

200712005A

厚生労働科学研究費補助金

医療機器開発推進研究事業

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-一般-004)に関する研究

平成19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 神保 孝一

平成20(2008)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) 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. N-(1-mercaptopropionyl)-4-S-CAP-SH の合成とその新規結合型マグネトリポソーム
(NPrCAP-SH/ML)、結合型マグネタイト (NPrCAP-SH/M) および結合型マグネタイト
(NPrCAP/PEG/マグネタイト) の合成研究・・・11
伊藤 祥輔、若松 一雅
2. メラノーマ標的ナノ微粒子 (NPrCAP/PEG/DM) によるメラノーマ温熱免疫療法の開発
～薬剤合成の評価法の検討と PEG 修飾の効果～・・・16
本多 裕之、井藤 彰
3. NPrCAP/M のメラノーマ細胞選択的移行性と温熱療法によるメラノーマ細胞の
選択的障害・・・22
山下 利春
4. メラノーマ標的ナノ微粒子 (NPrCAP/Magnetite) によるメラノーマ温熱
免疫療法の臨床応用
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～・・・26
小野 一郎
5. メラノジェネシス標的ナノパーティクル NPrCAP/M を用いた悪性黒色腫
化学温熱免疫 (CTI) 療法における腫瘍免疫機構の解析・・・35
佐藤 昇志、田村 保明

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
(医療機器医推進研究事業)
総括研究報告書

メラノーマ標的ナノ微粒子 (NPrCAP) 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医学部	名誉教授
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
	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	准教授
	山下 利春	札幌医科大学皮膚科学講座	教授
	小野 一郎	札幌医科大学皮膚科学講座	准教授
	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

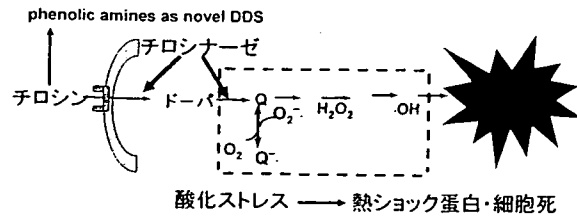
皮膚がん(癌)で最も悪性度が高く、又日本を含め全世界的に新規治療法の開発が切実に求められているのは悪性黒色腫(メラノーマ)である。メラノーマはメラニン色素産生細胞であるメラノサイトが癌化した腫瘍である。従い本症は、メラノサイトの存在する全ての部位、即ち全身の皮膚と口腔、鼻腔、眼球、陰、肛門等の粘膜のみならず眼球内、脳・軟脳膜に発症し、早期よりリンパ行、血行路を介し、全身の臓器に転移、全ての癌の中で最も悪性度の高い癌の一つである。

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)。

殊に本研究では現在外科的切除以外有効な治療法のないメラノーマに対し3つの戦略をもちい新規化学温熱免疫(CTI: chemothermoimmunotherapy)療法を開発することを目的とする。其の戦略の1はメラノーマに特異なメラニン色素形成、メラノジェネシスを分子標的とする薬剤 N-propionyl cysteaminyphenol (NPrCAP) をもちいメラノーマに選択的に取り込まれる DDS を構築する事、その2はメラノジェネシス経路に取り込まれた NPrCAP が発生する細胞毒性フリーラジカル由来の酸化 stress を介した化学療法による細胞破壊と腫瘍抗原ペプチド産生をおこなう事、其の3は NPrCAP とナノ磁気微粒子マグネタイトを重合させ、熱ショック蛋白産生を介した温熱免疫療法を確立する事である。これにより TIL (腫瘍浸潤リンパ球) を活性化させ遠隔転移腫瘍の撲滅を図る(図2)。

図1

1. 新規DDSの開発:メラノーマに特異な形質であるチロシナーゼ基質の細胞膜レセプターを介した選択的取り込み



2. 新規化学・免疫療法剤の開発:メラニン形成に伴う細胞障害性フリーラジカル・酸化ストレスの産生

A. 研究目的

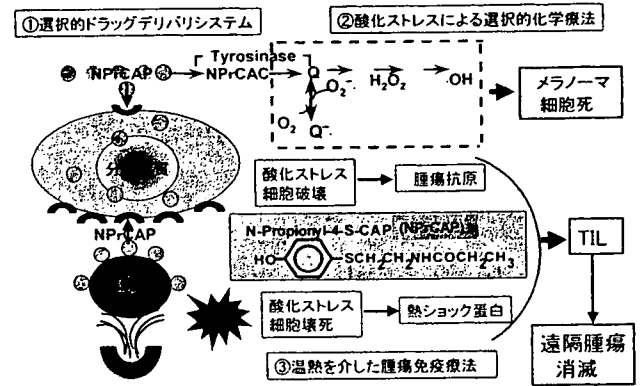
メラニン形成 (メラノジェネシス) は全てのメラノーマ細胞にとり特異な分化形質であり、癌化と共に異常に亢進する。本経路は無色素性腫瘍 (amelanotic melanoma) に於いても存在する。メラニン前駆体であるチロシンはメラノジェネシスの経過中にチロシナーゼと酸化・還元反応をおこし細胞毒性を有するフリーラジカルを生ずる。本研究はこのメラノジェネシスに伴う細胞毒性反応を利用し、メラニン形成酵素チロシナーゼの基質であるチロシンに細胞膜との親和性を高めるために硫黄を含有させたフェノリックアミン (phenolic amine) 誘導体を合成しメラノーマ細胞を選択的に破壊することである。

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、
- ③ CAP 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、

- ④ 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)。

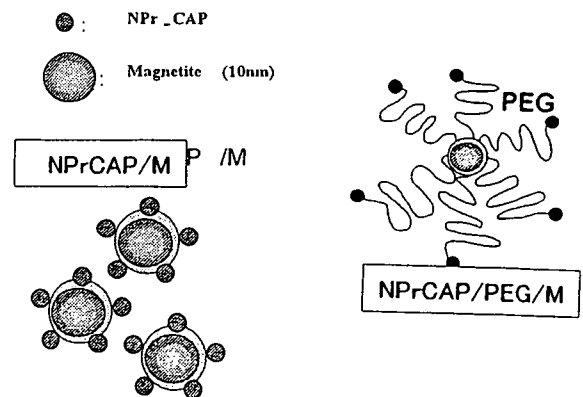
図2



B. 研究方法 / C. 研究結果

NPrCAPをマグネタイト重合、固定させた薬剤は4種類合成された (図3)。

図3

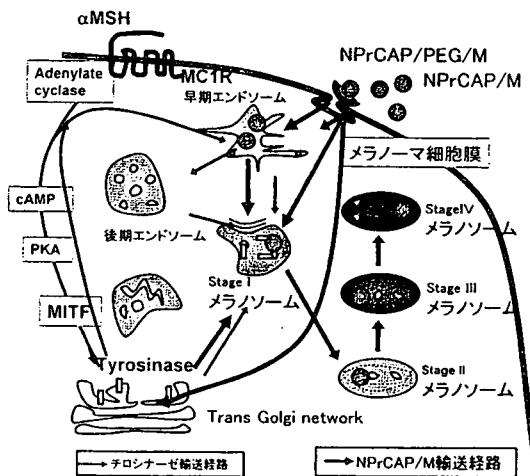


これ等薬剤の合成は共同研究者である本多と伊藤とで開発した。これらマグネタイトは10nm大のナノ微粒子を用いた。マグネタイトは①中性リポソーム (NPrCAP-magnetoliposome; NPrCAP/ML)、②陽イオンリポソーム (NPrCAP

-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)。

我々は①動物実験に対しては主としてNPrCAPとMと直接結合したNPrCAP/Mを②ヒトの臨床試験に対してはこれにPEG(polyethylene glycol)とを重合させ多くの脚足をもち、細胞結合性を増加させたNPrCAP/PEG/Mを合成した。これら薬剤はメラノーマ表面のレセプターを介しエンドソーム系に先ず入り、其の後メラノジェネシスの代謝経路の直接入り、細胞内メラノジェネシス経路に集積すると考えられる。即ちNPrCAP/Mはin vivo局所投与、in vitro培養細胞系において選択的にメラノーマ組織・細胞、更に腹腔内に投与した際、メラノジェネシスの最終産物であるメラノソームに集積し、細胞内に蓄積された(図4)。

図4

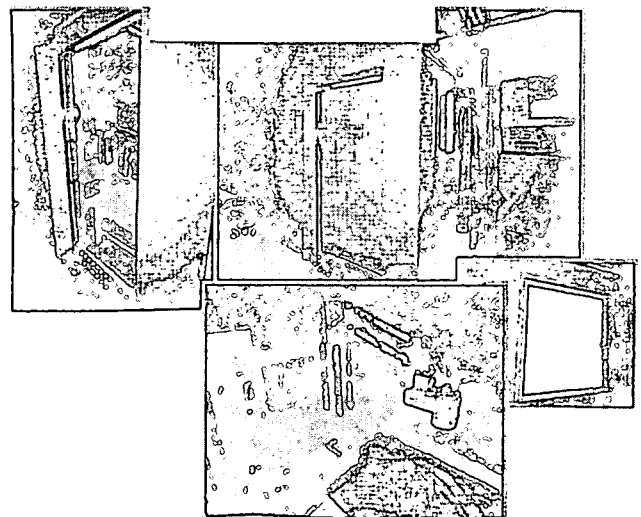


動物実験治療プロトコールは腫瘍移植 6 日目より 1 日おきに NPrCAP/M を 3 回投与し、磁場照射により腫瘍表面温度 43 度に設定し、其の後治療腫瘍を切除除し、次いで加療マウスを 40 日間放置し、再度メラノーマを第 1 回メラノーマ移植部位とは反体側に移植し、腫瘍の増殖抑制・拒絶を見、更に長期的延命効果をみる事である。コントロールとして鉄投与のみの場合全く第 2 回メラノーマ移植リチャレンジテストで腫瘍増殖抑制・拒絶は認められなかった。しかし磁場

照射を行うと約 50%の治療効果で認められた。一方鉄投与・磁場照射と全く同等の効果が NPrCAP/M 単独・磁場照射無しでも認められた。最も効果的なりチャレンジテスト抑制・拒絶効果は NPrCAP・M に磁場照射を行った群であった。熱ショック蛋白産生を見ても同様の結果が得られた。また腫瘍表面の加温は 41 から 46 度中、43 度が最も効果的であった。本プロトコールにもとづき、メラノーマ増殖抑制を見ると、第 1 回移植後では NPrCAP/M 治療群は磁場照射の有無に関係なく同等の腫瘍増殖抑制効果が認められた。しかし、第 2 回目のメラノーマ移植リチャレンジテスト増殖拒絶が磁場照射併用群で 90-100%に、非併用群では 50%に認められた。更に生存曲線を見ますと磁場照射群マウスでは 100%、非照射群では 20%の ILS が認められた。

これ等動物実験と平行し、メラノーマ症例に対し第 I, II 相 CTI 療法臨床試験を実施するため、企業との提携・指導下にて学内に GMP-grade-NPrCAP/PEG/M 合成施設と CTI 治療室(図 5)を作り、併せて既存の磁場発生装置を臨床治療用に改良し、更に薬剤安全性を確認の後に倫理委員会の許可を受け、臨床試験(学内限定第 I, II 相)を平成 19 年 3 月より開始した。

図5



現在までに 4 例の症例が登録され加療を行っ

ているがその一例にCRがみとめられた。本症例はメラノーマ原発巣不明で多発性全身皮膚転移巣の患者で、NPrCAP/PEG/Mを状腕の皮膚メラノーマ転移巣内に投与し、その1週後に治療部を切除し、組織学的検索に回した。薬剤投与・磁場照射局所の腫瘍辺縁ではリンパ球とマクロファージ (CD68) の周密な浸潤があり、リンパ球はCD8陽性の細胞障害性T細胞であり、これ等リンパ球はMHC class I発現樹状細胞陽性の部位に高頻度認められた。この事はCTI加療後にHSP70とメラノーマ由来抗原ペプチド複合体が抗原提示細胞である樹状細胞に取り込まれMHC class I抗原提示をT細胞に行い腫瘍免疫の獲得がなされた事を示唆する。事実、実際の評価対象の4箇所の皮膚転移は超音波画像下でその体積の縮小を経時的に示し、152日後には瘢痕組織のみとなった。患者は加療開始10ヵ月後通常の社会生活を送っている(表1)。

表1

メラノジェネシス標的ナノ微粒子
メラノーマ化学温熱免疫療法開発の要約

【基礎研究】

NPrCAP:

- ①新規メラノーマ標的DDS、化学療法的細胞殺効果
- ②再移植メラノーマ増殖抑制・拒絶効果があり加温により効果増強

NPrCAP/M:

- ①磁場照射後、選択的化學温熱細胞殺効果
- ②再移植メラノーマ増殖抑制・拒絶効果と生存率(%ILS)の増加
- ③HSPとメラノーマペプチド複合体によるTIL活性化による腫瘍免疫効果

NPrCAP/PEG/M:

- ①より効率的な拡散性、親水性、腫瘍親和性と選択的DDS効果
- ②ホストに無害(LD50>1,000mg/kg)、NPrCAP/Mのヒト治療用改良型

【臨床研究】

- ①CTI治療室の建築、既存の交換磁場発生装置のヒト治療用への改造
- ②NPrCAP/PEG/Mを用い学内限定第I, II相臨床研究試験の開始(2007年3月)、CTIメラノーマ治療症例選定・評価委員会設置
- ③4例の臨床試験を行い全身皮膚転移巣の1例

CR, 1例PR

④照射腫瘍ではMHC Class I発現周囲にCD8+細胞が浸潤する事を確認

D. 考察

1. 臨床試験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年間行ってきた。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うる。

- 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-propionyl誘導体であるNPrCAP(N-propionyl-4-S-cysteaminly phenolはチロシナーゼへの基質親和性が高くしかも反応速度が緩徐であり、メラノーマに特異的、非可逆的な細胞毒性を示した(図6, 7)。

図6

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

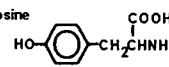
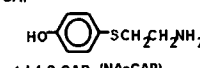
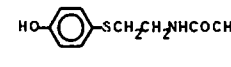
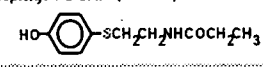
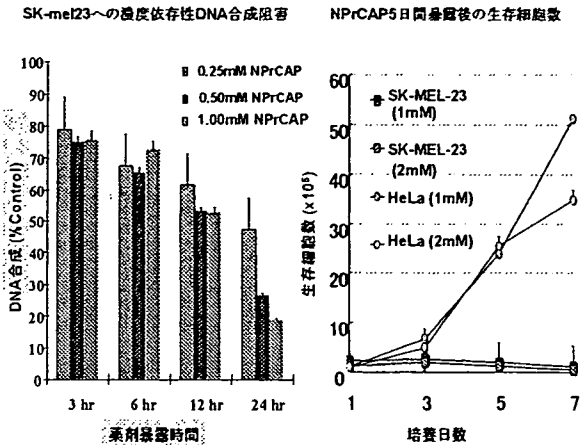
	Km (μ M)	Vmax (μ mole/min/mg)
Tyrosine 	0.3	1.80
4-S-CAP 	117.0	7.97
N-Acetyl-4-S-CAP (NAcCAP) 	375.0	9.28
N-Propionyl-4-S-CAP (NPrCAP) 	340.9	5.43

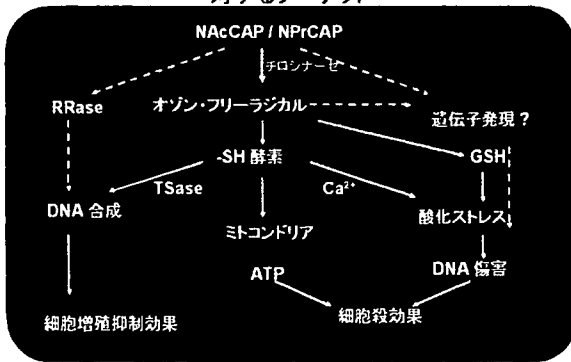
図7



- ② 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。
- ③ 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7)。
- 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8)。

図8

NPrCAP/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



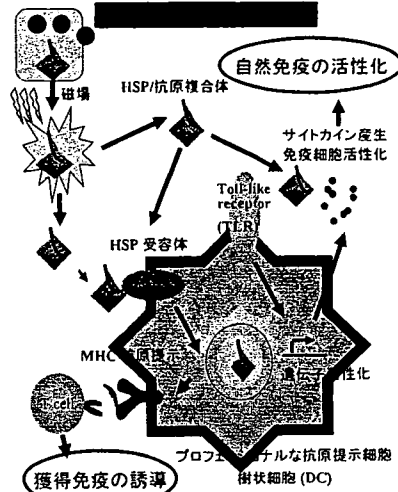
- ⑤ PrCAPは安定な薬剤であり、人体に塗布した場合 (例えば肝斑患者の顔面) 皮膚

に無害で脱色効果がある (10年以上の経過観察)。

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

生体に HSP を介した腫瘍免疫機構が生ずる事は、多くの我々の研究グループを含め多くの最近の研究で明らかになっている。今回の我々の研究は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にメラノーマを標的とし化学・免疫療法剤である NPrCAP とを重合させ、NPrCAP/M、更に新規薬剤である NPrCAP/PEG/M を合成し、これら薬剤がメラノーマの形質であるメラノジェネシスを標的とした腫瘍免疫機構が発生しえる事を証明した (図9)。

図9



2. 臨床試験研究のための特色・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、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 今回の研究で NPrCAP/M 自体、磁場照射を行うこと無しでも、統計的に十分な有意差を持って、メラノーマ増殖抑制効果のみならず、腫瘍移植再チャレンジ試験においても腫瘍増殖抑制が認められた。

2) 新規メラノーマ標的新規化学・温熱・免疫 (CTI) 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ことが明らかとなった。

- 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、同時に投与数ヵ月後に全身数箇所の体毛が白色化し、免疫機構を介したメラノサイトの選択的破壊が認められた。
- 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。
- ④ 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、人体に無侵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。
- ⑤ 結果として直接の細胞殺効果のみならず磁場照射後に発生した HSP と NPrCAP による選択的細胞破壊により発生した

メラノーマ由来のペプチドにより細胞傷害性 T 細胞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ずでに確認し、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 (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/M、NPrCAP/PEG/M はメラノーマ標的ナノ微粒子新規薬剤であり、効率の高い化学・免疫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温熱細胞殺効果により更に高いメラノーマ増殖抑制効果を有する。
- ④ NPrCAP/M、NPrCAP/PEG/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/PEG/M の急性毒性 (LD₅₀>1,000mg/kg) は既に終了した。ヒト加療用の機器の安全性を検討し、慢性毒性実験を経て臨床治験を平成 19 年度中に開始し、4 例中 1 例に CR の治療効果を与えることができた。

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。

我々の最終目的は原発巣外科的切除前に CTI 療法を行い、その後メラノーマ腫瘍抗原ペプチドを継続して投与するという次世代 CTI 併用療法の開発を行い、これにより第3、4期メラノーマ患者を撲滅することである。我々の研究は医、工、化学連携で生まれた新しい治療法であるが、今後これに産が加わり国内企業との共同研究により安価で安定した GMP 製剤を作成し、国内のみならずカナダ・米国の施設と共同研究し、本治療法の充実を図る計画である (表 2)。

表 2

腫瘍細胞形質標的ナノ微粒子化学温熱免疫療法の今後の展望

【最終目標】

①CTI 療法を外科的手術前、メラノーマ初期原発巣に施行。その後特異的ペプチドを用いた次世代型免疫療法を継続維持し、メラノーマの再発・転移を防止

②海外施設 (カナダ・米国) と連携した国際的臨床試験

③CTI 療法の他癌腫治療への応用

【問題点】

①NP r CAP/PEG/M の親水性・分散性の改良

②NP r CAP 自体の抗腫瘍免疫機序の解明とマグネタイトとの至的重合

③抗原ペプチドの解析と癌免疫賦活ペプチドデザイン

【今後の研究計画】

①薬剤化学合成; 新規改良薬剤の合成と化学的に安定した GMP 製剤供給

② 抗腫瘍機序; 腫瘍選択性・特異性と薬剤感受レセプター

③次世代型併用療法の開発; TIL 解析・増幅、TIL 誘導 CTL の温熱、ペプチド探索・デザイン・アッセイ法の開発

④新規薬剤の学内限定第 I, II 相試験、学外症例第 II, III 相試験

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・腔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法がなく、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. Akasaka Y, Ono I, Tominaga A, Ishikawa Y, Ito K, Suzuki T, Imaizumi R, Ishiguro S, Jimbow K, Ishii T: Basic fibroblast growth factor in an artificial dermis promotes apoptosis and inhibits expression of α -smooth muscle actin, leading to reduction of wound contraction. Wound Rep Reg, 2007, 15: 378-389
2. Imai A, Sahara H, Tamura Y, Jimbow K, Saito T, Ezoe K, Yotsuyanagi T, Sato N: Inhibition of endogenous MHC class II-restricted antigen presentation by tacrolimus (FK506) via FKBP51. Eur. J. Immunol, 2007, 37: 1730-1738
3. Kamiya T, Okabayashi T, Tokota S, Jiro O, Yamashita T, Fujii T, Jimbow K: Increased caspase-2 activity is associated with induction of IFN- β sensitive melanoma cell lines. J Invest Dermatol (Submitted), 2007
4. Ogino J, Sohma H, Kamiya T, Yamashita T, Jimbow K: Tyrosinase-related-protein 1 (TYRP-1) is directly associated with AP-1 and co-localized with CGA proteins as well as CI-M6PR in the vesicular transport of early melanogenesis. J Invest Dermatol (Submitted), 2007
5. Yanagisawa K, Yasuda S, Kai M, Imai S, Yamada K, Yamashita T, Jimbow K, Kanoh H,

- Sakane F: Diacylglycerol kinase α suppresses tumor necrosis factor- α -induced apoptosis of human melanoma cells through NF- κ B activation. *BiochemBiophys Acta*, 2007, 1771: 462-474.
6. Kawakami A, Sakane F, Imai S, Yasuda S, Kai M, Kanoh H, Jin H, Hirosaki K, Yamashita T, Fisher D, Jimbow K: Rab7 regulates maturation of melanosomal matrix protein gp 100/Pmel 17/Silv. *J Invest Dermatol* (In press), 2007
 7. Ono I, Yamashita T, Takada T, Tominaga A, Hirosaki K, Jimbow K: Reconstruction method with a newly-designed bilobed flap after excision of tumors of the skin. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg*, 2006, 40: 32-40.
 8. Takada T, Yamashita T, Sato M, Kawakami Y, Tominaga A, Ono I, Jimbow M, Tsutsumi H, Jimbow K: Papulonecrotic tuberculid-like eruptions after BCG vaccination. *J Dermatol*, 2007, 34(3): 183-191.
 9. Ogino J, Jimbow K, Ono I, Sakemoto A, Kamiya T, Kaneko R, Hirosaki 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 Dermal* (Submitted), 2007
 10. Hida T, Yamashita T, Hirosaki K, Kawakami 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 gp100 in melanogenesis cascade. *Exp Cell Res*, 2006 (Submitted)*Pigment Cell Res* (Submitted), 2007
 11. 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*, 2007 (Submitted)
 12. Ito A, Fujioka M, Yoshida T, Wakamatsu K, Ito S, Yamashita T, Jimbow K, Honda H. 4-s-cysteaminylphenol-loaded magnetite cationic liposomes for combination therapy of hyperthermia with chemotherapy against malignant melanoma. *Cancer Sci*, 2007, 98(3), 424-430
2. 学会発表
1. Kowichi Jimbow, Tomoaki Takada, Makito Sato, Akiko Sakemoto, Takafumi Kamiya, Ichiro Ono, Toshiharu Yamashita, Yasuaki Tamura, Noriyuki Sato, Atsushi Miyamoto, Akira Ito, Hiroyuki Honda, Shosuke Ito, Kazumasa Wakamatsu: Exploitation of Melanogenesis can provide tyrosinase-targeted drug delivery system and Chemo-thermo-immunotherapy with NPrCAP-magnetite for melanoma patients. 21th Annual Meeting of Pigment Cell Research Congress, Dec 8, 2007, Aichi, Japan.
 2. Exploitation of melanogenesis for tyrosinase targeted DDS and chemo-thermo-immunotherapy with NPrCAP-magnetite for melanoma patients; rationale and preliminary clinical evaluation. 4th International Melanoma Congress, Nov 1-4, 2007, New York. *Pigment Cell Res.* 20; 513-580
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
 - 1) Title: PHENOLIC AMINE AS DEPIGMENTING AND ANTIMELANOMA AGENTS; 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) 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
(医療機器医推進研究事業)
総括研究報告書

GMP 製剤としての N-(1-mercaptopropionyl)-4-S-CAP-SH および結合型マグネタイト
(NPrCAP/PEG/マグネタイト) の合成とその結合量の測定

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

本年度は、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気ナノ鉄微粒子を結合させた薬剤の設計、作製を目的として、昨年度合成した N-(1-mercaptopropionyl)-4-S-cysteaminyphenol (NPrCAP-SH) の大量かつ純度の高い物質として得られる化学合成ルートおよび精製法の構築を検討した。ついで、その化合物の GMP 製剤の合成法の確立を行った。この化合物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 PEG 結合型マグネタイトと反応させて、GMP grade の NPrCAP/PEG/マグネタイトを合成した。ついで、NPrCAP-SH のマグネタイトに対する結合量を測定した。

A. 研究目的

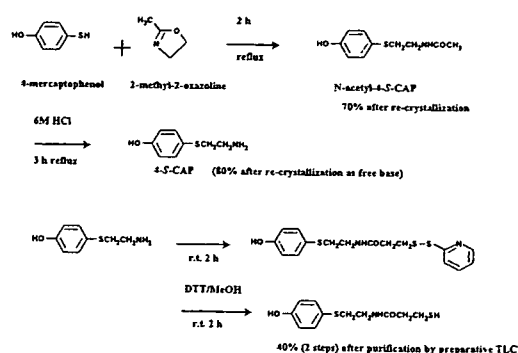
本研究を遂行するために必要な N-(1-mercaptopropionyl)-4-S-cysteaminy lphenol (NPrCAP-SH) を大量かつ純度の高い物質として得られる化学合成ルートおよび精製法の構築を行った。さらに、GMP grade による生産を念頭に入れたプロセスの構築を行った。ついで、PEG/マグネタイトと NPrCAP-SH との結合法の改良を行い、結合量の向上をめざした。これらの薬剤の合成は、動物・臨床実験をスムーズに進行させるために最重要である。

B. 研究方法および結果

1) NPrCAP-SH 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、再結晶後 70% の収率で N-アセチル-4-S-CAP を得た。これを 6M 塩酸で 3 時間還流させ、再結晶後、目的物の 4-S-CAP を 80% の収率で得た。つづいて、4-S-CAP を 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 (1:1、2:1、3:1)) で精製後 (94%、油状物質)、メタノール中ジチオトレイトール (DTT) と室温で 2 時間反応させ、得られた目的物質 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 (2:1)) で精製後、さらに再結晶 (酢酸エチル-エーテル) し無色結晶を得た (80%) (図 1)。

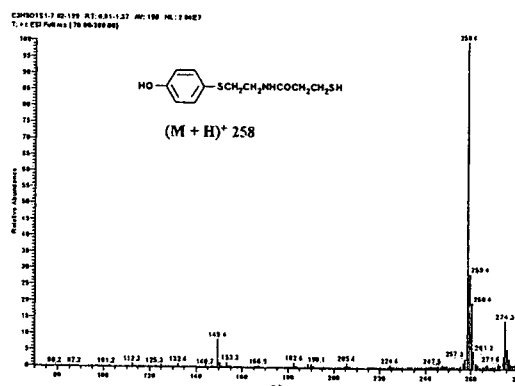
図 1



つぎに GMP grade の NPrCAP-SH を得るために、分取 HPLC によりさらに精製を行った。HPLC 条件: カラム (Silica gel Type MG, 10 μ m, 15 x 250 mm)、移動相 (酢酸エチル : n-ヘキサン、2 : 1)、検出器 (紫外線検出器、250 nm)、測定温度 (室温)、流速 (4.0 ml/min)

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、((M + H)⁺: 258, 164, 153, 132, 125) (図 2) および ¹H-NMR スペクトル (CD₃COCD₃, 400 MHz) により同定した (図 3)。元素分析結果: 理論値 (C₁₁H₁₅N₁O₂S₂ として): C, 51.36; H, 5.84; N, 5.45; S, 24.90 測定値: C, 51.41; H, 5.78; N, 5.50; S, 24.83。

図 2



2) マグネタイトのアミノシラン化

マグネタイト (40 mg/ml) を 50 ml 遠沈管に 5.0 ml 分注し、リン酸バッファー 5.0 ml で希釈する (最終濃度 20 mg/ml)。3-アミノプロピルトリエトキシシラン (APTES) 原液をフィルター滅菌して、2 ml 加え、vortex mixer で攪拌後、超音波で 60 分処理後、4,000 rpm で 40 分遠心後、上清を除き、リン酸バッファーを加えて、懸濁した。さらに超音波処理 5 分、vortex mixer で 1 分攪拌した (3 回繰り返す)。10 ml のリン酸バッファーを加え、超音波処理を 30 分行い、再分散した。

3) アミノシラン化マグネタイトと PEG との反応

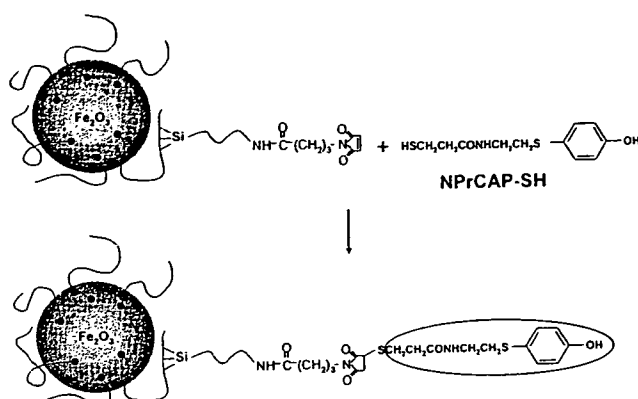
SUNBright MA-050-HS (PEG) を 24 mg/200 mg マグネタイトになるように秤量し、1 ml のリン酸バッファーを加え、ろ過滅菌を行う。再分散が終わった遠沈管に PEG を全量加え、vortex mixer で攪拌する。超音波処理 60 分後、amicon チューブ 4 本に 2.5 ml ずつ分注し、4,000 rpm で 10 分遠心後、注射水 0.5 ml ずつ加え懸濁した。回収した懸濁液を一つの遠沈管に集め、超音波処理 30 分して再分散した。

4) PEG 修飾されたマグネタイトと NPrCAP-SH との反応

マグネタイト/PEG (20 mg/ml) 10ml にフィルター滅菌した NPrCAP-SH (12.5 mg/ml エタノール溶液) 1.0 ml を加えて、室温で 30 分間超音波処理した後、室温で 6 時間放置した。Amicon チューブ 8 本に 1.25 ml ずつ入れ、4,000 rpm/min で 20 分遠心し、上清を分離した後、沈殿を蒸留水 0.5 ml で洗浄した。この操作を 3 回行った。Amicon チューブを逆さまにして、受け取りチューブに装着し、200 μ l の蒸留水を十字口に注ぎ、3,500 rpm で 2 分遠心した。8 本の Amicon チューブの試料を全量 2.5ml の蒸留水に懸濁して一つの遠心管に集め、超音波で 20 分間処理し、再分散させた (図 3)。

合成したマグネタイト/PEG/NPrCAP-SH は化合物安全性研究所へ郵送し、安全性試験を行った。

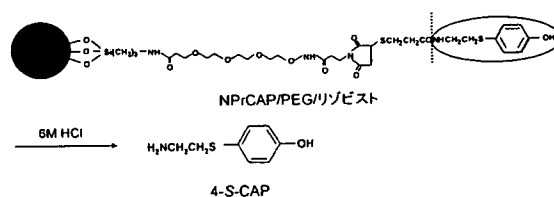
図 3



5) NPrCAP/PEG/マグネタイトにおける NPrCAP の結合量の測定

懸濁液を 6M 塩酸で加水分解 (110°C、4h) し、生成する 4-S-CAP を HPLC で測定したところ、結合量は 176 nmol/mg (添加した NPrCAP-SH の 42%) であった。3 回目の水洗により水洗中の溶液には、NPrCAP-SH はほとんど含まれていなかった (未結合の NPrCAP-SH 総量は添加した NPrCAP-SH の 50%)。しかしながら、この結合量はロットごとにバラツキが見られた (図 4)。

図 4



C. 考察

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シェーリング製のマグネタイトに PEG 処理したものと 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。この原因は、未結合のカルボキシデキストランが含有しているためと考えられた。これを打開するためにマグネタイトの製造元会社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の合成を新たに依頼し、そのマグネタイトを使って 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。つぎに GMP grade PEG/マグネタイトを合成し、GMP grade NPrCAP-SH との反応により目的の GMP grade NPrCAP/PEG/マグネタイトを合成した。

D. 結論

マグネタイト製造元会社との連携により、NPrCAP-SH とカルボキシデキストランがフリーのマグネタイトを反応させて目的の物質を合成できた。さらに、新たに調製した GMP grade マグネタイトを用いて GMP grade NPrCAP/PEG/マグネタイトの合成を達成できた。今後は、GMP grade の NPrCAP/PEG/マグネタイトの安定した供給が必要になる。しかしながら、結合量のバラツキを少なくする改良法の構築の必要性が急務である。

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) Wakamatsu, K., Hu, D-N., McCormick, S.A., Ito, S. Characterization of melanin in human iridal and choroidal melanocytes from eyes with various colored irides. *Pigment Cell Res.*, 2008, 21: 97-105.

- 2) Ito A, Fujioka M, Yoshida T, Wakamatsu K, Ito S, Yamashita T, Jimbow K, and Honda H. 4-S-cysteaminylphenol-loaded magnetite cationic liposomes for combination therapy of hyperthermia with chemotherapy against malignant melanoma. *Cancer Sci.* 2007, 98(3): 424-430.
- 3) Wakamatsu, K., Hirobe, T., and Ito, S. High levels of melanin-related metabolites in plasma from pink-eyed dilution mice. *Pigment Cell Res.*, 2007, 20: 222-224.
- 4) Kitao, Y., Imai, Y., Ozawa, K., Kataoka, A., Ikeda, T., Soda, M., Namekawa, K., Kiyama, H., Stern, D. M., Hori, O., Wakamatsu, K., Ito, S., Itohara, S., Takahashi, R., and Ogawa, S. Pael receptor induces death of dopaminergic neurons in the substantia nigra via endoplasmic reticulum stress and dopamine toxicity, which is enhanced under condition of parkin inactivation. *Hum Mol Genet.*, 2007, 16: 50-60.
- 5) Murakami, K., Wakamatsu, K., Nakanishi, Y., Takahashi, H., Sugiyama, S., Ito, S. Serum levels of pigmentation markers are elevated in patients undergoing hemodialysis. *Blood Purif.*, 2007, 25(5-6): 483-489.

2. 学会発表

- 1) 佐藤牧人、山下利春、黄倉真恵、高田知明、酒本亜紀子、小野一郎、田村保明、佐藤昇志、若松一雅、伊藤祥輔、井藤彰、本多裕之、神保孝一、「マグネタイト結合型システアミニールフェノール (NPrCAP/M) のメラノーマ細胞親和性と細胞死誘導」、第 21 回日本色素細胞学会 (豊明) 2007 年 12 月 8 日
- 2) 酒本亜紀子、田村保明、高田知明、佐藤牧人、小野一郎、山下利春、若松一雅、

伊藤祥輔、井藤彰、本多裕之、佐藤昇志、神保孝一、「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」、第 21 回日本色素細胞学会 (豊明) 2007 年 12 月 8 日

- 3) Kowichi Jimbow, Tomoaki Takada, Makito Sato, Akiko Sakemoto, Takafumi Kamiya, Ichiro Ono, Toshiharu Yamashita, Yasushi Tamura, Noriyuki Sato, Atsushi Miyamoto, Akira Ito, Hiroyuki Honda, Kazumasa Wakamatsu, and Shosuke Ito, 「Exploitation of melanogenesis can provide tyrosinase-targeted drug delivery system and Chemo-thermo-immunotherapy with NPrCAP-magnetite for melanoma patients.」、第 21 回日本色素細胞学会 (豊明) 2007 年 12 月 8 日
- 4) 井上雄二、影下登志郎、若松一雅、伊藤祥輔、尹浩信、「熊本大学皮膚科におけるメラノーマ患者 350 例の 5-S-CD 値について」、第 21 回日本色素細胞学会 (豊明) 2007 年 12 月 8 日
- 5) 菊池かな子、若松一雅、多田弥生、小宮根真弓、伊藤祥輔、玉置邦彦、「ナローバンド UVB 療法中尋常性乾癬患者の血清中 5-S-cysteinyldopa 値の変化」、第 21 回日本色素細胞学会 (豊明) 2007 年 12 月 8 日
- 6) 若松一雅, 伊藤祥輔, Murray Brilliant, 「メラニンの微量分析法の再検討」、第 21 回日本色素細胞学会 (豊明) 2007 年 12 月 9 日
- 7) 古川雅代、中村厚、大坪真也、永岡隆、清原祥夫、若松一雅、伊藤祥輔、宗田孝之、「ヒト皮膚モデルに於けるユーメラニンとフェオメラニンの化学的定量」、第 21 回日本色素細胞学会 (豊明) 2007 年 12 月 9 日
- 8) 塚本克彦、長田厚、小山敏雄、若松一雅, 「部分的金髪症の 1 例: メラニン定量分析と基礎病変についての考察」、第 21 回

日本色素細胞学会 (豊明) 2007 年 12 月 9 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
(医療機器医推進研究事業)
総括研究報告書

メラノーマ標的ナノ微粒子 (NPrCAP/PEG/DM) による
メラノーマ温熱免疫療法の開発
～薬剤合成の評価法の検討と PEG 修飾の効果～

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 准教授

研究要旨

本年度は、デキストラン被覆マグネタイト (DM) にポリエチレングリコール(PEG)を介してメラノーマ細胞特異的親和性を有する N-プロピル システアミニール フェノール (NPrCAP) を結合させた薬剤である NPrCAP/PEG/DM の合成において、薬剤合成のはじめの 2つのプロセスである DM のアミノシラン化および PEG 化について、合成プロトコールの評価法の検討を行い、また磁性ナノ粒子の PEG 修飾の生物学的効果について調べた。

DM の表面に CAP 化合物を結合させるための工程として、3-アミノプロピル・トリエトキシシラン(APTES)を用いて DM 表面を被覆した。この際、DM への APTES 導入量を定量化するための方法として、ニンヒドリン法によるアミノ基の定量法が適用可能であることが分かった。さらに、薬剤を PEG 化するために、アミノシラン化された DM を、分子量 5000 で両末端がそれぞれスクシニミド基あるいはマレイミド基が結合した PEG と反応させる際に、アミノシラン化 DM への PEG 導入量を定量化するための方法として、比色法による PEG 鎖の定量法が優れていることが分かった。

PEG で被覆することによって、粒子の分散安定性が飛躍的に向上するほか、非特異的な細胞内取り込みが抑えられることが期待できる。そこで、PEG を結合した磁性ナノ粒子を作製し、ヒト表皮角化細胞株 HaCaT 細胞、マウス線維芽細胞化部 NIH3T3 細胞、マウス筋芽細胞株 C2C12 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細胞内取り込み量が抑制されていた。これらの結果から、PEG を修飾することで非特異的な細胞との結合が抑制されることから、NPrCAP のもつメラノーマ細胞特異的結合が発揮されると考えられる。

これらの結果から、薬剤の PEG 化工程における合成評価法が決定された。この評価法を用いて、薬剤を再現性よく、大量に作製するための検討を行うことで、製薬会社等で GMP 基準に準拠した薬剤の生産の基盤とすることができると考えられる。

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ニール・フェノール (cysteaminy phenol: CAP) と、細胞内温熱効果を有するデキストラン被覆マグネタイト (DM) を結合させた薬剤の設計を行った。前年度までに、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、親水性が高く、非電荷で、分子鎖が柔軟であるために、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の貪食や、組織の細胞への非特異的吸着を回避できることから、注目されている。

本年度は、今後の製薬会社等の企業ベースによる GMP 薬剤大量生産法の開発を念頭に、現在臨床研究のために少量生産している薬剤を、再現性よく、大量に作製するために、DM への PEG 結合プロセスに関して、合成評価方法の検討を行った。また、薬剤の PEG 修飾に関して、生物学的な効果を調べた。

B. 研究方法

B-1 サンプル中のアミノシランカップリング剤濃度の測定

1 mg/ml の DM 溶液 50 ml にアミノシランカップリング剤である 3-アミノプロピル・トリエトキシシラン (APTES) を 0.5 % 濃度で加え、マグネティックスターラーを用いて攪拌しながら一晩反応させた。その後、ニンヒドリン法によって、サンプル中のアミノ基を定量することで、DM へのアミノ基導入量が測定可能かを調べた。ニンヒドリン法は、0.3 ml のサンプル溶液に 0.3 ml のニンヒドリン溶液を加え、100°C で 20 分間加熱し、570 nm の吸光度を測定することで

行った。検量線として、L-ロイシンを用いた。

B-2 サンプル中の PEG 濃度の測定

PEG 濃度の測定は、Vaszileva ら (Biotechnol Bioeng, 1982, 24: 1931-1939) によって報告されている比色法によって行った。分子量 5000 の PEG を含む 0.2 ml のサンプル溶液に 1.0 ml の 0.5 M 過塩素酸を加え、15 分間の攪拌後、10,000 ×g で遠心分離を行った。0.25 ml の 5% BaCl₂ 溶液をとり、0.1 ml の 0.1M ヨウ素溶液を 1ml の上清に加えた。15 分間の静置後、535 nm の吸光度を測定した。

B-3 PEG 化マグネタイト (PEG-Mag) の作製 (図 1)

10 mg/ml のマグネタイトコロイド溶液 5 ml に APTES を 0.1 ml 加え、超音波発生装置 (Digital Sonifier 250, BRANSON, Danbury, Connecticut, USA) で超音波を当てた状態で 1 時間反応させた。その後、遠心分離を 2 回行って上清を除き、10ml のリン酸緩衝液 (pH 7.5) を加えて攪拌した。これを Aminosilane-Mag とする。その後、遠心分離して上清を除き、10 ml のリン酸緩衝液を加えて攪拌するといった洗浄の操作を 3 回繰り返し、マグネタイトの微粒子を洗った後、10 ml 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 10 mg 秤量して 0.5 ml 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、遠心分離をして上清を除き、PEG 修飾マグネタイト (PEG-Mag) を作製した。作製した溶液の粒子径およびゼータ電位は、動的光散乱法分析装置 (大塚電子社製) を用いて測定した。