

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月29日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22501022

研究課題名（和文） IL-10の機能制御を目的とした分子標的薬の構築

研究課題名（英文） Development of molecular targeting drugs that can regulate IL-10 functions

## 研究代表者

田村 裕（TAMURA YUTAKA）

千葉大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号：50263174

## 研究成果の概要（和文）：

皮膚癌における悪性度が最も高いとされている悪性黒色腫の新規治療法の開発を目標とし、悪性黒色腫の重篤化に関与している IL-10 を標的とした IL-10 デコイを悪性黒色腫選択的に「送達・集積」させる非侵襲的同定法と共に、内包する IL-10 デコイの放出を伴った光線力学温熱療法を可能とする DDS 製剤としての分子標的薬の構築を行った。

## 研究成果の概要（英文）：

The malignant melanoma has highest malignancy in skin cancer. We aimed at the development of the new cure of the malignant melanoma. We constructed molecular target medicine with the next property: the noninvasive identification method to let deliver and accumulate molecular target medicine (IL-10 decoy which targeted IL-10) selectively and perform a malignant melanoma, the hyperthermia treatment with the release of IL-10 decoy containing it.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍免疫学

キーワード：分子標的薬・悪性黒色腫・IL-10

## 1. 研究開始当初の背景

【悪性黒色腫】悪性黒色腫は悪性度が非常に高く、早期に所属リンパ節へ転移し、さらには肺・肝臓・脳などの主要な臓器へと転移する。進行した悪性黒色腫に対しては、外科療法その他、抗がん剤による化学療法、リンパ球などを用いた免疫療法、放射線療法などの手段を組み合わせた集学的治療が行われている。近年、第4世代の癌免疫療法として「樹

状細胞免疫療法」が世界的に注目を集めている。東京大学医科学研究所の臨床研究において、全身転移患者の約3割において癌の縮小や長期に渡る進行停止の症例が認められている。一方、中部大学の研究グループが考案した「抗体付きマグネトリポソーム」を使用した「温熱免疫療法」に関しては、信州大学医学部における臨床試験（平成21年3月31日までに6例）の結果、原発癌組織の加温に

よる免疫賦活効果等が認められている。

【IL-10】IL-10は、分子量18kDaの糖タンパク質で、ホモダイマーとして機能するサイトカインである。IL-10は、2型ヘルパーT細胞(Th2細胞、ヒトCD4+T細胞)、単球、マクロファージ、活性化B細胞、肥満細胞、角化細胞、樹状細胞、Regulatory T細胞等の細胞から産生される。IL-10の生物活性は多岐にわたるが、他のサイトカインと際立って異なる特徴は、「抑制性活性」が中心となっていることにある。海外共同研究者の佐藤は、悪性黒色腫患者の85%以上において観察された血中でのIL-10濃度の上昇が、キラーT細胞(CTL)の活性を阻害し、悪性黒色腫における免疫寛容の成立に関与していることを報告している(Clin Cancer Res(1996)2,1383)。また、IL-10は、細胞が悪性形質転換やウイルス感染などのストレスを受けた際に発現する「MHCクラスI鎖関連タンパク質(MICA/B)」の発現を抑制し、腫瘍細胞等がCTL上のNKG2Dによる認識と殺傷から逃れること(免疫寛容の成立)を可能にしていると考えられている。(Immunity(2008)29,372., Immunological Reviews(2008)223,114.)

【分子標的薬】分子標的薬は、癌細胞が持つ特異的な性質を分子レベルで捕らえ、それを標的とすることによる「効率的な作用」を意図して設計されている。2001年に転移性乳癌の治療薬である「ハーセプチン」が発売されて以来、「グリベック(慢性骨髄性白血病、消化管間質腫瘍)」、「イレッサ(非小細胞肺癌)」等が承認され、従来の抗癌剤の治療成績を大きく凌駕する成果を上げている。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、皮膚癌における悪性度が最も高いとされている「悪性黒色腫」の治療に有効な分子標的薬を開発することである。これまでに、「悪性黒色腫」の重篤化に関与しているIL-10を標的としたIL-10デコイ(図1:IL-10R1の細胞外領域を抗体の不変領域に融合させたタンパク質分子標的薬)を創出し、その物性と機能を評価してきた(Cancer Immuno Immunother.(2009)58,1307., PCT/JP2004/013090)。今後は、引き続きIL-10デコイの「IL-10活性阻害剤」としての改良に取り組むと共に、「悪性黒色腫」からのIL-10産生を阻害するペプチド分子標的薬としての「IL-10産生阻害剤」を「論理的創薬システム」(特願2007-59268)によって創出する。これにより、タンパク質分子標的薬である「IL-10活性阻害剤」とペプチド分子標的薬である「IL-10産生阻害剤」の2剤併用による「悪性黒色腫治療」に関する「トランスレーショナルリサーチ」への礎を確立することを目的とする。

## 3. 研究の方法

本研究では、悪性黒色腫の免疫寛容を阻止する「IL-10活性阻害剤」と「IL-10産生阻害剤」に関する研究開発を行う。まず、これまでの研究成果(Cancer Immuno Immunother.(2009)58,1307., PCT/JP2004/013090)により悪性黒色腫の縮小と免疫賦活効果が確認されているIL-10デコイに更なる改良を施した「IL-10活性阻害剤」を作製する。また、悪性黒色腫からのIL-10の産生を促進している転写因子(Pbx-1とPrep-1)に結合し、それらが有する転写活性を阻害するペプチド分子標的薬を「IL-10産生阻害剤」として作製する。

以下のように研究を進める。

◆「IL-10活性阻害剤」ータンパク質分子標的薬ーに関する研究

① 改良型IL-10デコイの創出:田村/菅波, 齋藤/時重

・改良型IL-10デコイを立体構造に基づくコンピュータ・シミュレーションにより設計する。

・改良型IL-10デコイ発現ベクターを構築する。

・改良型IL-10デコイを無細胞タンパク質発現系により作製する。

② IL-10デコイの機能評価:田村/菅波, 齋藤/時重, 佐藤/寺井

・改良型IL-10デコイのIL-10捕獲能を、物理化学的・分子生物学的・細胞生物学的に評価する。

◆「IL-10産生阻害剤」ーペプチド分子標的薬ーに関する研究

① ペプチド分子標的薬の創出:田村/菅波, 佐藤/寺井

・転写因子(Pbx-1とPrep-1)に対するペプチド分子標的薬を、独自に開発した「論理的創薬システム」(特願2007-59268)により設計し、化学合成(受託)すると共に細胞内局在を解析する。

② 標的転写因子(Pbx-1, Prep-1)の創出: 齋藤/時重

・転写因子(Pbx-1とPrep-1)の遺伝子クローニングを行い、発現ベクターを構築する。

・転写因子(Pbx-1とPrep-1)を無細胞タンパク質発現系により作製する。

③ ペプチド分子標的薬の機能評価:田村/菅波, 齋藤/時重, 佐藤/寺井

・ペプチド分子標的薬のPbx-1とPrep-1に対する転写阻害能を、物理化学的・分子生物学的・細胞生物学的に評価する。

## 4. 研究成果

本研究者は、皮膚癌における悪性度が最も高いとされている「悪性黒色腫」の治療に有効な分子標的薬の開発を目標としている。これ

までに、「悪性黒色腫」の重篤化に関与している IL-10 を標的とした IL-10 デコイ (IL-10R1 の細胞外領域を抗体の不変領域に融合させたタンパク質分子標的薬) を創出し、その物性と機能を評価すると共に、IL-10 デコイに関するこれまでの研究成果 (Cancer Immunol Immunother. (2009) 58, 1307., PCT/JP2004/013090, 特許第 4635255 号) を踏まえて、「IL-10 活性阻害剤」としての機能に更なる改良を施してきた。具体的には、悪性黒色腫の縮小と免疫賦活効果が確認されている IL-10 デコイの機能を保持したまま、発現・精製の簡便性と生体内での安定性を向上させるため、多角体タンパク質に IL-10 を融合させた「多角体 IL-10 デコイ」を新たに創出した。次に、「多角体 IL-10 デコイ」が有する物理化学的評価 (標的タンパク質である IL-10 との結合特異性、結合速度、結合常数等の算出) を生体分子間相互作用解析装置 (BIACORE T-100) によって行うと共に、生化学的評価 (標的タンパク質である IL-10 との結合特異性、結合強度等の算出) を ELISA アッセイ等により検討した。さらに、「多角体 IL-10 デコイ」が有する物理化学的、生化学的評価を引き続き検討するとともに、IL-10 デコイのドラッグデリバリーシステム (DDS) の構築に取り組んだ。具体的には、IL-10 デコイを悪性黒色腫の組織選択的に「送達・集積」させる「非侵襲的同定法」と共に、内包する IL-10 デコイの放出を伴った“光線力学温熱療法”を可能とする DDS 製剤の開発とその機能評価を行い、「IL-10 活性阻害剤」としての腫瘍組織縮小と免疫賦活効果に関する検討を行った。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Suganami A, Toyota T, Okazaki S, Saito K, Miyamoto K, Akutsu Y, Kawahira H, Aoki A, Muraki Y, Madono T, Hayashi H, Matsubara H, Omatsu T, Shirasawa H, Tamura Y. Preparation and characterization of phospholipid-conjugated indocyanine green as a near-infrared probe. Bioorg Med Chem Lett. 査読有 2012 Dec 15;22(24):7481-5. doi: 10.1016/j.bmcl.2012.10.044.
- ② Terai M, Eto M, Young GD, Berd D, Mastrangelo MJ, Tamura Y, Harigaya K, Sato T. Interleukin 6 mediates production of interleukin 10 in metastatic melanoma. Cancer Immunol

Immunother. 査読有 2012 Feb;61(2):145-55. doi: 10.1007/s00262-011-1084-5.

- ③ Sato T, Terai M, Tamura Y, Alexeev V, Mastrangelo MJ, Selvan SR. Interleukin 10 in the tumor microenvironment: a target for anticancer immunotherapy. Immunol Res. 査読有 2011 Dec;51(2-3):170-82. doi: 10.1007/s12026-011-8262-6.

[学会発表] (計 3 件)

- ① 田村 裕, その他  
ICG-Liposome を用いたマウス扁平上皮癌に対する光線力学温熱療法, 第 71 回日本癌学会学術総会, 2012 年 9 月 19-21 日, 札幌市.
- ② 田村 裕, その他  
独自に開発した ICG-Liposome による扁平上皮癌に対する光線力学的温熱療法の開発, 第 67 回日本消化器外科学会総会, 2012 年 7 月 18 日, 富山市.
- ③ 田村 裕, その他  
ナノ粒子 ICG-Liposome と光学力学的による扁平上皮癌に対する温熱療法の開発, 第 66 回日本食道学会学術集会, 2012 年 6 月 21 日, 長野市.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 3 件)

- ① 名称: 近赤外線波長特性を利用した非侵襲性医療装置  
発明者: 田村 裕, その他.  
権利者: 鳥取大学, 千葉大学  
種類: 特許  
番号: 特願 2012-103379 号  
出願年月日: 2012 年 4 月 27 日  
国内外の別: 国内
- ② 名称: リポソーム複合体  
発明者: 田村 裕, その他.  
権利者: 鳥取大学, 千葉大学  
種類: 特許  
番号: 特願 2011-223273 号  
PCT/JP2012/076259  
出願年月日: 2011 年 10 月 7 日  
国内外の別: 国内
- ③ 名称: リンパ節イメージング用蛍光プローブ  
発明者: 田村 裕, その他.

権利者：千葉大学  
種類：特許  
番号：特願 2010-124252 号  
PCT/JP2011/003069・TW100119156  
出願年月日：2010 年 5 月 31 日  
国内外の別：国内・国外

○取得状況（計 1 件）

- ① 名称：抗体医薬  
発明者：田村 裕, 大塚 榮子  
権利者：産業技術総合研究所  
種類：特許  
番号：特許第 4635255 号  
取得年月日：2010 年 12 月 3 日  
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.m.chiba-u.ac.jp/class/bioinform/>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

田村 裕 (TAMURA YUTAKA)

千葉大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号：50263174