

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 24 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461682

研究課題名(和文) 骨髄由来抑制細胞をターゲットとした悪性黒色腫新規免疫療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel immunotherapy for malignant melanoma by targeting MDSC.

研究代表者

藤村 卓 (Fujimura, Taku)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：50396496

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍内MDSC、腫瘍随伴マクロファージのマウス黒色腫における抗腫瘍効果はPD-L1の発現のみでなくマクロファージから産生されるケモカインの変化が重要であることが明らかとなった。ケモカインの変化により、腫瘍内に導入される制御性T細胞の比率が大きく変動し、抗腫瘍効果に大きな影響を与えること、マクロファージが治療のターゲットとなりうることを明らかとした。この結果は2015年、Oncoimmunologyに掲載されている。さらにマクロファージからのこれらケモカインの産生が人で検証し、2015年にJ Invest Dermatolに2報、2016年にExp Dermatolに2報報告した。

研究成果の概要(英文)：Our present study revealed that, not only the expression of PD-L1, but also the production of chemokine is important to modify the immunosuppressive microenvironment in B16F10 melanoma model. In addition, on human M2 macrophages, the expression of PD-L1 could be decreased by the treatment of several immune therapy for metastatic melanoma. We published these data at Oncoimmunology in 2015. Moreover, we further investigated tumor-associated macrophages in the series of skin tumor, including invasive and non-invasive extramammary Paget's disease and mycosis fungicides. These data was published at Journal of Investigative Dermatology and Experimental Dermatology in 2015 and 2016.

研究分野：皮膚科

キーワード：腫瘍随伴マクロファージ 制御性T細胞 MDSC 悪性黒色腫 PD-L1 ケモカイン

1. 研究開始当初の背景

悪性黒色腫の早期発見頻度は、皮膚科医を中心とした種々の啓蒙活動の結果、本邦では年々上昇している。しかし、悪性黒色腫の速い進展のために、発見時に全身に転移を認める症例や術後に再発し死の転帰をとる症例が数多く存在することも事実である。悪性黒色腫はその免疫原性より腫瘍特異的免疫細胞の誘導が数多く試みられてきた。これらの結果は、免疫療法の成否には従来より提唱されていた(1)腫瘍特異的エフェクター細胞の誘導と(2)腫瘍抗原の修飾だけでは不十分で、(3)腫瘍環境における免疫寛容の破綻が必須であることを示唆している。

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。また、MDSC を担癌マウスに導入することすなわち 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、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ていた。

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 MDSC 上の免疫抑制分子 (B7H1/PD-L1) 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により検討する。また、制御性 T 細胞をマウス生体内で除去することおよび B7H1 を生体内でブロックすることの、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 細胞および MDSC の抗腫瘍効果への関与を検討する。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、B7H1 陽性 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ことを目的にする。

3. 研究の方法

マウス悪性黒色腫モデルである *ret*, B16 を用いることにより、(1)マウス悪性黒色腫は *in vivo* において、PD-L1 をブロックすることにより、腫瘍の生着もしくは増殖を抑制できるか、(2)PD-L1 を *in vivo* で投与することにより、制御性 T 細胞と MDSC の数、フェノタイプの変化を変化させるかどうか、(3)PD-L1 投与により誘導された MDSC、制御性 T 細胞が *in vitro* において T 細胞の増殖を直接抑制するかどうか、(4)もし、T 細胞抑制に影響があるのなら、これが何を介して変化しているのかを PD-L1、CD39/CD73 を中心に検討する、(5)これら制御性 T 細胞、MDSC

の変化がサイトカイン産生能など担癌体の免疫寛容に関わるファクターに影響を与えるかどうか、を明らかにする。

4. 研究成果

本研究により、腫瘍内 MDSC、腫瘍随伴マクロファージの B16F10melanoma における抗腫瘍効果は、PD-L1 のマクロファージ側では関連に乏しく、むしろマクロファージから産生されるケモカインの変化が重要であることが明らかとなった。このケモカインの変化により、腫瘍内に導入される制御性 T 細胞の比率が大きく変動し、これが各種薬剤の抗腫瘍効果の発現に大きな影響を与えること、マクロファージが治療のターゲットとなりうることを明らかとした。この結果は 2015 年、*Oncoimmunology* に掲載されている。さらにマクロファージからのこれらケモカインの産生が人の皮膚ガンでどのようになっているかを検証し、乳房外パジェット病、菌状息肉腫におけるケモカインの変化を 2015 年に *J Invest Dermatol* に 2 報、2016 年に *Exp Dermatol* に 2 報報告した。

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 20 件)

1. Fujimura T, Kambayashi Y, Kakizaki A, Furudate S, Aiba S. RANKL expression is a useful histochemical marker for differentiation of pagetoid squamous cell carcinoma in situ from Extramammary Paget's Disease. *J Cut Pathol* 2016, in press. 査読あり
2. Furudate S, Fujimura T, Kakizaki A, Hidaka T, Asano M, Aiba S. Tumor-associated M2 macrophages in mycosis fungoides acquired immunomodulatory function by interferon alpha and interferon gamma. *J Dermatol Sci* 2016, in press. 査読あり
3. Fujimura T, Kambayashi Y, Furudate S, Kakizaki A, Hidaka T, Asano M, Aiba S. Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL)/RANK signaling promotes cancer-related inflammation through M2 macrophages. *Exp Dermatol* 2016, 25: 397-399. 査読あり. doi: 10.1111/exd.12949.
4. Furudate S, Fujimura T, Kakizaki A, Kambayashi Y, Asano M, Watabe A, Aiba S. The possible interaction between periostin expressed by cancer stroma and tumor-associated macrophages in developing mycosis fungoides. *Exp Dermatol* 2016; 25: 107-112. 査読あり. doi: 10.1111/exd.12873.
5. Fujimura T, Furudate S, Kakizaki A, Kambayashi Y, Haga T, Hashimoto A,

- Aiba S. Contact immunotherapy enhances the therapeutic effect of nivolumab in treating with in-transit melanoma: two cases reports. *J Dermatol* 2015, in press. 査読あり. doi: 10.1111/1346-8138.13229.
6. Kakizaki A, Fujimura T, Furudate S, Kabayashi Y, Yamauchi T, Yagita H, Aiba S. Immunomodulatory effect of peritumoral administration of interferon-beta on melanoma through tumor-associated macrophages. *Oncoimmunology* 2015; e1047584. 査読あり.
 7. Fujimura T, Kabayashi Y, Furudate S, Asano M, Kakizaki A, Aiba S. Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL) promotes the production of CCL17 from RANK+ M2 macrophages. *J Invest Dermatol* 2015;135: 2884-2887. 査読あり. doi: 10.1038/jid.2015.209.
 8. Kabayashi Y, Fujimura T, Furudate S, Asano M, Kakizaki A, Aiba S. The possible interaction between receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL) expressed by extramammary Paget cells and its ligand on dermal macrophages. *J Invest Dermatol* 2015; 135: 2547-50. 査読あり. doi: 10.1038/jid.2015.199.
 9. Kakizaki A, Fujimura T, Kabayashi Y, Furudate S, Aiba S. Comparison of CD163⁺ macrophages and CD206⁺ cells in the lesional skin of CD30⁺ lymphoproliferative disorders: lymphomatoid papulosis and primary cutaneous anaplastic large-cell lymphoma. *Acta Derm Venereol* 2015, 600-602. 査読あり. doi: 10.2340/00015555-2016.
 10. Furudate S, Fujimura T, Ishibashi M, Aiba S. Epidermotropic diffuse large B-cell lymphoma infiltrating in the umbilicus, presenting as Sister Mary Joseph Nodule. *J Eur Acad Derm Venereol* 2015, in press. 査読あり. doi: 10.1111/jdv.13217.
 11. Fujimura T, Kabayashi Y, Furudate S, Kakizaki A, Haga T, Hashimoto A, Aiba S. Immunomodulatory effects of peplomycin on immunosuppressive and cytotoxic cells in the lesional skin of cutaneous squamous cell carcinoma. *Dermatology* 2015, 230: 250-255. 査読あり. doi: 10.1159/000369166.
 12. Takahashi T, Fujimura T, Kabayashi Y, Numata Y, Aiba S. Isolated collagenoma developing on the scalp. *Eur J Dermatol* 2014; 24: 704-6. 査読あり. doi: 10.1684/ejd.2014.2445.
 13. Furudate S, Fujimura T, Kabayashi Y, Kakizaki A, Aiba S. Comparison of CD163⁺ CD206⁺ M2 macrophages in the lesional skin of bullous pemphigoid and pemphigus vulgaris: the possible pathogenesis of bullous pemphigoid. *Dermatology* 2014, 229: 369-378. 査読あり. doi: 10.1159/000365946.
 14. Fujimura T, Kabayashi Y, Furudate S, Kakizaki A, Aiba S. CD163⁺ M2 macrophages induce eosinophils and Th2 polarization in the lesional skin of eosinophilic cellulitis. *Eur J Dermatol* 2014, 24: 180-5. 査読あり. doi: 10.1684/ejd.2014.2283.
 15. Fujimura T, Kabayashi Y, Furudate S, Kakizaki A, Aiba S. Immunomodulatory effect of bisphosphonate risedronate sodium on CD163⁺ Arginase1⁺ M2 macrophages: the development of a possible supportive therapy for angiosarcoma. *Clin Dev Immunol* 2013; 2013: 325412. 査読あり. doi: 10.1155/2013/325412
 16. Furudate S, Fujimura T, Kabayashi Y, Aiba S. Immunosuppressive and Cytotoxic Cells in Invasive versus Non-invasive Bowen's Disease. *Acta Derm Venereol* 2014; 94: 337-339. 査読あり. doi: 10.2340/00015555-1729.
 17. Tojo G, Fujimura T, Kawano M, Ogasawara K, Kabayashi Y, Furudate S, Mizuashi M, Aiba S. Comparison of IL-17 producing cells in different clinical types of alopecia areata. *Dermatology* 2013, 227: 77-82. 査読あり. doi: 10.1159/000353159.
 18. Kabayashi Y, Fujimura T, Furudate S, Hashimoto A, Haga T, Aiba S. Comparison of immunosuppressive cells and cytotoxic cells in angiosarcoma: the development of a possible supportive therapy for angiosarcoma. *Dermatology* 2013, 227: 14-20. 査読あり. doi: 10.1159/000351316.
 19. Fujimura T, Furudate S, Kabayashi Y, Aiba S. Potential use of bisphosphonates in invasive extramammary Paget's disease: an immunohistochemical investigation. *Clin Dev Immunol* 2013, 164982. 査読あり. doi: 10.1155/2013/164982.
 20. Kabayashi Y, Fujimura T, Aiba S. Comparison of immunosuppressive cells and immunomodulatory cells in keratoacanthoma and invasive squamous cell carcinoma. *Acta Derm Venereol* 2013, 93: 663-668. 査読あり. doi: 10.2340/00015555-1597.
- [学会発表](計 6件)
1. Taku Fujimura, Aya Kakizaki, Sadanori Furudate, Yumi Kabayashi, Takeshi Yamauchi, Hideo Yagita, Setsuya Aiba.

- IFN-β Augments PD-1 Abs Therapy in B16F10 Melanoma. 26 th annual meeting Korean Society of Investigative Dermatology. 招待なし. 2016/3/24-2016/3/26. ソウル、韓国
2. 藤村 卓. 進化する悪性黒色腫治療戦略:基礎から臨床へ. 第 34 回日本臨床皮膚外科学会. 招待あり. 2016/3/5-2016/3/6. ホテル阪急エキスポパーク、大阪.
3. Taku Fujimura, Sadanori Furudate, Aya Kakizaki, Yumi Kambayashi, Setsuya Aiba. Tumor-associated macrophages and stromal factors play roles at different stages in developing mycosis fungoides. 第 40 回研究皮膚科学会. 招待なし. 2015/12/11-13. 岡山コンベンションセンター、岡山
4. Taku Fujimura, Yumi Kambayashi, Sadanori Furudate, Aya Kakizaki, Setsuya Aiba. Possible mechanisms of the crosstalk between Langerhans cells and regulatory T cells in extramammary Paget's disease by RANKL/ RANK pathways. 14 th International Workshop on Langerhans cells. 招待なし. 2015/11/5-8. 京都国際交流センター、京都
5. Taku Fujimura, Sadanori Furudate, Yumi Kambayashi, Aya Kakizaki, Setsuya Aiba. Topical administration of imiquimod modifies the profiles of tumor-associated macrophages in B16F10 melanomas. 第 45 回欧州研究皮膚科学会. 招待なし. 2015/9/9-12. ロッテルダム、オランダ
6. 藤村卓、古舘禎騎、神林由美、志藤光介、芳賀貴裕、橋本彰、相場節也. **根治切除不能悪性黒色腫 8 例に対する抗 PD-1 抗体の使用経験**. 第 31 回皮膚悪性腫瘍学会. 招待なし. 2015/7/3-4. 大阪国際会議場、大阪

〔図書〕(計 1 件)

1. Fujimura T, Enk AH. Myeloid derived suppressor cells. Immunology of the skin. Springer. 2016, 179-192.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：
 国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 取得年月日：
 国内外の別：

〔その他〕
 ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者 藤村 卓 (TAKU Fujimura)

東北大学・医学系研究科・助教
 研究者番号：50396496

(2) 研究分担者 相場節也 (SETSUYA Aiba)

東北大学・医学系研究科・教授
 研究者番号：80159269

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：