

201011012A

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

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 神 保 孝 一

平成23(2011)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. CTI 両方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に関する研究
本多 裕之 15
2. GM 製剤にむけた高純度 N-(1-mercaptopropionyl)-4-S-CAP-SH の安定な供給とそのデキストランマグネタイト結合体 NPrCAP/PEG/APTS/DNM のチロシナーゼの基質としての反応性に関する研究 23
伊藤 祥輔・若松 一雅
3. NPrCAP 製剤によるアポトーシス誘導とアジュバント効果の検討 29
中山 睿一
4. NPr4S-CAP および NPr4S-CAP デキストラン結合体の生物活性 35
山下 利春
5. CTI 療法で誘導される TIL の TCR 解析 39
井藤 彰
6. メラノジェネシス標的 NPrCAP を用いた悪性黒色腫化学療法により誘導される腫瘍免疫機構の解析 45
田村 保明
7. 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 51
米田 明弘
8. 新規 CTI 治療薬剤の合成と GMP 製剤化 55
野原 聡

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
(H21 - ナノ - 一般 - 006)

研究代表者 札幌医科大学医学部 神保 孝一 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
中山 睿一 川崎医療福祉大学・腫瘍免疫学教授
伊藤 祥輔 藤田保健衛生大学医療学部 名誉教授
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
野原 聡 名糖産業株式会社名古屋研究所 業務管理職

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
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
加藤 潤史 札幌医科大学医学部皮膚科学講座 助教
肥田 時征 札幌医科大学医学部皮膚科学講座 助教
柳澤 健二 札幌医科大学医学部皮膚科学講座 助教
本間 敏男 セントラル女性クリニック 院長
森野 富夫 (株) ナノセラピー研究所 代表取締役社長
美濃輪 昇 東レ (株) 医薬事業部長
山本 泰司 山本ビニター (株) 代表取締役社長

研究要旨

I. 研究の背景・目的・必要性

我々は①メラノーマに特異な形質であるメラノジェネシスを分子標的とした薬剤および②新規ナノ微粒子結合体を用いた次世代型低侵襲性化学・温熱・免疫「CTI(chemo-thermo-immuno)」療法の開発を行っている。CTI療法については、メラノーマ腫瘍内投与に基づくCTI療法臨床試験を開始し、CTI療法の理念の有用性を確認したが、①全身投与が可能な高拡散性新規薬剤、②継続的維持免疫療法と③治療機器の更なる開発が必要とされた。今年度は従来の医・工・化学の連携に加え、薬剤開発のために産から原薬メーカーが分担研究者として加わり、選択的腫瘍内拡散性と低侵襲性治療が可能な新規薬剤プロトタイプを完成した。今後は①本プロトタイプ薬剤をもちいた低侵襲性治療機器開発のために新たに産から医療機器メーカーが分担研究者として加わり、②分子標的・免疫作用機序の解明による継続的維持療法を開発し、GMP製剤を生産し、③更に産から新たに製薬会社が研究協力者として加わり、全国レベルでの臨床試験に向けた治療プロトコルを完成させる計画である。

II. 研究成果・今後の計画

1. GMP製剤開発と薬剤安定性・選択的抗腫瘍効果の検討：

今年度は作年度に我々が開発したメラノジェネシスを分子標的としたNPrCAP-SH (N-1-mercaptopropionyl 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) をプロトタイプ薬剤として更なる改良を加えた。今後は本薬剤の①安定性・抗腫瘍効果の解明と②毒性実験を終了させ、③全国レベルで行うに必要なGMP製剤合成方法を完成させる。分担研究者である名糖産業はMRI造影剤として既に臨床に用いられているリゾビストGMP製剤開発会社であり、我々の開発した新規薬剤の骨格には改良型リゾビストが用いられている。

2. 分子標的・免疫作用機序に基づく解明による継続的維持療法の開発：

作年度の研究実績を発展させて今年度は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-SHの癌免疫賦活への有用性の検討を行った。これら実績をもとに今後は次世代型CTI療法の臨床プロトコルを確立する。更に東レ医薬事業部、日本化薬の子会社であるナノメデシン研究所が研究協力者として加わり、国内他施設との連携による全国レベルでの第I, II相臨床試験開始の準備を始める計画である。

3. CTI療法の低侵襲性磁場発生装置の開発：

健康保険の適用を受けており、さらに癌治療の最前線で導入されているハイパーサーミア用医療機器「サーモロン-RF8」の使用を検討する。本プロジェクトで開発した薬剤のサーモロン-RF8での発熱挙動について検証し、低侵襲性医療機器開発を行う。

III. 研究の特色・独創性及び期待される成果

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、すなわち能動的な“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。予備

的臨床試験で症例数は限定されているが本方法の有用性を実証している。NPrCAP-SH 自体も継続的
化学・免疫療法効果を増強するブーストアジュバントとしての効果が示唆されている。

A. 研究目的

我々の研究は①磁性微粒子と結合した高拡散性、選択的腫瘍内集積性を有する新規ナノメデシン薬剤の抗腫瘍効果の確認、②新しい医療用機器を用いた治療法の安全性の確立、③選択的腫瘍細胞破壊で誘導される腫瘍分子標的と免疫作用機序の解析に拠る免疫治療とブースト効果を確立し、④多施設で同時に同一プロトコールで容易に治療し得る医療用機器を用い、⑤生体内がんペプチド産生による患者に優しく遠隔転移巣撲滅の次世代型化学・温熱・免疫（CTI）療法を確立することを目的とする。

1. 次世代型CTI療法薬剤の開発と抗腫瘍効果・安全性

1) 新規CTI療法薬剤の合成開発

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った。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かった。従って、H21年度に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、分散性の改良を行った。これに加え、中規模（50mLスケール）で合成できる反応～精製条件を確立した。H22年度には薬剤のin vivoデータに基づき、新たなメラノジェネシスを分子標的とする新規薬剤の基質を探索する。同時に分散安定性の高く、生体内での集積性を向上させる製剤の更なる改良を進める。H23年度には、最終的な改良新規薬剤のGMPグレードでの大量合成法を確立する。

2) GMP水準の製剤合成設備確立

上述の中規模合成される新規薬剤については、ヒト用無菌注射剤が合成できる清浄度のエリア

で、クロスコンタミを避ける為の専用装置を確保する必要がある。そこでH21年度には名糖産業（株）名古屋研究所内の実験室をクリーンルームへ改修し、さらにクリーンベンチと専用合成装置を導入した（GMP水準の設備確立）。

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。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ゾ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。

3) 新規CTI療法薬剤の抗腫瘍効果・安全性

我々はすでに、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-SH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(Takada T et al, Journal of Biomedicine and Biotechnology, in press)。

2. CTIで誘導される腫瘍分子標的と免疫作用機序の解析

1) 腫瘍抗原の解析

現在、CEA、CA19-9（消化器がん）、 α -フェトプロテイン（肝臓がん）、CA125（卵巣がん）等多くの腫瘍抗原が知られている。メラノーマでもMAGE-1、MART-1、gp100等の報告がある。そこで、我々が提案しているCTI療法では免疫賦活に関連する特異的腫瘍抗原の同定を目指す。特異的腫瘍抗原を発見し、ブーストして治療効果を高めることは治療効果増強のために非常に重要

である。遺伝子発現解析により、NPrCAP-SH と温熱によって誘導される遺伝子産物の中から新規の抗原タンパク質の同定を目指す。MHC class I 分子を介して提示されるペプチド長は 8 から 10 残基と規定されている。治療効果増強のためには、高発現タンパク質由来のペプチドライブラリーによる探索が重要であり、短鎖ペプチドを固相合成法で作成し、ペプチドアレイとしてライブラリー化して抗原エピトープを解析することがきわめて重要である。

HeLa 細胞を使って温熱処理し、高発現するタンパク質が 41 種類あることを見出した。また温熱処理後 6 時間程度で最大値に達することを見出した。メラノーマ細胞についても発現解析を実施中である。ペプチドアレイに関しては、Photolinker を合成し、紫外線照射 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ピトープの網羅的探索に活用できるようになった。細胞アレイの技術を開発し、細胞の形態変化も観測できることが明らかになった。

これらの結果を受けて、H22 年度は CTI 療法で高発現するメラノーマ特異的なタンパク質の特定し、エピトープになる得る候補配列を決定する。引き続きペプチドアレイにより蛍光ラベルペプチドを合成し、細胞膜上の MHC class I 分子への結合を確認する。また、リンパ節由来の細胞群からメラノーマを攻撃する能力をもつ CTL が含まれるかどうかを、メラノーマ細胞アレイで評価し、CTL の単離増殖・同定等に協力する。

2) 深部メラノーマに対する NPrCAP の癌免疫賦活への有用性の検討

CTI 療法後のメラノーマに対する新たな免疫ブースト治療の確立も必要である。我々は磁性ナノ粒子を含まない NPrCAP 自身が酸化ストレスによるメラノーマ細胞死を誘導することを報告しており、NPrCAP-SH の腫瘍内投与による抗腫瘍効果を検討した。その結果、NPrCAP-SH 腫瘍内投与により B16F1 及び B16-OVA メラノーマの腫瘍増殖抑制効果を認めた。さらに完全退縮を認

めたマウスでは、メラノーマに対する細胞傷害性 T 細胞の誘導を認めた。本年度は、NPrCAP-SH 投与スケジュールの最適化と、抗原特異的な CTL 誘導の有無、メラノーマ分化抗原に対する抗体産生の有無について検討する。

B. 研究方法

I. 次世代型新規薬剤の開発と抗腫瘍効果・安全性

1. 新規薬剤合成法の樹立

1) 従来の合成方法では、カップリング薬剤を効率よく反応させることに欠点があったので、薬剤のカップリング反応の順番を変え、NPrCAP/PEG/APTS/DM の合成収率の向上をめざす。そのための新たな合成法を確立する。

2) メラノジェネシスの基質部分である NPrCAP を NPr-Homo-CAP に変更することにより、より脂溶性を向上させ、生体内での腫瘍内集積性を向上させることを目的とする。なお、NPr-Homo-CAP は、NPrCAP の 4-S-CAP 母核より炭素 1 個分多い構造であり、4-S-CAP 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 (S. Inoue et al., *Biochem. Pharmacol.*, 39, 1077-1083, 1990)。そのための新規薬剤 NPr-Homo-CAP/PEG/APTS/DNM の合成を行う。

3) 先に我々は、NPrCAP/M がチロシナーゼに対する基質になることを報告した (M. Sato et al., *J. Invest. Dermatol.*, 129, 2233-2241, 2009)。NPrCAP/PEG/APTS/DNM のチロシナーゼに対する基質実験を行う。

2. 新規薬剤の GMP 製剤の合成

1) H21 年度の検討結果を踏まえ、次ステップとしては薬剤の構成要素である磁性ナノ粒子およびスパーサーについて、物性・構造・置換度等を最適化することにより、全身投与後の特異的腫瘍内集積性を向上させた更なる新規製剤の開発を目指す。

具体的には、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 (reticuloendothelial system, RES) の臓器である肝臓と脾臓に分布しやすいことが分かっている。ここで、スパーサーである PEG 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する。

また、粒子サイズ自体を 30nm 未満 (超微小超磁性酸化鉄) とすることで上述貪食を回避できるが、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についても検討を加える。

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、ある程度の量が血管内皮を通過して腫瘍組織へ集積することも期待できるため、これについても検討を加える。

また、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。

2) 全身投与新規製剤を中規模で再現性良く合成する為の、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、薬剤の品質維持を目指す。

3) 先に我々は、NPrCAP/M がチロシナーゼに対する基質になることを報告した (M. Sato et al., J. Invest. Dermatol., 129, 2233-2241, 2009)。NPrCAP/PEG/APTS/DNM のチロシナーゼに対する基質実験を行う。

3. 新規製剤の抗腫瘍効果・安全性

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 (Takada T et al, Journal of Biomedicine and Biotechnology, in press), 既存製剤 (NPrCAP/PEG/M, NPrCAP/M) 新規開発製剤 (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、同様に新規製剤の安全性についても平行して検討する。

1) CTI 療法製剤の抗腫瘍効果・安全性の検討:

NPrCAP-SH 単独のメラノーマ抗腫瘍効果の解明 B16-OVA 株を用いた動物を用いた研究で NPrCAP/M に磁場照射を加えた治療群は、①初期移植腫瘍の増殖抑制効果のみならず、②腫瘍の再チャレンジ移植に対し略 100% に近い腫瘍増殖抑制効果と③担癌マウスに対しコントロール群と比較し略 100% に近い余命 ILS があった。一方 NPrCAP/M に磁場照射を加えない単独治療群も①磁場照射群と同様初期移植腫瘍の増殖抑制効果のみならず、②腫瘍の再チャレンジ移植に対し略 50% に近い腫瘍増殖抑制効果と③担癌マウスに対し略 50% に近い余命 ILS があった (Sakemoto et al., Journal of Immunotherapy, submitted)。

この事は NPrCAP-SH 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ことを示唆する。新規製剤を用い、この機序の解明を行なう。更に NOD/NOG マウス系メラノーマ細胞株を用いて in vitro, in vivo における NPrCAP 及び NPrCAP/PEG/DNM の細胞殺効果を比較し免疫原性を明らかにするため、抗体 T 細胞反応を検討する。

3-1-2) CTI 療法と治療後の NPrCAP-SH 単独投与による進行期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-SH 全身投与 (静脈内) による同時肺転移に対する効果の検討

新規 NPrCAP/PEG/DNM のメラノジェネシス標的機序の分子機構の検討新規製剤がメラノジェネシス酵素 (チロシン酸化酵素) 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。

転移性メラノーマ に対する NPrCAP-SH 単独投与の検討

B16F10 を用いて肺転移の系を作製し、NPrCAP-SH 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。

1) 皮膚転移腫瘍に対する新規 NPrCAP/PEG/DNM の治療効果の検討 3-2-1) 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。

CTI 療法の予備的臨床試験において、現在 1 症例が生存しており、これら 1 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。

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

1) 抗原エピトープ解析

メラノーマ細胞に NPrCAP-SH や温熱処理をほどこして高発現するタンパク質を特定する。gp100 や MART-1 等の抗原も含めて、配列情報に基づき、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。

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

Photolinker つきの蛍光標識オーバーラップペプチドライブラリーを合成し、実際に可溶化状態で抗原提示細胞を作用させ、細胞への結合の有無を評価する。細胞アレイの技術を用いて各ペプチドに対して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。

3) 非特異的免疫刺激能の検討

NPrCAP, NPcCAP/PEG/DNM の非特異的免疫刺激能の有無を確認する必要があるのでヒト末梢血リンパ球を用いサイトカイン産生を検討する。

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。

2. 腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) の解析

1) CTL 産生評価

CTI 療法後のマウス所属リンパ節からリンパ球を分離し、CD3 および IL-2 で培養した後、B16 あるいは EL-4 で細胞を刺激して、ELISPOT assay を行う。

2) TCR レパトワ解析

CTI 療法後のマウス所属リンパ節から、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 遺伝子のレパトワ解析を行い、担癌無治療マウスおよび非担癌マウスの TCR レパートリーと比較する。

3) TCR レパトワ解析

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 療法後のマウス所属リンパ節から、抗体磁気分離法により CD8 陽性 T 細胞を分離し、単細胞からの 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

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

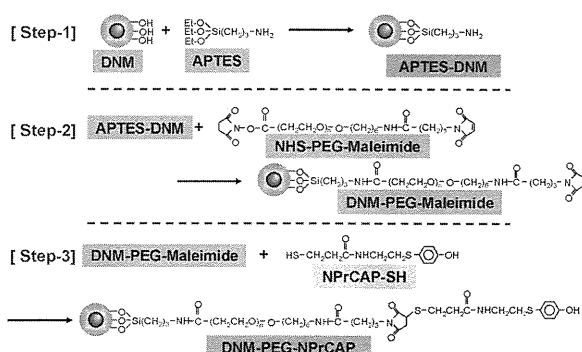
樹立した TCR 遺伝子導入 T 細胞が、in vitro および in vivo において、B16 細胞および B16 腫瘍を殺傷する能力があるかどうかを調べる。また、in vitro においては名古屋大学の単細胞 T cell array を用いて解析する。

3. 深部メラノーマに対する NPrCAP-SH の癌免疫賦活への有用性の検討

1) NPrCAP-SH 腫瘍内投与による抗腫瘍効果と腫瘍免疫誘導の機序

我々はすでに B16-OVA および B16F1 メラノーマ担癌マウスを用いて NPrCAP-SH の腫瘍内投与を行い、抗腫瘍化学・免疫療法効果を確認したが、これらマウスを用いて、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。特に既知のメラノーマ分化抗原のどのペプチド種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 assay, ELISA を用いて検討する。

2) NPrCAP-SH と樹状細胞の腫瘍内投与による抗腫瘍効果の検討



コントロールとして NPrCAP-SH 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) NPrCAP-SH 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-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を ⁵¹Cr を用いた細胞障害試験、ELLISPOT assay を用いて抗腫瘍効果を検討する。

4. MHC クラス I 発現と治療感受性の相関

日本人に多い末端黒子型メラノーマ (ALM) の腫瘍細胞の細胞遺伝子の発現、癌遺伝子の変異、MHC クラス I の発現を解析し、術後化学療法の効果、無増悪生存期間、全生存期間をプロスペクティブに検討する。MHC クラス I の発現と予後については、レトロスペクティブな研究が可能である。NPrCAP-マグネタイトによる温熱免疫療法、インターフェロン-β による ALM 細胞株の MHC クラス I 発現を検討する。

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「新規製剤の開発」に関する H 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

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 (課題-2) 等の問題があった。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り、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。

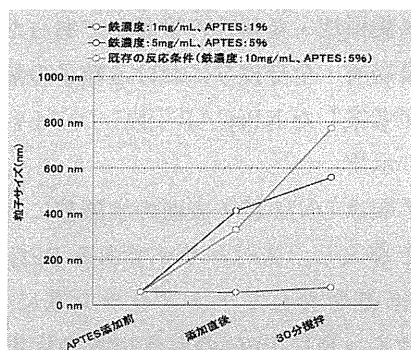
2. アミノシラン化時の粒子凝集への対応

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（下図）。

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 μg/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-SHを可溶化し、水中での反応を行うこととした。

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

	反応時鉄濃度 (mg/mL)	アミノシラン 添加量*	反応温度×時間	アミノシラン含量 (ug/mg-Fe)	全体粒子径 (nm)
従来条件	20.0	12	4°C×1hr	147	1200
原料DNM	-	-	-	-	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

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。

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、

	PEG-CAP/APTES mol ratio	粒子径 [nm]	NPrCAP結合量 [nmol/mg-Fe]	1μmフィルター ろ過
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

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。

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した。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た。HNPrCAP-SH は、メラ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/cm²) 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ピトープ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

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。ノこの結果を受けて、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、H22,23年度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- γ 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。

4. 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, (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。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同時に腫瘍内投与すると、さらに強い抗腫瘍効果を得た。今後は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。

E. 結論

1. H21年度から新たに企業(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全身投与が可能な製剤の大量合成法を開発に着手した。名糖産業はは既に臨床実績のある肝臓用MRI造影剤であるリゾビスト原薬となるDNM開発・製造会社である。この技術を基に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)を改良した新規薬剤を合

成した。これにより全身投与が可能で、皮膚以外の遠隔転移巣に対してもデリバリー性（DDS）を持った化学・温熱・免疫（CTI）療法製剤の開発が可能となった。ま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。本治療法の理念は東レと共同で「特開 2008-19202、メラノーマ標的温熱免疫療法治療剤」として H18 年 7 月 12 日に出願済みである。

2. 従来の局所投与では施術者の手技へのウエイトが高く、治療範囲は限定的であるため、その全体的な治療効果には、化学・温熱効果に続く、免疫効果を待つ必要があり、治療期間や施術頻度の観点から患者や施術者への負担は軽くないのが現状である。従って、初期の製剤投与でも対象となるメラノーマ部位への製剤を均等かつ再現性良く到達させた上で化学・免疫治療を施すことで、集中的な治療による施術期間の短縮が可能となり、臨床コストの低減も期待できる。

このためには、上述の局所投与に代わり、更にデリバリー性を向上させた新規製剤による血中投与（全身投与）が効果的であり、その簡便性は臨床での早期普及にも貢献できる。なお、新規製剤の中規模合成にも、既存の GMP 設備とノウハウが利用できる為、初期段階での費用負担はやや重くなるが、その後は保守管理費用が中心となる。

3. 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る。臨床試験において治療対象腫瘍以外の遠隔腫瘍に対しても腫瘍の退縮・縮小を示す症例を得、患者末梢血から NPrCAP/PEG/M と磁場照射によりメラノーマに選択的な熱ショック蛋白質の発現誘導とそれに引き続く細胞壊死により誘導される細胞傷害性 T 細胞による腫瘍免疫であることを確認した。今後はメラノーマ癌抗原テトラマーと ELISPOT assay 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することが出来る。

4. 臨床例において 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、HSP の特徴である生体に対する danger signal の効果により、数多くのリンパ球が腫瘍内に浸潤する様子がみられた。これらの腫瘍浸潤リンパ球（tumor-infiltrating lymphocyte, TIL）は、特に高い抗腫瘍活性が期待できることから、TIL の解析を十分詳細に行い、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 療法を確立する。

F. 健康危険情報

1. 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した。これにより、新たなメラノジェネシスを分子標的とする次世代型新規薬剤の開発が可能となる。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。

2. 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、CTI 療法による CTL の質的あるいは量的変化が確認されれば、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。

3. 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な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（生体内産生がんペプチド療法）。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・酸化酵素反応活性を有し、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。

4. CTI療法はTIL産生を直接生体内に起させ、遠隔転移巣の消滅をさせる事ができた。今後はメラノーマ特異ペプチド抗原を同定し(更に可能ならば個々の患者に特異なペプチド)、TILのブーストをかけ、持続的に発現させる事により、メラノーマの再発を防御する事が可能となり、今世紀最大の健康福祉のテーマである癌撲滅の最終手段の一つと位置付けられ得る。

5. CTI治療は、医・工・化学連携で生まれた新しい臨床応用が可能なトランスレーショナルリサーチである。本研究ではGMP製品化に向けて企業(産)が研究分担者(名糖産業株式会社)、研究協力者(東レ株式会社)として加わった。これにより化学的に安定した安価な製剤の恒常的大量生産と供給が可能となり国民の保健・医療・福祉の向上に貢献できる。

6. 本研究は、本邦初の臨床研究へと展開したメラノーマ標的磁性ナノ粒子によるナノメディシンであり、ナノ微粒子を用いた新規薬剤の改良・開発を行ない免疫賦活における更なるメカニズムの解析を行うが、ナノ微粒子を用いた臨床医学の新しい研究への糸口を本邦のみならず世界で最初に導入した小林 猛名古屋大学工学部名誉教授(現中部大学大学院応用生物学研究科教授)が研究協力者として、更にペプチドを用いた腫瘍免疫療法開発・研究の国際的第一人者である中山睿一川崎医療福祉大学・腫瘍免疫学教授(岡山大学大学院歯薬総合研究科名誉教授)が分担研究者として次年度から本研究班に加わった。これら新チームを基にした研究成果を、臨床へとフィードバックすることでCTI療法が、実践医学へとより発展していく事につながる。これは、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のグループの使命であり、社会に対する責任である。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Jimbow K, Takada T, Osai Y, Thomas PD, Sato M, Sato A, Kamiya T, Ono I, Tamura Y, Sato N, Miyamoto A, Ito A, Honda H, Wakamatsu K, Ito S, Yamashita T, Nakayama E, Kobayashi T: Melanogenesis exploitation and melanoma nanomedicine; Utilization of melanogenesis substrate, NPrCAP for exploiting melanoma-targeting drug and its conjugation magnetite nanoparticles for developing melanoma chemo-thermo-immunotherapy. Open Conference Proceedings J, Vol. 1, (2011) in press
- 2) Jimbow K: Geriatric Dermatology (加齢皮膚医学)の展開、Geriatric Medicine 老年医学、Jan. 2011,(in Japanese) in press
- 3) Jimbow K, Osai Y, Sato A, Takada T, Sato M, Kamiya T, Ono I, Yamashita T, Tamura Y, Ito A, Honda H, Wakamatsu K, Ito S, Kobayashi T, Nakayama E: Melanogenesis substrate, N-propionyl cysteaminyphenol, alone possesses a potent chemotherapeutic and immunogenic property in conducting melanoma chemo-thermo-immunotherapy, a combined therapy of NPrCAP and magnetite nanoparticle with HSP generation by alternating magnetic field. Pigment Cell Melanoma Res, (2010) 23:900-901
- 4) Sato A, Tamura Y, Sato N, Yamashita T, Takada T, Sato M, Osai Y, Ohkura M, Ono I, Ito A, Honda H, Wakamatsu K, Ito S, Jimbow K: Melanoma-targeted chemo-thermo-immuno (CTI)-therapy using N-propionyl-4-S-cysteaminyphenol-magnetite nanoparticles elicits CTL response via heat shock protein-peptide complex release. Cancer Sci,(2010)

- 101(9):1939-1946
- 5) Jimbow K, Ogino J, Hida T, Kawakami A: Comparison of biological significance of eu- and pheomelanin pigmentation in skin aging process. *Geriatric Dermatol Seminar*, (2009), 5(3):31-44
 - 6) 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) 30(5):349-57
 - 7) Jimbow K, Takada T, Sato M, Kamiya T, Ono I, Yamashita T, Tamura Y, Sato N, Miyamoto A, Wakamatsu K, Ito S, Ito A, Honda H, Murase K: Melanogenesis cascade as the molecular target for the development of chemo-thermo-immunotherapy: rationale and clinical application (in Japanese). *Skin Cancer*, (2009) 24:174-180
 - 8) 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 Biotech*, (2009) 10:1155/457936
 - 9) 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*, (2009) 129(9):2233-41
 - 10) Hida T, Kokai Y, Kawakami A, Hirosaki K, Okura M, Sohma H, Tosa N, Yamashita T, Jimbow K: Rab 7 is a critical mediator in vesicular transport of Tyrp1 in melanocytes. *J Dermatol*, (2009)129(9):2233-41
 - 11) 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*, (2009) 22; 62334

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） 分担研究報告書

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に関する研究

研究分担者 本多 裕之 名古屋大学大学院工学研究科・教授

A. 研究目的

生体内においてがん細胞をはじめとして、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。

一方、がん細胞のケモセラピーでは培養細胞を平面培養して評価する方法では、実際のがん細胞の生育環境と異なるため、正確な評価ができない。間質細胞との相互作用も報告があり、ECM存在下で、かつ間質細胞との混合培養系を構築し、薬剤感受性を評価する必要がある。また、免疫セラピーでは、活性化T細胞のような免疫担当細胞による攻撃を混合培養系で、つぶさに観察評価できる系を確立する必要がある。

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 μm 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、すでに、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している。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、がん細胞の挙動観察を実施し、CTI治療効果増強のための混合培養評価系の構築を目的とした（図1）。

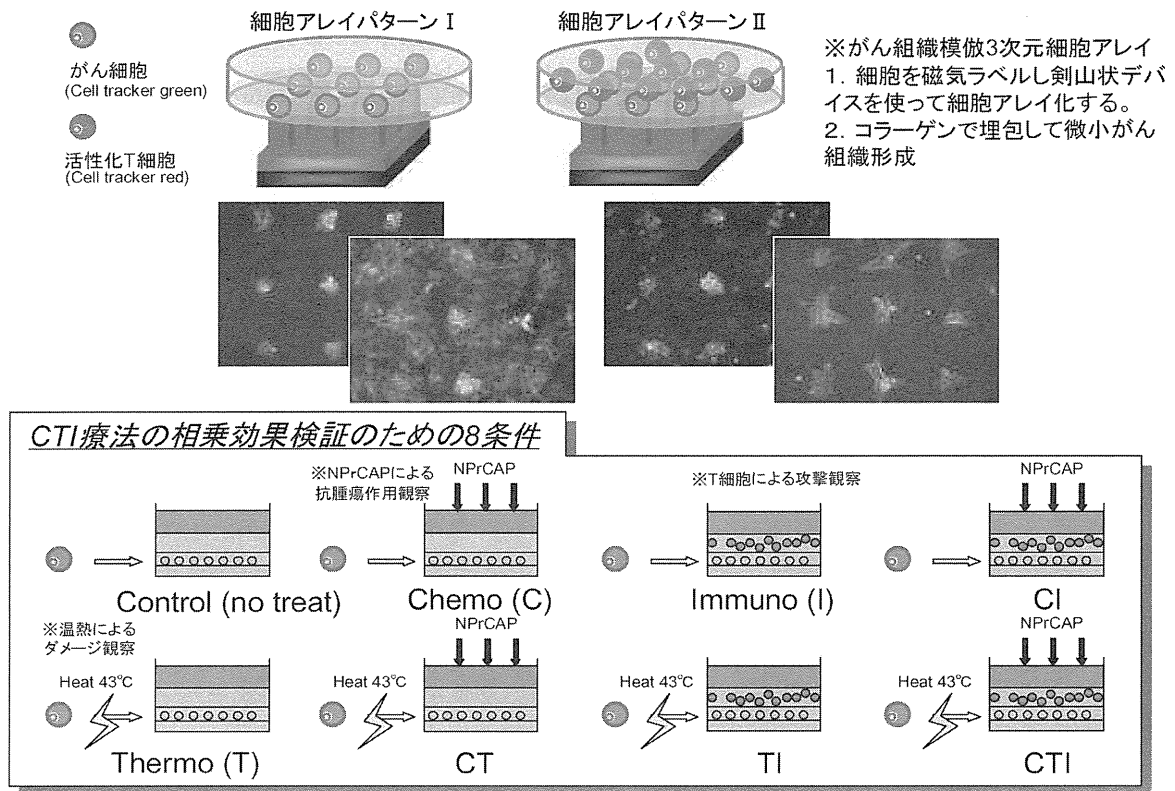


図1 CTI療法効果検証のための細胞アレイ評価系の構築

B. 研究方法

ヒト悪性黒色腫細胞（以下メラノーマ）としてM-1細胞を用いた。培養は、37℃、5% CO₂、95% Air 下のCO₂ 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、0.1 μg/ml ストレプトマイシン硫酸塩) (Invitrogen) を含む Roswell Park Memorial Institute medium 1640 (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、1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。

間質細胞として正常ヒト皮膚線維芽細胞NHDFを用いた。培養と継代操作は、M-1細胞

と同様に行ったが、培地には10% FBS及びPSを含む Dulbecco's Modified Eagle Medium high glucose (DMEM) (Invitrogen) を用いた。またM-1細胞との相互作用の評価に向けて、RPMI1640での増殖速度及び形態に変化がないことを確認した。

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Fe₃O₄ (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 μlに12 N HCl 200 μlを加え、40℃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 μ l、1%チオシアン酸カリウム 4 ml 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で MCL を作製した。リン脂質として TMAG (N-(*a*-trimethylammonio-acetyl)-didodecyl-D-glutamatchloride) (相互薬工、東京)、DLPC (Dilauroylphosphatidylcholine) (Sigma-Ardrich)、DOPE (Dioleoyl phosphatidylethanolamin) (SigmaArdrich) 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 μ 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、CO² 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。

3次元ゲル中に細胞アレイパターンニングを行う 3次元磁気細胞パターンニング法を以下の通り行った。培養皿には、lumox dish 35 (以下ベトリパーム) (Greiner Bio-One、Wemmel、Belgium) を使用した。これは、厚さ 25 μ 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。まず、MCL を細胞に導入し、細胞を磁気ラベル化した。次に、磁気ラベルした細胞を培養皿からトリプシン処理によりはがした。次に、剣山状鉄製デバイスをネオジム磁石の上に配置し、磁力線を支柱の上に集中さ

せ、その剣山状鉄製デバイスの上に下層を濃度や成分を調整したコラーゲン溶液でコートした培養皿を配置し、磁気ラベルした細胞を培養皿に播種した。播種細胞濃度は 1.8×10^5 cell/dish で行った。これにより同一平面上に細胞アレイパターンニングを行った。その後、上から培養皿にコラーゲン溶液を更に加えることにより細胞をゲルによって 3 次元的に包んだ 3次元磁気細胞アレイを完成させた。

前述の 3次元磁気細胞パターンニング法をもとにがん微小環境において重要な役割をもつ間質線維芽細胞とがん細胞の相互作用による挙動評価系を構築した。

間質線維芽細胞とがん細胞の相互作用には直接接している線維芽細胞が ECM を溶かすことで、細胞が移動可能な穴を形成し、その穴を利用してがん細胞が浸潤する直接相互作用と、サイトカインなどの可溶性因子を介した間接相互作用が知られている。この 2つの相互作用を評価するため「直接接触」と「間接作用」という 2つの評価系を構築した。以下にその作製法を示す。

(a) 「直接接触」

基本的な作製法は前述の 3次元磁気細胞パターンニング法に従うが、コートした培養皿にがん細胞と間質線維芽細胞を 2:1 の割合で混合した細胞懸濁液を播種することでがん細胞と間質細胞を同じ位置にパターンニングする。これにより直接相互作用による挙動を評価する。

(b) 「間接作用」

こちらも前述の 3次元磁気細胞パターンニング法に従うが、上から添加するコラーゲン混合溶液中に間質線維芽細胞を均一に混合しておく。これによりアレイ配列されたがん細胞の周りに間質細胞が存在する間接相互作用による挙動を評価する。