

機関番号：84409

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790400

研究課題名(和文) 生化学的創薬戦略による人工アジュバントの開発

研究課題名(英文) Development of synthetic adjuvants by biological drug design

研究代表者

赤澤 隆 (AKAZAWA TAKASHI)

地方独立行政法人 大阪府立病院機構 大阪府立成人病センター(研究所)・研究所・研究員

研究者番号：80359299

研究成果の概要(和文)：

がん免疫療法において強力なアジュバントの開発が期待されている。我々は、TLR2 リガンドとして働くマイコプラズマ由来リポペプチドの構造を基に、バクテリア由来配列を機能配列に置き換えることで、付加機能を持つ新規 TLR2 リガンドを設計した。このアジュバント・エンジニアリングは薬剤設計の新しい戦略であり、本研究では集合体形成を目的に設計した化合物について着目し、その詳細解析を進めたので報告する。

研究成果の概要(英文)：

It is essential to develop effective immunoadjuvants for tumor immunotherapy. We created new adjuvants based on the structure of mycoplasmal lipopeptide, which is a toll-like receptor (TLR) 2 ligand. Adjuvant engineering, substituting a functional motif for bacterial origin sequence of lipopeptide, is a novel drug design strategy. Here, we report the characterization of a new TLR2 ligand with complexation capability.

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	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：腫瘍、腫瘍免疫、アジュバント、BCG-CWS

1. 研究開始当初の背景

がん患者に対してウシ結核菌弱毒化ワクチン株 (BCG) の細胞骨格成分 (Cell Wall Skeleton: CWS) を単独で定期的に皮内投与する免疫アジュバント療法が当センターで臨床応用されている。我々は、本治療法の科学的根拠を明確化する基礎研究および臨床用薬剤調製に携わってきた。この作用メカニズムは BCG-CWS がトル様受容体 (TLR) 2 及び

4 のリガンドであり、樹状細胞を定期的に成熟・活性化させることによって体内を監視させ、がん再発時に早急な応答を導くことであると予想される。現在の免疫アジュバント療法は再発防止など予防的な適用であるものの、がん抗原の適切な補充方法の開発、樹状細胞療法との組合せによって、がん治療への適用が期待できる。

一方、BCG-CWS は菌体から精製する巨大分

子複合体であり、純度・安定性・安定供給に懸念が存在する。また、BCG-CWS の持つ強力な多様な免疫活性化能は、術後患者の免疫力を底上げするためには最適であるものの、特定の活性を限定・強化した方が治療に有利に働くケースも想定される。こうした問題を解決するため、我々は BCG-CWS のアジュバント活性を限定・強化し、化学合成可能な抗がんアジュバントの設計をはじめた。

天然 TLR2 リガンドとして知られるマイコプラズマ由来マクロファージ活性化リポペプチド (MALP-2, Pam2Cys-GNNDENISFKEK) は BCG-CWS の特徴に類似しており、樹状細胞を刺激して IL-23 を誘導する。この基本骨格となる Pam2Cys (P2C-) 構造は化学合成可能であり、これに結合する細菌由来のペプチド配列は改良・付加が容易である事を見いだした。平成 16 年度より、ここに生理機能ペプチドを結合させる生化学的創薬戦略で追加機能を持つ TLR2 リガンドを人工設計し、アジュバントとして開発する「アジュバント・エンジニアリング」を展開している。

2. 研究の目的

本研究の目的は、がん免疫療法に有用な新規人工アジュバントを開発する事である。本助成を受ける前段階で、既に候補化合物 A を人工設計していた。効果的な免疫細胞との接着を期待してインテグリン結合配列である RGDS を組み込んだ P2C-RGDS である。この化合物は *in vitro* 樹状細胞活性化、*in vivo* マウスがん治療モデルにおいて MALP-2 と同等以上の有効性を示したため、アジュバント・エンジニアリングによって、強力な新規アジュバントの開発が可能であると確信した。

本研究では、化合物 A の研究成果をまとめると共に、強力なアジュバントの人工設計を目指して、新たな機能を付加した TLR2 リガンド・化合物 B と化合物 C を作製した。特に興味深い性質を示した化合物 C (P2C-S*****)、集合体形成能を付加、特許申請予定のため配列は明記していない) について、詳細な解析を進めている。

3. 研究の方法

化合物 A を設計したアジュバント・エンジニアリング戦略を図 1 に示した。本研究では集合体形成能を TLR2 リガンドに付加するためにタグ配列を組み込んだ化合物 C を作製した。化合物 C はビーズ等をベースとした集合体形成によって、樹状細胞やマクロファージに効率的に認識されると予想され、強力な免疫活性化を誘導する事が期待された。また、がん抗原ペプチドとの複合体形成など、より効果的な免疫療法への応用も期待できる (図 2)。化合物 C、天然リポペプチド・MALP-2、および、既報の人工リポペプチド・P2C-SK4

(P2C-SK4) を比較し、それぞれの *in vitro*、*in vivo* のアジュバント活性を検討した。

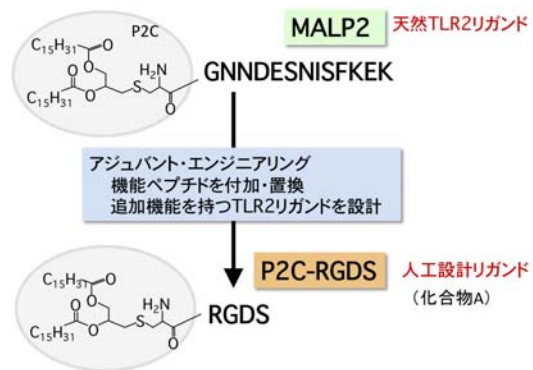


図 1 アジュバント・エンジニアリング戦略と試作化合物 A (細胞接着能を付加)

集合体形成能 : P2C-S***** (化合物 C)

- 親和性タグ配列を利用した集合体形成 (免疫細胞による効果的な認識・捕獲を期待)
- アジュバント・がん抗原ペプチド複合体も可能

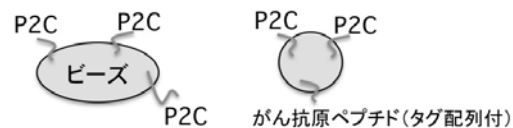


図 2 化合物 C (集合体形成能を持つリポペプチド) の人工設計とその応用

(1) *in vitro* 活性

各リポペプチドのアジュバント活性は、マウス骨髄より誘導した樹状細胞 (bone marrow derived dendritic cell, BMDC) を 100nM で刺激した際に誘導される IL12p40 産生量、および、脾臓細胞 (splenocytes) を刺激した際に誘導される IFN γ 産生量を ELISA 法で測定して評価した。

(2) *in vivo* 活性

in vivo の抗がん効果を評価するため、マウス移植がんモデルとして、C57BL/6 マウスと OVA 遺伝子が導入された EG7 細胞株を用いた。EG7 移植後に腫瘍の形成を確認し、群分けを行い、EG7 細胞可溶化物と化合物 C または P2C-SK4 10nmol を混合したワクチンを、腫瘍周辺の皮内に投与した (3-4 日ごとに計 3 回)。また、ワクチンにビーズを混合し、集合体形成による効果を確認した。

(3) 改良型リポペプチドの活性評価

(1) および (2) の研究結果を基に、新たに P2C-S*****KKKK (化合物 CF)、P2C-SK4***** (化合物 CR)、P2C-S***** (化合物 CL) を作製した。これらの *in vitro* の活性を、(1) と同様に検討した。

4. 研究成果

(1) in vitro 樹状細胞活性化能および脾臓細胞活性化能

今回、設計した化合物 C、MALP-2、P2C-SK4 の in vitro 活性を評価したところ、他の 2 つと比較して、化合物 C は樹状細胞からの IL12p40 産生を強力に誘導した。一方、P2C-SK4 は他の 2 つと比較して脾臓細胞からの IFN γ 産生を強力に誘導した (図 3)。以上の結果は、リポペプチド中の配列によって、異なる活性化の方向性を持つ化合物が設計可能である事を意味している。

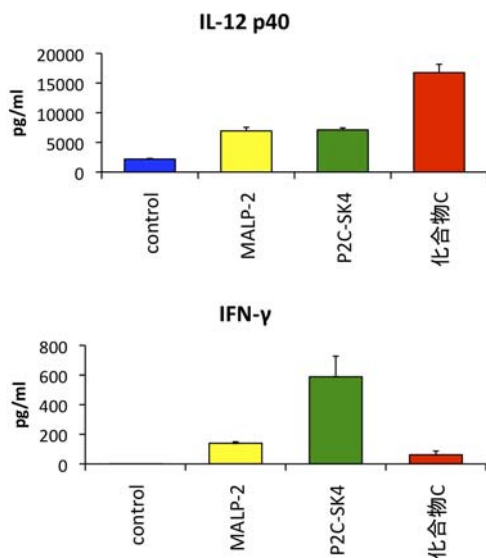


図 3 in vitro サイトカイン誘導

(2) in vivo マウス腫瘍移植モデルにおける抗がん効果

これらの化合物の抗がん効果を評価したところ、P2C-SK4 では有意な腫瘍成長抑制を認めたが、化合物 C では認められなかった (図 4)。さらに集合体形成を目的として、ビーズをワクチン中に混合して投与したが、十分な抗がん効果は認められず、この実験モデルにおいて、期待した有効性は得られなかった。

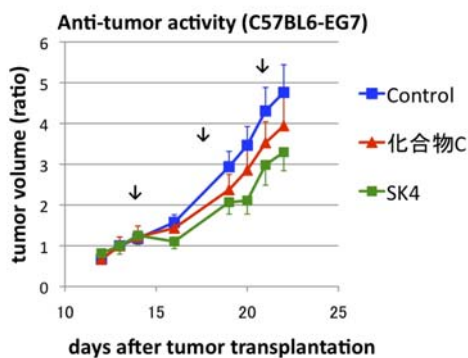


図 4 in vivo 抗がん効果

(3) 改良型 (タンデム結合および長鎖タイプ) リポペプチドの活性評価

(1)の結果から、リポペプチドは、ペプチド配列によって、異なる免疫活性化能を示す。すなわち、先の 2 ペプチド配列をタンデムに結合する事によって両者の活性 (IL12p40 増強と IFN γ 増強) を持つ化合物が設計できる可能性があった。そこで、P2C-S*****K (化合物 CF)、P2C-SK*** (化合物 CR) を作製し、それぞれの活性を測定したが、相加効果を得る事はできず、P2C 直後に接続したペプチド配列に準拠した活性を示した (図 5)。しかしながら、同配列を伸長した P2C-S***** (化合物 CL) を設計し、活性を検討したところ、IL12p40 と IFN γ の両者を強力に誘導する化合物を作製する事に成功した。(図 5)

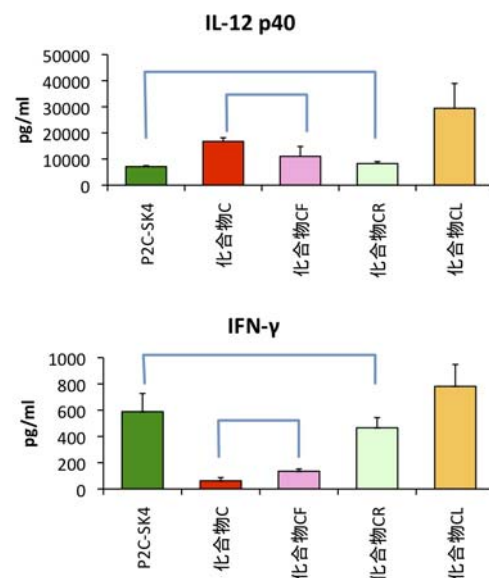


図 5 改良型リポペプチドの in vitro 活性

今後、化合物 CL の in vivo 抗がん効果を評価し、アジュバント化合物としての有効性を検討する必要がある。また、集合体形成については、ワクチン調製方法や投与方法を含めて検討する事により、より有効な抗がん効果が引き出せる可能性がある。アジュバント・がん抗原ペプチド複合体についても、十分な検討に至っておらず、今後の解析が重要と考えている。さらに、今回、IL12p40 と IFN γ の両者を強力に誘導する化合物を作製する事ができたが、作用メカニズムをはじめ、不明な点も多く、より詳細な解析が必要と考えられた。

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7件)

(1) Sawahata R, Shime H, Yamazaki S, Inoue N, Akazawa T, Fujimoto Y, Fukase K, Matsumoto M, Seya T. Failure of mycoplasma lipoprotein MALP-2 to induce NK cell activation through dendritic cell TLR2. *Microbes Infect.* 13(4): 350-8. 2011. 査読有

(2) Yabu M, Shime H, Hara H, Saito T, Matsumoto M, Seya T, Akazawa T, Inoue N. IL-23-dependent and -independent enhancement pathways of IL-17A production by lactic acid. *Int Immunol.* 23(1):29-41. 2011. 査読有

(3) Mito K, Sugiura K, Ueda K, Hori T, Akazawa T, Yamate J, Nakagawa H, Hatoya S, Inaba M, Inoue N, Ikehara S, Inaba T. IFN γ markedly cooperates with intratumoral dendritic cell vaccine in dog tumor models. *Cancer Res.* 70(18): 7093-101. 2010. 査読有

(4) Sugiura K, Wijewardana V, Fujimoto M, Akazawa T, Yahata M, Mito K, Hatoya S, Inoue N, Inaba T. Effect of IL-12 on canine dendritic cell maturation following differentiation induced by granulocyte-macrophage CSF and IL-4. *Vet Immunol Immunopathol.* 137(3-4):322-6. 2010. 査読有

(5) Akazawa T, Inoue N, Shime H, Kodama K, Matsumoto M, Seya T. Adjuvant engineering for cancer immunotherapy: Development of a synthetic TLR2 ligand with increased cell adhesion. *Cancer Sci.* 101(7): 1596-603. 2010. 査読有

(6) Mimura Y, Takahashi K, Kawata K, Akazawa T, Inoue N. Two-step colocalization of MORC3 with PML nuclear bodies. *J Cell Sci.* 123(Pt 12):2014-24. 2010. 査読有

(7) Akao Y, Ebihara T, Masuda H, Saeki Y, Akazawa T, Hazeki K, Hazeki O, Matsumoto M, Seya T. Enhancement of antitumor natural killer cell activation by orally administered Spirulina extract in mice. *Cancer Sci.* 100(8):1494-501. 2009. 査読有

〔学会発表〕(計5件)

(1) Akazawa T, Inoue N. Adjuvant engineering for cancer immunotherapy: development of a synthetic TLR2 ligand with alternative functions. 第5回 国際ペプチドシンポジウム (ポスター). 2010年12月4-9日. 京都

(2) Akazawa T, Inoue N, Shime H, Kodama K, Matsumoto M, Seya T. Adjuvant engineering for cancer immunotherapy: development of a synthetic TLR2 ligand with additional function. 第14回 国際免疫学会 (ポスター). 2010年8月22-27日. 神戸

(3) Akazawa T, Inoue N, Kodama K, Matsumoto M, Seya T. Adjuvant engineering for cancer immunotherapy: development of a synthetic TLR2 ligand with alternative functions. 第69回 日本癌学会 学術総会 (ポスター). 2010年9月22-24日. 大阪

(4) Akazawa T, Inoue N, Shime H, Kodama K, Matsumoto M, Seya T. A synthetic TLR2 ligand containing the RGD motif works as an effective adjuvant. 第68回 日本癌学会 学術総会 (ポスター). 2009年10月1-3日. 横浜

(5) 赤澤 隆. インテグリン結合モチーフを含む人工設計リポペプチドはトル様受容体2のリガンドとして機能し、効果的なアジュバント活性を持つ. 第13回 日本がん免疫学会 (一般口演). 2009年6月24-25日. 北九州

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.mc.pref.osaka.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

赤澤 隆 (AKAZAWA TAKASHI)

地方独立行政法人 大阪府立病院機構 大阪府立成人病センター (研究所)・研究所・研究員

研究者番号: 80359299