

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 23 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860951

研究課題名(和文) マウス悪性黒色腫発育早期の腫瘍浸潤樹状細胞の解析 - 経時的変化とその意義 -

研究課題名(英文) Phenotypic and functional change of tumor-infiltrating dendritic cells during murine melanoma growth.

研究代表者

中原 剛士 (Nakahara, Takeshi)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：40529848

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,900,000円

研究成果の概要(和文)：マトリゲルと混ぜたB16メラノーマをマウス皮膚に接種することにより、腫瘍発育早期から経時的に腫瘍浸潤DC(TIDCs)の動態を解析した。結果は、腫瘍発育早期に多くのTIDCsが認められた。B16と異なる時期に回収したTIDCsを同時にマウス皮膚に接種すると、腫瘍発育早期に回収したTIDCsは腫瘍発育を亢進し、逆に晩期に回収したTIDCsは抑制した。さらに早期のTIDCsは腫瘍環境のIFN-gやgranzyme B, perforinを減少させ、晩期のTIDCsは増加させた。すなわち、TIDCsは早期には腫瘍免疫に抑制的に、晩期には促進的に働いていた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the frequency, phenotype and function of TIDCs over time from early stages of melanoma growth in mice. Flow cytometric analysis revealed that the tumors were infiltrated by a significant population of CD11c+MHCII+ DCs, especially at an early stage of tumor growth. The allogeneic stimulatory capacity of TIDCs increased with tumor growth, while this capacity of DCs in lymph nodes decreased. TIDCs harvested at an early stage of melanoma (early TIDCs) accelerated tumor growth, but those harvested at a late stage (late TIDCs) delayed tumor progression when they were co-injected with melanoma cells. Furthermore, co-injection of early TIDCs failed to induce full immunocompetent maturation of CD8+ T cells, with much lower expression of IFN γ , granzyme B and perforin within the tumor microenvironment. In conclusion, TIDCs change their characteristics from an immunoinhibitory to an immunostimulatory phenotype over time in association with tumor progression.

研究分野：皮膚免疫

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が最も有効である。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長い期間存在せず、転移を認める症例の予後は不良であったが、近年ようやく分子標的薬や免疫チェックポイント阻害薬といった新しい薬剤が使用できるようになり、その効果が期待されている。反面、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あげ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、その意味では免疫阻害薬チェックポイントのような薬剤の使用は、免疫療法との併用などでさらなる効果が期待できるかもしれない。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。悪性黒色腫は腫瘍局所の微小環境は、樹状細胞を介した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の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樹状細胞の機能やT細胞との相互作用、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、腫瘍発育早期から経時的に行い、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(TIDCs)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。また、

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。

(2)腫瘍接種ごく初期には非常に多くの割合のCD11c+, MHC class +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。しかし、リンパ節においては、樹状細胞の割合は、腫瘍接種や発育に大きな影響を受けなかった。

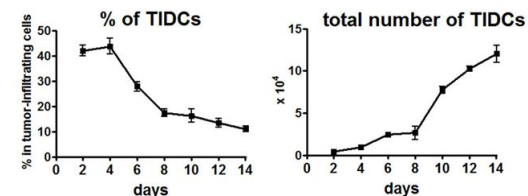


図1 腫瘍内浸潤細胞内のTIDCs

(3) TIDCs 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。それと比較し、所属リンパ節の樹状細胞のCD86の発現は、一時的であった。

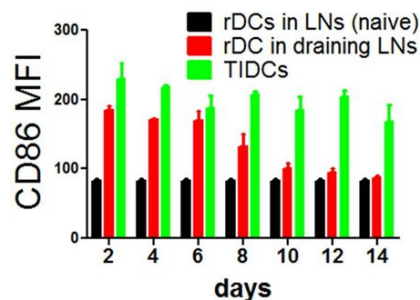


図2 TIDCs とリンパ節内のDCsのCD86発現

(4)TIDCsは、腫瘍発育とともにアロT細胞刺激能が経時的に増強し、免疫抑制性の表面蛋白(VEGFR-2, PD-L1)の発現は減少した。

(5)腫瘍接種後早期の4日目に回収したTIDCs(early TIDCs)と、後期11日目に回

収した TIDCs(late TIDCs) を腫瘍細胞と混ぜて接種すると、early TIDCs は腫瘍発育を促進し、late TIDCs は腫瘍発育を抑制した。

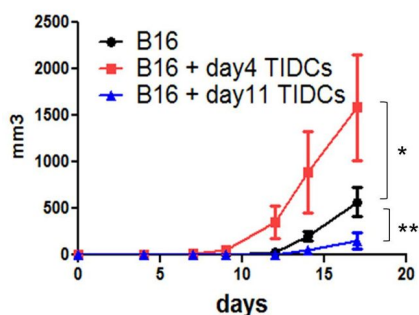


図 3
Early TIDCs と late TIDCs の vivo での腫瘍発育への影響

(6) Early TIDCs と late TIDCs を接種した腫瘍を回収すると、それぞれ腫瘍微小に環境に異なる影響を与えていた。Early TIDCs は腫瘍内の IFN-g や granzyme B, perforin を減少させ、late TIDCs は増加させていた。

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、経時的にその性質が変化することが示された。その性質の違いは、腫瘍微小環境に異なる影響を与えることでその機能を発揮することが推測された。

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 6 件)

Zhu L, Ito T, Nakahara T, Nagae K, Fuyuno Y, Nakao M, Akahoshi M, Nakagawa R, Tu Y, Uchi H, Furue M. Upregulation of S100P, receptor for advanced glycation end products and ezrin in malignant melanoma. *J Dermatol*. 2013 Dec;40(12):973-9. doi:10.1111/1346-8138.12323

Oba J, Nakahara T, Abe T, Hagihara A, Moroi Y, Furue M. Expression of programmed death receptor ligand 1 in melanoma may indicate tumor progression and poor patient survival. *J Am Acad Dermatol*. 2014 May;70(5):954-6. doi: 10.1016/j.jaad.2014.01.880.

Dugu L, Nakahara T, Wu Z, Uchi H, Liu M, Hirano K, Yokomizo T, Furue M. Neuronatin is related to keratinocyte differentiation by up-regulating involucrin. *J Dermatol Sci*. 2014 Mar;73(3):225-31. doi: 10.1016/j.jdermsci.2013.10.008.

Furue M, Takahara M, Nakahara T, Uchi H. Role of AhR/ARNT system in skin homeostasis. *Arch Dermatol Res*. 2014 Nov;306(9):769-79. doi: 10.1007/s00403-014-1481-7.

Yasukochi Y, Nakahara T, Abe T, Kido-Nakahara M, Kohda F, Takeuchi S, Hagihara A, Furue M. Reduction of serum TARC levels in atopic dermatitis by topical anti-inflammatory treatments. *Asian Pac J Allergy Immunol*. 2014 Sep;32(3):240-5. doi: 10.12932/AP0419.32.3.2014.

Nakahara T, Moroi Y, Takayama K, Itoh E, Kido-Nakahara M, Nakanishi Y, Furue M. Changes in sebum levels and the development of acneiform rash in patients with non-small cell lung cancer after treatment with EGFR inhibitors. *Oncotargets Ther*. 2015 Jan 28;8:259-63. doi: 10.2147/OTT.S76860.

〔学会発表〕(計 3 件)

中原剛士 マウス悪性黒色腫浸潤樹状細胞の継時的変化とその意義
第 23 回樹状細胞研究会 2013 年 5 月 17 日、京都

Takeshi Nakahara, Junna Oba, Masutaka Furue. Very early tumor-infiltrating

dendritic cell change their characteristics from immunoinhibitory to immunostimulatory in association with tumor progression.

2014 Annual meeting Society of Investigative Dermatology, 2014年5月7 - 10日 USA

中原剛士 マウス悪性黒色腫浸潤樹状細胞の経時的機能解析とその腫瘍微小環境における役割 第114回日本皮膚科学会総会
2015年5月29 - 31日 横浜

〔図書〕(計 0件)

〔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・医学研究院・准教授
研究者番号：40529848

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし