

## 15 - 10 悪性黒色腫の新しい診断及び治療法の開発に関する研究

主任研究者 信州大学医学部 齋田俊明

### 研究成果の要旨

悪性黒色腫は臨床診断、病理組織診断ともに難しい腫瘍であり、誤診されることが稀でない。そこで FISH 法や MLPA 法などの手法を用いる分子診断法を開発し、診断確定に有用なことを明らかにした。センチネルリンパ節生検について多施設共同研究を進め、203 症例を集積し、その精度・適用・意義に関する知見をえた。また、glypican-3 と SPARC が本腫瘍の新たな血清腫瘍マーカーとして、早期段階から有用なことを見出した。進行期症例に対する新たな治療法として、悪性黒色腫抗原ペプチドで刺激した樹状細胞を用いる免疫療法とインターフェロン 遺伝子を用いる遺伝子治療の臨床研究を施行し、いずれも一部の症例で転移巣の消退がみられて注目された。また、EBM に基づく悪性黒色腫の診療ガイドライン作成の作業を進めた。基礎的研究成果としては、本腫瘍の新規腫瘍抗原として PAX3 と M27 を同定した。また、本腫瘍の進展に関与する分子として注目されている BRAF と Skp-2 の siRNA を構築し、これらが黒色腫細胞の増殖、浸潤能を阻害することを明らかにした。その他、本腫瘍の臨床疫学、骨転移の発症機序などについて研究を進めた。

### 研究者名および所属施設

研究者名	所属施設および職名
齋田俊明	信州大学医学部 教授
山本明史 神保孝一 大塚藤男	国立がんセンター中央病院 医長 札幌医科大学医学部 教授 筑波大学大学院人間総合科学研究科 教授
影下登志郎	熊本大学大学院医学研究科 助教授
松崎ゆり子 井口東郎	慶應義塾大学医学部 助手 九州がんセンター臨床研究部 室長

### 分担研究課題

悪性黒色腫の新しい診断・治療法の開発と診療ガイドラインの確立  
悪性黒色腫の新しい治療法の開発に関する研究  
悪性黒色腫の遺伝子診断  
サイトカイン受容体の阻害によるメラノーマ転移能の制御の研究  
メラノーマ免疫療法におけるエスケープ機構の解析  
悪性黒色腫の診断や治療に応用可能な腫瘍抗原の同定  
悪性黒色腫の骨転移に対する分子標的治療の開発に関する研究

### 総括研究報告

#### 1 研究目的

本研究の目的は、転移を生じやすく、治療抵抗性で難治な腫瘍として知られる悪性黒色腫の予後改善を目指し、新しい診断法と治療法を開発することである。具体的には、臨床的課題として、早期病変の的確な検出と診断、

分子診断法の開発、センチネルリンパ節生検法の確立、新規腫瘍マーカーの発見、進行期症例の新しい治療法としての樹状細胞療法と遺伝子治療の開発、本腫瘍の診療ガイドラインの作成などを設定した。また基礎的課題としては、悪性黒色腫の新規腫瘍抗原の発見・同定、黒色腫細胞の遺伝子異常の解析と siRNA を用いる治療法の開発、黒色腫細胞の増殖・浸潤能にかかわるサイトカインとその受容体の検索、白人の悪性黒色腫と比較した日本

人悪性黒色腫の臨床疫学的特徴、本腫瘍の骨転移成立機序の解明などを設定した。

## 2 研究成果

本年度の成果を臨床的研究と基礎的研究に分けて記載する。

### 1) 臨床的研究成果

a) 悪性黒色腫の分子診断法の開発：掌蹠の悪性黒色腫に特徴的なダーモスコピー所見として齋田らが見出した parallel ridge pattern を呈する掌蹠の病変の中に、臨床的、病理組織学的にはごく軽微な所見しか呈さず、とても悪性黒色腫とは診断できない症例が複数経験された。掌蹠の悪性黒色腫では CGH 解析により多数の遺伝子に増幅がみられ、とくに 11q13 に座位する Cyclin D1 遺伝子の増幅が約 40% で認められることが知られている。そこで齋田らは臨床的、病理組織学的には軽微な所見だが、ダーモスコピーにて parallel ridge pattern を呈する 9 病巣につき、FISH 法にて Cyclin D1 の増幅の有無を検索したところ、4 病巣(44%)で明らかな増幅が認められた。他方、臨床的、病理組織学的に悪性黒色腫早期病変との鑑別が難しいが、ダーモスコピーにて良性病変に特徴的な parallel furrow pattern を呈する 7 病巣では Cyclin D1 の増幅はまったく見出されなかった。以上より、手技的に煩雑な CGH に比べ、パラフィン切片で比較的容易に検索できる FISH 法が掌蹠の悪性黒色腫早期病変の診断確定に有用なことが明らかにされた。このことは、黒色腫早期病変の的確な検出に役立つのみでなく、早期病変の生物学的特徴の解明にも大きく貢献するものと考えられる。

Spitz 母斑は良性の母斑の一型だが、異型性の強いメラノサイトの増殖がみられ、しばしば悪性黒色腫と誤診される。CGH 解析で網羅的に遺伝子の増幅・欠失を調べると悪性黒色腫では各種の遺伝子に増幅・欠失が認められるが、Spitz 母斑を含めて良性の母斑では増幅・欠失はほとんど見出されない。そこで齋田らは、全遺伝子座をほぼ網羅するように選出された代表的な癌関連遺伝子 76 個の増幅・欠失を一挙に解析する MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification) 法が、悪性黒色腫と母斑の鑑別に役立つかが検討した。悪性黒色腫原発巣 16 病巣、Spitz 母斑 14 病巣、通常の母斑 18 病巣から DNA を抽出して検討したところ、悪性黒色腫では全例で多数の遺伝子に増幅・欠失が高頻度に認められた(平均 13 個の遺伝子に増幅・欠失あり)。これに対し、Spitz 母斑全例と通常の母斑の多くは増幅・欠失を示さ

ず、7 病巣においてわずか 1 ~ 2 個の遺伝子の増幅・欠失が検出されたのみであった。この結果は、パラフィン切片数枚で比較的簡便に検索できる MLPA 法により、悪性黒色腫と Spitz 母斑が分子鑑別診断できる可能性を示すものである。

b) センチネルリンパ節生検の多施設共同研究：悪性黒色腫におけるセンチネルリンパ節生検の手技確立と意義を明らかにするために、色素法と radiotracer + ガンマプローブを併用する一定の手法を規定したうえで、当研究班に加わる臨床施設の共同研究を実施した。これまでに 203 例がエントリーされ、198 例でセンチネルリンパ節が同定された(同定率 97.5%)。センチネルリンパ節での顕微鏡的転移の陽性率は、原発巣の進行度(病変の厚さ)に比例して高まることが示されたが、in situ 病変と原発巣の厚さ 1 mm 未満の症例ではセンチネルリンパ節転移は検出されなかった。なお、偽陰性率(顕微鏡的転移がセンチネルリンパ節で陰性で、それより上位の非センチネルリンパ節で陽性)は 0.98% (2/293) に過ぎなかった。以上より、センチネルリンパ節生検は、患者の QOL を含めて、予防的郭清に取って代わる有用な治療戦略であることが確認された。今後、予後との相関などについても検討する予定である。

c) 新規腫瘍マーカーの発見とその意義：悪性黒色腫の血清腫瘍マーカーとしてはこれまでに 5-S-cysteinyl dopa や MIA (melanoma inhibitory activity) などが知られていたが、いずれもかなり進行した段階で上昇するものである。影下らは、癌胎児性抗原の一つである Glypican-3 (GPC3) の血中濃度が悪性黒色腫患者の約 40% で高値を示し、しかも病期 I、II のような早期段階から同程度の陽性率を示すことを見出した。さらに影下らは、SPARC (secreted protein, acidic and rich in cysteine) の血中濃度が悪性黒色腫患者において同じく比較的早期から上昇することを見出した。GPC3 と SPARC を組み合わせると、病期 0 という早期段階から 13/15 (87%) の患者が検出され、早期診断にきわめて有用な可能性が示された。

d) 進行期症例の免疫療法・遺伝子治療の臨床試験：進行期悪性黒色腫は化学療法、放射線療法に抵抗性であり、有効な治療は存在しない。山本らは、進行期悪性黒色腫患者末梢血からえた樹状細胞を、HLA-A2 および A24 拘束性に認識される悪性黒色腫抗原ペプチド各 5 種類でパルスし、患者の皮下に投与する免疫療法の第 I、II 相試験を実施した。有害反応はとくに認められず、第 I 相試験では 9 例中 CR 1 例、PR 1 例、SD 1 例がえられ、第 II 相試験では PR 1 例、SD 4 例がえられた。第 I 相の CR 例 1

例(32ヶ月)と第II相のSD1例(14ヶ月)で治療が継続されている。

斎田らは正電荷リポソーム包埋インターフェロン 遺伝子製剤を進行期患者の皮膚転移巣に注入する遺伝子治療を開始した。第1例目では1個の転移巣に1回10ugのDNAを隔日、計6回注入したところ、遺伝子注入転移巣の完全消退のみでなく、非注入転移巣にも効果がみられた。第2例目では一度に3個の皮膚転移巣に各10ugのDNAを隔日、計6回投与し、第3例目ではやや大きめの皮膚転移巣1個に1回量30ugのDNAを局注した。いずれも注入転移巣にはリンパ球浸潤などの反応がみられたが、一部には腫瘍細胞の残存、再増殖が認められた。なお、いずれの症例でも有害反応はほとんど認められず、安全に臨床試験を実施することができた。

e) 疫学調査と診療ガイドライン作成作業：本邦における悪性黒色腫患者の実態を把握するために、国内の代表的施設へアンケート調査を継続的に実施している。1987年から2001年の間に2067例の患者が登録され、疫学的動態の解析が可能となっている。近年の傾向として、白人に多い表在拡大型の増加が注目される。患者年齢の若年化傾向もみられており、今後注意を要する。

悪性黒色腫の診療ガイドラインの作成については、日本癌治療学会などの活動とも連動した形で準備を開始した。これまでに悪性黒色腫に対する「抗がん剤適正使用のガイドライン」を作成し、日本癌治療学会の機関誌 *Int J Clin Oncol* に掲載、発表した。EBMに基づく検討では、悪性黒色腫の化学療法はDTICが標準薬とされているが、その効果は奏効率20%程度と低い。多剤併用療法にて奏効率は上昇するが、生存期間の有意な延長はみられず、逆に高度の骨髄抑制などの有害反応を高率に生じることが明らかにされた。今後、診断と検査の手順、標準的外科療法、支持療法、緩和療法などについても順次、ガイドラインを作成し、診療ガイドラインを完成させる方向で作業を進めている。

## 2) 基礎的研究成果

a) 新規悪性黒色腫抗原の発見・同定：松崎らは網羅的遺伝子発現解析手法であるDNAチップ、SAGE法あるいはSEREX法などを駆使して悪性黒色腫の新規抗原の検索を進め、新規抗原としてPAX3やM37抗原を単離・同定した。また、影下らはGPC3やHSP105が悪性黒色腫の免疫療法の新規な標的分子として有望なことを見出した。

b) 悪性黒色腫細胞に対するsiRNAの作用：松崎らは、悪性黒色腫細胞で高率に変異がみられ、シグナル伝達で重要な役割を果たしていると考えられるBRAF遺伝子とSCF

ユビキチンリガーゼ複合体の基質認識サブユニットSkp-2に注目し、この二つのsiRNAを構築して黒色腫細胞内へ導入し、増殖・浸潤能に及ぼす影響を検討した。この二つのsiRNAは単独でも*in vitro*で細胞増殖、浸潤能を抑制し、マウス移植腫瘍の*in vivo*実験系でも増殖の抑制効果が確認された。また、BRAFとSkp-2のsiRNAを同時発現するベクターを構築して検討したところ、さらに強い効果がえられることが明らかにされた。

c) 悪性黒色腫細胞の遺伝子変異の解析：神保らは、白人においてその遺伝子多型が悪性黒色腫の発生リスクを上昇させると報告されているメラノコルチン1レセプター(MC1R)遺伝子について日本人黒色腫患者での特徴を検討し、Val92Metが有意に黒色腫患者に多いことを見出した。しかし、白人におけるハイリスク多型は日本人では有意ではないことが示唆された。さらに神保らは、日本人に多い末端黒子型黒色腫6例の原発巣と転移巣についてDNAマイクロアレイを用いて比較検討し、転移に際して発現が有意に上昇ないし低下する遺伝子を複数同定した。これら各遺伝子発現変化の意義について現在、解析中である。

d) 悪性黒色腫細胞の増殖・浸潤に關与するサイトカイン・受容体の解析：大塚らは、メラノサイトの増殖・運動能などに關与するサイトカインとしてSCFとその受容体c-kitに注目し、ヒトの初期培養悪性黒色腫細胞を用いて*in vitro*で阻害抗体などを用いて検討した。その結果、SCFは黒色腫細胞のchemokinesisを増強し、E-cadherinの発現低下を招くことが明らかにされた。

e) 悪性黒色腫の免疫療法におけるエスケープ機構の解析：影下らは、黒色腫細胞におけるHLA Class I分子への腫瘍抗原の提示不全によって、免疫学的エスケープがおこる可能性を考え、抗原提示機構にかかわる10数種の分子群に対する単クローン抗体を入手し、検討を開始した。

f) 悪性黒色腫の骨転移成立機序の解析：井口は、黒色腫細胞がLIF(leukemia inhibitory factor)を産生し、これが破骨細胞の活性化を招いて、骨転移を促進することを見出した。LIFは黒色腫細胞9株中7株で発現がみられ、これを発現するSEKI株のヌードマウス胸腔内接種により多発性の骨転移を生じることが確認された。

## 3 倫理面への配慮

樹状細胞療法などの臨床試験は各施設の倫理委員会の承認をえている。遺伝子解析に係わる研究は倫理委員会・遺伝子解析研究専門委員会等の承認をえている。ま

た、IFN- $\gamma$  遺伝子を用いる遺伝子治療臨床研究については、厚生労働省厚生科学審議会がん遺伝子治療臨床研究作業委員会の審議を経て、厚生労働大臣の承認をえており、患者・家族への十分な説明と同意のもとに、附属病院の遺伝子治療臨床研究審査委員会で適格性などを判定してもらったうえで研究を実施している。さらに、疫学調査については日本皮膚悪性腫瘍学会として国立がんセンター中央病院倫理委員会へ申請しており、個人情報保護法に照らし、適切に対処している。

#### 研究成果の刊行発表 外国語論文

1. Rokuhara S., Saida T., et al., Number of acquired melanocytic nevi in patients with melanoma and control subjects in Japan: A significant risk factor for non-acral melanoma but not for acral melanoma. *J Am Acad Dermatol* 50: 695-700, 2004
2. Saida T., et al., Histopathologic characteristics of malignant melanoma affecting mucous membranes: A unifying concept of histogenesis. *Pathology* 36: 404-413, 2004
3. Saida T., et al., Significance of dermoscopic patterns in detecting malignant melanoma on acral volar skin: Results of a multi-center study in Japan. *Arch Dermatol* 140: 1233-1238, 2004
4. Piccolo D., Saida T., et al., Diagnosis and categorization of acral melanocytic lesions using teledermoscopy. *J Telemed Telecare* 10: 346-350, 2004
5. Saida T, et al., Acro-lentiginous melanoma. In: *Atlas of Dermoscopy* (ed. by Marghoob AA, Braun R, Kopf AW), New York: Parthenon, 2005, p221- 233
6. Grin CM., Saida T., et al., Pigmented lesions of the palms and soles. In: *Atlas of Dermoscopy* (ed. by Marghoob AA, Braun R, Kopf AW), New York: Parthenon, 2005, p271- 279
7. Akiyama Y., Yamamoto A., Clinical response in Japanese metastatic melanoma patients treated with peptide cocktail pulsed dendritic cells. *J Transl Med*, 2005 (in press)
8. Nishizawa A., Yamamoto A., Clinicopathologic significance of dysadherin expression in cutaneous malignant melanoma: Immunohistochemical analysis of 115 cases. *Cancer*. 2005 (in press)
9. Yoneta A., Jimbow, K., et al., UVB irradiation enhances tyrosinase-mediated cell death in fibroblasts from familial atypical multiple mole and melanoma (FAMMM) patients. *Melanoma Res* 14:387-394, 2004
10. HezayRad, H., Jimbow, K., et al., Tyrosinase - related proteins suppress tyrosinase-mediated cell death of melanocytes and melanoma cells. *Exp Cell Res* 298:317-328, 2004
11. Furuta J., Otsuka, F., et al., Promoter methylation profiling of 30 genes in human malignant melanoma. *Cancer Sci* 95: 962-968, 2004
12. Furuta, J., Otsuka, F., et al., Silencing of the thrombomodulin gene in human malignant melanoma. *Melanoma Res*. in press
13. Campoli M., Kageshita T., Human high molecular weight-melanoma associated antigen (HMW-MAA): structural features, functional role in the biology of melanoma cells and clinical significance. *Crit Rev Immunol* 24: 267-296, 2004
14. Nakatsura T, Kageshita T., Identification of Glypican-3 as a novel tumor marker for melanoma. *Clin Cancer Res* 10: 6612-6621, 2004
15. Monji M., Kageshita T., Identification of a novel human cancer/testis antigen, KM-HN-1, recognized by cellular and humoral immune responses. *Clin Cancer Res* 10: 6047-6057, 2004
16. Kageshita T., Recent progress in diagnosis and treatment of melanoma. *JMAM* 47: 524-528, 2004
17. Kawakami Y., Matsuzaki Y., et al., Identification of human tumor antigens and its implication for diagnosis and treatment of cancer. *Cancer Science*, 95: 784-791. 2005
18. Matsuzaki Y., et al., Systematic identification of human melanoma antigens using serial analysis of gene expression (SAGE). *J. Immunother.* 28: 10-19. 2004

19. Inozume T., Matsuzaki Y., et al., A novel melanoma antigen, FCRL/FREB, identified by cDNA profile comparison using DNA chip are immunogenic in multiple melanoma patients. *Int. J. Cancer*, 114: 283-290. 2005

#### 日本語論文

1. 斎田俊明、ほか、正電荷リポソーム包埋インターフェロン 遺伝子による悪性黒色腫の遺伝子治療、*Skin Cancer* 19: 41-47、2004
2. 斎田俊明、ほか、メラノーマにおけるセンチネルリンパ節生検。病理と臨床22: 479-485、2004
3. 野呂佐知子、山本明史、悪性黒色腫のsentinel node biopsyおよび病理学的検討。日皮会誌、114: 15-24、2004
4. 斎田俊明、山本明史、抗がん剤適正使用ガイドライン 皮膚悪性腫瘍。*Int J Clin Oncol*、9(Supple.) : 35-43、2004
5. 藤沢康弘、山本明史、樹状細胞を用いた腫瘍特異的免疫療法。*Skin Cancer*、19: 7-15、2004
6. 藤沢康弘、山本明史、超音波診断と色素法を併用した鼠径部センチネルリンパ節の同定。*皮膚臨床*、46: 449-453、2004
7. 山崎直也、山本明史、悪性黒色腫に対するSNNS;臨床応用の現況について。臨床外科 59: 553-558、2004  
石原和之、大塚藤男、ほか、皮膚悪性腫瘍の発生数に関する全国アンケート (1997~2001年)。*Skin Cancer* 56: 741-745、2004
8. 影下登志郎、メラノーマ遺伝子治療の現状と展望  
*Skin Cancer* 19: 34-40、2004
9. 影下登志郎、悪性黒色腫 手許に置きたい診断基準とその解説 *皮膚科臨床*46:1958-1604
10. 松崎ゆり子、皮膚がんのジェネティクス:最新医学、臨床遺伝子学'03:がんのジェネティクス・千葉勉(編) 最新医学社、大阪
11. 林恵美子、松崎ゆり子、河上裕、新しい癌の標的療法・新規腫瘍抗原の探索法の進歩:*Biotherapy*: vol. 18. 癌と化学療法社、2004年11月