

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860967

研究課題名(和文) 菌状糸肉症モデルマウスの作製と表皮浸潤・転移機構の解析

研究課題名(英文) The study of mechanism of epidermotropism and metastasis of mycosis fungoides by establishing mouse mycosis fungoides model

研究代表者

福田 桂太郎 (Fukuda, Keitaro)

慶應義塾大学・医学部・特任助教

研究者番号：60464848

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：菌状糸肉症(MF)は表皮向性を示し、interface dermatitis(ID)やPautrier微小膿瘍(PM)を認める。本研究はMFマウスの作製、MFの表皮浸潤機構の解明を目的に実施した。我々はデスモグレイン3を認識するTCR(H1)、MFのInk4a/Arf(がん抑制遺伝子)変異、c-Myc(がん遺伝子)をCD4+T細胞に導入、Rag2欠損マウスに移植し、ID、PMをきたすMFマウスの作製に成功した。Ink4a/Arf変異・H1導入CD4+細胞はPMを形成せず、Ink4a/Arf変異・c-Myc導入CD4+T細胞はPMを形成した。PMの形成にはc-Mycが必要であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Mycosis fungoides (MF) is a cutaneous T cell lymphoma of CD4+ T cells that show epidermotropism. It is characterized by interface dermatitis (ID) and Pautrier's microabscess (PM), a clustering of MF cells in the epidermis. This project was conducted to establish MF model mouse that recapitulate histopathology of MF and to clarify the mechanism of the development of PM. Since mutation in INK4A/ARF (tumor suppressor gene) and overexpression of C-MYC (oncogene) are associated in human MF, we isolated CD4+T cells from Ink4/Arf-/- mice and retrovirally transduced c-Myc and desmoglein 3 specific TCR (H1) that induces ID. T cells were then adoptively transferred into Rag2-/- mice, which lead to the development of ID and PM that recapitulated MF. In addition, transfer of Ink4/Arf-/- CD4+T cells transduced with c-Myc developed PM whereas transfer of Ink4/Arf-/- CD4+T cells transduced with H1 did not develop PM. Our results suggest that oncogene c-Myc is essential for the development of PM.

研究分野：皮膚科学

キーワード：菌状糸肉症 Pautrier微小膿瘍 表皮抗原認識 C-MYC INK4A/ARF

1. 研究開始当初の背景

菌状糸肉症(Mycosis fungoides:MF)は皮膚T細胞リンパ腫(Cutaneous T cell lymphoma:CTCL)の最も頻度の高い病型で、CTCLの50~60%を占める。紅斑期、局面期を経て腫瘍期に至り、リンパ節や他臓器へ転移して行く。腫瘍期の5年生存率は40%で、内臓転移した場合、平均生存期間は9カ月と予後不良あり、病態の解明が急がれる疾患である。最近、遺伝子解析により、局面期にはがん抑制遺伝子 *INK4a/ARF* の不活性化が約70%(Laharanne E et al, Mod Pathol 2010)、腫瘍期には、がん遺伝子 *C-MYC* の活性化が32%の症例で認められると報告された(van Doorn R et al, Blood 2009)。

病理組織学的にMFは、(1)表皮向性、(2)真皮表皮境界部の帯状リンパ球浸潤と液状変性からなる interface dermatitis(ID)、(3)MF細胞の集簇である Pautrier 微小膿瘍が見られ、これら(1)-(3)の所見が病理組織学的診断の決め手となる。中でも(3)の所見は、特徴的な所見であり、Pautrier 微小膿瘍の形成機序の解明は、MFの表皮浸潤機構の理解、新しい治療戦略の想起に重要である。

長年、皮膚病理学の世界では、Pautrier 微小膿瘍は表皮に存在する抗原提示細胞、ランゲルハンス細胞に近接して見られることが注目されていた。そして、MF細胞はランゲルハンス細胞によって提示された表皮抗原を認識し、Pautrier 微小膿瘍を形成すると考えられてきた。しかし、Pautrier 微小膿瘍の形成機序の解明において、MF細胞の表皮抗原認識が関与しているか解析することは重要であるにもかかわらず、現存するMFモデルマウスは、MF患者から得た腫瘍細胞をNOD/SCID-B2m^{-/-}マウスに直接皮下に移植するモデルで、腫瘍T細胞は真皮で増殖するが、表皮向性を示さず、表皮に浸潤しない。また表皮の自己抗原を認識するCTCL細胞株も存在しない。さらには、既存のMFモデルマウ

スは、リンパ節に転移するが、肝臓や肺などの内臓転移をきたさないなど、多数の問題点が存在する。このような現状から、MFの表皮浸潤ならびに内臓転移機構を解明するのに有用な表皮向性およびヒトのMFで認めるPautrier微小膿瘍に酷似した病理像、そして肝臓や肺転移をきたすMFモデルマウスの作製が望まれていた。

2. 研究の目的

本研究は、ヒトのMFに酷似した病理像を呈するMFモデルマウスを作製し、Pautrier微小膿瘍の形成におけるMF細胞の表皮抗原認識の重要性、MFの表皮浸潤・内臓転移機構を明らかにすることを目的として実施した。

3. 研究の方法

申請者の所属する研究室では、表皮角化細胞が発現する細胞間接着分子であるデスメグレイン3(Dsg3)を特異的に認識するT細胞受容体(TCR)を発現するレトロウイルスベクターの樹立に成功し、このベクターを脾臓から分取したCD4陽性T細胞に導入してDsg3特異的TCRを発現させ、*Rag2*^{-/-}マウスに移植することでIDをきたすマウスの作製に成功した(Takahashi H et al, J Clin Invest 2011)。また *Ink4a/Arf*^{-/-}マウスの骨髓から前駆B細胞を分取し、*c-Myc*レトロウイルスベクターを導入して、*c-Myc*を過剰発現させた人工がん幹細胞(induced cancer stem cell:iCSC)を野生型マウスに移植することで、前駆B細胞リンパ性白血病・リンパ腫マウスの作製に成功した(Sugihara E et al, Oncogene 2011)。これらの方法を組み合わせ、*INK4a/ARF*^{-/-}マウスの脾臓のCD4陽性T細胞を分取し、(1)Dsg3特異的TCR、(2)*c-Myc*、(3)*c-Myc*とDsg3特異的TCRを発現させたiCSCを *Rag2*^{-/-}マウスに移植することでMFモデルマウスの作製を試みた。そして、形成される病変の病理組織学的解析を行った。さ

らには、フローサイトメトリーにより、表皮・真皮に浸潤した腫瘍細胞数や腫瘍細胞の表面抗原の定量的解析を施行した。

4. 研究成果

表皮に発現するデスモグレイン3 (Dsg3)を特異的に認識するTCRの鎖・鎖(H1 , H1)のレトロウイルスベクターと*c-Myc*のレトロウイルスベクターを*Ink4a/Arf*^{-/-}マウスCD4陽性T細胞に導入、*Rag2*^{-/-}マウスに移植したところ、移植8週間後に病理組織で、口囲や耳の表皮にPautrier微小膿瘍に酷似した像(図1)を呈し、また肝や肺転移病変を形成するMFモデルマウスを作成することができた(図2)。しかし、3つのレトロウイルスベクターの遺伝子導入効率は低く、モデルマウスを量産できないという問題があった。

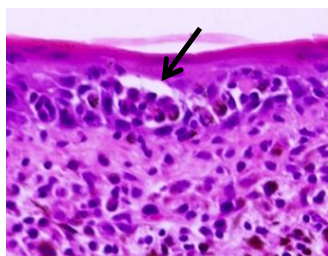


図1 MFモデルマウスの皮膚病理組織像
(矢印：Pautrier微小膿瘍様構造)

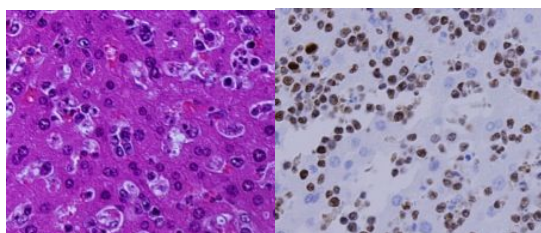


図2 MFモデルマウスの肝臓の病理組織
(左：H&E、右：Ki-67)

そこで、遺伝子導入効率を高めつつ、TCRの鎖と鎖を同量発現させ、さらには遺伝子導入が成功した細胞がGFP陽性となり、FACSや免疫染色で検出できるようにする目的で、H1、H1とGFPとの間にP2A配列を挿入したレトロウイルスベクター(H1-GFP)を構築した。そして、*INK4a/Arf*^{-/-}マウスCD4陽性T細胞に

H1-GFPベクターを導入、*Rag2*^{-/-}マウスに移植してみた。またコントロールとして、Dsg3特異的なTCRを持たないMock-GFPも同様に*INK4a/Arf*^{-/-}マウスCD4陽性T細胞に導入、*Rag2*^{-/-}マウスに移植した。その結果、移植2,4週後のマウスの表皮に存在するH1-GFP、Mock-GFP陽性細胞数に差はなく、CD4陽性T細胞の表皮向性に表皮抗原認識は関与しないことが示唆された。また移植8週後では、H1-GFP移植マウスは、Mock-GFP移植マウスより、表皮中のGFP陽性細胞が有意に増加していた。腫瘍細胞の表皮抗原認識は、表皮中での増殖を促進することが示された。しかし、Pautrier微小膿瘍の形成は認めなかった。

一方、*c-Myc*-GFPのみ導入した*Ink4a/Arf*^{-/-}マウスCD4陽性T細胞を*Rag2*^{-/-}マウスに移植した場合、Mock-GFPを導入した*Ink4a/Arf*^{-/-}マウスCD4陽性T細胞の場合と比較して、移植後4週間の時点で、表皮に浸潤したT細胞は有意に増加し、表皮内、特に毛能上皮内でPautrier微小膿瘍の形成を認めた。表皮中のCD4陽性T細胞の80%以上は、CD69・CD103陽性、CD44・CD62L陰性の皮膚レジデントメモリーT細胞で、病理像のみならず、T細胞のphenotypeもヒトのMFと類似していた。以上より、Pautrier微小膿瘍の形成には、がん抑制遺伝子の*Ink4a/Arf*の不活性だけでなく、がん遺伝子*c-Myc*が必要であることが示唆された。

さらに我々は、毛嚢上皮からメモリーT細胞の増殖に重要なIL-7が分泌されることに着目し、表皮特異的にIL-7を欠損させた*Rag2*^{-/-}マウスを作製した。そして*c-Myc*-GFPベクターを*INK4a/Arf*^{-/-}マウスCD4陽性T細胞に導入した後、この細胞を*Rag2*^{-/-}マウスおよび表皮特異的にIL-7を欠損させた*Rag2*^{-/-}マウスに移植し、比較した。その結果、後者では、有意に表皮中の腫瘍細胞の数が減少し、また、Pautrier微小膿瘍の形成も抑制された。表皮中のIL-7は、MFの表皮内増殖に対する治療標的になりうることを示唆された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

1. 福田桂太郎、舩越 建、谷川瑛子、海老原全、天谷雅行: IV 期悪性黒色腫に対するカルボプラチン+パクリタキセル併用療法の救済療法としての有効性 *日本皮膚科学会雑誌* 2014, 124 巻, 1555-61 (査読 有)

〔学会発表〕(計4件)

1. Adachi T, Kobayashi T, Sugihara E, Fukuda K, Ohyama M, Saya H, Yamada T, Amagai M, Nagao K: Skin-infiltrating CD4+ lymphoma cells depend on hair follicle derived IL-7. The 39th Annual Meeting of the Japanese Society for investigative Dermatology, 12/12-14/2014, Hotel Hankyu Expopark, Suita-City, Osaka.

2. Fukuda K, Sugihara E, Ohta S, Izuhara K, Amagai M, Saya H: Injury promotes melanoma metastasis via wound healing process with periostin. The 39th Annual Meeting of the Japanese Society for investigative Dermatology, 12/12-14/2014, Hotel Hankyu Expopark, Suita-City, Osaka.

3. Fukuda K, Sugihara E, Ohta S, Izuhara K, Amagai M, Saya H: Injury promotes melanoma metastasis via periostin induced in wound healing process. The 73rd Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, PACIFICO Yokohama, Yokohama, Kanagawa, 9/25-27/2014.

4. Fukuda K, Sugihara E, Amagai M, Saya H: Periostin expression induced by wound healing process promotes metastasis of melanoma cells. International Investigative Dermatology, 5/7-11/2013, Edinburgh International Conference Centre, Edinburgh, Scotland.

〔図書〕(計1件)

1. 福田桂太郎

鼻腔・副鼻腔悪性黒色腫

皮膚科臨床アセット 17 皮膚の悪性腫瘍 実践に役立つ最新の診断・治療 29, pp. 173-77, 中山書店, 2014.6

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

なし

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

福田 桂太郎 (FUKUDA KEITARO)
慶應義塾大学・医学部・特任助教
研究者番号 60464848