

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 4 月 18 日現在

機関番号：37116

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791095

研究課題名（和文）悪性黒色腫における PD-1 関連免疫抑制とケモカイン受容体関連転移修飾

研究課題名（英文）PD-1 associated immunomodulation and chemokine receptor-derived metastases in malignant melanoma

研究代表者 日野 亮介（HINO RYOSUKE）

産業医科大学・医学部・講師

研究者番号：30446116

研究成果の概要（和文）：メラノーマ細胞のケモカイン受容体を網羅的に調べたところ、進行が早い例において腫瘍細胞に CCR5 が強く発現していることが分かった。そのため、腫瘍細胞に CCR5 のリガンドである CCL3, 5 の添加をし、細胞内サイトカイン染色にて確認したところ TGF- β や IL-10 などの抑制性分子の産生が増強した。かつ腫瘍細胞そのものが CCL5 を産生していることを見いだした。かつ CCL5 の添加により腫瘍細胞の増殖能が亢進することも確認できた。以上の結果より、メラノーマ細胞に CCR5 が発現することは、そのリガンドにより増殖能を亢進させるのみならず、抑制性分子の発現を促し、さらに autocrine 的に産生してその作用を増強することで腫瘍の進展に寄与する可能性を見いだすことができた。

研究成果の概要（英文）：We found the strong expression of CCR5 on tumor cells obtained from aggressive cases. Our present findings suggest that CCR5 function can relate with migration, TGF- β production, and proliferation of melanoma cells. These findings suggest that the CCR5 and its ligands may promote tumor progression in an autocrine/paracrine manner. In tumor microenvironment, CCR5 plays dual role: promotion of tumor progression or enhancement of tumor immunity. In this study, we focused on CCR5 associated tumor progression. Based on these findings, we conduct further investigation whether CCR5 expression affects the prognosis of malignant melanoma.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：悪性黒色腫，ケモカイン受容体，免疫抑制

1. 研究開始当初の背景

悪性黒色腫は免疫原性が高い腫瘍であることが知られているため多くの免疫療法が試みられているが、満足のいく安定した結果は得られていない。免疫療法が効きにくい理由

として、悪性黒色腫，特に進行例では患者が免疫抑制状態になっていることが知られてきた。この要因として、腫瘍自体が免疫抑制性のサイトカインを放出すること、抑制性 T 細胞の増殖を誘導することなどがよく知ら

れている。また、腫瘍細胞と host との関連において、抑制性のシグナルを誘導する分子が多く見つかった。この中でも、活性化した T 細胞に発現する受容体である Programmed death-1 (PD-1) 分子は、このリガンドである Programmed death-1 ligand 1 (PD-L1), PD-L2 と結合することで T 細胞が“疲弊した”状態に陥ることで免疫抑制状態をもたらすことで注目されるようになった (図 1)。多くの腫瘍において PD-L1, PD-L2 の発現が見られることが知られるようになってきており、悪性黒色腫の細胞で発現することが確認された。我々は多数例の悪性黒色腫における PD-L1 発現を検討し、発現の強さが予後や深達度に相関することを発見した。しかし、腫瘍の進行にどのように関与するかは不明である。

2. 研究の目的

悪性黒色腫の免疫抑制は多くの現象が複合的に重なって生じる。その結果腫瘍の進行や転移を招く。この現象を腫瘍細胞からの抑制性サイトカインの産生、抑制性分子の発現、ケモカインレセプターの発現パターン、そして浸潤細胞の特徴や機能など網羅的に調査することを目的とした。

(1) PD-1/PD-L1, 2 を介する免疫抑制機構の解明

まず、本研究では手術で得られた検体より腫瘍細胞、ないし浸潤リンパ球を分離し、腫瘍細胞の PD-L1 発現の強度と浸潤リンパ球の PD-1 発現を検討し、相互増強的な効果があるのかを検討することをめざした。さらに、腫瘍浸潤細胞に注目し、浸潤しているリンパ球や樹状細胞の機能、そして PD-1 を発現しているリンパ球に抗原特異性があるのかどうか、検討することをめざした。また、*in vitro* ないし *in vivo* の系を用いて PD-1/PD-L1 の阻害をすることで腫瘍の進展の有無、リンパ球や樹状細胞の機能の変調を調べ、悪性黒色腫においてこれらの分子が発現する本質的な意義、ないしこの分子の阻害が免疫療法の増強効果につながる可能性を検討した。

また、我々の preliminary な検討では、リンパ節転移を有する例では PD-L1 発現が有意に高いことを見出した。このことより、リンパ節転移に PD-L1, 2 が何らかの促進的な関わりを持つ可能性も視野に入れて検討することを目指した。

(2) ケモカイン受容体の発現差による転移

様式の決定

悪性黒色腫の転移様式には様々なものがあり、これまでの検討で腫瘍細胞に CCR7 が発現していることがリンパ節転移に関与することや CXCR4 が発現していることが肺転移に関与することが知られている。しかし、in-transit 転移をはじめとする皮膚病変についてはよく知られておらず、腫瘍細胞におけるケモカイン受容体や接着分子の発現の差異があると予想している。我々の preliminary な検討で腫瘍細胞において CCR4, 10 の発現が高くなっていることを発見した。これらの発現を多数例において網羅的に検討することで腫瘍の転移様式に迫ることを目指した。

3. 研究の方法

(1) 検体の採取・スクリーニング

手術で得られた悪性黒色腫の組織を一部採取し、collagenase で処理し、PD-L1 発現やケモカイン受容体の発現、および腫瘍浸潤細胞の PD-1 染色を行い、フローサイトメーターでその強度を確認した。特に、ケモカインレセプターに関しては CCR1-10, CXCR1-5 の全てを網羅的に調査した。

(2) 腫瘍浸潤細胞の培養

腫瘍浸潤細胞を解析するためには、浸潤細胞が大量に必要なため、培養が必須である。腫瘍組織を collagenase で処理後、分離できた細胞を高濃度 IL-2 存在下で培養すると効率的に腫瘍浸潤細胞が増殖する。そこで、HLA-A0201 陽性もしくは A24 陽性例の浸潤細胞については tetramer 法を用い、GP-100, MART-1 などの腫瘍抗原特異的な T 細胞を確認し、フローサイトメーターでその細胞に PD-1 の発現があるか否か検討する予定とした。すなわち、抗原特異的な T 細胞が疲弊している可能性を証明することを目指した。また、制御性 T 細胞についても検討した。また、我々の preliminary な検討では T 細胞中の PD-1 陽性細胞は進行期に増加していたことより、PD-1 陽性細胞や FoxP3 陽性細胞の出現と腫瘍の進行度について相関があることも確認した。

(3) 悪性黒色腫細胞の培養

腫瘍細胞を増殖培地で培養、継代し、腫瘍細胞での PD-L1 発現の有無を調査する。株化できれば長期的に培養ないし保存する。

(4) 腫瘍細胞の抑制性因子の探索・癌幹細胞

マーカーの確認

(3)で株化できた腫瘍細胞があれば IFN- γ などのサイトカイン処理で PD-L1 発現を増強させる。その環境において IL-10 や TGF- β 産生の程度を培養上清からの ELISA 法で探索した。また、このような抑制性サイトカインの分泌を制御する因子の探索をする。また、悪性黒色腫の既知の治療に抵抗性が強いとされる cancer stem cell マーカーとして知られている CD133 分子の発現がある細胞とそうでない細胞をマグネティックビーズにて分離し、これらの細胞群においての抑制性サイトカイン産生の程度を同様の手法で比較した。

(5)腫瘍細胞の遊走能

腫瘍細胞浮遊液を調製し、ケモカインを添加して transwell 法で遊走能を確認する。これらの遊走能が転移の有無、発症してから転移が確認されるまでの時間と相関するか調査する。

4. 研究成果

腫瘍細胞浮遊液の検討では、進行期には主要州医に浸潤している CD8 陽性リンパ球に PD-1 の強い発現がみられる例が多かった。制御性 T 細胞は同定困難であった。PD-1/PD-L1 軸に関しては良い成果がえられず、ケモカイン受容体を中心に研究した。腫瘍細胞を単離し、解析できたが、株化できた細胞はなかった。腫瘍細胞の解析は腫瘍の増大が早く急速に予後不良になる例において、患者検体より得られた腫瘍細胞に CCR5 が強く発現していることが見いだされた(図1)。また、リンパ節転移のある例では CXCR4 の発現が高かった。そのため、CCR5 の発現が免疫学的・細胞生物学的に何らかの意義がある可能性に着目した。

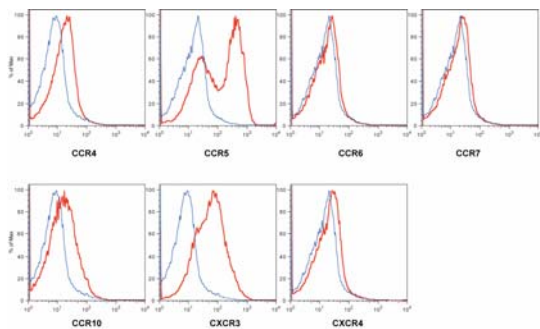


図1. CCR5 細胞の強い発現

癌幹細胞マーカーである CD133 陽性細胞と陰性細胞でソーティングし、検討したところ、

CD133 陽性細胞の分画が CCR5 を強く発現していることが見いだされた。

CCR5 のリガンドである CCL3, 5 を添加すると、濃度依存性に遊走能が亢進した。

CD133 を発現するメラノーマ細胞株である WM-115 細胞を用いて検討したところ、CCR5 のリガンドである CCL3, 5 の添加をし、細胞内サイトカイン染色にて確認したところ CCL3 の処理により TGF- β や IL-10 などの抑制性分子の産生が増強した(図2)。

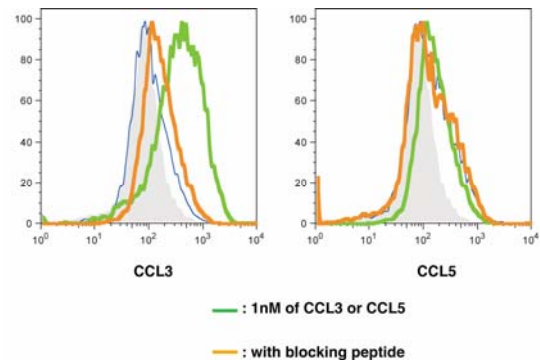


図2 CCL3, CCL5 添加による TGF- β 産生亢進

また、患者から得られた腫瘍細胞および WM-115 細胞そのものが CCL5 を産生していることを見いだした。

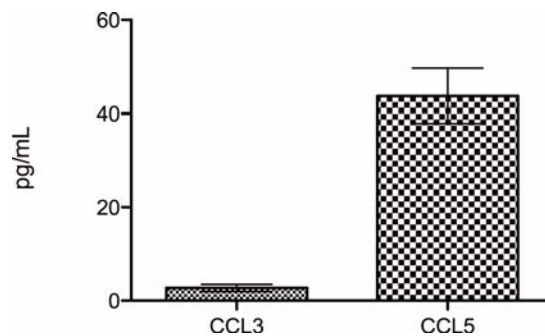


図3 WM-115 細胞からの CCL5 産生

かつ CCL5 の添加して CFSE 処理した WM-115 細胞を培養すると、CFSE の蛍光強度が低い細胞群が増加したことが確認された。CFSE 処理された細胞は分裂すると蛍光強度が半分になる。この事実から、腫瘍細胞の増殖能が亢進することも確認できた。(図4)

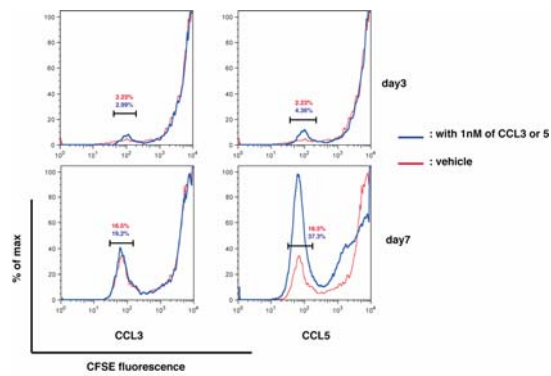


図4 CCL3, CCL5 添加による増殖能亢進

以上の結果より、メラノーマ細胞に CCR5 が発現することは、そのリガンドにより増殖能を亢進させるのみならず、抑制性分子の発現を促し、さらに autocrine 的に産生してその作用を増強することで腫瘍の進展に寄与する可能性を見いだすことができた。

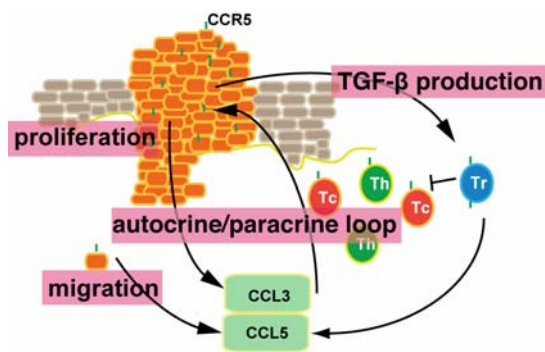


図5 CCR5 を軸としたメラノーマ進展機序

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)

[学会発表] (計 2 件)

1. Ryosuke Hino, et al: The expression of CCR5 is associated with TGF- β production by melanoma cells. 36th annual meeting of Japanese Society for Investigative Dermatology, 京都国際会議場, 京都 2011年12月9日

2. Ryosuke Hino, et al: The expression of CCR5 is associated with TGF- β production by melanoma cells. 41st annual meeting of European Society for Dermatological Research, Barcelona international conference centre, Barcelona, Spain 2011年9月8日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

日野亮介 (HINO RYOSUKE)

産業医科大学・医学部・講師

研究者番号: 30446116