

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 6月 5日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23791261

研究課題名（和文）腫瘍微小環境でメラノーマに誘導される新規免疫抑制分子の同定

研究課題名（英文）Identification of novel immune-suppressive factors on melanoma cells

研究代表者

猪爪 隆史（INOZUME TAKASHI）

山梨大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80334853

研究成果の概要（和文）：進行したメラノーマは難治である一方、方法によっては免疫療法が奏効する。メラノーマは様々な免疫を抑制する因子を発現しているがその大部分は未知である。本研究ではメラノーマ細胞の発現遺伝子を網羅的に解析し、未知の免疫抑制分子をいくつか同定した。さらにその作用を阻害することでメラノーマへの免疫反応を増強出来ることを証明した。本研究の結果は効果的な新しいメラノーマ治療に結びつくと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Melanoma is an immunogenic tumor. On the other hands, it expresses many unknown immunosuppressive factors. In this research, we have identified some novel immunosuppressive factors expressed by melanoma cells, and revealed that inhibition for them elicited anti-melanoma immune-response. Our findings may contribute to developing an effective treatment for melanoma.

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	4,160,0000

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、メラノーマ、腫瘍免疫

1. 研究開始当初の背景

メラノーマは悪性度の高い皮膚癌で、進行期に対する有効な治療は無い。一方で一部の免疫療法が劇的に奏効することがあり、奏効例の解析より癌が発現する免疫抑制因子を除去することの重要性が強く示唆されている。実際に CTLA-4 や PD-1 といった免疫抑制因子に対する阻害抗体を投与する臨床試験ではメラノーマ患者の生存が延長するなど、従来の治療には見られなかった成果が報告されている。

メラノーマ拒絶に重要な役割を果たす CTL(cytotoxic lymphocyte)の活性化に伴って放出される IFN γ は様々な免疫抑制分子をメラノーマ細胞上に誘導することが知られ

ている。研究代表者は過去に、メラノーマ腫瘍周囲のメラノーマ反応性 CTL が活性化に伴い PD-1 を発現し、また IFN γ を放出してメラノーマ細胞上に PD-L1 を発現させ、その結果メラノーマ反応性 CTL 自身に強い抑制をかけていることを、ヒトサンプルを用いて証明した。しかし、こうした IFN γ でメラノーマ細胞に誘導される免疫抑制分子は他にも多数存在し、その大部分はいまだ未知である。そのため、より有効なメラノーマに対する免疫療法を開発するために、それらの究明と制御方法の開発が強く求められている。

2. 研究の目的

現在、臨床試験にて、新しいメラノーマ治療薬として脚光を浴びている抗 CTLA-4 抗体や抗 PD-L1, PD-1 抗体の様に、メラノーマに対するより強力な免疫反応を惹起する方法を開発する目的で、以下の研究を行う。

(1), CTL の活性化に伴って放出される IFN γ 刺激でメラノーマ細胞に誘導される、PD-L1 のような作用をもつ新規免疫抑制因子を同定する。

(2), 同定した候補分子の免疫抑制効果を *in vitro*, *in vivo* で評価する。

(3), 免疫抑制効果が確認出来た候補分子の CTL 抑制機序の詳細を解明する。そしてより効果的な阻害方法を検討し、それによって抗メラノーマ免疫反応が増強されるかを確認する。

3. 研究の方法

研究代表者のこれまでの研究でメラノーマ細胞株群 A (526mel, 1833mel) は IFN γ 刺激で CTL からの認識が減弱し、メラノーマ細胞株群 B (501Ame1, 2487mel) では減弱しないことが分かっている (図 1)。これよりメラノーマ細胞株群 A には細胞株群 B には発現されない免疫抑制因子が誘導されている可能性がある。この知見に基づいて以下の(1)-(3)の実験を行った。

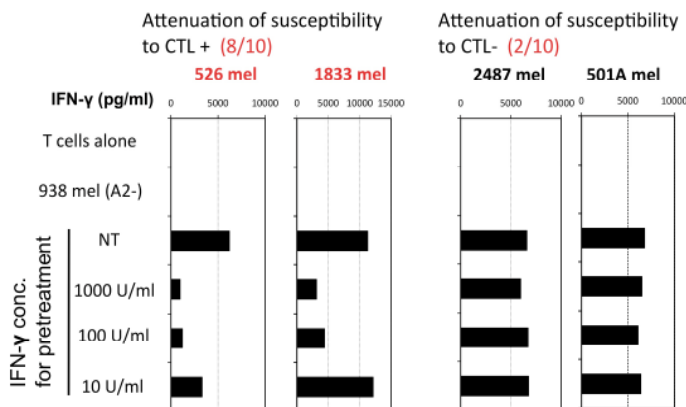


図 1 : メラノーマ細胞株群 A (526mel, 1833mel) は IFN γ 刺激で CTL からの認識が減弱し、メラノーマ細胞株群 B (501Ame1, 2487mel) では減弱しない

(1), GeneChip 解析にて、IFN γ 刺激でメラノ

ーマ細胞株群 A のみで 5 倍以上に発現が増加し、メラノーマ細胞株群 B で発現が上昇しない遺伝子群を候補としてピックアップする。

(2), 候補遺伝子を RT-PCR などによって単離し、レトロウイルスを用いて細胞株群 B に強制発現させ、メラノーマ抗原特異的にメラノーマ細胞を認識、殺傷する CTL と共培養する。候補遺伝子の強制発現によって CTL からの認識が低下するかどうかを CTL からのサイトカイン放出やメラノーマ細胞の Lysis assay で評価した。

(3), 免疫抑制効果が確認出来た候補分子について、その抑制メカニズムを検討する。抑制メカニズムは図 2 のいずれかである可能性が予想されるため、それに応じて抑制分子の CTL への作用を抑える薬剤や阻害抗体を準備し、これらを添加することでより抗メラノーマ免疫反応が増強されるかを確認する。

抑制メカニズムのパターン

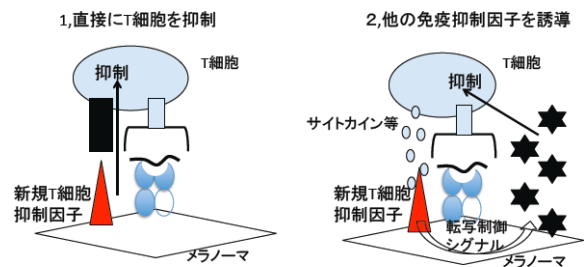


図 2 : 新規 T 細胞 (CTL) 抑制分子による抑制メカニズムのパターン

4. 研究成果

(1), 前述の GeneChip を用いたメラノーマ細胞発現遺伝子の網羅的解析によって、IFN γ 刺激でメラノーマ細胞に誘導される免疫抑制遺伝子の候補、約 80 遺伝子を選択した。選択基準は、IFN γ 刺激により前述のメラノーマ細胞株群 A (526mel, 1833mel) で 5 倍以上、メラノーマ細胞株群 B (501Ame1, 2487mel) で 2 倍以下の発現変化が見られた遺伝子、とした。

(2), 80 個の候補遺伝子のうち、報告上 CTL 機能に作用する可能性がある遺伝子約 10 個を選択し、これらを発現しない細胞株群 B にレトロウイルスを用いて強制発現させた。そしてこれら導入細胞とメラノーマ抗原 MART-1 に特異的に反応する CTL と *in vitro*

で共培養し、強制発現させた遺伝子の CTL 活性化への影響を見たところ、CD271 を始めとする数個の遺伝子導入により CTL の活性化が抑制された (図 3)。

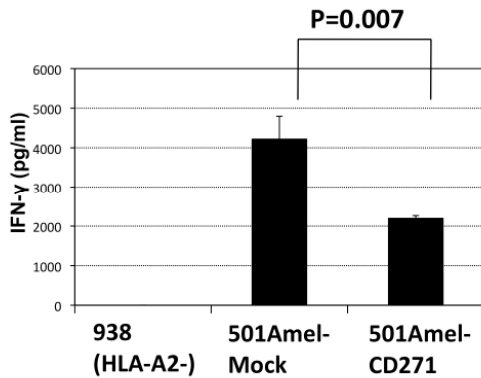


図 3 : CD271 の強制発現によりメラノーマ細胞の CTL からの認識は減弱する

(3), メラノーマ細胞上に発現が増強された CD271 に関しては、CTL が放出する NGF によってメラノーマ細胞にシグナルが入り、MART-1 を始めとするメラノーマ抗原の量が減少することで CTL 活性化を抑制していることを突き止めた。その他の候補分子は CTL 上のリガンドを介して直接、CTL に抑制をかけていることを発見した。メラノーマにおける CD271 の免疫抑制効果を証明したのは初めてのことである。

(4), 候補分子やそのリガンドに対する阻害抗体を添加することでメラノーマ細胞から CTL への抑制が解除され、腫瘍認識時の CTL 活性化が増強されることを発見した。

(5), 候補分子は同様に IFN γ 刺激で誘導される CTL 抑制分子、PD-L1 と協調的に CTL を抑制することを発見した。これは研究代表者が発見した新規 CTL 抑制因子が PD-1 や PD-L1 阻害に加えて新たな治療のターゲットとなりうることを示す重要なデータである (図 4)。

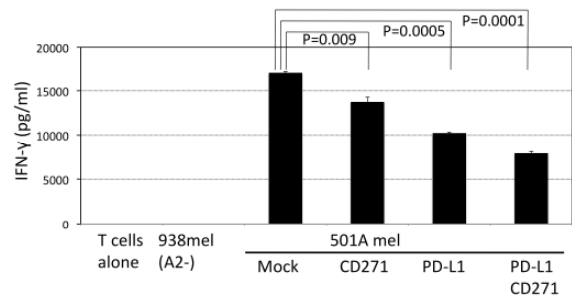


図 4 : メラノーマ細胞に強制発現させた CD271 と PD-L1 は相加的に CTL からの認識を低下させる。

今後の展望

CD271 がメラノーマ特異的 CTL より放出される IFN γ でメラノーマ細胞上に発現増強されることは、研究期間中に他のグループにより報告された。しかし、発現増強された CD271 が CTL を抑制する分子として機能している点について証明したのは本研究が初であり、現在報告の準備を行っている。

また本研究では CD271 以外にも、CTL 上の受容体との結合を介してメラノーマ特異的 CTL の活性化を強力に抑制する分子を同定しており、現在こちらの解析を続行している。今後これらの分子を阻害する方法を確立することで、現在メラノーマに対して最も有望な治療の一つとされる抗 PD-1, PD-L1 抗体や抗 CTLA-4 抗体のように、新しい有望な治療の開発に直結する可能性が高い。

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)

[学会発表] (計 4 件)

①猪爪隆史、CD155 is highly expressed by melanoma tissues and it suppresses the activation of melanoma specific CTLs via interaction with TIGIT, The 37th annual meeting of the Japanese society for investigative dermatology, 2012年12月7-9日、ロワジュール那覇、沖縄

②猪爪隆史、CD155 はほぼすべてのメラノーマ細胞株に発現され、メラノーマ特異的 CTL の活性化を直接に抑制する、
第16回日本がん免疫学会総会、
2012年7月26-28日、北海道大学学術交流会館、北海道

③猪爪隆史、Enhanced NGFR signal in melanoma cells suppresses the tumor recognition by melanoma specific T cells.
2012 SID annual meeting and 75th anniversary celebration
2012年5月9-12日、Raleigh conventional center, Raleigh, North Carolina, USA

④猪爪隆史、NGFR is up-regulated on melanoma cells by IFN γ stimulation and it suppressed the tumor recognition by tumor specific T cells,
The 36th annual meeting of the Japanese society for investigative dermatology,
2011年12月9-11日、京都国際会議場、京都

6. 研究組織

(1)研究代表者

猪爪 隆史 (INOZUME TAKASHI)
山梨大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：80334853

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし