

20111008A

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23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 神 保 孝 一

平成24(2012)年3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 療法の効果増強を目指した基礎研究
～ ブラストペプチドの探索と細胞アレイを用いた Chemo-, Thermo-therapy の比較 ～
本多 裕之 13
2. N-Propionyl-4-S-cysteaminyphenol (NPrCAP) のチロシナーゼによる活性化とチオール類との結合形成：化学・免疫療法との関連 21
伊藤 祥輔・若松 一雅
3. NPrCAP 製剤によるアポトーシス誘導と免疫賦活効果 27
中山 睿一
4. メラノーマ細胞に対する N-propionyl-4-S-cysteaminyphenol (NPrCAP) の生物学的, 生化学的および分子生物学的活性 37
山下 利春
5. CTI 療法で誘導される TIL の TCR 解析 41
井藤 彰
6. CTI 療法の奏効率上昇を目的とした免疫賦活法の基礎的検討 47
田村 保明
7. 新規薬剤 (NPrCAP/PEG/DNM) を用いた CTI 療法 のメラノーマ転移巣に対する効果の解析 53
米田 明弘
8. 「新規 CTI 治療薬剤の合成と GMP 製剤化」に関する研究 57
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

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
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
中山 睿一 川崎医療福祉大学腫瘍免疫学 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化学工学部門 准教授
山本 泰司 山本ビニター株式会社 代表取締役社長
田村 保明 札幌医科大学医学部病理学・腫瘍免疫医学 講師
米田 明弘 札幌医科大学医学部・腫瘍制御医学 講師
野原 聡 名糖産業株式会社 業務管理職

研究協力者 中部大学大学院 応用生物学研究科 応用生物学専攻 教授 小林 猛
：温熱療法総括アドバイス
札幌医科大学医学部薬剤部 部長 教授 宮本 篤
：CTI 合成薬剤の安全性検討、CTI 薬剤管理
札幌医科大学医学部病理学第一講座 教授 佐藤 昇志
：腫瘍免疫病理、CTI 臨床試験管理委員
札幌医科大学医学部内科学第一講座 教授 篠村 恭久
：腫瘍内科免疫、CTI 臨床試験管理委員長
札幌医科大学医学部外科学第一講座 教授 平田 公一
：腫瘍外科、CTI 臨床試験管理委員
札幌医科大学医学部皮膚科学講座 助教 加藤 潤史
：サーモトロン基礎・臨床研究
札幌医科大学医学部皮膚科学講座 助教 肥田 時征
：メラノーマ症例臨床研究
札幌医科大学医学部皮膚科学講座 助教 柳澤 健二
：メラノーマ症例臨床研究
セントラル女性クリニック 院長 本間 敏男
：サーモトロン基礎・臨床研究
日本化薬(株) 研究開発本部 ナノメデシン医薬研究所 所長 森野 富夫
：CTI ナノメデシン統括
東レ(株) 医薬事業部長 美濃輪 昇
：CTI 新規薬剤開発アドバイス

研究要旨

我々は厚生労働科学省・医療機器開発推進研究事業の補助を受け、医・工・化学の連携により、①悪性黒色腫（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(NPrCAP:N-propionyl cysteaminylophenol)および②同薬剤との鉄(magnetite:M)ナノ微粒子とが結合した製剤(NPrCAP/M)と造影注射剤リゾビストとpolyethylene glycol(PEG)結合改良型であるNPrCAP/PEG/Mを合成し、③磁場照射による化学・温熱・免疫「CTI(chemo-thermo-immuno)」療法を開発し、④その臨床的有用性を確認した。

しかし、NPrCAP/PEG/Mは低拡散性で化学的、生物学的免疫誘導体として不安定であり、又磁場発生装置も生体に侵襲度が高く、①高拡散性新規製剤、②継続的維持免疫療法、③低侵襲性治療機器の3点の更なる開発が必要とされた。そこで産から、CT画像診断の造影剤として臨床に用いられているリゾビストを開発した原薬メーカー(名糖産業)が分担研究者として加わり、新規製剤の開発を行い、リゾビストを骨格とした磁性ナノ粒子の性質を維持しつつ、ろ過滅菌が可能で長期間安定した高拡散性とNPrCAP高結合量を有する新規製剤、NPrCAP/PEG/DNM(DNM:dextran magnetite、デキストラン被覆リゾビスト)を低価格で合成する方法を確立することに成功した。

更に新たに機器製造・販売メーカー(山本ビニター)から産の分担研究者として加わり、ナノ微粒子に対する低侵襲性新規温熱発生装置の開発の予備実験を開始した。殊にすでに保険診療に用いられている温熱発生装置サーモロンRF-8型機の改良により我々の開発した薬剤を用いて温熱療法をおこなうことが出来ることを確認した。

我々の研究の最終ゴールはすでに我々が過去6年間の厚労省科学研究費で開発に成功したプロトタイプ製剤を用い、低侵襲性温熱治療機器を開発し、それを用いてがん細胞に特異的に取り込まれるプロトタイプDDSナノ磁性粒子製剤を適正化し、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、患者自身の有している樹状細胞を介し、腫瘍特異的細胞傷害性T細胞の誘導を活性化させ、遠隔転移腫瘍の撲滅を図る能動的“生体内産生がんペプチド免疫療法”を行うことである(図1)。

A. 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(図1)。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。H21、22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。H23年度は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

次世代型CTI (化学・温熱・免疫)療法の開発戦略

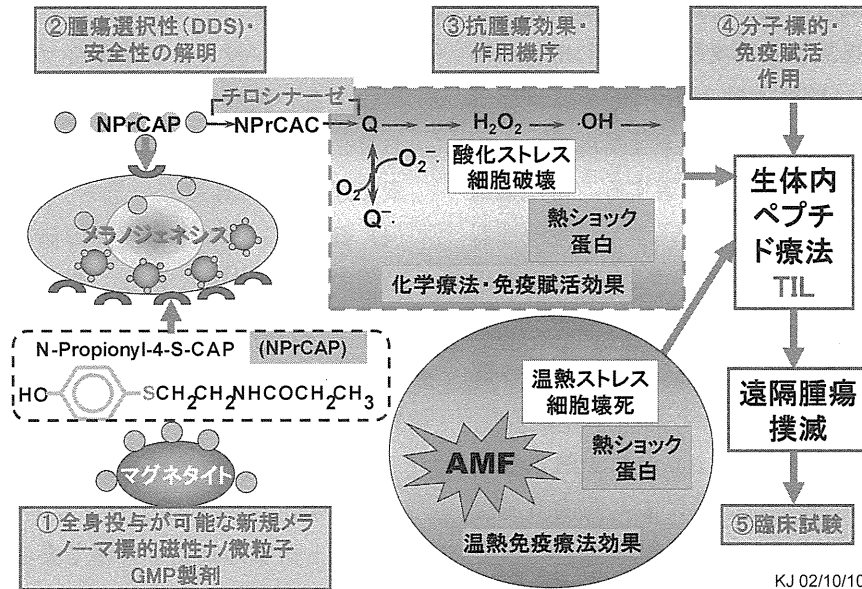


図1. メラニン形成（メラノジェネシス）はメラノーマ細胞にとり特異な分化形質である。我々の開発した薬剤は細胞内に選択的に取り込まれて集積し、化学・免疫療法効果を有す。磁場照射により温熱免疫効果も有し、生体内ペプチド療法効果を示す。

コールを完成させる。

B. 研究方法

H23年度は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。これ等5課題に焦点を当て研究する。

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療法薬剤の合成と新規製剤のGMP化開発

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が、H22年度には現行製剤の分散性の改良を行い、長期安定性と高拡散性のある新規製剤プロトタイプ合成に成功し、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。H23年度には分散安定性が高く、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、新規プロタイプ製剤の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

H22年度には分担研究者である名糖産業（株）名古屋研究所内の実験室を改修し、GMP水準製剤の作成設備を設置した。同社は臨床用MRI造影剤として富士フィルムRIファーマ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H23年度には、適格性検証に加え、大量のGMP製剤合成の準備を開始する。

3) 新規CTI療法薬剤の抗腫瘍効果・免疫賦活継続維持と磁場発生機器の改良

H23年度は既に確立した実験プロトコールに従い（Takada T et al, J Biomed Biotech, 2010）、

新規製剤の抗腫瘍効果、急性・慢性毒性実験を行う。腫瘍内分布効果に関しては新薬剤が旧薬剤と比較し腫瘍内高拡散性と高集積性を有している事を既に確認した。H23年度はより高い抗腫瘍効果、免疫賦活性と継続維持を皮下腫瘍内のみならず深部腫瘍（肺転移巣）にて検索する。新規薬剤を発熱させる高周波装置として、すでに医療機器として認可されているサーモトロン RF-8 の有用性について、RF-8 を製造している医療機器メーカーである山本ビニターが分担研究者として直接研究に参加し、機器の改良を含めて検討する。RF-8 は全国レベルで国内に 100 台以上購入されており、RF-8 を使用することにより国内多施設で同時に低侵襲性機器を用いた臨床試験が可能となる。

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) 抗原ペプチド添加による CTI 療法効果増強
(1) メラノーマ CTI 療法の効果増強を目的として、CTI 治療により MHC に提示される抗原ペプチドによる免疫賦活治療を試みる。H22 年までに、MHC クラス 1 に提示されやすいメラノーマ抗原由来のペプチド 13 種類を、in silico でスクリーニングした。今後更にこれらのペプチドの免疫ブースト効果を、in vitro で確認するため、細胞アレイ混合培養系を構築し、メラノーマに対する CTL 活性の評価を行う。具体的には、腫瘍浸潤 T 細胞 (TIL) を単離し、メラノーマに対する cytotoxicity を評価する。少数の TIL を評価するため、磁気微粒子による磁気分離により濃縮するとともに、磁気剣山デバイスを用いた細胞アレイ培養系を応用し、メラノーマ細胞との混合培養による cytotoxicity 活性を定量的に評価する。
(2) すでに癌細胞と間質細胞の混合培養に成功しており、間質細胞の存在により浸潤能が増強する癌細胞があることを明らかにした。また磁性微粒子磁気ラベル法により、永久磁石による細胞の磁気分離が可能であることも明らかにした。CTL の単離には担癌マウスを用いた CTI 療法が必要

であり、H23 年度に着手し、ブーストの効果確認までを目指す。

(3) ペプチド投与による免疫ブーストの惹起を目標にする。免疫ペプチドはすでに複数報告されており、CTI 療法特異的に発現するペプチドの探索で達成できる。

(4) 細胞アレイによる浸潤評価は他に類を見ない独創的な評価方法であり、少数の細胞の機能（浸潤や生死判別など）を定量的に評価する方法として非常に優れている。

2) 深部メラノーマに対する NPrCAP-SH の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-SH 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腫瘍増殖抑制効果を認め、更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 (Sato A et al., Cancer Sci, 2010)。H23 年度は、NPrCAP-SH 全身投与による肺転移抑制効果と腫瘍免疫誘導の機序、免疫継続維持治療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。

3) CTI 療法にて誘導される特異免疫反応を用いた低侵襲性継続療法の確立

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。H23 年度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継続・増強するための TIL 活性化による併用療法戦略を開発する。

(4) NPr-4S-CAP Dextran 複合体の自然免疫賦活効果を実証

NPr-4S-CAP Dextran による *in vitro* のヒト単球刺激効果を検討した。予備的な結果では、100 μ M の濃度で、IL-1 β 、IL-6、IL-8、TNF α 産生を認めた。このような炎症性サイトカインの産生には、自然免疫受容体が関与している可能性があり、H23年度はこの点についても検討する。

C. 研究結果

I. 次世代型 CTI 療法薬剤の開発と抗腫瘍効果・安全性

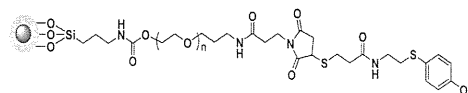
1. ナノ微粒子の最適化による体内拡散性・腫瘍集積性・発熱性の検討

新規薬剤の開発に際しての①腫瘍局所・全身投与における粒子の最適化条件の設定し、②アミノシラン化時の粒子凝集阻止法の改良により高拡散性を樹立することに成功し、更に③疎水性 NPrCAP-SH の導入効率の改良により磁性ナノ粒子（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 合成法を確立することに成功し、④本方法の更なる改良を試み高収率（75%から90%に向上）、低コスト（使用試薬がより安価）

の新規製剤合成条件を確立し、新規薬剤のプロトタイプ合成に成功した（図2, 3, 4）。本薬剤の腫瘍集積の特異性、腫瘍増殖抑制効果も検討した（図5, 6）

2. 深部メラノーマに対する NPrCAP-SH の抗腫瘍効果・免疫賦活への有用性の検討

現在の CTI 療法の問題点として、長期の腫瘍免疫賦活のために、何らかの方法で免疫を再度ブーストする必要がある。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を確認した。



新規磁性ナノ微粒子GMP薬剤

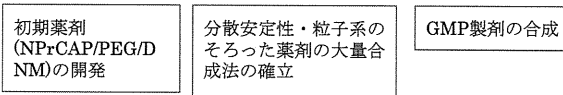


図3. 平成21・22年度には、合成条件の改良により初期製剤の分散安定性を向上させ、全身投与が可能な新規製剤(NPrCAP/PEG/DNM)を開発した。更に種々の検討から合成条件を決定し、中規模スケールでの合成を実施した。平成23年度には、臨床試験に向けたGMPグレードの製剤合成をおこなう。

新規薬剤NPrCAP/PEG/DNM合成法の確立

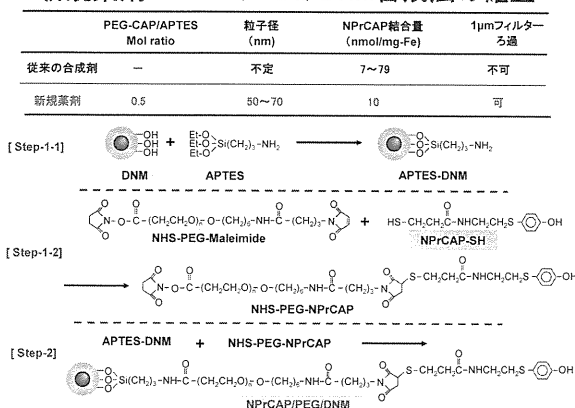


図2. メラノジェネシスを分子標的とした NPrCAP-SH (N-1-mercaptopropionyl cysteaminyphenol) とデキストラン被覆マグネタイト・ナノ微粒子 (DNM) 結合体 (NPrCAP/PEG/DNM) であるプロトタイプ薬剤の合成に成功した。

新規高分散性磁性粒子の発熱特性

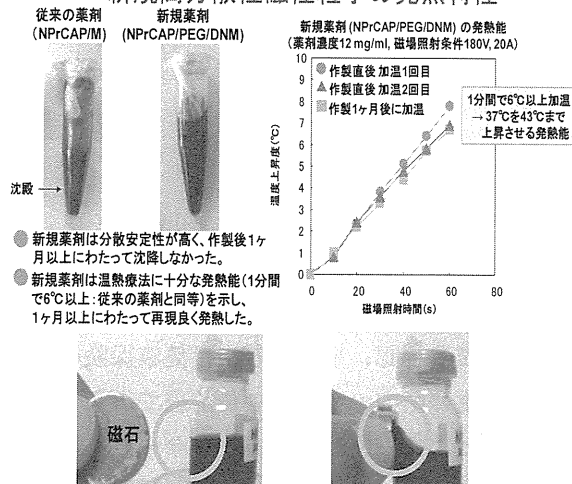


図4. 新規薬剤(NPrCAP/PEG/DNM)の高分散性で長期保存でも拡散性を失わず極めて安定した薬剤である。しかも、磁場照射後の発熱性も極めて高い。

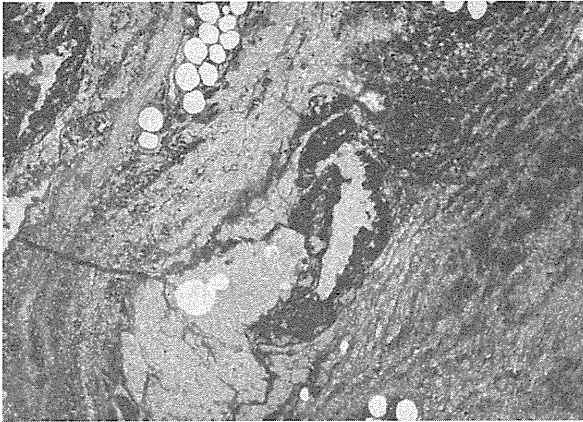


図5. メラノーマ細胞を移植後、新規薬剤(NPrCAP/PEG/DNM)を局所投与し、磁場照射を行った。温度が十分に上昇することを確認し、これまでと同様のプロトコルにより3回、治療を行った。旧薬剤では薬剤が凝集してしまい、薬剤が一部にしか集積しなかったが、新規薬剤では十分な拡散性が得られ、腫瘍全体に到達した(図9-a; Alcean Blue 鉄染色)。抗腫瘍効果においても、図9-bに示すごとく、薬剤および磁場照射群は薬剤のみおよびコントロール群に比べ、抗腫瘍効果を、また、薬剤のみにおいてもコントロール群と比べ、抗腫瘍効果を示した。

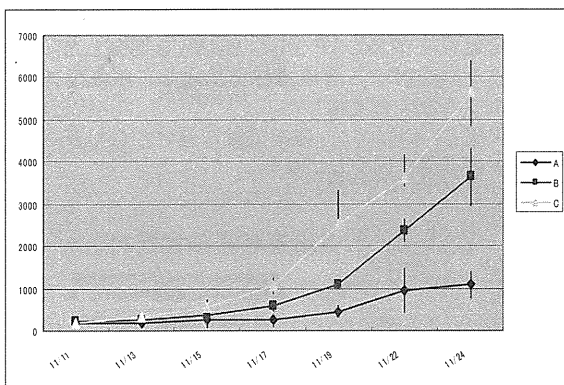
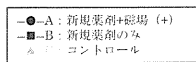


図6

3. 磁場発生機器の検討

CTI療法の磁場発生装置として、昭和59年に厚生省の製造承認、平成2年には健康保険の適用を受け、更に国内の癌治療の最前線で導入されている山本ビニター社製のハイパーサーミア用医療機器「サーモロン-RF-8」の使用を検討した(図7)。本機器は本来、誘電加熱型の加熱装置であり、磁性体の介在なしで体内の誘電抵抗で腫瘍付近を

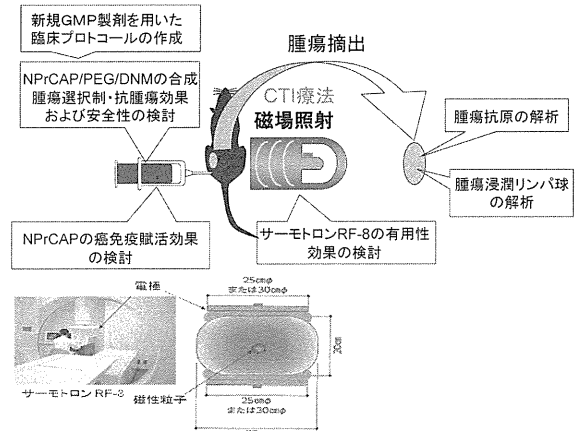


図7. GMP製剤開発と薬剤安定性・選択的抗腫瘍効果の検討: 分子標的・免疫作用機序の解明による継続的維持療法の開発: サーモロンを用いた低侵襲性磁場発生装置の開発を行う。

マイルドに発熱させる装置であるが、磁性ナノ粒子の介在によって腫瘍局所的にさらに高く発熱する事を我々のグループは報告している。サーモロン-RF8は肺癌において有望な成績を示しており、メラノーマの肺転移でも高い治療効果が期待できる。

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

時系列のDNAマイクロアレイ解析結果から、

CTI免疫効果検証のためのin vitro細胞アレイ実験

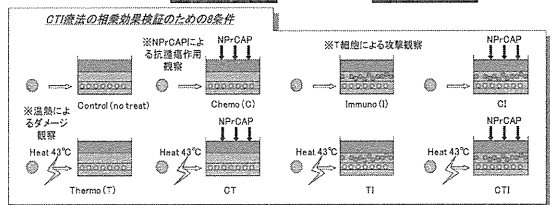
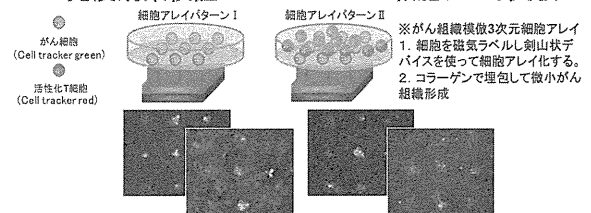


図8. CTI治療効果増強のためには、がん細胞と活性化T細胞との相互作用をつぶさに観察する評価系を確立する必要がある。細胞を、無毒な磁性ナノ微粒子で磁気ラベルし、培養器裏面に配した剣山状デバイスでアレイ配置することでCTI療法の相乗効果が検証できる。がん細胞の細胞アレイ実験系の構築に成功した。

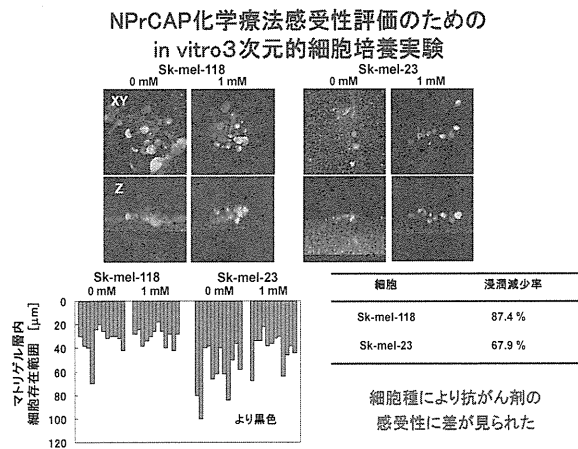


図9. レーザー顕微鏡を用いて細胞アレイをZ軸方向に観察することで細胞浸潤の評価ができることに成功した。画像解析で定量的評価も可能であった。NPrCAP-SH, NPrCAP/PEG/DNMの細胞毒性についても浸潤能で評価可能。

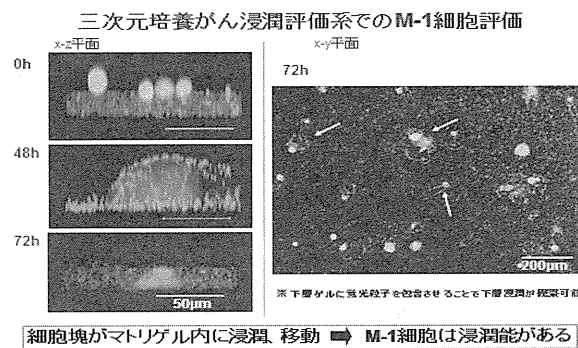


図10. 生体内を模倣するため、ECMであるコラーゲンで埋包した細胞アレイを構築した。下層に蛍光ビーズを分散させることで、下層浸潤が観察可能。日本人患者から樹立された悪性メラノーマ細胞、M-1細胞（緑色蛍光ラベル）を用いて深部に浸潤する様子が観察できた。

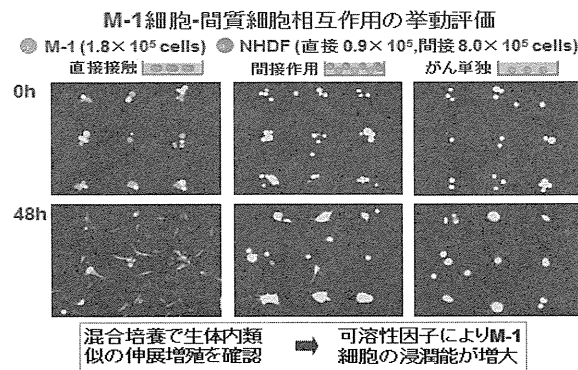


図11. M-1細胞（緑色）と間質細胞（オレンジ色）との相互作用観察に始めて成功した。M-1細胞は間質細胞からの可溶性因子で伸展しやすくなることがわかり、また画像解析で定量評価も可能。活性化T細胞との相互作用観察にも使用する。

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した。候補配列が多かったのでペプチドアレイを作製し、acetovanilloneを出発物質として、6段階の有機合成反応で、Fmoc-aminoethyl photolinkerを合成したところ、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。更に、細胞の悪性度や浸潤を細胞ごとに観察するために、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を開発した（図8, 9, 10, 11）。

2. CTI療法で誘導されるメラノーマ特異的CTLの解析

CTI療法によるCTLの質的あるいは量的変化が確認できれば、CTI療法の免疫賦活効果を増幅する併用療法になりえ、CTI療法の臨床的なインパクトはさらに高まる。メラノーマ担癌マウスにおけるCTI療法後のTCRレパトワ解析を行った所、CTI療法後に所属リンパ節が肥大する事、所属リンパ節のCD8陽性T細胞のTCRポピュレーションが変化する事、および腫瘍浸潤リンパ

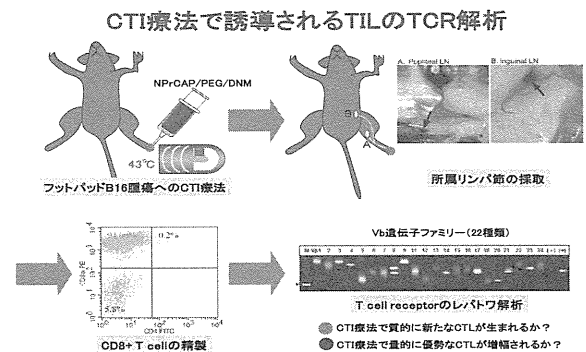


図12. CTL産生評価

CTI療法後のマウス所属リンパ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。

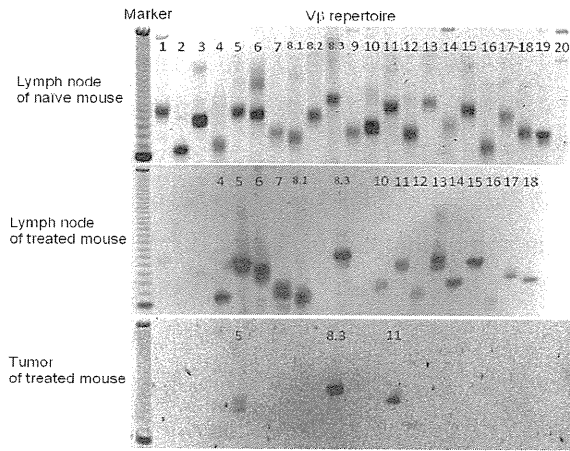


図13. TCRレパートワ解析：

CTI療法後のマウス所属リンパ節および腫瘍から、CD8陽性T細胞を分離し、TCR遺伝子のレパートワ解析を行ったところ、CTI療法後の腫瘍内にオリゴクローナルに増幅されたCD8陽性T細胞が観察された。今後解析を進めてCTIで誘導されるCTLを同定する。

球 (TIL) がさらに限定された TCR ポピュレーションになることを見いだした。従い TIL の攻撃は、①リンパ球の所属リンパ節からの腫瘍への移行、②リンパ球の腫瘍への攻撃および③所属リンパ節への帰還といったプロセスが速やかに行われていると考えられる (図 12, 13)。

3. NPrCAP 単独の癌免疫賦活への有用性の確認

メラノーマ標的薬剤である NPrCAP-SH が酸化ストレスに基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た。殊にマウスメラノーマを用いた実験では、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。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 (図 14)。

4. NPrCAP/PEG/DNM のアポトーシス誘導効果

NPrCAP-SH はメラノーマ細胞にアポトーシス

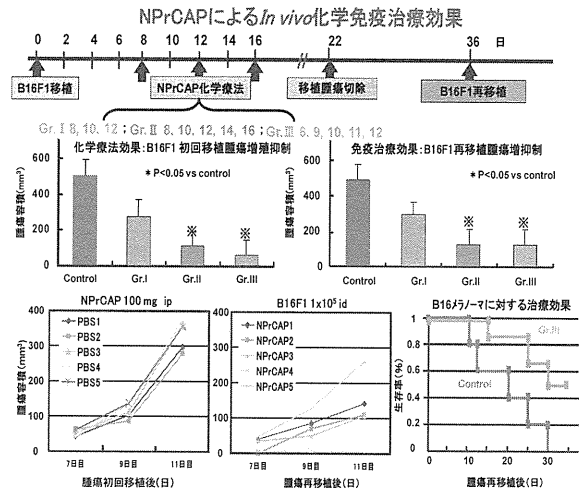


図14. NPrCAP-SH 単独投与による化学療法・免疫療法効果：B16皮下再移植腫瘍増殖はNPrCAP-SH投与により阻害され、またメラノーマ担癌マウス生存率も延長した。

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 B16 メラノーマ細胞を NPrCAP-SH で処理し、CM-H₂DCFDA (In vitro ROS) で活性酸素 (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た。NPrCAP-SH によって誘導される 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-SH はメラノ

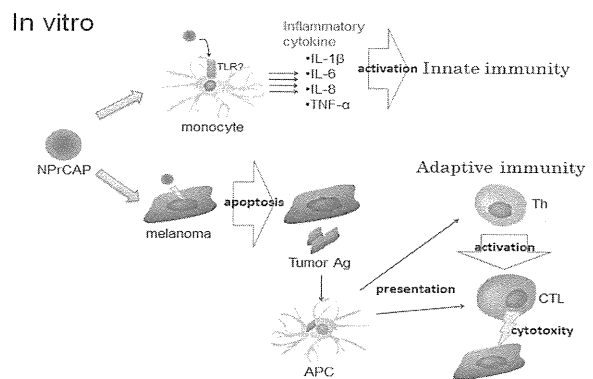


図15. ヒト末梢血単球を製剤で刺激することにより、炎症系サイトカインが産生され、自然免疫を賦活することが期待される。一方で、ヒトメラノーマ細胞株に製剤を投与することでアポトーシスが誘導され、がんタンパクが抗原提示細胞に貪食されて抗原処理・提示を受ける。その結果、ヘルパーT細胞、細胞傷害性T細胞が活性化され、腫瘍に対する獲得免疫応答の賦活化が期待される。

In vivo

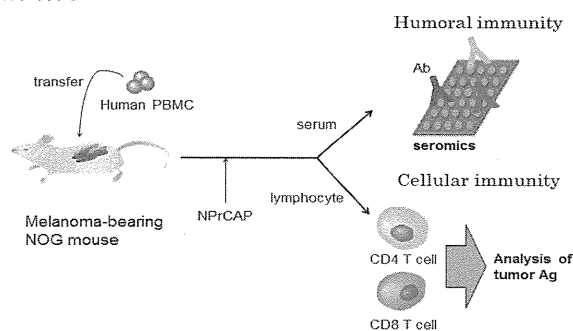


図16. NOGマウスを用いて、ヒトメラノーマ担癌マウスモデルを確立する。ヒトPBMCを移入し、製剤単独、及びCTI治療によるヒト免疫系での抗腫瘍効果を検討する。まず、プロテインアレイを用いたセロミックス法により、CTI治療前後での血清中抗体反応の上昇を検討し、認識抗原を解析する。さらに、CD4T及びCD8 T細胞の認識抗原を解析する。

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。更にNPrCAP/PEG/DNMでヒトメラノーマ細胞を加温処理し、Annexin Vにより染色し、アポトーシスを検討したが、メラノーマ細胞に強い二相性のアポトーシス誘導効果を認めた。アポトーシス酵素カスパーゼ3の変化も同様に認められた(図15, 16)。

D. 考察

1. GMP 製剤開発と薬剤安定性・選択的抗腫瘍効果の検討：

H22年度はH21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。H23年度は本薬剤の安定性・抗腫瘍効果の解明と毒性実験の一部を終了させた。又全国レベルで行うに必要なGMP製剤合成方法を基礎的データを得ることが出来た。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：

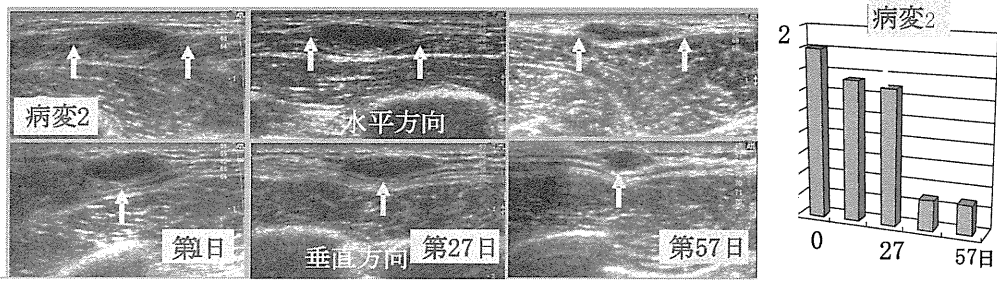
H22年度の研究実績を進展させてH23年度はCTI治療後のメラノーマ再移植拒絶反応に焦点をあて、抗腫瘍効果の機序として①腫瘍抗原の解析、②腫瘍浸潤リンパ球の解析、③肺転移等の深部メラノーマに対するNPrCAP-SHの癌免疫賦活への有用性の検討を行い次世代型CTI療法の臨床プロトコルを確立するための基礎的データが得られた。

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、さらに世界の癌治療の最前線で100台以上も導入されている山本ビニター社製のハイパーサーミア用医療機器「サーモトロン-RF8」の使用を検討した。今後の国内多施設および世界進出も考慮に入れて、今年度は「産」における新たな連携として、山本ビニター株式会社が分担研究者として加わった。今後は本プロジェクトで開発した製剤のサーモトロン-RF8での発熱挙動について調べ、低侵襲性医療機器開発を行う。

E. 結論

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きている。CTI療法そのものの意義に関しては、メラノーマ腫瘍内投与に基づくCTI療法の予備的臨床試験を開始し、CTI療法の理念の有用性を確認したが(図17, 18)、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。H21、22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



CTI療法後の皮膚転移巣US像変化

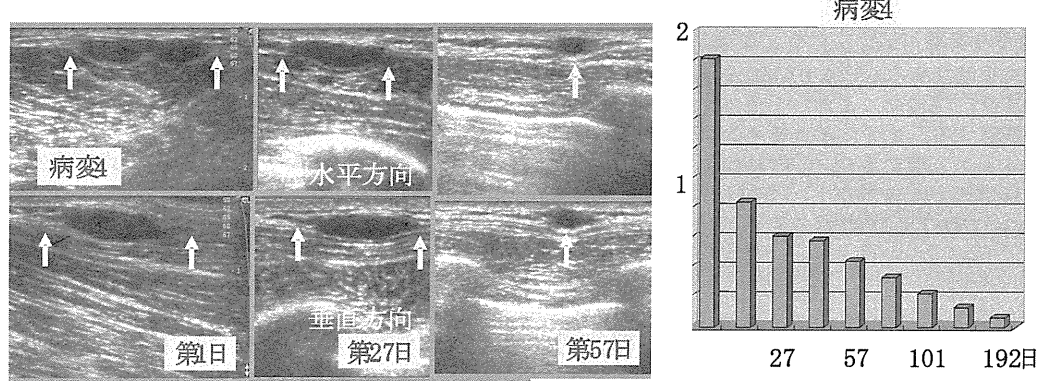


図17. 症例：68歳男性 ステージⅣ 化学・免疫ペプチド療法を試みるにも無効。学内倫理委員会の承諾の基に、左上腕の皮膚転移巣にNPrCAP/PEG/Mを用いたCTI療法を施行。治療開始1週間後に左上腕以外の皮膚転移巣が縮小を示し始め、192日後には全ての計測可能な皮膚転移巣が癒痕化。

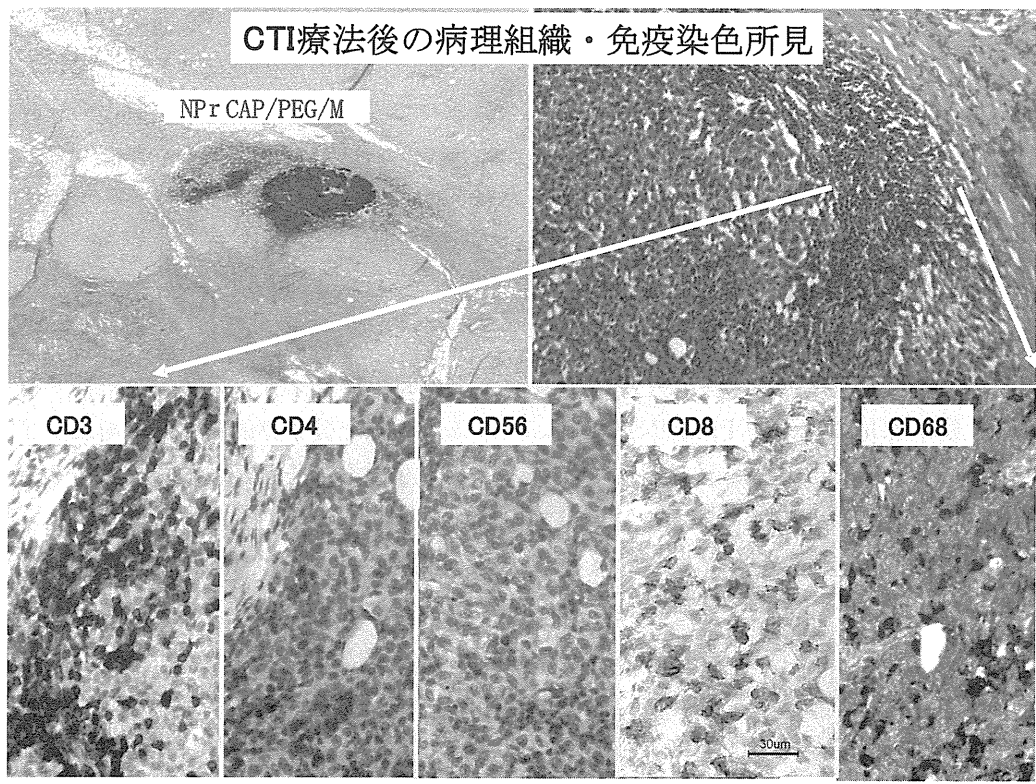


図18. 投与されたNPrCAP/PEG/M周辺にはリンパ球、マクロファージの集積が認められ、CD8陽性の細胞傷害性T細胞が優位であった。これらT細胞はMHC I発現部位に一致して分布していた。本旧製剤の欠点として拡散性が低く、注射局所のみしか集積しないという事で全身投与、大型腫瘍治療には適しない。

メラノーマ化学・温熱・免疫 (CTI) 療法のメカニズム

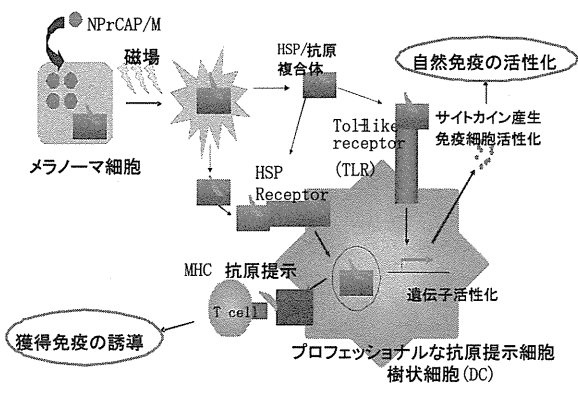


図19. 旧薬剤NPPrCAP/Mを用いた化学・温熱・免疫療法の作用機序；熱ショックタンパク(HSP)はNPPrCAP-SH自体が腫瘍細胞内でメラノジェネシスの過程で取り込まれた際に発生するのみならずNPPrCAPとマグネタイト・ナノ微粒子との結合体が磁場照射を浴びても発生する。HSP/抗原複合体は抗原提示樹状細胞に取り込まれ細胞傷害性T細胞に提示される。新規薬剤NPPrCAP/PEG/DNMも同様の機序をたどることが推定される。

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(図19)。H23年度は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製剤生産の基礎実験を開始することが出来た。

F. 健康危険情報

1. 本研究では薬剤デリバリー性と高拡散性を向上させるために癌種に特異的な形質発現を標的として利用し新規薬剤を開発している。治療効果のある新規薬剤にナノ微粒子を結合させ特異的な形質代謝系に積極的に取り込ませ、磁場照射を行うことにより癌組織を選択的に破壊し、更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患者の生体内に癌ペプチドを産生させることにより行なっている。この生体内がんペプチド産生という治療理念は21世紀の医療に求められている生体にとり最も低侵襲性の治療法である。
2. 我々はメラノジェネシス(チロシナーゼに

よる酸化還元反応基質)を分子標的としたが、NPPrCAP-SH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)の次世代型新規治療法開発にも応用しえる。

3. CTI療法はTIL(Tumor Infiltrating Lymphocytes)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。

4. CTI治療は、医・工・化学と産が連携して生まれる新しいトランスレーショナルリサーチである。本申請では新規製剤開発と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)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る。またナノ微粒子に対する温熱発生装置としてサーモトロンRF-8改良に産(山本ビニター)が研究分担者として加わった。同機器は国内の多くの施設に既に設置され、保険診療が可能な温熱発生装置として用いられている。

5. 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、国民の保健・医療・福祉の向上に対する貢献は、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グループの社会に対する責任であり使命でもある。

G. 研究発表

1. 論文発表
 - 1) Furue M, Yamazaki S, Jimbow K, Tsuchida T, Amagai M, Tanaka T, Matsunaga K,

- Muto M, Morita E, Akiyama M, Soma Y, Terui T, Manabe M: Prevalence of dermatological disorders in Japan: a nationwide, cross-sectional, seasonal, multicenter, hospital-based study. *J Dermatol* 2011 Apr;38(4):310 – 20. doi: 10.1111/j.1346 – 8138.2011.01209.x.
- 2) Hida T, Sohma H, Kokai Y, Kawakami A, Hirosaki K, Okura M, Tosa N, Yamashita T, Jimbow K: Rab7 is a critical mediator in vesicular transport of tyrosinase – related protein 1 in melanocytes. *J Dermatol* 2011 May;38(5):432 – 41. doi: 10.1111/j.1346 – 8138.2010.01004.x. Epub 2010 Sep 20.
- 3) 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* 2011, 2:5 – 16.
- 4) Jimbow K: Geriatric Dermatology(加齢皮膚医学)の多様性と今後の展開, *Geriatric Medicine 老年医学* 2011, 49(1):53 – 59 (in Japanese)
- 5) K. Jimbow, Y. Tamura, A. Yoneta, T. Kamiya, I. Ono, T. Yamashita, A. Ito, H. Honda, K. Wakamatsu, S. Ito, S. Nohara, E. Nakayama and T. Kobayashi: Conjugation of magnetite nanoparticles with melanogenesis substrate, NPrCAP provides melanoma targeted, insitu peptide vaccine immunotherapy through HSP production by chemo – thermotherapy. *J Biomaterials and Nanobiotechnology*, in press
- 2. 学会発表**
- 1) K. Jimbow: Utilization of melanogenesis substrate, NPrCAP for exploiting melanoma-targeting drug and its conjugation with magnetite nanoparticles for melanoma chemo-thermo-immunotherapy. 86th Canadian Dermatology Associating Meeting, June 22 – 26 in Edmonton, Canada.
- 2) 神保 孝一：メラノーマ形質を分子標的としたナノメデシン化学・温熱・免疫療法の基礎と臨床. 9月9日 – 10日 日本ハイパーサーミア学会第28回大会, 名古屋
- 3) K. Jimbow: Melanoma in situ peptide vaccine by chemo-thermotherapy through utilization of melanogenesis substrate, NPrCAP and its conjugation with magnetite nanoparticles. 21st International Pigment Cell Conference, September 20 – 24 in Bordeaux, France.
- 4) K. Jimbow: Successful Introduction of Melanoma-Targeted, In situ Peptide Vaccine Thorough Chemo-Thermotherapy by Conjugation of Melanogenesis Substrate, NPrCAP, with Magnetite Nanoparticles. Istanbul Immunology Forum, March 1 – 2 in Istanbul, Turkey)

H. 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

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基礎研究

～ ブーストペプチドの探索と細胞アレイを用いた Chemo-, Thermo-therapy の比較 ～

研究分担者 本多 裕之 名古屋大学大学院工学研究科・教授

研究要旨

我々が開発した細胞アレイ技術は、培養細胞をコラーゲンゲルでコートし、アレイ状に配置した培養器上で、生体環境を模倣した状況で培養でき、細胞の浸潤・増殖などの培養挙動を観察することができる。CTI療法の効果増強を目指し、この技術を応用してメラノーマ細胞を培養し、NPrCAPに対する感受性と温熱処理の感受性を同時評価し、その競合作用を観察した。両者は相加効果であることがわかり、NPrCAPのIC50は0.7mM程度であることがわかった。また免疫療法の効果増強を目指し、メラノーマ抗原タンパク質由来のワクチンペプチドを、ペプチドアレイ技術で探索し、gp100で6種類、MART-1, TRP-2およびTyrosinaseでそれぞれ、3種類、4種類、3種類の候補ペプチドを選択した。そのうちの1種類のペプチドLPWHRLFLLは、HLA-A24およびマウスのH-2Kbに提示されることがわかり、ブースト効果のあるワクチンペプチドになる可能性があることが示唆された。

A. 研究目的

薬剤 (Chemo-)・温熱 (Thermo-)・免疫 (Immuno-) の作用による悪性黒色種 (メラノーマ) の新規治療 (Chemo-, Thermo-, Immunotherapy; CTI 治療) において、その効果を高め、遠隔転移巣に対しても退縮せしめ、完全治癒に導くためには、薬剤の到達濃度増強、温熱効果増強だけではなく、局所がん細胞死滅で惹起されるがん免疫作用を増強することが強く望まれる。特にがん細胞由来の抗原ペプチドの同定と、ペプチド投与による免疫賦活が重要である。

本研究室では、セルロースメンブレン上でスポット状に多種類のペプチドを合成する手法 (セルロースメンブレン Fmoc 固相合成法) で、機能性ペプチドの探索を実施してきた。細胞死誘導ペプチド、細胞接着ペプチドなどの細胞機能性ペプチドや、胆汁酸結合ペプチド、抗体 Fc 領域認識ペプチド、乳酸菌結合/凝集誘導ペプチド、アミ

ラーゼ阻害ペプチドなどの低分子/タンパク質結合ペプチドなどの探索に成功している。このため、本研究では、温熱治療下で高発現し、抗原提示に重要な働きをする Hsp70 に注目し、Hsp70 結合能を示すがん細胞特異的発現タンパク質由来の抗原ペプチドの特定を行った。

一方、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 (Extracellular matrix; 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。Chemotherapy に対するがん細胞感受性評価において、通常のがん細胞平面培養法では、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。

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

ターニングする、磁気細胞アレイ化技術を開発した。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培養器裏面に設置すると、磁気ラベル細胞は支柱部分に引き寄せられ、培養器上でアレイ状に並ぶ。

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、がん細胞の挙動観察を行った。温熱感受性および薬剤 (N-propionyl-cysteaminylphenol; NPrCAP) 感受性を調べた。

B. 研究方法

B-1 がん抗原ペプチドの特定

まず、 $9.5\text{ cm} \times 14\text{ cm}$ に裁断したセルロースメンブレン (Whatman, England) FILTER PAPER 542 HARDENED ASHLESS 24.0 cm を使用した。 β -アラニン溶液 ($12\text{ ml } 0.5\text{ M } \beta\text{-Ala}$, $0.6\text{ ml } 1\text{-Methylimidazole}$, 0.75 ml DIPC in DMF

150 ml) を作製し、メンブレンを浸し、2日間振とうさせることで、セルロースメンブレンの OH 基と β -alanine の COOH 基がエステル結合した活性化メンブレンを作製した。未反応 β -アラニンを除去するために DMF とメタノールで活性化メンブレンを洗浄し ($5\text{ min} \times$ 各 2 回)、自然乾燥させ、 4°C にて保存した。

ペプチドアレイの作製は Fmoc 固相合成反応を用いた (Fig.1)。材料となるアミノ酸は 0.5M Fmoc-アミノ酸 (全て渡辺化学工業株式会社) 溶液 (in DMF (N,N-ジメチルホルムアミド (047-25475、和光純薬株式会社、大阪))) に活性化剤 (DIPCI (N,N'-Diisopropylcarbodiimide) (渡辺化学工業株式会社) : 1-hydroxybenzotriazole (HOBt, Anhydrous) (A00015、渡辺化学工業株式会社) = 1 : 4) を混合 (アミノ酸 : 活性化剤 = 100 : 17) したものをを用いた。活性化アミノ酸を peptide synthesizer (ASP222、IntavisAG, Koln, Germany) を用いて活性化メンブレン上にスポットティングした (スポット径: 2 mm 、スポット量: 1 残基目 $0.3\ \mu\text{l}$ 2 残基目以降 $0.5\ \mu\text{l}$)。1 残基目にはリンカーとして Fmoc-11-Amino-

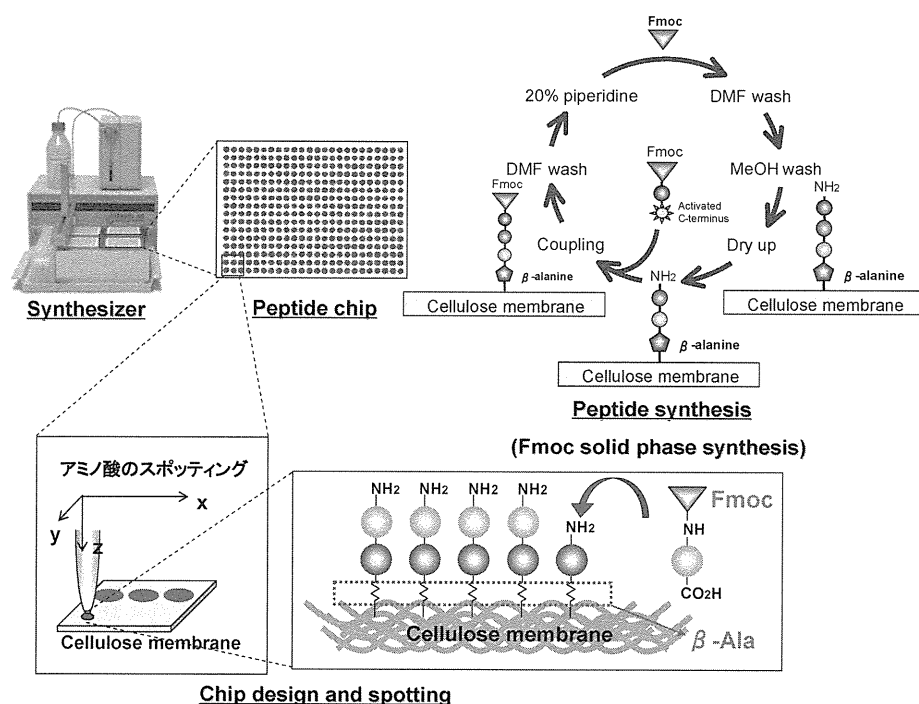


Fig. 1 ペプチドアレイの Fmoc 固相合成法

undecanoic acid (K00962、渡辺化学工業株式会社) を合成 (1 spot = 0.3 μ l \times double spotting) した。アミノ酸スポットティング後はメンブレンを DMF で洗浄 (5min \times 2 回)、20% piperidine / DMF に 20 min 浸透した。脱保護の後、さらに DMF (5min \times 2 回)、メタノール (5min \times 2 回) で洗浄した。上記の操作を繰り返し、ペプチド鎖伸長反応を行うことでセルロースメンブレン上に任意のペプチド鎖を合成した。ペプチド伸長反応終了後、20% piperidine / DMF で Fmoc 基を完全に脱保護し、更に、各アミノ酸側鎖に結合している保護基を除去するため、Trifluoroacetic acid (TFA) (A00025、渡辺化学工業株式会社) : m-クレゾール (034-04646、和光純薬株式会社) : 1,2-Ethanedithiol (EDT) (A00057、渡辺化学工業株式会社) : チオアニソール (T0191、東京化学工業株式会社、東京) = 40 : 1 : 3 : 6) を 100 ml 作製し、メンブレンを 3 h 浸した。脱保護後、残存試薬を取り除くためにジエチルエーテル (051-01157、和光純薬株式会社) で 5min \times 3 回洗浄、乾燥後、Dulbecco's PBS (pH7.35 ~ 7.55) (05913、日水製薬株式会社、東京) を用いて 50 rpm で 1h 洗浄した。これを 6 回繰り返した後、実験に用いた。

ペプチドアレイとして合成するペプチドは、ヒトメラノーマ抗原タンパク質として報告のある gp100, MART-1, TRP-2 および Tyrosinase のアミノ酸配列を用い、Hsp70 (NSP-555-F, Stressgen) との結合実験に供した。ペプチドアレイに Hsp70 を 37 $^{\circ}$ C、3h 作用させ、洗浄後、マウス由来 anti-Hsp70 IgG (SPA-810-F, Stressgen) を結合後、二次抗体として Alexa488 標識抗マウス IgG (A-11059, invitrogen) を作用させ、可視化した。Hsp70 結合ペプチドの MHC 結合性に関しては、BIMAS Score 解析 (<http://www.mpiib-berlin.mpg.de/MAPPP/binding.html>) で評価した。

B-2 がん細胞アレイによる機能評価

悪性黒色腫細胞 (以下メラノーマ) としてマウスメラノーマ B16-F1 細胞を用いた。培養は、37 $^{\circ}$ C、

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 μ g/ml ストレプトマイシン硫酸塩) (Invitrogen) を含む Dulbecco's Modified Eagle Medium high glucose (DMEM) (Invitrogen) を用いた。

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。

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 10 nm の Fe₃O₄ (戸田工業、東京) を用いた。脱イオン水中で高分散させた磁性微粒子溶液 (濃度 10 mg/ml) をリン脂質に包み込むことで Magnetite cationic liposome (MCL) を作製した。リン脂質として TMAG (N-(α -tri-methyl-ammonio-acetyl)-didodecyl-D-glutamate chloride) (相互薬工、東京)、DLPC (Di-lauroyl phosphatidylcholine) (Sigma-Ardrich)、DOPE (Dioleoyl phosphatidylethanolamin) (Sigma Ardrich) を用い、ナス型フラスコとロータリーエバポレータを用いて、モル比 1 : 2 : 2 (TMAG:DLPC:DOPE) の組成のリン脂質膜を作製した。このリン脂質膜に磁性微粒子 2 ml を加えてボルテックス攪拌し、MCL 溶液を作製した。

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。

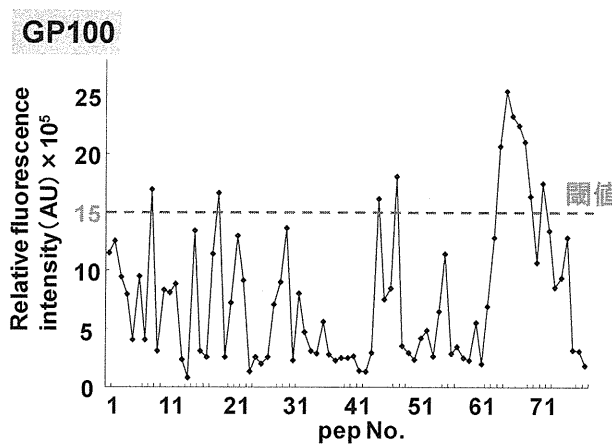
3 次元磁気細胞パターンニングには、lumox dish 35 (以下ペトリパーム) (Greiner Bio-One、

Wemmel, Belgium) を使用した。剣山状鉄製デバイスを用いて、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ペトリパームを配置し、磁気ラベルした細胞を培養皿に 1.8×10^5 cell/dish で播種した。これにより同一平面上に細胞アレイパターンニングが完成する。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。

C. 研究結果

C-1 がん抗原ペプチドの特定

実験結果の一例を Fig. 2 に示す。gp100 では、



Hsp70 に高結合活性を示すペプチドが 11 種類見出された。さらに BIMAS Score で評価した結果、候補ペプチド 6 種類を選択することができた。同様に、MART-1, TRP-2 および Tyrosinase でそれぞれ、3 種類、4 種類、3 種類の候補ペプチドを選択した (Fig. 3)。またこれらのうちのひとつ、LPWHRLFLL は、HLA-A24 およびマウスの H-2Kb に提示されることがわかった。また HLA-A24 トランスジェニックマウスに免疫して、誘導された細胞傷害性 T 細胞は、マウスメラノーマ B16F0 および HLA-A24 に提示された本ペプチドを認識して、腫瘍細胞を傷害することが明らかになった (札幌医大田村らの報告参照)。このことは、ペプチド探索が成功したことを示すだけでなく、候補ペプチドが CTI 療法を助けるブーストペプチドとして機能する可能性があることを

BIMAS score		BIMAS score									
pep No.	Sequence	蛍光強度	SD	HLA-A24	HLA-A0201	pep No.	Sequence	蛍光強度	SD	HLA-A24	HLA-A0201
1	RLVKRQVPL	1.61E+06	4.69E+05	0.0303	12	21.362					
2	RLVAVLGL	1.25E+06	2.84E+05	0.1	18.426	42	STESTIGSL	1.40E+05	7.84E+04	0.4	0.002
3	RLVAVLGL	8.85E+05	3.11E+05	0.36	0.728	43	RLGQVLSST	1.75E+05	1.61E+04	0.144	5.488
4	AVGALLAV	7.98E+05	2.63E+05	0.15	13.907	44	RLIDGATL	2.95E+05	1.53E+05	0.72	21.262
5	RLAVGATRY	4.07E+05	2.98E+05	0.11	13.228	45	RLVVRQVPL	1.81E+05	4.68E+04	0.172	21.262
6	RVPVRRQVPL	2.46E+05	3.72E+05	0.12	11.613	46	RVQVLDVPL	1.49E+05	1.08E+05	0.7293	0.558
7	RLVAVLGL	4.07E+05	1.68E+05	8.4	0	47	LVYVGRSV	5.44E+05	3.28E+05	0.8	0.007
8	RLVAVLGL	3.56E+05	4.01E+05	0	0.002	48	RYVQVSVL	1.52E+05	1.80E+05	0.489	0.011
9	GILVPEVIA	3.10E+05	2.90E+05	0.132	27.958	49	LVVAVLGL	3.35E+05	5.59E+04	3.074	18.944
10	RVSNDQPTL	8.29E+05	9.34E+04	6.7	6.548	50	GGVSAEL	2.92E+05	7.88E+04	0.722	0.115
11	RVPVRRQVPL	2.11E+05	2.16E+05	0.001	0.008	51	SGEGRFEL	2.26E+05	1.14E+05	0.6	0.052
12	RVVAVLGL	8.88E+05	1.95E+05	1	8.228	52	LVVSDQGL	4.17E+05	1.13E+05	0.6	0.065
13	RQVAVLGL	2.34E+05	1.71E+05	0.18	7.052	53	GGVPPAGL	4.90E+05	5.81E+04	0.64	0.139
14	RVVAVLGL	1.87E+05	1.71E+05	0.13	6.901	54	RVVPPAGL	2.72E+05	2.72E+05	0.6	26.818
15	RLVAVLGL	1.34E+05	1.32E+05	0.2	3.157	55	GVVAVLGL	6.47E+05	2.48E+05	0.844	3.285
16	RLVAVLGL	3.12E+05	5.82E+04	4	11.225	56	RQVAVLGL	1.14E+05	2.68E+05	0.7	0.488
17	RLVAVLGL	2.61E+05	1.99E+05	0.11	11.225	57	RVVAVLGL	1.14E+05	2.68E+05	0.7	0.488
18	RVVAVLGL	1.14E+05	2.20E+05	0.2	0	58	GVVAVLGL	3.49E+05	2.18E+05	0.15	17.14
19	RVPVRRQVPL	1.87E+05	2.20E+05	0.1	0.002	59	RVVAVLGL	5.54E+05	1.72E+05	0.6	0.977
20	RVVAVLGL	2.55E+05	1.18E+05	10.6	0	60	SLADVLSLA	2.90E+05	6.02E+04	0.12	20.565
21	RVVAVLGL	1.24E+05	1.65E+05	0.9	0.109	61	SLAVVSTSL	3.52E+05	7.94E+04	0.6	21.862
22	RVVAVLGL	1.20E+05	4.71E+05	11.0	0.939	62	RVVAVLGL	1.19E+05	9.24E+04	0.6	26.221
23	RVVAVLGL	8.14E+05	0.77E+04	8.7	1.861	63	GVVAVLGL	6.85E+05	5.62E+04	0.14	26.316
24	RVVAVLGL	1.32E+05	3.21E+04	8.8	14.824	64	GVVAVLGL	1.25E+05	2.11E+05	0.6	0.225
25	RVVAVLGL	2.58E+05	8.21E+04	7.6	0	65	RVVAVLGL	2.09E+05	1.74E+05	0.4	0.225
26	RVVAVLGL	1.89E+05	4.14E+04	6	0	66	RVVAVLGL	2.52E+05	2.54E+05	0.844	4.709
27	RVVAVLGL	2.24E+05	1.01E+05	0.24	0.001	67	RVVAVLGL	2.02E+05	1.93E+05	0.21	81.955
28	RVVAVLGL	7.08E+05	1.15E+05	0.6	0.028	68	RVVAVLGL	2.24E+05	2.91E+05	0.18	412.346
29	RVVAVLGL	1.98E+05	2.01E+04	0.15	26.516	69	RVVAVLGL	2.10E+05	1.22E+05	0.6	14.89
30	RVVAVLGL	1.37E+05	4.97E+04	0	17.443	70	RVVAVLGL	1.44E+05	1.41E+05	0.15	6.899
31	RVVAVLGL	2.25E+05	1.31E+05	0	0.005	71	RVVAVLGL	1.07E+05	2.21E+05	0.6	60.222
32	RVVAVLGL	1.08E+05	2.08E+05	0	0.051	72	RVVAVLGL	1.07E+05	2.21E+05	0.6	60.222
33	RVVAVLGL	4.75E+05	8.18E+04	6.1	11.267	73	RVVAVLGL	1.34E+05	1.72E+04	0.3	1492.565
34	RVVAVLGL	3.99E+05	3.67E+04	0.15	28.137	74	RVVAVLGL	8.51E+05	1.05E+05	0.6	6.974
35	RVVAVLGL	1.89E+05	3.31E+04	0.165	4.699	75	RVVAVLGL	1.35E+05	1.35E+05	0.1	8.552
36	RVVAVLGL	1.35E+05	4.13E+04	0.12	56.272	76	RVVAVLGL	1.28E+05	1.44E+05	0.504	9.459
37	RVVAVLGL	2.81E+05	6.88E+04	0.6	6.915	77	RVVAVLGL	1.15E+05	1.71E+05	0.6	0.139
38	RVVAVLGL	2.28E+05	1.19E+05	0.55	14.059	78	RVVAVLGL	3.05E+05	1.55E+05	0.1	0.262
39	RVVAVLGL	2.94E+05	8.43E+04	1.2	7.555	79	RVVAVLGL	1.87E+05	1.27E+05	0.1	0.262
40	RVVAVLGL	2.32E+05	2.00E+05	0.15	18.603						

候補ペプチド BIMAS score 5.0以上
 蛍光強度 1.5×10^6 以上

Fig. 2 ペプチドアレイでの Hsp70 結合試験結果

BIMAS score						
pep No.	Sequence	蛍光強度	SD	P値	HLA-A24	HLA-A0201
45	RLVKRQVPL	1.61E+06	4.69E+05	0.0303	12	21.362
48	RYGFSFVTL	1.80E+06	1.80E+05	0.0004	400	0.011
66	LIVGILLVL	2.53E+06	2.54E+05	0.0006	8.4	4.709
67	GILLVLMV	2.32E+06	1.99E+05	0.0002	0.21	81.385
68	LLVLMVAV	2.24E+06	2.92E+05	0.0019	0.18	412.546
69	LLVLMVAV	2.10E+06	1.23E+05	0.0001	6	14.89
78	AAAAAAAAA	3.06E+05	1.55E+05			

BIMAS score						
pep No.	Sequence	蛍光強度	SD	P値	HLA-A24	HLA-A0201
2	GILTVILGV	1.79E+06	1.66E+05	0.0004	0.21	81.385
4	LTVILGVLL	2.21E+06	2.96E+05	0.0021	7.2	0.504
6	VILGVLLLI	2.28E+06	1.35E+05	0.0001	2.1	20.753
12	AAAAAAAAA	3.06E+05	1.55E+05			

BIMAS score						
pep No.	Sequence	蛍光強度	SD	P値	HLA-A24	HLA-A0201
1	MLLAVLYCL	1.59E+06	2.73E+05	0.0048	8.4	309.05
2	LLAVLYCLL	2.02E+06	1.73E+05	0.0002	4.8	54.474
24	LPWHRLFLL	1.84E+06	1.43E+05	0.0002	4	26.248
59	AAAAAAAAA	3.06E+05	1.55E+05			

BIMAS score						
pep No.	Sequence	蛍光強度	SD	P値	HLA-A24	HLA-A0201
66	LVALVGLFV	1.81E+06	3.80E+05	0.0115	0.14	56.902
67	VALVGLFVL	2.06E+06	2.62E+05	0.0015	6	10.207
68	ALVGLFVLL	2.36E+06	3.21E+05	0.0026	8.64	40.589
70	GLFVLLAFL	2.38E+06	4.14E+05	0.0069	4.8	999.867
74	AAAAAAAAA	3.06E+05	1.55E+05			

Fig. 3 CTI療法増強候補ペプチド