

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成30年 5月18日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19703

研究課題名(和文)アポクリン系腫瘍における免疫寛容誘導メカニズムの解明

研究課題名(英文) Possible mechanisms of induction of immunotolerance in apocrine-origin skin tumors

研究代表者

神林 由美 (Kabayashi, Yumi)

東北大学・医学系研究科・助教

研究者番号：50755303

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究全般を通して、皮膚悪性腫瘍における腫瘍随伴性マクロファージ(Tumor-associated macrophages: TAMs)の動向を、各癌腫の間質由来タンパク、特にRANKLを中心に解析をした。その結果、本研究期間を通してImpact factorのある国際誌に11本掲載した。以上、本研究成果は当初の予想をはるかに超えた優良な結果であったと考える。

研究成果の概要(英文)：During this research period, we investigated the immunomodulatory effects of cancer stromal factors on tumor-associated macrophages (TAMs), especially focused on RANKL. For example, we have published the immunomodulatory effects of RANKL on M2 macrophages using DNA microarray analysis, suggesting that RANKL increases the characteristic chemokines, which could be related with immunosuppressive immune cells such as regulatory T cells. We have published these results on Experimental Dermatology at 2016. In addition, we found that not only M2 macrophages, but also Langerhans cells in the lesional skin of Extramammary Paget's disease expresses RANK, leading to produce CCL17 by the stimulation of soluble RANKL. We have published these results on Brit J Dermatol at 2017. In aggregate, we have published 11 research papers, all of which possesses impact factor, during our research period.

研究分野：皮膚科

キーワード：腫瘍随伴性マクロファージ RANKL 乳房外パジェット病 アポクリン腺癌

1. 研究開始当初の背景

アポクリン腺由来の皮膚悪性腫瘍である乳房外パジェット病(extramammary Paget's disease: EMPD)は、高齢者の外陰部に好発し、真皮へ浸潤すると高率にリンパ節転移、他臓器転移を引き起こす。浸潤性 EMPD は、術後補助療法として化学療法や放射線療法などが施行されるが、奏効率は低く、5年生存率は50%前後との報告もあり、予後不良である。

骨代謝調節因子 RANKL (receptor activator of nuclear factor kappa B ligand) は TNF (tumor necrosis factor) superfamily の一つで、骨芽細胞が発現している RANK 受容体と結合し、骨のリモデリングを調節する。この RANKL/RANK 経路は、アポクリン腺由来である乳腺の発育、乳汁産生に關与する他、乳癌の骨転移、腫瘍環境形成に重要な役割を果たすことが知られている。また、皮膚領域においては紫外線照射により高発現する表皮細胞の RANKL が、表皮のランゲルハンス細胞の RANK と結合することにより、CD4⁺CD25⁺ 制御性 T 細胞を皮膚局所や所属リンパ節に誘導することがマウスモデルで証明され、ランゲルハンス細胞を介した RANKL/RANK シグナルが皮膚の免疫抑制環境形成に關与することが報告されている(Loser et al. 2006, Nat Med)。

EMPD における免疫寛容: RANKL/ RANK シグナルの役割

これまで、乳癌における RANKL/RANK の発現と同様、我々は EMPD は、腫瘍細胞上に RANKL、MMP7 を発現し腫瘍間質に soluble (s)RANKL を放出していることを報告している (Kambayashi et al. 2015 J Invest Dermatol)。また、我々は、EMPD 腫瘍内では、M2 マクロファージが RANK を発現し、sRANKL 刺激により CCL17 を産生していることを報告した (Fujimura et al. 2015 J Invest Dermatol)。実際、ヒト末梢血より誘

導した M2 マクロファージは RANK を細胞表面に発現し、sRANKL の刺激により、多量の CCL17 を産生する。CCL17 は制御性 T 細胞の遊走に關わるケモカインであることから、EMPD は腫瘍内で、M2 マクロファージを中心として、抑制型の免疫環境を形成していることが推測される (Kambayashi et al. 2015 J Invest Dermatol; Fujimura et al. 2015 J Invest Dermatol)。

2. 研究の目的

上記知見に基づき、本研究期間に我々は以下の点を明らかにすることを目的とした。ヒト単球由来 M2 マクロファージを用いて、(1)M2 マクロファージを sRANKL で刺激することにより、ケモカイン、サイトカインの発現を DNA microarray および Gene set enrichment analysis (GSEA) を用いて網羅的に検討する。解析は、過去の報告 (Martinez et al. 2006 J Immunol) と同様にケモカイン活性、サイトカイン活性が統計学的有意であることを確認をした後に、腫瘍環境におけるケモカイン、サイトカイン全項目の mRNA 発現強度を明らかにする。(2) (1)の結果を定量的 PCR を用いて、DNA microarray 上のデータの統計学的な意義を検証する。(3) (2)の結果を ELISA 法を用いて、蛋白レベルで確認する。以上より、RANKL/ RANK 刺激が、ヒト M2 マクロファージ由来の細胞走化性因子にあたえる影響を in vitro で網羅的に明らかにする。

RANKL/RANK シグナルのヒトランゲルハンス細胞への影響の検討

前述した通り、表皮ランゲルハンス細胞の RANKL/ RANK シグナルが、制御性 T 細胞を皮膚局所や所属リンパ節に誘導することがマウスモデルで証明されているが、この細胞走化性因子はいまだ明らかにされていない (Loser et al. 2006, Nat Med)。また我々は、ヒト EMPD 腫瘍内のランゲルハンス細胞は RANK を発現していることを確認した。そのため我々は、臍帯血由来 CD34 陽性細胞からランゲルハンス様細胞を誘導し (Mollah et al. 2003 J Invest Dermatol)、フローサイトメトリーで細胞表面に RANK が発現することを確認した後、sRANKL で刺激し、細胞上清中のケモカインを multiplex ELISA array を用いて網羅的に検討することにより、ランゲルハンス細胞の産生しうるケモカインを明らかにする。さらに、それらのケモカインが、実際にヒト EMPD 検体のランゲルハンス細胞で産生されるのかを、蛍光抗体染色で明らかにする。**RANKL 陽性マウス乳癌モデルにおける、抗 RANKL 抗体の腫瘍随伴性マクロファ-**

ジへの影響

ヒト M2 マクロファージおよびランゲルハンス細胞の EMPD 検体内での分布と関連ケモカインが明らかとなった場合、担癌生体内でのこれらの細胞の動勢を明らかにするため、RANKL 陽性マウス乳癌細胞 (MM102D) を用いて腫瘍内の腫瘍随伴性マクロファージ、制御性 T 細胞の動勢を *in vivo* で検証する。C3H/He マウスに (MM102D) を皮下注射し生着させた 3 日後に抗 RANKL 抗体を投与し、腫瘍径が 7 mm 大に到達した時点で腫瘍を回収、腫瘍内および循環中のマクロファージを単離し、前述のケモカイン産生を ELISA で検証する。さらに、Neuro Probe AP48 chamber を用いて、この培養上清が制御性 T 細胞の走化性に関与するかを明らかにする。また、マクロファージから産生されるケモカインが担癌体の腫瘍および循環中の免疫担当細胞に与える影響をフローサイトメトリーで検証する。最終的には、RANKL 陽性腫瘍の担癌体において、抗 RANKL 抗体が制御性 T 細胞の流入を抑制することを *in vivo* で明らかにする。マウス *in vivo* で抗 RANKL 抗体の効果が証明できた場合、東北大学倫理委員会承認のもと、浸潤性 EMPD 患者に抗 RANKL 抗体を投与し、治療前後の血清中のケモカインを ELISA 法で測定して、ケモカインの動勢を明らかにする。

3. 研究の方法

RANKL/RANK 経路を介したシグナルが M2 マクロファージに及ぼす影響を、DNA microarray で解析する。また、皮膚の RANK 陽性細胞として知られるランゲルハンス様細胞においても、RANKL/RANK 経路を介したシグナルがどのような影響を及ぼすか、ヒト CD34 由来ランゲルハンス細胞を用いて検証する。次に、マウス RANKL 陽性乳癌細胞 (MM48) 担癌前後に抗 RANKL 抗体を投与し、TAMs および MDSC を分離培養、ケモカインの産生能を網羅的に検討し、このケモカインの細胞走化性を Neuro Probe AP48 chamber で検証する。さらに、現在乳癌、乳房外パジェット病などの固形癌の骨転移治療に使用されているヒト抗 RANKL 抗体が患者の血清ケモカインの動勢を明らかにし、これらケモカインが機能的バイオマーカーとなりうるか明らかにする。

4. 研究成果

本研究全般を通して、皮膚悪性腫瘍における腫瘍随伴性マクロファージ (Tumor-associated macrophages: TAMs) の動向を、各癌腫の間質由来タンパク、特に RANKL を中心に解析をした。その結果、新たに、RANKL 刺激により、

M2 マクロファージが主なサブタイプである TAMs が腫瘍進行を促進する抑制型免疫細胞を誘導するケモカインを複数種産生することが明らかとなった。これは 2016 年の *Exp Dermatol* に発表している (Fujimura T, Kambayashi Y, et al.)。また、RANK は乳房外パジェット病の腫瘍内に存在するランゲルハンス細胞にも発現しており、RANKL 刺激により制御性 T 細胞を誘導する CCL17 の産生を増加させることが明らかとなった。この結果は *Brit J Dermatol* に 2017 年に発表している (Fujimura T, Kambayashi Y, et al) 。さらに乳房外パジェット病のみでなく、アポクリン腺由来の悪性腫瘍であるアポクリン腺癌においても腫瘍自体が RANKL を発現していること、アポクリン腺癌が腫瘍内に M2 極性を持つ TAMs を豊富に持つことが明らかとなった。この結果は *Anticancer Res* に 2018 年に発表している (Kambayashi Y, Fujimura T, et al.)。さらに RANKL の発現が、病理学的に乳房外パジェット病との鑑別に困難である、パジェット様ボーエン病との鑑別に有効であることを 2016 年に *J Cutan Pathol* に報告した (Fujimura T, Kambayashi Y, et al) 。以上の研究成果を中心に、本研究期間を通して Impact factor のある国際誌に 11 本掲載したことから、本研究成果は当初の予想をはるかに超えた優良な結果であったと考える。

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 11 件)

1: Sato Y, Fujimura T, Kambayashi Y, Hashimoto A, Aiba S. Successful Treatment of Advanced Primary Cutaneous Peripheral T-Cell Lymphoma with Oral Bexarotene Monotherapy. *Case Rep Oncol*. 2018 Mar 28;11(1):212-215. doi: 10.1159/000488236. eCollection 2018 Jan-Apr. PubMed PMID: 29681823; PubMed Central PMCID: PMC5903120. 査読有

2: Fujimura T, Sato Y, Tanita K, Kambayashi Y, Otsuka A, Fujisawa Y, Yoshino K, Matsushita S, Funakoshi T, Hata H, Yamamoto Y, Uchi H, Nonomura Y, Tanaka R, Aoki M, Imafuku K, Okuhira H, Furudate S, Hidaka T, Aiba S. Serum levels of soluble CD163 and CXCL5 may be predictive markers for immune-related adverse events in patients with advanced melanoma treated with nivolumab: a pilot study.

Oncotarget. 2018 Feb 15;9(21):15542-15551. doi: 10.18632/oncotarget.24509. eCollection 2018 Mar 20. PubMed PMID: 29643991; PubMed Central PMCID: PMC5884646. 査読有

3: Tanita K, Fujimura T, Kabayashi Y, Tsukada A, Sato Y, Hashimoto A, Aiba S. Intensity-Modulated Radiotherapy Triggers Onset of Bullous Pemphigoid in a Patient with Advanced Melanoma Treated with Nivolumab. Case Rep Oncol. 2018 Feb 15;11(1):114-118. doi: 10.1159/000487127. eCollection 2018 Jan-Apr. PubMed PMID: 29606949; PubMed Central PMCID: PMC5869583. 査読有

4: Fujimura T, Kabayashi Y, Fujisawa Y, Hidaka T, Aiba S. Tumor-Associated Macrophages: Therapeutic Targets for Skin Cancer. Front Oncol. 2018 Jan 23;8:3. doi: 10.3389/fonc.2018.00003. eCollection 2018. Review. PubMed PMID: 29410946; PubMed Central PMCID: PMC5787130. 査読有

5: Kabayashi Y, Fujimura T, Furudate S, Lyu C, Hidaka T, Kakizaki A, Sato Y, Tanita K, Aiba S. The Expression of Matrix Metalloproteinases in Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B Ligand (RANKL)-expressing Cancer of Apocrine Origin. Anticancer Res. 2018 Jan;38(1):113-120. PubMed PMID: 29277763. 査読有

6: Fujimura T, Kakizaki A, Kabayashi Y, Sato Y, Tanita K, Lyu C, Furudate S, Aiba S. Cytotoxic antimelanoma drugs suppress the activation of M2 macrophages. Exp Dermatol. 2018 Jan;27(1):64-70. doi: 10.1111/exd.13417. Epub 2017 Oct 26. PubMed PMID: 28833504. 査読有

7: Fujimura T, Kabayashi Y, Furudate S, Kakizaki A, Hidaka T, Aiba S. Possible mechanisms of the crosstalk between Langerhans cells and regulatory T cells in extramammary Paget disease by receptor activator of nuclear factor kappa B (RANK) ligand/RANK pathways. Br J Dermatol. 2017 Feb;176(2):387-394. doi: 10.1111/bjd.14864. Epub 2016 Dec 22. PubMed PMID: 27411503. 査読有

8: Furudate S, Fujimura T, Kabayashi Y, Kakizaki A, Hidaka T, Aiba S.

Immunomodulatory Effect of Imiquimod Through CCL22 Produced by Tumor-associated Macrophages in B16F10 Melanomas. Anticancer Res. 2017 Jul;37(7):3461-3471. PubMed PMID: 28668835. 査読有

9: Furudate S, Fujimura T, Tsukada A, Sato Y, Hidaka T, Tanita K, Kabayashi Y, Haga T, Hashimoto A, Aiba S. Successful Treatment of Advanced Primary Cutaneous Apocrine Carcinoma on the Scrotum with Systemic Chemotherapy and Radiotherapy Followed by Denosumab. Case Rep Oncol. 2017 Jan 16;10(1):52-56. doi: 10.1159/000455091. eCollection 2017 Jan-Apr. PubMed PMID: 28203164; PubMed Central PMCID: PMC5301092. 査読有

10: Fujimura T, Kabayashi Y, Kakizaki A, Furudate S, Aiba S. RANKL expression is a useful marker for differentiation of pagetoid squamous cell carcinoma in situ from extramammary Paget disease. J Cutan Pathol. 2016 Sep;43(9):772-5. doi: 10.1111/cup.12743. Epub 2016 Jun 20. PubMed PMID: 27251225. 査読有

11: Fujimura T, Kabayashi 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 May;25(5):397-9. doi: 10.1111/exd.12949. Epub 2016 Feb 26. PubMed PMID: 27167703. 査読有

〔学会発表〕(計 3 件)

1: 神林由美 Lichen planus folliculitis tumidus と鑑別を要した小児 milia en plaque の 1 例 日本皮膚科学会宮城地方会学術大会第 381 回例会・総会 2018 年

2: 神林由美 ダブラフェニブ・トラメチニブ療法中に生じた多形紅斑重症型の 1 例 第 69 回日本皮膚科学会西部支部学術大会 2017 年

3: 神林由美 Immunomodulatory effects of classical chemotherapeutic agents for melanoma on M2 macrophages 日本研究皮膚科学会 2016 年

〔図書〕(計 0 件)

〔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 0 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

神林 由美 (KAMBAYASHI, Yumi)
東北大学・医学系研究科・助教
研究者番号：50755303