

## 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 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591217

研究課題名（和文）皮膚細胞浸潤における beta7 インテグリンの役割と悪性黒色腫

研究課題名（英文）The role of beta 7 integrin on cutaneous cell infiltration and melanoma

研究代表者

門野 岳史（KADONO TAKAFUMI）

東京大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：80292910

研究成果の概要（和文）：悪性黒色腫に対する抗腫瘍免疫において重要なのは血球細胞が腫瘍へと浸潤することであるが、血球細胞の移動を司る細胞接着因子である beta7 インテグリンおよび alphaE インテグリンの腫瘍免疫における役割に関して研究を展開した。alphaE インテグリン欠損では腫瘍免疫への明らかな影響はみられなかったが、beta7 インテグリンの欠損により抗腫瘍免疫の増強がみられた。また、そのメカニズムとして beta7 インテグリンが欠損すると細胞接着機能を代償するため ICAM-1、VCAM-1 の発現が増強し、インターフェロンガンマを発現する Th1 型の CD4 陽性 T 細胞の浸潤数が増加することにより、抗腫瘍効果が亢進すると考えられた。

研究成果の概要（英文）：As leukocyte infiltration is one of the most important factors for tumor immunity in melanoma, we investigated the role of beta 7 integrin and alpha E integrin that belong to adhesion molecules implicated in leukocyte migration. The lack of alpha E integrin did not affect tumor immunity, whereas beta 7 integrin deficiency significantly augmented the tumor immunity. When beta 7 integrin is deficient, the expressions of ICAM-1 and VCAM-1 were upregulated to compensate for the loss of beta 7 integrin, which lead to the increase of Th1-type CD4-positive T cells which produced significant amount of interferon gamma.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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

## 1. 研究開始当初の背景

悪性黒色腫は近年本邦で増加傾向の見られる悪性腫瘍である。外科的切除が治療の原則であるが、進行期に対する治療は困難であ

り、化学療法や放射線療法の効果も限定的である。また様々な免疫療法が試みられているが、その有効率は未だ高いとは言えない。悪性黒色腫の皮膚病変では腫瘍細胞に対して

免疫応答が起こり、炎症が惹起される。こうした免疫応答により腫瘍細胞が障害を受け、腫瘍は縮小するが、この免疫応答を抑制するため腫瘍は IL-10 など様々な物質を放出し抑制的に働く T 細胞や骨髄球系の細胞を誘導する。従って悪性黒色腫に対する免疫応答には抗腫瘍効果をもたらすものとそれを抑制するものの両者が混在し、そのバランスに応じて腫瘍病変が縮小するか否かが決定される。

悪性黒色腫に対する免疫応答が生じるためには炎症細胞が腫瘍局所へと浸潤する必要がある。これら炎症細胞は免疫を促進し抗腫瘍効果を持つ群と、逆に抑制的に働く群との両者が混在している。これら様々な炎症細胞の浸潤は細胞接着分子やケモカインなどによって高度に制御されている。従って悪性黒色腫の腫瘍局所に炎症細胞がどのような分子を利用して浸潤してくるか、また各々の炎症細胞がどのようにこれらの分子を使い分けているかについて知ることが極めて重要である。

炎症細胞が血管内から遊走し腫瘍局所へと浸潤するには、①捕捉/ローリング、②活性化、③固着、④血管外へ遊走といった一連のステップを介して行われ、この過程で白血球や血管内皮細胞に発現する細胞接着分子が重要な働きを担っている。捕捉/ローリングは主に P, E, L-selectin、といった 3 つのセレクチン・ファミリーによって制御される。引き続き起こる炎症細胞の固着はケモカインによりインテグリンファミリーが活性化されること、また炎症により血管内皮細胞にインテグリンファミリーに対するリガンドの発現が上昇することによって起こる。悪性黒色腫における皮膚の腫瘍塊を栄養する血管には主として ICAM-1 や VCAM-1 といったインテグリンファミリーに対するリガンドが発現している。また、これらに対するインテグリンファミリーとしては ICAM-1 に対しては LFA-1 および Mac-1 などが、VCAM-1 に対しては alpha4beta1 が知られていた。しかしながら、悪性黒色腫などの皮膚腫瘍局所への炎症細胞浸潤にどの細胞接着分子がどのように関わっているかは未だ明らかではない。

beta7 インテグリンはインテグリンファミ

リーに属する細胞接着分子で、alpha4 インテグリン若しくは alphaE インテグリンとヘテロダイマーを形成し、白血球のローリングや固着を制御する。alpha4beta7 インテグリンは主としてリンパ球に発現し、パイエル板などの腸管リンパ組織へのリンパ球の移行に不可欠である。そのリガンドとしては MAdCAM と VCAM-1 が知られている。一方、alphaEbeta7 インテグリンは活性化したリンパ球や一部の樹状細胞に発現していることが知られ、殊に皮膚においては活性化した CD8 陽性細胞、真皮における樹状細胞の一部、そして dendritic epidermal T cell (DETC) に発現しこれらの炎症細胞の維持に関与すると考えられている。従って beta7 インテグリンは血球細胞の移動を通じて腸管免疫のみならず、皮膚における免疫に重要な役割を果たしていることが考えられる。実際、beta7 インテグリンの皮膚免疫における役割を検討する目的で beta7 インテグリン欠損マウスの耳を用いて接触性皮膚炎の誘導を試みたところ、耳介の腫脹が著明に低下していた。この要因について探索したところ、beta7 インテグリン欠損マウスでは DETC の数には著変がなく、この接触性皮膚炎の反応低下は effector phase においてリンパ球の皮膚への浸潤が減少することによって生じることが分かった。従って、beta7 インテグリンは皮膚にも発現する VCAM-1 と結合することにより皮膚への炎症細胞浸潤も制御することが分かり、皮膚での免疫にも重要な役割を果たすことが考えられた。しかしながら beta7 インテグリンが悪性黒色腫などの皮膚腫瘍に対する腫瘍免疫における役割は明らかではないことより、本研究の立案に至った。

## 2. 研究の目的

悪性黒色腫をはじめとする様々な癌腫に対する免疫応答は極めて多岐にわたるが、腫瘍細胞を攻撃する血球細胞を病変部に適切に移行させることは極めて重要である。今回、白血球の血管内皮への接着を司る beta7 インテグリンが如何に腫瘍病変への細胞浸潤を制御するか、またそれがどのように腫瘍病変に影響を与えるかについて主として欠損マウスを用いて解析することを目的とする。

### 3. 研究の方法

野生型マウス、beta7 インテグリン欠損マウスおよび alphaE インテグリン欠損マウスに B16 悪性黒色腫細胞を接種した後の腫瘍の出現頻度、大きさの変化を計測した。腫瘍接種部位としては耳介、背部、足底さらには静注による肺転移モデルも行った。さらに、腫瘍病変への好中球、リンパ球、組織球、肥満細胞などの炎症細胞浸潤を免疫組織学的に検討した。また、腫瘍細胞の増殖を抑制もしくは促進させると考えられるサイトカインや細胞成長分子の発現や産生を real-time PCR で検討した。

更に、担癌マウスより脾臓細胞を摘出し CTL アッセイを行った。最後に、beta7 インテグリン欠損マウスにおける ICAM-1 の重要性を確認するため、ICAM-1 に対するモノクローナル抗体の投与を行い、腫瘍形成に影響を与えるかどうかに関して検討を行った。

### 4. 研究成果

野生型マウス、beta7 インテグリン欠損マウス、および alphaE インテグリン欠損マウスに B16 悪性黒色腫細胞を耳に接種した後の腫瘍の出現頻度、大きさの変化を計測したところ、腫瘍接種 35 日後の段階で beta7 インテグリン欠損マウスにおいては腫瘍の成長が有意に遅延しており、野生型マウスと比較して腫瘍の体積が約 30%に留まっていた。また、alphaE インテグリン欠損マウスにおいても、野生型マウスと比較して腫瘍の体積が約 40%と腫瘍の成長が有意に遅延してした。一方で、悪性黒色腫細胞を足底若しくは腹部に皮下注射した場合は野生型マウス、beta7 インテグリン欠損マウス、および alphaE インテグリン欠損マウスに明らかな差は見られなかった。

次に、耳に接種した後の腫瘍病変への炎症細胞浸潤を HE 染色および免疫組織学染色により検討したところ、好中球、マクロファージ、CD8 陽性 T 細胞の数には差はみられなかったが、beta7 インテグリン欠損マウスにおいては腫瘍部への CD4 陽性 T 細胞の数が増加していた。更に、腫瘍細胞の増殖を抑制もしくは促進させると考えられるサイトカイン

や細胞成長分子の発現を Real-Time PCR にて検討したところインターフェロンガンマに加えて CCL5、CXCL 9 も beta7 インテグリン欠損マウスにおいて有意に増加していた。

一方、野生型マウスおよび beta7 インテグリン欠損マウスに B16 悪性黒色腫細胞を静脈注射した後、肺における転移巣を検討したが、両者の間に差は見られなかった。更に野生型マウスおよび beta7 インテグリン欠損マウスの脾臓細胞を用いて CTL アッセイを行ったところ両者に差は見られなかった。従って beta7 インテグリン欠損マウスにおいては systemic な腫瘍免疫に関しては野生型マウスと差がないが、皮膚での病変に関しては、何らかの要因でインターフェロンガンマを発現する CD4 陽性 T 細胞の浸潤数が増加することにより、抗腫瘍効果が野生型マウスより亢進すると考えられた。

PCR にて beta7 インテグリン欠損マウスではインターフェロンガンマ、CCL5、CXCL 9 といった Th1 型反応にかかわる分子が高発現していたことより、Th1 細胞の局所浸潤に関わる ICAM-1、VCAM-1 の発現についての検討を行ったところ、beta7 インテグリン欠損マウスでは ICAM-1、VCAM-1 の発現が亢進していた。以上より、beta7 インテグリン欠損マウスにおいては ICAM-1、VCAM-1 の発現亢進により、インターフェロンガンマを発現する Th1 型の CD4 陽性 T 細胞の浸潤数が増加し、その結果として抗腫瘍効果が野生型マウスより増強すると考えられた。

### 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 3 件)

1) Ohmatsu H, Kadono T, Sugaya M, Tomita M, Kai H, Saeki H, Steeber DA, Tedder TF, Tamaki K, Sato S:  $\alpha 4 \beta 7$  integrin is essential for contact hypersensitivity by regulating migration of T cells to inflammatory skin. J Allergy Clin Immunol 126: 1267-1276, 2010.

2) 門野岳史: 皮膚の炎症における細胞接着

分子の役割. 日本臨床免疫学会会誌  
33(5): 242-248, 2010.

3) Kai H, Kadono T, Kakinuma T, Tomita M,  
Ohmatsu H, Asano Y, Tada Y, Sugaya M, Sato  
S: CCR10 and CCL27 are overexpressed in  
cutaneous squamous cell carcinoma. *Pathol  
Res Pract* 207: 43-48, 2011.

[学会発表] (計 8 件)

1) 門野岳史:  $\beta 7$  インテグリンと皮膚. 第 1  
回 東京 Immunology Club for Young  
Dermatologists 研究会 2010 年 2 月 6 日, 東  
京.

2) Kai H, Kadono T, Ohmatsu H, Tomita M,  
Asano Y, Sugaya M, Sato S: Beta7 integrin  
deficiency suppress cutaneous tumor  
formation. *Immunology2010 The Annual  
Meeting of the American Association of  
Immunologists* May 7-11, 2010. Baltimore,  
USA.

3) 門野岳史: 悪性黒色腫に対する beta7  
integrin の役割. 平成 22 年度厚生労働省「悪  
性黒色腫に対する新しい診療体系の確立に  
関する研究」研究班第 1 回班会議 2010 年 7  
月 31 日, 東京.

4) Kadono T:  $\beta 7$  integrin and cutaneous  
inflammation. La Jolla Institute for  
Allergy & Immunology (LIAI) Immunology  
Symposium November 8, 2010. Tokyo, Japan.

5) Kadono T, Ohmatsu H, Sato S: Beta 7  
integrin is essential for the induction of  
oral tolerance. *Immunology2011 The Annual  
Meeting of the American Association of  
Immunologists* May 13-17, 2011. San  
Francisco, USA.

6) Masui Y, Kadono T, Kai H, Sato S: CXC  
chemokine receptor 3 deficiency promotes  
cutaneous tumor formation. *Immunology2011  
The Annual Meeting of the American  
Association of Immunologists* May 13-17,

2011. San Francisco, USA.

7) Yamada D, Kadono T, Masui Y, Asano Y,  
Tada Y, Sugaya M, Sato S:  $\beta 7$  integrin  
deficiency attenuates immune  
complex-mediated tissue injury. 42st  
Annual Meeting of the European Society for  
Dermatological Research Meeting September  
19-22, 2012. Venice, Italy.

8) Yamada D, Kadono T, Masui Y, Asano Y,  
Tada Y, Sugaya M, Sato S:  $\alpha E$  integrin  
deficiency attenuates Arthus reaction. 第  
37 回日本研究皮膚科学会年次学術大会・総会  
2012 年 12 月 7 日-9 日, 那覇.

[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]

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

門野 岳史 (KADONO TAKAFUMI)  
東京大学・医学部附属病院・准教授  
研究者番号: 80292910

### (2) 研究分担者

佐藤 伸一 (SATO SHINICHI)  
東京大学・医学部附属病院・教授  
研究者番号: 20215792

### (3) 連携研究者

なし