

201111008B

# 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21-23年度 総合研究報告書

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 .....	神保 孝一 1
--	---------

## 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～ .....	本多 裕之 27
2. メラノーマに特異的なメラニン色素形成を分子標的とする新規薬剤の合成法の開発と そ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・若松 一雅 37
3. 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 49
4. NPrCAP によるメラノーマ細胞選択的アポトーシスの誘導と B16 マウス移植腫瘍の抑制 .....	山下 利春 57
5. CTI 療法で誘導される TIL の TCR 解析 .....	井藤 彰 65
6. 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 .....	田村 保明 71
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 .....	米田 明弘 79
8. 「新規 CTI 治療薬剤の合成と GMP 製剤化」に関する研究 .....	野原 聡 83

## 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

# 厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業） 総合研究報告書

## 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 准教授 小野 一郎：CTI臨床研究・試験  
札幌医科大学医学部皮膚科学講座 助教 神谷 崇文：CTI臨床研究・試験  
札幌医科大学医学部皮膚科学講座 助教 加藤 潤史：温熱機器サーモトロン基礎・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  
名糖産業株式会社 業務管理職 村瀬 勝俊：CTI治療製剤の開発  
セントラル女性クリニック 院長 本間 敏男：温熱機器サーモトロン基礎・臨床研究  
山本ビニター株式会社 相談役/最高技術顧問 山本 五郎：新規温熱機器サーモトロン開発  
山本ビニター株式会社 機器開発部長 東 庸太郎：新規温熱機器サーモトロン開発  
日本化薬㈱ 研究開発本部 ナノメデシン医薬研究所 所長 森野 富夫：CTIナノメデイシン統括  
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

## I. 研究の目的・流れ

1. 我々は過去3年間、本厚生労働科学省・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 cysteaminyphenol）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 その臨床の有用性を確認した。これら製剤は札幌医大遺伝子治療室で我々がGMPに準拠し作成したものである。
2. 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。
3. 上述の新規製剤を用い、① 医工化学連携による分子標的/化学・免疫・温熱作用機序の解明により低侵襲性継続的維持療法を開発し、② 名糖産業による中・大規模新規GMP製剤の生産・供給法の確立のための基礎実験を行った。殊に③ 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ための予備的実験を開始した。

## II. 研究成果の概略

1. GMP製剤開発と薬剤安定性・選択的免疫学的抗腫瘍効果の検討：  
新規開発されたプロトタイプCTI治療製剤をこれから開発される新規低侵襲性温熱装置に有効・安全に作用するGMP製剤として確立するために更なる改善を図った。又、NPrCAP自身が腫瘍免疫を誘導する可能性を見出したがその機序を免疫化学的に探索することにより、CTI療法ブースト効果への増強を図るための基礎的実験を行った。
2. 分子標的・免疫作用機序に基づく解明による継続的免疫維持療法の検討：  
現在、CTI療法による腫瘍内浸潤リンパ球の質的・量的変化を確認し、腫瘍免疫効果の高いペプチドの探索・同定を行っているが、更に、磁性微粒子製剤への吸着固定法の開発に成功した。これにより今後、効率的な腫瘍部位への投与法を確立し、新規開発される低侵襲性温熱機器を用いたCTIの免疫誘導機構の解析とその効果をブーストするための継続的免疫維持療法の開発に応用し得る。

### 3. CTI療法の低侵襲性磁場発生装置の開発：

現在、試験的に使用している交番磁場を用いた電磁誘導型加熱機器は熱傷などの生体危険性・侵襲が高い。国内で唯一健康保険適用を受け、癌治療の最前線に導入されている誘電型加温装置（サーモトロンRF-8）を改良した、新規低侵襲性加温医療機器（サーモトロンRS-8）の開発を「産」と「学」からサーモトロンRF-8を開発したハイパーサーミア機器製造会社（山本ビニター）とハイパーサーミア開発研究施設（ルイパストゥール医学研究センターハイパーサーミア医科学研究室）が新たに分担研究者、研究協力者として加わり、開始した。

## Ⅲ. 研究の結論、意義

すでに我々が過去3年間の厚労省科学研究費補助によりCTI療法の理念の有用性を確認し、更にプロトタイプ製剤の開発に成功した。CTI療法を行うにはマグネタイト微粒子を有効に発熱させる加温装置の開発を併せて行わなければならないが、すでに保険診療に用いられている癌温熱療法に広く用いられているサーモトロン発生装置を改良した低侵襲性温熱治療機器の開発のための予備的実験を開始する事が出来た。今後の我々の研究展開はこの新規開発機器を用いて癌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”を行う事である。これにより次世代型の低侵襲性化学・温熱・免疫療法「CTI療法」を確立する事ができる。

## A. 研究目的

医・工・化学の連携に加え、産から原薬開発・製造メーカーと医療機器開発・製造メーカーが加わり、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DDSとしての役割と化学療法剤効果をもつ薬剤であるNPrCAPと結合した新規ナノ微粒子（デキストラン被覆マグネタイトであるリゾビスト）製剤（NPrCAP/PEG/DNM）を用い、②サーモトロンRF-8を基礎として開発する改良型新規低侵襲性温熱発生装置を用い、温熱療法を行い、③結果として生ずる生体内がんペプチド産生による、④患者に優しく負担がなく遠隔転移撲滅が可能である化学・温熱・免疫「CTI（chemo-thermo-immuno）」療法を開発する。

本研究においてメラノーマ（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:N-propionyl cysteaminyphenol）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）」療法の理念を開発し（流れ図1）、④その臨床的有用性を確認した（流れ図2）。

## B. 研究方法

### 1. GMP製剤開発と薬剤安定性・安全性及び選択的抗腫瘍効果の検討

#### 1) GMP製剤開発・薬剤安定性の検討と新規温熱加温装置の開発

- (1) 新規製剤の物性の改良が行い、その合成条件を確定する。
- (2) GMP製剤としての最終形態（処方）確定に向けたデータ取得と中規模GMP製剤作成法を確立するための予備的実験を開始する。
- (3) マウス背部にメラノーマ細胞を移植し、NPrCAP/PEG/DNMを注入したマウスおよび非注入マウスで加温性を検討する。腫

瘍局所において特異的に十分な加温が得られることを確認後、移植腫瘍に対する抗腫瘍効果および、皮膚・肺転移巣に対する腫瘍拒絶効果を検討する。

## 2) 選択的・化学的・生物学的薬理作用

- (1) 新規製剤のチロシナーゼ基質としての有効性：システインの存在下にてチロシナーゼにより酸化させ、キノン体への代謝反応系を検討し、システイン残基を介するタンパクとの結合形成を証明する。
- (2) メラノーマ細胞への取込みおよび代謝：培養マウス、ヒトメラノーマ培養細胞に対する取込みおよび代謝を経時的に鉄および水解生成物として定量する。同時にキノン体への酸化をシステイン付加体として定量する。NPr-4SCAP 構造およびそのキノン体への代謝がCTI療法における腫瘍 targeting に必須であることを証明する。同様の手法をメラノーマ細胞パネルに適用し、チロシナーゼ活性との相関をみる。
- (3) 新規製剤のチロシンヒドロキシラーゼ (tyrosine hydroxylase: TH) の基質としての有効性：NPr-4SCAP/PEG/DNM を TH 酸化してカテコール体への代謝を証明する。さらに、カテコール体の自動酸化により生化学的に TH の存在によりキノン体のタンパクとの結合形成を、チロシナーゼ酸化の場合と同様に、確認する。

## 2. 分子標的・腫瘍免疫作用機序の解明に基づく CTI療法の効果増強の解析

### 1) CTI療法で活性化される腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) の解析

- (1) TCR 遺伝子のクローニングと遺伝子導入 T 細胞の作製：CTI療法後の腫瘍から、抗体磁気分離法により CD8 陽性 T 細胞を分離し、1 細胞からの PCR により TCR  $\alpha$  および  $\beta$  遺伝子をクローニングする。
- (2) TCR 遺伝子導入 T 細胞を用いた *in vitro*

および *in vivo* の検討：前年度に作製した TCR 遺伝子導入 T 細胞が、*in vitro* および *in vivo* において、B16 細胞および B16 腫瘍を殺傷する能力があるかどうかを検証した。また、これらの TCR 遺伝子導入 T 細胞が、どのペプチド抗原を認識するかについて解析し、抗原を同定する事を開始した。

- (3) 今後、同定された抗原を用いたペプチドワクチン療法や TCR 遺伝子導入 T 細胞療法が、CTI療法における免疫ブースト効果があるかどうかを調べ、この方法論が臨床においても有用であるか検証する。

### 2) メラノーマ抗原ペプチドの探索

- (1) これまで、メラノーマ抗原たんぱく質全網羅ペプチドアレイライブラリーを用いて探索してきたマウス由来の 18 種類、ヒト由来の 16 種類の候補ペプチドに関して、HLA-A24 遺伝子導入 Tg マウスを用いて抗原ペプチドとしての最も効果の高いものを探索する事を開始した。
- (2) メラノーマ抗原ペプチドの探索と応用：TCR 遺伝子導入 T 細胞を用い、B16 細胞および腫瘍殺傷能力を調べた。TCR 遺伝子導入 T 細胞が認識するペプチド抗原を解析し、同定する計画である。

### 3) NPrCAP/PEG/DNM 認識ペプチドの探索

- (1) セルロースメンブレン型ペプチドアレイでランダムライブラリーを構築し、NPrCAP/PEG/DNM 認識ペプチドを探索した。分散性の高い NPrCAP/PEG/DNM を利用し、ライブラリーペプチドを可溶化し、NPrCAP/PEG/DNM の凝集反応を利用して結合ペプチド探索を開始した。
- (2) NPrCAP/PEG/DNM 製剤へのペプチドタグ結合：探索したペプチドを Alexa 等の蛍光試薬でラベルし、NPrCAP/PEG/DNM 製剤と混合し、結合力を検証中である。スペーサーの有無、腫瘍組織内 pH や

温熱温度による結合活性への影響も検証する予定である。

#### 4) 新規メラノーマ抗原ペプチドの免疫効果の検討

- (1) 動物実験下で構築したタグ付きワクチンペプチドを、NPrCAP/PEG/DNM 製剤と混合し、実際の CTI 療法での効果確認を行っている。癌組織でのワクチンペプチドの滞留性の評価も行い、効果検証に役立てる。
- (2) マウス H-2Kb, あるいは H-2Db とヒト HLA-A24 に共通して提示されるペプチドを用いて、メラノーマ担癌マウスに、CTI 療法を施行し、新規抗原ペプチドをワクチンとして免役し、肺転移抑制効果を検討する。
- (3) マウス脾細胞に誘導される細胞障害性 T 細胞の活性・頻度の比較を、 $^{51}\text{Cr}$  を用いた細胞障害性試験、ELISPOT アッセイを用いて検討した。

#### 5) NPrCAP 単独による免疫応答の賦活化及びアジュバント効果の検討

- (1) NPrCAP 単独の炎症系サイトカインの産生機序を明らかにする。IL-1  $\beta$  の産生に関与している inflammasome の活性化と、それ以外のサイトカイン (IL-6, IL-8, TNF  $\alpha$ ) の産生経路をそれぞれ解析した。
- (2) 獲得免疫応答賦活効果を、ヒト末梢血単核球を用いて解析する。単球細胞から未成熟な樹状細胞を誘導し、NPCMD 製剤による成熟化を促し、成熟した樹状細胞を抗原提示細胞として使用し、T 細胞の刺激誘導を試みる。刺激後、T 細胞の IFN  $\gamma$  産生を測定する事で、薬剤による獲得免疫賦活効果を検討する計画である。
- (3) NPrCAP による免疫応答の賦活化及びアジュバント効果の検討：担癌マウスに NPCMD 薬剤単独、あるいは NPCMD 薬剤 + 抗原ペプチドを複合投与することにより、抗腫瘍効果を検討した。

「担癌前のマウスに NPCMD 製剤を投与することで、免疫賦活化による予防効果を検討した」。

#### 3. 誘電加温装置サーモトロンを用いた CTI 療法の開発

- (1) マウスにおける誘電加温型サーモトロンを用いた CTI 療法の開発：現在、癌治療のための温熱療法に健康保険が適応され広く国内で用いられているサーモトロン RF-8 を改良した新規機器開発のための基礎的予備データを取った。
- (2) 動物実験用小型装置 (RF-IV) を山本ビニター株式会社がサーモトロン RF-8 装置の改変や温度測定法の機械的改良を着手した。この際、様々な濃度に調製した臨床用ナノ製剤を封入した筋肉等価寒天ファントムの発熱と出力との関係を検索中である。

## C. 研究結果

### 1. 新規製剤開発と薬剤安定性・安全性及び選択的抗腫瘍効果の検討

#### 1) 新規製剤開発と薬剤安定性

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 cysteamine phenol) と磁性ナノ粒子 (DNM) との結合体：NPrCAP/PEG/DNM 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 (流れ図 3, 4)。H23 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、H23 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。

(1) 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。

(2) 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。

(3) 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)の研究によりH23年度中に二度実施され、高い発熱効果が確認できた。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。

(4) その他

NPrCAP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 $\alpha$ 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（川崎福祉大・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。

2) 新規製剤の安全性及び選択的抗腫瘍効果の検討

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。H23年度、我々は同薬剤を全身投与した際の薬剤分布を確認した。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に比較し、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（流れ図5）。

(1) 新規薬剤(NPrCAP/PEG/DNM)の全身投与における薬剤分布の検討

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、脾への取り込みが多かった。

(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に比較し、肺転移は拒絶された。同様に肺表面の腫瘍数を計測した。非移植群に比較し、CTI療法群では、平均肺スポットの減少を認め、肺移植の拒絶を認めた。

3) 新規製剤の選択的・化学的・生物学的薬理作用と抗腫瘍効果との比較検討

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（流れ図 6）。

#### (1) NPrCAP のチロシナーゼ酸化

NPrCAP のチロシナーゼ酸化により 326nm と 460nm に吸収極大をもつ色素が生成された。その構造は、ortho-キノン体である NPrCAQ 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 の NMR と MS によりなされた。

#### (2) NPrCAQ とチオール類の反応

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同時に反応し、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 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 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 NPrCAP と培養した。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。同様に、B16F1 メラノーマ担がんマウスの腫瘍に NPrCAP を投与したのち 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% の収率で付加体へと代謝されたことが分かった。血清中にも微量ではあるが検出された。

## 2. 分子標的・腫瘍免疫作用機序の解明に基づく CTI 療法の効果増強の解析

### 1) CTI 療法で活性化される腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) の解析

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グ放出量の検討を行ったところ、TCR V $\beta$  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られ考えられる（流れ図 7）。

### (1) TCR 遺伝子のクローニングと遺伝子導入 T 細胞の作製

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。一方、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た。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。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。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。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た。

(2) TCR 遺伝子導入 T 細胞を用いた *in vitro* および *in vivo* の検討

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 $\beta$ 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 $\beta$ 20を除くほぼ全てのTCR V $\beta$ 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 $\beta$ 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 $\beta$  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。中でも、複数回の実験で V Vb11の発現が確認されたことから、TCR V Vb11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た。

2) メラノーマ抗原ペプチドの探索

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療法の効果増量を目指し、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(流れ図8)。

(1) がん抗原ペプチドの特定

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。またこれらのうちの1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。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示している。

## (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。同時にコラーゲン埋包しない通常の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を試験した。温熱作用と薬剤作用の競合作用は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。

## 3) 新規メラノーマ抗原ペプチドの免疫効果の検討

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はメラノサイトを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った。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。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が報告されている。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が報告されている。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、今後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。

### (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

我々はあらかじめ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腫瘍内投与を2回行って、腫瘍増殖に与える効果を検討した。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。また生存日数の著明な延長を認めた。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) NPrCAP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

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1x10<sup>6</sup>個C57BL/6マウスに移植し、腫瘍径が4-5mmになる12日目と14日の2回、NPrCAPを24.4 $\mu$ m腫瘍内に投与し、

15日目に1x10<sup>6</sup>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したが、NPrCAPとDCの併用群が最も強力な抗腫瘍効果を示した。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日以内に全例腫瘍死した。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。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。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<sup>+</sup>T細胞の頻度が増加していた。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

髓由来樹状細胞と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メラノームを取り込んでいることが確認された。

- (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ム細胞を取り込み、腫瘍抗原をCD8<sup>+</sup> T細胞にクロスプレゼンテーション

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CD8<sup>+</sup> 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。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ムに発現しているモデル抗原に対する特異的なCD8<sup>+</sup> 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メラノーム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メラノーム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。さらにこのCTLはマウスのメラノーム抗原である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CD8<sup>+</sup>T細胞を高頻度に認めた。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、メラノーム特異的な免疫応答が誘導されていることが明らかとなった。

- (7) Hsp72結合親和性の高いメラノーム関連抗原ペプチドの同定

Hsp72およびH-2Kb, HLA-A24への結合親和性を指標に同定されたメラノーム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 208-216(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メラノーム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。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(流れ図9)。

- 4) NPrCAP単独による免疫応答の賦活化及びアジュバント効果の検討

メラノジェネシス標的製剤NPrCAP(N-(1-mercaptopropionyl)-4-S-cysteaminyphenol)のこれまでの化学温熱免疫(CTI)療法の解析により、本薬剤は、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、本薬剤がメラノーム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、H23年度、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、本薬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（流れ図10）。

(1) NPCMD 処理による炎症性サイトカインの産生

免疫担当細胞をNPrCAP（NPCMD）で刺激した結果、CD14陽性単球細胞からのみ、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8、TNF $\alpha$ といった炎症性サイトカインの産生が観察された。これらのサイトカインのうち、IL-1 $\beta$ 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 $\beta$ 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- $\beta$ ）として産生される。その後、活性型カスパーゼ1により切断されて活性型IL- $\beta$ 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 $\beta$ の分泌を引き起こすため、上述の二経路を両方とも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。

(2) 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。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する。一方で、CD8陽性T細胞においては、非特異的なIFN $\gamma$ の産生が検出された。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た。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た。

5) NPrCAP の生物学的、生化学的および分子生物学的活性

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。

(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した所、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。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。

(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。

### 3. CTI療法の低侵襲性磁場発生装置の開発

#### (1) サーモトロン-RF8と製剤の発熱挙動

健康保険の適用を受けており、癌治療の最前線で広く導入されているハイパーサーミア用医療機器「サーモトロン-RF8」を用い、NPrCAP/PEG/DNM製剤の発熱挙動についての研究を開始し、本機器改善・改良の有用性を示唆する所見が得られた。

#### (2) CTI療法の多施設大型治験に向けた検討

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」の基本的構造を生かし改良し、新規機器を開発するための予備実験を行った。

#### (3) 誘電加温型の加温

サーモトロン-RF8は本来、誘電加温型の加温装置であり、磁性体の介在なしで体内の誘電抵抗で発熱させる装置であるが、磁性ナノ粒子の介在によってさらに高く発熱することが報告されている (Shinkai *et al.* Jpn J Cancer Res. 2002, 93 (1) :103-

108)。さらに、動物実験用の小型装置を用いた予備的な検討により、我々の製剤においても誘電加温による高い発熱能があることが示された (流れ図11)。

担癌マウスを用いた誘電加温実験。腫瘍に磁性ナノ粒子製剤を注入し、誘電加温を行ったところ、製剤を注入しない場合と比較して高く温度上昇し、60秒でハイパーサーミアに有効な42°Cまで温度が上昇した。

- (4) 改良型新規機器サーモトロン-RS8での発熱挙動今後の多施設および世界進出を視野に入れて、本プロジェクトで開発した製剤のサーモトロン-RS8改良型新規機器での発熱挙動について調べるとともに、動物実験によるCTI療法の効果を調べる前臨床研究を行う。また、サーモトロン-RF8は肺癌において有望な成績を示しており、メラノーマ肺転移でも高い治療効果が期待できる。

マウスの肺転移・肝転移モデルにおいて、開発した製剤を用いてCTI療法を施行することで、前臨床研究の基礎的データを得る。さらに、現行の保険適用装置である利点を活かして、将来的展望としての多施設臨床治験およびカナダをはじめとする世界進出への足掛かりとなる基礎データを取得する。

## D. 考察・結論

近年、日本におけるメラノーマ発生頻度と死亡率は急速に増加する傾向にある。殊にこの傾向は20~50歳代の青壮年に認められる事が多い。しかも日本人メラノーマは白人メラノーマと異なり足底・粘膜に発生し、早期から皮膚・血行転移を起こしやすく、より悪性度が高い。これ等転移性癌を持った患者に対し現時点では我々の試みている全ての治療法が無効である。殊に現在、国内で最も多く用いられている化学薬剤 (DTIC) の治療効果は7.5%でしかも催奇形性が高い。従来の治療概念に無い戦略に基づく新規治療法を開発することは急務である。



一方、欧米で2010～2011年にかけて新たなメラノーマ治療法が登場した。進行期メラノーマに対する選択的BRAF阻害薬Vemurafenibの第III相ランダム化比較試験が行われ、6カ月全奏効率はVemurafenib群48.4%、DTIC群5.5%と、画期的な臨床効果が示された（Chapman PB *et al*: New Engl J Med 364: 2507, 2011）。さらに、進行期メラノーマに対する抗CTLA-4抗体（Ipilimumab）の第III相ランダム化比較試験が行われ、全生存期間の中央値はIpilimumab投与群10ヶ月、gp100単独投与群は6.4ヶ月、2年生存率はIpilimumab単独投与群23.5%、gp100単独投与群13.7%であった（Hodi FS *et al*: New Engl J Med 363: 711, 2010）。これら分子標的治療薬のいくつかは、近い将来日本でも使用可能になるが、VemurafenibはBRAF V600E変異のあるメラノーマのみが適応となり、Ipilimumabは全身炎症反応副作用として高率に見られる。従って、進行期メラノーマの治療は症例ごとに考慮する状況に変わりはなく、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。

#### 1) 現在まで行った研究と今後の研究計画との関係

CTI療法の開発は過去3年間、厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）の補助を受けてきた。研究開始当初は、NPrCAPと鉄マグネタイト（M）との結合体であるNPrCAP/PEG/Mを用いたメラノーマ腫瘍内投与に基づくCTI療法臨床試験を少数例、学内限定のもとに開始し、CTI療法の理念の有用性を確認した。しかし、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低侵襲性治療機器の更なる開発が必要とされた。

H21～22年度は産から原薬製造メーカーが参画し選択的腫瘍内拡散性可能な新規薬剤プロトタイプであるNPrCAPとデキストラン被覆リゾビスト（DNM）との結合体を用い

たNPrCAP/PEG/DNMを完成した（流れ図3）。H23年度は本プロトタイプ薬剤を用いた①低侵襲性免疫維持療法として生体内癌ペプチド療法の理論的構築と②新たに産から国内唯一のサーモトロン開発メーカーが分担研究者として加わり低侵襲性治療機器開発の予備研究を開始した。

今後は①医工化学連携による分子標的/化学・免疫・温熱作用機序の解明による低侵襲性継続的維持療法、産との連携により②中・大規模新規GMP製剤の生産・供給法と③ナノ微粒子に対する低侵襲性新規温熱発生装置を完成させる。更に④医から国内・国外メラノーマ治療施設と産から製薬会社が研究協力者として加わり、多施設早期臨床試験early phase I/IIに向けた治療プロトコルを完成させる。

#### 2) 研究の特色・独創性

##### (1) GMP 製剤開発と薬剤安定性・選択的免疫学的抗腫瘍効果の検討

H21～23年度は、新規NPrCAP/PEG/DNM製剤の安定性・有効性に関する基礎的データ取得について行われてきた。又CTI療法におけるNPrCAP構造の役割とその解析を行った（Ito S *et al*, 投稿準備中）。

##### (2) 分子標的・免疫作用機序に基づく解明による継続的免疫維持療法の開発

CTI療法による腫瘍内浸潤リンパ球の質的あるいは量的変化を確認し、誘導されるメラノーマ特異的腫瘍抗原を同定し、抗原ペプチドを特定し、腫瘍免疫効果の増強を図ることを目的とし以下の結果を得た。

CTI療法で誘導されるメラノーマ特異的CD8陽性T細胞のTCR遺伝子のクローニングを行い、TILにおいてTCRのポピュレーションが限定され、特にVβ11陽性CD8T細胞が腫瘍免疫に重要な役割を果たすことを見出し、Vβ11におけるCDR3領域の遺伝子配列を同定した（Ito A *et al*, 投稿準備中）。

抗原たんぱく質由来でMHCに提示されやすい抗原ペプチドを全網羅ペプチドアレイライブラリーで探索を行い、1700種以上のペプチドの中で、マウスMHC分子、H2-Kbに提示されうるペプチド3種類、H2-Dbに提示されうる15種類のペプチド、更にヒトメラノーマ抗原に対してもMHC分子、HLA-A24およびHLA-A0201に提示されやすいペプチド16種類の特定に成功した(本多、投稿準備中)。

NPrCAPでヒト末梢血単球を刺激することにより、炎症系サイトカイン産生を誘導する事を明らかにし、本製剤には、メラノジェネシスを標的とした抗腫瘍効果だけでなく、自然免疫系の賦活化を介したアジュバント効果という副次効果を有する事を見出した(中山、投稿準備中)。

(3) CTI療法の低侵襲性磁場発生装置メラノ

ーマ加温新規器サーモトロン-RS8の開発

健康保険の適用を受けており、癌治療の最前線で広く導入されているハイパーサーミア用医療機器「サーモトロン-RF8」を用い、NPrCAP/PEG/DNM製剤の発熱挙動についての研究を開始し、本機器改善・改良の有用性を示唆する所見が得られ、メラノーマ加温新規器サーモトロン-RS8開発のための基礎データが集積された。

(4) 国内・国際メラノーマ研究・診療施設との連携

本CTI療法の作用機序解明と将来的共同臨床治験開始の準備のために、産からは従来からと同様、継続して東レ株式会社医薬事業部長が研究協力者として、学からは国内と国外のメラノーマ研究・診療グループが新たに研究協力者として加わった。

## E. 研究成果・考案の流れ図

図1：CTI療法開発の理論的背景と戦略

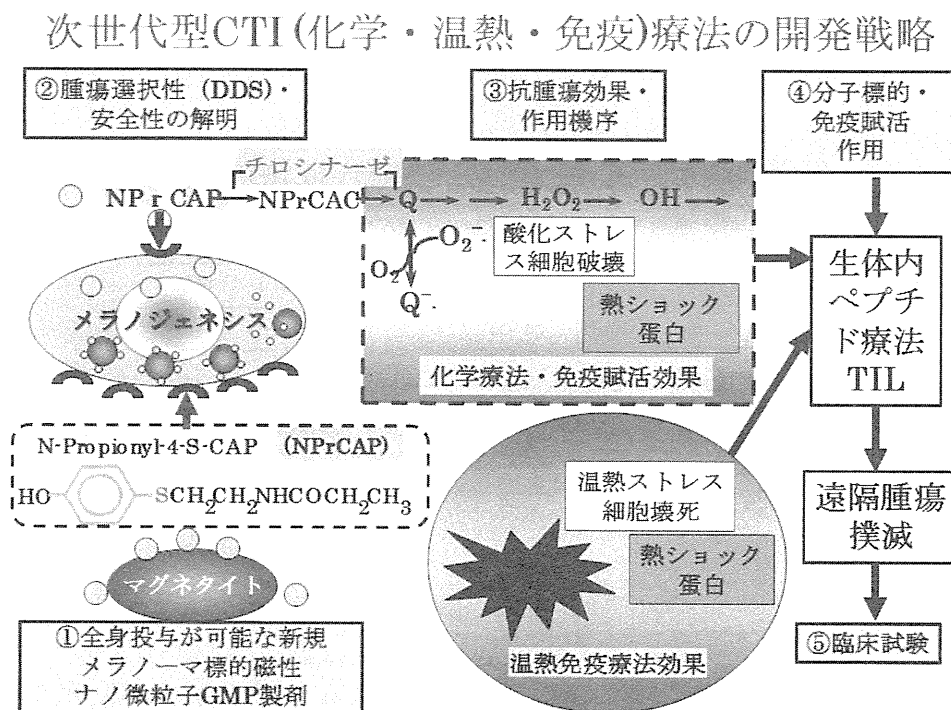
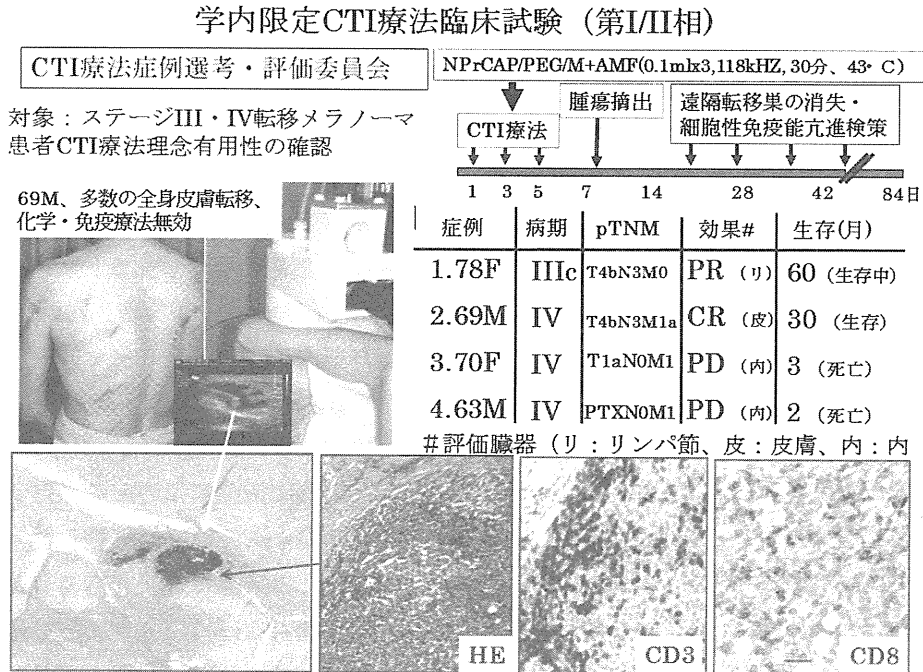


図2：学内限定CTI療法臨床試験（第I / II相）



症例2 の実際のCTI治療。

- ①製剤はUSガイド下で皮下腫瘍内に投与。その後図に示す如く磁場照射。病理組織は製剤投与局所の所見であるが、用いられた旧製剤は注入局所に凝集し、拡散性がない。
- ②しかし、磁場照射後、製剤周囲にはリンパ球（CD3）主体の炎症細胞（HE）が密に浸潤し、その大多数は細胞障害性T細胞（CD8）である。

図3：デキストラン・リゾピスト（dextran magnetite）を用いた新規製剤の合成

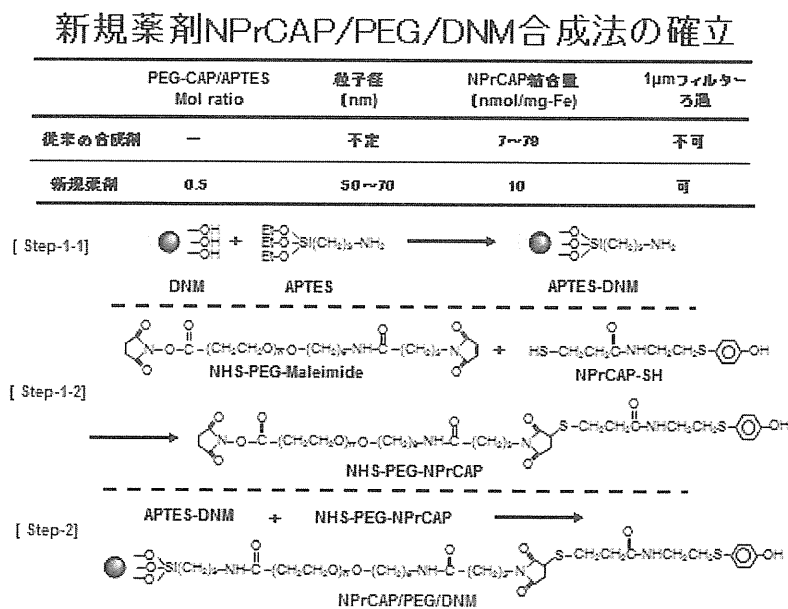


図4：我々の開発した新規製剤の物性と臨床応用への特徴

新規磁性粒子製剤の高拡散性と磁場照射による高発熱性と抗腫瘍効果

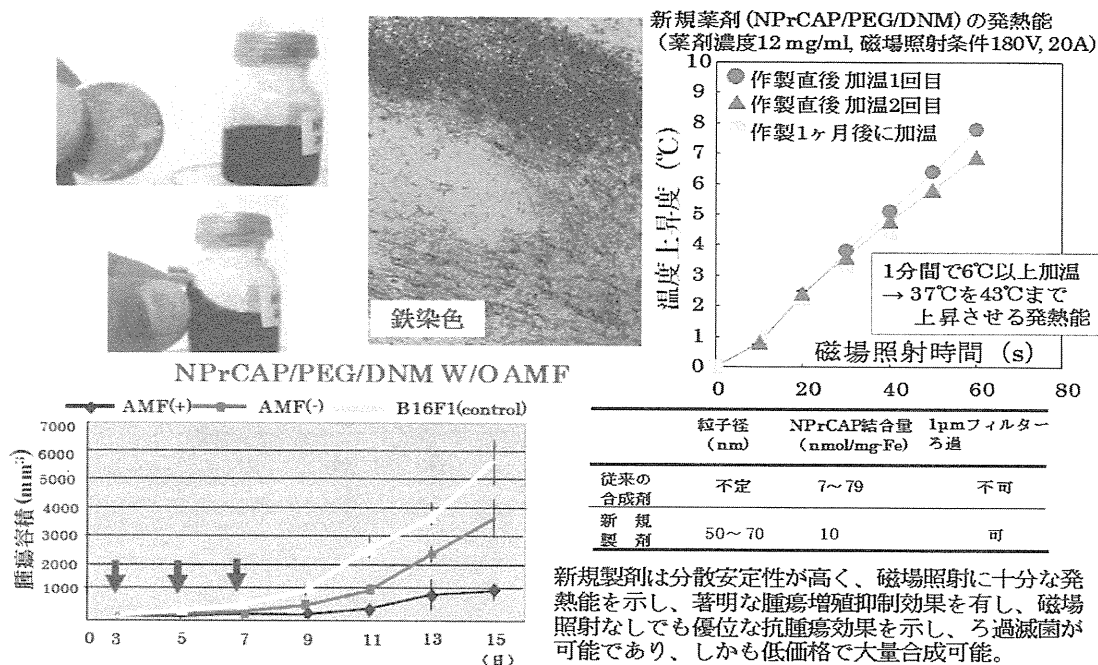


図5：新規製剤の選択的メラノーマ腫瘍内への集積と抗腫瘍効果（化学療法効果）

1. 新規製剤NPrCAP/PEG/DNMの腫瘍内分散性および抗腫瘍効果

本薬剤はマウス背部に移植されたメラノーマ腫瘍内局所投与において、非常に高い分散性及び拡散性を示し、メラノーマ細胞に選択的に取り込まれた。

図5-a：褐色に染まる部分が腫瘍内への新規製剤の選択的取り込みを示す。

