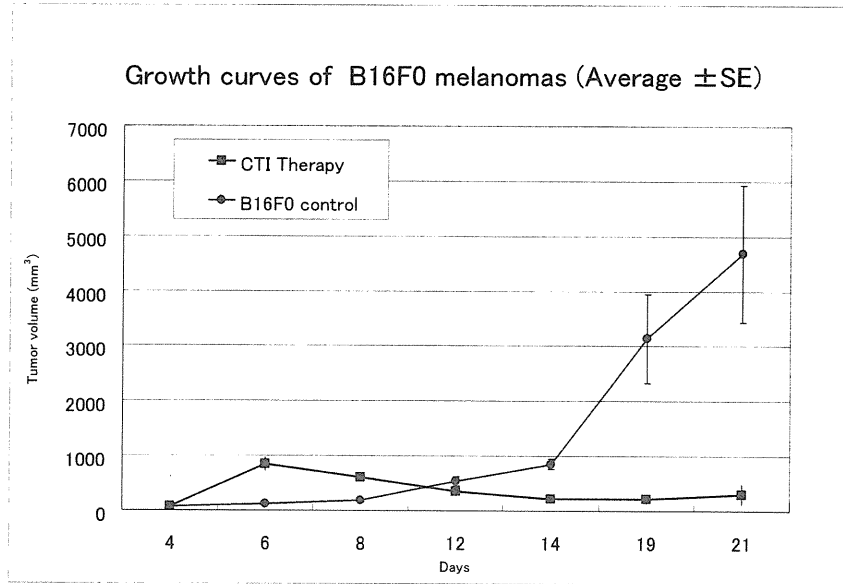


図5-b : CTI 治療により高い抗腫瘍効果を示した



## 2. CTI 療法による肺転移巣に対する効果

CTI療法後マウス尾静脈よりメラノーマ細胞を注入し、肺転移巣を作成した。無治療群に比較し、CTI治療群では腫瘍拒絶効果を示した。

図5-c :

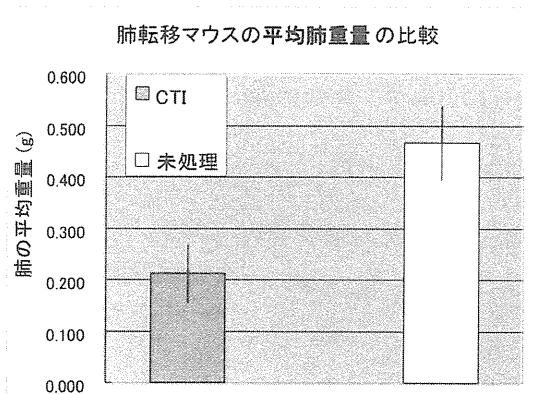
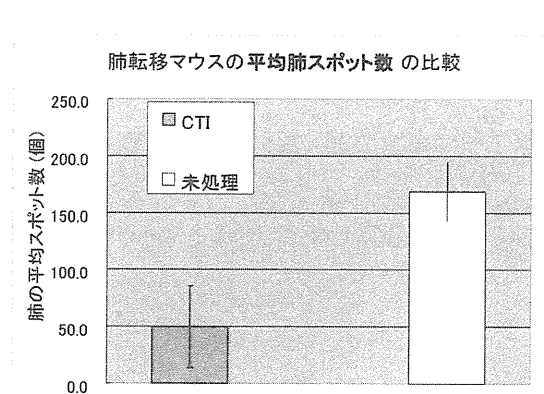


図5-d :

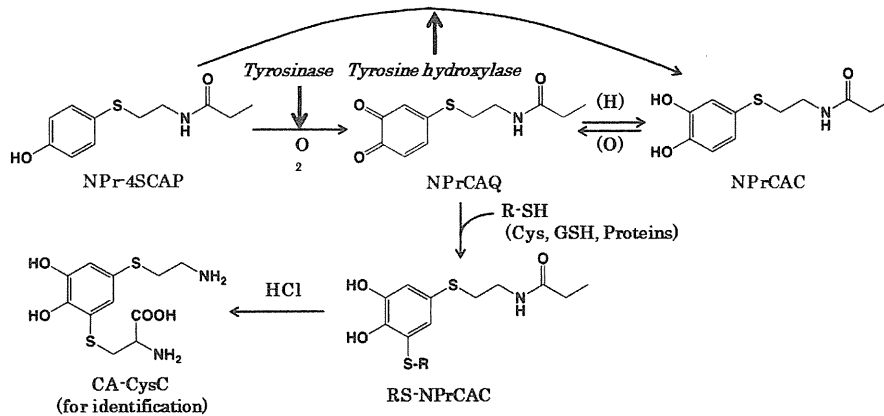


これまでの研究結果より新規製剤を用いたCTI療法が遠隔転移巣に対しても腫瘍拒絶効果を発揮することが期待される。

## 図6 : 新規製剤の化学的、生物学的特性

我々のNPrCAP開発はメラノジェネシスの基質であるアミノ酸、チロシンをイオウ (S) で化学的修飾させた cysteaminyphenol の誘導体によるメラノーマ細胞への選択的DDSによる取り込みとこれら腫瘍細胞の選択的破壊の研究に始まる (Miura S *et al*, Arch Derm Res 279:219-225, 1987; Tandon M *et al*, Bio Pharmacol 55:2023-2029,1998)。NPrCAP/M製剤について、チロシナーゼ (Tyr) の基質となりメラノーマ細胞への親和性を発揮することが証明された (Sato *et al*, J Invest Dermatol 2009)。

図6-a : NPrCAPとメラノーマに特異な分化形質であるメラニン産生酵素チロシナーゼ (Tyr: tyrosinase)、チロシンヒドロキシラーゼ (tyrosine hydroxylase) との反応



NPrCAP/PEG/DNMは、先端に位置するNPr-4SCAP構造がPEG (polyethylene glycol) を介してDNM (dextran magnetite : リゾビスト) に結合したものであり、図6ではPEG/DNM構造を省略する。PEGおよびデキストランは生体内温熱治療で分解し、NPr-4SCAP結合分子が発生する。NPr-4SCAP構造は、Tyr酸化によりキノン体NPrCAQに代謝される。NPrCAQは極めて反応性が高く、システインのSH基を介してチオールRSHと結合し、RS-NPrCAC構造となる。その証明には、塩酸水解により生成するCA-CysCをHPLCにより同定する。一方、THはNPr-4SCAPを水酸化してNPrCACを生じ、その酸化によりNPrCAQが生成し、同様な代謝経路に取り込まれる。

図7 : CTI療法で活性化される腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) の解析

CTI療法後に所属リンパ節が肥大し、CD8陽性T細胞の数が増加すること、および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CD8 T細胞が腫瘍免疫に重要な役割を果たすことを見出した (図7-a,b)。またVβ11におけるCDR3領域の遺伝子配列を同定した (表7-c)。

図7-a :

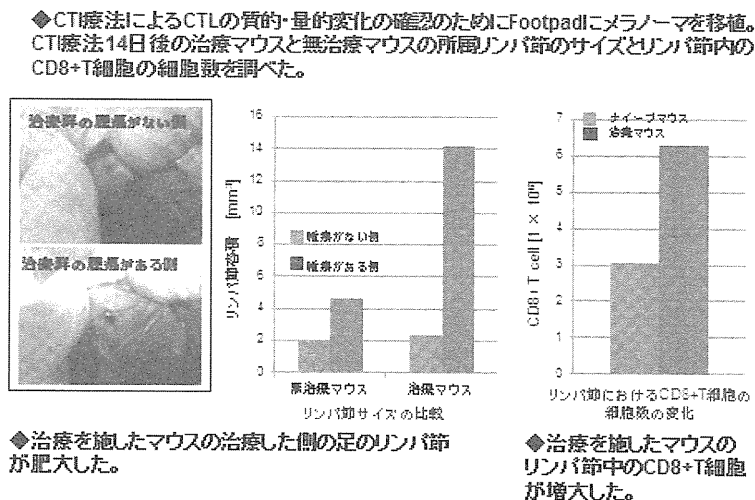


図7-b :

## TCRレパトワ解析

### ◆腫瘍浸潤T細胞の質的解析: TCR Vβのレパトワ解析

リンパ節および腫瘍組織を破壊、逆転写後、22種のTCRプライマーによるPCRと電気泳動解析

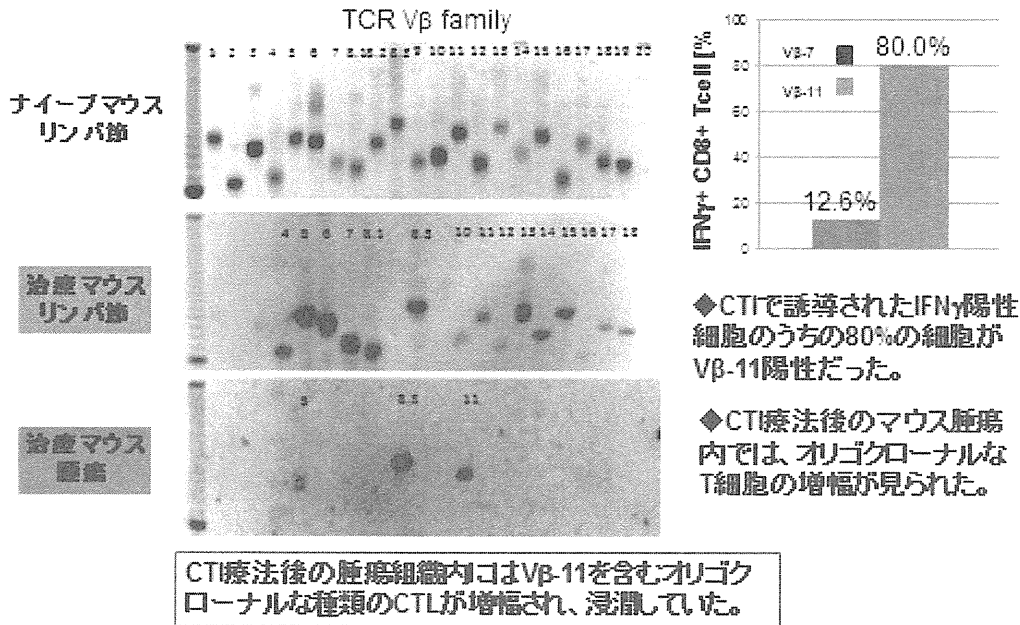


表7-c : CTI療法後のTILにおけるVβ11 CD8陽性細胞のCDR3シーケンス解析

	Vβ	N-Db-N	Jβ	
Vβ11	GCAAGCAGC A S S	TTAGAACTGGGGGGGCGA L E L G G R	GAACAGTAC E Q Y	Jβ2-7
	GCAAGCAGC A S S	TCACTGCTT S L L	AGTGCAGAA S A E	Jβ2-3
	GCAAGCAGC A S S	TCACTGTTT S L F	AGTGCAGAA S A E	Jβ2-3

### 図8 : 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

これまでに我々は、Fmoc固相合成法により、メラノーマで高発現される4種のメラノソーム抗原タンパク質 (TRP- 2、Tyrosinase、gp100、MART- 1) の全アミノ酸配列をスポット合成した抗原タンパク質由来全網羅ペプチドアレイを作製し、CTI療法で高発現するシャペロンタンパク質であるHSP70との結合実験を行った。抗原となるペプチドはHSP70を経由してMHC分子上に提示されるため、HSP70に高結合し、かつMHC分子との親和性が高いペプチドを、上記セルロースメンブレンタイプペプチドアレイとBIMASデータベースを使って探索した。

図8-a,b : 抗原蛋白質由来配列全網羅ペプチドアレイを用いたHSP70高結合ペプチドの探索 (Mart-1の結果)

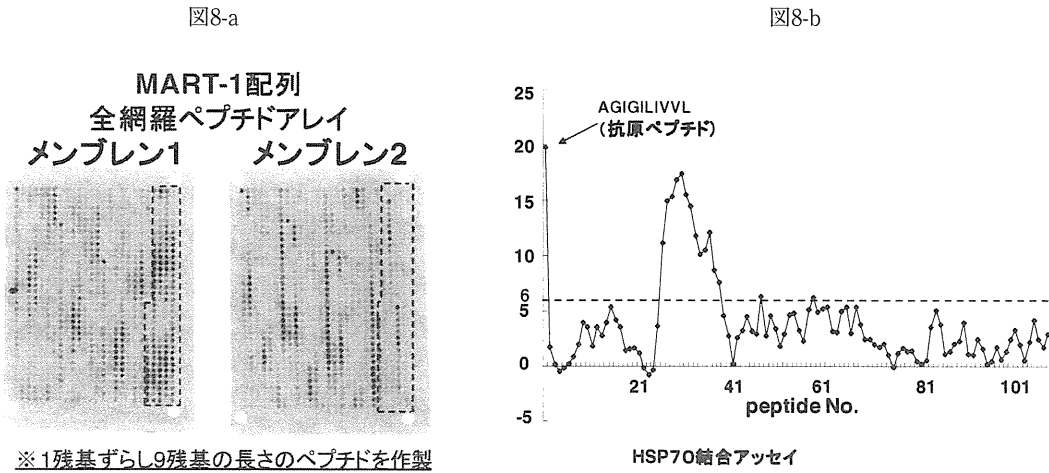


図8-c :

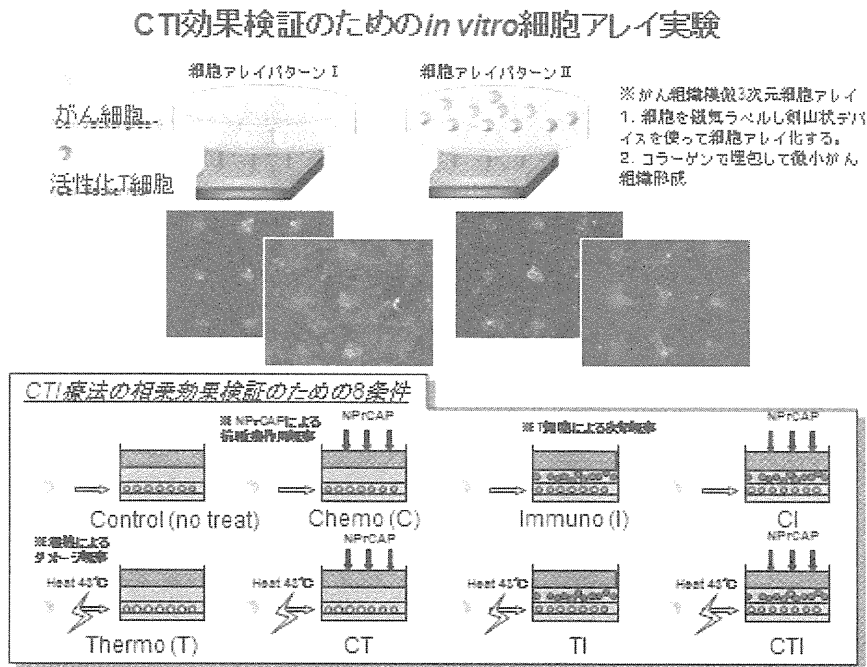
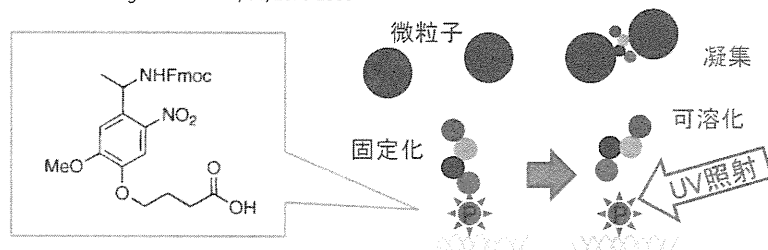


図8-d :

(4-[4-(1-(Fmocamino)ethyl)-2-methoxy-5-nitrophenoxy]butanoic acid)  
C.P. Holmes. *J. Org. Chem.* 1997, 62, 2370-2380



NPrCAP/PEG/DNM 認識ペプチドの探索は、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・可溶化し、分散性の高いペプチドの結合で生じるNPrCAP/PEG/DNMの凝集反応を利用して探索する（図8-d）。ペプチドの可溶化は、すでに開発しているフォトリンカーの上にペプチド合成し、紫外線照射で光解裂反応を惹起することで可溶化する。

図9：CTI療法と新規に同定したメラノーマ抗原ペプチドワクチンの併用療法の検討

1. 前述（図8-a,b）の研究で同定されたHsp70に結合親和性の高い抗原ペプチドの1つであるJHペプチド（前述のLPWHRLFLLペプチド）は、HLA-A24およびマウスのH-2Kbに提示される。このJHペプチドを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細胞は、マウスメラノーマB16F0およびHLA-A24に提示されたJH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。

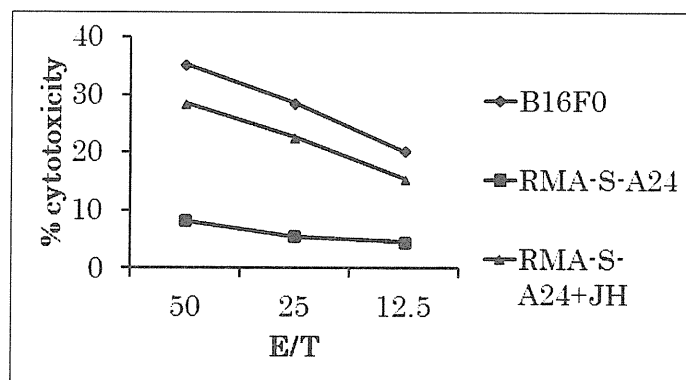


図10：NPCMD 製剤による免疫応答の賦活化及びアジュバント効果の検討

メラノジェネシスを分子標的としたNPrCAP 製剤は不溶性である。これを可溶化するためにカルボキシメチルデキストラン（CMD）とNPrCAPの複合体（NPCMD）を作製し、ヒト単球による炎症性サイトカイン発生機構を解析した。

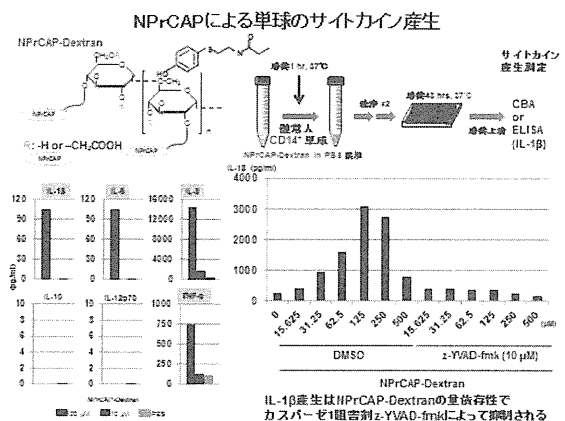
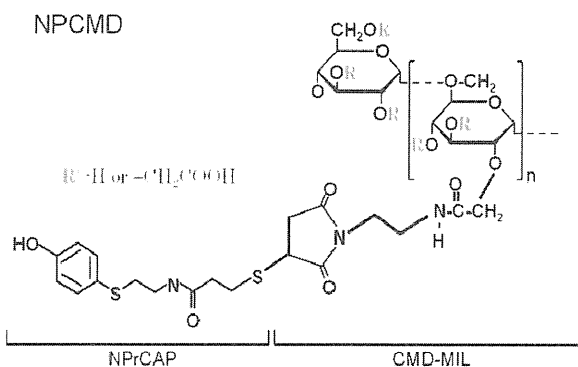


図11：誘電加熱装置を用いた新規CTI療法機器サーモトン-RS8の開発

担癌マウスを用いた誘電加熱実験。腫瘍に磁性ナノ粒子製剤を注入し、誘電加熱を行ったところ、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℃まで温度が上昇した。

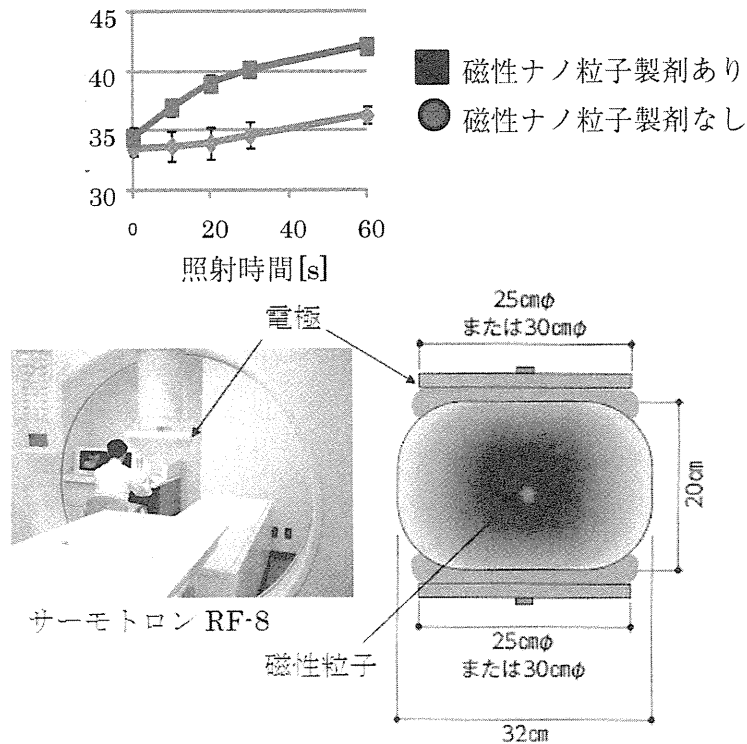


図11：次世代型CTI療法確立に向けての新規CTI療法医療機器装置の開発

## F. 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, in situ peptide vaccine immunotherapy through HSP production by chemo-thermotherapy. J Biomaterials and Nanobiotechnology, in press
  - 6) Jimbow K, Osai Y, Sato A, Takada T, Sato M, Kamiya T, Ono I, Yamashita T, Tamura Y, Ito A, Honda H, Wakamatsu K, Ito S, Kobayashi T, Nakayama E: Melanogenesis substrate, N-propionyl cysteaminyphenol, alone possesses a potent chemotherapeutic and immunogenic property in conducting melanoma chemo-thermo-immunotherapy, a combined therapy of NPrCAP and magnetite nanoparticle with HSP generation by alternating magnetic field. Pigment Cell Melanoma Res, (2010) 23:900-901
  - 7) Sato A, Tamura Y, Sato N, Yamashita T, Takada T, Sato M, Osai Y, Ohkura M, Ono I, Ito A, Honda H, Wakamatsu K, Ito S, Jimbow K: Melanoma-targeted chemo-thermo-immuno (CTI) -therapy using N-propionyl- 4 -S-cysteaminyphenol-magnetite nanoparticles elicits CTL response via heat shock protein-peptide complex release. Cancer Sci, (2010) 101 (9) :1939-1946
  - 8) Jimbow K, Ogino J, Hida T, Kawakami A: Comparison of biological significance of eu-and pheomelanin pigmentation in skin aging process. Geriatric Dermatol Seminar, (2009) , 5 (3) :31-44
  - 9) Kamiya T, Okabayashi T, Yokota S, Kan Y, Ogino J, Yamashita T, Fujii N, Jimbow K: Increased caspase- 2 activity is associated with induction of apoptosis in IFN-beta sensitive melanoma cell lines. J Interferon Cytokine Res, (2009) 30 (5) : 349-57
  - 10) Jimbow K, Takada T, Sato M, Kamiya T, Ono I, Yamashita T, Tamura Y, Sato N, Miyamoto A, Wakamatsu K, Ito S, Ito A, Honda H, Murase K: Melanogenesis cascade as the molecular target for the development of chemo-thermo-immunotherapy: rationale and clinical application (in Japanese) . Skin Cancer, (2009) 24:174-180
  - 11) Takada T, Yamashita T, Sato M, Ono I, Tamura Y, Sato N, Miyamoto A, Ito A, Honda H, Wakamatsu K, Ito S, Jimbow K: Growth inhibition of re-challenge B16 melanoma transplant by conjugates of melanogenesis substrate and magnetite nanoparticles as the basis for developing melanoma-targeted chemo-thermo-immunotherapy. J Biomed Biotech, (2009) 10:1155/457936
  - 12) Sato M, Yamashita T, Ohkura M, Osai Y, Sato A, Takada T, Matsusaka H, Ono I, Tamura Y, Sato N, Sasaki Y, Ito A, Honda H, Wakamatsu K, Ito S, Jimbow K:

- N-propionyl-cysteaminylphenol-magnetite conjugate (NPrCAP/M) is a nanoparticle for the targeted growth suppression of melanoma cells. *J Invest Dermatol*, (2009) 129 (9) :2233-41
- 13) Hida T, Kokai Y, Kawakami A, Hirosaki K, Okura M, Sohma H, Tosa N, Yamashita T, Jimbow K: Rab 7 is a critical mediator in vesicular transport of Tyrp1 in melanocytes. *J Dermatol*, (2009) 129 (9) : 2233-41
  - 14) Hida T, Sohma H, Kokai Y, Kawakami A, Hirosaki K, Okura M, Tosa N, Jimbow K: Rab7 is a critical mediator in vesicular transport of tyrosinase-related protein 1 in melanocytes. *J Dermatol*, 2010.
  - 15) Kawakami A, Saga K, Ono I, Hida T, Jimbow K, Yamashita T: Spontaneous regression of bowenoid papulosis in a patient with acquired immunodeficiency syndrome after an increase in peripheral CD4+ T lymphocytes. *Int J Dermatol*, 48 (2) :210-212, 2009.
  - 16) Hida T, Wakamatsu K, Sviderskaya EV, Donkin AJ, Montoliu L, Lynn Lamoreux M, Yu B, Millhauser GL, Ito S, Barsh GS, Jimbow K, Bennett DC: Agouti protein, mahogunin, and attractin in pheomelanogenesis and melanoblast-like alteration of melanocytes: a cAMP-independent pathway. *Pigment Cell Melanoma Res*, 22; 623-34, 2009.
  - 17) Sato M, Yamashita T, Ohkura M, Osai Y, Sato A, Takada T, Matsusaka H, Ono I, Tamura Y, Sato N, Sasaki Y, Ito A, Honda H, Wakamatsu K, Ito S, Jimbow K: N-Propionyl-Cysteaminylphenol-Magnetite Conjugate (NPrCAP/M) Is a Nanoparticle for the Targeted Growth Suppression of Melanoma Cells. *J Invest Dermatol*, 129:2233-41, 2009.
  - 18) Takada T, Yamashita T, Sato M, Sato A, Ono I, Tamura Y, Sato N, Miyamoto A, Ito A, Honda H, Wakamatsu K, Ito S, Jimbow K: Growth inhibition of re-challenge B16 melanoma transplant by conjugates of melanogenesis substrate and magnetite nanoparticles as the basis for developing melanoma-targeted chemo-thermo-immunotherapy. *J Biomed Biotechnol*, Vol 2009, Article ID 457936, 13 pages, 2009.
- ## 2. 学会発表
- 1) 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, Istanbul, Turkey (March 1-2, 2012)
  - 2) 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, Bordeaux, France (September 20-24, 2011)
  - 3) 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. 2011年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
  - 4) 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, Edmonton, Canada (June 22-26, 2011)
  - 5) Jimbow K, Takada T, Sato M, Sato A, Osai



- Y, Kamiya T, Ono I, Yamashita T, Tamura Y, Ito A, Honda H, Wakamatsu K, Ito S: Utilization of melanogenesis substrate, NPrCAP for exploiting melanoma-targeting drug and its conjugation with magnetite nanoparticles for developing melanoma chemo-thermo-immunotherapy. 2nd International Conference on Drug Discovery and Therapy (Dubai) , (February 1-4, 2010)
- 6) Osai Y, Tamura Y, Sato N, Wakamatsu K, Ito S, Ito A, Honda H, Okura M, Yamashita T, Jimbow K: N-propionyl-4-S-cysteaminyphenol induces apoptosis of mouse B16F1 melanoma cells and suppression of transplanted B16F1 tumors. *Pigment Cell & Melanoma Res*, 22 : 915, 2009 (Fukuoka) , (December 5-6, 2009)
- 7) Jimbow K, Takada T, Sato M, Sato A, Osai Y, Kamiya T, Ono I, Yamashita T, Tamura Y, Ito A, Honda H, Wakamatsu K, Ito S: Melanogenesis cascade for developing novel selective drug delivery and chemo-thermo-immunotherapeutic strategies in melanoma; specificity and biological effect. *Pigment Cell & Melanoma Res*, 22 : 915, 2009 (Fukuoka) , (December 5-6, 2009)
- 8) Jimbow K, Thomas PD, Osai Y, Takada T, Sato M, Sato A, Tamura T: Melanogenesis substrate, N-propionyl cysteaminyphenol is selectively incorporated into melanoma cells and inhibits the growth of re-challenged secondary transplantation. *Pigment Cell & Melanoma Res*, 22:877, 2009, (Boston) , (November 1-4, 2009)
- 9) Osai Y, Tamura Y, Sato N, Wakamatsu K, Ito S, Ito A, Honda H, Ohkura M, Yamashita T, Jimbow K: N-propionyl-cysteaminyphenol suppresses re-challenge of mouse B16F1 tumor by inducing tumor-specific immune response. *J Invest Dermatol* 129, Suppl (Hungary) , (September 9-12, 2009)
- 10) Jimbow K, Takada T, Sato M, Sato A, Kamiya T, Ono I, Yamashita T, Tamura Y, Sato N, Miyamoto A, Wakamatsu K, Ito S, Ito A, Honda H, Murase K: Melanogenesis and nanomedicine as the basis and clinic for melanoma-targeted DDS and chemo-thermo-immunotherapy. 25th Annual Meeting of the Japanese Skin Cancer Society (Okayama) , (May 22-23, 2009)

## G. 知的所有権の取得状況

### 1. 特許取得

- 1) Title: PHENOLIC AMINE AS DEPIGMENTING AND ANTIMELANOMA AGENTS; Stiefel Inc., & University of Alberta (2種類の特許)  
 PATENT #: 3178834 (in Japan) , 5925332 (in USA) , 2015197 (in Canada) , 46522 (in Philippine) , 9604333- 6 (in Singapore) , 204254 (in South Korea) , 82105703 (in Taiwan) , 651823 (in Australia) , Israel (106347)
- 2) Title: メラノーマ標的ナノ微粒子 (NPrCAP/ML) によるメラノーマ温熱免疫療法の開発 (平成16年11月30日までの研究結果データに基づく研究内容)  
 Patent : 特許第36178834号広報 (特許文献)

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

## II. 分担研究報告

# 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

## 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態で培養でき、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。この方法を使うことで、生体内環境を模倣した状態でメラノーマ細胞を培養することができ、メラノーマ細胞の浸潤・増殖などの悪性度を客観的に評価することに成功した。また、間質細胞との相互作用も評価できることを明らかにするとともに、CTI療法の効果増強を目指し、NPrCAPに対する感受性と温熱処理の感受性を同時評価に成功した。さらに、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、MART-1、TRP-2およびTyrosinaseから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ンニングする、磁気細胞アレイ化技術を開発した。電磁軟鉄を加工して $\mu\text{m}$ 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巣を模倣した環境をin vitroで再現し、がん細胞の挙動観察を行った。

## B. 研究方法

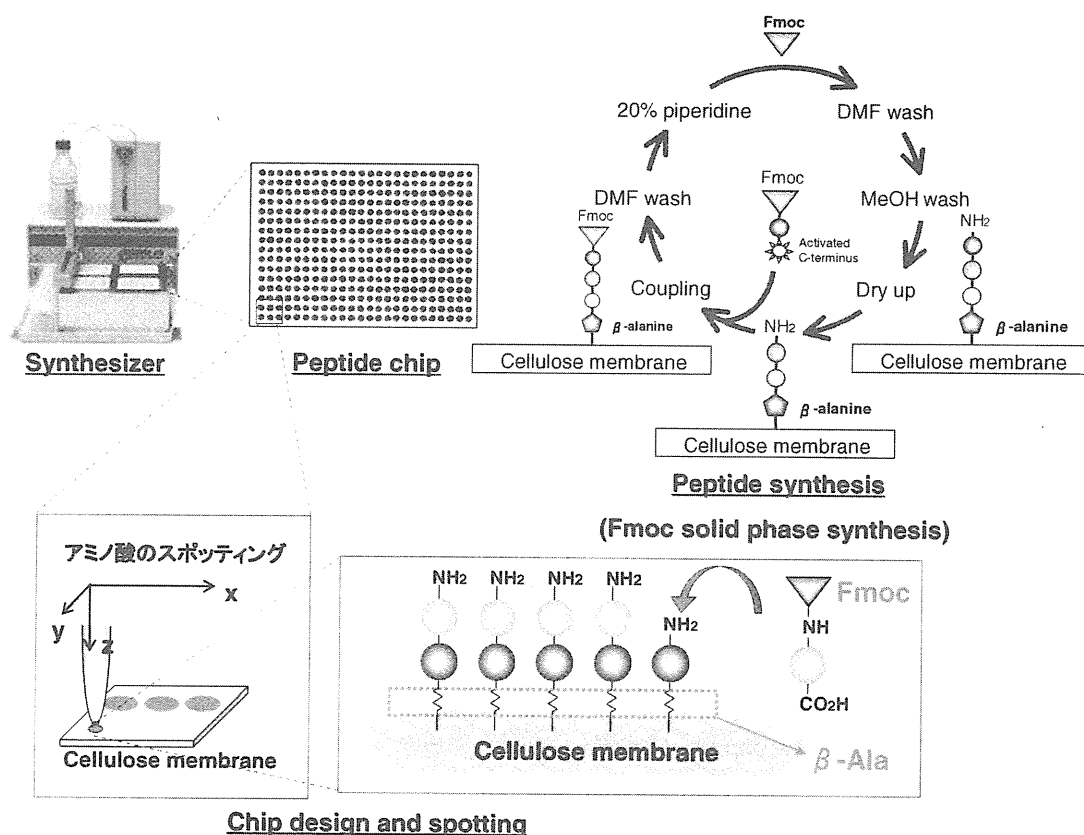


Fig. 1 ペプチドアレイのFmoc固相合成法

### B-1 がん抗原ペプチドの特定

まず、セルロースメンブレン (9.5cm $\times$ 14cm, Whatman, England) を $\beta$ -アラニン溶液 (12ml 0.5M  $\beta$ -Ala, 0.6 ml 1-Methylimidazole, 0.75ml DIPC in DMF 150ml) に浸し、2日間振とうさせ活性化メンブレンを作製した。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)) とメタノールで活性化メンブレンを洗浄し (5min $\times$ 各2回), 未反応 $\beta$ -アラニンを除去し自然乾燥させた。

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）のDMF溶液として用意し、活性化剤（DIPCI (N,N'-Diisopropylcarbodiimide) および 1-hydroxybenzotriazole (HOBt, Anhydrous)) を混合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。

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 × 2回）、脱保護の後、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た。ペプチドアレイに Hsp70 (NSP-555-F, Stressgen) を 37℃、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、およびヒト悪性黒色腫細胞（以下メラノーマ）として Sk-mel-23、Sk-mel-118 (UT)、MeWo、G361、および M-1 細胞を用いた。培養は、37℃、5% CO<sub>2</sub>、95% Air 下の CO<sub>2</sub> 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 100U/ml ペニシリン G ナトリウム、0.1μg/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。

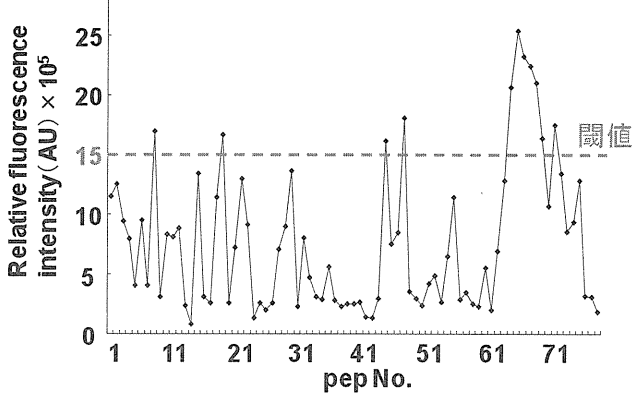
間質細胞として正常ヒト皮膚線維芽細胞 NHDF を用いた。培養と継代操作は、M-1 細胞と同様に行ったが、培地には 10% FBS 及び PS を含む Dulbecco's Modified Eagle Medium high glucose (DMEM) (Invitrogen) を用いた。

磁性微粒子として粒子径 10 nm の Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (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 10mg/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-( $\alpha$ -tri-methyl-ammonio-acetyl)-didodecyl-D-glutamate chloride) (相互薬工、東京)、DLPC (Di-lauroyl phosphatidylcholine) (Sigma-Ardrich)、DOPE (Dioleoyl phosphatidyl-ethanolamin) (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、CO<sub>2</sub> 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<sup>5</sup> 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。

### GP100



		BIMAS score				BIMAS score					
pep No.	Sequence	蛍光強度	SD	P値	HLA-A24	HLA-A0201	HLA-A24	HLA-A0201			
1	DLVLRNLL	1.15E+05	1.15E+05	0	1.602	41	WVETAREL	2.67E+05	1.41E+05	0.6	0.11
2	LHLAVGA	1.25E+05	2.44E+05	0	10.495	42	STSEISSL	1.40E+05	1.44E+05	8.4	0.002
3	MLAVGALL	9.45E+05	3.11E+05	5.8	0.726	43	SLQPLDGT	1.33E+05	1.55E+05	0.144	5.395
4	AVGALLAV	7.98E+05	2.63E+05	0.15	11.997	44	PLQDLYATL	2.95E+05	1.73E+05	0.72	7.173
5	LLAVGATKV	4.07E+05	2.55E+05	0.11	118.234	45	RLVKRQVPL	1.81E+05	4.65E+05	1.7	21.562
6	KVPRHQDNL	9.48E+05	3.72E+05	12	17.531	46	ROVPLDVL	7.49E+05	1.88E+05	17.285	0.888
7	PLWVRSRDL	4.07E+05	1.68E+05	8.4	0	47	LVYGSFSV	8.44E+05	2.25E+05	5	0.007
8	RTKAWNRDL	1.65E+05	4.59E+05	8	0.002	48	RYGSFSVTL	1.80E+05	1.80E+05	4.60	0.011
9	DLVPSATEA	3.10E+05	2.00E+05	0.132	27.026	49	VTLVGVGI	3.52E+05	5.99E+05	3.024	8.544
10	KVSRQKPL	8.79E+05	9.34E+05	8	8.442	50	IQIESASR	2.92E+05	7.89E+05	7.2	0.115
11	INPFSQKVL	8.11E+05	2.16E+05	20	0.008	51	SGEGDAFL	2.36E+05	1.14E+05	6.6	0.932
12	VYRWNTL	8.86E+05	1.95E+05	1	5.709	52	LVYSGGGL	4.17E+05	1.13E+05	6	0.585
13	SGWGGGPPV	2.34E+05	1.71E+05	0.18	7.652	53	GGPPGAPR	4.79E+05	5.81E+05	8.64	0.139
14	VYPSFIDDA	8.27E+04	1.17E+05	7.5	0.091	54	VLPSPAGL	2.62E+05	2.28E+05	0	35.315
15	KTWGYYGV	1.94E+05	1.32E+05	0.2	215.701	55	QQVLYKDL	6.47E+05	2.46E+05	8.84	3.268
16	VLGGPVSL	3.12E+05	8.62E+04	4	83.527	56	RGOSRYDL	1.14E+05	1.65E+05	5	0.488
17	MLGHTIMEV	2.61E+05	1.99E+05	0.11	118.235	57	TYCLNLSLA	2.88E+05	3.97E+05	5	0.002
18	VYRHRSRS	1.14E+05	1.22E+05	5	0	58	QLVSLADT	3.49E+05	3.16E+05	0.15	11.14
19	RGSRVYVPL	1.47E+05	2.50E+05	8	0.209	59	VSLADTNSL	2.54E+05	1.78E+05	7.2	0.877
20	GVPLAMSS	2.55E+05	1.10E+05	16.2	0	60	SLADTNSLA	2.89E+05	0.63E+06	0.12	20.269
21	VSVSLRAL	7.24E+05	1.85E+05	6	0.109	61	SLAVSTVL	5.93E+05	7.66E+05	8	21.942
22	RNDPLTFAL	1.30E+06	4.12E+05	17.28	0.809	62	IMPGGAGL	1.93E+05	9.93E+05	6	26.32
23	QRTLALGL	9.14E+05	9.72E+04	6	1.981	63	QLGQVPLV	6.52E+05	5.63E+05	0.14	24.516
24	GLHPDSYSL	1.35E+05	3.97E+04	4.8	62.504	64	GVPLVGLI	1.93E+05	2.11E+05	8.4	0.528
25	GVLEADIS	2.59E+05	8.21E+04	7.5	0	65	VPLVGLIL	2.68E+05	1.74E+05	8.4	0.278
26	RYTWVPGDS	1.99E+05	1.14E+05	6	0	66	LVPLVGLI	2.32E+05	2.54E+05	8.4	4.309
27	DFGSSDYL	2.54E+05	1.01E+05	24	0.001	67	GILLVMAV	2.27E+05	1.98E+05	0.21	81.355
28	SLLSRAL	7.08E+05	1.19E+05	5.8	0.028	68	LLVLMMAV	2.24E+05	2.92E+05	0.18	412.546
29	ILSRVAVL	8.98E+05	2.61E+04	0.15	29.616	69	RLVLMMAV	2.27E+05	1.23E+05	8	14.35
30	ALVWHTL	1.37E+06	4.97E+04	6	117.493	70	LVLMVLLA	1.54E+05	1.41E+05	0.15	5.295
31	ITLSEPKIT	2.25E+05	1.31E+05	9	0.066	71	DNAVYVGL	1.07E+05	2.17E+05	9.6	60.262
32	GPVTAQVVL	6.06E+05	1.58E+05	6	0.057	72	ASVAVVGL	4.49E+05	1.10E+05	0	1.09
33	VVLQAMP	4.75E+05	8.18E+04	6	11.787	73	RLMKQGFV	1.34E+05	1.72E+04	0.3	149.558
34	VLAAPRIT	3.98E+05	9.72E+04	0.15	29.137	74	RGQSPFAL	6.52E+05	1.19E+05	0	1.979
35	SVAVPTIEV	2.84E+05	3.41E+04	0.165	6.086	75	WLRLPRFD	9.31E+05	1.98E+05	0.1	9.552
36	GMTFPRVVP	5.93E+05	4.70E+04	0.12	50.332	76	RLPRFSSC	1.28E+05	1.44E+05	0.504	5.438
37	VSVWVTL	2.91E+05	9.89E+04	0.015	0.015	77	CPSEVNSL	3.19E+05	1.79E+05	0.133	0
38	VMGITLAEI	2.25E+05	1.19E+05	0.55	14.078	78	AAAAAAAA	3.08E+05	1.55E+05	0.1	0.063
39	QHTPAEIS	2.59E+05	9.48E+04	1.7	7.555	79					
40	ADPTVPL	2.55E+05	2.44E+05	0.15	14.922	80					

● 候補ペプチド  
 ■ BIMAS score 5.0以上  
 ■ 蛍光強度  $1.5 \times 10^6$ 以上

Fig. 2 ペプチドアレイでのHsp70結合試験結果

## 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。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。

### GP100

		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	RYGSFSVTL	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	GILLVLMVAV	2.32E+06	1.99E+05	0.0002	0.21	81.385
68	ILLVLMVAVV	2.24E+06	2.92E+05	0.0019	0.18	412.546
69	LLVLMVAVVL	2.10E+06	1.23E+05	0.0001	6	14.89
78	AAAAAAAA	3.06E+05	1.55E+05			

### MART-1

		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	AAAAAAAA	3.06E+05	1.55E+05			

### Tyrosinase

		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
2.4	LPWHRLFLL	1.84E+06	1.43E+05	0.0002	4	26.248
59	AAAAAAAA	3.06E+05	1.55E+05			

### TRP-2

		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	8.4	40.589
70	GLFVLLAFL	2.38E+06	4.14E+05	0.0069	4.8	999.867
74	AAAAAAAA	3.06E+05	1.55E+05			

Fig. 3 CTI療法増強候補ペプチド

### C-2 がん細胞アレイによる機能評価

マトリゲル上、かつ三次元的にECMに包埋した環境下で、がん原発巣を模倣した細胞集合体をア



レイ状にパターンニングして、マトリゲルへの浸潤を評価する培養系を構築した。がん原発巣でがん細胞が置かれている環境、とっている形態を模倣することができた。次いで、三次元培養がん浸潤評価系により上記の細胞について浸潤能の評価、比較を行った。橙色蛍光標識ポリスチレン (PS) ビーズ (粒子径 $1.0 \mu\text{m}$ ) (invitrogen, CA, USA)を混ぜたマトリゲルを用意し、ゲル境界が識別できるようにした。

3日間培養後、いずれの細胞もマトリゲル方向への浸潤が見られ、Sk-mel-23は他の細胞種と比較して浸潤距離は長かった(Figs. 4, 5)。また浸潤が見られるスポットの割合は、UT、MeWo、G361では同程度であり、Sk-mel-23ではそれよりも多く、Sk-mel-23は浸潤能が高いという結果になった。UT、G361、Sk-mel-23の結果は、インベーションアッセイと相関のある結果である。ただし、MeWoではインベーションアッセイとは異なる結果となった。MeWoはメラノーマ患者のリンパ節転移巣由来株であり、xenograftの形成や、ヌードマウスに注射すると肺結節の形成が見られ、転移能を有する細胞種である。

UTは比較的丸い形態をとり、G361、Sk-mel-23は細長い形態をとり、MeWoは最も細長く伸展する。使用したセルカルチャーインサートのメンブレンは、ポアサイズ $8.0 \mu\text{m}$ の空孔が $1 \times 10^5 \text{pores}/\text{cm}^2$ であいているものであり、空孔間距離は計算上平均 $32 \mu\text{m}$ である。一方、MeWoは細胞の長軸が $100 \mu\text{m}$ 以上である。これらのことから、MeWoは、その浸潤能によりマトリゲルを溶解するが、メンブレン下部方向へ誘引されても複数の空孔にまたがることで移動することができず、それがインベーションアッセイで浸潤能に結果が表れなかった原因であると思われる。

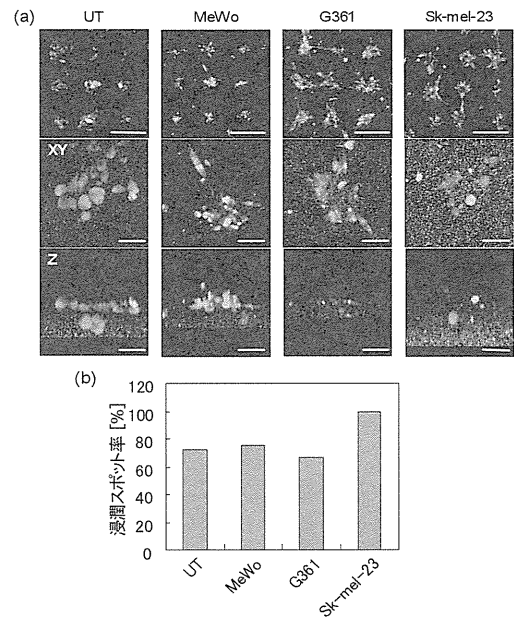


Fig. 4 3Dアレイでの浸潤能評価 パターンニング3日後に評価、(a)共焦点顕微鏡により取得した画像、上段スケールバー $250 \mu\text{m}$ 、中段 $50 \mu\text{m}$ 、下段スケールバー $50 \mu\text{m}$ 、Z方向図、(b)細胞存在範囲 $30 \mu\text{m}$ 以上を浸潤とみなし12スポット計測したときの浸潤スポット数。

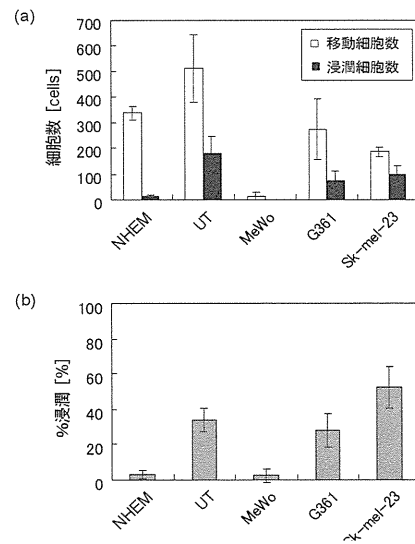


Fig. 5 インベーションアッセイでの浸潤能評価 (a)コントロールインサートを移動した移動細胞数とマトリゲルインサートを浸潤した浸潤細胞数、(b)移動細胞数に対する浸潤細胞数の割合、%浸潤値 (n=3)。

### C-2 間質細胞の混合培養系でのM-1細胞の形態観察

メラノーマ細胞として、日本人悪性黒色腫由来で培養可能な細胞として樹立されたM-1細胞を使用した。間質細胞としてNHDF（正常ヒト皮膚線維芽細胞；Neonatal Normal Human Dermal Fibroblasts）を使用した。

M-1細胞は磁性微粒子を取り込み、細胞アレイを形成することができた。しかし、M-1細胞は、通常の平面培養では紡錘状の伸展が観察されるものの、コラーゲンで埋包した場合は凝集塊を形成し、浸潤しない形態が観察された。そこで、NHDF（赤色蛍光で標識）とM-1細胞（緑色蛍光

で標識）をそれぞれ、赤色蛍光、緑色蛍光で標識し、混合培養系を構築した。M-1細胞をアレイ配置した後に、NHDFを上部に播種する間接作用評価系と、両方の細胞を同時にアレイ配置する直接接触評価系を構築し、評価した。Fig. 6に示すように、NHDFを上部に同時に巻き込む間接作用評価系では、M-1細胞が紡錘状に伸展する様子が観察できた。また、NHDFと同時にアレイ配置した直接接触評価系でも同様の様子が観察された。これは、間質細胞から分泌される可溶性液性因子によって進展増殖が促進されることを強く示唆するものである。

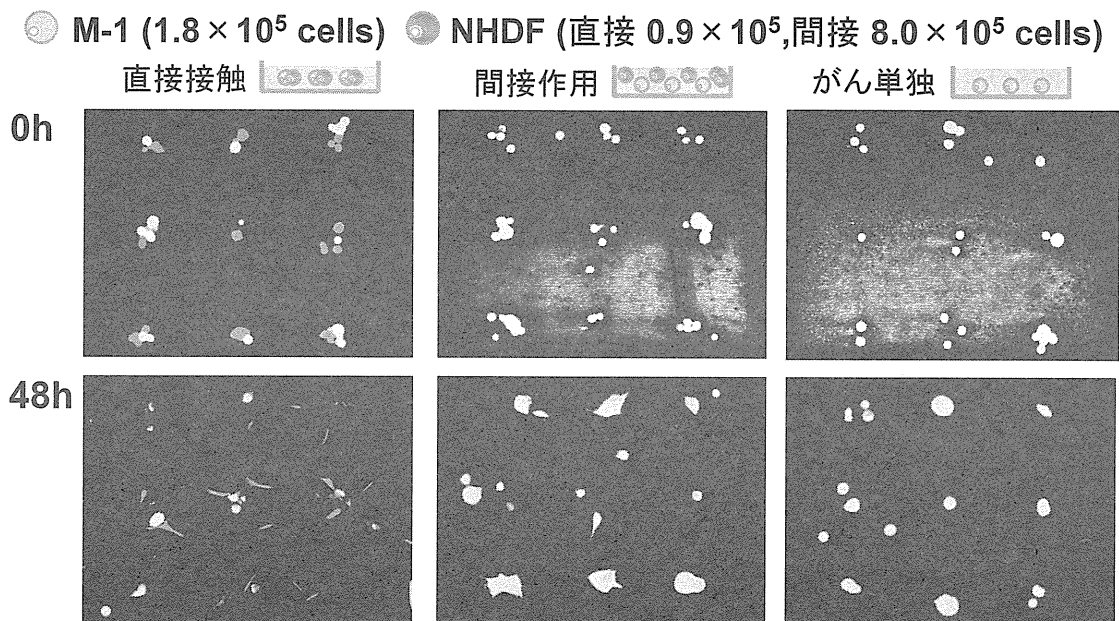


Fig. 6 M-1細胞-間質細胞相互作用の挙動評価

### C-3 がん細胞の薬剤感受性評価系の構築

ケモセラピーの効果を確認するためには、薬剤濃度の勾配を形成し、1枚の培養ディッシュで評価できる手法を構築する必要がある。このため、モデル薬剤としてパクリタキセル (PTX) を、モデルがん細胞として3T3を用い、濃度勾配による細胞の増殖阻害を観察した。PTXは脂溶性であるため、溶媒としてオレイン酸、オレイン

酸メチル1:1混合液を作成し、これにPTXを5 mg/Lで溶解させた。PTXの油層から培養液への拡散を助けるため、油層はTweenでエマルジョン化し、天然多糖高分子であるアルギン酸カルシウムゲルに埋包する方法を選択した。油滴の平均径は176nmである。



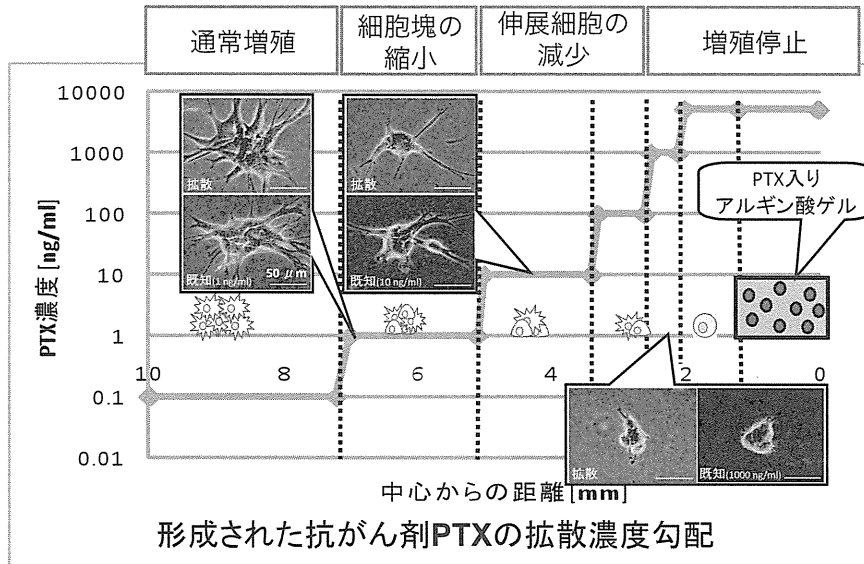


Fig. 7 同一培養ディッシュ中での薬剤濃度勾配の影響評価

このゲルを円筒形に成形し、培養ディッシュのほぼ中央に置き、PTXのゲルからの拡散による濃度勾配を形成させ、PTXによる3T3の形態変化を観察した。ゲルを設置した中心からの距離に応じて24時間後の細胞形態がドラスティックに変化する様子が観察された。これらの形態変化をFig. 7にまとめて示す。中心部では5mg/LのPTX濃度であり、辺縁部は0.1ng/ml程度と判断できた。ほぼ $10^4$ から $10^5$ オーダーの濃度勾配が形成されていた。

#### C-4 がん細胞の温熱/薬剤相互作用評価

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。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。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。

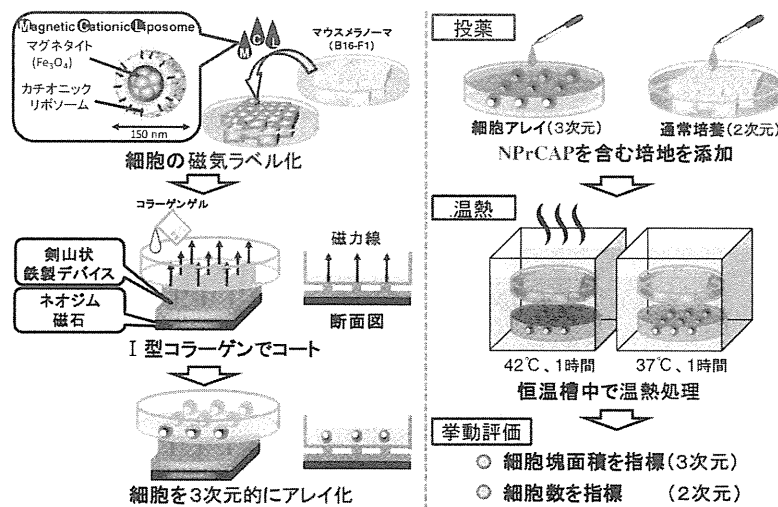


Fig. 8 温熱/薬剤相互作用評価法

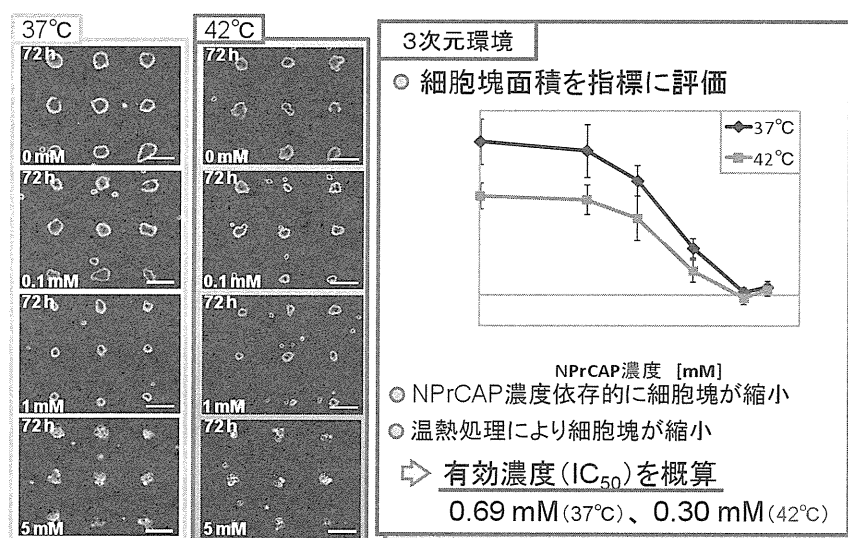


Fig. 9 細胞アレイを用いた温熱/薬剤相互作用実験結果

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. 8に示す。温熱は42℃, 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℃で0.69mM、42℃で0.30mMとなった（Fig.9）。

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。

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

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をなる。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℃条件下）では31%、42℃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

がん抗原ペプチドの探索に関しては、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、がん細胞の悪性度、薬剤に対する感受性が評価できることを示した。また、異種細胞との共培養系も新規に構築できた。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

小出寛展、松村拓、高野翔、大河内美奈、本多裕之、3次元細胞アレイによる腫瘍細胞の浸潤評価、化学工学会第75年会（2010年3月20日、鹿児島大学）

小出寛展、松村拓、高野翔、大河内美奈、本多裕之、3次元細胞アレイによるがん細胞の浸潤評価、第17回HAB研究機構学術年会（2010年5月21日、昭和大学）

松村拓、小出寛展、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生体模倣条件下でのがん細胞挙動評価、化学工学会第42回秋季大会（2010年9月6日、同志社大学）

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）  
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）治療法の開発に関する研究  
（分担）研究報告書

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

（分担）研究者 若松 一雅 藤田保健衛生大学医療科学部教授  
伊藤 祥輔 藤田保健衛生大学名誉教授

## 研究要旨

本研究は、GM製剤に向けたN-(1-mercaptopropionyl)-4-S-cysteaminyphenol (NPrCAP-SH)の安価な合成法を開発し、そのデキストランマグネタイトとの結合体 (NPrCAP/PEG/APTS/DNM) を効率よく合成する経路を検討した。つぎにNPrCAP/PEG/APTS/DNMがチロシナーゼの良好な基質になりうるかどうかを検討し、NPrCAP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。

### A. 研究目的

すでに我々は、本研究を円滑に遂行するために必要な薬剤、N-(1-mercaptopropionyl)-4-S-cysteaminyphenol (NPrCAP-SH)を大量かつ純度の高い物質として得る合成ルートを開発した (Satoら、J Invest Dermatol., 129, 2233-2241, 2009)。しかしながら、①この合成過程で使用する試薬が高価、②反応副生成物と目的物との分離が困難など、改善する余地があったため、できるだけ安価な試薬を用いて、反応経路・反応時間の短縮を行い、反応混合物から目的物質を効率よく精製する新たな合成法を検討した。ついで、NPrCAP結合量の定量方法の再検討と薬剤のチ

ロシナーゼの基質としての有効性を検討した。

N-Propionyl-4-S-cysteaminyphenol (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monobenzene (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