

C. 研究結果

C-1 間質細胞の混合培養系での M-1 細胞の形態観察

メラノーマ細胞として、日本人悪性黒色腫由来で培養可能な細胞として樹立された M-1 細胞を使用した。間質細胞として NHDF (正常ヒト皮膚線維芽細胞; Neonatal Normal Human Dermal Fibroblasts) を使用した。

M-1 細胞は磁性微粒子を取り込み、細胞アレイ

レイ化する細胞 (本研究では M-1 細胞) をセルトラッカーグリーンで、共培養する細胞 (本研究では NHDF 細胞) をセルトラッカーレッドで蛍光標識し、2 種類の細胞を識別評価できる系を構築した。蛍光標識で、どちらの細胞も伸展増殖に影響は認められず、観察可能な混合培養系の構築が可能であった。

そこで、NHDF (赤色蛍光で標識) と M-1 細胞 (緑色蛍光で標識) をそれぞれ、赤色蛍光、緑色蛍光で標識し、混合培養系を構築した。M-1 細胞をア

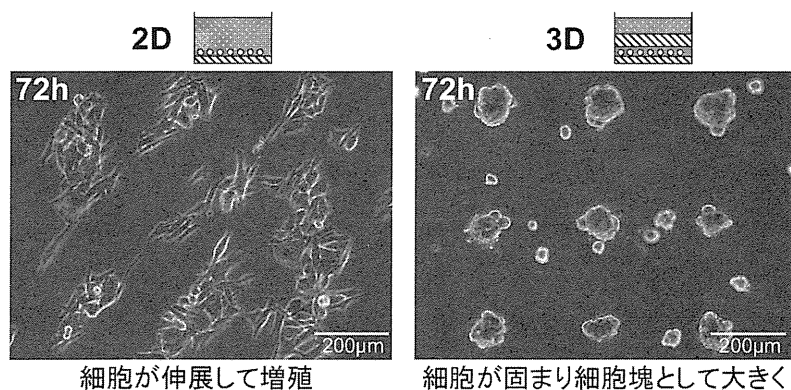


図2 M-1 細胞の細胞アレイによる挙動変化

を形成することができた。しかし、M-1 細胞は、通常の平面培養では紡錘状の伸展が観察されるものの、コラーゲンで埋包した場合は凝集塊を形成し、浸潤しない形態が観察された (図2)。

2 種類の細胞の混合培養系を構築するため、ア

レイ配置した後に、NHDF を上部に播種する間接作用評価系と、両方の細胞を同時にアレイ配置する直接接触評価系を構築し、評価した。

図3に示すように、NHDF を上部に同時に巻き込む間接作用評価系では、M-1 細胞が紡錘状に

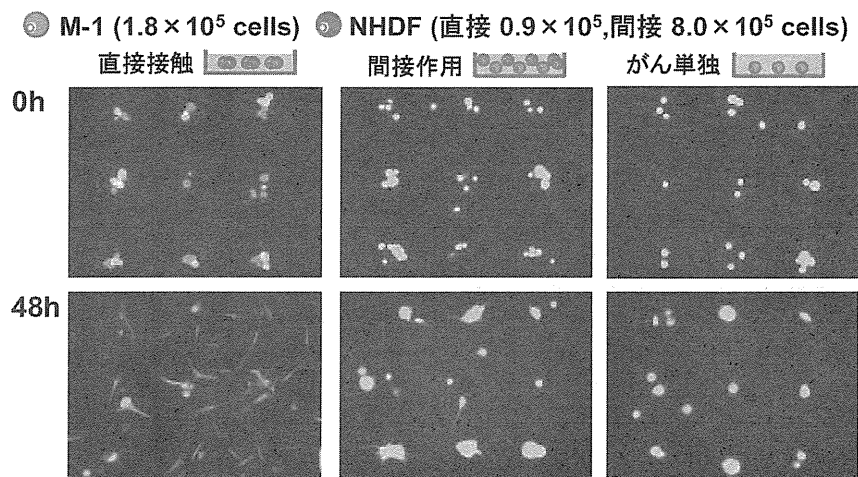


図3 M-1 細胞 - 間質細胞相互作用の挙動評価

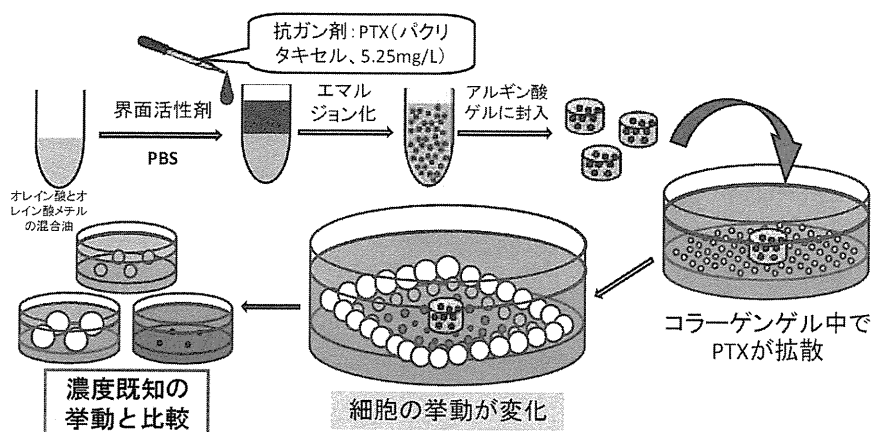


図4 薬剤ゲル埋包による拡散濃度勾配形成評価法

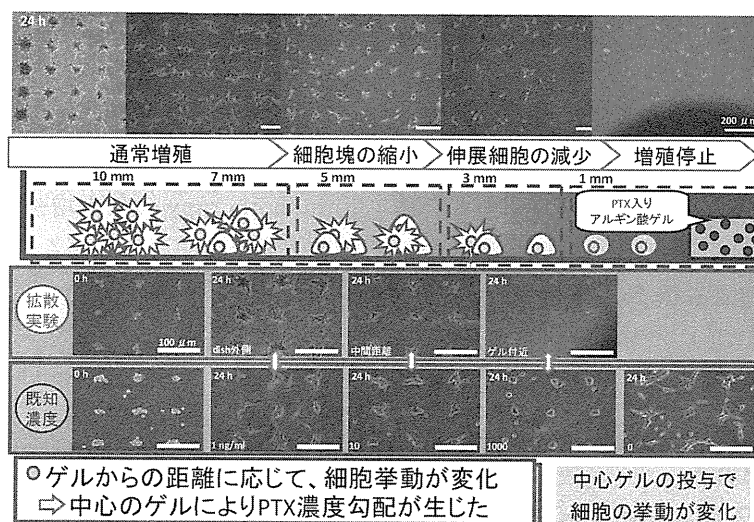


図5 濃度勾配による細胞挙動観察

伸展する様子が観察できた。また、NHDFと同時にアレイ配置した直接接評価系でも同様の様子が観察された。これは、間質細胞から分泌される可溶性液性因子によって進展増殖が促進されることを強く示唆するものである。

C-2 がん細胞の薬剤感受性評価系の構築

ケモセラピーの効果を確認するためには、薬剤濃度の勾配を形成し、1枚の培養ディッシュで評価できる手法を構築する必要がある。このため、モデル薬剤としてパクリタキセル (PTX) を、モデルがん細胞として3T3を用い、濃度勾配による細胞の増殖阻害を観察した。

PTXは脂溶性であるため、溶媒として細胞毒性のない有機溶媒を検討した。種々の溶媒のうち、オレイン酸およびオレイン酸メチルが適していることが判明した。そこで、オレイン酸、オレイン酸メチル 1:1 混合液を作成し、これにPTXを5mg/Lで溶解させた。PTXの油層から培養液への拡散を助けるため、油層はTweenでエマルジョン化し、天然多糖高分子であるアルギン酸カルシウムゲルに埋包する方法を選択した。油滴の平均径は176nmである。

このゲルを円筒形に成形し、培養ディッシュのほぼ中央に置き、PTXのゲルからの拡散による

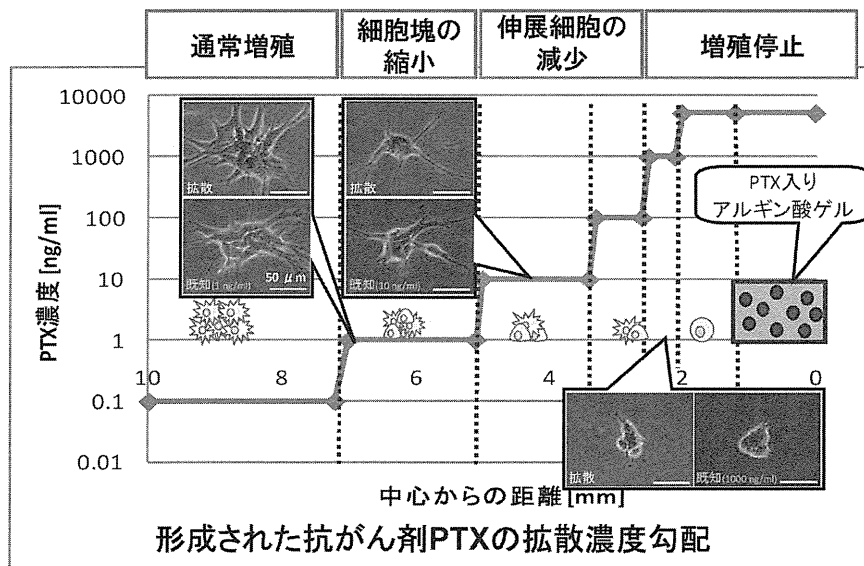


図6 同一培養ディッシュ中での薬剤濃度勾配の影響評価

濃度勾配を形成させた (図4)。別途、PTX による 3T3 の形態変化を観察し、細胞に暴露される PTX 濃度を形態変化で評価できる系を構築した。

実際の培養結果を図5に示す。ゲルを設置した中心からの距離に応じて24時間後の細胞形態がドラスティックに変化する様子が観察された。すなわちゲル近傍ではほとんど増殖が観察されず、PTXによる細胞死が観察された。またディッシュ辺縁部ではPTXの影響はほとんどなく、薬剤暴露のない増殖が観察された。

これらの形態変化を図6にまとめて示す。中心部では5mg/LのPTX濃度であり、辺縁部は0.1ng/ml程度と判断できた。ほぼ 10^4 から 10^5 オーダーの濃度勾配が形成されていた。

D. 結論

細胞の磁気ラベルと剣山状アレイを用いて構築した細胞アレイを使うことで、がん細胞の悪性度、薬剤に対する感受性が評価できることを示した。また、異種細胞との共培養系も新規に構築できた。これらのことをあわせ、今後は実際の薬剤であるNPrCAPの細胞毒性を調べ、蛍光ラベルした薬剤を作成し、薬剤の取り込みと細胞死のメカニズムを明らかにする。この研究を通して

Chemotherapyの機構解明と効果増強が検討できる。また、細胞障害性T細胞との共培養系に発展させることで、Immunotherapyの効果を確認し、Immunotherapyの効果増強のためのペプチドの探索と効果確認につなげる。

E. 健康危険情報

なし

F. 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)

松村拓、小出寛展、大河内美奈、本多裕之、磁気細胞パターンニング法を用いた生体模倣条件下での

がん細胞挙動評価、化学工学会第42回秋季大会
(2010年9月6日、同志社大学)

G. 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

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

若松 一雅 藤田保健衛生大学医療科学部教授

伊藤 祥輔 藤田保健衛生大学名誉教授

研究要旨

本研究は、GM 製剤にむけた新規 N-(1-mercaptopropionyl)-4-S-cysteaminyphenol (NPrCAP-SH) の安定な原料供給としての反応経路を確立し、そのデキストランマグネタイトとの結合体 (NPrCAP/PEG/APTS/DNM) を効率よく合成する経路を検討した。ついで、NPrCAP/PEG/APTS/DNM がチロシナーゼの良好な基質になりうるかどうかを検討した。さらに、NPr-4-CAP-SH のコントロール体として、NPr-2-S-CAP-SH の合成を行った。

A. 研究目的

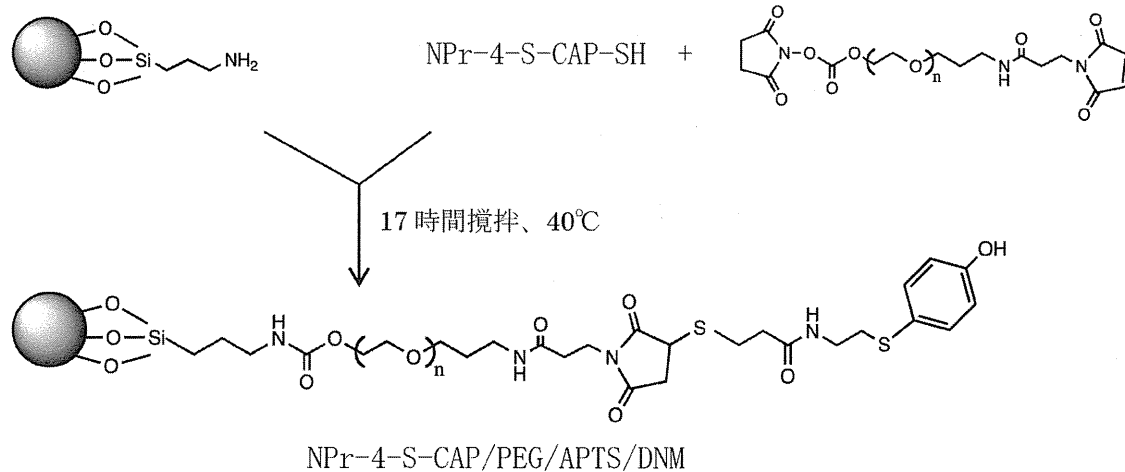
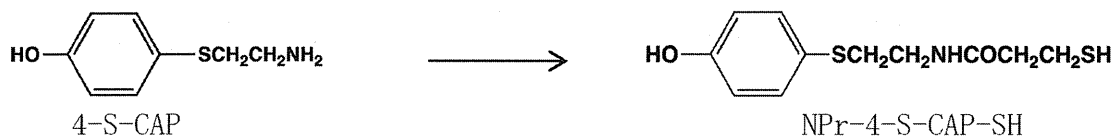
本研究を遂行するためには、薬剤のもっとも根幹部分を占める N-(1-mercaptopropionyl)-4-S-cysteaminyphenol (NPrCAP-SH) を効率よく、かつ短時間で大量に純度の高い物質として得る必要があったので、それにともない、前年度報告した方法の改良を行った。その結果、one-pot 反応で目的とする化合物の合成を達成できた。NPrCAP-SH とデキストランマグネタイトを結合させるために、まず、デキストランマグネタイトをアミノシラン化剤であるアミノプロピルトリエトキシシラン (APTS) でアミノシラン化させた。一方、NPrCAP-SH を SUNBright MA-050-HS (PEG) と反応させ PEG 化した。両者をカップリングさせて目的とする NPrCAP/PEG/APTS/DNM を合成した。一方、NPrCAP の磁性体への結合量を測定した。つぎに、NPrCAP の薬剤と

しての効果を判定する上で、そのコントロール体を得る必要があった。コントロール体として、チロシナーゼの基質にならない NPr-2-S-CAP-SH を合成し、その 2-S-体とカルボキシメチルデキストランとの結合体を合成し実験に用いた。さらに、NPrCAP/PEG/APTS/DNM がチロシナーゼに対する良好な基質になるかどうかを、すでに報告した 4-S-CAP と NPrCAP/M のデータから比較した。

B. 研究方法および結果

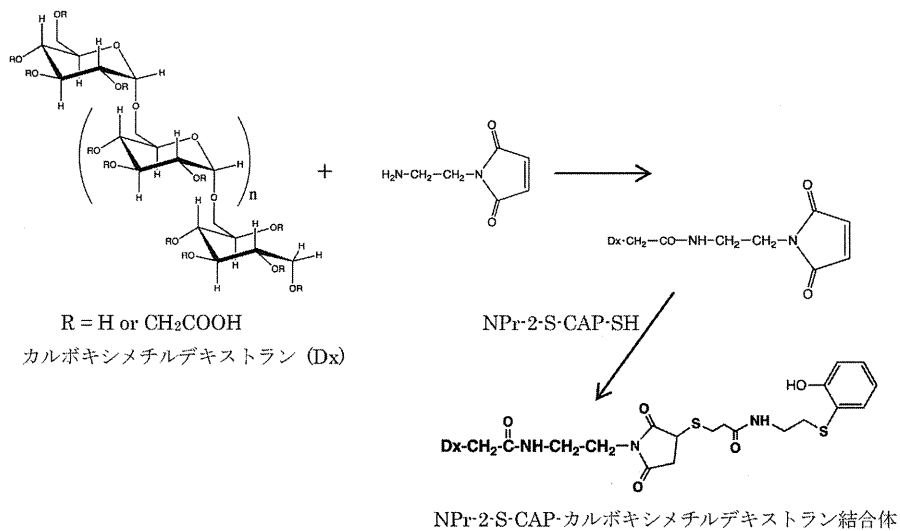
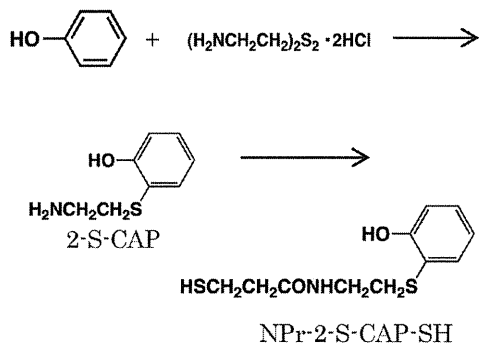
1) NPrCAP-SH の合成

Padgette らの文献 (J. Med. Chem., 27: 1354-1357, 1984) に従い、再結晶後 70% の収率で N-アセチル-4-S-CAP を得た。これを 6M 塩酸で 3 時間還流させ、再結晶後、目的物の 4-S-CAP を 80% の収率で得た。つづいて、4-S-CAP を



4-mercaptophenol と 2-methyl-2-oxazoline を 2 時間還流させ、再結晶後 70% の収率で N-アセチル 4-S-CAP を得た。これを 6M 塩酸で 3 時間還流させ、再結晶後、目的物の 4-S-CAP を 80% の収

率で得た。つづいて、4-S-CAP を DMF 中、3-メルカププロピオン酸、DCC、1-ヒドキシベンゾトリアゾールと室温で 1 時間反応させた。通常の後処理後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー、引き続き再結晶により 90% の収率で、NPr-4-S-CAP-SH を合成した。この 1 段階の反応により、目的とする化合物の安定した供給ができるようになった。NPr-4-S-CAP-SH をデキストランマグネタイトと結合させるために、まずデキストランマグネタイトを 3-アミノプロピルトリエトキシシラン (APTS) と反応させた。一方、NPr-4-S-CAP-SH を SunBright MA-050-HS (PEG) と反



応させたものを、さきに合成した DNM-APTS と 40℃、17 時間反応させ、目的とする NPrCAP/PEG/APTS/DNM を合成した。NPr-4-S-CAP の結合量は、1% フェノールを含んだ 6M-HCl で 110℃、1 時間加水分解させ、生成する 4-S-CAP を HPLC で定量した。

2) NPr-4-S-CAP-SH のコントロール化合物としての NPr-2-S-CAP-SH の合成

NPr-4-S-CAP-SH のコントロール化合物として構造異性体である NPr-2-S-CAP-SH の合成を行った。2-S-CAP はモノアミノオキシダーゼと反応せず、チロシナーゼの基質にならない化合物であることが知られている。文献既知の方法で、2-S-CAP を合成後、上記と同じように NPr-2-S-CAP-SH を 86% の収率で合成した。この化合物をカルボキシメチルデキストランと結合させ、NPr-2-S-CAP-カルボキシメチルデキストラン結合体を合成した。この結合体を 4-S-体のコントロール実験に使用した。

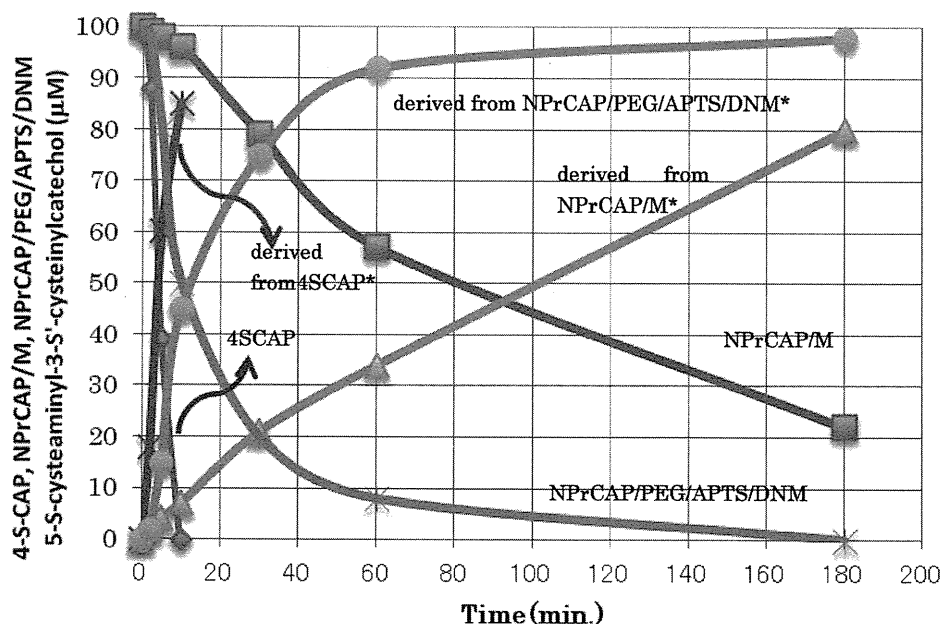
3) 4-S-CAP、NPrCAP/M と NPrCAP/PEG/APTS/DNM のチロシナーゼの基質としての反応性

NPrCAP/PEG/APTS/DNM のチロシナーゼに対する基質実験を行った。通常のチロシナーゼ活

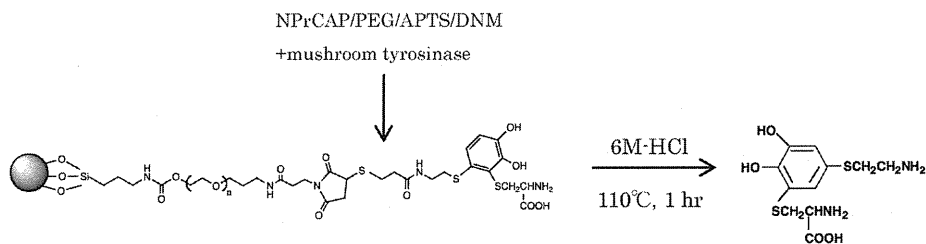
性を測定する方法は、比色法 (565 nm) を使用する。しかしながら、この方法は反応液が着色しているため使用できない。したがって、次に述べる方法で測定した。すなわち、NPrCAP 結合体をチロシナーゼ酸化し、経時的に反応液を分取し、反応液に 1% を含んだ 6M-HCl で 110℃、1 時間反応させた。生成する 5-S-システアミル-3-S'-システイニルカテコールを HPLC で分析した。その結果、コントロールに用いた 4-S-CAP の反応速度定数は、 0.17 min^{-1} であり、一方、NPrCAP/PEG/APTS/DNM のそれは 0.041 min^{-1} であった。なお、比較としてすでに文献に報告した NPrCAP/マグネタイト (M) は、 $8.5 \times 10^3 \text{ min}^{-1}$ であった。この結果から、NPrCAP/PEG/APTS/DNM はチロシナーゼの良好な基質となり、4-S-CAP と反応速度の比は、4.0 であることがわかった。NPrCAP/PEG/APTS/DNM が NPrCAP/DNM より良好なチロシナーゼの基質となったのは、側鎖が延長したために、芳香族環の立体障害が軽減されたこと、また分散性が増加したためと考えられた。

< 半減期 >

4-S-CAP: 4.2 min, NPrCAP/PEG/APTS/DNM: 17 min, NPrCAP/M: 82 min



* 5-S-システアミル-3-S'-システイニルカテコール



5-S-システアミル-3-S'-システイニルカタコール

< 反応速度定数 >

4-S-CAP: 0.17 min⁻¹, NPrCAP/PEG/APTS/DNM: 0.041 min⁻¹, NPrCAP/M: 8.5 x 10⁻³ min⁻¹

< 反応速度比 >

4-S-CAP/(NPrCAP/PEG/APTS/DNM): 4.0,
4-S-CAP/(NPrCAP/M): 19.5

Barak, O., Erickson, D.T., Meaney, J.F., Walsh, J.B., Cheng, K.C., Ito, S., Wakamatsu, K., Frudakis, T., Thomas, M., Brilliant, M.H. Predicting phenotype from genotype: normal pigmentation. *J. Forensic Sci.* 55, 315-322, 2010.

C. 考察および結論

本研究を遂行するために、原料となる化合物を大量にかつ迅速に提供することは、不可欠である。本年度は、その目的のために1段階で合成できる反応ルートを開発できた。さらに、本化合物(NPr-4-S-CAP-SH)のコントロール化合物としての2-S-体の合成も達成できた。さらに、本化合物がチロシナーゼの基質として良好であるかどうかの実験を行い、さきに報告したNPrCAP/マグネタイトとの比較から、それよりも良好な基質であることがわかった。今後は、GMPグレードの化合物を合成する必要がある、それに向けた反応経路、精製システムの構築をする必要がある。

3) Robinson, S., Dixon, S., August, S., Diffey, B., Wakamatsu, K., Ito, S., Friedmann, P.S., Healy, E. Protection against ultraviolet radiation involves MC1R-mediated non-pigmentary and pigmentary mechanisms in vivo. *J Invest. Dermatol.*, 130, 1904-1913, 2010.

4) Adachi, K., Wakamatsu, K., Ito, S., Matsubara, H., Nomura, K., Tanaka, H., Kato, K. A close relationship between androgen levels and eumelanogenesis in the teleost red seabream (*Pagrus major*): Quantitative analysis of its seasonal variation and effects of oral treatment with methyl testosterone. *Comp. Biochem. Physiol. Part A: Mol. Integr. Physiol.*, 156, 184-189, 2010.

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Singaravelan, N., Pavlicek, T., Beharav, A., Wakamatsu, K., Ito, S., Nevo, E. Spiny mice modulate eumelanin to pheomelanin ratio to achieve cryptic coloration in "Evolution Canyon," Israel. *Plos One*, 5, e8708, 2010.

2) Valenzuela, R.K., Henderson, M.S., Walsh, M.H., Garrison, N.A., Kelch, J.T., Cohen-

5) Jiang, S., Liu, X-M., Dai, X., Zhou, Q., Lei, T-C., Beermann, F., Wakamatsu, K., Xu, S-Z. Regulation of DHICA-mediated antioxidation by dopachrome tautomerase: implication for skin photoprotection against UVA radiation. *Free Rad. Biol. Med.*, 48, 1144-1151, 2010.

- 6) Hirobe, T., Kiuchi, M., Wakamatsu, K., Ito, S. Estrogen Increases Hair Pigmentation in Female Recessive Yellow Mice. *Zoological Sci.*, 27, 470-476, 2010.
- 7) Okuda, H., Wakamatsu, K., Ito, S. Regioselectivity on the cooxidation of 5,6-dihydroxyindole and its 2-carboxylic derivative from the quantum chemical calculations. *Chemical Physics Letters*. 2010.
- 8) Kempf, V., Wakamatsu, K., Ito, S., Simon, J.D. Imaging, chemical and spectroscopic studies of the methylation-induced decomposition of melanosome. *Photochem Photobiol.* 86, 765-771, 2010.
- 9) Endo, M., Beppu, H., Akiyama, H., Wakamatsu, K., Ito, S., Kawamoto, Y., Shimpo, K., Sumiya, T., Koike, T., Matsui, T. Agaritine purified from *Agaricus blazei* Murrill exerts anti-tumor activity against leukemic cells. *Biochim Biophys Acta*, 1800, 669-673, 2010.
- 10) Kadekaro, AL., Leachman, S., Kavanagh, R.J., Swope, V., Cassidy, P., Supp, D., Sartor, M., Schwemberger, S., Babcock, G., Wakamatsu, K., Ito, S., Koshoffer, A., Boissy, RE., Manga, P., Sturm, RA., Abdel-Malek, ZA. Melanocortin 1 receptor genotype: an important determinant of the damage response of Melanocytes to ultraviolet radiation. *The FASEB J*, 24, 3850-3860, 2010.
- 11) Sato, A., Tamura, Y., Sato, N., Yamashita, T., Takada, T., Sato, M., Osai, Y., Okura, 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.*, 101, 1939-1946 2010.
- 12) Peles, DN., Lin, E., Wakamatsu, K., Ito, S., Simon, J.D. Ultraviolet absorption coefficients of melanosomes containing eumelanin as related to the relative content of DHI and DHICA. *J. Phys. Chem. Lett.* 1, 2391-2395, 2010.
- 13) Panzella, L., Wakamatsu, K., Monfrecola, G., Ito, S., Ayala, F., Napolitano, A. Increased cysteinyl-dopa plasma levels hint to melanocyte as stress sensor in psoriasis. *Experimental Dermatology*, 2010.
- 14) Ito, S., Wakamatsu, K. Human hair melanins: What we have learned and have not learned from mouse coat color pigmentation. *Pigment Cell & Melanoma Res.* 24, 63-74, 2010.
- 15) Hirobe, T., Ito, S., Wakamatsu, K. The mouse pink-eyed dilution allele of the P-gene greatly inhibits eumelanin, but not pheomelanin synthesis as studied by chemical analysis. *Pigment Cell & Melanoma Res.* 24, 241-246, 2010.

2. 学会発表

- 1) 村瀬貴也、伊藤祥輔、若松一雅。ヒト脳内黒質に存在する黒褐色色素ニューロメラニンの生成過程の解明。第23回日本色素細胞学会学術大会、東京、11月27日、東京。
- 2) 奥田英和、若松一雅、伊藤祥輔、宗田孝之。量子化学計算からの5,6-dihydroxyindoleとそのカルボキシ誘導体のヘテロ二量体化機構。第23回日本色素細胞学会学術大会、東京、11月27日、東京。
- 3) 若林雄希、中島弘明、深澤勝則、若松一雅、芋川玄爾。グルコサミンは3次元ヒト表皮

モデルでエンドセリン-1/ステムセルファクター誘導色素沈着をメラノサイトでの CREB シグナルの減少により抑制する。第 23 回日本色素細胞学会学術大会、東京、11 月 27 日、東京。

- 4) 広部知久、吉原千尋、竹内栄、阿部宏之、若松一雅、伊藤祥輔、河陽子、相馬良直、溝口昌子。ルビーアイ 2 の新規突然変異遺伝子 (ru2d/Hps5d) はマウスのメラノサイトの分化を抑制し毛色を薄くするが、L-チロシンはその分化活性を回復させる。第 23 回日本色素細胞学会学術大会、東京、11 月 27 日、東京。
- 5) 菊池かな子、多田弥生、若松一雅、伊藤祥輔。尋常性白斑患者における Narrowband UVB 治療前後の血清 5-S-cysteinyl dopa 値について。第 23 回日本色素細胞学会学術大会、東京、11 月 28 日、東京。

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

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

中山 睿一 川崎医療福祉大学・教授

A. 研究目的

悪性黒色腫（以下、メラノーマ）は抗原性の強い腫瘍の一つとして知られている。1991年に Boon らによって、細胞傷害性 T 細胞（CTL: cytotoxic T-lymphocyte）が認識するがん抗原として MAGE（Melanoma antigen）が、ヒトメラノーマから初めて同定された。以来、メラノーマは強い免疫原性を持つ腫瘍として、様々な免疫学的解析が行われており、免疫療法の有効な対象疾患であると考えられている。

メラノジェネシスを標的とする製剤 NPrCAP を用いた化学温熱免疫（CTI: Chemo-Thermo-Immuno-）療法による効果的な抗メラノーマ免疫応答には、メラノーマ細胞の細胞死によるがん抗原の暴露、抗原提示細胞によるがん抗原提示、抗メラノーマ CTL の誘導・賦活化が必要となる。これまでに、NPrCAP- マグネタイト処理後磁場照射したメラノーマ細胞がネクローシスによる細胞死を起こすこと、また、CTI 療法により抗メラノーマ CTL が誘導されることが報告されている。本研究では、新規製剤 NPrCAP/PEG/DNM

（図 1）処理によって誘発される *in vitro* での殺細胞効果の検討をおこなった。また、NPrCAP- デキストラン（図 2）の免疫担当細胞への効果を解析することで、製剤そのもののアジュバント効果についても検討した。

B. 研究方法

1. NPrCAP/PEG/DNM によるアポトーシス誘導の検討

ヒトメラノーマ細胞株 SK-MEL-21、SK-MEL-37、M-1 および OU-MEL-1、対照としてヒト子宮頸癌細胞株 HaLa、あるいはヒト肺腺癌細胞株 OU-LC-KI を使用した。腫瘍細胞株を NPrCAP/PEG/DNM で 37℃、20 分処理し、遠心洗浄後、37℃で 48 時間培養した。培養後の細胞を アネキシン V、あるいはカスパーゼ 3 および 7-AAD で染色し、フローサイトメトリーによりアポトーシス細胞率を検出した。アポトーシスを起こしている細胞では、ホスファチジルセリン（PS）が細胞膜の細胞質側から外層側に移動する。

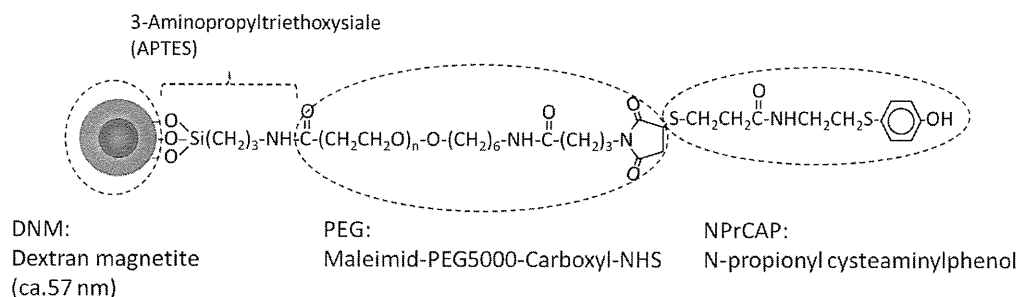
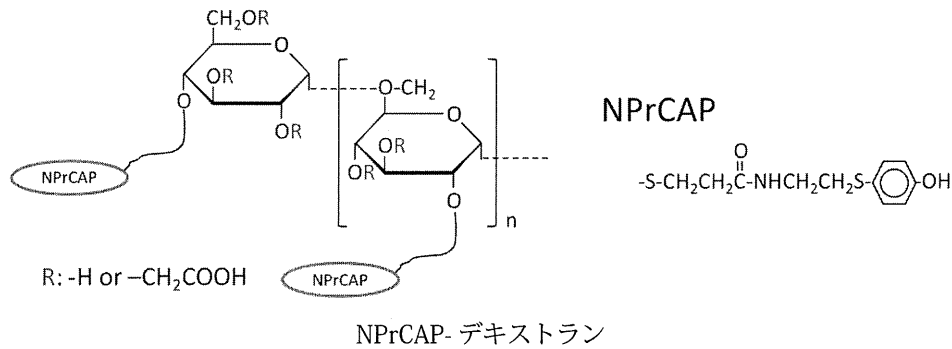


図 1 .NPrCAP/PEG/DNM



アネキシンVはPSに親和性を示すため、蛍光標識したアネキシンVによって細胞表面に発現したPSを検出することができる。また、アポトーシス誘導刺激に反応して、カスパーゼ3の活性化が起こる。活性カスパーゼ3は、阻害ペプチド配列に蛍光プローブを標識したもの (FITC-DEVD-fmk) で検出することができる。一方、7-AADは死細胞すべてを染色する。アネキシンVあるいはカスパーゼ3と7-AADを対染色することで、ネクローシス細胞とアポトーシス細胞を区別することができる。

2. NPrCAP- デキストランによるアジュバント効果の検討

健康人末梢血単核球由来の各種免疫担当細胞をNPrCAP- デキストランで刺激した。磁性ビーズを用いてCD3 (T細胞)、CD14 (単球)、CD19 (B細胞)、CD56 (NK細胞) 陽性細胞および、それ以外の細胞群に分離した。NPrCAP- デキストランを加えて、37°Cで1時間処理する。遠心洗浄

後、37°Cで48時間培養し、培養上清中の炎症性サイトカイン (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, TNF- α) をサイトカインビーズアレイあるいはELISAで測定した。特に活性型IL-1 β の分泌にはカスパーゼ1の活性化が必要となるため、活性カスパーゼ1阻害剤 (Z-YVAD-fmk) を用いて、反応の特異性を検討した。

C. 研究結果と考察

1. NPrCAP/PEG/DNMによるアポトーシス誘導の検討

ヒトメラノーマ細胞株SK-MEL-21、SK-MEL-37、M-1、OU-MEL-1において、NPrCAP/PEG/DNM処理群で対照のPBS処理群と比較してアネキシンV陽性細胞の増加がみられた。一方で、非メラノーマ細胞株であるHeLaおよびOU-LC-KIでは差がみられなかった (図3)。同様に、カスパーゼ3陽性細胞もメラノーマ細胞株においてのみ、観察された。以上の結果は、in vitroに

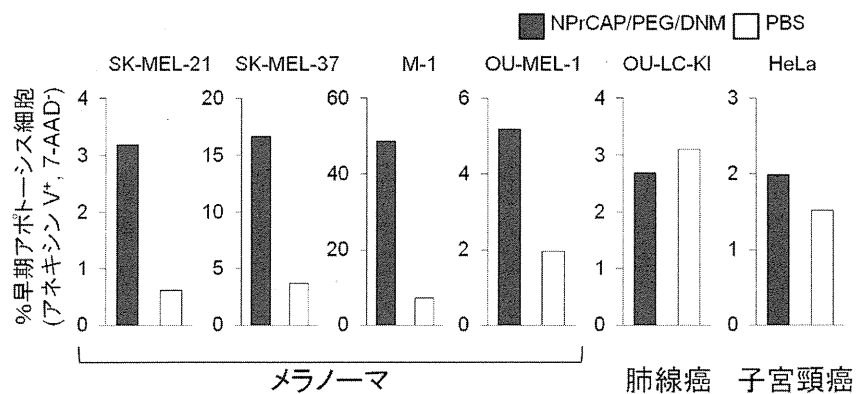


図3. NPrCAP/PEG/DNMによるアポトーシス誘導

において、ヒトメラノーマ特異的に製剤がアポトーシスを誘導することを示唆している。

これまでの研究で、B16F1 マウスメラノーマ細胞において、NPrCAPが活性酸素 (ROS: reactive oxygen species) の産生を介してアポトーシスを誘導することが明らかとなっている。今回の結果は、ヒトメラノーマにおいても同様の反応により、NPrCAP 単独でもアポトーシスを誘導できることを示唆している。生体内において、磁場照射によるネクローシスの誘導のみならず、製剤によるアポトーシス誘導により、効率的にメラノーマ細胞を傷害し、結果として抗メラノーマ CTL が誘導されることが期待される。

2. NPrCAP- デキストランによるアジュバント効果の検討

各免疫担当細胞を NPrCAP- デキストランで刺激した結果、CD14 陽性単球細胞においてのみ、IL-1 β 、IL-6、IL-8、TNF- α といった炎症性サイトカインの産生が観察された (図4)。

これらのサイトカインのうち、IL-1 β の分泌には NLR (NOD like receptor) ファミリーが関与することが知られている。IL-1 β はまず酵素前駆体として産生され、カスパーゼ1により活性化されて細胞外へ分泌される。カスパーゼ1 は NLR ファミリーに刺激が入ることによって形成されるインフラマソームにより活性化される。このこと

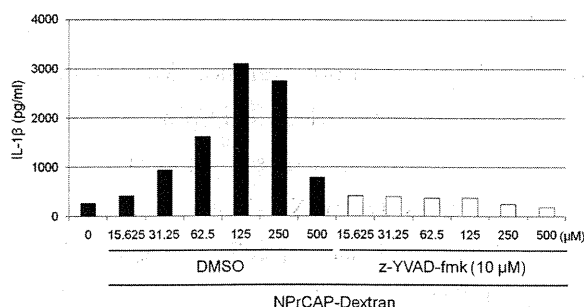


図5. カスパーゼ1阻害剤によるIL-1 β 分泌の抑制

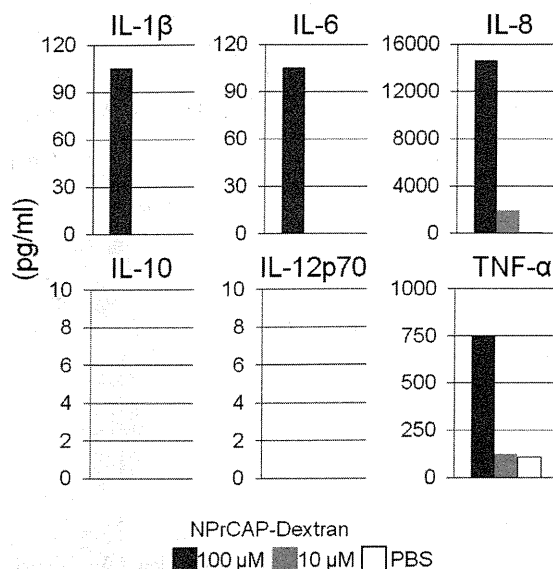


図4. CD14 陽性細胞の NPrCAP- デキストラン処理によるサイトカイン産生

から、NPrCAP- デキストランが NLR ファミリーのリガンドとして働いている可能性が示唆される。そこで IL-1 β に着目し、以下の実験を行った。CD14 陽性細胞に対し、活性カスパーゼ1 阻害剤 (Z-YVAD-fmk) 存在下で NPrCAP- デキストランを処理した結果、IL-1 β 分泌の抑制が観察された (図5)。

このことより、NPrCAP- デキストランの NLR レセプターへの関与が示唆された。

以上の結果から、局所における炎症系サイトカインの産生により、自然免疫系が賦活化されることが期待される。また、抗原提示細胞の T 細胞に対

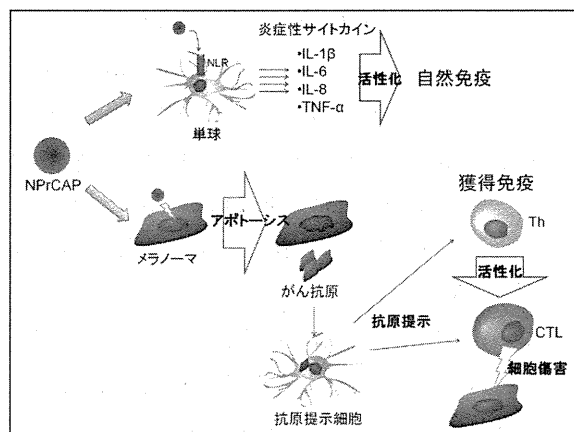


図6. NPrCAP 処理による免疫系の賦活化

する抗原提示能を高め、CTLのみならず、がん抗原特異的なヘルパーT細胞(Th)の誘導も期待される。結果として、自然免疫、獲得免疫双方の賦活化が起こり、より効率的にメラノーマ細胞を拒絶することが期待される(図6)。

D. 健康危険情報

E. 研究発表

1. 論文発表

1. Kakimi, K., Isobe, M., Uenaka, A., Wada, H., Sato, E., Doki, Y., Nakajima, J., Seto, Y., Yamatsuji, T., Naomoto, Y., Shiraishi, K., Takigawa, N., Kiura, K., Tsuji, K., Iwatsuki, K., Oka, M., Pan, L., Hoffman, E.W., Old, L.J., and Nakayama, E. A phase I study of vaccination with NY-ESO-1 peptide mixed with Picibanil OK-432 and Montanide ISA-51 in patients with cancers expressing the NY-ESO-1 antigen. *Int. J. Cancer*, 2011, in press.
2. Hanafusa, T., Ali Mohamed Ali ElDib, Kitaoka, K., Ohue, Y., Nakayama, E., and Ono, T. Isolation and characterization of human lung cancer antigens by serological screening with autologous antibodies. *Cancer Letter*, 301(1): 57-62, 2011.
3. Eikawa, S., Ohue, Y., Kitaoka, K., Aji, T., Uenaka, A., Oka, M., and Nakayama, E. Enrichment of Foxp3⁺ CD4 Tregs in migrated T-cells to IL-6- and IL-8-expressing tumors through predominant induction of CXCR1 by IL-6. *J. Immunol.*, 185(11): 6734-6740, 2010.
4. Mizote, Yu., Taniguchi, T., Tanaka, K., Isobe, M., Wada, H., Saika, T., Kita, S., Koide, Y., Uenaka, A., and Nakayama, E. Three novel NY-ESO-1 epitopes bound to DRB1*0803,

DQB1*0401 and DRB1*0901 recognized by CD4 T cells from CHP-NY-ESO-1-vaccinated patients. *Vaccine*, 28 (32): 5338-5346, 2010.

2. 学会発表

1. 和田 尚、垣見和宏、磯辺みどり、上中明子、珠玖 洋、Lloyd. J. Old、土岐祐一郎、中山睿一、NY-ESO-1 癌ワクチン(シンポジウム)、第14回 日本がん免疫学会(熊本)、2010年7月22~23日
2. 溝手 雄、上中明子、磯辺みどり、喜多祥一、和田 尚、中山睿一、NY-ESO-1 ワクチン患者におけるCD4 T細胞の反応解析、第14回 日本がん免疫学会(熊本)、2010年7月22~23日
3. 花房直志、北岡賢太、大植祥弘、中山睿一、小野俊朗、SEREX法による肺腺癌抗原の同定と発現解析、第14回 日本がん免疫学会(熊本)、2010年7月22~23日
4. 大植祥弘、榮川伸吾、溝手 雄、磯辺みどり、福田 実、上中明子、岡 三喜男、中山睿一、肺癌患者におけるXAGE-1b特異的T細胞の誘導とその解析、第14回 日本がん免疫学会(熊本)、2010年7月22~23日
5. 榮川伸吾、大植祥弘、磯辺みどり、池内一廣、上中明子、垣見和宏、岡 三喜男、中山睿一、NY-ESO-1 f-ペプチドワクチン投与患者におけるCD8 T細胞の免疫応答、第14回 日本がん免疫学会(熊本)、2010年7月22~23日
6. Yu Mizote, Akiko Uenaka, Midori Isobe, Shoichi Kita, Hisashi Wada., Eiichi Nakayama, Analysis of CD4 T cell responses from NY-ESO-1 vaccinated patients, 第69回 日本癌学会総会(大阪) 2010年9月22~24日
7. Tadashi Hanafusa, Kenta Kitaoka, Yoshihiro Ohue, Eiichi Nakayama, Toshiro Ono, Isolation and characterization of human lung cancer antigens by serological

- screening with autologous antigodies, 第69回 日本癌学会総会 (大阪) 2010年9月22～24日
8. Yoshihiro Ohue, Shingo Eikawa, Yu Mizote, Midori Isobe, Minoru Fukuda, Akiko Uenaka, Kazuhiro Kakimi, Mikio Oka, Eiichi Nakayama, CD4 and CD8 T cell responses against XAGE-1b antigen in non-small cell lung cancer patients, 第69回 日本癌学会総会 (大阪) 2010年9月22～24日
 9. Shingo Eikawa, Yoshihiro Ohue, Midori Isobe, Kazuhiro Ikeuchi, Akiko Uenaka, Kazuhiro Kakimi, Mikio Oka, Eiichi Nakayama, CD8 T cell response in NY-ESO-1 f-peptide vaccinated patient, 第69回 日本癌学会総会 (大阪) 2010年9月22～24日
 10. Junji Kawada, Hisashi Wada, Midori Isobe, Makoto Yamasaki, Hiroshi Miyata, Akiko Uenaka, Masaki Mori, Yuichiro Doki, Eiichi Nakayama, Heteroclitic serological response after NY-ESO-1 protein vaccination, 第69回 日本癌学会総会 (大阪) 2010年9月22～24日
 11. YOSHIHIRO OHUE, Shingo Eikawa, Yu Mizote, Hirofumi Matsumoto, Nami Okazaki, Midori Isobe, Akiko Uenaka, Mikio Oka, and Eiichi Nakayama, Spontaneous XAGE-1b Immunity in Patients with Non-Small-Cell Lung Cancer, INTERNATIONAL IMMUNOTHERAPY SYMPOSIA SERIES, CANCER IMMUNOTHERAPY 2010 (NEW YORK), 2010年10月6～8日
 12. SHINGO EIKAWA, Yoshihiro Oue, Midori Isobe, Kazuhiro Ikeuchi, Akiko Uenaka, Kazuhiro Kakimi, Mikio Oka, and Eiichi Nakayama, CD8 T Cell Respose in NY-ESO-1 f-Peptide Vaccinated Patients, INTERNATIONAL IMMUNOTHERAPY SYMPOSIA SERIES, CANCER IMMUNOTHERAPY 2010 (NEW YORK), 2010年10月6～8日
 13. 松本博文、磯辺みどり、中村洋一、大植祥弘、黒瀬浩史、池田征樹、阿部公亮、清水大樹、大藤 貴、毛利圭二、加藤茂樹、尾長谷 靖、宮下修行、小橋吉博、上中明子、永安 武史、中山睿一、岡 三喜男、肺癌の自然退縮と増悪における免疫学的な病態解析、第51回 日本肺癌学会総会 (広島) 2010年11月3～4日
 14. 大植祥弘、榮川伸吾、溝手 雄、磯辺みどり、福田 実、上中明子、中山睿一、岡 三喜男、肺癌患者における XAGE-1b 特異的 T細胞の誘導とその解析、第51回 日本肺癌学会総会 (広島) 2010年11月3～4日
 15. 榮川伸吾、大植祥弘、磯辺みどり、池内一廣、上中明子、和田 尚、垣見和宏、岡 三喜男、中山睿一、NY-ESO-1f ペプチドワクチン投与肺がん患者における CD8 T細胞の免疫応答、第51回 日本肺癌学会総会 (広島) 2010年11月3～4日
 16. 溝手 雄、上中明子、磯辺みどり、垣見和宏、岡 三喜男、中山睿一、NY-ESO-1 長鎖ペプチドワクチン投与患者における CD4 T細胞反応の解析、第51回 日本肺癌学会総会 (広島) 2010年11月3～4日

F. 知的財産権の出願・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 -NPr-4-S-CAPおよびNPr-4-S-CAP-dextran結合体の生物活性-

山下 利春 札幌医科大学皮膚科学講座 教授

要 旨

NPr-4-S-CAP と NPr-4-S-CAP-dextran の生物学的、生化学的機能の解析を行い、NPrCAP 化合物のアポトーシス誘導活性の有無を検討した。NPr-4-S-CAP 1mM は B16F1 細胞に ROS を産生し、増殖抑制とアポトーシス誘導を起こしたが、NPr-4-S-CAP-dextran 3.0 mM は B16F1 細胞の増殖を抑制しなかった。NPr-4-S-CAP による B16F1 細胞に対するアポトーシス誘導と活性酸素産生は相関傾向を示した。

A. 研究背景と目的

N-propionyl-4-S-cysteaminylphenol (NPrCAP-4-S-CAP) はメラノーマ細胞にアポトーシスを誘導する化学療法薬としての生物学的活性と、遠隔転移に相当する二次腫瘍の増殖を抑制する細胞免疫誘導能を有する。マウス B16F1 細胞を NPrCAP-4-S-CAP 1 mM で 1 時間処理し、CM-H2DCFDA (Invitrogen) で活性酸素 (reactive oxygen species: ROS) を測定すると、B16F1 細胞では、線維芽細胞ではみられない ROS の著明な増加が認められる。NPrCAP-4-S-CAP よって誘導される B16F1 細胞の細胞死は caspase 3 の活性化と DNA 断片化を伴うアポトーシスであることが示された。従って、NPrCAP-4-S-CAP がメラノーマ細胞のメラニン合成系に取り込まれ、細胞内 ROS の増加によってアポトーシスが誘導される機構が示唆される。NPrCAP-4-S-CAP による ROS 発生はメラニン合成系をもつメラノサイト系細胞で特異的に起こると推測されるが、マウス T リンパ腫 RMA においても、NPrCAP-4-S-CAP によりアポトーシスが誘導される。

以上の実験結果より、1) NPrCAP-4-S-CAP によるアポトーシスの誘導はメラニン合成系をもつ細胞に特異的あるいは選択的に認められる、2) メラノサイト系細胞では、他の細胞系に比べて ROS に対する防御機構の発現が低下している、の 2 つの可能性が考えられる。本研究では、NPr-4-S-CAP、NPr-4-S-CAP-dextran、低活性コントロールの NPr-2-S-CAP、NPr-2-S-CAP-dextran の、正常細胞に対する生物学的、生化学的機能の解析を行い、各種細胞に対する NPrCAP 化合物のアポトーシス誘導活性の有無を検討し、メラノサイトの酸化ストレス応答系のシグナル伝達系の解析を行う。

B. 研究材料と方法

NPr-4-S-CAP を propylene glycol に溶解して 103 mM のストック液を作製した。NPr-2-S-CAP 103 mM、NPr-4-S-CAP-dextran (28.3 nmol/mg)、NPr-2-S-CAP-dextran (1.2 nmol/mg) は、藤田保健衛生大学の若松一雅博士と名糖産業(株)名古屋研究所の野原 聡研究員および玉井梨絵研究員

が合成したものをを用いた。細胞はNH3T3 (mouse fibroblast cell line)、B16F1 (mouse melanoma cell line)、tig118 (human normal fibroblast cells)、正常ヒト表皮メラノサイト、色素性ヒトメラノーマ細胞株 MM418、無色素性メラノーマ細胞株 SK-mel-24 を用いた。細胞を 6cm デイッシュに培養し、NPr-4-S-CAP-dextran と NPr-2-S-CAP-dextran 添加培地で 1 時間培養し培地を換え 24 ~ 48 時間後の細胞数と ROS 量を測定した。

C. 研究結果

1. NPr-4-S-CAP-dextran の生物活性 新しく合成された dextran 結合型結 NPr-4-S-CAP の生物活性の検討を行った。B16F1 細胞は 1 ~ 3 mM の NPr-4-S-CAP-dextran 処理によって増殖抑制されなかった。Dextran free の NPr-4-S-CAP 1mM は B16F1 細胞の増殖を抑制しアポトーシスを誘導したが、今回用いた NPr-4-S-CAP-dextran 3.0 mM は B16F1 細胞の増殖を抑制しなかった。
2. ROS 産生とアポトーシス NPr-4-S-CAP は B16F1 細胞の増殖を抑制するが、正常ヒト表皮メラノサイト、無色素性メラノーマ細胞 SK-mel-24、色素性ヒトメラノーマ細胞 MM418 に対する増殖抑制効果は著明ではなかった。B16F1 細胞は NPr-4-S-CAP により活性酸素を産生するが、色素性ヒトメラノーマ細胞 MM418 における活性酸素の産生は著明ではなかった。NPr-4-S-CAP による細胞増殖抑制 (アポトーシス誘導能) と活性酸素産生は相関傾向を示した。

D. 考察

今回用いた NPr-4-S-CAP-dextran 3.0 mM は、置換度 28.3 mM より求めると、NPr-4-S-CAP 0.85 mM に相当する。NPr-4-S-CAP 1 mM でアポトーシスが誘導されることから、dextran を結合した構造は、同じモル濃度でも生物活性が低下する可能性が示唆される。

細胞の酸化ストレス防御機構として、Keap1-

Nrf2 システムが注目されている。Keap1 の酸化修飾により、Nrf2 のユビキチン化が低下し新規合成された Nrf2 が核へ移行し、Antioxidant response element をもつ抗酸化遺伝子群や解毒代謝遺伝子群 (HO-1、NQO-1、GCL、GST) が活性化する。

NPr-4-S-CAP が、非メラノサイト系細胞においても ROS 産生とアポトーシス誘導に関係するのかどうかに興味をもたれる。また、H₂O₂ 刺激と NPrCAP 刺激によるメラノサイト系細胞の酸化ストレス応答シグナルと下流の細胞遺伝子の発現を比較検討することにより、メラノサイト系細胞とメラノーマにおける酸化ストレス応答系の特性を明らかにしたい。

E. 研究業績

1. Yoneta A, Horimoto K, Nakahashi K, Mori S, Maeda K, and Yamashita T: A case of cystic basal cell carcinoma which shows a homogenous blue/black area under dermatoscopy. *J Skin Cancer* vol 2011, Article ID 450472, 4 pages, 2011.
2. Yamashita T, Osai Y, Nishizaka N, Hida T: Varicella-zoster virus. *Nippon Rinsho* 68 Suppl 6:310-313, 2010 [Article in Japanese].
3. Toyota M, Suzuki H, Nishizaka T, Sato A, Yamashita T: Molecular mechanisms involved in epigenetic alterations in cancer. *Gan To Kagaku Ryoho* 37 (9): 1650-3, 2010 [Article in Japanese].
4. Sato A, Tamura Y, Sato N, Yamashita T, Takada T, Sato M, Osai Y, Okura 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* 101(9): 1939-46, 2010.
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* 30 (5): 349-57, 2010.
 6. 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.
 7. 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.
 8. Yamashita T, Yoneta A, Hida T: Macrophage inhibitory cytokine-1: a new player in melanoma development. *J Invest Dermatol* 129: 262-264, 2009.
 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* 129: 2233-2241, 2009.

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療法で誘導されるTILのTCR解析

井藤 彰 九州大学工学研究院・准教授

A. 研究目的

CTI療法において誘導される腫瘍免疫においては、磁性ナノ粒子の発熱に伴う温熱療法とNPrCAPによるメラノジェネシス標的型化学療法の併用により誘導される細胞死に伴う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。本研究では、このCTI (Chemo-Thermo-Immuno-) 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の質的および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。

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CTLの量的および質的解析を行った。具体的には、所属リンパ節を規定するためにマウスフットパッドに腫瘍を移植し、(日)CTI療法を行った後の所属リンパ節のサイズ測定、(月)フローサイトメトリーによるリンパ節内のCD8陽性T細胞数の測定、(火)腫瘍内CD8陽性T細胞の免疫染色、といった量的解析、およびCTI療法を行ったマウスの所属リンパ節または腫瘍内のCD8陽性T細胞のT細胞レセプター (T cell receptor, TCR) のレパトワ解析を行った。

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A20-180「磁性ナノ粒子を用いたがん温熱免疫療法の開発」）。

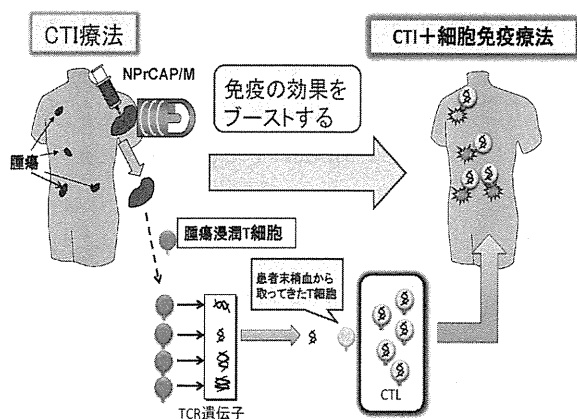


図1 研究戦略

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 (5×10^5) を C57/BL6 マウスのフットパッドに皮下移植し、3日後 (day3) に NPrCAP/M (40 mg/ml, 0.05 ml) を腫瘍内に注入し、高周波磁場照射 (120 kHz, 386 Oe) を行った。磁場照射時間は1日1回 43°C、30分で行った。磁場照射中の腫瘍表面温度と直腸温度は光ファイバー温度計を用い

て測定した。この一連の操作を1日置きに3回行った(図2)。治療後、day14に腫瘍を切除して、腫瘍の重量測定を行い、OCTコンパウンド(サ

抽出した腫瘍もしくはリンパ節から、RNA抽出キット(タカラバイオ)を使用してRNAを抽出した。抽出したRNAに対して

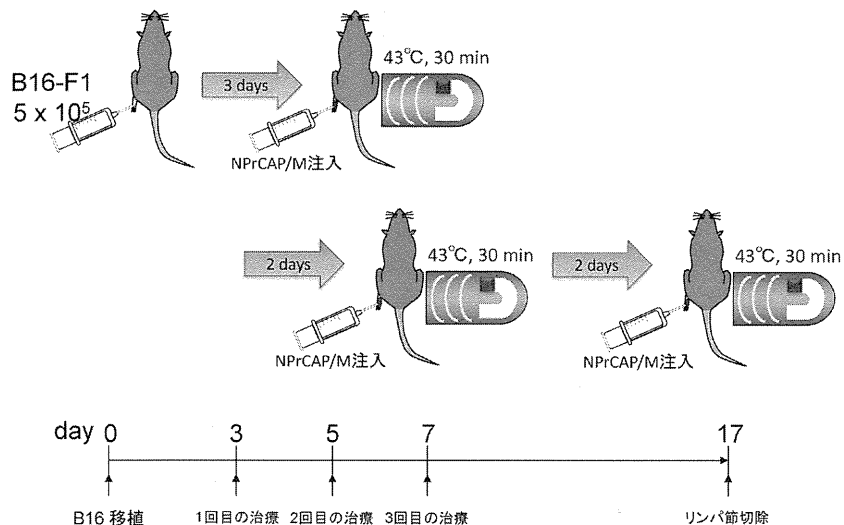


図2 治療実験スキーム

クラファインテックジャパン)を用いて凍結固定し、薄切切片を作製して抗CD8抗体染色による免疫組織学的解析を行った。

所属リンパ節からのリンパ球の単離

マウスに麻酔を施した後、染色するリンパ節がある側の足の裏に1% Evans Blue (Sigma)を25 μ l皮下注射し、15分間静置することでリンパ節を青色に染色した。ハサミとピンセットを用いて青色を呈している鼠径部のリンパ節を切除した。切除したリンパ節はPBSの上で血液を十分に洗い落とし、付着した脂肪を丁寧に切り除いた。切除したリンパ節を5mlのMACS buffer (Miltenyi Biotec)に懸濁、gentleMACS Dissociator (Miltenyi Biotec)を用いて分散し、細胞懸濁液を作製した。細胞懸濁液を遠心チューブに移し、4°C, 300 \times g, 10分間の条件で遠心分離することでリンパ球を得た。得られたリンパ球について、抗CD8抗体を使用して、フローサイトメトリーにより陽性細胞数を計測した。

TCR V β ファミリーレパトワ解析

SuperTCRExpress Mouse T Cell Receptor V β Repertoire Clonality Detecting Kit (BioMed Immunotech)を用いて、TCR V β ファミリーレパトワ解析を行った。操作はキットのプロトコールに従って行った。逆転写反応は50分間42°Cで処理することで行った。94°Cで3分間反応させた後、94°Cで30秒、55°Cで30秒、72°Cで45秒を1サイクルとし、35サイクル繰り返し、その後72°Cで5分間処理した。2段階目のPCRのために、Taq DNA polymeraseを用いて、95°Cで3分間反応させた後、95°Cで30秒、58°Cで30秒、72°Cで30秒を1サイクルとし、30サイクル繰り返し、その後72°Cで5分間処理した。電気泳動に用いるゲルはSuperTCRExpress Mouse T Cell Receptor V β Repertoire Clonality Detecting Kitを使用して作製した。4%アガロースゲルにエチジウムブロマイドを最終濃度が0.5 μ g/mlになるように入れ、均一になるように攪拌した。ゲル型に流しこみ、20分間室温で静置することで固化させた。ゲルの左端のウェルには10bpのDNAスタンダードをマーカーとして入れた。各ウェルにサンプルを