltrating histiocytes. Acta Derm Venereol 2013, in press. doi: 10.2340/00015555-1507. 査読あり

4. T. Fujimura, Possible supportive therapy for invasive extramammary Paget's disease by bisphosphonates. Clin Dev Immunol 2013, 164982. doi: 10.1155/2013/164982. 査読あり

5. T. Fujimura, et al. Crosstalk between regulatory T cells (Tregs) and myeloid derived suppressor cells (MDSC) during melanoma growth. Oncoimmunology 2012, 1: 1434-1435. 査読あり

6. T. Fujimura, et al. Regulatory T cells (Treg) stimulate B7-H1 expression in myeloid derived suppressor cells (MDSC) in *ret* melanomas. Journal of Investigative Dermatology 2012; 132: 1239-1246. doi: 10.1038/jid.2011.416. 査読あり

7. T. Fujimura, et al. Comparison of Foxp3⁺ regulatory T-cells and CD163⁺ macrophages in invasive and non-invasive extramammary Paget's disease. Acta Derm Venereol 2012, 92: 625-628. doi: 10.2340/00015555-1453. 査読あり

8. R. Shimada, T. Fujimura, et al. CD163 positive adult xanthogranuloma arising from Merkel cell carcinoma treated with local radiotherapy. Acta Derm Venereol 2012; 92: 631-632. doi: 10.2340/00015555-1356. 査読あり

[学会発表] (計5件)

1. T. Fujimura et al. Generation of B7H1-expressing CD11b+Gr1⁺ myeloid derived suppressor cells (MDSCs) during immune-modulatory therapy for B16F10 melanoma. **第37回日本研究皮膚科学会**, 2012年12月07日~2012年12月09日, **沖繩**

2. Y. Kambayashi, T. Fujimura et al. Comparison of immunosuppressive cells and immunomodulatory cells in Angiosarcoma: the possible novel supportive therapies

for angiosarcoma. 第 37 回日本研究皮膚科学会, 2012 年 12 月 07 日~2012 年 12 月 09 日, 沖縄

3. S. Furudate, T. Fujimura et al. Comparison of Foxp3+ regulatory T-cells and CD163+ macrophages in invasive and non-invasive extramammary Paget's disease. 第 37 回日本研究皮膚科学会, 2012 年 12 月 07 日~2012 年 12 月 09 日, 沖縄

4. T. Fujimura, et al. Imiquimod augments the expression of B7H1 on CD11b+Gr1+ myeloid derived suppressor cells (MDSCs) in B16F10 melanoma. 42th European Society for Dermatological Research annual meeting. 2012 年 09 月 19 日~2012 年 09 月 22 日, イタリア、ヴェネチア

5. Y. Kambayashi, T. Fujimura, et al. Comparison of immunosuppressive cells and immunomodulatory cells in keratoacanthoma and cutaneous squamous cell carcinoma. 42th European Society for Dermatological Research annual meeting. 2012 年 09 月 19 日~2012 年 09 月 22 日, イタリア、ヴェネチア

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤村 卓 (FUJIMURA TAKU)
東北大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号 : 50396496

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :