

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11年度 総括・分担, 総合研究報告書

平成12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、さらには老齡マウス皮膚では角質層破壊の程度によりCTL感作効率が著しく異なることが判明し、ヒトへの臨床応用への一助となる事実が明確となった。

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、その細胞表面の主要組織適合クラスI分子を介してウイルス抗原や腫瘍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がん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- α 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腫瘍抗原ペプチドでバルスしたものを生体内にもどす方法を主に用いており、膨大な手間と危険性からヒトへの臨床応用という点で、実現性に乏しいものとなっている。

皮膚の表皮には多数のLCが常在しているため、皮膚へのウイルスペプチドまたは腫瘍抗原ペプチドの塗布

により効果的なワクチン法が開発できれば、それは樹状細胞の単離培養する必要の無い安全で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がん治療法は実現不可能であろう。

我々はこれまでのマウスを用いた皮膚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ハリア破壊皮膚へのウイルスペプチドまたは腫瘍抗原ペプチドの適用においてウイルスワクチンまたはがん治療が可能であるかを詳細に検討した。さらに高齢マウスを用いた老化に伴う角質層破壊皮膚LCのT細胞感受能の研究から、老化と皮膚LC機能について詳細な検討を行った。

研究方法

ペプチド

MHCクラスII H-2K^b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

8 ~ 10 週齢または 1 年齢の 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 日目の脾臓から脾細胞を調整した。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脾細胞の 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^b 抗体で処理し (室温、30 分)、抗体処理単核球を得た。I-A^b 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^b 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^b 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^b に拘束したペプチド特異的 CTL の誘導を見るために L^k 細胞に H-2K^b 遺伝子を導入し、H-2K^b 分子を強制発現させた L^{kb} 細胞を作製した。CTL アッセイには L^{kb} 細胞を Cr⁵¹ 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^{kb} 細胞を 200 μ Ci Na⁵¹Cr と 10% FCS を含む RPMI-1640 培地で 1 時間培養し、⁵¹Cr ラベル L^{kb} 細胞を作製した。これを RPMI-1640 培地で 4 回洗浄し、50 μ 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 1x10⁴ 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 μ l とする。8 時間培養後遠心し、100 μ l 上層と細胞を含む 100 μ l 下層に分けそれぞれの中に含まれる ⁵¹Cr 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 10⁴ 個の B6 頸部リンパ細胞を、HSVgpB, TRP-2 または MUT1 ペプチド (50 μ g/ml, 1 時間) でパルスしマイトマイシン C 処理した B6 ヒ細胞 (1x10⁵ 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 ⁵¹Cr ラベルした L^{kb} 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塗布による特異的 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^b 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 μ g 塗布した時に CTL は最大に感作されることが判明した。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 活性も見られないので、ペプチド特異的な CTL 誘導反応が生じていると考えられた。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 CTL 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 CTL の感作が見られるものの、脾臓内ではそれが見られなかったもので、一回の免疫では塗布した皮膚近傍のリンパ節内で CTL 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 CTL 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、脾臓内でペプチド特異的 CTL 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 CTL 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 1×10^6 個皮下移植した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 細胞の移植をほぼ完全に拒絶し、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、完全な拒絶にはならず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。さらにテーフ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 担癌マウスの腫直径 5 mm の時にテーフ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ハ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 CTL 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 CTL 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 CTL 前駆細胞頻度はそれぞれ 1/4565、1/6055、1/28550 であった。テーフ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 CTL 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 CTL 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。がんの免疫治療実験においてテーフ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 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検討した。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^b 分子の発現を抗 H-2K^b 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^b 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。

以上の結果は、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。

角質層破壊皮膚の LC による DNA の取り込み

B6 マウスをテープストリッピング後、経時的に蛍光 (FITC) 標識 DNA を塗布すると、この場合テープストリッピングと同時に DNA を塗布すると、LC 内にわずかに蛍光が存在し、DNA 取込みが観察されたが、ペプチドのようにテープストリッピング 12~24 時間後の塗布では DNA の取込みを表す、蛍光は見出せない。

角質層破壊皮膚への抗原ペプチド塗布による CTL 感作法における加齢に伴う変化

8~10 週令の B6 マウス (若齢) と 1 年令の B6 マウス (高齢) を用いて、表皮 LC の存在密度及び、その H-2K^b, I^a_b, CD40, CD54, CD80, CD86 の発現レベルについて検討したとこ

ろ、若齢と老齢マウスにおける LC 密度、またその表面抗原の発現に有意な差は認められなかった。そこで次に角質層破壊に伴い経時的に得られる表皮 LC 密度を表皮シートの抗 Ia^b 抗体を用いた染色によって、また表面抗原の発現レベルをそこから得られる表皮細胞浮遊液を抗 H-2K^b, 抗 Ia^b, 抗 CD40, 抗 CD54, 抗 CD80, 抗 CD86 抗体を用い染色したもののフローサイトメトリー分析により検討した結果、若齢マウスでは耳翼のテープストリッピングを 8 回行うと 12~24 時間で LC のリンパ節への移動が最大になるのに対し、高齢マウスでは 4 回のテープストリッピングで 12~24 時間後に LC の移動が最大となった。高齢マウス耳翼を 8 回テープストリッピングすると LC の密度が急激に減少する。このことは過剰なテープストリッピングによる表皮の破壊が起こっていると解釈できた。さらに、若齢マウス耳翼の 8 回テープストリッピングにより活性化した LC はその約 30% が H-2K^b, Ia^b, CD40, CD54, CD80, CD86 の発現を高めるが、老齢マウス耳翼の 4 回テープストリッピングで得られる LC も同様の割合でそれぞれの表面抗原の発現を増強させることが判った。

次に、若齢マウスと高齢マウスの耳翼をそれぞれ 8 回と 4 回テープスト

リッピングし、24 時間後に TRP-2 ペプチドを塗布し免疫マウスを作製し、B16 細胞を皮下移植した時のがん細胞の増殖について検討した。結果、TRP-2 免疫若齢マウスでは B16 細胞の増殖が非常に抑制されるが、TRP-2 免疫高齢マウスでの B16 細胞の増殖は、対照として行った免疫無しのマウス内での B16 増殖よりは明らかに弱くなるものの、TRP-2 免疫若齢マウスで得られる B16 細胞の増殖抑制に比べるとその効果は優位に低いことが判明した。

以上の結果より、老齢マウスでの皮膚表皮 LC の密度及び表面抗原の発現は若齢マウスとほとんど変わらないものの、CTL 感作能という点に関しては若齢マウスより劣る可能性と、表皮 LC の機能は高齢マウス LC と若齢マウス LC とでは同程度であるが、老齢マウスでは感作される側のリンパ球の機能低下により、効果的な CTL 感作が妨げられているものと考えられた。

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、がん治療においてはより特異的 CTL 頻度の高い腫瘍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 細胞のサイトカインのヘルプにより更に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言われているので、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がん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パ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塗布すればより強く CTL を感作できるかもしれない。テープストリッピング直後での DNA の塗布では LC への取込みがわずかながら観察されることより、角質層破壊皮膚を用いた遺伝子治療の可能性も考えられた。さらにこの免疫法をヒトで応用するためには、実施するヒトの年齢により効果的なテープストリッピング回数及びペプチド濃度の選択が必須と考えられた。

結 論

MHC クラス II-K^b 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, 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 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 μ g 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 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、各々のがん細胞増殖の極端な低下が観察された。また DNA 塗布実験において角質層破壊皮膚が有用であること、加齢に伴う有効なワクチン効果は角質層破壊の程度によ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実施の場として有用であることが判った。

研究発表

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 1997 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) Br. 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 Venercol 77 231. Subacute and chronic prurigo effectively treated with recombinant interferon- γ 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 japanease-chinease herbal medicine, maintains interferon- γ 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) Br. 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) Photomed Photobiol 19 57 Generation of monoclonal antibody specific for fluoroquinolone-photoadducts cross-reactivity among fluoroquinolones. 1998 Y Tokura, N Seo, M Takigawa
- 16) Br 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 Ishii-Ginoza, N Seo, T Ito, M Sakurai, F Fukumi, M Takigawa
- 17) J. Immunol. 160 3719. Cross-reactivity in murine Fluoroquinolone photoallergy Exclusive usage of TCR

- V β 13 by immune T cells that recognize fluoroquinolone-photomodified cells 1998 Y Tokura, N Seo, H Yagi, F Furukawa, M Takigawa
- 18) J Dermatol 138 904 Severe mosquito bite hypersensitivity, natural killer cell leukemia, latent or chronic active epstein-barr virus infection and hydroa vacciniforme-like eruption 1998 Y Tokura, S Ishihara, K Ohshima, A Hidano, M Koide, N Seo, M Takigawa
- 19) Clin Exp Immunol 112 403 Tumour-specific cytotoxic T lymphocyte activity in Th2-type Sezary syndrome its enhancement by interferon-gamma (IFN- γ) and IL-12 and fluctuations in association with disease activity 1998 N Seo, Y Tokura, K Matsumoto, F Furukawa, M Takigawa
- 20) J Immunol 161 4138 Down-regulation of tumoricidal NK and NK T cell activities by MHC K^b molecules expressed on Th2-type $\gamma\delta$ T and $\alpha\beta$ T cells coinfiltrating in early B16 melanoma lesions 1998 N Seo, Y Tokura, F Furukawa, M Takigawa
- 21) Photomed Photobiol 20.105 Induction of Th1-skewing cytokine production by 8-methoxypsoralen plus UVA in T lymphocytes 1998 Y Tokura, N Seo, H Yagi, H Wakita, S Moriwaki, F Furukawa, M Takigawa
- 22) J Immunol 163 242 Depletion of IL-10- and TGF- β -producing regulatory $\gamma\delta$ T cells by administering a daunomycin-conjugated specific mAb in early tumor lesions augments the activity of CTLs and NK cells 1999 N Seo, Y Tokura, M Takigawa, K Egawa
- 23) J Invest Dermatol 113 202 Treatment of T lymphocytes with 8-methoxypsoralen plus ultraviolet A induces transient but biologically active Th1-skewing cytokine production 1999 Y Tokura, N Seo, H Yagi, H Wakita, S Moriwaki, F Furukawa, M Takigawa
- 24) Arch Dermatol Res 291 382 Hyporesponsiveness of peripheral blood lymphocytes to streptococcal superantigens in patients with guttate psoriasis evidence for systemic stimulation of T cells with superantigens released from focally infecting Streptococcus pyogenes 1999 Y Tokura, N Seo, A Ohshima, H Wakita, R Yokote, F Furukawa, M Takigawa
- 25) J Dermatol Sci 21 34 Lymphocyte stimulation test with drug-photomodified cells in patients with quinolone photosensitivity 1999 Y Tokura, N Seo, A Ohshima, H Yagi, F Furukawa, M Takigawa
- 26) J Invest Dermatol Symp Proc 4 184 Modulation of T-lymphocytes

proliferation by exogenous natural ceramides and sphingosylphosphorylcholine 1999 Y Tokura, H Wakita, N. Seo, F Furukawa, K Nishijima, M Takigawa

27) Proc Natl. Acad Sci USA 97 371
Percutaneous peptide immunization via corneum barrier-disrupted murine skin for experimental tumor immunotherapy 2000 N. Seo, Y. Tokura, T Nishijima, 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細胞賦活化剤，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ペプチド特異的CTLへの効率的な抗原提示が行われること、角質層破壊皮膚は遺伝子治療の場として有用であること、また最も効率的なCTL感作の実現には、年齢に応じた角質層破壊法の選択が重要であること、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がん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- α 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腫瘍抗原ペプチドでパルスしたものを生体内にもとす方法を用いており、手間と安全性の面から実現性に乏しいと考えられている。

皮膚の表皮には多数の LC が常在しているため、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がん治療法の実現は難しいであろう。

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ハ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角質層バリア破壊皮膚へのウイルスペプチドまたは腫瘍抗原ペプチドの適用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^b 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日目の脾臓から脾細胞を調整した。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脾細胞の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^b抗体で処理し(室温、30分)、抗体処理単核球を得た。I-A^b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^b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^b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^bに拘束したペプチド特異的CTLの誘導を見るためにL^k細胞にH-2K^b遺伝子を導入し、H-2K^b分子を強制発現させたL^{kb}細胞を作製した。CTLアッセイにはL^{kb}細胞をCr⁵¹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^{kb}細胞を200 μCi Na^[51Cr]と10%FCSを含むRPMI-1640培地で1時間培養し、⁵¹CrラベルL^{kb}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 1×10^4 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 ^{51}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 12.0×10^3 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) でパルスしマイトマイシンC処理した B6 脾細胞 (1×10^5 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 ^{51}Cr ラベルした L^b 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塗布による特異的 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^b 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 μ 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 CTL 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 CTL の感作が見られるものの、脾臓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 CTL 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 CTL 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、脾臓でペプチド特異的 CTL 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 CTL を感作する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 CTL 前駆細胞頻度

正常マウスにおける頸部リンパ節内における HSVgpB、TRP-2 または MUT1 特異的 CTL 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 CTL 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 CTL 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 CTL 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。がん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 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^b 分子の発現を抗 H-2K^b

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、部の表皮 LC はテープストリッピング後 12~24 時間で H-2K^b 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。

角質層破壊皮膚の LC による DNA の取り込み

B6 マウスをテープストリッピング後、経時的に蛍光 (FITC) 標識 DNA を塗布すると、この場合テープストリッピングと同時に DNA を塗布すると、LC 内にわずかに蛍光が存在し、DNA 取り込みが観察されたが、ペプチドのようにテープストリッピング 12~24 時間後の塗布では DNA の取り込みを去す、蛍光は見出せない。

角質層破壊皮膚への抗原ペプチド塗布による CTL 感作法における加齢に伴う変化

8~10 週令の B6 マウス (若齢) と 1 年令の B6 マウス (高齢) を用いて、表皮 LC の存在密度及び、その H-2K^b, I^a_b, CD40, CD54, CD80, CD86