

図1. NPrCAPの細胞増殖とROS産生に対するNPrCAPの効果(B16F1細胞)

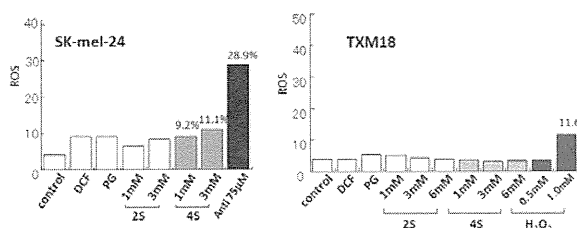


図2. 無色素性メラノーマ細胞におけるROS産生

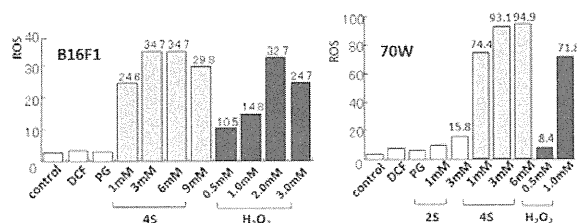


図3. 色素性メラノーマ細胞におけるROS産生

ち、メラニン合成活性、NPrCAPによるROS産生、NPrCAPによるアポトーシス誘導は相関性を示した(図1、図2、図3)。

3) メラノーマ細胞におけるNrf1とHO-1の発現

細胞内の酸化ストレスに対応して、転写因子Nrf2がリン酸化・活性化し、様々な抗酸化/解毒代謝遺伝子群が転写誘導される。ヒトメラノサイトにおいても、酸化ストレスに伴って、Nrf-ARE経路が活性化され、ヘムオキシゲナーゼ1(HO-1)が転写活性化されることが報告された。NPrCAPによるROS産生に対応して、Nrf-ARE/HO-1経路の活性化が見られるかどうかについて検討した。

ウェスタンブロット法、real-time PCR法のいずれにおいても、Nrf、HO-1遺伝子の転写誘導、

蛋白質レベルの増加も認められなかった。以上の結果より、NPrCAPによりメラノーマ細胞にROS産生が亢進するが、Nrf1/HO-1酸化ストレス応答系は機能せず、アポトーシスが容易に誘導されることが示唆された。

4) RNAマイクロアレイによる解析

NPrCAPにより、ROS産生とアポトーシス誘導を示すヒトメラノーマ細胞70WをNPrCAP 3mMで処理した後、RNAを精製し、遺伝子転写産物のマイクロアレイ解析(TORAY)に供した。2倍以上の転写促進を示した細胞遺伝子21のうち、13遺伝子がアポトーシス関連遺伝子であったことより、広範囲の細胞遺伝子がアポトーシスに関与する事が示唆された。今後、転写誘導された細胞遺伝子との解析を行い、メラノーマ細胞のアポトーシス誘導機構の解明を目指した研究を行う予定である。

D. 研究業績

- Hida T, Yoneta T, Nishizaka T, Ohmura T, Suzuki Y, Kameshima H, Yamashita T: Pigmented mammary Paget's disease mimicking melanoma: report of three cases. Eur J Dermatol 2011 Nov 7 [Epub ahead print]
- Yoneta A, Horimoto K, Nakahashi K, Mori S, Maeda K, 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.
- Uhara H, Yamazaki N, Takata M, Inoue Y, Sakakibara A, Nakamura Y, Suehiro K, Yamamoto A, Kamo R, Mochida K, Yamashita T, Takenouchi T, Takenaka H, Yoshikawa S, Takahashi A, Uehara J, Kawai M, Iwata H, Kadono T, Kai Y, Watanabe S, Murata S, Ikeda T, Fukamizu

- H, Tanaka T, Hatta N, Saida T: Applicability of radiocolloids, blue dye and fluorescent indocyanine green to sentinel node biopsy in melanoma. *J Dermatol* 2011 May09.
4. 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; 38: 432-441.
 5. Okura M, Hagiwara K, Hida T, Yoneta A, Yanagisawa K, Horio Y, Yamashita T: Effects of a low-molecular-weight polyphenol(oligonol) on the growth and melanogenesis of primary melanocytes and melanoma cells. International Pigment Cell Conference. 2011 Sep 20-24, Bordeaux, France.
 6. Yoneta A, Tamura Y, Nohara S, Ito A, Honda H, Wakamatsu K, Ito S, Yamashita T, Jimbow K: Development and evaluation of antitumor effect of novel NPrCAP-magnetite nanoparticles for chemothermo-immunotherapy in malignant melanoma. International Pigment Cell Conference. 2011 Sep 20-24, Bordeaux, France.
 7. Ishii-Osai Y, Yamashita T, Okura M, Tamura Y, Sato N, Ito A, Honda H, Wakamatsu K, Ito S, Jimbow K: N-Propionyl-4-S-Cysteminyphenol generates reactive oxygen species and mediates apoptosis in pigmented melanoma cells. International Pigment Cell Conference. 2011 Sep 20- 24, 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

要 旨

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細胞の解析として、特に腫瘍浸潤リンパ球の解析を行った。CTI療法後に所属リンパ節の増大が認められ、フローサイトメトリーによる解析により、リンパ節内のCD8陽性T細胞数の増加がみられた。また、CTI療法を行ったマウスの腫瘍浸潤リンパ球のT細胞レセプターのレパトワ解析および各種抗原で再刺激した際のインターフェロン γ 放出量の検討を行ったところ、TCR V β を発現するT細胞が重要であり、TRP-2ペプチドが抗原となりえることが示された。これらの結果は、CTI療法における免疫のブースト方法に重要な知見を与えると考えられる。

A. 研究目的

CTI（Chemo-Thermo-Immuno-）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ことが今までの研究でわかっている。本研究では、このCTI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）の解析として、特に腫瘍浸潤リンパ球（tumor-infiltrating lymphocyte, TIL）の解析を行う。CTI療法後におけるTIL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と考えられる。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効果的に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、前年度に引き続き、CTI療法後のTIL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、CTI療法を行った後の所属リンパ節のサイズ測定、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）のレパトワ解析およびインターフェロン（IFN） γ 放出量の検討を行った。

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 A22-180-0「磁性ナノ粒子を用いたがん温熱

免疫療法の開発」。

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(day 3)に NPrCAP/M(40mg/ml, 0.05 ml) を腫瘍内に注入し、高周波磁場発生装置 (第一高周波鋼業社製) を用いて交流磁場照射 (120 kHz, 386 Oe) を行った。磁場照射時間は 1 日 1 回、30 分間行った。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、出力を調整することで 43°C に合わせた。この一連の操作を 1 日置きに 3 回行った (図 1)。治療後、day 14 に腫瘍を切除して、腫瘍の重量測定を行った。

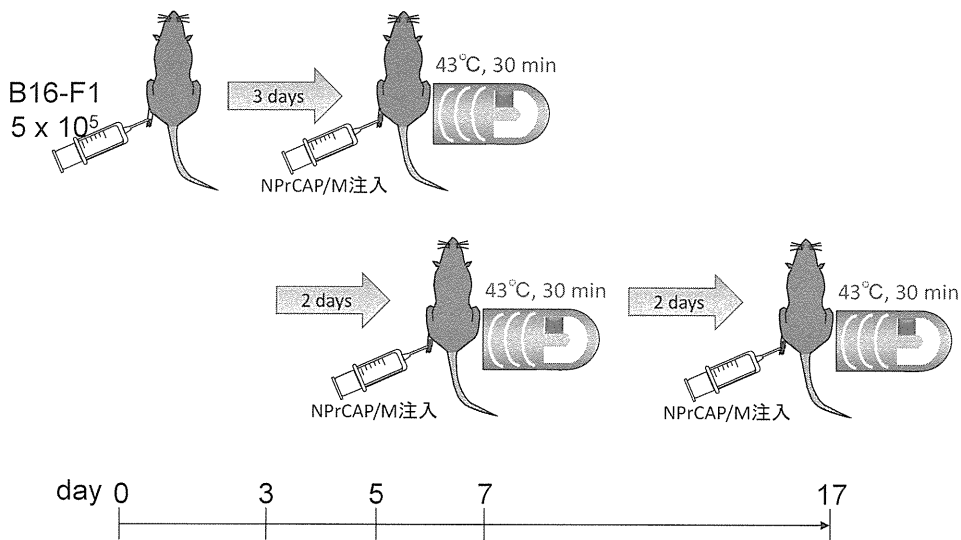


図 1

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 5 ml 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。

TCR V β ファミリーレパトワ解析

摘出したリンパ節から、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 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 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プロマ

イドを最終濃度が $0.5 \mu\text{g/ml}$ 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10 bp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入れ、150Vで1.5時間電気泳動を行い、TCR $V\beta$ のバンドパターンを調べた。電気泳動は、サブマリンアガロースゲル電気泳動装置（マリソル）を用いて行った。さらに、電気泳動後のDNAのバンドを精製し、TAクローニングキット（pGEM-T and pGEM-T Easy Vector Systems, Promega）を用いて、TCR $V\beta$ のCDR3領域をクローニングした。クローニングしたDNA配列は、シーケンス解析を行うことで、CTI療法で誘導されるTILのTCR $V\beta$ のCDR3領域を同定した。

IFN- γ 分泌細胞解析

CTI療法後のリンパ節細胞がB16細胞あるいはメラノーマ抗原ペプチドに対して反応するかどうかを調べるため、B16細胞を以下のように調製した。また、メラノーマ抗原ペプチドとして、TRP-1 (222-229), TRP-2 (180-188) およびgp100 (25-33)、および、コントロールペプチドとしてOVA (257-264) も使用した。90%コンフルエントまで増殖したB16F1細胞を、最終濃度が $10 \mu\text{g/ml}$ 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 $5 \times 10^5 \sim 2 \times 10^6$ 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。ペプチドの実験は同様に、それぞれのペプチドでリンパ節細胞を5日間刺激した。5日後に培地を回収して、リンパ節細胞が分泌したIFN- γ 量ELISAキット（Thermo）を用いて定量した。

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°C に到達した。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ところ、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。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およびナイーブ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2）。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マウスで比較したところ、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3）。これらの結果から、

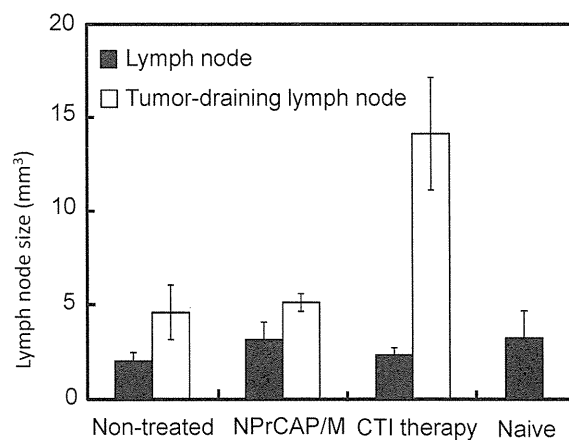


図2 治療後のリンパ節のサイズ

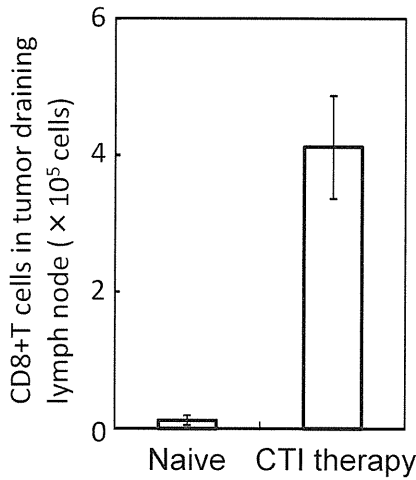


図3 治療後のリンパ節のサイズ

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。

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、V β 20 を除くほぼ全ての 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。一方で、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 15 種類のレパトワに限定された。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 はさらに限定され、V β 5, 8.3, 11 の三種類に限定されたことから、CTI 後の TIL はオリゴクローナルに増幅されていることが分かった。その中でも、複数回の実験で V β 11 の発現が確認されたことから、TCR V β 11 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られる。

さらに、5 匹分の腫瘍を使用してレパトワ解析を行ったところ、V β 4,6,8,11,15,17 の 6 種類のレパトワが検出され、シーケンス解析を行ったところ、表 1 の 5 種類のシーケンス結果が得られた (表 1)。

次に、CTI 療法後の TIL における抗原特異性を調べるために、メラノーマ抗原特異的ペプチド

表 1 CDR3 のシーケンス解析

	V β	N-DB-N	J β	Frequency
v β 6	TGTGCCAGCAG C A S S	CCCTGGACGG P G R	AACACAGAA N T E	J β 1-1 1/1
v β 8.2	GCCAGCGGTG A S G	CAGACAGT A D S	AGTCAAAC S Q N	J β 2-4 5/5
v β 11	GCAAGCAGCTTAGA A S S L E	ACTGGGGGGCGA L G G R	GAACAGTAC E Q Y	J β 2-7 3/6
	GCAAGCAGC A S S	TCACTGCTT S L L	AGTGCAGAA S A E	J β 2-3 1/6
	GCAAGCAGC A S S	TCACTGTTT S L F	AGTGCAGAA S A E	J β 2-3 2/6

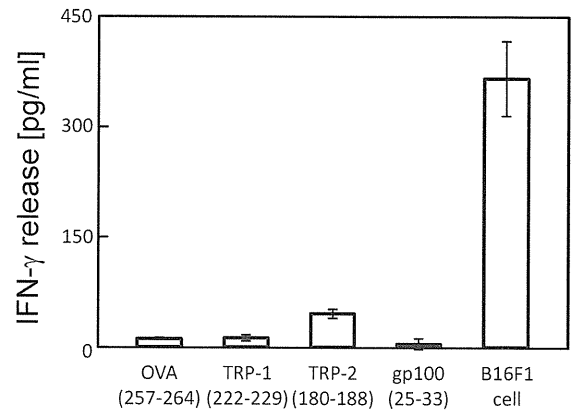


図 4 IFN- γ 放出量の定量による抗原の解析

や B16F1 細胞を用いて、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。

図 4 に結果を示す。治療開始から 14 日後のマウスからリンパ節を切除し、各ペプチドあるいは IFN- γ 処理することで MHC-I を発現させた B16F1 細胞で刺激することで、抗原による再刺激を与えたところ、コントロールの OVA (257-264) と比較して、TRP-2 (180-188) で刺激した場合に有意に IFN- γ が放出された。一方、B16F1 細胞自体を用いた場合には、TRP-2 (180-188) で刺激した場合よりもはるかに高い IFN- γ 放出量が検出された。これらのことから、CTI 療法で誘導された TIL は TRP-2 に反応することが示された。これまでに、B16 細胞に対する免疫療法で得られた CTL クローンが V β 11 を発現しているといった報告がある。我々の検討においても、CTI 療法後に V β 11 が多く検出され (表 1)、さらに TRP-2 に反応する (図 4) ことで一致した傾向がみられた。一方で、B16F1 細胞で

再刺激すると、はるかに高い活性がみられたことから、他の抗原が存在する可能性が示された。

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 細胞特異的に重要であることが示唆された。また、TRP-2 ペプチドの投与が、CTI 療法の効果をブーストするアジュバント療法になりえることが分かった。

D. 健康危険情報

E. 研究発表

1. 論文発表

投稿準備中

2. 学会発表

1. 井藤 彰、磁性ナノ粒子を用いた医療技術の開発、北九州化学工学懇話会、2011 年 12 月 13 日
2. 井藤 彰、機能性磁性ナノ粒子の開発と医療への応用、第 4 回ナノバイオ若手ネットワークシンポジウム、2011 年 6 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

CTI療法の奏功率上昇を目的とした免疫賦活法の基礎的検討

田村 保明 札幌医科大学 病理学第1講座 講師

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。このようなメラノーマに対する新たな免疫ブースト治療として、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の局所および全身性投与による抗腫瘍効果を検討する。またNPrCAPはメラノサイトに選択的に取り込まれ、酸化ストレスによるメラノサイトの細胞死を誘導することから、再発予防の観点からナイーブマウスにNPrCAP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、すなわちチロシナーゼ、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。本年度においてはNPrCAP腫瘍内投与によりアポトーシスを来したメラノーマ由来の癌抗原を効率よく抗原提示させる目的で、腫瘍内にNPrCAPと樹状細胞を併用投与することで、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ならびに治療効果を検討した。さらに、CTI療法の抗腫瘍免疫応答誘導には、温熱療法によるメラノーマ細胞死に伴う熱ショック蛋白質Hsp72の細胞外への放出が重要な役割を果たしていることを報告している。メラノーマ細胞から放出されるHsp72にはメラノーマ腫瘍抗原ペプチドが結合しており、この

Hsp72-ペプチド複合体が抗原提示細胞に取り込まれたのち、抗原ペプチドがクロスプレゼンテーションされることでT細胞を活性化することを報告している。すなわちCTI療法はそれ自身がin situペプチドワクチンとして、抗腫瘍免疫応答を誘導する。そこで、Hsp72に結合効率の高いメラノーマ抗原ペプチドを同定して、このペプチドをワクチンとしてCTI治療後のメラノーマ特異的免疫維持療法に用いることを計画している。

B. 研究方法

1 NPrCAP全身性投与による抗腫瘍効果と腫瘍免疫誘導の機序

B16-OVAおよびB16F1メラノーマ担癌マウスを用いてNPrCAPの全身性投与（腹腔内投与および静脈内投与）を行い、腫瘍増殖に与える効果を検討する。また抗腫瘍効果の見られたマウスを用いて、メラノーマ特異的細胞傷害性T細胞誘導、抗メラノーマ抗体の誘導を検討する。特にメラノーマ分化抗原のどれに対する免疫反応が誘導されているのか、明らかにすることでヒトの臨床試験の基礎とする。これらは、⁵¹Crを用いた細胞障害試験、ELLISPOT, ELISAを用いて検討する。

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をNPrCAP単独腫瘍内投与と比較する。

3. 腫瘍内 NPrCAP + 樹状細胞細胞投与による治療による抗メラノーマ免疫応答誘導

NPrCAP と樹状細胞の腫瘍内投与によるメラノサイト細胞死を介するメラノーマ分化抗原、すなわち gp100, TRP-2 およびモデル抗原 OVA に対する免疫応答誘導がなされているかを ^{51}Cr を用いた細胞障害試験、ELLISPOT を用いて検討する。

4. 樹状細胞によるアポトーシス細胞の貪食とクロスプレゼンテーションによる細胞障害性 T 細胞の誘導

B16OVA 細胞に NPrCAP を添加培養し、アポトーシスを誘導し、これに骨髓由来樹状細胞と 6 時間混合培養した。その後、CD11c MACS 磁気ビーズを用いて、樹状細胞を精製し、OVA 特異的な細胞障害性 CD8^+ T 細胞 B3Z と共培養を行い、その反応性を検討した。

5. Hsp72 および HLA-A24 に結合親和性の高いメラノーマ関連抗原ペプチドの同定

共同研究者の本多により Hsp72 および HLA-A24 への結合親和性を指標に同定されたメラノーマ関連抗原由来ペプチドをまず、HLA-A24 を発現している T2-A24 を用いたペプチド結合アッセイを用いて、その HLA-A24 結合能をフローサイトメーターを用いて測定した。次に HLA-A24 への結合が確認されたペプチドを骨髓から誘導した樹状細胞にパルスしたものを HLA-A24 トランスジェニックマウスに 4 回免疫して、ペプチド特異的な細胞障害性 T 細胞の誘導を検討した。

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

昨年度までの研究によって、あらかじめ NPrCAP を腹腔内に投与したマウスに B16F1 メラノーマを接種すると、ほぼ全例で腫瘍増殖の

抑制効果を認めた。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た。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な細胞障害性 T 細胞 (CTL) が誘導することが可能であった。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。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 腫瘍内投与による皮下移植メラノーマに対する抗腫瘍効果

上記の検討結果から、すでに存在するメラノーマに対して NPrCAP を腫瘍内投与による治療効果が期待された。これを検討する目的で、あらかじめモデル抗原として Ovalbumin (OVA) を発現させたマウスメラノーマ B16OVA を皮下に樹立したマウスに対して、NPrCAP を腫瘍内投与 ($24.4 \mu\text{M}$) を合計 2 回行って、腫瘍増殖に与える効果を検討した。すなわち 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 $24.4 \mu\text{M}$ 腫瘍内に投与して、その腫瘍増殖に与

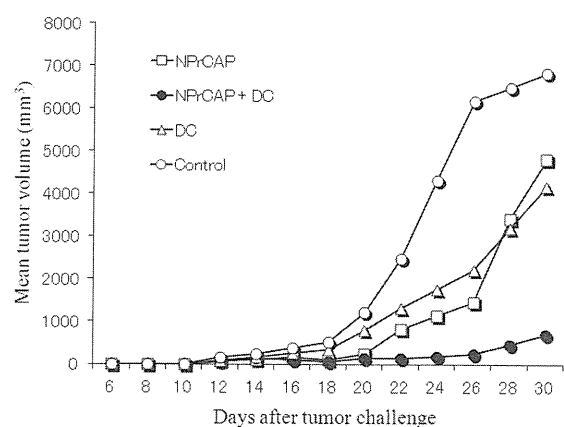


図 1

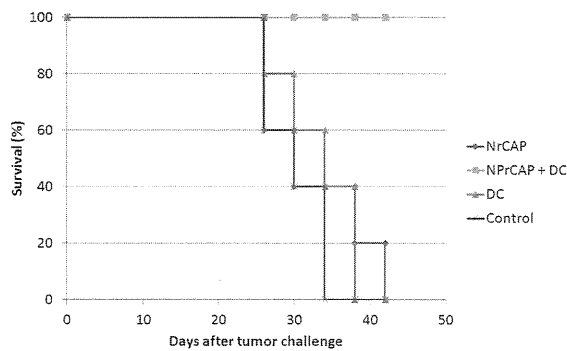


図 2

える効果を観察した。NPrCAP を 2 回腫瘍内投与した群では、コントロール群と比較して、明らかな B16OVA メラノーマの腫瘍増殖抑制効果を認めた (図 1)。また生存日数の著明な延長を認めた (図 2)。この事実は、腫瘍内に投与された NPrCAP がメラノーマに取り込まれ、アポトーシス誘導による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. NP r CAP と樹状細胞の腫瘍内投与は、著明な抗腫瘍効果を示し、メラノーマ特異的細胞障害性 T 細胞を誘導する。

NPrCAP の腫瘍内投与は、局所の腫瘍増殖抑制効果を認めるものの、その効果は満足できるものではなく、さらに腫瘍増殖を制御できる治療法を検討した。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 m 腫瘍内に投与し、15 日目に 1×10^6 個の骨髓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 1)。特筆すべきことに、50% のマウスでは腫瘍は完全に退縮した。生存率を比較すると、NPrCAP-DC 併用群では、腫瘍接種後 50 日後においても 100% 生存していたが、その他の群では 42 日以

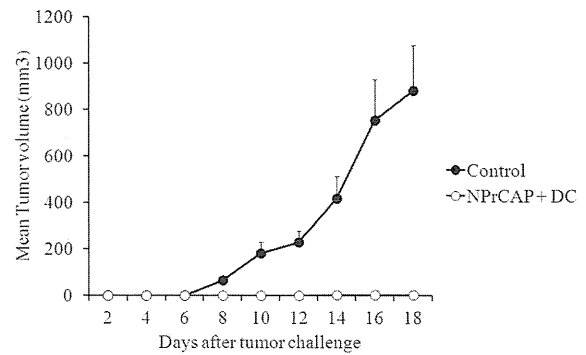


図 3

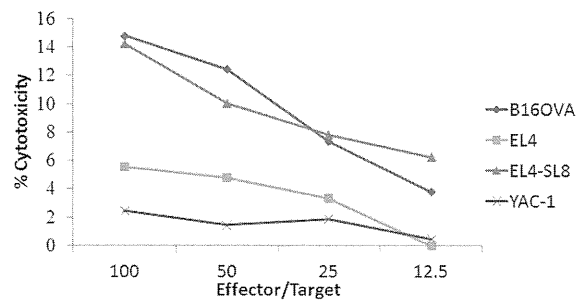


図 4

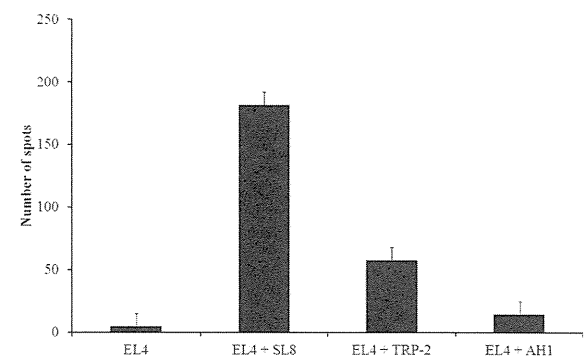


図 5

内に全例腫瘍死した (図 2)。さらに 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)。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 4)。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。ELISPOT アッセイにおいても、OVA 由来抗原ペプチドである SL8 に対する CD8⁺ T 細胞の頻度が増加していた (図 5)。さらに興味深いことに、メラノーマ腫瘍抗原である TRP-2 に対する反応も確認された。このように NPrCAP と DC の併用療法は、メラノーマ抗原に対する細胞障害性 T 細胞を誘導して、強力な抗腫瘍効果を示すことが明らかとなった。

4. 樹状細胞は、NPrCAP 処理によりアポトーシスが誘導されたメラノーマ細胞を貪食する。

PKH-red で染色した B16OVA 細胞に NPrCAP を添加培養し、アポトーシスを誘導し、これに PKH-green で染色した骨髄由来樹状細胞と 3 時間混合培養した。これを蛍光顕微鏡で観察する

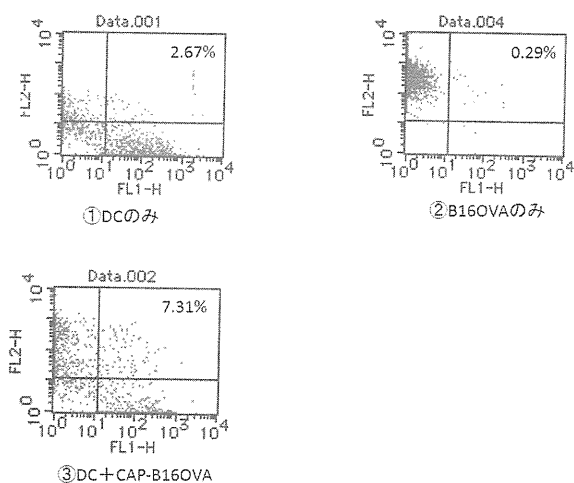


図 6

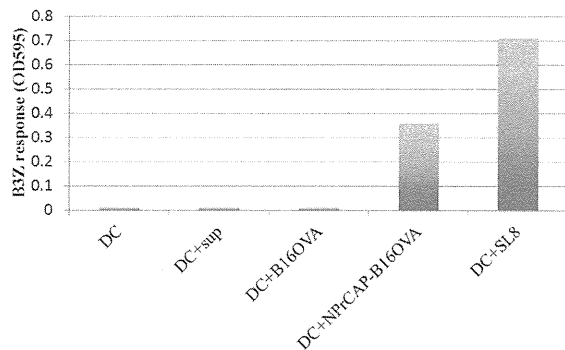


図 7

と、断片化した B16OVA を貪食している樹状細胞が多数観察された。これをさらにフローサイトメーターで確認すると、約 8% の樹状細胞が B16OVA メラノーマを取り込んでいることが確認された (図 6)。

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 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 7)。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メラノーマに発現しているモデル抗原に対する特異的な CD8⁺ T 細胞が誘導されたことによるものと考えられた。

6. CTI 療法による全身性免疫応答の誘導

CTI 療法により B16F1 メラノーマを拒絶したマウスを用いて、細胞障害性 T 細胞の誘導を検討した。その結果、B16F1 メラノーマ細胞特異的な細胞障害性 T 細胞 (CTL) の誘導が可能であった (図 8)。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、高い細胞障害性を認めた。さらに ELISPOT アッセイにおいても、TRP-2 ペプチドを特異的に認識する CD8T⁺ 細胞を高頻度に認めた (図 9)。このように、CTI 療法により治療効果を示したマウスにおいては、メラノーマ特異的な免疫反応が誘導されていることが明らかとなった。

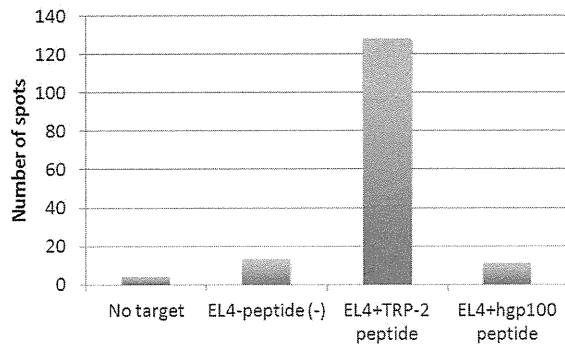


図 8

7. Hsp72 結合親和性の高いメラノーマ関連抗原ペプチドの同定

共同研究者の本多により Hsp72 および H-2K^b, HLA-A24 への結合親和性を指標に同定されたメラノーマ関連抗原由来ペプチドの細胞障害性 T 細胞誘導能を検討した。Tyrosinase^{E208-216} (LPWHRLFLL) を樹状細胞にパルスして HLA-A24 トランスジェニックマウスに免疫すると、B16F0 メラノーマとこのペプチドをパルスした HLA-A24 を発現する RMA-S-A24 細胞を傷害する T 細胞を誘導し得た (図 10)。本ペプチドを用いて、ヒト末梢血リンパ球を用いて、細胞障害性 T 細胞の誘導を行っている。候補ペプチドとして、TRP-2 由来 (ALVGLFVLL)、Tyrosinase 由来 (LLAVLYCLL) がさらに同定され、これらのペプチドが HLA-A24 によく提示されることを確認したので、現在 HLA-A24 トランスジェニックマウスに免疫を行っている。

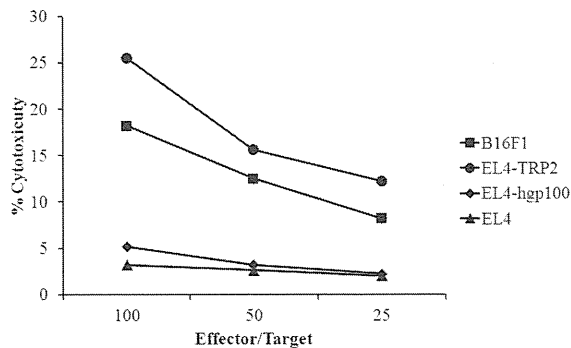


図 9

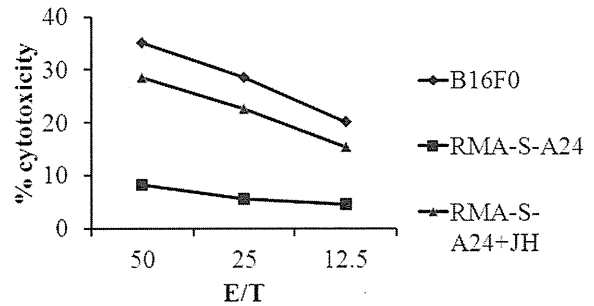


図 10

6. 結果のまとめ

NPrCAP のメラノーマ腫瘍内投与により、メラノーマの増殖抑制が認められた。さらに抗腫瘍効果の増強を目的として、NPrCAP 腫瘍内投与後、樹状細胞を腫瘍内に投与した結果、非常に強い抗腫瘍効果を確認 50% 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、B16 メラノーマ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。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。今後、全身性免疫誘導の効果さをさらに確認するために、NPrCAP と樹状細胞の併用療法後、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。

D. 健康危険情報

なし

E. 研究発表

1. 論文発表

- SOX2 is overexpressed in stem-like cells of human lung adenocarcinoma and

- augments the tumorigenicity. Nakatsugawa M, Takahashi A, Hirohashi Y, Torigoe T, Inoda S, Murase M, Asanuma H, Tamura Y, Morita R, Michifuri Y, Kondo T, Hasegawa T, Takahashi H, Sato N. Lab Invest. 91 (12): 1796 – 804, 2011.
2. Cytotoxic T lymphocytes efficiently recognize human colon cancer stem-like cells. Inoda S, Hirohashi Y, Torigoe T, Morita R, Takahashi A, Asanuma H, Nakatsugawa M, Nishizawa S, Tamura Y, Tsuruma T, Terui T, Kondo T, Ishitani K, Hasegawa T, Hirata K, Sato N. Am J Pathol. 178 (4) : 1805 – 13, 2011.
 3. Immunogenic enhancement and clinical effect by type-I interferon of anti-apoptotic protein, survivin-derived peptide vaccine, in advanced colorectal cancer patients. Kameshima H, Tsuruma T, Torigoe T, Takahashi A, Hirohashi Y, Tamura Y, Tsukahara T, Ichimiya S, Kanaseki T, Iwayama Y, Sato N, Hirata K. Cancer Sci. 102 (6) : 1181 – 7, 2011
 4. 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. 186 (7) : 4325 – 30, 2011.
 5. 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, 23 (4) : 223 – 37, 2011.
 6. 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. 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.
 7. 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. 日本臨床ストレス応答学会、2011, 11月、名古屋.
 2. 田村 保明: N-propionyl-4-S-cysteaminyphenol-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、2011, 9月10日、名古屋.

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
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 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

米田 明弘 札幌医科大学皮膚科学講座 講師

研究の要旨

我々は、これまで悪性黒色腫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 に鉄ナノ微粒子およびポリエチレングリコールを結合させた製剤（NPrCAP/PEG/M）を合成し、磁場照射による化学温熱免疫療法を開発し、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、高拡散性新規製剤の開発が必要とされた。我々は、より高拡散性のある新規薬剤（NPrCAP/PEG/DNM）を開発し、マウス背部皮下に移植された腫瘍内における高拡散性をすでに確認している。今回、我々は同薬剤を全身投与した際の薬剤分布を確認した。転移性肺腫瘍への特異的取り込みは認めなかったが、局所療法後の肺転移拒絶モデルにおいて、非移植コントロールマウスと比較し、腫瘍細胞の肺への拒絶を示した。新規薬剤を用いた本治療が腫瘍局所への抗腫瘍効果のみならず遠隔転移巣への治療効果を発揮する可能性を示唆した。

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・部分消失した。

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。（3）CTI療法により局所病変のみならず、遠隔転移巣への抗腫瘍効果を解析する。

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。

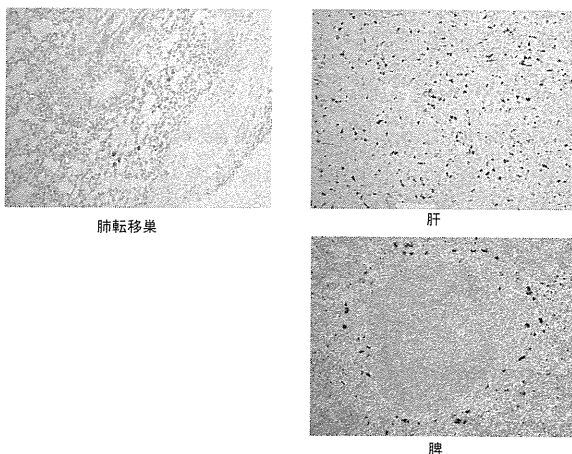
(2) 新規 NPrCAP/PEG/DNM の腫瘍治療効果・安全性の検討

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) の全身投与における薬剤分布を検討した。

メラノーマ細胞 B16F010 をマウス尾静脈より静注し、肺転移を生じさせ、本薬剤を投与した。薬剤投与 4 日後に各臓器への薬剤の分布を検討した。肺転移巣への選択的取り込みを期待したが、肺への取り込みは十分ではなく、肝、脾にほとん

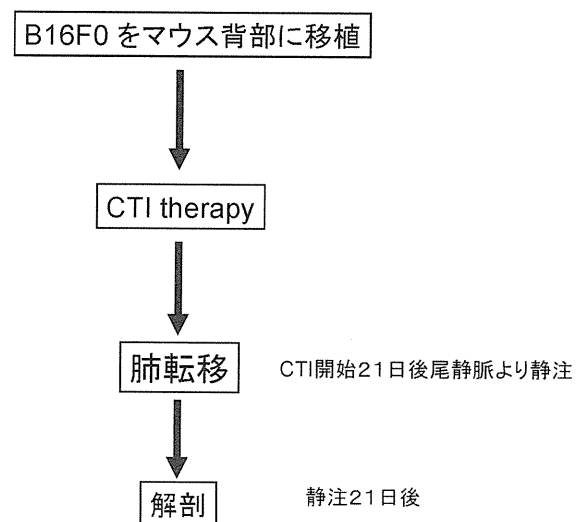


どは取り込まれた。

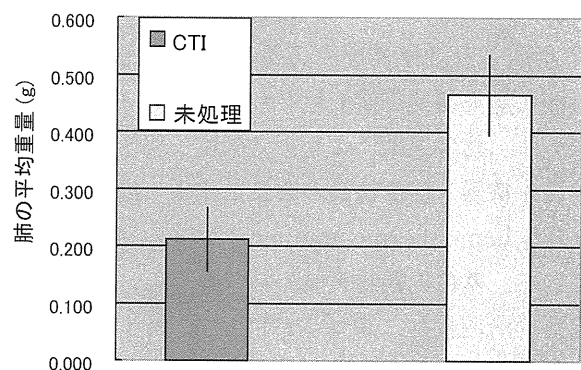
2. 新規薬剤を用いた CTI 療法による肺転移拒絶を検討した。

マウス背部皮下にメラノーマ細胞 (B16F0) を移植後、CTI 療法を施行し、肺転移を生じさせた。非移植コントロールマウスと比較し、肺転移は拒絶された。

肺転移モデル



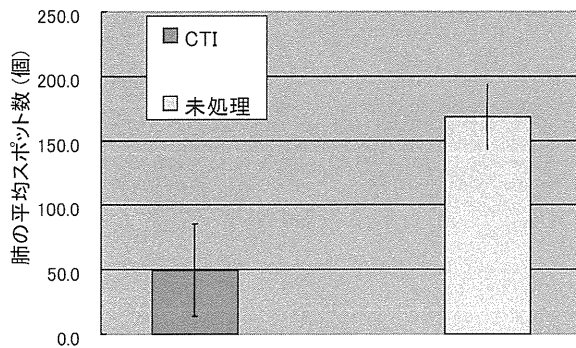
肺転移マウスの平均肺重量の比較



CTI 療法施行 21 日目に尾静脈よりメラノーマ細胞を静注した。21 日後の肺重量を比較した。非移植群と比較し、CTI 療法群では、肺重量の減少を示し、肺移植の拒絶を認めた。

同様に肺表面の腫瘍数を計測した。非移植群と比較し、CTI 療法群では、平均肺スポットの減

肺転移マウスの平均肺スポット数 の比較



少を認め、肺移植の拒絶を認めた。

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, Yamashita T. A case of cystic basal cell carcinoma which shows a homogenous blue/black area under dermatoscopy. J Skin Cancer 2011; 450472: 1 - 4.

2. 学会発表

Yoneta A, Nishizaka T, Hida T, Goto S, Ozawa M, Yamashita T: Two cases of advanced melanoma treated with dendritic cell vaccination therapy. 22nd World Congress of Dermatology. 2011 May 24 - 29. Seoul, Korea.

Yoneta A, Tamura Y, Nohara S, Ito A, Honda H, Wakamatsu K, Ito S, Yamashita T, Jimbow K: Development and evaluation of antitumor effect of novel NPrCAP-magnetite nanoparticles for chemo-thermo-immunotherapy in malignant melanoma. 21st International Pigment Cell Conference. 2011 Sep 21 - 24: Bordeaux, France.

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) を開発している。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、H22 年度にはその大量合成-GMP 化に着手した。本年度からは本格的な大量合成を進めた結果、合計 14 ロット (800mL 相当) の合成を行い、かつ合成された新規製剤サンプルは加温試験および急性 / 慢性毒性試験 (前臨床試験の一部) に供され、将来の臨床試験に向けたデータ確保に貢献した。また、今年度から臨床で実用化されている加温機器：サーモトロン RF-8 を利用した加温に成功した。

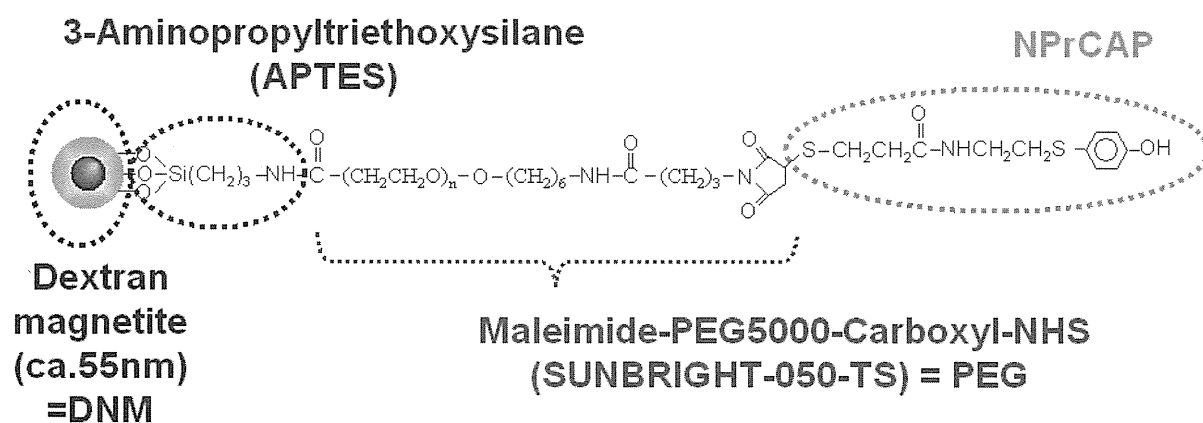


図1

A. 研究目的

本分担研究に関する今年度 (H23 年) 計画としては、昨年度 H22 年度までに確立した「分散性の良い全身投与可能な新規製剤」の量産化、およびそれを使用した前臨床試験の開始である。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大量化】

H21 - 22 年度に開発した新規製剤について、

名糖産業 (株) 名古屋研究所内に本資金にて整備した専用クリーンルーム内での量産合成法の確立 (再現性の確認を兼ねる) を目的とする。また、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。

【毒性試験 (前臨床試験) の実施】

分散性の良い新規製剤を臨床試験に進めるため、第一ステップとなる前臨床試験に着手することを目的とする。

【加温検討】

本製剤の加温については、一般に誘導加温型装置を用いるが、該機器の医療分野への進出が遅々としている状況である。そこで、実現可能な代替機器の確保も今年度中の目的の一つとする。

B. 研究方法

【大量合成化-GMP】

昨年度までに改良、さらに最適化した合成方法について、GMP 準拠マニュアル (Standard Operating Procedure) を作成し、それに則り反応の繰り返し再現性を確認する。

【前臨床試験の着手】

上述の再現性確認で得られるサンプルを使用し、ラット急性毒性、及び慢性毒性試験を (株) 化合物安全性研究所に委託実施する。

【加温試験方法】

現在、本邦で唯一医療機器認可され、国内で約 100 台が普及しているハイパーサーミア装置：サーモトロン RF-8 (山本ビニター株式会社) を利用することとする。本機器は所謂、誘電加温型であり、磁性ナノ粒子の発熱については一般概念化されていないが、本研究協力者の小林 (中部大学教授) らの研究によると磁性ナノ粒子を効率良く発熱する報告がある (Jpn. J. Cancer Res., 90, 699, 1999)。よって、本研究でもこの研究を基に確証的なデータの取得を進める。

C. 研究結果・考察

【大量合成化】

最適化した条件を手本化した SOP を忠実に遵守し繰り返し合成を行った結果、計 14 ロット (800mL 相当) を合成し、得られたサンプルは再現性が確認できた。これにより、製剤の規格を暫定的に決定した。

【前臨床試験】

(株) 化合物安全性研究所に委託したラット急性毒性、慢性毒性の試験結果は、毒性に問題ないとのことであった。(詳細については別途記載)

【加温試験】

サーモトロン RF-8 による加温試験は、分担研究者の井藤 (九州大・准教授) 及び山本ビニター (株) のご協力により今年度中に二度実施され、当社はその試験用サンプルを供給した。実験結果については別途井藤らの報告にある通り、高い発熱効果が確認できたため、今後は最適な薬剤濃度、投与量、加温時間 (薬剤としての処方) を決定するための系統的データの取得が必要となる。

【その他】

当初の研究計画にはなかったが、本製剤の核である抗メラノーマ物質 NP r CAP の機能解明の一助とすべく、また新たな応用可能性も目指し副題として検討した。

即ち、NP r CAP は水に溶けにくいという性質であることから、水溶性 NPrCAP を開発すべく、水に対する溶解性が著しく高く、かつ粘性の低い多糖類であるデキストラン (グルコースの α 1-6 結合型高分子) との複合体を試作した。本試作品の評価は分担研究者の中山 (川崎医大・教授) らにより行われ、その報告によると、サイトカイン、インターロイキン類の誘導作用を示すことが明らかになった。この効果はアポトーシス誘導剤としての応用可能性が考えられるため、現在、構造活性相関データの取得に着手し、より高い活性の開発と、メカニズムの解明を進めている。

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 なし

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表