

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

近年開発された診断法のダーモスコピーは悪性黒色腫の臨床診断に有用であり、とくに日本人に多い掌蹠のメラノーマでは特異的所見が見出され、診断確定に役立っている。病理組織診断困難例には FISH 法や MLPA 法などの分子診断法を開発し、有用なことを示した。センチネルリンパ節生検の多施設共同研究を進め、203 症例を集積し、精度・適用・意義に関する知見をえた。また、本腫瘍の新たな血清腫瘍マーカーとして glypican-3 と SPARC が早期段階から有用なことを見出した。進行期症例の新たな治療法として、樹状細胞を用いる免疫療法やインターフェロン β 遺伝子を用いる遺伝子治療を施行し、いずれも一部の症例で転移巣の消退がみられている。EBM に基づく悪性黒色腫の診療ガイドライン作成作業も進めている。基礎的研究としては、本腫瘍の新規腫瘍抗原 PAX3、CAGE、M27 を同定した。病型や進行度による遺伝子発現パターンの網羅的解析を行い、また BRAF と Skp-2 遺伝子の siRNA 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。HGF や SCF が黒色腫細胞の運動性、接着能に及ぼす影響や骨転移の発生機序についても研究した。

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	国立がんセンター中央病院 医長
神 保 孝 一	札幌医科大学医学部 教授
大 塚 藤 男	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	慶應義塾大学医学部 助手
井 口 東 郎 ^{*1}	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

*1: 平成 16 年 4 月 1 日～平成 17 年 3 月 31 日

総括研究報告

1 研究目的

悪性黒色腫は転移を生じやすく、治療抵抗性の難治な腫瘍として知られている。本研究の目的は、新しい診断法、治療法を開発し、本腫瘍の予後を改善することである。そのためには、的確な早期検出・早期診断がまず

第一に重要であり、また進行期症例に有用な治療法の開発も欠かせない。

2 研究成果

1) 悪性黒色腫の新しい診断法の開発：ダーモスコピー dermoscopy は、皮疹の 10～50 倍の拡大像を観察する診

断法である。日本人では足底など四肢末端無毛部が悪性黒色腫の最好発部位であるが、斎田らはダーモスコピーにて、掌蹠の悪性黒色腫の色素斑部では平行に走行する皮丘に一致する帯状の色素沈着が高率に認められること見出し、parallel ridge pattern (PRP) と名付けた。PRP は悪性黒色腫の早期病変である melanoma in situ でも高率に認められる。PRP は全悪性黒色腫で感度 86%、特異度 99%、positive predictive value (PPV) 94%、melanoma in situ では感度 86%、特異度 99%、PPV 84% であった。なお、掌蹠の良性の色素細胞母斑では皮溝に一致する平行線状の色素沈着である parallel furrow pattern (PFP) とその亜型の lattice-like pattern (LLP) が高率に見出される。PFP/LLP が色素細胞母斑を検出する感度は 67%、特異度は 93%、PPV は 98% であった。以上より、ダーモスコピーが掌蹠の悪性黒色腫の早期検出に有用なことが改めて確認された。その後、掌蹠の悪性黒色腫に特徴的な 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。斎田らが、このような 9 病巣について FISH 法にて Cyclin D1 の検索したところ、4 病巣 (44%) で Cyclin D1 の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 parallel furrow pattern を呈した 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、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示された。

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。斎田らは、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否かを検討した。悪性黒色腫原発巣 16 病巣、Spitz 母斑 14 病巣、通常の母斑 18 病巣について検討したところ、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 母斑の分子鑑別診断が可能であることを示すものである。

2) 悪性黒色腫の新規腫瘍マーカー：悪性黒色腫の血清

腫瘍マーカーとしては、5-S-CD (5-S-cysteinyldopa) や MIA (melanoma inhibitory activity) などが知られているが、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 Glypican-3 (GPC3) が術前の悪性黒色腫患者血清の 40% (36/91) に検出され、経過を追うことができた 14 例全例で摘出術後に陰性化することを見出した。病期別にみると、in situ および病期 I ~ III のいずれにおいても約 40% の患者が陽性であった。以上より、GPC3 は早期から陽性化する悪性黒色腫の血清腫瘍マーカーとして有用と考えられる。また影下らは、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%) の患者が陽性となり、早期診断にきわめて有用なことが示された。

3) センチネルリンパ節生検の多施設共同研究：標準的手法として、標識は生体色素とラジオアイソトープを併用し、ガンマプローブを用いてセンチネルリンパ節を同定すること、生検したセンチネルリンパ節の組織学的検索は、最大断面が出るように半割し、両側に 10 枚の連続切片を切り出して、1, 3, 5, 10 枚目を HE 染色し、2 枚目を S-100 蛋白、4 枚目を HMB-45、6 枚目を MART-1 で免疫染色して観察する。そして、センチネルリンパ節に転移陽性であったら原則として根治的郭清術を施行することとする。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) に比例して高まるが、in situ 病変と原発巣の厚さ 1mm 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。

4) 進行期症例の免疫療法・遺伝子治療の臨床試験：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 SD 1 例 (14 ヶ月) で治療が継続されている。

斎田らは正電荷リボソーム包埋インターフェロン β 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。

5) 進行期悪性黒色腫に対する新たな併用化学療法レジメンの提案：有用な化学療法が存在しない現状を考え、以下のようなレジメンを提案した。比較的低用量のシスプラチン(CDDP)とドセタキセル(DOC)の併用療法で、CDDPの用量は20mg/m²で固定し、DOCのスタート量は15mg/m²とする。これを週1回の間隔で3週連続投与し、1週休薬して1コースとする。各コース終了後に有害反応を評価し、grade 2以上の有害反応が出たらDOCを5mg/m²単位で減量する。逆にまったく有害反応がみられなかったら5mg/m²単位で増量する。こうしてgrade 1の範囲内になるようにDOCの用量を調節し、PDとならない限り、治療を継続する。主要評価項目は無増悪生存期間とし、副評価項目を奏効率とPSとする。"tailored weekly CD療法"と名付けた本レジメンは、DOCの用量を患者毎に設定し、QOLを保った状態であるべく長期間治療を継続しようとする点に特徴があり、これによって生存期間を有意に延長させることを狙っている。

6) 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実施し、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。

7) 新規悪性黒色腫抗原の発見・同定：松崎らは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、M172、CAGE、M37抗原などを単離・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。

8) 悪性黒色腫細胞の遺伝子変異の解析：神保らは日本人に多い末端黒子型黒色腫(ALM)35病巣と白人で多くみられる表在拡大型黒色腫(SSM)25病巣についてCGH(comparative genomic hybridization)とFISH法を用いて遺伝子発現の増幅、欠失を検索した。その結果、DNAコピー数が3倍以上の増幅を示すものがALMでは33病巣(94%)にみられたが、SSMでは11病巣(44%)であり、増幅・欠失のパターンにも差がみられることを見出した。またALM 6症例の原発巣と対応する転移巣について、DNA microarray法にて8,300遺伝子の転写レベルを検索し、原発巣に高発現する遺伝子を5個、転移巣に高発現するそれを7個発見した。

9) 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invitro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。

10) 悪性黒色腫細胞の増殖・浸潤に関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・運動能などに関与するサイトカインとしてHGFとSCFに注目し、これらサイトカインの培養悪性黒色腫細胞に対する運動能・浸潤能などへの影響をinvitroで検討した。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。

3 倫理面への配慮

臨床試験は各施設の倫理委員会の承認をえている。遺伝子解析研究は遺伝子解析研究専門委員会等の承認をえている。遺伝子治療臨床研究は厚生労働省の承認をえている。疫学調査については個人情報保護法を遵守する形で国立がんセンター中央病院倫理委員会へ申請中である。