

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 28 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462004

研究課題名(和文) 乳癌組織における腫瘍内浸潤樹状細胞の成熟化のメカニズムと予後との関連

研究課題名(英文) Prognostic Value of Tumor-infiltrating Dendritic Cells in Human Breast Carcinomas

研究代表者

岩本 充彦 (IWAMOTO, MITSUHIKO)

大阪医科大学・医学部・講師

研究者番号：20351398

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：乳癌組織を用いて免疫染色を行い、未熟樹状細胞はおよびCD1aで、成熟樹状細胞はCD83を用いて標識した。その結果樹状細胞の成熟度とCD83の発現とは相関が認められた。またVEGFとTGF- β の発現とCD83の発現とは負の相関が認められた。一方、CD1aやS100とは相関が認められなかった。つまりVEGFとTGF- β の発現は樹状細胞の成熟のメカニズムに参与していることが示された。CCR6, CCR7, macrophage inflammatory protein-3a(MIP-3a)の発現と樹状細胞の成熟度とは相関は示されなかった。さらに腫瘍内成熟浸潤樹状細胞の多寡が進行乳癌患者の重要な予後因子の1つであることが証明された。

研究成果の概要(英文)：Frozen tissues were obtained from all patients with breast cancer who underwent curative surgery at Osaka Medical College. The present research demonstrate that, in breast cancer tissues, the number of mature TIDCs expressing CD83 is strongly associated with prognosis compared to that of TIDCs expressing S100 or CD1a. In addition, our results showed the increased number of mature TIDCs was associated with intratumoral expression of immunosuppressive cytokines like VEGF and TGF- β . On the other hand, we could not show the correlation between expression of CC-chemokine receptor 6 (CCR6), CC-chemokine receptor 7(CCK7), macrophage inflammatory protein-3a(MIP-3a) and TIDCs. Finally, we could show that the infiltration of tumors by mature DCs expressing CD83 is of great importance in initiating the primary antitumor immune response and is confirmed as an independent, immunologic prognostic parameter for survival in patients with breast cancer.

研究分野：外科学

キーワード：乳癌 樹状細胞

1. 研究開始当初の背景

樹状細胞は抗原特異的免疫応答を起動することから腫瘍組織への樹状細胞浸潤の多寡は腫瘍細胞と宿主免疫機構との相互関係を反映すると考えられる。殊に、成熟樹状細胞は所属リンパ節に移行し、防御機構の一端を担う可能性が高いとされている。これまでに、大腸癌、肺癌、膵癌、膀胱癌、乳癌などの癌において、腫瘍組織内の樹状細胞浸潤と予後への関与が報告されてきた。しかし、そのメカニズムの解明は不十分であった。さらに樹状細胞の浸潤状況と予後との関連も明確ではなかった。樹状細胞を用いた免疫療法がいまだ一定の成果が得られていないのは、成熟樹状細胞が腫瘍内に機能的に浸潤できていないことが理由の1つに挙げられている。成熟度別に腫瘍内に浸潤する樹状細胞が同定することは、抗腫瘍免疫能を有する樹状細胞を的確に同定することを意味する。また近年の研究により、成熟樹状細胞は CD83 を表面抗原として有し、一方未熟樹状細胞表面には CD1a が存在することが明らかとなっている。これらに着目し、乳癌組織における腫瘍内浸潤樹状細胞の特異的 surface 抗原 CD83 および CD1a を用いて標識すれば、その成熟度別の樹状細胞の多寡、および浸潤程度が明らかとなる。またリンパ節移、予後との相関を臨床病理学的に検討することで成熟樹状細胞の存在が予後規定因子の1つになり得ると考えられる。また、近年、腫瘍が分泌する、vascular endothelial growth factor (VEGF)、transforming growth factor- (TGF-) 等が樹状細胞の分化や機能面に対して抑制的に作用していることが報告されていることより、患者予後との関連を含め、腫瘍組織レベルで樹状細胞の浸潤と樹状細胞の成熟化と VEGF、TGF- の発現とに負の相関が証明できれば、成熟化阻害因子、予後関連因子であることの理論的根拠が説明できる。さらに、未熟樹状細胞は CC-chemokine receptor 6

(CCR6) などのケモカインレセプターを発現し、macrophage inflammatory protein-3 (MIP-3) などのケモカインと相互作用し、癌組織へ移行するという仮説をもとに、未熟樹状細胞と成熟樹状細胞における CCR6、MIP-3 の発現を検索することで、遊走因子としての存在意義を明らかとし得る。さらに MIP-3 と CCR7 の解析も行うことにより、分化した成熟樹状細胞は CCR6 発現が低下し、代わって MIP-3 に反応する CCR7 を発現とする仮説も臨床検体レベルで証明できる。さらに近年、抗 HER2 療法であるトラスツマブ、ラパチニブの開発により HER2 過剰発現乳癌の予後が改善されつつあるが、樹状細胞浸潤との関連を証明した報告はなく、明らかとなれば免疫治療との併用療法が有用であることの理論的根拠となる。

2. 研究の目的

これまで腫瘍組織内の樹状細胞の免疫組織学的検出には、S-100 蛋白抗体が用いられてきた。しかしながら、S-100 蛋白は樹状細胞特異的の marker ではなく、また樹状細胞はその成熟度によって様々な phenotype、機能を有することから樹状細胞、特に抗原提示能を有する樹状細胞の発現のみを反映しているとは言い難く、また未熟樹状細胞をも同時に検出するため、その正確性が疑問視されてきた。乳癌を含めた様々な癌腫で、腫瘍内浸潤樹状細胞の発現と予後との関連を調べた報告があるが、理論的に抗原提示能を有しない未熟樹状細胞を含めた樹状細胞発現が予後に寄与し得るとするのは理論的根拠に乏しい。本研究はその疑問に答えるべく、腫瘍内浸潤樹状細胞の検出を表面抗原に着目し、成熟樹状細胞を CD83 で、未熟樹状細胞を CD1a でそれぞれ標識して、成熟度別の樹状細胞の発現とその多寡を明らかにした上、リンパ節転移さらには予後との関連を明らかにすることを目的とする。さらに成熟阻害因子とされ

る VEGF、TGF- β との発現を成熟度別に検索し、負の相関性を示すことで阻害因子としての存在意義を明らかとする。また CCR6、MIP-3 などのケモカインと相互作用し、癌組織へ移行するという仮説を、樹状細胞成熟度別に発現を確認することで証明するものである。また、切除リンパ節に対しても同様の実験を行うことでこれまで不明とされてきた、腫瘍細胞がリンパの流れまたは血流によってリンパ節に達し、そこで樹状細胞によって捕捉されるのか、または樹状細胞が腫瘍塊で腫瘍抗原を捕捉し、T 細胞感作するべくリンパ節に戻るのかという疑問に対し、実臨床レベルで回答することに繋がると考えられる。加えて MIP-3 と CCR7 の解析も行うことにより、MIP-3 の受容体は未熟樹状細胞に発現し、未熟樹状はとりわけ MIP-3 に強く応答し、その一方 MIP-3 はリンパ臓器の T 細胞領域に特異的に発現し、分化した成熟樹状細胞は CCR6 発現が低下し、代わって MIP-3 に反応する CCR7 を発現するとする仮説も臨床検体レベルで証明したいと考える。さらに近年、トラスツズマブ、ラパチニブなど HER2 高発現乳癌に対する分子標的治療薬が開発され、患者予後改善に大きく寄与しているが、癌遺伝子・癌抑制遺伝子産物でもある HER2 と腫瘍内浸潤するもしくはリンパ節内に存在する樹状細胞との関連を示した報告はなく、その関連、さらには予後規定因子の重要な因子であるリンパ節転移や長期予後との相関も明らかとしたいと考える。

3. 研究の方法

-80 度で凍結された乳癌組織（長期予後も調べるため平成 15 年以前の標本を使用）を用い免疫染色を行った。その際未熟樹状細胞は CD1a で、成熟樹状細胞は CD83 で標識させる。切除リンパ節にも染色を行い、腫瘍本体とリンパ節間の成熟度程度を検索

する。次いで VEGF、TGF β の発現も検索し、樹状細胞の成熟度との相関を調べた。続いて RT-PCR 法、ELISA 法を用いて腫瘍本体、リンパ節における CC-chemokine receptor 6 (CCR6)、CC-chemokine receptor 7 (CCR7)、macrophage inflammatory protein-3 α (MIP-3 α)、macrophage inflammatory protein-3 β (MIP-3 β) の発現の有無を検索した。さらに腫瘍内の HER2/neu の発現を免疫染色もしくは FISH 法で行った。すべてのデータすなわち成熟度と患者予後との関連を検証した。

4. 研究成果

樹状細胞の成熟度の多寡と CD83 の発現には相関が認められた。またサイトカインである、VEGF と TGF の発現と CD83 の発現には負の相関が認められた。一方、CD1a や S100 には相関が認められなかった。これらの結果により、VEGF と TGF の発現は樹状細胞の成熟のメカニズムに関与していることが示された。CC-chemokine receptor 6 (CCR6)、CC-chemokine receptor 7 (CCR7)、macrophage inflammatory protein-3 α (MIP-3 α)、HER2 の発現と成熟度とに相関は示されなかった。さらに、腫瘍内成熟浸潤樹状細胞の発現と患者予後（全生存率および健存率）とに相関が示された。すなわち腫瘍内成熟浸潤樹状細胞の多寡が進行乳癌患者の重要な予後因子の 1 つであることが証明された。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0件）

取得状況（計 0件）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩本 充彦 (IWAMOTO, Mitsuhiko)

大阪医科大学・医学部・講師

研究者番号：20351398

(2) 研究分担者

内山 和久 (UCHIYAMA, Kazuhisa)

大阪医科大学・医学部・教授

研究者番号：80232567