

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790037

研究課題名(和文) - GalCerを搭載した二元的免疫誘導型ナノ粒子の創製と癌免疫療法への展開

研究課題名(英文) Induction of antitumor immunity by nanoparticle incorporating alpha-galactosylceramide

研究代表者

中村 孝司 (Nakamura, Takashi)

北海道大学・薬学研究科(研究院)・助教

研究者番号：20604458

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、強力な癌免疫を誘導するナチュラルキラーT(NKT)細胞を活性化する糖脂質alpha-galactosylceramide(GC)は、水に不溶であり、標的細胞である抗原提示細胞への送達効率が低いため、直接投与による臨床応用が困難であった。本研究では、リポソームベースの独自のデリバリーシステムであるオクタアルギニン修飾ナノ粒子にGCを搭載することで、抗原提示細胞へのGC送達効率の向上、NKT細胞の分化活性化、サイトカイン産生の促進、GC単独では困難であったマウスメラノーマの肺転移抑制に成功した。

研究成果の概要(英文)：Alpha-galactosylceramide (GC), a lipid antigen present on CD1d molecules, is predicted to have clinical applications as a new class of adjuvant, because GC strongly activates natural killer T (NKT) cells which produce large amounts of IFN-gamma. Here, we incorporated GC into stearylated octarginine-modified liposomes (R8-Lip), our original delivery system developed for vaccines, and investigated the effect of nanoparticulation. The nanoparticulation of GC enhanced the GC presentation on CD1d of antigen presenting cells, NKT proliferation, IFN-gamma production, therapeutic effect against highly malignant B16 melanoma. These results strongly indicate that the nanoparticulation of GC by R8-Lip is promising technique for achieving systemic GC therapy.

研究分野：薬物送達学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：ドラッグデリバリー リポソーム ワクチン 癌免疫療法 脂質抗原

1. 研究開始当初の背景

脂質抗原提示分子である CD1d 分子に提示された α -Galactocylceramide (GC) の刺激によるナチュラルキラーT (NKT) 細胞からの大量のインターフェロン (IFN) γ の産生はキラーT 細胞・ヘルパーT 細胞やナチュラルキラー (NK) 細胞の活性化・分化を促す。その結果、キラーT 細胞による癌抗原特異的な癌細胞排除と NK 細胞による非特異的な癌細胞排除が行われ、Major histocompatibility complex class I (MHC-I) 分子の発現レベルに関係なく癌細胞を殺すことが可能であると考えられている。従来のペプチド療法 (特異的) や NK 細胞療法 (非特異的) では、抗腫瘍効果が MHC-I の発現レベルに大きく依存していたが、GC の刺激による NKT 細胞の活性化は癌種に依らない 2 段階の次世代癌免疫療法として大いに期待されており、いくつかの臨床試験が行われてきた (Molling JW et al. *Clin. Immunol.* 129: 182-194 2008)。しかしながら、糖脂質である GC は水溶性が低いいため樹状細胞への取り込み効率が非常に悪いという製剤学的な問題を有しており、GC の直接投与 (静脈内投与や皮下投与など) では殆ど効果が得られていない。それ故、GC を水溶性製剤化し、樹状細胞に効率的に取り込ませることが可能なデリバリーシステムの開発が望まれている。

2. 研究の目的

本研究ではリポソームベースの独自のデリバリーシステムであるオクタアルギニン (R8) 修飾ナノ粒子への GC の搭載方法を確立し、*in vitro* および *in vivo* において細胞内動態及び体内動態の観点からシステムの最適化を行う。そして実用的、且つ特異的及び非特異的、つまり二元的 (Dual) な免疫応答を活性化可能な Dual-immunoactivatable Nano Particles (DiaNP) を創製し、新たな癌免疫療法を切り拓く。

3. 研究の方法

(1) GC 搭載ナノ粒子 (DiaNP) の調製

GC は水に不溶の糖脂質であるため、リポソームの脂質膜に搭載することとした。GC 及びリポソーム脂質 (卵黄リン脂質、コレステロール、ステアリル化オクタアルギニン) を完全に有機溶媒に溶解させた後、有機溶媒を除去することで、脂質薄膜を調製した。調製した脂質薄膜を緩衝液で水和することで DiaNP を調製した。

(2) 抗原提示細胞を用いた *in vitro* における DiaNP の機能評価

抗原提示細胞としてマウス樹状細胞株 JAWSII 細胞を用いた。DiaNP もしくは DMSO に溶解させた GC を JAWSII 細胞に処理し、24 時間後の GC 抗原提示を評価した。GC 抗原提示は、CD1d に提示された GC を認識する抗体を用いてフローサイトメーターにより測定した。

(3) マウスを用いた *in vivo* における DiaNP の最適化と機能評価

CD1d に提示された GC により活性化した NKT 細胞は IFN- γ を産生する。マウスの尾静脈から DiaNP を投与し、18 時間後の血中 IFN- γ 濃度を測定することで、*in vivo* における DiaNP の最適化及び機能評価を行った。比較対象として、5.6%スクロース、0.75%ヒスチジン、0.55% Tween20 を用いて可溶化した GC 溶液を用いた。

(4) DiaNP の抗腫瘍活性評価

癌モデルとして luciferase 発現 B16-F10 メラノーマ (B16-luc) 細胞を用いた。B16-luc 細胞をマウスに静脈内投与し肺癌モデルを作成、4 日後に最適化した DiaNP を静脈内投与した。B16-luc 細胞の投与から 19 日後に肺を回収し、肉眼的観察及び luciferase 活性測定による定量的な抗腫瘍活性評価を行った。

(5) DiaNP の抗腫瘍活性機構の解明

マウスに DiaNP を尾静脈内投与し、24 時間後に脾臓を回収し、抗原提示細胞の CD1d への GC 抗原提示効率をフローサイトメーターにより評価した。さらに投与 3 日後に脾臓を回収し、NKT 細胞数をフローサイトメーターにより評価した。

4. 研究成果

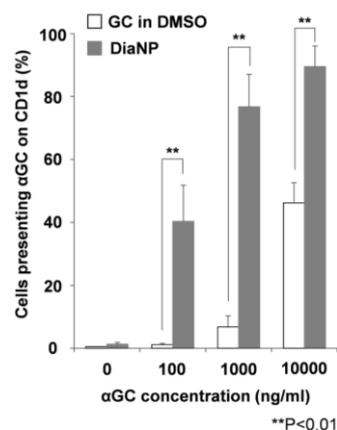
(1) GC 搭載ナノ粒子 (DiaNP) の調製

クロロホルム/メタノール=1:1 の溶媒に溶解させることで、均一な脂質薄膜の調製に成功し、粒子径 100 nm、ゼータ電位が 40 mV の DiaNP の構築に成功した。

(2) 抗原提示細胞を用いた *in vitro* における DiaNP の機能評価

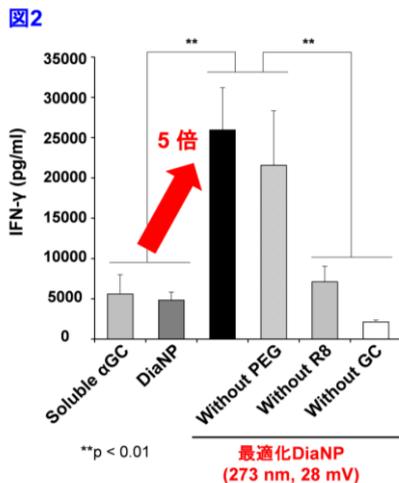
JAWSII 細胞に DiaNP 及び DMSO で溶解させた GC を処理し、GC 抗原提示を評価した結果、DiaNP は CD1d に GC を提示している細胞数を有意に増加させ、GC のみと比較して、その効率は約 100 倍であった (図 1) 以上のことから、GC のナノ粒子化は、GC 抗原提示を劇的に促進することが明らかになった。

図 1



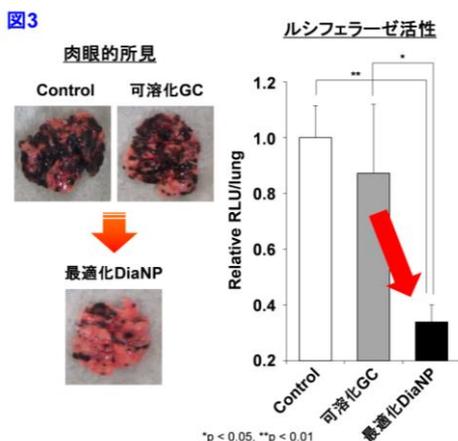
(3) マウスを用いた *in vivo* における DiaNP の最適化と機能評価

DiaNP 及び可溶化 GC をマウスに尾静脈投与した結果、予想に反して同程度の IFN- γ であったことから、DiaNP の最適化を行った。オクタアルギニン (R8) による非特異的吸着を軽減するためにポリエチレングリコール (PEG) を DiaNP に修飾し、さらに粒子径の制御を行うことで、免疫組織である脾臓への集積を狙った。最適化 DiaNP の粒子径は 273 nm、ゼータ電位は 28 mV であった。最適化 DiaNP では脾臓への集積が有意に増加し、最適化前と比較して、約 5 倍の IFN- γ 産生の増強が認められた (図 2)。以上のことから、in vivo の静脈内投与においても、GC をナノ粒子化することで、GC による免疫誘導の促進に成功した。



(4) DiaNP の抗腫瘍活性評価

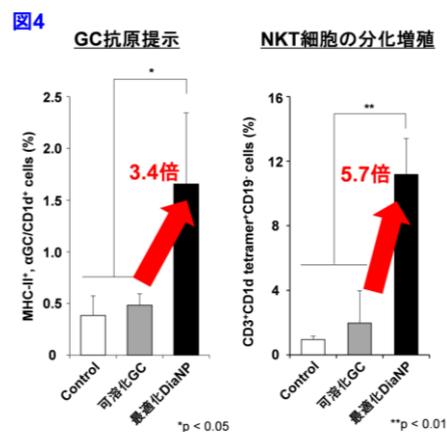
B16-luc 細胞を尾静脈から投与することで作成したマウスモデルに最適化した DiaNP と可溶化した GC を尾静脈内投与し、肺転移抑制効果を比較した。その結果、肉眼的観察において Control 群と可溶化 GC 投与群では同程度の肺転移が認められたが、最適化 DiaNP 投与群では、明らかな転移巣の減少が観察された (図 3 左)。さらに回収した肺全体のルシフェラーゼ活性を測定することで、転移した B16 細胞の量を定量的に評価した結果、DiaNP 投与群において有意なルシフェラーゼ活性の減少が認められ、その抑制効率は 60%



以上であった (図 3 右)。以上のことから、GC 単体では転移抑制効果が認められない条件においても、GC をナノ粒子化した DiaNP では有効な抗腫瘍活性が誘導できることが明らかになった。

(5) DiaNP の抗腫瘍活性機構の解明

マウス尾静脈から DiaNP もしくは可溶化 GC を投与し、脾臓中の GC を提示している抗原提示細胞の割合及び NKT 細胞の割合を評価した。その結果、DiaNP 投与群において GC を提示している抗原提示細胞の割合が 3.4 倍、NKT 細胞の割合が 5.7 倍増加した。このことは、DiaNP の癌免疫誘導が CD1d への GC 抗原提示、NKT 細胞の活性化を介していることを示唆しており、GC のナノ粒子化によりそれらが顕著に促進されたことが明らかになった。



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 1 件)

- Nakamura T, Yamazaki D, Yamauchi J, Harashima H The nanoparticulation by octaarginine-modified liposome improves α -galactosylceramide-mediated antitumor therapy via systemic administration J. Control. Release 171: 216-224 (2013) 査読有 doi: 10.1016/j.jconrel.2013.07.004. Epub 2013 Jul 13.

[学会発表] (計 4 件)

- Nakamura T, Yamazaki D, Yamauchi J, Harashima H The nanoparticulation of α -galactosylceramide by octaarginine-modified liposome enhances α -galactosylceramide mediated antitumor effects in an experimental lung metastasis model 40th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society (Honolulu, Hawaii, USA, July 21-24, 2013)
- 中村孝司、山崎大樹、山内順、原島秀吉 オクタアルギニン修飾ナノ粒子に

- よる NKT 細胞を介した癌免疫療法の
増強 日本薬学会第134年会 2014年3
月 27-30 日 熊本
3. 中村孝司、山崎大樹、山内順、原島秀
吉 オクタアルギニン修飾ナノ粒子に
よる NKT 細胞を介した抗腫瘍免疫の
促進 日本薬剤学会 第 28 年会 2013
年 5/23-5/25 名古屋
4. Yamazaki D, Nakamura T, Harashima H
 α -Galactosylceramide incorporated
octaarginine-modified nanoparticles
inhibit experimental tumor metastasis 第
41 回 日本免疫学会総会 2012 年 12
月 5-7 日 神戸

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.pharm.hokudai.ac.jp/yakusetu/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

中村 孝司 (NAKAMURA Takashi)
北海道大学・大学院薬学研究院・助教
研究者番号：20604458