

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。今回、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-cysteaminy-3-S'-cysteinyl- catechol (CA-CysC)として確認した。

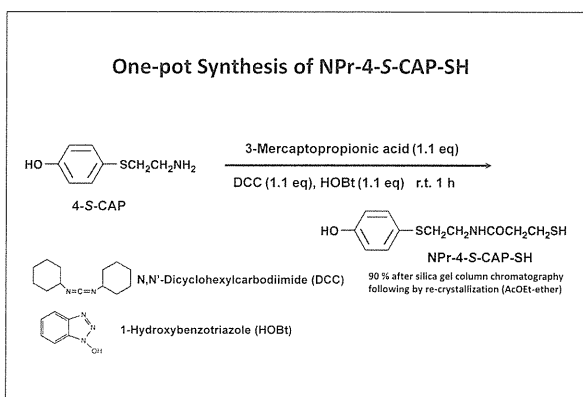


図1

## B. 研究方法および結果

### 1) NPrCAP-SHの新規合成法の開発

Padgetteらの文献(J. Med. Chem., 27: 1354-1357, 1984)に従い、再結晶後70%の収率でN-アセチル-4-S-CAPを得た。これを6M塩酸で3時間還流させ、再結晶後、目的物の4-S-CAPを80%の収率で得た。以前報告したNPrCAP-SHの合成法に使用したN-succinimidyl-3-[(2-pyridyl)-dithio]propionate (SPDP)は、約13万円/gと高価であり、反応後の目的物質との精製が煩雑であったので、実験条件を再検討した。その結果、4-S-CAPをDMF中3-メルカプトプロピオン酸、DCC、1-ヒドロキシベンゾトリアゾールと室温で1時間反応させることにより目的物質を再結晶後、90%の収率で得ることができた。このone-pot reactionにより目的とするNPrCAP-SHを安定に供給す

ることができるようになった(図1)。NPrCAP-SHをデキストランマグネタイトと結合させるために、まず、図2のようにデキストランマグネタイトを3-アミノプロピルトリエトキシシラン(APTS)と反応させた後、NPrCAP-SHをSunBright MA-050-HS(PEG)と反応させたものと40℃、17時間反応させて目的とするNPrCAP/PEG/APTS/DNMを合成した。

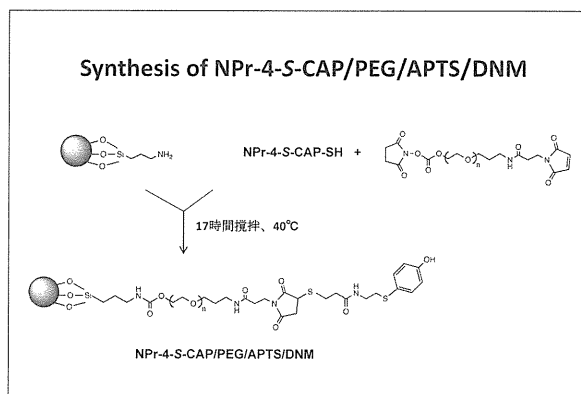


図2

### 2) コントロール化合物としてのNPr-2-S-CAP-SHの合成とそのカルボキシメチルデキストラン結合体の合成

4-S-CAPの構造異性体である2-S-CAPは、モノアミンオキシダーゼと反応せず、チロシナーゼの基質にならないことが知られている。文献既知の方法で2-S-CAPを合成後、上記と同じようにNPr-2-S-CAP-SHを86%の収率で合成した。このものをカルボキシメチルデキストランと結合させ、NPr-2-S-CAP-カルボキシメチルデキストラン結合体を合成した。この結合体を4-S-体のコントロール実験に使用した(図3)。

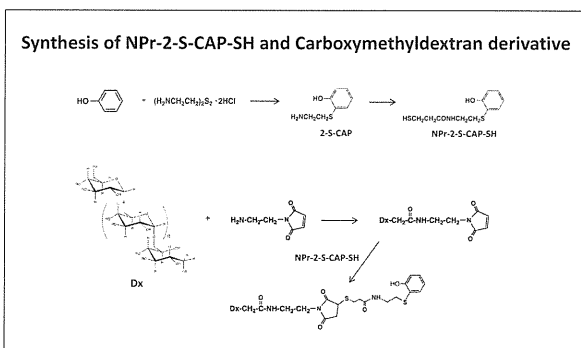


図3

### 3) デキストランマグネタイトに結合した NPrCAP 量の定量法の再検討

NPrCAPの結合量を求めるに際し、従来はNPrCAP/PEG/APTS/DNM懸濁液に9倍量の6M塩酸を加え、110℃で4時間反応させた。しかしながら、この方法では再現性よく4-S-CAP量を定量することができないことがわかった。原因は、塩酸水解中に4-S-CAPが分解するためと考えられたため、1%フェノールを含む6M塩酸で加水分解する方法を検討した。同時に、反応時間の検討も行ったその結果、1%フェノールを含まない6M塩酸で加水分解した場合は、4時間後の結合量が、1時間の20%に減少した。一方、1%フェノールを含む6M塩酸で加水分解した場合は、4-S-CAPの分解が抑えられ、2時間の反応時間でさえ分解されにくいことがわかった。以上の結果より、1) NPrCAP/PEG/APTS/DM懸濁液に9倍量の1%フェノールを含む6M塩酸を加え、110℃で1時間反応させる。2) 反応液を0.1 M塩酸で10倍希釈後、HPLC分析により4-S-CAP量を定量する。という実験条件を確立した(図4)。

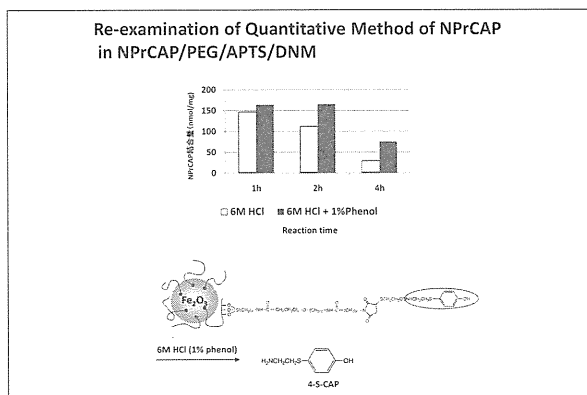


図4

### 4) NPrCAP/PEG/APTS/DNMのチロシナーゼの基質としての反応性

NPrCAP/PEG/APTS/DNMのチロシナーゼに対する基質実験を行った。NPrCAP自身であれば、チロシナーゼ酸化により生成するキノン体は、比色法(460 nm)を用いて測定することができる。しかしながら、この方法では反応液が着色しているため使用できない。したがって、次に述べ

る方法で測定した。すなわち、L-システイン共存下、NPrCAP結合体をチロシナーゼ酸化し、経時的に反応液を分取し、反応液に1%のフェノールを含む6M塩酸で110℃、1時間反応させ、生成する5-S-システアミニル-3-S'-システイニルカテコール(CA-CysC)をHPLCで分析した。その結果、コントロールに用いた4-S-CAPの一次反応速度定数は、 $0.17 \text{ min}^{-1}$ であり、一方、NPrCAP/PEG/APTS/DNMのそれは $0.041 \text{ min}^{-1}$ であった。なお、比較としてすでに文献に報告したNPrCAP/マグネタイト(M)は、 $8.5 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ であった(M. Satoら、JID, 2233-2241, 2009)。この結果から、NPrCAP/PEG/APTS/DNMはチロシナーゼの良好な基質となり、4-S-CAPとの反応速度比は、4.0であることがわかった(図5)。NPrCAP/PEG/APTS/DNMがNPrCAP/DNMより良好なチロシナーゼの基質となったのは、側鎖が延長したために、芳香族環の立体障害が軽減されたこと、また分散性が増加したためと考えられた。

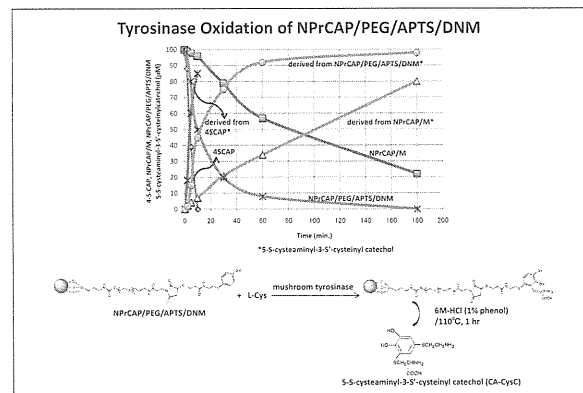


図5

<半減期>

4-S-CAP: 4.2 min, NPrCAP/PEG/APTS/DNM: 17 min, NPrCAP/M: 82 min

<反応速度定数>

4-S-CAP:  $0.17 \text{ min}^{-1}$ , NPrCAP/PEG/APTS/DNM:  $0.041 \text{ min}^{-1}$ , NPrCAP/M:  $8.5 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$

<反応速度比>

4-S-CAP/(NPrCAP/PEG/APTS/DNM): 4.0  
4-S-CAP/(NPrCAP/M): 19.5

### 5) NPrCAPのチロシナーゼ酸化および生成物のチオール類との反応

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6)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。

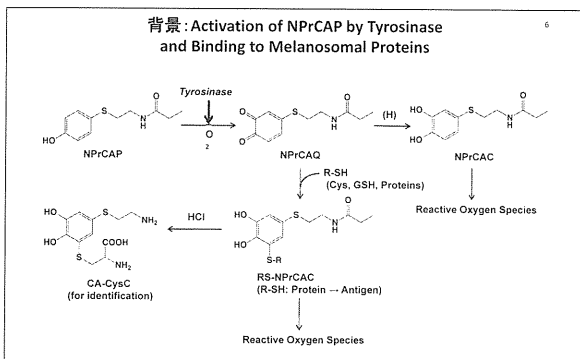


図6

NPrCAQは極めて反応性が高く、過剰のN-アセチルシステイン (NACys)、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、

NACys付加体NACys-NPrCAC (図6)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6)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。

### 6) 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  $\mu$  mol 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。

表1. NPrCAQ-チオール付加体の生成量<sup>a</sup>

画分	In vitro実験 (nmol) <sup>b</sup>		In vivo実験 (nmol) <sup>c</sup>	
	細胞	培地	腫瘍	血清
タンパク-SH	0.47 (0.8%) <sup>d</sup>	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%)

<sup>a</sup> 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。

<sup>b</sup> 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。

<sup>c</sup> 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。

<sup>d</sup> 括弧内は、消費されたNPrCAPに対する収率。

## C. 考察および結論

本研究により原料のNPrCAP-SHを大量にかつ迅速に提供する合成ルートを確認することができた。さらに、本化合物 (NPr-4-S-CAP-SH) のコントロール化合物としての2-S-体の合成も達成できた。また、1) NPrCAP結合量を測定する方法の確立、さらに2) NPrCAP/PEG/APTS/DNMがチロシナーゼの基質としてさきに報告したNPrCAP/マグネタイトよりも良好な基質になることを示した。今後は、GMPグレードの化合物を合成する必要があり、それに向けた反応経路、精製システムの構築をする必要がある。

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。

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) Wakamatsu, K., Ohtara, K., Ito, S. Chemical analysis of late stages of phaeomelanogenesis: conversion of dihydrobenzothiazine to a benzothiazole structure. *Pigment Cell Melanoma Res.*, 22, 474-486, 2009.
- 2) Ito, S. Melanins seem to be present everywhere in the body, but for what? *Pigment Cell Melanoma Res.*, 22, 12-13, 2009.
- 3) 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 (NPrCAP/M) is a nanoparticle for the targeted growth suppression of melanoma cells. *J. Invest. Dermatol.*, 129, 2233-2241, 2009.
- 4) 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. Biotechnol.* 2009. doi: 10.1155/2009/457936.
- 5) Spry, ML., Vanover, JC., Scott, T., Abona-Ama, O., Wakamatsu, K., Ito, S., D'Orazio, JA. Prolonged treatment of fair-skinned mice with topical forskolin causes persistent tanning and UV protection. *Pigment Cell Melanoma Res.*, 22, 219-229, 2009.
- 6) Greco, G., Wakamatsu, K., Panzella,

- L., Ito, S., Napolitano, A., d'Ischia, M. Isomeric cysteinyl dopas provide a (photo) degradable bulk component and a robust structural element in red human hair pheomelanin. *Pigment Cell Melanoma Res.*, 22, 319-327, 2009.
- 7) Hu, DN., Wakamatsu, K., Ito, S., McCormick, SA. Comparison of eumelanin and pheomelanin content between cultured uveal melanoma cells and normal uveal melanocytes. *Melanoma Res.*, 19 (2), 75-79, 2009.
- 8) Gasparini, J., Bize, P., Piau, R., Wakamatsu, K., Blount, J.D., Ducrest, A-L., Roulin, A. Strength and cost of an induced immune response are associated with a heritable melanin-based colour trait in female tawny owls. *J. Animal Ecology*, 78, 608-616, 2009.
- 9) Hida, T., Wakamatsu, K., Sviderskaya, E.V., Donkin, A.J., Montoliu, L., Lamoreux, M. L., Yu, B., Millhauser, G. L., Ito, S., Barsh, G.S., Jimbow, K., Bennett, D. Agouti protein, mahogunin and attractin in phaeomelanogenesis and melanoblast-like alteration of Melanocytes: a camp-independent pathway. *Pigment Cell Melanoma Res.*, 22, 623-634, 2009.
- 10) Scott, T., Wakamatsu, K., Ito, S., D'Oradio, JA. Purification and growth of melanocortin 1 receptor (Mclr)-defective primary murine Melanocytes is dependent on stem cell factor from keratinocytes-conditioned media. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*. 45, 577-583, 2009.
- 11) Simon, J.D., Peles, D., Wakamatsu, K., Ito, S. Current Challenges in understanding melanogenesis: Bridging chemistry, biological control, morphology and function. *Pigment Cell Melanoma Res.*, 22, 563-579, 2009.
- 12) Van Raamsdonk, C.D., Barsh, G.S., Wakamatsu, K., Ito, S. Independent regulation of hair and skin color by two G protein-coupled pathway. *Pigment Cell Melanoma Res.*, 22, 819-826, 2009.
- 13) Murakami, K., Nakanishi, Y., Wakamatsu, K., Yamamoto, K., Kohriyama, N., Hasegawa, M., Tomita, M., Nabeshita, K., Hiki, Y., Asano, S., Kawashima, S., Ito, Y., Fujita, Y., Asada, H., Nakai, S., Sugiyama, S., Ito, S. Serum levels of 5-S-cysteinyl dopa are correlated with skin colors in hemodialysis patients but not in peritoneal dialysis patients. *Blood Purif.* 28, 209-215, 2009.
- 14) Coelho, S.G., Choi, W., Brenner, M., Miyamura, Y., Yamaguchi, Y., Wolber, R., Smuda, C., Batzer, J., Kolbe, L., Ito, S., Wakamatsu, K., Zmudzka, B.Z., Beer, J.Z., Miller, S.A., Hearing, V.J., Short- and long-term effects of UV radiation on the pigmentation of human skin. *J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.* 14, 32-35, 2009.
- 15) Vanover, J.C., Spry, M.L., Hamilton, L., Wakamatsu, K., Ito, S., D'Orazio, J.A. Stem cell factor rescues tyrosinase expression and pigmentation in discrete anatomic locations in albino mice. *Pigment Cell Melanoma Res.*, 22, 827-838, 2009.
- 16) Lee, E., Tanaka, H., Wakamatsu, K., Sugita, S. Melanin-based iridescent feather color in the Jungle Crow. *J. Vet. Med. Sci.* 71(9), 1261-1263, 2009.
- 17) 神保孝一、高田知明、佐藤牧人、佐藤亜紀子、神谷崇文、小野一郎、山下利春、田村保明、佐藤昇志、宮本篤、若松一雅、伊藤祥輔、井藤彰、本多裕之、村瀬勝俊。メラノーマ形質を分子標的とした化学・温熱・免疫療

- 法の基礎と臨床。Skin Cancer, 24, 174-180, 2009.
- 18) 新保寛、金児孝晃、千原猛、別府秀彦、新里昌功、若松一雅、園田茂。マウス大腸粘膜の細胞増殖能に対するアロエエモジン5週間混餌投与の影響。医学と生物, 153, 218-224, 2009.
- 19) Singaravelan, N., Pavlicek, T., Beharav, A., Wakamatsu, K., Ito, S., Nevo, E. Spiny mice modulate eumelanin to pheomelanin ratio to achieve cryptic coloration in "Evolution Canyon," Israel. Plos One, 5, e8708, 2010.
- 20) Valenzuela, R.K., Henderson, M.S., Walsh, M.H., Garrison, N.A., Kelch, J.T., Cohen-Barak, O., Erickson, D.T., Meaney, J.F., Walsh, J.B., Cheng, K.C., Ito, S., Wakamatsu, K., Frudakis, T., Thomas, M., Brilliant, M.H. Predicting phenotype from genotype: normal pigmentation. J. Forensic Sci, 55, 315-322, 2010.
- 21) Robinson, S., Dixon, S., August, S., Diffey, B., Wakamatsu, K., Ito, S., Friedmann, P.S., Healy, E. Protection against ultraviolet radiation involves MC1R-mediated non-pigmentary and pigmentary mechanisms in vivo. J Invest. Dermatol., 130, 1904-1913, 2010.
- 22) Adachi, K., Wakamatsu, K., Ito, S., Matsubara, H., Nomura, K., Tanaka, H., Kato, K. A close relationship between androgen levels and eumelanogenesis in the teleost red seabream (*Pagrus major*): Quantitative analysis of its seasonal variation and effects of oral treatment with methyl testosterone. Comp. Biochem. Physiol. Part A: Mol. Integr. Physiol., 156, 184-189, 2010.
- 23) Jiang, S., Liu, X-M., Dai, X., Zhou, Q., Lei, T-C., Beermann, F., Wakamatsu, K., Xu, S-Z. Regulation of DHICA-mediated antioxidation by dopachrome tautomerase: implication for skin photoprotection against UVA radiation. Free Rad. Biol. Med., 48, 1144-1151, 2010.
- 24) Hirobe, T., Kiuchi, M., Wakamatsu, K., Ito, S. Estrogen Increases Hair Pigmentation in Female Recessive Yellow Mice. Zoological Sci., 27, 470-476, 2010.
- 25) Okuda, H., Wakamatsu, K., Ito, S. Regioselectivity on the cooxidation of 5,6-dihydroxyindole and its 2-carboxylic derivative from the quantum chemical calculations. Chemical Physics Letters. 2010.
- 26) Kempf, V., Wakamatsu, K., Ito, S., Simon, J.D. Imaging, chemical and spectroscopic studies of the methylation-induced decomposition of melanosome. Photochem Photobiol. 86, 765-771, 2010.
- 27) Endo, M., Beppu, H., Akiyama, H., Wakamatsu, K., Ito, S., Kawamoto, Y., Shimpo, K., Sumiya, T., Koike, T., Matsui, T. Agaritine purified from *Agaricus blazei* Murrill exerts anti-tumor activity against leukemic cells. Biochim Biophys Acta, 1800, 669-673, 2010.
- 28) Kadakara, AL., Leachman, S., Kavanagh, R.J., Swope, V., Cassidy, P., Supp, D., Sartor, M., Schwemberger, S., Babcock, G., Wakamatsu, K., Ito, S., Koshoffer, A., Boissy, RE., M̃anga, P., Sturm, RA., Abdel-Malek, ZA. Melanocortin 1 receptor genotype: an important determinant of the damage response of Melanocytes to ultraviolet radiation. The FASEB J, 24, 3850-3860, 2010.
- 29) 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. Melanoma-targeted

- chemo-thermo-immuno (CTI)-therapy using N-propionyl-4-S-cysteaminylphenol-magnetite nanoparticles elicits CTL response via heat shock protein-peptide complex release. *Cancer Sci.*, 101, 1939-1946 2010.
- 30) Peles, DN., Lin, E., Wakamatsu, K., Ito, S., Simon, JD. Ultraviolet absorption coefficients of melanosomes containing eumelanin as related to the relative content of DHI and DHICA. *J. Phys. Chem. Lett.* 1, 2391-2395, 2010.
- 31) Panzella, L., Wakamatsu, K., Monfrecola, G., Ito, S., Ayala, F., Napolitano, A. Increased cysteinyl-dopa plasma levels hint to melanocyte as stress sensor in psoriasis. *Experimental Dermatology*, 20, 288-290, 2010.
- 32) Ito, S., Wakamatsu, K. Human hair melanins: What we have learned and have not learned from mouse coat color pigmentation. *Pigment Cell & Melanoma Res.* 24, 63-74, 2010.
- 33) Hirobe, T., Ito, S., Wakamatsu, K. The mouse pink-eyed dilution allele of the P-gene greatly inhibits eumelanin, but not pheomelanin synthesis as studied by chemical analysis. *Pigment Cell & Melanoma Res.* 24, 241-246, 2010.
- 34) 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.
- 35) 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.
- 36) 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.
- 37) 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.
- 38) 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.
- 39) 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 with melanocytes. *Arch Dermatol Res.* 303, 263-276, 2011.
- 40) 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.
- 41) 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. *Phytother. Res.* doi: 10.1002/ptr.3552, 2011.
- 42) 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.
- 43) 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.
- 44) 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 *ru2<sup>d</sup>/Hps5<sup>ru2-d</sup>* inhibits melanocyte differentiation and its impaired differentiation is rescued by L-tyrosine. *Zoological Sci.*, 28, 790-801, 2011.
- 45) 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
- 46) 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) Wakamatsu, K. Chemical structure of neuromelanin: an elucidation to the production process. 3rd Asian Society for Pigment Cell Research Meeting. Seoul, Korea, June 12, 2009. [*Pigment Cell & Melanoma Res.*, 22, 352, 2009]
- 2) Ito, S. Chemical and biochemical control of mixed melanogenesis. 3rd Asian Society for Pigment Cell Research Meeting. Seoul, Korea, June 11, 2009. [*Pigment Cell & Melanoma Res.*, 22, 345, 2009]
- 3) Osai, Y. N-propionyl-cysteaminyphenol suppresses re-challenge of mouse B16F1 tumor by inducing tumor-specific immune response. 39th Annual Meeting of the European Society for Dermatological Research. Budapest, Hungary, September 9, 2009.
- 4) Murakami, K., Wakamatsu, K., Nakanishi, Y., Yamamoto, K., Kohriyama, N., Hasegawa, M., Tomita, M., Nabeshima, K., Hiki, N., Asano, S., Kawashima, S., Ito, Y., Fujita, Y., Asada, H., Nakai, S., Sugiyama, S., Ito, S. Serum levels of 5-S-cysteinyl-dopa are correlated to pigmentation in patients undergoing hemodialysis. World Congress of Nephrology 2009. Milano, Italy, May 24, 2009.
- 5) 若松一雅、太田良和美、伊藤祥輔。フェオメラニン生成の後期過程の化学的分析。第22回日本色素細胞学会学術大会、福岡、12月5日、平成21年 [*Pigment Cell & Melanoma Res.*, 22, 910, 2009]
- 6) 奥田秀和、中村厚、若松一雅、伊藤祥輔、宗田孝之。5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid二量体の異性体判別：中赤外吸収スペクトル。第22回日本色素細胞学会学術大会、福岡、12月5日、平成21年 [*Pigment Cell & Melanoma Res.*, 22, 910, 2009]



- 7) 箴井泰江、田村保明、佐藤昇志、若松一雅、伊藤祥輔、井藤彰、本多裕之、黄倉真恵、佐藤亜紀子、山下利春、神保孝一。N-propionyl-4-S-cysteaminyphenolはメラノーマ細胞にアポトーシスを誘導しマウスB16F1腫瘍の増殖を抑制する。第22回日本色素細胞学会学術大会、福岡、12月5日、平成21年 [Pigment Cell & Melanoma Res., 22, 915, 2009]
- 8) Jimbow, K., Thomas, P.D., Osa, Y., Takasa, T., Sato, M., Tamura, Y., Ono, I., Yamashita, T., 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. 第22回日本色素細胞学会学術大会、福岡、12月5日、平成21年 [Pigment Cell & Melanoma Res., 22, 915, 2009]
- 9) 村瀬貴也、伊藤祥輔、若松一雅。ヒト脳内黒質に存在する黒褐色色素ニューロメラニンの生成過程の解明。第23回日本色素細胞学会学術大会、東京、11月28日、平成22年 [Pigment Cell & Melanoma Res., 23, 865, 2010]
- 10) 奥田英和、若松一雅、伊藤祥輔、宗田孝之。量子化学計算からの5,6-dihydroxyindoleとそのカルボキシ誘導体のヘテロ二量体化機構。第23回日本色素細胞学会学術大会、東京、11月27日、平成22年 [Pigment Cell & Melanoma Res., 23, 864, 2010]
- 11) 若林雄希、中島弘明、深澤勝則、若松一雅、芋川玄爾。グルコサミンは3次元ヒト表皮モデルでエンドセリン-1/ステムセルファクター誘導色素沈着をメラノサイトでのCREBシグナルの減少により抑制する。第23回日本色素細胞学会学術大会、東京、11月27日、平成22年 [Pigment Cell & Melanoma Res., 23, 866, 2010]
- 12) 広部知久、吉原千尋、竹内栄、阿部宏之、若松一雅、伊藤祥輔、河陽子、相馬良直、溝口昌子。ルビーアイ2の新規突然変異遺伝子 (ru2d/Hps5d) はマウスのメラノサイトの分化を抑制し毛色を薄くするが、L-チロシンはその分化活性を回復させる。第23回日本色素細胞学会学術大会、東京、11月27日、平成22年 [Pigment Cell & Melanoma Res., 23, 866, 2010]
- 13) 伊藤祥輔。「分かりやすいメラニンの生化学とメラノサイトの生化学」混合型メラニン形成の生化学。第23回日本色素細胞学会学術大会、東京、11月28日、平成22年 [Pigment Cell & Melanoma Res., 23, 862, 2010]
- 14) 菊池かな子、多田弥生、若松一雅、伊藤祥輔。尋常性白斑患者におけるNarrowband UVB治療前後の血清5-S-cysteinyldopa値について。第23回日本色素細胞学会学術大会、東京、11月28日、平成22年 [Pigment Cell & Melanoma Res., 23, 872, 2010]
- 15) K. Wakamatsu, T. Murase, F.A. Zucca, L. Zecca, S. Ito. Chemistry and biophysics of neuromelanin. XXIst International Pigment Cell Conference (IPCC), 20-24 September 2011, Bordeaux, France. [Pigment Cell & Melanoma Res., 24, 764, 2011]
- 16) S. Ito, Y. Nakanishi, K. Wakamatsu. Evaluation of alkaline hydrogen peroxide oxidation to analyze eumelanin and pheomelanin. XXIst International Pigment Cell Conference (IPCC), 20-24 September 2011, Bordeaux, France. [Pigment Cell & Melanoma Res., 24, 783, 2011]
- 17) 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. [Pigment Cell & Melanoma Res., 24, 801, 2011]
- 18) 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. [Pigment Cell & Melanoma Res., 24, 854, 2011]
  - 19) 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-Cysteaminylphenol generates reactive oxygen species and mediates apoptosis in pigmented melanoma cells. XX1st International Pigment Cell Conference (IPCC), 20-24 September 2011, Bordeaux, France. [Pigment Cell & Melanoma Res., 24, 855, 2011]
  - 20) 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. [Pigment Cell & Melanoma Res., 24, 782, 2011]
  - 21) S. Commo, K. Wakamatsu, S. Ito. Human hair pigmentation characteristics revealed by melanin determination in human eumelanin hairs of various ethnic origins. XX1st International Pigment Cell Conference (IPCC), 20-24 September 2011, Bordeaux, France. [Pigment Cell & Melanoma Res., 24, 783, 2011]
  - 22) 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. [Pigment Cell & Melanoma Res., 24, 785, 2011]
  - 23) 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. [Pigment Cell & Melanoma Res., 24, 786, 2011]
  - 24) 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. [Pigment Cell & Melanoma Res., 24, 817, 2011]
  - 25) 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. [Pigment Cell & Melanoma Res., 24, 817, 2011]
  - 26) M. Kono, T. Kondo, S. Ito, T. Suzuki, K. Wakamatsu, S. Ito, Y. Tomita.

Oculocutaneous albinism 1 minimal pigment type; a case report on the analysis of genotype-phenotype correlation. XXIst International Pigment Cell Conference (IPCC), 20-24 September 2011, Bordeaux, France. [Pigment Cell & Melanoma Res., 24, 827, 2011]

- 27) K. Kikuchi, K. Wakamatsu, Y. Tada, S. Ito. Serum 5-S-cysteinyldopa levels in psoriasis and vitiligo patients undergoing narrowband ultraviolet B phototherapy. XXIst International Pigment Cell Conference (IPCC), 20-24 September 2011, Bordeaux, France. [Pigment Cell & Melanoma Res., 24, 836, 2011]

## H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

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（医療機器開発推進研究事業） 総括研究報告書

## 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)-4-S-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。

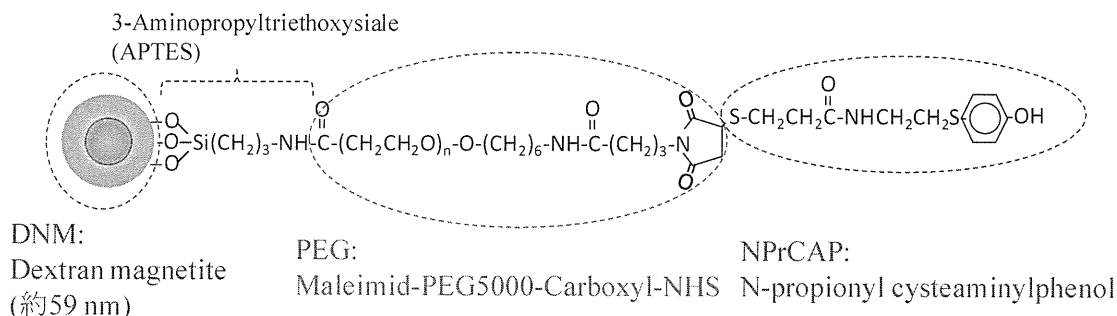


図1. NPrCAP/PEG/DNM

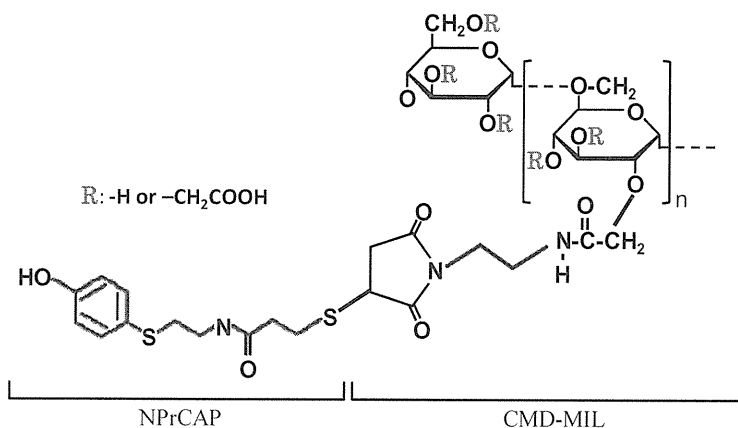


図2. NPCMD

## 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、培養上清中の炎症系サイトカイン (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, TNF  $\alpha$ ) をサイトカインビーズアレイで測定した。さらに、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 $\beta$ , TNF $\alpha$ 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 $\gamma$ 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。

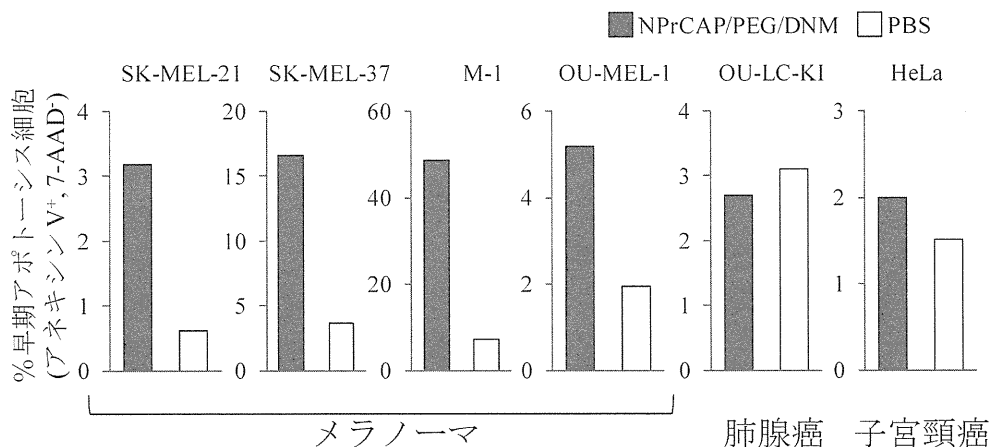


図3. NPrCAP/PEG/DNMによるアポトーシス誘導

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 $\beta$ , 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 (図4)。

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、活性型カスペーゼ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刺激している可能性がある。そこでIL-1 $\beta$ 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。

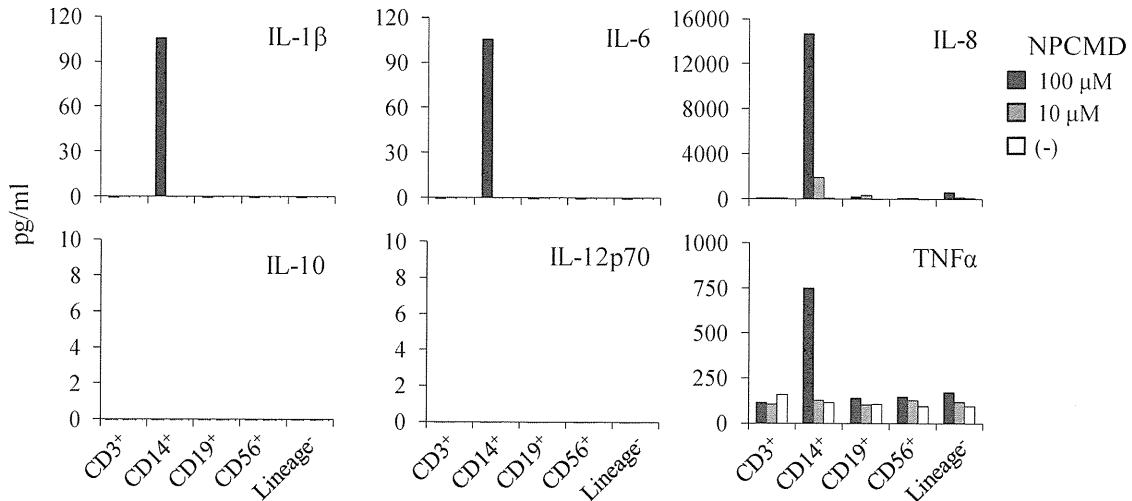


図4. NPCMD処理によるヒトPBMCからのサイトカイン産生

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 $\beta$ 、TNF $\alpha$ 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 $\alpha$ は産生されたが、IL-1 $\beta$ 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 $\beta$ 、TNF $\alpha$ の産生を認めなかった。

しかし、LPS処理により予め細胞内にpro-IL-1 $\beta$ を産生しておくことで、AlumあるいはATP処理によってIL-1 $\beta$ 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 $\beta$ を測定した結果、NPCMDおよびLPSによって、pro-IL-1 $\beta$ 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。

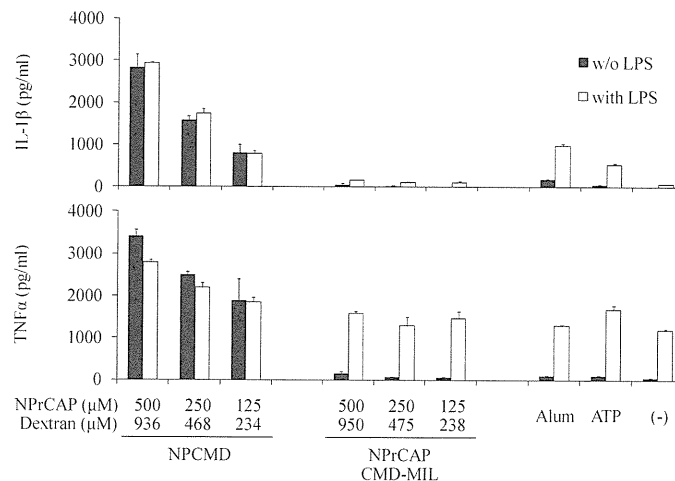


図5. NPCMD処理によるTHP-1細胞からのIL-1 $\beta$ 、TNF $\alpha$ 産生

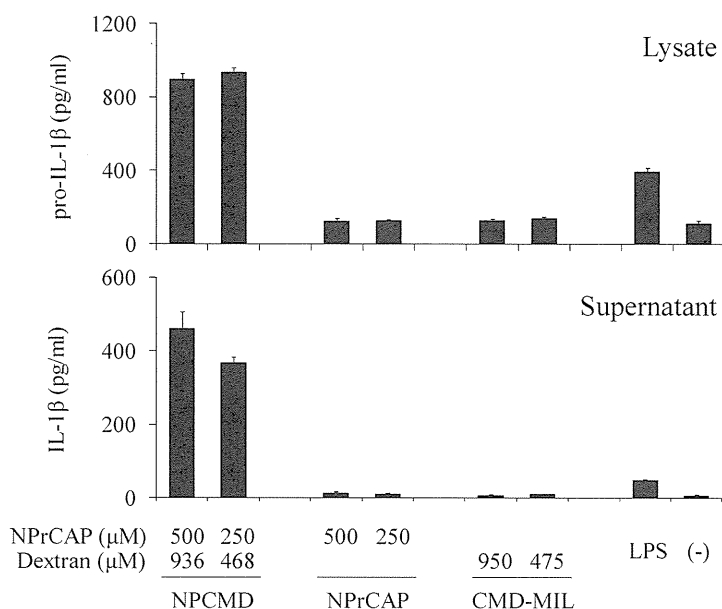


図6. NPCMD処理によるTHP-1細胞内pro-IL-1β産生

### 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する。

一方で、CD8陽性T細胞においては、非特異的なIFNγ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IFNγを産生することが報告されている(Kupz, 2012)。

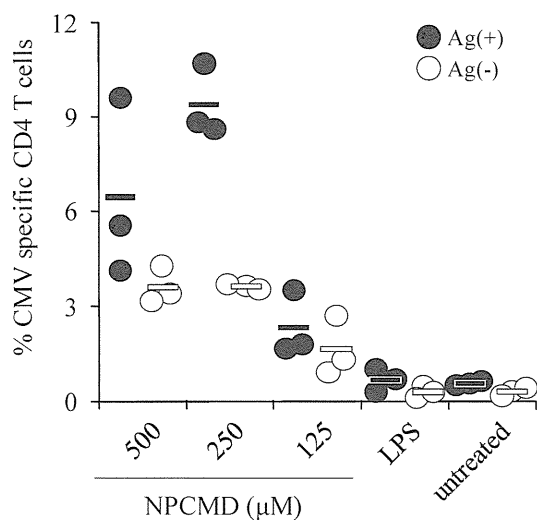


図7. 抗原特異的CD4陽性T細胞応答

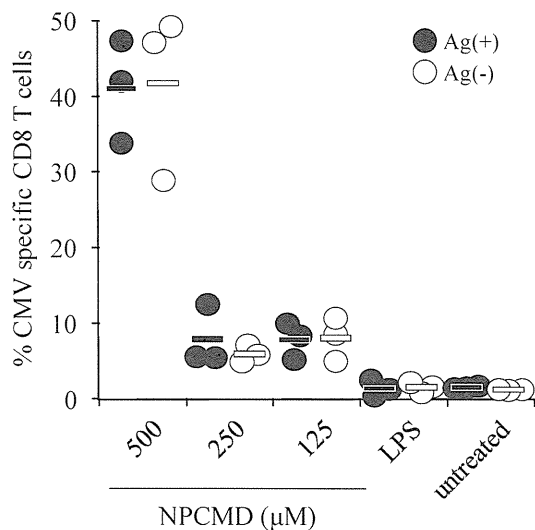


図8. 抗原特異的CD8陽性T細胞応答

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IFNγ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., Gnjatic, 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-1f 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<sup>+</sup> 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 OhueE, 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

# 平成21～23年度厚生労働科学研究費 「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」 （分担）研究報告書

## 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

分担研究者 山下 利春 札幌医科大学皮膚科学講座

### 要旨

本研究では、N-propionyl-4-S-cysteaminylphenol (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およびB16F1マウス移植腫瘍を用いて検討した。細胞障害活性は活性型 NPrCAPに観察されたが、不活性型のN-propionyl-2-S-cysteaminyl phenol (NPr-2-S-CAP) には認められなかった。NPrCAPによる細胞死誘導は、活性酸素 (reactive oxygen species: 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唆された。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の間に相関を認めた。B16F1移植担癌マウスの腫瘍内へのNPrCAP注射により移植腫瘍の明確な縮小が認められた。残存腫瘍を切除後、B16F1細胞を再チャレンジした実験において、2次腫瘍の形成が抑制された。CD8抗体を腹腔内注射したマウスでは、2次腫瘍の増殖抑制が解除されたことより、NPrCAPの腫瘍内注射と温熱効果により、腫瘍特異的なCD8細胞の誘導が示唆された。

### 研究の背景と目的

悪性黒色腫（メラノーマ）はきわめて転移しやすく、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。ランダム化比較試験により、多剤併用化学療法や生物化学療法はダカルバジン単剤に比べ生存期間を延長する効果は示されなかった。しかし、多剤併用化学療法や生物化学療法に反応し5年以上生存する例が知られている。メラノーマの予後決定因子として、宿主の腫瘍特異的細胞免疫応答の有無、制御性T細胞の存在、腫瘍細胞のアポトーシス、MHCクラスI分子の発現などが考えられて

いる。治療反応例における宿主因子と腫瘍因子の検討は、今後のメラノーマの治療効果と個別化治療を考える上できわめて重要である。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（Hodi FS *et al*: New Engl J Med 363: 711、2010; Chapman PB *et al*: New Engl J Med 364: 2507、2011）。VemurafenibはBRAF V600E変異のあるメラノーマのみが適応となり、Ipilimumabは全身炎症反応の副作用が高率にみられる。従って、患者の状態や腫瘍の遺伝子変化に関わらず使用で