

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24年 5月15日現在

機関番号：37401
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21560813
 研究課題名（和文）がん治療を目指した新しい複合リポソームワクチンの開発
 研究課題名（英文）Development of Novel Vaccine Using Hybrid Liposomes for Cancer Therapy
 研究代表者
 後藤 浩一（GOTO KOICHI）
 崇城大学・生物生命学部・教授
 研究者番号：30279377

研究成果の概要（和文）：本研究では、ムチン MUC-1 の合成ペプチドを腫瘍抗原とし、また、組換えタンパク mB7-1 を T 細胞の活性化シグナル分子として、リン脂質 DMPC と非イオン性界面活性剤 Tween 80 からなる複合リポソーム（ハイブリッドリポソーム）に組み込んだ新しいリポソームワクチン(HL-MUC-1/mB7-1)の創製を試みた。HL-MUC-1/mB7-1 を接種した後、乳がん細胞を播種したがんモデルマウスにおいて延命効果が観測され、がん免疫の新しいリポソームワクチンとしての可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：The immunotherapeutic effects of hybrid liposomes (HL-MUC-1/mB7-1) composed of phospholipids (DMPC) and nonionic surfactants (Tween 80) including synthetic MUC-1 antigen peptides and recombinant mB7-1 proteins were examined. In vivo experiments, the prolonged survival was observed in mouse models with breast cancer cells after the treatment of HL-MUC1/mB7-1. The results suggested that HL-MUC1/mB7-1 could have the possibility of novel liposome vaccine for cancer therapy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

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：免疫学・癌・リポソーム・ワクチン・T細胞

1. 研究開始当初の背景

腫瘍抗原の多くは、がん細胞のタンパク質に由来するペプチド断片である。主要組織適合性遺伝子複合体分子と複合体を形成した後、樹状細胞（DC）やマクロファージなどの抗原提示細胞の表面に提示され、T細胞を刺激することで、抗原特異的エフェクター細胞

を誘導する。そこで、腫瘍抗原と同じアミノ酸配列をもったペプチドが合成され、ペプチドワクチンとして、あるいはペプチドでパルスした DC をワクチンとして、がん免疫治療に応用する試みがなされている。

一方、ベシクル分子とミセル分子を緩衝水溶液中で超音波照射するだけで得られる複

合リポソーム (ハイブリッドリポソーム) は、素材や組成を選択することにより、毒性がなく、長期間安定で細網内皮系 (RES) を回避できるリポソームとして構築できることを明らかにしている。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た研究では、疎水性の薬剤や生理活性分子がハイブリッドリポソームに取り込まれることにより、溶解性や安定性の改善、さらに薬効効果の向上などが観測されている。

これらの研究成果を背景に、本研究では、がん免疫の誘導に係わるペプチドやタンパクをハイブリッドリポソームに組み込んだ新しいリポソームワクチンの創製とその免疫誘導効果について検討した。

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 のペプチドをがん抗原とし、また、膜タンパク B7-1 を T 細胞の活性化シグナル分子として複合リポソームに組み込んだリポソームワクチンの創製を検討した。すなわち、ムチン MUC-1 のオリゴペプチドをペプチド抗原として合成した。また、組換えタンパク質として B7-1 を調製し、ハイブリッドリポソームに組み込んだで複合リポソームワクチンを創製した。マウスに複合リポソームワクチンを接種後、がん細胞を移植し、複合リポソームワクチンの免疫誘導について検討した。

3. 研究の方法

(1) MUC-1 ペプチドの Fmoc 固相合成

ムチン MUC-1 の抗原ペプチドの合成を Fmoc 固相合成法により行った。担持樹脂は、*p*-アルコキシベンジルアルコール樹脂 (Wang 樹脂) (200 - 400 mesh, 0.9 - 1.2 mmol/g) (国産化学) を用いた。Fmoc-L-アミノ酸には、Fmoc-Ala-OH (国産化学)、Fmoc-Gly-OH (渡辺化学工業)、Fmoc-Pro-OH (渡辺化学工業)、Fmoc-Val-OH (渡辺化学工業)、Fmoc-Arg (Pmc)-OH (国産化学)、Fmoc-Asp(OtBu)-OH (渡辺化学工業)、Fmoc-His(Trt)-OH (渡辺化学工業)、Fmoc-Lys(Pal)-OH (渡辺化学工業)、Fmoc-Ser(tBu)-OH (渡辺化学工業)、Fmoc-Thr(tBu)-OH (渡辺化学工業) を用いた。縮合およびカップリング用の試薬として、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)、ベンゾトリアゾール-1-イル-オキシ-トリス (ピロリジノ) ホスホニウムヘキサフルオロホスフェート (PyBOP) (渡辺化学工業)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (HOBt) (国産化学)、*N,N'*-ジイソプロピルエチルアミン (DIEA) (国産化学) を用いた。また、クリ

ーページ試薬として、チオアニソール (渡辺化学工業)、トリフルオロ酢酸 (TFA) (国産化学) を使用した。

固相合成は、マルチ固相合成器 (KMS-3、国産化学) を用い、まず、Wang 樹脂に 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 (和光純薬工業) でカップリング処理した。得られた樹脂をピペリジン (和光純薬工業) で処理し、分光光度計 (U-2000、日立) で 301 nm の吸光度を測定してリシンの導入率を算出した。次に、20% ピペリジンで脱 Fmoc 反応を行った後、Fmoc-L-アミノ酸を PyBOP、HOBt および DIPEA を用い、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、TFA/チオアニソール (95:5) 溶液でクリーページ反応を行った。

得られた粗生成物の精製は、ODS カラム (関東化学、RP-18 GP II、10.0 mm × 250.0 mm) を用いた逆相 HPLC (ポンプ: 日本分光、PU-2089、検出器: 日立、L-4200 UV-VIS、記録計: 日立、D-2500) で行った。移動相に 0.05% TFA を含有した H₂O/CH₃CN (20:80) 混合液を流速 1.0 ml/min で用い、室温において 220 nm の波長で検出した。

(2) 組換えタンパク mB7-1 の調製

T 細胞の活性化シグナル分子の B7-1 膜タンパクは、組換えタンパクとして調製した。マウス B リンパ腫瘍細胞 (A20 細胞) (ATCC) の全 RNA を、ChargeSwitch Total RNA Cell Kits (invitrogen) を用いて抽出し、SuperScript One-Step RT-PCR System with Platinum Taq (invitrogen) を用いた RT-PCR (プライマー: 5'-cggggtaccatggcttgcattgtcagt-3', 5'-ccgctcagctaaaggaagacggctctg-3') により mB7-1 の cDNA を複製した。mB7-1 cDNA を *Xho* I (和光純薬工業) と *Kpn* I (和光純薬工業) で処理した後、市販の哺乳類細胞発現用プラスミドベクター (pcDNA3.1/Hygro(+)) (invitrogen) に DNA Ligation Kit Ver.2.1 (タカラバイオ) でライゲーションを行い、One Shot TOP10 Chemically Competent *E. coli* (invitrogen) を用いて大腸菌を形質転換した。PCR によるインサートチェック後、質転換した大腸菌を液体培養し、HiSpeed Plasmid Midi Kit (QIAGEN) を用いて組換えプラスミドを抽出した。

リポフェクトアミン 2000 (invitrogen) を用いたリポフェクション法により、組換えプラスミドを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) へトランスフェクションした。ハイグロマイシン B を用いて選択培養した後、Triton X-100 を含んだ細胞溶解液で膜タンパ

クを抽出し、NuPAGE Bis-Tris 電気泳動システム (invitrogen) で SDS-PAGE を行い、さらに、PVDF 膜に転写後、WesternBreeze Chemiluminescent Detection System, anti-Goat (invitrogen) を用いたウエスタンブロッティングにより、mB7-1 タンパクの発現を確認した。さらに、FITC 標識ハムスター由来抗 mB7-1 抗体 (BD Pharmingen) と Anti-FITC MicroBeads (Milteny Biotec) を用いた磁気細胞分離法により mB7-1 発現細胞を分離し、FITC 標識ハムスター由来抗 mB7-1 抗体と PI (Molecular Probes) を用いたフローサイトメトリー (EPICS XL, Beckman Coulter) で mB7-1 発現細胞の分離を確認した。

抗マウス mB7-1 抗体 Anti-mouse CD80 (BD Pharmingen) を、HiTrap NHS-activated HP Columns (GE ヘルスケア) にカップリングさせたアフィニティークロマトグラフィーと、ゲルろ過クロマトグラフィー (HiLoad 16/60 Superdex 75 pg, GE ヘルスケア) で mB7-1 発現 CHO 細胞の膜タンパクを処理し、デオキシコール酸のミセルに可溶化した状態で精製物のフラクションを得た。RC 透析チューブ ポア 7 (Spectrum) を用いてフラクションを透析し、mB7-1 の精製物を得た。

(3) 複合リポソームの創製

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) とミセル界面活性剤ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノオレエート (Tween 80) (ナカライテスク) を、5%ブドウ糖水溶液中でバス型超音波照射器 (VELVO-CLEANER, VS-N300S) により超音波照射処理 (45 °C、1 ml/lmin) し、90 mol% DMPC/10 mol% Tween 80 ([DMPC] = 2.00×10^{-3} M、[Tween 80] = 2.22×10^{-4} M) のハイブリッドリポソーム (HL) を調製した。調製した HL にムチン MUC-1 抗原ペプチドと組換えタンパク mB7-1 ([MUC-1] = 50 μ g/ml、[mB7-1] = 10 μ g/ml) を加え、さらに、超音波処理 (45 °C、30 sec) してムチン MUC-1 抗原ペプチドと組換え mB7-1 タンパクを含有したハイブリッドリポソーム (HL-MUC-1/mB7-1) を調製した。調製した HL-MUC-1/mB7-1 は、0.45 μ m フィルターで濾過し、実験に用いた。

HL-MUC-1/mB7-1 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。

(4) 複合リポソームワクチンの免疫誘導実験

HL-MUC-1/mB7-1 の免疫誘導実験は、HL-MUC-1/mB7-1 を C3H/He マウス (5 週齢、雌、約 20 g) (日本クレア) に接種後、ヒト MUC-1 を外来性に発現しているマウス乳がん由来細胞 (MM46-APR-MuC1 cl.1 細胞) (理研バイオリソースセンター) を移植して評価した。

C3H/He マウスをコントロール (5%ブドウ糖水溶液投与) 群、HL 投与群、HL-MUC-1/mB7-1 投与群 (各群 3 匹) に群分けし、試料 100 μ l (DMPC 136 μ g、Tween 80 29 μ g、MUC-1 5 μ g、mB7-1 1 μ g) を皮下投与した。1 週間後、 2.5×10^7 cells/ml の MM46-APR-MuC1 cl.1 細胞 0.20 ml (5.0×10^6 cells/body) を腹腔内に播種した。腹腔内播種後、目視による状態観察や体重測定を行った。

4. 研究成果

(1) ムチン MUC-1 抗原ペプチドの合成

上皮性がん細胞に分泌されるムチン MUC-1 の抗原ペプチドとして、T 細胞が認識するエピトプ配列 (Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala) を含み、また、ハイブリッドリポソームに効率的に組み込まれるように、疎水性のバルミトイル基を有するリシンを付加したペプチドを、Fmoc 法により固相合成した。合成の粗生成物を HPLC で精製・分析したところ、分取されたフラクションでは、単一のピーク ($R_t = 5.8$ min) が観測された (図 1)。また、精製物のマスペクトル分析からは、目的物の分子量が観測され (m/z Calcd for $C_{124}H_{211}N_{29}O_{32}$ 2618.58; found 2619.53)、得られた精製物が目的の MUC-1 ペプチドであることが示された。

(A)

H-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

(B)

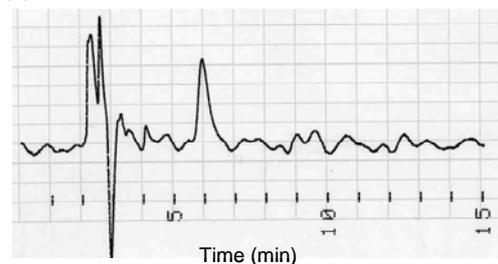


図 1 ムチン MUC-1 ペプチドのアミノ酸配列 (A) と合成ペプチドの HPLC (B)

(2) T 細胞副刺激タンパク mB7-1 の調製

T 細胞の活性化シグナル分子として、B7-1 分子を組換えタンパクとして調製した。マウス B リンパ腫瘍細胞の B7-1 遺伝子を組み込んだ哺乳類細胞発現用プラスミドを用い、チャイニーズハムスター卵巣由来細胞 (CHO 細胞) ヘトランスフェクションし、mB7-1 発現細胞を磁気細胞分離法により分取した。mB7-1 発現 CHO 細胞より膜タンパクを抽出し、アフィニティークロマトグラフィーで精製した。アフィニティークロマトグラフィーで得られた試料のウエスタンブロッティングの結果を図 2 に示した。文献に報告されて

いる約 60 kDa のサイズ付近にバンドが観測され、組換え mB7-1 が得られたことが確認できた。本研究では、さらにゲルろ過クロマトグラフィーで精製して実験に用いた。

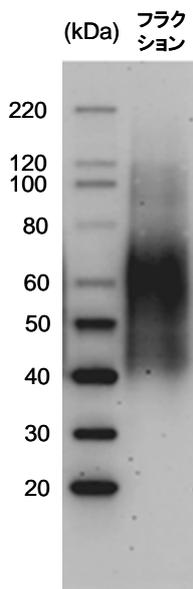


図2 組換え mB7-1 のウェスタンブロッティング

(3) 複合リポソームの物性

リン脂質 DMPC と非イオン性ミセル界面活性剤 Tween 80 からなるハイブリッドリポ

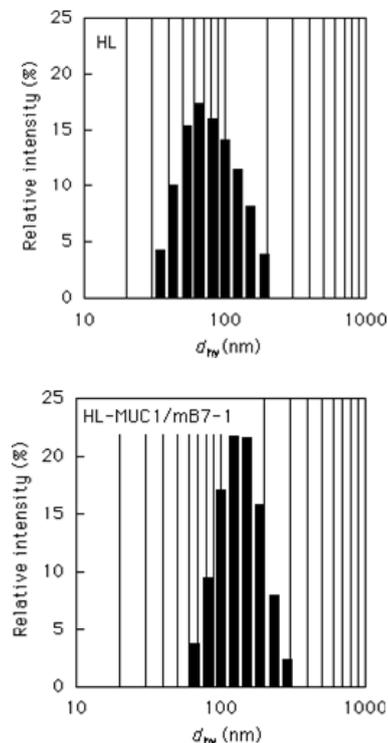


図3 複合リポソームの膜サイズ分布
[DMPC] = 2.00×10^{-3} M、[Tween 80] = 2.22×10^{-4} M、[MUC-1] = 50 μ g/ml、[mB7-1] = 10 μ g/ml.

ソーム (HL) に、ムチン MUC-1 の合成ペプチドと組換えタンパク mB7-1 を組み込んだ複合リポソーム (HL-MUC-1/mB7-1) を調製した。動的光散乱法により、HL と HL-MUC-1/mB7-1 の膜サイズを測定したところ、HL と HL-MUC-1/mB7-1 は、単分散のサイズ分布を示し、平均直径は、それぞれ、73 nm と 119 nm あった (図3)。

(4) 複合リポソームの免疫誘導効果

C3H/He マウスに複合リポソーム (HL-MUC-1/mB7-1) を接種後、乳がん細胞を移植して複合リポソームの免疫誘導について検討した。コントロール群、HL 投与群、HL-MUC-1/mB7-1 投与群の体重変化に明確な差異は観測されなかったが (図4)、平均生存日数は、コントロール群 21.7 日、HL 投与群 22.7 日、HL-MUC-1/mB7-1 投与群 24.0 日であり、HL-MUC-1/mB7-1 投与群で 111% の延命効果が観測された (図5)。

ハイブリッドリポソームに合成ペプチドと組換えタンパクを組み込んだ複合リポソームが、がん免疫のリポソームワクチンとなる可能性を、今回、初めて明らかにした。

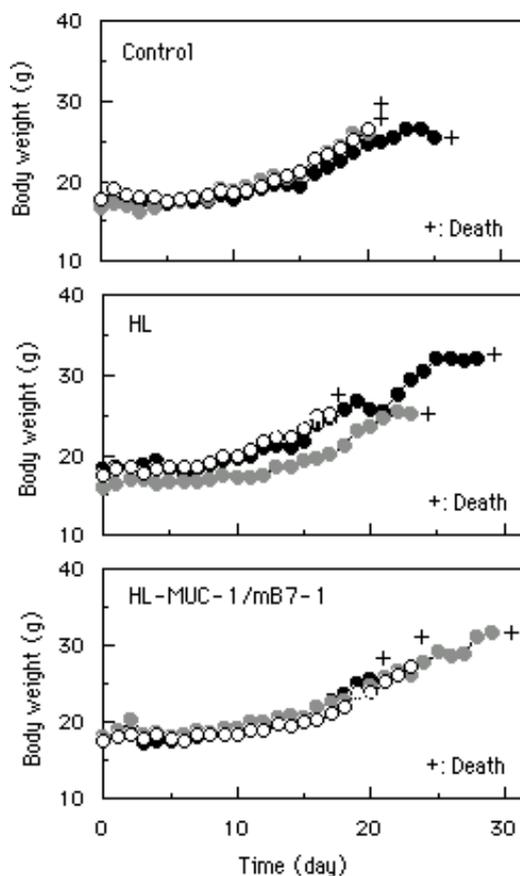


図4 複合リポソームを接種した乳がん移植マウスの体重変化
投与: DMPC 136 μ g、Tween 80 29 μ g、MUC-1 5 μ g、mB7-1 1 μ g.

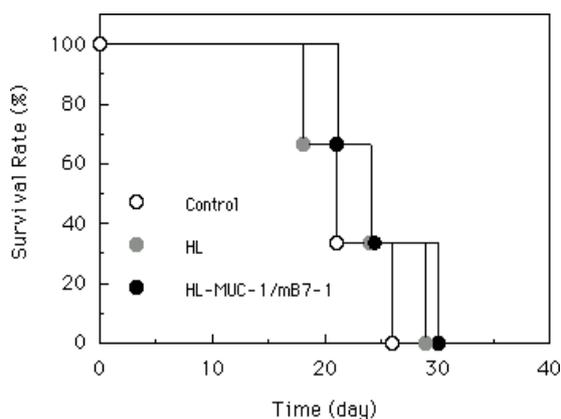


図5 複合リポソームを接種した乳がん移植マウスの生存曲線

平均生存日数：コントロール群 21.7 日、HL 投与群 22.7 日、HL-MUC-1/mB7-1 投与群 24.0 日 (n=3) .

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 10 件)

- ① Y. Komizu, H. Ueoka, K. Goto, R. Ueoka, Remarkable Inhibitory Effects of Hybrid Liposomes on Growth of Human Colon Cancer Cells through Induction of Cell Cycle Arrest along with Apoptosis, 査読有, *International Journal of Nanomedicine*, 6 巻, 2011, 1913-1920.
- ② Y. Komizu, M. Yukihara, R. Kariya, K. Goto, S. Okada, R. Ueoka, Selective Accumulation of Hybrid Liposomes into Adult T-Cell Leukemia Cells along with Induction of Apoptosis, 査読有, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 21 巻, 2011, 3962-3965.
- ③ H. Ichihara, K. Zako, Y. Komizu, K. Goto, R. Ueoka, Therapeutic Effects of Hybrid Liposomes Composed of Phosphatidylcholine and Docosahexaenoic Acid on the Hepatic Metastasis of Colon Carcinoma along with Apoptosis *in Vivo*, 査読有, *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 34 巻, 2011, 901-905.
- ④ 座古恵子, 坂口磨姫, 古水雄志, 市原英明, 後藤浩一, 松本陽子, 上岡龍一, ハイブリッドリポソームを用いたアルツハイマー病治療に関する基礎研究, 査読有, *薬学雑誌*, 131 巻, 2011, 775-782.
- ⑤ M. Yukihara, K. Ito, O. Tanoue, K. Goto, T. Matsushita, Y. Matsumoto, M. Masuda, S. Kimura, R. Ueoka, Effective Drug Delivery System for Duchenne Muscular Dystrophy Using Hybrid Liposomes Including Gentamicin along with Reduced Toxicity, 査

読有, *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 34 巻, 2011, 712-716.

- ⑥ 上岡秀嗣, 古水雄志, 後藤浩一, 上岡龍一, 温州みかん抽出物含有ハイブリッドリポソームの制がん効果に関する研究, 査読有, *化学工学論文集*, 37 巻, 2011, 271-276.
- ⑦ Y. Komizu, S. Nakata, K. Goto, Y. Matsumoto, R. Ueoka, Membrane-Targeted Nanotherapy with Hybrid Liposomes for Tumor Cells Leading to Apoptosis, 査読有, *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 2 巻, 2011, 275-279.
- ⑧ 市原英明, 巽一喜, 後藤浩一, 松本陽子, 上岡龍一, イタドリ生理活性物質含有ハイブリッドリポソームのリンパ腫細胞に対する増殖抑制効果, 査読有, *化学工学論文集*, 37 巻, 2011, 192-196.
- ⑨ K. Goto, K. Zako, Y. Komizu, R. Ueoka, Inhibitory Effects of Hybrid Liposomes Composed of Phosphatidylcholine and Docosahexaenoic Acid on the Growth of Colon Cancer Cells along with Apoptosis and Differentiation, 査読有, *Chemistry Letters*, 40 巻, 2011, 90-92.
- ⑩ Y. Komizu, S. Nakata, K. Goto, Y. Matsumoto, R. Ueoka, Clustering of Lipid Rafts in Plasma Membranes by Hybrid Liposomes for Leukemia Cells along with Apoptosis, 査読有, *Chemistry Letters*, 39 巻, 2010, 1291-1293

[学会発表] (計 5 件)

- ① 北島英樹, ハイブリッドリポソームによるヒト骨肉腫細胞の浸潤抑制効果, 第 15 回日本がん分子標的治療学会学術集, 2011 年 6 月 24 日, ホテル日航東京.
- ② M. Ohgidani, Apoptotic mechanism of leukemia cells by hybrid liposomes in relation to fluctuation of membranes, 4th International Symposium on Nanomedicine, 2010 年 11 月 30 日, 岡崎コンファレンスセンター.
- ③ K. Goto, Inhibitory effects of hybrid liposomes containing polyunsaturated fatty acids on the growth of tumor cells, 4th International Symposium on Nanomedicine, 2010 年 11 月 30 日, 岡崎コンファレンスセンター.
- ④ Y. Komizu, Clustering of lipid rafts in plasma membranes by hybrid liposomes for leukemia cells leading to apoptosis, The 4th International Symposium on Molecular Science of Fluctuations toward Biological Functions, 2010 年 11 月 30 日, ピアザ淡海.
- ⑤ K. Goto, Specific inhibitory effects of hybrid liposomes on the growth of HIV-latently infected cells and primary effusion

lymphoma *in vitro* and *in vivo*, BIT's 1st
World Congress of Virus and Infections-2010,
2010年8月2日, 釜山.

[その他]

ホームページ等

<http://www.life.sojo-u.ac.jp/biomed/index.html>

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・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