

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 3月31日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23791276

研究課題名（和文） 皮膚悪性腫瘍微小環境が樹状細胞を介した免疫反応に与える影響の解析

研究課題名（英文） The effects of skin tumor microenvironment on dendritic cell-mediated immune response

研究代表者

中原 剛士（NAKAHARA TAKESHI）

九州大学・九州大学病院・講師

研究者番号：40529848

研究成果の概要（和文）：

本研究では、マウス悪性黒色腫に浸潤している樹状細胞の解析を経時的に行った。腫瘍接種後ごく初期から、非常に多くの割合の樹状細胞（CD11c+, MHC class II+）が腫瘍内に浸潤しており、その割合は腫瘍の増大とともに徐々に減少していくことがわかった。しかし浸潤する樹状細胞の数は逆に、腫瘍の増大とともに増加した。また、形質細胞様樹状細胞や通常の二次リンパ組織では見られない樹状細胞サブセット（CD11c+, B220+, Gr-1-, NK1.1+）も割合は少ないものが見られ、腫瘍が増大してもその割合にほとんど変化は見られなかった。腫瘍に浸潤している樹状細胞は表面マーカー（CD86）で見るとリンパ節の樹状細胞より活性化した状態であった。

本研究により、腫瘍発育早期には予想以上に多くの腫瘍浸潤樹状細胞が見られたため、これらの更なる詳しい表面マーカーの解析、機能の解析は抗腫瘍免疫を高める手がかりになりうると考えられた。

研究成果の概要（英文）：

We examined phenotypic analysis of tumor-infiltrating dendritic cell (TIDC) at different time points after tumor injection. Murine melanoma were infiltrated by many conventional DC especially at early time point. Other dendritic cell subsets like plasmacytoid DC and CD11c+, B220+, Gr-1-, NK1.1+ DC were also infiltrating into the tumor although their proportion was very low. TIDC were a little more mature than lymphoid resident DCs in dLNs.

From these results, we found that there were much more TIDC than expected at early stage of tumor growth, and detailed analysis of functions of these TIDC might be able to lead the new approach for enhancement of tumor immunity.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,400,000	720,000	3,120,000

研究分野：皮膚科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学 皮膚科学

キーワード：樹状細胞、悪性黒色腫

1. 研究開始当初の背景

皮膚悪性黒色腫に対する有効な治療法は、現時点では早期の外科的治療以外に見つかっていない。遠隔転移を来した悪性黒色腫に

対する効果的な治療法は存在しないため、転移を認める症例の予後は不良である。樹状細胞やペプチドを用いた免疫療法は、マウスモデルなどで有効な効果が見られるものもあ

り、当初は期待が大きかったが実際の臨床の現場においてははっきりとした臨床効果を見せているとはいえないのが現状である。その要因はいくつかあると考えられるが、担癌生体内や腫瘍局所での様々な免疫抑制状態が関与していることが考えられる。そのため、抗腫瘍免疫の活性化に加えて、その免疫抑制状態の解除が有効な治療効果を得るためには不可欠であり、申請者らは実際その目的で抗がん剤を樹状細胞と併用することで抗腫瘍効果が増強することを報告している。しかし、腫瘍局所での免疫抑制状態の明らかな機序はまだ不明な点が多い。悪性黒色腫の悪性度（進展や転移のしやすさ）は一体何で規定されているのだろうか？そのような予後因子の発現の有無、すなわち悪性度の異なる悪性黒色腫は腫瘍局所の微小環境に違いがあり、抗腫瘍免疫に異なる影響を与えているのだろうか？これらに対する答えもまだ出ていない。

近年、主にマウスにおいて末梢組織あるいは二次リンパ組織での異なる機能を持つ樹状細胞サブセットの多様性が見出されている。また、同じサブセットの樹状細胞が周囲の環境により免疫応答増強・抑制の相反する役割を担っており、その抑制の際に制御性T細胞と積極的に関わっている可能性も考えられている。これらのことから、異なる樹状細胞サブセット間の相互作用、樹状細胞と制御性T細胞の相互作用は適切な免疫応答にきわめて重要であり、その免疫応答には環境、特に悪性腫瘍の場合は腫瘍周囲の微小環境が重要な影響を与えることが考えられる。

2. 研究の目的

今回我々は、皮膚悪性黒色腫局所における腫瘍細胞と異なる樹状細胞サブセットの相互作用、特に腫瘍微小環境が樹状細胞を介した免疫反応に与える影響についての解析・検討を行い、皮膚悪性黒色腫の悪性度を規定する因子・機序の解明、免疫療法の治療成績向上へとつなげることを目的として本研究を行った。

3. 研究の方法

今までの腫瘍浸潤樹状細胞についての報告は、接種後1-2週間の十分に大きくなった腫瘍を用い、しかもCD11cのみを樹状細胞のマーカーとして解析しているものがほとんどであった。今回我々はマトリジェルと共に悪性黒色腫を接種することで接種後非常に早期から腫瘍浸潤樹状細胞の解析を行った。具体的には経時的に腫瘍を回収し、percollを用いた比重遠心法にて腫瘍浸潤細胞を腫瘍細胞と赤血球から分離した。同時に腫瘍の所属リンパ節、非所属リンパ節も回収を行い、経時的にフローサイトメトリーを

用いて浸潤細胞のサブセットの解析、活性化の解析を行った。

4. 研究成果

(1)マトリジェルと共に腫瘍を接種すると、接種後早期から腫瘍の回収が可能であり、浸潤細胞の解析を行うことが可能であった。



図1 マトリジェルと共に接種したマウス悪性黒色腫 (day4, day11)

(2)マウス悪性黒色腫には CD11c+, MHC class II + 樹状細胞、形質細胞様樹状細胞 (CD11c+, B220+, Gr-1+), CD11c+, B220+, Gr-1-, NK1.1+ 樹状細胞の3つの樹状細胞サブセットが浸潤していた。

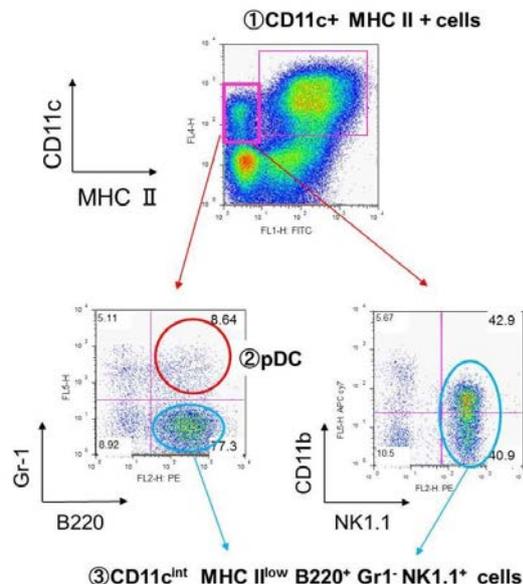


図2 腫瘍浸潤樹状細胞のサブセット

(3)腫瘍接種ごく初期には非常に多くの割合の CD11c+, MHC class II + 樹状細胞が腫瘍内に浸潤しており、その割合は腫瘍の増大とともに徐々に減少していくことがわかった。しかし浸潤する樹状細胞の数は逆に、腫瘍の増大とともに増加した。また、形質細胞様樹状

細胞や CD11c+ B220+ Gr-1- NK1.1+樹状細胞も非常に割合は少ないものが見られ、このサブセットの割合は腫瘍が増大してもほとんど変化は見られなかった。

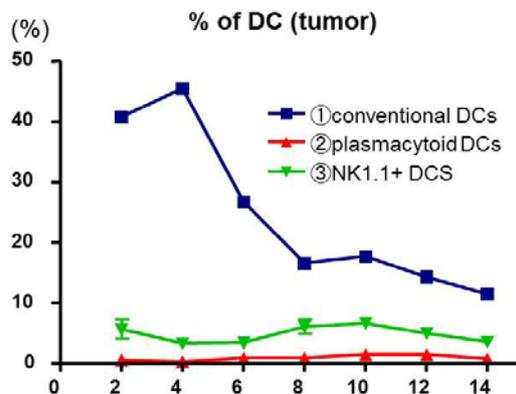


図3 腫瘍浸潤樹状細胞各サブセットの割合

(4)腫瘍接種後の所属リンパ節と非所属リンパ節における樹状細胞の割合は予想に反して有意な差は見られなかった。しかし、所属リンパ節においては浸潤細胞全体の細胞数の増加に伴い樹状細胞の細胞数も腫瘍発育に伴い増加した。

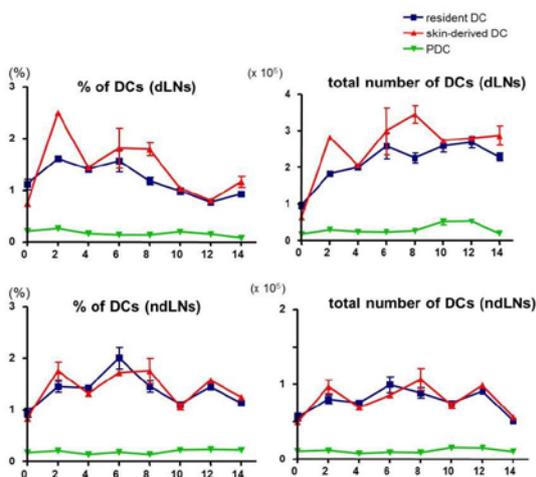


図4 所属・非所属リンパ節の樹状細胞の割合と細胞数

また、腫瘍浸潤樹状細胞とリンパ節の樹状細胞の活性化の比較においては、腫瘍に浸潤している樹状細胞は表面マーカー（CD86）で見ると、腫瘍発育早期ではリンパ節の樹状細胞と同程度の発現であったが、腫瘍の発育に伴い、CD86 がより高発現したより活性化した状態であった。

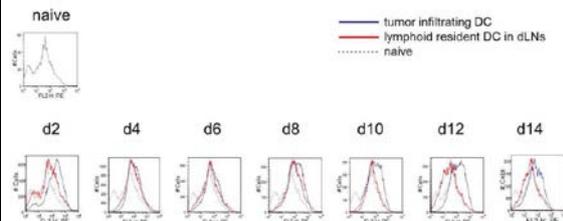


図5 腫瘍、リンパ節の樹状細胞におけるCD86の発現

本研究により、腫瘍発育早期には予想以上に多くの腫瘍浸潤樹状細胞が見られたため、これらの更なる詳しい表面マーカーの解析、機能の解析は抗腫瘍免疫を高める手がかりになりうると考えられた。今後は機能解析を行うとともに、悪性度の異なる腫瘍の接種で腫瘍浸潤樹状細胞にどのような違いが出るかを検討する予定である。

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 4 件)

Ito T, Moroi Y, Oba J, Nakahara T, Takeuchi S, Uchi H, Takahara M, Masuda T, Furue M. The prognostic value of a reverse transcriptase-PCR assay of sentinel lymph node biopsy for patients with cutaneous melanoma: a single-center analysis in Japan. *Melanoma Res.* 2012 Feb;22(1):38-44. (査読あり)

Oba J, Moroi Y, Nakahara T, Abe T, Hagihara A, Furue M. Expression of milk fat globule epidermal growth factor-VIII may be an indicator of poor prognosis in malignant melanoma. *Br J Dermatol.* 2011 Sep;165(3):506-12. (査読あり)

Oba J, Nakahara T, Abe T, Hagihara A, Moroi Y, Furue M. Expression of c-Kit, p-ERK and cyclin D1 in malignant melanoma: an immunohistochemical study and analysis of prognostic value. *J Dermatol Sci.* 2011 May;62(2):116-23. (査読あり)

Xie L, Takahara M, Nakahara T, Oba J, Uchi H, Takeuchi S, Moroi Y, Furue M. CD10-bearing fibroblasts may inhibit skin inflammation by down-modulating substance P. *Arch Dermatol Res.* 2011 Jan;303(1):49-55. (査読あり)

〔学会発表〕(計 1 件)

中原剛士 師井洋一 古江増隆
マウス悪性黒色腫浸潤樹状細胞の解析
第 22 回樹状細胞研究会
2012 年 06 月 15 日 福島

〔その他〕

ホームページ等
九州大学医学部皮膚科学教室
<http://www.kyudai-derm.org/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中原 剛士 (NAKAHARA TAKESHI)
九州大学・九州大学病院・講師
研究者番号：40529848

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし