

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18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 神保 孝一

平成19(2007)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/LM) 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/M と磁場照射によるメラノーマ細胞特異的細胞死誘導・・・・・・11
山下 利春

2. 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～・・・・・・15
本多 裕之、井藤 彰

3. GMP grade の N-(1-mercaptopropionyl)-4-S-CAP-SH 結合型リゾビスト (NPrCAP/PEG/
リゾビスト) の合成とその結合量の測定・・・・・・22
伊藤 祥輔、若松 一雅

4. メラノーマ標的ナノパーティクル NPrCAP/M を用いた化学温熱免疫 (CTI) 療法にお
ける腫瘍免疫機構の解析・・・・・・27
佐藤 昇志、田村 保明

5. メラノーマ標的ナノ微粒子 (NPrCAP/Rizobist) によるメラノーマ温熱免疫治療臨
床応用
～CTI 治療室の設計・施工、交番磁場発生装置改造と臨床治療手順の確立～・・・33
小野 一郎

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

IV. 研究成果の刊行物・別冊

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
分担研究者	山下 利春	札幌医科大学皮膚科学講座	助教授
	小野 一郎	札幌医科大学皮膚科学講座	講師
	本多 裕之	名古屋大学大学院工学研究科	教授
	井藤 彰	九州大学大学院工学研究院	助教授
	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
	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

本研究はN-Propionyl-4-S-cysteaminy phenol (NPrCAP)を標的ドラッグ・デリバリー剤としたMagnetite Liposome (M)を用いた新しいメラノーマnano-medicineの産・学・官国際共同開発を行う。メラノーマの発生は近年加速度的に上昇しているが、予後は極めて悪く、病初期から皮下、肺、肝、脳転移をとる。外科的切除以外、有効な治療法は無い。我々の開発した①メラノーマ細胞と特異的親和性を有するシステアミニール・フェノール(cysteaminy phenol: CAP)を②細胞内温熱効果を有する磁気ナノ微粒子(マグネタイト)を内包するリポソーム(magnetite liposome: M)と重合させ、Mをメラノーマ細胞に特異的に取り込ませるメラノーマに対する新しいドラッグ・デリバリー・システムを開発し同時に③Mの温熱効果に伴う腫瘍免疫効果とCAPの持つ細胞殺効果を発現させる事により従来のメラノーマ治療法概念とはまったく異なる新しいナノ・メデシンを確立する(図1)。

本申請研究は過去2年間の研究でこれら一連の研究を発展させ新規化合物NPrCAP/Mを合成した。本治療法により我々は、メラノーマ細胞に特異的に取り込まれたNPrCAP/Mに対し磁場照射による温熱療法を行い、メラノーマ細胞に対し選択的細胞殺効果(化学療法)と温熱腫瘍免疫効果を発現させることを目的とする。

【 図1】

NPrCAP/MLを用いた標的DDSと温熱加療によるメラノーマ 標的温熱免疫化学療法の実現

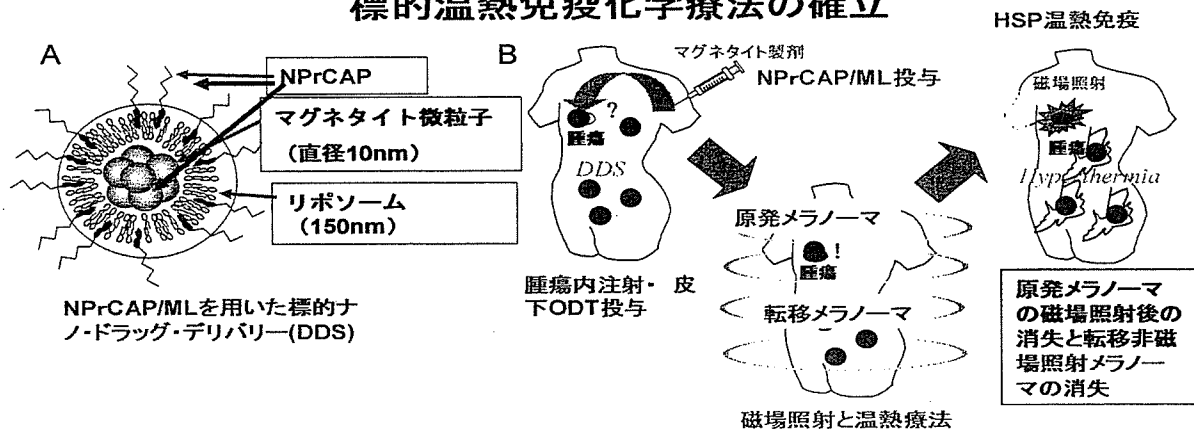


図1 A) 目的: メラノーマに選択的標的親和性をもつNPrCAPと癌細胞にターゲティング能を持つマグネタイト粒子マグネタイト・リポソームの重合体 (NPrCAP/ML)によるメラノーマの選択的治療法の確立。B) 方法・期待される効果: NPrCAP/MLのメラノーマ内組織への注射、外用後標的指向性を有すNPrCAP/ML製剤は腫瘍に集積し、さらに外部より磁場を照射することで、温熱療法が可能になる。又NPrCAPの化学的作用とmagnetiteからの温熱により壊死化したメラノーマ細胞はHSP (Heat Shock Protein熱ショック蛋白)を介し、遠隔転移メラノーマに対して細胞傷害性T細胞による腫瘍免疫を発現させる (メラノーマ標的温熱免疫化学療法)。

本研究の基礎となる我々の過去の実験結果として以下の4点があげられる。

- ①神保・山下・小野らはCAPがメラノーマ細胞に *in vivo*, *in vitro* で一定の細胞膜表面レセプターと思われる機構を開始して選択的に取り込まれ、山下らはメラニン形成と細胞死と直接関連を有する事、即ちメラノーマを特異的に標的とするドラッグ・デリバリー作用を有する事を証明した。
- ②本多・井藤らは開発した温熱療法が従来の誘電加温型と異なり癌に指向性を持つマグネタイトだけが発熱する周波数を交番磁場発生装置によって照射する事で癌に特異な加温が可能である事を確認した。
- ③井藤らは加温に伴うHSP (Heat Shock Protein)の活性化を証明した。
- ④佐藤らは人癌の腫瘍免疫におけるHSP (Heat Shock Protein)の臨床的重要性と作用機序を解明した。

現在類似のアプローチとして正電荷脂質 (Magnetite Cationic Liposome; MCL)があるが、同方法は癌細胞との特異的吸着に抗体を用いているが抗体の特異性、異種蛋白としての抗原性から臨床応用に問題があった。本申請のNPrCAPはメラノーマ細胞に特異なチロシナーゼの基質であるアミノ酸チロシンの誘導体であり、メラノーマ細胞をレセプター機構にて選択的に標識し、同時に細胞内に取り込まれる物質でこれをマグネタイトとリポソームに固定

化する事で、大量合成が可能で且つ臨床応用に最も近い薬剤である。

今年度の研究ゴールは①NPrCAP/Mの合成 (本多・井藤) と *in vitro* 温熱療法の効果の判定 (神保・山下・佐藤)、②坦癌マウスを用いた治療効果の判定 (神保・山下・佐藤) とMRIによる検出法の開発 (山下・佐藤)、③臨床治験プロトコルの作成と倫理委員会での承認に基くPhase I, IIと臨床治験への基礎研究 (全員)の3点である。

A. 研究目的

メラニン形成経路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。本研究はメラニン形成酵素チロシナーゼの基質であるシステアミニール・フェノール (cysteaminy phenol: CAP) (表1)が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 (国際特許取得済み)を利用し、CAPが温熱細胞殺効果を有するナノ磁気粒子 (M)に固定化する事により新しい選択的ナノ・ドラッグ・デリバリー・システムを開発し、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。

表1

表1: シスアミノイルフェノール(CAP)誘導体とチロシナーゼ阻害性 表2: NPrCAPとメラノーマ細胞との選択的共有結合

		Km (μ M)	Vmax (μ mole/min/mg)	阻害剤	(共有結合/me)
Tyrosine	COOH HO	0.3	1.80	酪メラノーマ	0.330 \pm 0.118
4-S-CAP	HC	117.0	7.97	酪コントロール	0.010 \pm 0.001
N-Acetyl-4-S-CAP (NACCA P)	HO	375.0	9.28	皮下メラノーマ	0.521 \pm 0.076
N-Propionyl-4-S-CAP (NPPC AP)	HC	340.9	5.43	正常肺	0.013 \pm 0.003
				正常腎	0.008 \pm 0.001

メラノーマは日本を含め全世界的に発症頻度、死亡率が増加している。白人は90人に一人発生する。日本でも近い将来1000人に一人は発生すると予測される。日本人メラノーマは早期から転移を起こしやすく現在の化学、放射線、免疫療法は無効に等しい。新しいドラッグ・デリバリー・システムに基く治療法の開発が急務である。

次年度には倫理委員会の許可を得、Phase I, II を経、直接末期メラノーマ患者への臨床試験の基礎を得る。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。我々は皮下の腫瘍内に直接NPrCAP/Mを投与する。

B. 研究方法/C. 研究結果

メラノーマ細胞に対し選択的取り込みを有すNPrCAPを標的ドラッグ・デリバリー剤として用い腫瘍細胞に選択的温熱細胞障害を有すmagnetiteと固定化させ(NPrCAP/M)、新しいメラノーマ治療法を開発した(図2)。

皮下腫瘍内又は全身的に投与されたNPrCAP/Mは①メラノーマ細胞に選択的に吸着し取り込まれた。②加温により癌細胞を選択的に障害しHSP(熱ショック蛋白)を介した腫瘍免疫を遠隔転移巣に発現させ傷害した。

1. NPrCAP/M及びNPrCAP/PEG/Mの合成: CAPを図2に示す方法で、マグネトリポソームに固定した。マグネタイトは10nm太のナノ微粒子を用いた。合成後の薬剤の粒子径とNPrCAPの固定化、抗腫瘍活性を測定した。

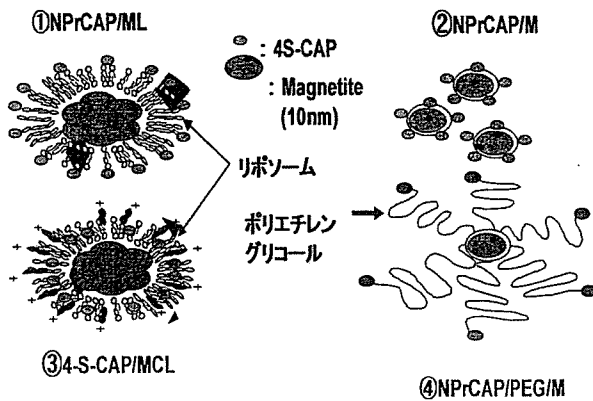
メラノーマ細胞特異的親和性を有するCAPと細胞内温熱効果を有する磁気ナノ微粒子(マグネタイト)を結合させた薬剤の設計、作製、および有効性評価を行った。これまでに、4種類の薬剤を設計して試した。①マグネタイトを中性のリポソームで包埋して、CAP類の1つであるNPrCAPをリポソーム表面に結合させ

たNPrCAP/MLは、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点で有利である。②NPrCAPを共有結合で直接的にマグネタイトに結合させたNPrCAP/Mは、合成が簡便であり、将来のGMP規格での合成を考えた場合に有利である。③CAPを正電荷脂質膜に封入したリポソームにマグネタイトを包埋させた4-S-CAP/MCL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。④CAP化合物を、ポリエチレングリコール(PEG)を介してマグネタイトに結合させたNPrCAP/PEG/Mは、PEGの効果によりマグネタイトの分散性が飛躍的に向上し、また、CAP化合物のマグネタイトへの結合量を増加するのに有利であった。また、PEGの効果により、in vivoにおける血中安定性および細網内皮系によるトラップを回避することが期待できること、また、②と同様にGMPでの合成を考えた場合に有利であることから、このNPrCAP/PEG/Mを今後の第一剤候補として選択するに至った。

これまでに、①4-S-CAPより2段階でNPrCAP-SHを合成した(収率40%)。このNPrCAP-SHは、マグネタイトと効率良く結合させるためにNPrCAPの末端に-SH基をつけた化合物である。②この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)およびその直接結合型マグネタイト(M)と反応させ、目的とするNPrCAP/MLおよびNPrCAP/Mを合成した。それぞれのNPrCAPの取り込み量は、22 nmol/mg マグネトリポソーム、61 nmol/mg マグネタイトであった。③NPrCAP/Mがチロシナーゼの基質になることを確認した。④マグネタイト分散性が飛躍的に向上したPEG処理されたマグネタイトとNPrCAP-SHを反応させたところ、NPrCAP/PEG/Mの結合量は30 nmol/mg マグネタイトであり、上記二つのマグネタイトと同程度の結合量であった。⑤臨床応用に視野を向けてすでにMRI用肝臓造影剤として使用されているマグネタイトにPEG処理されたものとNPrCAP-SHとの反応を検討したところ、NPrCAPとの結合量が低いことがわかった(結合量: 2.9 nmol/mg マグネタイト)。これを打開するために遊離のカルボキシデキストランを含まないマグネタイトを合成し、そのものとNPrCAP-SHとの反応を行なったところ結合量の改善が見られた(結合量: 29 nmol/mg マグネタイト)(図2)。ついで、この

NPrCAP/PEG/M を用いて化合物の毒性試験を行った。

【図 2】



さらに、本研究グループでは、③ 4-S-CAP/MCL に関して、B16 メラノーマ細胞における CAP 化合物によるメラノーマ特異的 化学療法+マグネタイトによる細胞内温熱療法 といった新しい組み合わせ療法における抗腫瘍 効果を検討した (Ito et al., Cancer Sci. in press). B16 担癌マウスに 4-S-CAP/MCL を投与 した時、4-S-CAP を介した化学療法による抗腫 瘍効果を示した。さらに、B16 担癌マウスに 4-S-CAP/MCL を投与した後、マウスに交番磁場 を照射したところ、B16 メラノーマの腫瘍は組 織特異的に 45°C という温熱療法に有効な温度 まで上昇し、無治療のマウス、4-S-CAP/MCL を 投与しただけのマウス、および温熱療法のみを 施したマウスの腫瘍と比較して、有意に腫瘍体 積増加を抑制することに成功した。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、CAP 化合物の持つメラノーマ特異的な化学療法と、 マグネタイトが持つガン細胞内加温を同時に 発揮可能な、強い抗腫瘍効果を示すことが期待 される。

2. NPrCAP/M のメラノーマ組織への選択 的取り込みの解析：① in vivo B16 メラノーマ 担癌マウスを用い、メラノーマへの選択的取 り込みを MRI にて確認した。この際腫瘍内への 直接の注射と皮膚密封法 (Occlusive Dressing Therapy: ODT) と比較し、経皮投与と軟膏基材 の有用性についても検討した。② in vitro 実験系で各種ヒト・メラノーマ、非メラノーマ 細胞を用い、NPrCAP/M のメラノーマ細胞への 選択的取り込みと細胞障害を確認した。

臨床第 I・II 相研究試験を IRB に申請する ための基礎的動物実験結果を得た。殊に、急性 毒性実験、薬剤としての安定性、更には腫瘍組

織への選択的取り組みを確認した。最も興味あ る所見は、腹腔内投与により NPrCAP/M は、メ ラノーマに選択的に蓄積し、各メラノーム内に 局在する事を確認した。

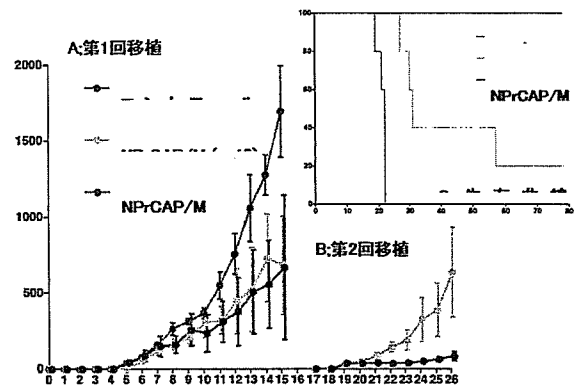
更に、NPrCAP/M のメラノーマ細胞親和性 を検討する目的で、細胞が付着したスライドグ ラスを倒立した状態で、培養液中に設置し低濃 度の NPrCAP/M と接触する状態で培養した後、 鉄染色を行う事によってメラノーマ細胞に吸 着もしくは取り込まれた NPrCAP/M を測定した。 また、その実際の細胞内取り込みの計時的変化 を電子顕微鏡下で観察した。

3. 温熱加温と NPrCAP 薬剤の in vitro 併 用効果の解明：NPrCAP/M の温熱加温効果の温 度依存性 (43-46 度) と NPrCAP 濃度依存性の 有無、相乗・相加効果を検討した。最も効率の 良い温度は 43 度であった。

4. NPrCAP/M の in vivo B16 メラノーマ 担癌マウスの延命効果の検討：交番磁場を照射 する事による担癌マウスへの延命効果のみならず、皮下転移巣、肺転移巣への抗腫瘍効果の 判定を行った。更に Kaplan Meier 法を用い、 治療群の優位な延命効果を確認した (図 3)。

【図 3】

NPrCAP/M + AMF 加療によるメラノーマ移植後の



5. NPrCAP/M と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 討した。

更に、NPrCAP/M 注入後の磁場照射を行う再 にする最も効果的な抗腫瘍効果を発現する腫 瘍スケジュールの確認をおこなった。この方法 によると少なくとも第 2 回に再チャレンジさ

れたメラノーマ移植は、少なくとも3ヶ月間担癌マウス腫瘍免疫抗のメモリーの保存、温存の為に拒絶反応をおこなうことが確認された。

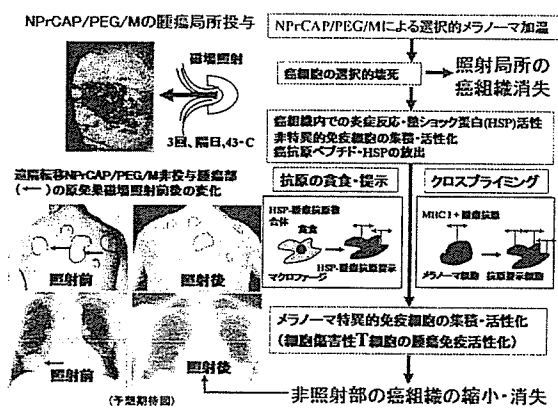
6. NPrCAP/M 加温後の坑メラノーマ効果と腫瘍免疫機構の相関の解明：NPrCAP/M が投与局所の癌のみならず遠隔部の皮膚・肺転移巣に対し、坑腫瘍効果をどの程度有するか、その際、腫瘍性免疫がどのように直接関与しているかを *in vivo*, *in vitro* 系で解明した。

NPrCAP/M 加温後の HSP ペプチド複合体の介した腫瘍免疫抗を解析し、①メラノーマ細胞に特異的な CDL を用い誘導効果、②メラノーマ抗原であるチロシナーゼ関連蛋白 (TYR-1、2、gp100 等) に対する応答、デトラマ解析

(ELISPOT 解析) を用いて検討した、更に、③腫瘍拒絶における免疫組織学的な解析をおこなった、④一方この腫瘍免疫誘導は細胞内温熱によって腫瘍細胞から遊離放出される HSP ペプチド抗体によるものを有する事を確認した。

7. 臨床治験プロトコールの作成：末期メラノーマ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ために学内 IRB に臨床治験試験の実施承認を求め許可された。札幌医大皮膚科病棟には常時 10 名以上の high risk メラノーマ患者が入院している。これらの概要を図 4 に示した。

【図 4】



E. 結論

1. 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：

①低分子アミノ酸のイオウ誘導体であり、細胞内への取り込みに問題がない。②チロシンより V_{max} , K_m においてはるかに高いメラニン形成の基質であり (表1)、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。③チロシナーゼ・メラニン形成は臨床的に無色素産生メラノーマでも常に存在し、癌化と共に異常に亢進する。即ちメラノーマ細胞に正常細胞 (メラノサイト) と比較しより高く取り込まれる。④イオウは細胞膜親和性をたかめる。⑤従来標的として用いられた抗体と異なり人体にとり異種蛋白ではなく、頻回使用しても無害である。

2. M 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。

①M は NPrCAP を介し、細胞内へ容易に取り込まれ得る。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 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免疫療法も誘導し得る (図 4)。

D. 考察

1. NPrCAP/M 及び NPrCAP・PEG/M の合成及びチロシナーゼ基質としての反応性：NPrCAP/PEG/M の合成法の改良を更に行い、GMP 製剤として化学的に合成が容易であり安定性の高いものを大量に作成する方法を確立する。更に NPrCAP/M と NPrCAP/PEG/M を用いメラノーマ細胞との結合及びチロシナーゼとの基質との親和性の変化を検索した。現在 NPrCAP・PEG/M の基質親和性及びもっとも効果的な即座の化学構造を決定することが出来た。これにより NPrCAP/PEG/M に化学的安定であり、且つ最も効率的に細胞親和性を有する薬剤の化学構造を決定する予定である。

2. NPrCAP/PEG/M の細胞下ターゲティングの解析：前年度までの若松、伊藤班員の研究から NPrCAP/ML はチロシナーゼの基質となるが反応速度論的にはコントロールの 4-S-CAP の 1/16 であること、また、チロシナーゼ遺伝子の発現のない無色素性メラノーマ細胞株 (SK-mel-24、UT など) でも非メラノーマ細胞に比べて NPrCAP/M の取り込みが高いことが認められた。これらの結果は、メラニン合成経路が NPrCAP/M のターゲットであるとすれば、NPrCAP/M が B16F1 マウスメラノーマ細胞の後期メラノソームに高率に取り込まれる実験事実と矛盾する。NPrCAP/M の細胞下ターゲティングの解析は、NPrCAP/PEG/M による細胞障害の分子機構を明らかにするのみならず、無色素性メラノーマにも通常型の色素性メラノ-

マと同様に NPrCAP/PEG/M による温熱免疫療法が有効であるかどうかの根拠となる。

3. CTI 療法におけるメラノーマ細胞特異的免疫の誘導: マウスメラノーマ細胞に仮想癌抗原として OVA を導入した B16-OVA 細胞を C57B1/6 マウスに接種し、腫瘍を形成したのち、CTI 療法を施行した。CTI 療法により腫瘍の拒絶を認めたマウスの脾細胞中に OVA 特異的細胞傷害性 T 細胞 (CTL) 活性を認めた。この免疫機構の機序を以下の実験系で行う。

1) CTI療法による熱ショック蛋白質 (heat shock protein: HSP) の発現誘導: CTI 療法を施行した B16-OVA 細胞における Hsp70 および Hsp90 の発現を western blotting により検討する。Hsp70 および Hsp90 は hyperthermia 施行後 24 時間から 48 時間後に発現増加を確認する。また hyperthermia 後の 48 時間の培養上清中に Hsp70 および Hsp90 の放出を確認する。殊に NPrCAP-M を取り込ませた B16-OVA 細胞に hyperthermia を施行すると、熱ショックにより HSP の発現誘導を認め、引き続いておこる細胞死により培養上清に HSP が放出されるものか否かを検討する。

2) CTI療法による抗腫瘍免疫応答のメカニズム:

これまでの我々の研究から放出された HSP には腫瘍抗原が結合していることが予想される。すなわち CTI 療法により細胞死をきたした B16-OVA 細胞から放出された Hsp70 および Hsp90, さらに小胞体内の HSP には OVA 由来の抗原が結合したまま細胞外環境に放出され、これが樹状細胞などの抗原提示細胞に取り込まれ、CD8+ T 細胞などの免疫細胞が活性化されると予想される。これを検証するために、CTI 療法を施行した B16-OVA 細胞から lysate を調製し、骨髄から誘導した樹状細胞にパルスし、OVA 由来抗原ペプチド SL8 (SIINFEKL) を特異的に認識する CTL と共培養し、その活性化を検討する。CTI 療法を施行していない lysate に比較して、CTI 後の lysate は CTL の活性化能が優位に高いことを確認する。さらにこの lysate から HSP、特に Hsp70 を除去するとその活性化能の半減をみる。これら一連の実験により (1) CTI 療法により発現誘導された HSP が CTL 認識抗原を結合している (HSP-抗原複合体)、(2) CTI 療法によりメラノーマ細胞は細胞死をおこすが、この際細胞外に放出された HSP-抗原複合体は樹状細胞などの抗原提示細胞により抗原提示され、抗原特異的 CTL を活性化する過程を明らかにしえる。

3) In vivoにおけるCTI療法後メラノーマ細胞由来HSPの免疫効果:

CTI 療法後の B16-OVA 細胞から Hsp70, Hsp90 および小胞体 HSP を含む HSP を分離し、マウスに免疫した。所属リンパ節より樹状細胞を分離し、OVA 抗原特異的 CTL の反応性を検討する。これにより、B16-OVA 由来の HSP で免疫したマウスの樹状細胞は、特異的 CTL を強く活性化させ、HSP に腫瘍由来の抗原である OVA 由来ペプチドが結合している事を確認し、腫瘍特異的 CTL の誘導は、我々の化学・温熱・免疫療法により発現増強し、細胞外に放出された HSP-抗原複合体を介する反応である事を検証する。

4. 磁場発生装置の安全性: 我々は過去 2 年間 3 種類の磁場発生装置の試作を行い、第 3 号機を持ってようやく実際の患者さんに用いる事が出来る磁場発生装置を製作する事に成功した。本装置の安全性は充分確認されており、札幌医科大学付属病院皮膚科外来に本装置が設置され、平成 19 年度より本装置を用い臨床研究試験が開始される予定である。

5. 薬剤投与と腫瘍切除手術等の臨床研究プロトコルの作製: NPrCAP/M を用いた基礎実験、更に、NPrCAP・PEG/M を用いた急性毒性実験及び薬剤の安定性は既に完了した。これら所見を元に平成 18 年度 11 月に IRB に第 I・2 相臨床研究試験実施を申請したが、患者さんの安全性と人権を十分に尊重した上で、インフォームドコンセントをとりおこない、平成 19 年度 1 月より臨床研究試験 (5 例) を開始する予定である。これら 5 例の臨床研究試験終了後は、国内の他大学、他施設に働きかけ、より多くの症例を集め、第 II・III 相試験へと平成 19 年度から開始する予定である。

F. 健康危険情報

次年度 (平成 19 年) は遠隔転移を有する VI 期の患者を対象とするヒトメラノーマの自主臨床研究を開始する。直接の治療対象はメラノーマの皮膚あるいは皮下転移で、転移腫瘍に直接 NPrCAP/M を注射後磁場照射し、2 週間後に全切除するプロトコルを計画している。自主臨床研究の前に、動物およびヒトボランティアへ投与して注射局所の炎症反応の有無、組織障害性および NPrCAP/PEG/M の組織貯留性を病理組織学的に検討する。小型動物を用いた急性毒性実験はすでに全て終了した。患者さんを用いた臨床試験の前に大型動物であるブタの皮下に NPrCAP/PEG/M を注射後磁場照射し、継時的に注射局所を切除して組織内の鉄量を測定し、組

織レベルで細胞障害と炎症細胞浸潤の有無と程度を検討する。また、治療量の 10 倍の NPrCAP/PEG/M を皮下注射し、各種臓器への移行と注射局所の残留量を検討し、さらに治療量の 100 倍以上の NPrCAP/PEG/M を腹腔内に投与して 3 ヶ月後に採血検査と各種臓器への残留の程度と毒性を検討する。ブタでの実験の後、ボランティア皮下に治療量の NPrCAP/M を投与し動物実験と同様、局所の細胞障害と炎症細胞浸潤学について検討し、投与前後の採血検査によって安全性の確認を行う。

NPrCAP 自体の毒性実験は英国の研究所に依頼し、催奇形性、人への障害試験を含む全ての試験において安全性が確認されている。また、マグネタイトは実際の臨床薬として用いられている製剤を使用する。多施設第 II, III 相試験は GMP grade の製剤を作成できる施設に外部委託し、製剤の合成を行い、患者さんへの倫理的安全性を十分配慮して行う。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Takada T, Yamashita T, Sato M, Sakemoto A, Matsusaka H, Ono Ichiro, Tamura Y, Sato N, Ito A, Honda H, Wakamatsu K, Ito S, Jimbow K. Rejection of secondly inoculated melanoma and prolongation of life span of melanoma-bearing mice by melanogenesis targeted chemo-thermo-immuno (CTI) therapy using NPrCAP-Magnetite nano-particles. *Pigment Cell Res.* 2006, 19: 470-548
- 2) Yanagisawa K, Jimbow K, Hanoh H, Sakane F. Diacylglycerol kinase alpha suppresses TNF-alpha-induced apoptosis of human melanoma cells through activation of NF-KAPPA B. *Pigment Cell Res.* 2006. 19; 470-548
- 3) Sakemoto A, Tamura Y, Soto N, Yamashita T, Takada T, Sato M, Okura M, Ono I, Ito A, Honda H, Wakamatsu K, Ito S, Jimbow K. Characterization of Tumor Immunity in melanoma chemo-thermo-immunotherapy (CTI Therapy) using NPrCAP-magnetite (NPrCAP/M) nano-particles. *Pigment Cell Res.* 2006. 19; 470-548
- 4) Kawai N, Ito A, Nakahara Y, Honda H, Kobayashi T, Futakuchi M, Shirai T, Tozawa K, Kohri K. Complete regression of experimental prostate cancer in nude mice by repeated hyperthermia using magnetite cationic liposomes and a newly developed solenoid containing a ferrite core. *Prostate.* 2006, 66(7):718-727.
- 5) Ito A, Fujioka M, Yoshida T, Wakamatsu K, Ito S, Yamashita T, Jimbow K, and Honda H. 4-*S*-cysteaminyphenol-loaded magnetite cationic liposomes for combination therapy of hyperthermia with chemotherapy against malignant melanoma. *Cancer Sci.* 2007 (in press).
- 6) Ito A, Honda H, Kobayashi T. Cancer immunotherapy based on intracellular hyperthermia using magnetite nanoparticles: a novel concept of "heat-controlled necrosis" with heat shock protein expression. *Cancer Immunol Immunother.* 2006, 55(3):320-328.
- 7) Chintala Ito A, Fujioka M, Yoshida T, Wakamatsu K, Ito S, Yamashita T, Jimbow K, and Honda H. 4-*S*-cysteaminyphenol-loaded magnetite cationic liposomes for combination therapy of hyperthermia with chemotherapy against malignant melanoma. *Cancer Sci.* 2007 (in press).
- 8) D' Orazio JA, Nobuhisa T, Cui R, Arya M, Spry M, Wakamatsu K, Igras V, Kunisada T, Granter S, Nishimura EK, Ito S, Fisher DE. Topical drug rescue strategy and skin protection based on the role of Mcl1 in UV-induced tanning. *Nature*, 2006, 443: 340-344.
- 9) Ito S. Encapsulation of a reactive core in neuromelanin. *Proc Natl Acad Sci (USA)*, 2006 103: 14647-14648.
- 10) Gautam R, Novak EK, Tan J, Wakamatsu K, Ito S, Swank RT. Interaction of Hermansky-Pudlak syndrome genes in the regulation of lysosome-related organelles. *Traffic*, 2006, 7: 779-792.
- 11) Ito A, Fujioka M, Yoshida T, Wakamatsu K, Ito S, Yamashita T, Jimbow K, and Honda H. 4-*S*-cysteaminyphenol-loaded magnetite cationic liposomes for

- combination therapy of hyperthermia with chemotherapy against malignant melanoma. *Cancer Sci.* 2007 (in press).
- 12) D' Orazio JA, Nobuhisa T, Cui R, Arya M, Spry M, Wakamatsu K, Igras V, Kunisada T, Granter S, Nishimura EK, Ito S, Fisher DE. Topical drug rescue strategy and skin protection based on the role of Mcl1 in UV-induced tanning. *Nature*, 2006, 443: 340-344.
 - 13) Wakamatsu K, Kavanagh R, kadekaro AL, Terzieva S, Sturm R, Leachman S, Abdel-Malek A, Ito S. Diversity of pigmentation in cultured human melanocytes is due to differences in the type as well as quantity of melanin. *Pigment Cell Res*, 2006, 19: 154-162.
 - 14) Wakamatsu K, Takasaki A, KagedalB, Kageshita T, Ito S. Determination of eumelanin in human urine. *Pigment Cell Res*, 2006, 19: 163-169.
 - 15) Wakamatsu K, Ito S. Evaluation of melanin-related metabolites as markers of solarultraviolet radiation. *Pigment Cell Res*, 2006 19: 460-464.
 - 16) Heat Shock Proteins: A guide for cross-presentation. Tamura Y, Sato N. in *Heat Shock proteins in Biology and Medicine*, 2006
 - 17) Hatakeyama, N., Tamura, Y., Sahara, H., Suzuki, N., Suzuki, K., Hori, ., Mizue, N., Torigoe, T., Tsutsumi, T., Sato, N. Induction of Autologous CD4- and CD8-mediated T-cell Responses against Acute Lymphocytic Leukemia (ALL) Cell Line using Apoptotic Tumor Cell-loaded Dendritic Cells. *Exp. Hematol.* 34: 197-207, 2006
 - 18) Tsukahara T, Kawaguchi S, Ida K, Kimura S, Tamura Y, Ikeda T, Torigoe T, Nagoya S, Wada T, Sato N, Yamashita T. HLA-restricted specific tumor cytotoxicity by autologous T-lymphocytes infiltrating metastatic bone malignant fibrous histiocytoma of lymph node. *J Orthop Res.* 24: 94-101, 2006
 - 19) Ueda G, Sunakawa H, Nakamori K, Shinya T, Tsuchioka W, Tamura Y, Kosugi T, Sato N, Ogi K, Hiratsuka H. Aberrant expression of beta- and gamma-catenin is an independent prognostic marker in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg.* ; 35(4):356-61, 2006
 - 20) Takada T, Yamashita T, Sato M, Kawakami Y, Tominaga A, Ono I, Jimbow M, Tsutsumi H and Jimbow K: Paoulonecrotic tuberculid-like eruptions after DCG vaccination. *J Dermatology* 2007 (in press).
 - 21) Ono I, Sakemoto A, Ogino J, Kamiya T, Yamashita T and Jimbow K: The Real time, three-dimensional analyses of benign and malignant skin tumors by confocal microscopy. *J Dermatol Science* 43: 135-141, 2006.
 - 22) King KE, Ponnampertuma 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* 27: 53-63, 2006.
 - 23) Kamiya T, Saga K, Yanagisawa K, Kaneko R, Yamashita T, Ishida O and Jimbow K: Small cell variant of CD30+ primary cutaneous T-cell lymphoma with epidermotropism that completely regressed after incisional skin biopsy. *Brit J Dermatol* 155: 484-487, 2006.
 - 24) Ono I, Yamashita T, Kamiya T, Takada T, Kaneko R and Jimbow K: Lower lip and vermilion reconstruction with buccal musculomucosal flap combined with V-Y plasty after malignant tumor excision. *Plastic Recon Surgery* 117: 133-139, 2006.
 - 25) Ono I, Sakemoto A, Ogino J, Kamiya T, Yamashita T and Jimbow K: The real time, three-dimensional analyses of benign and malignant skin tumors by confocal microscopy. *J Dermatol Science* 43: 135-141, 2006.
 - 26) Ono I, Yamashita T, Kamiya T, Takada T, Kaneko R and Jimbow K: Lower lip and vermilion reconstruction with buccal musculomucosal flap combined with V-Y plasty after malignant tumor excision. *Plastic Recon Surgery* 117:133e-139e, 2006.

2. 学会発表

1) 神保孝一、山下利春、小野一郎、松坂英信、高田知明、佐藤牧人、酒本亜紀子、佐藤昇志、田村保明、宮本篤、本多裕之、井藤彰、伊藤祥輔、若松一雅：メラノジェネシス標的ナノ微粒子・チロシン（フェノール）誘導体によるメラノーマ化学・温熱免疫療法の開発、札幌（札幌プリンスホテル）、(March 20-21, 2006)

2) 神保孝一、山下利春、小野一郎、松坂英信、高田知明、佐藤牧人、酒本亜紀子、佐藤昇志、田村保明、宮本篤、本多裕之、井藤彰、伊藤祥輔、若松一雅：メラノーマ治療における新規標的療法の開発：メラノジェネシス標的ナノ微粒子・チロシン（フェノール）誘導体によるメラノーマ化学・温熱・免疫療法。第22回日本臨床皮膚科医会総会・臨床学術大会（22nd Japan Organization of Clinical Dermatologists 2006）. Japan (May 20, 2006) [日本臨床皮膚科医会雑誌（J JOCD）23（6）：524（4）-530（10），2006]

3) Jimbow K, Yamashita T, Ono I, Matsusaka H, Takada T, Sato M, Sakemoto A, Sato N, Tamura Y, Miyamoto A, Honda H, Ito A, Ito S, Wakamatsu K. Sulfur-homologue of melanogenesis-substrate with magnetite (NPrCAP/M) can inhibit melanoma growth and reject second melanoma inoculation: a novel chemo-thermo-immuno (CTI) therapy in nano-DDS medicine. 第10回基盤的癌免疫研究会総会 [The 10th Annual Meeting of Society for Fundamental Cancer Immunology (SFCI)]、札幌（札幌コンベンションセンター）、(July 13-14, 2006)

4) Jimbow k, Takada T, Sato M, Sakemoto A, Tamura Y, Ito A, Honda H, Wakamatsu K, Ito S, Yamashita T: NPrCAP-magnetite with/without local heat generation can provide melanogenesis-targeted drug delivery system, kill primarily inoculated melanoma by non-apoptosis and reject secondarily inoculated melanoma by HSP-mediated immune reaction. 3rd Annual International Melanoma Research Congress (IMRC)、the Netherland (Nordwijk), (September 14-16, 2006)、[Melanoma Research

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

1) 東レとの特許

Title: PHENOLIC AMINE AS DEPIGMENTING AND ANTIMELANOMA AGNETS; K. Jimbow, MD, PhD, FRCPC, Stiefel Inc., & University of Alberta (2種類の特許)

1998年：PATENT #: 3178834(in Japan), 5925332(in USA), 2015197(in Canada), 46522(in Philippine), 9604333-6(in Singapore), 204254(in South Korea), 82105703(in Taiwan), 651823(in Australia), 2000年：Israel (106347)

2) NPrCAP/MLを用いたメラノーマへの温熱免疫化学療法：特許申請中

3)

①2004年2月25日、ハーセプチンを含有する新規リポソームの調製法、井藤彰、名古屋大学、特願2004-049423、公開無 ②2004年2月23日、悪性腫瘍に対する新規免疫賦活剤、井藤彰ほか2名、名古屋大学、PCT/JP04/01621、公開無 ③2004年3月31日、サイトカインと磁性微粒子からなる悪性腫瘍の温熱治療剤、井藤彰ほか2名、名古屋大学、米国特許10/815273、公開無 ④2003年3月27日、熱ショックタンパク質と磁性微粒子からなる悪性腫瘍の温熱治療剤、本多裕之ほか2名、名古屋大学、PCT/JP03/03825、公開 ⑤2001年10月25日、ガンの温熱療法における免疫賦活剤、本多裕之ほか4名、名古屋大学、PCT/JP01/10704、公開

4)

①ヒト胃癌抗原遺伝子および胃癌抗原蛋白質：特願平 10-197852 ②スルホラムノシルアシルグリセロール誘導体および医薬としての用途：特願平 11-051396 ③スルホプラノシルアシルグリセロール誘導体を含む医薬：特願平 11-051397 ④新規なスルホラムノシルアシルグリセロール誘導体およびその医薬としての用途：特願平 11-051398 ⑤新規な免疫抑制剤：特願平 11-065208 ⑥サバイビン由来癌抗原ペプチド：特願 2001-84438 ⑦滑膜肉腫抗原ペプチド：特願 2001-125334 ⑧新規な免疫抑制剤；ガラクトース誘導体(SFAG)の免疫抑制剤としての用途特許：

PCT/JP01/05942 ⑧リカバリン由来癌抗原ペ
プチド：特願 2001-122609 ⑨新規ヒト癌・精
巢抗原及びその遺伝子：特願 2000-274218
PCT/JP01/07784 ⑩腫瘍抗原タンパク質及び
その利用：特願 2002-282345 ⑪L-セレクチン
結合阻害剤：特願 2002-316827 ⑫SYT-SSX 改
変ペプチド：特願 2002-350633 ⑬リビン由来
の HLA-A24 結合性癌抗原ペプチド：特願
2003-273236 ⑭サバイビン由来 HLA-A24 結合
性癌抗原ペプチド：特願 2004-191478 ⑮佐藤
昇志、鳥越俊彦、下澤久美子、中澤恵実理：変
性 HLA class I 重鎖を認識するマウス単クロー
ン抗体、特願 2005-094920、3月29日、2005

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
NPrCAP/M と磁場照射によるメラノーマ細胞特異的
細胞死誘導

分担研究者 山下 利春 札幌医科大学皮膚科学講座 助教授

研究要旨

NPrCAP 結合マグネタイトを用いてメラノーマ治療の自主臨床研究を開始するに当たって、メラノーマに対する細胞障害の感受性と特異性を検討することが必要である。また、皮下注射した NPrCAP/M の他臓器への移行性と体内貯留性についての検討も重要である。今年度は NPrCAP/M 処理+磁場照射による細胞障害性をメラノーマ細胞と非メラノーマ細胞間で比較検討し、NPrCAP/M 処置と磁場照射のいずれも非メラノーマ細胞には障害を与えないが、メラノーマ細胞では NPrCAP/M 処置により軽度の細胞障害、NPrCAP/M 処置+磁場照射により著明な細胞障害を与えることが示された。B16F1 メラノーマ細胞と EG7 リンフォーマ細胞を C57black マウス両側背部皮下に移植したマウスに NPrCAP/M を腹腔内投与し、移植腫瘍中の鉄の取り込みと細胞内局剤を検討した。B16F1 細胞を移植したマウスでは腫瘍内に Fe が検出され、Fe 粒子は細胞質内の後期メラノソームに高率に認められた。EG7 リンフォーマ組織中には Fe 染色で検出される NPrCAP/M は認められなかった。NPrCAP/M の各臓器への NPrCAP/M の移行性を検討した結果、これまでの報告と同様、Fe のほとんどが脾臓と肝臓に検出され、他の臓器には移行し難いことが見いだされた。以上より、NPrCAP 結合マグネタイトはメラノーマに対する細胞障害の感受性および特異性が高く、メラニン合成系を標的とする DDS としてすぐれたナノパーティクルであり、体内では網内系に移行し他臓器への移行は微量であることが示された。

A. 研究目的

われわれは GMP グレードの新しい NPrCAP 結合マグネタイト (Risovist-PEG-CAP) を用いたメラノーマ治療の自主臨床研究を平成 19 年 4 月より開始する予定である。NPrCAP 結合マグネタイトをヒトに投与するに先立って、NPrCAP/M がメラノーマ細胞に高親和性および高細胞障害性を示し、非メラノーマ細胞に低親和性および低細胞障害性を示すこと、すなわちメラノーマに対する感受性と特異性についての検討が必要である。また、皮下注射した NPrCAP/M の他臓器への移行性と体内貯留性についての検討も重要である。そこで、平成 19 年度は培養細胞とマウス移植腫瘍を用いて以下の実験を行った。

B. 研究方法

ヒト由来の子宮頸癌細胞株 HeLa、骨肉腫細胞株 SaOS2、メラノーマ細胞株 SK-mel-23、SK-mel-118 は Dalbecco's modified Eagle's medium (DMEM) に 5% fetal bovine serum (FBS)、抗生物質 (Penicillin G、streptomycin) を加えた培地で培養した。マウス線維芽細胞株 NIH3T3、マウスメラノーマ細胞株 B16F1、マウスリンフォーマ細胞株 EG7 はそれぞれ DMEM + 5%FBS + 抗生物質、RPMI1640+5%FBS+抗生物質で培養した。

各培養細胞に NPrCAP/M を最終濃度 0.6mg/ml となるように培地に添加して、20 分間培養した。集めた細胞を磁場照射装置 (第 1 高周波 (株) 製) で 43°C、30 分間処置した後、デイッシュにシードし、2 日後に生細胞数を計測した。

C57black マウス両側背部皮下に B16F1 と EG7 細胞を各 5×10^5 皮下注射し、腫瘍径が $>5\text{mm}$ になった時点で、NPrCAP/M (40 mg/ml, 1.0 ml) をマウス腹腔内に注射し、2 週間後に移植腫瘍を切除し、鉄染色により NPrCAP/M の取り込みを検討した。同時に、腫瘍細胞内の鉄の局在を電子顕微鏡により検討した。

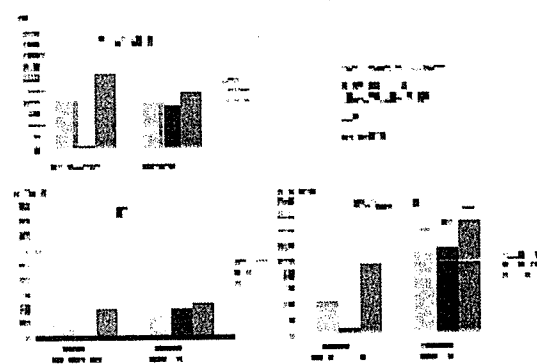
また、注射した NPrCAP/M の他臓器移行性について検討する目的で、C57black マウス背部皮下に 5×10^5 の B16F1 細胞を皮下注射し、腫瘍径が $>5\text{mm}$ になった時点で NPrCAP/M (40 mg/ml, 0.5 ml) を腫瘍内に注射し 5 日後に各臓器を摘出して鉄定量により NPrCAP/M の取り込みを検討した。正常マウス腹腔内に NPrCAP/M 50mg を投与し 2 週間後の各臓器に

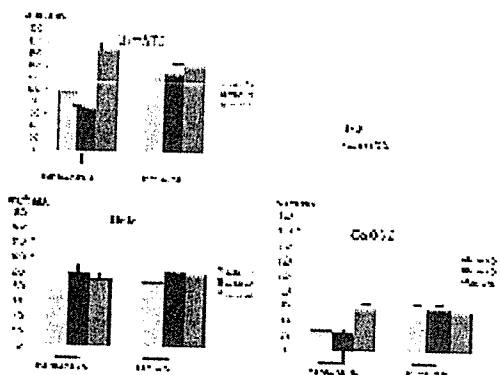
おける鉄量を測定した。

C. 実験結果および D. 考察

1. NPrCAP/M と磁場照射によるメラノーマ細胞の特異的障害

前年度の研究によって、非メラノーマ細胞 (HeLa、SaOS2) の NPrCAP/M の細胞取り込み量が 2-5% であるのに比べ、メラノーマ細胞 (SK-mel-23、SK-mel-118、MM418、MeWo) では 35% 以上と高率であったこと、また、NPrCAP/M 処理細胞の磁場照射によって誘導されるメラノーマ細胞の細胞死はアポトーシスではなくネクローシスであることを報告した。今年度は NPrCAP/M 処理 + 磁場照射による細胞障害性をメラノーマ細胞と非メラノーマ細胞間で比較検討した。NPrCAP/M (最終濃度 0.6mg/ml) を培地に添加して、30 分間処理後、細胞を集めて磁場照射装置で 43°C、30 分間処置した。その結果、非メラノーマ細胞 (NIH3T3、HeLa、SaOS2) では NPrCAP/M 処理 + 磁場照射による細胞障害は NPrCAP/M 処理のみの群と大差なかったが、メラノーマ細胞 (SK-mel-23、SK-mel-118、B16F1) では磁場照射によって著明な細胞障害が認められた (図 1)。すなわち、NPrCAP/M 処置、磁場照射、NPrCAP/M 処置 + 磁場照射のいずれも非メラノーマ細胞には大きな障害を与えないが、メラノーマ細胞では NPrCAP/M 処置により軽度の細胞障害、NPrCAP/M 処置 + 磁場照射に著明な細胞障害を与えることが示された。





【図1】

2. マウス移植腫瘍における NPrCAP/M の取り込みと細胞内局在

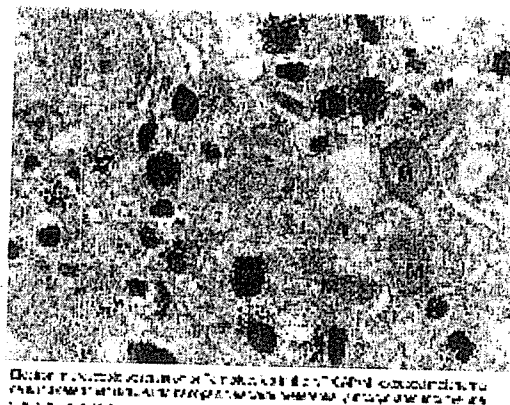
C57black マウス両側背部皮下に B16F1 と EG7 細胞を注入移植し、腫瘍径が>5mm になった時点で NPrCAP/M を腹腔内投与し、6 日後、12 日後に移植腫瘍を切除して鉄染色により NPrCAP/M の取り込みを、また、電子顕微鏡により腫瘍細胞内の鉄の局在を検討した。その結果、B16F1 細胞を移植したマウスでは 5 匹中 5 匹の腫瘍内に Fe が検出された。一方、EG7 リンフォーマ細胞を移植した 5 匹では、いずれの腫瘍中にも Fe 染色で検出される NPrCAP/M は認められなかった (表 1)。この結果はメラノーマ組織には、血流を介して NPrCAP/M が効率良く取り込まれること、すなわち、メラノーマおよびメラニン合成系を標的とする優れたドラッグデリバリーシステム (DDS) であることを示している。ただし、EG7 腫瘍には血管が比較的少なくコントロールとしては不十分であるため、別のマウス可移植腫瘍での検討が必要である。

Days after NPrCAP/M	Fe positive	
	B16F1	EG7
6 days	100% (5/5)	0% (0/5)
12days	100% (5/5)	0% (0/5)

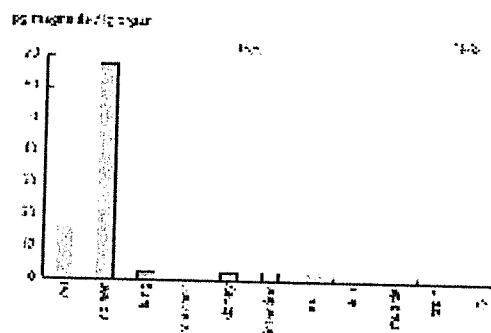
【表 1】

また、背部に B16F1 腫瘍を担癌するマウスの腹腔内に NPrCAP/M を注射し、2 週間後に移植腫瘍を切除し、鉄染色により NPrCAP/M の細胞内局在を電子顕微鏡により検討した。Fe 粒子は細胞質内の、内部に黒色構造を有する後期メラノソーム内に高率に認められた (図 2)。

他の細胞内小器官にはほとんど認められなかったことから、NPrCAP/M はメラノーマ細胞の後期メラノソームに高親和性を示し、チロシナーゼの基質として働くことが強く示唆された。



【図 2】



【図 3】

3. NPrCAP/M の他臓器への移行性

C57black マウス背部皮下の B16F1 腫瘍に NPrCAP/M を局注し、5 日後に各臓器を摘出して皮下腫瘍以外の臓器組織への NPrCAP/M の移行性を検討した。その結果、腫瘍以外に脾臓にわずかの鉄が検出のみであった。また、NPrCAP/M 50mg を腹腔内に投与したマウスでは、脾臓に約 70%、肝臓に約 20%の鉄が検出されたが、心臓、肺、腸管、腎臓には 2-3%のみが検出され、網内系以外の臓器には移行し難いことが見いだされた (図 3)。

E. 結論

NPrCAP 結合マグネタイトはメラノーマに対する細胞障害の感受性および特異性が高く、細胞内の後期メラノソームに高率に取り込ま

れたことからメラノーマ細胞およびメラニン合成系に特異的な DDS として優れたナノパーティクルであると考えられる。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 山下利春、原弘之、神保孝一：メラノーマにおける最近の進歩。細胞、38:30-32, 2006

2. 学会発表

1) Jimbow K, Yamashita T, Ono I, Matsusaka H, Takada T, Sato M, Sakemoto A, Sato N, Tamura Y, Miyamoto A, Honda H, Ito A, Ito S, Wakamatsu K: Sulfur-homologue of melanogenesis-substrate with magnetite (NPrCAP/M) can inhibit melanoma growth and reject second melanoma inoculation: A novel chemo-thermo-immuno (CTI) therapy in nano-DDS medicine. The 10th Annual Meeting of Society for Fundamental Cancer Immunology (SFCI). Sapporo Japan. July 13-14, 2006

2) Jimbow K, Takada T, Sato M, Sakemoto A, Tamura Y, Ito A, Honda H, Wakamatsu K, Ito S, Yamashita T: NPr-CAP-magnetite melanoma by non-apoptosis and reject secondarily inoculated melanoma by HSP-mediated immune reaction. 3rd Annual International Melanoma Research Congress, Nordwijk, Netherlands, September 14-16, 2006

3) Yamashita T, Sato M, Ohkura M, Tamura Y, Ito A, Honda H, Wakamatsu K, Ito S, Jimbow K: Induction of cell death in melanoma cells by magnetite-conjugated N-propionyl cysteaminyphenol (NPrCAP/M) nanoparticles. 3rd Annual International Melanoma Research Congress, Nordwijk, Netherlands, September 14-16, 2006

4) Sato M, Yamashita T, Ohkura M, Sakemoto A, Takada T, Matsusaka H, Ono I, Tamura Y, Sato N, Ito A, Honda H, Wakamatsu K, Ito S, Jimbow K: Incorporation to melanoma cells and induction of cell death by magnetite conjugated N-propionyl cysteaminyphenol

(NPrCAP) nanoparticles for melanoma CTI therapy. 13th Meeting of the Europeans Society for Pigment Cell Research, Barcelona, Spain. September 24-27, 2006

4) Sakemoto A, Tamura Y, Sato N, Yamashita T, Takada T, Sato M, Ohkura M, Ono I, Ito A, Honda H, Wakamatsu K, Ito S, Jimbow K: Characterization of tumor immunity in melanoma chemo-thermo-immunotherapy (CTI therapy) using NPrCAP-magnetite (NPrCAP/M) nano-particles. 13th Meeting of the Europeans Society for Pigment Cell Research, Barcelona, Spain. September 24-27, 2006

5) Takada T, Yamashita T, Sato M, Sakemoto A, Matsusaka H, Ono I, Tamura Y, Sato N, Ito A, Honda H, Wakamatsu K, Ito S, Jimbow K: Rejection of secondly inoculated melanoma and prolongation of life span of melanoma-bearing mice by melanogenesis targeted chemo-thermo-immuno (CTI) therapy using NPrCAP-magnetite nano-particles. 13th Meeting of the Europeans Society for Pigment Cell Research, Barcelona, Spain. September 24-27, 2006

H. 知的財産権の出願・登録状況

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
～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 九州大学大学院工学研究院 助教授

研究要旨

本年度は、臨床応用を念頭に、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 (cysteaminy phenol: CAP) と細胞内温熱効果を有する磁性ナノ微粒子 (マグネタイト) を結合させた薬剤の規格の決定と、GMP に準拠した合成方法の検討を行った。

核となる磁性ナノ粒子には、MRI の造影剤としてすでに臨床で使用されており、安全性も確認されているデキストランマグネタイト (商品名: リゾビスト) を使用した。デキストランマグネタイトの発熱能力を調べたところ、以前から合成して使用していたマグネタイトと比較しても、より高い発熱能を示した。デキストランマグネタイトの表面に CAP を結合させるために、デキストランマグネタイトをアミノシラン化する必要があるが、アミノシランカップリングを行うと、粒子径が増大して沈降が見られた。そこで、デキストランマグネタイト表面に直接 CAP を結合するのではなく、ポリエチレングリコール (PEG) で被覆し、その表面に CAP 化合物を結合した。そのことによって、粒子の分散安定性が飛躍的に向上し、少なくとも2ヶ月以上、粒子径は75nm程度であった。

さらに、PEG を使用することによって、全身性投与時における血中滞留性の向上が期待できる。そこで、PEG を結合した磁性ナノ粒子を作製し、マクロファージ細胞株である J774-1 細胞に添加して、細胞への磁性ナノ粒子の結合量を測定したところ、PEG 修飾をしていないマグネタイトと比べて顕著に貪食が抑制されていた。これらの結果から、PEG を修飾することでマクロファージなどの貪食細胞に貪食が抑制されていることから、PEG がマグネタイトに導入されて貪食細胞に対するステルス効果を発揮していると考えられる。

これらの結果から、臨床に使用する薬剤の規格が決定された。さらに、この規格の薬剤をクリーンに、また再現性よく、大量に作製するための検討を行うことで、臨床応用に使用する薬剤を完成させた。

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ニール・フェノール (cysteaminy 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) を結合させた薬剤の設計を行った。前年度までに、リポソームを利用した剤形を検討したが、臨床応用を念頭においた場合には、多数の脂質を使用するよりもシンプルな剤形が望まれた。一方、直接的にマグネタイトに CAP を結合させる方法では、粒子の分散安定性が悪いため、血中投与までを考慮に入れると、課題が残った。そこで本年度は、磁性ナノ粒子と CAP 化合物との間のリンカーとして、ポリエチレングリコール (PEG) を検討した。PEG は、親水性が高いために、粒子の分散安定性を向上させる効果が報告されており、また、血中投与した際には、血中タンパク質の結合を防ぎ、さらには細網内皮系のマクロファージ等の貪食を回避できることから、非常に注目されている。

本年度は、臨床応用を念頭に、薬剤の規格の決定と、GMP に準拠した合成方法の検討を行った。

B. 研究方法

B-1 デキストランマグネタイト (リゾビスト) の発熱特性

臨床応用を考慮した場合、核となる磁性ナノ粒子の医薬品としての安全性は大きな問題である。この問題を回避するために、すでに MRI の造影剤として市販されているデキストランマグネタイト (商品名: リゾビスト) の使用を検討した。

リゾビストは、MRI の造影剤であって、我々が開発した高周波磁場発生装置で発熱させることが

できるかを検討した。

従来使用していたマグネタイトあるいはリゾビストの水分散コロイド溶液 0.5 ml (マグネタイト量: 5mg) と、2%アガロース溶液 0.5 ml をそれぞれエッペンドルフチューブに加えてゲル化させた。コントロールとして超純水 0.5 ml と 2%アガロース溶液を 0.5 ml を加えたものも作製した。これらのサンプルを、高周波磁場発生装置のコイル中に置いて、光ファイバー温度計をチューブ内に挿入した。交番磁場を発生させ、10 分間の温度変化を測定した。

B-2 NPrCAP/PEG/リゾビストの合成 (図 1)

40mg/ml のマグネタイトコロイド溶液 (リゾビスト) 10ml にアミノシランカップリング剤である 3-Aminopropyltriethoxysilane (APTES, 濾過滅菌済み) を 2ml 加え、超音波発生装置 (Digital Sonifier 250, BRANSON, Danbury, Connecticut, U. S. A.) で超音波を当てた状態で 1 時間反応させた。その後、遠心分離 (4000rpm, 40min) をして上清を除き、10ml のリン酸緩衝液 (pH 7.5) を加えて攪拌した。その後、遠心分離 (4000rpm, 10 min) をして上清を除き、10ml のリン酸緩衝液 (pH 7.5, Sigma 製) を加えて攪拌するといった洗浄の操作を 3 回繰り返して、マグネタイトの微粒子を洗った後、10ml のリン酸緩衝液に再懸濁した。続いて、ポリエチレングリコール (SUNBRIGHT MA-050TS, 日本油脂製) を 24 mg 秤量して 1ml のリン酸緩衝液に溶解させ、濾過滅菌した後、マグネタイトを含む溶液と混合させた。超音波発生装置で超音波を照射しながら 1 時間反応させた。反応終了後、Amicon tube 4 本に 2.5ml ずつ分注し、遠心分離 (4000rpm, 20min) をして上清を除き、0.5ml ずつの注射用蒸留水 (大塚製) を加えて懸濁した。遠心分離 (4000rpm, 10min) をして上清を除き、0.5ml ずつの注射用蒸留水を加えて懸濁した。この操作