

き、かつ、副作用の少ない安全な進行期メラノーマの治療法が求められている。

メラノソームは通常、網膜と脳軟膜を除けば、皮膚及び毛組織にのみ存在する。このため、メラニン合成系を標的とするメラノーマ抑制療法は、全身副作用の少ないメラノーマ特異的な治療となり得る。N-propionyl-4-S-cysteaminylphenol (NPrCAP) は、チロシナーゼの基質としてメラニン合成系に取り込まれ、メラノーマ細胞に細胞障害を示す。これまでNPrCAPをマグネタイトに結合したナノ微粒子 (NPrCAP/M) を合成し、培養細胞および移植腫瘍に対する実験的治療を行い、以下の結果を得ている。ヒトおよびマウスメラノーマ細胞は効率よくNPrCAP/Mを取り込み、NPrCAP/M処理後磁場照射したメラノーマ細胞はネクローシスを起こす (Sato M *et al.*: J Invest Dermatol, 2009)。移植腫瘍を用いたモデル実験では、46°Cよりも43°Cの温熱療法が2次腫瘍の抑制に効果的で、熱ショック蛋白質 (HSP70) の誘導も46°Cよりも高レベルである (Takada T *et al.*: J Biomed Biotechnol, 2009)。

本研究では、まず、当科で診療した進行期メラノーマ患者46名の統計学的解析を行い、NPrCAP-マグネタイトによる局所治療 (Chemo-Thermo-Immunotherapy, CTI療法) の適応となる皮膚・皮下転移の頻度を解析した。NPrCAP-マグネタイトによるCTI療法は、NPrCAPのメラノーマ親和性とメラノーマ特異的細胞傷害性を期待するものである。そこで本研究では、NPrCAPのメラノーマ細胞特異的細胞障害性のメカニズムを詳細に解析するため、NPrCAP処理細胞における活性酸素 (ROS) の発生とアポトーシス誘導性、およびこれらの相関について検討した。さらに、B16F1移植担瘤マウスの腫瘍内NPrCAP局注による局所化学療法の効果と宿主の免疫応答について解析を行った。

研究の方法

1. 進行期メラノーマ患者の解析

札幌医大皮膚科で1995年1月～2009年12月の15年間に病期IV (進行期) メラノーマと診断さ

れた46例における転移臓器、全身状態、皮膚皮下転移のある症例についての後ろ向き研究を行った。

2. NPrCAPによるROSの発生とアポトーシス誘導性の検討

NPrCAPをプロピレングリコールに溶解してストック液を作製した。NPrCAPとNPr-2-S-CAPは、藤田保健衛生大学の若松一雅博士の合成したロットを用いた。NPrCAP、NPr-2-S-CAPを使用時に最終濃度1.0～3.0 mMに調製した。細胞はNH3T3 (mouse fibroblast cell line)、B16F1 (mouse melanoma cell line)、tig118 (human normal fibroblast cells)、正常ヒト表皮メラノサイト、色素性ヒトメラノーマ細胞株70W、SK-mel-23、MM418、M1、MeWo、無色素性ヒトメラノーマ細胞株 SK-mel-24、SK-mel-118、TXM18を用いた。細胞を6 cmディッシュに培養し、NPrCAPあるいはNPr-2-S-CAP添加培地で1時間培養し、24～48時間後の細胞数とROS量を測定した。

細胞数はトリパンブルー法で算定した。アポトーシスの解析はフローサイトメトリー (FACS Calibur flowcytometer, Becton Dickinson) を用いた。細胞内ROSとカスパーゼ3は蛍光染色により検出した。NPrCAP添加培地で培養した細胞を、CM-H₂DCFDA (Invitrogen) で処理し、パラホルムアルデヒド固定後、Rab pAb to Active Caspase 3 (Abcam, Cambridge) を2時間反応させ、2次抗体 (Labeled Goat Anti-Rabbit IgG Antibodies) を加え12時間静置した。洗浄後Hoechst 33342 solutionを添加し15分反応させた後共焦点レーザー走査顕微鏡で観察した。

3. 動物実験

動物実験は札幌医科大学動物実験指針に則って行った。C57BL/6J Jclマウス (4週齢、雌) をホクドー (株) (札幌) より購入し、札幌医科大学動物実験施設部で標準的な飼料と水分により飼育した。抗腫瘍効果の検討は、 3×10^5 のB16F1細胞をマウスの右背部皮下に移植し、移植後8日

目より NPrCAP 100 μ l (24.4 μ mol) を 3 回隔日 (group I)、5 回隔日 (group II)、または 5 回連日 (group III) で腫瘍内に注射し、2 日ごとに腫瘍径を測定した。コントロール群にはプロピレングリコールを 5 日間連続腫瘍内注射した。22 日目に残存腫瘍を摘出し、36 日目に反対側に 1.5×10^5 の B16F1 細胞を移植した。B16F1 のコントロール群として RMA マウスリンフォーマ細胞を用いた。

5 回連続治療群の一部のマウスに、再移植前後 7 日目 (29 日目と 43 日目) に、抗 CD4 抗体 (Anti-mouse CD4, eBioscience, San Diego, CA)、抗 CD8 抗体 (Anti-mouse CD8 α , eBioscience)、ラット IgG (Rat IgG1 negative control, AbD Serotec, Kidlington, UK) をそれぞれ 0.2 mg 腹腔内投与し、腫瘍の経時的変化を測定した。

研究の結果および考察

1. 進行期メラノーマ患者の解析

当科で 1995 年 1 月～2009 年 12 月の 15 年間に病期 IV と診断された進行期メラノーマ 46 例の内訳は、男性 23 名、女性 23 名で、病型は末端黒子型 15 例、結節型 6 例、表在拡大型 2 例、悪性黒子型 2 例、脈絡膜 5 例、外陰部・膣 3 例、直腸・肛門 3 例、原発不明 3 例、鼻腔 1 例、その他 6 例であった。遠隔転移出現まで 0～11 年 7 ヶ月 (中央値 13 ヶ月)、遠隔転移出現から死亡まで 2 ヶ月～4 年 6 ヶ月 (中央値 12 ヶ月) であった。経過中に最初に診断された転移臓器は肺と肝が多く、肺 18 例 > 肝 8 例 > 皮膚、リンパ節各 4 例 > 骨 2 例であった。経過中に皮膚・皮下転移がみられたのは 8 例 (21.7%) で、NPrCAP-マグネタイトによる局所 CTI 療法の適応となる直径 1 cm 以上 (体積 > 1.0 ml) の皮膚転移がみられたのは 7 例 (15.2%) であった。さらに、皮膚・皮下転移出現時に全身状態がよく (performans status, PS: 0 か 1)、肝・腎機能に問題なく、CTI 治療が可能と思われる患者は 7 例中 5 例 (46 例の 10.9%) であった。皮膚・皮下転移は全身転移に伴って出現する 경우가多く、皮膚転移のみの症例は原発不明メラノーマ

の 1 例のみであった。以上より、進行期メラノーマに CTI 療法を適応する場合、経静脈的に肺や肝にターゲティングする新しい剤型 (次世代型 NPrCAP-マグネタイト) が求められる。

2. NPrCAP による ROS の発生とアポトーシス誘導活性の検討

NPrCAP はヒトメラノーマ細胞に細胞死を誘導し、マウス毛包メラノサイトにアポトーシスを誘導する。NPrCAP による殺細胞効果の分子機構について培養細胞を用いて検討した。NPrCAP 1.0～3.0 mM あるいはプロピレングリコール (陰性コントロール) 添加培地で 1 時間培養し、24 時間後の生細胞数を計測した。NPrCAP 処理群の B16F1 マウスメラノーマ細胞の生細胞数は、コントロールに比べ 51.6% (NPrCAP 1 mM) ～55.0% (NPrCAP 3 mM) に低下した。不活性型の NPr-2-S-CAP は B16F1 細胞に細胞傷害活性を示さず、マウス線維芽細胞 NIH3T3 は、NPrCAP 添加による細胞傷害を認めなかった。フローサイトメトリ解析により、NPrCAP 添加培地で培養した B16F1 細胞はアポトーシス誘導能をもつ TRAIL (TNF Related Apoptosis Inducing Ligand) 処理と同レベルの sub-G1 分画の増加を示した。一方、NIH3T3 細胞の sub-G1 分画に変化はみられなかった。以上より、NPrCAP はマウスメラノーマ細胞に特異的に作用しアポトーシスを誘導することが示唆された。

NPrCAP に伴う細胞内 ROS の増加とカスパーゼ 3 の活性化の有無を蛍光顕微鏡により検討した。NPrCAP を添加した B16F1 細胞では、約半数の核に濃縮と凹凸分岐を認め、細胞内 ROS の増加およびカスパーゼ 3 の活性化を認めた。一方、溶媒 (ポリプレングリコール) 添加 B16F1 細胞、NPrCAP あるいは溶媒添加 NIH3T3 細胞ではアポトーシス細胞は観察されず、また、活性酸素の増加および活性化カスパーゼ 3 も検出されなかった (Ishii-Osai Y *et al*: manuscript in preparation) .メラノーマ細胞のメラニン合成活性と NPrCAP による ROS 発生、アポトーシス誘導の関係につ

いてさらに検討を行った。NPrCAPはメラニン合成のみられるマウスB16F1、ヒト70W、ヒトM1細胞の増殖を抑制し大量のROSを産生したが、正常ヒト表皮メラノサイト、無色素性メラノーマ細胞SK-mel-24、TXM18の増殖抑制効果は著明ではなくROS産生はほとんど認められなかった。すなわち、メラニン合成活性、NPrCAPによるROS産生、NPrCAPによるアポトーシス誘導は相関性を示した(図1、図2、図3)。

以上より、NPrCAPは、メラニン合成の活発なメラノーマ細胞に選択的にアポトーシスを誘導し、アポトーシス過程にROSが関与することが示唆された。しかし、将来的なメラノーマ転移巣へのターゲッティング・CTI療法を考えた場合、血液細胞、血管内皮細胞、免疫担当細胞に対する細胞障害性の有無と程度をさらに検討する必要がある。

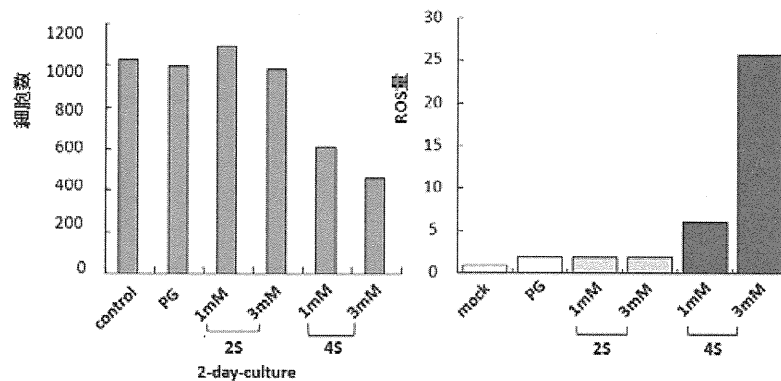


図1. NPrCAPの細胞増殖とROS産生に対するNPrCAPの効果(B16F1細胞)

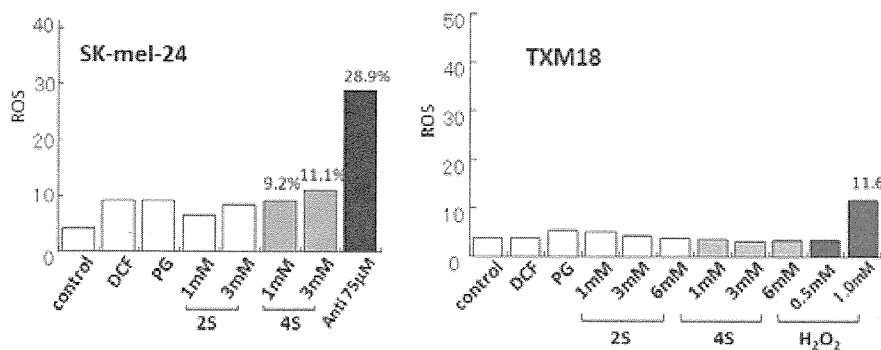


図2. 無色素性メラノーマ細胞におけるROS産生

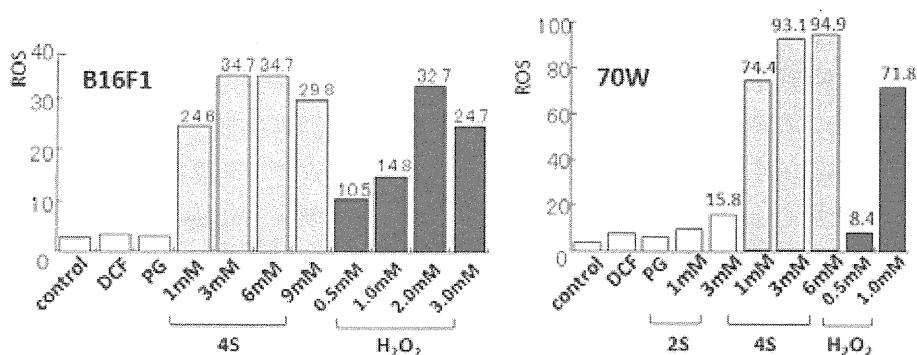


図3. 色素性メラノーマ細胞におけるROS産生

細胞の酸化ストレス防御機構として、Keap1-Nrf2 システムが注目されている。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 (Jian Z *et al*: J Invest Dermatol 131: 1420, 2011)。そこで、NPrCAPによるROS産生に対応して、Nrf-ARE/HO-1経路の活性化の有無と程度を検討した。NPrCAPによるROS産生とアポトーシス誘導の明確な70WとM1細胞にNPrCAPを添加し、細胞抽出とRNAを調整し、ウェスタンブロット法とreal-time PCR法によりNrfとHO-1遺伝子の発現を検討した。その結果、転写誘導、蛋白質レベルのいずれにおいても、NPrCAP処理後に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誘導されずアポトーシス誘導が促進される可能性が示唆された。

3. 抗腫瘍効果の検討

B16F1移植腫瘍にNPrCAPを注射した治療群では、いずれの群においても腫瘍の縮小を認めた。グループII (5回隔日投与) とグループIII (5回連日投与) は、コントロール群と比較して統計学的に優位な腫瘍縮小効果を認めた。NPrCAPの腫瘍内投与はマウスリンフォーマRMAの腫瘍増殖に影響を与えなかった。残存腫瘍切除後にB16F1細胞を再移植した結果、いずれの群においても腫瘍の増殖が抑制されたが、特にグループII、IIIでは、無処理マウスにB16F1を移植したコントロール群と比較し、2次腫瘍抑制効果に統計学的有意差を認めた (Ishii-Osai Y *et al*: manuscript in preparation)。2次腫瘍を移植したマウスの全生存率を検討した結果、NPrCAP投与群における生存率はグループI、II、IIIのいずれの群においてもNPrCAP非投与群に比べ有意に高かつ

た。NPrCAPを連日5回腫瘍内投与したグループIIIマウス6匹のうち2匹に、実験開始6週間後より全身に白斑が多数出現した。2次腫瘍の拒絶および全身性白斑の出現より、メラノーマ細胞とメラノサイトのメラニン合成系に対する全身性免疫が誘導されたことが示唆される。移植腫瘍の拒絶に細胞障害性T細胞が関与することを示すため、CD4、CD8各サブセットに特異的な抗体をマウス原腔内に投与し、2次腫瘍への効果を検討した。コントロールのラットIgG投与群と抗CD4抗体投与群では、B16F1腫瘍は増殖抑制されたのに対し、抗CD8抗体投与群では明らかな腫瘍の増大を認めた (Ishii-Osai Y *et al*: manuscript in preparation)。この結果より、腫瘍拒絶の宿主免疫にはCD8⁺ T細胞が関与していることが示唆された。

以上の結果は、NPrCAP自身にメラノーマ細胞に対するアポトーシス誘導作用があることに加えて、宿主に腫瘍特異的な細胞傷害性T細胞を含む免疫応答を誘導する活性をもつことを示唆しており、進行期メラノーマに対するアジュバント療法に応用できる可能性が示された。

研究業績

1. Toyota M, Suzuki H, Yamashita T, Hirata K, Imai K, Tokino T, Shinomura Y: Cancer epigenomics: implications of DNA methylation in personalized cancer therapy. *Cancer Sci* 100: 787-791, 2009.
2. 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: 210-212, 2009.
3. Yamashita T, Yoneta A, Hida T: Macrophage inhibitory cytokine-1: a new player in melanoma development. *J Invest Dermatol* 129: 262-264, 2009.

4. 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: 2233-2241, 2009.
5. Toyota M, Suzuki H, Nishizaka T, Sato A, Yamashita T: Molecular mechanisms involved in epigenetic alterations in cancer. *Gan To Kagaku Ryoho* 37: 1650-3, 2010 [Article in Japanese].
7. 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-immuno therapy. *J Biomed Biotechnol*. 2009 doi:10.1155/2009/457936.
8. 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: 1939-46, 2010.
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* 30: 349-57, 2010.
10. Hida T, Yoneta T, Nishizaka T, Ohmura T, Suzuki Y, Kameshima H, Yamashita T: Pigmented mammary Paget's disease mimicking melanoma: report of three cases. *Eur J Dermatol* 2011 Nov 7 [Epub ahead print]
11. Yoneta A, Horimoto K, Nakahashi K, Mori S, Maeda K, Yamashita T: A case of cystic basal cell carcinoma which shows a homogenous blue/black area under dermatoscopy. *J Skin Cancer*, 2011; 2011: 450472. Epub2010 Sep23.
12. Uhara H, Yamazaki N, Takata M, Inoue Y, Sakakibara A, Nakamura Y, Suehiro K, Yamamoto A, Kamo R, Mochida K, Yamashita T, Takenouchi T, Takenaka H, Yoshikawa S, Takahashi A, Uehara J, Kawai M, Iwata H, Kadono T, Kai Y, Watanabe S, Murata S, Ikeda T, Fukamizu H, Tanaka T, Hatta N, Saida T: Applicability of radiocolloids, blue dye and fluorescent indocyanine green to sentinel node biopsy in melanoma. *J Dermatol* 2011 May09.
13. Hida T, Sohma H, Kokai Y, Kawakami A, Hirotsuki K, Okura M, Tosa N, Yamashita T, Jimbow K. Rab7 is a critical mediator in vesicular transport of tyrosinase-related protein 1 in melanocytes. *J Dermatol* 2011; 38: 432-441.
14. Jimbow K, Yoneta A, Tamura Y, Osai Y, Sato M, Sato A, Kamiya T, Kato J, Takada A, Yamashita T, Miyamoto A, Ito A, Honda H, Wakamatsu K, Ito S, Murase K, Nohara S, Nakayama E, Kobayashi T: Introduction of melanoma in situ peptide vaccine by chemothermoimmunotherapy through exploitation of melanogenesis substrate, NPrCAP, and its conjugation with magnetite nanoparticles. *Pigment Cell*

- Melanoma Res 24: 801, 2011.
15. Okura M, Hagiwara K, Hida T, Yoneta A, Yanagisawa K, Horio Y, Yamashita T: Effects of a low-molecular-weight polyphenol(oligonol) on the growth and melanogenesis of primary melanocytes and melanoma cells. Pigment Cell Melanoma Res 24: 845, 2011.
 16. Yoneta A, Tamura Y, Nohara S, Ito A, Honda H, Wakamatsu K, Ito S, Yamashita T, Jimbow K: Development and evaluation of antitumor effect of novel NPrCAP-magnetite nanoparticles for chemothermo-immunotherapy in malignant melanoma. Pigment Cell Melanoma Res 24: 854, 2011.
 17. Ishii-Osai Y, Yamashita T, Okura M, Tamura Y, Sato N, Ito A, Honda H, Wakamatsu K, Ito S, Jimbow K: N-Propionyl-4-S-Cysteminyphenol generates reactive oxygen species and mediates apoptosis in pigmented melanoma cells. Pigment Cell Melanoma Res 24: 855, 2011.
 18. Utsu M, Hida T, Takahasgi H, Yamashita T: Etanercept-induced lichen planus-like eruptions following the lines of Blaschko. Eurp J Dermatol 2012 (in press).

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療法で誘導されるTILのTCR解析

井藤 彰 九州大学工学研究院・准教授

要旨

CTI (Chemo-Thermo-Immuno-) 療法で誘導される免疫機構の解析を行うために、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。B16F1担癌マウスにCTI療法を行うことで、腫瘍の退縮および腫瘍浸潤リンパ球が観察された。さらに、CTI療法後に所属リンパ節の有意な増大が認められ、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を行ったところ、腫瘍内にオリゴクローナルなTCRを発現するT細胞が観察された。この中で、TCR $V\beta 11$ を発現するT細胞が主に検出され、CTI療法後に細胞数が増加していた。また、各種抗原で再刺激した際のインターフェロングamma放出量の検討を行ったところ、TRP-2ペプチドが抗原となりえることが示された。これらの結果は、CTI療法における免疫のブースト方法に重要な知見を与えると考えられる。

A. 研究目的

CTI療法において誘導される腫瘍免疫においては、磁性ナノ粒子の発熱に伴う温熱療法とNPrCAPによるメラノジェネシス標的型化学療法の併用により誘導される細胞死に伴うHeat Shock Protein (HSP)70-抗原ペプチド複合体の放出が重要な役割を担うことが今までの研究でわかっている。本研究では、このCTI療法で誘導される免疫機構の解析をさらに進めるために、CTI療法で活性化される細胞障害性T細胞 (cytotoxic T lymphocyte, CTL) の解析として、特に腫瘍浸潤リンパ球 (tumor-infiltrating lymphocyte, TIL) の解析を行う。CTI療法後におけるTILの質的および量的変化が確認できれば、CTI療法の臨床的なインパクトはさらに高まると考えられる。また、CTI療法で誘導されるメラノーマ特異的CTLのTCR遺伝子をクローニングすることができれば、

将来的に患者の末梢血由来のT細胞へのTCR遺伝子導入による遺伝子治療への展開が可能となり、CTI療法の免疫賦活効果を効果的に増幅する併用療法になりえる。

本研究は、B16メラノーマ担癌マウスを用いた実験系で、CTI療法後のTILの量的および質的解析を行った。

B. 研究方法

この研究における動物実験は、九州大学工学研究院動物実験委員会の承認を受けて行った（承認番号A20-038-2「がん温熱療法における腫瘍免疫機構の解析と新しい治療法の開発」およびA21-180とA22-180-0「磁性ナノ粒子を用いたがん温熱免疫療法の開発」）。

NPrCAP結合型マグネタイト (NPrCAP/M) を用いたCTI療法

マウスメラノーマ細胞株B16F1細胞 (5×10^5) をC57/BL6マウスのフットパッドに皮下移植し、3日後 (day 3) にNPrCAP/M (40 mg/ml, 0.05 ml) を腫瘍内に注入し、高周波磁場発生装置 (第一高周波鋼業社製) を用いて交流磁場照射 (120

kHz, 386 Oe) を行った。磁場照射時間は1日1回、30分間行った。磁場照射中の腫瘍表面温度と直腸温度は光ファイバー温度計を用いて測定し、出力を調整することで43°Cに合わせた。この一連の操作を1日置きに3回行った (図1)。治療後、day 17に腫瘍を切除して、腫瘍の重量測定を行った。

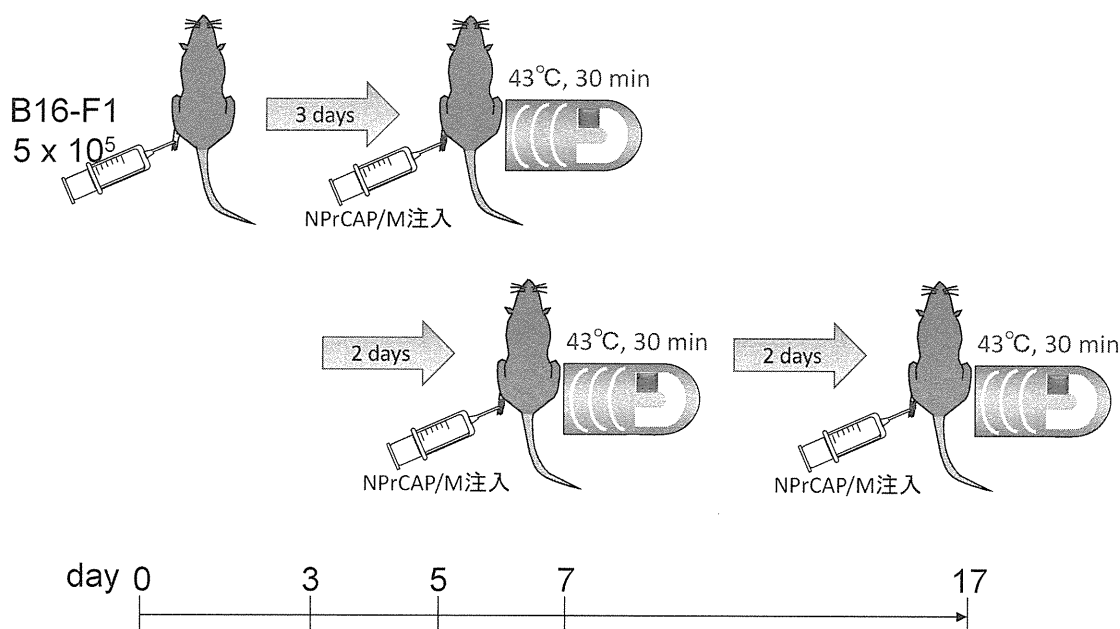


図1 治療実験スキーム

所属リンパ節からのリンパ球の単離

マウスに麻酔を施した後、染色するリンパ節がある側の足の裏に1% Evans Blue (Sigma) を25 μ l 皮下注射し、15分間静置することでリンパ節を青色に染色した。ハサミとピンセットを用いて青色を呈している鼠径部のリンパ節を切除した。切除したリンパ節はPBSの上で血液を十分に洗い落とし、付着した脂肪を丁寧に切り除いた。切除したリンパ節を5 ml のMACS buffer (Miltenyi Biotec) に懸濁、gentleMACS Dissociator (Miltenyi Biotec) を用いて分散し、細胞懸濁液を作製した。細胞懸濁液を遠心チューブに移し、4°C, 300 \times g, 10分間の条件で遠心分離することでリンパ球を得た。

TCR V β ファミリーレパトワ解析

抽出したリンパ節から、RNA抽出キット (タカラバイオ) を使用してRNAを抽出した。抽出したRNAに対してSuperTCRExpress Mouse T Cell Receptor V β Repertoire Clonality Detecting Kit (BioMed Immunotech) を用いて、TCR V β ファミリーレパトワ解析を行った。操作はキットのプロトコールに従って行った。逆転写反応は94°Cで3分間反応させた後、94°Cで30秒、55°Cで30秒、72°Cで45秒を1サイクルとし、35サイクル繰り返し、その後72°Cで5分間処理した。2段階目のPCRのために、Taq DNA polymeraseを用いて、95°Cで3分間反応させた後、95°Cで30秒、58°Cで30秒、72°Cで30秒を

1 サイクルとし、30サイクル繰り返し、その後72°Cで5分間処理した。電気泳動に用いるゲルは SuperTCRExpress Mouse T Cell Receptor V β Repertoire Clonality Detecting Kit を使用して作製した。4%アガロースゲルにエチジウムブロマイドを最終濃度が0.5 μ g/mlになるように入れ、均一になるように攪拌した。ゲル型に流しこみ、20分間室温で静置することで固化させた。ゲルの左端のウェルには10 bpのDNAスタンダードをマーカーとして入れた。各ウェルにサンプルを入れ、150Vで1.5時間電気泳動を行い、TCR V β のバンドパターンを調べた。電気泳動は、サブマリンアガロースゲル電気泳動装置（マリソル）を用いて行った。さらに、電気泳動後のDNAのバンドを精製し、TAクローニングキット（pGEM-T and pGEM-T Easy Vector Systems, Promega）を用いて、TCR V β のCDR3領域をクローニングした。クローニングしたDNA配列は、シーケンス解析を行うことで、CTI療法で誘導されるTILのTCR V β のCDR3領域を同定した。

IFN- γ 分泌細胞解析

CTI療法後のリンパ節細胞がB16細胞あるいはメラノーマ抗原ペプチドに対して反応するかどうかを調べるため、B16細胞を以下のように調製した。また、メラノーマ抗原ペプチドとして、TRP-1 (222-229), TRP-2 (180-188) および gp100 (25-33)、および、コントロールペプチドとしてOVA (257-264)も使用した。90%コンフルエントまで増殖したB16F1細胞を、最終濃度が10 μ g/mlになるようにマイトマイシンCを添加したDMEM培地で3時間培養した。培地を除いた後、PBSで十分に洗い、最終濃度が100 units/mlになるようにIFN- γ を添加したDMEMで48時間培養することで、B16F1細胞のMHCクラスIの発現を誘導した。その後、リンパ節から採取した細胞を5 $\times 10^5 \sim 2 \times 10^6$ cells/mlになるように調製し、RPMI培地で5日間培養し、B16F1細胞を抗原とする再刺激を行った。ペプチドの実験は同様に、それぞれのペプチドでリンパ節細胞を5日間刺激

した。5日後に培地を回収して、リンパ節細胞が分泌したIFN- γ 量ELISAキット（Thermo）を用いて定量した。

C. 研究結果と考察

メラノーマ担癌マウスにNPrCAP/Mを注入後、磁場照射を行うことで、フットパッド腫瘍表面温度が上昇し、2分後に43°Cに到達した(図2)。この温度は我々の今までの検討で、CTI療法の免疫を最も賦活する加温温度であることが分かっている。一方で、直腸温度は上昇しなかったことから、NPrCAP/Mを用いたCTI療法は腫瘍特異的加温が可能であると考えられる。

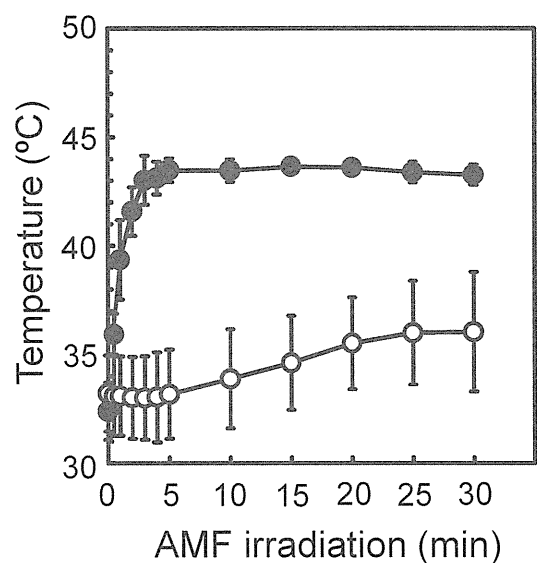


図2 磁場照射による加温。●腫瘍、○直腸

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(図3)。以上のことから、CTI療法の治療効果について実証された。

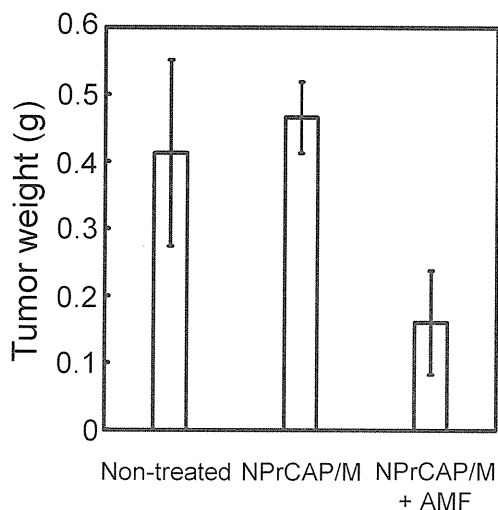


図3 治療後の腫瘍サイズ

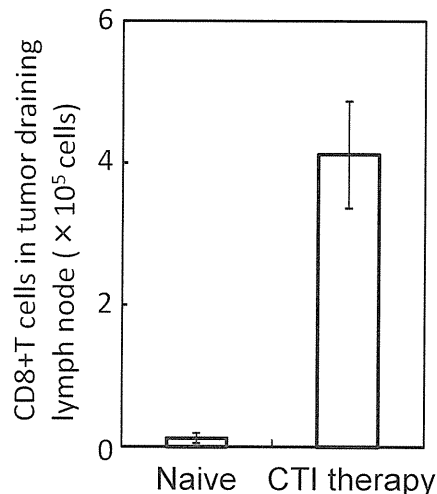


図5 治療後のCD8+T細胞数

治療開始から14日後において、右足に移植した腫瘍の所属リンパ節である右半身鼠径部リンパ節が、左半身の鼠径部リンパ節と比較して肥大していることを確認した。このリンパ節のサイズを測定し、さらに無治療担癌マウスおよびナイーブマウスと比較したところ、CTI療法を施したマウスでリンパ節が肥大化していることが分かった (図4)。

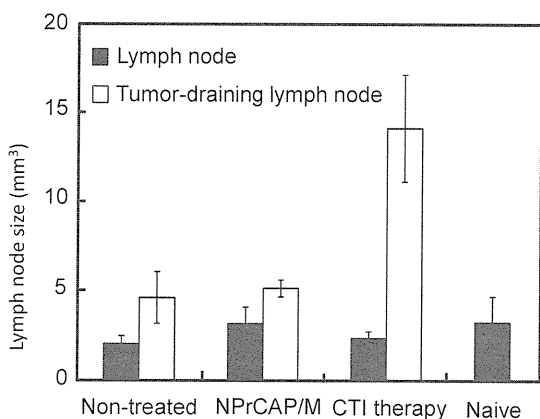


図4 治療後のリンパ節のサイズ

また、この所属リンパ節を破碎し、細胞懸濁液を作製、CD8陽性T細胞の数を治療マウスと無治療マウスで比較したところ、治療を行ったマウスでCD8陽性T細胞数が増大していることが分かった (図5)。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る。

さらに、CD8陽性T細胞の質的な変化を調べるために、腫瘍に浸潤したT細胞と所属リンパ節のTCR V β ファミリーのレパトワ解析を行った。ナイーブマウスのリンパ節においては、V β 20を除くほぼ全てのTCR V β ファミリーをもつCD8陽性T細胞が存在していることが分かった。一方で、CTI療法を施した腫瘍の所属リンパ節では、TCR V β ファミリーのレパトワが15種類のレパトワに限定された。さらに、CTI療法を施した腫瘍に浸潤してきたCD8陽性T細胞のTCRはさらに限定され、V β 5, 8.3, 11の三種類に限定されたことから、CTI後のTILはオリゴクローナルに増幅されていることが分かった。その中でも、複数回の実験でV β 11の発現が確認されたことから、TCR V β 11を発現するCD8陽性T細胞がCTI療法により活性化され、腫瘍を攻撃するために浸潤している細胞の一つではないかと考えられる。

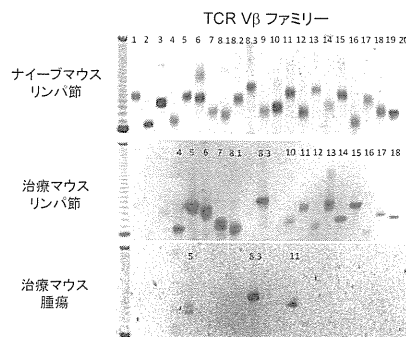


図6 TCRレパトワ解析

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

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

表1 CDR3のシーケンス解析

次に、CTI療法後のTILにおける抗原特異性を調べるために、メラノーマ抗原特異的ペプチドやB16F1細胞を用いて、特異的なIFN- γ 産生能を調べた。腫瘍に浸潤したT細胞では解析に必要な細胞数を得ることが難しいため、同様の性質を持つT細胞が存在していると考えられる所属リンパ節から細胞を取得して実験を行った。

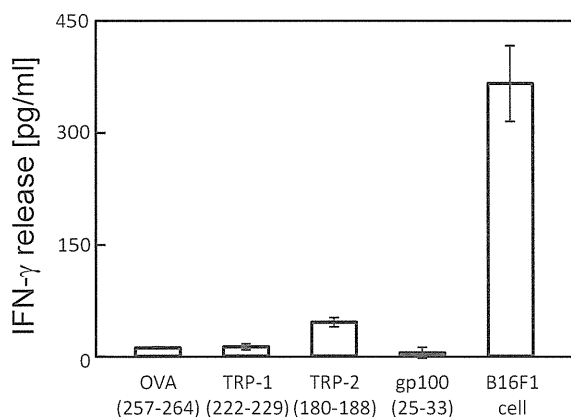


図7 IFN- γ 放出量の定量による抗原の解析

図7に結果を示す。治療開始から14日後のマウスからリンパ節を切除し、各ペプチドあるいはIFN- γ 処理することでMHC-Iを発現させたB16F1細胞で刺激することで、抗原による再刺激を与えたところ、コントロールのOVA (257-264)と比較して、TRP-2 (180-188)で刺激した場合に有意にIFN- γ が放出された。一方、B16F1細胞

自体を用いた場合には、TRP-2 (180-188)で刺激した場合よりもはるかに高いIFN- γ 放出量が検出された。これらのことから、CTI療法で誘導されたTILはTRP-2に反応することが示された。これまでに、B16細胞に対する免疫療法で得られたCTLクローンがV β 11を発現しているといった報告がある。我々の検討においても、CTI療法後にV β 11が多く検出され(表1)、さらにTRP-2に反応する(図7)ことで一致した傾向がみられた。一方で、B16F1細胞で再刺激すると、はるかに高い活性がみられたことから、他の抗原が存在する可能性が示された。

以上の結果から、CTI療法によって、所属リンパ節が肥大すること、腫瘍内においてTILはオリゴクローナルに増幅され、特にTCR V β 11を発現する細胞がB16F1細胞特異的に重要であることが示唆された。また、TRP-2ペプチドの投与が、CTI療法の効果をブーストするアジュバント療法になりえることが分かった。

D. 健康危険情報

E. 研究発表

1. 論文発表

1. Tomoaki Takada, Toshiharu Yamashita, Makito Sato, Akiko Sato, Ichiro Ono, Yasuaki Tamura, Noriyuki Sato, Atsushi Miyamoto, Akira Ito, Hiroyuki Honda, Kazumasa Wakamatsu, Shosuke Ito and Kowichi Jimbow: 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. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, (2009) 2009:457936.

2. Makito Sato, Toshiharu Yamashita, Masae

Ohkura, Akiko Sato, Tomoaki Takada, Hidenobu Matsusaka, Ichiro Ono, Yasuaki Tamura, Noriyuki Sato, Yasushi Sasaki, Takashi Tokino, Akira Ito, Hiroyuki Honda, Kazumasa Wakamatsu, Shosuke Ito and Kowichi Jimbow, N-Propionyl-Cysteaminylphenol-Magnetite conjugate (NPrCAP/M) Is a Novel Nanoparticle for the Targeted Growth Suppression of Melanoma Cells. *Journal of Investigative Dermatology*(2009)129(9), pp.2233-2241

3. Akiko Sato, Yasuaki Tamura, Noriyuki Sato, Toshiharu Yamashita, Tomoaki Takada, Makito Sato, Yasue Osai, Masae Ohkura, Ichiro Ono, Akira Ito, Hiroyuki Honda, Kazumasa Wakamatsu, Shosuke Ito and Kowichi Jimbow, 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 Science* 101(9):1939-1946 (2010)

2. 学会発表

1. Akira Ito, Hyperthermia using functional magnetite nanoparticles. *BioEM2009*, (Davos, Switzerland), June 14-19, 2009.

2. Akira Ito, Hyperthermia using magnetite nanoparticles. *The 2nd Pusan National Univ. - Global COE Kyushu Univ. Joint Symposium on Molecular Science and Technology*, (Busan, Korea), December 10-12, 2009.

3. 井藤 彰、磁性ナノ粒子を用いた癌治療技術、日本磁気学会第176回研究会 第37回ナノバイオ磁気工学専門研究会、2011年1月21日
4. 井藤 彰、磁性ナノ粒子を用いた磁場誘導加温型がん温熱療法の開発、平成22年度日本伝熱学会九州支部講演会、2011年3月4日
5. 井藤 彰、機能性磁性ナノ粒子の開発と医療への応用、第4回ナノバイオ若手ネットワークシンポジウム、2011年6月4日
6. 井藤 彰、磁性ナノ粒子を用いた医療技術の開発、北九州化学工学懇話会、2011年12月13日

F. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

厚生労働科学研究補助金（医療機器開発推進研究事業） 分担研究報告書

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

分担研究者 田村保明 札幌医科大学病理学第1講座 講師

研究の要旨

我々はメラノーマ細胞に選択的にとりこまれ細胞内発熱効果をもつNPrCAP/Mを用いて選択的にメラノーマ細胞を温熱するChemo-Thermo-Immuno (CTI) Therapyの基礎的・臨床的検討を行っている。本治療法では、NPrCAPによる化学療法効果およびマグネタイトによる温熱療法効果により、抗メラノーマ腫瘍免疫応答も誘導されていることを報告してきた。すなわちNPrCAP/Mを用いたメラノーマ温熱がHSPのup-regulationを介して腫瘍免疫を誘導することが示唆された。さらに重要なことは、腫瘍由来のHSPには腫瘍抗原ペプチドが結合しており、このHSP-ペプチド複合体が樹状細胞などの抗原提示細胞によりクロスプレゼンテーションされ、特異的なT細胞応答を誘導することを明らかにした。このCTI療法により誘導された抗腫瘍免疫応答を維持・増強することはメラノーマの根治を目指す上で最重要課題である。NPrCAPは、メラノサイトおよびメラノーマ細胞に選択的に取り込まれ、酸化ストレスを誘導することによりアポトーシス細胞死を誘導する。本研究では、マグネタイトが付加されていないNPrCAP単独投与による抗腫瘍効果と免疫誘導効果について検討を行った。あらかじめNPrCAPをマウスに腹腔内投与しておくこと、正常メラノサイト細胞死を介する抗メラノーマ免疫応答が誘導され、後のマウスメラノーマ接種に対して、強い抗腫瘍効果を認めた。またメラノーマ腫瘍内にNPrCAPを投与すると、腫瘍の増殖抑制効果に加え、抗メラノーマ免疫応答をも誘導することを示した。さらにNPrCAPと樹状細胞を併用すると、さらに強い抗腫瘍効果を認めた。この免疫応答は、樹状細胞が細胞死をおこしたメラノーマ腫瘍を取り込み、腫瘍抗原をクロスプレゼンテーションすることで、細胞障害性T細胞を誘導することによることを示した。このようにNPrCAPを腫瘍内に投与することで、局所の抗腫瘍効果に加え、全身的抗メラノーマ免疫応答を誘導できることから、CTI療法の免疫維持・強化療法としてNPrCAP腫瘍内投与の有効性が示された。さらにCTI療法では、温熱により発現誘導されたHsp72がメラノーマ腫瘍抗原を結合していることを明らかにしていることから、代表的なメラノーマ抗原からHsp72に結合親和性の高い抗原ペプチドを探索し、CTI療法後の特異的ブーストワクチンの開発を行う。

A. 研究目的

現在のCTI療法によって誘導された抗メラノーマ腫瘍免疫応答を、長期間維持するために、何らかの方法で免疫を再度ブーストする必要がある。

このようなメラノーマに対する新たな免疫ブースト治療として、皮下移植マウスメラノーマ腫瘍に対する、磁性ナノ粒子を含まないNPrCAPの局所および全身性投与による抗腫瘍効果を検討する。またNPrCAPはメラノサイトに選択的に

取り込まれ、酸化ストレスによるメラノサイトの細胞死を誘導することから、再発予防の観点からナイーブマウスにNPrCAPを投与することによるメラノサイト細胞死による免疫応答、すなわちチロシナーゼ、gp100, TRP-2をはじめとするメラノーマ分化抗原に対する免疫応答誘導がなされているかの検討も併せて行う。メラノサイト分化抗原特異的免疫応答が誘導されることは、本CTI療法後の免疫誘導による再発予防の可能性を示唆する。本年度においてはNPrCAP腫瘍内投与によりアポトーシスを来したメラノーマ由来の癌抗原を効率よく抗原提示させる目的で、腫瘍内にNPrCAPと樹状細胞を併用投与することで、樹状細胞によるクロスプレゼンテーションを介する免疫応答ならびに治療効果を検討した。さらに、CTI療法の抗腫瘍免疫応答誘導には、温熱療法によるメラノーマ細胞死に伴う熱ショック蛋白質Hsp72の細胞外への放出が重要な役割を果たしていることを報告している。メラノーマ細胞から放出されるHsp72にはメラノーマ腫瘍抗原ペプチドが結合しており、このHsp72-ペプチド複合体が抗原提示細胞に取り込まれたのち、抗原ペプチドがクロスプレゼンテーションされることでT細胞を活性化することを報告している。すなわちCTI療法はそれ自身がin situ ペプチドワクチンとして、抗腫瘍免疫応答を誘導する。そこで、Hsp72に結合効率の高いメラノーマ抗原ペプチドを同定して、このペプチドをワクチンとしてCTI治療後のメラノーマ特異的免疫維持療法に用いることを計画している。

B. 研究方法

1) NPrCAP全身性投与によるメラノサイト傷害を利用した抗メラノーマ免疫応答誘導

ナイーブC57/BL6マウスにNPrCAP (100 μ g/100 μ l) を腹腔内投与する。コントロールとして溶媒であるプロピレングリコールを100 μ l投与した。薬剤の直接効果を除外し、かつ免疫学的記憶効果を確認する目的で、90日後に、同系のマウスメラノーマ細胞B16F1細胞を5x10⁵個移植し、その腫

瘍径を週2 - 3回測定した。メラノーマ特異的免疫応答の検討には、メラノーマ分化抗原であるgp100, TRP-2に対する免疫応答誘導がなされているかを⁵¹Crを用いた細胞障害試験、ELLISPOTを用いて検討を行った。

2) NPrCAP全身性投与による抗腫瘍効果と腫瘍免疫誘導の機序

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

3) 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

マウスメラノーマB16OVAを皮下に樹立したマウスに対して、NPrCAPを腫瘍内投与 (24.4 μ M) を合計2回行って、腫瘍増殖に与える効果を検討した。すなわちB16OVAを1x10⁶個C57BL/6マウスに移植し、腫瘍径が4 - 5 mmになる12日目と14日の2回、NPrCAPを24.4 μ m腫瘍内に投与して、その腫瘍増殖に与える効果を観察した。

4) NPrCAPと樹状細胞の腫瘍内投与による抗腫瘍効果の検討

NPrCAPと樹状細胞併用腫瘍内投与による抗腫瘍効果の増強をNPrCAP単独腫瘍内投与と比較する。具体的には、抗原提示能を検討する目的で、Ovalbumin (OVA) を発現するB16F1 (B16OVA) 細胞を用いて検討を行った。1x10⁶個のB16OVAをC57BL/6マウスの皮下に移植し、担癌マウスを作成した。第12, 14日目に腫瘍内にNPrCAP (100 μ g) を局所注射し、第13, 15日目に骨髓細胞から誘導した1x10⁶個の樹状細胞を腫

瘍内投与し、その後腫瘍径を週2 - 3回測定した。腫瘍拒絶したマウスに対しては、B16OVAを再移植し、腫瘍拒絶効果を検討した。

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

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

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

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

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

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

C. 研究結果

1. NPrCAP投与によるメラノーマに対する抗腫瘍免疫応答の誘導

NPrCAPを腹腔内に投与したC57/BL6マウスの約80%において皮膚白斑と体毛の白色化が認め

られた。非常に興味深いことに、これらのマウスにB16F1メラノーマを接種すると、ほぼ前例で腫瘍増殖の抑制効果を認めた(図1A, B, C)。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る。実際、NPrCAP投与によりメラノーマを拒絶したマウスでは、脾細胞からB16F1メラノーマ細胞特異的な細胞障害性T細胞(CTL)が誘導することが可能であった(図1D)。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(図1D)。一方、human gp100もマウスのCTLを誘導することが知られているが、このペプチドは認識しなかった。これに対しT細胞を欠くヌードマウスを用いて、同様の検討を行ったが、NPrCAP前投与によるB16F1メラノーマ細胞の増殖抑制効果は観察されなかった。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腹腔内投与による皮下移植メラノーマに対する抗腫瘍効果

あらかじめマウスメラノーマB16F1を皮下に樹立したマウスに対して、NPrCAPを腹腔内投与を合計2回行って、腫瘍増殖に与える効果を検討した。この際、100 μg, 250 μg, 500 μgと投与量を変えて投与し、至適投与量を決定した。250 μgのNPrCAPを2回腹腔内投与した群で、最もよいB16F1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、腹腔内に投与されたNPrCAPが皮下のメラノーマに標的され、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静脈内投与による皮下移植メラノーマに対する抗腫瘍効果

あらかじめマウスメラノーマB16F1を皮下に樹

立したマウスに対して、NPrCAPを250 μ g 静脈内投与を合計2回行って、腫瘍増殖に与える効果を検討した。NPrCAP腹腔内投与により明らかなB16F1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。

4. 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

NPrCAPを2回腫瘍内投与した群では、コントロール群と比較して、明らかなB16OVAメラノーマの腫瘍増殖抑制効果を認めた(図2)。また生存日数の著明な延長を認めた(図3)。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。

5. NPrCAPと樹状細胞の腫瘍内投与は、著明な抗腫瘍効果を示し、細胞障害性T細胞を誘導する。

B16OVAを1x 10⁶個C57BL/6マウスに移植し、腫瘍径が4 - 5 mmになる12日目と14日の2回、NPrCAPを24.4 μ m腫瘍内に投与し、15日目に1x10⁶個の骨髓より培養誘導した樹状細胞を腫瘍内に投与した。NPrCAP (CAP) とDCを腫瘍内に投与した群では、PBS投与群 (control) と比較して、明らかな腫瘍増殖抑制効果を認めた。またDC単独投与群およびNPrCAP単独投与群でもコントロールと比較して抗腫瘍効果を認めたが、NPrCAPとDCの併用群が最も強力な抗腫瘍効果を示した(図2)。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(図3)。NPrCAPとDCの併用によって腫瘍の完全退縮を認めたマウスに、B16OVAを再移植すると、完全に(100%) B16OVAを拒絶した(図4)。一方、ナイーブマウスにB16OVAを移植した群では、100%腫瘍は増殖した。NPrCAPとDCの併用によって腫瘍の完全退縮を認めたマウスの脾細胞細胞を用いて、腫瘍特異的細胞障害性T細胞CTL

の誘導を検討した(図5)。その結果、B16OVAメラノーマに対する特異的なCTLを検出した。さらにモデル抗原であるOVA由来ペプチドSL8に対する特異的なCTLの誘導(EL4-SL8)も確認された。さらにELISPOTアッセイの結果も、SL8およびメラノーマ抗原TRP2ペプチドに対する特異的なCTLが誘導されていることが示された(図6)。このようにNPrCAPとDCの併用療法は、メラノーマ特異的CTL誘導を介して強力な抗腫瘍効果を示すことが明らかとなった。

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

PKH-redで染色したB16OVA細胞にNPrCAPを添加培養し、アポトーシスを誘導し、これにPKH-greenで染色した骨髓由来樹状細胞と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メラノーマを取り込んでいることが確認された(図7)。

7. 樹状細胞はNPrCAP腫瘍内投与によりアポトーシスに陥ったメラノーマ細胞を取り込み、腫瘍抗原をCD8⁺ T細胞にクロスプレゼンテーションする。

B16OVA細胞にNPrCAPを添加培養し、アポトーシスを誘導し、これに骨髓由来樹状細胞と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⁺ T細胞B3Zと共培養を行い、その反応性を検討した。その結果、NPrCAPによりアポトーシスが誘導されたB16OVAは樹状細胞に取り込まれ、クロスプレゼンテーションによりB3Zが特異的に活性化した。一方、NPrCAP未処理のB16OVAは樹状細胞に取り込まれず、T細胞を活性化しなかった(図8)。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CD8⁺ T細胞が誘導されたことによるものと考えられた。

8. CTI療法による全身性免疫応答の誘導

CTI療法によりB16F1メラノーマを拒絶したマウスを用いて、細胞障害性T細胞の誘導を検討した。その結果、B16F1メラノーマ細胞特異的細胞障害性T細胞(CTL)の誘導が可能であった(図9)。さらにこのCTLはマウスのメラノーマ抗原であるTRP-2由来の抗原ペプチドを認識し、高い細胞障害性を認めた。さらにELISPOTアッセイにおいても、TRP-2ペプチドを特異的に認識するCD8T+細胞を高頻度に認めた(図10)。このように、CTI療法により治療効果を示したマウスにおいては、メラノーマ特異的な免疫反応が誘導されていることが明らかとなった。

9. Hsp72結合親和性の高いメラノーマ関連抗原ペプチドの同定

共同研究者の本多によりHsp72およびH-2K^b, HLA-A24への結合親和性を指標に同定されたメラノーマ関連抗原由来ペプチドの細胞障害性T細胞誘導能を検討した。Tyrosinase^{E208-216}(LPWHRLFLL)を樹状細胞にパルスしてHLA-A24トランスジェニックマウスに免疫すると、B16F0メラノーマとこのペプチドをパルスしたHLA-A24を発現するRMA-S-A24細胞を傷害するT細胞を誘導し得た(図11)。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。

10. 結果のまとめ

NPrCAPのメラノーマ腫瘍内投与により、メラノーマの増殖抑制が認められた。さらに抗腫瘍効果の増強を目的として、NPrCAP腫瘍内投与後、樹状細胞を腫瘍内に投与した結果、非常に強い抗腫瘍効果を認め50%のマウスでは、腫瘍の完全退縮も観察された。これらのマウスでは、B16

メラノーマ細胞に対する細胞障害性T細胞の誘導が示された。このようにNPrCAPは、自身の有する酸化ストレスによる細胞障害活性に加えて、メラノーマ抗原であるTRP-2に対するT細胞応答を誘導することによって、抗腫瘍効果を示すことが考えられた。これは、NPrCAPによってアポトーシスに陥ったメラノーマ細胞を樹状細胞が取り込み、メラノーマ抗原をクロスプレゼンテーションすることで細胞障害性T細胞を誘導することを明らかにした。今後、全身性免疫誘導の効果をさらに確認するために、NPrCAPと樹状細胞の併用療法後、肺転移を抑制可能であるかについて検討する予定である。さらにHsp72に結合親和性の高いメラノーマ腫瘍抗原ペプチドを同定し、CTI後のブーストワクチンの有効性についてさらに検討を進めていく。

D. 考察

NPrCAPはメラノーマ細胞に取り込まれると、チロシナーゼの非常に良い基質となるため、メラニン合成経路において過剰なフリーラジカル産生による酸化ストレスを惹起することでアポトーシスを誘導する。この性質を利用して、メラノーマに対する抗腫瘍効果とそれに伴う抗腫瘍免疫応答の誘導について検討した。まずナイーブマウスにNPrCAPを単独投与すると、正常メラノサイトの傷害により、体毛の白色化を観察した。このようなマウスでは、メラノーマに対する抗腫瘍免疫応答が誘導されており、マウスメラノーマ細胞の移植に対し、抵抗性を示した。また興味深いことに、メラノサイト分化抗原であるTRP-2に対する細胞障害性T細胞が誘導されていた。さらに樹立されたB16F1メラノーマに対してもNPrCAPを投与することにより、メラノーマの増殖抑制が認められた。一部のマウスでは、腫瘍の完全退縮も観察された。これらのマウスでは、B16F1細胞に対する細胞障害性T細胞の誘導が示された。このようにNPrCAPは、自身の有する酸化ストレスによる細胞障害活性に加えて、メラノーマ抗

原である TRP-2 に対する T 細胞応答を誘導することによって、抗腫瘍効果を示すことが考えられた。さらに NPrCAP と樹状細胞を腫瘍内投与すると、非常に強い抗腫瘍効果を認めた。これは、NPrCAP によってアポトーシスに陥ったメラノーマ細胞を樹状細胞が取り込み、メラノーマ抗原をクロスプレゼンテーションすることで細胞障害性 T 細胞を誘導することを明らかにした。このように NPrCAP 投与により、全身性の抗腫瘍免疫応答を誘導することが可能であり、遠隔転移したメラノーマに対しても治療効果が期待できることを示している。今後、これを確認するために、NPrCAP 単独投与および NPrCAP と樹状細胞の併用療法後、メラノーマ肺転移を抑制可能であるかについて検討する予定である。メラノーマの征圧のためにはこの抗腫瘍免疫効果を生涯にわたり持続させることが肝要である。CTI 療法で一旦誘導された免疫応答に対するブースター免疫として NPrCAP の効果的な投与方法の開発が今後の重要な課題である。

E. 結論

我々が開発したチロシンのアナログである NPrCAP によるメラノーマ標的薬療法により、同時に抗メラノーマ免疫応答をも誘導することは特筆すべき特徴であると考えられる。NPrCAP はメラノーマに対し、免疫賦活性の細胞死を介する免疫応答を惹起し、全身性免疫応答を誘導し、転移巣の退縮を期待できるものである。今後、我々が開発している NPrCAP/magnetite を用いた chemothermo-immunotherapy (CTO therapy) としての温熱療法により誘導された全身性の抗腫瘍免疫の維持をはかるためのブースター免疫としての NPrCAP 単独投与を検討することが重要な課題である。さらには CTI 療法で発現が著明に誘導される Hsp72 高親和性ペプチドワクチンによるブースター免疫の開発も急務である。また深部の再発・転移にも有用な治療法の開発も念頭に置く必要がある。

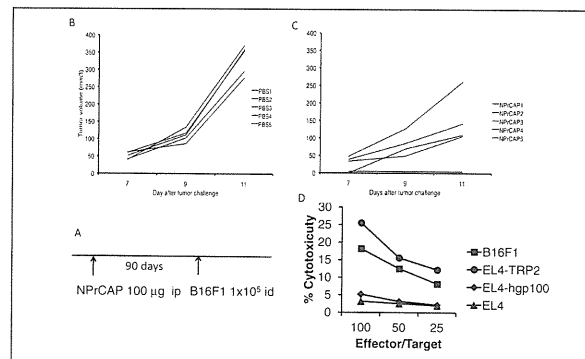


図 1

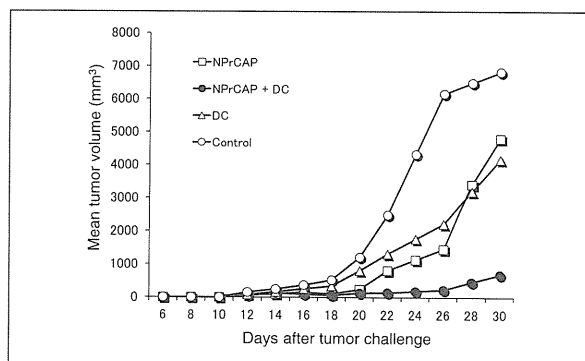


図 2

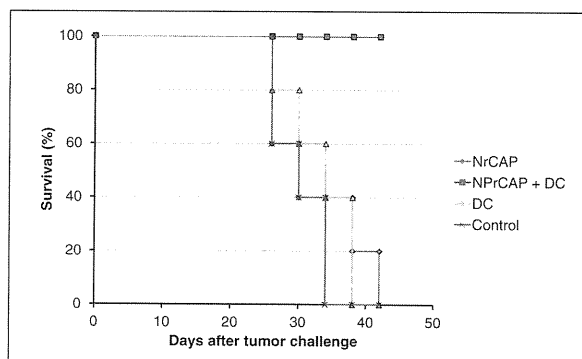


図 3

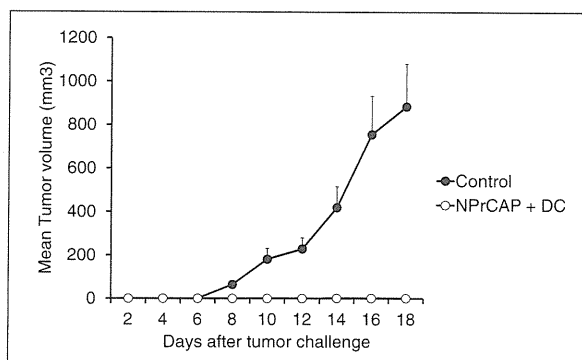


図 4

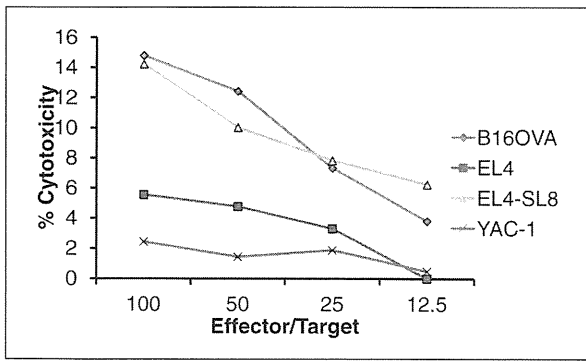


図 5

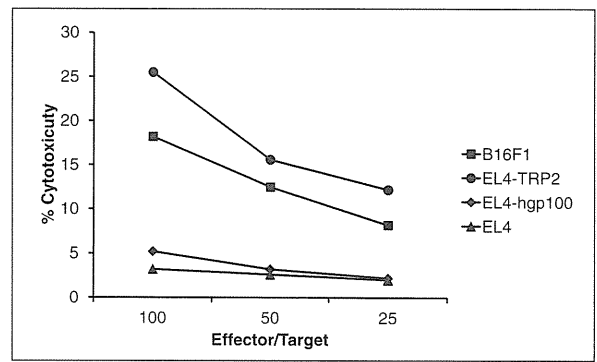


図 9

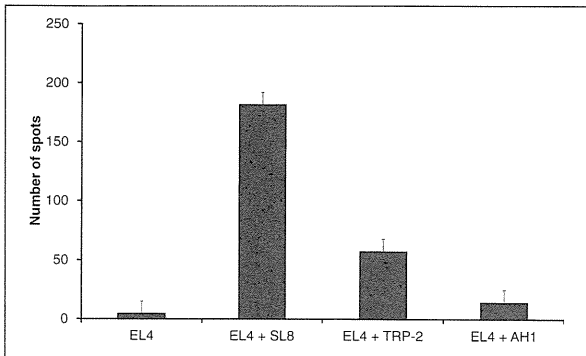


図 6

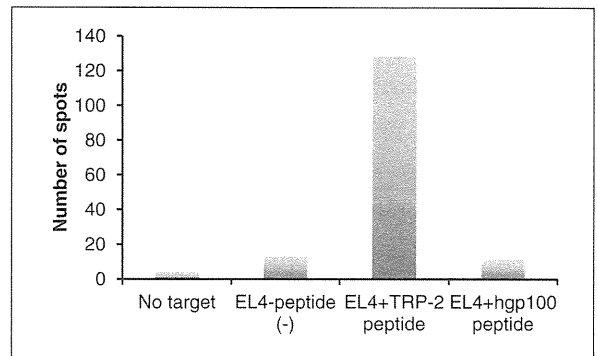


図10

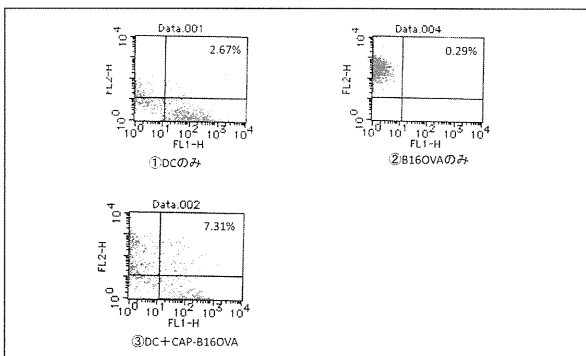


図 7

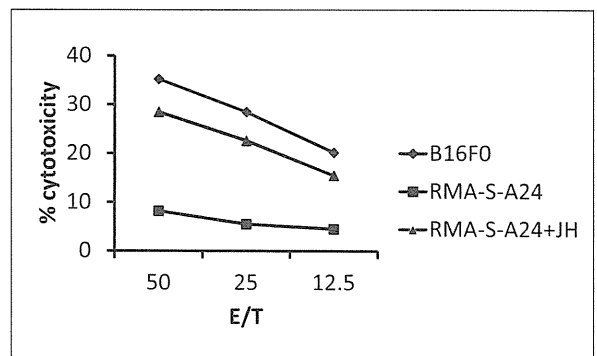


図11

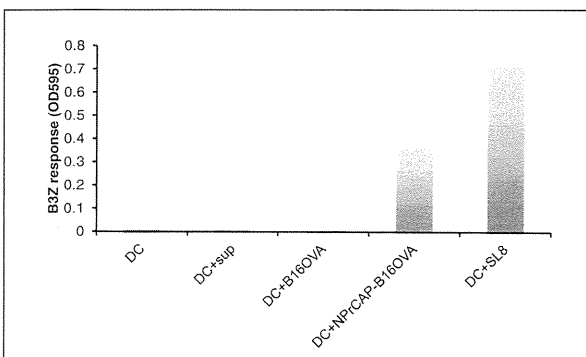


図 8

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Tumor-Produced Secreted Form of Binding of Immunoglobulin Protein (BiP) elicits Antigen Specific Tumor Immunity. Tamura Y, Hirohashi Y, Kutomi G, Nakanishi K, Kamiguchi K, Torigoe T, Sato N. J Immunol. In press, 2011.

2. Extracellular Heat Shock Protein 90 Translocates Chaperoned Antigen from Endosome to Proteasome for Generating Antigenic Peptide to be Cross-presented by Dendritic Cells. Oura J, Tamura Y, Kamiguchi K, Kutomi G, Sahara H, Torigoe T, Himi T, Sato N. Int Immunol, in press, 2011.
3. 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. Sato A, Tamura Y, Sato N, Yamashita T, Takada T, Sato M, Osai Y, Okura M, Ono I, Ito A, Honda H, Wakamatsu K, Ito S, Jimbow K. Cancer Sci. Sep;101 (9) :1939-46, 2010.
4. Okuya K., Tamura Y, Saito K, Kutomi G, Torigoe T, Hirata K, Sato N.: Spatiotemporal regulation of heat shock protein 90-chaperoned self-DNA and CpG-oligodeoxynucleotide for type-I interferon induction via targeting to static early endosome. J Immunol. Jun 15;184 (12) : 7092-9, 2010.

2. 学会発表

1. 田村 保明 : HSPによる自己免疫疾患制御、日本臨床ストレス応答学会、2011年11月2日、名古屋
2. 田村 保明 : 分泌型熱ショック蛋白質による腫瘍免疫誘導、日本免疫学会、2011年11月29日、千葉
3. Y. Tamura, K. Saito, K. Okuya, T. Torigoe, N. Sato : Spatiotemporal regulation of heat shock protein 90-chaperoned self-DNA and CpG-oligodeoxynucleotide for type-I interferon induction via targeting to static early endosome. 14th International Congress on Immunology, Kobe, Japan,

August 22-27, 2010.

4. 田村 保明 : N-propionyl-4-S-cysteaminylphenol-magnetite nanoparticles elicits CTL response via heat shock protein-peptide complex release. 日本ハイパーサーミア学会総会、2010年9月10日、福岡.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 : なし
2. 実用新案登録
なし。
3. その他
なし。