

令和 3 年 5 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：2019～2020

課題番号：19K23906

研究課題名(和文)皮膚リンパ腫におけるOX40の役割の検討

研究課題名(英文)The role of OX40 in cutaneous lymphoma

研究代表者

上條 広章(Kamijo, Hiroaki)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80843820

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：未だ進行期の生存率が極めて低い皮膚T細胞リンパ腫において新規治療ターゲットとしてOX40に着目した。我々の研究により、菌状息肉症やセザリ-症候群の腫瘍細胞において、OX40とOX40リガンドが共発現しており、それらの相互作用が腫瘍の増殖・生存に関与していることが解明された。このことからOX40-OX40Lの相互作用を阻害することにより皮膚T細胞リンパ腫の治療につながる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

皮膚T細胞リンパ腫は根治的な治療で未だ確立されたものはなく、進行期の生存率は極めて低い疾患である。それ故、新たな治療の開発が急務である。今回我々は、OX40-OX40L相互作用がリンパ腫腫瘍細胞の増殖、生存を促進しており、それら相互作用を阻害することで腫瘍細胞の増殖が抑制されることを解明した。このことからOX40-OX40L相互作用は皮膚T細胞リンパ腫の新規治療ターゲットとなりうる可能性が示唆され、また今回得られた知見が他のリンパ腫などの悪性腫瘍にも応用できる可能性が考えられる。

研究成果の概要(英文)：OX40L was aberrantly expressed in cutaneous T-cell lymphoma (CTCL) cells, in addition to OX40. Blockade of OX40-OX40L interactions between tumor cells decreased cell proliferation, survival, and in vivo growth. Therefore, OX40-OX40L interactions may play important roles in tumorigenesis of CTCL and thus potentially be therapeutic targets for this life-threatening disease.

研究分野：皮膚T細胞リンパ腫

キーワード：皮膚T細胞リンパ腫 OX40

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

皮膚T細胞リンパ腫 (cutaneous T-cell lymphoma: CTCL) は皮膚病変を初発症状とするT細胞リンパ腫で、根治的な治療で未だ確立されたものではなく、進行期の生存率は極めて低い疾患である。進行期の化学療法の効果は限定的で根治的な治療ではなく、新たな治療の開発が必要とされている。近年悪性腫瘍に対するがん免疫療法、即ち免疫チェックポイント阻害薬の有効性が報告され、臨床応用されており、新たな免疫チェックポイント分子として複数の治療ターゲットとなりうる候補分子が同定されている。しかしCTCLにおいては本来腫瘍免疫を担当するT細胞が腫瘍化しており、腫瘍細胞自体が免疫チェックポイント分子を利用し腫瘍進展に関与している可能性がある。CTCLの病態を解明し、新たな治療ターゲットを提案するために、免疫調整機能を担う分子OX40 (CD134)とそのリガンドであるOX40リガンド (OX40L)の役割について解析する。

(1)皮膚T細胞リンパ腫の病態解明および新規治療法開発の必要性

皮膚T細胞リンパ腫 (cutaneous T-cell lymphoma: CTCL) は皮膚を原発とする悪性リンパ腫で、代表疾患として菌状肉腫が挙げられる。未だ病因は解明されておらず、進行例では生命予後不良で、予後を大きく改善する確立された治療はない。それゆえ、菌状肉腫の病態解明と既存の治療とは異なる機序を標的とした新規治療薬の開発が切に望まれている。

(2)CTCLにおけるがん免疫療法の課題

これまでに免疫チェックポイント分子、共刺激分子は多数報告されているが、それぞれの分子のがん免疫への関与や、免疫恒常性維持への関与の度合いはその分子を発現する細胞によって大きく異なる。CTCLにおけるがん免疫療法を検討する上では、どの分子が最も適した免疫チェックポイント分子、共刺激分子となり得るのか同定することが重要となる。しかしながらCTCLにおいては、ほかの悪性腫瘍と異なり、腫瘍細胞自体が免疫機構を担うT細胞であるという特異性を考えなければならない。CTCLにおけるがん免疫療法を開発する上では、腫瘍化したT細胞に発現する分子を解析し、それぞれの分子の抗腫瘍免疫への関与や腫瘍細胞間の相互作用について解析する必要がある。研究代表者らは以前、プロモドメイン阻害薬JQ1が腫瘍免疫に関わるCCR4のCTCLの腫瘍細胞における発現にもたらす影響を検討している (Kamijo H et al Arch Dermatol Res. 2017)。

(3) 新たな免疫チェックポイント調整因子OX40の役割

OX40は腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーに属し、活性化したT細胞に発現する。一方、そのリガンドOX40Lは活性化B細胞や樹状細胞などの抗原提示細胞に発現する。T細胞上のOX40にOX40Lが結合することにより、T細胞が活性化し増殖やサイトカイン産生が促進される。それ故、OX40アゴニスト抗体はT細胞の活性化を介した抗腫瘍免疫を増強し、抗腫瘍効果を発揮することから抗腫瘍薬として様々な悪性腫瘍で臨床応用され始めている。興味深いことにヒトT細胞白血病ウイルス1型に感染したT細胞ではOX40とOX40Lが共発現しており、Taxというウイルスタンパク質によりそれらの発現が誘導されていることが報告されている (Takasawa N et al Jpn J Cancer Res. 2001)。また成人T細胞白血病/リンパ腫では、腫瘍細胞がOX40を発現し、OX40L刺激により腫瘍細胞の血管内皮に対する接着が誘導される (Imura A et al Blood. 1997)。以上からOX40-OX40L相互作用は成人T細胞白血病/リンパ腫において腫瘍進展に有利に働いていると考えられる。またOX40と同じ腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーに属するCD137とそのリガンドCD137リガンドの相互作用が、CTCLにおいて腫瘍進展に有利に働いていることを研究者代表は報告している (Kamijo H et al Blood. 2018)。このようにOX40とOX40Lの相互作用がT細胞腫瘍であるCTCLの病態において大きく関与していることが想定される。

2. 研究の目的

CTCLの病態を解明し、新たな治療ターゲットとなりうる分子を見出すことである。

3. 研究の方法

CTCLの腫瘍細胞においてOX40とOX40Lが腫瘍増殖に関わる可能性を検討するため、末梢血中や病変部皮膚においてCTCL腫瘍細胞のOX40とOX40Lの発現を免疫染色、定量的RT-PCR、フローサイトメトリーで解析する。可溶性OX40や可溶性OX40Lの関与を検討するためCTCL患者血清中の可溶性OX40や可溶性OX40Lの濃度をELISAにて測定する。CTCLの腫瘍細胞でOX40やOX40Lの発現が見られたら、CTCLのcell lineを用いてOX40やOX40Lに対する中和抗体やリコンビナントOX40Lタンパクによりin vivo、in vitroで腫瘍増殖に関わるかを解析する。具体的には以下の方法を用いる。

(1)免疫染色によるCTCL病変部皮膚のOX40やOX40Lの発現の解析

CTCL患者および健常者の皮膚組織を用いてOX40やOX40Lの発現を免疫染色で解析する。400倍拡大視野で3か所の視野をランダムに選び、陽性細胞数を平均して比較検討する。

(2)定量的RT-PCRによるCTCL病変部皮膚のOX40やOX40Lの発現の解析

CTCL患者および健常者の皮膚におけるOX40やOX40LのmRNA発現を定量的RT-PCR法で測定する。CTCLの病勢マーカーとして知られるCCL17の発現との相関を解析する。

(3)フローサイトメトリーによるヒト末梢血異型リンパ球のOX40、OX40Lの発現の解析

セザリ-症候群の末梢血単核球を分離し、フローサイトメトリーでCD4陽性CD7陰性の異型リンパ球のOX40とOX40Lの発現を解析する。

(4)ELISA法による血清中の可溶性OX40と可溶性OX40Lの解析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

CTCL 患者および健常者より提供頂いた血清を-80 のフリーザーに凍結保存する。溶解した血清中の可溶性 OX40、可溶性 OX40L について、ELISA キットを用いて濃度を解析する。

(5)CTCL cell line の抗 OX40/OX40L 抗体投与時の細胞増殖、生存への影響を解析

CTCL ヒト細胞株である、Myla cell, SeAx cell, Hut78 cell, MJ cell, HH cell を所有しており、抗 OX40 中和抗体や抗 OX40L 中和抗体で相互作用をブロックすることや、リコンビナント OX40L タンパクを用いて *in vitro* での細胞増殖、生存の変化を解析する。

(6)*in vivo* での CTCL cell line の抗 OX40/OX40L 中和抗体投与時の腫瘍増殖の解析

CTCL ヒト細胞株 5 種 (Myla, SeAx, Hut78, MJ, HH) の中で 5) の中で中和抗体投与による細胞増殖への影響が大きかった細胞株を選択して用いる。免疫不全マウスの SCID マウスに腫瘍を皮下注射して、抗 OX40 中和抗体や抗 OX40L 中和抗体を加えて *in vivo* での腫瘍増殖の変化を解析する。

4. 研究成果

(1)免疫染色による CTCL 病変部皮膚の OX40 や OX40L の発現の解析

CTCL 患者および健常者の皮膚組織を用いて OX40 や OX40L の発現を免疫染色で解析したところ、CTCL 病変部の腫瘍細胞にて OX40 及び OX40L の発現が確認できた。また 400 倍 1 視野当たりの陽性細胞数をカウントして評価したところ、病期が進行するにつれて陽性細胞数が増加していた。

(2)定量的 RT-PCR による CTCL 病変部皮膚の OX40 や OX40L の発現の解析

CTCL 患者および健常者の皮膚における OX40 や OX40L の mRNA 発現を定量的 RT-PCR 法で測定したところ、CTCL 病変部にて OX40 と OX40L の mRNA 発現の有意な上昇がみられた。また OX40 と OX40L の mRNA 発現量は有意に正の相関関係にあった。

(3)フローサイトメトリーによるヒト末梢血異型リンパ球の OX40、OX40L の発現の解析

セザリ-症候群の末梢血単核球を分離し、フローサイトメトリーで CD4 陽性 CD7 陰性の異型リンパ球の OX40 と OX40L の発現を解析したところ、異型リンパ球は OX40 と OX40L を発現していた。一方、健常人末梢血 CD4 陽性 T 細胞は OX40 を発現しているのみであった。

(4)ELISA 法による血清中の可溶性 OX40 と可溶性 OX40L の解析

CTCL 患者および健常者より提供頂いた血清中の可溶性 OX40、可溶性 OX40L について、ELISA キットを用いて濃度を解析したところ、CTCL 患者と健常人で血清中の可溶性 OX40、可溶性 OX40L 濃度についていずれも有意な変化がみられなかった。

(5)CTCL cell line の抗 OX40/OX40L 抗体投与時の細胞増殖、生存への影響を解析

CTCL ヒト細胞株である、Myla cell, Hut78 cell, HH cell を用いて、抗 OX40 中和抗体や抗 OX40L 中和抗体で OX40-OX40L 相互作用をブロックする実験を行った。Myla cell, Hut78 cell, HH cell いずれの細胞株においても、抗 OX40 中和抗体や抗 OX40L 中和抗体は有意な細胞増殖抑制効果がみられた。また Annexin V と 7-AAD を使ったフローサイトメトリー解析により、抗 OX40 中和抗体は Hut78 cell, HH cell にアポトーシスを誘導した。

(6)*in vivo* での CTCL cell line の抗 OX40/OX40L 中和抗体投与時の腫瘍増殖の解析

Hut78 cell を免疫不全マウスである NSG マウスに皮下注射し、抗 OX40 中和抗体や抗 OX40L 中和抗体を加えて *in vivo* での腫瘍増殖の変化を解析したところ、抗 OX40 中和抗体や抗 OX40L 中和抗体は有意に腫瘍形成を抑制した。

以上の結果から、CTCL 腫瘍細胞では OX40 と OX40L が過剰発現しており、腫瘍細胞同士の OX40-OX40L 相互作用を阻害することにより細胞増殖や生存能、*in vivo* での腫瘍形成能が低下した。このことは、CTCL 腫瘍細胞において OX40-OX40L 相互作用が腫瘍進展において重要な役割を担っていることが考えられる。そして、今後の CTCL や他のリンパ腫における新規治療ターゲットに OX40-OX40L 相互作用がなりうることが示唆される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------