（書式１２）

氏　　名	神林（かんばやし）　由美（ゆみ）
学位の種類	博士（医学）
学位授与年月日	平成 27 年 3 月 25 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項
研究科専攻	東北大学大学院医学系研究科（博士課程）医科学　専攻
学位論文題目	The mechanisms of immunoregulatory effects in extramammary Paget's disease by RANKL /RANK pathways.**(乳房外パジェット病における RANKL/RANK 経路を介した免疫制御機構の解明)**
論文審査委員	主査　教授　相場　節也 教授　石井　直人　教授　小笠原　康悦

論文内容要旨

アポクリン腺由来の皮膚悪性腫瘍である乳房外パジェット病は、高齢者の外陰部に好発し、真皮へ浸潤すると高率にリンパ節転移、他臓器転移を引き起こす。浸潤性乳房外パジェット病は、術後補助療法として化学療法や放射線療法などが施行されるが、奏効率は低く、5 年生存率は 50%前後との報告もあり、予後不良である。

骨代謝調節因子RANKL（receptor activator of nuclear factor kappa B ligand）はTNF（tumor necrosis factor）superfamilyの一つで、骨芽細胞に発現し、破骨細胞が発現するRANKと結合することにより骨のリモデリングを調節する。このRANKL/RANK経路は、アポクリン腺由来である乳腺の発育、乳汁産生に関与する他、乳癌の骨転移、腫瘍環境形成に重要な役割を果たすことが知られている。また、紫外線照射により高発現する表皮細胞のRANKLが、表皮のランゲルハンス細胞のRANKと結合することにより、$CD4^+CD25^+$ regulatory T cells(Tregs)を皮膚局所や所属リンパ節に誘導することがマウスモデルで証明され、RANKL/RANK経路が皮膚の免疫抑制環境形成に関与することが報告されている。

これまで、乳癌における RANKL/RANK の発現は報告されてきたが、乳癌と同様にアポクリン由来である乳房外パジェット病での報告はない。そこで私は、乳房外パジェット病の腫瘍細胞に RANKL や RANK が発現し、腫瘍環境形成に関与するのではないかと仮説を立てた。

当科で経験した乳房外パジェット病 12 例、浸潤性乳房外パジェット病 8 例のパラフィン切片で免疫組織化学染色を行い、腫瘍細胞（Paget 細胞）に RANKL が発現することを確認した。一方、受容体の RANK は発現していなかった。次に laser microdissection（LMD）法で腫瘍部表皮と非腫瘍部表皮を採取し、RANKL および RANK の発現を定量的 PCR で確認した。RANKL の発現は有意差をもって腫瘍部表皮で高く、RANK の発現は、むしろ腫瘍部表皮で低い傾向にあった。以上より、Paget 細胞は、RANKL を発現することが分かった。RANKL は膜結合型蛋白で、matrix metalloproteinases (MMPs)によって切断され、可溶型になることが知られている。乳癌では、MMP-7 が RANKL の切断に関与し、切断された可溶型 RANKL が、破骨細胞の RANK と結合し破骨細胞を活性化することで、溶骨性変化が促進することが知られている。次に、乳房外パジェット病における MMP-7 の発現を免疫組織化学染色で確認したところ、腫瘍細胞およびその周囲に強く発現していることが明らかになった。また、健常部のアポクリン腺に MMP-7 は染まらないが、乳房外パジェット病の病変部真皮アポクリン腺には強く染まることを確認した。さらに、LMD 法で採取した病変部表皮の MMP-7 の発現を定量 PCR で確認すると、健常部表皮と比較して有意差をもって MMP-7 の発現が高いことが明らかになった。

実際、病変部の組織中に、可溶型 RANKL が存在するかを確認するために、手術時に採取した乳房外パジェット病の病変部と健常部をそれぞれ 7 日間培養し、培養上清中の可溶型 RANKL を ELISA 法で測定した。健常部と比較し、病変部の培養上清中には、可溶型 RANKL が優位に存在することを確認した。また、凍結組織の RANKL の免疫組織学染色でも、病変部真皮に健常部真皮と比較し RANKL が存在することを確認した。

一方、RANK は、表皮の一部の細胞と、真皮の細胞にびまん性に発現していることを凍結切片の免疫組織学染色で確認した。表皮の RANK は、CD1a との蛍光二重染色で一致しており、表皮ランゲルハンス細胞が主に CD1a を発現していることが明らかとなった。一方、真皮の RANK の発現は、以前我々が報告した乳房外パジェット病に浸潤する M2 マクロファージの分布に類似していた。M2 マクロファージは、tumor-associated macrophages(TAMs)の中で CD163、CD206、Arginase 1 (Arg 1)などのマーカーを持ち、腫瘍環境形成に関与することから、免疫抑制型のマクロファージであることが知られている。そこで、CD163、CD206、Arg 1 および CD3 と RANK の蛍光二重染色を施行したところ、RANK 陽性細胞である CD163 と CD206、Arg 1 は一致したが、RANK と CD3 とはほとんど一致しなかった。

RANK陽性細胞中のCD163 陽性率は約 62%であった。よって、真皮におけるRANK陽性細胞の主体はM2 マクロファージであり、残り約 40%のCD163^{-}RANK^{+}細胞は、過去の報告などから真皮樹状細胞を考えた。しかし、樹状細胞の成熟マーカーであるCD83, CD205, CD208 の免疫組織化学染色では、真皮にほとんど陽性細胞は認めなかった。以上より、CD163^{-}RANK^{+}細胞は、未熟な樹状細胞や未分化マクロファージなどの骨髄系細胞である可能性を考えた。

次に、RANKL刺激によるM2 マクロファージの性状の変化を調べるために、ヒト末梢血CD14^{+}単球から、M2 マクロファージを誘導した。M-CSF単独で誘導したマクロファージは、M2 マクロファージのマーカーであるCD163 やArg 1 を発現するがRANKは発現しない。しかし、M-CSF にIL-4 を加え培養するとはじめて、RANKを発現することがわかった。このことは、実際の組織中に存在するCD163^{+}RANK^{-}細胞（約 50%）が、IL-4 の影響を受けていない未熟なM2 マクロファージである可能性を示唆している。*In vitro*で誘導したCD163^{+} Arg 1^{+}RANK^{+}M2 マクロファージを用いて、可溶型RANKL刺激によるケモカインやサイトカインの変化を定量的PCRやELISA 法で確認した。すると、mRNA,蛋白レベルの両方で可溶型RANKL濃度依存性にCCL17 の発現および産生亢進がみられた。CCL17 は、CCR4 陽性細胞の走化性に関与するケモカインの一つで、CCR4 陽性Tregsの誘導を介して局所、末梢の免疫寛容に重要な役割を果たすことが知られている。可溶型RANKLで刺激したM2 マクロファージを用いたCD4^{+} T細胞のchemotaxis assay では、可溶型RANKLの濃度依存性にCD4^{+} T細胞は走化性を示し、抗CCR4 抗体でその走化性が低下することを確認した。実際の病変にもCD163^{+}CCL17^{+}細胞やTregsのマーカーの一つであるFoxp3^{+}細胞が浸潤し、またmRNAレベルでも非腫瘍部と比較して腫瘍部ではCCL17 の発現が高いことを確認した。

以上より、乳房外パジェット病におけるRANKL/RANK経路は、腫瘍周囲に浸潤するM2 マクロファージからのCCL17 産生を介してFoxp3^{+} Tregsを腫瘍部へ遊走し、局所の免疫抑制環境を誘導することで、腫瘍環境形成、転移に関与する可能性が示唆された。

現在、骨粗鬆症、多発性骨髄腫、固形癌骨転移による骨病変の治療薬として抗 RANKL 抗体製剤（完全ヒト型モノクローナル抗体：Denosumab）が使用されている。今回の研究結果から、抗 RANKL 抗体は、乳房外パジェット病の骨転移病変にだけではなく、局所の免疫抑制環境の改善、腫瘍浸潤・転移抑制に作用し、確立された薬物療法のない乳房外パジェット病の新規治療薬の一つと成り得るのではないかと考えた。

【所定様式⑬No.1】大学院の課程による者（課程博-医学）

審　査　結　果　の　要　旨

博士論文題目　博士論文題目：The mechanisms of immunoregulatory effects in extramammary Paget's disease by RANKL /RANK pathways.
(乳房外パジェット病における RANKL/RANK 経路を介した免疫制御機構の解明)

所属専攻・分野名　医科学専攻　・　皮膚科学分野

氏名　神林由美

乳房外パジェット病は、アポクリン腺由来の表皮内癌で、高齢者の外陰部に好発し、真皮へ浸潤すると高率に他臓器転移を引き起こす。治療は手術療法で、手術適応のない症例や転移症例に対する確立された薬物療法はない。しかし、今後高齢化が進み、薬物療法の需要が増加することが予想される。

骨代謝調節因子 RANKL（receptor activator of nuclear factor kappa B ligand）は TNF（tumor necrosis factor）superfamily の一つで、破骨細胞が発現している RANK と結合することにより骨のリモデリングを調節する。この RANKL/RANK 経路は、アポクリン腺由来である乳腺の発育、乳汁産生に関与する他、乳癌の骨転移、腫瘍環境形成に重要な役割を果たすことが知られている。また、紫外線照射により高発現する表皮細胞の RANKL が、表皮のランゲルハンス細胞の RANK と結合することにより、$CD4^+CD25^+$regulatory T cells(Tregs)を皮膚局所や所属リンパ節に誘導することがマウスモデルで証明され、RANKL/RANK 経路が皮膚の免疫抑制環境形成に関与することが報告されている。それゆえ、神林君は、乳癌と同様、アポクリン腺由来の乳房外パジェット病において、RANKL/RANK 経路が腫瘍進展、骨転移をはじめとした他臓器転移などに関与するかを検証した。

乳房外パジェット病における RANKL、RANK の発現は、手術標本のパラフィン切片、および凍結切片を用いて免疫組織化学染色を行い、また laser microdissection（LMD）法で表皮内の病変部、非病変部を採取し、それぞれにおける RANKL、RANK の発現を定量的 PCR で評価した。RANKL は、腫瘍細胞（Paget 細胞）および病変部表皮に有意に発現していたのに対し、受容体である RANK は表皮の樹状細胞にのみ発現し、その発現は腫瘍部表皮で低いことを確認した。膜結合型蛋白である RANKL は、matrix metalloproteinases (MMPs)によって切断され、可溶型に変化する。乳癌では、MMP-7 が RANKL の切断に関与すると報告されている。RANKL と同様に腫瘍部の MMP-7 の発現を、免疫組織化学染色、LMD 法で採取した腫瘍部の定量的 PCR で確認した。また、手術時に採取した乳房外パジェット病の組織培養では、腫瘍部の培養上清中に可溶型 RANKL（sRANKL）が非腫瘍部と比較し有意に存在することを ELISA 法で確認した。一方 RANK は、病変部真皮にびまん性に発現しており、その分布は乳房外パジェット病に浸潤する M2 マクロファージの分布に類似していた。M2 マクロファージは、tumor-associated macrophages(TAMs)の中で CD163、CD206、Arginase-1 (Arg-1)などのマーカーを持ち、腫瘍環境形成に関与することが知られ、乳癌では Tregs と同様に浸潤細胞数が多いほど予後不良であることが報告されている。蛍光抗体法で、真皮の RANK 陽性細胞は、CD163、CD206、Arg-1 陽性細胞と一致していることを確認した。以上より、真皮における M2 マクロファージが RANK の主なソースであることが示唆された。

次に、ヒト末梢血 $CD14^+$単球から、M-CSF と IL-4 で誘導した $CD163^+$ $CD206^+$ $Arg\text{-}1^+$M2 マクロファージに RANK が発現していることを確認した後、それらの細胞における sRANKL 刺激の影響を定量的 PCR や ELISA 法で確認した。mRNA,蛋白レベルの両方で sRANKL 濃度依存性に CCL17 の発現・産生が著明に亢進した。CCL17 は、CCR4 陽性細胞の走化性に

関与するケモカインの一つで、CCR4 陽性 Tregs の誘導を介して局所、末梢の免疫寛容に重要な役割を果たす。sRANKL で刺激した M2 マクロファージを用いた T 細胞の chemotaxis assay では、sRANKL の濃度依存性に T 細胞は走化性を示し、抗 CCR4 抗体でその走化性が低下することを確認した。実際の病変部真皮にも、$CD163^{+}CCL17^{+}$細胞や Tregs のマーカーの一つである $Foxp3^{+}$ 細胞が浸潤し、また、mRNA レベルでも、腫瘍部で有意に CCL17 が発現していることを確認した。以上より、乳房外パジェット病における RANKL/RANK 経路は、腫瘍周囲に浸潤する M2 マクロファージからの CCL17 産生を介して $Foxp3^{+}$ Tregs を腫瘍部へ遊走し、局所の免疫抑制環境を誘導する可能性が示唆された。

本研究は、骨粗鬆症、多発性骨髄腫、固形癌骨転移病変の治療薬である抗 RANKL 抗体製剤（完全ヒト型モノクローナル抗体：Denosumab）が、乳房外パジェット病の骨転移病変にだけではなく、局所の免疫抑制環境の改善、腫瘍浸潤・転移抑制にも作用し、乳房外パジェット病の新規治療薬としての可能性を見出したと考える。

よって，本論文は博士（医学）の学位論文として合格と認める。