

研究マインド支援グラント 報告書

平成27年度 研究マインド支援グラント(若手) 報告書

メラノーマの新規治療法に関する基礎的研究

研究代表者 高木 理英(医学部 免疫学)

研究分担者 川野 雅章*

緒 言

美白剤に含まれる白樺樹皮由来のフェノール化合物であるロドデノール(英語表記: rhododendrol)は皮膚の白斑症を誘発するため、近年社会的問題になっている¹⁾。当初ロドデノールはチロシナーゼと結合しその働きを抑制するだけでなくハイドロキシロドデノール(ロドデノール自体より有毒)に変化しメラノサイトのアポトーシスを誘発するという報告がされたが²⁾、このアポトーシス誘導に必要なロドデノールの濃度は実際の皮膚局所で生じうる濃度の100倍以上と推測されている。さらに化粧品利用者のわずか2%しか影響を受けていない事や、免疫抑制剤(例えばタクロリムス)がロドデノール誘発性白斑に効果がある事など³⁾、当初考えられていた機序だけでは白斑症発症を説明することは難しい。アロステリック効果にみられるように、結合する基質の構造によっては酵素のコンフォメーションが変化することがあり、これによってプロテアーゼのアクセシビリティも変化し得る。そこで今回我々は、ロドデノールはチロシナーゼと結合する事により生理的には存在しないチロシナーゼ由来ペプチド断片(免疫学的非自己)を産生させ、T細胞の活性化が起こったという作業仮説のもと、研究を行う事にした。

隠蔽自己ペプチド分子機構の基礎的見地となる発見は我々の研究で、自己のインスリン分子に反応するT細胞によって引き起こされる自己免疫不全症(インスリン自己免疫症候群)からだった。インスリン分子はS-S結合が3箇所存在するペプチドダイマーだが、ここにバセドウ病の治療に用いられるメチマゾールのような還元剤が作用すると一部のS-S結合が切断されて、 α 鎖のモノマーが出現する。この分子はHLA-DRB1*04:06に高親和性で結合する構造モチーフを持っているため、生理的には存在しないHLA-ペプチド複合体が多数出現する。生体はこれを「免疫学的非自己」と勘違いしてT細胞を活性化し、インスリンに対する抗体が産生されて低血糖のような症状を引き起す⁴⁾。

何らかの環境要因が引き金となり、生理的に存在しない自己抗原(隠蔽自己ペプチド)を出現させ、自己免疫病を発症させる可能性が示唆される。我々は、ロドデノール誘発

性白斑症がインスリン自己免疫症候群と同様「隠蔽自己ペプチド(cryptic-self peptides)」を介した自己免疫病であること、HLA-DR4が遺伝要因であること、さらにこのような免疫応答がロドデノールで誘発されるのであれば、ロドデノールはメラノーマに対する抗腫瘍免疫応答を誘導できるはずであると考え、メラノーマ動物モデルの治療の有効性を明らかにすることを本研究の目的とした。

材料と方法

ペプチド合成

ヒトメラノーマ関連T細胞エピトープの各種報告に基づいてペプチドを合成、精製した^{5,6)}。

末梢血単核細胞(PBMCs)

埼玉医科大学病院IRBの承認を得て研究を開始した。同意を得られたロドデノール誘発性白斑の患者8名より静脈血の提供を受け、Ficoll-Paqueを用いた勾配遠心分離を用いて調製した。PBMCはペプチドと共培養、残りの細胞は凍結保存した。顆粒白血球から得られたDNAはHLA研究所(京都)でHLAタイピングを行った。

T細胞ラインの樹立

PBMCは10% HS (human serum) /PRMI1640培地を用いて培養した。96穴プレート(平底)60wellの1well当たり 1.5×10^5 の細胞とTable 1に示したチロシナーゼ由来のペプチドで共培養を開始し、8-10日後には自己PBMC(1.5×10^5 /well)にペプチドパルスとX線照射(30 Gy)処理を行った細胞をプラスト化したT細胞へ添加した。さらに7日間培養を維持した後にペプチドに対する反応性を決定した。

T細胞ラインのペプチド誘発性増殖反応

チロシナーゼペプチド($0.1 \mu\text{M}$ 当量)とX線照射(30 Gy)処理を行った自己PBMC(1.5×10^5)を96穴プレート(平底)を用いてT細胞(3×10^4)と共培養した。72時間培養後に $1 \mu\text{Ci}/\text{well}$ 濃度の ^3H -thymidineで16時間処理し、液体シンチレーションによって放射活性を測定した。

*医学部 免疫学

サイトカイン解析

患者R02, R07, R08 から得られたT細胞ラインは、ペプチド 5 または 10 の存在下でX線照射した自己PBMC (4.5×10^5 /well) と共に 48 穴プレートを用いて共培養した。培養開始から 2 日後、培養上清を集め、IFN γ , IL-4, IL-5, IL-17, TNF α とGM-CSFをELISA測定法を用いて測定した。(R&Dシステム)。

ロドデノールによるB16 メラノーマ (黒色腫) の治療

C57/BL6 由来のB16 黒色腫細胞を 10 %FCS/RPMIで培養し、ロドデノールと 20 μ g/mlで 18 時間共培養ののち洗浄し、完全にロドデノールを除去した後に使用した。

メラノーマに対するロドデノール処理B16 細胞免疫化の効果

動物実験は実験動物委員会の承認を得て研究を開始した。6～8週令の雌マウス(C57/BL6・チャールズリバー)を用い、ロドデノール処理したB16 細胞とコントロールと

してmock処理したB16 細胞をX線照射 (60 Gy) し、PBSで調整後 2×10^6 個をマウスの背部皮下に免疫した。10 日の間隔をあけて 3 回マウスに免疫し、最終接種から 10 日後、 2×10^6 個のX線照射無しのB16 細胞を皮下接種し、腫瘍の長軸の長さを観察し続けた。

組織学的分析

ロドデノールとX線照射処理のB16 細胞によって免疫され、腫瘍細胞を移植されたマウスより白斑・メラノーマ組織を採取し、10 %の中性ホルマリンに固定しHE染色を行った。

結 果

患者 8 名中 7 名がHLA-DR4 陽性であった (Table 2)。(日本人集団でのHLA-DR4 の陽性率は 30-40 %)そして、Table 2 に示したように、チロシナーゼ由来の自己ペプチドに反応するT細胞を観察するとペプチド 2, 5, 9, そし

Table 1. Tyrosinase-derived synthetic peptides

Peptide #	Sequence (position)	Restriction
1	CLLWSFQTSA (p8-17)	HLA-A2
2	MLLAVLYCL (p1-9)	A2
3	YMDGTMSQV (p369-377)	A2
4	DAEKCDICTDEY (p240-251)	A1
5	SEIWRDIDF (p192-200)	B44
6	AFLPWHRLF (p206-214)	A24
7	QNILLSNAPLGPQFP (p56-70)	DRB1*04:01
8	YSYLQDSDPDSFQD (p448-462)	DRB1*04:01
9	NCTERRLLVRRNIFDLSAPEK (p111-131)	DRB1*04:05
10	FLLHHAFVDSIFEQWLRRHRP (p386-406)	DRB1*15:01
11	LLGGSEIWRDIDFAHEAPAFL (p188-208)	DRB1*04:05

HLA restriction shown in the table indicates a typical antigen-presenting molecule.

Table 2. The HLA-DRB1 types and the peptide specificity of T-cell lines

Patient #	HLA-A*	B*	C*	DRB1*	Peptide Specificity	T cell subset
R01	02:01/11:01	15:01/35:01	04:01/08:01	<u>04:03/09:01</u>	2, 5, 9	—
R02	24:02/24:02	07:02/15:01	03:03/07:02	01:01/08:02	5	Tc17
R03	24:02/31:01	40:02/40:02	03:03/03:04	<u>04:10/11:01</u>	—	—
R04	11:01/11:01	54:01/54:01	01:02/01:02	<u>04:05/04:05</u>	—	—
R05	03:01/26:02	15:01/59:01	01:02/03:03	<u>04:05/14:06</u>	—	—
R06	24:02/24:02	40:02/40:02	03:04/03:04	<u>04:10/04:10</u>	—	—
R07	24:02/26:03	35:01/59:01	01:02/03:03	<u>04:05/04:10</u>	10	Th0
R08	24:02/24:02	15:01/54:01	01:02/08:01	<u>04:05/11:01</u>	10	Th0

HLA-DR4-associated alleles are underlined.

Increased frequency of DR4 : $p=0.0015$

て 10 に特異的だった。ペプチド 2, 5 はクラス I 拘束性で Tc17 のサイトカイン産生パターンを示し、ペプチド 9, 10 はクラス II 拘束性で Th0 のパターンを示している。対象として HLA-DR4 陽性の健康人ボランティア 3 人から採血を行い用い同様の実験を行ったが、ペプチド選択性を示さなかった。これらの結果は、感受性には HLA が遺伝要因として関与しており、患者 PBMC 中には自己チロシナーゼペプチドに特異的な自己反応性ヘルパー T (Th) 細胞およびキラー T (Tc) 細胞が存在することを示唆している。

このような免疫応答がロドデノールで誘発されるのであれば、ロドデノールはメラノーマに対する抗腫瘍免疫応答を誘導できるはずである。マウスを用いた実験では以下のような腫瘍抑制効果を認めた。ロドデノール処理した B16 細胞で免疫されたマウスは、免疫されなかったマウスに比べて体内における腫瘍の成長抑制を有意に示し、25 日目の時点ではロドデノール処理群では 0 mm、対象群では 10 mm という大きな差が見られた (Fig. 1)。そして、予想通りロドデノール処理群は全身性の白斑症を発症した。同じ実験を 4 回繰り返したが、同様の結果を得る事が出来た (Fig. 2)。マウスにはロドデノールを直接注射したり塗ったりしたわけではないので、ロドデノールによる直接的な細胞障害は考えられない。自己の免疫系を介して起こった事象であると思われる。また、その組織像は腫瘍内への炎症細胞浸潤のみならず、真皮への細胞浸潤とその表皮内への浸潤が観察出来た。炎症細胞は単核球と、多核球からなっており、後者には少量の好酸球も含まれていた。

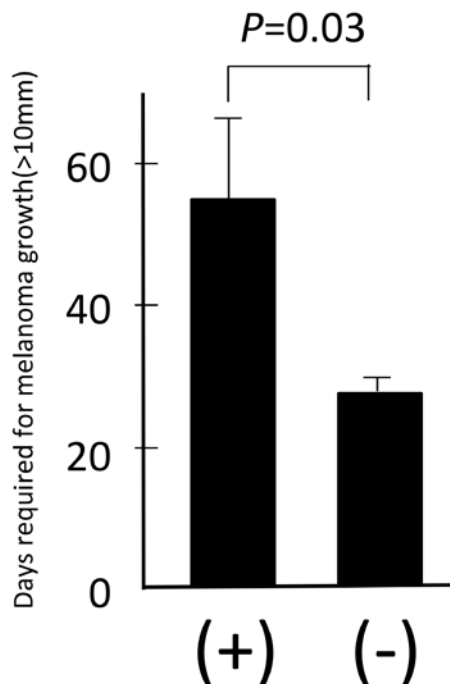


Fig. 1. Tx with rhododendrol.

考 察

チロシナーゼは抗体依存的細胞媒介細胞障害 (ADCC) のためのターゲット分子になりえる⁷⁾。なぜならば GERL システム (ゴルジ体 Golgi apparatus → 小胞体 endoplasmic reticulum → リソソーム lysosome) と関連した膜タンパク質であるからである⁸⁾。そして、それはエンドサイトーシスに関連しているだけではなくエキトサイトーシスも関連している。立体構造的に正常なチロシナーゼタンパク分子 (ADCC に至ることができる) と IgG 抗体が反応する場合、全身性の白斑症がロドデノールによって誘発され得る。しかし、患者におけるロドデノール誘発性白斑の発症は主に繰り返し化学物質と接触した部分に制限されている。患者 Th 細胞は主に Th1 細胞で、ロドデノールの暴露に反応して、IgG 反応よりもむしろ Tc 細胞の生成を助けているように考えられるが、実際、患者とマウスメラノーマモデルの間には免疫活性のメカニズムは格段に違いがある。これは、マウスはロドデノール処理し照射した B16 細胞を皮下に免疫された間、患者の免疫細胞は本来の場所である表皮のみでロドデノール処理された皮膚メラノサイトにさらされていることが考えられる。

結 論

- ロドデノール誘発性白斑症は HLA-DR4 を遺伝要因とする自己免疫病である。
- ロドデノールはメラノーマの免疫療法に応用可能である。

謝 辞

本研究は平成 27 年度研究マインド支援 Grant (若手限定) の助成を受けて行われたものであり、ここに深謝いたします。



Fig. 2. Generalized vitiligo induced by immunization with rhododendrol-treated and irradiated B16 cells.

引用文献

- 1) Nishigori C, Aoyama Y, Ito A, Suzuki K, Suzuki T, Tanemura A, Ito M, et al. Guide for medical professionals (i.e. dermatologists) for the management of Rhododendrol-induced leukoderma. *J Dermatol* 2015; 42: 113-28.
- 2) Sasaki M, Kondo M, Sato K, Umeda M, Kawabata K, Takahashi Y, et al. Rhododendrol, a depigmentation-inducing phenolic compound, exerts melanocyte cytotoxicity via a tyrosinase-dependent mechanism. *Pigment Cell Melanoma Res* 2014; 27: 754-63.
- 3) Suzuki K, Aoyama Y, Ito A, Suzuki T, Tanemura A, Nishigori C, Ito M, et al. The Second Epidemiology Report of Rhododendrol-induced Leukoderma in Japan Based on a Nationwide Survey. *Jpn J Dermatol* 2014; 124: 3125-42.
- 4) Matsushita S, Takahashi K, Motoki M, Komoriya K, Ikagawa S, Nishimura Y. Allele specificity of structural requirement for peptides bound to HLA-DRB1*0405 and -DRB1*0406 complexes: Implication for the HLA-associated susceptibility to methimazole-induced insulin autoimmune syndrome. *J Exp Med* 1994; 180: 873-83.
- 5) Topalian SL, Gonzales MI, Parkhurst M, Li YF, Southwood S, Sette A, et al. Melanoma-specific CD4+ T cells recognize nonmutated HLA-DR-restricted tyrosinase epitopes. *J Exp Med* 1996; 183: 1965-71.
- 6) Michaeli Y, Sinik K, Haus-Cohen M, Reiter Y. Melanoma cells present high levels of HLA-A2-tyrosinase in association with instability and aberrant intracellular processing of tyrosinase. *Eur J Immunol* 2012; 42: 842-50.
- 7) Imokawa G, Mishima Y. Isolation and biochemical characterization of tyrosinase-rich GERL and coated vesicle in melanin synthesizing cells. *Brit J Dermatol* 1981; 104: 169-78.
- 8) Broadwell RD, Oliver C. Golgi apparatus, GERL, and secretory granule formation within neurons of the hypothalamo-neurohypophyseal system of control and hyperosmotically stressed mice. *J Cell Biol* 1981; 90: 474-84.

研究成果リスト

論文

- 1) Takagi R, Kawano M, Nakamura K, Tsuchida T, Matsushita S. T-cell responses to tyrosinase-derived self-peptides in patients with leukoderma induced by rhododendrol: Implications for immunotherapy targeting melanoma. *Dermatology* 2016; 232: 44-9. 査読有

学会発表

- 1) 高木理英, 川野雅章, 中村晃一郎, 土田哲也, 松下祥. ロドデノール誘発性白斑症は自己免疫病である. 第115回日本皮膚科学会総会 2016年6月4日, 京都
- 2) 高木理英, 川野雅章, 中村晃一郎, 土田哲也, 松下祥. ロドデノール誘発性白斑症は自己免疫病である. 第65回日本アレルギー学会学術大会 2016年6月18日, 東京