

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461677

研究課題名(和文)皮膚疾患におけるマクロファージ亜集団の解析

研究課題名(英文) Investigation of subpopulation of skin resident macrophages.

## 研究代表者

渡部 晶子 (Watabe, Akiko)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：30422132

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題を通して、腫瘍随伴マクロファージの研究として悪性黒色腫、乳房外パジェット病、皮膚T細胞リンパ腫におけるマクロファージの動向の解析を行った。その結果、異なるストローマにおけるマクロファージの刺激が腫瘍随伴性マクロファージの産生するケモカインを変化させ、その結果腫瘍内に導入されるエフェクター細胞が癌腫により異なることを明らかにした。また炎症性皮膚疾患では主に天疱瘡、類天疱瘡におけるマクロファージの動向を検討し、疾患におけるマクロファージの役割を証明した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the immunomodulatory effects of cancer-specific stroma on tumor-associated macrophages, using skin samples from malignant melanoma, extramammary Paget's disease and cutaneous T cell lymphoma patients. Our study suggested that these skin cancer possesses different cancer stroma (e.g. IL-4, periostin, RANKL, etc.), and those stromal factors stimulate macrophages to produce several specific chemokine, such as CCL17 and CCL22, to develop immunosuppressive tumor microenvironment in each tumor. Concerning inflammatory skin disease, we evaluated the immunomodulatory function of tissue-reside macrophages in pemphigus vulgaris and bullous pemphigoid, suggesting that the chemokine production from tissue-reside macrophages play important roles in developing autoimmune bullous disease.

研究分野：皮膚科

キーワード：腫瘍随伴性マクロファージ ケモカイン M2 マクロファージ 腫瘍微小環境

1. 研究開始当初の背景

- (1) T細胞にはTh1, Th2, Th17, Tregなど機能の異なる亜集団が存在し、それらは複雑に絡み合い感染防御、腫瘍免疫の誘導、また、アレルギー性疾患、膠原病などの発症に関与する。従来、これらT細胞亜集団の分化、機能制御は樹状細胞により担われていると考えられていた。しかし、近年、マクロファージにもM1, M2という亜集団が存在することが知られるようになり、樹状細胞に加えてそれらがT細胞の機能制御、局所への動員、また、免疫、炎症反応後の組織修復などに多面的に関与することが明らかにされた。一般に、M1マクロファージは、GM-CSF刺激やM-CSF存在下にIFN-g/LPS刺激を加えることにより誘導され、多量の炎症性サイトカインやROSを産生し、Th1細胞に対して促進的に働き、病原微生物の排除や抗腫瘍免疫に関与する。一方、M2マクロファージは、M-CSF存在下にIL-4刺激を加えることにより誘導され、免疫制御細胞として機能し、寄生虫感染防御、組織修復や腫瘍進展に関与する
- (2) 皮膚においても、すでにこれまでの研究により、腫瘍、炎症反応におけるTh1, Th2, Th17, Tregの関与が明らかにされてきており、当然、その背景にそれらの反応を支えるM1, M2マクロファージの存在が想定される。しかし、我々が調べ得た限りでは、皮膚疾患においてM1, M2マクロファージの存在、病態形成における役割を検討した研究は極めて限られている。その最大の原因として、マウスと異なりヒトM1, M2マクロファージを同定する特異性の高いマーカーが見いだされていなかったことが挙げられる。しかし、最近、これらを同定できる有効なマーカーが報告されるようになった。

2. 研究の目的

- (1) 本研究では、まず、新たに同定されたM1,

M2マクロファージのマーカーを用いて、炎症性皮膚疾患、皮膚腫瘍を幅広くスクリーニングし、皮膚疾患におけるM1, M2マクロファージの組織切片上での総数、両者の比率、組織分布を明らかにする。同様に、皮膚に生じる様々な肉芽腫性疾患を同様の手法で解析し、これまでの肉芽腫の形態に基づく分類を、肉芽腫を形成するマクロファージの想定される機能により再分類する。また、腫瘍にもM2-likeマクロファージと呼ばれるM2マクロファージに類似した機能を有するtumor associated macrophage (TAM: 腫瘍随伴性マクロファージ)が存在する。そこで、TAM特異的マーカーも解析に加えることで、皮膚腫瘍の組織学的に異なった病型間、また、同一腫瘍の上皮内がんから浸潤がんにいたる過程でのマクロファージ亜集団の総数、比率、組織分布などの変化を明らかにする。以上の研究をとおして皮膚疾患、疾患病期別の浸潤マクロファージのM1, M2プロフィールを明らかにし、病態形成におけるマクロファージの関与を明らかにするとともに新たな治療法開発の糸口をみつける。

(2) 次に、これまでの多くの報告でアレルギー性炎症や腫瘍進展に関与が示唆されているM2マクロファージの機能を修飾する薬剤を検討する。検討する薬剤は、有効性を見いだしたときに早期に臨床応用が可能な既にヒトに使用されている薬剤から候補を選ぶ。炎症性皮膚疾患を標的に検討する薬剤としては、抗アレルギー剤、ニコチン酸アミド、テトラサイクリン、DDS、活性型ビタミンD3、それに加えて紫外線を考えている。また、腫瘍におけるM2マクロファージの機能修飾の目的では、インターフェロン $\alpha$ ,  $\gamma$ , イミキモッド, DTICなどを検討する。検討方法としては、マウスでは骨髄細胞から、ヒトでは末梢血単球から至適サイトカインを用いてM2マクロファージを誘導し、それらに上記薬剤処理を行った後、LPS刺激を加えてその機能的変化をケモカイン、サイトカインprofileを指標に検討する。

3. 研究の方法

東北大学皮膚科教室が現有する炎症性皮膚疾患、皮膚腫瘍パラフィン包埋標本を用いて、M1, M2マクロファージの分類に用いられ

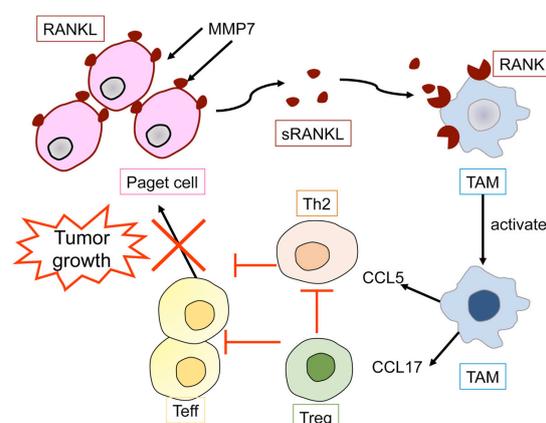
る抗体である、CD68、CD163、CD169、CD206 を用いて免疫染色をおこない、皮膚疾患全般にわたり浸潤細胞中にしめる M1, M2 マクロファージの割合、また、M1, M2 マクロファージの比率、局在を明らかにする。肉芽腫性疾患においては、肉芽腫の組織分類を M1, M2 マクロファージという観点から再考する。また、皮膚悪性腫瘍においては、個々の腫瘍により腫瘍内微小環境が異なることから、各々の腫瘍環境における特徴的なストローマ因子を検証し、各種腫瘍におけるマクロファージ刺激因子を明らかにする。次に、それらマクロファージ刺激因子が、どのように腫瘍内でマクロファージを刺激して、腫瘍微小環境を抑制型免疫環境として維持するかを、複数段階に分化させたヒト単球由来のマクロファージを DNA マイクロアレイ、定量的 PCR や ELISA 法を用いて、主にマクロファージから産生されるケモカイン、サイトカイン、matrix metalloproteinase (MMP) を網羅的に解析することにより明らかにする。さらにこれら実験で得た結果を、実際の腫瘍サンプルで各種病期における産生を解析し、これらの因子が実際に疾患予後に関与するか否かを明らかにする。

#### 4. 研究成果

本研究課題を通して、腫瘍随伴マクロファージの研究として悪性黒色腫、乳房外パジェット病、皮膚 T 細胞リンパ腫におけるマクロファージの動向の解析を行った。その結果、悪性黒色腫では間質にはペリオスチンと IL-4 が、乳房外パジェット病では RANKL を腫瘍自体が産生し間質に放出していること、皮膚 T 細胞リンパ腫では、疾患早期にペリオスチンが、進行期に IL-4 が有意であることが明らかとなった。これら、異なるストローマによる M2 マクロファージ刺激で産生されるケモカイン、サイトカイン、MMP を解析したところ、乳房外パジェット病では、RANKL 刺激により M2 マクロファージからの

CCL17 (TARC) の産生が未刺激群の数千倍産生されることが明らかとなった。さらにこのマクロファージから産生される CCL17 は、CCR4 陽性 T 細胞の遊走因子であることを確認した。注目すべきことに、CCR4 は主に抑制型免疫細胞である制御性 T 細胞や腫瘍の進展に関与する Th2 細胞に発現していることから、乳房外パジェット病では、RANKL が腫瘍随伴性マクロファージを刺激することにより産生されるケモカインにより、腫瘍内の抑制型免疫環境を維持することが明らかとなった (図 1)。

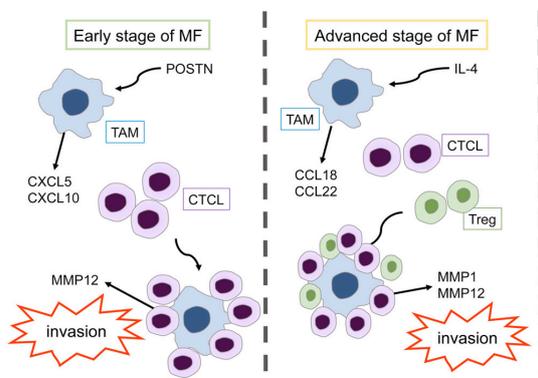
図 1



また、皮膚 T 細胞リンパ腫においては、疾患早期群のストローマ因子であるペリオスチンによる刺激により M2 マクロファージは CCL7 や CXCL10 など皮膚 T 細胞リンパ腫の早期の腫瘍形成に関与することがすでに報告されているケモカインが選択的に有意に増加することが明らかとなった。その一方、進行期のストローマの主成分である IL-4 による M2 マクロファージの刺激では、ペリオスチンと異なり、CCL17, CCL18, CCL22 など CCR4 陽性リンパ腫細胞の遊走および腫瘍内への制御性 T 細胞の遊走に関わるケモカインが主体に増加することが明らかとなった (図 2)。さらに実際、これらマクロファージ産生物質が皮膚 T 細胞リンパ腫の腫瘍細胞の遊走に関わっていることを明らかにし、実際にインターフェロンで治療した患者の腫瘍環境におけるケモカインの変化を確認

することができた。これらの結果から、これまで困難であった皮膚T細胞リンパ腫の治療における治療法の選択において大きな一助となることが考えられる。

図 2



その結果腫瘍内に導入されるエフェクター細胞が癌腫により異なることを明らかにした。また炎症性皮膚疾患では主に天疱瘡、類天疱瘡におけるマクロファージの動向を検討し、疾患におけるマクロファージの役割を証明した。

#### 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 10 件)

1. Fujimura T, Kambayashi Y, Furudate S, Kakizaki A, Hidaka T, Aiba S. Possible mechanisms of the crosstalk between Langerhans cells and regulatory T cells in extramammary Paget's disease by receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL)/ RANK pathways. *Brit J Dermatol* 2017; 176: 387-394. 査読あり
2. Fujimura T, Kakizaki A, Furudate S, Aiba S. A possible interaction between periostin and CD163+ skin-resident macrophages in pemphigus vulgaris and bullous pemphigoid. *Exp Dermatol*, 2016: in press, doi: 10.1111/exd.13157. 査読あり
3. Fujimura T, Kakizaki A, Furudate S, Kambayashi Y, Aiba S. Tumor-associated macrophages in skin: how to treat their heterogeneity and plasticity. *J Dermatol Sci* 2016; 83: 167-173. 査読あり
4. Fujimura T, Kambayashi Y, Kakizaki A, Furudate S, Aiba S. RANKL expression is a useful histochemical marker for differentiation of pagetoid squamous cell carcinoma in situ from Extramammary Paget's Disease. *J Cut Pathol*

2016; 32: 772-775. 査読あり

5. Furudate S, Fujimura T, Kakizaki A, Hidaka T, Asano M, Aiba S. Tumor-associated M2 macrophages in mycosis fungoides acquired immunomodulatory function by interferon alpha and interferon gamma. *J Dermatol Sci* 2016; 83: 182-189. 査読あり
  6. Fujimura T, Kambayashi Y, Furudate S, Kakizaki A, Hidaka T, Asano M, Aiba S. Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL)/RANK signaling promotes cancer-related inflammation through M2 macrophages. *Exp Dermatol* 2016; 25: 397-399. 査読あり
  7. Furudate S, Fujimura T, Kakizaki A, Kambayashi Y, Asano M, Watabe A, Aiba S. The possible interaction between periostin expressed by cancer stroma and tumor-associated macrophages in developing mycosis fungoides. *Exp Dermatol* 2016; 25: 107-112. 査読あり
  8. Kambayashi Y, Fujimura T, Furudate S, Asano M, Kakizaki A, Aiba S. The possible interaction between receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL) expressed by extramammary Paget cells and its ligand on dermal macrophages. *J Invest Dermatol* 2015; 135: 2547-50. 査読あり
  9. Fujimura T, Kambayashi Y, Furudate S, Asano M, Kakizaki A, Aiba S. Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL) promotes the production of CCL17 from RANK+ M2 macrophages. *J Invest Dermatol* 2015; 135: 2884-2887. 査読あり
  10. Kakizaki A, Fujimura T, Furudate S, Kambayashi Y, Yamauchi T, Yagita H, Aiba S. Immunomodulatory effect of peritumoral administration of interferon-beta on melanoma through tumor-associated macrophages. *Oncimmunology* 2015; 4: e1047584. 査読あり
- [学会発表] (計 6 件)
1. Fujimura T. Tumor-associated macrophages in skin: how to treat their heterogeneity and plasticity. Japanese society for investigative Dermatology, 41th annual meeting, Sendai, Sendai International Center, Japan. シンポジウム、口演, 2016/12/9~11
  2. Kakizaki A, Fujimura T, Furudate S, Kambayashi Y, Aiba S. IFN-β augments the anti-tumor effects of PD-1 Abs in melanoma: the possible immunotherapy for metastatic melanoma. Japanese society for investigative Dermatology, 41th annual meeting, Sendai, Sendai International Center, Japan. 一般 口演, 2016/12/9~11
  3. Furudate S, Fujimura T, Kakizaki A, Aiba S. Immunological background of mycosis fungoides develops from inflammatory to steady states. Japanese society for investigative Dermatology, 41th annual meeting, Sendai, Sendai International Center,

- Japan. 一般、ポスター, 2016/12/9~11
4. Sato Y, Furudate S, Fujimura T, Kambayashi Y, Kakizaki A, Aiba S. Possible immunomodulatory effects of tumor-associated macrophages in RANKL expressing apocrine-origin cancers. Japanese society for investigative Dermatology, 41th annual meeting, Sendai, Sendai International Center, Japan. 一般、ポスター, 2016/12/9~11
  5. Tanita K, Fujimura T, Kakizaki A, Furudate S, Aiba S. Immunomodulatory effects of periostin on CD163+ skin-resident macrophages in pemphigus vulgaris and bullous pemphigoid. Japanese society for investigative Dermatology, 41th annual meeting, Sendai, Sendai International Center, Japan. 一般 口演, 2016/12/9~11
  6. Fujimura T, Kakizaki A, Furudate S, Aiba S. A possible interaction between periostin and CD163+ skin-resident macrophages in pemphigus vulgaris and bullous pemphigoid. European Society for Dermatological Reserch, annual meeting, Munich, Germany, 一般、ポスター, 2016/9/7~10.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

渡部 晶子 (Watabe, Akiko)

東北大学・病院・助教

研究者番号：30422132

### (2) 研究分担者

伊藤 由美子 (Ito Yumiko)  
東北大学・病院・臨床検査技師  
研究者番号：00375057  
相場 節也 (Aiba Setsuya)  
東北大学・医学系研究科・教授  
研究者番号：80159269  
木村 裕 (Kimura Yutaka)  
東北大学・病院・助教  
研究者番号：90375056  
藤村 卓 (Fujimura Taku)  
東北大学・医学系研究科・助教  
研究者番号：50396496

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

### (4) 研究協力者

柿崎 彩 (Kakizaki Aya)  
東北大学・医学系研究科・大学院生