

平成21年3月31日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19560780

研究課題名（和文） 腫瘍免疫を誘導増強する複合脂質膜の創製とがん治療への応用

研究課題名（英文） Hybrid liposomes enhancing the antitumor immunity and their applications to cancer therapy

研究代表者

後藤 浩一（GOTO KOICHI）

崇城大学・生物生命学部・准教授

研究者番号：30279377

研究成果の概要：腫瘍免疫を誘導増強する複合脂質膜の創製を目的とし、T細胞活性化の副シグナルを発する膜タンパクを組換えタンパク質として得るために、マウス腫瘍細胞より複製した遺伝子を用いて発現用プラスミドの調製を検討したところ、目的の組換えプラスミドが得られた。また、がん抗原となるペプチド誘導体を固相法で合成した。さらに、リン脂質とミセル界面活性剤からなる複合脂質膜を調製し、細網内皮系を回避可能な安定な膜を形成できることを明らかにした。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学・生物機能・バイオプロセス

キーワード：腫瘍免疫・複合脂質膜・抗原提示細胞・T細胞・B7-1・ムチン MUC-1

1. 研究開始当初の背景

1980年代末に腫瘍（がん）抗原をコードする遺伝子がクローニングされ、腫瘍抗原の存在が明らかにされて以来、腫瘍免疫学の研究が飛躍的な発展を遂げている。とくに、がん細胞に対する免疫応答を強化してがん治療に応用する試みが注目されており、外科療法、放射線療法、化学療法とともに重要ながん治療法の一つとなっている。また、免疫機能の作用機序の解明も進んでいる。がん細胞のタンパク質に由来するペプチド抗原は、樹状細胞やマクロファージなどに取り込まれ

たのちT細胞を刺激するが（第1シグナル）、さらに、B7-1（CD80）やB7-2（CD86）といった膜タンパクリガンドによる副刺激（第2シグナル）を受けてはじめてT細胞が活性化され、がんに対する免疫機能が誘導されることが明らかにされた。

一方、複合脂質膜（ハイブリッドリポソーム）を薬物送達システム（DDS）のドラッグキャリアーとして用いる研究において、ニトロソウレア系抗がん剤、フラボノイド、天然由来成分、インシュリンペプチドおよび多価不飽和脂肪酸などをハイブリッドリポソーム

ムに含有させた結果、とくに疎水性の薬剤や生理活性分子はハイブリッドリボソームに効率よく取り込まれ、溶解性や安定性の改善、薬効効果の向上が観測されるなど、ハイブリッドリボソームのドラッグキャリアーとしての有用性が明らかになっている。

そこで、本研究では、複合脂質膜の新しい医用工学的応用として、免疫賦活因子を組み込んだ、がんの免疫治療へ応用可能な新しい複合脂質膜の創製を検討した。

2. 研究の目的

本研究では、上皮性がん細胞に分泌されるムチン MUC-1 のペプチドを腫瘍抗原とし、また、膜タンパク B7-1 を活性化補助シグナルのリガンドとして用いることで、T 細胞系の腫瘍免疫を誘導増強する抗原提示細胞と同様の機能を複合脂質膜系で発現可能と考えた。そこで、B7-1 を組換えタンパク質として調製し、また、ムチン MUC-1 のペプチド誘導体を化学合成して複合脂質膜に組み込み、その免疫誘導効果について検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) マウス B リンパ腫瘍細胞 (A20 細胞 (ATCC)) は、培地 RPMI-1640 に血清 (FBS) 10% と 2-メルカプトエタノール (0.05mM) を添加したものをを用い、37°C、湿度 95%、5% CO₂ の条件で培養した。

(2) A20 細胞からのトータル RNA の抽出は、ChargeSwitch Total RNA Cell Kits (invitrogen) を用いて行った。得られた RNA サンプルを 10mM Tris-HCl 緩衝液 (pH7.0) で希釈し、分光光度計 (U-2000 (日立)) を用いて 260nm と 280nm の吸光度 (OD₂₆₀、OD₂₈₀) を測定した。

(3) SuperScript One-Step RT-PCR System with Platinum Taq (invitrogen) を用い、サーマルサイクラ (PC708 (アステック)) を使用して図 1

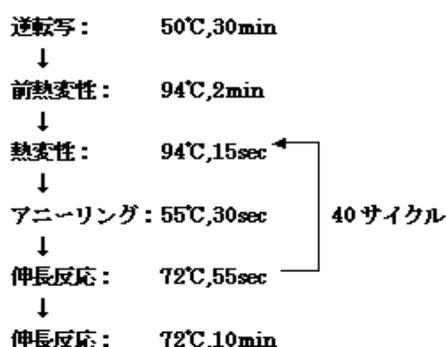


図 1 RT-PCR の温度プログラム

の温度プログラムの RT-PCR を行い、A20 細胞のトータル RNA より mB7-1 の 2 本鎖 cDNA (mB7-1cDNA) を得た。また、RT-PCR 産物を鋳型 DNA とし、PCR で mB7-1cDNA を複製した。用いたプライマーの配列を以下に示した。

mB7-1 センスプライマー (nippon gene) :
 5'-ggtagcatggcttgcattgtcagttg-3' (27 mer)
 5'-cggggtaccatggcttgcattgtcagttg-3' (30 mer)
 mB7-1 アンチセンスプライマー (nippon gene) :
 5'-ctcagcctaagaagacggctg-3' (24 mer)
 5'-ccgctcagcctaagaagacggctg-3' (27 mer)

DNA の精製は、illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE healthcare) を用いて行った。

(4) 複製した mB7-1 cDNA と市販の哺乳類細胞発現用プラスミドベクター (pcDNA3.1/Hygro(+)) (invitrogen) は、それぞれ *Xho* I (和光純薬工業) と *Kpn* I (和光純薬工業) の制限酵素で 2 段階処理を行った後、DNA Ligation Kit Ver.2.1 (タカラバイオ) でライゲーションを行った。One Shot TOP10 Chemically Competent *E. coli* (invitrogen) を用い、ライゲーション反応液で大腸菌 (*E. coli* K12 誘導体) を形質転換し、アンピシリン含有 LB プレートに植菌して 37°C で 16h 培養した。

(5) 形質転換した大腸菌のシングルコロニーをピックアップし、Pfx50 DNA Polymerase (invitrogen) を用いてインサートチェック PCR を行った。プライマーは、pcDNA3.1/Hygro(+)) のマルチクロニングサイトの両外側に相補性のある以下のものを用いた。

T7 プロモータープライマー (invitrogen) :
 5'-taatacagactcactataggg-3'
 BGH リバースプライマー (invitrogen) :
 5'-tagaaggcacagtcgagg-3'

インサートチェック後、形質転換した大腸菌をアンピシリン含有 LB 液体培地を用いて 37°C で一晩振とう培養した。得られた培養液を遠心処理して集菌し、HiSpeed Plasmid Midi Kit (QIAGEN) を用いて組換えプラスミドを抽出・精製した。

(6) 組換えプラスミド中の mB7-1 について、ダイナーミネーター法によりシーケンス解析を行った。T7 プロモータープライマーと BGH リバースプライマーを用い、mB7-1 の上流側と下流側よりシーケンス反応を行った。

(7) mB7-1cDNA を組み込んだ組換えプラス

ミド (pcDNA3.1/Hygro(+)/mB7-1) をリポフェクション法によりタンパク質発現用のチャイニーズハムスター卵巣由来細胞 (CHO-S 細胞 (GIBCO)) へトランスフェクトした。リポフェクトアミン 2000 (invitrogen) を使い、トランスフェクション用の CD-CHO 培地 (invitrogen) に懸濁した CHO-S 細胞に pcDNA3.1/Hygro(+)/mB7-1 のトランスフェクション処理を施し、処理後 2 日目より選択試薬ハイグロマイシン B (invitrogen) を添加 (最終濃度 200 μ g/ml) して振とう培養 (37 $^{\circ}$ C、湿度 95%、8%CO₂、130rpm) した。

(8) ムチン MUC-1 の抗原ペプチド誘導体の合成を Fmoc 固相法により行った。Fmoc-L-アミノ酸には、Fmoc-Ala-OH (国産化学)、Fmoc-Gly-OH (国産化学)、Fmoc-Pro-OH (渡辺化学工業)、Fmoc-Val-OH (国産化学)、側鎖に保護基を持つものとして、Fmoc-Arg (Mtr)-OH (渡辺化学工業)、Fmoc-Asp(OtBu)-OH (渡辺化学工業)、Fmoc-His(Trt)-OH (渡辺化学工業)、Fmoc-Lys(Pal)-OH (Bachem)、Fmoc-Ser(tBu)-OH (渡辺化学工業)、Fmoc-Thr(tBu)-OH (渡辺化学工業) を用いた。縮合剤、カップリング試薬として、ジイソプロピルカルボジイミド (DIC (国産化学))、4-ジメチルアミノピリジン (DMAP (国産化学))、ベンゾトリアゾ-1-イル-オキシ-トリス (ピロリジン) ホスホニウムヘキサフルオロホスフェート (PyBOP (国産化学))、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (HOBt (ハイペップ研究所)) を用いた。また、クリーベージ試薬として、トリメチルシリルブロミド (TMSBr (渡辺化学工業))、チオアニソール (国産化学)、トリフルオロ酢酸 (TFA (国産化学)) を使用した。

(9) 固相合成は、固相合成用反応装置 SPS Reactor 96 ポジション (J-KEM) を使い、まず、ヒドロキシメチルフェノキシ型のリンカーを持つ担持樹脂 (TentaGel S-PHB (ハイペップ研究所)) に C 末端のリシンを DIC と DMAP を用いる対称無水物法でエステル化して導入した。未反応部位は、塩化ベンゾイル (国産化学) でキャッピング処理した。得られた樹脂をピペリジンで処理し、分光光度計で 301nm の吸光度を測定してリシンの導入率を算出した。次に、20%ピペリジン (国産化学) で脱 Fmoc 反応を行った後、Fmoc-アミノ酸を PyBOP と HOBt で活性化してダブルカップリング法によりペプチド鎖を伸長した。脱 Fmoc 反応とカップリング反応は、サンプリングした樹脂の Kaiser テスト (国産化学) で確認した。また、1M TMSBr/チオアニソール/TFA 溶液でクリーベージし、樹脂からのペプチドの切り出しと脱保護反応を行った。

(10) 得られた生成物の分析は、ODS カラム (Mightysil RP-18、 ϕ 4.6mm \times 250mm、関東化学) を用いた逆相 HPLC (ポンプ: PU-2089 (日本分光)、検出器: L-4200 UV-VIS (日立)、記録計: D-2500 (日立)) で行った。移動相に 0.1%TFA を含有した H₂O/C₂H₅OH 混合溶媒を流速 0.8ml/min で用い、室温において 220nm の波長で検出した。

(11) リン脂質 L- α -ジミリスチルホスファチジルコリン (DMPC (日本油脂))、ミセル界面活性剤ポリオキシエチレン(23)ラウリルエーテル (C₁₂(EO)₂₃ (シグマ)) および蛍光リン脂質 1-パルミトイル-2-[12-(7-ニトロ-2-1,3-ベンゾキサジアゾイ-4-イル)アミノ]ドデカノイル]-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (NBDPC (フナコシ)) を緩衝溶液 (PBS(-)) 中でバス型超音波照射器 (VELVO-CLEANER-URATRASON-VS-N300S) により超音波照射処理 (300W、45 $^{\circ}$ C) し、複合脂質膜 (90mol%DMPC/10mol%C₁₂(EO)₂₃/4mol%NBDPC) を調製した。調製した複合脂質膜溶液は、0.20 μ m フィルターで濾過した。

(12) 複合脂質膜の膜サイズは、粒径分布測定装置 (ELS-800 (大塚電子)) を用いて、動的光散乱法により測定した。光源として、He-Ne レーザーの 632.8nm の発振線を出力 5mW で使用し、散乱角 90 度で得られた拡散係数 (D) を次式 (Stokes-Einstein の式) に代入して膜の直径 (d_{hy}) を求めた。ここで、 κ は Boltzmann 定数、 T は絶対温度、 η は溶液の粘度である。

$$d_{hy} = \kappa T / 3\pi\eta D$$

4. 研究成果

(1) A20 細胞より抽出したトータル RNA (OD₂₆₀/OD₂₈₀>1.8) を使い、mB7-1 に特異的な 27mer のセンスプライマーと 24mer のアンチセンスプライマーで RT-PCR を行った。さらに、得られた RT-PCR 産物を鋳型 DNA として PCR を行った。30mer のセンスプライマーと 27mer のアンチセンスプライマーを用いて行った PCR 産物のアガロース電気泳動の結果を図 2 に示した。660bp 付近に非特異的な副産物に由来すると考えられるバンドが検出されたが、930bp 付近に強いバンドが観測され、目的の mB7-1cDNA (939bp) が得られたことが示唆された。

(2) 精製した 930bp 付近の PCR 産物とプラスミド pcDNA3.1/Hygro(+) を制限酵素 *Xho* I と *Kpn* I で処理した後、ライゲーション反応を行い、大腸菌を形質転換した。形質転換した大腸菌を LB プレートに植菌し、37 $^{\circ}$ C で 16h 培養し、生成したコロニー数は非常に

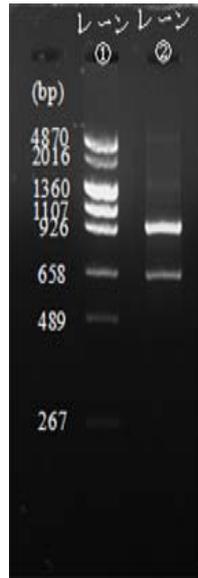


図2 PCR産物のアガロース電気泳動
 レーン①：pHY マーカー
 レーン②：PCR産物

少なかった (7.14×10^2 cfu/ μ g)。しかしながら、シングルコロニーをピックアップし、インサートチェックを行った結果、mB7-1cDNAが pcDNA3.1/Hygro(+) に挿入された際に観測されるサイズ (1036 bp) 付近にバンドが検出され (図3のレーン①、④、⑥、⑬)、目的の組換えプラスミドが導入された大腸菌株が得られた可能性が示された。

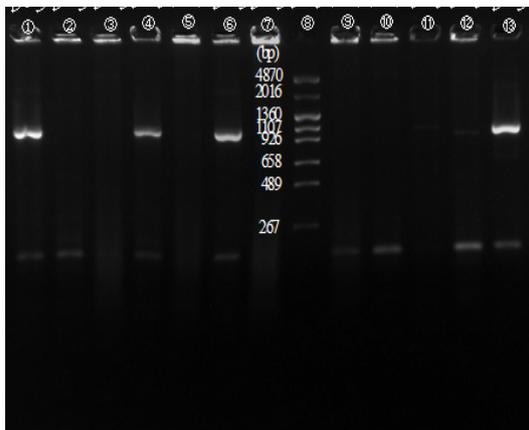


図3 形質転換した大腸菌のインサートチェック

(3) インサートチェックで 1036 bp 付近にバンドが観測されたコロニーを液体培養し、組換えプラスミドを抽出・精製した。得られた組換えプラスミドのアガロース電気泳動を行ったところ、mB7-1cDNA が pcDNA3.1/Hygro(+) に挿入されたサイズの 6.4 kbp 付近

にバンドが観測された (図4)。また、組換えプラスミドを鋳型 DNA とし、mB7-1 に特異的な 30 mer のセンスプライマーと 27mer のアンチセンスプライマーを用いた PCR (PCR-1)

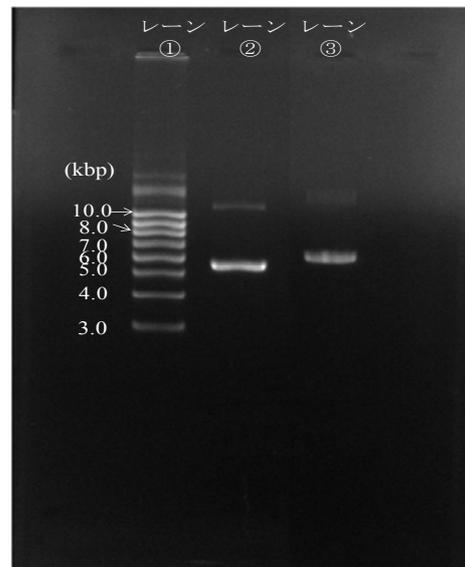


図4 組換えプラスミドのアガロース電気泳動
 レーン①：Supercoiled Plasmid マーカー
 レーン②：pcDNA3.1/Hygro(+)
 レーン③：組換えプラスミド



図5 組換えプラスミドのインサートチェック
 レーン①：pcDNA3.1/Hygro(+) (PCR-1)
 レーン②：組換えプラスミド (PCR-1)
 レーン③：pHY マーカー
 レーン④：組換えプラスミド (PCR-2)
 レーン⑤：pcDNA3.1/Hygro(+) (PCR-2)

と T7 プロモータープライマー・BGH リバースプライマーを用いた PCR (PCR-2) を行った。各 PCR 産物のアガロース電気泳動の結果を図 5 に示したが、PCR-1 産物では mB7-1cDNA のサイズに相当する 930 bp 付近のバンドが観測され (図 5 レーン②)、PCR-2 では産物、形質転換した大腸菌のインサートチェックと同様に、1036 bp 付近にバンドが観測された (図 5 レーン④)。さらに、組換えプラスミドのシーケンス解析を行ったところ、マルチクローニングサイト内に mB7-1 の配列が確認できた。これらの結果より、mB7-1cDNA が pcDNA3.1/Hygro(+) に挿入された目的の組換えプラスミド pcDNA3.1/Hygro(+)/mB7-1 が得られたことが明らかになった。

以上の様にして得られた組換えプラスミド pcDNA3.1/Hygro(+)/mB7-1 をチャイニーズハムスター卵巣由来の CHO-S 細胞にリポフェクション法でトランスフェクトした後、選択試薬ハイグロマイシン B を用いて培養した。選択開始約 7 日後よりハイグロマイシン B に耐性のある CHO-S 細胞が増殖し、導入遺伝子発現細胞株の存在が示された。

(4) ムチン MUC-1 は、20 個のアミノ酸配列を 25~100 回以上繰り返すタンデムリピート構造を細胞外ドメインとして発現している。そこで、T 細胞がエピトプとして認識するタンデムリピート内のアミノ酸配列 Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro を含む 20 個のアミノ酸残基と、ペプチドが複合脂質膜に効率よく組み込まれるように長鎖アルキル基 (パルミトイル基) を側鎖に有する 2 個のリシン残基からなる 22mer のオリゴペプチドを Fmoc 固相合成法により検討した。以下のアミノ酸配列のペプチド誘導體 (1G-20H21K(Pal)22K(Pal)) の合成について述べる。

NH₂-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-Pro-Ala-His-Lys(Pal)-Lys(Pal)-OH

まず、ペプチド誘導體の C 末端になる Fmoc-Lys(Pal)-OH を DIC と触媒量の DMAP を用いて樹脂に導入したところ、0.046mmol/g の Fmoc-Lys(Pal)樹脂が得られた。本樹脂を固相担体とし、PyBOP と HOBt を縮合剤として Fmoc-アミノ酸のカップリング反応を行い、ペプチド誘導體 1G-20H21K(Pal)22K(Pal)を合成した。生成物は、樹脂に導入された C 末端の Fmoc-Lys(Pal)量を基準として 49%の収率であり、HPLC の分析では単一ピークが示され、目的の 1G-20H21K(Pal)22K(Pal)が得られたことが示唆された。

(5) 緩衝溶液中で超音波照射処理により調製した複合脂質膜の直径(d_{hy})の経時変化を図 6 に示した。図から明らかのように、複合脂質膜は約 3 週間以上、直径 50~60nm の安定な膜を形成することが明らかになった。約 100nm 以下のサイズのリポソームは細網内皮系 (RES) を回避できることが知られており、腫瘍免疫治療への応用において、本複合脂質膜が生体内で有効に機能する可能性が示された。

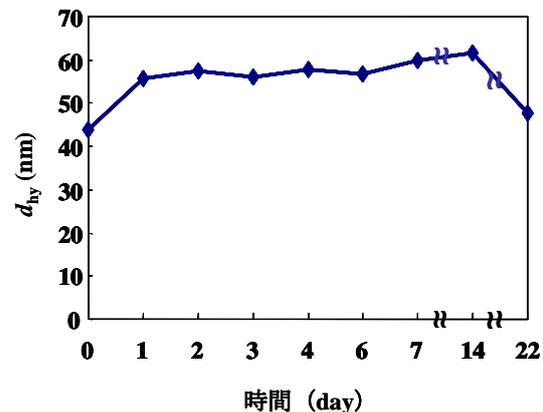


図 6 複合脂質膜のサイズの経時変化

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)

[学会発表] (計 2 件)

- ① 永田未歩、蛍光脂質含有ハイブリッドリポソームのがん診断薬への応用、化学工学会第 73 年会、2008 年 3 月 19 日、静岡
- ② 後藤浩一、ハイブリッドリポソームのヒト末梢血単核細胞に対する免疫賦活効果、第 11 回がん分子標的治療研究会総会、2007 年 7 月 6 日、大阪

6. 研究組織

(1) 研究代表者

後藤 浩一 (GOTO KOICHI)
 崇城大学・生物生命学部・准教授
 研究者番号：30279377

(2) 研究分担者

上岡 龍一 (UEOKA RYUICHI)
 崇城大学・生物生命学部・教授
 研究者番号：70099076