

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月24日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591429

研究課題名（和文） メラノーマにおける制御性 T 細胞誘導へのケモカインと腫瘍浸潤マクロファージの関与

研究課題名（英文） Association of chemokines and tumor associated macrophages in induction of regulatory T cells in melanoma.

研究代表者

木庭 幸子（KINIWA YUKIKO）

信州大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：20436893

研究成果の概要（和文）：メラノーマ患者の腫瘍組織を詳細に検討したところ、抑制的な役割をもつ制御性 T 細胞の浸潤が認められ、同部位に、CD204 陽性マクロファージが浸潤していることが明らかとなった。メラノーマ胸水や腹水中の CCL22 レベルの上昇および、培養メラノーマからの CCL22 産生も確認された。メラノーマにおける局所的免疫抑制状態の機序として、Treg のリクルートに CCL22 等を介した腫瘍浸潤マクロファージの関与が強く示唆された。

研究成果の概要（英文）：Results of immunohistochemical study showed that CD204 positive macrophages were associated with infiltration of regulatory T cells in melanoma tissues. In addition, CCL22 production in ascites and pleural fluids of melanoma were demonstrated. These results suggested that tumor associated macrophages might induce regulatory T cells in melanoma via CCL22.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
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：メラノーマ、制御性 T 細胞、腫瘍浸潤マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

（1）がんに対する生体内の免疫応答について、この20年間で分子レベルの詳細な解明がなされ、ペプチド療法、樹状細胞療法などの免疫療法が広く行われるようになったが、奏効率は極めて低い。その原因として、全身あるいは腫瘍局所の微小環境における免疫

抑制状態があり、制御性 T 細胞（Treg）や腫瘍関連マクロファージ（TAM）がそのような免疫抑制の誘導に中心的役割を果たすことが示唆されている。これまで、研究代表者らは、メラノーマを含む複数の腫瘍における腫瘍浸潤リンパ球（以下、TIL）に含まれる Treg を検出して報告した。しかしな

がら、どのようにして腫瘍局所に Treg が誘導されるかは、いまだ明らかにされていない。

(2) 近年、注目されている TAM は、(a)成長因子を産生して腫瘍細胞の増殖を促す(b)血管新生を促すことにより間接的に腫瘍の進展に関わる(c)腫瘍細胞やストローマが産生する M-CSF、IL-6 や IL-10 などによって自身が増殖する(d)樹状細胞の成熟を抑制したり、ナイーブ T リンパ球にアナジーを誘導する(e)ケモカインを産生することにより Th2 優位を促す、といった機能が明らかにされつつあり、いずれの点においても腫瘍の進展に関わると考えられている。

2. 研究の目的

Treg や TAM による腫瘍の免疫抑制状態への関与の詳細を明らかにし、これらを排除あるいは機能の抑制を図ることにより、腫瘍の制御につながることを期待される。メラノーマにおける Treg のリクルートに関わるケモカインや TAM の役割について明らかにする。免疫抑制状態をコントロールするための基礎的データを得ることにより、免疫療法を含む癌治療の向上に役立てる。

3. 研究の方法

(1) 腫瘍組織における CCL22 産生を調べた。メラノーマ患者から採取した胸水と腹水を用い、含まれる細胞による産生を ELISA 法を用いて調べた。

(2) 腫瘍組織に浸潤するマクロファージのフェノタイプを CD68 抗体と CD204 抗体を用いた免疫染色により調べた。

(3) 腫瘍組織に浸潤する Treg と TAM の関係を免疫染色により調べた。

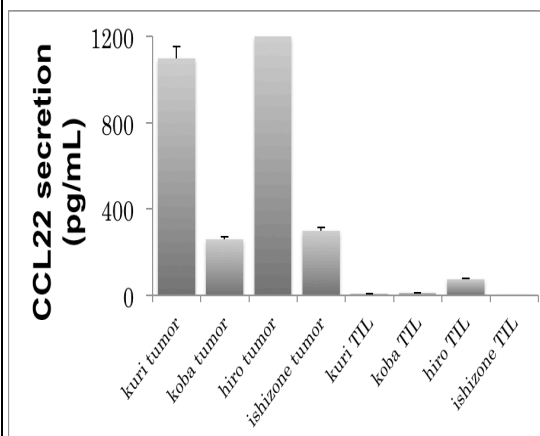
4. 研究成果

(1) 腫瘍組織における CCL22 産生

メラノーマ患者の癌性胸水を採取し、含まれる細胞成分から産生される CCL22 を定量したところ、浮遊細胞にくらべ、付着細胞からより多くの CCL22 産生が認められた。(図)

このことから、浸潤する腫瘍細胞あるいは、マクロファージを含む単球系細胞による Th2 細胞を誘導するケモカインの産生が示唆された。

(図)



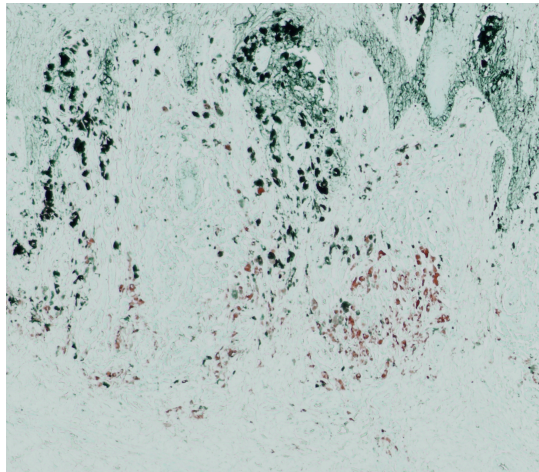
(2) メラノーマにおける制御性 T 細胞

メラノーマ組織における制御性 T 細胞の頻度を検討するため、リンパ節転移組織、リンパ節微小転移組織、および転移のないリンパ節における制御性 T 細胞を制御性 T 細胞のマーカーである foxP3 抗体を用いて組織化学的に検討した。その結果、転移のないリンパ節組織にくらべて、リンパ節転移組織とリンパ節微小転移組織においては foxP3 陽性細胞の頻度が有意に高いことが明らかとなった。この結果より、メラノーマ細胞の存在が、何らかのメカニズムにより制御性 T 細胞を誘導している可能性が示唆された。

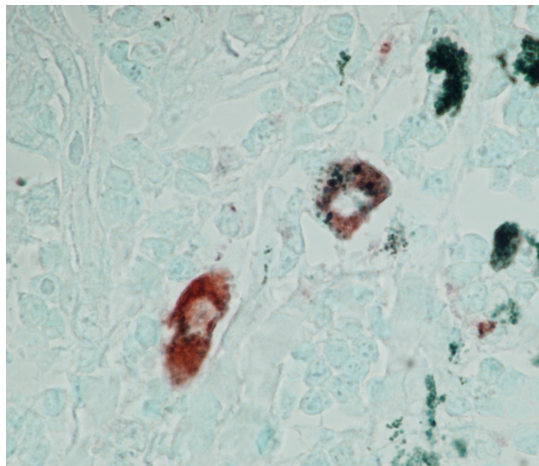
(3) TAM の分布と頻度解析

メラノーマ微小環境に浸潤するマクロファージの新たなフェノタイプ解析を試みた。CD204 は、マクロファージスカベンジャーレセプターA として知られ、種々の炎症におけるマクロファージの機能に深く関与する膜タンパクである。CD204 は CD68 とは異なる機能のマクロファージを検出するマーカーとして注目されている。この CD204 の抗体を用いて組織染色を行った。その結果、色素細胞母斑には CD204 陽性細胞はほとんど見いだされないが、メラノーマの組織には多数浸潤しているのが認められた。興味深いことに、とりわけ、腫瘍の先進部に数多く見いだされた。これは、CD204 陽性マクロファージが、がん微小環境における免疫抑制的細胞としてメラノーマの進展に関わっている可能性を確認するものと推察された。(図 a, b)

(図 a) x 40



(図 b) x 400



(4) TAM と Treg の関係

そこで、Treg のマーカーを用いて、CD204 細胞の分布との相関を調べた。その結果、CD204 陽性細胞は、Treg のマーカーである foxP3 陽性細胞が浸潤する領域に多く分布していることが分かった。これらの結果より、CD204 陽性マクロファージが産生するケモカインによって、Treg が誘導されている可能性が示唆された。

(5) 今後の展望

①腫瘍組織中には、Treg や TAM のほかにも stromal 細胞なども存在しており、腫瘍の進展を助長している。これらの細胞群が、腫瘍特異的リンパ球や樹状細胞および NK 細胞などによる免疫応答を妨げる機序については、さらなる in vitro での実験や動物モデルが

必要と思われた。TAM のような免疫抑制的な働きをする細胞を制御する方法の開発に役立てることができるであろう。

②近年、急速に進んでいる CTLA-4 や PD-1 などのモノクローナル抗体療法が、メラノーマの抑制的免疫状態を打破することを期待されており、これらの治療薬によって、TAM の質的あるいは量的変化、CCL22 などの Treg を誘導する可能性のあるケモカインの産生の変化等を検討することも重要と思われた。

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 5 件)

- ① Sakaizawa K, Goto Y, Kiniwa Y, et al, Mutation analysis of BRAF and KIT in circulating melanoma cells at the single cell level. Br J Cancer、査読有、106, 2012, p939-946、doi:10.1038/bjc.2012.12
- ② 内山龍平、井出葉子、木庭幸子、他、ダカルバジン単剤投与が奏効した進行期悪性黒色腫の 1 例、Skin Cancer、査読有、25, 2011, p353-357
- ③ 木庭幸子、大橋敦子、高沢裕子、他、メラノサイト特異的蛋白陰性の原発不明悪性黒色腫の 1 例、Skin Cancer、査読有、26, 2011, p139-142
- ④ 木庭幸子、メラノーマの免疫療法 最近の動向、癌と化学療法、査読無、37、2010、p629-633
- ⑤ 木庭幸子、メラノーマにおける免疫回避機構、癌と化学療法、Skin Cancer、査読無、24、2009、p159-163

[学会発表] (計 4 件)

- ① 木庭幸子、高沢裕子、内山彩、奥山隆平、CD133 陽性メラノーマの解析、表皮細胞研究会、2011.10.29. 横浜市
- ② 木庭幸子、内山彩、奥山隆平、WT-1specific anti-tumor immune response in melanoma、Society for Melanoma Research、2010.11.7. シドニー
- ③ 木庭幸子、高沢裕子、奥山隆平、メラノーマにおける side population の解析、

第1回先端医療研究会、2010.10.15、名古屋市

- ④ 木庭幸子、メラノーマにおける免疫回避機構、第25回日本皮膚悪性腫瘍学会シンポジウム、2009.5.21、岡山市

[図書] (計2件)

- ① 木庭幸子、「1冊でわかる皮膚がん」、2011、文光堂、6ページ
② 木庭幸子、「EBMがん化学療法・分子標的治療法」、2010、中外医学社、8ページ

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木庭 幸子 (KINIWA YUKIKO)
信州大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：20436893

(2) 研究分担者 齋田 俊明

齋田 俊明 (SAIDA TOSHIAKI)
信州大学・医学部・特任教授
研究者番号：10010381

(3) 連携研究者

()

研究者番号：