

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19591301

研究課題名（和文） 悪性黒色腫患者の経皮免疫療法で誘導される細胞障害性 T 細胞のケモカイン受容体と走化の調節

研究課題名（英文） Regulation of cell migration and chemokine expressions on cytotoxic T cells induced by percutaneous immunization in melanoma patients

研究代表者 八木 宏明（YAGI HIROAKI）

浜松医科大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：20242779

研究成果の概要：倫理委員会承認のもとに、悪性黒色腫に対する特異ペプチドを用いて経皮的に免疫を行う経皮免疫療法（PPI）を病期 III 以上の患者に施行した。PPI により患者末梢血にペプチドを抗原特異的に認識する腫瘍細胞特異的な細胞障害活性を有する細胞障害性 T 細胞（CTL）の誘導に成功した。この CTL の細胞表面に発現される T 細胞受容体 V β を解析したところ、複数の患者で少数の V β に偏りがみられた。これらの V β を有する CTL のケモカイン受容体発現を調べたところ、多くは CXCR3 陽性、CCR4 陰性であることがわかった。そこで、CCD カメラで real-time に細胞の動きが観察できる TAXIScan という装置を用いて細胞走化の解析を行った。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：悪性黒色腫、メラノーマ、免疫療法、細胞障害性 T 細胞、ケモカイン、ケモカイン受容体、細胞走化、ケモタキシス、ペプチド

1. 研究開始当初の背景

経皮免疫（PPI）によるメラノーマ治療は大学の倫理委員会の承認のもとにおこなった。

我々はこれまでに表皮に常在する強力な DC であるランゲルハンス細胞（LC）に注目し、それを皮膚常在のまま利用できる安全で、しかも簡便ながん免疫治療法の開発をマウス悪性黒色腫細胞ばかりでなく、種々のマウス実験がん細胞を用い研究してきた。その結果、テープストリッピングや瞬間接着剤な

どを用い急性に角質層破壊した皮膚では種々の物質の透過性が高まるのみならず、LC が活性化し CTL への強いプライミング能を獲得すること、その一部は高い CTL 活性を保持したまま近傍のリンパ節へ移動すること、またその皮膚へ腫瘍関連抗原ペプチドを塗布すれば、生体内でそれに特異的な CTL 活性を増強活性化できることが判明しており、1) ヒトの角質層破壊には瞬間接着剤が有効であること、2) 角質層破壊した

ヒト皮膚の表皮LCではCD40, CD54, CD80, CD86, HLAクラスI, II分子などの活性化、刺激誘導補助因子の発現の誘導、増強が見られること、3)角質層破壊から24時間後には表皮LC密度が減少し、間接的なリンパ節移動現象が見られることを見出した。さらに、従来の化学療法が無効であった末期悪性黒色腫患者において臨床試験を開始した。はじめに悪性黒色腫細胞特異的なCTLが誘導されるか、また実際に誘導されたCTLにより腫瘍が縮小するかを検討した。HLA拘束性の抗原ペプチドを合成し、HLA-A24の患者では tyrosinase, gp-100, MAGE-2, MAGE-3 のカクテルを使用し、HLA-A0201の患者では MART-1 を使用した。CTLのモニタリングとしては、テトラマー、ペンタマーまたはインターフェロン γ 産生誘導能を検討した。その結果、7回以上の免疫が終了した5例のすべてで、すべてあるいはいずれかのペプチドに対するCTLが誘導された。1例は進行して死亡したが、2例は腫瘍が縮小し、治療開始時にすべての腫瘍を摘出した2例では、それまで進行性であった腫瘍の再発が予防された。症例数が少なく臨床効果の比較解析には至らないが、化学療法無効例への施行である点を考慮すると極めて高い臨床効果と考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、経皮免疫療法の効率化への基礎研究として抗原ペプチド特異的CTLのT細胞受容体V β とケモカイン受容体の発現をモノクローナル抗体により解析する。さらにケモカイン受容体では、サイトカインなどの各種因子と培養することにより、その発現を調節する因子の検討を行う。また限界希釈法で細胞株の樹立を行い、より精度の高い解析をめざす。さらに標的となる悪性黒色腫細胞側での、これらケモカイン受容体に対するリガンドの発現を調節する因子を培養細胞で検索する。さらにCTLの走化をTranswellにより解析しターゲット細胞への走化に関する検討を行う。これらの解析により、経皮免疫療法において最も重要なステップであるCTLと標的となる腫瘍細胞の相互反応における最適な細胞環境の条件を明らかにする。

3. 研究の方法

対象患者:PPIの目的と意義、試験方法および試験内容を理解し、同意したステージIV、身体活動状態はステータス0~1、年齢は20才から80才までのメラノーマ患者とする。治療前に肉眼的あるいはCT/MRIなど画像学的に腫瘍径(体積)などにより評価可能な病変を有し、HLA検査で適切ながんペプチドがあることが条件となる。本研究ではHLA-A0201およびA24に結合するペプチドを用い

た。

PPI治療:角層剥離の24時間後に剥離皮膚表面にHLA-A02ではMART-1ペプチド溶液、HLA-A24ではgp-100, tyrosinase, MAGE-2, MAGE-3のペプチド混合液を含有するパッチを、24時間貼付する。がんの進行状況に応じて、この操作を一月に1回、計7回おこなった。PPI7回終了後に治療効果を判定し、同時にCTLの増加の有無を調べる。

フローサイトメーターによるCTL検出:

1. テトラマー結合試験、ペンタマー結合試験、細胞内インターフェロン γ 産生細胞検出試験

免疫療法に使用したペプチドの各々について誘導されたCTLを特異的に認識するMHCテトラマー、MHCペンタマーを合成し、三重染色で、これらと結合するCD8陽性細胞数を解析する。末梢血から単核細胞を分離し、免疫ペプチドを添加し培養する。3日後に細胞を回収し、ペプチド特異的にインターフェロン γ を産生するCD8陽性細胞数を解析する。

T細胞受容体V β とケモカイン発現の解析メラノーマ特異的CTLのT細胞受容体V β を、実際の患者の血液で解析したところ2~3種類のT細胞受容体V β に偏りがある可能性が見いだされた。これらのCTLの多くにおいてケモカイン発現は、CXCR3陽性、CCR4陰性であった。現在のところ、CXCR3のリガンドに対する走化性をCCDカメラによりreal timeで観察できるTAXIScan™という新たな方法で解析する。

4. 研究成果

臨床効果 従来の化学療法が無効であった末期悪性黒色腫患者において臨床試験を開始した。はじめに悪性黒色腫細胞特異的なCTLが誘導されるか、また実際に誘導されたCTLにより腫瘍が縮小するかを検討した。HLA拘束性の抗原ペプチドを合成し、HLA-A24の患者では tyrosinase, gp-100, MAGE-2, MAGE-3 のカクテルを使用し、HLA-A0201の患者では MART-1 を使用した。CTLのモニタリングとしては、テトラマー、ペンタマーまたはインターフェロン γ 産生誘導能を検討した。その結果、7回以上の免疫が終了した症例のすべてで、すべてあるいはいずれかのペプチドに対するCTLが誘導された。臨床効果としては、腫瘍の縮小、消退、それまで進行性であった腫瘍の再発予防が確認された。症例数が少なく臨床効果の比較解析には至らないが、化学療法無効例への施行である点を考慮すると極めて高い臨床効果と考えられる。

さらにPPIにより患者末梢血にペプチドを抗原特異的に認識する腫瘍細胞特異的な細胞障害活性を有する細胞障害性T細胞(CTL)の誘導に成功した。このCTLの細胞表面に発現されるT細胞受容体V β を解析したところ、複数の患者で少数のV β に偏りがみられた。

これらの Vb を有する CTL のケモカイン受容体発現を調べたところ、多くは CXCR3 陽性、CCR4 陰性であることがわかった。これらの結果から、CCD カメラで real-time に細胞の動きが観察できる TAXIScan という装置を用いて、治療により誘導された CTL が効率よく腫瘍巣に浸潤するための条件を調べる細胞走化の解析のセットアップが完了した。

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 2 件)

Promiscuous interaction between gold-specific T cells and APCs in gold allergy.

Hashizume H, Seo N, Ito T, Takigawa M, Yagi H. J Immunol. 2008;181(11):8096-102

The current status and future direction of percutaneous peptide immunization against melanoma.

Seo N, Takigawa M.

J Dermatol Sci. 2007;48(2):77-85

[学会発表] (計 1 件)

Yagi H,

Long-term immunological and clinical outcomes in advanced melanoma patients treated with percutaneous peptide immunization, the 10th International Symposium on Dendritic Cells, Kobe, 2008

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

八木 宏明 (YAGI HIROAKI)

浜松医科大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：19591301

(2) 研究分担者

瀬尾 尚宏 (SEO NAOHIRO) (2007 年度)

浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号：50283354

(3) 連携研究者

瀬尾 尚宏 (SEO NAOHIRO) (2008 年度)

浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号：50283354