

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893052

研究課題名(和文)皮膚悪性リンパ腫におけるB細胞の腫瘍増殖、腫瘍免疫逃避機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of B cell involvement in progression and immune evasion in cutaneous lymphoma

研究代表者

宮垣 朝光 (MIYAGAKI, Tomomitsu)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：50582003

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：皮膚T細胞リンパ腫患者の末梢血中においては、制御性B細胞および制御性B細胞を含んでいる分画の割合が減少しており、それらの数は病勢マーカーと逆相関を示しており、皮膚T細胞リンパ腫の進展に關与している可能性が示唆された。

また、皮膚T細胞リンパ腫の病変部皮膚、血中ではVEGF-Aの発現が上昇しており、病勢マーカー、痒みの程度をあらわすマーカーと相関していたことより、VEGF-Aが皮膚T細胞リンパ腫の進展及び痒みの発現に關与している可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：The ratios of IL-10-producing regulatory B cells, CD24(hi)CD27(+) B cells, and CD24(hi)CD38(hi) B cells were significantly decreased in peripheral blood of patients with CTCL. The numbers of them were significantly inversely correlated with serum LDH levels, one of the disease severity markers of CTCL. Thus, regulatory B cells might be associated with progression of CTCL. The expression levels of VEGF-A in lesional skin and sera in patients with CTCL were significantly elevated. VEGF-A expression levels were correlated with CCL27 expression levels in lesional skin, one of the disease severity markers, and clinical and serological markers for pruritus. Thus, VEGF-A can be associated with disease progression and pruritus in CTCL.

研究分野：医歯薬学

キーワード：皮膚悪性リンパ腫 B細胞 サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

(1) 皮膚悪性リンパ腫とは、初診の時点で皮膚以外の臓器に病変を認めないリンパ腫である。その大部分はT細胞が腫瘍化した皮膚T細胞リンパ腫(cutaneous T cell lymphoma; CTCL)であるが、B細胞やNK細胞、形質細胞様樹状細胞のリンパ腫も存在する。治療法や予後は腫瘍細胞の種類や浸潤形態などで異なるが、多剤併用化学療法を含めた複数の治療に抵抗性であり、診断確定後数年以内に患者が死亡するケースも少なくない。また、徐々に進行するケースでも、原病や治療に伴う免疫抑制状態による感染症の合併、皮膚病変の潰瘍化などにより、患者のQOLの低下がしばしば見られる。それゆえ、皮膚悪性リンパ腫、特に頻度の高いCTCLの病態生理の解明と、それに基づいた有効性の高い新規治療薬の開発が望まれている。

(2) 癌細胞には免疫システムに認識される癌関連抗原が存在することが知られている。免疫監視機構から逃避して増殖し、顕在化した癌組織に対してはこのような癌抗原を標的とした免疫反応が存在することが予想される。しかしながら、実際に癌患者で認められる癌抗原に対する免疫反応は多くの場合極めて微弱である。その理由として、腫瘍細胞や腫瘍周囲のストローマ細胞、免疫担当細胞、それらによって産生されたサイトカインやケモカインなどの液性因子によって構成される腫瘍微小環境では免疫細胞の機能を抑制するメカニズムが存在することが近年の研究により明らかになった。皮膚悪性リンパ腫は、病初期は皮膚においてのみリンパ腫細胞が増殖するという特異な疾患であり、さらに様々なサイトカインやケモカイン、それらを産生する細胞がその病態に関与していることから、皮膚悪性リンパ腫においても同様の腫瘍微小環境が存在すると考えられている。

(3) B細胞は抗体を産生し、免疫を促進的に制御することが広く知られてきた。それ以外にも、抗原提示能、サイトカイン産生能を介してT細胞の活性化させ、免疫応答を促進させている。一方、炎症反応を抑制する制御性B細胞が存在することが報告されている。以前より、T細胞が腫瘍免疫逃避機構において、重要な役割を果たしていることは知られていたが、近年、B細胞も腫瘍の成長を促すサイトカインの産生、抑制性サイトカイン(IL-10やTGF- β など)の産生を介する腫瘍免疫抑制、制御性T細胞の誘導などの機能を有しており、腫瘍増殖、腫瘍免疫逃避機構において重要な役割を果たしていることが報告された。従って、CTCLにおいても、B細胞が腫瘍増殖、腫瘍免疫逃避機構に関与している可能性が考えられ、新たな治療のターゲットとなることが想定される。

2. 研究の目的

前述のとおり、CTCLに対する治療は確立していない。本研究の目的は、皮膚悪性リンパ腫患者の末梢血中におけるB細胞によるサイトカインの産生能の検討、およびマウスのリンパ腫細胞株に対するB細胞の影響をin vitroでの共培養系やマウスへ細胞株を接種させるin vivoの系で検討を行うことにより、CTCLにおけるB細胞の役割を明確にし、CTCLに対する新規治療法に結び付けることである。

3. 研究の方法

(1) CTCL患者の末梢血中B細胞の検討

CTCL患者よりヘパリン採血を行い、ficollを用いて密度勾配遠心分離法にて末梢血中単核球(PBMC)を分離する。回収したPBMC上のCD19、CD24、CD27、CD38の発現をフローサイトメトリー法にて測定し、CTCL患者の末梢血中のB細胞分画を検討した。

上記と同様に回収したPBMCをCpG、抗CD40抗体で48時間刺激し、後半5-6時間でPMA、ionomycin+brefeldin Aを追加し、刺激して、IL-10の発現を誘導した。その後、細胞内フローサイトメトリー法にてIL-10の発現を検討した。

、得られたB細胞分画およびB細胞からのIL-10産生のデータと皮膚悪性リンパ腫の病態やTh2環境を反映する種々のマーカー、血中サイトカイン、ケモカイン値との相関を調べた。相関にはスピアマンの順位相関係数を用いた。

(2) CTCL患者におけるB細胞からも産生される血管増殖因子VEGF-Aの関与の検討

CTCLの患者の血清及び病変部皮膚組織を用いて、ELISA法、quantitative RT-PCR法にて、VEGF-Aの発現を検討した。

血清中および組織中VEGF-Aの発現と種々の臨床データ、サイトカイン値、ケモカイン値との相関について検討を加えた。

4. 研究成果

(1) CTCL患者の末梢血中B細胞の検討

CTCL患者では健常人と比較して、制御性B細胞を含むCD19(+)CD24(hi)CD27(+)B細胞およびCD19(+)CD24(hi)CD38(hi)B細胞の分画の割合が減少していた。

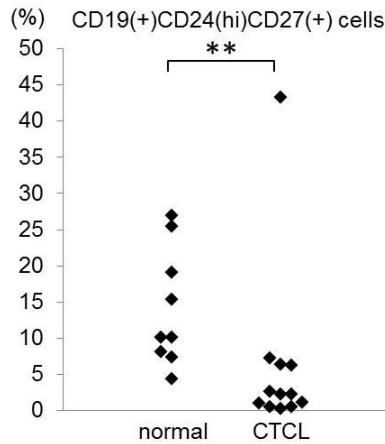


図 1 . CD19(+)
CD24(hi)CD27(+)
B 細胞の割合

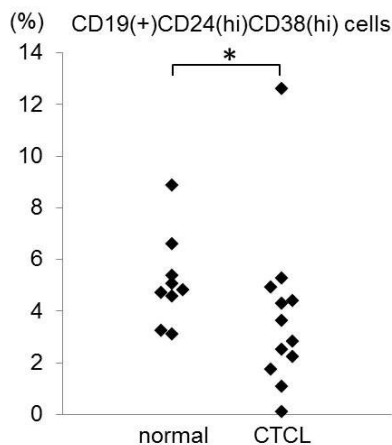


図 2 . CD19(+)
CD24(hi)CD38(hi)
B 細胞の割合

CTCL 患者では末梢血中の IL-10 産生制御性 B 細胞の割合が減少していた。

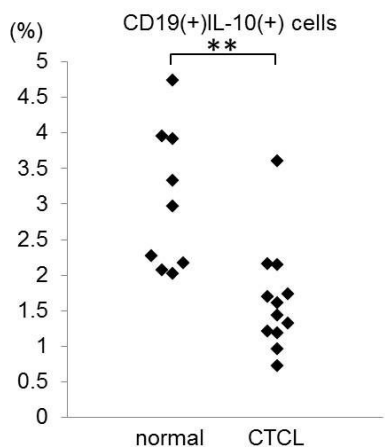


図 3 . CD19(+)
IL-10(+)
B 細胞の割合

CTCL 患者の末梢血中の CD19(+)
CD24(hi)CD27(+)
B 細胞数、
CD19(+)
CD24(hi)CD38(hi)
B 細胞数、
CD19(+)
IL-10(+)
B 細胞数は CTCL の血清マーカーである LDH と逆相関を認めた。

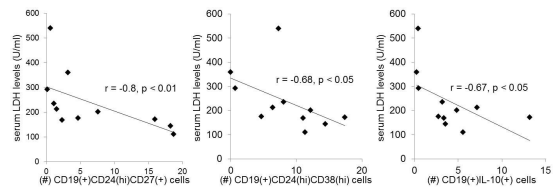


図 4 . 各種 B 細胞分画と血清 LDH 値の逆相関

以上の結果より、制御性 B 細胞が CTCL の病勢に関与している可能性が考えられた。

(2)CTCL 患者における B 細胞からも産生される血管増殖因子 VEGF-A の関与の検討

CTCL 病変部組織において、VEGF-A mRNA の発現は上昇しており、病勢マーカーである CCL27 の発現と相関を認めた。

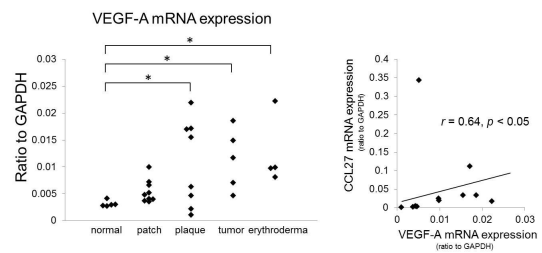


図 5 . CTCL 病変部における VEGF-A mRNA の発現と CCL27 mRNA の発現との相関

CTCL 患者の血清中 VEGF-A 値は上昇しており、痒みのマーカーである VAS スコア、血清 IgE 値、血清 NGF 値と相関を認めた。

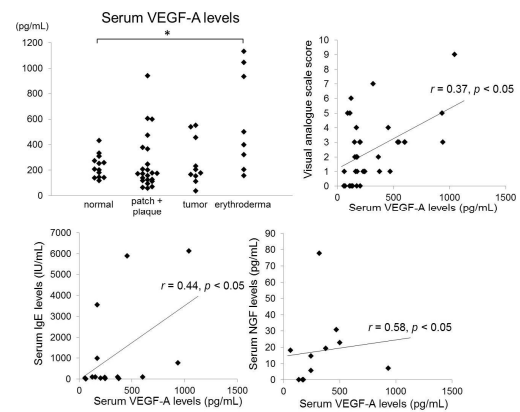


図 6 . 血清中 VEGF-A 値と痒みのマーカーとの相関

以上の結果より、VEGF-A は CTCL 患者の病勢進行およびかゆみの発現に関与している可能性が考えられた。

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 9 件)

Miyagaki T, Sugaya M, Oka T, Fujita H, Sato S. Serum chemokine levels

differentially regulated by vorinostat in a Sézary syndrome patient. **Br J Dermatol**, 査読有、173 巻、2015、620-622、doi: 10.1111/bjd.13696

Miyagaki T, Sugaya M. Recent advances in atopic dermatitis and psoriasis: genetic background, barrier function, and therapeutic targets. **J Dermatol Sci**, 査読有、78 巻、2015、89-94、doi: 10.1016/j.jdermsci

Miyagaki T, Fujimoto M, Sato S. Regulatory B cells in human inflammatory and autoimmune diseases: from mouse models to clinical research. **Int Immunol**, 査読有、27 巻、2015、495-504、doi: 10.1093/intimm/dxv026

〔学会発表〕(計 6 件)

Miyagaki T. Serum chemokine levels differentially regulated by vorinostat in a Sézary syndrome patient. **EORTC Cutaneous Lymphoma Clinical Meeting**. Paris, France. Oct, 2014.

Miyagaki T. VEGF-A and PlGF are involved in progression of cutaneous T-cell lymphoma (CTCL). **The 74th Annual Meeting of the Society for Investigative dermatology**. Atlanta, GA, USA. May, 2015.

〔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〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮垣 朝光 (MIYAGAKI, Tomomitsu)
東京大学医学部附属病院・講師

研究者番号 : 50582003

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし