

平成 21 年 4 月 30 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19591298
 研究課題名 (和文) ヒトメラノーマにおける腫瘍拒絶能と制御性 T 細胞による腫瘍エスケープ機構の解明
 研究課題名 (英文) Analysis of T cell-mediated tumor rejection and regulatory T cell-mediated tumor escape in melanoma.
 研究代表者：
 木庭 幸子 (KINIWA YUKIKO)
 信州大学・医学部・助教
 研究者番号：20436893

研究成果の概要：

メラノーマの原発巣、転移巣ともに、制御性 T 細胞が認められ、なかでも微小転移巣に比べて、肉眼的転移巣においては、foxP3 の mRNA レベルが高かったことから、腫瘍量の増大に相関して、制御性 T 細胞が誘導されていることが示唆された。また、腫瘍細胞が CCL22 を産生していることから、CCL22 と制御性 T 細胞の CCR4 発現の interaction が、腫瘍局所における Treg 誘導のメカニズムと考えられた。いっぽう、in vitro 抗原ペプチド刺激により、TGF β の産生が認められた。未熟 DC で刺激した場合に増強した。これらの反応は、患者に比べて、健常人では TGF β の産生はほとんど認められなかったことから、メラノーマ患者では、免疫抑制的サイトカインの産生が起りやすい病態が示唆された。以上の結果から、抗原特異的免疫療法においては、刺激にもちいる樹状細胞の成熟度やペプチドの選択を慎重に行うことの重要性が明らかとなった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：皮膚腫瘍学、腫瘍免疫学

1. 研究開始当初の背景

癌患者における免疫抑制状態については、様々な検討がなされているが、近年注目されているのが制御性 T 細胞である。Sakaguchi らが報告した CD4+CD25+制御性 T 細胞はマウスにおいて見出され、末梢免疫寛容において自己反応性リンパ球の除去を行う中心的な

役割を果たし、その機能異常やイニシエーター遺伝子欠損により自己免疫性疾患を発症することが知られている。(1) 癌における制御性 T 細胞：癌との関わりにおいては、腫瘍拒絶モデルにおいて anti-CD25 抗体を用いて制御性 T 細胞を除去することによって、抗腫瘍効果が増強するという現象が報告され

た。これまでに、制御性リンパ球が抗原提示細胞によるサイトカインの産生分泌を抑制したり、共刺激分子の発現をダウンレギュレートすることや、エフェクターT細胞の増殖抑制、サイトカイン産生分泌の抑制などを通して、腫瘍に対する免疫応答を妨げることが分かっている。ヒトにおいても、メラノーマ、卵巣癌、肺癌、など固形腫瘍や血液系腫瘍に、CD4+CD25+ T細胞が高頻度に検出されたと報告されている。また、研究代表者である木庭らは、メラノーマ患者から樹立した自己腫瘍認識T細胞の中に、CD4+CD25+ 制御性T細胞が存在し、エフェクター細胞の抗腫瘍効果を妨げることを見出した(Immunity, 2004)。当然ながら、この現象から懸念されることは、抗原特異的な免疫療法において、エフェクター細胞のみならず制御性T細胞が誘導され、その結果、十分な治療効果が得られないということである。(2) 抗原刺激によって誘導される制御性T細胞：研究代表者である木庭らは、新規の癌精巢抗原である LAGE-1 を認識するT細胞が、制御性リンパ球優位であることを見出した。いっぽう、LAGE-1 との相同性を有する癌精巢抗原である NY-ESO-1 を認識するT細胞はエフェクター細胞優位であった(Immunity, 2004)。この現象から、抗原によって誘導されるT細胞のサブセットが異なる可能性が考えられるが、どの腫瘍抗原が制御性リンパ球を誘導しやすいか、網羅的に調べた研究はこれまでに報告されていない。(3) 制御性T細胞が腫瘍局所にリクルートされるメカニズム：Curie1 やは、卵巣がんの癌性腹水中の MDC/CCL22 が高レベルであり、腹水中の制御性T細胞がCCR4陽性であることを報告した(Nat. Med, 2004)。MDC/CCL22はCCR4のリガンドであり、腫瘍細胞や腫瘍浸潤マクロファージ、樹状細胞が産生するMDC/CCL22と制御性T細胞の表面に発現するCCR4のインタラクションによって、制御性T細胞が腫瘍局所に遊走し、局所にとどまるという可能性が示唆されている。このほか、リンパ腫の腫瘍細胞中にCCR4+ 制御性T細胞が存在することや、また肺癌におけるMDC/CCL22のレベルが高いことが報告されているが、メラノーマに存在する制御性リンパ球のCCR4の発現やメラノーマ組織におけるMDC/CCL22のレベルを調べた報告は未だない。以上の学術的背景をふまえ、がん患者における制御性T細胞の頻度や、そのリクルートメントに関わる分子を調べることによって、制御性T細胞をコントロールすることが可能になれば、今後の免疫療法の開発/改良にとって大変意義深く、また、制御性T細胞が誘導

されやすい腫瘍抗原を網羅的に調べることは、抗原特異的な免疫療法に直接役立つ重要な情報となりえると考え、本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

(1) 腫瘍浸潤リンパ球の中に含まれる腫瘍抗原特異的リンパ球の存在と、制御性T細胞の存在と機能。腫瘍抗原特異的リンパ球の抗腫瘍能を抑制すること。

(2) 同一患者においては、原発病巣、転移リンパ節、転移なし所属リンパ節における、制御性T細胞の存在と頻度。

(3) これまでに同定されている腫瘍抗原で末梢血リンパ球を刺激し、誘導されるリンパ球のサブセット。

(4) 制御性T細胞がCCR4とCCL22の相関によって、腫瘍局所にリクルートされること。

3. 研究の方法

(1) メラノーマ組織に浸潤する制御性T細胞を調べるために、以下の3つの実験を行った。

①メラノーマ組織をもちいて免疫組織化学的にfoxp3陽性細胞を検討した。

②メラノーマ組織からRNAを抽出してfoxp3のmRNA発現を調べた。

③メラノーマ患者組織から採取した腫瘍浸潤リンパ球に含まれる制御性T細胞をフローサイトメトリーで解析した。

(2) メラノーマから同定された複数の腫瘍抗原ペプチドでリンパ球をin vitroで刺激することにより、どのような免疫学的な変化が現れるかについて、以下のことを調べた。

①抗原特異的T細胞の誘導について、ELISPOT法で調べた。

②刺激後のリンパ球に含まれる制御性T細胞をフローサイトメトリーで解析した。

③刺激後のリンパ球によるサイトカインの産生をELISA法で調べた。

メラノーマから単離されたMHCクラス1拘束性の抗原ペプチドの中から、MAGE1 A2, MART1 A2, gp100 A2, tyrosinase A2, MAGE1 A24, gp100 A24, tyrosinase A24, MAGE3 A24の合計8つを選び、メラノーマ患者および健常人のリンパ球刺激に用いた。刺激に際して、抗原提示細胞として末梢血単球由来樹状細胞を用いた。

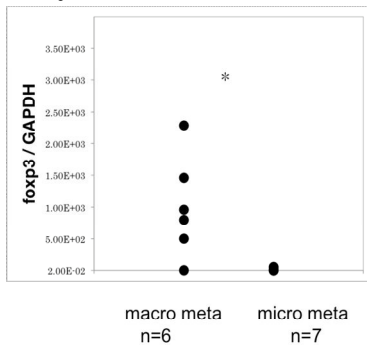
(3) 制御性T細胞のリクルートとして、腫瘍由来のCCL22とCCR4の関連を調べるために、腫瘍細胞から産生されるCCL22をELISA法で調べた。

4. 研究成果

(1) メラノーマにおける制御性 T 細胞の頻度: foxP3 の免疫組織化学な解析の結果、メラノーマの原発巣 12 例と母斑 5 例では、原発巣では低発現が 5 例、中等度発現 5 例、高発現 2 例であったのに対して、母斑組織では 5 例全例が低発現であった。リンパ節転移についても検討したところ、転移のあるリンパ節においては、17 例中 3 例が低発現、4 例が中等度発現、10 例が高発現であったのに対し、転移のないリンパ節においては、16 例中 7 例が低発現、7 例が中等度発現、2 例が高発現を示した。このうち高発現の 2 例はいずれも腫大したリンパ節に認められた。以上の結果から、メラノーマの組織には制御性 T 細胞が高率に存在することが示された。

	number of foxp3 positive cells		
	low	intermediate	high
LN metastasis; nonSN (n=5)	1	3	1
LN metastasis; SN (n=12)	2	1	9
negative SN; enlarged (n=8)	2	4	2
negative SN; normal (n=8)	5	3	0
primary lesion (n=12)	5	5	2
nevus (n=5)	5	0	0

いっぽう、foxP3 の mRNA 発現を real-time PCR によって解析したところ、リンパ節転移における foxP3 発現は、肉眼的転移において、より発現が高かったことから、腫瘍細胞の量に依存して制御性 T 細胞の頻度が高いことが示唆された。



また、腫瘍浸潤リンパ球に含まれる CD25 高発現 foxP3 陽性細胞の頻度は 0.7% から 2.4% であり、患者ごとにばらつきが見られた。

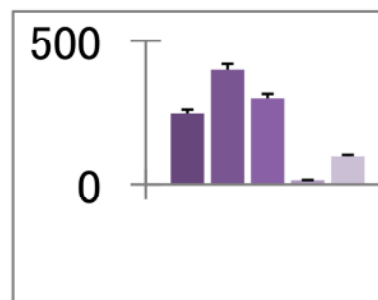
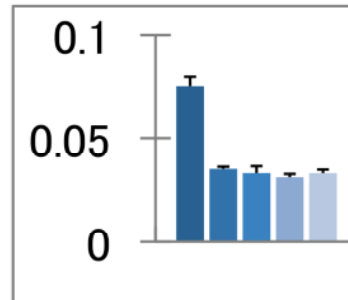
2) 抗原刺激によるリンパ球のフェノタイプと機能の変化

メラノーマから単離された MHC クラス 1 拘束性の抗原ペプチドの中から、MAGE1 A2, MART1 A2, gp100 A2, tyrosinase A2, MAGE1 A24, gp100 A24, tyrosinase A24, MAGE3 A24 の合計 8 つを選び、メラノーマ患者および健常人のリンパ球刺激に用いた。刺激に際して、抗原提示細胞として末梢血単球由来樹状細胞を用いた。

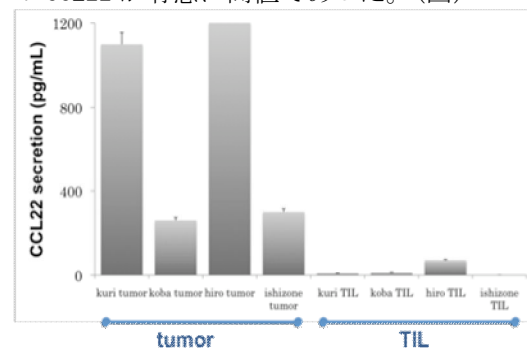
① ELISPOT 解析の結果、ペプチド特異的な IFN γ の産生細胞が検出された。

② 刺激後のフローサイトメトリー解析をおこなったところ、CD25 高発現 foxP3 陽性細胞の頻度に、ペプチド間での有意差は認められなかった。

③ 刺激後のリンパ球を OKT3 で刺激し、培養上清中に産生されたサイトカインを ELISA 法で調べたところ、いくつかのペプチドによって TGF β の産生が認められた (図)。いっぽう、IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 などの産生は認められなかった。



(3) 腫瘍細胞から産生される CCL22 を調べるために、腫瘍から腫瘍細胞とリンパ球を採取し、それぞれを培養して産生される CCL22 を ELISA 法でしらべたところ、腫瘍細胞由来の CCL22 が有意に高値であった。(図)



まとめ：

・メラノーマの原発巣、転移巣ともに、制御性T細胞が認められ、なかでも微小転移巣に比べて、肉眼的転移巣においては、foxP3のmRNAレベルが高かったことから、腫瘍量の増大に相関して、制御性T細胞が誘導されていることが示唆された。

・腫瘍細胞がCCL22を産生していることから、CCL22と制御性T細胞のCCR4発現のinteractionが、腫瘍局所におけるTreg誘導のメカニズムと考えられた。

・in vitro 抗原ペプチド刺激により、TGF β の産生が認められた。未熟DCで刺激した場合に増強した。

・患者に比べて、健常人ではTGF β の産生はほとんど認められなかった。

・メラノーマ患者では、免疫抑制的サイトカインの産生が起りやすい病態が示唆された。

結語として、メラノーマの微小環境においては、メラノーマ細胞そのものが制御性T細胞の誘導に深く関わっていることが明らかとなった。また、抗原特異的免疫療法においては、刺激にもちいる樹状細胞の成熟度やペプチドの選択を慎重に行うことの重要性が明らかとなった。

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2件)

- ①. 木庭幸子、斎田俊明; 知っておきたいがん免疫療法・実臨床のトピックス「メラノーマ」の免疫治療；侵襲と免疫, vol.17(4), 43-44, 2008 (査読なし)
- ②. Kiniwa Y, Wang HY, Peng W, Peng G, Wheeler T, Thompson T, Wang RF; CD8+ Foxp3+ regulatory T cells mediate immune suppression in prostate cancer. , **Clin Cancer Res.**, 2007 Dec ;13(23):6947-58 (査読あり)

[学会発表] (計2件)

- ①. 木庭幸子 「メラノーマに対する免疫応答と免疫療法」、Kumamoto Dermatological Academy, 2009年3月26日、熊本市
- ②. 木庭幸子、内山彩、斎田俊明 「Analysis of Regulatory T cells in Melanoma」、5th International Investigative Dermatology, 2008年5月14日、京都市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木庭 幸子 (KINIWA YUKIKO)

信州大学・医学部・助教

研究者番号 20436893

(2) 研究分担者

斎田 俊明 (SAIDA TOSHIAKI)

信州大学・医学部・教授

研究者番号 10010381

木藤 健治 (KIDO KENJI)

信州大学・医学部・医員

研究者番号 00447765