

厚生科学研究費補助金(厚生科学特別研究事業)

# 経表皮のワクチン法の開発に関する研究

(研究課題番号 H10-特別-044)

平成10年度 総括・分担研究報告書

平成11年 3 月

主任研究者 瀧川 雅浩 (浜松医科大学皮膚科学教室教授)  
分担研究者 瀬尾 尚宏 (浜松医科大学皮膚科学教室助手)

厚生科学研究費補助金（厚生科学特別研究事業）  
総括研究報告書

経表皮的王クチン法の開発に関する研究

主任研究者 瀧川 雅浩 浜松医科大学皮膚科学教室教授

研究要旨

角質層バリア破壊皮膚における抗原ペプチド塗布は表皮ランゲルハンス細胞を介し効果的に生体内のCTLを感作すること等が明らかとなった。またバリア破壊皮膚が遺伝子治療実施の場として有用であることも判明した。

## 研究目的

樹状細胞の一種で、ヘルパーT (Th) 細胞への強い抗原提示細胞として知られているランゲルハンス細胞 (LC) は、近年になりその細胞上の主要組織適合クラス I 分子を介してウイルス抗原や癌抗原などの内在性の抗原を効率的に細胞障害性 T 細胞 (CTL) 提示することが判明し、この細胞を用いた抗ウイルスワクチン法または癌治療法の研究が大きく注目されている。ところが今日まで行なわれているこれらワクチン法及び治療法の研究のほとんどは、末梢血内にわずかに存在する樹上細胞前駆細胞を単離し、それを試験管内においてIL-4, GM-CSFまたはTNF- $\alpha$ の存在下で培養した後に得られる成熟樹状細胞をウイルスペプチドまたは癌ペプチドでパルスしたものを生体内にもどす方法を用いており、大変に手間がかかり実現性に乏しいと思われる。

皮膚の表皮には多数のLCが常在しているので、皮膚へのウイルスペプチドまたは癌ペプチドの塗布により効果的なワクチン法が開発できれば、それは単離培養のいらない最も実現性の高い方法となるに違いない。しかしながら正常皮膚でLCは休止状態にありThやCTLへの抗原提示能は低く、リンパ節内への移動性にも富まないため正常皮膚を用いてはウイルスワクチン法や癌治療法は実現不可能であろう。

我々はこれまでの皮膚DTH反応の研究によって、皮膚最外層の角質層バリアをテープストリッピングまたはアセトン処理による脂質抽出によって破壊すると、その皮膚でLCが活性化し、リンパ節内へ移動し効率的にTh細胞に抗原提示することを証明した。そこで本研究においてはバリア破壊皮膚へのウイルスペプチドまたは癌ペプチド、さらにはDNAワクチンをめざした抗原挿入DNAの適用においてウイルスワクチンまたは癌治療が可能であるかを詳細に検討した。

## 研究方法

ペプチド及びDNA MHCクラス I H-2K<sup>b</sup>分子によ

り提示されCTLの誘導可能なHSVgpB498-505ペプチド、VSVNP53-59ペプチド、TRP-2181-188ペプチド (B16メラノーマのエピトープ)、MUT152-59ペプチド (3LL肺癌のエピトープ)、OVA257-264ペプチドを用いた。DNAとしてはGIS社のpGeneGrip(PE,FITC)を用いた。

バリア破壊 C57Bl/6 (B6) マウス耳翼または毛を剃った腹部皮膚をセロファンテープを用いそれぞれ8回または15回ストリッピングし角質層を破壊した。

ペプチド及びDNA塗布 テープストリッピングにより皮膚バリアを破壊し、12、24、48時間後に種々の濃度でアセトン：オリーブオイル、4：1に溶解させたペプチドを、また水または70%エタノールに溶解したプラスミドDNA塗布した。

CTLの調整 B6マウス耳翼にペプチドを塗布し、一週間後の頸部リンパ節からリンパ球を調整し、これを2 U/mlのrIL-2と10%FCSを含むRPMI-1640培地で3日間培養し、ペプチドにより感作されたリンパ球だけを増殖させた。また別にB6マウス耳翼にペプチドを塗布し、2週間後に毛を剃った腹部に同じペプチドを塗布した。2回目のペプチド塗布後5日目のヒ臓から細胞を調整した。これを0.17M塩化アンモニウム処理し赤血球を除去した後、ナイロンウールカラムを用いてヒ細胞のT細胞分画を得た。これを2 U/mlのrIL-2と10%FCSを含むRPMI-1640培地で3日間培養し、ペプチドにより感作されたリンパ球だけを増殖させた。

LCによるCTL感作能を調べるために、B6マウス耳翼から表皮シートを得て、これを0.2%トリプシン処理 (37℃、2時間) することにより表皮細胞浮遊液を得た。この浮遊液をHistopaque1083による遠心分離法にかけ、LCを含む単核球を分離した。これを抗マウスI-A<sup>b</sup>抗体で処理し (室温、30分)、抗体処理単核球を得た。I-A<sup>b</sup>抗原陽性細胞は抗マウスIgG

抗体の結合した磁気ビーズを用いて単離した（抗体処理単核球：ビーズ、1：3）。I-A<sup>b</sup>陽性表皮細胞のペプチドパルスは、50 μg/mlのペプチドを含むRPMI-1640培地でインキュベーションすることにより行い。1回洗浄後、正常B6マウス頸部リンパ球と混合培養（ペプチドパルスI-A<sup>b</sup>陽性細胞数：リンパ球数、1：50、2 U/ml rIL-2と10%FCSを含むRPMI-1640培地を用い37℃、7日間することによりペプチド特異的リンパ球を感作した。感作されたリンパ球がペプチド特異的CTLかどうか以下のCTLアッセイにより検討した。

CTLアッセイ 生体内においてH-2K<sup>b</sup>に拘束したペプチド特異的CTLの誘導を見るためにL<sup>b</sup>細胞にH-2K<sup>b</sup>遺伝子を導入し、H-2K<sup>b</sup>分子を強制発現させたL<sup>b</sup>細胞を作製した。CTLアッセイにはL<sup>b</sup>細胞をCr<sup>51</sup>ラベルし、ペプチドパルスしたものを標的細胞として用いた。L<sup>b</sup>細胞を200 μCi Na<sup>51</sup>Crと10%FCSを含むRPMI-1640培地で1時間培養し、<sup>51</sup>CrラベルL<sup>b</sup>細胞を作製した。これをRPMI-1640培地で4回洗浄し、50 μg/mlのペプチドを含むRPMI-1640培地で1時間インキュベーションした。これを1回洗浄し、CTLアッセイの標的細胞としてもちいた。CTLアッセイは以下のように行った。96穴プレートに1x10<sup>4</sup>個の標的細胞を入れ、これに上記CTLを種々の比で加えた。1穴あたりの最終容量は200 μlとする。8時間培養後遠心し、100 μl上清と細胞を含む100 μl下層に分けそれぞれの中に含まれる<sup>51</sup>Cr量をγカウンターでカウントした。% specific lysisは次のように計算した。% specific lysis=(cpm experimental release - cpm spontaneous release) / (cpm maximal release - cpm spontaneous release) x 100.

ペプチド特異的CTL前駆細胞の定量 頸部リンパ節内におけるペプチド特異的CTL前駆細胞の数を、限界希釈法によりにより定量した。96穴プレート内において0.6、1.2、6.0及び12.0 x 10<sup>3</sup>個のB6頸部リ

ンパ細胞を、HSVgpB、TRP-2またはMUT1ペプチド（50 μg/ml、1時間）でパルスレイトマイシンC処理したB6ヒ細胞（1x10<sup>5</sup>個）と共に10 U/ml rIL-2と10%FCSを含むRPMI-1640培地で2週間培養した。得られた細胞を均等に二分しそれぞれを4時間CTLアッセイにかけた。標的細胞はエフェクター細胞を得るために用いたペプチドと同じペプチドでパルスし<sup>51</sup>CrラベルしたL<sup>b</sup>細胞を用いた。10%以上の% specific lysisを示したwellをpositive wellとし% negative wellを算出し、これをsemilog方眼紙にプロットした。CTL前駆細胞頻度は37% negative wellの細胞数により算出した。

#### ランゲルハンス細胞へのDNAの取り込み

テープストリッピング皮膚への経時的なDNA塗布を行った後、表皮細胞浮遊液を調整し、MHCクラスII高陽性のランゲルハンス細胞がDNAを取り込んでいるかを、PE又はFITC標識抗I-A抗体を用いFACSにより解析した。一方、DNA塗布皮膚切片を蛍光顕微鏡で観察し、ランゲルハンス細胞にDNAが取り込まれているかどうかを確認した。

#### 研究結果

#### バリア破壊皮膚への抗原ペプチドとふによる特異的CTLの感作

接着テープを用いた皮膚のストリッピングは、角質層を破壊するだけでなく、角質層の回復に伴う免疫学的変調、例えば種々のリンフォカインの産生による免疫反応の変化、を促す方法として広く知られている。さらに我々は、表皮LCがバリア破壊に伴いTh細胞へ効率的に抗原提示することを知るに至り、この皮膚へのCTL誘導性ペプチドの塗布は、生体内で効果的に特異的CTLが感作されるのではないかと考えた。そこでHSVgpB、VSV NP、TRP-2、MUT1またはOVAペプチドをB6マウス耳翼の角質層を破壊後、12、24 または48時間で塗布した時、その後頸部リンパ節内で各々のペプチドに特異的なCTLが感作され

るかどうかを検討した。結果、用いた全てのペプチドにおいて、頸部リンパ節内でそのペプチド特異的なCILがH-2K<sup>b</sup>拘束的に感作されることが判った。また感作される強さはテープストリッピング後12~24時間でペプチドを塗布した時であり、一匹のマウスあたり24または48  $\mu$ g塗布した時にCILは最大に感作されることが判った。一方塗布ペプチドとCILアッセイの標的細胞のパルスペプチドを違う組み合わせで行ったCILアッセイでは何のCIL活性も見られない、さらに、バリア破壊しないマウス耳翼への抗原ペプチドの塗布では、リンパ節内でペプチド特異的CILは感作されなかった。

このテープストリッピング皮膚への抗原ペプチド塗布法では、頸部リンパ節内において特異的CILの感作が見られるものの、ヒ臓内ではそれが見られなかったので、一回の免疫では塗布した皮膚近傍のリンパ節内でCILの感作が起こる。そこで、一回目はテープストリッピング耳翼を用い、二回目は2週間後にテープストリッピング腹部皮膚を用いてペプチドを塗布すると全身でペプチド特異的CILが感作されるかどうかについて検討してみた。HSVgpBまたはTRP-2ペプチドいずれを用いた場合も、2回抗原塗布後、ヒ臓内でペプチド特異的CILが感作されることが判った。この結果は、バリア破壊皮膚を用いて抗原ペプチド塗布を数回行えば、全身で特異的CILを感作さらには増幅活性化させることが可能であることを示していた。

#### バリア破壊皮膚への癌抗原ペプチド塗布による癌ワクチン及び癌の免疫治療実験

上述のようにテープストリッピングしたB6マウス耳翼及び腹部皮膚を用いてTRP-2 (B16メラノーマ細胞のエピトープ) またはMUT1 (3LL肺癌細胞のエピトープ) ペプチド塗布による免疫を2回行なった後に、それぞれにB16細胞または3LL細胞を $1 \times 10^6$ 個皮下移植時の癌細胞の増殖について検討した。結

果、TRP-2免疫されたマウスは、B16細胞の移植を完全に拒絶し、すべてのマウスが3ヵ月以上生存した。一方MUT1免疫されたマウスは移植3LL細胞の増殖を極度に低下させるが、完全な拒絶には至らず1ヵ月後には全てのマウスが死亡した。コントロールとして行なったOVA免疫マウスはB16及び3LLの増殖を全く低下させなかった (data not shown)。さらにテープストリッピングを行なわずTRP-2またはMUT1塗布を行なったマウスも、それぞれB16または3LLの増殖を全く低下させなかった。

次にB16担癌マウスの癌直径5mmの時にテープストリッピング耳翼及び腹部にTRP-2塗布を行なった結果、B16細胞の増殖抑制または退縮がすべてのマウスに見られ、100%が1ヵ月以上また90%が2ヵ月以上生存した。コントロールとして行なったバリア破壊しない耳翼及び腹部皮膚にTRP-2塗布したマウスは26日後には全て死亡した。一方、3LL担癌マウスに同様の方法でMUT1塗布した場合、顕著な3LLの増殖抑制が観察されるものの90%のマウスが36日後には死亡し、2ヵ月以上生存するマウスは存在しなかった。

#### リンパ節内におけるCIL前駆細胞頻度

正常マウスにおける頸部リンパ節におけるHSVgpB、TRP-2またはMUT1特異的CIL前駆細胞の頻度を限界希釈法により算出した結果、HSVgpB、TRP-2、MUT1特異的CIL前駆細胞頻度はそれぞれ1/4565、1/6055、1/28550であった。テープストリッピング耳翼へのそれぞれのペプチド塗布により1/924、1/1216、1/11625に頻度が増加する。この結果はHSVgpBまたはTRP-2特異的CIL前駆細胞はもともと大きなクローンとして生体内に存在しており、MUT1特異的CIL前駆細胞はそれに比べるとかなり低い頻度で存在していることを示していた。癌の免疫治療実験においてテープストリッピング皮膚への抗原ペプチド塗布による免疫法でB16担癌マウスに

比べると3LL担癌マウスにおいて治療効果が低いのは、MUTI 特異的CTLが癌を退縮させるのに十分な増幅ができていないためであると予測できる。

#### バリア破壊皮膚への抗原ペプチド塗布による生体内での特異的CTL感作における表皮LCの関与

皮膚には表皮にLCがまた真皮にも樹状細胞が存在するため、バリア破壊皮膚に抗原ペプチド塗布した時の生体内でCTLの感作に関与するのはどちらの樹状細胞であるかを知るために、テープストリッピング耳翼の皮下にTRP-2注入する実験を行なった。結果、皮下注入においても頸部リンパ節内でTRP-2特異的CTLの感作が弱いながら起こるが、その強さはテープストリッピングに関係なく正常耳翼の皮下注入した場合と同程度であった。このことからテープストリッピング処理における効果は表皮LCによる可能性が強いと考えられる。

次にテープストリッピング耳翼または正常耳翼からLC-enriched fractionを得て、それにTRP-2パルスしたものと頸部リンパ球との混合培養による特異的CTLの感作実験を行なった。結果、テープストリッピング耳翼から分離したLC分画は正常耳翼から分離したLC分画よりも強くCTLを感作した。一方、どちらの耳翼から得たLC除去分画もCTL感作能を全く持たなかった。

さらにテープストリッピング後の表皮LCのH-2K<sup>b</sup>分子の発現を抗H-2K<sup>b</sup>抗体を用いたフローサイトメトリーによる解析により検討した結果、一部の表皮LCはテープストリッピング後12~24時間でH-2K<sup>b</sup>分子の発現を高めることが判った。この結果は抗原ペプチド塗布によるCTLの感作がテープストリッピング後12~24時間で最大となる結果と一致している。以上は、表皮LCがテープストリッピング皮膚へのペプチド塗布による生体内での特異的CTL感作に大きく関与していることを示唆させた。

#### バリア破壊皮膚のランゲルハンス細胞によるDNAの

#### 取り込み

B6マウス耳翼をテープストリッピング後、経時的に蛍光標識DNAを塗布すると、この場合TS時にDNAを塗布した時に最も強いランゲルハンス細胞内での蛍光がFACSによる分析でも皮膚切片による観察でも検出できた。またペプチドのように、24~48後の塗布では、ほとんどDNAが取り込まれないことも判った。

#### 考察

本研究によってバリア破壊皮膚がウイルスワクチン法及び癌の免疫治療法において有用であることを始めて明らかにすることができた。またこの方法の実施にあたりCTL前駆細胞頻度の高い抗原ペプチドを用いることが大変重要であることを証明した。

ヘルペスウイルスのように潜在的に感染しているウイルスについては、それに特異的なCTLの頻度が既に高いので、この方法は大変効果的なワクチン法となるに違いないが、癌治療においてはより特異的CTL頻度の高い癌抗原ペプチドの選択が治療効果を高める大きな要因となるであろう。以前の我々の研究でこの方法はTh細胞をも強く感作できることが証明されている。さらにCTLはTh細胞の助けによりより強く感作されることが判明しているので、CTL特異的ペプチドと共にTh細胞特異的ペプチド（特にTh1細胞特異的ペプチド）を併用して塗布すればより高いワクチン効果が得られるかもしれない。また一種類のペプチドよりも数種類のカクテルの方がより効果的であるといわれているので、HSVワクチンであればHSVgpBペプチドの他のエピトープペプチドを同定し、それらを混ぜた抗原液のバリア破壊皮膚への塗布はより高いHSV特異的CTL感作が期待できるかもしれない。これまでに行なわれている単離培養により得られる樹状細胞を用いたウイルスワクチン法や癌治療法の研究を見ると、ペプチド単独のパルスよりもheat shock protein (HSP) を結合させ

たペプチドまたは抗原遺伝子を組み込んだベクターをバルスした方が樹状細胞はより効率的にCILへ抗原提示することが判っているので、HSP-ペプチド複合体または抗原DNAをテープストリッピング皮膚にとふすればより強くCILを感作できるかもしれない。また、DNA塗布によってもバリア破壊皮膚のランゲルハンス細胞は効果的にDNAを取り込むことから、バリア破壊皮膚の遺伝子治療の可能性も考えられた。

#### 結論

MHCクラスII-2K<sup>b</sup>分子に結合しCILを誘導できることが知られているHSVgpB, VSVNP, TRP-2, MUT1, OVAペプチドを、テープストリッピングにより角質層除去した皮膚へ塗布した場合、角質層除去後12-24時間で塗布した時に最も強く近傍リンパ節内においてそれらペプチドに特異的なCILが感作された。テープストリッピングB6マウス耳翼によるペプチド塗布を行った2週間後に、同マウステープストリッピング腹部による同じペプチド処理を行うと、全身でペプチド特異的CIL活性が高まった。耳翼あたり20~40 $\mu$ gのペプチド塗布した時、最も強いCILの感作が観察された。この方法によりTRP-2(B16メラノーマのエピトープ)またはMUT1(3LL肺癌細胞のエピトープ)免疫したマウスは、それぞれB16細胞または3LL細胞の皮下移植を拒絶した。さらにこの免疫法をB16または3LL担癌マウスに行った時、各々癌細胞増殖の極端な低下が観察された。またDNA塗布実験においてバリア破壊皮膚が有用であることも確認できた。以上より角質層破壊皮膚はウイルスワクチン法または癌治療法、さらにはDNA治療実施の場として有用であることが判った。

#### 研究発表

##### 1. 論文

1) J. Invest. Dermatol. 108: 488. T-cell proliferation to superantigen-releasing *Staphylococcus aureus* by MHC class II-bearing

keratinocytes under protection from bacterial cytolysin. 1997 Y. Tokura, F. Furukawa, H. Wakita, H. Yagi, T. Ushijima, M. Takigawa

2) J. Invest. Dermatol. 109: 175. Altered permeability and disordered cutaneous immunoregulatory function in mice with acute barrier disruption. 1997 T. Nishijima, Y. Tokura, G. Imokawa, N. Seo, F. Furukawa, M. Takigawa

3) J. Invest. Dermatol. 110: 253 Sphingosylphosphorylcholine stimulates proliferation and upregulates cell surface-associated plasminogen activator activity in cultured human keratinocytes. H. Wakita, K. Matsushita, K. Nishimura, Y. Tokura, F. Furukawa, M. Takigawa

4) Eur. J. Dermatol. 7: 129 A lymphocytic papular eruption possibly associated with primary human immunodeficiency virus infection. 1997 Y. Tokura, H. Fujita, T. Kamada, F. Furukawa, M. Takigawa

5) Eur. J. Dermatol. 7: 185 Epidemic occurrence of an acute, erythematous eruption mimicking contact dermatitis: a new disease?. 1997 M. Sakurai, H. Sudo, Y. Tokura, M. Takigawa, Y. Matsunaga, T. Kurata

6) Eur. J. Dermatol. 7: 291 Lymphomatoid papulosis in children. 1997 K. Towyama, Y. Tokura, H. Yagi, F. Furukawa, M. Takigawa

7) Eur. J. Dermatol. 7: 19 Vitiligo with raised inflammatory borders: involvement of T cell immunity and keratinocytes expressing MHC class II and ICAM-I molecules. 1997 H. Yagi, Y. Tokura, F. Furukawa, M. Takigawa

8) British J. Dermatol. 136: 918 Wells' syndrome: a pathogenic role for circulating CD4+CD7- T cells expressing interleukin-5 mRNA. 1997 H. Yagi, Y.

Tokura, K. Matsushita, K. Hanaoka, F. Furukawa, M. Takigawa

9) Acta. Derm. Venereol 77: 231 Subacute and chronic prurigo effectively treated with recombinant interferon-g: Implications for participation of Th2 cells in the pathogenesis of prurigo. 1997 Y. Tokura, H. Yagi, K. Hanaoka, F. Furukawa, M. Takigawa

10) Int. J. Dermatol. 36: 587 Hair cycle-dependent expression of heat shock proteins in hair follicle epithelium 1997 H. Hashizume, Y. Tokura, M. Takigawa, R. Paus

11) J. Dermatol. 24: 88 Evaluation of soluble cell adhesion molecules in atopic dermatitis 1997 M. Koide, F. Furukawa, Y. Tokura, S. Shirahama, M. Takigawa

12) J. Dermatol. 25: 131 Systemic administration of hochu-ekki-to, a japease-chinease herbal medicine, maintains interferon-g production by peripheral blood mononuclear cells in patients with mycosis fungoides. 1997

Y. Tokura, M. Sakurai, H. Yagi, F. Furukawa, M. Takigawa

13) Cell. Immunol. 178: 172 Spontaneous Hair Follicle cycling may influence the development of murine contact photosensitivity by modulating keratinocyte cytokine production. 1997 Y. Tokura, U. Hofmann, S. M-Rover, R. Paus, H. Wakita, H. Yagi, N. Seo, F. Furukawa, M. Takigawa.

14) British J. Dermatol. 138:357 Streptococcal impetigo induces Th1-preponderant activation of T lymphocytes with subsequent anergy to superantigenic exotoxins in patients with atopic dermatitis. 1998 Y. Tokura, M. I-Ginoza, N. Seo, T Ito, M Sakurai, F. Furukawa, M. Takigawa

15) J Photomedicin and Photobiology 19:57 Generation of monoclonal antibody specific for fluoroquinolone-photoadducts: cross-reactivity among fluoroquinolones. 1998 Y. Tokura, N. Seo, M. Takigawa

16) J. Immunol. 161, 4138. Down-regulation of Tumoricidal NK and NKT cell activities by MHC Kb molecules expressed on Th2-type gd T and ab T cells coinfiltrating in early B16 melanoma lesions. 1998, N. Seo, Y. Tokura, F. Furukawa, M. Takigawa.

#### 知的所有権の取得状況

特許取得；公開番号：特開平10-316585、発明の名称：キラーT細胞賦活剤、出願人：日東電工株式会社、発明者：瀧川雅浩 瀬尾尚宏



厚生科学研究費補助金（厚生科学特別研究事業）  
分担研究報告書

経表皮的王クチン法の開発に関する研究

分担研究者 瀬尾 尚宏 浜松医科大学皮膚科学教室助手

研究要旨

角質層バリア破壊皮膚に抗原ペプチド塗布すると表皮ランゲルハンス細胞を介したC'TLへの抗原提示が効率的に生じること等が明らかとなった。

## 研究目的

樹状細胞の一種で、ヘルパーT (Th) 細胞への強い抗原提示細胞として知られているランゲルハンス細胞 (LC) は、近年になりその細胞上の主要組織適合クラス I 分子を介してウイルス抗原や癌抗原などの内在性の抗原を効率的に細胞障害性T細胞 (CTL) 提示することが判明し、この細胞を用いた抗ウイルスワクチン法または癌治療法の研究が大きく注目されている。ところが今日まで行なわれているこれらワクチン法及び治療法の研究のほとんどは、末梢血内にわずかに存在する樹上細胞前駆細胞を単離し、それを試験管内においてIL-4, GM-CSFまたはTNF- $\alpha$ の存在下で培養した後に得られる成熟樹状細胞をウイルスペプチドまたは癌ペプチドでパルスしたものを生体内にもどす方法を用いており、大変に手間がかかり実現性に乏しいと思われる。

皮膚の表皮には多数のLCが常在しているので、皮膚へのウイルスペプチドまたは癌ペプチドの塗布により効果的なワクチン法が開発できれば、それは単離培養のいらない最も実現性の高い方法となるに違いない。しかしながら正常皮膚でLCは休止状態にありThやCTLへの抗原提示能は低く、リンパ節内への移動性にも富まないので正常皮膚を用いてはウイルスワクチン法や癌治療法は実現不可能であろう。

我々はこれまでの皮膚DTH反応の研究によって、皮膚最外層の角質層バリアをテープストリッピングまたはアセトン処理による脂質抽出によって破壊すると、その皮膚でLCが活性化し、リンパ節内へ移動し効率的にTh細胞に抗原提示することを証明した。そこで本研究においてはバリア破壊皮膚へのウイルスペプチドまたは癌ペプチドの適用においてウイルスワクチンまたは癌治療が可能であるかを詳細に検討した。

## 研究方法

ペプチド MHCクラスI H-2K<sup>b</sup>分子により提示さ

れCTLの誘導可能なHSVgpB498-505ペプチド、VSV NP53-59ペプチド、TRP-2181-188ペプチド (B16メラノーマのエピトープ)、MUT152-59ペプチド (3LL肺癌のエピトープ)、OVA257-264ペプチドを用いた。

バリア破壊 C57BL/6 (B6) マウス耳翼または毛を剃った腹部皮膚をセロファンテープを用いそれぞれ8回または15回ストリッピングし角質層を破壊した。

ペプチド塗布 テープストリッピングにより皮膚バリアを破壊し、12、24、48時間後に種々の濃度でアセトン：オリーブオイル、4：1に溶解させたペプチドを塗布した。

CTLの調整 B6マウス耳翼にペプチドを塗布し、一週間後の頸部リンパ節からリンパ球を調整し、これを2 U/mlのrIL-2と10%FCSを含むRPMI-1640培地で3日間培養し、ペプチドにより感作されたリンパ球だけを増殖させた。また別にB6マウス耳翼にペプチドを塗布し、2週間後に毛を剃った腹部に同じペプチドを塗布した。2回目のペプチド塗布後5日目のヒ臓からヒ細胞を調整した。これを0.17M塩化アンモニウム処理し赤血球を除去した後、ナイロンウールカラムを用いてヒ細胞のT細胞分画を得た。これを2 U/mlのrIL-2と10%FCSを含むRPMI-1640培地で3日間培養し、ペプチドにより感作されたリンパ球だけを増殖させた。

LCによるCTL感作能を調べるために、B6マウス耳翼から表皮シートを得て、これを0.2%トリプシン処理 (37℃、2時間) することにより表皮細胞浮遊液を得た。この浮遊液をHistopaque1083による遠心分離法にかけ、LCを含む単核球を分離した。これを抗マウスI-A<sup>b</sup>抗体で処理し (室温、30分)、抗体処理単核球を得た。I-A<sup>b</sup>抗原陽性細胞は抗マウスIgG抗体の結合した磁気ビーズを用いて単離した (抗体処理単核球：ビーズ、1：3)。I-A<sup>b</sup>陽性表皮細胞

のペプチドパルスは、50  $\mu\text{g/ml}$ のペプチドを含むRPMI-1640培地でインキュベーションすることにより行い。1回洗浄後、正常B6マウス頸部リンパ球と混合培養（ペプチドパルスI-A<sup>b</sup>陽性細胞数：リンパ球数、1：50、2 U/ml rIL-2と10%FCSを含むRPMI-1640培地を用い37℃、7日間することによりペプチド特異的リンパ球を感作した。感作されたリンパ球がペプチド特異的CTLかどうか以下のCTLアッセイにより検討した。

CTLアッセイ 生体内においてH-2K<sup>b</sup>に拘束したペプチド特異的CTLの誘導を見るためにL<sup>b</sup>細胞にH-2K<sup>b</sup>遺伝子を導入し、H-2K<sup>b</sup>分子を強制発現させたL<sup>b</sup>細胞を作製した。CTLアッセイにはL<sup>k<sup>b</sup></sup>細胞をCr<sup>51</sup>ラベルし、ペプチドパルスしたものを標的細胞として用いた。L<sup>b</sup>細胞を200  $\mu\text{Ci}$  Na<sup>51</sup>Crと10%FCSを含むRPMI-1640培地で1時間培養し、<sup>51</sup>CrラベルL<sup>b</sup>細胞を作製した。これをRPMI-1640培地で4回洗浄し、50  $\mu\text{g/ml}$ のペプチドを含むRPMI-1640培地で1時間インキュベーションした。これを1回洗浄し、CTLアッセイの標的細胞としてもちいた。CTLアッセイは以下のように行った。96穴プレートに1x10<sup>6</sup>個の標的細胞を入れ、これに上記CTLを種々の比で加えた。1穴あたりの最終容量は200  $\mu\text{l}$ とする。8時間培養後遠心し、100  $\mu\text{l}$ 上清と細胞を含む100  $\mu\text{l}$ 下層に分けそれぞれの中に含まれる<sup>51</sup>Cr量を $\gamma$ -カウンターでカウントした。% specific lysisは次のように計算した。% specific lysis=(cpm experimental release - cpm spontaneous release) / (cpm maximal release - cpm spontaneous release) x 100.

ペプチド特異的CTL前駆細胞の定量 頸部リンパ節内におけるペプチド特異的CTL前駆細胞の数を、限界希釈法によりにより定量した。96穴プレート内において0.6、1.2、6.0及び12.0 x 10<sup>3</sup>個のB6頸部リンパ細胞を、HSVgpB、TRP-2またはMUT1ペプチド(50  $\mu\text{g/ml}$ 、1時間)でパルスシマイトマイシンC

処理したB6ヒ細胞(1x10<sup>6</sup>個)と共に10 U/ml rIL-2と10%FCSを含むRPMI-1640培地で2週間培養した。得られた細胞を均等に二分しそれぞれを4時間CTLアッセイにかけた。標的細胞はエフェクター細胞を得るために用いたペプチドと同じペプチドでパルスし<sup>51</sup>CrラベルしたL<sup>b</sup>細胞を用いた。10%以上の% specific lysisを示したwellをpositive wellとし% negative wellを算出し、これをsemilog方眼紙にプロットした。CTL前駆細胞頻度は37% negative wellの細胞数により算出した。

### 研究結果

#### バリア破壊皮膚への抗原ペプチドとふによる特異的CTLの感作

接着テープを用いた皮膚のストリッピングは、角質層を破壊するだけでなく、角質層の回復に伴う免疫学的変調、例えば種々のリンフォカインの産生による免疫反応の変化、を促す方法として広く知られている。さらに我々は、表皮LCがバリア破壊に伴いTh細胞へ効率的に抗原提示することを知るに至り、この皮膚へのCTL誘導性ペプチドの塗布は、生体内で効果的に特異的CTLが感作されるのではないかと考えた。そこでHSVgpB、VSV NP、TRP-2、MUT1またはOVAペプチドをB6マウス耳翼の角質層を破壊後、12、24 または48時間で塗布した時、その後頸部リンパ節内で各々のペプチドに特異的なCTLが感作されるかどうかを検討した。結果、用いた全てのペプチドにおいて、頸部リンパ節内でそのペプチド特異的なCTLがH-2K<sup>b</sup>拘束的に感作されることが判った。また感作される強さはテープストリッピング後12-24時間でペプチドを塗布した時であり、一匹のマウスあたり24または48  $\mu\text{g}$ 塗布した時にCTLは最大に感作されることが判った。一方塗布ペプチドとCTLアッセイの標的細胞のパルスペプチドを違う組み合わせで行ったCTLアッセイでは何のCTL活性も見られない、さらに、バリア破壊しないマウス耳翼への抗原

ペプチドの塗布では、リンパ節内でペプチド特異的CILは感作されなかった。

このテープストリッピング皮膚への抗原ペプチド塗布法では、頸部リンパ節内において特異的CILの感作が見られるものの、ヒ臓内ではそれが見られなかった。一回の免疫では塗布した皮膚近傍のリンパ節内でCILの感作が起こる。そこで、一回目はテープストリッピング耳翼を用い、二回目は2週間後にテープストリッピング腹部皮膚を用いてペプチドを塗布すると全身でペプチド特異的CILが感作されるかどうかについて検討してみた。HSVgpBまたはTRP-2ペプチドいずれを用いた場合も、2回抗原塗布後、ヒ臓内でペプチド特異的CILが感作されることが判った。この結果は、バリア破壊皮膚を用いて抗原ペプチド塗布を数回行えば、全身で特異的CILを感作さらには増幅活性化させることが可能であることを示していた。

#### リンパ節内におけるCIL前駆細胞頻度

正常マウスにおける頸部リンパ節におけるHSVgpB、TRP-2またはMUT1特異的CIL前駆細胞の頻度を限界希釈法により算出した結果、HSVgpB、TRP-2、MUT1特異的CIL前駆細胞頻度はそれぞれ1/4565、1/6055、1/28550であった。テープストリッピング耳翼へのそれぞれのペプチド塗布により1/924、1/1216、1/11625に頻度が増加する。この結果はHSVgpBまたはTRP-2特異的CIL前駆細胞はもともと大きなクローンとして生体内に存在しており、MUT1特異的CIL前駆細胞はそれに比べるとかなり低い頻度で存在していることを示していた。癌の免疫治療実験においてテープストリッピング皮膚への抗原ペプチド塗布による免疫法でB16担癌マウスに比べると3LL担癌マウスにおいて治療効果が低いのは、MUT1特異的CILが癌を退縮させるのに十分な増幅ができていないためであると予測できる。

#### バリア破壊皮膚への抗原ペプチド塗布による生体内

#### での特異的CIL感作における表皮LCの関与

皮膚には表皮にLCがまた真皮にも樹状細胞が存在するため、バリア破壊皮膚に抗原ペプチド塗布した時の生体内でCILの感作に関与するのはどちらの樹状細胞であるかを知るために、テープストリッピング耳翼の皮下にTRP-2注入する実験を行なった。結果、皮下注入においても頸部リンパ節内でTRP-2特異的CILの感作が弱いながら起こるが、その強さはテープストリッピングに関係なく正常耳翼の皮下注入した場合と同程度であった。このことからテープストリッピング処理における効果は表皮LCによる可能性が強いと考えられる。

次にテープストリッピング耳翼または正常耳翼からLC-enriched fractionを得て、それにTRP-2パルスしたものと頸部リンパ球との混合培養による特異的CILの感作実験を行なった。結果、テープストリッピング耳翼から分離したLC分画は正常耳翼から分離したLC分画よりも強くCILを感作した。一方、どちらの耳翼から得たLC除去分画もCIL感作能を全く持たなかった。

さらにテープストリッピング後の表皮LCのH-2K<sup>b</sup>分子の発現を抗H-2K<sup>b</sup>抗体を用いたフローサイトメトリーによる解析により検討した結果、一部の表皮LCはテープストリッピング後12~24時間でH-2K<sup>b</sup>分子の発現を高めることが判った。この結果は抗原ペプチド塗布によるCILの感作がテープストリッピング後12~24時間で最大となる結果と一致している。以上は、表皮LCがテープストリッピング皮膚へのペプチド塗布による生体内での特異的CIL感作に大きく関与していることを示唆させた。

#### 考 察

ヘルペスウイルスのように潜在的に感染しているウイルスについては、それに特異的なCILの頻度が既に高いので、この方法は大変効果的なワクチン法となるに違いないが、癌治療においてはより特異的

CTL頻度の高い癌抗原ペプチドの選択が治療効果を高める大きな要因となるであろう。以前の我々の研究でこの方法はTh細胞をも強く感作できることが証明されている。さらにCTLはTh細胞の助けによりより強く感作されることが判明しているため、CTL特異的ペプチドと共にTh細胞特異的ペプチド（特にTh1細胞特異的ペプチド）を併用して塗布すればより高いワクチン効果が得られるかもしれない。また一種類のペプチドよりも数種類のカクテルの方がより効果的であるといわれているので、HSVワクチンであればHSVgpBペプチドの他のエピトープペプチドを同定し、それらを混ぜた抗原液のバリア破壊皮膚への塗布はより高いHSV特異的CTL感作が期待できるかもしれない。これまでに行なわれている単離培養により得られる樹状細胞を用いたウイルスワクチン法や癌治療法の研究を見ると、ペプチド単独のバルスよりもheat shock protein (HSP) を結合させたペプチドまたは抗原遺伝子を組み込んだベクターをバルスした方が樹状細胞はより効率的にCTLへ抗原提示することが判っているため、HSP-ペプチド複合体または抗原DNAをテープストリッピング皮膚にとふすればより強くCTLを感作できるかもしれない。

#### 結論

MHCクラスIII-2K<sup>b</sup>分子に結合しCTLを誘導できることが知られているHSVgpB, VSVNP, TRP-2, MUI1, OVAペプチドを、テープストリッピングにより角質層除去した皮膚へ塗布した場合、角質層除去後12-24時間で塗布した時に最も強く近傍リンパ節内においてそれらペプチドに特異的なCTLが感作された。テープストリッピングB6マウス耳翼によるペプチド塗布を行った2週間後に、同マウステープストリッピング腹部による同じペプチド処理を行うと、全身でペプチド特異的CTL活性が高まった。耳翼あたり20~40 μgのペプチド塗布した時、最も強いCTLの感作が観察された。この方法によりTRP-2(B16メ

ラノーマのエピトープ)またはMUI1(3LL肺癌細胞のエピトープ)免疫したマウスは、それぞれB16細胞または3LL細胞の皮下移植を拒絶した。さらにこの免疫法をB16または3LL担癌マウスに行った時、各々癌細胞増殖の極端な低下が観察された。

#### 研究発表

##### 1. 論文

- 1) J. Invest. Dermatol. 109: 175. Altered permeability and disordered cutaneous immunoregulatory function in mice with acute barrier disruption. 1997 T. Nishijima, Y. Tokura, G. Imokawa, N. Seo, F. Furukawa, M. Takigawa
- 2) Cell. Immunol. 178: 172 Spontaneous Hair Follicle cycling may influence the development of murine contact photosensitivity by modulating keratinocyte cytokine production. 1997 Y. Tokura, U. Hofmann, S. M-Rover, R. Paus, H. Wakita, H. Yagi, N. Seo, F. Furukawa, M. Takigawa.
- 3) British J. Dermatol. 138:357 Streptococcal impetigo induces Th1-preponderant activation of T lymphocytes with subsequent anergy to superantigenic exotoxins in patients with atopic dermatitis. 1998 Y. Tokura, M. I-Ginoza, N. Seo, T Ito, M Sakurai, F. Furukawa, M. Takigawa
- 4) Photomedicine and Photobiology 19:57 Generation of monoclonal antibody specific for fluoroquinolone-photoadducts: cross-reactivity among fluoroquinolones. 1998 Y. Tokura, N. Seo, M. Takigawa
- 5) J. Immunol. 161, 4138. Down-regulation of Tumoricidal NK and NKT cell activities by MHC Kb molecules expressed on Th2-type gd T and ab T cells coinfiltrating in early B16 melanoma lesions. 1998, N. Seo, Y. Tokura, F. Furukawa,

M.Takigawa.

19980075

これ以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。

### 「研究成果の刊行に関する一覧表」

Tokura Y, Furukawa F, Wakita H, Yagi H, Ushijima T, Takigawa M. T-cell proliferation to superantigen-releasing *Staphylococcus aureus* by MHC class II-bearing keratinocytes under protection from bacterial cytolysin.

J Invest Dermatol. 1997 Apr;108(4):488-94.

Nishijima T, Tokura Y, Imokawa G, Seo N, Furukawa F, Takigawa M. Altered permeability and disordered cutaneous immunoregulatory function in mice with acute barrier disruption.

J Invest Dermatol. 1997 Aug;109(2):175-82.

Wakita H, Matsushita K, Nishimura K, Tokura Y, Furukawa F, Takigawa M. Sphingosylphosphorylcholine stimulates proliferation and upregulates cell surface-associated plasminogen activator activity in cultured human keratinocytes.

J Invest Dermatol. 1998 Mar;110(3):253-8.

Tokura Y, Fujita H, Kamada T, Furukawa F, Takigawa M. A lymphocytic papular eruption possibly associated with primary human immunodeficiency virus infection.

Eur J Dermatol. 1997;7:129-131.

Towayama K, Tokura Y, Yagi H, Furukawa F, Takigawa M. Lymphomatoid papulosis in children.

Eur J Dermatol. 1997;7:291-4.

Yagi H, Tokura Y, Furukawa F, Takigawa M. Vitiligo with raised inflammatory borders: involvement of T cell immunity and keratinocytes expressing MHC class II and ICAM-1 molecules.

Eur J Dermatol. 1997;7:19-22.

Yagi H, Tokura Y, Matsushita K, Hanaoka K, Furukawa F, Takigawa M. Wells' syndrome: a pathogenic role for circulating CD4+CD7- T cells expressing interleukin-5 mRNA.

Br J Dermatol. 1997 Jun;136(6):918-23.

Tokura Y, Yagi H, Hanaoka K, Ito T, Towyama K, Sachi Y, Tanaka M, Sakamoto T, Sekizuka T, Furukawa F, Takigawa M. Subacute and chronic prurigo effectively treated with recombination interferon-gamma: implications for participation of Th2 cells in the pathogenesis of prurigo.

Acta Derm Venereol. 1997 May;77(3):231-4.

Hashizume H, Tokura Y, Takigawa M, Paus R. Hair cycle-dependent expression of heat shock proteins in hair follicle epithelium.

Int J Dermatol. 1997 Aug;36(8):587-92.

Koide M, Furukawa F, Tokura Y, Shirahama S, Takigawa M. Evaluation of soluble cell adhesion molecules in atopic dermatitis.

J Dermatol. 1997 Feb;24(2):88-93.

Tokura Y, Sakurai M, Yagi H, Furukawa F, Takigawa M. Systemic administration of hochu-ekki-to (bu-zhong-yi-qi-tang), a Japanese-Chinese herbal medicine, maintains interferon-gamma production by peripheral blood mononuclear cells in patients with mycosis fungoides.

J Dermatol. 1998 Feb;25(2):131-3.

Tokura Y, Hofmann U, Muller-Rover S, Paus R, Wakita H, Yagi H, Seo N, Furukawa F, Takigawa M. Spontaneous hair follicle cycling may influence the development of murine contact photosensitivity by modulating keratinocyte cytokine production.

Cell Immunol. 1997 Jun 15;178(2):172-9.

Tokura Y, Ishii-Ginoza M, Seo N, Ito T, Sakurai M, Furukawa F, Takigawa M. Streptococcal impetigo induces Th1-preponderant activation of T lymphocytes with subsequent anergy to superantigenic exotoxins in patients with atopic dermatitis.

Br J Dermatol. 1998 Feb;138(2):357-8.



Tokura Y, Seo N, Takigawa M. Generation of monoclonal antibody specific fluoroquinolone-photoadducts: Cross-reactivity among fluoroquinolones.

Photomedicine and Photobiology. 1997; 19:57-8.

Seo N, Tokura Y, Furukawa F, Takigawa M. Down-regulation of tumoricidal NK and NK T cell activities by MHC Kb molecules expressed on Th2-type gammadelta T and alphabeta T cells coinfiltrating in early B16 melanoma lesions.

J Immunol. 1998 Oct 15;161(8):4138-45.