

入れ、150Vで1.5時間電気泳動を行い、TCR V β にどのようなレパトワがあるか調べた。電気泳動は、サブマリニアガロースゲル電気泳動装置(マリソル)を用いて行った。

IFN- γ 分泌細胞解析

90%コンフルエントまで増殖したB16F1細胞を、最終濃度が10 μ g/mlになるようにマイトマイシンCを添加したDMEM培地で3時間培養した。培地を除いた後、PBSで十分に洗い、最終濃度が100 units/mlになるようにIFN- γ を添加したDMEMで48時間培養することで、B16F1細胞のMHCクラスIの発現を誘導した。その後、リンパ節から採取した細胞を5 \times 10⁵~2 \times 10⁶ cells/mlになるように調製し、RPMI培地で5日間培養し、B16F1細胞を抗原とする再刺激を行った。培養中は2日おきに半分量の培地交換を行った。5日後に激しくピペティングすることで細胞を回収した。IFN- γ 分泌細胞の解析はMouse IFN- γ Secretion Assay kit(Miltenyi Biotec)を用いて実験を行った。回収したリンパ球を遠心分離し、洗浄後、細胞を45分間、5%CO₂, 37 $^{\circ}$ Cのインキュベーターで培養し、癌抗原特異的なIFN- γ を産生させた。抗CD8-PerCP抗体(Miltenyi Biotec)を10 μ lと抗TCR V β 7-FITC抗体(Abcam)あるいは抗TCR V β 11-FITC抗体(BD Pharmingen)を10 μ l加え、氷上かつ容器の蓋を閉めることで暗所に保ち、抗体反応を開始した。5-15分後、Mouse IFN- γ Detecting Antibody(Miltenyi Biotec)を20 μ l加え、さらに10分間氷上、暗所で反応させた。抗体反応終了後、10mlの4 $^{\circ}$ CのRPMI培地を加え、遠心分離し、上清を取り除いた。細胞を500 μ lのPBSに懸濁し、フローサイトメーターを用いて解析することで、IFN- γ を産生する細胞のポピュレーションを調べた。

C. 研究結果と考察

メラノーマ担癌マウスにNPrCAP/Mを注入

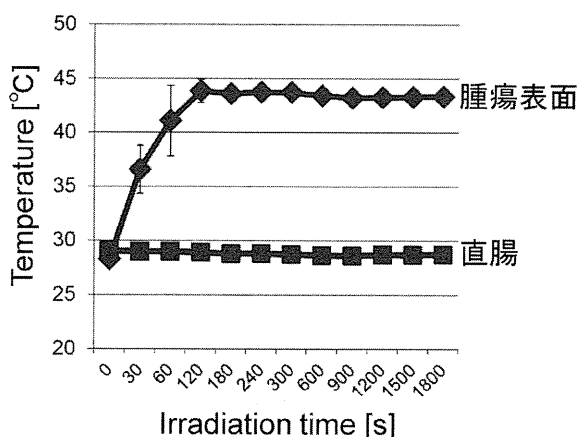


図3 磁場照射中の腫瘍表面温度変化

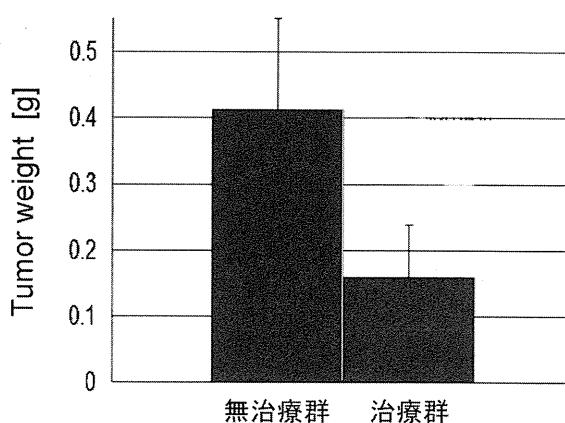


図4 腫瘍重量の比較

後、磁場照射を行うことで、フットパッド腫瘍表面温度が上昇し、2分後に43 $^{\circ}$ Cに到達した(図3)。この温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。

磁場照射を1日おきに3回行い、治療開始から14日後の腫瘍の重さを測定することで、温熱療法の治療効果を調べた(図4)。コントロールとして無治療の担癌マウスと比較して、治療を行ったマウスにおいて、有意に腫瘍が縮小する結果となった。以上のことから、CTI療法の治療効果について実証された。

治療開始から14日後において、右足に移植した腫瘍の所属リンパ節である右半身鼠径部リンパ節が、左半身の鼠径部リンパ節と比較して肥大し

ていることを確認した (図 5A)。このリンパ節のサイズを測定し、さらに無治療担癌マウスと比較したところ、CTI 療法を施したマウスでリンパ節が肥大化していることが分かった (図 5B)。また、この所属リンパ節を破碎し、細胞懸濁液を作製、CD8 陽性 T 細胞の数を治療マウスと無治療

さらに、CD8 陽性 T 細胞の質的な変化を調べるために、腫瘍に浸潤した T 細胞と所属リンパ節の TCR V β ファミリーのレパトワ解析を行った。ナイーブマウスのリンパ節においては、ほぼ全ての TCR V β ファミリーをもつ CD8 陽性 T 細胞が存在していることが分かった (図 7)。一

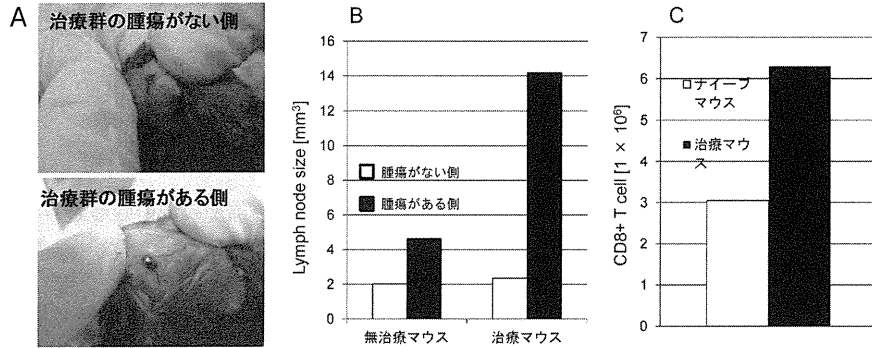


図 5 所属リンパ節の解析

マウスと比較したところ、治療を行ったマウスで CD8 陽性 T 細胞数が増大していることが分かった (図 5C)。これらの結果から、CTI 治療により免疫が誘導され、所属リンパ節の CD8 陽性 T 細胞数が増幅されたと考えられる。

この結果を受けて、B16 腫瘍に浸潤する CD8 陽性 T 細胞の量的解析として、抗 CD8 抗体を用いた免疫組織化学的検討をおこなったところ、治療群にのみ、腫瘍辺縁から浸潤している CD8 陽性 T 細胞が見られた (図 6)。しかしながら、B16 メラノーマ細胞は免疫原性が非常に低い細胞であり、腫瘍内に浸潤する T 細胞は僅かであった。この結果は、昨年度に解析した腹部担癌モデルマウスを用いた実験結果と一致した。

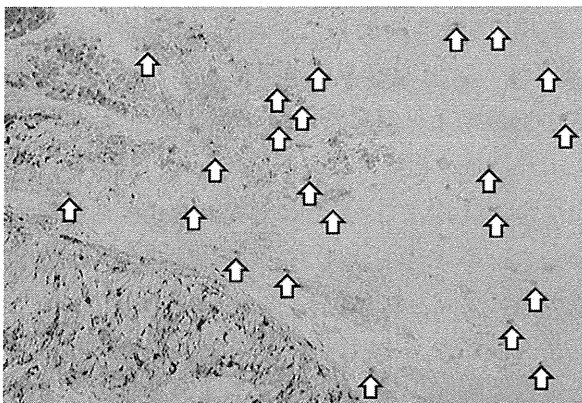


図 6 腫瘍浸潤 CD8 陽性 T 細胞 (矢印) の免疫組織化学的染色。

方で、CTI 療法を施した腫瘍の所属リンパ節では、TCR V β ファミリーのレパトワがやや限定された (図 7)。さらに、CTI 療法を施した腫瘍に浸潤してきた CD8 陽性 T 細胞の TCR はさら

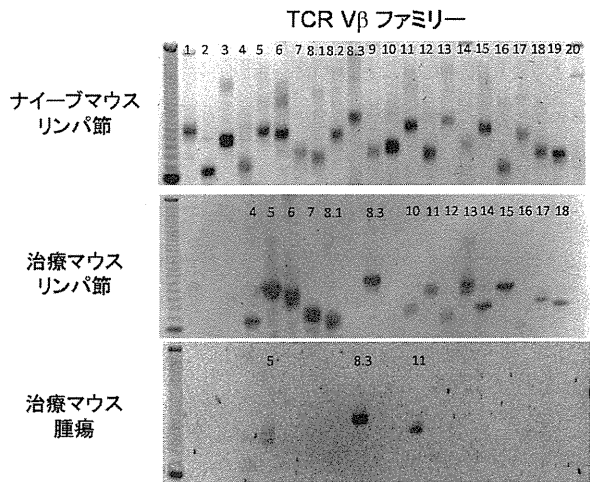


図 7 CTI 療法で誘導される CD8 陽性

に限定され、オリゴクローナルに増幅されていることが分かった (図 7)。その中でも、複数回の実験で V β の発現が確認されたことから、TCR V β を発現する CD8 陽性 T 細胞が CTI 療法により活性化され、腫瘍を攻撃するために浸潤している細胞の一つではないかと考え、以降の実験では TCR V β に着目した。

TCR V β 11 を発現する CD8 陽性 T 細胞が B16F1 細胞特異的に活性化されているかを調べるため、B16F1 細胞と共培養することで、腫瘍特異的な IFN- γ 産生能を調べた。腫瘍に浸潤した T 細胞では解析に必要な細胞数を得ることが難しいため、同様の性質を持つ T 細胞が存在していると考えられる所属リンパ節から細胞を取得して実験を行った。治療開始から 14 日後のマウスからリンパ節を切除し、細胞懸濁液を作製、それを IFN- γ 処理することで MHC-I を発現させた B16F1 細胞と共培養することで、抗原による再刺激を与えた。TCR V β 11 のコントロールとして、腫瘍内への浸潤が確認されなかった TCR V β 7 についても調べた。共培養後に回収したサンプルに対し、IFN- γ とリンパ球の両方に結合する抗体 (Mouse IFN- γ Catch Reagent) を反応させることで、IFN- γ 産生細胞を捕捉した。さらに、抗 IFN- γ -PE 抗体、抗 CD8-PerCP 抗体、抗 TCR V β 11-FITC 抗体あるいは抗 TCR V β 7-FITC 抗体を反応させることで、IFN- γ を産生し、かつ目的の TCR V β ファミリーを発現する細胞を同時に蛍光染色して、フローサイトメトリーにて解析した。この解析結果をもとに、IFN- γ を産生する全細胞集団と、IFN- γ を産生し、かつ目的の TCR V β ファミリーを発現する細胞集団の割合から、IFN- γ を産生する全ての細胞のうち、どれだけの細胞が TCR V β 11 あるいは TCR V β 7 を発現するか調べた (図 8)。その結果、IFN- γ を産生する細胞のうち 80% が TCR V β 11 を発現することが分かった。これ

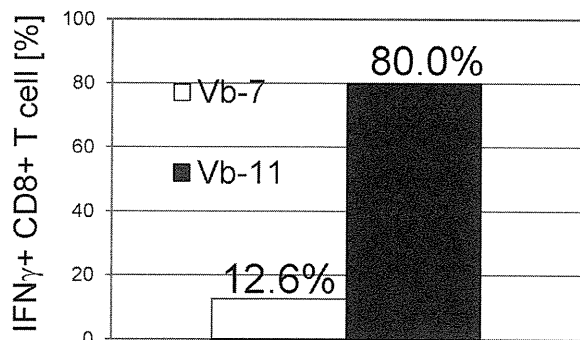


図 8 腫瘍特異的な IFN- γ 産生細胞の割合

らの結果から、TCR V β 11 を発現する細胞が B16F1 細胞特異的に細胞傷害性を発揮していることが示唆された。

以上の結果から、CTI 療法によって、所属リンパ節が肥大すること、腫瘍内において TIL はオリゴクローナルに増幅され、特に TCR V β 11 を発現する細胞が B16F1 細胞特異的に細胞傷害性を発揮していることが示唆された。

D. 健康危険情報

E. 研究発表

1. 論文発表

1. Akiko Sato, Yasuaki Tamura, Noriyuki Sato, Toshiharu Yamashita, Tomoaki Takada, Makito Sato, Yasue Osai, Masae Ohkura, Ichiro Ono, Akira Ito, Hiroyuki Honda, Kazumasa Wakamatsu, Shosuke Ito and Kowichi Jimbow, Melanoma-Targeted Chemo-Thermo-Immuno (CTI)-therapy Using N-propionyl-4-S-cysteaminylphenol-Magnetite Nanoparticles Elicits CTL Response Via Heat Shock Protein-Peptide Complex Release. Cancer Science 101(9):1939-1946 (2010)

2. 学会発表

- 井藤 彰、磁性ナノ粒子を用いた癌治療技術、日本磁気学会第 176 回研究会 第 37 回ナノバイオ磁気工学専門研究会、2011 年 1 月 21 日
- 井藤 彰、磁性ナノ粒子を用いた磁場誘導加温型がん温熱療法の開発、平成 22 年度日本伝熱学会九州支部講演会、2011 年 3 月 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[田村1]労働科学研究補助金（医療機器開発推進研究事業） 分担研究報告書

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

分担研究者 田村保明 札幌医科大学病理学第1講座 講師

研究の要旨

我々はメラノーマ細胞に選択的にとりこまれ細胞内発熱効果をもつ NPrCAP/M を用いて選択的にメラノーマ細胞を温熱する Chemo-Thermo-Immuno (CTI) Therapy の基礎的・臨床的検討を行っている。本治療法では、NPrCAP による化学療法効果およびマグネタイトによる温熱療法効果により、抗メラノーマ腫瘍免疫応答も誘導されていることを報告してきた。すなわち NPrCAP/M を用いたメラノーマ温熱が HSP の up-regulation を介して腫瘍免疫を誘導することが示唆された。さらに重要なことは、腫瘍由来の HSP には腫瘍抗原ペプチドが結合しており、この HSP-ペプチド複合体が樹状細胞などの抗原提示細胞によりクロスプレゼンテーションされ、特異的な T 細胞応答を誘導することを示してきた。この CTI 療法により誘導された抗腫瘍免疫応答を維持・増強することはメラノーマの根治を目指す上で最重要課題である。NPrCAP は、メラノサイトおよびメラノーマ細胞に選択的に取り込まれ、酸化ストレスを誘導することによりアポトーシス細胞死を誘導する。本研究では、マグネタイトが付加されていない NPrCAP 単独投与による抗腫瘍効果と免疫誘導効果について検討を行った。あらかじめ NPrCAP をマウスに腹腔内投与しておく、正常メラノサイト細胞死を介する抗メラノーマ免疫応答が誘導され、後のマウスメラノーマ接種に対して、強い抗腫瘍効果を認めた。またメラノーマ腫瘍内に NPrCAP を投与すると、腫瘍の増殖抑制効果に加え、抗メラノーマ免疫応答をも誘導することを示した。さらに NPrCAP と樹状細胞を併用すると、さらに強い抗腫瘍効果を認めた。この免疫応答は、樹状細胞が細胞死をおこしたメラノーマ腫瘍を取り込み、腫瘍抗原をクロスプレゼンテーションすることで、細胞障害性 T 細胞を誘導することによることを示した。このように NPrCAP を腫瘍内に投与することで、局所の抗腫瘍効果に加え、全身的抗メラノーマ免疫応答を誘導できることから、CTI 療法の免疫維持・強化療法として NPrCAP 腫瘍内投与の有効性が示された。

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。これまでの検討で NPrCAP は、メラノサイトおよびメラノーマ細胞に選択的に取り込まれ、酸化ストレスを誘導することによりアポトーシス細胞死を誘導することを明らかにしている。そこ

で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 の腫瘍内投与による抗腫瘍効果および抗メラノーマ免疫誘導効果を検討する。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 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の解析として、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。またNPrCAPはメラノーマ細胞選択的にアポトーシスを誘導するため、腫瘍内にNPrCAPと樹状細胞を投与することで、アポトーシス細胞を取り込んだ樹状細胞によるクロスプレゼンテーションを介する免疫応答を誘導できる可能性を検討する。

1) 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

NPrCAPを投与することによるメラノサイト細胞死を介する抗メラノーマ免疫応答につき検討する。具体的にはメラノーマ分化抗原、すなわちTRP-2、gp100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。またこのマウスにおける抗腫瘍効果を検討する。

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) NPrCAP全身投与至適量の決定

B16F1皮下腫瘍に対して、NPrCAPの全身投与を行う際の、至適投与量を決定する。

B. 研究方法

1) NPrCAP全身性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C57/BL6マウスにNPrCAP(100 μg/100 μl)を腹腔内投与する。コントロールとして溶媒であるプロピレングリコールを100 μl投与した。薬剤の直接効果を除外し、かつ免疫学的記憶効果を確認する目的で、90日後に、同系のマウスメラノーマ細胞B16F1細胞を5x10⁵個移

植し、その腫瘍径を週2-3回測定した。メラノーマ特異的免疫応答の検討には、メラノーマ分化抗原である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を用いて検討を行った。

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。この際、100 μg, 250 μg, 500 μgと投与量を変えて投与し、至適投与量を決定した。この際、薬物による副作用を検討するために、マウスの諸臓器を採取し、組織学的に検討した。

3) NPrCAPと樹状細胞の腫瘍内投与による抗腫瘍効果の検討

NPrCAPと骨髄由来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学的効果の比較検討を行う。

具体的には抗原提示能を検討する目的で、Ovalbumin (OVA)を発現するB16F1メラノーマ細胞(B16OVA)を用いて実験を行った。1x10⁶個のB16OVAをC57BL/6マウスの皮下に移植し、担瘤マウスを作成した。第12, 14日目に腫瘍内にNPrCAP(100 mg)を局所注射し、第13, 15日目に骨髄細胞から誘導した1x10⁶個の樹状細胞を腫瘍内投与し、その腫瘍径を週2-3回測定した。腫瘍拒絶したマウスに対しては、さらにB16OVAを再移植し、腫瘍拒絶効果を検討した。腫瘍径は1日おきに測定した。次に治癒したマウスから脾臓を摘出し、放射線照射したB16OVAメラノーマ細胞と一緒に5日間培養した。5日後、⁵¹Cr release assayを行った。標的細胞はB16-OVA、B16F1、EL4、YAC-1そしてOVA由来のペプチドであるSL8をパルスしたEL4を用いた。

4) アポトーシスメラノーマ細胞の樹状細胞による抗原提示の検討

B16OVA細胞にNPrCAP(20 mM)を添加培養

し、アポトーシスを誘導し、これと骨髄由来樹状細胞と6時間混合培養した。その後、CD11c MACS 磁気ビーズ (Miltenyi Biotec) を用いて、樹状細胞 (1×10^5) を精製し、OVA 特異的な CD8⁺ T細胞 B3Z (1×10^5) と共培養を行い、24時間後 CPRG (Roche) を加え、吸光度 595 nm を測定することによりその反応性を検討した。

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 C57/BL6 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 A, B, C)。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 (図 1D)。さらにこの CTL はマウスのメラノーマ抗原である TRP-2 由来の抗原ペプチドを認識した (図 1D)。一方、human gp100 もマウスの CTL を誘導することが知られているが、このペプチドは認識しなかった。これに対し T細胞を欠くヌードマウスを用いて、同様の検討を行ったが、NPrCAP 前投与による B16F1 メラノーマ細胞の増殖抑制効果は観察されなかった。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。

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。この際、100 μ g, 250 μ g, 500 μ g と投与量を変えて投与し、至適投与量を決定した。250 μ g の NPrCAP を 2 回腹腔内投与した群で、最もよい 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)。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 250 μ g 静脈内投与を合計 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。

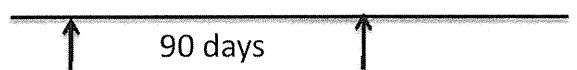
4. NPrCAP と樹状細胞の腫瘍内投与は、著明な抗腫瘍効果を示し、細胞障害性 T細胞を誘導する。

B16OVA を 1×10^6 個 C57BL/6 マウスに移植し、腫瘍径が 4-5 mm になる 12 日目と 14 日の 2 回、NPrCAP を 24.4 μ g 腫瘍内に投与し、15 日目に 1×10^6 個の骨髄より培養誘導した樹状細胞を腫瘍内に投与した。NPrCAP (CAP) と DC を腫瘍内に投与した群では、PBS 投与群 (control) と比較して、明らかな腫瘍増殖抑制効果を認めた。また DC 単独投与群および NPrCAP 単独投与群でもコントロールと比較して抗腫瘍効果を認めたが、NPrCAP と DC の併用群が最も強力な抗腫瘍効果を示した (図 3 A)。NPrCAP と DC の併用によって腫瘍の完全退縮を認めたマウスに、B16OVA を再移植すると、完全に (100%) B16OVA を拒絶した (図 3 B)。一方、ナイーブマウスに B16OVA を移植した群では、100% 腫瘍

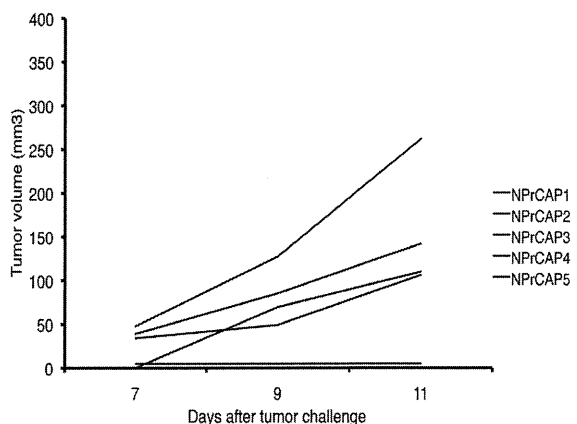
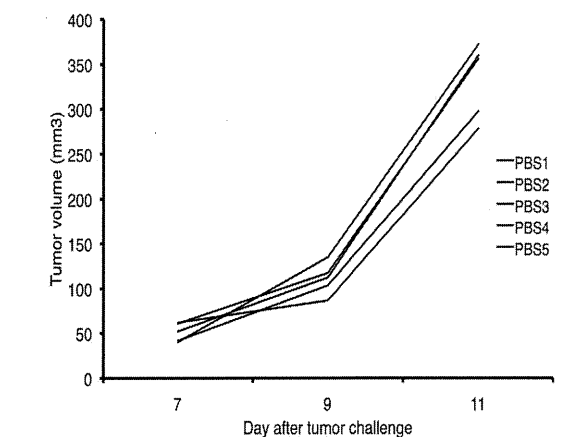
は増殖した。NPrCAP と DC の併用によって腫瘍の完全退縮を認めたマウスの脾細胞細胞を用いて、腫瘍特異的細胞障害性 T 細胞 CTL の誘導が検討した (図 3C)。その結果、B16OVA メラノーマに対する特異的な CTL をみた。さらにモデル抗原である OVA 由来ペプチドに対する特異的な CTL の誘導 (EL4-SL8) も確認された。このように NPrCAP と DC の併用療法は、強力な抗腫瘍効果を示すことが明らかとなった。

5. 樹状細胞は NPrCAP 腫瘍内投与によりアポトーシスに陥ったメラノーマ細胞を取り込み、腫瘍抗原を CD8⁺ T 細胞にクロスプレゼンテーションする。

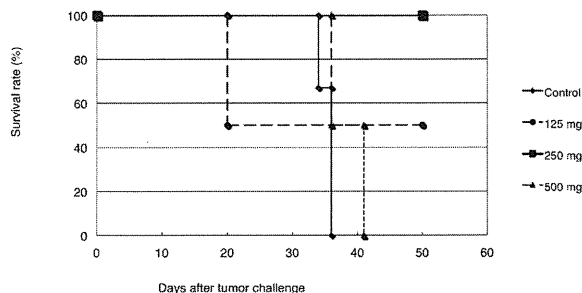
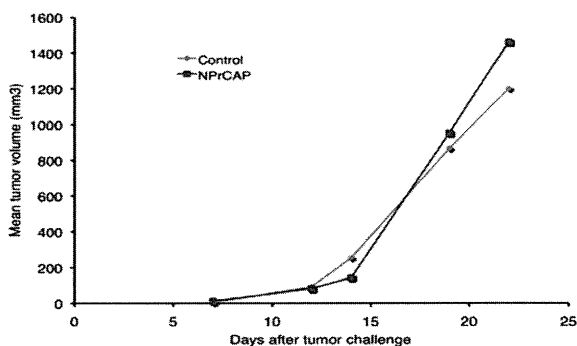
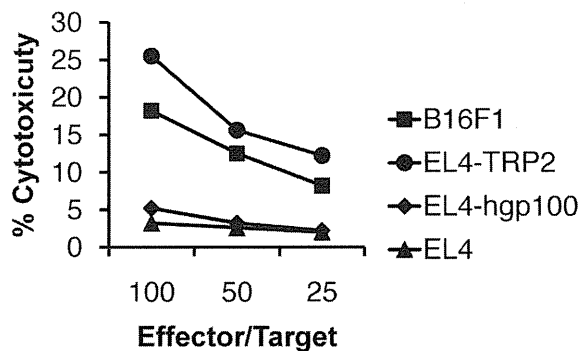
B16OVA 細胞に NPrCAP を添加培養し、アポトーシスを誘導し、これに骨髄由来樹状細胞と 6



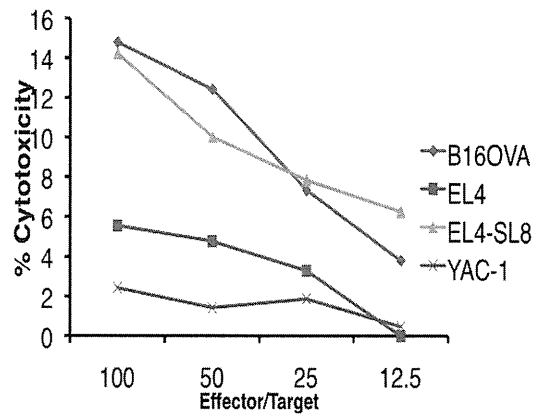
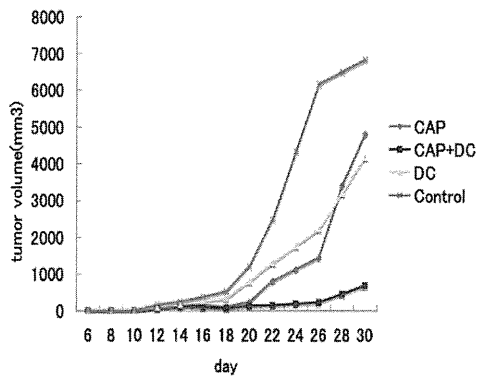
NPrCAP 100 μg ip B16F1 1x10⁵ id



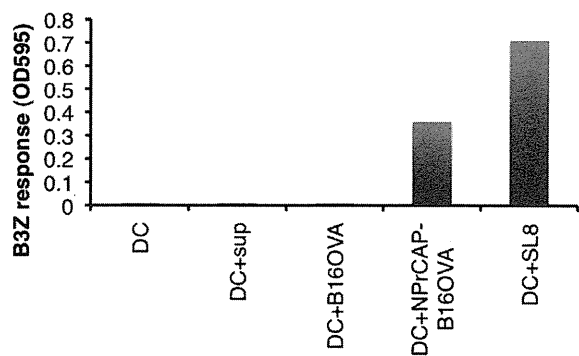
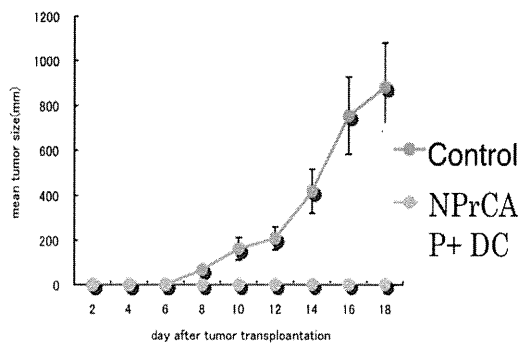
時間混合培養した。その後、CD11c MACS 磁気ビーズを用いて、樹状細胞を精製し、OVA 特異的な CD8⁺ T 細胞 B3Z と共培養を行い、その反応性を検討した。その結果、NPrCAP によりアポトーシスが誘導された B16OVA は樹状細胞に取り込まれ、クロスプレゼンテーションにより B3Z が特異的に活性化した。一方、NPrCAP 未処理の B16OVA は樹状細胞に取り込まれず、T 細胞を活性化しなかった (図 3D)。以上の結果は、NPrCAP と樹状細胞の併用腫瘍内投与は、クロスプレゼンテーションによる腫瘍抗原の効率的な提示により CD8⁺ T 細胞が誘導されたことによるものと考えられた。



B16OVA



B16OVA rechallenge



D. 考察

NPrCAPはメラノーマ細胞に取り込まれると、チロシナーゼの非常に良い基質となるため、メラニン合成経路において過剰なフリーラジカル産生による酸化ストレスを惹起することでアポトーシスを誘導する。この性質を利用して、メラノーマに対する抗腫瘍効果とそれに伴う抗腫瘍免疫応答の誘導について検討した。まずナイーブマウスにNPrCAPを単独投与すると、正常メラノサイトの傷害により、体毛の白色化を観察した。このようなマウスでは、メラノーマに対する抗腫瘍免疫応答が誘導されており、マウスメラノーマ細胞の移植に対し、抵抗性を示した。また興味深いことに、メラノサイト分化抗原であるTRP-2に対する細胞障害性T細胞が誘導されていた。さらに樹立されたB16F1メラノーマに対してもNPrCAPを投与することにより、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、メラノーマ抗原であるTRP-2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。さらにNPrCAPと樹状細胞を腫瘍内投与すると、非常に強い抗腫瘍効果を認めた。これは、NPrCAPによってアポトーシスに陥ったメラノーマ細胞を樹状細胞が取り込み、メラノーマ抗原をクロスプレゼンテーションすることで細胞障害性T細胞を誘導することを明らかにした。このようにNPrCAP投与により、全身性の抗腫瘍免疫応答を誘導することが可能であり、遠隔転移したメラノーマに対しても治療効果が期待できることを示している。今後、これを確認するために、NPrCAP単独投与およびNPrCAPと樹状細胞の併用療法後、メラノーマ肺転移を抑制可能であるかについて検討する予定である。メラノーマの征圧のためにはこの抗腫瘍免疫効果を生涯にわたり持続させることが肝要である。CTI療法で一旦

誘導された免疫応答に対するブースター免疫として NPrCAP の効果的な投与法の開発が今後の重要な課題である。

E. 結論

我々が開発したチロシンのアナログである NPrCAP によるメラノーマ標的化学療法により、同時に抗メラノーマ免疫応答をも誘導することは特筆すべき特徴であると考えられる。NPrCAP はメラノーマに対し、免疫賦活性の細胞死を介する免疫応答を惹起し、全身性免疫応答を誘導し、転移巣の退縮を期待できるものである。今後、我々が開発している NPrCAP/magnetite を用いた chemo-thermo-immunotherapy (CTO therapy) としての温熱療法により誘導された全身性の抗腫瘍免疫の維持をはかるためのブースター免疫としての NPrCAP 単独投与を検討することが重要な課題である。また深部の再発・転移にも有用な治療法の開発も念頭に置く必要がある。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Tumor-Produced Secreted Form of Binding of Immunoglobulin Protein (BiP) elicits Antigen Specific Tumor Immunity. Tamura Y, Hirohashi Y, Kutomi G, Nakanishi K, Kamiguchi K, Torigoe T, Sato N. J Immunol. In press, 2011.

2. Extracellular Heat Shock Protein 90 Translocates Chaperoned Antigen from Endosome to Proteasome for Generating Antigenic Peptide to be Cross-presented by Dendritic Cells.

Oura J, Tamura Y, Kamiguchi K, Kutomi G, Sahara H, Torigoe T, Himi T, Sato N. Int Immunol, in press, 2011.

3. Melanoma-targeted chemo-thermo-immuno

(CTI)-therapy using

N-propionyl-4-S-cysteaminylphenol-magnetite nanoparticles elicits CTL response via heat shock protein-peptide complex release. 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. Cancer Sci. Sep;101(9):1939-46, 2010.

4. 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. Jun 15;184(12):7092-9, 2010.

2. 学会発表

1. Y. Tamura, K. Saito, K. Okuya, T. Torigoe, N. Sato : Spatiotemporal regulation of heat shock protein 90-chaperoned self-DNA and CpG-oligodeoxynucleotide for type-I interferon induction via targeting to static early endosome. 14th International Congress on Immunology, Kobe, Japan, August 22-27, 2010.

2. 田村 保明: N-propionyl-4-S-cysteaminylphenol-magnetite nanoparticles elicits CTL response via heat shock protein-peptide complex release. 日本ハイパーサーミア学会総会、2010、9月10日、福岡。

H. 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科学温熱免疫（CTI）治療法の開発に関する研究

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。基礎的動物実験の結果を基にメラノーマ腫瘍局所内投与に基づくCTI療法（第I世代）を、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。現在まで4症例がエントリーされ、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製剤を開発し、安定したGMP製剤の大量合成法を確立する。（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。殊に後者はCTI治療後のメラノーマ再移植拒絶反応に焦点

をあて、抗腫瘍効果の機序として①腫瘍抗原の解析、②腫瘍浸潤リンパ球の解析、（3）深部メラノーマに対するNPrCAPの癌免疫賦活への有用性、④MHCクラスI発現と治療感受性の検討を行う。これら結果をもとに次世代型CTI療法臨床プロトコルを確立し、海外（カナダ）を含む他施設との連携による第I, II相臨床試験開始を目指す。

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

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

（2）新規NPrCAP/PEG/DNMの腫瘍治療効果・安全性の検討

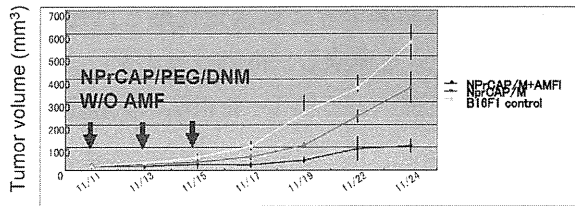
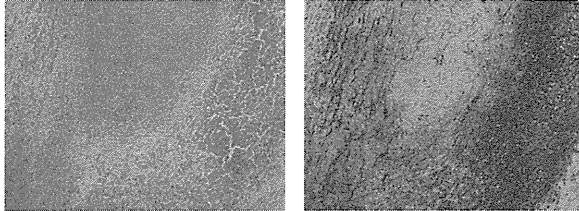
新規製剤のin vivo抗腫瘍効果を検討する。薬剤細胞殺効果及び直接の免疫誘導効果を検討する。我々の過去の動物を用いた研究方法はすでに確立されているので、既存製剤（NPrCAP/PEG/M, NPrCAP/M）新規開発製剤（NPrCAP/PEG/DNM）と比較した有効性について検討する。具体的には、深部臓器メラノーマ担癌マウスにCTI療法を行い、治療後に再度メラノーマを移植し、これら移植腫瘍への拒絶反応と宿主延命の効果をみる。また、同様に新規製剤の安全性についても平行して検討する。

C. 研究結果

1. 新規薬剤 (NPrCAP/PEG/DNM) の抗腫瘍効果を検討した。

メラノーマ細胞 B16F0 をマウス背部に移植

新規薬剤 (NPrCAP/PEG/DNM) は、より高い拡散性を示し、磁場放射により高い抗腫瘍効果を達成した

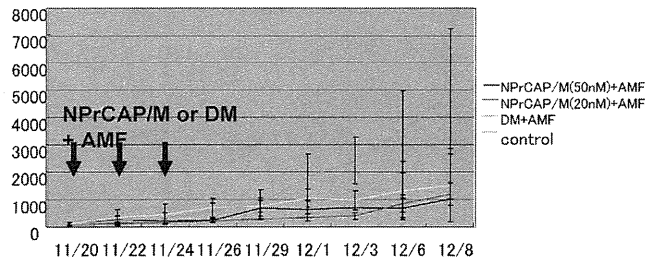


し、薬剤投与群、薬剤投与及び磁場照射群、無治療群にわけて抗腫瘍効果を検討した。

下図に示すように、薬剤投与群では、無治療群に比較して、抗腫瘍効果を発揮し、磁場照射を加えると更なる抗腫瘍効果を示した。

上図に示す如く、薬剤は腫瘍辺縁より中心部に向かい徐々に拡散している

2種類の種類では、50nmの方が20nmよりも高い抗腫瘍効果を示した



2. 2種類異なる粒子径の薬剤により同様の処理を行った。

粒子径が20nmのものに比べ、50nmの方が高い抗腫瘍効果を示した。

新規薬剤 (NPrCAP/PEG/DNM) は、より高い拡散性を示し、磁場照射により高い抗腫瘍効果を達成した

3. 担癌マウスに新規薬剤 (NPrCAP/PEG/DNM) を腫瘍内に投与し、1hr, 6hr, 24hr, 48hr の腫瘍内局在を観察した。

ベルリンブルー染色の結果を示す。

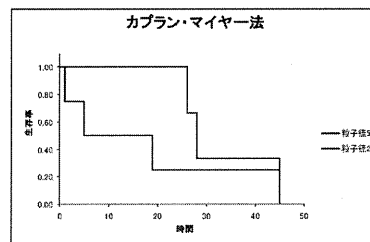
1hr 後では、薬剤が腫瘍内にびまん性に拡散している。

経時的に、薬剤到達部位において、腫瘍細胞の破壊が見られる。

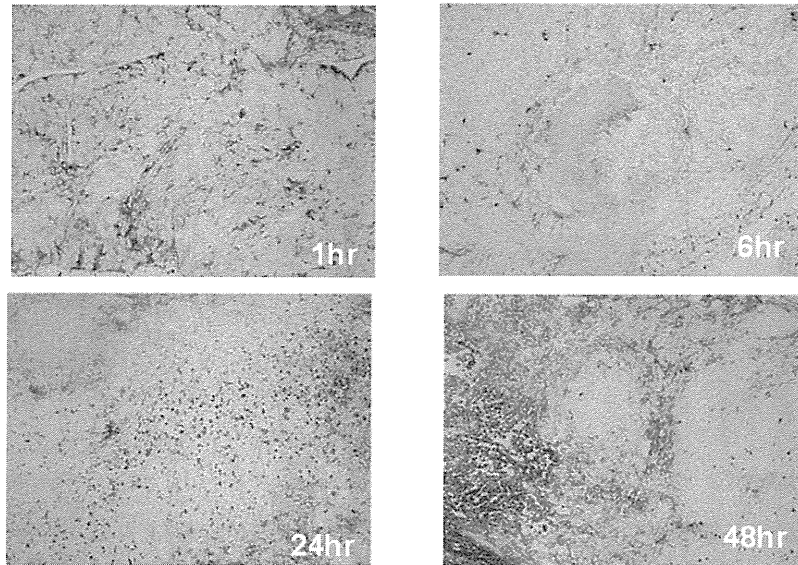
マクロファージによるメラニン色素の取り込みも観察される

新規薬剤 (NPrCAP/PEG/DNM) を腫瘍内投与後の経時的变化

薬剤が経時的に腫瘍内へ拡散し、抗腫瘍効果を示している



新規薬剤 (NPrCAP/PEG/DNM) を腫瘍内投与後の経時的変化



薬剤が経時的に腫瘍内へ拡散し、抗腫瘍効果を示している

D. 健康危険情報

E. 研究発表

1. 論文発表

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. 2011; 2011: 450472. Epub2010 Sep23.

2. 学会発表

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） 分担研究報告書 「新規CTI治療薬剤の合成とGMP製剤化」に関する研究

野原 聡 名糖産業株式会社 業務管理職

研究要旨

メラノジェネシスを分子標的とした新規 DDS 製剤として、NPrCAP (N-propionyl cysteaminyl phenol) と磁性ナノ粒子 (DNM) との結合体：NPrCAP/PEG/DNM (図 1 参照) を開発中である。H21 年度には本製剤の合成条件の改良により、旧製剤よりも分散安定性を向上させ、全身投与可能な新規製剤を開発した。本年度は合成条件を最適化し、その条件に従い大量合成・量産化方法を確定した。量産化された新規製剤は加温試験および毒性試験に供された。H23 年度には、特に臨床関係の試験に向けて、GMP 適合品の供給体制を整備する予定である

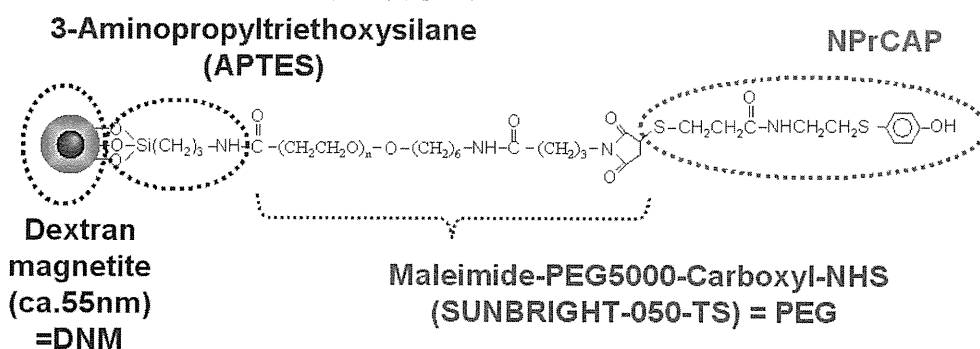


図 1

A. 研究目的

本分担研究に関する今年度（H22 年）計画としては、H21 年度に確立した「腫瘍局所 / 全身投与可能な新規製剤」の量産化である。その具体的な内容 3 点を下記に示す。

【新規薬剤の合成条件の最適化】

H21 年度に開発した新規合成法について、反応濃度、温度、試薬量を変化させ、新規製剤の特徴である分散性を維持した状態（粒子径が数十ナノメートルを超えない）で、NPrCAP 結合量の最も良い条件を調査することを目的とする。

【最適化された合成条件を基にスケールアップ】

上記で見出した最適条件に従った新規製剤を、現行の 5 ml スケールから数十 ml スケールにアップさせることを目的とする。また、このスケールでの再現性を確認する。

【GMP】

確定した量産化方法を、GMP 基準下で合成するための各種整備を目的とする。

B. 研究方法

【合成法の最適化】

昨年度に我々が改良した NPrCAP/PEG/DNM の合成手順を図 2 に示す。

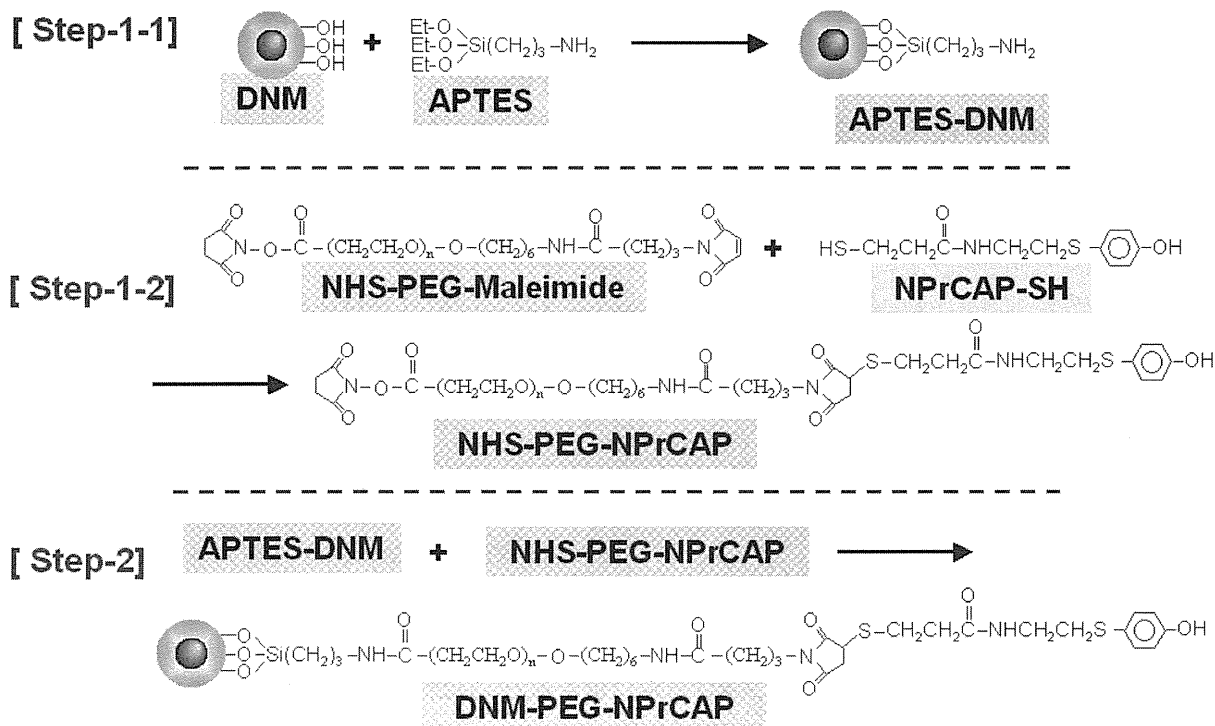


図 2

この手順は、旧製剤の直線的合成（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 の導入効率が低いという問題があった）に対して、効率の良い収束型の合成法であり、臨床用製剤（注射用製剤）として必須の分散性・易ろ過性を可能とした（H21 年度）。

そこで、本年度は、この新合成法での最適条件を見出すべく反応濃度・温度・時間・試薬量・pH 等の条件を調査することとする（今年度前半）。

【中規模量産化】

今年度後半は、上記最適化された合成条件にて、スケールを 5 ml から 50ml にアップさせる。また、このスケールでの合成手順を文書でマニュアル化し、同一条件で最低 5 回以上の繰り返し合成を行い、再現性を確認する。

【GMP 適合品】

中規模スケールで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

ある。そこで、上記の連続生産において生成物の物性（NPrCAP 結合量、粒子径、磁化率、pH、etc）が安定していることが確認出来たら、その合成方法をクリーンルーム内で実施するための必要器具の選定を行う。また、製造方法マニュアル等（Standard Operating Procedure）の作成を開始する。

C. 研究結果・考察

【合成法の最適化】

最適化に向けて反応条件の各種ファクターを検討した結果を下図 3～5 に示す。

図 3、反応濃度の違いによる NPrCAP 結合量

NPDM	反応条件				生成物	
	Fe Conc.	PEG-CAP / APS	温度	時間	CAP Conc.	
	[mg/mL]	mol ratio	[°C]	[h]	[nmol/mg-Fe]	分子/粒子
#035	5	0.5	40	17	4.4	0.65
#036					≤0.37	≤0.06
#038					1.21	0.18
#043					20	3.87

図4、反応時間、試薬量の違いによる NPrCAP 結合量

NPDM	反応条件				生成物	
	Fe Conc.	PEG-CAP / APS	温度	時間	CAP Conc.	
	[mg/mL]	mol ratio	[°C]	[h]	[nmol/mg-Fe]	分子/粒子
#042	20	0.5	40	4	2.76	0.41
#043				17	3.87	0.58
#035	5	0.5		17	4.4	0.65
#039		1		17	5.8	0.86

図5、反応温度の違いによる NPrCAP 結合量

NPDM	反応条件				生成物	
	Fe Conc.	PEG-CAP / APS	温度	時間	CAP Conc.	
	[mg/mL]	mol ratio	[°C]	[h]	[nmol/mg-Fe]	分子/粒子
#028	5	0.5	0-4	17	0.29	0.04
#029			rt		1.82	0.27
#031			40		8.48	1.26

以上より、試作 # 031 の反応条件を最適条件と位置づけた (図6)。

図6、最適反応条件

反応条件				生成物	
Fe Conc.	PEG-CAP / APS	温度	時間	CAP Conc.	
[mg/mL]	mol ratio	[°C]	[h]	[nmol/mg-Fe]	分子/粒子
5	0.5	40	17	4~8	0.6~1.2

【中規模量産化】

上記のとおり決定した最適化条件について、50ml スケールで繰り返しかえし合成した結果、下図に示すように一定の NPrCAP 結合量および粒子径を有する生成物が再現良く合成できた (図7)。

図7、中規模スケールでの合成再現性

Lot.	NPrCAP量 (nmol/mg-Fe)	粒子径 (nm)	合成量 (mL)
#046	3.9	59	60
#053	3.9	54	53
#054	3.9	57	27
#058	6.1	58	56
#059	測定中	測定中	59

この繰り返し合成結果を踏まえ、新規製剤の物性的な規格 (微生物関連を除く) を暫定的に定めた (図8)。

図8、新規製剤の暫定規格

項目	規格
・鉄濃度 (mg/mL)	27 - 29
・NPrCAP含量 (nmol/mg-Fe)	3.0 - 6.1
・粒子径 (nm)	50 - 65
・磁化率 (erg·gauss ⁻² ·g ⁻¹)	0.025 - 0.035
・pH	6.0 - 9.0
・不純物	今後、同定する。

以上の如くして作成した新規製剤は、各種基礎評価 (各分担研究者)、サーモトロンによる加温試験 (山本ビニター(株)のご協力)、毒性試験 (株化合物安全性研究所に委託) に供され、現在実施中である。

【GMP 製剤化】

名糖産業 (株) 名古屋研究所内に整備されたクリーンルームにおける本製剤を合成する工程を決定した。また、これに伴う専用器具の選定・導入を行った。

手順書 (SOP) については、まず製造方法に関するものから順次作成した。品質、衛生に関するものは H23 年度に実施することとする。H23 年以降ではヒトを対象とした臨床系試験の実施を予定しているため、H23 年度中の GMP 運用を目指すことが当分担研究の最重要課題である。

【その他】

当初の研究計画にはなかったが、本製剤の活性成分である NP r CAP が水に溶けにくいという大きな性質があることから、別途水溶性 NPrCAP を開発すべく、多糖の中でも水に対する溶解性が著しく高く、かつ粘性の低いデキストラン (グルコースの α 1-6 結合型多糖) との複合体を試作した。その結果、水に可溶の NPrCAP が作成でき、NPrCAP 自身の基礎メカニズムの検討に寄与することが可能となった。但し、NPrCAP 結合量の増加に伴い溶解度も低下するため、最適な結合量を今後検討する必要がある。

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

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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 with magnetite nanoparticles for developing melanoma chemo-thermo-immunotherapy	The Open Conference Proceeding J	2	5-16	2011
Jimbow K, Ogino J, Hida T, Kawakami A	Comparison of biological significance of eu-and pheomelanin pigmentation in skin aging process	加齢皮膚医学セミナー	5	75-88	2011
Endo M, Beppu H, Akiyama H, Wakamatsu K, Ito S, Kawamoto Y, Shimpo K, Sumiya T, Koike T, Matsui T	Agaritine purified from <i>Agaricus blazei</i> Murrill exerts anti-tumor activity against leukemic cells.	Biochim Biophys Acta.	1800(7)	669-73	2010
Okuda H, Wakamatsu K, Ito S, Sota T	Regioselectivity on the cooxidation of 5,6-dihydroxyindole and its 2-carboxy derivative from the quantum chemical calculations	Chem Phys Lett	490	226-9	2010

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 IFN induction via targeting to static early endosome	J Immunol	184(12)	7092-9	2010
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-cysteaminylphenol-magnetite nanoparticles elicits CTL response via heat shock protein-peptide complex release	Cancer Sci	101(9)	1939-46	2010
神保 孝一, 山本 博章, 若松 一雅, 伊藤 祥輔	メラニン・メラノサイトの選択的臓器部分と生体の生命活動、恒常性の維持及び加齢への調節機構	加齢皮膚医学セミナー	6	印刷中	2011