

岩手医科大学
審査学位論文
(博士)

イミキモド外用による 日光角化症治療の効果予測因子の解析

佐藤隆亮, 高橋和宏

岩手医科大学医学部, 皮膚科学講座

(Received on December 17, 2015 & Accepted on January 22, 2016)

要旨

イミキモドは分子量 240.3Da の合成アミンであり, 強力な抗ウイルス作用, 抗腫瘍効果を持つ. イミキモド外用による日光角化症治療症例 30 例について, その治療効果と患者背景, 治療期間, 表皮直下の浸潤肥満細胞数, 形質細胞様樹状細胞数について検討した. 浸潤肥満細胞は一次抗体に抗 mast cell tryptase を, 形質細胞様樹状細胞は一次抗体に抗 CLEC4C ポリクロナール抗体を用いて免疫染色を ABC with DAB で行った. イミキモド外用の作用機序および動物実験の結果から治療有効例では浸潤肥満細胞数および形質細胞様樹状細胞数が無効例に比し多いことを予測した

が, 浸潤肥満細胞数および形質細胞様樹状細胞数と治療効果に相関はなかった. しかしながら治療効果の有無と治療期間に単変量解析で有意差がみられ, 有効例では治療期間が長いという結果が得られた.

すなわち, 治療期間 8 週で抗腫瘍効果が不完全でも継続塗布することで腫瘍の完全消失が期待できることが示唆された.

さらに, 治療前の日光角化症の浸潤肥満細胞数は少なく, イミキモドによって遊走・集簇した肥満細胞の活性化の程度が効果発現に関与すると考えられた.

Key words : actinic keratosis, imiquimod, mast cell, univariate analysis, multivariate analysis

I. 緒言

日光角化症は中高齢者の日光暴露部に好発する表皮内癌であり, 顔面, 頸部, 耳介, 手背, 禿頭部に好発する. 発症には長期の紫外線暴露によって生じた DNA 損傷とその修復過程の異常が p53 などの癌抑制遺伝子や ras など癌遺伝子の変異をもたらし, さらには紫外線による個体の免疫抑制も関与して発症すると考えられている¹⁾.

イミキモド (imiquimod) は分子量 240.3Da の合成アミンであり, 強力な抗ウイルス作用,

抗腫瘍効果を持つ. 本邦では日光角化症に対するイミキモドの優れた抗腫瘍効果が確認され^{2,3)}, 2011 年には顔面又は禿頭部の日光角化症に対して保険適応が認められている. その抗腫瘍効果は Toll-like receptor (TLR) -7 を介さない直接腫瘍細胞のアポトーシスを誘導する経路⁴⁾と形質細胞様樹状細胞 (plasmacytoid dendritic cell, pDC) の TLR-7 を介して NF- κ B など活性化させ種々の炎症性サイトカインを誘導し抗腫瘍効果を発現する経路⁵⁾が知られている.

また, pDC の表皮直下の真皮への動員にはイミキモドに活性化された肥満細胞からの CCL2 の放出が関与し, 肥満細胞が表出する

Corresponding author: Ryusuke Sato
ikuraisono@hotmail.com

TLR-7を介する免疫反応の誘導に重要な役割を担っていることが報告されている^{4,6)}。

一方, イミキモドの日光角化症の治療効果は完全消失率約50%^{7,8)}あるいは70%²⁾とされている。しかし, 組織型が肥厚型では効果が低く, pDCの欠損マウスでは抗腫瘍効果が発現しない⁵⁾報告があるなど, イミキモド治療が効果を示さない例や治療効果出現までに長期間を要する例が存在するなど, イミキモド外用治療効果の予測因子については明らかにされていない。

今回われわれは肥満細胞のpDC動員に着目し, イミキモド外用の治療効果に真皮内浸潤肥満細胞数が関与しているという仮説のもとに, 日光角化症に対するイミキモド外用の治療効果と肥満細胞やpDC細胞など真皮内浸潤細胞数, 患者背景, イミキモド外用治療期間などを単変量あるいは多変量解析し, 効果予測因子となり得るかを検討した。

II. 研究対象と方法

1. 試験期間と対象

対象は1991年から, 2007年までに当科を受診した顔面皮膚の日光角化症の患者のうち当院で組織標本が保管されているもの30例を対象とし, 後ろ向きに検討した。

患者の個人情報保護に関しては「症例報告を含む医学論文及び学会研究会発表における患者プライバシー保護に関する指針」⁹⁾にのっとり配慮した。

2. 試験部位とイミキモドの使用法

試験部位は効果の解剖学的部位による差が生じないように顔面に生じた日光角化症のみに限定した。イミキモド5%クリーム(ベセルナ5%クリーム, 持田製薬, 日本)は用法用量にのっとり, 治療部位に1日1回, 週3回, 就寝前に塗布した。塗布後はそのままの状態を保ち, 起床後に塗布した薬剤を水または温水で洗い流した。紅斑, びらんが強いもの, 継続期間が長いものに関しては休薬期間をおいて継続可能な

症例では継続し最大22週継続した。

3. 効果判定

イミキモド外用治療の効果判定は基本的には最低4週塗布後およびその後の経過観察による臨床像において紅斑, 角化, 鱗屑, 血管拡張の残存, 再発の有無を視診, 触診で確認し残存, 再発のないものを有効例と判定した。

しかし増大傾向にあるもの, 患者が早期の手術療法を希望したもの, 紅斑, びらんなど副作用のため継続が困難なものに関しては4週間を待たずに治療終了とし効果を判定した。

4. 病理組織学的検索

イミキモド外用前に皮膚生検を施行した。採取した組織は10%ホルマリンで24時間固定した後パラフィン包埋し3 μ mに薄切して標本を作製した。

1) 病型分類

病型分類にはイミキモド外用前のヘマトキシリン・エオジン染色標本を用いて行った。日光角化症の組織型は一般に萎縮型, 肥厚型, Bowen型, 棘融解型, 色素型, 苔癬型の6型に分類されるが, 実際には1つの腫瘍内に複数の組織型が混在することが多い。本研究では日光角化症の主病変部を構成する基本組織型として①萎縮型, ②肥厚型, ③Bowen型, ④棘融解型の4型に分類した。

2) 肥満細胞およびpDCの免疫組織化学的検索

免疫染色はABC with DABで行った。

一次抗体には抗mast cell tryptase (mouse) (クローン;AA1, IMGENEX社, IMG-80250 USA), 抗CLEC4Cポリクロナール抗体 (Rabbit) (alternative name BDCA-2) (ATLAS社, HPA029432 USA)をそれぞれ用いてイミキモド外用前の組織標本を染色した。

3) 肥満細胞およびpDC細胞数の計測

浸潤細胞数の計測では免疫染色標本を無作為に抽出した3箇所部位で表皮基底層直下から乳頭下層までの範囲の1視野(750 μ m \times 200 μ m)の免疫染色陽性細胞数を顕微鏡により

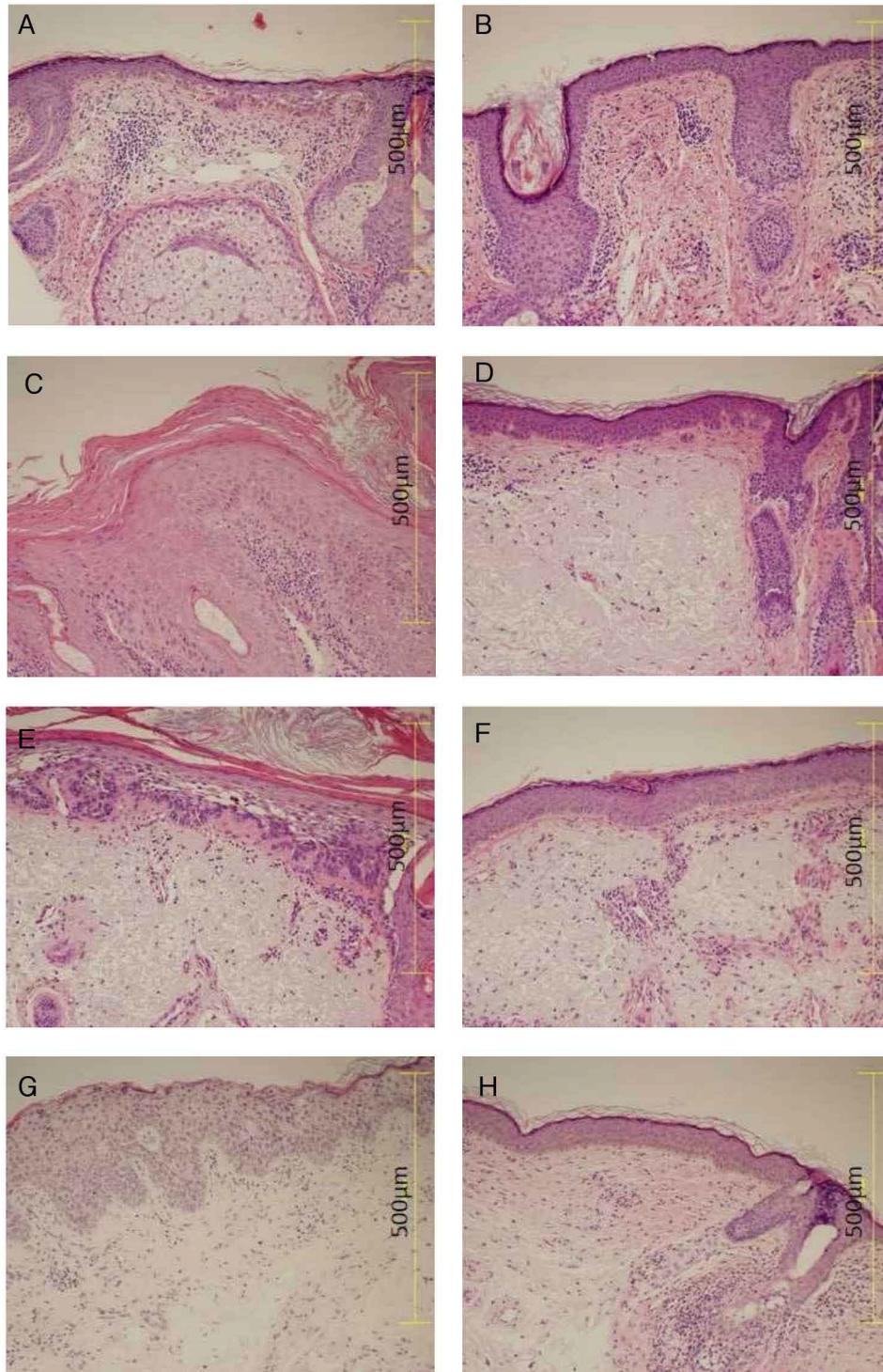


図1. 各病理組織型の治療前後の HE 染色像

(A) 萎縮型治療前. 表皮は萎縮し主として基底層近くに異型細胞を見る. (B) 萎縮型治療後. 表皮の厚さは正常となり異型細胞をみとめない. (C) 肥厚型治療前. 表皮は肥厚し主として基底層近くに異型細胞を見る. (D) 肥厚型治療後. 表皮の厚さは正常となり異型細胞をみとめない. (E) 棘融解型治療前. 基底層近くに異型細胞を認め, さらに異型細胞およびその周囲で棘融解をみとめる. (F) 棘融解型治療後. 棘融解をみとめず, 異型細胞もみとめない. (G) Bowen 型治療前. 表皮全層性に異型細胞をみとめる. (H) Bowen 型治療後. 異型細胞は消失している.

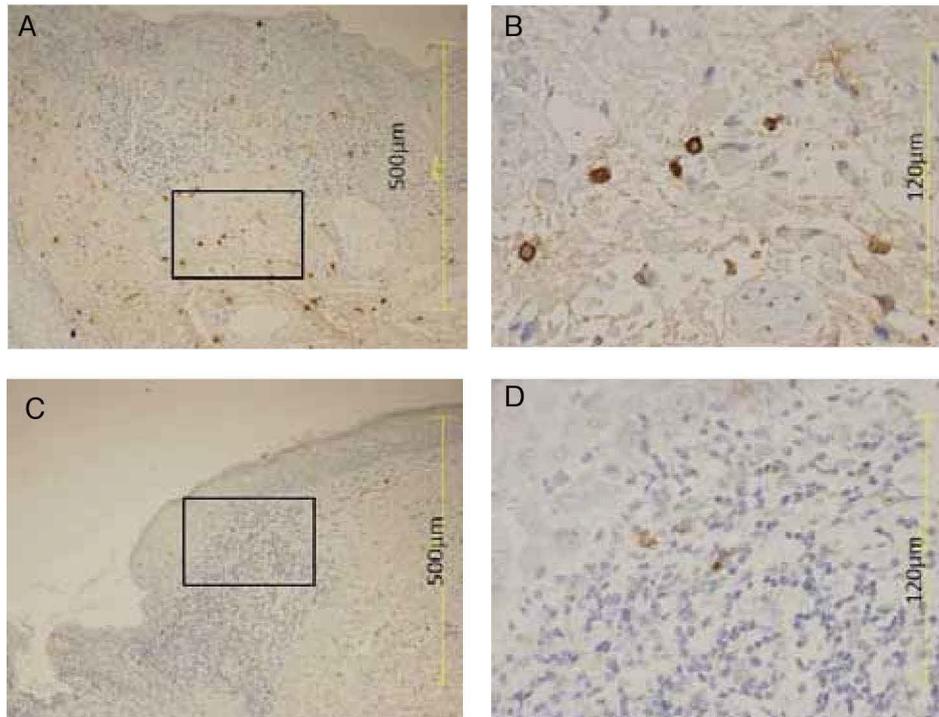


図2. 正常表皮における肥満細胞およびpDCの特殊染色像
 (A) 抗 mast cell tryptase 染色弱拡大像. 真皮の浅層から中層にかけて染色陽性の肥満細胞が散在する. 真皮乳頭層にやや多くみとめられる. (B) 抗 mast cell tryptase 染色強拡大像. リンパ球よりやや大型の単核で円形の染色陽性の肥満細胞. (C) 抗 CLEC4C ポリクロナール抗体染色弱拡大像. 表皮直下に染色陽性のpDCをみとめる. (D) 抗 CLEC4C ポリクロナール抗体強拡大像. 染色陽性のpDCは単核で樹状に突起を伸ばしている.

カウントし平均を算出した.

5. 統計学的検討

統計学的検討の際に脱落例は除外して検討した.

集計したデータは統計ソフト Statcel3 を用いて検討した. 効果の有無, 性別, 年齢, 病型, 治療期間, 多発病変か単発病変かおよび肥満細胞数, pDC 数などの相関に関して, 単変量解析は連続変数に関しては Student's t-test 検定を, 離散変数に関しては Mann-Whitney U test 検定を用いて検討した. 多変量解析は重回帰分析を用いて検討した. $p < 0.05$ を統計的有意と判定した.

III. 結 果

対象症例は 30 例であった. 対象の profile を表 1 に, その割合を表 2 に, 統計的解析を表 3 に示す.

対象症例の年齢は平均 78.3 歳 (56 - 93 歳), 男女比は 14 : 16 であった.

1. 効果判定

イミキモド外用治療の効果判定は有効 73.3% (22 例), 無効 16.7% (5 例), 脱落 10% (3 例) であった.

2. 皮疹の単発と多発

単発例が 50%, 多発例が 50% であった. 効果判定と皮疹の単発あるいは多発との相関は認めなかった.

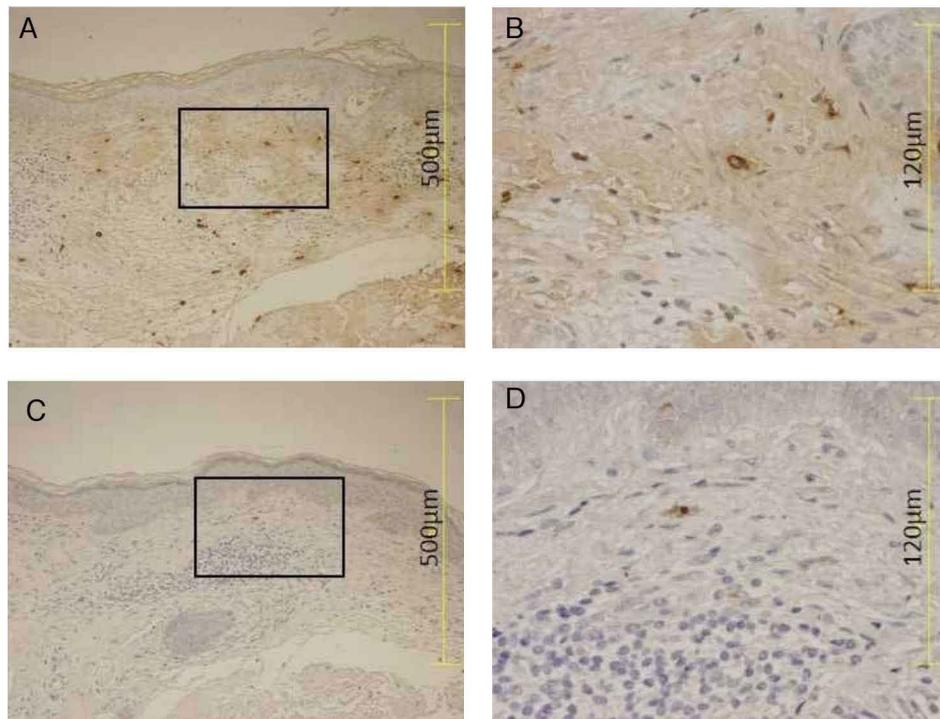


図3. 日光角化症組織における肥満細胞およびpDCの特殊染色像
 (A) 抗 mast cell tryptase 染色弱拡大像. (B) 抗 mast cell tryptase 染色強拡大像.
 (A) の枠線部の拡大. (C) 抗 CLEC4C ポリクロナール抗体染色弱拡大像. (D)
 抗 CLEC4C ポリクロナール抗体強拡大像. (C) の枠線部の拡大.

3. 治療期間

治療期間は平均8.16週(2 - 22週)であった。効果判定と治療期間との相関は単変量解析で有意差を示し有効例では治療期間が長いという結果が得られた。

4. 病理組織型

日光角化症の病理組織型は萎縮型43%、肥厚型20%、棘融解型6.7%、Bowen型30%であった。各病理型の治療前後の組織像を図1に示す。また、正常組織における特殊染色陽性の肥満細胞及びpDCを図2に日光角化症標本での特殊染色陽性肥満細胞及びpDCを図3に示す。

効果は萎縮型が有効10：無効2で奏効率0.833、肥厚型が有効4：無効1で奏効率0.800、棘融解型有効2：無効0で奏効率1.00、Bowen型有効6：無効2で奏効率0.750であった。

効果判定と病理組織型との相関は認めなかった。また、肥厚型とその他の分類との比較も単変量解析で検討したが有意差は明らかではなかった。

5. 肥満細胞数

肥満細胞数は平均 $75.3 \pm 38/\text{mm}^2$ で、効果判定と肥満細胞数との相関は認めなかった。

6. pDC数

pDC数は平均 $9.6 \pm 13.5/\text{mm}^2$ で、効果判定とpDC数との相関は認めなかった。

IV. 考 察

イミキモド外用療法は日光角化症に効果的薬剤である。しかし、効果を示さない例や治療効果出現までに長期間を要する例が存在するなど、イミキモド外用治療の予後因子については明らかにされていない。今回われわれはイミキ

表 1. 対象の特徴

患者番号	効果	病型	性別	治療期間 (週)	年齢	MAST	pDC	単発多発
1	E	Bowen 型	女	4	93	12	0	多発
2	E	Bowen 型	男	8	92	14	0	多発
3	E	萎縮型	男	8	72	16	0	多発
4	E	肥厚型	女	8	79	6	0	単発
5	E	萎縮型	女	9	75	7	0	単発
6	E	肥厚型	男	12	82	15	0	多発
7	E	萎縮型	女	22	60	18	1	単発
8	E	肥厚型	男	12	62	12	5	単発
9	E	Bowen 型	男	6	78	13	3	多発
10	E	萎縮型	女	14	56	8	0	多発
11	E	萎縮型	女	8	77	13	2	多発
12	E	棘融解型	女	8	83	5	6	多発
13	N	萎縮型	女	2	76	0	0	単発
14	脱落	萎縮型	女	4	78	2	0	単発
15	E	肥厚型	女	8	77	7	0	単発
16	E	Bowen 型	男	8	87	15	5	単発
17	E	萎縮型	女	19	82	3	3	多発
18	E	Bowen 型	男	6	75	15	0	単発
19	E	萎縮型	女	4	80	18	0	単発
20	E	萎縮型	男	8	85	6	0	単発
21	E	萎縮型	女	8	82	10	0	単発
22	E	Bowen 型	男	8	72	10	3	単発
23	E	棘融解型	女	8	78	10	0	多発
24	E	肥厚型	男	13	91	8	0	多発
25	脱落	Bowen 型	女	3	84	25	4	多発
26	E	萎縮型	男	10	76	8	0	単発
27	脱落	肥厚型	男	4	76	13	4	単発
28	N	Bowen 型	女	3	76	11	4	単発
29	N	萎縮型	男	7	76	21	2	多発
30	N	Bowen 型	男	3	89	26	5	

MAST: mast cell count ($/1.5 \times 10^5 \mu\text{m}^2$) ; pDC: plasmacytoid dendritic cell cMASTount ($/1.5 \times 10^5 \mu\text{m}^2$)

表 2. 対象の特徴の集計結果

	例数	有効例(有効率)
全体	30	22 (73.3%)
病型		
萎縮型	13 (43.3%)	10 (76.9%)
肥厚型	6 (20%)	4 (66.7%)
棘融解型	2 (6.7%)	2 (100%)
Bowen 型	9 (30%)	6 (66.7%)
単発多発		
単発	15 (50%)	10 (80.0%)
多発	15 (50%)	10 (66.7%)

表 3. 結果の統計的解析

	p 値	
	単変量解析	多変量解析
性別	0.618	0.635
年齢	0.640	0.747
病型	0.574	0.771
治療期間	0.046	0.047
多発単発	0.618	0.567
mast cell count	0.437	0.646
pDC count	0.366	0.328

モド外用による肥満細胞の pDC 動員に着目し、日光角化症に対するイミキモド外用の治療効果と肥満細胞や pDC 細胞など真皮内浸潤細胞数、患者背景、イミキモド外用治療期間などを単変量あるいは多変量解析し、効果予測因子となり得るかを検討した。

患者背景とイミキモドの有効性に関し、年齢については 56 歳から 93 歳で平均 78.3 歳であった。発症年齢が 60 歳代から増加し 70 歳以上が多数を占めるといった過去の報告^{10,11)}と同様の傾向が見られた。また、男女比は 14:16 で性差に偏りは見られなかった。年齢、性別によ

る有効性の統計学的な差は見られなかった。

本研究で日光角化症の単発と多発でイミキモドの有効性に差がみられなかった。即ち、日光角化症の単発と多発で発症機序や免疫学的癌抑制機構に差がないことを示している。

また、日光角化症は一定の領域が共通の発がん因子、即ち紫外線の影響を受けて癌が多発する危険性を有する field cancerization^{12,13)} の状態から発症するとされる。従って、単発発症でも目視されない微小病変が点在するためイミキモド外用は広範囲に塗布する field therapy が推奨されている。

病理組織型とイミキモドの効果に関し、肥厚型では有効性が低いとの報告⁶⁾がある。しかし本研究では各病型での有効性に統計学的な差は見られなかった。本邦でのランダム化試験¹²⁾では角質層あるいは表皮全体が肥厚し、イミキモド外用剤の浸透が悪いと予測される肥厚性および過角化性の病変は除外して行われている。しかし、20症例を検討した菅らの報告¹⁰⁾では病理組織型にかかわらず奏功しており、4週治療例と8週治療例の2群に分けての検討でも両群の病理組織型に特別な差異はなかったとしている。従って、日光角化症は病理組織型に関係なくイミキモドが浸透し抗腫瘍効果を発揮することが示された。

本研究において、イミキモド外用治療の効果出現と治療期間に単変量解析で相関が見られた。すなわち、初期に僅かな効果しかみられない場合でも外用治療を継続することにより効果が増強することが示された。本邦での日光角化症に対するイミキモド外用薬の用法用量は4週間、週3回眠前に塗布し、その後4週間の休薬期間をもうけ、効果不十分の際にはさらに4週塗布が認められている¹²⁾。しかし、4週塗布後の効果が不十分な場合や8週塗布で効果がみられるものの完全消失に至らない例では継続塗布をすることで完全消失が期待できる場合がある。本研究は、日光角化症がイミキモド外用治

療で不完全消失であったとしても8週を超えて継続塗布することで完全消失が期待できることを示唆している。

イミキモドの抗腫瘍効果の機序は、イミキモドにより活性化されたpDCがケモカインの放出による免疫制御のみならず、granzyme B, perforin, TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)を発現し直接的に腫瘍細胞を攻撃することによる⁵⁾。また、pDCの病巣真皮への動員は、イミキモドにより細胞膜上に表出したTLR-7を介して活性化された肥満細胞からCCL2が放出されることによる^{4,6)}。

従って、腫瘍周囲に浸潤する肥満細胞の多寡が日光角化症のイミキモド外用療法のキーポイントになっていると思われた。しかし、本研究の結果は日光角化症周囲の浸潤pDC数は少なく、しかもその多寡はイミキモドの効果と関連がなかった。本来、IFNの分泌や後の免疫反応を誘導する腫瘍周囲の浸潤pDC数は本来少なく¹⁴⁾、さらにその活性程度も低いため続くT細胞性免疫を誘導できない¹⁴⁾とされ、イミキモドにより肥満細胞を介してはじめてpDCが腫瘍周囲に集合しさらに活性化すると考えられる。

一方、本研究で日光角化症病巣周囲の浸潤肥満細胞数は少なく、しかもイミキモドの治療効果はむしろ浸潤細胞が少ないほど良いとの結果を得た。大西ら¹⁶⁾はマウスの実験的紫外線誘発日光角化症で浸潤肥満細胞数は正常皮膚と同様にごく僅かであること、イミキモド外用で浸潤細胞数が10倍に増加することを示している。従って、日光角化症の浸潤肥満細胞数は本来、正常皮膚と同様に少なく、イミキモド外用によって何らかの因子が肥満細胞の遊走、増殖と活性化を誘導すると考えられる。皮膚真皮の肥満細胞の増殖と成熟はヒアルロン酸受容体であるCD44¹⁷⁾が関与し、さらに、上皮細胞由来の肥満細胞遊走因子は細胞外基質(extracellular matrix:ECM)蛋白のひとつであるフィブロネ

クチンであることが同定され, フィブロネクチンにより誘導される肥満細胞遊走に関わる細胞内伝達機構において Src ファミリーにひとつである Lyn の重要な制御因子であることが実験的に証明されている¹⁷⁾. 従って, イミキモドにより日光角化症の病巣周囲に表出するフィブロネクチンと CD44 の発現量によって浸潤肥満細胞数に変動するとともに, イミキモドの効果も規定されると思われる.

本研究で, イミキモドの使用期間と効果発現

に相関がみられたが, 長期間の使用で徐々に日光角化症周囲にフィブロネクチンと CD44 が発現してくることを意味していると考えた.

稿を終えるにあたり, 本研究の機会を与えていただき, 御指導・御校閲を賜りました岩手医科大学医学部皮膚科学講座・赤坂俊英教授に厚く御礼申し上げます.

利益相反: 著者には開示すべき利益相反はない.

References

- 1) 玉置邦彦: 皮膚科学体系 12 巻, 1 版, pp. 25-26, 中山書店, 東京, 2002.
- 2) 前田文彦, 赤坂俊英: イミキモド: 薬剤の特性と日光角化症治療への意義. 癌と化学療法 **36**, 577-581, 2009.
- 3) 前田文彦, 高橋和宏, 赤坂俊英: イミキモドの日光角化症に対する抗腫瘍効果発現機序の解析. 岩手医誌 **62**, 167-178, 2010.
- 4) **Martin H, Barbara D and Maria S:** How imiquimod licenses plasmacytoid dendritic cells to kill tumors. *Oncoimmunology* **1**, 1661-1663, 2012.
- 5) **Georg S, Christine B, Martina T, et al.:** Tumoricidal activity of TLR7/8-activated inflammatory dendritic cells. *J Exp Med* **204**, 1441-1451, 2007.
- 6) **Barbara D, Martin H, Nicole A, et al.:** Imiquimod clears tumors in mice independent of adaptive immunity by converting pDCs into tumor-killing effector cells. *J Clin Invest* **122**, 575-585, 2012.
- 7) **Falagas ME, Angelousi AG and Peppas G:** Imiquimod for the treatment of actinic keratosis: a meta-analysis of randomized controlled trials. *J Am Acad Dermatol* **55**, 537-538, 2006.
- 8) **Hadley G, Derry S and Moore RA:** Imiquimod for actinic keratosis: systematic review and meta-analysis. *J Invest Dermatol* **126**, 1251-1255, 2006.
- 9) 外科関連学会協議会: 症例報告を含む医学論文及び学会研究会発表における患者プライバシー保護に関する指針. 日臨外会誌 **68**, 巻頭, 2014.
- 10) 菅 裕司, 山下利春: 日光角化症に対するイミキモド外用の治療効果. *Progress med* **35**, 305-309, 2015.
- 11) 市橋正光, 市原和之: 皮膚悪性腫瘍の診断と治療指針ならびに全国アンケートの集計. *Skin cancer* **9**, 18-26, 1994.
- 12) 斎田俊明, 川島 眞: 日光角化症のイミキモド療法. *臨床皮膚科* **66** (5号増刊), 119-122, 2012.
- 13) 斎田俊明: 日光角化症の診断と治療. *Skin cancer* **25**, 214, 2010.
- 14) **Treilleux I, Blay JY, Bendriss-Vemare N, et al.:** Dendritic cell infiltration and prognosis of early stage breast cancer. *Clin Cancer Res* **10**, 7466-7474, 2004.
- 15) **Zou W, Machelon V, CoulombL' HA, et al.:** Stromal-derived factor-1 in human tumors recruits and alters the function of plasmacytoid precursor dendritic cells. *Nat Med* **7**, 1339-1346, 2001.
- 16) 大西正純, 高橋和宏: 実験的紫外線誘発日光角化症および有棘細胞癌のイミキモド外用治療における浸潤肥満細胞. 岩手医誌 **68**, 13-27, 2016.
- 17) **Takano H, Nakazawa S, Shirata N, et al.:** Involvement of CD44 in mast cell proliferation during terminal differentiation. *Lab Invest* **89**, 446-455, 2009.
- 18) **Suzuki T, Shoji S, Yamamoto K, et al.:** Essential roles of Lyn in fibronectin-mediated filamentous actin assembly and cell motility in mast cells. *J Immunol* **161**, 3694-3701, 1998.

Analysis of an effect prediction factor of
actinic keratosis treatment with
topical imiquimod application

Ryusuke SATO and Kazuhiro TAKAHASHI

Department of Dermatology, School of Medicine,
Iwate Medical University, Morioka, Japan

(Received on December 17, 2015 & Accepted on January 22, 2016)

Abstract

Imiquimod is a synthetic amine (molecular weight 240.3 Da), and has a strong anti-virus action and an anti-tumor effect. We analysed 30 cases of actinic keratosis treated by topical 0.5% imiquimod cream application, using multivariate analysis of its therapeutic effects and each patient's background, treatment period, the number of permeating mast cell counts, and plasmacytoid dendritic cell counts of the dermis. Staining for permeating mast cells was done with anti-mast cell tryptase for the first antibody, and for plasmacytoid dendritic cells was done with anti-CLEC4C polyclonal antibody for the first antibody, and then with immunostaining in ABC with DAB. It was supposed that the numbers of permeating mast cell and plasmacytoid dendritic cells are larger in

cases of effective treatment than in ineffective cases. However, in this study, there was no correlation between the therapeutic effect and the number of permeating mast cells and/or plasmacytoid dendritic cells. From these observations, we can suggest that even if there is an incomplete anti-tumor effect after 8-week treatment periods, continued application of imiquimod to the lesion can be expected to lead to complete tumor disappearance. Furthermore, before the treatment infiltrated mast cells in the actinic keratosis (AK) lesion are scarce. Thus we can predict that imiquimod leads to infiltration and gathering of mast cells and activates them in the AK lesion. Consequently, we suppose the degree of this activation is related to the effectiveness of treatment.
