

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19H04465

研究課題名（和文）細胞移動制御による免疫シフトマテリアルの開発

研究課題名（英文）Development of immune shift materials by controlling cell mobility

研究代表者

木村 剛（Tsuyoshi, Kimura）

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・准教授

研究者番号：10393216

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,300,000円

研究成果の概要（和文）：腫瘍での免疫監視を逃避した免疫抑制状態を解除するため、空洞性材料にTreg細胞をリクルート・捕獲する免疫シフトマテリアルの開発を行った。空洞性材料表面に細胞非接着性ポリマーおよび抗Treg抗体を修飾した免疫シフトマテリアルを設計・合成した。抗体-抗原反応を介したTreg細胞の捕獲をin vitro・in vivoで実現し、担がんマウスモデルでの腫瘍増大抑制効果が示され、免疫シフトマテリアルの有用性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん免疫療法に対する新しい治療戦略として、腫瘍周辺の免疫抑制状態を解除する免疫シフトマテリアルの開発を提案した。免疫抑制性細胞である制御性T細胞の本免疫シフトマテリアルを用いた腫瘍近傍からの移動により腫瘍増殖減少を示したことは、空間的細胞制御が免疫状態に関係することを明らかとした点において学術的意義は大きい。また、本免疫シフトマテリアルはがん免疫等の様々な免疫疾患に応用が期待され、社会的意義を有する。

研究成果の概要（英文）：We designed and synthesized an implantable anti-CD25 antibody-immobilized materials (CD25-materials) to suppress tumor growth by removing regulatory T cells (Tregs). The surface of material was graft-polymerized with poly(acrylic acid), and the anti-mouse CD25 antibody was then immobilized. The CD25-material could effectively and selectively capture CD25-positive cells through antigen-antibody interactions. In addition, implantation of the CD25-material into mice subcutaneously demonstrated the Treg-capturing ability with only a weak inflammatory reaction. In tumor-bearing mice, tumor growth was suppressed by subcutaneous implantation of the CD25-material near the tumor for 1 week. These results suggested that the anti-CD25 antibody-immobilized material could capture Tregs in vivo and inhibit tumor proliferation. Further research is needed to facilitate cancer immunotherapy using implantable anti-CD25 antibody-immobilized material as a Treg-capturing device.

研究分野：生体材料学

キーワード：生体材料 バイオ界面 免疫シフト

1. 研究開始当初の背景

免疫系のバランス調節においては、免疫抑制性と免疫亢進性の T 細胞が主要な役割を果たしており、がんや自己免疫疾患などの重篤な疾病ではそれらのバランスが乱れた状態にある。特に、腫瘍内では、がん増殖的かつ免疫抑制的な状態であるがん微小環境を形成していることが知られており、免疫監視を逃避した免疫抑制状態にある。この免疫抑制状態に強く関与する細胞の一つとして制御性 T 細胞 (Treg 細胞) が挙げられ、Treg 細胞は正常組織に比べ腫瘍組織にて高い割合で集積している。免疫抑制状態の解除を目的とした腫瘍組織からの Treg 細胞の薬剤的除去治療などが試みられているが、Treg 細胞は自己免疫抑制にも関与していることから、全身性の投薬等では自己免疫疾患を惹起する危険性がある。例えば、免疫チェックポイント抗体の投与では Treg の除去により大腸炎・下垂体炎などの自己免疫症状が副作用として生じると報告されている。したがって、より腫瘍選択的な Treg 細胞の除去法の開発が求められる。申請者は、体外循環下で体内全身から免疫細胞を選択的に捕獲・回収する「免疫細胞捕集デバイス」を開発に取り組んでおり (2016~2018 年度 科研費基盤研究 (B))、現在までに、選択的に免疫細胞を捕獲し、効率的に捕獲細胞を回収する基盤技術を確立した。細胞非接着性に修飾した基材に標的細胞特異的な抗体を固定化する技術である。Treg 細胞の表面抗原に対する抗体 (抗 CD25 抗体) を固定化した基材では、効率的な Treg 細胞の捕獲を達成できた。この研究を実施中、抗体固定化基材の生体内埋植において、免疫抑制性の Treg に対する抗 CD25 抗体を固定化した基材では炎症の惹起は認められず、一方、免疫亢進性の細胞障害性 T 細胞に対する抗 CD8 抗体を固定化した基材では強い炎症が認められた。この結果は、抗体固定化基材が特定の免疫細胞の配置を規定し、それを反映した生体反応と解釈できる。そこで申請者は、本技術を発展させ、Treg 特異的な抗体を固定化した空洞性材料 (多孔質、繊維性) を腫瘍近傍に留置させることで、腫瘍から Treg 細胞を空洞性材料にリクルート・捕獲し、腫瘍での免疫抑制状態を解除できるのではないかとの発想に至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、Treg 細胞選択的に誘引・捕獲する免疫シフトマテリアルを開発し、免疫シフトマテリアルへの Treg 細胞の移動を介した腫瘍からの Treg 細胞選択的な除去による免疫抑制状態の解除を実証することである。開発する免疫シフトマテリアルは、Treg 細胞を選択的に捕獲するために空洞性材料表面を細胞非接着性ポリマーのグラフトにて改質し、Treg 細胞に対して特異的な認識分子 (抗 CD25 抗体) を固定化し、腫瘍近傍に留置し、Treg 細胞を捕獲することで免疫抑制状態を解除する戦略にある。本研究を実現するためには、がん細胞、間質細胞、免疫細胞のそれぞれの細胞移動に関する基礎的研究が必要であり、三次元空間への細胞移動の制御要素の解明を目指す。表面を構成するグラフト鎖、認識分子の種類、密度、固定化法やそれらの組み合わせを変えて合成し、各パラメータが Treg 捕獲にどのように影響を及ぼすかを明らかにする。また、各要素の寄与に関する知見を基に Treg 高捕獲率な免疫シフトマテリアルを合成する。さらに、疾患モデル動物を作出し、開発した免疫シフトマテリアルを用いた免疫抑制状態解除の有効性を示す。

3. 研究の方法

本研究では、腫瘍内の Treg 細胞を免疫シフトマテリアルに誘引、捕獲することで、腫瘍組織での免疫抑制状態を解除することを目指し、(1) Treg 細胞に対する捕獲・捕獲分子を固定した免疫シフトマテリアルの合成、(2) 免疫シフトマテリアルの Treg 細胞選択的誘引・捕獲機能の評価 (in vitro/in vivo)、(3) がんモデル動物での免疫シフトマテリアルを用いた免疫抑制状態の解除を研究の大項目として研究を実施した。(1) について、細胞非接着性ポリマーでグラフトすうことで改質し、Treg に対して特異的な認識分子 (抗 CD25 抗体) を固定化するように設計し、合成した。(2) について、Treg を脾臓より採集し、in vitro での Treg 捕獲効率を検討した。また、皮下埋入し、マテリアル近傍の Treg 局在を検討した。(3) について、がん細胞を用いたモデル動物の作成し、腫瘍近傍へのマテリアル留置後の腫瘍増大を検討した。

4. 研究成果

(1) Treg 細胞に対する捕獲・捕獲分子を固定した免疫シフトマテリアルの合成については、多孔質材料および繊維性材料に Treg 特異的に作用する抗体を導入することが可能であった (図 1, 2)。抗体固定化の制御が可能であり、基盤的な手法を確立できた (図 3)。(2) 免疫シフトマテリアルの Treg 細胞選択的誘引・捕獲機能の評価 (in vitro/in vivo) については、in vitro において、Treg 細胞の高効率な捕獲が示され、また、他の細胞との共存においても Treg 細胞の捕獲が可能であった。また、抗体固定化量の増加に伴う捕獲効率の向上が示さ

れた。以上のことから、免疫シフトマテリアルの Treg 細胞への高い特異性が示された (図 4)。In vivo においては、正常マウスの皮下への導入にて Treg 細胞の免疫シフトマテリアル周囲への集積が確認でき、in vivo においても Treg の誘引・捕獲が示された (図 5)。(3) ががんモデル動物での免疫シフトマテリアルを用いた免疫抑制状態の解除については、担がんマウスの近傍付近への免疫シフトマテリアルの留置において、腫瘍増殖の抑制が示された。腫瘍の抑制メカニズムに関する詳細な検討が必要ではあるが、免疫シフトマテリアルの応用可能性が示された。

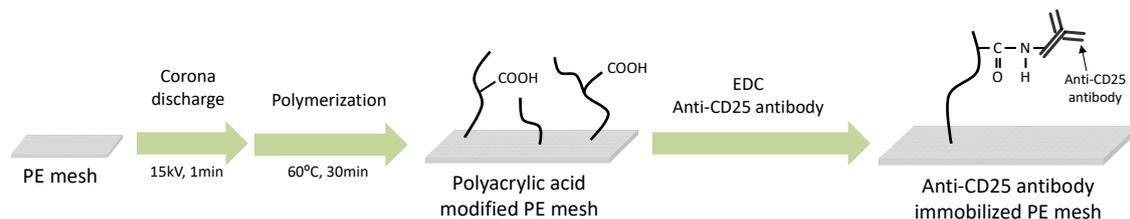


図 1. 免疫シフトマテリアルの合成

Mesh (PE)				Porous material (PE, Sunfine AQ)		
Fiber diameter (μm)	Pitch (μm/μm)	PAAc grafted (Feed: 5 wt%)	Antibody immobilized (Feed: 50 μg/ml)	Pore size (μm)	PAAc grafted (Feed: 5 wt%)	Antibody immobilized (Feed: 50 μg/ml)
86	76/163			32		
86	125/163			61		
212	392/423			157		

*Amount of immobilized antibody: 2.3μg/cm²

図 2. 多孔質材料および繊維性材料への抗体固定化

Acrylic acid conc.(%)	Methylene blue staining	Anti-CD25 antibody concentration[μg/ml]			
		0	0.5	5	50
0					
2					
5					

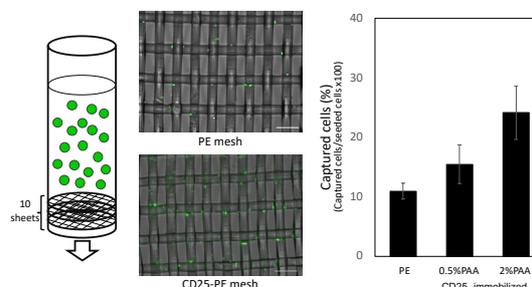


図 3. 抗体固定化の制御

図 4. 脾臓細胞内の CD25 陽性細胞の捕獲

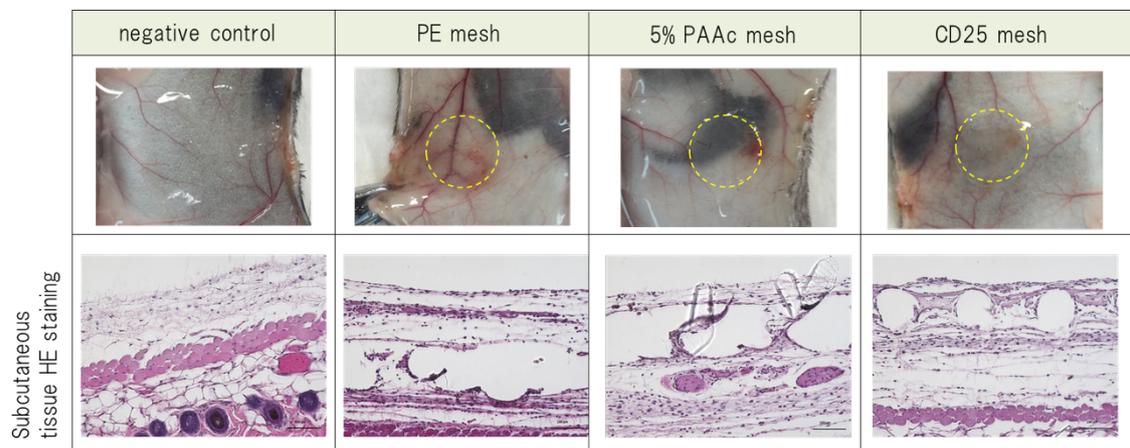


図 5. 免疫シフトマテリアル周囲への Treg 集積 (マウス皮下)

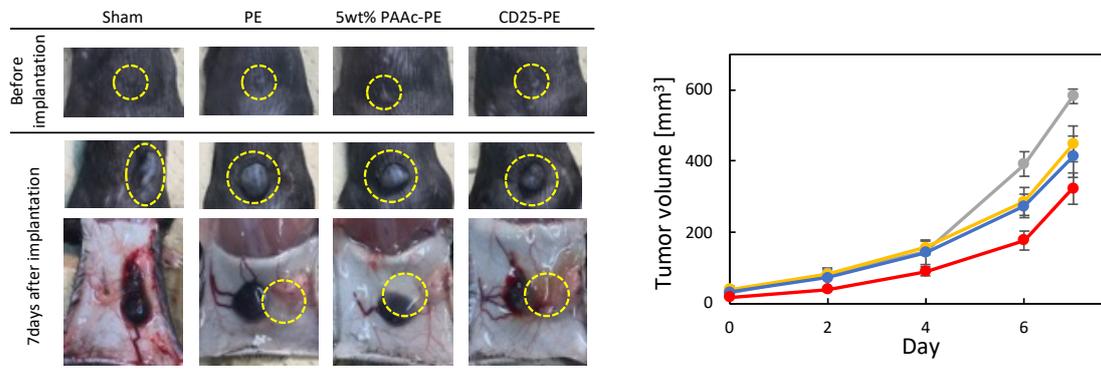


図 6. 免疫シフトマテリアル埋植による腫瘍増大抑制 (担がんマウス)

以上より、本研究課題では、*in vivo* で免疫細胞を選択的にかつ高効率に捕獲することによる免疫制御の可能性を示し、本研究のコンセプトである細胞移動を介した免疫シフトによる免疫調節を実証した。今後のさらなる改良により免疫シフトマテリアルの広範な応用が可能となると考えられ、免疫調節マテリアルとしての発展の可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Tsuyoshi Kimura, Mayuka Kondo, Yoshihide Hashimoto, Toshiya Fujisato, Naoko Nakamura, Akio Kishida	4. 巻 5
2. 論文標題 Surface morphology of PDMS replica transferred from various decellularized aortic lumens affects cellular orientation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ACS Biomaterials Science and Engineering	6. 最初と最後の頁 5721-5726
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acsbmaterials.8b01536	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 -
1. 著者名 Naoko Nakamura, Ai Ito, Tsuyoshi Kimura, Akio Kishida	4. 巻 20
2. 論文標題 Extracellular matrix induces the periodontal ligament reconstruction in vivo	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3277
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms20133277	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Naoko Nakamura, Kazuki Saito, Tsuyoshi Kimura, Akio Kishida	4. 巻 66
2. 論文標題 Recellularization of decellularized cancellous bone scaffolds using low-temperature cell seeding	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Tissue and cell	6. 最初と最後の頁 101385
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.tice.2020.101385	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 -
1. 著者名 Mako Kobayashi, Junpei Kadota, Yoshihide Hashimoto, Toshiya Fujisato, Naoko Nakamura, Tsuyoshi Kimura, Akio Kishida	4. 巻 21
2. 論文標題 Elastic modulus of ECM hydrogel derived from decellularized tissue affects capillary network formation of endothelial cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 6304
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms21176304	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Mako Kobayashi, Masako Ohara, Yoshihide Hashimoto, Naoko Nakamura, Toshiya Fujisato, Tsuyoshi Kimura, Akio Kishida	4. 巻 16
2. 論文標題 Effect of luminal surface structure of decellularized aorta on thrombus formation and cell behavior	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLoS one	6. 最初と最後の頁 e0246211
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0246221	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tsuyoshi Kimura, Rino Tokunaga, Yoshihide Hashimoto, Naoko Nakamura, Akio Kishida	4. 巻 22
2. 論文標題 Tumor growth suppression by implantation of an anti-CD25 antibody-immobilized material near the tumor via regulatory T cell capture	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Science and technology of advanced materials	6. 最初と最後の頁 607-615
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/14686996.2021.1944782	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yoshihide Hashimoto, Akitatsu Yamashita, Jun Negishi, Tsuyoshi Kimura, Seiichi Funamoto, Akio Kishida	4. 巻 8
2. 論文標題 4-Arm PEG-Functionalized Decellularized Pericardium for Effective Prevention of Postoperative Adhesion in Cardiac Surgery	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ACS Biomaterials Science & Engineering	6. 最初と最後の頁 261-272
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsbmaterials.1c00990	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 -

〔学会発表〕 計21件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 8件)

1. 発表者名 石山雄大, 赤岩拓未, 木村剛, 中村奈緒子
2. 発表標題 血液中から特定細胞の捕獲を行う細胞脱着フィルターの開発
3. 学会等名 2020年度ライフサポート学会細胞制御工学研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 戸田翔太, 橋本良秀, 木村剛, 岸田晶夫
2. 発表標題 マクロファージ担持マイクロ粒子を用いた生体材料の免疫学的評価法の開発
3. 学会等名 2020年度ライフサポート学会細胞制御工学研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 戸田翔太, 橋本良秀, 木村剛, 岸田晶夫
2. 発表標題 生体材料の免疫学的評価を目指したマクロファージ担持マイクロ粒子の作製
3. 学会等名 第15回ナノ・バイオメディカル学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中村奈緒子, 石山雄大, 赤岩拓未, 中根貴道, 木村剛, 岸田晶夫
2. 発表標題 がん治療を目指した血液中からの選択的細胞捕集の検討
3. 学会等名 第58回人工臓器学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 徳永梨乃, 木村剛, 橋本良秀, 中村奈緒子, 岸田晶夫
2. 発表標題 抗CD25抗体固定化材料を用いたTreg捕獲による腫瘍抑制
3. 学会等名 第48回医用高分子シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Akio Kishida, Rino Tokunaga, Yoshihide Hashimoto, Naoko Nakamura, Tsuyoshi Kimura
2. 発表標題 Development of an antibody-immobilized filter for capture of target cells
3. 学会等名 ESB2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木村剛, 徳永梨乃, 橋本良秀, 中村奈緒子, 岸田晶夫
2. 発表標題 Treg捕獲による腫瘍抑制を目指した抗CD25抗体固定化フィルターの開発
3. 学会等名 LIFE2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木村剛, 徳永梨乃, 橋本良秀, 坂口志文, 木村俊作, 中村奈緒子, 岸田晶夫
2. 発表標題 免疫細胞捕獲を介したがん免疫調節の可能性
3. 学会等名 第68回高分子討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tsuyoshi Kimura
2. 発表標題 Immunomodulation and biological tissue
3. 学会等名 ASAIO The 65th Annual Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Naoko Nakamura, Takumi Akaiwa, Tsuyoshi Kimura, Akio Kishida
2. 発表標題 Cell capturing using antibody-immobilized filter under flowing conditions
3. 学会等名 4th International Symposium on Biomedical Engineering 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tsuyoshi Kimura, Rino Tokunaga, Yoshihide Hashimoto, Naoko Nakamura, Akio Kishida
2. 発表標題 Development of an implantable immunomodulatory material based on cell moving for cancer treatment
3. 学会等名 IFA02019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木村剛, 徳永梨乃, 前田華子, 橋本良秀, 中村奈緒子, 岸田晶夫
2. 発表標題 Treg捕獲を介する免疫調節材料の開発
3. 学会等名 第41回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 徳永梨乃, 木村剛, 橋本良秀, 中村奈緒子, 岸田晶夫
2. 発表標題 抗CD25抗体固定化材料を用いたTreg捕獲による腫瘍抑制
3. 学会等名 第41回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木村剛, 徳永梨乃, 橋本良秀, 中村奈緒子, 岸田晶夫
2. 発表標題 抗CD25抗体固定化材料の埋入による腫瘍抑制
3. 学会等名 第70回高分子学会年次大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 木村剛, 戸田翔太, 前田華子, 橋本良秀, 松島隆英, 野村渉, 浅原弘嗣, 岸田晶夫
2. 発表標題 デザイナー細胞による高分子生体材料評価法の開発
3. 学会等名 第70回高分子討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 木村剛, 徳永梨乃, 橋本良秀, 中村奈緒子, 岸田晶夫
2. 発表標題 がん免疫治療を目指した抗体固定化材料による腫瘍抑制
3. 学会等名 LIFE2020-2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shota Toda, Yoshihide Hashimoto, Tsuyoshi Kimura, Akio Kishida
2. 発表標題 Preparation of macrophage adhering particles for immunological evaluation of biomaterials
3. 学会等名 TERMIS-WC2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 T. Kimura, R. Tokunaga, Y. Hashimoto, N. Nakamura, A. Kishida,
2. 発表標題 Tumor suppression by capturing of Tregs with an anti-CD25 antibody-immobilized material
3. 学会等名 第8回アジアバイオマテリアル学会 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tsuyoshi Kimura, Rino Tokunaga, Yoshihide Hashimoto, Naoko Nakamura, Akio Kishida
2. 発表標題 Tumor growth suppression by releasing cancer immune suppression using an anti-CD25 antibody-immobilized material
3. 学会等名 Materials Research Meeting 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tsuyoshi Kimura, Rino Tokunaga, Moeko Hagiwara, Yoshihide Hashimoto, Naoko Nakamura, Akio Kishida
2. 発表標題 Tumor growth suppression by releasing cancer immune suppression using an anti-CD25 antibody-immobilized material
3. 学会等名 SFB-JSB joint symposium (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中村奈緒子, 石山雄大, 赤岩拓未, 中根貴道, 木村剛, 岸田晶夫
2. 発表標題 がん治療のための選択的細胞捕集デバイスの開発
3. 学会等名 第43回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東京医科歯科大学生体材料工学研究所物質医工学分野ホームページ
<http://www.labonet.info/kishida/>

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 分 担 者	中村 奈緒子 (Nakamura Naoko) (70754878)	芝浦工業大学・システム理工学部・准教授 (32619)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------