

令和 2 年 5 月 18 日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K17968

研究課題名(和文)糖鎖・Toll様受容体アゴニスト固定化金ナノ粒子を用いたがんワクチンの開発

研究課題名(英文) Development of cancer vaccine using sugar chain and toll-like receptor agonist immobilized gold nanoparticles

研究代表者

新地 浩之 (Shinchi, Hiroyuki)

鹿児島大学・理工学域工学系・助教

研究者番号：70770155

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、がん関連糖鎖抗原とアジュバント(免疫増強剤)となる合成低分子Toll様受容体7(TLR7)アゴニストを共固定化した金ナノ粒子を用いたがんワクチンの開発に取り組んだ。本研究で用いた糖鎖抗原は、免疫細胞への輸送能が乏しく、がんワクチンの開発には至らなかった。一方、マンノースなどの糖鎖とTLR7アゴニストを共固定化した金ナノ粒子は、低分子のTLR7リガンドに比べて有意に高いアジュバント活性を示し、細胞性免疫を誘導可能なアジュバントになることを見出した。また、一部の糖鎖構造では腫瘍の増大抑制効果が認められたことから、がん免疫療法のための有用なアジュバントになることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

TLRアゴニストは、自然免疫を活性化し、獲得免疫の誘導に寄与することから、ワクチンや免疫療法のアジュバントとしての利用が期待されている。その中でも、TLR7のアゴニストは、種々の合成低分子化合物が開発され、抗ウイルス治療薬として既に臨床利用されている。しかし、全身投与すると致死的な副作用を誘発する恐れがあり、その利用法が制限されていた。本研究では、糖鎖を固定化した金ナノ粒子を用いて合成低分子TLR7アゴニストを免疫細胞選択的に輸送することで、安全且つ効果的なアジュバントとして利用できることを見出した。今後、がんや感染症に対するワクチンや免疫療法のアジュバントとして幅広い応用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we have addressed to develop a cancer vaccine using gold nanoparticles co-immobilized with a synthetic small molecule Toll-like receptor 7 (TLR7) agonist and a tumor-associated sugar chain antigen. The sugar chain antigen used in this study did not lead to the development of a cancer vaccine due to their poor capability to deliver to immune cells. On the other hand, we found that several sugar chain structure such as alpha-mannose are effective for selective delivery, and gold nanoparticles co-immobilized with alpha-mannose and TLR7 agonist have significantly higher adjuvant activity compared to small-molecule TLR7 ligands. Furthermore, some of gold nanoparticle conjugates showed tumor growth inhibition effect, suggesting that they may be useful adjuvants for immunotherapy.

研究分野：糖鎖工学、免疫工学

キーワード：アジュバント 金ナノ粒子 糖鎖 免疫療法 ワクチン TLR

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

1981年以降、がん(悪性新生物)が日本人の死因の第一位として続いている。従来のがん治療は、外科手術・化学療法・放射線療法の三大療法が中心だが、これらの手法では根治が難しく、患者の負担も大きい。そのため、新たな治療法の開発が求められている。そこで、生体が元来有する免疫機構を増強することでがん細胞を排除するがんワクチン療法が注目されている。

本研究は、新たながんワクチンを開発するための標的分子として糖鎖に着目した。糖鎖は、全ての細胞表面に存在し、細胞の分化や増殖、細胞間の情報伝達、微生物感染など様々な生体機能に関与する。一方、その構造・発現量は、生体の状態や疾患に応じて鋭敏に変化するため、疾患のバイオマーカーとしても注目されている。これまでに、シアリル Tn 抗原やムチン型糖鎖などががん細胞表面に特異的に発現する糖鎖抗原として見出されており、これらを標的としたがんワクチンの開発が検討されている。しかし、糖鎖は親水性が高く、単独では抗原性が低いため、糖鎖を標的としたがんワクチンの開発は容易ではない。糖鎖の抗原性を高めるために、抗原性タンパク質や脂質との複合化が行われているが、臨床研究において、がんワクチンとしての十分な効果はこれまで得られていない。したがって、糖鎖を標的としたがんワクチンを開発するためには、強力に免疫応答を誘導可能なアジュバント分子が必要だと考えられた。

2. 研究の目的

近年の自然免疫研究の発展から、ワクチンが十分な効果を発揮するためには、自然免疫を活性化して獲得免疫を誘導することが重要だと考えられており、自然免疫を活性化する Toll 様受容体 (TLR) に対するアゴニストをアジュバント (免疫増強剤) に利用する研究が注目されている (Steinhagen, F. et al. *Vaccine* 2011 (29), 3341)。その中でも TLR7 のアゴニストは、種々の合成低分子化合物が開発され、抗ウイルス免疫や抗腫瘍免疫に極めて重要な I 型インターフェロン (Zitvogel, L. et al., *Nat. Rev. Immunol.*, 2015, 15, 405) を誘導できるため、がんワクチンの効果的なアジュバントになることが期待できる。一方、合成低分子 TLR アゴニストの多くは全身投与すると血流で急速に拡散し、不特定の細胞を活性化するため、サイトカイン放出症候群などの重篤な副作用を引き起こす危険性がある。TLR7 は主に免疫細胞内のエンドソームに局在するため、TLR7 リガンドの効力を強くするためには、エンドサイトーシスによりリガンド分子を免疫細胞内に効率的に輸送する必要がある。研究代表者は、先行研究において、TLR7 の合成低分子アゴニスト (1V209) を多糖などの高分子キャリアに複合化することで、マクロファージ刺激能や IgG2c クラスの抗体産生能が約 100 倍向上することを見出した (Shinchi, H., et al. *Biconj. Chem.* 2015 (26) 1713)。糖鎖抗原とアジュバント分子を複合化すれば、有用なワクチンになると期待できるが、多糖などのポリマー分子に複数の化合物を修飾する場合、その調製法が煩雑になってしまう。そこで本研究では、糖鎖抗原と TLR7 アゴニストのキャリア分子として金ナノ粒子 (GNP) に着目した。GNP は、化学的に安定で、特徴的な光学的特性を持つ直径数 nm ~ 数十 nm のナノ粒子であり、その表面にはチオール基を有する機能性分子や生体分子を簡単に固定化できる。近年は、バイオイメージングや光線力学療法、ドラッグデリバリーなど、医療分野での応用も検討されており、生体に対しても安全だと考えられている。本研究は、糖鎖抗原と TLR7 アゴニストを共固定化した金ナノ粒子を調製し、新たながんワクチンを開発することを目的とした。

3. 研究の方法

研究代表者らのグループでは、糖鎖などにジスルフィド基 (チオクト酸) を有するリンカーを付加し、簡単に金属ナノ粒子表面に固定化する技術を確認していた (Shinchi, H., et al. *Chem. Asian J.* 2013 (7) 2678、Shinchi, H., et al. *Bioconj. Chem.* 2014 (25) 286、Suda, Y., et al. *Bioconj. Chem.* 2008 (143) 833)。本研究ではこれらの技術を応用し、まず、糖鎖と TLR7 アゴニストを共固定化した GNP を調製し、アジュバント活性を評価した。その後、がんワクチンとしての有効性について検討した。具体的には、以下の点について検討した。

(1) ジスルフィドリンカーを有する TLR7 アゴニスト誘導体の合成

TLR7 アゴニストには、合成低分子 TLR7 アゴニストの 1V209 を用いた。1V209 を金ナノ粒子に固定化するために、ジスルフィド基を有するチオクト酸 (α -リポ酸) を修飾した 1V209 誘導体を合成した。チオクト酸は、両末端にアミノ基を有するスペーサー分子を介して 1V209 に修飾した。この時、スペーサーの構造が免疫活性に影響することが考えられたため、4,7,10-トリオキサ-1,13-トリデカンジアミン (TTDDA) または *m*-フェニレンジアミン (*m*PDPA)、エチレンジアミン (EDA) を介してチオクト酸を修飾した 3 種類の 1V209 誘導体 (1V209-TTDDA-TA、1V209-*m*PDPA-TA、1V209-EDA-TA) を合成した。

(2) 金ナノ粒子表面への TLR7 アゴニスト及び糖鎖固定化条件の検討

1V209 誘導体は、水に難溶性であり、1V209 誘導体のみを GNP 表面に固定した場合、水中で分散できないことが予想された。そのため、1V209 誘導体と糖鎖の固定化比率や GNP 調製時の反応溶媒を検討し、生理的条件下で安定に分散する GNP の調製条件を検討した。

(3) *In vitro* での免疫増強活性評価

In vitro での免疫増強活性は、マウス骨髄由来樹状細胞 (BMDC)、マウスマクロファージ細胞株 J774A.1 細胞、ヒト末梢血単核細胞 (PBMC) の 3 種類を用いて評価した。1V209・糖鎖共固定化 GNP の存在下で細胞を 18 時間培養後、培養上清中に産生された炎症性サイトカインを ELISA 法で定量し、その産生量を指標に免疫増強活性を評価した。

(4) *In vivo* でのアジュバント活性評価

In vivo でのアジュバント活性は、C57BL/6 マウスを用いて評価した。0 日目と 14 日目に、モデルタンパク質抗原のオボアルブミン (OVA) と、アジュバントとなる 1V209・糖鎖共固定化 GNP をマウス尾部に皮内投与した。その後、免疫 38 日目に眼窩静脈叢より採血し、血中の OVA に対する IgG1 抗体と IgG2c 抗体の産生価を評価した。

(5) *In vivo* でのがんワクチン活性評価

糖鎖抗原・TLR7 アゴニスト固定化金ナノ粒子の抗腫瘍免疫活性は、C57BL/6 マウスの両脇腹に B16-OVA 細胞を定着させた腫瘍モデルマウスを用いて評価した。B16-OVA 細胞を移植後に糖鎖抗原・TLR7 アゴニスト固定化金ナノ粒子を投与し、腫瘍の増大抑制効果を評価した。

4. 研究成果

(1) 1V209・糖鎖共固定化 GNP の調製

まず、糖鎖成分に α マンノースを用いて、1V209 誘導体と α マンノースを共固定化した GNP (1V209- α Man-GNP) の調製方法を検討した。1V209 誘導体と α マンノースを有するリガンド複合体 (Man α 1-6Glc-mono) のモル比が 3:7、または 1:9、1:19、1:39 になるように混合し、GNP 表面に共固定化した。その結果、1V209 誘導体と Man α 1-6Glc-mono のモル比が 1:9、1:19、1:39 の場合に、水中で安定に分散する GNP が得られた。得られた 1V209- α Man-GNP は、透析 (Spectra/Por® 3, 分画分子量:3,500) によって精製した。1V209- α Man-GNP に固定化された 1V209 誘導体および Man α 1-6Glc-mono を定量したところ、GNP 表面に固定化した際のモル比と同程度の固定化比率であった。1V209- α Man-GNP の PBS 中での粒径を動的光散乱 (DLS) 法によって測定したところ、平均粒径は 8~10 nm であった。これは、透過型電子顕微鏡 (TEM) で測定した粒径 (平均粒径 4~5nm) と類似しており、PBS 中で単一の粒子として分散していることが示唆された。

(2) 1V209- α Man-GNP の *in vitro* での免疫増強活性

In vitro での免疫増強活性を 3 種類の免疫細胞を用いて評価した。マウス BMDC を用いて IL-6 の産生量を指標に評価したところ、GNP に固定化した 1V209 誘導体の濃度依存的な IL-6 の産生が観察され、1V209 誘導体単体に比べて 50%効果濃度が約 6 倍低かった。1V209 誘導体を固定化していない α Man-GNP では IL-6 が産生されなかったことから、GNP に固定化した 1V209 誘導体によって IL-6 の産生が誘導されたと考えられる。また、免疫増強活性は、1V209 誘導体の構造に依存せず、いずれの 1V209 誘導体を固定化した GNP でも同程度の IL-6 産生能を示した。1V209- α Man-GNP の細胞毒性を MTT アッセイにより評価したところ、1V209 誘導体の濃度に依存した細胞死は観察されなかったことから、細胞障害性の低いアジュバントだと考えられる。次に、J774A.1 細胞を用いて IL-6 の産生能を評価した。その結果、1V209 誘導体に比べて IL-6 の産生能が著しく低下した。これは、未分化の J774A.1 細胞は、マンノース受容体をほとんど発現していないため、マンノース受容体を介した 1V209- α Man-GNP の取り込みが起こらず、TLR7 を活性化できないためだと考えられる。このことから、TLR7 の活性化には、1V209- α Man-GNP がマンノース受容体を介したエンドサイトーシスによって細胞内に移行することが重要であり、糖鎖が免疫細胞への選択的輸送に重要な分子であることを見出した。続いて、ヒト PBMC を用いて腫瘍壊死因子- α の産生能を評価した。その結果、1V209 誘導体に比べて、より低濃度で TNF- α の産生が誘導された。したがって、1V209- α Man-GNP は、ヒト細胞においても高いサイトカイン産生能を有することが示唆された。

(3) 1V209- α Man-GNP の *in vivo* でのアジュバント活性

In vivo での免疫増強活性を C57BL/6 マウスを用いて評価した。0 日目と 14 日目に、モデルタンパク質抗原の OVA と、アジュバントとなる 1V209- α Man-GNP をマウス尾部に皮内投与した。その後、免疫 38 日目に眼窩静脈叢より採血し、血中の OVA に対する IgG1 抗体と IgG2c 抗体の産生価を評価した。その結果、1V209 単体に比べて IgG2c 抗体の産生価が 10^3 倍以上高かったことから、細胞性免疫の誘導能が高いことが示唆された。これは、これまでに開発した 1V209 とデキストランの複合体 (1V209-dextran, Shinchi, H., et al. Biconj. Chem. 2015 (26) 1713) と同様の結果であったが、免疫 38 日目のマウスの体重に対する脾臓の重さの割合を比較したところ、1V209-dextran を投与したマウスでは脾臓が腫大していた一方で、1V209- α Man-GNP ではほとんど変化がなかった。以上から、1V209- α Man-GNP は、B 細胞増加等の過剰な免疫応答を起こさない安全且つ効果的なアジュバントであることが示された。

(4) *In vivo* でのがんワクチン活性

ヒト腫瘍組織の 80% 以上で発現が認められるシアリル Tn (STn) 抗原をがん抗原に用いて、1V209 と STn 抗原を共固定化した GNP (1V209-STn-GNP) を調製し、ワクチンとしての有用性を評価した。その結果、*in vitro*、および *in vivo* の両方において、アジュバント活性の著しい低下が観察された。また、腫瘍モデルマウスを用いて、1V209-STn-GNP 投与後の腫瘍の増殖抑制効果を検討したが、有意な効果は認められなかった。これらのことから、GNP 表面の糖鎖構造が免疫細胞の認識に重要であり、STn 抗原と 1V209 のみを GNP に固定化した場合、ワクチン材料として適さないことが示唆された。一方、一部の糖鎖構造では、有意な腫瘍の増大抑制効果が認められたことから、現在解析を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shinchi Hiroyuki, Yamaguchi Toru, Moroishi Toshiro, Yuki Masaharu, Wakao Masahiro, Cottam Howard B., Hayashi Tomoko, Carson Dennis A., Suda Yasuo	4. 巻 30
2. 論文標題 Gold Nanoparticles Coimmobilized with Small Molecule Toll-Like Receptor 7 Ligand and α -Mannose as Adjuvants	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bioconjugate Chemistry	6. 最初と最後の頁 2811 ~ 2821
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.bioconjchem.9b00560	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 幸 勝治、新地 浩之、若尾 雅広、隅田 泰生
2. 発表標題 Toll様受容体7リガンド・糖鎖共固定化蛍光性ナノ粒子の開発
3. 学会等名 2019年度 日本生化学会九州支部例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 新地 浩之
2. 発表標題 合成低分子TLR7リガンドを用いた新規アジュバントの開発
3. 学会等名 第32回 日本動物細胞工学会2019年度大会（JAACT2019）（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroyuki Shinchi, Toru Yamaguchi, Toshiro Moroishi, Tomoko Hayashi, Howard B. Cottam, Dennis A. Carson, Masahiro Wakao, Yasuo Suda
2. 発表標題 Development of toll-like receptor 7 ligand and α -mannose immobilized gold nanoparticles toward adjuvant immunotherapy
3. 学会等名 ACS Fall 2019 National Meeting & Expo -Chemistry & Water-（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山口徹、新地浩之、諸石寿朗、若尾雅広、林公子、Howard B. Cottam、Dennis A. Carson、隅田泰生
2. 発表標題 新規アジュバントとしてのTLR7リガンド・糖鎖固定化金ナノ粒子の開発
3. 学会等名 第24回日本エンドトキシン・自然免疫研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山口徹、新地浩之、若尾雅広、林公子、Howard B. Cottam、Dennis A. Carson、隅田泰生
2. 発表標題 TLR7リガンド固定化金ナノ粒子の調製と免疫増強活性評価
3. 学会等名 2017年度生命科学系合同年次大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 TLRリガンド固定化ナノ粒子	発明者 隅田泰生、新地浩之、若尾雅広	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-202064	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 免疫増強作用を有する金ナノ粒子	発明者 隅田泰生、新地浩之、若尾雅広	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2017-206818	出願年 2017年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

隅田研究室 http://www.cb.kagoshima-u.ac.jp/lab/suda-lab/index.html
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 協力 者	諸石 寿朗 (Moroishi Toshiro)	熊本大学・大学院生命科学研究部・教授 (17401)	