

障害される 45°C、45 分間の条件で細胞を高温処置し、一方、アポトーシスのコントロールとしてキメラ p63-p53 遺伝子を導入した細胞を用意し、細胞を集めた後、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細胞 DNA の断片化を検討した。アガロースゲル電気泳動に用いた細胞 DNA は、5mM Tris-HCL/10mM EDTA/0.1% Triton-X 100 溶解バッファーに懸濁後、遠心して核分画を除き、RNase 処理、Proteinase K/SDS 消化の後、フェノール抽出、エタノール沈澱により DNA を精製した。フローサイトメトリーは、細胞を 70%エタノール固定後、細胞 DNA を PI で染色した後 FACs 解析に供した。

3) NPrCAP/M の細胞親和性および細胞内局在の検討：

非メラノーマ細胞 MRC5、HeLa、SaOS2、メラノーマ細胞 SK-mel-23、SK-mel-118、MM418、MeWo に NPrCAP/M を添加して 10-30 分間処置した後、鉄染色により NPrCAP/M を吸着あるいは取り込んだ細胞数を計測した。方法は以下の 2 つの方法を用いた。(1) 通常のプラスチックデイッシュ上に培養した細胞に NPrCAP/M を添加して 10-30 分間、静置後、鉄染色する。(2) スライドガラス上に細胞を培養し、細胞の付着したスライドガラスを 50ml 遠心管に挿入し、低濃度の NPrCAP/M を含有する培地を遠心管に入れ、15 分間、ゆっくり回転させた後、鉄染色により NPrCAP/M の細胞取り込み量を検討する。鉄染色は、細胞をメタノールで 5 分間固定した後、1%フェロシアン化カリウム溶液で 30 分間処理し、ケルンエヒトロート液で核染色を行った。

C. 研究成果及び考察

1) NPrCAP/ML と NPrCAP/M の発熱効果の検討：

B16F1 メラノーマ細胞に 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、磁場照射停止後は速やかに温度の低下がみられた(図 1)。ML、NPrCAP/ML、NPrCAP/M の中では、NPrCAP/M が最も強力で迅速な温熱効果を示すことが見いだされたため、以後の実験は NPrCAP/M を用いて行う事とした。

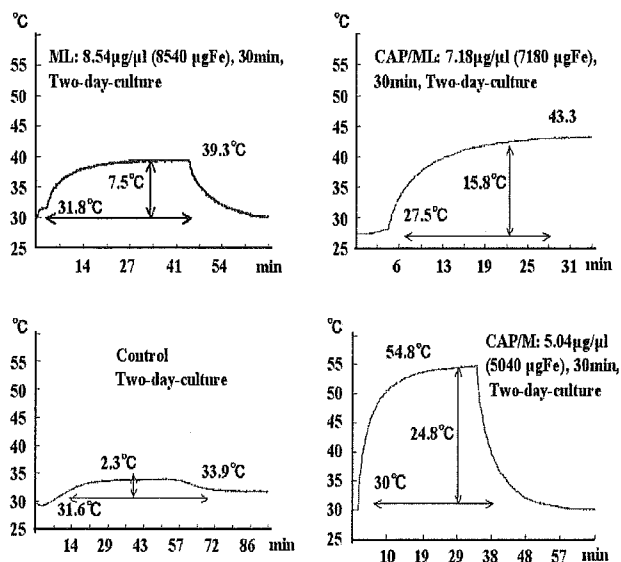


図 1. マウスメラノーマ細胞 B16F1 に対する発熱効果。

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、細胞数を計測した。45°C、60 分間の処置により

40-100%の細胞に細胞死を認め、調べた細胞株のうち、SK-mel-118 (95%) と B16F1 (100%) にとくに高い高温感受性を認めた (図 2)。

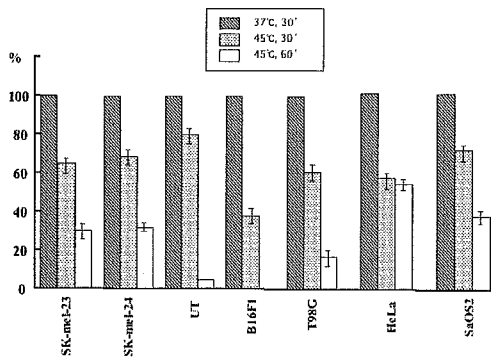


図 2. 各種細胞株の高温感受性.

細胞の 50%以上が障害される 45°C、45 分間処理、およびアポトーシスのコントロールとしてキメラ p63-p53 遺伝子導入の後、細胞を集め、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細胞 DNA の断片化を検討した。これらの実験条件、すなわち 45°C、45 分間処理あるいはキメラ p63-p53 遺伝子導入後 48 時間後には、いずれも培養細胞の約 50% が障害された。SK-mel-24、SK-mel-118、B16F1 のいずれにおいても、高温処理では DNA の断片化も sub-G1 分画の増加も認められなかった。さらに、SK-mel-23 と B16F1 の 2 株に対しては、NPrCAP/M (45mg/ml、30min) 処理後に磁場照射 (45°C、45 分) し、細胞 DNA の解析を行った。キメラ p63-p53 遺伝子発現細胞では、アガロースゲル電気泳動、フローサイトメトリーのいずれにおいても DNA の断片化が観察されたが、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 (図 3A、B)。

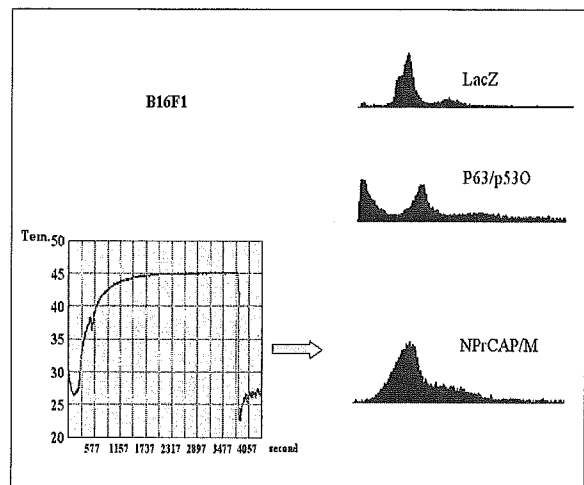
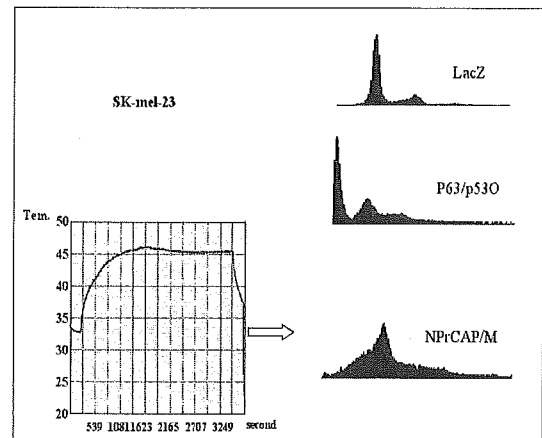


図 3A、B. NPrCAP/M 処理細胞の FACS 解析.

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。

3) NPrCAP/M の細胞親和性および細胞内局在の検討:

NPrCAP/M は、AMF により発熱させると、従来の NPrCAP/ML よりも急速に高温に達するすぐれた磁性体である。しかし、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、(1)通常のプラスチックディッシュ上に培養した細胞に NPrCAP/M を含有する培地添加して取り込みの程度を鉄染色で検討する、(2)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、の 2 つの方法で NPrCAP/M の細胞親和性を検討した。(1)の方法では、メラノーマ細胞と非メラノーマ細胞の間に明らかな差はみられなかったが、(2)の方法では、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。

D. 評価

1) 達成度について

初年度の研究目的の一つであった、メラノーマ親和性をもつナノ微粒子の開発は、発熱効果に優れた NPrCAP/M を見出したことで達成されたと思われる。NPrCAP/M は懸濁性がよいため高濃度の懸濁液を調整することが可能であり、また、NPrCAP/ML に比べて構造が

より単純であるため合成および臨床応用がより容易である。

化学療法であれ温熱療法であれ遺伝子療法であれ、腫瘍細胞をすべて死滅させることはきわめて困難であり、腫瘍細胞の駆逐には宿主の免疫反応に依存せざるを得ない。本研究における NPrCAP/M による細胞死過程の検討によって、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、DNA の断片化を伴わないネクロシスであることが強く示唆された。このことは、NPrCAP/M と磁場照射による温熱療法が、炎症反応を伴う免疫療法として作用することが予測される。

NPrCAP/M 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、鉄を含むため細胞表面に沈澱付着し、そのため、メラノーマ細胞特異的な細胞取り込みを示すことは困難であった。われわれは、沈澱による非特異的吸着をできるだけ抑制した実験条件を開発し、メラノーマ細胞と非メラノーマ細胞間で NPrCAP/M の親和性に差があるかどうかを検討した。その結果、非メラノーマ細胞 (MRC5、HeLa、SaOS2) が 2-5%であったのに比べ、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) の鉄染色陽性率を示し、メラノーマ細胞に高親和性があることが示された。これにより、in vivo 実験においてもメラノーマ特異的なドラッグデリバリーシステムとして有効であることが示唆される。

2) 研究成果の学術的、国際的、社会的意義について

メラノーマは皮膚癌の中でも悪性度が高く、腫瘍が厚いほど、すなわち垂直浸潤の程度が強いほど転移しやすく予後が悪くなる。一方、メラノーマの分化抗原が細胞性免疫の標的になることが知られており、炎症反応を伴うネクロシスを誘導することができれば宿主の細胞性免疫により腫瘍の退縮が期待できる。NPrCAP/M によるメラノーマ特異的なドラッグデリバリーと磁場照射によるメラノーマ細胞の特異的障害によって、細胞死の誘導とともに免疫系が活性化され、効率のよい腫瘍の退縮が期待できる。メラノーマの温熱免疫療法において、細胞死の誘導と免疫系の活性化の2つの抗腫瘍過程の最も効率よい条件を確立することは、メラノーマ治療において最も重要な研究課題であるが、これまで詳細な研究は行われていない。本研究はメラノーマ治療にきわめて重要な研究である。

3) 今後の展望について

本研究によって、NPrCAP/M 温熱療法によるメラノーマ細胞はネクロシスを起こすこと、また、NPrCAP/M がメラノーマ細胞に効率よく取り込まれることが示された。今後は、NPrCAP/M 単独と NPrCAP/M 処理+磁場照射によってメラノーマ細胞に特異的な細胞死が誘導されることを、他の非メラノーマ細胞と比較検討する。また、NPrCAP/M 処理+磁場照射後に培地中にメラノーマ分化抗原が溶出されるかどうかを抗体を用いて検討する。さらに、NPrCAP/M 処理したメラノーマ細胞の電顕写真を撮影して、NPrCAP/M 細胞内局在の検討を行う。

E. 結論

本研究によって、1) M、NPrCAP/ML、NPrCAP/M のうち、NPrCAP/M に最も迅速な発熱作用がみとめられた、2) NPrCAP/M 処理後の磁場照射によるメラノーマ細胞はアポトーシスではなくネクロシスを起こす、3) NPrCAP/M がメラノーマ細胞に効率よく取り込まれること、の3点が明かとなった。NPrCAP/M はメラノーマ特異的な Drug delivery system であり、メラノーマ特異的な温熱療法の治療薬であり、宿主に免疫反応を誘導しうることが示唆された。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Khan MMH, Hossain MK, Kobayashi K, Sakauchi F, Yamashita T, Feroze Ahmed M, Hossain MD, Quamruzzaman Q, Mori M: Levels of blood and urine chemicals associated with longer duration of having arsenicosis in Bangladesh. *Int J Environ Health Res* 15: 289, 2005.
- 2) Kamiya T, Saga K, Yanagisawa K, Yamashita T, Jimbow K: Small cell variant of CD30-positive primary cutaneous T-cell lymphoma with epidermotropism that

completely regressed after incisional skin biopsy. Br J Dermatol, 2006 (in press).

- 3) King KE, Ponnampereuma RM, Gerdes MJ, Tokino T, Yamashita T, Baker CC and Weinberg WC: Unique domain functions of p63 isotypes that differentially regulate distinct aspects of epidermal homeostasis. Carcinogenesis, 2006 (in press).

2. 学会発表

特になし

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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
～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～

分担研究者 本多 裕之 名古屋大学大学院工学研究科 教授
井藤 彰 名古屋大学大学院工学研究科 助手

研究要旨

メラノーマ細胞特異的親和性を有するシステアミニール・フェノール（cysteaminyl phenol: CAP）と細胞内温熱効果を有する磁気ナノ微粒子（マグネタイト）を結合させた薬剤を3種類設計した。一つは、マグネタイトを中性のリポソームで包埋して、CAP類の1つであるNPrCAPをリポソーム表面に結合させたNPrCAP/MLであり、リポソームを利用することで細胞とマグネタイト間の有機-無機親和性を向上させることができる。2種類目は、NPrCAPを共有結合で直接マグネタイトに結合させたNPrCAP/Mであり、合成が簡便で、将来のGMP規格での合成を考えた場合に有利である。3種類目は、CAPを正電荷脂質膜に埋め込みマグネタイトを内封してリポソーム化した4-S-CAP包埋型MLであり、この薬剤はCAPが表面に突出していないためにメラノーマ細胞との親和性が劣ることが考えられるが、表面に正電荷を持たせてあるため、細胞との親和性が高くなるように設計した。

さらに、これら3つの薬剤の内、本分担グループでは、4-S-CAP包埋型MLに関して、B16メラノーマ細胞における抗腫瘍効果を検討した。4-S-CAP包埋型MLをB16の培養液中に添加したところ、4-S-CAPの殺細胞効果が濃度依存的に確認された。さらに、その細胞に交番磁場を照射したところ、マグネタイトが発熱することで、温熱療法が可能であった。これらのin vitro実験の結果から、4-S-CAP包埋型MLはCAPによる化学療法とマグネタイトによる温熱療法を同時に可能にする素材であることが分かった。さらにこの素材の抗腫瘍効果を調べるためにin vivoの実験を行った。B16担癌マウスに4-S-CAP包埋型MLを局注して、さらに交番磁場を照射したところ、無治療のマウス、4-S-CAP包埋型MLを投与しただけのマウス、および温熱療法のみを施したマウスと比較して、有意に腫瘍体積増加を抑制した。これらの結果から、CAP化合物とマグネタイトを含むナノパーティクルは、メラノーマ治療において強い抗腫瘍効果を示すことが期待される。

A. 研究目的

メラノーマ特異的なドラッグデリバリーシステムと薬剤・温熱さらにはそれに付随する免疫効果といった高い抗腫瘍効果を同時に発揮するナノメディシンの開発を目指して、メラノーマ細胞特異的親和性・殺細胞効果を有するシステアミンール・フェノール (cycteaminyl phenol: CAP) と、細胞内温熱効果を有する磁気ナノ微粒子 (マグネタイト) を結合させた薬剤を3種類設計した。一つは、マグネタイトを中性のリポソームで包埋して、CAP 類の一つである NPrCAP をリポソーム表面に結合させ、突出させた NPrCAP/ML であり、リポソームを利用することで細胞とマグネタイト間の有機-無機親和性を向上させることが期待できる。2種類目は、NPrCAP を、アミノシランカップリングを介した共有結合で、直接マグネタイトに結合させた NPrCAP/M であり、合成が簡便で、将来の GMP 規格での合成を考えた場合に有利である。3種類目は、CAP を正電荷脂質膜に埋め込みマグネタイトを内封してリポソーム化した 4-S-CAP 包埋型 ML であり、この薬剤は CAP が表面に突出していないために、先述の NPrCAP/ML に比してメラノーマ細胞との親和性が劣ることが考えられるが、リポソーム表面に正電荷を持たせてあるため、細胞との親和性が高くなるように設計し、本分担グループでは、マグネタイトを出発物質とした化学合成、具体的にはマグネタイトのリポソーム化あるいはアミノシラン化、といった合成プロセスを担当した。

さらに、これら3つの薬剤の内、本分担グループでは、4-S-CAP 包埋型 ML に関して、B16 メラノーマ細胞に対する抗腫瘍効果を *in vitro* および *in vivo* で検討した。

B. 研究方法

B-1 3種類の薬剤の合成

3種類の薬剤の概略図を図1に示す。

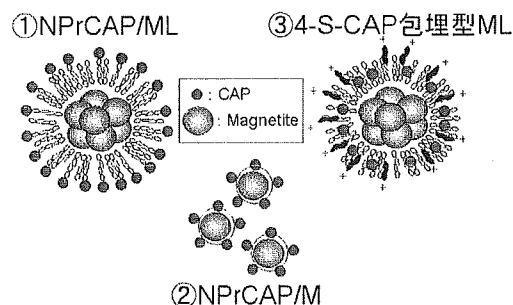


図 1 三種類の薬剤。① NPrCAP/Magnetoliposome (ML) は、マグネタイトを核に、リポソームで覆われており、表面に CAP が結合している。② NPrCAP/Magnetite (M) は、マグネタイトをアミノシランでコートして、その表面に CAP が結合している。③ 4-S-CAP 包埋型 ML は、マグネタイトを核に、正電荷脂質で覆われており、疎水性の CAP は脂質二重膜内に包埋されている。

① NPrCAP/ML の作製

PC (SIGMA), PE (東京化成), DPPE-propyl maleimide (日本油脂) をクロロホルム中で溶解して、ナス型フラスコ内 40°C で1時間エバポレートすることでクロロホルムを揮発させ、さらに 4°C のデシケーター内で半日以上保存することで脂質膜を作った。さらに、予め洗浄して濃度を合わせた水分散マグネタイト (戸田工業) を、ナス型フラスコの脂質膜に添加し、15分かけて激しくボルテックスミキサーにかけ、さらに超音波処理 (28W) を20分間行うことで、マレイミド基が突出したマグネトリポソーム (ML) を作製し、藤田保健衛生大学の研究分担グループに送った。

② NPrCAP/M の作製

10 nm の酸化鉄ナノ粒子 (Fe_3O_4) であるマグネタイト表面の水酸基に、アミノシランカップリング剤 (3-aminopropyltriethoxysilan, 東京化成) を結合させることでアミノ基を導入し、スクシン

イミド基とマレイミド基を両端に持つ化合物 (Sulfo-GMBS, PIERCE) を反応させることで、マグネタイト表面にマレイミド基を導入し、結果として無機金属化合物であるマグネタイトの表面に有機化合物である CAP 化合物を結合させる方法を提案し、合成することに成功した。これを藤田保健衛生大学の研究分担グループに送った。

③ 4-S-CAP 包埋型 ML

DLPC (日本油脂), DOPE (日本油脂), TMAG (相互薬工), 4-S-CAP (札幌医大のグループより供与頂いた) をメタノール中で溶解して、ナス型フラスコ内 40°C で 1 時間エバポレートすることでメタノールを揮発させ、さらに 4°C のデシケーター内で半日以上保存することで 4-S-CAP を含む脂質膜を作った。さらに、予め洗浄して濃度を合わせた水分散マグネタイト (戸田工業) を、ナス型フラスコの脂質膜に添加し、15 分かけて激しくボルテックスミキサーにかけ、さらに超音波処理 (28W) を 20 分間行うことで、4-S-CAP が包埋されたマグネトリポソーム (ML) を作製した。作製した 4-S-CAP 包埋型 ML を動的光散乱による粒径測定 (FPAR-700S, 大塚電子) に供した。

B-2 4-S-CAP 包埋型 ML を用いたガン治療実験

1. in vitro 実験

4-S-CAP 包埋型 ML を上述の方法で作製する際に、4-S-CAP の添加量を変えた薬剤を 25-400 μM に変えて作製し、濃度の異なる 4-S-CAP 包埋型 ML を作製した。これらを B16 メラノーマ細胞に添加して、2 日後の細胞数をトリパンブルー色素排除法で測定することで、4-S-CAP 包埋型 ML としてリポソーム表面に固定化した 4-S-CAP の抗メラノーマ殺細胞活性を評価した。

B16 細胞内への 4-S-CAP 包埋型 ML の取り込み

量測定は、150 pg-magnetite/cell (4S-CAP としては 100 μM) の濃度で B16 細胞に添加し、24 時間培養後に細胞内鉄濃度をチオシアン酸カリウムによる比色法により測定した。

in vitro における磁場印可に伴う発熱実験は、マグネタイトを取り込んだ細胞を培養皿からはがして回収し、PBS で細胞を洗浄した後、細胞数を 3×10^7 cells に調製してペレットにした。このペレットに対して、高周波磁場発生装置 (第一高周波工業) を用いて磁場照射 (360kHz, 5kW) を 30 分間行った。磁場照射時の細胞ペレットの温度は、光ファイバー温度計 (安立計器) で測定した。磁場照射後の細胞数の経時変化は、細胞を培養皿に再播種して、1 日後および 2 日後の細胞数をトリパンブルー色素排除法で評価した。

2. in vivo 治療実験

B16 メラノーマ細胞を C57B1/6 マウスに移植し、腫瘍径が 5 mm になった時、4-S-CAP 包埋型 ML (20 mg-magnetite/ml (0.15ml)) を腫瘍に直接注入して、高周波磁場 (360kHz, 5kW) を 30 分間照射した (day 0)。さらに翌日、もう一度 4-S-CAP 包埋型 ML (20 mg-magnetite/ml (0.15ml)) を腫瘍に注入して、高周波磁場 (360kHz, 5kW) を 30 分間照射した (day 1) といった治療実験を行い、腫瘍径を 2 日ごとに計測していくことで治療効果を調べた。

(倫理面への配慮)

ヒトに関連した実験ではないので、特に倫理面への配慮は必要ないと考えられる。

C. 研究結果

C-1 3 種類の薬剤の合成

NPrCAP/ML, NPrCAP/M, 4-S-CAP 包埋型 ML の 3 種類の薬剤の合成 (前者 2 つは中間体) に成功した。

薬剤の水分散性としては、NPrCAP/M が最も高かった。また、NPrCAP/ML, NPrCAP/M に関しては、研究分担グループである藤田保健衛生大学によって完全に合成され、さらに札幌医科大学のグループにより、in vivo での抗腫瘍効果が確かめられた。

4-S-CAP 包埋型 ML に関しては、本研究分担グループが全て合成を行った。動的光散乱による粒径測定の結果、4-S-CAP 包埋型 ML の平均粒子径は 403.8 ± 39.3 nm であった。

C-2 4-S-CAP 包埋型 ML を用いたガン治療実験

1. in vitro 実験

4-S-CAP 包埋型 ML を B16 の培養液中に添加したところ、4-S-CAP の殺細胞効果が濃度依存的に確認された (図 2)。

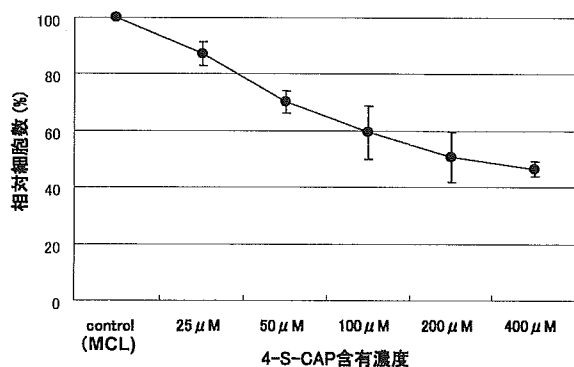


図 2 4-S-CAP 包埋型 ML の濃度依存的な抗メラノーマ殺細胞活性。4-S-CAP 包埋型 ML に含まれる 4-S-CAP 単独による薬効が、濃度依存的に見られた。

また、4-S-CAP 包埋型 ML を B16 の培養液中に添加して、細胞内へのマグネタイトの取り込み量について調べたところ、18 pg/cell が細胞に取り込まれていた。さらに、その細胞に交番磁場を照射したところ、マグネタイトが発熱することで、ペレット全体が 43°C に加温された (図 3)。

磁場照射による温度変化(n=3)

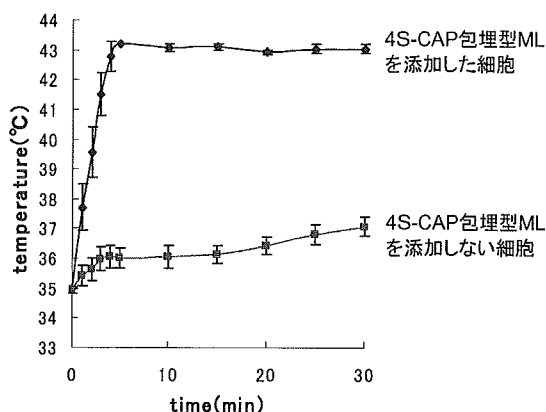


図 3 in vitro における細胞発熱実験。磁場照射により、4-S-CAP 包埋型 ML を投与した細胞では 43°C まで発熱した。一方、4-S-CAP 包埋型 ML を投与しない細胞では温度上昇は見られなかった。

さらに、磁場照射後の細胞を培養皿に再播種して、細胞数の経時変化を測定したところ、4-S-CAP 包埋型 ML における「4-S-CAP」のもつ殺細胞効果と「マグネタイト」による温熱療法による殺細胞効果に相加効果があることが分かった。

これらの in vitro の結果から、4-S-CAP 包埋型 ML は CAP による化学療法とマグネタイトによる温熱療法を同時に可能にする素材であることが分かった。

2. in vivo 治療実験

この素材の抗腫瘍効果を調べるために in vivo の実験を行った。B16 担癌マウスに 4-S-CAP 包埋型 ML を局注して、さらに交番磁場を照射したところ、腫瘍局所の温度は、磁場照射開始 5 分以内に 45°C まで上昇した。無治療のマウス、4-S-CAP 包埋型 ML を投与しただけのマウス、および 4-S-CAP を含まないマグネタイトカチオニックリポソームによる温熱療法のみを施したマウスの腫瘍と比較して、有意に腫瘍体積増加を抑制し (図 4)、6 匹中の 1 匹の腫瘍は完全に退縮した。

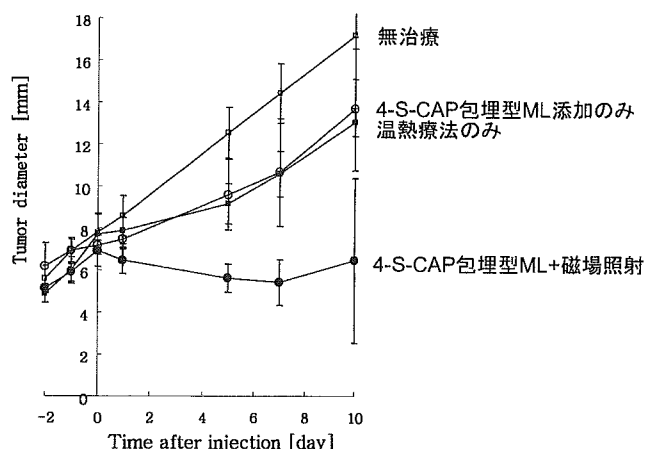


図4 in vivoにおける抗腫瘍効果。4-S-CAP 包埋型 ML を投与して磁場照射を行うことで、有意な抗腫瘍効果が見られた。

これらの結果から、CAP 化合物とマグネタイトを含むナノパーティクルは、メラノーマ治療において強い抗腫瘍効果を示すことが期待される。

D. 考察

D-1 3種類の薬剤の設計・合成

本研究では、3つのタイプのことなる新規薬剤を合成し、4-S-CAP 包埋型 ML においては局注での抗腫瘍効果を確認した。今後、最終目標である血中投与において、メラノーマ細胞に集積させるドラッグデリバリーシステムを完成させるには、さらなる工夫が必要となる。具体的には、血中での安定性および細網内皮系への取り込みの回避を考える必要がある。現在、さらに3つのタイプの薬剤に対して、ポリエチレングリコールを表面に導入して、これらの問題を回避する実験を行っている。

D-2 4-S-CAP 包埋型 ML を用いたガン治療実験

本研究では、4-S-CAP 包埋型 ML の 4-S-CAP 部分の効果とマグネタイトによる温熱療法の効果の相加効果をみるために、温熱療法の温度を

45℃に設定した。しかし、マグネタイトによる発熱は 45℃以上に設定することも可能であり、46℃以上に加温すると全てのマウスの腫瘍が完全に退縮するという結果も得られている。したがって、マグネタイトを用いた温熱療法単独でもメラノーマ治療に対してかなり高い効果が期待できるが、さらに 4-S-CAP が併用されることで、相加効果によって、より強力な治療法が確立されると考えられる。

E. 結論

CAP 化合物とマグネタイトを含む3種類の新しいナノメディシンを設計し合成することに成功した。また、マウスのメラノーマにおける動物実験における検証で、CAP 化合物とマグネタイトを含むナノパーティクルは、メラノーマ治療において強い抗腫瘍効果を示すことが示唆された。

F. 健康危険情報

(分担研究報告書には記入せずに、総括研究報告書にまとめて記入)

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ito A, Kobayashi T, Honda H. A mechanism of antitumor immunity induced by hyperthermia, *Japanese Journal of Hyperthermic Oncology*, 21(1), 1-11 (2005)
- 2) Tanaka K, Ito A, Kobayashi T, Kawamura T, Shimada S, Matsumoto K, Saida T, Honda H. Intratumoral injection of immature cells enhances antitumor effect of hyperthermia using magnetic nanoparticles, *Int. J Cancer*, 116, 624-633 (2005)
- 3) Ito A, Nakahara Y, Fujioka M, Kobayashi T, Takeda K, Nakashima I, Honda H. Complete

- regression of hereditary melanoma in a mouse model by repeated hyperthermia using magnetite cationic liposomes, Japanese Journal of Hyperthermic Oncology, 21(3), 139-149(2005)
- 4) Tanaka K, Ito A, Kobayashi T, Kawamura T, Shimada S, Matsumoto K, Saida T, Honda H. Heat immunotherapy using magnetic nanoparticles and dendritic cells for T-lymphoma. J Biosci Bioeng. 100(1), 112-115(2005)
- 5) Ito A, Fujioka M, Tanaka K, Kobayashi T, Honda H. Screening of cytokines to enhance vaccine effects of heat shock protein 70-rich tumor cell lysate. J Biosci Bioeng. 100(1), 36-42(2005)
- 6) Ito A, Shinkai M, Honda H, Kobayashi T. Medical application of functionalized magnetic nanoparticles. J Biosci Bioeng. 100(1), 1-11(2005)
- 7) Kawai N, Ito A, Nakahara Y, Futakuchi M, Shirai T, Honda H, Kobayashi T, Kohri K. Anticancer effect of hyperthermia on prostate cancer mediated by magnetite cationic liposomes and immune-response induction in transplanted syngeneic rats. Prostate. 64(4), 373-381(2005)

2. 学会発表

- 1) Tanaka K, Ito A, Kobayashi T, Kawamura T, Shimada S, Matsumoto K, Shimada T, Honda H "Immunotherapy for melanoma using hyperthermia with magnetic nanoparticles and dendritic cells" 12th European Congress on Biotechnology (デンマーク コペンハーゲン) 2005年8月21日
- 2) 井藤 彰、中原陽子、藤岡正剛、小林 猛、武田湖州恵、中島 泉、本多裕之「RETトランスジェニックマウスに発生したメラノーマに対する磁性微粒子を用いた温熱療法の治療効果」 第64回日本癌学会学術総会 (札幌) 2005年9月14日
- 3) 井藤 彰、田中功二、小林 猛、川村龍吉、島田眞路、松本和彦、斎田俊明、本多裕之「未熟樹状細胞を用いた Heat Immunotherapy の開発」日本ハイパーサーミア学会第22回大会 (岡山) 2005年9月23日

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
なし。
2. 実用新案登録
なし。
3. その他
なし

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：ナノメディシン分野）
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
～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～

分担研究者 若松 一雅 藤田保健衛生大学衛生学部 教授
伊藤 祥輔 藤田保健衛生大学衛生学部 教授

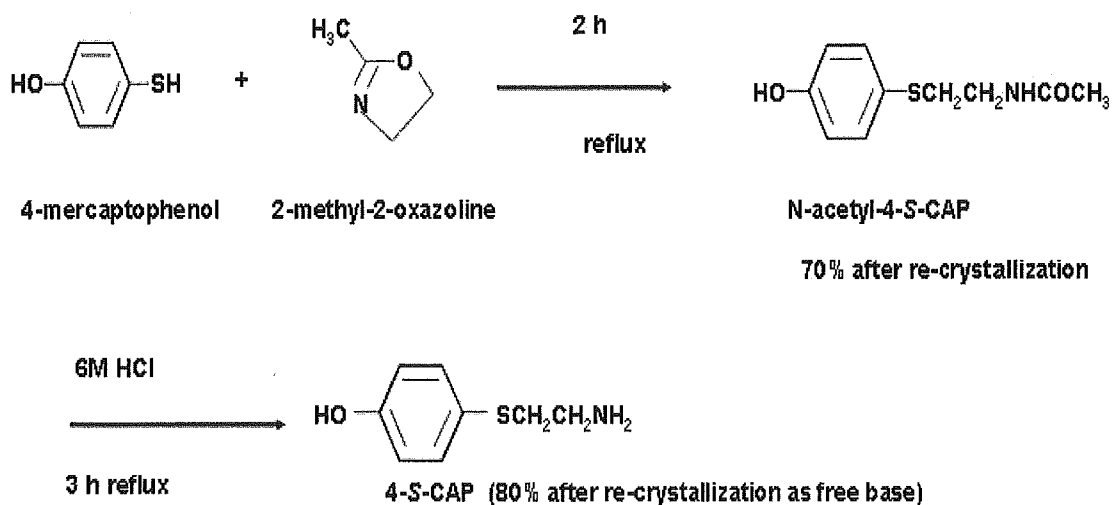
研究要旨

本研究は、N-(1-mercaptopropionyl)-4-S-cysteaminylphenol (NPrCAP-SH)を標的ドラッグ・デリバリー剤としたマグネトリポソーム (ML) および直接結合型マグネタイト (M) を合成することを目的とした。文献既知の方法で4-S-cysteaminylphenol (4-S-CAP)を合成後、2段階40%の収率で目的物質 NPrCAP-SH を合成した。このものを分担研究グループである名古屋大学大学院工学研究科本多教授の研究室で合成されたマグネトリポソーム (ML) および直接結合型マグネタイト (M) と反応させ NPrCAP-SH/ML および NPrCAP-SH/M を合成した。さらに NPrCAP-SH/M がチロシナーゼの基質になりうるかどうか検討した。

A. 研究目的

N-(1-mercaptopropionyl)-4-S-cysteami
nylphenol (NPrCAP-SH)を標的ドラッグ・
デリバリ剤としたマグネトリポソーム
(ML)および直接結合型マグネタイト (M)
を合成し、マグネトリポソーム結合型
NPrCAP-SH/ML と直接結合型マグネタイト
NPrCAP-SH/M を実験材料として供給した。
さらに NPrCAP-SH/M がチロシナーゼの基
質となりうるかどうか検討した。

図 1



つづいて、4-S-CAP は
N-succinimidyl-3-[(2-pyridyl)dithio]
propionate (SPDP) とピリジン中、室温で
2時間反応させた後、カラムクロマトグ
ラフィー(酢酸エチル:n-ヘキサン(2:1))
で精製後、メタノール中ジチオトレイ
ール (DTT) と室温で2時間反応させ、得

B. 研究方法および結果

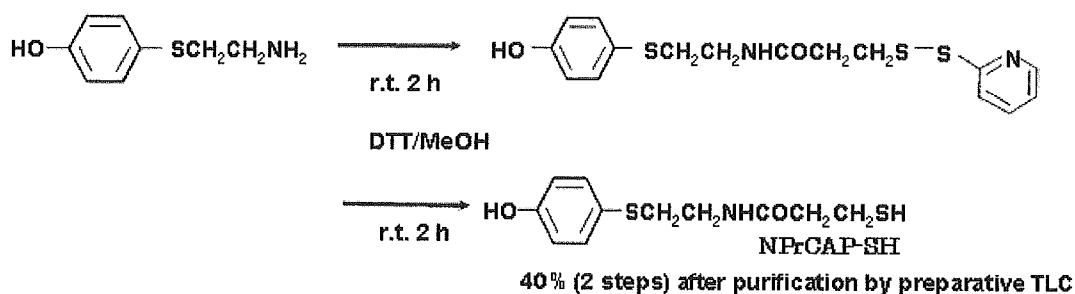
1) N-(1-mercaptopropionyl)-4-S-CAP の 合成

Padgette らの文献 (J. Med. Chem.,
27: 1354-1357, 1984) に従い、
4-mercaptophenol と
2-methyl-2-oxazoline を2時間還流させ、
N-アセチル-4-S-CAP を再結晶後70%の収
率で得た。このものを6M塩酸で3時間還
流させ、目的物の4-S-CAP を再結晶後、
80%の収率で得た (図1)。

られた目的物質

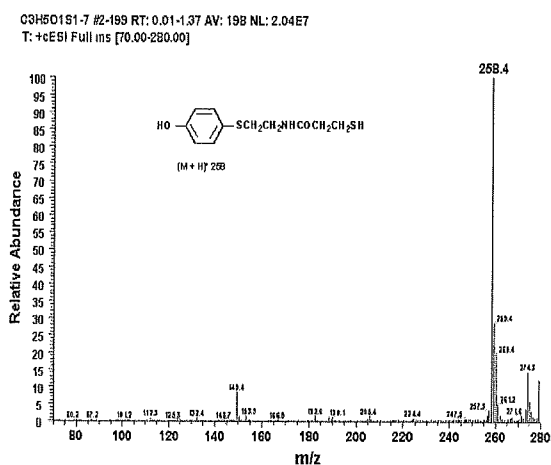
N-(1-mercaptopropionyl)-4-S-CAP
(NPrCAP-SH) をカラムクロマトグラフィー
(酢酸エチル:n-ヘキサン(3:1)) で
精製後、40%の収率(2段階)で得た(図
2)。

図 2



得られた目的物質は、ESI マススペクトルメトリーによる MS/MS 法により、同定した ((M+H)⁺: 258, 164, 153, 132, 125) (図 3)。

図 3



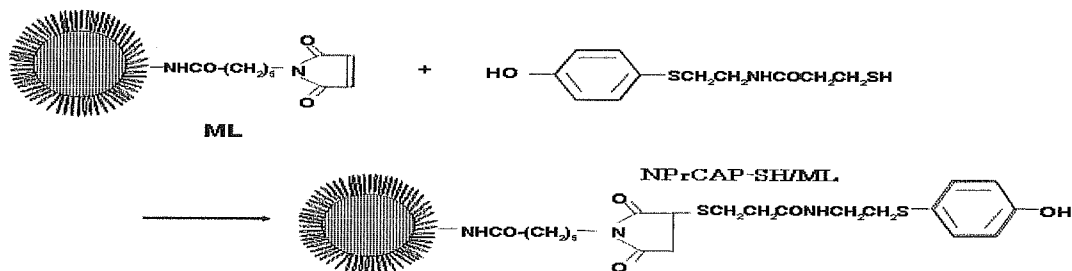
2) 結合型マグネトリポソーム

N-(1-mercaptopropionyl)-4-S-CAP (NPrCAP-SH/ML) の合成

名古屋大学大学院工学研究科本多研究室で合成されたマグネトリポソーム (ML) (40 mg/ml) 1ml に NPrCAP-SH (10 mg/ml メタノール溶液) 100 μ l 加えて、室温で

10 分間攪拌後、4 $^{\circ}$ C の冷蔵庫で一晩放置した。その後、3000 rpm/min で遠心、MilliQ-水による洗浄を 3 回繰り返した後、MilliQ-水 10 ml で懸濁させた。合成した NPrCAP-SH/ML を札幌医科大学へ郵送した (図 4)

図 4

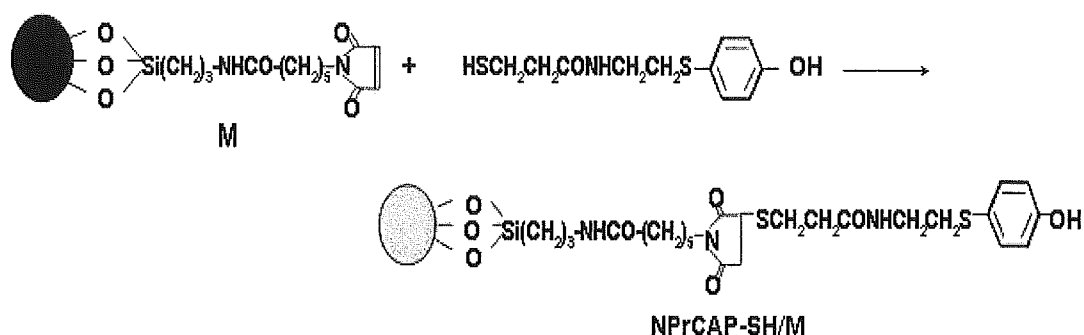


3) NPrCAP-SH 直接結合型マグネタイト (NPrCAP-SH/M) の合成

名大本多研究室で合成された直接結合型マグネタイト (M) (40 mg/ml) 1ml に NPrCAP-SH (10 mg/ml メタノール溶液) 100 μ l を加えて、室温で 10 分攪拌後、4 $^{\circ}$ C

の冷蔵庫で一晩放置した。その後、3000 rpm/min で遠心、MilliQ-水による洗浄を 3 回繰り返した後、MilliQ-水 10 ml で懸濁させた。合成した NPrCAP-SH/M を札幌医科大学へ郵送した (図 5)。

図 5

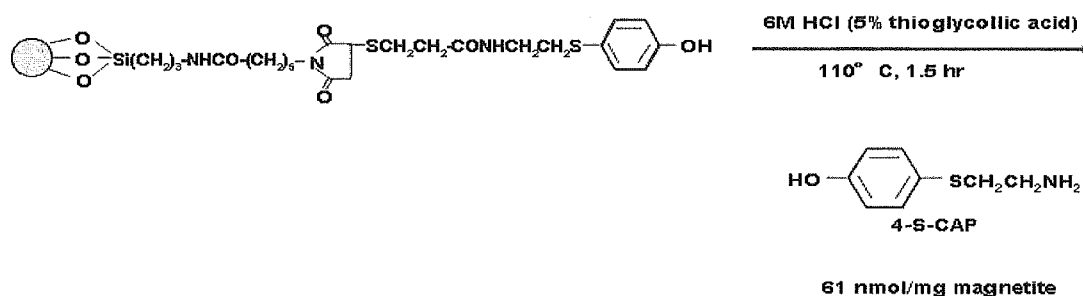


4) NPrCAP のマグネタイトへの取り込み量

NPrCAP-SH のマグネタイトへの取り込み量は、NPrCAP-SH/M を 6M 塩酸 (5% チオグリコール酸を含む) で 110 $^{\circ}$ C、1.5

時間反応させ、生成する 4-S-CAP 量を HPLC で定量することにより求めた。その結果、マグネタイト 1mg あたり 61 nmol の NPrCAP-SH が結合していることがわかった (図 6)。

図 6



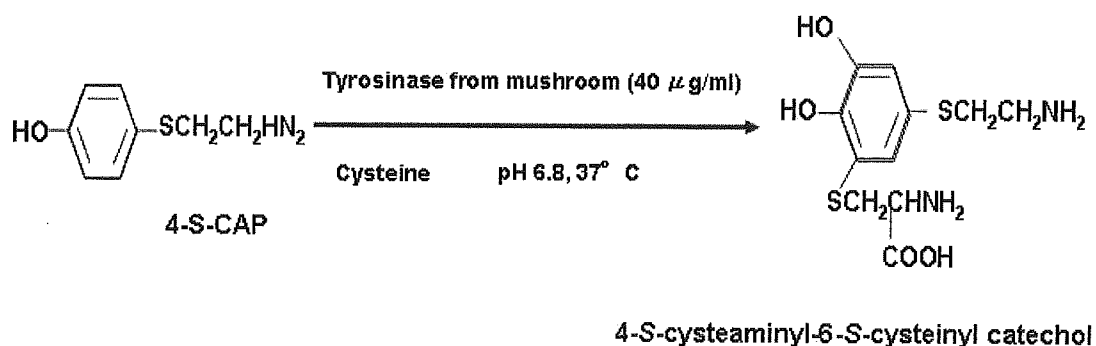
HPLC の分析条件: column: Capcel pak (C₁₈)、移動相: メタノール: 水: 1M-HClO₄ (10 : 90 : 1.5 by vol.)、流速: 0.7 ml/min、検出器: UV (250 nm)、カラム温度: 50 $^{\circ}$ C

5) 4-S-CAP のチロシナーゼ酸化

NPrCAP-SH/M のチロシナーゼ酸化による従来法のキノン体の生成量を測定する方法では、基質が黒色懸濁液のため使用できない。そこで、NPrCAP-SH/M は4-S-CAP 部分を含むので、NPrCAP-SH/M の

チロシナーゼ酸化を行なう前に、4-S-CAP のチロシナーゼ酸化を検討した。0.1 mM 4-S-CAP を0.2 mM システイン共存下、マッシュルームチロシナーゼ (40 μ g/ml) 酸化すると (図7)、反応は10分で終了した。

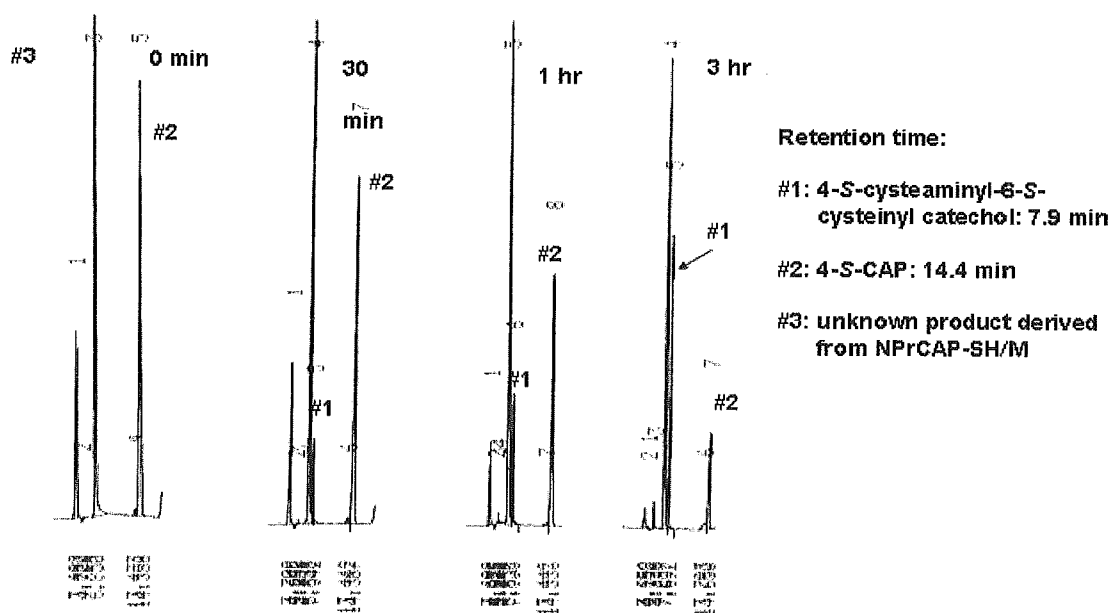
図7



酸化により生成した 4-S-cysteaminylnyl-6-S-cysteinyl

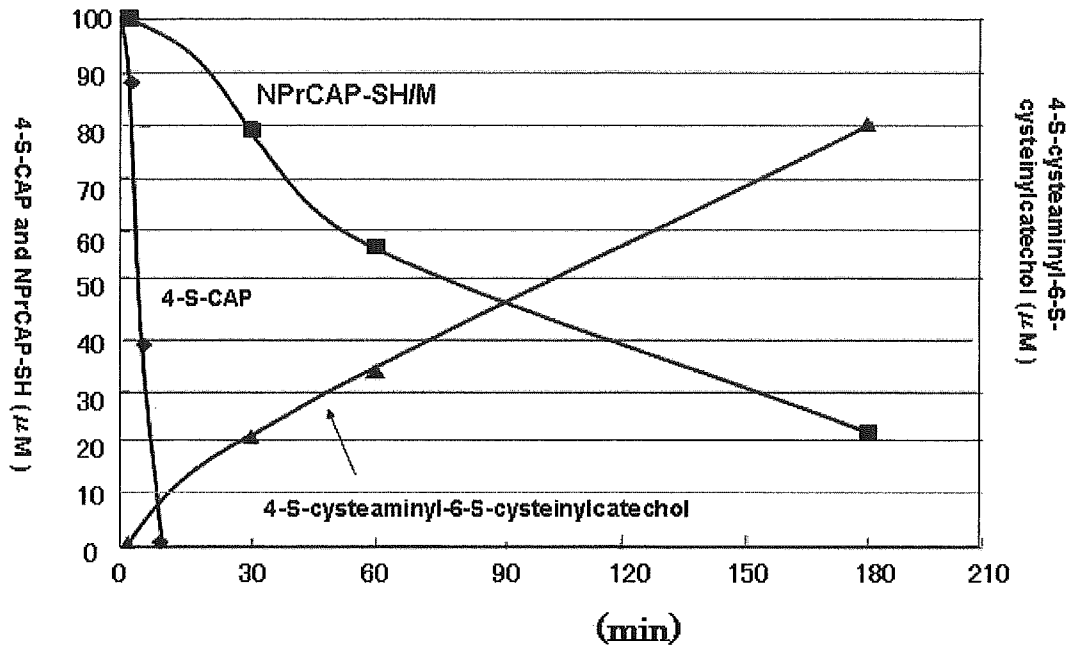
catecholはHPLCの分析より7.9分の保持時間であった (図9)。

図9



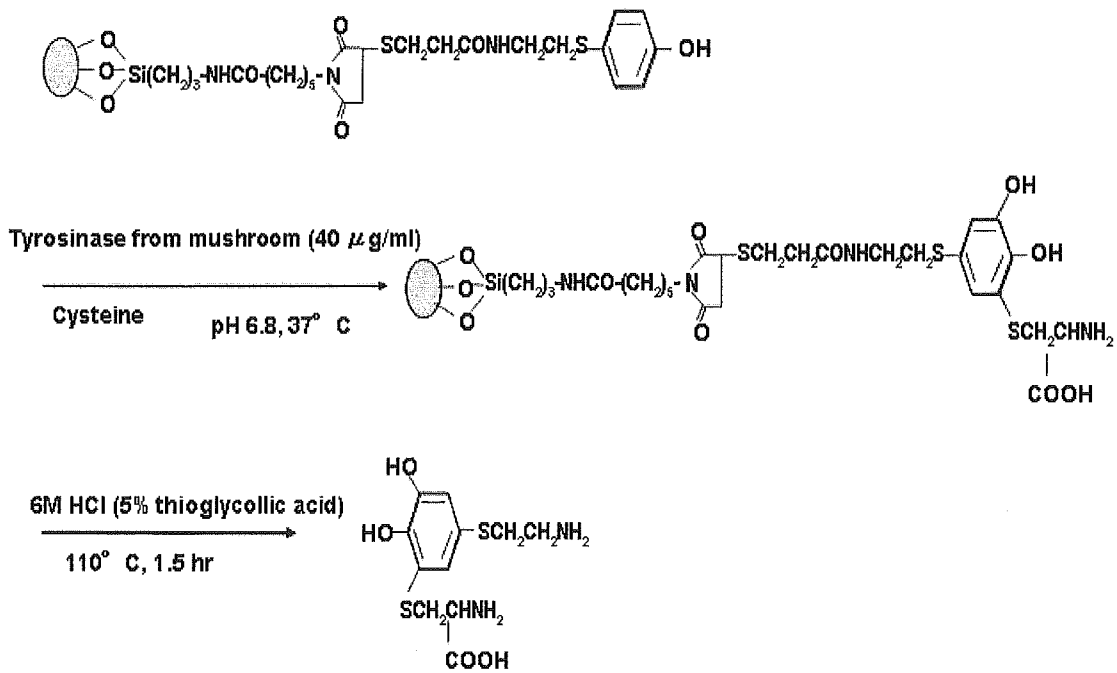
なお、初期濃度が半分になる時間は、4.2 分であった (図 10)。

図 10



6) NPrCAP-SH/M のチロシナーゼ酸化 (図 8)

図 8



NPrCAP-SH/M 0.1 mM を 0.2 mM システイン共存下、マッシュルームチロシナーゼ (40 μ g/ml) で酸化し、30分、1時間、3時間反応させた。反応生成物を 6M 塩酸 (5%チオグルコール酸を含む) で 110°C、1.5 時間反応させ HPLC で分析後 (図 9)、残存する 4-S-CAP 量と生成する 4-S-cysteaminyll-6-S-cysteinyll catechol 量を測定した。NPrCAP-SH/M の初期濃度が半分になる時間は、69 分であ

C. 考察

今後の検討課題として、1) 直接結合型マグネタイト (NPrCAP-SH/M) が mammalian チロシナーゼの基質になりうるかどうかを検討する。2) NPrCAP-SH/M とチロシナーゼ酸化して得られたシステイン付加体の 4-S-cysteaminyll-6-S-cysteinyll catechol 体を HPLC 分取し、質量分析法により同定する。3) マグネタイトに被覆させた側鎖をシラノールからポリエチレングリコール (PEG) にかえた新しいマグネタイトを合成し、それと NPrCAP-SH と反応させた化合物を従来のものと比較する。

D. 結論

結合型マグネトリポソーム NPrCAP-SH/ML と直接結合型マグネタイト NPrCAP-SH/M を合成した。さらにこのうち NPrCAP-SH/M がチロシナーゼの基質になりうる事が判明した。

った (図 10)。この結果から、4-S-CAP/(NPrCAP-SH/M) の反応速度の比は、16.4 になった。一方、生成した 4-S-cysteaminyll-6-S-cysteinyll catechol 量は時間とともに増加し、3時間後、80 μ M となった (図 10)。以上の事から、NPrCAP-SH/M がチロシナーゼの基質になる事がわかった。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表
特になし

2. 学会発表
特になし

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
なし

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

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 HSP を介した腫瘍免疫機構の解析に関する研究～

分担研究者 佐藤昇志 札幌医科大学病理学第一講座 教授
 田村保明 札幌医科大学病理学第一講座 講師

研究要旨

メラノーマ特異的に標的可能な NPrCAP/M によりメラノーマを選択的に targeting し、磁場照射による細胞内温熱療法（intracytoplasmic hyperthermia）により細胞の壊死を惹起し、細胞外微少環境にメラノーマ由来の HSP-ペプチド複合体が放出されることによる腫瘍免疫応答が誘導しうるかについて検討した。これらの免疫応答反応は全身性の免疫応答を誘導するものであるから、温熱療法による局所治療のみならず、生命予後を左右する肺、肝臓、脳などの遠隔転移巣に対しても抗腫瘍効果を期待できるものである。

A. 研究目的

NPrCAP/M を用いた温熱療法メカニズムを免疫学的な手法を用いて解析する。

(研究の背景)

我々は、これまでウイルス感染による細胞傷害や癌組織における虚血によって引き起こされる壊死の際に、細胞外微小環境(niche)に熱ショック蛋白質(HSP)-peptide 複合体が放出され、これが danger signal として樹状細胞を介する自然免疫反応を活性化し、同時に HSP 結合ペプチドがクロスプレゼンテーションされ、細胞傷害性 T 細胞 (cytotoxic T lymphocytes, CTL) を活性化し、特異的な

獲得免疫応答を誘導することを示している(図1)。この知見から、NPrCAP/Mによりメラノーマを選択的に targeting し、磁場照射による細胞内温熱療法 (intracytoplasmic hyperthermia) により細胞の壊死を惹起できれば、細胞外微小環境にメラノーマ由来の HSP-ペプチド複合体が放出され、樹状細胞を介する自然免疫・獲得免疫を協調的に誘導できるものと予想した。これらの免疫応答反応は全身性の免疫応答を誘導するものであるから、温熱療法による局所治療のみならず、生命予後を左右する肺、肝臓、脳などの遠隔転移巣に対しても抗腫瘍効果を期待できるものである。

図1

The role of *extracellular* HSP in immune response

