

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：37116

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860977

研究課題名(和文) CCR5を軸とした悪性黒色腫の進展メカニズムの研究

研究課題名(英文) A research of melanoma progression via CCR5 axis

研究代表者

日野 亮介 (HINO, Ryosuke)

産業医科大学・医学部・非常勤医師

研究者番号：30446116

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：当科の過去10年の手術例を検討したところ、CCR5発現の有無と明らかな予後の差、無病生存の差は得ることができなかった。また、臨床病型、腫瘍のサイズ、深達度においても一定の傾向はなく、原発巣におけるCCR5発現と悪性黒色腫の増悪、ないしCCR5発現が予後因子になりうるか、という点においては今回明らかにはできなかった。CCR5発現を増強させる生体側の因子の検索目的に、患者血清中のIL-17A, TNF- α などの炎症性サイトカインの濃度を確認した。ステージ3までの患者においては有意な差はなく、ステージ4の患者において血清IL-17Aが高い傾向にあったものの、その他には一定の傾向がみられなかった。

研究成果の概要(英文)：We could not detect any difference of prognosis or progression free survival between CCR5 expression is present or not in the resected specimens of primary tumors of melanoma patients treated in our hospital. To detect the factor for augmentation of CCR5 expression, we focused on inflammatory cytokines and checked IL-17A and TNF- α in the melanoma patients' serum. Serum IL-17A level of patient in stage 4 of CCR5 positive group is higher than negative group. However, there were no difference between positive or negative in TNF- α level in the melanoma patients' serum.

研究分野：悪性黒色腫

キーワード：悪性黒色腫 ケモカイン受容体

1. 研究開始当初の背景

悪性黒色腫は皮膚悪性腫瘍の中では悪性度が最も高く、治療にかかわらず不幸な転帰をたどる例も多い。また近年、悪性黒色腫の患者数は急速に増加しており、さらに死亡者も増加していることより重大な社会問題とも認識される。また、進行期の悪性黒色腫では有効な化学療法が少ない。そのため、多くの進行例で打つ手がないのが現状である。その一方、悪性黒色腫は免疫原性が高い腫瘍であることが知られているため多くの免疫療法が試みられているが、満足のいく安定した結果は得られていない。悪性黒色腫の細胞は多くの抑制性サイトカインを自ら分泌し、免疫抑制機構に寄与することも知られている。申請者らは進行期の悪性黒色腫患者から得られた腫瘍細胞に CCR5 が非常に高率に発現していることに着目した。乳癌患者においては CCR5 のリガンドである CCL5 の発現が予後因子になりうるという報告がある [Yaal-Hahoshen N et al: The chemokine CCL5 as a potential prognostic factor predicting disease progression in stage II breast cancer patients. Clin Cancer Res 2006]。CCR5 とそれに関連するケモカインの刺激により、悪性黒色腫の細胞はどのようなサイトカインを分泌するのか、その結果免疫抑制機構にどのように関与するか、そして、PD-L1 をはじめとした免疫抑制性分子の発現が変動するかどうか、検討することを目的とする。

2. 研究の目的

申請者は悪性黒色腫に対する手術、化学

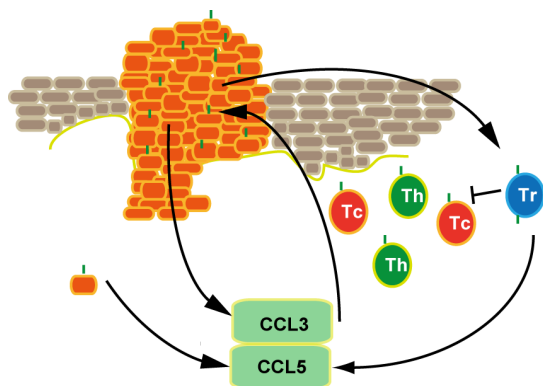
療法、免疫療法、終末期医療を多く経験してきた。その中で腫瘍に対する宿主の免疫応答、転移のメカニズムについて非常に強い関心を持っている。申請者らは一部の悪性黒色腫の腫瘍細胞で CCR5 が強く発現していることを発見した。CCR5 を軸とした腫瘍細胞からの抑制性サイトカインの産生、抑制性分子の発現、増殖能など腫瘍の進展に関わる事象を網羅的に調査し、それを阻害することで将来的な臨床応用に向けた取り組みができないか検討することを目的とする。

腫瘍細胞の転移機構にはケモカインとケモカイン受容体の相互作用が重要になるが、それぞれの意義については完全に知られてはいない。癌種によってはケモカイン受容体が増殖能や抑制性サイトカインの分泌などを介して腫瘍の進展に役割を果たしていることが証明されている。

申請者らは多数例の悪性黒色腫における PD-L1 発現を検討し、発現の強さが予後や深達度に相関することを発見し、また、進行例で腫瘍浸潤細胞や末梢血において PD-1 陽性の T 細胞が検出されることを示した [Hino R et al : Tumor cell expression of programmed cell death 1 ligand 1 is a prognostic factor for malignant melanoma. Cancer 2010]。

また、悪性黒色腫の細胞は多くの抑制性サイトカインを自ら分泌し、免疫抑制機構に寄与することも知られている。申請者らは進行期の悪性黒色腫患者から得られた腫瘍細胞に CCR5 が非常に高率に発現していることに着目した。乳癌患者においては CCR5 のリガンドである CCL5 の発現が予

後因子になりうるという報告がある [Yaal-Hahoshen N et al: The chemokine CCL5 as a potential prognostic factor predicting disease progression in stage II breast cancer patients. Clin Cancer Res 2006]。CCR5 とそれに関連するケモカインの刺激により、悪性黒色腫の細胞はどのようなサイトカインを分泌するのか、その結果免疫抑制機構にどのように関与するか、そして、PD-L1 をはじめとした免疫抑制性分子の発現が変動するかどうか、検討することを目的とする。



3. 研究の方法

(1) CCR5 を軸とした腫瘍増殖能，抑制性サイトカインの産生について

我々の検討によると、病勢が強い悪性黒色腫患者から採取した腫瘍細胞を検討したところ CCR5 を多く発現することが判明した。CCR5 を発現する悪性黒色腫の株化細胞における検討では、CCR5 のリガンドである CCL3, 5 に対する遊走能が確認できた。CCL3 または 5 による処理により抑制性サイトカインの発現や抑制性分子の発現が亢進するか、増殖能が亢進するかどうか、in vitro で検討する。また、腫瘍細胞そのものが CCL3, 5 などリガンドの生成に関与する可能性があり、腫瘍細胞からの産生能を多

くの検体で検討する。

(2) 切除標本から単離した腫瘍細胞を用いた CCR5 陽性細胞の特徴

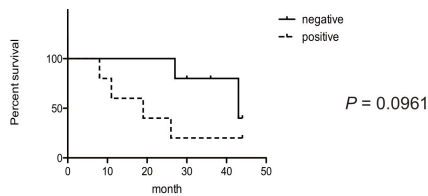
我々は、腫瘍量の多い切除標本からは腫瘍細胞を単離できる技術を有している。Cancer stem (like) cell は膜輸送タンパクが発達しており化学療法に抵抗性であり、かつ増殖・分化能をもつ。CCR5 と cancer stem cell マーカーである CD133 を二重染色することで、増殖能の高い cancer stem (like) cell の性格の有無を調べる。CCR5 が cancer stem cell に多く発現していれば、腫瘍微小環境において治療のターゲットとなる可能性がある。

(3) 腫瘍細胞における CCR5 発現は予後因子となるか

当科にて施行された手術標本において、CCR5 発現についてその強度、頻度を腫瘍細胞で確認するとともに、臨床病期や経過とどのように相関するか確認する。

4. 研究成果

手術で得られた標本で検討したところ、CCR5 の発現は全く発現していないもの、強発現しているものなど様々なものであった。CCR5 発現の有無で 2 群にわけ、検討することにした。まず、CCR5 発現は予後に関係するかどうかを検討するために、当科にて施行された手術標本において、CCR5 発現についてその強度、頻度を腫瘍細胞で確認するとともに、臨床病期や経過とどのように相関するか、パイロット的に年齢、性別、をマッチさせたステージ 3 の悪性黒色腫の 10 例における原発巣で検討したところ CCR5 発現が強い例において予後が短い傾向にあった。



そこで、当科の過去 10 年における手術例を同様に検討したところ、明らかな予後の差、無病生存の差は得ることができなかった。

また、臨床病型、腫瘍のサイズ、深達度においても陽性群、陰性群で比較しても明らかな差はなかった。以上の結果より、原発巣における CCR5 発現と悪性黒色腫の増悪、ないし CCR5 発現が予後因子になりうるか、という点においては今回明らかにはできなかった。

別の検討において、遠隔転移がある例など、腫瘍細胞を複数回採取する機会がある例において、CCR5 発現の有無について検討した。腫瘍の増悪、進展とともに CCR5 発現が増強してきた例を数例確認できた。

そのため、CCR5 発現を増強させる生体側の因子があるか否かを検討することとし、患者血清中の IL-17A, TNF- α などの炎症性サイトカインの濃度との相関をみるため、ELISA 法にて確認した。CCR5 陽性群と陰性群で比較したところ、ステージ 3 までの患者においては有意な差はなく、ステージ 4 の患者において血清 IL-17A が高い傾向にあったものの、

その他には一定の傾向はみられなかった。切除標本から分離した CCR5 を発現していない腫瘍細胞を培養し、ヒト IL17A で処理したが CCR5 の発現は誘導できなかった。

今回の一連の研究において CCR5 が発現する臨床的意義については十分に見いだすことができなかった。その結果をふまえ、予定していた研究内容をすべて網羅できなかったことは反省点として残る。

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 0 件)

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

日野 亮介 (HINO Ryosuke)

産業医科大学・医学部・非常勤医師

研究者番号： 30446116