

図1 PEG-Mag 作製スキーム

#### B-4 PEG-M の細胞内取り込み量測定と細胞毒性の評価

PEG-Mag, PEG 結合前の Aminosilane-Mag, およびコントロールとして未修飾のマグネタイトといった三種類の磁性ナノ粒子を用いて、三種類の細胞株（ヒト表皮角化細胞 HaCaT, マウス線維芽細胞 NIH3T3, マウス筋芽細胞 C2C12）によって貪食される量を測定した。実験前日に、ターゲット細胞を 60-mm dish に  $5 \times 10^5$  細胞となるように播種をした。実験は、コロイド溶液が三種類、ターゲット細胞が三種類、細胞に取り込ませる時間が 1 時間、2 時間の 2 条件、 $n=3$  で行った。

一細胞当たりマグネタイト量が 100 pg となるように、三種類のコロイド溶液をそれぞれ培地に添加し、マグネタイトコロイドを含んだそれぞれの培地を作製した。培養皿から培地を除き、それぞれのマグネタイトを含んだ培地と交換した。培地を添加してから、1 時間後、2 時間後にそれぞれの培地を取り除き、PBS を加えて一回洗った後、2ml の PBS を加えて、トリプシン溶液を用いて細胞を回収し、細胞数をトリパンブルー色素排除法でカウントし、残りを細胞内鉄濃度測定に用いた。細胞内鉄濃度測定に用いる液を、遠心分離し、上清を捨てた。回収した細胞のペレットに 12N の塩酸を 0.2 ml 加え、ペレットとマグネタイトを溶解させた。溶解したサンプルに、5% のトリクロロ酢酸溶液を 1 ml 加え、4°C の冷

蔵庫で 30 分間静置した。その後、遠心分離を行い、タンパク質、および脂質を除去した。その後、上清を別のマイクロチューブに移し、過酸化水素水 10  $\mu\text{l}$ 、チオシアン酸カリウム 4 ml を加えて、比色法にて細胞内のマグネタイト量を測定した。最後に、測定したマグネタイト量を同じ培養皿の細胞数で割ることで、一細胞当たりに取り込まれたマグネタイト量を算出した。

細胞毒性評価は、WST-8 アッセイを用いて行った。ターゲット細胞 (HaCaT, NIH3T3, C2C12 細胞) を 96-well plate に 5000 cells/well で播種し、それぞれのマグネタイト溶液が 0.1, 1 および 10 ng/cell の濃度の培地と交換した。48 時間後、WST 試薬を 10  $\mu\text{l}$  培地に添加して、490 nm の吸光度を測定することで細胞の生存率を測定した。

#### (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 サンプル中のアミノシランカップリング剤濃度の測定

ニンヒドリン法により、サンプル中のアミノ基量を測定したところ、サンプル中に含まれる量の理論値としては 4920 ppm であるのに対して、実測値としては、3985 ppm だった。これは、実際に含まれる量の 81% が検出されたと考えられる。また、得られた検量線から、本方法は感度が高く、有効な方法であると考えられる。

##### C-2 サンプル中の PEG 濃度の測定

PEG 濃度の測定は、Vaszileva らの方法を用いて、比色法の検討を行った。PEG 濃度に伴う吸光度の増加を図 2 に示す。本方法は簡便であり、PEG 濃度を変えた場合の検討で得られた吸光度の直線性から、感度も十分に高いため、本研究のプロセスに合致すると考えられる。

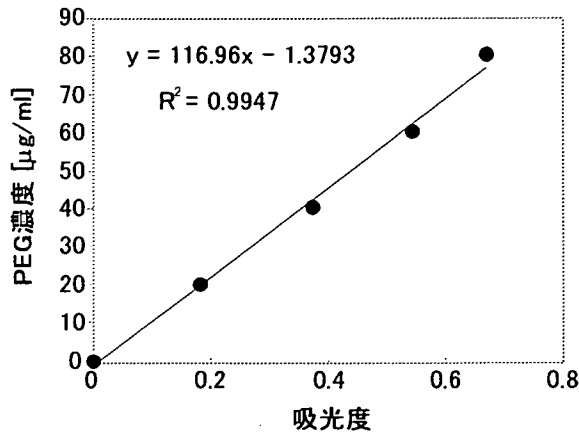


図2 PEG濃度の比色法による測定

### C-3 PEG化マグネタイト (PEG-Mag) の作製

図1のスキームで作製したPEG-Mag, Aminosilane-Mag, および未修飾のマグネタイトの性質と粒子径分布を、それぞれ表1と図3に示す。

表1 それぞれの磁性ナノ粒子の性質

|                 | Mean diameter [nm] | Zeta potential [mV] |
|-----------------|--------------------|---------------------|
| Magnetite       | 68.4±0.1           | -49.1±1.5           |
| Aminosilane-Mag | 915.4±276.1        | -2.5±0.1            |
| PEG-Mag         | 220.2±15.7         | -24.5±0.6           |

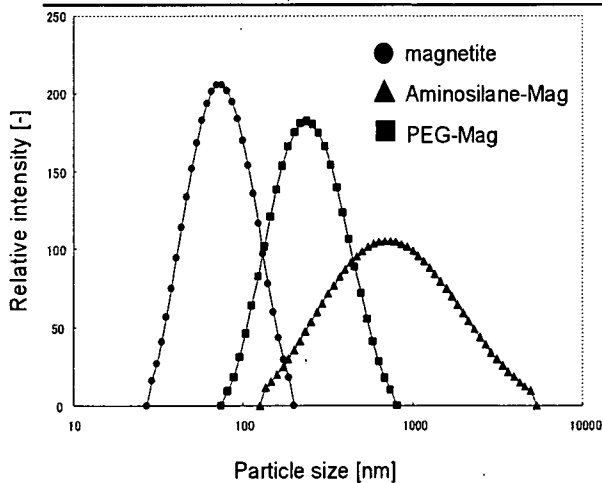


図3 磁性ナノ粒子の粒径分布

表1と図3より、マグネタイトのゼータ電位はマイナス側に大きく、粒子径は小さかった。一方、アミノシランを表面に結合

すると、ゼータ電位はプラス側にシフトするが、中性付近に留まり、また平均粒子径は915 nmと大きくなった。一方、PEGで表面をコートすることにより、ゼータ電位は再びマイナス側に大きくシフトし、粒子径が小さくなった。粒子径が小さいPEG-Magは、Aminosilane-Magと比較して、分散安定性が著しく高かった。

### C-4 PEG-Mの細胞内取り込み量測定と細胞毒性の評価

図4にPEG-MagおよびAminosilane-Magを添加した後の細胞内マグネタイト量を示す。

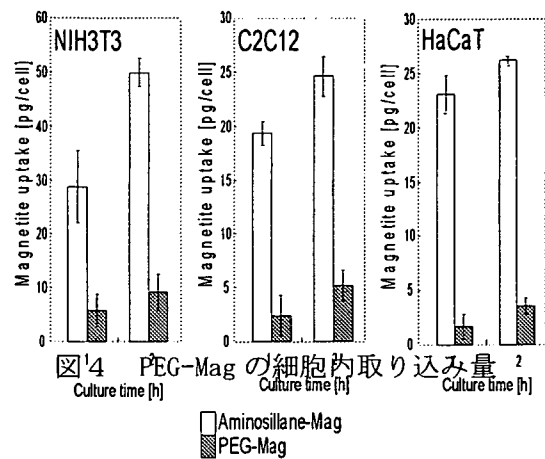


図4 PEG-Magの細胞内取り込み量<sup>2</sup>

図4に示すように、PEG-Magの細胞内取り込み量は、Aminosilane-Magの取り込み量と比較して、はるかに低く、添加した量のわずか5-10%程度の取り込み量であることが分かった。

さらに、PEG-MagおよびAminosilane-Magが0.1, 1および10 ng/cellを添加した後の生細胞率をWST-8 assay法で測定したところ、HaCaT細胞では全ての濃度で、C2C12細胞では0.1および10 ng/cellの濃度で、NIH3T3細胞では10 ng/cellを添加した時、有意にPEG-Magの生細胞率が高かった。このことは、PEG-Magの細胞内取り込み量の低下(図4)に伴い、細胞毒性も低下したと考えられる。

### D. 考察

#### D-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

ニンヒドリン法による実測値と測定値の19%の誤差に関しては、マグネタイト由来の褐色着色の吸光度への影響等が考えられるが、この点については、サンプルを完全に溶解させた後にマグネタイトを分離するなど、反応条件を変えることで十分に改良が可能である。したがって、もう少し検討を要するが、ニンヒドリンを用いることで、サンプル中のアミノ基量は、定量できると考えられる。

#### D-2 サンプル中の PEG 濃度の測定

PEG 濃度の測定は、Vaszileva らの方法を参考に行った。この方法も比色法なので、マグネタイト由来の褐色着色の吸光度への影響等が考えられるが、この点についても、サンプルを完全に溶解させた後にマグネタイトを分離するなど、反応条件を変えることで十分に改良が可能である。

#### D-3 PEG 化マグネタイト (PEG-Mag) の作製

表 1 および図 3 に、合成プロセスにおけるそれぞれのマグネタイト粒子の性質を示した。ナノ粒子の分散性に関しては、ゼータ電位の絶対値が大きいほど、粒子同士の反発により、粒子の分散安定性が増すと考えられることから、PEG-Mag の粒子径の小ささと分散安定性の高さは、ゼータ電位も関係しているのではないかと考えられる。

#### D-4 PEG-M の細胞内取り込み量測定と細胞毒性の評価

本実験では、PEG-Mag は細胞内取り込み量が低いことを示した。このことは、生体内に投与した際にも、非特異的に組織内の細胞に吸着して取り込まれてしまうことを防ぐ役割があると考えられる。このことによって、NPrCAP を表面に結合させた NPrCAP/PEG/DM は、非特異的な吸着が抑えられ、メラノーマ細胞特異的に結合することが期待できる。

PEG は生体親和性の高い高分子として知

られている。WST-8 における生細胞率の測定で、PEG-Mag が Aminosilane-Mag よりも細胞毒性が低かった理由は、PEG の持つ生体親和性の高さによるものもあると考えられることから、NPrCAP/PEG/DM の生体適合性も同様に期待できる。

#### E. 結論

GMP 基準に準じた大量合成を念頭において、各合成プロセスの合成評価法を検討した。また、薬剤の PEG 化による製剤の分散安定性、非特異的吸着抑制、および生体適合性について示した。

#### 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) Kawai N, Futakuchi M, Yoshida T, Ito A, Sato S, Naiki T, Honda H, Shirai T, Kohri K. Effects of heat therapy using magnetic nanoparticles conjugated with cationic liposomes on prostate tumor in bone. Prostate, in press (2008)
- 2) Okochi M, Hayashi H, Ito A, Kato R, Tamura Y, Sato N, Honda H. Identification of HLA-A24-restricted epitopes with high affinity to Hsp70 using peptide array. J Biosci Bioeng, in press (2008)
- 3) Ito A, Kobayashi T, Honda H. Heat immunotherapy with heat shock protein expression by hyperthermia using magnetite nanoparticles. Ann Cancer Res Ther, 15(2), 27-34 (2007)

##### 2. 学会発表

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  
(医療機器医推進研究事業)  
総括研究報告書

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

分担研究者 山下利春 札幌医科大学皮膚科学講座 教授

研究要旨

マグネタイト表面に NPrCAP を結合した新規ナノ微粒子 NPrCAP/M は、磁場照射により効率良く発熱する。NPrCAP/M 含有培地で培養した細胞に取り込まれた鉄量の定量により (*in vitro*)、さらに、B16F1 メラノーマ担癌マウス腹腔内に NPrCAP/M を投与し 2 週間の飼育後に背部メラノーマ細胞中の鉄を染色することにより (*in vivo*)、NPrCAP/M のメラノーマ細胞への選択的 DDS 機能を検討した。これらの結果より、NPrCAP/M はメラノーマ細胞に選択的かつ効率よく取り込まれ、細胞内では、後期メラノソームに特異的に局在することが見出された。NPrCAP/M 処理したメラノーマ細胞を磁場照射して 43°C、30 分温熱処理すると、NPrCAP/M は NPrCAP のないマグネタイトに比べ強い細胞死を誘導した。磁場照射による 43°C の温熱後のメラノーマ細胞の細胞 DNA とカスパーゼ活性を解析した結果、NPrCAP/M による温熱治療はメラノーマ細胞に非アポトーシス性の細胞死を誘導することが示された。本研究により、NPrCAP/M による温熱療法がメラノーマ細胞選択的でありかつ免疫療法として有効であることが示唆された。

## A. 研究目的

NPrCAP はメラニン合成酵素チロジナーゼの基質となり、メラノーマ細胞の増殖を抑制する。また、マグネタイト表面にNPrCAP/Mを内包するカチオン性リポソームを実験メラノーマに注入して局所温熱療法を行うと、周囲の正常組織を傷害することなく移植腫瘍を縮小させることが報告された (Ito A et al: Cancer Sci, 2007)。本研究班は、新たにNPrCAPをマグネタイト表面に結合させた新しいナノ微粒子NPrCAP/Mを合成した。NPrCAP/Mはナノ微粒子表面にメラノーマ細胞親和性をもつ分子を有するため、メラノーマ細胞選択的DDS機能とメラノーマ細胞障害性を有し、さらにマグネタイトの発熱性により温熱治療が可能なすぐれたメラノーマ標的治療薬と推測される。本研究はメラノーマ特異的DDS機能を評価することを目的として、NPrCAP/Mのメラノーマ細胞への親和性と温熱による細胞死誘導能を検討した。

## B. 研究方法

**NPrCAP/Mのメラノーマ親和性の検討:** メラノーマ細胞 (B16F1、SK-mel-23、SK-mel-24、SK-mel-118、MM418、70W、TXM18、MMIV、AK-1、96E)、非メラノーマ細胞 (NIH3T3、LLC、T98G、HeLa、SaOS2、HaCaT、H1229、Caski) の培地にNPrCAP/Mあるいはマグネタイト (84 mg/mlのFe相当量) を添加し30分間培養し、細胞内のNPrCAP/M量を鉄定量により測定した。非特異的吸着をできるだけ少量にするため、約60°の円盤に培養フラスコを固定して回転培養を行った。

**NPrCAP/Mのメラノーマ組織へのデリバリーの検討:** B16F1メラノーマ細胞を左背部、RMAあるいはEG7リンフォーマ細胞を右背部に移植した担癌C57/BL6マウスを作製した。担癌マウス腹腔内に124mgのNPrCAP/Mを投与し、15日目に両腫瘍を切除し鉄染色によってNPrCAP/Mを検出した。また、電子顕微鏡で細胞内鉄粒子の存在と局在性を検討した。

**NPrCAP/M温熱療法による細胞障害の検討:** NPrCAP/M添加培地で30分間細胞を培養し、集

めた細胞に43°C、30分間の磁場照射を行った後、細胞を集めデイッシュに播種し48時間培養した。集めた細胞をトリパンブルーで染色し、青染されない細胞数を計測した。

**NPrCAP/M温熱による細胞死の解析:** NPrCAP/M添加培地で30分間細胞を培養し、43°C、30分間の磁場照射を行い、細胞DNAをフローサイトメーターで解析し、細胞蛋白質中のカスパーゼ3、8、9の活性をアッセイキット (MBL社製キット) で測定した。

## C. 研究結果

1) **NPrCAP/Mのメラノーマ親和性の検討:** メラノーマ細胞と非メラノーマ細胞の培地にNPrCAP/Mあるいはマグネタイトを添加して30分間培養し、細胞を集め鉄量を測定した。メラノーマ細胞 (B16F1、SK-mel-23、70W、TXM18、AK-1、96E) は、マグネタイト処理後よりもNPrCAP/M処理後により多量のFe (マグネタイト、あるいはNPrCAP/M) を含んでいた。一方、非メラノーマ細胞8種類のうちHeLa細胞のみ、マグネタイト処理後よりもNPrCAP/M処理後のFe分子の取り込みが高かった。

2) **NPrCAP/Mのメラノーマ組織へのデリバリーの検討:** 同系のC57/BL6マウス左背部にB16F1を、右背部にRMAあるいはEG7リンフォーマを移植し、担癌マウス腹腔内に124mgのNPrCAP/Mを投与し、15日目に両腫瘍を切除し腫瘍細胞中の鉄粒子を検討した。B16F1メラノーマ組織の鉄染色によってB16F1細胞内に鉄分子 (NPrCAP/M) が検出されたが、リンフォーマ細胞中には検出されなかった。電子顕微鏡による観察により、NPrCAPと結合している鉄粒子は細胞質内の後期メラノソームに局在していた。

3) **NPrCAP/M温熱療法による細胞障害の検討:** NPrCAP/M添加培養細胞に磁場照射を行うと速やかに温度上昇し、10分以内に30°Cから50°Cまで上昇した。NPrCAP/Mを添加し培養したメラノーマ細胞 (MM418、B16F1、SK-mel-23、TXM18) に磁場照射し43°Cで30分間温熱すると、マグネタイト処理の場合に比べて強い細胞死が誘導された。一方、非メラノーマ細胞

ではNPrCAP/M処理とマグネタイト処理の間にほとんど差を認めなかった。

4) NPrCAP/M 温熱による細胞死の解析 : NPrCAP/M 処理後に磁場照射したメラノーマ細胞の DNA をフローサイトメーターで解析した結果、sub-G1 分画の増加はみられず、アガロースゲル電気泳動によっても断片化 DNA は検出されなかった。アポトーシス過程で活性化されるカスパーゼ 3、8、9 の亢進もみられなかった。

#### D. 考察

色素性メラノーマ (MM418、70W、B16F1、SK-mel-23) がマグネタイトに比較して NPrCAP/M を多量に取り込んだことより、NPrCAP/M の分子標的がメラニン合成経路であり、ナノ微粒子表面の NPrCAP が DDS 機能を有することが推測された。メラノーマを移植したマウス腹腔内への NPrCAP/M 投与実験から、NPrCAP/M は血流を介してメラノーマ組織へ移行したと考えられ、メラノーマを標的とする全身療法の可能性が示唆された。鉄粒子が後期メラノソーム内に高率に認められたことは、NPrCAP/M の分子標的がメラニン合成系であることを強く示唆している。NPrCAP/M 処理および 43°C、30 分の温熱による細胞障害実験により、色素性メラノーマ細胞に高率な細胞死が認められたことより、NPrCAP/M の取り込みと温熱による細胞死は相関し、マグネタイト表面の NPrCAP 分子がターゲティングに重要であると推測された。NPrCAP/M と磁場照射による温熱療法は細胞にネクロシスを誘導することを示唆し、B16F1 細胞を 43°C で温熱処理すると、46°C 処理よりも高レベルの HSP70 を産生したことは、NPrCAP/M による温熱療法が HSP70 を介する免疫療法としても有効であることを示唆している。

#### E. 結論

以上より、NPrCAP を結合したマグネタイトナノ微粒子 NPrCAP/M は、磁場照射により効率的に発熱すること、メラノーマ細胞に高率に

取り込まれ、磁場照射による 43°C の温熱によりメラノーマ細胞に非アポトーシス細胞死を誘導することが示された。本研究は、NPrCAP/M による温熱療法がメラノーマ標的温熱免疫療法として有効かつ有望であることを示唆するものであり、将来的なメラノーマの全身分子標的療法確立のための重要な研究であると考えられた。

#### 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, 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 Science* 98, 424-430, 2007.
2. Yanagisawa K, Yasuda S, Kai M, Imai S, Yamada K, Yamashita T, Jimbow K, Kanoh H, Sakane F: Diacylglycerol kinase- $\alpha$  suppresses tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced apoptosis of human melanoma cells through NF- $\kappa$ B activation. *Biochimica Biophysica Acta* 1771; 462-474, 2007.
3. Kawakami A, Sakane F, Imai S, Yasuda S, Kai M, Knoh H, Jin H-I, Hirotsuki K, Yamashita T, Fisher DE and Jimbow K: Rab7 regulates maturation of melanosomal matrix protein gp100/Pmel17/Silv. *J Invest Dermatol* 128:143-150, 2007.
4. 山下利春, 黄倉真恵, 菊地梨沙, 佐藤牧人, 高田知明, 小野一郎, 神保孝一: 帯状疱疹患者の末梢血リンパ球における水痘帯状疱疹ウイルス核酸の検出. *西日本皮膚科* 69(4): 408-413, 2007.

5. Oshima Y, Sasaki Y, Negishi H, Idogawa M, Toyota M, Yamashita T, Wada T, Nagaya S, Kawaguchi S, Yamashita T, Tokino T: Antitumor effect of adenovirus-mediated p53 family gene transfer on osteosarcoma cell lines. *Cancer Biol Ther* 6:1058-1066, 2007.
6. Maruyama R, Akino K, Toyota M, Suzuki H, Imai T, Ohe-Toyota M, Yamamoto E, Nojima M, Fujikane T, Sasaki Y, Yamashita T, Watanabe Y, Hiratsuka H, Hirata K, Itoh F, Imai K, Shinomura Y, Tokino T: Cytoplasmic RASSF2A is a pro-apoptotic mediator whose expression is epigenetically silenced in gastric cancer. *Carcinogenesis* (in press).
7. 2. 学会発表
8. Makito Sato, Toshiharu Yamashita, Masae Okura, Akiko Sakemoto, Tomoaki Takada, Ichiro Ono, Yasuaki Tamura, Noriyuki Sato, Kazumasa Wakamatsu, Akira Ito, Hiroyuki Honda, Shosuke Ito, Kowichi Jimbow: Magnetite-conjugated cysteaminyphenol as a novel nanoparticle vector for melanoma-directed drug delivery and therapy. 4<sup>th</sup> International Melanoma Congress, Nov 1-4, 2007, New York.

#### 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/Magnetite) による  
メラノーマ温熱免疫療室の臨床応用  
～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～

分担研究者 小野一郎 札幌医科大学医学部皮膚科 准教授

研究要旨

我々はメラノーマ (MM) 細胞に選択的に取り込まれチロシナーゼの基質となり、化学的に MM を障害する CAP を磁場照射により発熱するナノ鉄微粒子の magnetite の表面に直接結合させた NPrCAP/M を用いて選択的に MM 細胞を温熱する CTI 治療の効果について動物実験で検討を重ねてきた。動物実験による検討の結果、CAP は直接的な薬理学的効果に加え、温熱治療により治療した腫瘍壊死を見るのみでなく HSP を介した免疫反応により CTL が再移植した MM 腫瘍を拒絶することを確認した。本研究ではその治療戦略の臨床応用のための治療環境の整備の経緯について報告し、臨床例の短期治療経過についても報告する。今年度は基礎的検討の結果を踏まえ、ヒト臨床治療に用いる交番磁場発生装置を開発し、治療に伴い交番磁場発生装置から発生するマイクロ波、電磁波を完全にシールド可能な治療室を設計・施工した上で治療手順マニュアルを作成し、臨床応用の可能な環境・手法を完成させた。以上の治療環境の整備を踏まえ、自主臨床研究として早期臨床治験を開始した臨床例の短期治療経過でも治療部位の MM にはリンパ球が腫瘍細胞に浸潤破壊している像が観察されるとともに非治療遠隔皮膚転移巣でも縮小が観察され、同様な CTL と考えられる CD8 陽性リンパ球の浸潤が観察され、本治療法は MM に対する期待できる治療戦略となる可能性が示された。

## A. 研究目的

我々はMM細胞に選択的に取り込まれチロシナーゼの基質となり、化学的にMMを障害するCAPを磁場照射により発熱するナノ鉄微粒子のMの表面に直接結合させたCAP/Mを用いて選択的にMM細胞を温熱するCTI治療の効果について動物実験で検討を重ねてきた。動物実験による検討の結果、直接的な薬理学的効果に加え、温熱治療により治療した腫瘍壊死を見るのみでなくHSPを介した免疫反応によりCTLが再移植したMM腫瘍を拒絶することを確認した。MM標的ナノ微粒子によるCTI治療においては交番磁場発生装置によって発生される磁場により標的ナノ微粒子に含有される磁性体である鉄が発生する熱により温熱治療を行なう。そのため、発生するマイクロ波や磁場が人体、精密電子機器に影響を可能な限り排除しながら効果的な治療が可能なCTI治療室の設計・施工が極めて重要である。また、治療用チューブあるいはテーブルで治療可能な小動物とは全く異なり、患者の治療部位に患者に無理な体位を取らせることなく磁場発生コイルを圧縮して治療するための装置の開発、改良がもう一点重要な点である。本研究ではヒト治療用に特別に設計し、改良したことで臨床治療が可能な交番磁場発生装置開発、改造すること、機器製造メーカーから提供された機器仕様書と同装置を用いた際の治療コイルヘッド周辺の磁場強度測定結果を参考にしてCTI治療室を設計し、病院皮膚科外来に施工することを第一の目的とした。また、それらを用いてCTI治療の臨床応用を可能とする環境下での治療手順を作成することを目的として模擬腫瘍による検討も行った。つまり、本研究では安全で確実な治療装置の開発。安全で効率的な治療室の設計・施工。CTI治療手順マニュアルの作成。治療計画の立案の考え方、その実際。治療薬剤に対するアレルギー検査法の確立と実施。確実な薬剤投与の手法の確立。正確な温度管理下の磁場による加熱治療手法の確立。治療効果判定のための

画像解析法の確立。以上を踏まえた上での適切な治療法の確立のための探索的研究を実施するための環境作りについて総括し、早期臨床応用例の経過についても言及する。

## B. 研究方法

### B-1 臨床治療が可能な交番磁場発生装置開発、改造

従来、臨床治療用に設計され試作されていた交番磁場発生装置は動物実験用の磁場照射ヘッドがチューブ構造の機器と異なりテーブル状の治療コイルヘッドを持ち、加熱性能が高いことが予備動物実験で確認されていたものの、本体が3ピースに分かれている上、治療コイルヘッドが固定式であり、臨床治療には困難を伴うことが予想された。つまり、患者の治療部位に患者に無理な体位を取らせることなく磁場発生コイルヘッドを圧縮して治療するための装置の開発、改良がもう一点重要な点であった。基本的な改造点は機器の一体化と治療用磁場発生コイルヘッドに自在に稼働するアームを追加し、30分以上の治療期間安定にその位置を維持可能な堅牢性を有することの2点である。また、治療用ヘッドが加熱することを防止するために治療用ヘッドを大型として冷却水の流量を増加させる改造も行った。

### B-2 CTI治療室の設計・施工

本研究ではCTI治療の臨床応用が可能な完全にシールドされた治療室を設計、施工することを目的とした。本研究に先立ち、既に機器の治療コイル部分の高さを床面から1mとした場合に水平方向ではおよそ3-8  $\mu\text{T}$ 、2m離れば1  $\mu\text{T}$ 以下、さらに床面から10cmでも水平方向で1m離ればおよそ2-5  $\mu\text{T}$ 以下、2m離れば2  $\mu\text{T}$ 以下で有ることを踏まえ、現実的には50ないし60cm機器の治療コイル部分から離れば国際非電離放射線防護委員会が1998年4月に作成した時間変化する電界、磁場および電磁界による暴露を制限するためのガイドラインの推奨値よりも低値となることが製造業者の検討で明らかになっていた。この点

のみからは通常の治療室での CTI 治療も可能であるとの考え方もあるが、外来という実験環境とは全く異なる環境であること、ペースメーカーなどを装着した患者が機器のそばを通過する可能性、他の医療治療機器ないしコンピューター、電子カルテシステムへの影響、さらには治療にあたる医師の健康被害の可能性を可能な限り排除することを目的として完全にシールドされた治療室を設計し施工した。設計施工に当たっては MRI などの強力な磁場発生機器の設置室の設計施工に経験の有る施行業者の専門家と協議の上、設計施工を進めた。なお、交番磁場発生装置の設置条件としては電源 3 相 200 V、13kVA、冷却水、水圧 0.35MPa Max.、流量 7L/min 環境温度 10-35℃であるので以上を満たす電源と給排水、並びに冷暖房、照明装置を完備する治療室として設計依頼するとともに完成後に治療室の電磁波の遮蔽効果を RF attenuation meter aF-130L と 130D とを用いて検証した。測定は治療室の壁面、ドア、観測的などの 5 点を選択して低周波領域から高周波まで磁場の漏洩の程度を検討した。

#### B-3 臨床治療手順の確立

これらの治療環境を整備することに加え、臨床治療を開始するための手順を確立することが、安全で効果的・均一化した CTI の臨床治療を遂行するために必要であるので、本研究では疑似腫瘍を用いてより現実的な治療手順を作成することを二番目の目的とした。具体的には手術時に採取した余剰皮膚(単径部皮膚)の脂肪織内に 2 cm<sup>3</sup>程度の別の患者から採取した MM 腫瘍の一部分を筋膜で包み縫合して作成した疑似腫瘍を縫着して皮下転移を持つ、疑似皮下転移 MM 巣を作成した。本検討は当該患者の同意を得た上でおこなっている。次いで CAP/M 溶液 0.5 ml をシリンジポンプで 30 分かけて疑似腫瘍内に注入した。臨床例におけるのと同様 24 時間待機した後、光学式温度センサーを疑似腫瘍内中心に挿入、皮膚表面にも温度センサーを設置した上でフィルム製被覆

材で被覆して腫瘍直上皮膚に貼り付け、磁場治療を行った。その際、磁場照射に伴う腫瘍中心部の温度上昇の経過と治療後の病理組織像を検討した。

#### B-4 治療効果の判定

治療効果の判定は経時的に実施した超音波診断装置、CT、MRI の画像 Personal Computer に移植し、次いで Image J にて皮下腫瘍、遠隔転移腫瘍の大きさを測定、簡易的に体積を計算して行った。具体的には超音波診断装置から画像 data をカラー BMP 形式で CD 経由で PC へ移植する。次いで Photoshop でモノクロ JPG data へ変換保存。計測用 soft により、距離を測定し、体積は長軸 X 単軸 X 厚さ X  $\frac{3}{4} X \pi$  で算出した。

#### B-5 臨床例への応用

以上の治療環境の整備、治療手順の作成、動物実験の検討結果を踏まえて自主臨床研究として札幌医科大学附属病院の IRB の許可を得て、2007 年 3 月から stage IIIc、IV の MM 患者に対して CTI 治療の臨床応用を開始した。治療にあたっては治療による利益と不利益とを詳細に患者並びに家族に説明し、患者本人の同意を得た上で治療を開始した。治療にあたっては札幌医科大学附属病院自主臨床研究の手引き書、日本国厚生労働省臨床研究手順書に従い、Hershinki 宣言の精神を遵守して遂行した。治療は皮下腫瘍に注射針を超音波診断装置監視下に薬剤を 30 分かけて注入、その 24 時間後に腫瘍内温度を監視下に交番磁場発生装置による磁場照射を 30 分間行った。腫瘍内温度は腫瘍内に留置した光学式温度計により監視して 45-6℃ となるように、かつ腫瘍周辺で 43℃ を越えないように交番磁場発生装置の出力を調整して治療した。その治療を連日 3 回繰り返す治療を 1クールとした。溶液は 3 回の治療で腫瘍体積 cm<sup>3</sup> あたり 0.5 ml とし、1クールの治療では最大量 2.0 ml を越えないようにした。治療腫瘍は治療第 1 日から 2-3 週間後に患者の同意を得て全身麻酔下、あるいは局所麻酔下に切除し、各種の検討を行った。現在までに 4 例の臨床例に対して

治療を開始しているが現在まで長期の経過観察が可能であった2症例の経過について報告する。

### C. 研究結果

#### C-1 臨床治療が可能な交番磁場発生装置開発、改造

固定型であった治療用固定コイルヘッドを可変型フレキシブルアーム型へと変更、設置した位置に自動的に固定可能な自動位置固定装置を内蔵させた。治療用固定コイルヘッドを大型にし、冷却量を増大させて、患者への治療時の熱障害の可能性を軽減させた。それに伴い、冷却水循環装置のポンプを大型として長時間の治療にも余裕を持ったものと設計し直したものを追加するとともに流量が低下したり異常な温度上昇が有ると機器が自動的に停止する安全装置も完備した。また、従来は3ピース構造であった装置を一体化させ省スペース化させ、操作性も向上させた装置として改良した。治療に先立つ長時間に及ぶ試験運転でも装置には異常発熱は認められず、臨床治療が安全に遂行できる装置であることを確認できた。この際に計測した治療用固定コイルヘッドの温度上昇は軽微で冷却水温度(最高 27℃前後)と同程度であり、治療時に患者に熱障害を与える可能性が全くないことが確認できた。

#### C-2 CTI治療室の設計・施工

従来の皮膚科外来の一角に3 x 2 x 2.4 mのCTI治療室を新設した。CTI治療室の壁面、天井、床面には全面金属製メッシュをパネル板の間に挟み込み、表面はクロス仕上げとした。換気口、点検口などは銅製枠並びに銅製メッシュで全て被いシールドした。点検窓は2枚のガラス間に金属製メッシュを挟み込み挿入固定した。その際、ガラス間の金属メッシュと壁面の金属メッシュが接触するように固定、アースした。また、ガラスと固定枠の間にはスポンジの周りに金属を巻き付けた素材で密封、磁場の漏洩を完全に防止した。開閉ドアは吊り構造と

し、内部には壁と同様、金属製メッシュ(ラビット金網)をパネル板に挟み込んで作成、強固な金属製の枠で補強した。ドアの上方、側方には窓枠の際と同様スポンジの周りに金属を巻き付けた素材で密封、下方(ドア枠下)との面は弾性のある銅製金属板により磁場の漏洩を完全に防止した。給排水口の内壁は金属製管で被覆した上でパイプを貫通させた。パイプと金属管との間もスポンジの周りに金属を巻き付けた素材で密封した上で保護処理を施行した。このようにして設計施工したCTI治療室には蛍光灯照明、冷暖房、煙熱感知器、電源(3相200V1口、2相100V6口)を装備させ、ドアの段差にはスロープを設置し、バリアーフリー構造とした。また、CTI治療室のシールド効果を測定した結果、156 KHzの周波数ではおよそ20db以上の遮蔽効果があり、交番磁場発生装置から最も強く発生するのは150KHzの高周波磁場である事を勘案し、その倍数周波数も生ずるが次第に減弱すると考えられるので現状で十分な遮蔽効果が有ることが確認された。治療室内には交番磁場装置本体、冷却ポンプ装置、光学式温度計2台、記録用コンピューター、治療用木製ベッドを設置した(図1)。



図1: CTI治療室

#### C-3 臨床治療手順

手術時に採取したMMと余剰皮膚を用いた予備実験で治療開始時は電圧200V、電流40Aで開始したが、模擬腫瘍内温度は迅速に上昇、ほぼ3-4分程度で腫瘍内温度

は 43.1 度、皮膚表面温度は 26.7 度となった。その後は電圧 100 V、電流 20 A でその温度を維持することが可能であることが確認された。この際の経験から以下に示した治療手順を作成した。

治療に当たっては CAP/M 溶液 0.5 ml を  $\mu$  シリンジポンプで治療腫瘍に 30 分かけて注入、24 時間後に磁場治療を行った。治療腫瘍内に確実に薬剤を注入するために超音波診断装置を用いて行う様にした(図 2)。



図 2: 超音波診断装置を用いた薬剤注入。

その 24 時間後に磁場治療を行った、治療に当たっては腫瘍内と表面温度の測定を行い、腫瘍内温度を 43 度に 30 分間維持した。治療手順は給水バルブを最大に開いて、10 分くらい待機する。貯水タン内が満水になっていることを確認する。その後、壁の電源ブレーカーを ON にして、さらにポンプの電源も ON に入れる。治療室内の木製のベッドに患者の治療部医が交番磁場治療装置の治療ヘッドの下で水平となるように体位をとる。水が循環していることを確認してから治療部位にコイルヘッド部の位置決めをして無理なく治療可能であることを確認する。治療部位が水平でコイルヘッド部の中央に来るように体位を取りベッドの上、治療部位の下にタオルなどを挿入する。治療する腫瘍をマーキングし、その中心を基準に患者様の腫瘍がコイルの中央にきちんと圧着されるように直行する照準線を描く。温度計のセンサーを腫瘍の直上に貼り付け、フィルム製被覆材で被覆固定する。腫瘍内

温度を測定するには 18G サーフローを局麻下に腫瘍中心部と腫瘍辺縁まで挿入、内筒を除去した後に消毒した温度センサーを 2 本挿入しテープで固定する。交番磁場治療装置の治療ヘッドの中心が腫瘍の直上に 2-3mm 離れた状態で固定する。温度記録を開始し、機器の電源を ON とする。赤いボタンを 2 個左から順に(まず準備、次いで加熱)押してボリューム(レベル)を右(時計回り)に回してははじめだけ 150-200V 位で開始し、腫瘍内温度が 41 度を越えたら後は 50-100V 位にして腫瘍内温度が 45-6.0 度くらい、腫瘍周辺の温度が 43.0 度を越えないようにレベルを調整して保持する。その条件では次第に温度が上昇するので、43 度を絶対に越えないように調整する。転移腫瘍が皮膚の直下の場合は腫瘍内の温度計測は必ずしも必要ない。30 分の加熱治療が終了したらレベルを反時計回りに回して停止ボタンを押して shutdown する。機器が停止したことを確認して CTI 治療室の扉を完全に開放する。次いで交番磁場治療装置の治療ヘッドを患者から離脱させ、治療部位に異常がないかを確認する。10 分間程度ポンプを運転して機器が完全に cool down されたことを確認してからポンプの電源、次いで壁の電源ブレーカーを OFF にする(図 3)。



図 3: 腫瘍の中央と片雲の 2 箇所温度上昇をモニターしながら磁場治療を行う。

C-4 診断機器の画像情報を用いた治療効果の判定 超音波診断装置の画像 data を用いて計測用 software により、腫瘍の容積を算出して経時的に測定した結果、適切に治

療された症例では治療効果を判定する皮下転移のモニター腫瘍の体積を性格に計測することが可能であることが明らかとなった。また、臓器内のMM転移巣についてはCTの画像データを用いて同様に効果判定が可能であった。

#### C-5 早期臨床例の結果

症例1: 77歳女性: 2006. 7. 11初診。左第1趾のMM。術後左大腿左単径部に皮膚転移、リンパ節転移を来し、現在までに3回の手術を施行してきたが、さらに2007年1月になり、さらに同部にMMの再発を見た。CTI治療を3月28日から開始した。治療腫瘍は左大腿部の皮下転移巣。治療に当たってはCAP/M溶液0.5 mlを2回注入、3回隔日に磁場治療を行った。その際、腫瘍内と表面温度の測定を行い、腫瘍内温度を43度に30分間維持した。所定のCTI治療後、15日目に治療腫瘍を近接部の小皮膚転移巣とともに切除した(図4a, b)。



図4a: 摘出した治療腫瘍。



図4b: 摘出した治療腫瘍の病理組織像。

その結果、一過的に若干の腫瘍縮小効果がみとめられたものの左の単径部の皮下腫瘍(リンパ節)が治療に反応せず増大し続けたため6月29日から2回目のCTI治療を開始した。2回目の治療では左大腿部のリンパ節と考えられる腫瘍内に薬剤を3回に分けて2.0 ml注入、腫瘍内温度が45℃となるように隔日3回の磁場治療を行った。所定の治療を終了した後、7月20日に治療腫瘍を切除した。その結果、2回目の治療開始後60日の現在、全てのモニター腫瘍の縮小を見ている。

症例2は69歳男性: 2006. 6. 14初診。原発巣不明の体表の多発性の転移性悪性黒色腫。現在までに2回の手術を施行してきたが、さらに2007年3月になり、体幹に5個の悪性黒色腫の再発を、左の単径部には2個のリンパ節転移巣を、さらに左乳房皮下に見た。CTI治療を4月11日から開始した。治療腫瘍は左上右腕背側部の皮下転移巣とした。治療に当たってはCAP/M溶液0.5 mlを3回注入、3回隔日に磁場治療を行った。その際、腫瘍内と表面温度の測定を行い、腫瘍内温度を45度に30分間維持した。所定のCTI治療後、15日目に治療腫瘍を切除した(図5a, b)。

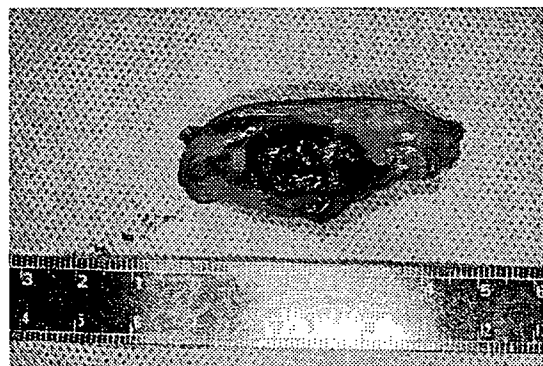


図5b: 治療腫瘍の病理組織像。

多くのモニター腫瘍で劇的な縮小効果が観察された。中でも体幹皮下に存在していたMM転移巣は治療後15日には劇的な縮小を見せ、その時点で体積が半分の症例も観察された。また、左乳頭部に存在した皮下腫瘍を治療開始後76日目に採取して病理組織学的に検討したところCD(陽性のCTLと考えら

れるリンパ球が多数観察された(図6)。

図6:非治療腫瘍の免疫染色像。

なお、それらの皮下腫瘍はその後も順調に縮小を続けているが一部の腫瘍(単径リンパ節転移)の再増殖を認めたために左肩径部のリンパ節転移巣に9月5日から再治療を行った。2回目の治療では左大腿部のリンパ節と考えられる腫瘍内に薬剤を3回に分けて2.0 ml注入、腫瘍内温度が45℃となるように隔日3回の磁場治療を行った。所定の治療を終了した後、9月20日に治療腫瘍を切除した。現在経過観察中であるが確認できる全ての腫瘍の縮小が順調に認められ新たな腫瘍の発生は認められていない(図7)。

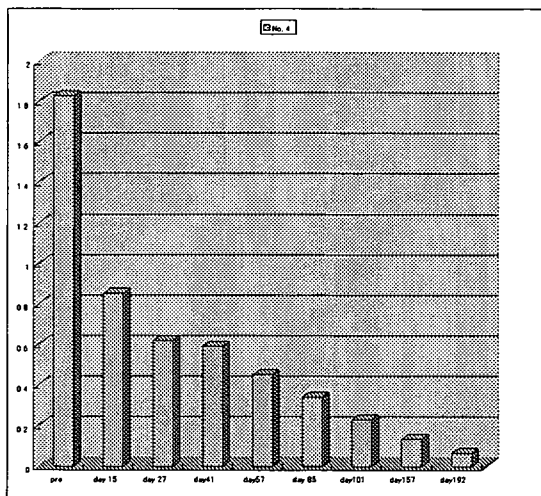


図7: モニター腫瘍の大きさの変化。

このように臨床例においても交番磁場装置をCTI治療室内で使用することで安全・確実に治療を遂行できた。また、治療効果の判定も画像診断技術を駆使することで監視・評価することが可能となり、2回目以降の治療時期決定においてもこれらの診断機器を駆使した治療効果の判定は極めて有効であった。

#### D. 考察

MMは極めて悪性度が高く、外科的治療、化学療法、免疫療法などを駆使してもstage IVの患者に対する治療法は未だ確立されていない。我々はMMに対する新規治療であるCTI治療の開発、臨床応用を目指して基礎

的検討を積み重ねてきた。本治療ではMM細胞に対して選択的に取り込まれるCAPを細胞に対する標的ドラッグデリバリーシステムとして用い、磁場照射により腫瘍に対して選択的に温熱細胞障害効果を有するナノ微粒子Mと結合・固定化させて治療するという治療概念で治療効果を期待する。動物実験による検討の結果、CAPの直接的な薬理学的効果に加え、温熱治療により治療した腫瘍内のM core周辺部の壊死を見るのみでなくHSPを介した免疫反応によりCTLが再移植したMM腫瘍を拒絶することを確認した。CAPはチロシナーゼの基質としてMMをはじめとした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を介して細胞膜に接着し、その後細胞内に取り込まれる。この際、MMでは癌化とともにCAPの取り込みが異常に亢進しているために他のメラニン形成細胞よりも特異的に取り込まれて化学的治療が可能となると考えられる。このためナノ微粒子M表面にCAPを結合させ、腫瘍内に注入すると細胞内に容易に取り込まれると推定される。その状態で生体に無害な程度の磁場に局所的に暴露することで腫瘍内のナノ微粒子Mが発熱、温度が43-45度に上昇、in situで効率的に腫瘍細胞を壊死させるとともにHSPを放出させることが可能である。我々の模擬実験の結果や臨床例の治療後摘出した腫瘍の病理組織像では治療した腫瘍の中心部に注入した薬剤によるcoreが存在、その周辺には発生した熱によるzone of necrosisが存在し、さらにその周辺にはzone of heat shockと考えられる腫瘍細胞が浮腫状に変性した部分を取り囲んでいた。また、治療後2-3週間後に摘出した治療腫瘍ではそのzone of heat shockの周辺を取り囲むようにCD8陽性のCTLと考えられるリンパ球の新宿を見た。腫瘍ではその結果、直接のMM細胞殺効果のみならずCTLサイトカインの放出を刺激して治療腫瘍のみではなく遠隔転移巣にも免疫療法としての効果を誘導し、縮小・消退させる物と考えられ。既にわれわれは



CAPはメラニン形成MMのみならず無色素性MMにも取り込まれることを確認し、さらに腹腔内に投与したCAP/Mが移植MMの細胞内小器官に分布することを確認している。将来は全身的な投与によっても治療効果が期待できる物と考えている。

それらの検討結果を踏まえ、本概念によるCTI治療の臨床応用のために治療装置を改良するとともに交番磁場発生装置から発生する電磁波を完全にシールド可能な治療室を設計・施工、治療機器の改良を行ない治療手順マニュアルを作成し、臨床応用の可能な環境・手法を完成させ、自主臨床研究を開始した。その結果を踏まえ、その治療戦略の臨床応用のための環境整備を目指した検討を行った。優れた基礎的研究成果も実際の臨床応用に適応させるためには種々の問題をクリアしなければならないのは当然である。治療環境には安全で操作性の優れた治療装置の開発改良、治療装置を設置して患者の治療を行うことに適した治療室の設計・施工が基本的に最も重要である。この点では本研究で述べたように十分に臨床応用に適した治療機器が開発改造できた。特に模擬腫瘍を用いた実験でも比較的低い出力で達成目的温度である43℃以上に達し、30分間維持できることが確認できた。この点から現状の交番磁場治療装置少数の症例の治療には既に十分な性能を持つことが確認できた。今後改善が望まれるのは交番磁場治療装置の治療ヘッドが三次元的に回転する装置の開発が望まれる。また、より長時間の治療をするためには冷却水の流量をさらに増加させることと、騒音の防止の観点から治療室外にポンプを設置することが望ましいと考えている。一方、今回設計・施工したCTI治療室は交番磁場治療装置から発生されるマイクロ波、電磁場をほぼ完全にシールド可能な極めて高性能な治療室として設計され、検証されていることから現実的には全く、人体はもとより、他の精密電子機器に対して影響を与える可能性は無いことが交番磁場発生装置か

ら最も強く発生するのは150kHzの高周波磁場であり、その倍数周波数も生ずるが次第に減弱すると考えられるので現状で十分な遮蔽効果が有ることが確認され室外に設置された電子機器や他の患者や医療従事者に障害を与える可能性が無いことが確認された。また、治療室内には治療用の木製ベッドを設置してあるので異常発熱などで患者に障害を与える可能性は皆無であることが確認されている。

以上の治療環境が整備されたことを受けて治療手順を作成したが、模擬皮膚腫瘍を用いた検討で研修を積んだ医師であればこの手順に従って臨床例の治療に当たれば安全に効果的な治療を進められるものと考えている。手順に従って治療に当たっては薬剤注入、磁場照射ともecho guide下に必ず2名以上の医師が当たることを原則とした。確実な治療効果を得るためにはecho guide下に腫瘍中央への薬剤の確実な投与と腫瘍coreおよび腫瘍表面の温度モニター下の磁場治療が有効である。確実な腫瘍内薬剤投与、磁場治療の際の温度計センサー先の適切な設置はecho guide下に行われることが望ましくこの点でもハンディエコー装置の導入使用は必須である。超音波診断装置、CT等の画像dataの解析法の確立により治療効果の数値化した公平で経時的な解析が可能となった。現在、既に4症例の治療を開始し、臨床経過を観察中であるが治療後、皮膚転移巣の劇的な縮小を認めている症例もあり、MMに対する新規治療法として期待される。今後は臨床例でさらに注意深く治療を進め、経験を積み重ねることでさらに優れた治療プロトコールの設定と治療手法の完成を目指したい。

## E. 結論

完全なシールドが達成されたCTI治療室を設置できた。CTI治療室には蛍光灯照明、冷暖房、煙熱感知器、電源、給排水装置完備、磁場防止ガラス使用観察窓装備。車椅子、ストレッチャーによる患者移送可能な



バリアフリー設計。治療用ベッドは木製。改造後の交番磁場治療装置も従来装置と同様の優れた加熱効果を持つことが試験運転で証明された。アームなどの操作性も比較的良好であり。患者の治療に当たっては水平に規定された治療部位に垂直に装置の治療面を近接させることが重要であった。今後は治療ヘッドが三次元的に回転する装置の開発が望まれる。少ない症例の治療では現状でも十分であるが、今後、長時間の治療のためには冷却水の流量を増加させることが望ましい。以上、CTI治療環境が整備され、治療手順が整備されたことを受けて臨床例での治療を開始させ、CTI治療の有効性を臨床例の早期効果判定の結果確認できた。超音波診断装置、CT等の画像dataの解析法の確立により治療効果の数値化した公平な解析が可能となった。現在、既に4症例の治療を開始し、臨床経過を観察中であるが治療後、皮膚転移巣の劇的な縮小、消失を認めている症例もある。本報告は世界で初めてのMMに対する nano particle magnetiteを用いた臨床治療であり従来根治的治療法が無かったMMの進行例の治療戦略として大いに期待される。

#### F. 健康危険情報

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Ono I, Akasaka Y, Kikuchi R, Sakemoto A, Kamiya T, Yamashita T, Jimbow K: Basic fibroblast growth factor reduces scar formation in acute incisional wounds. *Wound Repair Regen.* 15: 617-623, 2007.
- 2) Akasaka Y, Ono I, Tominaga A, Ishikawa Y, Ito K, Suzuki T, Imaizumi R, Ishiguro S, Jimbow K, Ishii T: bFGF in artificial dermis promotes apoptosis and inhibits expression of  $\alpha$ -smooth muscle actin, leading to reduction of wound contraction. *Wound Repair Regen.* 15:

378-389, 2007.

##### 2. 学会発表

1. Sato M, Yamashita T, Okura M, Sakemoto A, Takada T, Ono I, Tamura Y, Sato N, Wakamatsu K, Ito A, Honda H, Ito S, Jimbow K: Magnetite-conjugated cysteaminyphenol as a novel nanoparticle vector for melanoma-directed drug delivery and therapy. 4<sup>th</sup> International Melanoma Congress, Nov 1-4, 2007, New York.

#### 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

分担研究者 佐藤昇志 札幌医科大学病理学第1講座 教授  
田村保明 札幌医科大学病理学第1講座 講師

研究の要旨

我々はメラノーマ細胞に選択的にとりこまれ細胞内発熱効果をもつNPrCAP/Mを用いて選択的にメラノーマ細胞を温熱する Chemo-Thermo-Immuno (CTI) Therapy の確立を目指している。本治療法による抗腫瘍効果および腫瘍免疫機構を解析した。マウスにメラノーマ細胞を移植しNPrCAP/Mを腫瘍内投与後、磁場照射を行ったところ、腫瘍は縮小し、かつ再移植したメラノーマも拒絶された。腫瘍が拒絶されたマウスではメラノーマ細胞に特異的な細胞傷害性 T 細胞の誘導が確認された。NPrCAP/M を取り込ませたのち、磁場照射により加温した培養メラノーマ細胞の抽出液では Heat shock protein (HSP) が増加していた。さらにこの抽出液でパルスした樹状細胞と腫瘍抗原特異的 CD8<sup>+</sup> T 細胞との反応性が増加し、この反応は HSP の除去により低下した。また、磁場照射で加温した培養メラノーマ細胞の抽出液から抗 HSP 抗体を用いて精製した HSP をマウスに免疫することにより、樹状細胞により腫瘍抗原が提示され、腫瘍特異的な CTL が誘導された。以上より NPrCAP/M を用いたメラノーマ温熱が HSP の up-regulation を介して腫瘍免疫を誘導することが示唆された。さらに重要なことは、腫瘍由来の HSP には腫瘍抗原ペプチドが結合しており、この HSP-ペプチド複合体が特異的な T 細胞応答を誘導することが示唆された。

## A. 研究目的

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、担癌マウスに対する発熱による抗腫瘍効果、免疫誘導効果を検討し、腫瘍免疫機構のメカニズムを解析することである。

### 1) NPrCAP/M を用いた温熱療法の治療効果および免疫誘導効果の検討

メラノーマ担癌マウスを用いて NPrCAP/M による温熱治療を行い、腫瘍縮小および拒絶効果を検討する。また治癒したマウスにおいてメラノーマ特異的細胞障害性 T 細胞が誘導されているかを  $^{51}\text{Cr}$  release assay を用いて検討する。

### 2) Heat shock protein (HSP) 発現の検討

NPrCAP/M による温熱治療を行った培養メラノーマにおける HSP 発現量を ELISA 法で測定する。

### 3) NPrCAP/M を用いた温熱療法後のメラノーマ細胞抽出液でパルスした樹状細胞と特異的 CD8<sup>+</sup> T cell 反応性の検討

NPrCAP/M による温熱療法後腫瘍細胞抽出液により樹状細胞をパルスし CD8<sup>+</sup> T cell との反応性を検討した。さらに抽出液から HSP を除去した場合の反応も検討する。

## B. 研究方法

### 1) NPrCAP/M を用いた温熱療法の治療効果および免疫誘導効果の検討

モデル癌抗原として Ovalbumin を発現する B16F1 メラノーマ細胞 (B16-OVA) を用いて実験を行った。B16-OVA を C57BL/6 マウスの皮下に移植し、担癌マウスを作成した。第7, 9, 11, 13 日目に腫瘍内に NPrCAP/M を局所注射し、24 時間後に磁場照射を行った。さらに B16OVA を再移植し、腫瘍拒絶効果を検討した。腫瘍径は1日おきに測定した。次に治癒したマウスから脾臓を摘出し、放射線照射した B16-OVA メラノーマ細胞と一緒に5日間培養した。5日後、 $^{51}\text{Cr}$  release

assay を行った。標的細胞は B16-OVA、B16F1、EL4、YAC-1 そして OVA 由来のペプチドである SL8 をパルスした EL4 を用いた。

### 2) Heat shock protein 発現の検討

培養 B16-OVA メラノーマ細胞に NPrCAP/M を添加し、30 分間静置後、細胞ペレットに磁場照射を行い、72 時間培養した。72 時間後、培養細胞を集め、液体窒素による急速凍結、解凍を繰り返して細胞抽出液を作成した。細胞抽出液中の HSP 発現量を ELISA 法と Western blot 法で測定した。

### 3) NPrCAP/M を用いた温熱療法後のメラノーマ細胞抽出液でパルスした樹状細胞と特異的 CD8<sup>+</sup> T cell 反応性の検討

C57BL/6 マウスの骨髄より採取した樹状細胞に細胞抽出液を添加し2時間培養した。その後、OVA 由来のペプチドである SL8 に特異的に反応する CD8<sup>+</sup> T cell である B3Z を培養液に加え、24 時間培養した。24 時間後、CPRG 液を加え、OD595nm を測定した。さらに細胞抽出液から抗 Hsp70 抗体、抗 Hsp90 抗体、抗 KDEL 抗体とプロテインビーズを用いて HSPs を除去し、同様の実験を行った。このとき得られた免疫沈降物をマウスのフットパッドに免疫し、4 時間後膝窩リンパ節を摘出し、MACS ビーズを用いて精製した樹状細胞を B3Z とともに培養し24 時間後に CPRG 液を加え OD595nm を測定した。

### 4) 上記で精製した HSP の免疫による腫瘍特異的 CTL の誘導

細胞抽出液から抗 Hsp70 抗体、抗 Hsp90 抗体、抗 KDEL 抗体とプロテインビーズを用いて HSPs を精製した。これをマウスに2度、免疫し、脾細胞における CTL 誘導について  $^{51}\text{Cr}$  release assay を用いて検討した。

## C. 研究結果

### 1) NPrCAP/M を用いた温熱療法の治療効果および免疫誘導効果の検討

B16-OVA メラノーマに NPrCAP/M を局所注射し、磁場照射を行ったところ、腫瘍が縮

小し治癒した(図1)。さらに治癒したマウスに B16-OVA を再移植すると、腫瘍が拒絶された(図2)。腫瘍が拒絶されたマウスにおいては B16-OVA および OVA 由来のペプチドである SL8 をパルスした EL4 に特異的な細胞傷害性 T 細胞の誘導が確認され(図3)、治療マウスの腫瘍拒絶は腫瘍特異的な免疫によるものと考えられた。

## 2) Heat shock protein 発現の検討

一方培養細胞において NPrCAP/M を取り込ませた B16-OVA メラノーマ細胞に磁場照射し得られた細胞抽出液中には Hsp70 放出量の増加がみられたが Hsp90 の発現量は変化がなかった(図4)。また培養上清中の Hsp72 および Hsp90 を ELISA 法にて測定した。Hsp72, Hsp90 いずれも 48 時間後で検出されたが、Hsp72 の放出量が有意に高値であった(図5)。

## 3) NPrCAP/M を用いた温熱療法後のメラノーマ細胞抽出液でパルスした樹状細胞と特異的 CD8<sup>+</sup> T cell 反応性の検討

NPrCAP/M による加温後の細胞抽出液でパルスした樹状細胞は CD8<sup>+</sup> T cell との反応性の上昇がみられた(図6)。さらにこの細胞抽出液から HSP 抗体を用いて immunodepletion を行うと反応性の低下がみられた(図7A)。特に Hsp72/Hsc73 を除去すると、T 細胞の反応性が最も低下したことから、Hsp72/Hsc73 が CTI 療法による免疫誘導に重要な役割を果たしていることが示唆された。Hsp72/Hsc73, Hsp90 および小胞体の HSP の depletion は western blotting により確認した(図7B)。またこのとき得られた免疫沈降物をマウスのフットパッドに注射し、4 時間後膝窩リンパ節から樹状細胞を分離し、B3Z とともに培養したところ B3Z の反応がコントロールに比べて増加した(図8A)。この事実は、細胞内の HSP には抗原ペプチドが結合しており、生体内においても HSP-抗原ペプチド複合体が樹状細胞によりクロスプレゼンテーションされ、T 細胞を活性化することを

示すものである。以上の結果から NPrCAP/M が HSP の up-regulation を介して腫瘍疫を誘導することが示唆された。

## 4) NPrCAP/M と温熱処理後のメラノーマ細胞抽出液から精製した HSP の免疫による CTL の誘導

NPrCAP/M と温熱処理後の B16-OVA メラノーマ細胞抽出液から抗 Hsp72/Hsc73 抗体、抗 Hsp90 抗体および抗 KDEL 抗体とプロテイン A ビーズを用いて精製した HSP をマウスに 2 回免疫したのち、脾細胞を用いて CTL 活性を測定した。B16-OVA および EL4 に OVA 由来の SL8 ペプチドをパルスした標的細胞に対し、高い細胞傷害活性を認めた(図8B)。しかし、EL4 や YAC-1 は傷害されなかった。このことは腫瘍から精製した HSP には腫瘍由来の抗原が結合していることを示すものである。

図1 治療後の様子

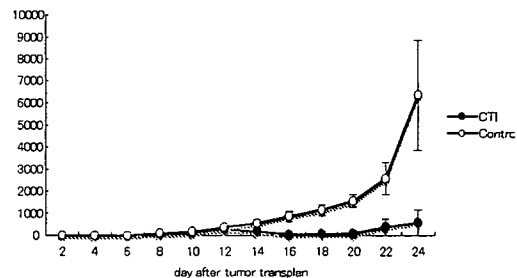


図2 再移植後の腫瘍径

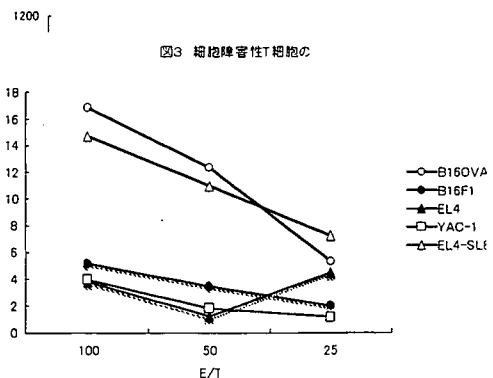


図3 樹状細胞特異的T細胞の