

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 25 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591623

研究課題名(和文)腫瘍免疫、血管炎、乾癬様皮膚炎におけるリンパの役割

研究課題名(英文)Function of lymphatics in tumor immunity, vasculitis, and imiquimod-induced psoriasis-like dermatitis

研究代表者

菅谷 誠 (Sugaya, Makoto)

東京大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：90334408

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：メラノーマ細胞を皮下注射すると、リンパ浮腫のあるマウスで腫瘍形成が有意に促進していた。リンパ節への腫瘍の流入が低下しており、サイトカイン産生も野生型マウスと比べて低下していた。メラノーマで免疫したマウスのリンパ節から単離したCD8陽性細胞は、*in vitro*でも*in vivo*でも、リンパ流に障害があるマウス由来のほうが抗腫瘍免疫効果が低かった。このように腫瘍細胞のリンパ節への流入は効果的な腫瘍免疫の成立に重要であることが分かった。またリンパ流に障害があるマウスでは、血管炎の初期段階では症状が軽くなっており、その原因として肥満細胞や組織球の細胞表面のFc 受容体IIIの発現の低下が考えられた。

研究成果の概要(英文)：Primary tumor growth was augmented in lymphedematous mice when B16 melanoma cells were subcutaneously injected. Expression of inflammatory cytokines as well as tumor-associated antigens in draining lymph nodes was significantly reduced in lymphedematous mice compared to wild-type mice. CD8+ T cells in draining LNs derived from lymphedematous mice bearing B16 melanoma also showed significantly decreased cytotoxic activity *in vitro* and *in vivo*. In summary, these findings suggest that lymphatic transport is essential in generating optimal tumor-specific immune responses. Moreover, early phase of leukocytoclastic vasculitis, the cutaneous and peritoneal reverse Arthus reactions, was attenuated in lymphedematous mice. Decreased Fc gamma receptor III expression on mast cells and macrophages may have resulted in reduced inflammation.

研究分野：皮膚科学

キーワード：リンパ 腫瘍免疫 リンパ節 CD8陽性細胞 アルサス反応 Fc 受容体

1. 研究開始当初の背景

(1) 末梢組織からリンパ節へのリンパ管を介した物質の流れは、炎症性疾患やリンパ浮腫の病態に深く関わっており、また担癌状態における腫瘍抗原の提示や転移の経路の一つとして極めて重要である。リンパ流の障害が腫瘍免疫や血管炎にどのような影響を与えるのか、これまでマウスを用いた研究はほとんどなされていなかった。

(2) カポジ肉腫ウイルスサイクリン遺伝子導入マウスは、カポジ肉腫ウイルス遺伝子の一つである v-cyclin を、リンパ管内皮細胞のマーカである VEGF 受容体 3 のプロモータを用いてリンパ管特異的に発現させている。研究代表者はこのマウスの解析を行い、リンパ流の障害によって、リンパ浮腫や胸水の貯留を来すことを世界に先駆けて報告した (Sugaya M, et al.: *Blood* 2005)。近年はこのマウスを用いて接触皮膚炎におけるリンパの役割を検討した。リンパ流に障害があるマウスでは、接触抗原塗布後の所属リンパ節に抗原を持った樹状細胞をほとんど認めず、感作リンパ球の誘導が弱いにも関わらず、激しい皮膚炎を生じ、組織の浮腫、細胞浸潤は高度であった (Sugaya M, et al.: *J Invest Dermatol* 2012)。

2. 研究の目的

腫瘍免疫、血管炎におけるリンパの役割を明らかにすることである。具体的には、リンパ流に障害のあるカポジ肉腫ウイルスサイクリン遺伝子導入マウスを用いて、腫瘍細胞を皮膚あるいは静脈内に注射する腫瘍免疫モデル、逆アルサス反応による血管炎モデルを用いて解析を行う。

3. 研究の方法

(1) カポジ肉腫ウイルスサイクリン遺伝子導入マウスと C57BL/6J マウスを交配し、リンパ流に障害のある F1 と野生型の F1 を作成した。B16 メラノーマ細胞、EL4 リンパ腫細胞を F1 に皮下注射し、腫瘍の肉眼的大きさや組織学的所見を解析した。また、所属リンパ節への腫瘍細胞の流入を定量化し、所属リンパ節の細胞毒性 T リンパ球の細胞傷害効果を評価して、腫瘍免疫の成立を確認した。

(2) カポジ肉腫ウイルスサイクリン遺伝子導入マウスをヘテロで繁殖し、同腹の野生型マウスを対照群として血管炎の実験に用いた。抗ニワトリ卵白アルブミン抗体を皮内に打ち、その後ニワトリ卵白アルブミンを尾静脈に注射して、逆アルサス反応を惹起した。皮膚の浮腫、出血の計測や血管炎の組織学的検討、サイトカイン発現の検討などを行った。

4. 研究成果

(1) B16 メラノーマ細胞、EL4 リンパ腫細胞を皮下注射したところ、リンパ浮腫のあるマウスでは腫瘍の大きさが有意に大きかった (図 1)。また、リンパ流に障害があるマウスではリンパ節への腫瘍の転移を認めず、リンパ節での TNF- α や IFN- γ の産生も、野生型マウスと比べて著しく低下していた。次にルシフェラーゼ遺伝子を導入した B16 メラノーマ細胞を用い、所属リンパ節への流入した腫瘍細胞を定量化した。予想通り、リンパ流に障害があるマウスの皮下にメラノーマ細胞を注射した後のリンパ節では、野生型マウスのリンパ節と比べてルシフェラーゼ活性が低下していた。興味深いことに、皮膚で形成された腫瘍の大きさとリンパ節のルシフェラーゼ活性には負の相関があり、所属リンパ節に腫瘍細胞が流入するほどリンパ節での抗腫瘍免疫が成立し、皮膚での腫瘍形成が進まないと考えた。さらにメラノーマ細胞を皮膚に注射した後にリンパ節を採取し、単離した CD8 陽性細胞は、in vitro における CTL assay でも、野生型マウスに移入した vivo における抗腫瘍免疫能においても、リンパ流に障害があるマウスから単離した CD8 陽性細胞のほうが cytotoxicity が低く、抗腫瘍免疫が低かった。このように腫瘍細胞のリンパ節への流入は、リンパ節転移というリスクがあるものの、効果的な腫瘍免疫を成立させ、皮膚での腫瘍形成の抑制という負のフィードバックに貢献していることを示すことができた。

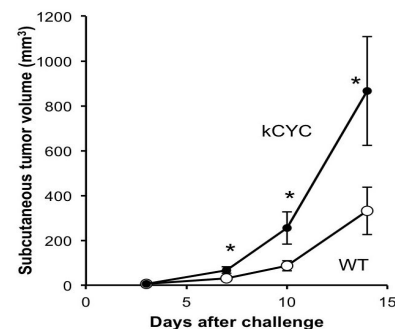


図 1 B16 メラノーマ細胞による腫瘍形成

(2) 血管炎におけるリンパ流の役割について解析した。リンパ流に障害があるマウスでは、逆アルサス反応惹起4時間後の浮腫は野生型マウスより軽度であったが、8時間後の出血は同等であり、12時間後の出血は野生型マウスより激しかった。組織学的な血管炎 (図 2) や IL-6、TNF- α 、CXCL1、CXCL2 などのサイトカインの発現も、早期はリンパ流に障害があるマウスのほうが野生型マウスよりも軽度であり、次第に野生型マウスよりも増悪することが観察された。血管炎惹起後の炎症の遷延は、下肢などのリンパがうっ滞しやすい部位で血管炎が悪化しやすいという臨床における観察に合致する。しかし、リン

パ流に障害があると血管炎の初期反応が減弱する理由は不明な点が多い。血管炎はアレルギー反応の1つであり、抗原抗体複合物が肥満細胞や組織球のFc 受容体IIIに結合することによって反応が開始すると考えられている。リンパ流に障害があるマウスの腹腔内の肥満細胞や組織球の細胞表面のFc 受容体IIIの発現は、野生型マウスと比べて低下していることが判明した。リンパ浮腫の環境下では、細胞にストレスがかかって表面分子の発現が変化する可能性を示しており、極めて興味深い知見を得ることができた。

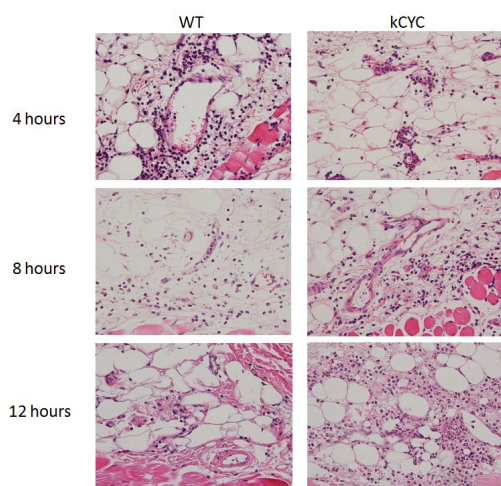


図2 アルサス反応による血管炎の組織像

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12件)

Sugaya M, Miyagaki T, Ohmatsu H, Suga H, Kai H, Kamata M, Fujita H, Asano Y, Tada Y, Kadono T, Okochi H, Sato S. Association of the numbers of CD163+ cells in lesional skin and serum levels of soluble CD163 with disease progression of cutaneous T cell lymphoma. *J Dermatol Sci* 査読有、68(1): 45-51, 2012.
DOI: 10.1016/j.jdermsci.2012.07.007.

Ohmatsu H, Sugaya M, Miyagaki T, Suga H, Fujita H, Asano Y, Kadono T, Sato S. BAFF levels are increased in lesional skin and sera in patients with cutaneous T cell lymphoma. *Br J Dermatol* 査読有、167(2): 359-367, 2012.
DOI: 10.1111/j.1365-2133.2012.10998.x

Suga H, Sugaya M, Miyagaki T, Ohmatsu H, Fujita H, Kagami S, Asano Y, Tada Y, Kadono T, Sato S. Association of nerve growth factor, chemokine (C-C motif) ligands and immunoglobulin E with pruritus in

cutaneous T-cell lymphoma. *Acta Derm Venereol* 査読有、93(2): 144-149, 2013.
DOI: 10.2340/00015555-1428.

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、27(1): e60-e67, 2013.
DOI: 10.1111/j.1468-3083.2012.04495.x.

Suga H, Sugaya M, Fujita H, Asano Y, Tada Y, Kadono T, Sato S. TLR4, rather than TLR2, regulates wound healing through TGF- and CCL5 expression. *J Dermatol Sci* 査読有、73(2): 117-124, 2014.
DOI: 10.1016/j.jdermsci.2013.10.009.

Suga H, Sugaya M, Miyagaki T, Ohmatsu H, Okochi H, Sato S. CXCR3 deficiency prolongs Th1-type contact hypersensitivity. *J Immunol* 査読有、190(12): 6059-6070, 2013.
DOI: 10.4049/jimmunol.1201606.

Kimura T, Sugaya M, Blauvelt A, Okochi H, Sato S. Delayed wound healing due to increased interleukin-10 expression in mice with lymphatic dysfunction. *J Leukocyte Biol* 査読有、94(1): 137-145, 2013.
DOI: 10.1189/jlb.0812408.

Morimura S, Sugaya M, Sato S. Interaction between CX3CL1 and CX3CR1 regulates vasculitis induced by immune complex deposition. *Am J Pathol* 査読有、182(5): 1640-1647, 2013.
DOI: 10.1016/j.ajpath.2013.01.023.

Kawaguchi M, Sugaya M, Suga H, Miyagaki T, Ohmatsu H, Fujita H, Asano Y, Tada Y, Kadono T, Sato S. Serum levels of angiopoietin-2, but not angiopoietin-1, are elevated in patients with erythrodermic cutaneous T-cell lymphoma. *Acta Derm Venereol* 査読有、94(1): 9-13, 2014.
DOI: 10.2340/00015555-1633.

Kimura T, Hamazaki TS, Sugaya M, Fukuda S, Chan T, Tamura-Nakano M, Sato S, Okochi H. Cilostazol improves lymphatic function by inducing proliferation and stabilization of lymphatic endothelial cells. *J Dermatol Sci* 査読有、74(2):150-158, 2014.
DOI: 10.1016/j.jdermsci.2014.01.001.

Suga H, Sugaya M, Miyagaki T, Ohmatsu H, Kawaguchi M, Takahashi N, Fujita H, Asano Y, Tada Y, Kadono T, Sato S. Skin barrier dysfunction and low antimicrobial peptide expression in cutaneous T-cell lymphoma. *Clin Cancer Res* 査読有、20(16): 4339-4348, 2014.
DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-14-0077.

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし

Suga H, Sugaya M, Miyagaki T, Kawaguchi M, Fujita H, Asano Y, Tada Y, Kadono T, Sato S. The role of IL-32 in cutaneous T-cell lymphoma. *J Invest Dermatol* 査読有、134(5): 1428-1435, 2014.
DOI: 10.1038/jid.2013.488.

〔学会発表〕(計 4 件)

記村貴之、菅谷 誠、Andrew Blauvelt、大河内仁志、佐藤伸一. Delayed wound healing due to increased interleukin-10 expression in mice with lymphatic dysfunction. 研究皮膚科学会第75回年次学術大会 2012年05月09日～2012年05月12日
ローリー、アメリカ合衆国

菅谷 誠、記村貴之、Andrew Blauvelt、大河内仁志、佐藤伸一. Delayed wound healing and impaired tumor immunity in mice with lymphatic dysfunction. 日本研究皮膚科学会第37回年次学術大会・総会 2012年12月07日～2012年12月09日 那覇

菅谷 誠. リンパ管機能不全が皮膚免疫に与える影響. 第112回皮膚科学会総会(招待講演) 2013年06月14日～2013年06月16日
横浜

菅谷 誠. リンパ流障害と皮膚免疫. 第39回日本リンパ学会総会(招待講演) 2015年3月27日～2015年3月28日 東京

〔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〕
ホームページ等
特になし

6. 研究組織

(1)研究代表者
菅谷 誠 (SUGAYA, Makoto)
東京大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号: 90334408