

示している。

C-2 がん細胞アレイによる機能評価

B16-F1 細胞に MCL をとりこませ、ペトリパー

ム上でアレイ状に配置し、コラーゲンで埋包する
生体環境模倣3次元培養を実施した。細胞はアレ
イ状に配置でき、細胞集塊（スフェロイド）を形
成した（Fig. 4）。同時にコラーゲン埋包しない通

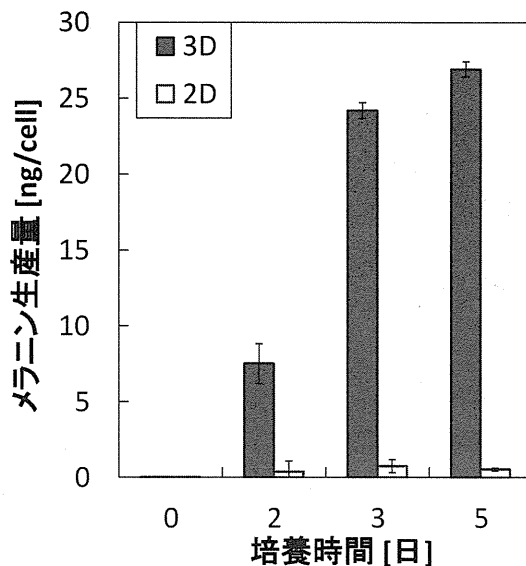
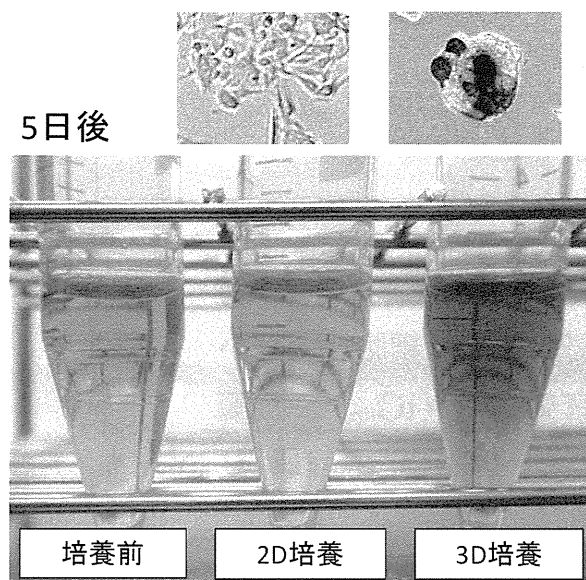


Fig. 4 メラノーマ細胞アレイとメラニン生産

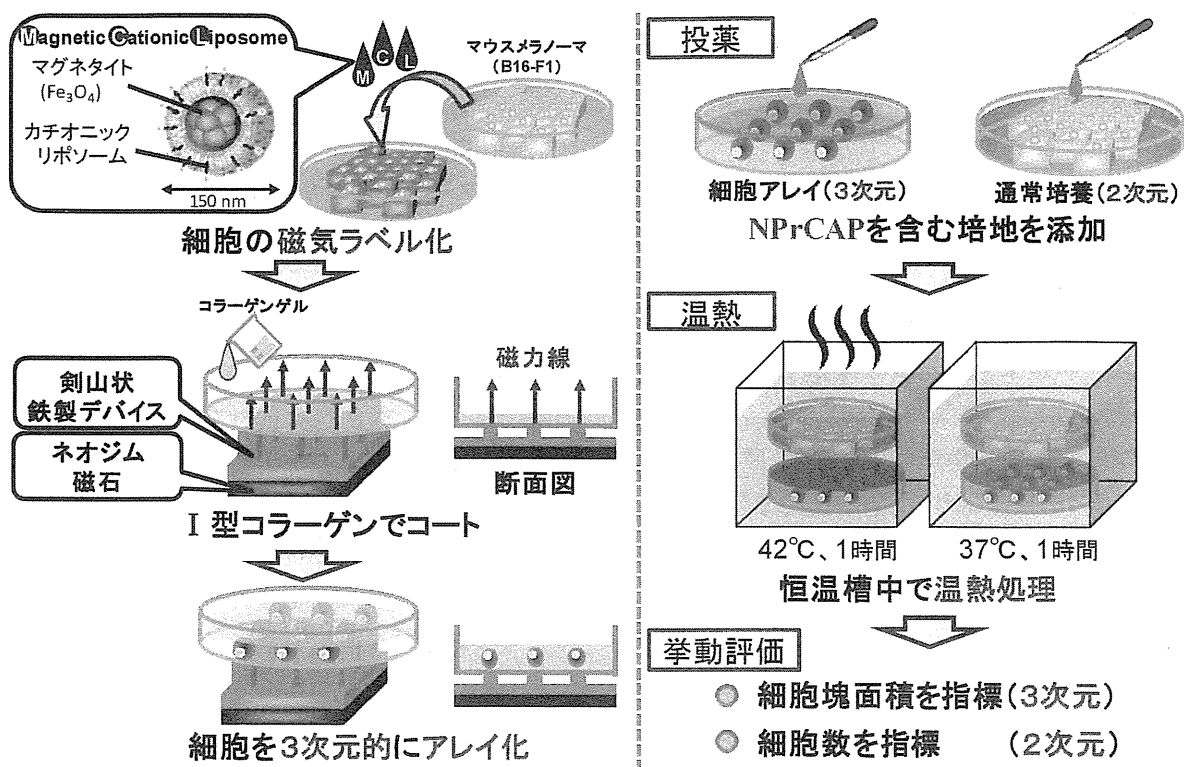


Fig. 5 温熱/薬剂相互作用評価法

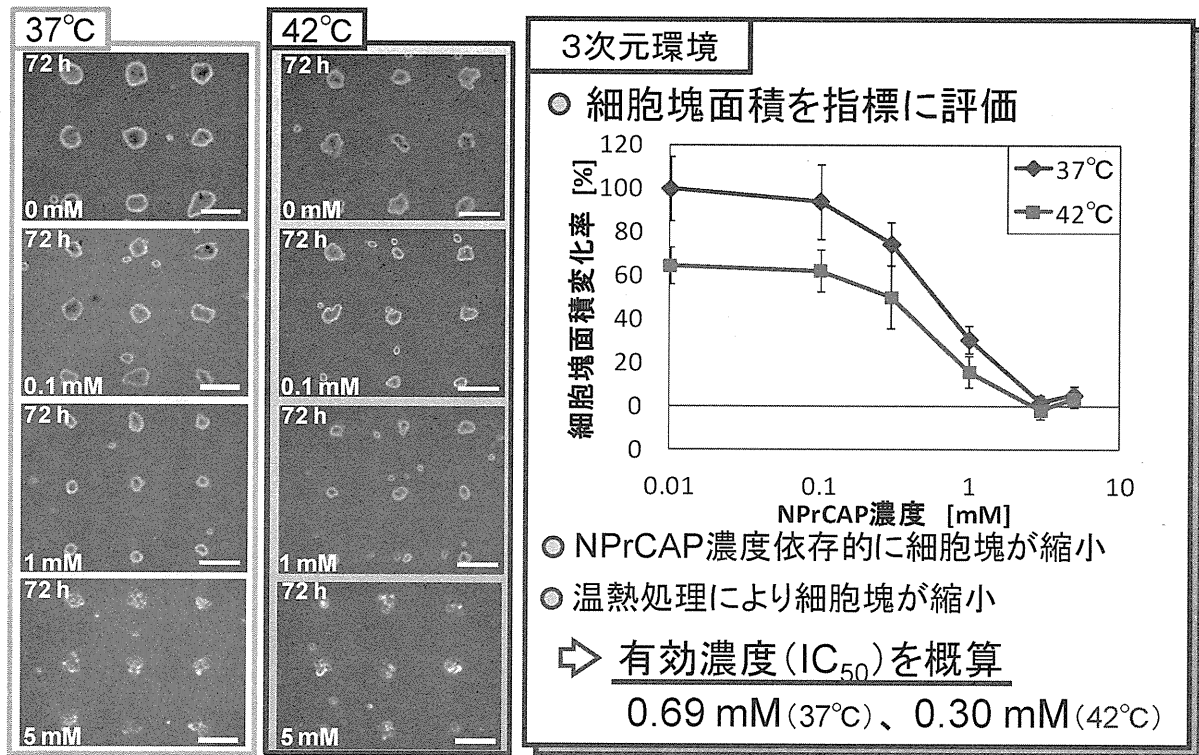


Fig. 6 細胞アレイを用いた温熱/薬剤相互作用実験結果

常の2次元培養も行ったところ、集塊形成した3次元培養のときだけメラニン生産が促進され、黒色のメラノーマスフェロイドが得られた。培養液の色も Fig.4 に示す。これは本培養方法が、本来の生体環境を模倣し、メラノーマ本来の特性を発現したものと思われる。

メラノーマの温熱感受性および薬剤感受性評価実験方法を Fig. 5 に示す。温熱は 42°C, 1h、薬剤濃度は 0.1mM から 5mM まで試験した。

細胞アレイでの細胞増殖評価（細胞塊面積による定量化）の結果、有効濃度は 37°C で 0.69mM、42°C で 0.30mM となった (Fig.6)。

温熱作用と薬剤作用の競合作用は、顕微鏡観察下、細胞塊の面積変化率を求め、次式で評価した。

$$\frac{\text{細胞塊面積変化率}[\%]}{\text{(理論値)}} = \frac{\text{細胞塊面積変化率}[\%]}{\text{(NPrCAPのみ)}} \times \frac{\text{細胞塊面積変化率}[\%]}{\text{(温熱のみ)}} / 100$$

理論値が実測値を上回れば相乗効果、同等であれば相加効果となる。例えば 1mM 条件下では、面積変化率（理論値）20%であり、薬剤のみ（37°C 条件下）では 31%、42°C 温熱条件下（薬剤 0mM）では 65% であることから相加効果と判定

された。どの薬剤濃度においても温熱と薬剤は相加効果であることがわかった。

D. 結論

ペプチドアレイを用いて gp100, MART-1, TRP-2 および Tyrosinase から合計 16 種類の免疫増強ペプチドの探索に成功した。実際にそのうちの 1 つ、LPWHRLFLL を 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 細胞が、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。この研究を通して CTI 療法の効果増強の可能性が示唆された。また、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、メラノーマ細胞の温熱/薬剤に対する感受性を評価し、互いに相加効果であることがわかった。

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

松村拓、大河内美奈、本多裕之、磁気細胞アレイによる生体模倣条件下でのがん細胞挙動及び遺伝子発現解析、日本生物工学会第63回大会（2011年9月27日、東京農工大学）

山本修平、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薬剤刺激評価系の構築、化学工学会第43回秋季大会（2011年9月14日、名古屋工業大学）

山本修平、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薬剤・温熱競合作用の評価、化学工学会第77年会（2012年3月15日、工学院大学）

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

N-Propionyl-4-S-cysteaminylphenol(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

伊藤 祥輔 藤田保健衛生大学名誉教授

若松 一雅 藤田保健衛生大学医療科学部教授

研究要旨

NPrCAP/PEG/DNM 製剤による CTI (Chemo-Thermo-Immuno-) 療法の作用機序を解明する上で、その構造中で Chemotherapy に関与する構造単位である NPrCAP 部分の役割を理解する必要がある。本研究では、このフェノール体自身のチロシナーゼ酸化による ortho-キノン体への活性化と、そのチオール類との結合形成を検討した。その結果、キノン体はシステインなどの非タンパク SH 化合物のみならず牛血清アルブミンと SH 基を介して結合すること、NPrCAP はメラノーマ培養細胞および腫瘍中でもキノン体を経てタンパクと結合することを証明した。この結合タンパクは、メラノーマ抗原として腫瘍免疫を惹起することが期待される。

A. 研究目的

N-Propionyl-4-S-cysteaminylphenol(NPrCAP) はチロシナーゼの良好な基質となり、メラノーマ細胞に選択的に取り込まれ、in vitro および in vivo で細胞毒性を引き起こすことが知られている。その作用機序については不明な点が多いが、分担研究者のひとりである山下利春らは、最近 NPrCAP が B16F1 マウスメラノーマの一次腫瘍のみならず再移植した二次腫瘍の増殖をも抑制すること、このメラノーマ免疫応答に CD8 + T 細胞が関与していることを示した。一方、ある種のフェノール類、例えば monobenzone (hydroquinone monobenzyl ether)、は皮膚接触により、接触部位のみならず非接触部位においても尋常性白斑を生じることが知られており、その

機序として近年キノン体修飾タンパクの高い免疫原性による可能性が示唆されている。すなわち、フェノール体がチロシナーゼ酸化により ortho-キノン体を経てチロシナーゼやメラノソームタンパクと結合して抗原となり、腫瘍免疫の誘導によりメラノサイトを破壊するという説である。

本年度は、NPrCAP のチロシナーゼ酸化によるキノン体への活性化とそのチオール類との結合形成について調べた (図 1)。結合形成は、塩酸水解して得られる 5-S-cysteaminyl-3-cysteiny catechol (CA-CysC) として確認した。

B. 研究方法

チロシナーゼとしてマッシュルーム由来のもの (Sigma 社) を用いた。反応はいずれも pH

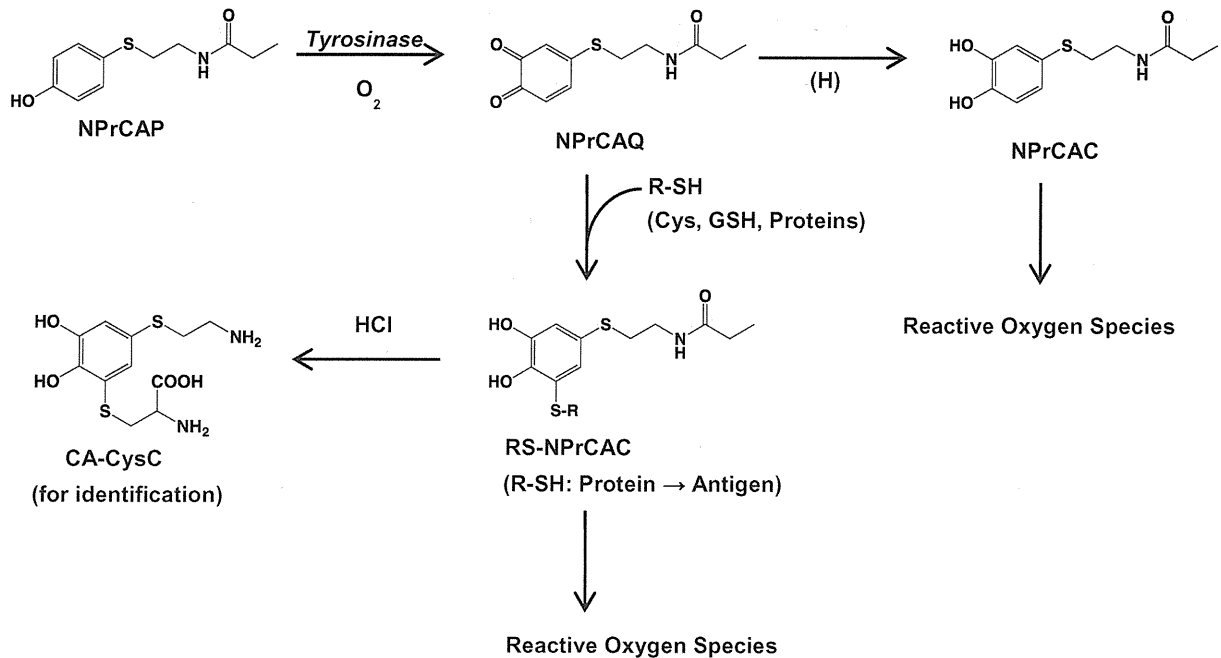


図1. NPrCAP のチロシナーゼ酸化とチオール類との結合形成

6.8 のリン酸緩衝液中 25℃で行い、UV-VIS スペクトルおよび HPLC により追跡した。生成物は ¹H-NMR、¹³C-NMR、質量分析（名古屋大学生命農学研究科小鹿一教授実施）により同定した。

In vitro および in vivo 実験は、札幌医科大学皮膚科学研究室において箆井泰江博士により実施された。

C. 研究結果

1) NPrCAP のチロシナーゼ酸化

NPrCAP のチロシナーゼ酸化により 326 nm と 460 nm に吸収極大をもつ色素が生成した。その構造は、ortho-キノン体である NPrCAQ (図1) と推測されたが、不安定であり、構造の確認は還元により得られるカテコール体 NPrCAC (吸収極大 253 nm および 290 nm) の NMR と MS によりなされた。

2) NPrCAQ とチオール類との反応

NPrCAQ は極めて反応性が高く、過剰の N-アセチルシステイン (NAcCys)、L-システイン、グルタチオンを添加すると瞬時に反応し、460 nm の吸収の消失と同時に 303 nm に吸収極大

をもつ SH 付加体を生成した。牛血清アルブミン (BSA) も同様に反応した。付加体の構造は、NAcCys 付加体 NAcCys-NPrCAC (図1) として NMR と MS により確認した。

次に、NPrCAQ とシステイン、グルタチオン、BSA との SH 基を介する結合形成は、塩酸水解後に生成する CA-CysC (図1) をアルミナで抽出後に HPLC で定量して確認した。それぞれからの収率は 77、75、59%であった。

3) In vitro および in vivo における NPrCAQ-タンパク付加体の生成

NPrCAQ が効率よく BSA と結合することを確認したので、次に in vitro と in vivo でのタンパクとの結合形成を調べた。In vitro 実験では B16 メラノーマ細胞または NIH3T3 繊維芽細胞を 0.1 mM NPrCAP と 24 時間培養した。その結果、NPrCAQ-チオール付加体は、メラノーマ細胞および培地のタンパク画分、非タンパク画分の両者に検出されたが、繊維芽細胞中には検出されなかった (表1)。同様に、B16F1 メラノーマ担がんマウスの腫瘍に 25 μmol NPrCAP を 5 日間投与したのち NPrCAQ-チオール付加体の生成を調べた。その結果、NPrCAP は腫瘍内で 5.5% の

表 1. NPrCAQ-チオール付加体の生成量^a

画分	In vitro 実験 (nmol) ^b		In vivo 実験 (nmol) ^c	
	細胞	培地	腫瘍	血清
タンパク-SH	0.47 (0.8%) ^d	0.22 (0.4%)	531 (3.3%)	12.4 (0.08%)
非タンパク-SH	0.13 (0.2%)	6.28 (11.2%)	356 (2.2%)	8.0 (0.05%)

^a NPrCAQ-チオール付加体の総量は除タンパク操作無しで測定した。一方、タンパク-SH との付加体の量は、トリクロロ酢酸によるタンパク沈殿を用いて測定した。いずれも塩酸水解、アルミナ抽出後に CA-CysC として定量した。アルミナ抽出は二重分析。

^b B16F1メラノーマ細胞 (50 万個) を 10 mL の培地中で 0.1 mM NPrCAP と 24 時間培養した。944 nmol (94.4%) の NPrCAP が未反応で残った。

^c B16F1 メラノーマ腫瘍に 25 mmol の NPrCAP を 5 日間連続投与した。8.79 mmol (35.2%) の NPrCAP が腫瘍 (0.56 g) 内に検出された。

^d 括弧内は、消費された NPrCAP に対する収率。

収率で付加体へと代謝されたことが分かった (表 1)。血清中にも微量ではあるが検出された。

D. 考察

NPrCAP によるメラノーマ増殖抑制作用の機序として、チロシナーゼによる活性化にともなう酸化ストレスによるアポトーシスの誘導が提案されている。同時に、細胞障害性 T 細胞が誘導され、全身性の抗腫瘍免疫誘導により再移植した腫瘍の増殖が抑制されるが、その機序は必ずしも明確ではない。

本研究において、NPrCAP がチロシナーゼにより酸化されて ortho-キノン体となり、チオール化合物と共有結合を形成することを示した。特に、システイン残基を 1 つしか含まない BSA が効率よく結合を形成することが分かった。このタンパクとの結合形成は、in vitro および in vivo でも証明された。特に、メラノーマ細胞と腫瘍において、結合形成の 3 分の 2 がタンパク SH によること (表 1) は注目に値する。すなわち、グルタチオンなどの非タンパク SH との結合形成はキノンの解毒化をもたらすが、その可能性は低いことを示唆するからである。

NPrCAP のチロシナーゼ酸化により生成す

る NPrCAQ はチロシナーゼあるいはメラノソームタンパクとシステイン残基を介して結合することにより抗原となり、CD8+T 細胞を活性化して腫瘍免疫を惹起するものと考えられる。同時に、NPrCAQ の細胞内での還元により生成する NPrCAC やチオール類との結合による RS-NPrCAC はカテコール体として自動酸化により活性酸素を生成し、酸化ストレスを惹起する。これが引き金となり、メラノーマ細胞のアポトーシス、それに引き続くメラノソーム関連抗原の提示を介して免疫応答を引き起こすものと考えられる。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ito, S., Wakamatsu, K., M. d'Ischia, A. Napolitano, A. Pezzella. Structure of Melanins: Melanins and Melanosomes. J. Borovanský, P. A. Riley (eds), Wiley-Blackwell, 167-185, 2011.
- 2) Ito, S., Wakamatsu, K. Diversity of human hair pigmentation as studied by chemical analysis of eumelanin and pheomelanin. J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol., 25, 1369-

- 1380, 2011.
- 3) Ito, S., Nakanishi, Y., Valenzuela, R.K., Brilliant, M.H., Kolbe, L., Wakamatsu, K. Usefulness of alkaline hydrogen peroxide oxidation to analyze eumelanin and pheomelanin in various tissue samples: application to chemical analysis of human hair melanins. *Pigment Cell Melanoma Res.* 24, 605-613, 2011.
 - 4) Mafli, A., Wakamatsu, K., Roulin, A. Melanin-based coloration predicts aggressiveness and boldness in captive eastern Hermann's tortoises. *Animal Behaviour.* 81, 859-863, 2011.
 - 5) Liu, X-M., Zhou, Q., Xu, S-Z., Wakamatsu, K., Lei, T-C., Maintenance of immune hyporesponsiveness to melanosomal proteins by DHICA-mediated antioxidation: possible implications for autoimmune vitiligo. *Free Radic. Biol. Med.*, 50, 1177-1185, 2011.
 - 6) Nakajima, H., Wakabayashi, Y., Wakamatsu, K., Imokawa, G. An extract of *Melia toosendan* attenuates endothelin-1-stimulated pigmentation in human epidermal equivalents through the interruption of PKC activity within melanocytes. *Arch Dermatol Res.* 303, 263-276, 2011.
 - 7) Niki, Y., Yoshida, M., Ando, H., Wakamatsu, K., Ito, S., Harada, N., Matsui, M.S., Yarosh, D.B., Ichihashi, M. 1-(2,4-Dihydroxyphenyl)-3-(2,4-dimethoxy-3-methylphenyl) propane inhibits melanin synthesis by dual mechanism. *J. Dermatol. Sci.*, 63, 115-121, 2011.
 - 8) Nakajima, H., Wakabayashi, Y., Wakamatsu, K., Imokawa, G. An extract of *withania somnifera* attenuates endothelin-1-stimulated pigmentation in human epidermal equivalents through the interruption of PKC activity within melanocytes. *Phyther. Res.* doi: 10.1002/ptr.3552, 2011.
 - 9) Hellström, A.R., Watt, B., Fard, S.S., Tenza, D., Mannström, Narfström, Bjön Ekestén, Ito, S., Wakamatsu, K., Larsson, J., Ulfendahl, M., Kullander, K., Raposo, G., Kerje, S., Hallböök, Marks, M.S., Andersson, L. Inactivation of Pmel alters melanosome shape but has only a subtle effect on visible pigmentation. *PLoS Genetics*, 7, e1002285, 2011.
 - 10) Kono, M., Kondo, T., Ito, S., Suzuki, T., Wakamatsu, K., Ito, S., Tomita, Y. Oculocutaneous albinism 1 minimal pigment type: a case report on the analysis of genotype of an OCA1MP patient. *Br. J. Dermatol.*, doi: 10.1111/j.1365-2133. 2011.
 - 11) Hirobe, T., Yoshihara, C., Takeuchi, S., Wakamatsu, K., Ito, S., Abe, H., Kawa, Y., Soma, Y. A novel deletion mutation of mouse ruby-eye 2 named ru2d/Hps5ru2-d inhibits melanocyte differentiation and its impaired differentiation is rescued by L-tyrosine. *Zoological Sci.*, 28, 790-801, 2011.
 - 12) Commo, S., Wakamatsu, K., Lozano, I., Panhard, S., Loussouarn, G., Bernard, B.A., Ito, S. Age-dependent changes in eumelanin composition in hairs of various origins. *Int. J. Cosmetic. Sci.*, doi: 10.1111/j.1468-2494.2011.00691.x
 - 13) Nakajima, H., Fukazawa, K., Wakabayashi, Y., Wakamatsu, K., Imokawa, G. *Withania somnifera* extract attenuates stem cell factor-stimulated pigmentation in human epidermal equivalents through interruption of ERK phosphorylation within melanocytes. *J. Nat. Med.*, doi: 10.1007/s11418-011-011-0604-0, 2011.
2. 学会発表
- 1) K. Wakamatsu, T. Murase, F.A. Zucca, L.

- Zecca, S. Ito. Chemistry and biophysics of neuromelanin. XX1st International Pigment Cell Conference (IPCC), 20 – 24 September 2011, Bordeaux, France.
- 2) S. Ito, Y. Nakanishi, K. Wakamatsu. Evaluation of alkaline hydrogen peroxide oxidation to analyze eumelanin and pheomelanin. XX1st International Pigment Cell Conference (IPCC), 20 – 24 September 2011, Bordeaux, France.
 - 3) J. Jimbow, A. Yoneda, Y. Tamura, Y. Osai, M. Sato, A. Sato, T. Kamiya, J. Kato, A. Takada, T. Yamashita, A. Miyamoto, A. Ito, H. Honda, K. Wakamatsu, S. Ito, K. Murase, S. Nohara, E. Nakayama, T. Kobayashi. Introduction of melanoma in situ peptide vaccine by chemotherapy through exploitation of melanogenesis substrate, NPrCAP, and its conjugation with magnetite nanoparticles. XX1st International Pigment Cell Conference (IPCC), 20 – 24 September 2011, Bordeaux, France.
 - 4) A. Yoneda, Y. Tamura, S. Nohara, A. Ito, H. Honda, K. Wakamatsu, S. Ito, T. Yamashita, K. Jimbow. Development and evaluation of antitumor effect of novel NPrCAP-magnetite nanoparticles for chemo-thermo-immunotherapy in malignant melanoma. XX1st International Pigment Cell Conference (IPCC), 20 – 24 September 2011, Bordeaux, France.
 - 5) Y. Ishii-Osai, T. Yamashita, M. Okura, Y. Tamura, N. Sato, A. Ito, H. Honda, K. Wakamatsu, S. Ito, K. Jimbow. N-Propionyl-4-S-Cysteaminyphenol generates reactive oxygen species and mediates apoptosis in pigmented melanoma cells. XX1st International Pigment Cell Conference (IPCC), 20 – 24 September 2011, Bordeaux, France.
 - 6) S. Commo, K. Wakamatsu, S. Ito. Human hair pigmentation characteristics revealed by melanin determination in human eumelanic hairs of various ethnic origins. XX1st International Pigment Cell Conference (IPCC), 20 – 24 September 2011, Bordeaux, France.
 - 7) S. Devi, Y. Markandeya, N. Maddodi, K. Wakamatsu, S. Ito, R. Balijepalli, V. Setaluri. A novel pathway for regulation of pigmentation by glutamate receptor mGluR6 through its action on TRPM1. XX1st International Pigment Cell Conference (IPCC), 20 – 24 September 2011, Bordeaux, France.
 - 8) S.G. Coelho, S. Ito, K. Wakamatsu, S.A. Miller, J.Z. Beer, V.J. Hearing. Distribution patterns of eumelanin and pheomelanin in human skin. XX1st International Pigment Cell Conference (IPCC), 20 – 24 September 2011, Bordeaux, France.
 - 9) Y. Niki, T. Hirobe, K. Wakamatsu, H. Ando, M. Yoshida, M. Ichihara, S. Ito. Slaty mutation inverses the ratio of DHI to DHICA content of eumelanin in both mouse melanocytes and hair. XX1st International Pigment Cell Conference (IPCC), 20 – 24 September 2011, Bordeaux, France.
 - 10) H. Okuda, T. Sota, K. Koike, K. Monda, T. Nakamura, K. Wakamatsu, S. Ito. Quantum chemical study of 5,6-dihydroxyindole tetramers as eumelanin model molecules. XX1st International Pigment Cell Conference (IPCC), 20 – 24 September 2011, Bordeaux, France.
 - 11) M. Kono, T. Kondo, S. Ito, T. Suzuki, K. Wakamatsu, S. Ito, Y. Tomita. Oculocutaneous albinism I minimal pigment type; a case report on the analysis of genotype-phenotype correlation. XX1st

International Pigment Cell Conference (IPCC), 20 – 24 September 2011, Bordeaux, France.

- 12) K. Kikuchi, K. Wakamatsu, Y. Tada, S. Ito. Serum 5-S-cysteinyl-dopa levels in psoriasis and vitiligo patients undergoing narrowband ultraviolet B phototherapy. XX1st International Pigment Cell Conference (IPCC), 20 – 24 September 2011, Bordeaux, France.
- 13) M. d'Ischia, J.-C. Garcia-Borrón Martínez, S. Ito, D. Simon. Methods in melanin research. XX1st International Pigment Cell Conference (IPCC), 20 – 24 September 2011, Bordeaux, France.

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免疫賦活効果

中山 睿一 川崎医療福祉大学・教授

研究要旨

メラノジェネシス標的製剤 NPrCAP (N-(1-mercaptopropionyl)-4S-cysteaminy) phenol) のこれまでの化学温熱免疫 (CTI: chemo-thermo-immuno) 療法の解析により、本製剤は、heat-shock protein (HSP) の発現上昇を介して抗腫瘍免疫応答を誘導することが明らかとなっている。本研究では、本製剤がメラノーマ特異的にアポトーシスを誘導することを明らかにした。また、今回、新たに作製した水溶性 NPrCAP 製剤のヒト単球系細胞に対する作用を検討した結果、本製剤が自然免疫応答を誘導し、結果として獲得免疫応答が賦活化されることを示した。このことは、NPrCAP 製剤がメラノジェネシスを標的とした抗腫瘍効果に加えて、免疫系を賦活化するアジュバント効果を有する可能性を示唆している。

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。

一方、がん免疫療法の起こりは、1891年に William Coley が担癌患者に丹毒を感染させて治療を試みたことに始まる。後に Coley's toxins と呼ばれる、不活化した化膿レンサ球菌とセラチア菌の混合物を直接注射する治療法は、自然免疫系の活性化によって炎症を引き起こし、腫瘍の治療を試みた最初の例である。現在では炎症反応は自然免疫系の賦活化だけでなく、獲得免疫系の賦活化にも必須であると考えられている。

メラノジェネシス標的製剤である NPrCAP を

用いた CTI 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 HSP の発現上昇を介して抗腫瘍免疫応答が誘導されることが報告されている。

本研究では、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 の免疫賦活効果に注目し、NPrCAP を水溶性にするためにカルボキシメチルデキストラン (CMD) をマレイミドリンカー (MIL) で結合させて複合体にした新規製剤 NPCMD (図 2) 処理によって誘導される免疫賦活効果を検討した。

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 HeLa、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。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. NPCMD 処理による炎症系サイトカインの産生

健康人末梢血単核球 (PBMC) 由来の各種免疫担当細胞を NPCMD 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。NPCMD を加えて、37℃ で 1 時間処理する。遠心洗浄後、37℃ 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で測定した。さらに、

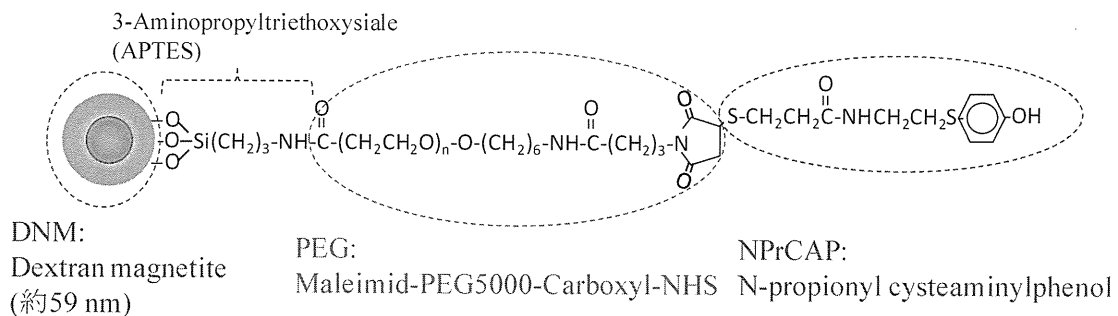


図 1. NPrCAP/PEG/DNM

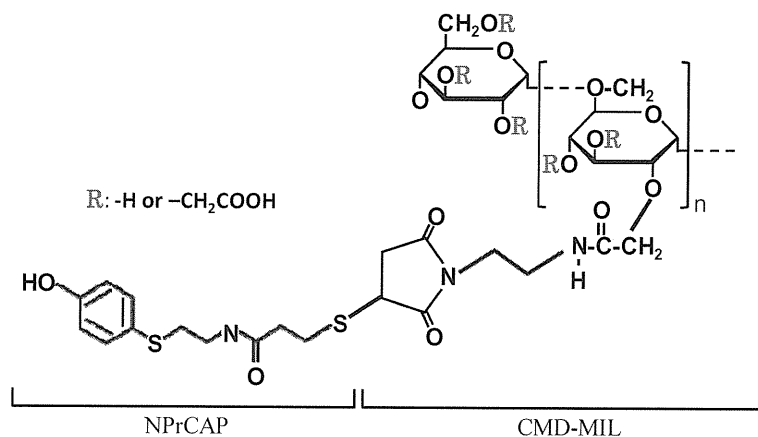


図 2. NPCMD

ヒト単球性白血病細胞株 (THP-1) を用いて、詳細な解析を行った。THP-1 細胞を NPCMD, NPrCAP, CMD-MIL で処理し、培養上清中の IL-1 β , TNF α の濃度を ELISA 法で測定した。

3. NPCMD による T 細胞賦活効果の検討

健康人 PBMC より、磁性ビーズを用いて CD14 陽性単球細胞、CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞をそれぞれ単離した。単球細胞を GM-CSF, IL-4 添加培地で 6 日間培養し未熟樹状細胞 (imDC) を誘導した。imDC にサイトメガロウイルス (CMV) pp65 タンパクを取りこませ、同時に NPCMD あるいは LPS を添加して成熟させた樹状細胞を抗原提示細胞とした。抗原提示細胞と CD4 陽性もしくは CD8 陽性 T 細胞をそれぞれ 12 日間共培養して CMV 特異的 T 細胞の刺激誘導を試みた。刺激培養後の CMV 特異的 T 細胞の頻度を、IFN γ 産生を指標としてフローサイトメトリーにより解析した。

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 において、ヒトメラノーマ特異的に本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. NPCMD 処理による炎症性サイトカインの産生

各免疫担当細胞を NPCMD で刺激した結果、CD14 陽性単球細胞からのみ、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)。

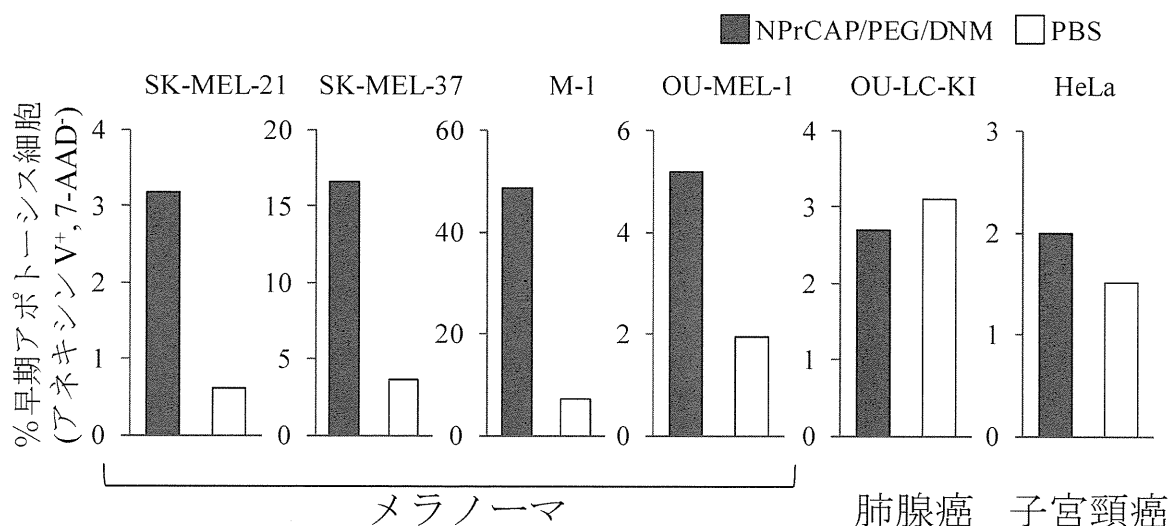


図 3. NPrCAP/PEG/DNM によるアポトーシス誘導

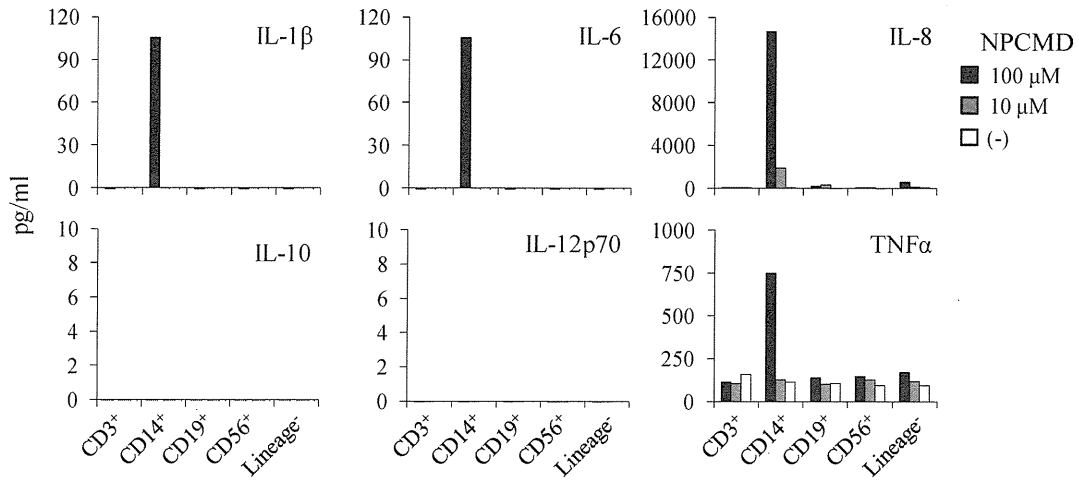


図4. NPCMD 処理によるヒト PBMC からのサイトカイン産生

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 はまず細胞内で TLR (Toll like receptor) などに刺激が入ることで酵素前駆体 (pro-IL- β) として産生される。その後、活性化型カスパーゼ 1 により切断されて活性化型 IL- β とし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で形成されるインフラマソームにより活性化される。NPCMD は単独で IL-1 β の分泌を引き起こすため、上述の二経路を両方とも刺激している可

能性がある。そこで IL-1 β 分泌に着目し、単球様細胞株 THP-1 を用いて以後の実験を行った。

THP-1 細胞においても健康人由来単球細胞と同じく NPCMD の刺激によって IL-1 β 、TNF α が産生されたが、NPCMD を構成する NPrCAP あるいは CMD-MIL による刺激では産生が認められなかった。また、TLR4 のリガンドである LPS による刺激では、TNF α は産生されたが、IL-1 β の分泌は検出されなかった。一方、NLRP3 のリガンドである Alum あるいは ATP による刺激は、単独では IL-1 β 、TNF α の産生を認めなかつ

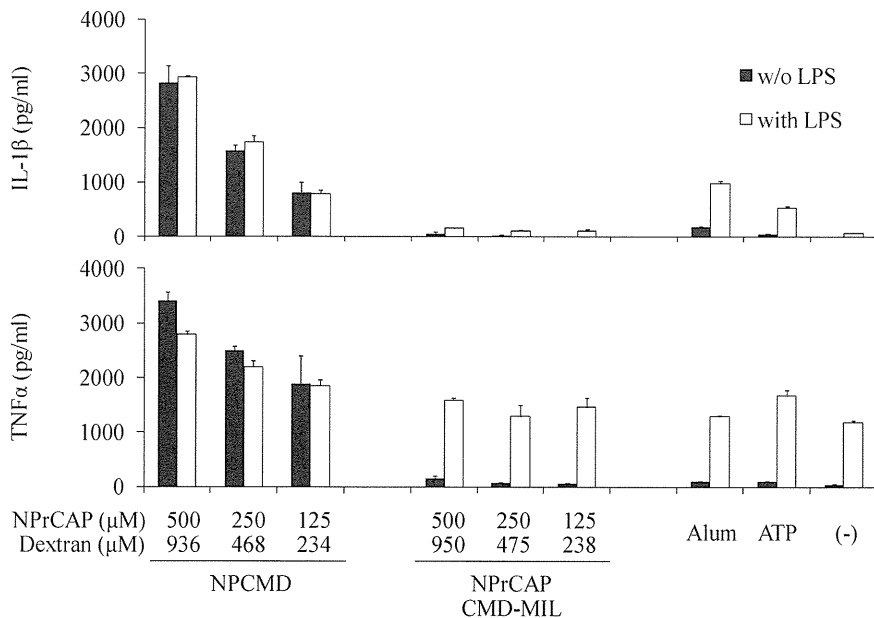


図5. NPCMD 処理による THP-1 細胞からの IL-1 β 、TNF α 産生

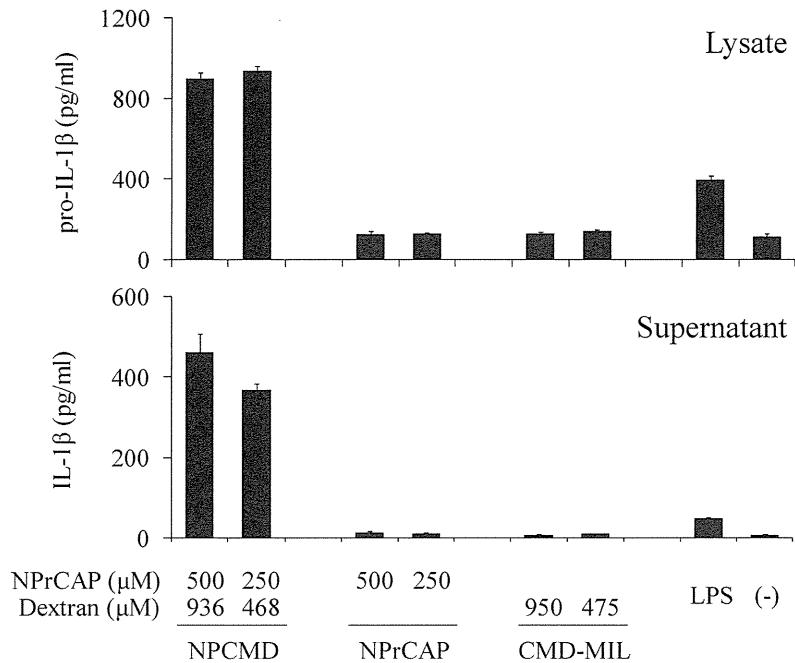


図6. NPCMD 処理による THP-1 細胞内 pro-IL-1 β 産生

た。しかし、LPS 処理により予め細胞内に pro-IL-1 β を産生しておくことで、Alum あるいは ATP 処理によって IL-1 β が分泌された (図5)。

さらに、刺激した細胞の細胞溶解液 (lysate) 中の pro-IL-1 β を測定した結果、NPCMD および LPS によって、pro-IL-1 β が産生されていた (図6)。

以上の結果より、NPCMD が二種類の経路を刺

激して単球系細胞に炎症系サイトカインを分泌させることが示唆された。

3. NPCMD による T 細胞賦活効果の検討

NPCMD 処理した成熟樹状細胞による抗原刺激により、抗原特異的 CD4 陽性 T 細胞の頻度が上昇した (図7)。このことは NPCMD 処理により、樹状細胞の抗原提示能が上昇したことを示唆

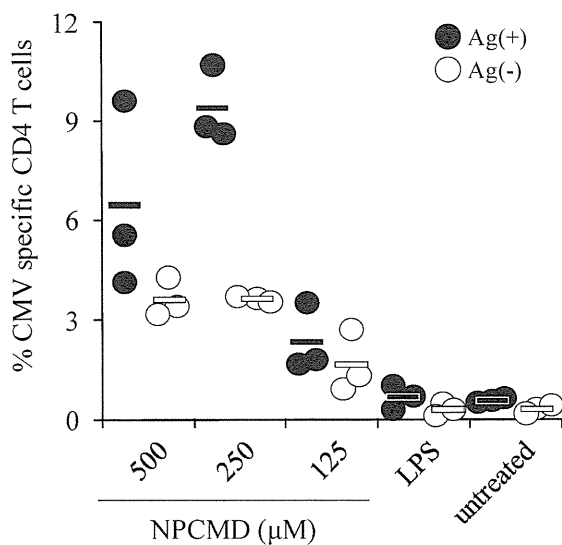


図7. 抗原特異的 CD4 陽性 T 細胞応答

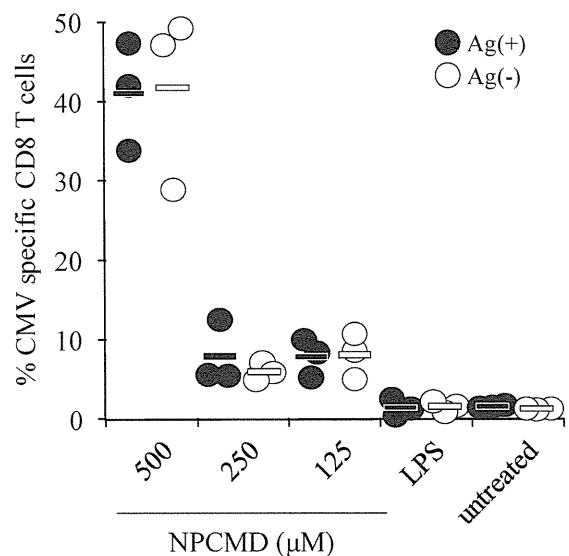


図8. 抗原特異的 CD8 陽性 T 細胞応答

する。

一方で、CD8 陽性 T 細胞においては、非特異的な IFN γ の産生が検出された (図 8)。最近、IL-1 ファミリーのサイトカインである IL-18 の刺激によって、CD8 陽性 T 細胞が非特異的に IFN γ を産生することが報告されている (Kupz, 2012)。このことから、NPCMD 刺激によって樹状細胞から分泌された IL-18 が CD8 陽性 T 細胞を活性化して IFN γ を産生させた可能性が考えられる。

以上の結果から、NPCMD を使用することで、局所における炎症性サイトカインの産生により、自然免疫系が賦活化され、結果的に CD8 陽性 T 細胞が活性化することが期待される。また、抗原提示細胞の T 細胞に対する抗原提示能を高め、がん抗原特異的なヘルパー T 細胞 (Th) が誘導されることも期待される。結果として、自然免疫、獲得免疫双方の賦活化が起こり、より効率的に腫瘍を拒絶することが期待される。

D. 健康危険情報

E. 研究発表

1. 論文発表

1. Ohue, Y., Eikawa, S., Okazaki, N., Mizote, Y., Isobe, M., Uenaka, A., Fukuda M., Old, L.J., Oka, M., and Nakayama, E. Spontaneous antibody, and CD4 and CD8 T-cell responses against XAGE-1b (GAGED2a) in non-small cell lung cancer patients. *Int. J. Cancer*, 2011 Nov 22. doi: 10.1002/ijc.27359, in press.
2. Kawada, J., Wada, H., Isobe, M., Gnjjatic, S., Nishikawa, Y., Jungbluth, A.A., Okazaki, N., Uenaka, A., Nakamura, Y., Fujiwara, S., Mizuno, N., Saika, T., Ritter, E., Yamasaki, M., Miyata, H., Ritter, G., Murphy, R., Hoffman, E.W., Pan, L., Old, L.J., Doki, Y.,

and Nakayama, E. Heteroclitic serological response in esophageal and prostate cancer patients after NY-ESO-1 protein vaccination. *Int. J. Cancer*, 130 (3) :584-92, 2011.

3. 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*, 129 (12) :2836-46. 2011.
4. 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.
5. 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.
6. Mizote, Y., 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. 中山睿一、NY-ESO-1 がんワクチン (シンポジウム)、第 28 回 日本医学会総会 2011 東京、2011 年 4 月 8 ~ 9 日

2. 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15回 日本がん免疫学会 (大阪)、2011年6月30～7月1日
3. 溝手 雄、上中明子、磯辺みどり、和田 尚、雑賀隆史、喜多祥一、岡 三喜男、中山睿一、HLAクラスIIテトラマーを用いた免疫モニタリング、第15回 日本がん免疫学会 (大阪)、2011年6月30～7月1日
4. Yu Mizote, Akiko Uenaka, Midori Isobe, Hisashi Wada, Takashi Saika, Shoichi Kita, Mikio Oka, Eiichi Nakayama, Detection of CD4 T-cell responses using the HLA class II tetramer in the vaccinated cancer patients, 第70回 日本癌学会総会 (名古屋)、2011年10月3～5日
5. 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70回 日本癌学会総会 (名古屋)、2011年10月3～5日
6. Hisashi Wada, Midori Isobe, Gnjatic Sacha, Hiroyoshi Nishikawa, Akiko Uenaka, Yurika Nakamura, Shinichi Fujiwara, Hironori Akitake, Makoto Yamasaki, Hiroshi Miyata, Yuichiro Doki, Eiichi Nakayama, “Antigen Spreading” in patients vaccinated with NY-ESO-1 protein, 第70回 日本癌学会総会 (名古屋)、2011年10月3～5日
7. Shohei Domae, Tadashi Hanafusa, Masato Otduka, Mika Muraoka, Akira Sasaki, Eiichi Nakayama, Toshiro Ono, Humoral immune response of cancer patients against newly SEREX-defined antigen, GKAP1, 第70回 日本癌学会総会 (名古屋)、2011年10月3～5日
8. Yoshihiro Ohue, Shingo Eikawa, Yu Mizote, Hirofumi Matsumoto, Nami Okazaki, Midori Isobe, Akiko Uenaka, Mikio Oka, Eiichi Nakayama, Correlation of Antibody and T Cell Responses Against XAGE-1b in NSCLC Patients, 19th Annual International Cancer Immunotherapy Symposium, (NEW YORK), 2011年10月3～5日
9. Shingo Eikawa, Kazuhiro Kakimi, Midori Isobe, Kiyotaka Kuzushima, Yoshihiro Ohue, Kazuhiro Ikeuchi, Akiko Uenaka, Heiichiro Udono, Lloyd J. Old, Mikio Oka, Eiichi Nakayama, Induction of CD8 T Cell Responses Restricted to Multiple HLA Class I Alleles in a Cancer Patient by Immunization with a 20-Mer NY-ESO-1f (NY-ESO-1 91-110) Peptide, 19th Annual International Cancer Immunotherapy Symposium, (NEW YORK), 2011年10月3～5日
10. 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
11. 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
12. 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
13. 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

14. 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
15. 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
16. Tadashi Hanafusa, Kenta Kitaoka, Yoshihiro Ohue, Eiichi Nakayama, Toshiro Ono, Isolation and characterization of human lung cancer antigens by serological screening with autologous antibodies, 第69回 日本癌学会総会（大阪）2010年9月22～24日
17. 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
18. 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
19. 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
20. 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
21. SHINGO EIKAWA, Yoshihiro Oue, Midori Isobe, Kazuhiro Ikeuchi, Akiko Uenaka, Kazuhiro Kakimi, Mikio Oka, and Eiichi Nakayama, CD8 T Cell Response in NY-ESO-1 f-Peptide Vaccinated Patients, INTERNATIONAL IMMUNOTHERAPY SYMPOSIA SERIES, CANCER IMMUNOTHERAPY 2010 (NEW YORK), 2010年10月6～8日
22. 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
23. 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
24. 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癌患者における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
25. 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

3. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
2. 実用新案登録

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

メラノーマ細胞に対するN-propionyl-4-S-cysteaminylphenol (NPrCAP) の生物学的、生化学的および分子生物学的活性

山下 利春 札幌医科大学医学部皮膚科学講座・教授

要 旨

本研究では、NPrCAP の化学療法薬としての抗メラノーマ効果を、培養メラノーマ細胞を用いて検討した。NPrCAP による細胞障害は活性型の NPr-4-S-CAP に観察されたが、不活性型の NPr-2-S-CAP には認められなかった。NPrCAP による細胞死誘導の過程は、活性酸素 (ROS) の産生、DNA の断片化およびカスパーゼ 3 の活性化を伴うアポトーシスであることが示された。NPrCAP による細胞死誘導と ROS 産生は色素性メラノーマ細胞に顕著にみられ、細胞内 ROS レベルとアポトーシス誘導は相関がみられた。NPrCAP によるアポトーシス誘導の分子機構について、さらに詳細な研究を行った。

A. 研究の背景と目的

悪性黒色腫（メラノーマ）は転移しやすく、遠隔転移を起こした進行期メラノーマの5年生存率は10%前後ときわめて予後が悪い。2010年から昨年にかけて、進行期メラノーマに対する選択的 BRAF 阻害薬 (Vemurafenib) と抗 CTLA-4 抗体 (Ipilimumab) の第 III 相ランダム化比較試験が行われ、いずれも全生存期間の改善が報告された。Vemurafenib は BRAF V600E 変異のあるメラノーマのみが適応となり、Ipilimumab は全身炎症反応が高率に合併する。従って、進行期メラノーマの先進的治療は、症例ごとに治療法を選択する必要があり、患者背景および腫瘍の遺伝子変化に関わらず使用でき、かつ、副作用の少ない安全な治療法が求められている。

メラノソームは通常、網膜と脳軟膜を除けば、皮膚及び毛組織にのみ存在する。このため、メラニン合成系を標的とするメラノーマ抑制療法は、全身副作用の少ないメラノーマ特異的な治療となり得る。N-propionyl-4-S-cysteaminylphenol

(NPrCAP) は、チロシナーゼの基質としてメラニン合成系に取り込まれ、メラノーマ細胞に細胞障害を示す。これまで NPrCAP をマグネタイトに結合したナノ微粒子 (NPrCAP/M) を合成し、培養細胞および移植腫瘍に対する実験的治療を行い以下の結果を得た。ヒトおよびマウスメラノーマ細胞は効率よく NPrCAP/M を取り込み、NPrCAP/M 処理後磁場照射したメラノーマ細胞はネクローシスを起こした (Sato M *et al*: J Invest Dermatol, 2009)。移植腫瘍を用いたモデル実験では、46℃よりも43℃の温熱療法が2次腫瘍の抑制に効果的であった (Takada T *et al*: J Biomed Biotechnol, 2009)。

NPrCAP-マグネタイトによる温熱免疫療法は、NPrCAP のメラノーマ親和性とメラノーマ特異的細胞傷害性を期待するものである。今年度は NPrCAP のメラノーマ細胞特異的細胞障害性のメカニズムを詳細に解析するため、NPrCAP 処理細胞における活性酸素 (reactive oxygen species) の発生とアポトーシス誘導性について検討した。

B. 研究方法

NPrCAP をプロピレングリコールに溶解し、使用時に Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)、あるいは RPMI1640 に希釈して使用した。マウスメラノーマ細胞 B16F1、マウス線維芽細胞 NIH3T3、およびヒトメラノーマ細胞株は 5% FBS を添加した DMEM で培養した。細胞死の解析はフローサイトメトリーにより検討した。細胞を回収後、70% エタノールで固定し、propidium iodide を加え、FACS Calibur flowcytometer (Becton Dickinson, CA, USA) で解析した。

蛍光抗体法による活性酸素の測定は、丸形スライドグラス上で培養した細胞に、5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydro-fluorescein diacetate, acetyl ester (CM-H2DCFDA, Invitrogen) を 1ml 加え、37℃、30 分間培養後 PBS で洗浄した。1mM NPrCAP、またはポリプロピレングリコールを加え 1 時間反応し洗浄した後、24 時間培養した。パラホルムアルデヒドで固定し、Rabbit pAb to Active Caspase 3 (Abcam) と 2 次抗体を加え、12 時間後 Hoechst 33342 solution (Wako) を添加し 15 分反応し、共焦点レーザー走査蛍光顕微鏡を用いてアポトーシスとネクローシスの識別、細胞内 ROS、活性化 Caspase 3 を観察した。

カスパーゼ活性の測定は、Caspase-Glo 3/7 Assay キット溶液 (Promega) 100 μ l と 5%FBS 添加 DME 100 μ l を添加し 2 時間後、マルチラベルリーダーで発光シグナル量を測定した。

Real time-PCR は、以下のように行った。細胞培養ディッシュに NPrCAP を 0.5、1.0、3.0 mM に調整した培養液を加え 1 時間培養後、さらに 24 時間培養した。細胞より RNA を精製し、cDNA を合成した。Nrf-2、HO-1 特異的プライマーを用いて、ABI/PRISM 7500、Real-Time PCR System (Applied Biosystems) で解析した。RNA マイクロアレイは東レの 3D-GENE ヒト全遺伝子型 2 色法により、24,460 遺伝子の発現変化を解析

した。

C. 研究結果及び考察

1) NPrCAP による細胞死の解析

NPr-4-S-CAP は B16F1 細胞の増殖を濃度依存性に抑制したが、NIH3T3 細胞の増殖には影響を与えなかった。生化学的に不活性な NPr-2-S-CAP はいずれの細胞の増殖にも影響を与えなかった。

NPrCAP による細胞増殖抑制の機序を検討するため、NPrCAP 処理を行った培養細胞の DNA をフローサイトメトリーで解析した。NPrCAP 添加培地で培養した B16F1 細胞では、sub-G1 分画の増加を認めたが、マウス NIH3T3 線維芽細胞ではコントロールと差が見られなかった。

NPrCAP による細胞死の形態学的変化、ROS の増加、およびアポトーシスに伴う caspase 3 の活性化の有無を蛍光顕微鏡により観察した。NPrCAP を添加した細胞群では、約半数の核に濃縮と凹凸分岐を認め、細胞内 ROS の増加、および caspase 3 の活性化を認めた。NIH3T3 細胞では NPrCAP 投与の有無に関わらずこれらの発現はみられなかった。活性化 Caspase 3/7 の発現を発光法により観察した。NPrCAP 添加培地で培養した B16F1 細胞では、コントロール群と比較して 33.7 倍の Caspase 3/7 の活性を認めた。

以上より NPrCAP はメラノーマ細胞にアポトーシスを誘導し、アポトーシス過程に活性酸素が関与することが示唆された。

2) ヒトメラノーマ細胞株における活性酸素とアポトーシス誘導

NPrCAP による ROS 発生、アポトーシス誘導と細胞のメラニン合成活性との関係について検討した。NPrCAP はメラニン合成のみられるマウス B16F1、ヒト 70W、ヒト M1 細胞の増殖を抑制し大量の ROS を産生したが、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、TXM18 の増殖抑制効果は著明ではなく ROS 産生はほとんど認められなかった。すなわ