

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。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。再びin-transit転移の増大を認め、2008年1月15日から左鼠径部リンパ節転移を標的にして3クール目のCTI療法を施行し、2008年2月14日に左鼠径部リンパ節郭清を施行した。再びin-transit転移巣の増大を認めたため2008年6月11日から4クール目のCTI治療を行った。その後、2009年7月3日に左下腿腫瘍切除し、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は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、左の鼠径部には2個のリンパ節転移巣を、さらに左乳房見た。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。

治療に当たってはNPrCAP/マグネタイト溶液0.5ml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43度に30分間維持した。所定のCTI治療後、15日目（4月26日）に治療腫瘍を切除した。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メラノーマ転移巣は治療後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、左乳房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CD8陽性のCTLと考えられるリンパ球が多数観察された。

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(鼠径リンパ節転移)の再増殖を認めたために左鼠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



図1b：症例1：治療後3年目の臨床写真。

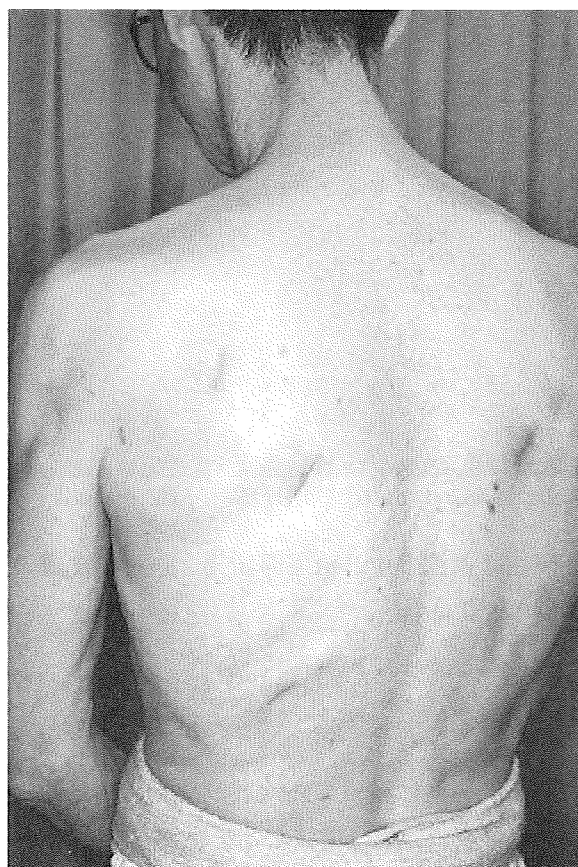


図2a：症例2：治療前。

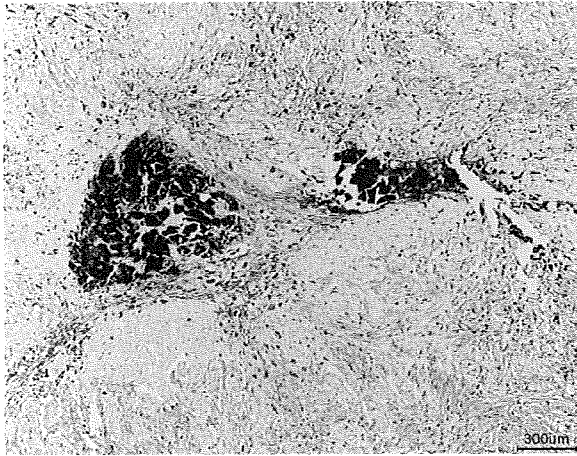


図 2 b : 治療腫瘍のCD8染色像。



図 2 c : 症例 2 : 治療後 2 年目の臨床写真。

い現在経過観察中。治療開始後 2 年目で皮膚の腫瘍の変化は無い。

D. 考察

メラノーマ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。

い。我々はメラノーマに対する新規治療である化学・温熱・免疫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。本治療ではメラノーマ細胞に対して選択的に取り込まれるNPrCAP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 nano particle magnetite 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。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。動物実験による検討の結果、NPrCAP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 magnetite 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が再移植したメラノーマ腫瘍を拒絶することを確認した。その検討結果を踏まえ、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。

すでに報告したように治療環境が整備されたことを受けて治療手順を作成し、それに従って臨床研究を開始した。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内 (core) および腫瘍表面 (surface) の温度モニター下の磁場治療が有効である事も改めて明らかとなった。検討の結果では腫瘍内温度を45度ないし46度とすることがCTI治療の効果を発現させるために必須であると考えられる。また、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は必須である事が明らかとなった。さらに超音波診断装置、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治療効果の判定・解析が可能となった。現在、既に4症例を治療し、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た2症例の詳細をこのたび報告した。これらの症例ではともに腫瘍の増大を抑制しているので、CTI治療はメラノーマに対する新規治療法として期待される。ただし、複数回の治療が必要なことと全ての転移腫瘍の完全な消失を認めることができていない点、臓器転移を完全に制御できていない症例もあり、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ルの設定と治療手法の完成を目指したい。

E. 結論

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した。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治療の有効性を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が、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。

謝辞

本研究に遂行にあたっては札幌医科大学皮膚科神谷崇文先生の協力が無ければ成果を上げる

ことは不可能でありました。心からの深甚なる感謝の意を表します。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 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.

2. 学会発表

- 1) 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.

G. 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（医療機器開発推進研究事業） 分担研究年度終了報告書

CTI療法の化学療法効果、免疫療法効果の比較検討

田村 保明 札幌医科大学医学部病理学第1講座 講師

A. 研究目的

現在のCTI療法によって誘導された抗メラノーマ腫瘍免疫応答を、長期間維持するために、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、皮下移植マウスメラノーマ腫瘍に対する、磁性ナノ粒子を含まないNPrCAPの全身性投与による抗腫瘍効果を検討する。さらに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の全身投与による転移性腫瘍に対する薬剤ターゲティング効果および抗腫瘍効果についても検討を行う。またNPrCAP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を投与することによるメラノサイト細胞死による免疫応答、すなわちチロシナーゼ、gp100, TRP-2をはじめとするメラノーマ分化抗原に対する免疫応答誘導がなされているかの検討も併せて行う。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療法後の免疫誘導による再発予防の可能性を示唆する。

B. 研究方法

1. NPrCAP全身性投与による抗腫瘍効果と腫瘍免疫誘導の機序

B16-OVAおよびB16F1メラノーマ担癌マウス

を用いてNPrCAPの全身性投与（腹腔内投与および静脈内投与）を行い、腫瘍増殖に与える効果を検討する。また抗腫瘍効果の見られたマウスを用いて、メラノーマ特異的細胞傷害性T細胞誘導、抗メラノーマ抗体の誘導を検討する。特にメラノーマ分化抗原のどれに対する免疫反応が誘導されているのか、明らかにすることでヒトの臨床試験の基礎とする。これらは、⁵¹Crを用いた細胞障害試験、ELLISPOT, ELISAを用いて検討する。

2. NPrCAPと樹状細胞の腫瘍内投与による抗腫瘍効果の検討

NPrCAPと樹状細胞併用腫瘍内投与による抗腫瘍効果の増強と免疫誘導効果の比較検討を行う。

3. 転移性メラノーマに対するNPrCAP単独投与の検討

B16F10を用いて肺転移の系を作製し、NPrCAPの静脈内投与および腹腔内投与による体内分布、安全性および抗腫瘍効果を検討する。最適な投与ルート、回数を明らかにする。

4. NPrCAP投与によるメラノサイト傷害を利用した抗メラノーマ免疫応答誘導

ナイーブマウスにNPrCAP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を⁵¹Crを用いた細胞障害試験、ELLISPOTを用いて検討

する。このマウスにおける抗腫瘍効果を検討する。

5. CTI療法と治療後のNPrCAP単独投与による進行メラノーマのコントロールの検討

上記の検討結果をふまえ、皮膚転移、肺転移の全身転移を有するマウスモデルに対する治療効果を検討する。具体的には以下のマウスモデルを用いて比較検討し、ヒトの病態を反映する治療系を確立する。

1. 皮膚転移メラノーマに対するCTI治療による同時肺転移に対する効果の検討
2. 皮膚転移メラノーマに対するCTI治療とNPrCAP全身投与(静脈内)による同時肺転移に対する効果の検討

C. 研究結果

1. NPrCAP投与によるメラノーマに対する抗腫瘍免疫応答の誘導

NPrCAPを腹腔内に投与したマウスの約80%において皮膚白斑と体毛の白色化が認められた。非常に興味深いことに、これらのマウスにB16F1メラノーマを接種すると、ほぼ前例で腫瘍増殖の抑制効果を認めた(図1)。この事実はNPrCAP投与により正常メラノサイトのアポトーシスを誘導し、これによってB16F1メラノーマに対する抗腫瘍免疫応答が誘導されたものと考えられる。実際、NPrCAP投与によりメラノ

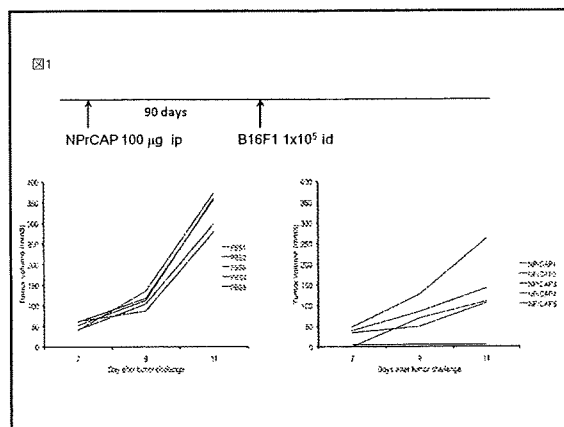


図1

ーマを拒絶したマウスでは、脾細胞からB16F1メラノーマ細胞特異的細胞障害性T細胞(CTL)が誘導することが可能であった。このように、NPrCAP全身投与により、メラノーマに対する抗腫瘍免疫が誘導されることが明らかになり、今後メラノーマの再発予防はもちろん、NPrCAPのメラノーマ細胞傷害による全身性転移に対しての治療効果が期待される。現在この誘導されたメラノーマ特異的免疫応答が、どのメラノーマ抗原に向かっているのか検討を行っている。

2. NPrCAP腹腔内投与による皮下移植メラノーマに対する抗腫瘍効果

あらかじめマウスメラノーマB16F1を皮下に樹立したマウスに対して、NPrCAPを100 μ g腹腔内投与を合計2回行って、腫瘍増殖に与える効果を検討した。NPrCAP腹腔内投与により明らかなB16F1メラノーマの腫瘍増殖抑制効果を認めた(図2、3)。また生存日数の著明な延長を認めた(図4)。この事実は、腹腔内に投与されたNPrCAPが皮下のメラノーマに標的され、メラノーマの増殖抑制をもたらしたものと考えられる。

3. NPrCAP静脈内投与による皮下移植メラノーマに対する抗腫瘍効果

あらかじめマウスメラノーマB16F1を皮下に樹立したマウスに対して、NPrCAPを100 μ g静

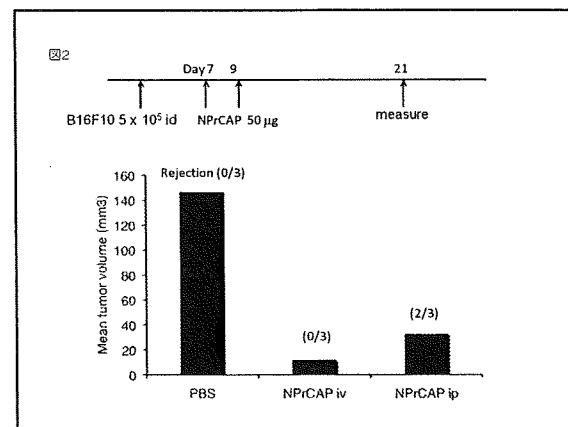


図2

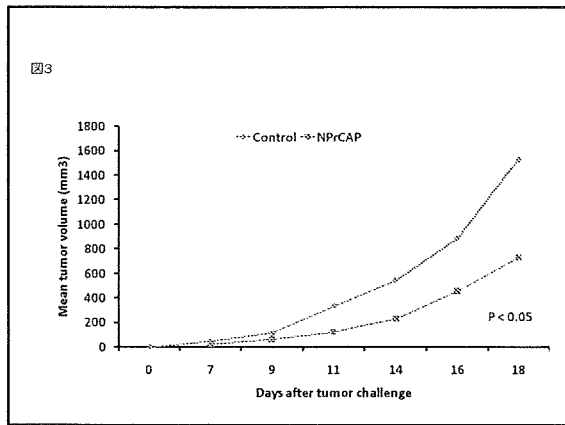


図3

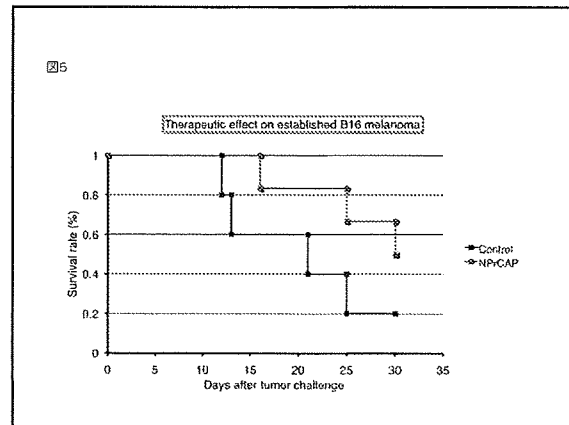


図5

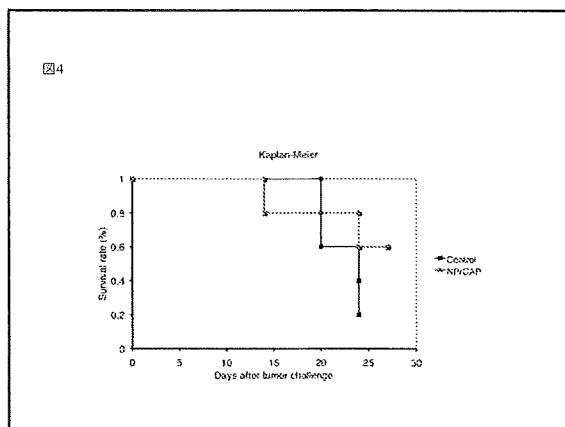


図4

脈内投与を合計2回行って、腫瘍増殖に与える効果を検討した。NPrCAP腹腔内投与により明らかなB16F1メラノーマの腫瘍増殖抑制効果を認めた。また生存日数の著明な延長を認めた(図2、5)。

4. 結果のまとめ

NPrCAP投与により、メラノーマの増殖抑制が認められた。一部のマウスでは、腫瘍の完全退縮も観察された。これらのマウスでは、B16F1細胞に対する細胞障害性T細胞の誘導が示された。このようにNPrCAPは、自身の有する酸化ストレスによる細胞障害活性に加えて、メラノーマ抗原に対するT細胞応答を誘導することによって、抗腫瘍効果を示すことが考えられた。今後、この免疫応答がどのメラノーマ抗原に向かっているのかをELISPOTアッセイなどを

用いて明らかにし、CTI治療後の追加ワクチンの可能性を検討する予定である。

D. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Okuya K, Tamura Y, Saito K, Kutomi G, Torigoe T, Hirata K, Sato N: Spatiotemporal regulation of heat shock protein 90-chaperoned self-DNA and CpG-oligodeoxynucleotide for type-I interferon induction via targeting to static early endosome. J Immunol. 2010, in press
- 2) Kutomi G, Tamura Y, Okuya K, Yamamoto T, Hirohashi Y, Kamiguchi K, Oura J, Saito K, Torigoe T, Ogawa S, Hirata K, Sato N: Targeting to Static Endosome is Required for Efficient Cross-Presentation of ER-resident Oxygen Regulated Protein 150-Peptide Complexes. J Immunol 183, 5861-5869, 2009.
- 3) Inoda S, Hirohashi Y, Torigoe T, Nakatsugawa M, Kiriya K, Nakazawa E, Harada K, Takasu H, Tamura Y, Kamiguchi K, Asanuma H, Tsuruma T, Terui T, Ishitani K, Ohmura T, Wang Q, Greene MI, Hasegawa T, Hirata K, Sato N: Cep55/c10orf3, a tumor antigen derived from a centrosome residing protein in breast carcinoma. J Immunother 32, 474-85,

2009.

- 4) Nakatsugawa M, Hirohashi Y, Torigoe T, Asanuma H, Takahashi A, Inoda S, Kiriyama K, Nakazawa E, Harada K, Takasu H, Tamura Y, Kamiguchi K, Shijubo N, Honda R, Nomura N, Hasegawa T, Takahashi H, Sato N: Novel spliced form of a lens protein as a novel lung cancer antigen, Lentsin splicing varinan 4. Cancer Science 100, 1485-93, 2009.
- 5) Kobayashi J, Hirohashi Y, Torigoe T, Michifuri Y, Yamamoto T, Tamura Y, Kamiguchi L, Miyazaki A, Yamaguchi A, Hariu, H, Hiratsuka H, Sato N: Clonal diversity of cytotoxic T lymphocytes that recognize autologous oral squamous cell carcinoma. Hum Immunol 70, 89-95, 2009.
- 6) Sugawara T, Torigoe T, Tamura Y, Kamiguchi K, Nemoto K, Oguro H, Sato N: Polyamine compound deoxyspergualin inhibits heat shock protein-induced activation of immature dendritic cells. Cell Stress chaperones 14,133-139, 2009.

2. 学会発表

- 1) 日本癌学会international symposium, Targeting "immune" -competent endosome by heat shock proteins (HSPs) for enhancing cancer immunotherapeutic potential, 2009,10月、横浜
- 2) 国際ストレス応答学会、Development of HSP-based cancer vaccine and its mechanism, 2009, 11月、札幌

E. 地的財産権の出願・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

CTI療法の化学療法効果、免疫療法効果の比較検討

米田 明弘 札幌医科大学皮膚科学講座 助教

A. 研究目的

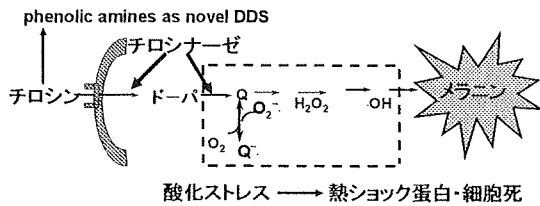
我々は新規メラノーマ治療法を開発すべく平成17年度より3年間厚生労働省科学研究・医療機器開発推進研究事業（ナノメディシン）の補助下、医・工・化学連携によりナノ微粒子薬剤開発と磁場発生機器・治療施設の改良と化学・

温熱・免疫「CTI (chemo-thermo-immuno)」療法の開発を行っている（図1、2）。基礎的動物実験の結果（図3、4、5）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、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6、7）。現在まで4症例がエントリーされ、

【今までの研究経過】

メラノジェネシス標的ナノ微粒子(NPrCAP/M)による 化学温熱免疫療法の開発

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

図1 a

戦略1

特異的DDSと細胞障害

- メラニン形成はメラノサイトに特異的細胞代謝であり癌化(メラノーマ)と共に異常に亢進
- メラニン形成酵素チロシナーゼの基質は細胞表面のレセプターを介し、メラノーマ細胞に特異的に取り込まれ、蓄積
- チロシナーゼと基質は酸化・還元反応を行うに際し、細胞障害性フリーラジカルを産生させ化学療法効果を発現

図1 b

CTI (化学・温熱・免疫)療法の治療戦略

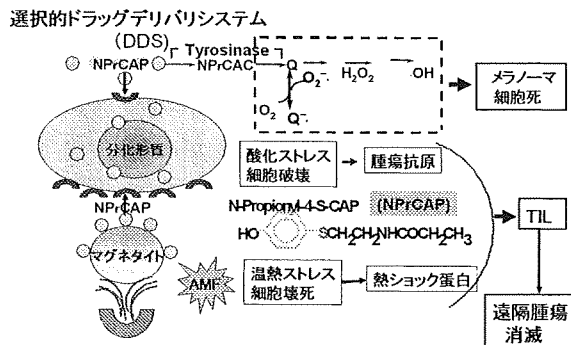


図2 a

戦略2

温熱細胞障害と細胞性免疫

- マグネタイト微粒子は細胞質内・小器官に容易に取り込まれ磁場照射により温熱細胞障害を惹起
- 温熱細胞障害は熱ショック蛋白(HSP)を介し、細胞性免疫を惹起
- メラニン形成基質・マグネタイト複合体はメラニン形成顆粒メラノソームに蓄積し、磁場照射により熱変性を起こし、メラノソーム関連蛋白・HSPを介した腫瘍免疫を発現

図2 b

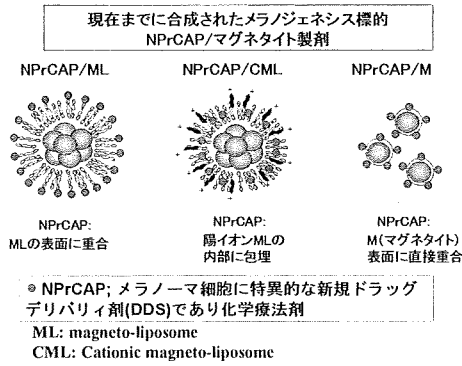


図 3

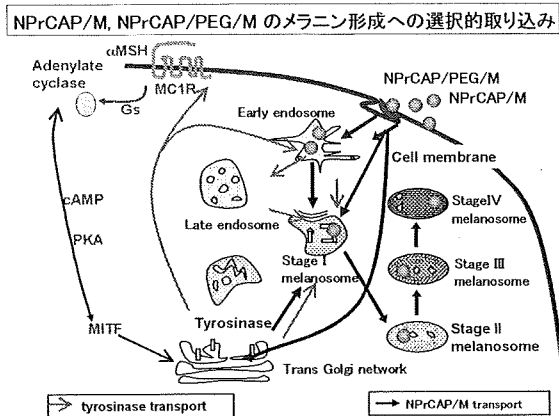


図 4 a

NPrCAP/M のメラノーマ細胞への選択的取り込み

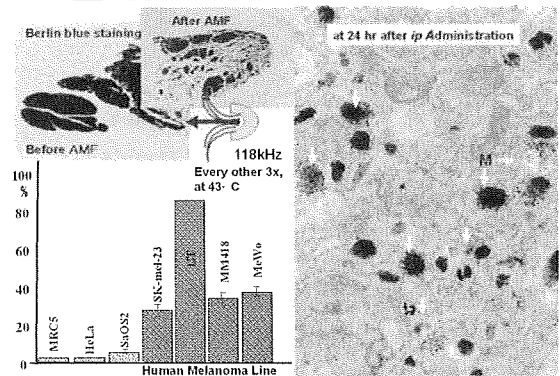


図 4 b

電子顕微鏡下でNPrCAP/Mは、メラノソーム中に取り込まれている事を確認 (白色矢印)。

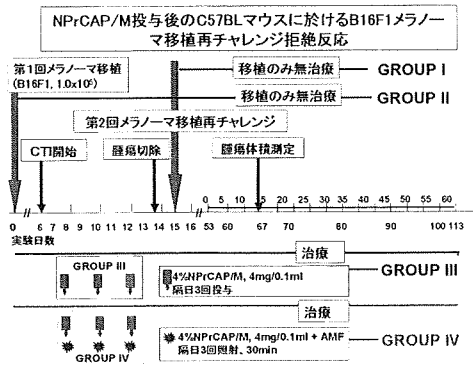


図 5 a

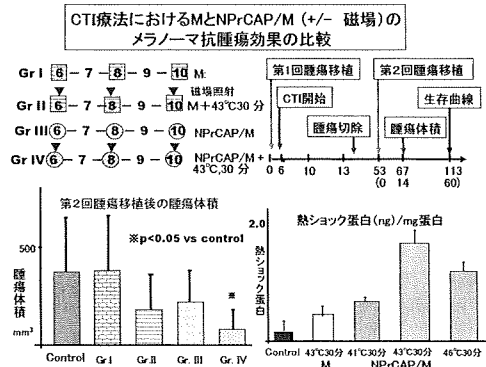


図 5 b

磁場照射の無いNPrCAP/M単独と磁場照射マグネタイト (M) とは同一の抗腫瘍効果 (再移植メラノーマ拒絶反応) がある

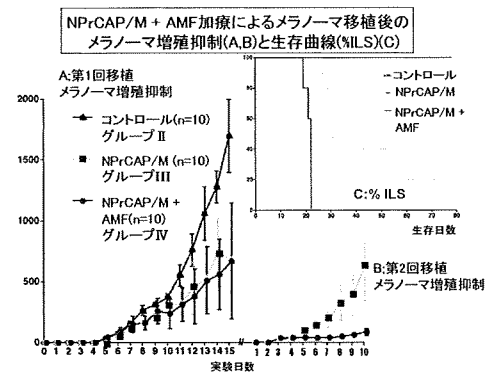


図 5 c

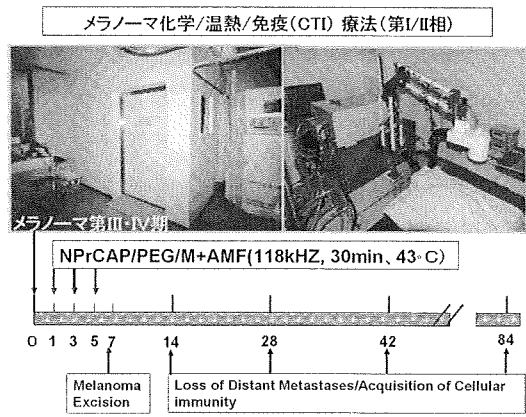


図 6 a

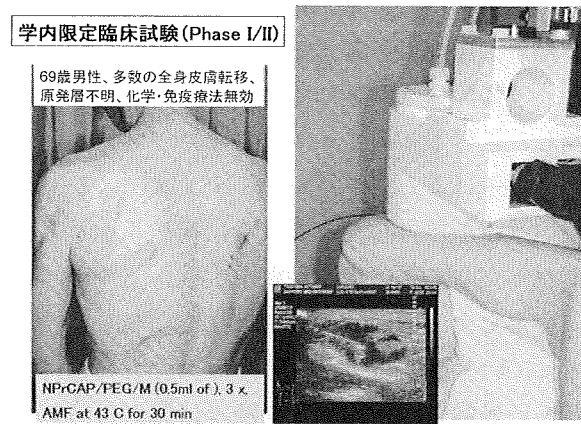


図 6 b

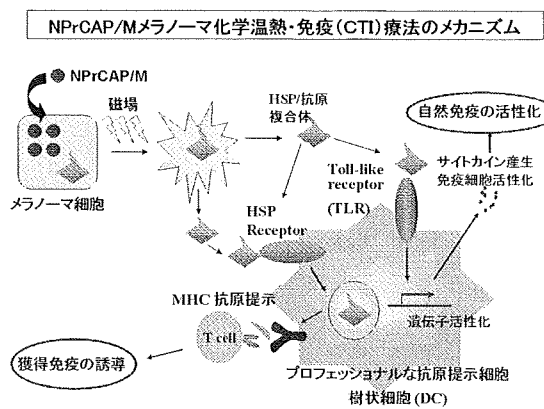


図 7 a

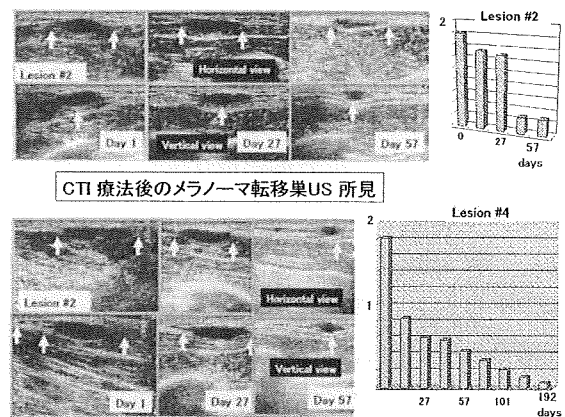


図 7 b

症例 1 の CTI 療法後の遠隔転移巣が消失。同様の所見は他の評価病巣でも認められた。

うち 2 例は CTI 療法後、全身皮膚・リンパ節転移巣が完全・部分消失し 20 ヶ月以上、日常生活に復帰している。

我々は 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。本申請は次世代型メラノーマ療法を確立するために必要な①全身投与が可能な新規薬剤と②次世代型化学・温熱・免疫 (CTI) 療法を開発する。

具体的には (1) 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) を基礎とし全身投与が可能な新規薬剤を開発し (H21、22年)、安定した

GMP 製剤の大量合成法を確立する (H23年)。(2) 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。

本研究では現行の局所腫瘍内製剤からデリバリー性と高拡散性を向上させた新規製剤を開発し、本製剤による血中投与 (全身投与) が効果的に行なわれる事を目的とする。結果として治療対象症例が大幅に拡大し、同時にその簡便性は患者・術者の負担を大幅に改善させ、多施設が並行して加療を行うことが可能となり、国内のみならず海外での臨床応用への早期普及に貢献できる。

過去 3 年間の厚労省ナノメディシン研究事業

に参加する事により、化学・温熱・免疫という3種の治療効果を有することを動物実験で証明し、予備的臨床試験にて本治療法の有効性を確認し、世界で初めてメラノジェネシス標的磁性ナノ粒子によるメラノーマ・ナノメディシン開発の糸口を報告した。これら研究成果をフィードバックして更に治療対象を広げ、実際の治療に応用しえる第二世代型治療法を開発し、発展させていく事は、ナノメディシン分野における新しい先端医療を開発した我々研究グループの使命であり、社会への責任である。

我々は新規癌治療法の開発に際して個々の癌種に特異的な形質発現を標的として利用し、治療効果のある成分を特異的形質代謝系に積極的に取り込ませ、癌組織を選択的に破壊し、さらにそれを介して最後の癌治療法といわれている癌免疫治療法を設計するという理念を考えた。従い、我々の開発する薬剤は、メラノーマと同様のチロシン・酸化還元酵素反応を有し、現在有効な治療法がない他の悪性腫瘍（神経冠由来の褐色色素細胞種、神経芽細胞腫等）の新規治療法開発にも応用しえる。

B. 研究方法

1. 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

新規薬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。

2. 新規NPrCAP/PEG/DNMの腫瘍治療効果・ 安全性の検討

新規薬剤の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する。我々の過去の動物を用いた研究方法はすでに確立されているので、既存薬剤（NPrCAP/PEG/M、NPrCAP/M）新規開発薬剤（NPrCAP/PEG/DNM）と比較した有効性について検討する。具体的には、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、同様に新規薬剤の安全性についても平行して検討する。

C. 研究結果

1. 新規薬剤NPrCAP/PEG/DNM の体内動態 分布および腫瘍親和性を検討する。マウス の背部にメラノーマ細胞株（B16F1）移植

腹腔内投与5日後

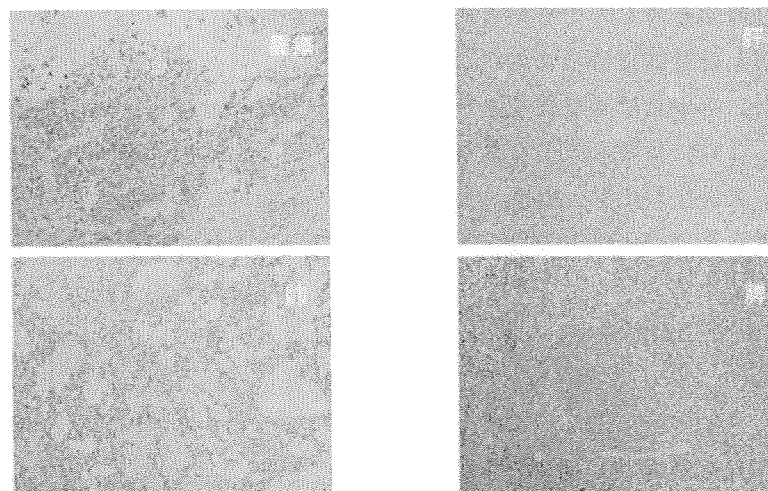


図 8

組織内マグネタイト測定（投与5日後）

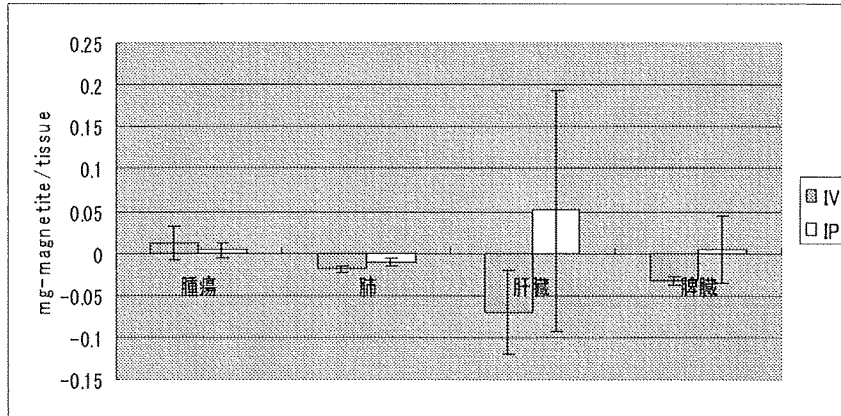


表 1. 薬剤非投与群との差を示した。IV（静脈内投与）、IP（腹腔内投与）いずれにおいても、腫瘍内への薬剤の取り込みを認めた。

治療開始9日後の腫瘍径

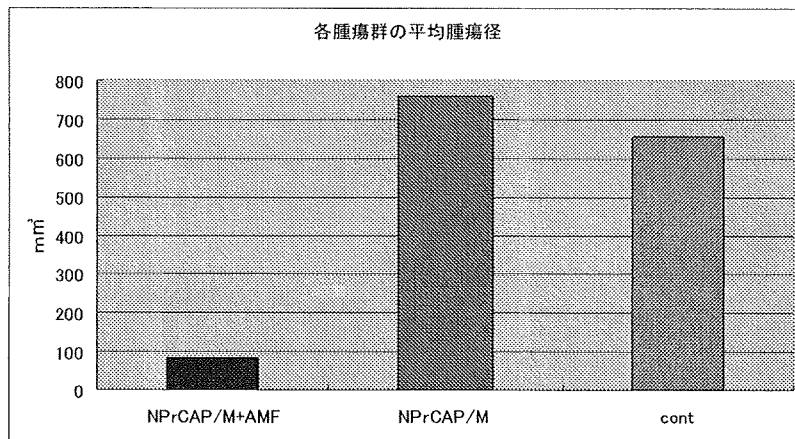


表 2

後、新規薬剤を腹腔内あるいは静脈内に投与し、2日後および、5日後の薬剤局在を検討した。

腹腔内投与、静脈内投与のいずれにおいても、腫瘍内への薬剤の取り込みが見られ、腫瘍選択的に薬剤が取り込まれることが実証された。（図8、表1）

2. マウス背部にメラノーマ細胞（B16F1）を移植し、6、8、10日後に新規薬剤を腫瘍内に投与、磁場照射を行った。

治療開始9日後に腫瘍径を測定した。薬剤投与および磁場照射群では、薬剤投与のみあるい

は無治療群と比較し、有意に腫瘍径の縮小を認めた。（表2）

【今後の展望】

新規薬剤が全身投与にて、腫瘍選択的に取り込まれることが実証された。今後は、内臓臓器転移モデルを作成し、薬剤が転移巣に取り込まれることを確認する。薬剤自体の抗腫瘍効果を調べ、磁場照射との併用において、相乗効果があるかどうかを検討する。

D. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yamashita T, Yoneta A, Hida T: Macrophage inhibitory cytokine-1: a new player in melanoma development. J Invest Dermatol 129 (2) : 262-4, 2009.
- 2) 國本梨沙、平野桃子、菅 裕司、西坂尚大、森 暁、米田明弘、山下利春、神保孝一、大黒 浩、辻比呂志、溝田 淳、佐藤明彦：重粒子線治療を行った脈絡膜悪性黒色腫の1例。皮膚科の臨床 50 : 1185-1188, 2009.

2. 学会発表

なし。

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

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

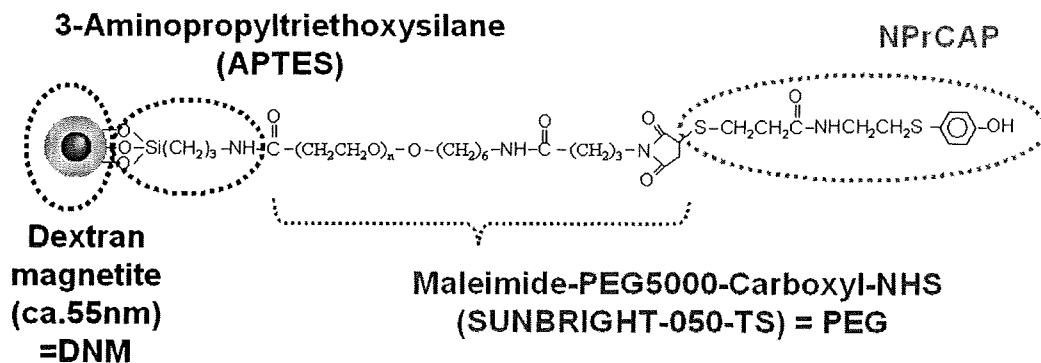
新規CTI治療薬剤の合成とGMP製剤化

村瀬 勝俊 名糖産業株式会社名古屋研究所 主任研究員

研究要旨

H21年度には、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）とデキストランマグネタイト（磁性ナノ微粒子=DNM）との結合体：NPrCAP/PEG/DNM（下図を参照）を基礎とし、合成条件の改良により現行製剤の分散安定性を向上させ、全身投与が可能な新規製剤を開発した。また、H23年度に予定しているGMPグレード製剤の確立に向け、クリーンエリアを整備した。

なお、H22年度には、得られた新規製剤のin vivoデータに基づき、生体内での集積性を向上させるべく新規製剤の更なる改良を進め、翌H23年度には最終的な改良新規製剤の中規模スケールでのGMPグレードの合成を確立する予定である。



A. 研究目的

本研究事業における分担研究である「新規製剤の開発」に関するH21年度計画としては、「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」である。これを達成するための具体的な目的として、次の2点を掲げた。

【新規CTI治療薬剤の合成開発】

既に現行製剤でも一定の成果が上げられているが、その合成スケールはごく小規模（5mL前後のスケール）であり、複数名の患者を対象とした臨床研究を並行実施するには不十分である。また、現行製剤では一定期間保存可能な高分散性が維持できない為、製剤をある程度ストックした上での継続的な臨床研究を進めることができない。

従って、今年度は現行製剤の長期安定性（例

えば1年程度)の向上を目指し、分散性の改良を行うこととした。これに加え、中規模(50mLスケール)で合成できる反応~精製条件を確立する。

【新規CTI治療薬剤のGMP製剤化】

上述の中規模合成される新規製剤については、将来的(H23年度予定)にはヒトでの臨床試験を見据えたGMPグレード製剤とする必要があり、このようなエリアの構築に向けて、今年度はハード面を整備する。

B. 研究方法

【合成開発】

昨年度までに我々が考案したNPrCAP/PEG/DNM合成手順を以下に示す。

この手順はDNM粒子表面の水酸基にアミノシラン基を導入し、スペーサーである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(課題-1)、および疎水性NPrCAP-SHの導入効率が低い(課題-2)などの問題があった。臨床用製剤として確立するためには、注射用製剤としての分散性・易ろ過性を維持する必要がある。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。

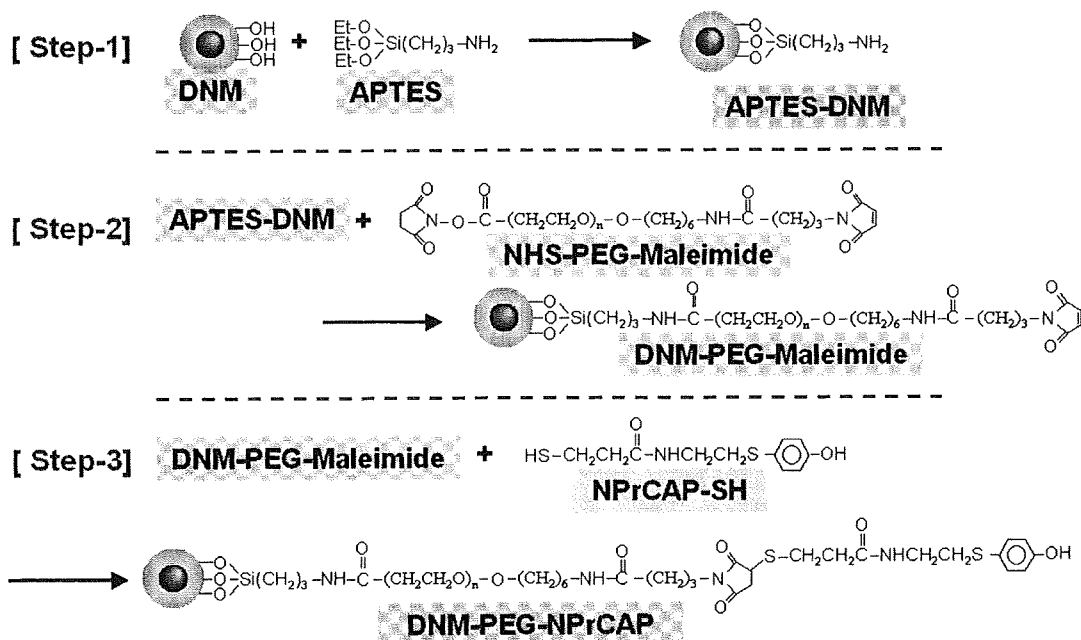
そこで、上記2つの課題に対して、次のとおり進めることとした。

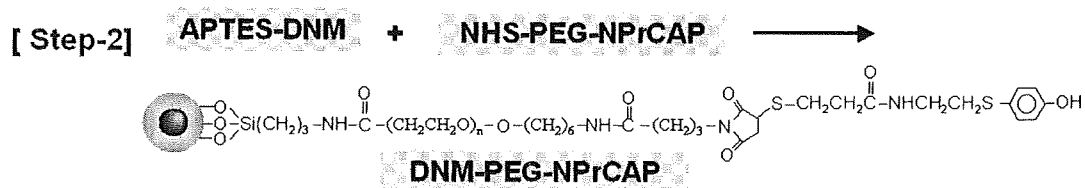
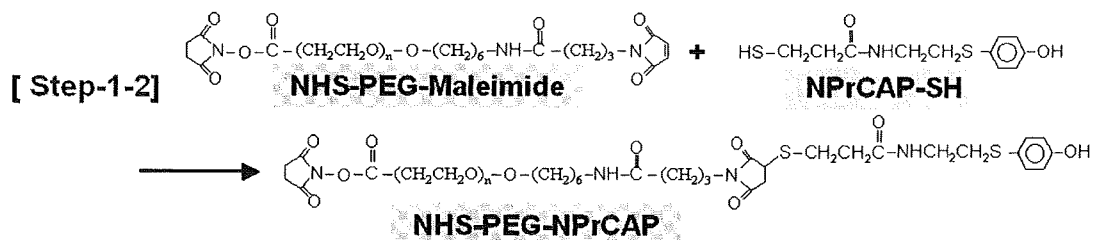
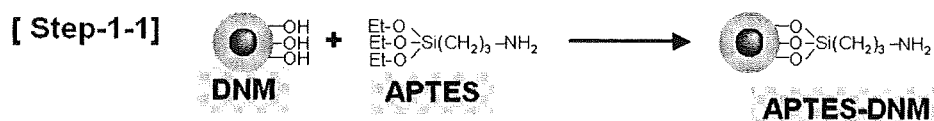
課題-1:

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

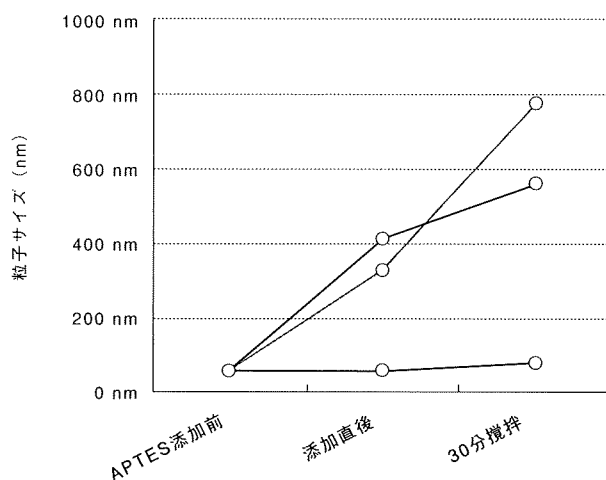
課題-2:

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、





- 鉄濃度：1mg/mL、APTES：1%
- 鉄濃度：5mg/mL、APTES：5%
- 既存の反応条件（鉄濃度：10mg/mL、APTES：5%）



	反応時鉄濃度 (mg/mL)	アミノラン添加量 *	反応温度 × 時間	アミノラン含量 (ug/mg-Fe)	全体粒子径 (nm)
従来条件	20.0	12	4°C × 1hr	147	1200
原料DM	—	—	—	—	56
Run-1	2.0	0.6	rt × 16hr	88	57
Run-2	10	0.4	rt × 14hr	248	54

*：DNM被覆デキストラン由来の水酸基とのモル比

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り、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を可溶化し、水中での反応を行う。

	PEG-CAP/APTES mol ratio	粒子径 [nm]	NPrCAP結合量 [nmol/mg-Fe]	1 μ mフィルター 透過
従来の合成条件	-	-	7~79	不可
Run-1	1.0	110	66	可
Run-2	1.0	97	164	可
Run-3	0.5	77	63	可
Run-4	0.5	107	72	可

【GMP製剤化】

製剤合成を実施する場所となる名糖産業(株)名古屋研究所内の実験室に対し、クリーンルームへの改修およびクリーンベンチを導入し、専用合成装置を導入する（GMP水準の設備確立）。

C. 研究結果

【合成開発】

課題-1 に対して検討した結果、下図に示すとおり凝集を改善することが出来た。

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 μ g/mg-Fe程度に制御することとした。

課題-2 について検討した結果、下表（次ページ）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。

【GMP製剤化】

名糖産業(株)名古屋研究所内の実験室に対し、クリーンルームへの改修およびクリーンベンチを導入し、専用合成装置の導入が完了した。

これらの新規設備については、単に導入するだけでは不十分であり、各設備/装置の適格性を検証し、クリーンエリアの清浄度を維持する必

要がある。

その点で、同社は臨床用MRI造影剤としてバイエルシエーリング社から販売されているリズビストの原薬であるフェルカルボトランのGMP製造実績がある。従って、そのノウハウを活かしH22年度には、上述の適格性検証に加え、クリーンエリアの清浄度、環境モニタリング、および定期的なメンテナンスを継続的に行うことでGMP水準設備の維持を行う。なお、それぞれの所定の保守管理を標準化するために、標準手順・記録書の作成も実施する。

D. 健康危険情報

特になし

E. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

F. 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

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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
Jimbow K, Kamiya T, Hida T	Epidermal melanin unit and aging of skin; biological and molecular significance of pheomelanin in constitutive photo-aging process	加齢皮膚医学セミナー	4	53-64	2009
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	Article ID 457936	2009
Jimbow K, Takada T, Osai Y, PThomas D, Sato M, Sato A, Kamiya T, Ono I, Tamura Y, Sato N, Miyamoto A, Ito A, Honda H, Wakamatsu K, Ito S, Yamashita T, E Nakayama, Kobayashi T	Melanogenesis exploitation and melanoma nanomedicine; Utilization of melanogenesis substrate, NPrCAP for exploiting melanoma-targeting drug and its conjugation with magnetite nanoparticles for developing melanoma chemo-thermo-immunotherapy	2 nd International Conference on Drug Discovery and Therapy		In press	2010
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- β sensitive melanoma cell lines.	J Interferon Cytokine Res		In press	2010
Jimbow K, Ogino J, Hida T, Kawakami A	Comparison of biological significance of eu-and pheomelanin pigmentation in skin again process	加齢皮膚医学セミナー	5	印刷中	2010