

15-10 悪性黒色腫の新しい診断・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

悪性黒色腫の予後の改善には正確な早期診断が重要である。これにつき日本人に多い末端黒子型黒色腫の早期病変がダーモスコピーにて parallel ridge pattern と称する特異なパターンを呈することを見出し、この所見によって従来は見逃されていた早期病変を検出できることを示した。本腫瘍の新たな血中腫瘍マーカーとして glypican-3 が有用で、早期段階から 40%程度の陽性率を示すことを明らかにした。本腫瘍は組織学的にしばしば Spitz 母斑と誤診されるが、癌関連遺伝子を網羅的に解析する MLPA 法にてかなり正確に鑑別できることを明らかにした。本腫瘍につきセンチネルリンパ節生検のグループスタディを実施し、同定率 98.9%、偽陰性率 1.5%という優れた成績をえた。先進的な治療法としてインターフェロンβ遺伝子を用いる遺伝子治療、樹状細胞療法、温熱免疫療法などの開発を進めた。本腫瘍の診療ガイドラインの作成作業を本格化した。基礎的研究としては、BRAF 遺伝子変異の検討、Gene チップによる新規腫瘍抗原の同定、p63 によるアポトーシスの誘導などで成果を上げた。

研究者名および所属施設

研究者名	所属施設および職名	分担研究課題
齋田俊明	信州大学医学部 教授	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
山本明史	国立がんセンター中央病院 医長	悪性黒色腫の新しい治療法の開発に関する研究
神保孝一	札幌医科大学医学部 教授	悪性黒色腫の診断・治療法の開発
大塚藤男	筑波大学臨床医学系 教授	メラノーマ細胞の免疫療法に関する研究
影下登志郎	熊本大学大学院医学薬学研究部 助教授	腫瘍抗原を用いた悪性黒色腫の新しい診断・治療法の開発
松崎ゆり子	慶応義塾大学医学部 助手	悪性黒色腫の診断や治療に応用可能な抗原遺伝子の同定と機能解析

研究報告

1 研究目的

悪性度が高く、難治な悪性黒色腫は、本邦でも近年、患者数の増加が目立つ。本研究の目的は、悪性黒色腫の予後改善を目指し、最新の研究手法や新概念によって、

新たな診断法と治療法を開発することである。診断法に関しては、非侵襲的に拡大像を観察するダーモスコピーを用い、日本人の悪性黒色腫の最頻病型である末端黒子型黒色腫 (ALM) の早期検出に有用なガイドラインを確立

する。また、やはり早期診断に役立つ血清腫瘍マーカーに関する研究を進める。本腫瘍は病理組織診断も難しく、とくに Spitz 母斑としばしば誤診されるので、客観的な分子診断法の確立を目指す。治療法に関しては、センチネルリンパ節生検に関する多施設共同研究、樹状細胞などを用いる免疫療法、インターフェロン β 遺伝子を用いる遺伝子治療、マグネタイト微粒子を用いる温熱免疫療法などの開発を進める。さらに、EBM の手法に基づき、信頼できる最新の診療ガイドラインを作成し、公開することを目指す。基礎的研究としては、黒色腫細胞、とくに日本人に多い ALM の腫瘍細胞におけるシグナル伝達系の異常、増殖因子の解析、診断・治療に役立つ新規抗原遺伝子の同定などについて研究を進める。

2 研究方法

ダーモスコピーについては齋田らが DermliteFOTO やデルマトスコープを用い、信州大学皮膚科の掌蹠病変を中心に、一部他施設の症例も加えて解析する。血清腫瘍マーカーについては、影下らが新規マーカー glypican-3 (GPC3) などの有用性を検討する。分子診断については multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) 法などの応用を検討する。悪性黒色腫の診療ガイドライン作成については作成委員会を発足させ、Evidence-based Medicine (EBM) の手法に則って作成する。基礎的研究における MAPK シグナル経路、とくに BRAF 変異の検出には高感度の Mutector Assay を用いる。新規抗原遺伝子の探索には Affymetrix 社の GeneChip を用いる。

3 研究成果

本年度は、悪性黒色腫瘍の診断、治療に関し、以下に記載するような臨床的、基礎的研究成果を上げた。

1) 臨床的研究成果

齋田らは、色素性皮膚病変の新たな診断法であるダーモスコピーを用い、日本人の悪性黒色腫の最好発部位である足底など四肢末端無毛部に生じる末端黒子型黒色腫 (ALM) を検討し、その色素斑部が parallel ridge pattern (PRP) と称する特異な所見を呈することを見出した。PRP が ALM を検出する感度は 86%、特異度は 99% であり、早期病変の検出にきわめて有用なことを、詳細な病理組織学的検討と cyclin D1 をプローブとする FISH 法にて明らかにした。これらの研究成果に基づき、ダーモスコピーを用いて ALM を早期段階で検出するための臨床指針を作成した。

影下らは、GPC3 と secreted protein acidic and rich

in cystein (SPARC) が悪性黒色腫の血清腫瘍マーカーとして有用なことを見出した。特筆すべき点は、これらのマーカーが早期病変段階から検出されることで、たとえば GPC3 は病期 0 (melanoma in situ) で 44%、病期 I で 39%、病期 II で 55% の患者血清が陽性反応を示し、外科的摘出後にすべて陰性化した。GPC3 と SPARC のいずれかが陽性の者は、病期 0 の患者で 88%、I で 48%、II で 71% であり、本腫瘍の早期検出にきわめて有用な血清マーカーであることを明らかにした。

齋田らは MLPA 法を用い、悪性黒色腫 24 病巣、良性の母斑 24 病巣 (Spitz 母斑 11 病巣、通常型母斑 13 病巣) について癌関連の 76 遺伝子の欠失、増幅を解析した。その結果、悪性黒色腫では全例で欠失や増幅がみられ、平均 12.04 個の遺伝子に発現異常がみられた。これに対し、通常型母斑の 6 病巣は異常を示さず、残りの 7 病巣と Spitz 母斑 11 病巣では 1-2 個の遺伝子異常がみられたのみであった (平均 1.04 個の遺伝子に発現異常)。異常発現遺伝子の数が 2.42 以上であれば特異度 98%、感度 92.5% で悪性黒色腫と診断することができる。この診断法は、形態学的な組織診断でしばしば誤診を生じる悪性黒色腫と Spitz 母斑の客観的な分子鑑別診断法として有用と考えられる。MLPA のプローブに組み入れる遺伝子を改良すれば、診断への有用性はさらに高まり、組織診断困難例の診断確定に威力を発揮するものと期待される。

悪性黒色腫におけるセンチネルリンパ節生検の意義に関しては、山本らが中心になって多施設共同研究を実施中であり、現在までにシンチグラフィ、ガンマプローブ、生体色素を併用する一定の方式によって 262 症例が集積され、98.9% という高いセンチネルリンパ節の同定率がえられている。センチネルリンパ節が病理組織学的に転移陰性で経過観察とされた 199 症例中、後にリンパ節転移を生じたのは 3 例 (1.5%) に過ぎない。センチネルリンパ節内における腫瘍細胞の存在様式と予後との相関についても解析中である。

悪性黒色腫は化学療法にきわめて低感受性で、現時点で有用な化学療法のレジメンは何も存在しない。そこで、われわれはシスプラチン (CDDP) 20mg/m² とタキソテール (DOC) 15mg/m² を低用量で毎週投与し、有害反応の程度をメルクマールとして患者毎に DOC 量を増減するレジメンを作成した (tailored weekly PD 療法)。現在、パイロットスタディーとして 2、3 の進行期患者に施行し、反応をみているところである。

齋田らは吉田純教授 (名大脳外科) らと共同で、正

電荷リポソーム包埋インターフェロン β 遺伝子を皮膚転移巣に局注する遺伝子治療の臨床研究を実施し、今年度で予定していた5例の進行期患者への施行を終了した。全症例で問題になる有害反応はみられず、本遺伝子治療の安全性が確認できた。臨床効果はSD 1例、MR(mixed response) 1例、PD 3例という結果であった。MRの1例では非局注皮膚転移巣の消退が観察され注目された。現在、採取された検体を用いて基礎的解析を進めている。

また齋田らは、山下直秀教授(東大医科研)らと共同で、樹状細胞を自家腫瘍融解液でパルスして患者の皮内へ注入する樹状細胞療法を施行した。10例に実施し、大きな転移巣が消失した1例において、低酸素下で血管内皮細胞に発現が高進するcarbonic anhydrase IIに対するIgG抗体が誘導されたことを見出した。この抗体によって腫瘍新生血管が傷害され、腫瘍の消退を来したものと考えられる。

悪性黒色腫の新たな治療法として、齋田らは小林猛教授(中部大応用生物学部)らと共同で、マグネタイト微粒子をリポソームに包埋し、これに高分子黒色腫抗原(HMW-MAA)に対する単クローン抗体225.28を結合させた素材を用いる温熱免疫療法の開発に着手した。黒色腫転移巣部へこの素材を集積させ、ここに交番磁場を印加すると、病巣部のみを任意の温度に発熱させることができる。46°C30分間の温熱刺激によりHSP70が多量に放出され、これが黒色腫細胞に対するCTLを誘導し、全身的効果も期待することができる。現在、基礎研究と製剤の安全性試験をほぼ終了し、臨床試験のプロトコールなどを作成中である。

悪性黒色腫の診療レベルを向上させるためには、適切な診療ガイドラインが作成され、公開されることが望まれる。悪性黒色腫の診療ガイドラインは既に欧米からいくつかの提案がなされているが、日本人の悪性黒色腫は病型や頻度などが白人のそれとは大きく異なる。そこで日本の実情に即した診療ガイドラインの作成が望まれる。関連学会の支援のもとに「皮膚悪性腫瘍診療ガイドライン作成委員会」を発足させ、EBMの手法に基づいて悪性黒色腫をはじめとする皮膚がんの診療アルゴリズム、治療ガイドラインの作成作業を進めている。完成後、関連学会のホームページにて公開の予定である。さらに、本邦における悪性黒色腫患者の疫学的実態につき継続的調査を行っている。

2) 基礎的研究成果

白人に多くみられる表在拡大型黒色腫では BRAF 遺伝

子変異が高率に認められ、注目されている。しかし、日本人に多いALMではBRAF変異は低率にしか見出されない。齋田らが、ALM28病巣(原発巣13例、転移巣15例)について検討したところ、BRAF変異は3病巣に認められたのみであったが、Western blotにてMAPKシグナル経路の活性化を示すERK1/ERK2のリン酸化蛋白を検討したところ、14病巣中11病巣(78.5%)で同蛋白が検出された。また、この経路の下流に位置するcyclin D1遺伝子の増幅が21病巣中5病巣(うち2病巣はERK1/ERK2リン酸化蛋白陰性)で見出された。以上より、ALMにおいてもMAPKシグナル経路の恒常的活性化がおこっていることが示された。このことは同経路の分子標的療法の適用とも関連して重要な事実である。

BRAFの変異は、メラノサイトの良性腫瘍とみなされる色素細胞母斑においても高率に見出されると報告され、その意義が注目されている。しかし、母斑の部位や病型とBRAF^{V600E}との関係についてはデータに錯綜がみられる。齋田らは各部位の後天性母斑120病巣と先天性母斑62病巣につき、感度の優れたMutector Assayを用いてBRAF^{V600E}変異を検索した。その結果、後天性母斑の87.5%(105/120)、先天性母斑の69.4%(43/62)に同変異が検出された。さらに、非露光部(掌蹠、外陰部)の後天性母斑においても81.4%(35/43)で同変異が検出された。先天性母斑については、径15mm未満の小型病変では88.1%に変異がみられたが、径15-200mmの中型病変では変異がみられたのは30%(6/20)のみであった。このBRAF変異陰性の中型先天性母斑のうち9例でNRASの変異が検出された。さらに、小型先天性母斑において同一病巣内にBRAF^{V600E}陽性と陰性の母斑細胞集団が存在することがlaser microdissectionを用いた解析によって明らかにされた。以上の結果は、BRAFの変異が解剖学的部位や日光暴露とは無関係に生じている可能性を示すとともに、中型先天性母斑の遺伝子変異の独自性を示唆するものであり、母斑と悪性黒色腫の関係を考察する上で興味深い。

ALMの培養細胞株はきわめて少なく、ましてや早期病変からえられた細胞株は存在しない。齋田らはALM原発巣内で早期病変段階に相当する色素斑部より細胞株を樹立することに成功し、SMYM-PRGPと名付けた。本細胞株はBRAF遺伝子が野生型で、CDKN2AはLOHを示し、cyclin D1の増幅を示す。本細胞株の増殖因子要求性を検討し、エンドセリン1にて強い増殖促進がおこること、CaCl₂にも多少反応すること、c-Kitを発現し、SCFのオートクライン産生を示すことなどを明らかにした。以上、本細胞株はALM早期病変の細胞生物学的特性をよく保持していると考え

られ、今後きわめて有力な研究材料になるものと期待される。

神保らは、悪性黒色腫細胞株の多くは p53 が野生型であり、p63 がアポトーシス誘導能を示し、とくに p63-p53 キメラ遺伝子が強力にアポトーシスを誘導することを見出した。松崎らは、GeneChip を用いた遺伝子解析により、悪性黒色腫の新たな腫瘍抗原として FABP7 と TRAG3 を発見、同定した。大塚らは、悪性黒色腫患者の B 細胞を EB ウィルスでトランスフォームする方法によってヒト型単クローン抗体の作製を試み、ガングリオシド GD2 に対する抗体産生株をえた。

4 倫理面への配慮

本研究班の各種研究は、各施設の倫理委員会、遺伝子解析研究専門委員会などの承認をえたうえで実施された。遺伝子治療臨床研究については厚生労働省の委員会より承認をえている。

研究成果の刊行発表

外国語論文

- Saida T, Miyazaki A, Grin CM. Acro-lentiginous melanoma. In: Atlas of Dermoscopy (ed. by Marghoob AA, Braun R, Kopf AW), London: Taylor & Francis, p221-233, 2005
- Grin CM, Saida T. Pigmented lesions of the palms and soles. In: Atlas of Dermoscopy (ed. by Marghoob AA, Braun R, Kopf AW), London: Taylor & Francis, p271-279, 2005
- Tanaka K, Ito A, Kobayashi T, Saida T, Honda H, et al: Intratumoral injection of immature dendritic cells enhances antitumor effect of hyperthermia using magnetic nanoparticles. *Int J Cancer* 116: 624-633, 2005
- Kato H, Hayashi K, Saida T, Kontani K, Nishizawa O: Urethral advancement procedure for reconstruction after excision of male perianal melanoma in situ. *Urol Int* 74:183-4, 2005
- Miyazaki A, Saida T, Koga H, Oguchi S, Suzuki T, Tsuchida T: Anatomical and histopathological correlates of the dermoscopic patterns seen in melanocytic nevi on the sole: A retrospective study. *J Am Acad Dermatol* 53: 230-6, 2005
- Takata M, Goto Y, Ichii N, Yamaura M, Murata H, Koga H, Fujimoto A, Saida T: Constitutive activation of the mitogen-activated protein kinase signaling pathway in acral melanoma. *J Invest Dermatol* 125: 318-322, 2005
- Takata M, Suzuki T, Ansai S, Kimura T, Shirasaki F, Hatta N, Saida T: Genome profiling of melanocytic tumors using multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA): its usefulness as an adjunctive diagnostic tool for melanocytic tumors. *J Dermatol Sci* 40: 51-57, 2005
- Yoshiura K, Nakaoka T, Nishishita T, Sato K, Yamamoto A, Shimada S, Saida T, Kawakami Y, Takahashi TA, Fukuda H, Imajoh-Ohmi S, Oyaizu N, Yamashita N: Carbonic anhydrase-II is a tumor vessel endothelium-associated antigen targeted by dendritic cell therapy. *Clin Cancer Res* 11:8201-8207, 2005
- Yamaura M, Takata M, Miyazaki A, Saida T: Specific dermoscopy patterns and amplifications of the cyclin D1 gene to define histopathologically unrecognizable early lesions of acral melanoma in situ. *Arch Dermatol* 141: 1413-1418, 2005.
- Saida T: Lessons learned from studies of the development of early melanoma. *Int J Clin Oncol* 10: 371-374, 2005
- Takata M, Saida T: Early cancers of the skin: clinical, histopathological, and molecular characteristics. *Int J Clin Oncol* 10: 391-397, 2005.
- Ishihara Y, Saida T, Miyazaki A, Koga H, Tamiguchi A, Tsuchida T, Yoyama M, Ohara K: Early acral melanoma in situ: correlation between the parallel ridge pattern on dermoscopy and microscopic features. *Am J Dermatopathol* 28: 21-27, 2006.
- Nishizawa A, Yamamoto A, et al: Clinicopathologic significance of dysadherin expression in cutaneous malignant melanoma: Immunohistochemical analysis of 115 cases. *Cancer* 103:1693-1700, 2005
- Akiyama Y, Yamamoto A, et al: Clinical response in Japanese metastatic melanoma patients treated with peptide cocktail-pulsed dendritic cells. *J Transl Med* 3:4-00, 2005
- Inozume A, Yamamoto A, Matsuzaka Y, et al: 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

16. Jimbow K, et al: Management of pigmentary disorders. Conn' s Current Therapy 2006 edition. Editor: Robert E, et al, Saunders Elsevier, Philadelphia, 1058-1065, 2006
17. Furuta, J, Otsuka, F, et al: Silencing of the thrombomodulin gene in human malignant melanoma. Melanoma Res, 15: 15-20 2005.
18. Kageshita T, Ishihara T, et al: HLA class I allospecificity downregulation and differential expression of distinct monomorphic and polymorphic determinants of HLA class I antigens in surgically removed melanoma lesions. Tissue Antigens 65: 419-428, 2005.
19. Matsushita S, Kageshita T, et al., Comparison of dermoscopic and histopathologic findings in a mucous melanoma of the lip. Br J Dermatol 152: 1324-1326, 2005.
20. Wang X, Kageshita T, et al: A method of generate antigen-specific mAb capable of staining formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections. J Immunol Method 299: 139-151, 2005.
21. Tamori Y, Kageshita T, et al: Clinical significance of MHC class II-associated invariant chain expression in human gastric carcinoma. Oncology Reports 14: 873-877, 2005.
22. Curtin JA, Kageshita T, et al., Distinct sets of genetic alterations in melanoma. New Engl J Med 353: 2135-2147, 2005.
23. Matsuzaki, Y, et al: Systematic identification of human melanoma antigens using serial analysis of gene expression (SAGE). J Immunother 28: 10-19. 2005.
24. Kawakami Y, Matsuzaki Y, et al: Immunological detection of altered signaling molecules involved in melanoma development. Cancer Metastasis and Reviews, 24: 377-386, 2005.
3. 伊藤研一、藤森 実、天野 純、宇原 久、斎田俊明：悪性黒色腫・乳癌におけるセンチネルリンパ節の道程と転移の検索、からだの科学 増刊「高度先進医療」（出月康夫編）、p22-28、日本評論社、東京、2005
4. 斎田俊明：色素細胞母斑、日皮会誌 115:1435-1442, 2005
5. 清原祥夫、吉川周佐、藤原規広、大塚正樹、中川雅裕、山本明史、斎田俊明：皮膚悪性腫瘍における sentinel node navigation surgery. 癌と化学療法 32: 1191-1194, 2005
6. 斎田俊明、松本和彦、影下登志郎、水野正明、吉田純：癌に対する遺伝子治療：メラノーマ、日本臨床 63 (増12) :566-571, 2005
7. 斎田俊明：色素斑の悪性と良性の見分け方、日皮会誌 115:2185-2189d, 2005
8. 斎田俊明：掌蹠の色素性病変のダーモスコピーによる診断と鑑別、日皮会誌 115:1916-1920, 2005
9. 林 宏一、斎田俊明：口唇診療マニュアル：悪性黒色腫、MB Derma 108:67-70, 2005
10. 斎田俊明：メラノーマ・皮膚がん、「癌化学療法 update」（西條長宏、鶴尾 隆編）、中外医学社、東京、2005, pp465-478
11. 岩田浩明、山本明史：進行期悪性黒色腫に対する DAC-Tam 療法の多施設集計. 日皮会誌、115:879-885、2005
12. 西澤 綾、山本明史：悪性黒色腫術後 DAVFeron 療法における骨髄抑制の出現様式について. 日皮会誌、115 : 2320-2322、2005
13. 影下登志郎：免疫療法・遺伝子治療の問題点は何か、どう克服するか？ Skin Cancer 19: 306-312, 2005.
14. 石原 剛、影下登志郎、他：センチネルリンパ節生検における dynamic RI と CT/SPECT の意義. Skin Cancer 19, 293-297, 2005.

日本語論文

1. 宇原 久、林 宏一、斎田俊明：悪性黒色腫におけるセンチネルリンパ節生検と足底からのリンパ流路について、皮膚病診療 27: 183-188, 2005
2. 宇原 久、斎田俊明：皮膚障害、「がん薬物療法における支持療法」（西條長宏編集）、p64-65、医薬ジャーナル社、大阪、2005