

2009/2030A

厚生労働科学研究費補助金  
医療機器開発推進研究事業

メラノジェネシス標的NPrCAP・ナノ微粒子による  
次世代型メラノーマ化学温熱免疫 (CTI) 治療法の開発  
に関する研究

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 神保 孝一

平成22 (2010) 年5月

# 目 次

## I. 総括研究報告

- メラノジェネシス標的NPrCAP・ナノ微粒子による次世代型メラノーマ化学温熱免疫（CTI）治療法の開発…………… 1  
神保 孝一

## II. 分担研究報告

1. DNAマイクロアレイを用いた癌温熱免疫併用療法抗原の探索  
本多 裕之 …………… 15
2. メラノーマに特異的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NPrCAP-SHの新たに改良された簡便な合成法の開発とデキストランマグネタイトに結合したNPrCAP測定法の再検討 …………… 21  
伊藤 祥輔・若松 一雅
3. メラノーマ関連癌遺伝子とMHC発現及び薬剤感受性の相関について …………… 27  
山下 利春
4. TILの病理組織学的解析およびTCRレパトリー解析 …………… 30  
井藤 彰
5. メラノーマ標的ナノ微粒子（NPrCAP/マグネタイト）によるメラノーマ温熱免疫治療により治療し効果が認められたと考えられるた2症例の経過 …………… 35  
小野 一郎
6. CTI療法の化学療法効果、免疫療法効果の比較検討 …………… 41  
田村 保明
7. CTI療法の化学療法効果、免疫療法効果の比較検討 …………… 45  
米田 明弘
8. 新規CTI治療薬剤の合成とGMP製剤化…………… 51  
村瀬 勝俊

## III. 研究成果の刊行に関する一覧表

## IV. 研究成果の刊行物・別刷

# I. 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金  
(医療機器開発推進研究事業)  
総括研究報告書

メラノジェネシス標的NPrCAP・ナノ微粒子による  
次世代型メラノーマ化学温熱免疫 (CTI) 治療法の開発

研究代表者 神保 孝一 札幌医科大学医学部 名誉教授

研究分担者 本多 裕之 名古屋大学大学院工学研究科 教授  
伊藤 祥輔 藤田保健衛生大学医療学部 教授  
若松 一雅 藤田保健衛生大学医療学部 教授  
山下 利春 札幌医科大学医学部皮膚科学講座 教授  
井藤 彰 九州大学大学院工学研究院 准教授  
小野 一郎 札幌医科大学医学部皮膚科学講座 准教授  
田村 保明 札幌医科大学医学部病理学第一講座 講師  
米田 明弘 札幌医科大学医学部皮膚科学講座 助教  
村瀬 勝俊 名糖産業株式会社名古屋研究所 主任研究員

研究協力者 小林 猛 中部大学大学院 応用生物学研究科 教授  
中山 睿一 川崎医療福祉大学保健看護学科 教授  
宮本 篤 札幌医科大学医学部医療薬学講座 教授  
佐藤 昇志 札幌医科大学医学部病理学第一講座 教授  
篠村 恭久 札幌医科大学医学部内科学第一講座 教授  
平田 公一 札幌医科大学医学部外科学第一講座 教授  
廣崎 邦紀 札幌医科大学医学部皮膚科学講座 講師  
神谷 崇文 札幌医科大学医学部皮膚科学講座 助教

美濃輪 昇 東レ株式会社 医薬事業部長

## 研究要旨

近年、日本におけるメラノーマ発生頻度は急速に増加する傾向にある。殊に20～50歳代の青壮年の発症が多い。しかも日本人メラノーマは白人メラノーマと異なり早期から皮膚・血行転移を起こしやすく、これ等転移性癌を持った患者に対し現時点では全ての治療法が無効である。従来の治療概念に無い新しい戦略に基づく新規治療法の開発は急務である。

我々はメラノーマに特異な分化形質であるメラノジェネシスを分子標的とした新規メラノーマ治療法を開発すべく平成17年度より4年間厚生労働省科学研究・医療機器開発推進研究事業（ナノメディシン）の補助を受け、医・工・化学連携によりナノ微粒子薬剤開発と磁場発生機器・治療施設の改良と化学・温熱・免疫「CTI (chemo-thermo-immuno)」療法の開発を行っている。基礎的動物実験の結果を基にメラノーマ腫瘍局所内投与に基づくCTI療法（第I世代）を、学内倫理委員会の許可を受け、臨床試験（第I、II相）を平成19年3月より開始した。現在まで4症例がエントリーされ、うち2例はCTI療法開始前より患者の全身状態が悪くCTI療法後2～3カ月で死亡したが、他の2例（ステージIII、IV）はいずれも治療に反応し全身皮膚・リンパ節転移巣が完全・部分消失し、1例は28ヶ月生存、もう1例は32ヶ月以上生存し、現在も日常生活に復帰している。

我々は最初の3年間の研究でCTI療法の理念そのものの有用性を確認したが、新規薬剤と継続的維持療法の更なる開発が必要とされた。平成21年度より、従来の医・工・化学の連携に加え、産が分担研究者として加わり、次世代型メラノーマ療法を確立するために必要な選択的腫瘍内拡散性と全身投与が可能な新規薬剤を開発してきた。本薬剤を用いた次世代型化学・温熱・免疫（CTI）療法の分子標的・免疫作用機序を解明し、臨床試験に向けたGMP製剤を開発することを目的とし、研究を行ってきた。

具体的にはメラノジェネシスを分子標的とした新規DDSとして我々が開発したNPrCAP (N-propionyl cysteaminyphenol) とデキストラン被覆マグネタイト・ナノ微粒子 (DNM) 結合体 (NPrCAP/PEG/DNM) とした新規薬剤開発に着手し、プロトタイプ薬剤の開発に成功した。今後は(1) NPrCAP/PEG/DNM製剤の安定性・抗腫瘍効果の解明とCTI療法分子標的・免疫機構の解析を行う。殊に後者はCTI治療後のメラノーマ再移植拒絶反応に焦点をあて、抗腫瘍効果の機序として①腫瘍抗原の解析、②腫瘍浸潤リンパ球の解析、③肺転移等の深部メラノーマに対するNPrCAPの癌免疫賦活への有用性、④MHCクラスI発現と治療感受性の検討を行う。これら結果を基礎とし(2)十分な腫瘍内集積性を有す新規製剤を完成させ、安定したGMP製剤の大量合成法を確立する。併せて(3)次世代型CTI療法臨床プロトコルを確立し、更に国内・国外(カナダ)を含む他施設との連携による第I、II相臨床試験開始を目指す。

我々の研究の意義はCTI療法がペプチド等の腫瘍特異抗原を外から投与するのではなく、化学・温熱療法を行うことにより、患者自身の生体内に腫瘍特異抗原・ペプチドを産生させ、これにより患者自身の有している樹状細胞により腫瘍特異的細胞傷害性T細胞(CTL)の誘導を活性化させ、遠隔転移腫瘍の撲滅を図ること、すなわち“生体内産生がんペプチド免疫療法”を行なうことである。この方法は現在行われているペプチドを用いた免疫療法とは全く概念を異にしているものである。我々の予備的臨床試験は症例数が限定されているが本方法の有用性を実証している。更に、NPrCAP自体化学療法効果のみならず腫瘍免疫効果があることを示唆する所見が得られ、皮膚移植メラノーマにNPrCAPを局所注射し、その後メラノーマを再移植すると再移植腫瘍の増殖は拒絶され、抗CD8抗体

投与により逆に拒絶は阻害された。次年度はNPrCAP自体の化学・免疫療法効果の機序についても明らかにする。

## 平成21年度までのメラノジェネシス標的 化学・温熱・免疫 (CTI) 治療法開発の成果概要

H21-ナノ一般-006

1. メラニン形成酵素チロシナーゼ基質NPrCAPの薬理作用
  - (1) 化学療法剤効果
  - (2) 免疫賦活剤としての効果の可能性
2. NPrCAP/Mプラス磁場照射 (動物実験) ;
  - (1) MHC クラスI発現部位に一致し細胞障害性T細胞が浸潤
  - (2) HSP産生と再移植メラノーマ増殖の抑制・拒絶
3. NPrCAP/PEG/Mプラス磁場照射 (第I, II相臨床試験) ;
  - (1) 温熱による細胞壊死(necrosis)を惹起し、HSPを産生
  - (2) 磁場照射治療局所での細胞障害性T細胞浸潤増加と遠隔転移巣の消失
4. 皮膚メラノーマ転移病巣に対する化学・温熱・免疫療法 (chemo-thermo-immuno [CTI] therapy) による生体内ワクチン療法確立と有用性の確認
5. メラニン形成 (メラノジェネシス) を利用したDDS機能と全身投与が可能な高拡散性次世代型新規メラノーマ薬剤の開発; NPrCAP-PEG- DNM

### 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。我々は過去3年厚生労働省科学研究・医療機器開発推進研究事業：ナノメディシンの研究費補助を受け、メラニン形成酸化・還元酵素チロシナーゼの基質であるチロシンの硫黄・アミン誘導体であるシステアミニールフェノール (N-propionyl cysteaminylphenol: NPrCAP)

を合成し、磁性ナノ粒子 (magnetite:M) に固定化し、従来の概念にない化学・温熱・免疫 (CTI; chemo-thermo-immuno) 療法を開発した (図1)。臨床試験 (学内限定第I、II相) を平成19年3月より開始し、世界で始めてCTI療法が多数の皮膚転移巣を有する末期メラノーマ患者の皮膚転移巣の完全に消失させえることを確認し報告した (図2、3、4)。

これら研究背景をもとに以下の2点を研究目的とした。

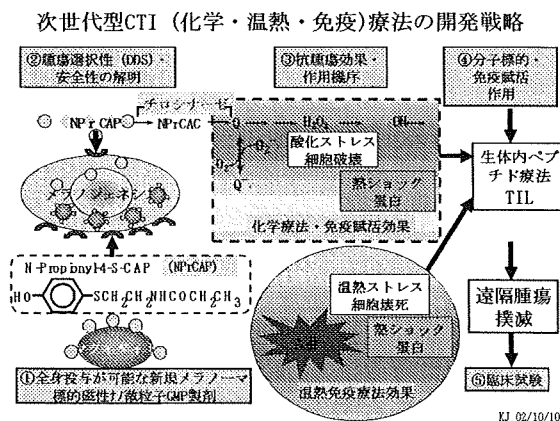


図1

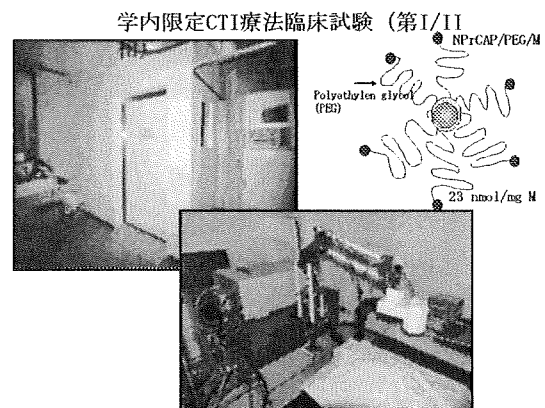


図2

対象：ステージIII・IV転移メラノーマ



図 3

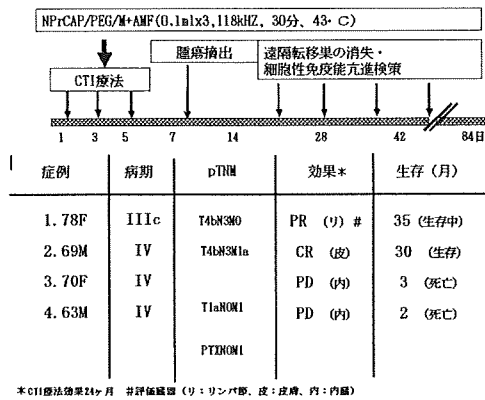


図 4

1) 新規製剤と合成法の開発と製剤安全性・抗腫瘍効果

現行製剤で一定の成果を上げることができたが、問題点として①分散性が極めて低く、注射局所に凝集し、個々の腫瘍内集積が不十分で頻回の投与を必要とする；②静脈内、全身投与が出来ず対象症例が極めて限定される；③ごく小規模の合成スケールで、複数の患者を対象とした臨床研究を並行実施できない等の問題点を有した。従い高分散性と長期安定性、安全性と優れた抗腫瘍効果を有する新規製剤と大規模GMP製剤合成法の開発が必要である。

2) 分子標的・免疫賦活機構の解明と次世代型CTI治療プロトコルの確立

予備的臨床試験で50%のCR、PRが得られ、その機序として熱ショック蛋白(HSP)と細胞障害性T細胞を介した腫瘍免疫の存在が示唆され

たが、持続的な抗腫瘍効果の発現を図る治療法の開発が必要で、そのためには腫瘍免疫したメラノーマ標的磁性ナノ粒子によるナノメディンにおける分子標的と免疫賦活機構の解析による次世代型CTI治療プロトコルを確立する(図5)。

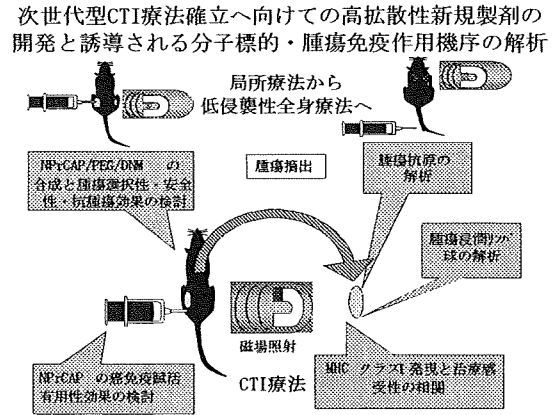


図 5

我々の研究の特色と独創性は、以下の3点に集約された。

1) 新たに企業(名糖産業)から研究分担者として研究グループに参加し、腫瘍局所投与のみならず静脈内全身投与が可能な製剤の大量合成法を開発する。本研究では既に臨床実績のある肝臓用MRI造影剤であり加温性と安全性に優れたデキストラン被覆磁性ナノ粒子(dextran-coated nanomagnetite:DNM)を改良し新規製剤を合成した。この際、名糖産業は国内DNM開発・製造会社であり、我々はこれを基にスパーサーを介し、メラノーマへの指向性と抗腫瘍効果を有する薬剤(NP rCAP)を結合させたGMP製剤を合成した。本邦でメラノーマ免疫療法剤として認可され実際の臨床に使用されているインターフェロンを開発した東レ株式会社が研究協力者として参加した。ナノメディン研究の先駆者である中部大学の小林猛先生が研究協力者として研究チームに入った。

2) CTI療法は治療対象腫瘍を治療できるのみならず、全身的な抗腫瘍免疫応答を誘導できた。今後はメラノーマ癌抗原テトラマーとELISPOT等の免疫学的モニタリングによる解析

により、CTI治療により誘導されたメラノーマ特異免疫応答を持続・増強するための戦略を開発した。

3) TIL活性化、更にCTI療法後の腫瘍組織は熱ショック蛋白(HSP)を誘導発現しており、多くのリンパ球が腫瘍内に浸潤する事がみられた。CTI療法の免疫賦活効果を増幅するためのTIL活性化による併用療法を開発することで、次世代型CTI療法を確立した。

## B. 研究方法

### 1. 新規製剤の開発

腫瘍局所投与に用いる現行薬剤を中規模で合成する為の、反応条件・装置/設備の最適化、製造バリデーション、各ステップでの評価項目と試験方法の標準化、使用機器類の適格性検証等によりGMP水準を構築し、薬剤の安定性向上並びに品質維持を目指した。

<平成21年度>

1) 現行製剤に用いられる60nm程度のサイズを有する磁性ナノ粒子は超磁性酸化鉄微粒子(super paramagnetic iron oxide, SPIO)に分類され、血管内投与においては、細網内皮系の臓器である肝臓と脾臓に分布しやすいことが分かった。ここで、スパーサーであるポリエチングリコールの鎖長や構造(分岐の有無等)を変えることで、肝臓クッパー細胞の貪食を回避するように物性を最適化した。また、粒子サイズ自体を30nm未満(超微小超磁性酸化鉄: ultra-small super paramagnetic iron oxide, USPIOに分類される)とすることも回避できるが、この場合に一般的には単位鉄重量当たりの加温性も損なわれる為、加温特性を損なわない新たな粒子設計を行なった。

2) 一方、血管内皮からガン組織への移行については、腫瘍組織によって新生された血管は、透過性が亢進されており、さらに組織に移行したナノ粒子は主としてリンパ管から回収されるが、腫瘍組織ではその回収機構が弱いために、

組織内に滞留しやすくなる効果(EPR効果, enhanced permeability and retention effect)が知られている。つまり、薬剤のサイズを腫瘍血管の隙間を考慮して100nm程度にコントロールすることで、量が血管内皮を通過して腫瘍組織へ集積される。

3) 中規模現行製剤および新規製剤に関する投与量/集積率と発熱性を検討し、抗腫瘍効果に基づく最適条件を確立する。

<平成22年度>

集積率、発熱性、抗腫瘍効果、安全性等を踏まえた全身投与新規薬剤の基本構造を決定し、その合成法を確立した。

<平成23年度>

全身投与新規薬剤を量産するための、反応条件の最適化、製造バリデーション、各ステップでの評価項目と試験方法の標準化等によりGMP水準を構築し、薬剤の品質維持法を確立する。

### 2. 抗腫瘍効果・安全性の検討

1) CTI療法製剤の抗腫瘍効果・安全性の検討:

<平成21年度>

(1) NPrCAP単独のメラノーマ腫瘍免疫効果の解明

過去3年間の動物を用いた研究でNPrCAP自体にメラノーマ化学療法効果のみならず腫瘍免疫効果がある事が示唆されたが、この機序の解明を行なった。

<平成22、23年度>

(2) 新規NPrCAP/PEG/DNMとメラノジェネシス標的との関連の化学療法、免疫療法効果至的治療効果の検討

新規製剤がメラノジェネシス酵素(チロシン酸化還元酵素)の基質であり、メラノーマ細胞に親和性を持つことが必須条件であるが、DDSとしてのメラノジェネシス標的機序を解明する。

(3) 新規NPrCAP/PEG/DNMの腫瘍治療効果・安全性の検討

新規製剤のin vivo 抗腫瘍効果を検討する。薬



剤細胞殺効果及び直接の免疫誘導効果を検討した。深部臓器メラノーマ担癌マウスにCTI療法を行い、治療後に再度メラノーマを移植し、これら移植腫瘍への拒絶反応と宿主延命の効果をみる。また、同様に新規製剤の安全性についても平行して検討する。

### 3. CTI局所腫瘍内治療の解析

<平成21年度>

既存製剤を用いた学内限定臨床試験は5症例を行い検討することが、既に札幌医大倫理委員会より許可されており、既に4症例が終了した。もう一例の症例をエントリーし、本臨床試験を終了させる予定である。

<平成22、23年度>

CTI療法の予備的臨床試験において、現在2症例が生存しており、これら2症例及び今後予定されている1症例のデータの詳細なる解析を行なう。これにより局所腫瘍内投与治療法の完成を目指す。殊に腫瘍内の温度上昇と腫瘍の破壊の程度とを病理組織学的に比較して局所治療法の改善・完成を目指す。これら結果から次世代型CTI療法確立のための基礎データを得る。

<平成22、23年度>

CTI療法の予備的臨床試験において、現在2症例が生存しており、これら2症例及び今後予定されている1症例のデータの詳細なる解析を行なう。これにより局所腫瘍内投与治療法の完成を目指す。殊に腫瘍内の温度上昇と腫瘍の破壊の程度とを病理組織学的に比較して局所治療法の改善・完成を目指す。これら結果から次世代型CTI療法確立のための基礎データを得る。

### 4. 分子標的・免疫賦活機構の解明

<平成21年度>

#### 1) DNAマイクロアレイを用いた抗原の探索

CTI療法後のマウスB16メラノーマ腫瘍のmRNAを抽出し、DNAマイクロアレイを行なった。遺伝子発現パターンを無治療腫瘍と比較することで、量的に発現変化がある遺伝子を抗原

タンパク質候補として選出する事を計画した。

<平成22年度>

#### 2) 抗原エピトープ解析

前年度にスクリーニングしたタンパク質のアミノ酸配列から、HSP70結合配列及びMHCクラスI結合配列の解析を行い、抗原エピトープの配列を予測する。

#### 3) 予測した抗原ペプチドを用いたin vitroおよびin vivo検討

配列予測した抗原ペプチドを合成して、in vitroおよびin vivoにおいて、B16メラノーマに対する細胞および腫瘍特異的免疫が活性化するかどうか調べる。

<平成23年度>

#### 4) 予測した抗原ペプチドを用いたin vitroおよびin vivo検討

前年度に引き続き検討を行い、CTI療法で誘導される抗原ペプチドを同定する。

### 5. 腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) の解析

<平成21年度>

#### 1) TILの病理組織学的解析

CTI療法後のマウスB16メラノーマ腫瘍の免疫組織化学染色を行い、無治療腫瘍と比較して、腫瘍浸潤リンパ球のバラエティーと数的変化を評価する方法を研究した。

#### 2) TCRレパートリー解析

CTI療法後のマウスB16メラノーマ腫瘍から、抗体磁気分離法によりCD8陽性T細胞を分離し、Taharaらの方法によりTCR遺伝子のレパートリー解析を行い、無治療腫瘍および転移モデル腫瘍におけるTILのTCRレパートリーと比較した。

<平成22年度>

#### 3) TCRレパートリー解析

前年度に引き続き行う。

#### 4) TCRのクローニングと遺伝子導入T細胞の作製

CTI療法後のマウスB16メラノーマ腫瘍から、抗体磁気分離法によりCD8陽性T細胞を分離し、1細胞からのPCRによりTCR遺伝子をクローニ

ングする。クローニングした遺伝子はレトロウイルスベクターによりマウス末梢血T細胞あるいはJurkat細胞株に遺伝子導入し、遺伝子導入T細胞を作製する。

5) TCR遺伝子導入T細胞を用いたin vitroおよびin vivoの検討

前年度に樹立したTCR遺伝子導入T細胞が、in vitroおよびin vivoにおいて、B16細胞およびB16腫瘍を殺傷する能力があるかどうかを調べる。

6. 深部メラノーマに対するNPrCAPの癌免疫賦への有用性の検討

<平成21年度>

1) NPrCAPを用いた腫瘍内投与の治療効果

B16-OVAおよびB16F1メラノーマ担瘤マウスを用いてNPrCAPの腫瘍内投与を行い、腫瘍縮小および拒絶効果を検討した。

2) 腫瘍特異的免疫の誘導

NPrCAP治療を行ったマウスにおけるメラノーマ特異的免疫応答を、治癒マウスを用いてre-challenge試験により検討した。

<平成22年度>

3) 腫瘍拒絶のエフェクター細胞の同定

NPrCAP腫瘍内投与後の治癒マウスを用いて、re-challenge時における腫瘍拒絶にあずかるエフェクター細胞の同定を行う。

4) 腫瘍特異的細胞傷害性T細胞 (CTL) の誘導

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51Cr release assayを用いて検討する。

<平成23年度>

5) 腫瘍特異的免疫誘導機構の解析

NPrCAP処理による酸化ストレスを介する免疫応答に焦点を当て解析する。

6) NPrCAP処理による免疫関連遺伝子発現変化の検討

免疫関連遺伝子チップおよび酸化ストレスを含むストレス応答遺伝子チップを用いたDNAマ

イクロアレイ解析を行い、腫瘍免疫発動に関与する分子の同定を行う。

7. MHCクラス I 発現と治療感受性の相関

<平成21年度>

1) メラノーマ細胞の培養

メラノーマ患者の転移巣から初代培養、及び培養細胞株の確立を行う。近年明らかになったエンドセリン、Stem Cell Factorなどの色素細胞増殖因子や間質系フィーダー細胞などを用いて培養を試みNPrCAP単独とNPrCAP/PEG/DNM療法に対する感受性を検討した。

2) 免疫染色によるメラノーマの細胞遺伝子発現の検討

予備的臨床治験患者のCTI治療前後切除組織切片の免疫染色によって、腫瘍細胞のMHCクラス I、cyclin D1、p16、hTERT、c-KIT、 $\beta$ -catenin等の発現を検索した。

3) メラノーマ関連癌遺伝子・癌抑制遺伝子の変異解析・発現解析

メラノーマの癌化・細胞増殖に関与しているといわれる遺伝子のうち、特にホットスポットの明らかなBRAF、N-ras、c-KITの変異をDNA解析により検討する。RNAが得られれば、Real Time PCR法でMITF、cyclin D1、p16、hTERT、c-KITの発現量を解析する事を計画した。

<平成22、23年度>

症例が蓄積した段階で薬剤感受性検査の結果と変異遺伝子解析結果を照合してその関連を探る。また、フォローアップ期間中に進行した症例では、転移巣の細胞遺伝子とくにMHCクラス I蛋白質の発現に注目し、全身状態と転移の部位とともに治療方針の決定に役立てる。

4) 抗原エピトープ解析

前年度にスクリーニングしたタンパク質のアミノ酸配列から、HSP70結合配列およびMHCクラスI結合配列の解析を行い、抗原エピトープの配列を予測する。これによりCTI療法で誘導される抗原ペプチドを同定し、治療薬剤感受性検

査の結果と変異遺伝子解析結果を照合してその関連を解析する。

5) 予測した抗原ペプチドを用いたin vitroおよびin vivo検討

配列予測した抗原ペプチドを合成して、in vitroおよびin vivoにおいて、B16メラノーマに対する細胞および腫瘍特異的免疫が活性化するかどうか調べる。

## C. 研究結果・考察

### I. 次世代型CTI療法薬剤の開発と抗腫瘍効果・安全性

本研究事業における分担研究である「新規薬剤の開発」に関する平成21年度計画は、「腫瘍局所・全身投与における粒子の最適化による体内拡散性・腫瘍集積性・発熱性の検討」であった。

#### 1. 腫瘍局所・全身投与における粒子の最適化

平成21年度に我々が考案したNPrCAP/PEG/DNM合成手順ではDNM粒子表面の水酸基にアミノシラン基を導入し、スパーサーであるPEGの片末端のNHS基を介してアミノシラン基にPEGを結合させる。更にPEGのもう一方の片末端のマレイミド基を介してNPrCAP-SHを導入する。

この合成法では、アミノシラン化時の粒子凝集、および疎水性NPrCAP-SHの導入効率が低い等の問題があった。臨床用薬剤として確立するためには、注射用薬剤としての分散性・易ろ過性を維持する必要がある、上述の粒子凝集は極力避ける必要がある。また、NPrCAP-SH導入効率については、全身投与時のメラノーマ患部への集積率に大きく影響すると考えられる。加えて、製剤化を見据えた生産コストへの影響も看過できない。

#### 2. アミノシラン化時の粒子凝集への対応

一般的にコロイド粒子への反応時の凝集は、粒子間の距離（≒粒子の濃度）および凝集を促

進するアミノシラン化試薬（APTES）の添加量に影響される。そこで我々は、この条件を変えることで、凝集しない条件を確立した。なお上述の好適な条件下で得られたアミノシラン化DNMの合成結果を下表に示す。但し、過剰のアミノ基の存在によりその後のPEG導入時のマレイミド基活性への影響が懸念される為、アミノシラン含有量は30  $\mu$ g/mg-Fe程度に制御することとした。

#### 3. 疎水性NPrCAP-SHの導入効率の改良

上述の従来合成手順では、アミノシラン化DMにPEGを導入（PEG/DNM）し、その後にNPrCAP-SHとの重合反応を行っているが、PEG/DNMが親水性コロイドであるのに対し、NPrCAP-SHは疎水性の為にアルコール等に溶解後して滴下する必要がある、水に分散したPEG/DNMと均質に反応できない、或いはこれによる粒子凝集が懸念される。

従って、下記の反応プロセスに改良することで、NPrCAP-SHを可溶化し、水中での反応を行うこととした。この結果、下表に示すように磁性ナノ粒子（原料の粒子サイズ：55nm）の性質を維持しつつ一定のNPrCAP結合量を有するNPrCAP/PEG/ DNM（Run-1~4）を得ることが出来た。

#### 4. 新規合成法の樹立

従来の合成法の問題点として、原料となるNPrCAP-SHを大量に合成するに際し、高価な試薬（SPDP: 約13万円/g）を使用したこと、また反応の後処理の煩雑さがあった。過去1年間、これらの問題点を克服するために、反応条件の検討を新たに行った。その結果、従来法では二段階の反応を必要としたが、一段階反応で目的物質を得ることができ、収率も75%から90%に向上し、使用試薬もより安価になり、合成条件の改善を図ることができた。

次に、合成されたNPrCAP/PEG/APTS/ DM中に結合しているNPrCAP-SHの結合量の測定の改

良を行った。先に我々は、6M-HCl中110°C、4時間の反応で生成する4-S-CAP量をHPLCで分析する方法を用いた。しかしながら、この方法では、生成する4-S-CAPの分解が起こることがわかったので、HCl中に1%のフェノールを添加し、反応時間を1時間に短縮することによって、4-S-CAPの分解が抑えられることをHPLC分析により確認した。これ等基礎研究と並行しGMP製剤作成専用のクリーンベンチを改修する事が出来た(図6、7)。

## 5. 深部メラノーマに対するNPrCAPの抗腫瘍効果・免疫賦活への有用性の検討

我々の予備的な検討で、メラノーマ標的薬剤であるNPrCAP-SHによるメラノーマ殺傷により、抗腫瘍免疫が誘導されることが分かっている。現在のCTI療法の問題点として、長期の腫瘍免疫賦活(6ヶ月から1年後)のために、何らかの方法で免疫を再度ブーストする必要がある。このようなメラノーマに対する新たな免疫ブースト治療として、磁性ナノ粒子を含まないNPrCAP-SHの腫瘍内投与による抗腫瘍効果を

検討する。この結果をふまえて転移性メラノーマとしてマウスの肺転移の系を作製し、NPrCAP-SHの全身投与の可能性についても検討を行っている。平成22年度には、NPrCAP-SHは、メラノサイトに選択的に取り込まれ、酸化ストレスによるメラノサイトの細胞死を誘導することから、再発予防の観点からナイーブマウスにNPrCAP-SHを投与することによるメラノサイト細胞死を介するメラノーマ分化抗原、すなわちチロシナーゼ、gp100, TRP-2に対する免疫応答誘導がなされているかの検討を行う。

メラノサイト分化抗原特異的免疫応答が誘導されることは、本CTI療法後の再発予防の可能性を示唆する。具体的には、1) NPrCAP-SH腫瘍内投与による転移腫瘍の治療効果、2) 腫瘍特異的免疫の誘導、3) 腫瘍拒絶のエフェクター細胞の同定、4) 腫瘍特異的細胞傷害性T細胞(CTL)の誘導といった実験を行っている。抗腫瘍免疫応答の誘導の詳細は以下の実験II. CTIで誘導される腫瘍免疫作用機序の解析で検討する。

## II. CTIで誘導される腫瘍免疫作用機序の解析

### 1. 腫瘍抗原の解析

予備実験としてHeLa培養細胞を使って44°C、1時間の温熱処理をほどこし、3時間ごとにmRNAを採取し時系列のDNAマイクロアレイ解析を行った。その結果、温熱後3時間で発現が最大になるタンパク質群と6時間で最大になるタンパク質群の2群があることが判明し、両群を合わせると高発現するタンパク質は41種類に達した。この結果から、実際のメラノーマ細胞での処理時間を温熱処理後6時間程度と設定できた。実際には、温熱とNPrCAP-SH処理をヒトメラノーマ細胞に作用させ、高発現した抗原候補タンパク質のアミノ酸配列の中から抗原提示細胞のMHC class Iに提示できる配列を推定する。候補配列が多い場合はペプチドアレイを作製し、実際の細胞を使って評価する。このため、acetovanilloneを出発物質として、6段階の有機

新規薬剤GMP製剤専用クリーンルーム改修

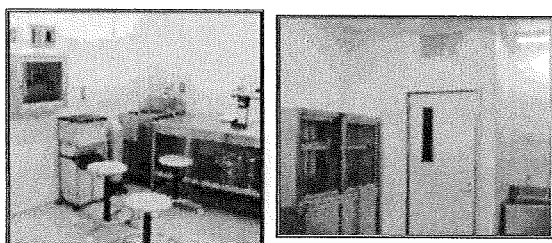


図6

米国連邦規格	浮遊粒子数 基準値 (非作業時)	クリーンルーム (改修直後、非作業時)
	0.5 μm以上の粒子	0.5 μm以上の粒子
クラス 100	3,530 個/m <sup>3</sup> 以下	
クラス 1000	35,300 個/m <sup>3</sup> 以下	20,000 個/m <sup>3</sup>
クラス 10,000 (クリーンルーム)	353,000 個/m <sup>3</sup> 以下	
クラス 100,000	3,530,000 個/m <sup>3</sup> 以下	

各数値は米国基準単位:「個/ft<sup>3</sup>」を「個/m<sup>3</sup>」に換算したもの

図7

合成反応で、Fmoc-aminoethyl photolinkerを合成した。セルロース膜上にこのphotolinkerを結合させ、その上に、蛍光色素でラベルしたペプチドを定法通りスポット合成した。得られたセルロース膜をトランスイルミネーター（365nm, 7.3mW/cm<sup>2</sup>）を使って紫外線照射を試みたところ、3時間で20 nmol以上のペプチドが解離することを見出し、抗原提示可能なペプチドエpiteopeの網羅的探索に活用できるようになった。

一方、細胞の悪性度や浸潤を細胞ごとに観察できる細胞アレイを検討した。ヒトメラノーマ細胞をMagnetite cationic liposomeで磁気ラベルし、コラーゲンコートしたガラスボトムディッシュに播種し、裏面に配置した磁気剣山状デバイスで磁気誘導して細胞アレイとして配置し、上部からコラーゲンで埋包することで、細胞の浸潤が評価できる細胞アレイが構築できた。このデバイスで、細胞を1スポットずつ観察でき、細胞の形態変化も評価できることが明らかになった。

## 2. CTI療法で誘導されるメラノーマ特異的CTLの解析

平成21年度は、CTI療法で誘導される免疫機構を解明するために、腫瘍浸潤リンパ球（TIL）のT細胞受容体（TCR）レパトワ解析を行い、CTI療法によって新たな細胞障害性Tリンパ球（CTL）が出現しているかを調べることを目標に実験を行った。申請書の研究計画に従い、マウスB16メラノーマ細胞をC57BL6マウスの皮下に移植し、CTI療法を行った後の腫瘍を摘出して、TILの病理学的検証と、TILのTCRレパトワ解析を行った。抗CD8抗体を用いた免疫組織化学染色を行ったところ、CTI療法を施した腫瘍でわずかにTILが見られるものの、顕著なCD8陽性T細胞の浸潤は確認されなかった。

この結果を受けて、B16腫瘍に浸潤するCD8陽性T細胞の割合をフローサイトメトリーで定量的に解析したところ、わずか0.02%であることが分かった。B16メラノーマ細胞は免疫原性が非常

に低い細胞であり、腫瘍に浸潤するT細胞はごく僅かであるため、TILのTCR遺伝子の増幅は困難であった。一方で、B16腫瘍においても、CTI療法でメラノーマ特異的なCTLが産生して全身性の抗腫瘍免疫を賦活することは、これまでの検討から明らかになっている。この結果を受けて、B16腫瘍に浸潤するCD8陽性T細胞の割合をフローサイトメトリーで定量的に解析したところ、わずか0.02%であることが分かった。B16メラノーマ細胞は免疫原性が非常に低い細胞であり、腫瘍に浸潤するT細胞はごく僅かであった。これらの結果から、B16腫瘍におけるTILの攻撃は、1) リンパ球の所属リンパ節からの腫瘍への移行、2) リンパ球の腫瘍への攻撃および3) 所属リンパ節への帰還といったプロセスが速やかに行われていると考えられた。

一方で、腫瘍からごく僅かな細胞数のTILを分離する方法として、Magnetic cell sorting (MACS) によるB16腫瘍からのCD8陽性T細胞の分離プロトコルの確立を行った。結果として、わずか0.02%のCD8陽性細胞を90%以上に精製可能な状態に調製するプロトコルを確立した。

これらの結果を受けて、今後は腫瘍内のリンパ球を解析するのではなく、所属リンパ節内のリンパ球を解析することで、CTI療法後に新たなメラノーマ特異的CTLが生まれるかどうかを解析する。具体的には、マウスB16メラノーマ細胞をC57BL6マウスのフットパッドに移植し、CTI療法を行った後に、所属リンパ節である鼠径および膝窩リンパ節を摘出して、ELISPOT assayによるCD8陽性細胞のIFN- $\gamma$ 産生細胞測定およびTCR遺伝子の増幅によるTCRレパトワ解析を行う。

## 3. 深部メラノーマに対するNPrCAP単独の癌免疫賦活への有用性の確認

上記の実験 I. 薬剤の抗腫瘍効果・安全性 (I-5) で述べたごとく、我々は予備実験検討の中で、メラノーマ標的薬剤であるNPrCAP-SH

### メラノーマCTI療法プロトコル

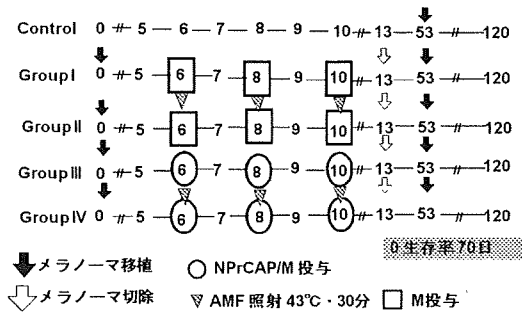
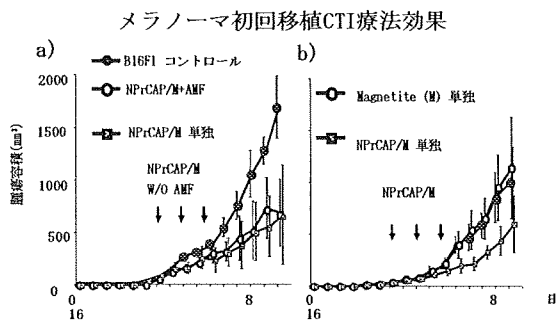


図 8



a) NPrCAP/Mの化学療法効果：磁場(M)の照射群と非照射群内に差がない  
 b) NPrCAP/M単独群(磁場照射なし)でも2回目の腫瘍再チャレンジ移植において腫瘍増殖抑制効果あり。

図 9

が酸化ストレスにもとづくメラノーマ殺傷（アポトーシスに基づく）により、抗腫瘍免疫を誘導することを見出している（Takada T et al, Journal of Biomedicine and Biotechnology, in press; Sato et al, Journal of Immunotherapy; submitted; Osai et al, Pigment Cell and Melanoma Research, ID457936 (2) pp915, 2009)。ことにマウスメラノーマB16F1およびB16-OVAを用いた実験では、磁性ナノ粒子を含まないNPrCAP-SH単独での抗腫瘍効果を確認した。すなわちメラノーマ腫瘍内にNPrCAP-SHを投与することで、抗腫瘍効果を認めた（図 8、9、10、11）。

完全な腫瘍退縮を認めたマウスでは、これらのメラノーマ細胞に対する細胞傷害性T細胞(CTL)の誘導を認めた。また抗体を用いたエフェクター細胞除去実験によって抗腫瘍効果はCD8T細胞に依存していることが明らかになった。またNPrCAP-SH腫瘍内投与時に樹状細胞を

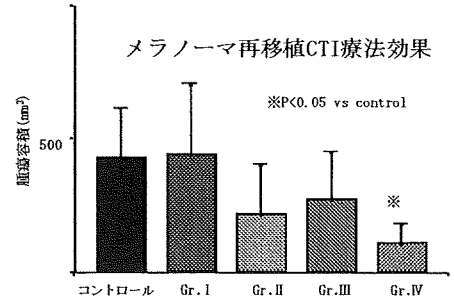
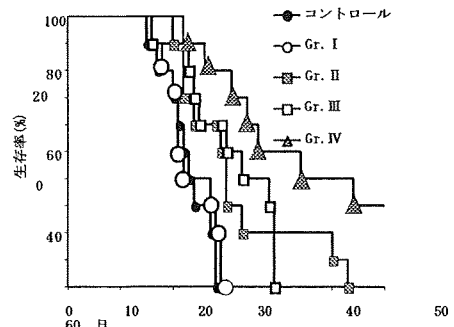


図8のプロトコルに従い以下の事件群に分けた  
 Gr I: マグネタイト (M)投与、磁場照射なしの群  
 Gr II: マグネタイト (M)に磁場照射を加えた群  
 Gr III: NPrCAP/Mのみと磁場照射を加えない群  
 Gr IV: NPrCAP/Mと磁場照射を併用した群

図10

### B16メラノーマ再移植後のCTI療法効果の生存率の比較



※コントロール、Gr I ~ Gr IVは図10と同じ

図11

同時に腫瘍内投与すると、さらに強い抗腫瘍効果を得た（流れ図、図 5 a, b参照）。平成22、23年度はB16担癌ナイーブマウスにNPrCAP-SHの静脈内投与および腹腔内投与を行い、正常メラノサイト傷害の有無を検討し、チロシナーゼ、gp100、TRP-2等のメラノーマ分化抗原に対する抗原特異的細胞傷害性T細胞の誘導、抗体産生といった全身性免疫応答誘導について検討する（図12）。

### 今後の研究計画

平成年度	新規製剤の開発	製剤安全性・抗腫瘍効果の検討	分子標的・免疫活性化作用の解明
22年度	腫瘍局所・全身投与における粒子の最適化による体内拡散性腫瘍集積性と発熱性の検証	新規製剤の腫瘍選択性・特異性・作用機序の解明	抗原エピトープ解析および同定した抗原ペプチドを用いた <i>in vitro</i> の検討 TCRレパト解析およびTCR遺伝子のクローニング腫瘍特異的免疫の誘導
23年度	全身投与と新規製剤NPrCAP-SHの合成	新規製剤の安全性・毒性実験	抗原ペプチドを用いた <i>in vivo</i> の検討 TCR遺伝子導入細胞を用いた <i>in vitro</i> および <i>in vivo</i> の検討CTIの誘導

図12

## E. 結論

メラノーマは悪性かつ治療抵抗性の皮膚癌で、進行例に対する治療成績は過去40年間見るべき進歩がない。最近の統計によるとメラノーマの全身療法に唯一認可されているダカルバジンの奏効率は7.5%であり、頻回投与による催奇形性（二次発癌）がより問題となっている。また、メラノーマの腫瘍抗原ペプチドを用いたペプチドワクチン療法が最近10年間盛んに行われているが、単独治療の奏効率は10%以下である。これらの背景として、①メラノーマは放射線・化学療法に抵抗性であること、②既存のペプチド免疫療法においてはメラノーマ細胞におけるMHCクラスIの発現低下と宿主の制御性T細胞が存在する事等複雑な免疫機構が関与することがあげられている。

我々のCTI療法はペプチド等の腫瘍特異抗原を外から投与するのではなく、化学・温熱療法を行うことにより、患者自身の生体内に腫瘍特異抗原・ペプチドを産生させ、これにより患者自身の有している樹状細胞により腫瘍特異的細胞傷害性T細胞（CTL）の誘導を活性化させ、遠隔転移腫瘍の撲滅を図ること、すなわち“生体内産生がんペプチド免疫療法”をおこなうことである。この方法は現在行われているペプチドを用いた免疫療法とは全く概念を異にしているものである。我々の予備的臨床試験は症例数が限定されているが本方法の有用性を実証している。更に、NPrCAP自体化学療法効果のみならず腫瘍免疫効果があることを示唆する所見が得られ、皮膚移植メラノーマにNPrCAPを局所注射をし、その後メラノーマを再移植すると再移植腫瘍の増殖は拒絶され、抗CD8抗体投与により逆に拒絶は阻害された。今年度は、新規薬剤のプロトタイプを完成させた。次年度は、新規薬剤のみならずNPrCAP自体の化学・免疫療法効果の機序について明らかにする。

## F. 健康危険情報

近年、日本を含め全世界各国に於いてメラノーマ患者の発症率、死亡率が増加している。その原因として生活習慣の変化、日光への暴露機会の増加等が挙げられているが、未だ詳細は明らかでない。白人は90人に一人発生する。日本人では1500人から2000人に一人発生するとされているが、近い将来1000人に一人は発生すると予測されている。日本人メラノーマは足底部皮膚、眼球内、口腔、肛門、膣粘膜等の非露光部に発生しやすい。本悪性腫瘍は現在のところ、早期外科的切除以外治療がなく、従来の概念になり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) Hida T, Sohma H, Kokai Y, Kawakami A, Hirosaki K, Okura M, Tosa N, Jimbow K: Rab7 is a critical mediator in vesicular transport of tyrosinase-related protein 1 in melanocytes. *J Dermatol*, 2010.
- 2) Kawakami A, Saga K, Ono I, Hida T, Jimbow K, Yamashita T: Spontaneous regression of bowenoid papulosis in a patient with acquired immunodeficiency syndrome after an increase in peripheral CD4+ T lymphocytes. *Int J Dermatol*, 48(2):210-212, 2009.
- 3) Hida T, Wakamatsu K, Sviderskaya EV, Donkin AJ, Montoliu L, Lynn Lamoreux M, Yu B, Millhauser GL, Ito S, Barsh GS, Jimbow K, Bennett DC: Agouti protein, mahogunin, and attractin in pheomelanogenesis and melanoblast-like alteration of melanocytes: a cAMP-independent pathway. *Pigment Cell Melanoma Res*, 22; 623-34, 2009.
- 4) Sato M, Yamashita T, Ohkura M, Osai Y, Sato A, Takada T, Matsusaka H, Ono I, Tamura Y, Sato N, Sasaki Y, Ito A, Honda H, Wakamatsu

K, Ito S, Jimbow K: N-Propionyl-Cysteaminyphenol-Magnetite Conjugate (NPrCAP/M) Is a Nanoparticle for the Targeted Growth Suppression of Melanoma Cells. *J Invest Dermatol*, 129:2233-41, 2009.

- 5) Takada T, Yamashita T, Sato M, Sato A, Ono I, Tamura Y, Sato N, Miyamoto A, Ito A, Honda H, Wakamatsu K, Ito S, Jimbow K: Growth inhibition of re-challenge B16 melanoma transplant by conjugates of melanogenesis substrate and magnetite nanoparticles as the basis for developing melanoma-targeted chemo-thermo-immunotherapy. *J Biomed Biotechnol*, Vol 2009, Article ID 457936, 13 pages, 2009.

## 2. 学会発表

- 1) Osai Y, Tamura Y, Sato N, Wakamatsu K, Ito S, Ito A, Honda H, Ohkura M, Yamashita T, Jimbow K: N-propionyl-cysteaminyphenol suppresses re-challenge of mouse B16F1 tumor by inducing tumor-specific immune response. *J Invest Dermatol* 129, Suppl (Hungary), (September 9-12, 2009)
- 2) Jimbow K, Thomas PD, Osai Y, Takada T, Sato M, Sato A, Tamura T: Melanogenesis substrate, N-propionyl cysteaminyphenol is selectively incorporated into melanoma cells and inhibits the growth of re-challenged secondary transplantation. *Pigment Cell & Melanoma Res*, 22:877, 2009, (Boston), (November 1-4, 2009)
- 3) Jimbow K, Takada T, Sato M, Sato A, Kamiya T, Ono I, Yamashita T, Tamura Y, Sato N, Miyamoto A, Wakamatsu K, Ito S, Ito A, Honda H, Murase K: Melanogenesis and nanomedicine as the basis and clinic for melanoma-targeted DDS and chemo-thermo-immunotherapy. 25th Annual Meeting of the Japanese Skin Cancer Society (Okayama), (May 22-23, 2009)
- 4) Jimbow K, Takada T, Sato M, Sato A, Osai Y, Kamiya T, Ono I, Yamashita T, Tamura Y, Ito A, Honda H, Wakamatsu K, Ito S: Melanogenesis cascade for developing novel selective drug delivery and chemo-thermo-immunotherapeutic strategies in melanoma; specificity and biological effect. *Pigment Cell & Melanoma Res*, 22 : 915, 2009 (Fukuoka), (December 5-6, 2009)
- 5) Osai Y, Tamura Y, Sato N, Wakamatsu K, Ito S, Ito A, Honda H, Okura M, Yamashita T, Jimbow K: N-propionyl-4-S-cysteaminyphenol induces apoptosis of mouse B16F1 melanoma cells and suppression of transplanted B16F1 tumors. *Pigment Cell & Melanoma Res*, 22 : 915, 2009 (Fukuoka), (December 5-6, 2009)
- 6) Jimbow K, Takada T, Sato M, Sato A, Osai Y, Kamiya T, Ono I, Yamashita T, Tamura Y, Ito A, Honda H, Wakamatsu K, Ito S: Utilization of melanogenesis substrate, NPrCAP for exploiting melanoma-targeting drug and its conjugation with magnetite nanoparticles for developing melanoma chemo-thermo-immunotherapy. 2nd International Conference on Drug Discovery and Therapy (Dubai), (February 1-4, 2010)

## F. 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; Stiefel Inc., & University of Alberta (2種類の特許)  
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), Israel (106347)



2) 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号広報 (特許文献)

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

## Ⅱ. 分担研究報告書

# 厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業） 分担研究年度終了報告書

## DNAマイクロアレイを用いた癌温熱免疫併用療法抗原の探索

本多 裕之 名古屋大学大学院工学研究科・教授

### A. 研究目的

CTI療法の効果増強を目指した細胞アレイによるがん細胞機能解析

がんの転移過程において、浸潤は最初のステップであり、極めて重要なステップの一つである。それ故に浸潤をターゲットとして抑制あるいは阻害する物質を探索することは、がんの転移の予防あるいは治療に大きく寄与しうる。また浸潤において、がん化した細胞が組織を浸潤する時にはまず基底膜中を浸潤して突き破る必要があるため、がん細胞が基底膜を浸潤する能力は転移能を表す重要な指標とされている。実際に、遺伝子導入によりin vitroで基底膜への浸潤が抑制された細胞は、in vivoでの転移も阻害される。

生体内において多くの細胞は細胞外マトリックス（ECM）に取り囲まれて存在しており、細胞はECMとの相互作用を介して接着や移動などの細胞機能を発現している。これまでin vitroにおいて細胞を用いた生物学的な研究を行う際には、培養環境を一定に保つことができ、かつ観察やたんぱく質などの分析が容易なことから二次元平面培養により行われることが多かったが、ECMの3分の1を占めるコラーゲンに細胞を包埋する培養法であるコラーゲンゲル包埋培養を行うことにより、細胞は生体内に近い増殖形態を示し、また表皮細胞は多層構造が生成することが確かめられている。このように、コラーゲン包埋培養では、細胞の持つ固有の形態学的性

質と分化機能を維持することができるため、in vitroにおいて生体内に近い条件下で細胞増殖、形態形成、分化誘導等が可能である。

以上のように、がん細胞にとって三次元的にECMに包埋された環境、がん細胞同士が三次元的な集合体を形成した環境は、生体内での現象を正確に映し出すにあたって重要な要素である。したがって、がん治療の成績向上のためには、がんの基礎研究や抗がん剤の評価をこれらの環境下で行うことにより、がん細胞の生命現象のより正確な理解や、がん治療に対する適切な抗がん剤の選択をする必要がある。

最も一般的に行われている浸潤評価法は、インベージョンアッセイ法である。この方法は、底面が多孔性メンブレンであるセルカルチャーインサート（ボイデンチャンバー、トランスウェルとも呼ばれる）を用いて、メンブレンを基底膜抽出物で覆い、その下部には誘因物質を添加し、上部で細胞の培養を行い、メンブレンの通過によって浸潤現象を評価する方法である。しかし、この時の培養環境は、誘因物質の濃度勾配の点では三次元的な環境となっているが、マトリゲル上での単層培養であること、足場がメンブレンとなり得ることから、ゲル包埋培養・スフェロイド培養という点では生体内模倣には不十分な環境であると言える。また、エンドポイントでの評価であることが評価条件の最適化を必要とさせて評価を困難にさせるとともに、浸潤過程の詳細な観察を不可能にしている。

本研究室ではこれまでに、細胞の磁気ラベル

を行って磁気誘導をすることで細胞をアレイ状にパターンニングする、磁気細胞アレイ化技術を開発した。細胞の磁気ラベルには、磁気応答性を持ったナノ粒子であるマグネタイト（磁性微粒子）、もしくは正電荷を帯びたりポソームに磁性微粒子を包み込んだMagnetite Cationic Liposome (MCL) を使用する。磁気ラベルを行った細胞は磁石に引き寄せられるようになり、磁石を用いて細胞を誘導することができる。磁気ラベル細胞のアレイ化には、電磁軟鉄を加工して $\mu\text{m}$ オーダーで等間隔に支柱を並べた、剣山状デバイスを使用する。剣山状デバイスを磁化すると支柱部分に磁力が集中するため、磁気ラベル細胞は支柱部分に引き寄せられてアレイ状に並ぶ。細胞の磁気ラベルは、増殖能や薬剤感受性に影響を及ぼさないことが確かめられている。そのため、細胞の機能解析に有用であり、血管内皮細胞の血管新生の解析、1細胞解析、がん細胞の三次元包埋培養での挙動評価に応用されている。磁力を用いた細胞アレイ化技術は、培養基盤の修飾を必要としないという大きな特徴があり、そのため特に細胞の挙動観察、評価に秀でた技術である。

そこで、本研究では、この技術を応用して、基底膜抽出物であるマトリゲル上で、かつ三次元的にECMに包埋した環境下で、メラノーマ細胞の集合体をアレイ状にパターンニングすることでがん原発層を模倣した環境をin vitroで再現し、そのような生体内を模倣した環境下で浸潤評価を行うことが可能な浸潤評価系の構築を目的とした。

## B. 研究方法

ヒト悪性黒色腫細胞（以下メラノーマ）Sk-mel-23、Sk-mel-118 (UT)、MeWo、G361を用いた。培養は、 $37^{\circ}\text{C}$ 、5% $\text{CO}_2$ 、95%Air下の $\text{CO}_2$ インキュベーター内にて細胞培養皿(greiner bio-one, Frickenhausen, Germany)で行い、培地には10% fetal bovine serum (FBS) (Invitrogen, Gaithersburg, MD, U.S.A.) 及び抗生物質ペニシ

リンストレプトマイシン (PS) (終濃度100 U/ml ペニシリンGナトリウム、0.1g/mlストレプトマイシン硫酸塩) (Invitrogen) を含むDulbecco's Modified Eagle Medium high glucose (DMEM) (Invitrogen) を用いた。継代操作については、コンフルエント状態になった細胞の培地を除き、Phosphate Buffered Saline (PBS) で二度洗浄後、5分間のトリプシン処理、培地による反応停止により培養皿から剥がして再播種することにより行った。対象としてヒト正常表皮メラニン細胞NHEM（倉敷紡績株式会社、大阪）を用いた。ゲル中でのパターンニングに向けて、粉末培地であるMCDB153培地（Sigma-Ardrich, St.Louis, MO, U.S.A.）を基礎培地として添加因子HMGS-2及びPSを添加した培地による培養も行った。継代操作については、コンフルエント状態になった細胞の培地を除き、PBSで二度洗い流した後、1分間のトリプシン処理、10% FBS/PBS溶液による反応停止により培養皿から剥がして再播種した。

細胞数の測定はトリパンブルー色素排除法により、生細胞数を血球計算盤(エルマ、東京)にてカウントし、算出した。

磁性微粒子として粒子径10nmの $\text{Fe}_3\text{O}_4$ （戸田工業、東京）を用いた。磁性微粒子の水溶液を8500rpmで20分間遠心分離し、脱イオン水で再懸濁することでイオン成分を取り除いた。その後、超音波処理を2時間以上行い、分散性を高め、かつ無菌状態とした。この磁性微粒子溶液を脱イオン水で希釈して10mg/mlとしたものを使用した。濃度測定は、チオシアン酸カリウムによる比色法により次のように行った。磁性微粒子の水溶液400 $\mu\text{l}$ に12N HCl200 $\mu\text{l}$ を加え、 $40^{\circ}\text{C}$ で30分間加熱して鉄を溶解させた。その後、過酸化水素水10 $\mu\text{l}$ 、1%チオシアン酸カリウム4mlを加え、分光光度計により吸光度（固定波長=480nm）を測定した。同時に濃度既知の鉄標準液についても同様の操作で吸光度を測定して検量線を作製し、磁性微粒子濃度を算出した。この磁性微粒子溶液をリン脂質に包み込むこと