

Z00500215 A

厚生労働科学研究費補助金

萌芽的先端医療技術推進研究事業

メラノーマ標的ナノ微粒子(NPrCAP/ML)によるメラノーマ
温熱免疫療法の開発(H17-ナノ-004)に関する研究

平成17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 神保 孝一

平成18(2006)年3月

目 次

I. 総括研究報告

- メラノーマ標的ナノ微粒子 (NPrCAP/ML) によるメラノーマ温熱免疫療法の開発 ----- 1
神保 孝一

II. 分担研究報告

1. NPrCAP/ML加温後のメラノーマ機能の分子生物学的変化の解析と臨床治験研究 ----- 16
山下 利春
2. 温熱免疫誘導機構の解析とNPrCAP/ML薬剤の合成とHSP免疫賦活作用の解明の研究 ----- 23
本多 裕之、井藤 彰
3. N-(1-mercaptopropionyl)-4-S-CAP結合型マグネトリポソーム (NPrCAP-SH/ML) と
NPrCAP-SH直接結合型マグネタイト (NPrCAP-SH/M) の合成とNPrCAP-SH/Mの
チロシナーゼの基質としての反応性 ----- 29
伊藤 祥輔、若松 一雅
4. NPrCAP/ML加温後のHSPを介した腫瘍免疫機構の解析に関する研究 ----- 36
佐藤 昇志、田村 保明

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 45

IV. 研究成果の刊行物・別冊 ----- 50

I . 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）
 総括研究報告書

メラノーマ標的ナノ微粒子（NPrCAP/ML）によるメラノーマ温熱免疫療法の開発

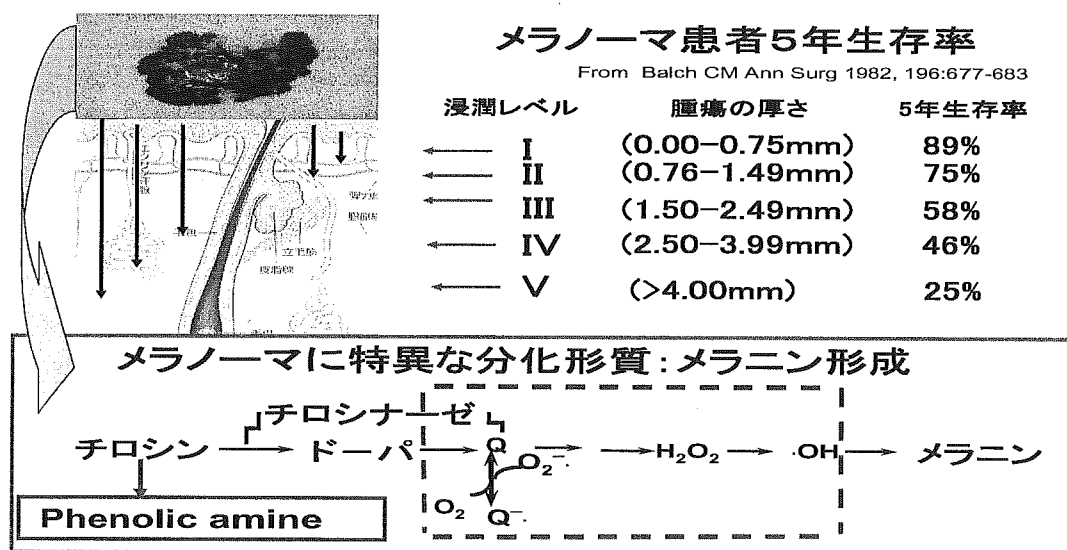
主任研究者 神保 孝一 札幌医科大学皮膚科学講座 教授

研究要旨

皮膚がん（癌）で最も悪性度が高く、又日本を含め全世界的に新規治療法の開発が切実に求められているのは悪性黒色腫（メラノーマ）である。メラノーマはメラニン色素産生細胞であるメラノサイトが癌化した腫瘍である。従い本症は、メラノサイトの存在する全ての部位、即ち全身の皮膚と口腔、鼻腔、眼球、膣、肛門等の粘膜のみならず眼球内、脳・軟脳膜に発症し、早期よりリンパ行、血行路を介し、全身の臓器に転移、全ての癌の中で最も悪性度の高い癌の一つである(図1)。

現在最も有効な治療法は外科的切除で、それ以外の化学療法、放射線療法、免疫療法、遺伝子療法等の試みは十分な成果をあげていない。本研究はメラノーマに特異な分化形質であるメラニン生合成（メラノジェネシス）を標的として新規ドラッグ・デリバリー・システム（DDS）とこの標的システムに加え、細胞障害性を有するDDS剤と磁場照射により細胞障害性の温熱を発生する鉄微粒子（ナノパーテクル）を重合させた薬剤を作成し、従来にない新規メラノーマナノメデシン治療法を開発する。

図1

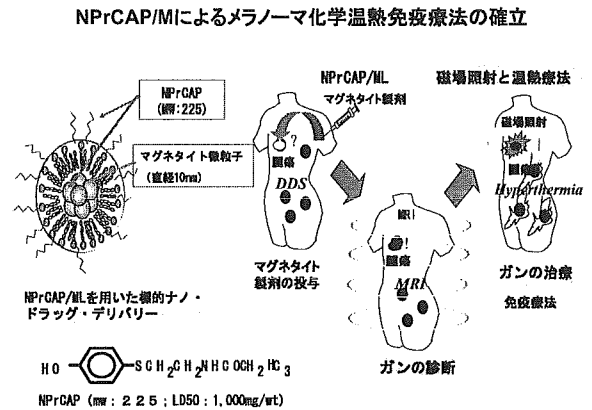


A. 研究目的

メラニン形成（メラノジェネシス）は全てのメラノーマ細胞にとり特異な分化形質であり、癌化と共に異常に亢進する。本経路は無色素性腫瘍（amelanotic melanoma）に於いても存在する。メラニン前駆体であるチロシンはメラノジェネシスの経過中にチロシナーゼと酸化・還元反応をおこし細胞毒性を有するフリーラジカルを生ずる（図1）。本研究はこのメラノジェネシスに伴う細胞毒性反応を利用し、メラニン形成酵素チロシナーゼの基質であるチロシンに細胞膜との親和性を高めるために硫黄を含有させたフェノーリックアミン(phenolic amine)誘導体を合成しメラノーマ細胞を選択的に破壊することである。

本研究は、殊に①システアミニールフェノール (cysteaminyl phenol: CAP) はメラノーマ細胞に選択的に接着し取り込まれ、直接、細胞殺効果を有する事、②メラノーマ細胞が熱ショックに弱く、しかも最も免疫反応を起しやすいという細胞生物学的特性を利用し、③CAPを磁場照射により細胞殺効果を有する温熱を発生するナノ磁気粒子 (magnetite particle) に固定化する事により新しい標的ナノ・ドラッグ・デリバリー・システムと化学温熱免疫療法を開発し、これにより従来の概念にない特異的メラノーマ治療法を確立する事を目的とした（図2）。

図2

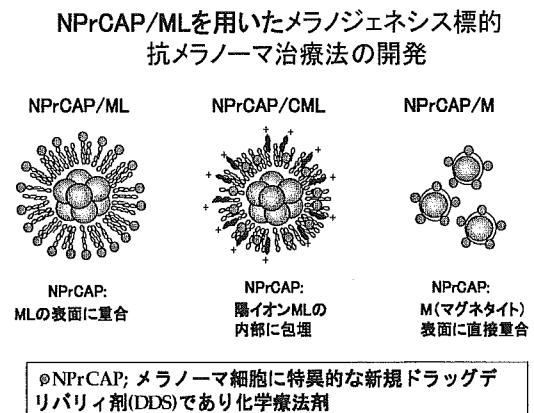


B. 研究方法 / C. 研究結果

1. NPrCAPとマグネタイト (M) 重合薬剤の合成:

NPrCAPをマグネタイト重合、固定させた薬剤は3種類合成された（図3）。

図3



これ等薬剤の合成は共同研究者である本多と伊藤とで開発した。これらマグネタイトは10nm大のナノ微粒子を用いた。マグネタイトは①中性リポソーム(NPrCAP-magnetoliposome; NPrCAP/ML)、②陽イオンリポソーム(NPrCAP-cationic magnetoliposome; NPrCAP/CML)へNPrCAPの内包を試みたものと、③マグネタイトとNPrCAPとを直接重合させたもの（

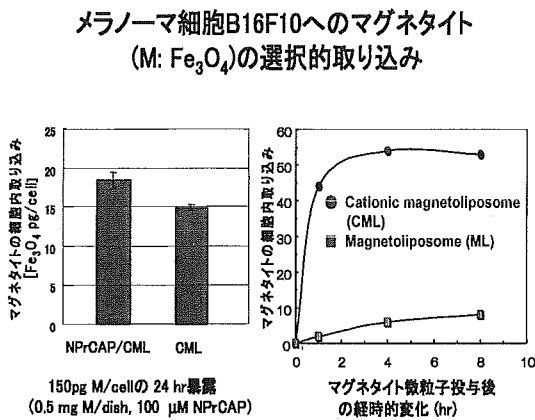
NPrCAP/M) である (図3)。

2. NPrCAP/ML, NPrCAP/CML, NPrCAP/M のメラノーマ組織への選択的取り込みの検討:

1) In vitro 細胞系を用いた選択的取り込み

- ① B16F1 メラノーマ細胞を用い、NPrCAP の DDS としての有用性を検索したところ NPrCAP 含有薬剤は非含有薬剤と比較し優位な細胞内取り込みの差を示した (図 4)

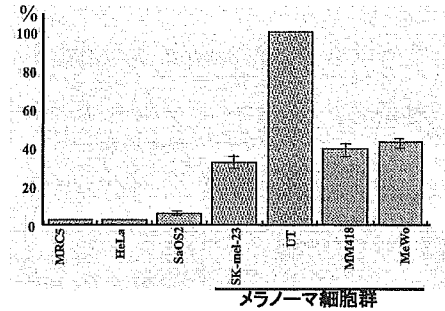
図 4



- ② 中性リポソームは非特異的に細胞に接着する事、陽イオンリポソームは薬剤合成後室温に長時間放置できず安定性に問題がある事が分かり、最終的にはNPrCAPとマグネタイトを直接重合・固定化したNPrCAP/Mを薬剤として用いる事とした。
- ③ NPrCAP/Mはメラノーマ細胞に選択的に取り込まれる事を確認した (図 5)。

図 5

NPrCAP/Mのメラノーマ細胞への選択的取り込み



2) In vivo 担癌マウスを用いた薬剤の選択的取り込み

- ① メラノーマ担癌マウスを用い、NPrCAP/ML, NPrCAP/CML, NPrCAP/Mのメラノーマ腫瘍への選択的取り込みを光学顕微鏡下にて観察したがNPrCAP/Mが最も効率的に取り込まれた。
- ② NPrCAP/Mは室温に安定で動物に短時間で投与でき (NPrCAP/ML, NPrCAP/CMLの場合30分かかったのがNPrCAP/Mは1分で終了)、in vitroの実験系の結果と同様、実用性の高い安定した薬剤である事がわかった。
- ③ 今後はMRIにて静脈内投与後の全身臓器での分布を検討しNPrCAP/Mの薬剤としての安定性とメラノーマへの取り込みの選択性を確認する。

3. NPrCAP/Mのチロシナーゼとの親和性の検討:

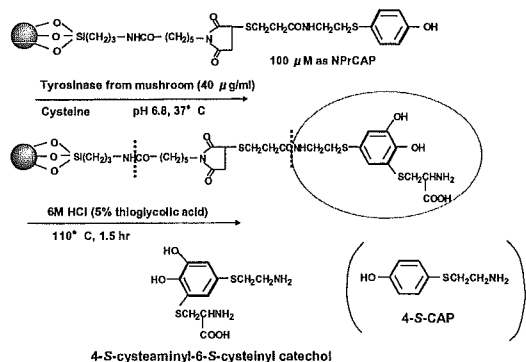
我々の薬剤開発の主眼の第一条件はメラノジェネシスを標的としてDDSの開発であるのでNPrCAP/Mがチロシナーゼの基質である事が必要条件である。一方NPrCAP/Mはマグネタイトを含有しているため黒色を呈しており従来用いられている呈色反応に基づくチロシナーゼ反応をもちいる事は出来ない。

- ① そこで我々はHPLCを用いた新しい

NPrCAP/M のチロシナーゼ酸化測定方法を確立した (図 6)。

図 6

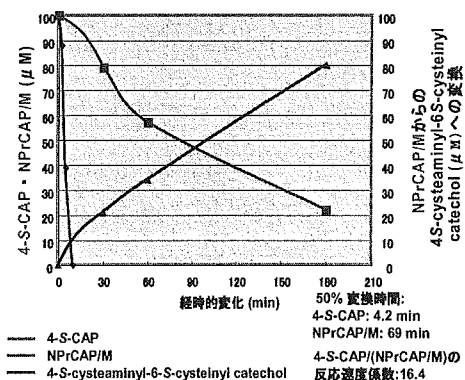
チロシナーゼによるNPrCAP/Mの酸化測定法



② 次いで本測定方法を用い、NPrCAP/M のチロシナーゼ酸化による 4-S-cysteaminy-6-S-cysteinylcatechol 形成の計時的変化を見ることにより間接的に NPrCAP/M のチロシナーゼ其質親和性を確認した (図 7)。

図 7

NPrCAP/Mのチロシナーゼ酸化による 4S-cysteaminy-6S-cysteinyl catechol形成の経時的変化



4. NPrCAP/M に基づく細胞死機構の検討:

我々の薬剤開発の第二の条件はマグネタイトの磁場照射による温熱効果による化学療法・免疫療法剤として作用することである。殊に腫瘍免疫発現に最も効率的な細胞死はアポトーシスではなくネクローシスであるので温

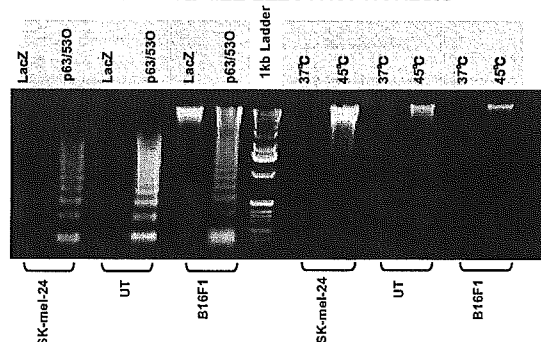
熱に基づく細胞死の機構を検討した。

① 先ずアポトーシス誘発のコントロールとしてアポトーシスに関係する p63 と p53 キメラ遺伝子を合成しこの mRNA をアデノウィルスベクターに組み込んだ。

② 次いでメラノーマ培養細胞を 37°C から 45°C に加温しアガロースゲル電気泳動法にて DNA ラダリング発現の有無を検索した。p63/ p53 キメラ遺伝子重合アデノウィル感染メラノーマ細胞ではラダリング発現がマウス、ヒトメラノーマ細胞で観察されたのに比し加温細胞ではいずれも DNA ラダリングは観察されなかった (図 8)。

図 8

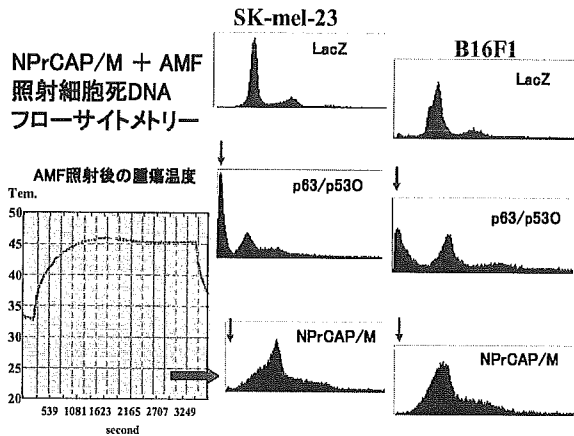
Ad-p63/530-感染・温熱死細胞からのDNA AGAROSE GEL ELECTROPHORESIS



③ 次いで磁場照射により加温処理したヒト、マウスメラノーマ細胞の磁場照射後の細胞を DNA フローサイトメトリーで subG1 fraction の発現を見ることでアポトーシス発現の有無を検索した。アポトーシスのコントロールとして用いた p63/p53 キメラ遺伝子重合アデノウィル感染細胞が著明な subG1 fraction を発現させアポトーシスの存在を示唆した。

これに対し磁場照射加温により細胞死したメラノーマ細胞はいずれも subG1 fraction の発現を示さなかった(図 9)。

図 9



- ④ 以上の結果は NPrCAP/M の磁場照射後に生ずるメラノーマ細胞死アポトーシスではなくネクローシスである事を示し、マグネタイト磁場照射による温熱免疫療法の可能性を示唆している。
- ⑤ 次いで温熱加温細胞死をしたメラノーマ細胞が温熱免疫の基礎となる HSP を産生するか否かを検討したところ HSP70, 90 の蛋白のいずれも発現する事を確認した。

5. NPrCAP/M の in vivo 抗メラノーマ増殖抑制効果の検討:

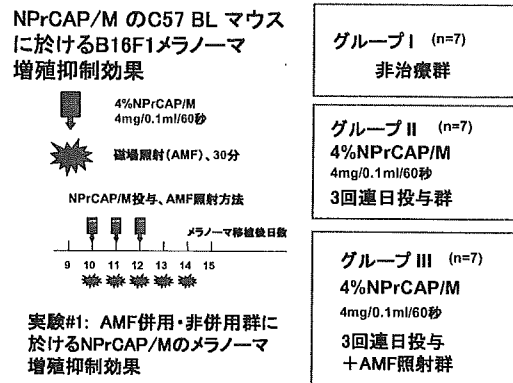
B16F1 細胞を用い以下の 3 点の C57 マウスを用いた動物実験を試みた。

実験 1: NPrCAP/M 単独、磁場照射 (alternating magnetic field: AMF) 併用のメラノーマ腫瘍増殖抑制の直接的効果

- ① メラノーマ移植後、4%NPrCAP/M を単独 3 回連日投与群と AMF 併用療法群とで比較した。この際磁場照射 (AMF) の効果をきちんと確認するために照射を 5

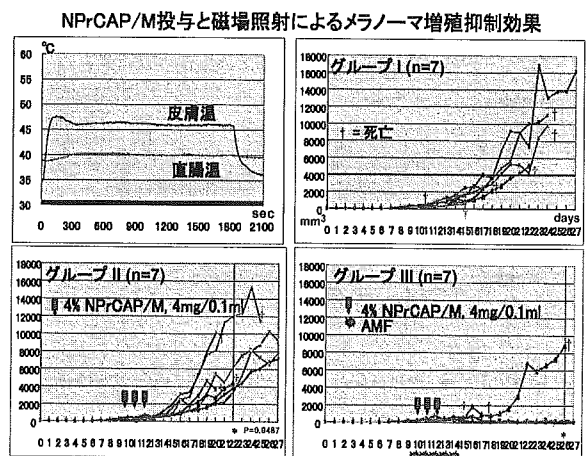
回連日行った (図 10)。

図 10



- ② コントロールの非加療群と比較してして NPrCAP/M 単独加療群では明らかに投与終了 1 週間までメラノーマ増殖効果が認められた (図 11)。即ち、NPrCAP/M 自体明らかな化学療法剤としての抗腫瘍効果を有する事が分かった。
- ③ 一方 NPrCAP/M と AMF 併用群では実験マウス 7 匹の内 1 匹を省き全マウスに於いてメラノーマ増殖の完全消失をみた (図 11)。即ち我々は NPrCAP/M と AMF 併用によりメラノーマを完全に消失させる事に成功したわけである。

図 11



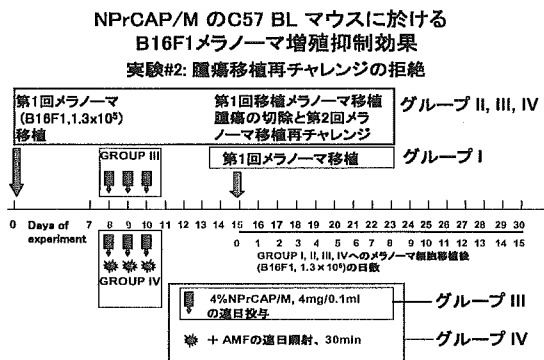
実験 2: NPrCAP/M 単独、磁場照射 (alternating

magnetic field:AMF) 併用によるメラノーマ再移植腫瘍に対する増殖抑制効果

NPrCAP/M 投与後メラノーマ細胞を加温処理することで細胞壊死（ネクロシス）を発生させ、腫瘍免疫を惹起させ得る事が予測されているので、これを実証させるために第1回メラノーマ増殖抑制実験後に移植腫瘍を切除し、反対側の正常皮膚にメラノーマを再移植し、リチャレンジされたメラノーマの増殖抑制、宿主マウスの腫瘍移植拒絶反応を検討した。

- ① 4群の実験マウスが用意された。グループ2から4は第1回のメラノーマの移植を実験開始1日目に受け、15日目にこれ等メラノーマを外科的に切除し、同時に第1回メラノーマ移植の反対側の健常皮膚に第2回目のメラノーマの移植を受け、腫瘍増殖の計時的変化を見た群である。これら3群の内、グループ2は無加療、グループ3はNPrCAP/Mの3回連日投与群、グループ4はNPrCAP/MとAMFを3回連日加療された群である。グループ1は実験開始初日にメラノーマの移植を受けずにグループ2から4と同時期（実験開始15日目）に始めてメラノーマの移植を受けた群である（図12）。

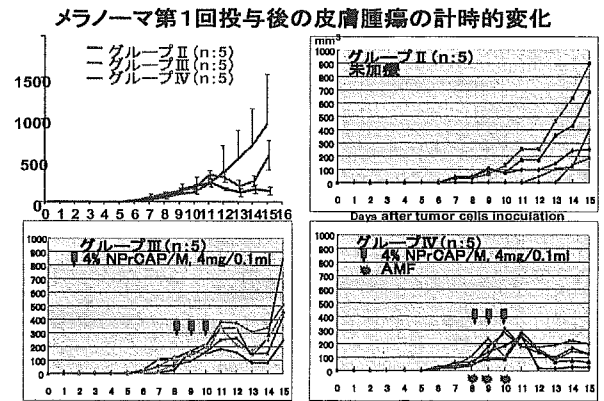
図 12



- ② 結果としてグループ3と4に於いて第

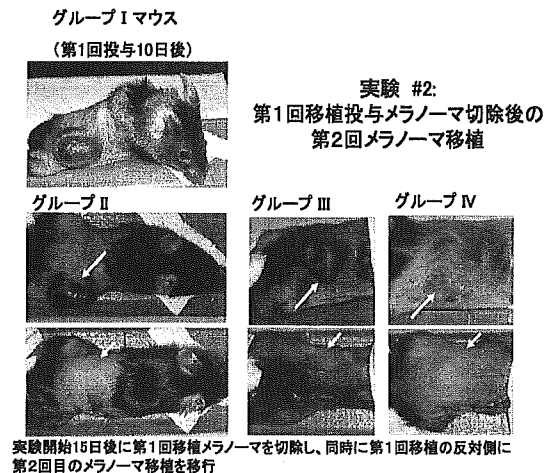
1回メラノーマ移植後メラノーマの増殖抑制効果が認められた。グループ4に於いて実験1と異なりメラノーマの増殖が完全に認められたのは実験マウス5匹中1匹であった（図13）。

図 13



- ③ 次にグループ1, 2, 3, 4のマウスは第2回目移植腫瘍を外科的に切除され反対側の健常皮膚にメラノーマ移植の再チャレンジ実験を受けた（図14）。

図 14



- ④ グループ3のNPrCAP/M単独加療群5匹のマウス中2匹に於いて再チャレンジ移植腫瘍の完全な増殖拒絶が、1匹においてほぼ完全な増殖抑制が認められた（図15, 16）。これら実験マウスの

脾臓からリンパ球を集め磁場照射加熱処理を受けたマウスにおいてメラノーマ細胞への腫瘍細胞性免疫機構の発現が確認された。

図 15

第2回メラノーマ細胞移植後の腫瘍増殖の計時的変化

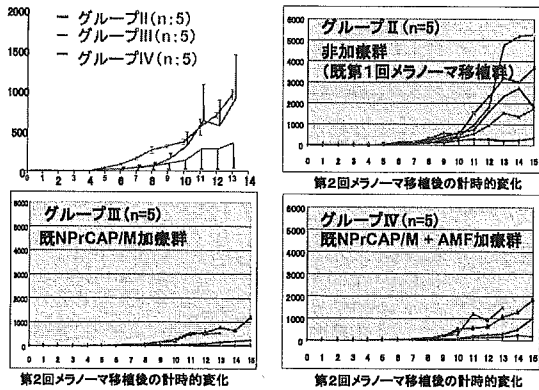
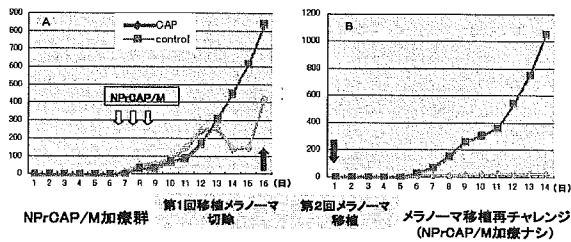


図 16

第2回メラノーマ移植後の腫瘍増殖に対する完全な拒絶反応



被験マウスは第1回メラノーマ移植後、NPrCAP/M(AMFなし)の加療(連日3回投与)後メラノーマを切除(A)、その後第2回目のメラノーマ移植のチャレンジを受けた(B)

⑤ 一方、グループ 4 の NPrCAP/M と AMF の併用療法と AMF の無併用療法 3 回施行群のマウスではいずれもコントロールのグループ 2 のマウス群に比し、軽度ながら腫瘍増殖抑制が認められたが完全な腫瘍拒絶反応は認められなかった。しかし 1 匹のマウスに於いて不完全ながら著明な腫瘍増殖拒絶が認められた (図 15)。

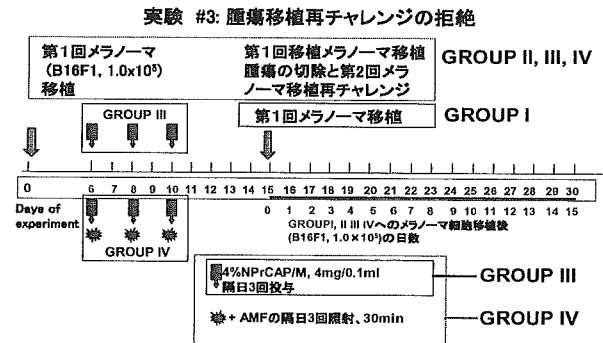
実験 3 : NPrCAP/M と磁場照射 (alternating magnetic field:AMF) 併用によるメラノーマ

再移植腫瘍に対する増殖拒絶効果

NPrCAP/M と AMF の併用療法の効果を最大限に引き出すために本実験では NPrCAP/M と AMF の併用を 3 回隔日に試行した。他の実験方法は実験 2 とまったく同一である (図 17)。

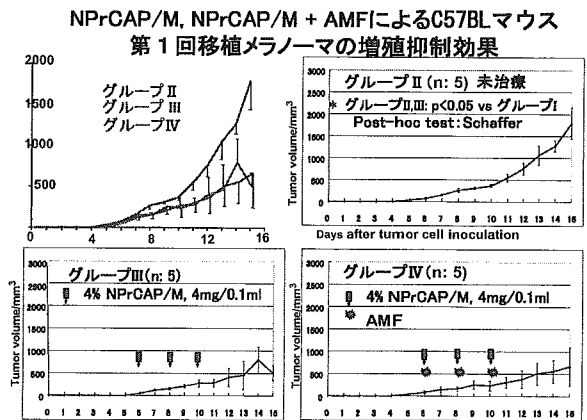
図 17

NPrCAP/MのC57BLマウスに於ける B16F1メラノーマ増殖抑制効果



① 実験 2 と同様、第 1 回移植メラノーマはグループ 3 において NPrCAP/M 単独治療による抗メラノーマ増殖抑制効果がグループ 2 の非加療群と比較し認められた。グループ 4 に於いては NPrCAP/M と AMF の併用によりグループ 3 と同様に抗メラノーマ増殖抑制効果が認められた (図 18)。

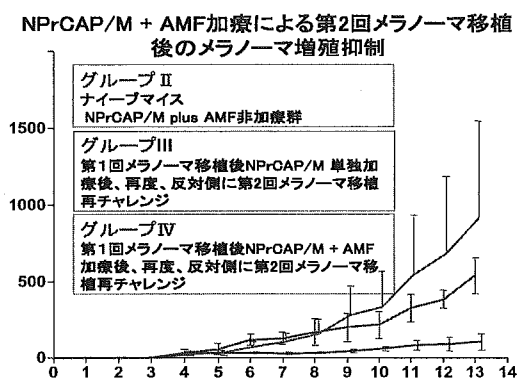
図 18



② 第 2 回目メラノーマ移植拒絶実験においてはグループ 3 に於いては実験 2 と異なり第 2 回再チャレンジメラノーマ

マ移植の完全な拒絶は認められなかった。しかしグループ4においては5匹の実験マウス中4匹において再チャレンジ移植腫瘍の完全な増殖拒絶が認められた(図19)。

図19



6. 今後の研究展開

1) NPrCAP/M と AMF 磁場照射による腫瘍免疫発現の解析：

温熱加温に伴う HSP 活性の動態を RT-PCR, Western blotting で検索し、最も免疫活性を有する考えられる HSP90, 70 等に焦点をあて、HSP が danger signal として macrophage や樹状細胞の受容体に結合し、抗原ペプチドの MHC class I へのクロス提示、腫瘍免疫活性化機構等を検索する。

2) NPrCAP/ML 加温後の坑メラノーマ効果と腫瘍免疫機構の相関の解明：

NPrCAP/ML が投与局所の癌のみならず遠隔部の皮膚・肺転移巣に対し、抗腫瘍効果をどの程度有するかを明らかにする。またその際、腫瘍性免疫がどのように直接関与しているかを in vivo, in vitro 系で解明する。

3) 臨床治験プロトコールの作成と実施：

① 末期メラノーマ (ステージ IV) 患者へ

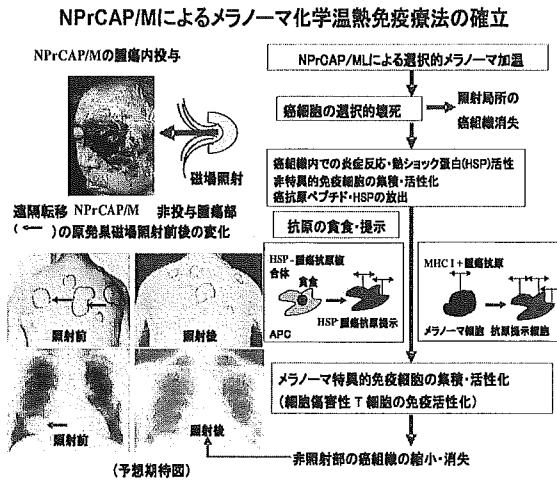
の治療を試みるために、倫理委員会の承認のもとに Phase I, II study のデータを得、臨床治験を開始する。この際メラノーマ転移は皮膚癌のため全身の皮下転移が肝、肺、脳転移より早期に起こることが多い。従い薬剤の投与方法として皮下の転移性メラノーマには腫瘍内には直接 NPrCAP/M を3回隔日に打ち磁場照射を行う。

② 次いでステージ II のハイリスクのメラノーマ患者の皮膚原発巣に新規開発中の皮膚バリアー除去軟膏に NPrCAP/M を混ぜ3回隔日に投与し磁場照射を行う。症例によっては皮膚密封法 (ODT) により経皮吸収を介した投与も試みる。実際の患者治療に用いる磁場発生装置は第一高周波発生装置製作所との共同研究にて試作品を完成し昨年12月に札幌医大に納入、臨床治験開始に向け現在その安全性をテスト中である。

③ 最終回 NPrCAP/M 投与と磁場照射24時間後に全身麻酔下でメラノーマの全切除とセンチネリンパ節の郭清術を施行する。センチネリンパ節郭清術に関しては昨年厚生労働省に高度先進医療の実施申請をし、既に実施認可を受けた。得られたリンパ組織を用い細胞性免疫の発現の検討と新規メラノーマ腫瘍特異抗原の同定を行う。特異抗原のペプチドを開発し手術後患者にペプチド療法を行い、これにより遠隔転移部位の消失、又メラノーマ再発の予防を図る(図20)。我々は現在、既知のメラノーマ特異抗原(チロシナーゼ、gp100等)を用いたペプチド療法を倫理委員会の認可の下に実

施中であるがこれに近じか厚生労働省に高度先進医療として申請するために準備中である。

図 20



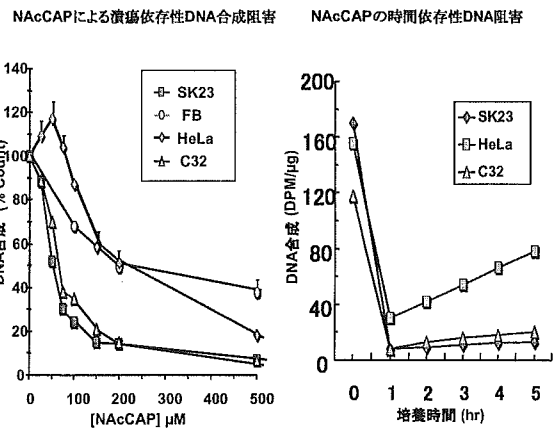
速度が緩徐であり、メラノーマに特異的、非可逆的な細胞毒性を示した（図21, 22, 23, 24）。

図21

メラノーマ標的治療薬としてのイオウ結合フェノールアミン同族体のチロシナーゼとの反応速度係数

	Km (μM)	Vmax (μmole/min/mg)
Tyrosine	0.3	1.80
4-S-CAP	117.0	7.97
N-Acetyl-4-S-CAP (NACAP)	375.0	9.28
N-Propionyl-4-S-CAP (NPrCAP)	340.9	5.43

図22



D. 考察

1. 本研究立ち上げのための基礎的研究成果

1) メラノーマの分化形質の特異性を利用した選択的破壊

本研究代表者である神保はメラノジェネシスという生物学的形質発現を利用し、メラノサイト・メラノーマ細胞を選択的に破壊し、メラノーマの新しい治療体系を確立する研究を過去35年間行ってきている。これらの内、本申請研究課題に直接関連し、本申請の基礎となる成果のうち代表的なものは以下に列挙しよう。

- ① メラニン形成酵素チロシナーゼの基質であるチロシンをSH基で化学的に修飾し、33種類の誘導体を合成したが、CAP、殊にそのN-acetyl, N-propionyl誘導体であるNacCAP (N-acetyl-4-S-cysteaminyl phenol)、NPrCAP (N-propionyl-4-S-cysteaminyl phenol)はチロシナーゼへの基質親和性が高くしかも反応

図23

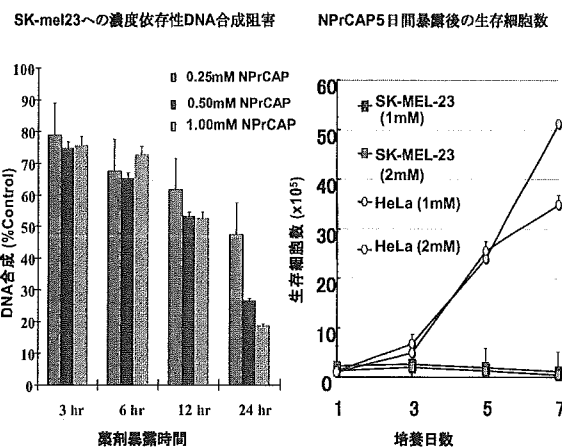
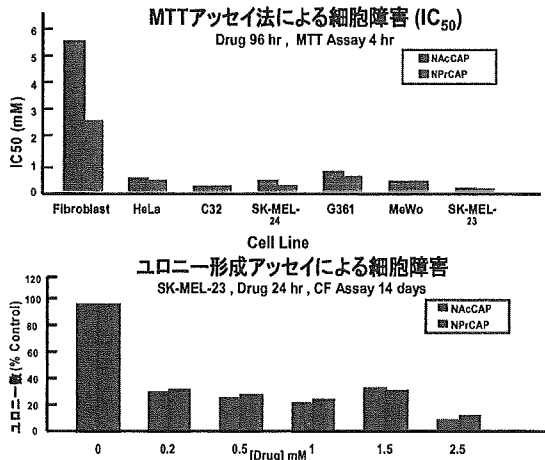
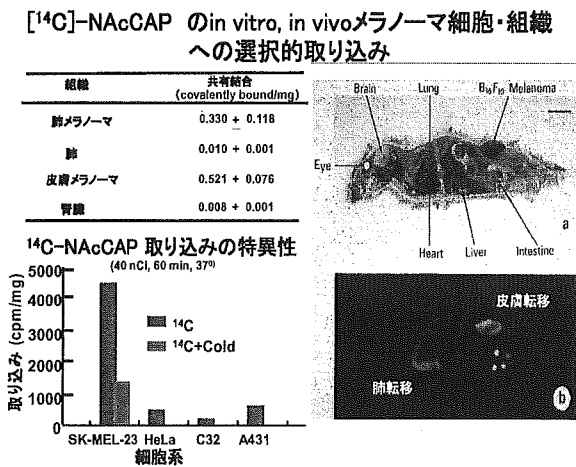


図24



② ¹⁴C標識NAcCAP, NPrCAPがin vitro、in vivo実験系でメラノーマ細胞に対して選択的にある種のリセプター機構を介し濃度依存性に細胞に接着し、その後細胞内に非可逆的に取り込まれる (図25)。

図25



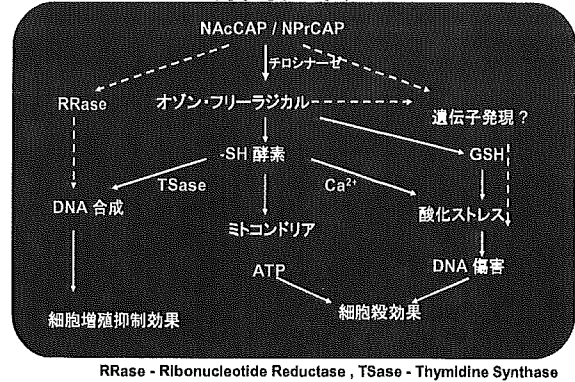
③ NAcCAP, NPrCAPはいずれもメラノーマ細胞に対し、細胞殺効果と細胞増殖抑制効果を有する (図26)。

④ これらメラノジェネシスを標的とした薬剤の抗腫瘍効果にはメラニン形成酵素チロシナーゼと反応した結果生ずる酸化ストレス、熱ショック等

が関係している (図26)。

図26

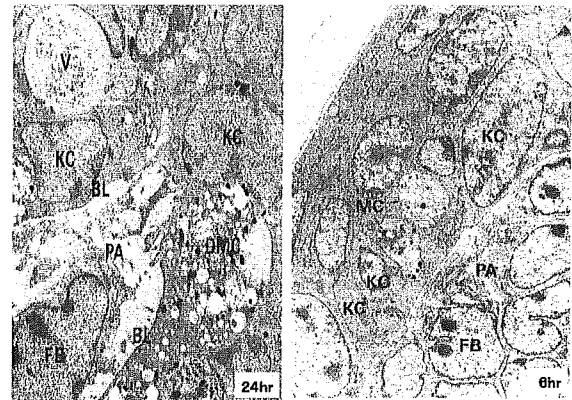
NAcCAP/NPrCAPのメラノサイト・メラノーマ細胞毒性に対するターゲット



⑤ 黒色マウスに10回腹腔内に投与すると全てのマウスに白毛が生じ、更に新生児マウスでは1回投与でメラノサイトの選択的皮膚変化がおり全身が銀色になる (図27)。

図27

システアミルフェノールに対するNAcCAP単回腹腔内投与後の毛母メラノサイト選択的変性



⑥ NAcCAP, NPrCAPは安定な薬剤であり、人体に塗布した場合 (例えば肝斑患者の顔面) 皮膚に無害で脱色効果がある (10年以上の経過観察)。

2) マグネタイト温熱療法

磁場照射に基く温熱を介した細胞殺効果の基礎となる 10nm、磁性ナノ微粒子 (マグネタ

イト) を発熱体とする磁場誘導加温型システムは共同研究者の本多らが開発し、本システムを用い神経性腫瘍の縮小・退縮に成功した。

3) 温熱ショック蛋白 (Heat shock Protein: HSP) と免疫機構

生体に HSP を介した細胞免疫機構、腫瘍免疫が生ずる事は、共同研究者の佐藤らが長年研究をおこなっている。

4) メラノーマのメラノジェネシスに基づく細胞死機構

メラニン形成 (メラノジェネシス) が癌化等の一定の条件下で細胞毒であり、メラノーマ細胞の障害をおこす機序に関しては、共同研究者の山下が研究し、その機序を明らかにしつつある。

2. 本研究の特色・独創性

1) 新規ドラッグ・デリバリー・システム (DDS) の開発

NPrCAP はドラッグ・デリバリー・システムとして最も有効で理想的な薬剤である事は以下の特色に基く。

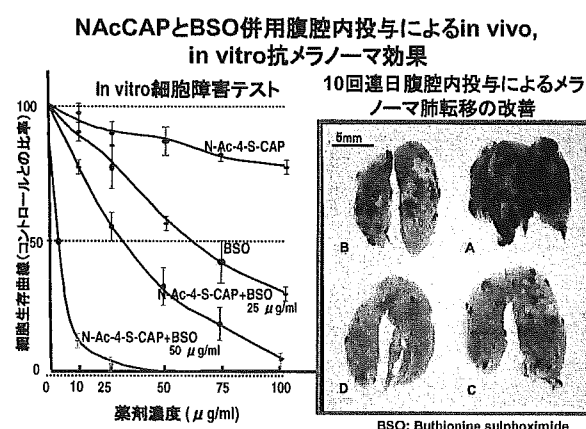
- ① 低分子アミノ酸チロシンのイオウ誘導体であり、人体に全く無害で細胞内への取り込みに問題がない。
- ② メラニン前駆物質であるチロシンより V_{max} , K_m においてはるかに親和性を有するメラニン形成の基質であり (図 21)、メラニン形成細胞に選択的に非可逆的に細胞膜リセプターと考えられる機構を介し細胞膜に接着しその後細胞内に取り込まれる。

2) 全身臓器に全く無害なメラノーマ新規化学・免疫療法剤の開発

In vivo 動物実験下で NPrCAP はメラノーマ以外には取り込まれず、しかも選択的に転移メラノーマの破壊をおこし、化学療法的な機序のみならず腫瘍免疫的な効果も有している可能性がある。

- ① 生後 3 日目の黒色マウスに一回の腹腔内投与を行うと全身の体毛は銀色となり、毛母メラノサイトの選択的破壊が投与 6 時間後に、細胞全体の壊死が 24 時間以内に観察される (図 27)。
- ② NPrCAP は細胞障害性ラジカルの発生を促すラジカル発生惹起剤 (BSO) の併用で著明なメラノーマ壊死を起こさせ、同時に担癌マウスの生存を延長させる (図 28)。

図 28



- ③ このメラノジェネシスを応用したラジカル発生は細胞死、アポトーシス (apoptosis) ではなくむしろネクローシス (細胞壊死: necrosis) に基くものであり、この事は本薬剤が細胞障害性 T 細胞を活性化させ腫瘍免疫を惹起させる可能性も有している。

3) マグネタイトを用いた温熱細胞殺効果と腫瘍免疫機構

- ① マグネタイトは標的化可能な因子との組み合わせで癌細胞への特異的ターゲティングが可能である。一度細胞内に取り込まれ、人体に無浸襲で加温された場合、in situ で最も効率的に、熱ショックたんぱく質 (Heat Shock Protein:HSP) 等を介した細胞破壊を行ない得る。
- ② 結果として直接の細胞殺効果のみならず HSP 発生の結果、間接的に細胞傷害性 T 細胞・サイトカイン等を刺激し遠隔転移巣に対し腫瘍免疫も誘導し得る。

E. 結論

本研究課題を通し、病初期から遠隔転移を起こしやすく最も悪性度の高い癌であるメラノーマに対しメラノジェネシスを標的とした新規ドラッグ・デリバリー・システムと化学温熱免疫療法を開発する。これにより現在、外科的切除以外有効な治療法のないメラノーマの新しい治療体系を確立する。

メラノジェネシスはメラノサイト、メラノーマ細胞に特異な分化形質である。この生物学的過程がこれ等細胞にとりある特殊な条件下 (例えば、胎生期細胞分化・増殖期、一定の毛周期、癌化過程等) で逆に細胞毒である事を我々はすでに確認し、ハイドロキノン、カテコールを用いた研究へと展開し、本研究の基礎となった薬剤の合成と細胞毒性更に化学療法剤 (NAcCAP, NPrCAP) の開発へと進展してきた。

我々の研究成果は以下に要約しえる。

- ① NPrCAP は新規メラノーマ標的 DDS として有効であるばかりでなく、化学療法

的細胞殺効果と再移植メラノーマ増殖抑制効果を有する。

- ② NPrCAP/ML, CML, M の 3 群のメラノーマ標的ナノ微粒子薬剤のうち、NPrCAP/M が最も効率の高い化学温熱細胞殺効果を有する。
- ③ NPrCAP/M は磁場照射によりメラノーマ細胞に対し選択的的化学温熱細胞殺効果と再移植メラノーマ増殖抑制効果を有する。
- ④ NPrCAP/M を 3 回隔日投与し、磁場照射を行うとメラノーマ腫瘍の選択的破壊のみならず細胞性免疫に基づく遠隔転移部位のメラノーマの消失、または発生の予防を期待できる。
- ⑤ NPrCAP/M の急性毒性 (LD₅₀>1,000mg/kg) は既に終了した。現在、ヒト加療用の機器の安全性を検討中で慢性毒性実験を経て臨床治験を平成 18 年度中に開始する予定である。

上記結果は我々の行ってきたメラノジェネシスの基礎生物学の研究がいかにトランスレーショナル リサーチへと昇華しえるかを示したものと考える。

F. 健康危険情報

近年、日本を含め全世界各国に於いてメラノーマ患者の発症率、死亡率が増加している。その原因として生活習慣の変化、日光への暴露機会の増加等が挙げられているが、未だ詳細は明らかでない。白人は 90 人に一人発生する。日本人では 1500 人から 2000 人に一人発生するとされているが、近い将来 1000 人に一人は発生すると予測されている。日本人メラノーマは足底部皮膚、眼球内・口腔・肛門・膣粘膜等の非露光部に発生しやすく、しかもこれら外的刺激を受けやすい解剖学的位置

の関係から、病初期から転移を起こしやすい。本悪性腫瘍は現在のところ、早期外科的切除以外治療がなく、従来の概念にない新規治療法の開発は急務である。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yamada A, Saga K, Jimbow K: Acquired multiple pilosebaceous cysts on the face having the histopathological features of statocystoma multiplex and eruptive vellus hair cysts. *Int J Dermatol* 44(10): 861-863, 2005
- 2) Takenouchi M, Sahara H, Yamamoto Y, Matsumoto Y, Imai A, Fujita T, Tamura Y, Takahashi N, Gasa S, Matsumoto K, Ohta K, Sugawara F, Sakaguchi K, Jimbow K, Sato N: Mechanism of the immunosuppressive effect in vivo of novel immunosuppressive drug beta-SQAG), which inhibits the response of the CD62L+T-Cell subset. *Transplant Proc* 37(1): 139-142, 2005
- 3) Saga K, Jimbow K: Clear reticulated cytoplasm of human eccrine sweat glands: immunohistochemical differentiation from pathological degeneration. *Br J Dermatol* 152(2): 389-391, 2005
- 4) Ogino J, Jimbow K, Ono I, Sakemoto A, Kamiya T, Kaneko R, Hirotsaki K, Saga K, Yamashita T: Pilot study of combined dermoscopy and reflectance confocal microscopy evaluation for the early detection of basal cell carcinoma. *J Am Acad Dermatol* (submitted), 2005
- 5) Jimbow K, Hara H: Management of pigmentary disorders. Editor: Robert E, Rankel, Edward T. Bope, ELSEVIER, Philadelphia (USA), *Conn's Current Therapy* 2006 edition, 1058-1065, 2006
- 6) Imai A, Sahara H, Takenouchi M, Yamamoto Y, Matsumoto Y, Fujita T, Tamura Y, Takahashi N, Gasa S, Matsumoto K, Ohta K, Sugawara F, Sakaguchi K, Jimbow K, Yotsuyanagi T, Sato N: An Immunosuppressive effect by β 0SQAG9 on swine allogeneic skin grafting. 2005 (Submit).
- 7) Inoue H, Yamashita T, Jin HY, Sakauchi F, Kageshita T, Takata M, Saida T, Jimbow K: Unique sequence of MC1R gene in Japanese melanoma; Only Bal92Met is associated with higher susceptibility. *Sapporo Med J*, 2006 (in press)
- 8) Hida T, Yamashita T, Hirotsaki K, Kawakami A, Jin HY, Tosa N, Hitoshi S, Kokai Y, Jimbow K: Dominant negative Rab7 inhibits intracellular transport of tyrosinase-related protein-1, but not Tyrosinase or gp 100, from Golgi to melanosomes. *Sapporo Med J*, 2006 (in press)
- 9) Endo M, Yamashita T, Jin HY, Kamada A, Jimbow K: Functional analysis of human tyrosinase-related protein 1 (TYRP1) by site directed mutagenesis on tyrosinase-mediated melanin production and cytotoxicity. *Exp Cell Res*, 2006 (Submit)
- 10) Hida T, Yamashita T, Hirotsaki K, Kamada A, Jin HY, Tosa N, Hitoshi S, Kokai Y, Jimbow K: Dominant negative Rab 7 induces vesicular transport unique to Tyrp1 compared to other melanosomal proteins, tyrosinase and gp 100 in melanogenesis cascade. *Exp Cell Res*, 2006 (submit)

2. 学会発表

1) Jimbow K, Takada T, Yamashita T, Sato M, Sakemoto A, Matsusaka H, Ono I, Tamura Y, Sato N, Ito A, Honda H, Wakamatsu K, Ito S. "Melanogenesis—targeted drug delivery and chemotherapy system for development of melanoma thermo-chemotherapy using NPrCAP-magnetite nano-particles." 2nd Canadian Melanoma Conference (カナダ バンプ). 2006年3月3日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

1) 私の特許

Title: PHENOLIC AMINE DEPIGMENTING AND ANTIMELANOMA AGENTS

Patent: 3178834 (in Japan), 5925332 (in USA), 2015197 (in Canada), 46522 (in

Philippine), 9604333-6 (in Singapore), 204254 (in South Korean), 82105703 (in Taiwan), 651823 (in Australian)

2) 東レとの特許

Title: メラノーマ標的ナノ微粒子 (NPrCAP/ML)によるメラノーマ温熱免疫療法の開発

(平成16年11月30日までの研究結果データに基づく研究内容)

Patent: 特許第36178834号公報 (特許文献)

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

II . 分 担 研 究 報 告

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）

分担研究報告書

メラノーマ標的ナノ微粒子（NPrCAP/ML）によるメラノーマ温熱免疫療法の開発
～NPrCAP/ML 加温後のメラノーマ機能の分子生物学的変化の解析と臨床治験研究～

分担研究者 山下利春 札幌医科大学皮膚科学講座 助教授

研究の要旨

N-propionyl-cysteaminy-phenol（NPrCAP）は、メラノサイト系細胞に効率よく取り込まれメラニン合成酵素チロシナーゼの基質となると同時に細胞障害活性を示す。本研究は、NPrCAP を発熱体であるナノ微粒子マグネタイト（M）に結合した複合体を合成し、メラノーマ細胞への特異的親和性と発熱による細胞障害効果を検討し、合わせて細胞死の誘導と宿主の免疫誘導が効率よく起こる条件を確立することを目的とする。

B16F1 メラノーマ細胞にマグネタイトリポソーム（ML）、NPrCAP/ML、NPrCAP/M を添加後エッペンドルフチューブに細胞集め、磁場照射して温度上昇を比較検討した。その結果、NPrCAP/M が最も迅速な温度上昇を示した。

メラノーマ細胞の高温感受性を検討する目的で、細胞の 50%以上が障害される 45℃、45 分間処理により、さらに、NPrCAP/M（45mg/ml、30min）処理後に磁場照射（45℃、45 分）し、細胞 DNA の解析を行った。NPrCAP/M 処置と磁場照射では、高温下での培養の場合と同様、細胞 DNA の断片化は認められなかった。これらの結果より、磁性体による発熱も含め、高温による細胞死は DNA の断片化を伴うアポトーシスではなくネクローシスによるものと結論づけた。NPrCAP/M は、NPrCAP/ML と異なり脂質 2 重膜をもたないため、細胞親和性は低下することが推測された。一方、これらの合成体は鉄を含んでおり培地中で沈澱し細胞表面に付着するため、非特異的な細胞吸着が起こることと推測される。そこで、細胞の付着したスライドグラス上を NPrCAP/M を含有する培地を入れた 50ml 遠心管に入れ、15 分間、ゆっくり回転させた後、鉄染色を行う方法で NPrCAP/M の細胞親和性を検討した。その結果、非メラノーマ細胞（MRC5、HeLa、SaOS2）の鉄染色陽性率が 2-5%であったのに比べて、メラノーマ細胞（SK-mel-23、SK-mel-118、MM418、MeWo）では 35%（SK-mel-23）～100%（SK-mel-118）で非メラノーマ細胞に比べ 10 倍以上高率であった。この結果は、NPrCAP/M が沈澱せず浮遊した条件であってもメラノーマ細胞に高率に取り込まれることを示しており、メラノーマ特異的な Drug delivery system として有用であることが示唆される。

A. 研究目的

N-propionyl-cysteaminyl-phenol (NPrCAP) は、メラノサイト系細胞に効率よく取り込まれメラニン合成酵素チロシナーゼの基質となると同時に細胞障害活性を示す。本研究は、NPrCAP を発熱体であるナノ微粒子に結合した複合体を合成し、培養メラノーマ細胞、担癌マウス、ヒトメラノーマを対象として、腫瘍細胞への特異的親和性と発熱による細胞障害効果を検討し、合わせて細胞死の誘導と宿主の免疫誘導が効率よく起こる条件を確立することを目的とする。初年度は培養メラノーマ細胞の高温感受性と高温による細胞死のメカニズムを解析し、さらに NPrCAP 複合体のメラノーマ細胞親和性の検討を行う。以下に項目別の研究目的を記す。

1) NPrCAP マグネタイトリポソーム (NPrCAP/ML) と NPrCAP マグネタイト (NPrCAP/M) の発熱効果の検討:

NPrCAP をマグネタイトリポソームとマグネタイトにそれぞれ結合した複合体、NPrCAP/ML と NPrCAP/M、を合成し、培養メラノーマ細胞に導入して発熱効果を比較検討する。

2) メラノーマ細胞の高温感受性と NPrCAP/M による細胞死過程の検討:

メラノーマ細胞と非メラノーマ細胞を高温で培養し細胞障害の程度を比較検討する。とくに、メラノーマ細胞が非メラノーマ細胞と比較して高温感受性であるか高温抵抗性であるかを複数の細胞株を用いて検討する。また、高温処理および NPrCAP/M 導入と磁場照射によって誘導される細胞死が、アポトーシスで

あるかネクロシスであるかをアガロースゲル電気泳動とフローサイトメトリーによって検討する。

3) NPrCAP/M の細胞親和性および細胞内局在の検討:

NPrCAP/M と NPrCAP/ML は、メラニン合成系を生化学的な受容体としてメラノサイト系細胞に取り込まれると考えられるが、さらに、沈澱と貪食により細胞に取り込まれることが推測される。そこで、培地中での沈澱と非特異的な吸着をできるだけ抑制した条件で、NPrCAP/M の各種細胞取り込み量の検討を行う。

B. 研究方法

1) NPrCAP/ML と NPrCAP/M の発熱効果の検討:

B16F1 マウスメラノーマ細胞にマグネタイトリポソーム (ML)、NPrCAP-マグネタイトリポソーム (NPrCAP/M)、NPrCAP-マグネタイト (NPrCAP/M) をそれぞれ添加し、30 分間静置後、PBS で 2 回洗浄し、2 日間培養した。2 日後、PBS で懸濁して細胞をエッペンドルフチューブに集め、遠心後に得られた細胞ペレットに磁場照射して温度上昇を比較検討した。

2) メラノーマ細胞の高温感受性と NPrCAP/M による細胞死過程の検討:

メラノーマ細胞 (SK-mel-23、SK-mel-24、SK-mel-118、B16F1) と非メラノーマ細胞 (HeLa、SaOS2、T98G) を 45°C で 30~60 分間インキュベートした後、37°C で 2 日間培養し、細胞数を計測することによって高温による細胞死の程度を検討した。さらに、細胞の 50%以上が