

でMCLを作製した。リン脂質としてTMAG (N-( $\alpha$ -trimethylammonio-acetyl)- didodecyl-D-glutamate chloride)(相互薬工、東京)、DLPC (Dilauroyl phosphatidylcholine) (Sigma-Ardrich)、DOPE (Dioleoyl phosphatidylethanolamin) (Sigma-Ardrich)を用いた。それぞれクロロホルムに10mg/mlになるように溶解し、モル比1:2:2 (TMAG:DLPC:DOPE)の組成でナス型フラスコに入れ、ロータリーエバポレータで減圧して溶媒を除去し内壁に脂質膜を作製した。このリン脂質膜に上記の方法で作製した磁性微粒子(10mg/ml)2mlを加えてボルテックス攪拌しながら膜を膨潤させ、超音波装置 (UCW-201、東湘電機株式会社、横浜)で15分間の超音波処理を施し、10倍濃度のPBSを200 $\mu$ l加えさらに15分間の超音波処理を施してMCL溶液を作製した。MCLは、チオシアン酸カリウムによる比色法によって鉄濃度を測定したものを各実験に用いた。

MCLによる磁気ラベルは、同条件で細胞を播種してサブコンフルエント状態となった培養皿に細胞当たり目的の量となるようにMCLを添加し、CO<sub>2</sub>インキュベーター内で培養することにより、細胞にMCLを取り込ませて行った。

三次元細胞アレイ作製法は以下の通りである。培養皿には、lumox dish 35 (以下ペトリパーム) (Greiner Bio-One, Wemmel, Belgium)を使用した。これは、厚さ25 $\mu$ mの特殊フィルムを底面に固定した培養皿であり、細胞の磁気応答に適した薄さを有している。三次元培養がん浸潤評価系として、上層に基底膜抽出物であるマトリゲル(Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, U.S.A.)をコートしてその上から誘因物質を添加するパターンニング法と、下層にマトリゲルをコートするパターンニング法を実施した。上層マトリゲル法では、無血清培地で調製したI型コラーゲン混合溶液に、橙色蛍光標識ポリスチレン (PS) ビーズ (粒子径1.0 $\mu$ m) (invitrogen, CA, USA)を混ぜた溶液を、ペトリパームにコートした。一方、細胞はCell

Tracker greenによる蛍光染色、MCLによる磁気ラベルを行った。I型コラーゲンをコートしたペトリパームを、ネオジウム磁石に設置した剣山状デバイス (縦1cm $\times$ 横1cm $\times$ 高さ0.4cm、表面に縦100 $\mu$ m $\times$ 横100 $\mu$ m $\times$ 高さ320 $\mu$ mの四角柱型のポールを、150 $\mu$ m間隔で作製)上に配置し、その上で蛍光/磁気ラベル細胞を播種した。続いてその上からマトリゲルをコートした。マトリゲルは、主にラミニン、IV型コラーゲン、ヘパラン硫酸プロテオグリカン、エンタクチン/ニトジェンから構成されている。さらにその上に、血清入り培地で調製したI型コラーゲン混合溶液を加えた。こうして下層はI型コラーゲン、上層はマトリゲルに包み込まれ、上部に誘因物質を添加した環境中に細胞アレイを作製した。コラーゲンとマトリゲルを逆にした下層マトリゲル法も実施した。

## C. 研究結果

### C-1 細胞へのMCL取り込み量

メラノーマUT、MeWoについて、マグネタイト量が100pg/cellになるようにMCLを添加して10分、1、4、24、48時間培養し、細胞に取り込まれた鉄量を測定した。UTでは、培養4時間までは急激にMCLを取り込み、その後取り込みは緩やかになり24時間以降は頭打ちとなった。MeWoでは、1時間まではUTと同様にMCL取り込み量の急激な増加が見られ、その後は増加が緩やかになった。1時間の培養時間で、その他の細胞 (G361、Sk-mel-23、MCF-10A)についてもMCLの取り込み量を調べたところ、マグネタイト量3.1~5.0pg/cellと同程度の取り込み量を示した。実際にMCLを添加して1時間培養した各細胞を、剣山状デバイスを用いてパターンニングを行うと、いずれの細胞も細胞アレイの作製が可能であった。

### C-2 細胞増殖能と浸潤能

UT、MeWo、G361、Sk-mel-23、MCF-10Aについて、マグネタイトの量が100pg/cellになるよ

うにMCLを添加して培養した場合と、添加せずに培養した場合の細胞増殖能を比較した。いずれの細胞も増殖に差は見られなかったため、UT、MeWo、G361、Sk-mel-23、MCF-10AにおいてMCLの取り込みによる細胞増殖への影響は無い。磁気ラベル細胞の浸潤能を、in vitroでの浸潤評価として広く行われているインベーションアッセイにより調べた。メラノーマUTについて、磁気ラベルを行ったものを行っていない通常培養条件のものとの浸潤能を比較したところ、両者に差は見られなかった。したがって、UTではMCL取り込みによる浸潤能への影響は無く、UTは比較的MCL取り込み量の多い細胞であるので、今回使用するその他の細胞についてもMCLの取り込みによる浸潤能への影響は無いと思われる。

以上より、MCLの取り込みが細胞増殖能、浸潤能という細胞の活動に影響を与えないため、磁気ラベル細胞を用いて行う浸潤評価の正当性が示された。

### C-3 浸潤評価系構築法の検討

マトリゲル上、かつ三次元的にECMに包埋した環境下で、がん原発巣を模倣した細胞集合体をアレイ状にパターンニングして、マトリゲルへの浸潤を評価する培養系を構築した。各スポットに注目すると、1スポットあたりの細胞数は10cells前後となっており、上層マトリゲル法ではI型コラーゲン上のマトリゲル層との境界に細胞集合体を作製でき、下層マトリゲル法では三次元的にECMに包み込まれた環境でマトリゲル層の上に細胞集合体を作製できた。いずれの方法でも、がん原発巣でがん細胞が置かれている環境、とっている形態を模倣することができた。

続いて培養を行い、マトリゲル方向への浸潤の様子を観察した。浸潤距離は、Z方向に2  $\mu\text{m}$  ずつずらした連続断層画像を撮影して、取得した画像から判断した。培養を行って経時的に観察すると、3日間培養した後でも細胞集合体は

アレイを保っていた。そのため各スポットに注目して浸潤の様子を観察することができ、上層にマトリゲルをコートした方法では、培養2日後まではマトリゲル方向（上方向）への浸潤が見られるが、さらに培養すると3日目にはマトリゲル層内での細胞存在範囲は短くなった。一方で、下層にマトリゲルをコートした方法では、培養時間が長くなるにつれてマトリゲル層への浸潤距離は長くなっていった。なお、下層にマトリゲルをコートする方法で、パターンニング直後にもマトリゲル層内にわずかに細胞が存在していた。これは、ポリスチレンなどの他の培養基盤と比較して柔らかい素材であるマトリゲルの上に、磁力で細胞を引きつけるために、細胞がマトリゲルに沈んでいるものと思われる。

上層にマトリゲルをコートする方法で長く培養すると浸潤距離が短くなる原因だが、上部に添加した誘因物質が長期の培養では拡散によりディッシュ内で均一になってしまっており上方向に誘引されることは無くなること、また重力によって下方向へ誘引されることが考えられ、それにより浸潤能を持つ細胞はやがて下層方向に沈んでいき、マトリゲル方向への浸潤としては表れなくなると考えられる。こちらのパターンニング法は、誘引物質の濃度勾配が維持される場合には有用である可能性が考えられる。例えば異種細胞と共培養を行ってその細胞が分泌するサイトカインを誘因物質として浸潤評価を行う場合には、上層で異種細胞を培養すれば継続的に上方向から誘引され、有用だと考えられる。

### C-4 インベーションアッセイとの比較

がん細胞種ごとでの浸潤能を比較するために、メラノーマUT、MeWo、G361、Sk-mel-23について浸潤評価を行った。まず、既存の浸潤評価法であるインベーションアッセイによって浸潤能の評価を行った。底面がマトリゲルをコートしていない単なるメンブレンであるコントロールインサートを用いて移動細胞数を比較すると、細胞種ごとで差が見られた。細胞種によって移

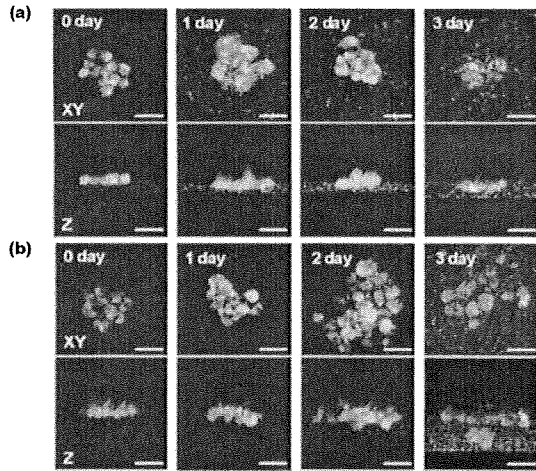


図1 パターニング法による浸潤挙動の比較  
共焦点顕微鏡によるXY, Z方向図、スケールバー50 $\mu$ m、  
a, 上層マトリゲル法、b, 下層マトリゲル法

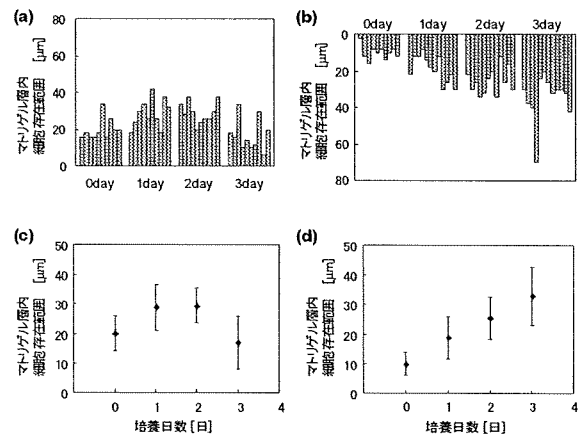


図2 パターニング法による浸潤挙動の比較  
マトリゲル層内に存在する細胞の範囲の経時変化、a, c  
は上層マトリゲル法、b, dは下層マトリゲル法、c, dは  
平均値

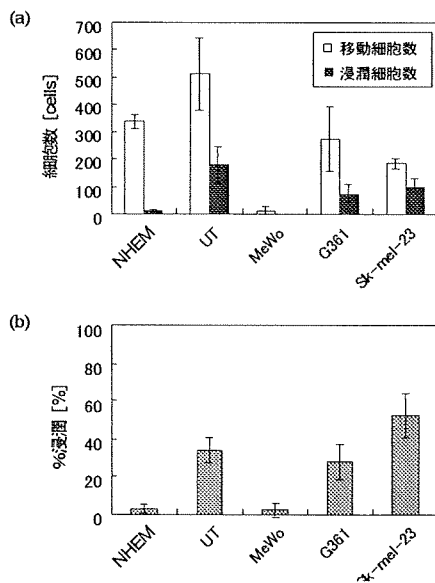


図4 インベージョンアッセイでの浸潤能評価  
(a) コントロールインサートを移動した移動細胞数と  
マトリゲルインサートを浸潤した浸潤細胞数、(b) 移  
動細胞数に対する浸潤細胞数の割合、%浸潤値 (n = 3)。

動能に違いがあるため、純粋な浸潤能を評価す  
るために「%浸潤」(コントロールインサートを  
通過する移動細胞数に対するマトリゲルコート  
インサートを通過する浸潤細胞数の割合) で評  
価したところ、メラノーマUT、G361、Sk-mel-  
23は正常ヒトメラニン細胞NHEMと比較して浸  
潤能を有しており、中でもSk-mel-23の浸潤能は

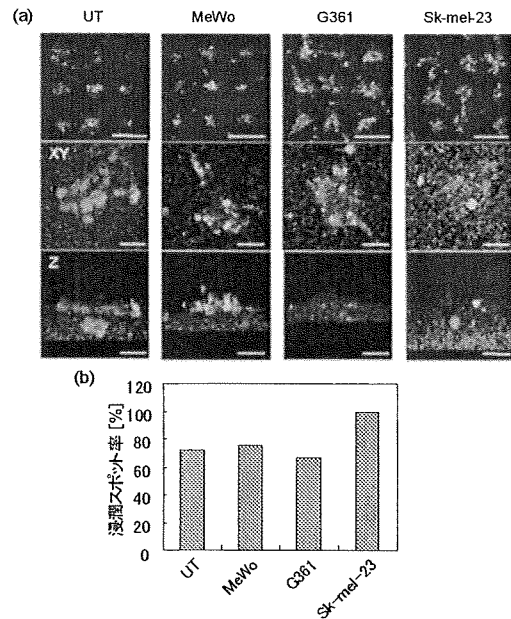


図4 3Dアレイでの浸潤能評価  
パターニング3日後に評価、(a) 共焦点顕微鏡により  
取得した画像、上段スケールバー250 $\mu$ m、中段50 $\mu$ m、  
いずれもXY方向図、下段スケールバー50 $\mu$ m、Z方向図、  
(b) 細胞存在範囲30 $\mu$ m以上を浸潤とみなし12スポッ  
ト計測したときの浸潤スポット数。

高いことがわかった。一方、メラノーマMeWo  
はNHEMと同様に浸潤能は無いという結果にな  
った。

次に、三次元培養がん浸潤評価系により上の  
細胞について浸潤能の評価、比較を行った。3  
日間培養後、いずれの細胞もマトリゲル方向へ  
の浸潤が見られ、Sk-mel-23は他の細胞種と比較

して浸潤距離は長かった。また浸潤が見られるスポットの割合は、UT、MeWo、G361では同程度であり、Sk-mel-23ではそれよりも多く、Sk-mel-23は浸潤能が高いという結果になった。UT、G361、Sk-mel-23の結果は、インベージョンアッセイと相関のある結果である。ただし、MeWoではインベージョンアッセイとは異なる結果となった。MeWoはメラノーマ患者のリンパ節転移由来株であり、xenograftの形成や、ヌードマウスに注射すると肺結節の形成が見られる。従って転移能を有する細胞種であり、三次元培養がん浸潤評価系での結果が正しい評価結果であることがわかる。

インベージョンアッセイで正確な評価ができなかったのは、単層培養であること、PETメンブレン基盤であることにより、生体内とは異なる環境であるためだと考えられる。ポリスチレン基盤での単層培養時には、UTは比較的丸い形態をとり、G361、Sk-mel-23は細長い形態をとり、MeWoは最も細長く伸展する。インベージョンアッセイにおけるコントロールインサートの移動細胞数は、細胞種によって大きな差があり、UTでは多く、G361、Sk-mel-23、MeWoの順に少なくなっていく、細胞形態との関連が推測される。使用したセルカルチャーインサートのメンブレンは、ポアサイズ $8.0\mu\text{m}$ の空孔が $1\times 10^5\text{pores}/\text{cm}^2$ であいているものであり、空孔間距離は計算上平均 $32\mu\text{m}$ である。一方、MeWoは細胞の長軸が $100\mu\text{m}$ 以上である。これらのことから、インベージョンアッセイでは、誘引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、細胞間、細胞—ECM間相互作用の点では培養開始時には単層培養条件であるためMeWoは細長い形態をとり、その浸潤能によりマトリゲルを溶解するが、メンブレン下部方向へ誘引されても複数の空孔にまたがることで移動することができず、それが浸潤能に結果が表れなかった原因であると思われる。

以上のように、三次元培養がん浸潤評価系では、多くの細胞種でインベージョンアッセイと

相関の取れた結果を示し、一部インベージョンアッセイでは正当な評価を行うことができない細胞種についてもその浸潤能を評価することができた。従って、本浸潤評価系では、生体内での現象を正確に映し出した浸潤能評価を行うことが可能である。

## D. 研究発表

### 1. 論文発表

投稿準備中

### 2. 学会発表

小出寛展、松村拓、高野翔、大河内美奈、本多裕之、3次元細胞アレイによる腫瘍細胞の浸潤評価、化学工学会第75年会（2010年3月20日、鹿児島大学）

小出寛展、松村拓、高野翔、大河内美奈、本多裕之、3次元細胞アレイによるがん細胞の浸潤評価、第17回HAB 研究機構学術年会（2010年5月21日、昭和大学）

## E. 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

# 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

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

若松 一雅 藤田保健衛生大学医療科学部教授  
伊藤 祥輔 藤田保健衛生大学医療科学部教授

## A. 研究目的

平成20年度に本研究を遂行するために必要な薬剤、N-(1-mercaptopropionyl)-4-S-cysteaminyphenol (NPrCAP-SH)を大量かつ純度の高い物質として得る合成ルートを開発し (Satoら、J Invest Dermatol, 129, 2233-2241, 2009)、メラノジェネシスを分子標的とした新規ドラッグデリバリーシステム (DDS) としてNPrCAP (N-propionyl cysteaminy phenol)とデキストラン被覆マグネタイト・ナノ微粒子 (DM)との新規結合体 (NPrCAP/APTS/PEG/DM)を得ることが出来た。しかしながら、NPrCAPを効率よく供給するに際して、いくつかの問題点が浮上したため、合成法の改良を検討した。原料となるNPrCAP-SHを大量に合成するに際し、この合成過程で使用される試薬が高価なこと、および反応副生成物と目的物との分離の困難さなどのいくつかの検討余地があった。本年度は、1) できるだけ安価な試薬を用いて、2) 反応経路・反応時間の短縮を行い、3) 反応混合物から目的物を効率よく精製する方法を確立することを検討した。また、4) NPrCAPが結合した結合型デキストランマグネタイト (NPrCAP/PEG/APTS/DM) 中のNPrCAP結合量の定量方法を再検討した。

## B. 研究方法および結果

### 1. NPrCAP-SHの新規合成法の開発

すでに報告したNPrCAP-SHの合成経路を以下に示す (図1)。この反応で使用するSPDPの値段は、約13万円/gと高価であった。さらに、図1のTLCプレートに示した様に、目的物の前後に試薬由来の不純物が出現し、精製が煩雑であった。

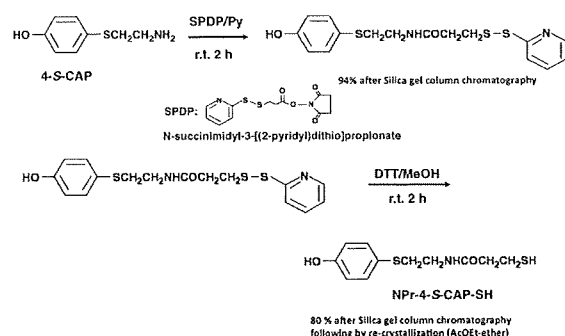


図1 a

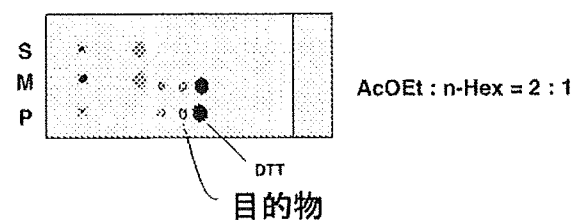


図1 b

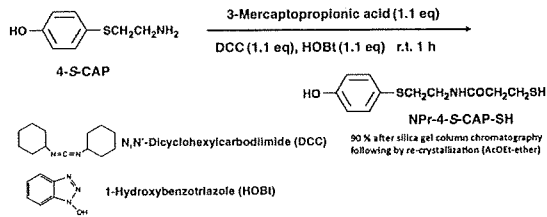


図 2 a

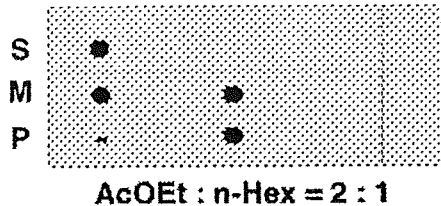


図 2 b

試薬の高価さ、精製の煩雑さを克服するために、以下の新しい反応経路を検討した。その結果、目的物をよい収率で得ることができた (図 2)。

実験方法は、4-S-CAPをDMF溶媒中で溶解させた後、3-メルカプトプロピオン酸、DCC、HOBtを加え、室温で1時間攪拌した。減圧下DMFを除去後、酢酸エチル抽出し、酢酸エチル層を減圧濃縮した。得られた反応混合物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル : n-ヘキサン = 4 : 1) で分離精製後、さらに酢酸エチル-エーテルで再結晶して目的物質を90%の収率で得ることができた。この化合物の構造は、<sup>1</sup>H-NMRおよびMS/MSスペクトルで確認された。この反応はone-pot反応であり、また使用した試薬はいずれも安価であった。精製も容易になり、反応収率も以前報告した合成法に比べ向上した。この合成法により、大量スケールの合成法を確立することができた。

## 2. 4-S-HomoCAP-SHの新規合成法

DMとの結合体でメラノジェネシスの基質部分であるNPrCAPをNPrHomoCAPに変更することで、より脂溶性を向上させ生体内での集積性を向上させることが期待される。NPrHomoCAPは、NPrCAPより炭素1個多い構造であり、4-S-CAP

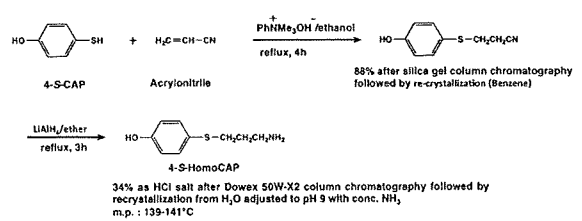


図 3

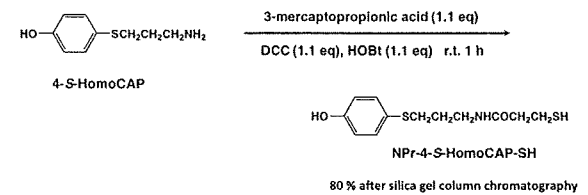


図 4 a

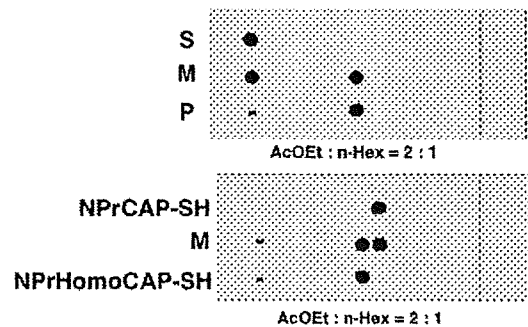


図 4 a

同様にメラノーマ細胞に強い細胞毒性を示すことが知られている。我々は、すでに4-S-HomoCAPが4-S-CAPと同様に、in vitroにおけるヒトメラノーマ細胞 (HMV-I、HMV-II細胞) に対して強い細胞毒性を示し、チロシナーゼやMAOの基質として働くことを報告した (Inoueら, Biochem Pharmacol., 39, 1077-1083, 1990)。本年度は、NPrCAP-SHに次ぐ次世代薬剤の候補として、NPrHomoCAP-SHの合成を検討した。

まず、4-S-CAPより炭素鎖を一つ延ばした4-S-HomoCAPを図3にしたがって合成した。すなわち、4-S-CAPとアクリロニトリルを相関移動触媒存在下、エタノール中で4時間還流し、ニトリル体を80%の収率で得た後、このニトリル体を水素化アルミニウムリチウムでアミン体に還元し、4-S-HomoCAPを陽イオン交換樹脂による精製後、34%の収率で得た。得られた4-S-HomoCAPを図4に示す上記に述べた同じ合成

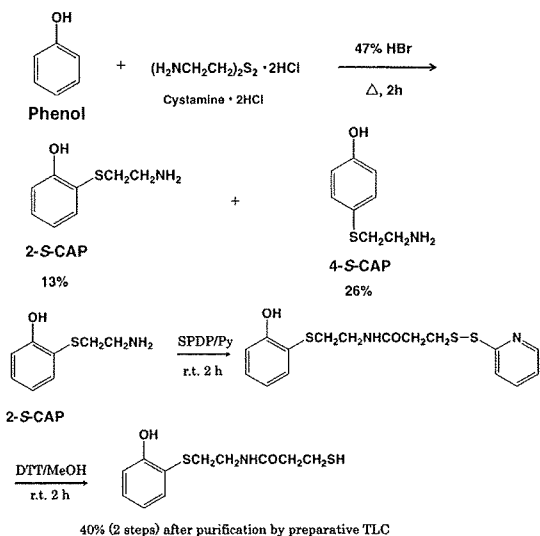


図 5

法で、NPr-4-S-HomoCAP-SHを80%の収率で合成した。

### 3. NPr-2-S-CAP-SHの新規合成法

すでに我々は、4-S-CAPがヒトチロシナーゼおよびマッシュルームチロシナーゼに対する基質となりうるが、2-S-CAPはそれらの基質にならないことを報告している (Itoら、Biochem Pharmacol, 36, 2007-2011, 1987)。そのため、メラノーマ細胞と特異的親和性を示さないと考えられるシステアミニルフェノール類としてのNPr-2-S-CAP-SHをNPr-4-S-CAP-SHのコントロール化合物として実験に使用するため、この化合物の合成を行った (図5)。

文献既知の方法 (Miuraら、Arch Dermatol Res., 279, 219-225, 1987) に従って、フェノールとシステアミンを47%臭化水素酸中、2時間還流し2-S-CAPを13%の収率で合成した。得られた2-S-CAPをSPDPと反応させた後、DTTで還元して、目的物質NPr-2-S-CAP-SHを得ることができた (2段階で40%)。

### 4. デキストランマグネタイトに結合したNPrCAP量を分析するための測定法の再検討

NPrCAPはDMと硫黄原子を介して結合してい

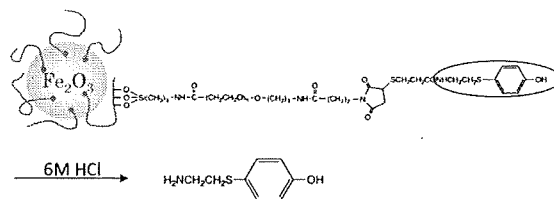


図 6

るが、その結合量は塩酸水解後得られる4-S-CAPをHPLCで定量することにより求めている。従来の方法は以下の方法で定量していた。1) NPrCAP/PEG/APTS/DM懸濁液に9倍量の6M塩酸を加え、110°Cで4時間反応させる。2) 反応液を0.4 M HClO4で10倍希釈後、HPLC分析して4-S-CAP量を定量する (図6)。

しかしながらこの方法では、再現性よく4-S-CAP量を定量することができないことが判明し、条件の検討を行った。原因は塩酸水解反応中に4-S-CAPが分解するためと考えられたため、1%のフェノールを含む6M塩酸で加水分解する方法を検討した。同時に、反応時間の検討も行った (表1)。

その結果、1%フェノールを含まない6M塩酸で加水分解した場合は、4時間後の結合量が、1時間の20%に減少した。一方、1%フェノールを含む6M塩酸で加水分解した場合は、4-S-CAPの分解が抑えられ、2時間の反応時間でも分解されにくいことがわかった。以上の結果より、1) NPrCAP/PEG/APTS/DM懸濁液に9倍量の1%フェノールを含む6M塩酸を加え、110°Cで1時間反応させる。2) 反応液を0.1M塩

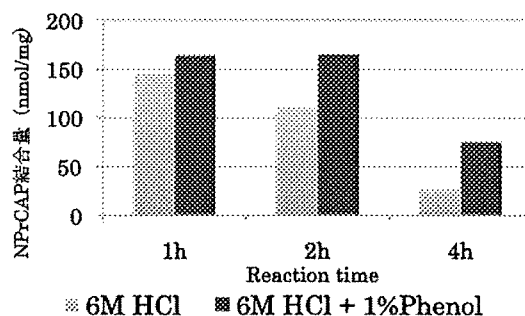


表 1

酸で10倍希釈後、HPLC分析により4-S-CAP量を定量する。という実験条件を確立した。

## D. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Wakamatsu K., Ohtara K., Ito S: Chemical analysis of late stages of pheomelanogenesis: conversion of dihydrobenzothiazine to a benzothiazole structure. *Pigment Cell Melanoma Res* 22, 474-486, 2009.
- 2) Ito S: Melanins seem to be present everywhere in the body, but for what? *Pigment Cell Melanoma Res* 22, 12-13, 2009.
- 3) 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 (NPrCAP/M) is a nanoparticle for the targeted growth suppression of melanoma cells. *J Invest Dermatol* 129, 2233-2241, 2009.
- 4) Takada T, Yamashita T, Sato M, 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* 2009. doi : 10.1155/2009/457936.
- 5) Spry ML, Vanover JC, Scott T, Abona-Ama O, Wakamatsu K, Ito S, D' Orazio JA : Prolonged treatment of fair-skinned mice with topical forskolin causes persistent tanning and UV protection. *Pigment Cell Melanoma Res* 22, 219-229, 2009.
- 6) Greco G, Wakamatsu K, Panzella L, Ito S, Napolitano A, d' Ischia M: Isomeric cysteinyl dopas provide a (photo) degradable bulk component and a robust structural element in red human hair pheomelanin. *Pigment Cell Melanoma Res* 22, 319-327, 2009.
- 7) Hu DN, Wakamatsu K, Ito S, McCormick SA: Comparison of eumelanin and pheomelanin content between cultured uveal melanoma cells and normal uveal melanocytes. *Melanoma Res* 19 ( 2 ) , 75-79, 2009.
- 8) Gasparini J, Bize P, Piault R, Wakamatsu K, Blount JD, Ducrest A-L, Roulin A: Strength and cost of an induced immune response are associated with a heritable melanin-based colour trait in female tawny owls. *J Animal Ecology* 78, 608-616, 2009.
- 9) Hida T, Wakamatsu K, Sviderskaya EV, Donkin AJ, Montoliu L, Lamoreux ML, Yu B, Millhauser GL, Ito S, Barsh GS, Jimbow K, Bennett D: Agouti protein, mahogunin and attractin in pheomelanogenesis and melanoblast-like alteration of Melanocytes: a camp-independent pathway. *Pigment Cell Melanoma Res* 22, 623-634, 2009.
- 10) Scott T, Wakamatsu K, Ito S, D' Orazio JA: Purification and growth of melanocortin 1 receptor (Mclr)-defective primary murine Melanocytes is dependent on stem cell factor from keratinocytes-conditioned media. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal* 45, 577-583, 2009.
- 11) Simon JD, Peles D, Wakamatsu K, Ito S: Current Challenges in understanding melanogenesis: Bridging chemistry, biological control, morphology and function. *Pigment Cell Melanoma Res* 22, 563-579, 2009.
- 12) Van Raamsdonk CD, Barsh GS, Wakamatsu K, Ito S: Independent regulation of hair and skin color by two G protein-coupled pathway. *Pigment Cell Melanoma Res* 22, 819-826, 2009.
- 13) Murakami K, Nakanishi Y, Wakamatsu K,



- Yamamoto K, Kohriyama N, Hasegawa M, Tomita M, Nabeshita K, Hiki Y, Asano S, Kawashima S, Ito Y, Fujita Y, Asada H, Nakai S, Sugiyama S, Ito S: Serum levels of 5-S-cysteinyldopa are correlated with skin colors in hemodialysis patients but not in peritoneal dialysis patients. *Blood Purif* 28, 209-215, 2009.
- 14) Coelho SG, Choi W, Brenner M, Miyamura Y, Yamaguchi Y, Wolber R, Smuda C, Batzer J, Kolbe L, Ito S, Wakamatsu K, Zmudzka BZ, Beer JZ, Miller SA, Hearing VJ, Short- and long-term effects of UV radiation on the pigmentation of human skin. *J Invest Dermatol Symp Proc* 14, 32-35, 2009.
- 15) Vanover JC, Spry ML, Hamilton L, Wakamatsu K, Ito S, D' Orazio JA: Stem cell factor rescues tyrosinase expression and pigmentation in discrete anatomic locations in albino mice. *Pigment Cell Melanoma Res* 22, 827-838, 2009.
- 16) Lee E, Tanaka H, Wakamatsu K, Sugita S: Melanin-based iridescent feather color in the Jungle Crow. *J Vet Med Sci* 71, 1261-1263, 2009.
- 17) 神保孝一、高田知明、佐藤牧人、佐藤亜紀子、神谷崇文、小野一郎、山下利春、田村保明、佐藤昇志、宮本篤、若松一雅、伊藤祥輔、井藤彰、本多裕之、村瀬勝俊。メラノーマ形質を分子標的とした化学・温熱・免疫療法の基礎と臨床。 *Skin Cancer* 24, 174-180, 2009.
- 18) 新保寛、金児孝晃、千原猛、別府秀彦、新里昌功、若松一雅、園田茂。マウス大腸粘膜の細胞増殖能に対するアロエエモジン5週間混餌投与の影響。 *医学と生物*, 153, 218-224, 2009.
2. 学会発表
- 1) Wakamatsu K : Chemical structure of neuromelanin: an elucidation to the production process. 3rd Asian Society for Pigment Cell Research Meeting. Seoul, Korea, June 12, 2009
- 2) Ito S : Chemical and biochemical control of mixed melanogenesis. 3rd Asian Society for Pigment Cell Research Meeting. Seoul, Korea, June 11, 2009.
- 3) Osai Y : N-propionyl-cysteaminylp henol suppresses re-challenge of mouse B16F1 tumor by inducing tumor-specific immune response. 39th Annual Meeting of the European Society for Dermatological Research. Budapest, Hungary, September 9, 2009.
- 4) Murakami K, Wakamatsu K, Nakanishi Y, Yamamoto K, Kohriyama N, Hasegawa M, Tomita M, Nabeshita K, Hiki N, Asano S, Kawashima S, Ito Y, Fujita Y, Asada H, Nakai S, Sugiyama S, Ito S: Serum levels of 5-S-cysteinyldopa are correlated to pigmentation in patients undergoing hemodialysis. World Congress of Nephrology 2009. Milano, Italy, May 24, 2009.
- 5) 若松一雅、太田良和美、伊藤祥輔。フェオメラニン生成の後期過程の化学的分析。第22回日本色素細胞学会学術大会、福岡、12月5日、2009
- 6) 億田秀和、中村厚、若松一雅、伊藤祥輔、宗田孝之。5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid二量体の異性体判別：中赤外吸収スペクトル。第22回日本色素細胞学会学術大会、福岡、12月5日、2009
- 7) 箴井泰江、田村保明、佐藤昇志、若松一雅、伊藤祥輔、井藤彰、本多裕之、黄倉真恵、佐藤亜紀子、山下利春、神保孝一。N-propionyl-4-S-cysteaminylphenolはメラノーマ細胞にアポトーシスを誘導しマウスB16F1腫瘍の増殖を抑制する。第22回日本色素細胞学会学術大会、福岡、12月5日、2009
- 8) Jimbow K, Thomas PD, Osa Y, Takasa T, Sato M, Tamura Y, Ono I, Yamashita T, 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. 第22回日本色素細胞学会学術大会、福岡、12月5日、2009.

## E. 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

# 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

## 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

山下 利春 札幌医科大学皮膚科学講座 教授

### A. 研究目的

悪性黒色腫（メラノーマ）は転移しやすく、病期Ⅲメラノーマ（所属リンパ節転移のある場合）の45～60%に遠隔転移が生じ、遠隔転移を起こした進行期メラノーマの5年生存率は10%前後ときわめて予後が悪い。ランダム化比較試験により、全身療法としての多剤併用化学療法や生物化学療法はダカルバジン単剤に比べ生存期間を延長する効果のないことが報告された。しかし、多剤併用化学療法や生物化学療法に反応し5年以上生存する例が少数ながら存在する。メラノーマの予後決定因子として、宿主の腫瘍特異的細胞免疫応答の有無、制御性T細胞の存在、アポトーシス誘導性、MHCクラスI分子の発現などが考えられている。治療反応例における宿主因子と腫瘍因子の検討は、今後のメラノーマの治療効果と個別化治療を考える上できわめて重要である。

メラニン合成系を標的とする化合物は、全身副作用の少ないメラノーマ特異的な分子標的治療薬となり得る。N-propionyl-4-S-cysteaminyphenol(NPrCAP)はチロシナーゼの基質としてメラニン合成系に取り込まれ、メラノサイトやメラノーマ細胞に細胞障害を示す。これまでNPrCAPをマグネタイトに結合したナノ微粒子（NPrCAP/M）を用いて、①ヒトおよびマウスメラノーマ細胞は効率よくNPrCAP/Mを取り込み、②NPrCAP/M処理後磁場照射したメ

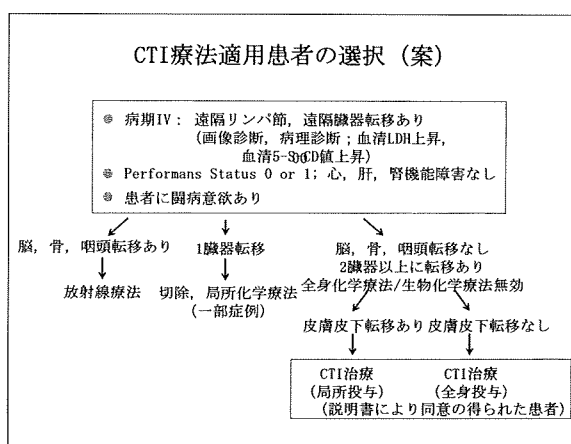
ラノーマ細胞はネクローシスを起こすことを報告した（Sato M et al: J Invest Dermatol, 2009）。

今年度は1）進行期メラノーマ患者46名における転移臓器の種類とNPrCAP-マグネタイトによる局所治療（Chemothermo-Immunotherapy, CTI療法）の適応となる皮膚・皮下転移の頻度を解析し、将来的に局所あるいは全身CTI療法の適用症例の選択（案）を作成した。また、2）NPrCAPのメラノーマ細胞特異的細胞障害性のメカニズムを解析するため、NPrCAP処理細胞におけるROS(reactive oxygen species)の発生とアポトーシス誘導性について検討した。

### B. 研究方法

#### 1) 行期メラノーマ患者の解析

札幌医大皮膚科で1995年1月～2009年12月の15年間に病期Ⅳ（進行期）メラノーマと診断さ



れた46例における転移臓器、全身状態、皮膚皮下転移のある症例をレトロスペクティブに解析した。樹状細胞ワクチン療法を行った2名の患者については、ペプチドワクチンに使用した腫瘍抗原とMHCクラスI分子の発現を切除組織の免疫染色により検討した。

## 2) NPrCAPによるROSの発生とアポトーシス誘導性の検討

NPrCAPはプロピレングリコールに溶解し、使用時に最終濃度1.0~3.0mMに調製した。細胞数はトリパンプルー法で算定した。アポトーシスの解析はフローサイトメトリー(FACS Calibur flowcytometer, Becton Dickinson)を用いた。細胞内ROSとカスパーゼ3は蛍光染色により検出した。NPrCAP添加培地で培養した細胞を、5-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydro-fluorescein diacetate, acetyl ester (CM-H2DCFDA, Invitrogen)で処理しパラホルムアルデヒド固定後、Rab pAb to Active Caspase 3 (Abcam, Cambridge)を2時間反応させ、2次抗体(Labeled Goat Anti-Rabbit IgG Antibodies)を加え12時間静置した。洗浄後1,000倍希釈したHoechst 33342 solutionを添加し15分反応させた後共焦点レーザー走査蛍光顕微鏡で観察した。

## C. 研究の結果および考察

### 1) 進行期メラノーマ患者の解析

当科で1995年1月~2009年12月の15年間に病期IVと診断された進行期メラノーマ46例の内訳は男性23名、女性23名で、病型は末端黒子型15例、結節型6例、表在拡大型2例、悪性黒子型2例、脈絡膜5例、外陰部・膣3例、直腸・肛門3例、原発不明3例、鼻腔1例、その他6例であった。病期II、IIIから進展した症例に加えて、初診時すでに遠隔転移のあった8例(原発不明メラノーマ3例を含む)が含まれる。遠隔転移出現まで0~11年7ヶ月(中央値13ヶ月)、遠隔転移出現から死亡まで2ヶ月~4年6ヶ月(中央値12ヶ月)であった。経過中に最初に診断

された転移臓器は肺と肝が多く、肺18例>肝8例>皮膚、リンパ節各4例>骨2例であった。経過中に皮膚・皮下転移がみられたのは8例(21.7%)で、NPrCAP-マグネタイトによる局所CTI療法の適応となる直径1cm以上(体積>1.0ml)の皮膚転移がみられたのは7例(15.2%)であった。さらに、皮膚・皮下転移出現時に全身状態がよく(performans status, PS:0か1)、肝・腎機能に問題なく、CTI治療が可能と思われる患者は7例中5例(46例の10.9%)であった。皮膚・皮下転移は全身転移に伴って出現する場合が多く、皮膚転移のみの症例は原発不明メラノーマの1例のみであった。以上より、進行期メラノーマにCTI療法を適応する場合、経静脈的に肺や肝にターゲティングする新しい剤型(次世代型NPrCAP-マグネタイト)が必要である。

進行期メラノーマに有効な治療法がないため、現在、診療現場では患者の年齢、生活および家族の状況、一般状態、転移臓器、闘病意欲などを考慮して多剤併用化学療法/生物化学療法、外科的治療、放射線治療、免疫療法が選択され集学的治療が行われている。放射線治療は全身副作用の少ない局所療法で咽頭、中枢神経、骨に転移がある場合の第一選択である。一臓器転移の場合、外科切除、局所化学療法(肝動注化学療法)が考慮される。これらの集学的治療を組み込んだCTI療法適用の選択(案)を示す(図1)。

### 2) NPrCAPによるROSの発生とアポトーシス誘導性の検討

NPrCAPはヒトメラノーマ細胞に細胞死を誘導し、マウス毛包メラノサイトにアポトーシスを誘導する。NPrCAPによる殺細胞効果を培養細胞を用いて検討した。NPrCAP1.0~3.0mMあるいはプロピレングリコール(陰性コントロール)添加培地で1時間培養し24時間後の生細胞数を計測した。NPrCAP処理群のB16F1マウスメラノーマ細胞の生細胞数は、コントロールに比べ51.6%(NPrCAP 1mM)~55.0%

(NPrCAP3mM)に低下した。一方、マウス線維芽細胞NIH3T3ではNPrCAP添加による有意差は見られなかった。フローサイトメトリー解析により、NPrCAP添加培地で培養したB16F1細胞はアポトーシス誘導能をもつTRAIL(TNF Related Apoptosis Inducing Ligand)処理と同レベルのsub-G1分画の増加を示した。一方、NIH3T3細胞のsub-G1分画に変化はみられなかった。以上より、NPrCAPはマウスメラノーマ細胞に特異的に作用しアポトーシスを誘導することが示された。

NPrCAPに伴う細胞内ROSの増加とカスパーゼ3の活性化の有無を蛍光顕微鏡により検討した。NPrCAPを添加したB16F1細胞では、約半数の核に濃縮と凹凸分岐を認め、細胞内ROSの増加およびカスパーゼ3の活性化を認めた。一方、溶媒（ポリプレングリコール）添加B16F1細胞、NPrCAPあるいは溶媒添加NIH3T3細胞ではアポトーシス細胞は観察されず、また、活性酸素の増加および活性化カスパーゼ3も検出されなかった。以上より、NPrCAPはメラノーマ細胞に特異的にアポトーシスを誘導し、アポトーシス過程にROSが関与することが示唆された(Osai Y *et al*: manuscript in preparation)。NPrCAPによる細胞障害はROSを介するアポトーシスであることが示唆されたが、血管内投与によるメラノーマ転移へのターゲッティングを考える場合、血液細胞、血管内皮細胞、免疫担当細胞に対する細胞障害性の有無と程度を検討する必要がある。

## E. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Toyota M, Suzuki H, Yamashita T, Hirata K, Imai K, Tokino T, Shinomura Y: Cancer epigenomics: implications of DNA methylation in personalized cancer therapy. *Cancer Sci* 100: 787-791, 2009.
- 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: 210-212, 2009.

- 3) Yamashita T, Yoneta A, Hida T: Macrophage inhibitory cytokine-1 : a new player in melanoma development. *J Invest Dermatol* 129: 262-264, 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-Cysteaminylphenol-Magnetite Conjugate (NPrCAP/M) Is a Nanoparticle for the Targeted Growth Suppression of Melanoma Cells. *J Invest Dermatol* 129: 2233-2241, 2009.
- 5) Kamiya, T, Okabayashi T, Yokota S, Kan Y, Ogino J, Yamashita T, Fujii N, Jimbow K: Increased caspase-2 activity is associated with induction of apoptosis in IFN- $\beta$  sensitive melanoma cell lines. *J. Interferon Cytokine Res*, 2009 (in press).

## F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

# 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

## TILの病理組織学的解析およびTCRレパートリー解析

井藤 彰 九州大学 工学研究院 准教授

### A. 研究目的

我々はこれまでに、CTI療法において誘導される腫瘍免疫においては、マグネタイトの発熱に伴う温熱療法とNPrCAPによる化学療法の併用により誘導される細胞壊死に伴うHeat Shock Protein (HSP)70-抗原ペプチド複合体の放出が重要な役割を担うことを証明した。本研究では、CTI療法で誘導される免疫機構の解析をさらに進めるためにCTI療法で活性化される細胞障害性T細胞 (cytotoxic T lymphocyte, CTL) の解析に関する検討を行う。CTI療法後におけるCTLの質的あるいは量的変化が確認できれば、CTI療法の臨床的なインパクトはさらに高まる。また、CTI療法で誘導されるメラノーマ特異的CTLのTCR遺伝子をクローニングすることができれば、将来的に患者の末梢血由来のT細胞へのTCR遺伝子導入による遺伝子治療への展開が可能となり、CTI療法の免疫賦活効果を増幅する併用療法になりえる (図1)。

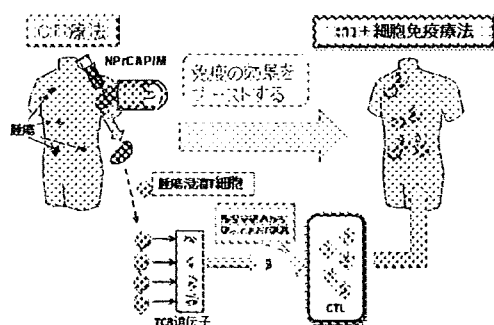


図1 研究戦略

本年度は、申請書の研究計画に基づいて、B16メラノーマ担癌マウスを用いた実験系で、CTI療法後のTILの質的解析 (T細胞レセプターのレパートワ解析) および量的解析 (フローサイトメトリーによる細胞数計測) を行った。

### B. 研究方法

この研究における動物実験は、九州大学工学研究院動物実験委員会の承認を受けて行った (承認番号A20-038-2「がん温熱療法における腫瘍免疫機構の解析と新しい治療法の開発」)。

NPrCAP結合型マグネタイト (NPrCAP/M) を用いたCTI療法

マウスメラノーマ細胞株B16F1細胞 ( $3 \times 10^5$ ) をC57/BL6マウスの皮下に移植し、腫瘍長径が5 mmになったらday 0とし、NPrCAP/M (40 mg/ml, 0.1 ml) を腫瘍内に注入し、高周波磁場照射 (120kHz, 386Oe) を行った。磁場照射時間は1日1回43°C、30分で行った。この一連の操作を1日置きに3回行った。治療後、マウスの腫瘍径を経時的に測定した。day 6、9、14に腫瘍を切除して、ホルマリン固定し、ヘマトキシリン&エオジン (HE) 染色および抗CD8抗体染色による免疫組織学的解析を行った。

腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) の解析

TILの量的な解析は、抗CD8抗体を用いた磁気分離 (MACS) によって精製し、フローサイト

メトリーによって行った。腫瘍を1 mm以下になるまで切断した後、40%/80%パーコールを用いて密度比重遠心分離を行い、リンパ球画分を採取した。その後、MACS（ミルテニーバイオテック社）のプロトコールに従って、磁気分離を行った。磁気分離後の細胞にPE標識抗CD8抗体とPIの二重染色を行い、フローサイトメーター（BD社）を用いて、解析を行った。

TILのT細胞レセプター（TCR）解析は、BioMed Immunotech社のキットを用いて、プロトコールにしたがって行った。

### 所属リンパ節からのCD8陽性T細胞の単離

ネブタールで麻酔したマウスフットパッドからエヴァンスブルー染色液を注射し、所属リンパ節である膝下および鼠径リンパ節を染色して、リンパ節を摘出した。摘出したリンパ節から、MACSを用いてCD8陽性T細胞を単離し、その精製度を抗CD8抗体および抗CD4抗体を用いて蛍光染色することで測定した。

### フットパッドに移植したB16メラノーマのCTI療法

マウスフットパッドにB16F1細胞（ $3 \times 10^5$ ）を移植し、腫瘍径が5 mm程度になったら40mg/mlのNPrCAP/Mを0.025 ml注射し、高周波磁場照射（120 kHz, 386 Oe）を行った。

## C. 研究結果

CTI療法で誘導されるメラノーマ特異的CTLの解析については、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の病理学的検証およびTCR解析における質的变化の検証を行った。

メラノーマ担癌マウスにNPrCAP/Mを注入後、磁場照射を行うことで、腫瘍表面温度が上昇し、5分間で43℃に到達した（図2）。この温

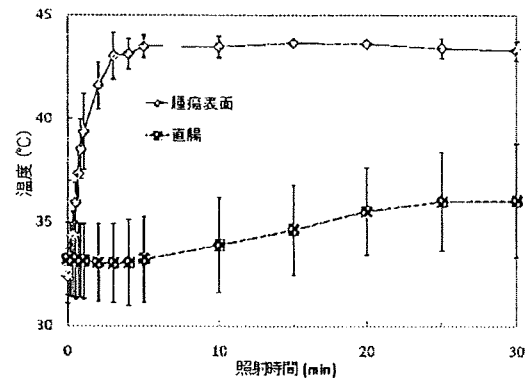


図2 磁場照射中の腫瘍表面および直腸温度変化

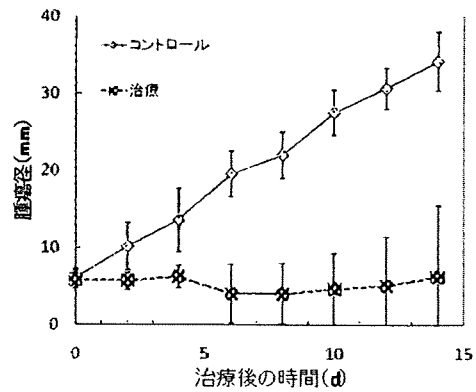


図3 腫瘍径の経時変化

度は我々の今までの検討で、CTI療法の免疫を最も賦活する加温温度であることが分かっている。一方で、直腸温度はほとんど上昇しなかったことから、NPrCAP/Mを用いたCTI療法は腫瘍特異的加温が可能であると考えられる。

CTI療法後の腫瘍径の経時変化を図3に示す。治療を行っていないコントロールのマウスは腫瘍サイズが増大していった。一方、治療を行ったマウスでは腫瘍の成長が著しく抑えられ、5匹中2匹のマウスでは完全に消失した。これらの結果から、比較的小さい腫瘍であれば温熱治療とNPrCAPの化学療法の併用だけで癌を完治させる程の治療効果があるといえる。温熱療法は、温度が高ければ高いほど、加温時間が長ければ長いほど、治療効果が高まることから、より高温・長時間加温での治療によって、腫瘍の完全退縮が期待されるが、本研究においては、TILの解析が目的であるため、全ての腫瘍が完

全退縮しない条件に設定した。また、本研究の加温条件では、治療後2週間に渡って腫瘍の成長が抑えられたということから、温熱治療により免疫が賦活された結果、腫瘍の成長が抑えられたと推測される。このことから、温熱治療によって腫瘍が完治し、以後も腫瘍が再増殖することがなかったマウスに対して腫瘍の再移植実験を行った。移植は原発癌の移植時と同じ細胞数で行ったが、腫瘍が生着することはなかった。この結果から、温熱治療によってB16F1細胞に対する免疫が獲得されたと考えられる。

CTI療法を行ったマウスにおいて、day 6、9、14で腫瘍を切除してHE染色を行った。結果として、day 6で切除した腫瘍切片ではリンパ球の浸潤は観察できなかったが、day 9 (図4) および day 14で切除した腫瘍においてはリンパ球がわずかに集まってきているのが観察できた。さらに、抗CD8抗体を用いた免疫組織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った。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、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陽性細胞を約95%に精製可能な状態に調製するプロトコルを確立した (図5)。

さらに、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ところ、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PCRによる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る。

この結果を受けて、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なCTLが生まれるかどうかを解析する方針とした。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、CD8陽性T細胞の精製およびTCR遺伝子の増幅によるTCRレパトワ解析を行うこととした。

まず、ナイーブマウスのフットパッドにエヴ

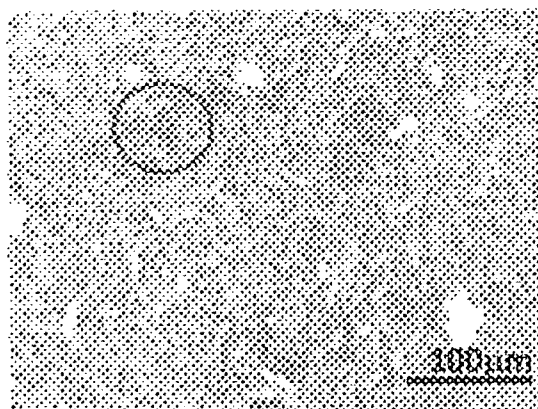


図4 腫瘍浸潤リンパ球。代表的な箇所を丸で囲んだ。

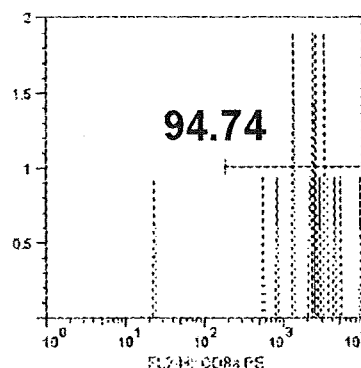


図5 腫瘍浸潤CD8陽性T細胞の精製。



ァンスブルー染色液を投与後、鼠径および膝窩リンパ節を観察したところ、青色に染色されていた。それを目印に鼠径および膝窩リンパ節を摘出し、抗CD8抗体を用いたMACSでCD8陽性T細胞を単離し、フローサイトメトリーで解析したところ、MACS精製前では26%のCD8陽性T細胞をMACS精製によって86%に精製することに成功した(図6)。さらにMACSの溶出回数を多くすることで、現在、90%以上の精製度を達成することに成功している。また、腫瘍浸潤リンパ球と異なり、所属リンパ節からは大量のCD8陽性T細胞を採取することができた。

一方、マウスフットパッド腫瘍に対するCTI療法の検討を行った。B16担癌マウスの腫瘍にNPrCAP/Mを投与して、交番磁場照射を行ったところ、腫瘍表面で速やかに温度上昇が得られ、43℃以上を達成した(図7)。さらに、磁場装置の出力を調節することで、容易に目的温度である43℃に調節することが可能だった。これらの

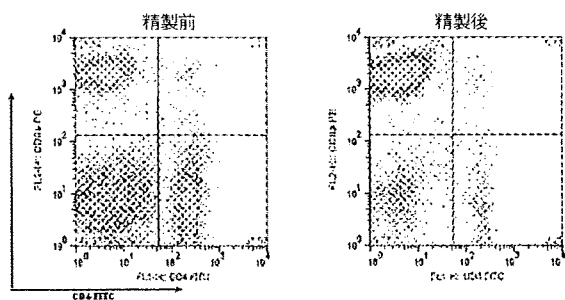


図6 MACSによるCD8陽性T細胞の精製

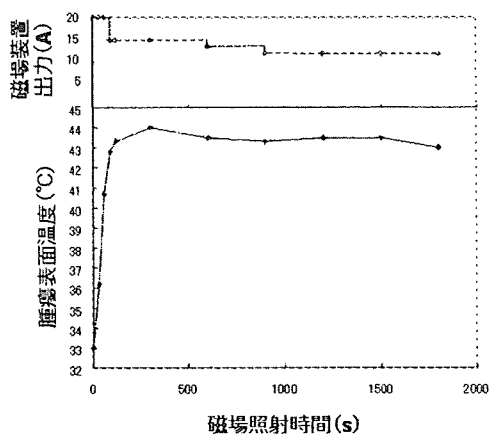


図7 磁場照射中のフットパッド腫瘍の表面温度変化

結果から、フットパッドを用いた実験系はCTIにより誘導されるCTL解析に有用であると考えられる。今後、この系を用いて、CTIによって誘導されたCTLのクローニングおよびTCRレパトワ解析を行っていく予定である。

## D. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 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 Biotech 2009:457936, 2009.
- 2) Sato M, Yamashita T, Ohkura M, Sato A, Takada T, Matsusaka H, Ono I, Tamura Y, Sato N, Sasaki Y, Tokino T, Ito A, Honda H, Wakamatsu K, Ito S, Jimbow K, N-Propionyl-Cysteaminylphenol-Magnetite conjugate (NPrCAP/M) Is a Novel Nanoparticle for the Targeted Growth Suppression of Melanoma Cells. J Invest Dermatol 129(9): 2233-2241, 2009.

### 2. 学会発表

- 1) Ito A, Hyperthermia using functional magnetite nanoparticles. BioEM2009, (Davos, Switzerland), June 14-19, 2009.
- 2) Ito A, Hyperthermia using magnetite nanoparticles. The 2nd Pusan National Univ. - Global COE Kyushu Univ. Joint Symposium on Molecular Science and Technology, (Busan, Korea), December 10-12, 2009.

## E. 地的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

# 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

## 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2症例の経過

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

本年度は、Chemo-Thermo-Immuno（CTI）治療により治療し、治療開始後2年以上生存している2症例の経過について報告する。すでに報告した完全なシールドが達成されたCTI治療室で、治療手順に従い、札幌医科大学臨床研究審査委員会の認可の下、自主臨床兼研究として臨床例での治療を開始させ、CTI治療ので2例の臨床例の治療した結果、その有効性を確認できた。本報告は世界で初めてのメラノーマに対するnano particle magnetiteを用いた臨床治療の有効と考えられる2症例の経過を示した物である

症例1：77歳女性：2006年7月11日初診。左第1趾の悪性黒色腫。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。その後、2007年3月28日から2009年7月3日までに4回のCTI治療を行った。左下腿腫瘍切除し、現在まで経過観察中。左大腿部の皮下腫瘍は大きさが著変無く、多部位の皮下転移巣も縮小し、CTI治療の効果が明らかである。

症例2：69歳男性：2006年6月14日初診。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、左乳房見た。さらにCTI治療を4月11日から開始した。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単径部のリンパ節転移巣、背部の皮膚転移巣に4回のCTI治療を行い現在経過観察中。治療開始後2年目では皮膚の腫瘍の大きさの変化は無い。

このように2症例とも皮膚転移巣の増大は阻止できている物の、完全な消失は得られず今後の治療法の改善が待たれる。

## A. 研究目的

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療において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 (NPrCAP/マグネタイト) に含有される磁性体である鉄が発生する熱により治療を行う小型動物を治療するのは全く異なり、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迫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、札幌医科大学附属病院皮膚科外来に施工した治療室内で治療を行った。また、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、改造を実施すること、並びにそれらを用いて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し、札幌医科大学臨床研究審査委員会の認可の下、自主臨床兼研究として臨床例の治療を行った。治療に当たっては腫瘍内温度と治療部位の皮膚温をモニターしながら1回の治療は30分間行った。その際、腫瘍内温度は45度前後となるように設定し、48度以上にはならないように調整しながら治療を行った。治療は1クール隔日の3回腫瘍内の薬剤投与と投与翌日の磁場治療を3回繰り返して行った。治療腫瘍は治療後3週間目前後に切除することを前提として治療を行った。

## B. 研究方法

### 治療効果の判定

超音波診断装置 (Philips HDI 5000 System) から画像dataをカラーBMP形式でCD経由でpersonal computer (Apple Mac-Book Pro) へ移植する。次いでPhotoshopでモノクロJPG dataへ変換保存。計測用software (ImageJ) により、

距離を測定し、以下の公式で体積は長軸X単軸X厚さX3/4X $\pi$ で概算した。

## C. 研究結果

症例1：77歳女性：2006年7月11日初診。左第1趾の悪性黒色腫。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、さらに同部に悪性黒色腫の再発を見た。

そのためCTI治療を2007年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NPrCAP/マグネタイト溶液0.5ml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 (2007年4月11日) に治療腫瘍を近接部の小皮膚転移巣とともに切除した。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



図1a：症例1：治療前。