

特集

● 難治性皮膚悪性腫瘍の治療戦略 ●

## 進行期悪性黒色腫に対する樹状細胞療法 —現状と展望—

九州大学大学院医学研究院・皮膚科学分野

師井 洋一

**要旨** 悪性黒色腫は予後不良の皮膚悪性腫瘍である。しかし、一方でこの腫瘍は様々なメラノーマ特異的な腫瘍抗原を発現することなどより、免疫療法の格好の標的として、世界中の研究者がその克服に取り組んでいる。わが国でも腫瘍特異的免疫療法として、様々な施設でペプチドワクチン、樹状細胞療法が試行されている。全世界で期待を込めて行われてきた樹状細胞療法について、その概要を概説するとともに、これまでの結果について報告したメタアナリシスを紹介する。期待された効果を上げていない樹状細胞療法について、その原因を考察する。近年、注目されている分子標的療法と今後の樹状細胞療法、免疫療法の未来について概説した。

[Biotherapy 23 (6) : 436-440, November, 2009]

### Dendritic Cell Therapy Against Malignant Melanoma: Current Status and Future Outlook

Yoichi Moroi

*Department of Dermatology, Graduate School of Medical Science, Kyushu University***Summary**

Dendritic cells (DCs) play a pivotal role in the initiation, programming and regulation of tumor-specific immune responses. However, DC therapy for malignant melanoma has had only limited clinical success. The low efficacy of a vaccine strategy against melanoma is discussed. Combination therapy with novel molecular-targeted therapy and vaccine therapy might be promising.

**Key words:** Dendritic cell vaccine, Lymphodepletion, Treg, Anti-CTLA-4 antibody, Molecular-targeted therapy  
**Address request for reprints to:** Dr. Yoichi Moroi, Department of Dermatology, Graduate School of Medical Science, Kyushu University, 3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582, Japan

## はじめに

1990年代から、癌抗原同定方法の開発によって<sup>1)</sup> 様々なペプチド抗原が明らかになり、免疫療法の格好の標的である悪性黒色腫に対してペプチド単独または+アジュバント、さらに樹状細胞を併用したワクチン療法が世界中で開始された。しかし2004年、これらワクチン療法の奏効率はわずか2.6%であったと報告された<sup>2)</sup>。現在までの解析では、ワクチン療法より末梢血中の抗腫瘍前駆細胞（腫瘍を認識、破壊できるCD8<sup>+</sup> T細胞）の増加は誘導できるが、腫瘍局所ではそれらの細胞が機能不全に陥っていることが明らかとなっている。すなわち、能動免疫療法で腫瘍拒絶を起こすためには、全身性、腫瘍局所での抗腫瘍免疫阻害環境を是正することが重要である。一方Rosenbergらは、腫瘍内に浸潤していた腫瘍浸潤リンパ球（TIL）を骨髄前処置した患者に輸注する方法を開発し<sup>3)</sup>、さらに放射線照射を追加することで奏効率は72%まで改善すると報告した<sup>4)</sup>。また、活性化T細胞の抑制に関連する分子CTLA-4を阻害する抗CTLA-4抗体がワクチン療法との併用で臨床試験され、治療効果が認められつつある<sup>5)</sup>。さらには、CTLA-4に類似した機能をもつPD-1分子の阻害剤などが注目されている。さらに、近年のメラノーマにおける発生、増殖にかかわる遺伝子の異常が明らかにされ、分子標的療法や癌幹細胞、上皮-間葉形質転換に標的を絞った治療法の開発が進み、これらの新規治療法は免疫療法との併用が期待できる。以上、樹状細胞療法の今後の展望について概説する。

### I. 樹状細胞療法とは

Nestleらによりメラノーマに対する有効性が報告されて<sup>6)</sup>、2000年ごろより全世界で行われているのが樹状細胞療法である。簡単にその概要を説明する。アフエレーシスなどで大量の末梢血単核球細胞を採取し、プラスチック接着細胞、CD14またはCD34<sup>+</sup>細胞などに選別する。GM-CSFとIL-4を添加した培養液で5日間培養する。誘導された未熟樹状細胞に抗原（ペプチド抗原または自己腫瘍溶解液）を取り込ませ、様々な因子で活性化させた後、主に皮内に投与する方法が通常行

われるが、直接未熟樹状細胞を腫瘍内に投与する場合もある。未熟樹状細胞を直接腫瘍内投与する場合には、放射線療法、化学療法、凍結療法など様々な前処置をして腫瘍のapoptosis/necrosisを誘導しておき、樹状細胞の抗原取り込み効率を上げることと、投与局所に何らかの炎症反応を誘導し投与した樹状細胞の活性化を促す必要があると考えられている。

2009年、世界中で報告されたメラノーマに対する樹状細胞療法のメタアナリシスが発表された<sup>7)</sup>。1996~2007年までに報告された38の論文、626症例に対する樹状細胞療法をデンマークのグループが総括した。全体の奏効率は、完全寛解（CR）3%、部分寛解（PR）6%で奏効率（CR+PR）は9%であった。病状不変（SD）は21%と比較的高かったが、各施設での治療効果判定の基準が一定ではなく、一概に評価することはできないとしている。同じメラノーマに対する樹状細胞とはいえ各施設で様々な改変を加えているため、これらの多彩な因子、症例の背景などと治療効果の相関について検討している。良好な治療効果（CR+PD+SD）との有意な相関を認めたものは、腫瘍特異的なT細胞の活性化（ELISPOT, tetramerなどで確認）（ $p=0.0004$ ）、CD4エピトープとなる抗原（keyhole limpet hemocyanin (KLH)、破傷風毒素など）の添加+アジュバントとしてのIL-2投与の追加（ $p=0.002$ ）、腫瘍溶解液よりはペプチドを抗原として免疫すること（ $p=0.03$ ）であった。成熟樹状細胞より未熟な樹状細胞であること（ $p=0.08$ ）、アジュバントとしてIL-2投与単独（ $p=0.09$ ）に関しては有意差はなかったものの、ある程度の傾向で奏効率に相関を認めた。一方で、病期、樹状細胞の培養法、樹状細胞前駆細胞はCD34<sup>+</sup>のみとするかどうか、投与方法（皮下、皮内、リンパ節内など）は、それらの選択によって奏効率が上がるような相関を認めなかった。やはり、われわれが感じていた印象と合致する点が多い。CD4抗原と、抗原としての腫瘍溶解液に関しては、制御性T細胞が認識する抗原の関与が考えられる。通常ペプチド抗原（すべてCD8抗原）で免疫する場合KLHを追加し、腫瘍溶解液では外来抗原を添加しない場合が多い。腫瘍溶解液ではそのなかに含まれる免疫抑制性抗原（制御

表1 腫瘍免疫におけるエスケープ機構

1. 腫瘍細胞自体が抑制性サイトカインを産生  
IL-10, IL-6, TGF- $\beta$ , PGE<sub>2</sub>, Th2 cytokines
2. 遺伝子変異などによる抗原, MHC (関連) 分子の発現低下, 消失
3. CTLA-4やPD-1などが関与する免疫抑制性メカニズム
4. 制御性 T 細胞の出現, 腫瘍内浸潤
5. 骨髄由来抑制性細胞 (腫瘍浸潤マクロファージなど) による免疫抑制, 転移促進

性 T 細胞が認識する CD4 抗原) への免疫誘導 (免疫抑制性の反応) が起こりやすく, 抗腫瘍免疫がうまく誘導されないのではと考えている。一方, 外来性の強い CD4 抗原 (KLH など) を添加することで腫瘍抗原内の制御性抗原の提示をマスクする可能性があり, これらの結果につながった可能性がある。IL-2 に関しては同じく制御性 T 細胞の誘導を促す可能性があり, 現時点では使用に関して統一した見解はないが, その投与量が問題 (比較的大量で活性化, 低用量で制御性 T 細胞誘導?) なのかもしれない。

## II. 米国国立がん研究所の免疫療法

米国国立がん研究所の Rosenberg らは, 画期的な免疫療法を開発した<sup>3)</sup>。ミニ移植などで用いられる非破壊性骨髄前処置 (シクロホスファミドとフルダラビンを投与) をした患者に, 腫瘍内に浸潤していた T 細胞 (TIL) を実験室内で大量に培養・増殖させて輸注後, 大量の IL-2 を投与する方法で高い奏効率を認めたと報告した。樹状細胞療法などのワクチン療法 (能動免疫療法) とは異なり, 直接作用する免疫担当細胞または蛋白質 (エフェクター) を投与する受動細胞療法 (養子免疫療法) となる。したがって, この場合の IL-2 は能動免疫賦活作用を期待するものではなく, 高濃度 IL-2 環境下で培養されてきた培養 TIL が生体内で長期生存するために使用される。TIL のうち CD8<sup>+</sup> 細胞のみを輸注しても効果はなく, CD8<sup>+</sup> 細胞と CD4<sup>+</sup> 細胞の両者が必要であるとされている。奏効率は 50% を超え, 従来のありとあらゆる治療法のなかでも最強な方法と考えられる。さらに, 全身放射線照射を併用することで (この処置の追加により破壊性骨髄前処置となる), 奏効率は 2 Gy 追加照射で 52%, 12 Gy 追加照射で 72% まで向上すると報告している<sup>4)</sup>。担癌患者で

は腫瘍に対する免疫反応を抑制する様々な細胞の活性が上昇しており, 骨髄前処置によってそれら細胞が消去され, 輸注した TIL が効率よく腫瘍局所に浸潤し, キラー活性を発揮すると想定されている。また, IL-7 や IL-15 が関与する homeostatic proliferation の作動などが関与しているらしい。この受動免疫療法をさらに強化するために, 腫瘍抗原認識 T 細胞受容体 (TCR) 遺伝子の導入により人工的に作製した短期培養抗腫瘍 T 細胞の使用が計画されている。すでに MART-1 特異的 TCR 遺伝子を導入した T 細胞を用いた養子免疫療法が実施され, 抗腫瘍効果が示されている<sup>8)</sup>。さらに, NY-ESO-1 抗原特異的 TCR 遺伝子導入 T 細胞の作製, 導入した TCR  $\alpha/\beta$  のペアリングや発現量を増やすための各種工夫, 抗原ノックアウトマウスを用いた高親和性 TCR の単離, CDR 2/3 領域のアミノ酸置換による高親和性 TCR の作製などが精力的に行われており, 養子免疫療法のさらなる抗腫瘍効果の増強, 抵抗癌種の拡大が試みられている<sup>9)</sup>。

## III. 抗腫瘍免疫の抑制機構に対する試み

前述のように, 免疫機能, ワクチン療法が十分に働かないことに関して, 従来から様々な理由が考えられている (表 1)。今後は, これら抑制機構の排除, コントロールが免疫療法の大きなテーマになると思われる。

制御性 T 細胞は CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> で, Foxp3 という遺伝子産物 (転写因子) を発現しており, 定常状態では自己免疫反応を抑制している。腫瘍免疫においては, これらの細胞を抑制することによってワクチン効果が増強することが期待される。この方法として, CD25 に結合する IL-2 のアミノ酸配列にジフテリア毒素を結合させた製剤 (denileukin diftitox, 商品名: ONTAK<sup>®</sup>) が臨床検討

され、単独投与では期待された臨床効果はなかったが<sup>10)</sup>、末梢血中の制御性 T 細胞は確実に減少しており、遅延型過敏反応、免疫された腫瘍抗原ペプチドに反応する T 細胞数は投与後に増強、増数していたという報告もあり<sup>11)</sup>、可能性は残されている。マウスでは制御性 T 細胞を消去するために汎用されている抗 CD25 抗体は、ヒトでは現在のところ、造血器悪性腫瘍または移植後の拒絶反応の治療に用いられているのみである。

近年注目されている骨髄由来抑制性細胞 (myeloid derived suppressor cells, MDSC) は、腫瘍増殖、免疫抑制において大きな役割を果たしていると考えられている。産生する一酸化窒素やアルギナーゼなどによって、T 細胞免疫を抑制することが判明している。現在、これらの細胞を標的とした治療法 (補助療法) が試みられており、抗癌剤の gemcitabine や COX-2 阻害剤、VEGF 阻害剤などが有望とされている<sup>12)</sup>。

#### IV. 抗 CTLA-4 抗体への期待

腫瘍免疫抑制のメカニズムとして、CTLA-4 や PD-1 が注目されている。どちらも抗原提示細胞上の B7 分子などに結合し、T 細胞側に増殖抑制など負のシグナルを供給する。これらは通常、免疫反応の過剰な暴走を止めるために働いているが、担癌患者ではしばしばこの負の経路が優位になっている場合が多いとされている。現在有望なのは抗 CTLA-4 抗体で、制御性 T 細胞の機能にも関連するといわれるこの分子を阻害することで、抗腫瘍免疫が活性化することが期待されている<sup>5)</sup>。事実、単独投与でも有効例が報告されており、またペプチドワクチンとの併用療法での初期臨床試験が終了しており、現在大規模試験が欧米で進行中である<sup>13)</sup>。制御性 T 細胞の機能に関連する分子ではあるが、抗体投与によって制御性 T 細胞の数や機能が抑制されるわけではなく、T 細胞全般の活性化による効果のようである<sup>14)</sup>。副作用の点では、T 細胞免疫を非特異的に活性化すると起こりやすい腸炎 (下痢、下血) が頻発する。腸管穿孔をはじめとする重症副作用が初期には認められたが、現在は用量の適正な設定で安全に使用できるようになっている。PD-1 と PD-L1 の結合も同様に負のシグナルを伝えるが、この結合

を阻害する製剤がリンパ腫領域で臨床試験され<sup>15)</sup>、有効例の報告があり、今後適応が拡大する可能性がある。

#### V. 分子標的療法併用の可能性

各種悪性腫瘍に対して、その生物学的な発癌メカニズムの解析により、様々な分子標的療法が開発されている。メラノーマでは、分化において重要な役割を果たしている *c-kit* に関して、遺伝子変異は少ないとされていた。しかし、近年の詳細な検討により、欧米人に多い表在拡大型では *c-kit* 変異はほとんど検出されないのに対して、末端黒子型や粘膜型では多数認められることが明らかとなった<sup>16)</sup>。すなわち、*c-kit* 変異に対し有効性を示すチロシンキナーゼ阻害剤が、ある種のメラノーマに有効である可能性がでてきた。事実、有効例の報告がある<sup>17)</sup>が無効例の報告もあり、症例の選択には単に *c-kit* 蛋白の過剰発現だけではなく、遺伝子変異を確実に検出する必要があるであろう。また、一方でチロシンキナーゼ阻害剤そのものが Treg や MDSC の誘導を抑制し、抑制性サイトカインの産生を抑制して免疫抑制状態を是正に貢献するというマウス実験の報告<sup>18)</sup>もあり、今後適応がますます拡大する可能性がある。

#### おわりに

樹状細胞単独療法における治療効果は限界があることが判明した。Rosenberg らの治療法は魅力的だが、どこでもできる治療ではなく、またリスクも大きい。彼らの成功例を基に免疫抑制状態を是正し、メラノーマを克服したいと世界中の臨床医が願っている。

#### 文 献

- 1) Van den Eynde, B.J. and Boon, T.: Tumor antigens recognized by T lymphocytes. *Int. J. Clin. Lab. Res.* 27(2):81-86, 1997.
- 2) Rosenberg, S.A., Yang, J.C. and Restifo, N.P.: Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat. Med.* 10(9):909-915, 2004.
- 3) Dudley, M.E., Wunderlich, J.R., Robbins, P.F., et al.: Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. *Science* 298(5594):850-854, 2002.
- 4) Dudley, M.E., Wunderlich, J.R., Yang, J.C., et al.:

- Adoptive cell transfer therapy following non-myeloablative but lymphodepleting chemotherapy for the treatment of patients with refractory metastatic melanoma. *J. Clin. Oncol.* 23 (10):2346-2357, 2005.
- 5) Peggs, K.S., Quezada, S.A., Korman, A.J., *et al.*: Principles and use of anti-CTLA4 antibody in human cancer immunotherapy. *Curr. Opin. Immunol.* 18(2):206-213, 2006.
  - 6) Nestle, F.O., Alijagic, S., Gilliet, M., *et al.*: Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumorlysate-pulsed dendritic cells. *Nat. Med.* 4 (3):328-332, 1998.
  - 7) Engell-Noerregaard, L., Hansen, T.H., Andersen, M.H., *et al.*: Review of clinical studies on dendritic cell-based vaccination of patients with malignant melanoma: assessment of correlation between clinical response and vaccine parameters. *Cancer Immunol. Immunother.* 58(1):1-14, 2009.
  - 8) Morgan, R.A., Dudley, M.E., Wunderlich, J.R., *et al.*: Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. *Science* 314(5796):126-129, 2006.
  - 9) Gattinoni, L., Powell, D.J. Jr., Rosenberg, S.A., *et al.*: Adoptive immunotherapy for cancer: building on success. *Nat. Rev. Immunol.* 6(5):383-393, 2006.
  - 10) Attia, P., Maker, A.V., Haworth, L.R., *et al.*: Inability of a fusion protein of IL-2 and diphtheria toxin (Denileukin Diftitox, DAB389IL-2, ONTAK) to eliminate regulatory T lymphocytes in patients with melanoma. *J. Immunother.* 28(6):582-592, 2005.
  - 11) Mahnke, K., Schönfeld, K., Fondel, S., *et al.*: Depletion of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> human regulatory T cells *in vivo*: kinetics of Treg depletion and alterations in immune functions *in vivo* and *in vitro*. *Int. J. Cancer* 120(12):2723-2733, 2007.
  - 12) Gabrilovich, D.I. and Nagaraj, S.: Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 9(3):162-174, 2009.
  - 13) Dougan, M. and Dranoff, G.: Immune therapy for cancer. *Annu. Rev. Immunol.* 27:83-117, 2009.
  - 14) Maker, A.V., Attia, P. and Rosenberg, S.A.: Analysis of the cellular mechanism of antitumor responses and autoimmunity in patients treated with CTLA-4 blockade. *J. Immunol.* 175(11):7746-7754, 2005.
  - 15) Keir, M.E., Butte, M.J., Freeman, G.J., *et al.*: PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 26:677-704, 2008.
  - 16) Fecher, L.A., Cummings, S.D., Keefe, M.J., *et al.*: Toward a molecular classification of melanoma. *J. Clin. Oncol.* 25(12):1606-1620, 2007.
  - 17) Hodi, F.S. and Friedlander, P.: Major response to imatinib mesylate in *KIT*-mutated melanoma. *J. Clin. Oncol.* 26(12):2046-2051, 2008.
  - 18) Ozao-Choy, J., Ma, G., Kao, J., *et al.*: The novel role of tyrosine kinase inhibitor in the reversal of immune suppression and modulation of tumor microenvironment for immune-based cancer therapies. *Cancer Res.* 69(6):2514-2522, 2009.

## 樹状細胞療法—今後の展望—

師井 洋一

九州大学大学院医学研究院皮膚科学分野

**要旨** 全世界で期待を込めて行われてきたメラノーマに対する樹状細胞療法について、その概要、これまでの結果について報告したメタアナリシスを紹介する。樹状細胞療法がメラノーマに対して奏効率が上がらない原因について、現在、世界最強と考えられる米国国立癌研究所の治療法を紹介しながら、考察する。近年、注目されている分子標的療法の現状などをふまえ、今後の樹状細胞療法、免疫療法の未来について概説した。

**Dendritic cell therapy : a future aspect**

Yoichi MOROI

*Department of Dermatology, Graduate School of Medical Science, Kyushu University*

Dendritic cells (DCs) play a pivotal role in the initiation, programming and regulation of tumor-specific immune responses. However, the DC therapy for malignant melanoma has yielded only limited clinical success. The low efficacy of vaccine strategy against melanoma will be discussed. The combination therapy with novel molecular targeted therapy and vaccine therapy might be promising. [*Skin Cancer (Japan)* 2009; 24: 153-158]

**Key words**: Dendritic cell vaccine, Lymphodepletion, Treg, Anti-CTLA-4 antibody, Molecular targeted therapy

## はじめに

1990年代から癌抗原同定方法の開発によって<sup>1)</sup>、様々なペプチド抗原が明らかになり、ペプチド単独または+アジュバント、さらに樹状細胞を併用したワクチン療法が世界中で開始された。しかし、2004年これらワクチン療法の奏効率はわずか2.6%であったと報告された<sup>2)</sup>。現在までの解析では、ワクチン療法より末梢血中の抗腫瘍前駆細胞(腫瘍を認識・破壊できるCD8+T細胞)の増加は誘導できるが、腫瘍局所ではそれらの細胞が機能不全に陥っていることが明らかとなっている。すなわち、能動免疫療法で腫瘍拒絶を起こすためには、全身性・腫瘍局所での抗腫瘍免疫阻害環境を是正すること

が重要である。一方、Rosenbergらは腫瘍内に浸潤していたTIL(腫瘍浸潤リンパ球)を大量に培養・増殖させて、骨髓前処置をした患者に輸注する方法を開発し<sup>3)</sup>、さらに放射線照射を追加することで奏効率は72%まで改善すると報告した<sup>4)</sup>。担癌患者では腫瘍に対する免疫反応を抑制する免疫抑制性の細胞の活性が上昇しており、骨髓前処置によって、それらの細胞が抑制・消去されると想定されている。活性化T細胞の抑制に関連する分子CTLA-4を阻害する抗CTLA-4抗体がワクチン療法との併用で臨床試験され、治療効果が認められつつある。さらには、抗腫瘍免疫を抑制するTGF- $\beta$ の阻害剤やCTLA-4に類似した機能を持つPD-1分子の阻害剤などが注目されている。さらに、近年のメラノーマにおける発生・増殖にかかわ

る遺伝子の異常が明らかにされ、分子標的療法やがん幹細胞、上皮-間葉形質転換に標的を絞った治療法の開発が進み、これらの新規治療法は免疫療法との併用が期待できる。以上、樹状細胞療法の今後の展望について概説する。

### 腫瘍免疫の基本

現在考えられている腫瘍免疫のシステムを図1に示す。腫瘍細胞は活発な分裂・増殖をするとともに、様々な誘因で常にアポトーシスやネクローシスを起こしている。それらの腫瘍細胞の残骸の一部は抗原提示細胞である樹状細胞に取り込まれて所属リンパ節に運ばれる。その経過の中で断片化された腫瘍抗原がMHCのクラスII、またはクラスI（クロスプレゼンター

ション)上に提示される。リンパ節内では、それら抗原を認識できるT細胞が適切な共刺激分子の刺激を受け、活性化し増殖する。その後、腫瘍局所からのケモカインなどの影響で腫瘍細胞を破壊すべく遊走する。もちろん、様々な補助的な因子やイベントが関与しているが、大筋ではこのように考えてよいと思われる。

### 樹状細胞療法とは

Nestleらよりメラノーマに対する有効性が報告されて<sup>5)</sup>、2000年頃より全世界で行われているのが樹状細胞療法である。簡単にその概要を説明する(図2)。アフレーシスなどで大量の末梢血単核球細胞を採取し、プラスティック接着細胞、CD14またはCD34陽性細胞などに

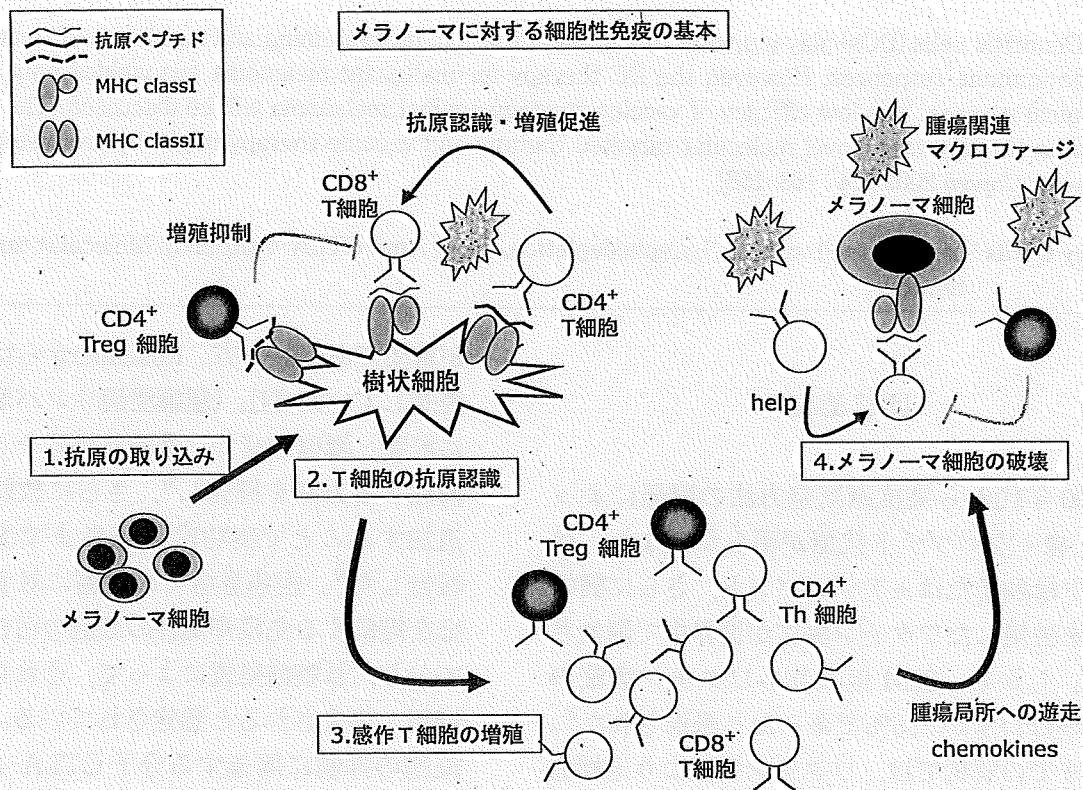


図1. 腫瘍免疫の概略

1. アポトーシスまたはネクローシスした腫瘍細胞が抗原提示細胞に取り込まれ、プロセッシングを受けてMHCとともに提示される(クロスプレゼンテーション)
2. リンパ節内へ移動した後、認識できるレセプターを持つT細胞へ抗原提示する。その際には、CD8陽性T細胞だけでなく、CD4陽性ヘルパーT細胞および制御性T細胞へも抗原提示されることが考えられている
3. 活性化したT細胞は増殖し、ケモカインなどにより腫瘍局所へ遊走する
4. 腫瘍表面の抗原+MHCを認識して腫瘍細胞を破壊するが、腫瘍関連マクロファージや制御性T細胞が妨害する

選別する。GM-CSFとIL-4を添加した培養液で5日間培養する。誘導された未熟樹状細胞に抗原を取り込ませ、様々な因子で活性化させた後、主に皮内に投与する方法が通常行われるが、直接未熟樹状細胞を皮内や腫瘍内に投与する場合もある。未熟樹状細胞を直接腫瘍内投与する場合には、放射線、化学療法、凍結療法など様々な前処置をして腫瘍のapoptosis/necrosisを誘導しておき、樹状細胞の抗原取り込み効率を上げることと、投与局所に何らかの炎症反応を誘導し投与した樹状細胞の活性化を促す必要があると考えられている。

2009年、世界中で報告されたメラノーマに対する樹状細胞療法のメタアナリシスが発表された<sup>6)</sup>。デンマークのグループが、1996年から2007年までに報告された38の論文、626症例に対する樹状細胞療法を総括した。全体の奏功率は完全寛解(CR)3%、部分寛解(PR)6%で奏功率は9%であった。病状不変(SD)は

21%と比較的高かったが、各施設での治療効果判定の基準が一定ではなく、一概に評価することはできないとしている。同じメラノーマに対する樹状細胞とはいえ、各施設で様々な改変を加えているため、これらの多彩な因子、症例の背景などと治療効果の相関について検討している。良好な治療効果(CR+PD+SD)との有意差を持った相関を認めたものは、腫瘍特異的なT細胞の活性化(ELISPOT, tetramerなどで確認)( $p=0.0004$ )、CD4エピトープとなる抗原(KLH: keyhole limpet hemocyanin, 破傷風毒素など)の添加+アジュバントとしてのIL-2の投与の追加( $p=0.002$ )、腫瘍溶解液よりはペプチドを抗原として免疫すること( $p=0.03$ )であった。成熟樹状細胞より未熟な樹状細胞部であること( $p=0.08$ )、アジュバントとしてIL-2を投与単独( $p=0.09$ )に関しては、有意差はなかったものの、ある程度の傾向で奏功率に相関を認めた。一方で、病期、樹状細胞の

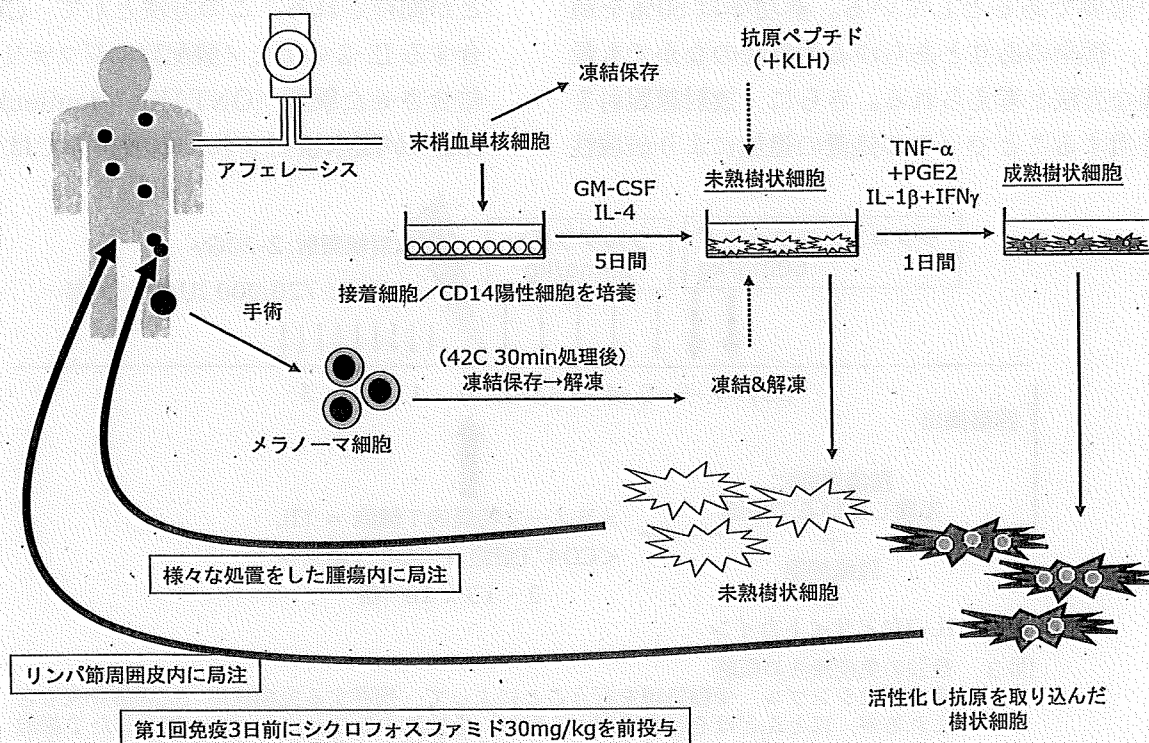


図2. 樹状細胞療法の概略

患者末梢血を選別後、GM-CSFとIL-4によって未熟樹状細胞に分化させる。通常、腫瘍抗原(腫瘍細胞の溶解液、または抗原ペプチド)を添加した後、TNF-αを代表とする様々な活性化因子で活性化した後、投与させる。リンパ節周囲の皮内が一般的だが、直接リンパ節へ投与する場合もある。未熟樹状細胞を、様々な腫瘍傷害処置(放射線、化学療法、凍結、温熱療法)をした後に、直接腫瘍局所に投与する方法も試行されている



培養法、樹状細胞前駆細胞はCD34陽性のみとするかどうか、投与方法（皮下、皮内、リンパ節内など）は、それらの選択によって奏率が上がるような相関を認めなかった。

### 最強の免疫療法

この分野の第一人者であるアメリカ国立癌研究所のRosenberg博士らは画期的な免疫療法を開発した<sup>3)</sup>。腫瘍内に浸潤していたT細胞(TIL)を実験室内で大量に培養・増殖させて、ミニ移植などで用いられる非破壊性骨髄前処置をした患者に輸注後、大量のIL-2を投与する方法で、高い奏率を認めたと報告した(図3)。この場合のIL-2は免疫賦活作用を期待するものではなく、高濃度IL-2環境下で培養されてきた輸注TILが生存するために使用される。TILのうちCD8陽性細胞のみを輸注しては効果なく、CD8陽性細胞とCD4陽性細胞の両者が必要であるとしている。奏率は50%を超え、従来のありとあらゆる治療法のなかでも最強の方法と考えられる。さらに、放射線照射を併用することで(この処置の追加により破壊性

骨髄前処置となる)、奏率は2Gy追加照射で52%、12Gy追加照射で72%まで向上すると報告している<sup>4)</sup>。担癌患者では腫瘍に対する免疫反応を抑制する制御性細胞の活性が上昇しており、骨髄前処置によって、それら細胞が消去されると想定されている。

### 抗腫瘍免疫の抑制機構

前述のように、免疫機能・ワクチン療法が十分に働かないことに関して、従来から様々な理由が考えられている(表1)。今後は、これら抑制機構の排除、コントロールが免疫療法の大きなテーマになると思われる。

制御性T細胞はCD4陽性CD25陽性で、Foxp3という遺伝子産物(転写因子)を発現しており、定常状態では自己免疫反応を抑制している。腫瘍免疫においてはこれらの細胞を抑制することによって、ワクチン効果が増強することが期待される。この方法として、CD25に結合するIL-2のアミノ酸配列にジフテリア毒素を結合させた製剤(ONTAK<sup>®</sup>: denileukin diftotox)が臨床検討され、単独投与では期待され

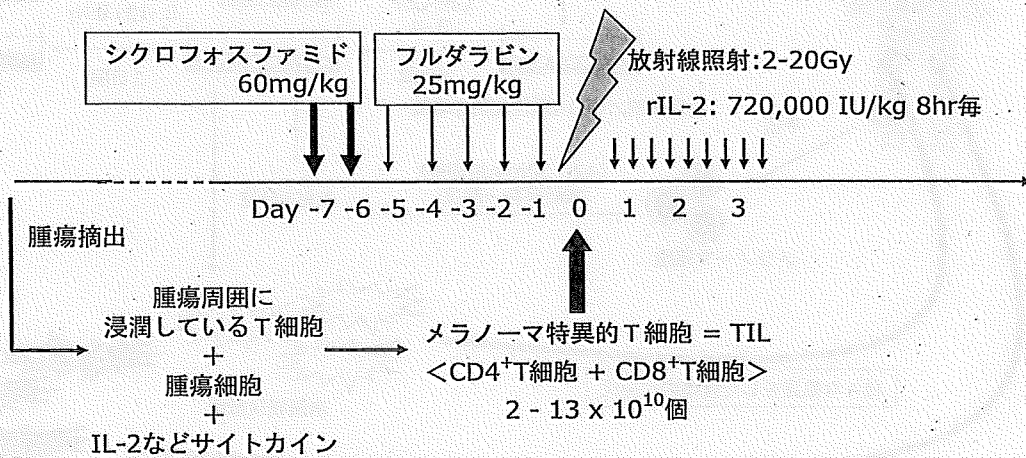


図3. 最強の免疫療法の概略

考え方はシンプル。骨髄処置を行うことによって、残存する免疫反応(抗腫瘍免疫も含まれるが、ほとんどはそれを抑制する反応)を排除することによって、移入したT細胞(TIL)の寿命を延ばすとともに、それらの腫瘍局所への集積も可能とした。当初は大量化学療法のための骨髄非破壊処置としていたが、その後、放射線照射を追加することでさらに奏率が向上した。腫瘍局所へTILの集積→局所IFNの増加→抗原・MHCの発現増強をも誘導し、腫瘍の免疫エスケープの一因である抗原、MHCの発現低下を克服できるため、抗腫瘍効果が高まっている。細胞移入後のIL-2投与は、移入したTILのアポトーシス(培養中の高濃度IL-2環境下から、体内の低IL-2環境へ移動するとアポトーシスを生じる)を抑制するために使用される

表1. 腫瘍免疫におけるエスケープ機構

- 1) 腫瘍細胞自身が抑制性サイトカインを産生  
IL-10, TGF- $\beta$ , PGE2, Th2 cytokines
- 2) 遺伝子変異などによる抗原・MHC (関連) 分子の発現低下・消失
- 3) CTLA-4 や PD-1 などが関与する免疫抑制性メカニズム
- 4) 制御性 T 細胞の出現, 腫瘍内浸潤
- 5) 腫瘍浸潤マクロファージ (骨髄由来抑制細胞) による免疫抑制・転移促進

た臨床効果はなかったが<sup>7)</sup>, 末梢血中の制御性 T 細胞は確実に減少しており, 遅延型過敏反応, 免疫された腫瘍抗原ペプチドに反応する T 細胞数は投与後に増強・増数していたという報告もあり<sup>8)</sup>, 可能性は残されている。

### 抗 CTLA-4 抗体への期待

腫瘍免疫抑制のメカニズムとして CTLA-4 や PD-1 が注目されている。どちらも抗原提示細胞上の B7 分子などに結合し, T 細胞側に増殖抑制など負のシグナルを供給する。これらは通常免疫反応の過剰な暴走を止めるために働いているが, 担癌患者ではしばしばこの負の経路が優位になっている場合が多いとされている。現在有望なのは抗 CTLA-4 抗体で, 制御性 T 細胞の機能にも関連するといわれるこの分子を阻害することで抗腫瘍免疫が活性化することが期待されている<sup>9)</sup>。事実, 単独投与でも有効例が報告されており, またペプチドワクチンとの併用療法での初期臨床試験が終了しており, 現在大規模試験が欧米で進行中である<sup>10)</sup>。副作用の点では, T 細胞免疫を非特異的に活性化すると起こりやすい腸炎 (下痢, 下血) が程度の差はあれ, ほぼ必発する。腸管穿孔をはじめとする重症副作用を併発する例が初期には認められたが, 現在は容量の適正な設定で安全に使用できるようになっている。PD-1 と PD-L1 の結合も同様に負のシグナルを伝えるが, この結合を阻害する製剤がリンパ腫領域で臨床試験され<sup>10)</sup>, 有効例の報告があり, 今後適応が拡大する可能性がある。

### 標的細胞の検討

再生医療で脚光を浴びる幹細胞であるが, 癌の領域にも幹細胞 (cancer stem cell) または原始細胞 (initiating cell) が注目されている。癌は, ごく少数の幹細胞の性質を持った細胞から生じると考えられ, その他大勢のがん細胞を治療により撃退しても, がん幹細胞が残れば再発, 転移するという考え方である。幹細胞は, 抗原や MHC などの発現を押さえて, 免疫システムから逃避しているが, 特異的なマーカーを発現している。そのなかには ABCB5, CD133 (Prominin-1), PAX3 などが候補としてあげられており, ABCB5 に関してはこの分子を標的とした免疫療法の効果が期待されている<sup>11)</sup>。一方, 局所で増殖したがん細胞が転移を起こすときに, 上皮-間葉転換 (epithelial mesenchymal transition: EMT) と呼ばれる形質転換を生じることが知られている。この形質転換によってがん細胞自体の性質変化とともに, 免疫抑制を誘導するメカニズムも同時に発動されることが示唆されており, この EMT を誘導する蛋白 (snail, SPARC など) が新たな免疫療法のターゲットとなる可能性がある<sup>12)</sup>。

### 分子標的療法の可能性, 併用

各種悪性腫瘍に対して, その生物学的な発癌メカニズムの解析により, 様々な分子標的療法が開発されている。メラノーマでは, 分化において重要な役割をはたしている *c-kit* に関して, 遺伝子変異は少ないとされていた。しかし, 近

年の詳細な検討により、欧米人に多い表在拡大型では *c-kit* 変異は少なく、BRAF/NRAS の変異が多いのに対して、末端黒子型や粘膜型では、その逆の傾向がみられることが明らかとなった<sup>13)</sup>。すなわち、*c-kit* 変異に対し有効性を示すチロシンキナーゼ阻害剤がメラノーマに有効である可能性が出てきた。事実、有効例の報告がある<sup>14)</sup>が、無効例の報告もあり、症例の選択には、単に *c-Kit* の過剰発現だけではなく、遺伝子変異を確実に検出する必要があるであろう。また、一方でチロシンキナーゼ阻害剤そのものが、Treg や腫瘍関連マクロファージの誘導を抑制し、抑制性サイトカインの産生を抑制し、免疫抑制状態の是正に貢献するという報告<sup>15)</sup>もあり、今後適応がますます拡大する可能性がある。

## まとめ

樹状細胞単独療法における治療効果は限られていることが判明した。Rosenberg らの治療法は魅力的だが、どこでもできる治療ではなく、またリスクも大きい。彼らの成功例をもとに、免疫抑制状態を是正し、メラノーマを克服したいと世界中の臨床医が願っている。

## 文 献

- 1) Van den Eynde BJ, Boon T : Tumor antigens recognized by T lymphocytes. *Int J Clin Lab Res*, 27 : 81-86, 1997
- 2) Rosenberg SA, Yang JC, Rwtstifo NP : Cancer immunotherapy : moving beyond current vaccines. *Nat Med*, 10 : 909-915, 2004
- 3) Dudley ME, Wunderlich JR, Robbins PF, et al : Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. *Science*, 298 : 850-854, 2002
- 4) Dudley ME, Wunderlich JR, Yang JC, et al : Adoptive cell transfer therapy following non-myeloablative but lymphodepleting chemotherapy for the treatment of patients with refractory metastatic melanoma. *J Clin Oncol*, 23 : 2346-2357, 2005
- 5) Nestle FO, Alijagic S, Gilliet M, et al : Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat Med*, 4 : 328-332, 1998
- 6) Engell-Noerregaard L, Hansen TH, Andersen MH, et al : Review of clinical studies on dendritic cell-based vaccination of patients with malignant melanoma : assessment of correlation between clinical response and vaccine parameters. *Cancer Immunol Immunother*, 58 : 1-14, 2009
- 7) Attia P, Maker AV, Haworth LR, et al : Inability of a fusion protein of IL-2 and diphtheria toxin (Denileukin Diftitox, DAB389IL-2, ONTAK) to eliminate regulatory T lymphocytes in patients with melanoma. *J Immunother*, 28 : 582-592, 2005
- 8) Mahnke K, Schönfeld K, Fondel S, et al : Depletion of CD4+CD25+ human regulatory T cells in vivo : kinetics of Treg depletion and alterations in immune functions in vivo and in vitro. *Int J Cancer*, 120 : 2723-2733, 2007
- 9) Peggs KS, Quezada SA, Korman AJ, et al : Principles and use of anti-CTLA4 antibody in human cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol*, 18 : 206-213, 2006
- 10) Dougan M, Dranoff G : Immune therapy for cancer. *Annu Rev Immunol*, 27 : 83-117, 2009
- 11) Schatton T, Murphy GF, Frank NY, et al : Identification of cells initiating human melanomas. *Nature*, 451 : 345-349, 2008
- 12) Kudo-Saito C, Shirako H, Takeuchi T, et al : Cancer metastasis is accelerated through immunosuppression during Snail-induced EMT of cancer cells. *Cancer Cell*, 15 : 195-206, 2009
- 13) Fecher LA, Cummings SD, Keefe MJ, et al : Toward a molecular classification of melanoma. *J Clin Oncol*, 25 : 1606-1620, 2007
- 14) Hodi FS, Friedlander P, Corless CL, et al : Major response to imatinib mesylate in KIT-mutated melanoma. *J Clin Oncol*, 26 : 2046-2051, 2008
- 15) Ozao-Choy J, Ma G, Kao J, et al : The novel role of tyrosine kinase inhibitor in the reversal of immune suppression and modulation of tumor microenvironment for immune-based cancer therapies. *Cancer Res*, 69 : 2514-2522, 2009

## EL26—3 皮膚悪性腫瘍のトピックス

### 化学療法：新しい投与方法

#### —動注と外用—

師井 洋一

#### はじめに

化学療法はすべてのがん治療において中心的な役割をはたしている治療法である。近年、血管内治療の適応が広まり、選択的動注化学療法が注目を浴びている。従来から施行されて一般的な肝臓腫瘍に対する治療から、頭頸部、骨盤内、消化器にいたるまでその適応が広がっている。我々は、一期的な手術療法での治療が困難と考えられる SCC 症例を中心に、放射線科の協力のもと、選択的動注化学療法を施行した。症例を供覧するとともに、その長所、問題点を概説する。

また、新規外用治療薬イミキモドは樹状細胞などの免疫担当細胞に作用して局所に大量のインターフェロンを誘導する。現時点では、尖圭コンジローマにのみ適応をもっているが、その作用機序を考えると大きな可能性をもった薬剤である。我々は、数例の前癌病変(汗孔角化症・放射線角化症)に対し、患者さんの同意を得て、イミキモド外用を試行してみた。症例を供覧し、5FU 軟膏との比較や、特別な問題点の少ないこの治療法について紹介する。

#### 選択的動注化学療法

動注化学療法は静脈投与による全身投与に比べ、数倍から数百倍の局所濃度を達成する事が可能で、頭頸部、肝臓を中心に骨盤内、消化管などその適応は拡大している。1970年にはカテーテル技術の向上により、選択的動注化学療法が報告され<sup>1)</sup>、1992年には頭頸部癌に対する高容量シスプラチン動注療法が極めて高い有効性を示す<sup>2)</sup>と、選択的動注化学療法が広く施行されるようになった。この治療法の利点は、局所制御に優れる事で、皮膚科領域でも再発の可能性の高い症例や、機能的整容的に再建が困難とも考えられる症例など適応は比較的多いと考えられる。

症例を供覧する。症例1：68歳女性。4年前より右臀部に腫瘍が出現、3カ月前より潰瘍化し、右鼠径部にも腫脹が出現。右会陰部に12×10cmの大きな紅色腫瘍を認め、右鼠径部には10cm大のリンパ節腫大を認めた(共に有棘細胞癌 SCC, 図1)。全身検索では遠隔転移、骨盤内リンパ節転移を疑わせる所見を認めなかった。一期的手術では再発の可能性が高いと考え、術前に化学療法と放射線療法の併用を計画し、血管造影検査で、原発巣、転移リンパ節ともに、明らかな tumor stain を認め、動注化学療法可能と判断された。治療開始後100日頃には腫瘍は消失し(図1)、122日目に行った手術での切除組織には病理学的にも原発巣、リンパ節とも腫瘍細胞の残存を認めなかった。有害事象は動注化学療法後10日目前後で grade 3~4 の骨髄抑制、および投与直後からの grade1 の吐気を認めたのみであった。

動注化学療法の適応は遠隔転移がなく、腫瘍の栄養血管が同定できる症例となっている。皮膚 SCC では pT3 以上(径5cmよりも大きい)の大きな原発巣が対象となりそうである。放射線療法との併用、特に放射線感受性をあげる薬剤(白金製剤、タキサン系など)との併用において、奏率が向上する事が判明している。その他、縮小手術が可能になり、QOL 低下を最小限にとどめること(顔面部の変形、四肢の切断、肛門周囲の人工肛門造設等)、腫瘍の活動性を低下させ、手術中の腫瘍播種を抑制することなどが利点としてあげられる。欠点は、放射線治療+手術となるため、治療期間が長期となり、数カ月から半年となる場合もある。また、治療の影響で、切除後の肉芽形成が遷延し、植皮術まで2カ月要した症例もあった。

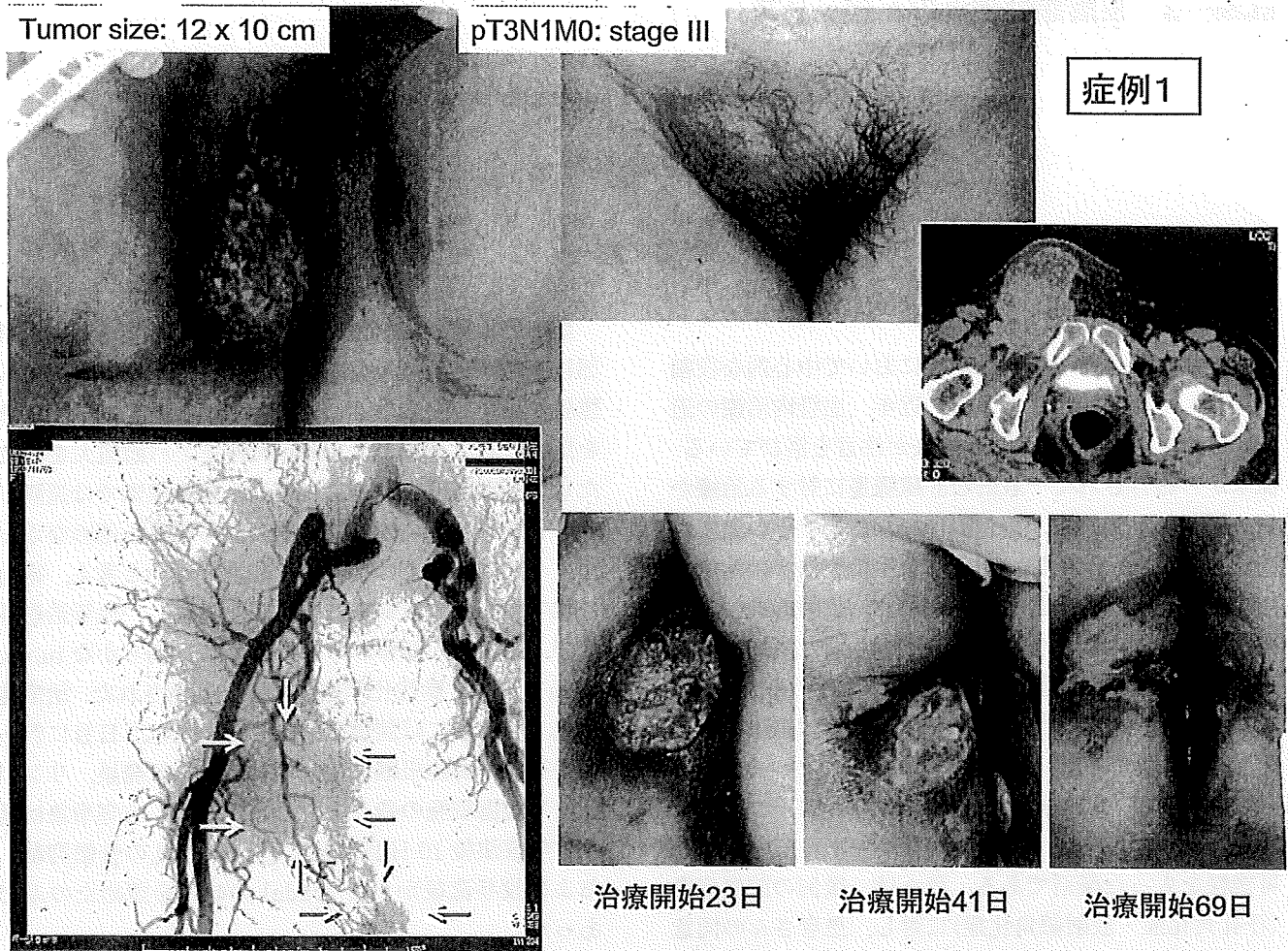
#### イミキモド外用

イミキモド imiquimod はイミダゾキノリン類に属する低分子化学合成物質であり、樹状細胞などに発現している Toll like receptor (TLR)-7 に直接結合し、シグナルを伝えることによって、様々なサイトカインを誘導し自然免疫を活性化する。本邦では平成19年末、

九州大学大学院医学研究院皮膚科学分野

著者連絡先：(〒812-8582)福岡市東区馬出3-1-1

九州大学大学院医学研究院皮膚科学分野 師井 洋一



症例1

図 1

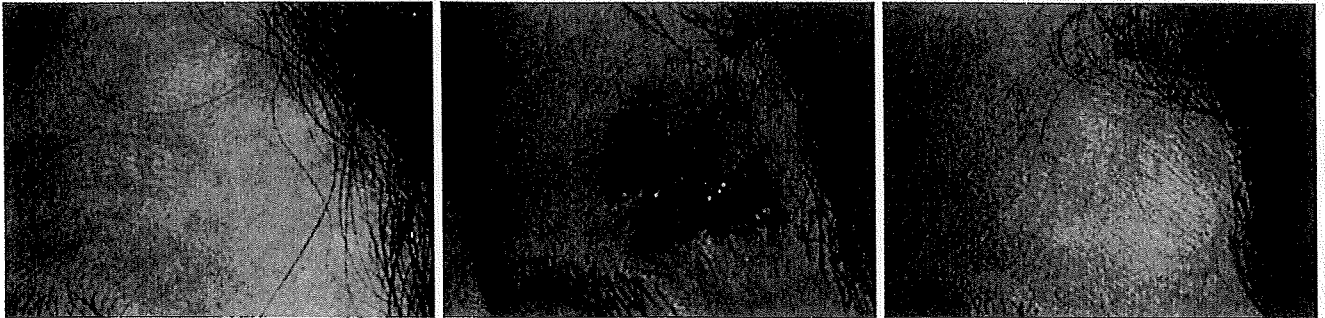
症例1：68歳女性。右会陰部の12×10cm紅色腫瘍と右鼠径部の10cm大のリンパ節腫大。血管造影で明らかな tumor stain (→) を2カ所(上：リンパ節，下：原発巣)認め、放射線併用、動注化学療法を施行した。放射線療法としてX線：61Gy(前後対向二門)，電子線：8Gy(前一門)，total = 69Gy。動注化学療法：CA療法：CDDP 65mg/m<sup>2</sup> + DXR 30mg/m<sup>2</sup> one shot, 第1回 day 11, 第2回 day 51。外陰部動脈分岐直前の main feeder と内陰部動脈へ1:1で注入。治療開始後、腫瘍は急速に縮小し、100日頃には腫瘍は消失し、122日に行った手術での切除組織には病理学的にも原発巣、リンパ節とも腫瘍細胞の残存を認めなかった。有害事象は、予想されたもので、軽度であった。

ベセルナクリーム5%®として尖圭コンジローマ治療薬として販売開始された。その特徴的な作用機序から、コンジローマの他、表在型基底細胞癌、日光角化症、ボーン病など表在性の皮膚悪性腫瘍でも有効性が認められつつある。事実、欧米では表在型基底細胞癌、日光角化症が適応疾患として追加承認されている。

われわれも日光角化症における有効例を経験しているが、その他の疾患に対するイミキモド有効例を紹介する。症例2は64歳男性。10年前より左前額部に環状

紅斑。徐々に拡大。生検で汗孔角化症の診断。ステロイド、ビタミンD3、トレチノイン外用や、Q-switchルビーレーザー治療にも軽快せず。同意を得た上で、5%イミキモドクリームを週3回、就寝前に外用し、翌朝洗顔していただいた(図2上)。外用開始2週間にはびらんとなり、血痂を付着していた。ヒリツキはあるものの外用続行には問題なかった。外用は4週間で終了し、その2週間には上皮化した。治療終了2年経過するが、再発は認めない。

## 症例2



治療開始前

治療開始14日

治療終了1年

## 症例3



治療開始前

治療終了2ヶ月

図 2

症例2: 64歳男性. 左前額部に各種治療に抵抗性の環状紅斑(汗孔角化症). 5%イミキモドクリームを週3回4週外用. 外用開始2週後にはびらんとなり, 血痂を付着していた(右上). ヒリツキはあるものの外用続行には問題なかった. 治療終了2年, 再発なし.

症例3: 83歳男性. 外科開業医で, 50年前より素手で胃透視などを施行. 28年前より手指に多数の角化性紅斑, 丘疹が出現, 当科で切除植皮を施行. 植皮部辺縁から再度, 角化性紅斑, 丘疹が出現. 外用は週3回4週間で, 落屑, 角化が著明に改善した(第4指爪囲, DIP部).

症例3は83歳男性. 外科開業医で, 50年前より素手で胃透視などを施行してきた. 28年前より手指に多数の角化性紅斑, 丘疹が出現. 当科で放射線角化症(SCC in situ), SCCの診断で切除植皮を施行. 植皮部辺縁から再度, 角化性紅斑が出現. 同意を得て, イミキモド外用を行った. 週3回4週間外用で, 落屑, 角化が著明に改善した(図2下).

イミキモド外用療法は, 大型や, 多発する日光角化症など表在型皮膚悪性腫瘍の治療において, 十分有効な選択肢となりうる. しかしながら, 外用時の強い皮膚反応は必発であり, またこの反応が起きなければ治

療効果が低いことなど, 事前の患者への十分な説明が必要である. 従来の治療法(凍結療法, 5FU軟膏)との比較を論じた報告<sup>3)</sup>では, 明らかに凍結療法よりも奏効率, 再発率, 整容面で優れており, 5FU軟膏との比較でも, イミキモドは臨床的奏効率で同等だったが, 再発率で優れていた. ただ临床上, 最も留意すべきことは, 病理学的完全消失率はイミキモドですら50~70%(日光角化症)しかなく, 決して高くないことである. 臨床的な皮疹消失率は高い(80~90%程度)が, 病理学的な検索では上記程度の奏効率しかないことを常に念頭に置き, 患者にも説明することが重要である.

それは、今回紹介した表在型皮膚腫瘍でも同様である。現在、日光角化症に対する臨床試験が開始、施行されており、本邦での試験結果が待たれるところである。

#### おわりに

動注化学療法は、症例を選択する事で、貴重なオプションになりうると思われる。今後も、症例の蓄積、前向きな検討が望まれる。

イミキモドは現時点では、尖圭コンジローマ治療薬であり、その他の皮膚腫瘍に用いる場合はすべて適応外使用となることに留意すべきである。安易な使用は

慎むべきで、使用する場合は、十分な説明と同意を取得したうえで治療し、また、治療後も定期的な診察と、患者教育(再発時の皮疹について説明し、セルフチェックを指導)が必須である。

謝辞：動注化学療法においてご協力いただきました、九州大学大学院医学研究院臨床放射線科の本田浩教授をはじめ、吉武忠正先生、藪内英剛先生、坂井修二先生に深謝致します。

#### 文 献

- 1) Andersson T, Andréasson L, Björklund A, et al: Intra-arterial chemotherapy of malignant head and neck tumours with superselective angiographic technique, *Acta Otolaryngol Suppl*, **360**: S167-170, 1979.
- 2) Robbins KT, Storniolo AM, Kerber C, et al: Rapid superselective high-dose cisplatin infusion for advanced head and neck malignancies, *Head Neck*, **14**: 364-371, 1992.
- 3) Krawtchenko N, Roewert-Huber J, Ulrich M, et al: A randomised study of topical 5% imiquimod vs. topical 5-fluorouracil vs. cryosurgery in immunocompetent patients with actinic keratoses: a comparison of clinical and histological outcomes including 1-year follow-up, *Br J Dermatol*, **157**(suppl 2): S34-S40, 2007.

## Activation of the mammalian target of rapamycin signalling pathway in epidermal tumours and its correlation with cyclin-dependent kinase 2

S.-J. Chen,\*† T. Nakahara,\* M. Takahara,\* M. Kido,\* L. Dugu,\* H. Uchi,\* S. Takeuchi,\* Y.-T. Tu,† Y. Moroi\* and M. Furue\*

\*Department of Dermatology, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, Maidashi 3-1-1, Higashiku, Fukuoka 812-8582, Japan

†Department of Dermatology, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, China

### Summary

#### Correspondence

Takeshi Nakahara.

E-mail: nakahara@dermatol.med.kyushu-u.ac.jp

#### Accepted for publication

13 August 2008

#### Key words

AKT, cyclin-dependent kinase 2, epidermal tumour, mammalian target of rapamycin

#### Conflicts of interest

None declared.

DOI 10.1111/j.1365-2133.2008.08903.x

**Background** The enzyme mammalian target of rapamycin (mTOR) integrates many different cellular signals to control cell growth and proliferation, protein synthesis and breakdown, and other processes. Dysregulation of mTOR is implicated in a range of human diseases, including cancers and cardiovascular disorders. To date, there has been no report on the expression of protein kinase B (AKT)/mTOR cell signalling in epidermal tumours.

**Objectives** This study was designed to investigate the activation of the mTOR signalling pathway in epidermal tumours and to correlate this with cyclin-dependent kinase 2 (CDK2) expression.

**Methods** Immunohistological staining was performed with phosphorylated (p-) AKT, p-mTOR, p-4E-binding protein 1 (p-4EBP1), p-ribosomal protein S6 (p-S6), p-p70 ribosomal protein S6 kinase 1 (p-p70S6K1) and CDK2 in 15 cases each of seborrhoeic keratosis, actinic keratosis, keratoacanthoma and Bowen's disease (BD), and 25 cases of squamous cell carcinoma (SCC). Fifteen normal skin (NS) samples served as control.

**Results** Among 85 tumours, 40 (47%) were positive for p-AKT, 31 (36%) for p-mTOR, 44 (52%) for p-4EBP1, 38 (45%) for p-S6, and 39 (46%) for p-p70S6K1. CDK2 immunostaining was positive in all cases of SCC and BD, and in 67% of benign tumours. All of these markers were stained much more frequently in malignant tumours than in benign tumours or NS. p-AKT, p-mTOR, p-4EBP1, p-p70S6K1 and p-S6 each showed high correlation with CDK2.

**Conclusions** Constitutive activation of the AKT/mTOR pathway was frequent in epidermal tumours, especially in malignant tumours. Activation was highly correlated with CDK2 expression, suggesting that the AKT/mTOR pathway may induce the malignant transition through CDK2 in epidermal tumours.

Mammalian target of rapamycin (mTOR) is a ubiquitously expressed serine/threonine kinase that affects a number of cellular functions, including protein synthesis and cell proliferation.<sup>1</sup> mTOR is a key component of the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) and protein kinase B (AKT) pathways that activate downstream kinases required for G<sub>1</sub> to S phase transition.<sup>2</sup> Cumulative evidence supports the hypothesis that mTOR acts as a master switch of cellular catabolism and anabolism, thereby determining whether cells, in particular tumour cells, grow and proliferate.<sup>2-4</sup> mTOR acts by directly activating p70 ribosomal protein S6 kinase 1 (p70S6K1) and inhibiting 4E-binding protein 1 (4EBP1). p70S6K1 phosphorylates the

S6 protein of the 40S ribosomal subunit [phosphorylated (p-) ribosomal protein S6 (p-S6)] at several sites leading to initiation of protein synthesis.<sup>5</sup> 4EBP1 is a translational repressor that negatively regulates the eukaryotic initiation factor 4E/4G (eIF-4E/G) complex by modulating phosphorylation of the involved proteins.<sup>6</sup> There are also increasing data that indicate that mTOR is frequently activated in many cancers as a result of alterations in the PI3K/AKT pathway and thus presents a potential therapeutic target.<sup>2,7</sup> Several inhibitors of mTOR are in clinical trials; AP23573 is one of them and has demonstrated potent antitumour activity in nonclinical and early clinical studies.<sup>8,9</sup>



Recently, molecules involved in cell-cycle regulation such as cyclins, cyclin-dependent kinases (CDKs) and CDK inhibitors have been attracting considerable attention as potential prognostic indicators.<sup>7,8</sup> CDK2 is considered to play an important role in cell proliferation and is expected to be associated with tumour aggressiveness and a poor prognosis.<sup>10,11</sup>

Because few studies have evaluated the role of these molecules in skin cancers, we evaluated these cell signalling pathways in a large series of epidermal tumours.

## Materials and methods

### Tissue samples

We identified 15 cases each of Bowen's disease (BD), keratoacanthoma (KA), actinic keratosis (AK) and seborrhoeic keratosis (SK), and 25 cases of squamous cell carcinoma (SCC). All formalin-fixed and paraffin-embedded tissues were obtained from the archives of the Department of Dermatology in Kyushu University Hospital, Japan. Clinical and demographic data were retrieved from the patient files, and two dermatologists

reviewed all cases. The paraffin-embedded tissues were evaluated by haematoxylin and eosin staining. Fifteen normal skin (NS) specimens served as normal controls.

### Immunohistochemistry

All samples were dealt with as in a previous study.<sup>12</sup> The sections were then incubated with antibodies against p-AKT (Ser473; 1 : 50), p-mTOR (Ser2448; 1 : 50), p-p70S6K1 (Thr421/Ser424; 1 : 200), p-S6 (1 : 100), p-4EBP1 (Ser65; 1 : 200) (all from Cell Signaling Technology, Beverly, MA, U.S.A.) and CDK2 (ready to use; Abcam, Cambridge, U.K.) at 4 °C overnight. Appropriate positive and negative controls were included in each assay.

### Statistical analysis

Statistical analysis using the Student's *t*-test was performed to determine whether there was a significant difference in expression of p-AKT, p-mTOR, p-p70S6K1, p-S6, p-4EBP1 and CDK2 among the six different sets of specimens.

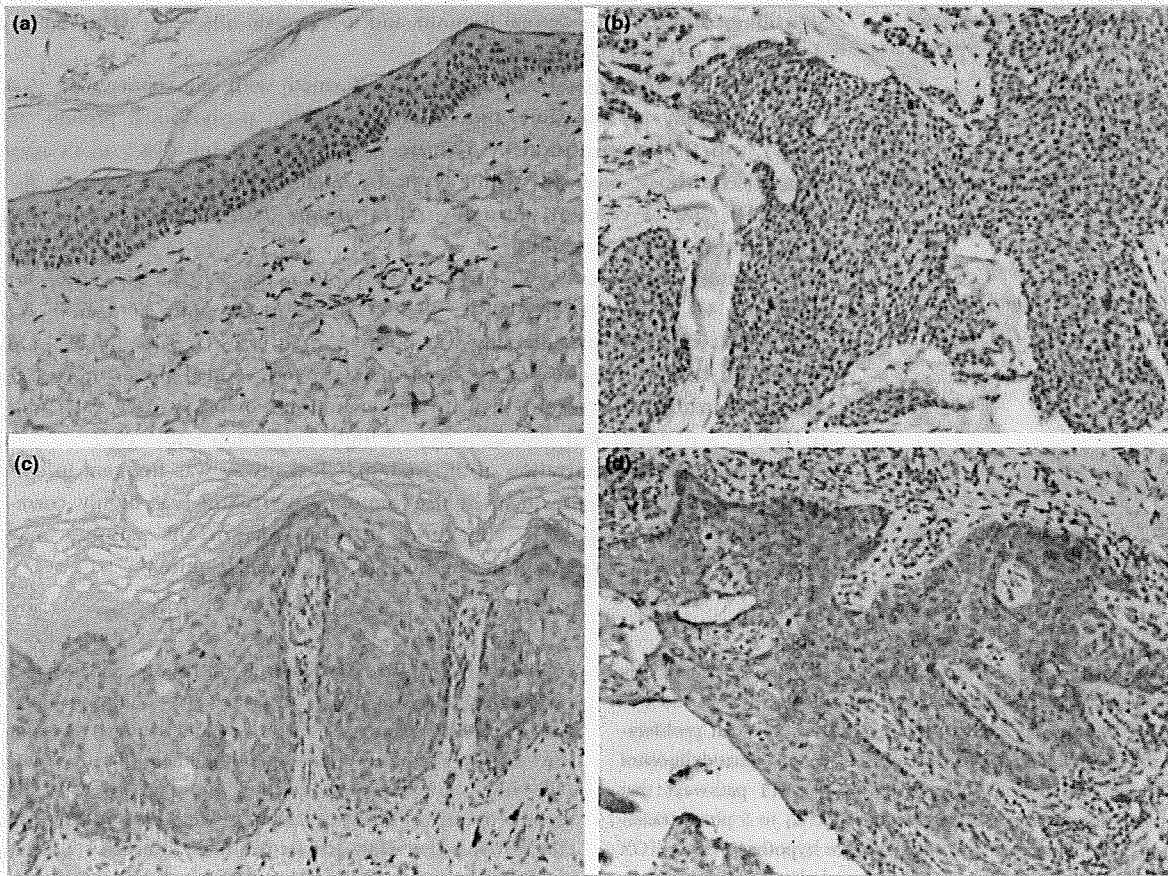


Fig 1. Immunohistochemical staining for phosphorylated protein kinase B (p-AKT) and phosphorylated mammalian target of rapamycin (p-mTOR) in skin tumours. p-AKT was negative in normal skin (a) but showed strong nuclear and cytoplasmic positivity in squamous cell carcinoma (SCC). (b) p-mTOR showed moderate cytoplasmic expression in Bowen's disease (c) and strong cytoplasmic expression in SCC (d). Original magnification: (a–d)  $\times 200$ .

Table 1 The expression of p-AKT, p-mTOR, p-4EBP1, p-S6, p-p70S6K1 and CDK2 in epidermal tumours

Group	n	p-AKT				p-mTOR				p-4EBP1				p-S6				p-p70S6K1				CDK2			
		-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++
NS	15	15	0	0	0	15	0	0	0	12	3	0	0	15	0	0	0	14	1	0	0	10	5	0	0
SK	15	13	2	0	0	13	2	0	0	12	2	1	0	14	1	0	0	13	2	0	0	7	7	1	0
AK	15	12	3	0	0	13	2	0	0	9	5	1	0	14	1	0	0	12	3	0	0	6	7	2	0
KA	15	11	4	0	0	13	2	0	0	9	4	2	0	10	1	3	11	11	2	2	0	2	9	3	1
BD	15	6	3	4	2	9	3	3	0	7	2	4	2	5	5	3	2	6	2	5	2	0	4	7	4
SCC***	15	3	2	7	3	5	3	3	4	3	2	7	3	2	2	7	4	4	3	4	4	0	3	6	6
SCC-M***	10	0	2	4	4	1	2	4	3	1	3	4	2	2	2	4	2	0	3	3	4	0	2	3	5

p-, phosphorylated; AKT, protein kinase B; mTOR, mammalian target of rapamycin; 4EBP1, 4E-binding protein 1; S6, ribosomal protein S6; p70S6K1, p70 ribosomal protein S6 kinase 1; CDK2, cyclin-dependent kinase 2; NS, normal skin; SK, seborrhoeic keratosis; AK, actinic keratosis; KA, keratoacanthoma; BD, Bowen's disease; SCC, squamous cell carcinoma without metastasis; SCC-M, squamous cell carcinoma with metastasis. After immunohistochemical staining, three high-power field images (HPFs,  $\times 200$ ) were randomly selected in each specimen, 100 tumour cells were counted in each field, and the mean percentage of positive cells for each staining from the three HPFs was calculated. Expression levels were graded semiquantitatively as negative (-), weak (+), moderate (++) or strong (+++), when tumour cells were positive at 0%, 1–20%, 21–50% or > 50%, respectively. \*\*\* $P < 0.001$  vs. NS, SK, AK, KA and BD.

Correlations among them were assessed by Pearson's correlation coefficient analysis.  $P < 0.05$  was considered to be statistically significant.

## Results

### Expression of components of the protein kinase B/mammalian target of rapamycin signalling pathway in epidermal tumours

In the NS specimens, immunohistochemical staining of p-AKT and p-mTOR was negative (Fig. 1a). Forty (47%) of 85 epidermal tumours were positive for p-AKT (Table 1), and the percentage of positive cells or the intensity of staining of p-AKT was significantly higher in BD or SCC (Fig. 1b) than in AK, SK or KA ( $P < 0.001$ ). The rate of positive p-AKT staining was significantly higher in SCC than in BD ( $P = 0.001$ ) and the rate was also higher in SCC with metastasis (SCC-M) than in SCC without metastasis ( $P < 0.05$ ). p-mTOR was positive in 31 (36%) of all epidermal tumour specimens (Table 1). The percentage of positive cells or the staining intensity of p-mTOR was significantly higher in BD (Fig. 1c) and SCC (Fig. 1d) than in AK, SK or KA ( $P < 0.001$ ). The rate of positive mTOR staining was also significantly higher in SCC than in BD ( $P < 0.001$ ), but there was no significant difference between SCC-M and SCC without metastasis ( $P > 0.05$ ). With regard to downstream effectors, the percentage of positive cells or the expression intensity of p-4EBP1, p-p70S6K1 and p-S6 was also significantly higher in BD or SCC than in SK, AK or KA ( $P < 0.001$ , Table 1).

### Cyclin-dependent kinase 2 expression in epidermal tumours

In five NS specimens, immunohistochemical staining of CDK2 showed weak nuclear positivity. It was also expressed in the

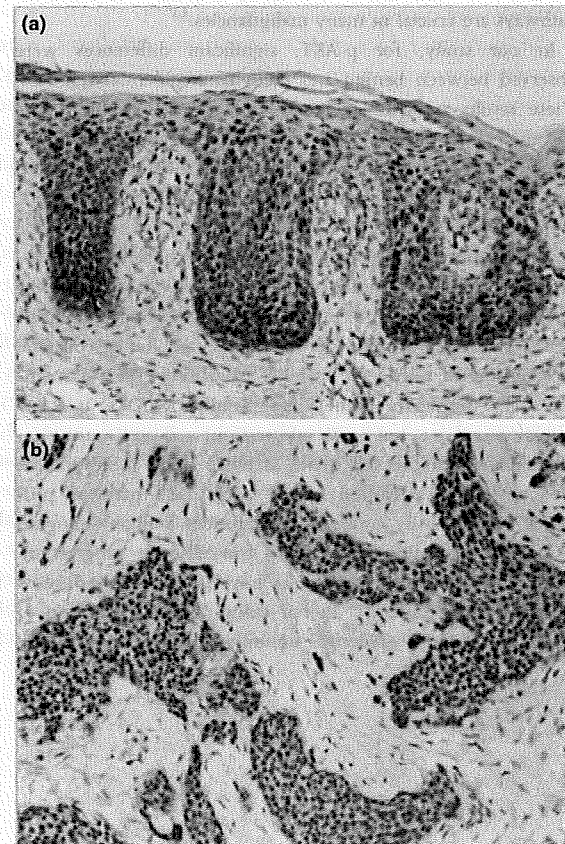


Fig 2. Immunohistochemical staining for cyclin-dependent kinase 2 (CDK2) in skin tumours. CDK2 showed moderate nuclear staining in Bowen's disease (a) and strong nuclear and cytoplasmic staining in squamous cell carcinoma (b). Original magnification: (a, b)  $\times 200$ .

nucleus in all the SCCs and BDs, and in 67% of benign tumours. Cytoplasmic staining was also observed in 10 malignant tumours. Benign tumours showed only weak CDK2 positivity and expression was significantly lower than in BD (Fig. 2a) or SCC (Fig. 2b) ( $P < 0.001$ ). CDK2 was increasingly detectable in SCC with tumour penetration and metastasis, but there was no significant difference between SCC-M and SCC without metastasis ( $P > 0.05$ ).

Statistical analysis revealed significant correlations between positivity of p-AKT and CDK2 ( $r = 0.805$ ,  $P = 5.926 \times 10^{-24}$ ), p-mTOR and CDK2 ( $r = 0.760$ ,  $P = 6.885 \times 10^{-20}$ ), p-4EBP1 and CDK2 ( $r = 0.893$ ,  $P = 6.885 \times 10^{-20}$ ), p-p70S6K1 and CDK2 ( $r = 0.889$ ,  $P = 6.192 \times 10^{-35}$ ), and p-S6 and CDK2 ( $r = 0.882$ ,  $P = 7.225 \times 10^{-34}$ ).

## Discussion

Study of the signalling pathways involved in cell growth, cell cycle and apoptosis has contributed greatly to our understanding of the molecular mechanisms of carcinogenesis in human tumours. The interest in this line of study is further enhanced when there are potential or known therapeutic targets involved or prognostic factors to therapy. These signalling pathways are crucial in many malignancies.<sup>13</sup>

In our study, for p-AKT, significant differences were observed between benign and malignant epidermal tumours. These results are consistent with our previous report.<sup>12</sup> The percentage of positive cells or the expression intensity of p-mTOR and the downstream effectors 4EBP1, p70S6K1 and p-S6 was also significantly higher in malignant epidermal tumours. Phosphorylation of 4EBP1 can be the consequence of several oncogenic events along these biochemical routes, including amplification or mutation of growth factor receptors, loss of function, or mutations in PTEN, phosphoinositide 3-kinase mutations, Ras mutations, and other collateral mechanisms of oncogenic cellular activation. CDK2, a member of the serine/threonine kinase family of CDKs, is a key regulator of G<sub>1</sub>-S cell cycle progression, activated during G<sub>1</sub> and S phases of the cell cycle. Maddika *et al.*<sup>14</sup> showed that the constitutive activation of the AKT/CDK2 pathway promotes apoptosis. By contrast, the transient and physiological AKT/CDK2 activation is necessary for cell-cycle progression. CDK1 and CDK2 also may act as novel prognostic indicators for early breast cancer.<sup>15</sup> In our study, higher expression of CDK2 in malignant epidermal tumours and a high correlation

with the AKT/mTOR pathway suggest that CDK2 may act as a novel target for AKT/mTOR during skin carcinogenesis. Interestingly, activation of the AKT/mTOR pathway and of CDK2 was significantly higher in SCC than in KA in our study. This may provide a clue to study the distinction between KA and SCC.

## References

- 1 Bjornsti M, Houghton PJ. The TOR pathway: a target for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2004; 4:335-8.
- 2 Rowinsky EK. Targeting the molecular target of rapamycin (mTOR). *Curr Opin Oncol* 2004; 16:564-75.
- 3 Takano A, Usui I, Haruta T *et al.* Mammalian target of rapamycin pathway regulates insulin signaling via subcellular redistribution of insulin receptor substrate 1 and integrates nutritional signals and metabolic signals of insulin. *Mol Cell Biol* 2001; 21:5050-62.
- 4 Panigrahi AR, Pinder SE, Chan SY *et al.* The role of PTEN and its signalling pathways, including AKT, in breast cancer; an assessment of relationships with other prognostic factors and with outcome. *J Pathol* 2004; 204:93-100.
- 5 Dufner A, Thomas J. Ribosomal S6 kinase signaling and the control of translation. *Exp Cell Res* 1999; 253:100-9.
- 6 Sarbassov DD, Sabatini DM. Redox regulation of the nutrient-sensitive raptor-mTOR pathway and complex. *J Biol Chem* 2005; 280:39505-9.
- 7 Petroulakis E, Mamane Y, Bacquer OL *et al.* mTOR: implications for cancer and anticancer therapy. *Br J Cancer* 2006; 94:195-9.
- 8 Colozza M, Azambuja E, Cardoso F *et al.* Proliferative markers as prognostic and predictive tools in early breast cancer: where are we now? *Ann Oncol* 2005; 16:1723-39.
- 9 Kuhling H, Alm P, Olsson H *et al.* Expression of cyclins E, A, and B, and prognosis in lymph node-negative breast cancer. *J Pathol* 2003; 199:424-31.
- 10 Sutherland RL, Musgrove EA. Cyclins and breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2004; 9:95-104.
- 11 Lee M-H, Yang H-Y. Regulators of G1 cyclin-dependent kinases and cancers. *Cancer Metast Rev* 2003; 22:435-49.
- 12 Liu H, Moroi Y, Yasumoto S *et al.* Expression of insulin-like growth factor-1 receptor, p-AKT and p-ERK1/2 protein in extramammary Paget's disease. *Br J Dermatol* 2006; 155:586-91.
- 13 Tee AR, Blenis J. mTOR, translational control and human disease. *Semin Cell Dev Biol* 2005; 16:29-37.
- 14 Maddika S, Ande SR, Wiechec E *et al.* Akt-mediated phosphorylation of CDK2 regulates its dual role in cell cycle progression and apoptosis. *J Cell Sci* 2008; 121:979-88.
- 15 Kim SJ, Nakayama S, Miyoshi Y *et al.* Determination of the specific activity of CDK1 and CDK2 as a novel prognostic indicator for early breast cancer. *Ann Oncol* 2008; 19:68-72.

## Correspondence

### Stromal cell-derived factor 1 expression in various skin tumours

DOI: 10.1111/j.1365-2133.2008.08996.x

SIR, Stromal cell-derived factor 1 (SDF-1 or CXCL12) was initially cloned from bone marrow stromal cells.<sup>1</sup> SDF-1 is widely expressed in various organs including heart, liver, brain, kidney, skeletal muscle and lymphoid organs. Vascular endothelial cells, stromal fibroblasts and osteoblasts are the major cellular source for SDF-1 in these organs.<sup>2</sup> Since high levels of functional SDF-1 were first reported in human

ovarian cancer<sup>3</sup>, there has been interest in the role of SDF-1 and its receptor, CXCR4, in tumour pathology. Cumulative studies documented a strong correlation between SDF-1 expression and bone marrow and lymph node metastasis of breast<sup>4</sup> and prostate cancer<sup>5</sup> and many other human tumours.<sup>6</sup> With respect to the expression of SDF-1 in skin diseases, we found reports only of increased expression of SDF-1 at wound margins.<sup>7,8</sup> However, no detailed data are available about the expression of SDF-1 in cutaneous neoplasms. In this study, we performed an immunohistochemical analysis of the expression of SDF-1 in a series of cutaneous neoplasms.

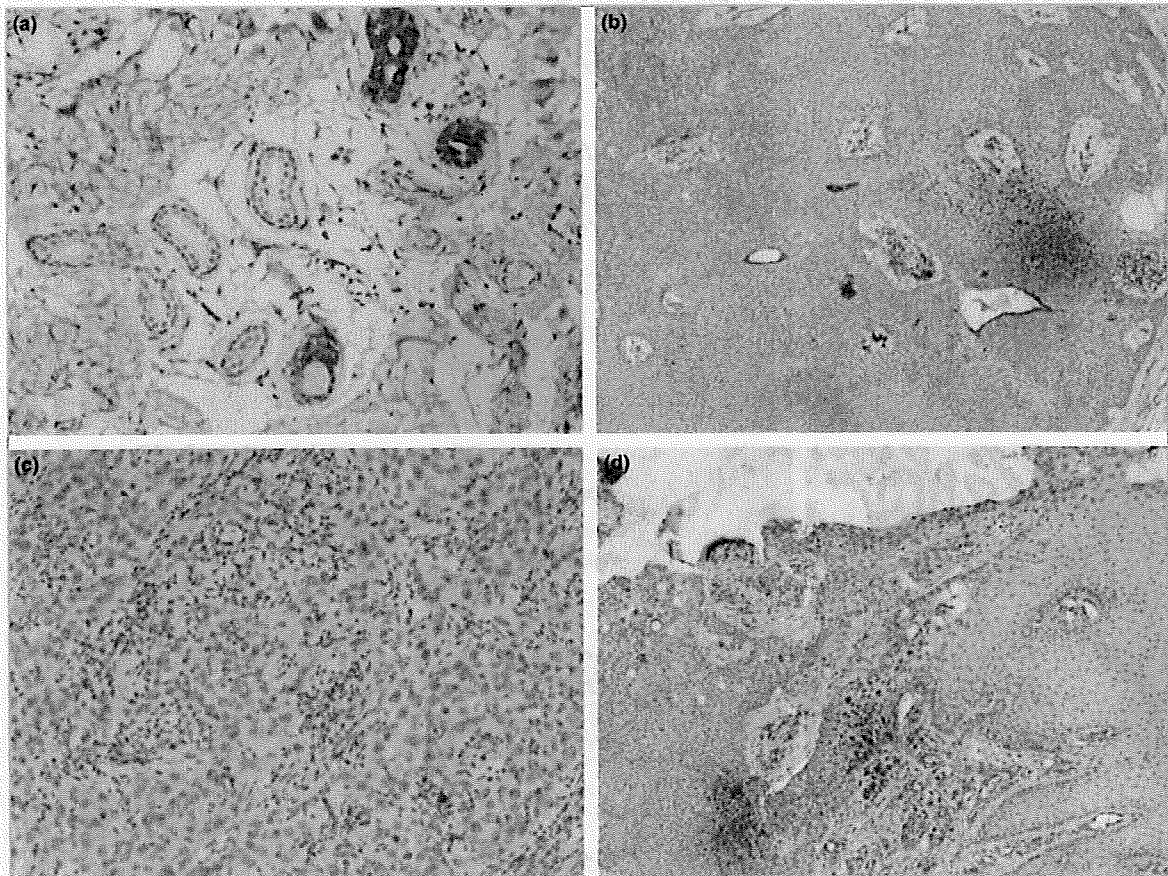


Fig 1. Stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) expression in neoplasms with presumed eccrine differentiation. In human normal skin, the secretory, but not ductal, portion of eccrine glands was strongly positive for SDF-1 (a). All eccrine poromas (b) and eccrine porocarcinomas (c) showed negative SDF-1 expression in tumour cells; however, luminal and periluminal positive staining was detected focally in two poromas (b) and one eccrine porocarcinoma (d).