

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月11日現在

機関番号：82502
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23700532
 研究課題名（和文） DDS型 Find-me シグナルのマクロファージ動態制御によるがん免疫療法の開発
 研究課題名（英文） Development of tumor immunotherapy based on the control of distribution and function of macrophages with DDS-type “Find-me” signals
 研究代表者
 城 潤一郎（JO JUN-ICHIRO）
 独立行政法人放射線医学総合研究所・分子イメージング研究センター・研究員
 研究者番号：60511243

研究成果の概要（和文）：マクロファージは、死細胞から放出される信号（Find-me シグナル）によりその場所を感知、移動し、死細胞を除去する。本研究では、この現象を活用し、“Find-me シグナル”とマクロファージ活性化薬剤とを同時に含み、がん組織へデリバリー可能なナノ構造体を、薬剤送達技術（DDS）と材料学とを駆使して創製した。加えて、創製したナノ構造体を用いたがん免疫療法の可能性とそのメカニズムについて検討した。

研究成果の概要（英文）：It has been well recognized that dead cells are effectively eliminated by macrophages based on “Find-me” signals released from dead cells. In this study, nanostructures, which enable to simultaneously include attraction (“Find-me” signals) and activation drugs of macrophages and deliver to the tumor tissue, were designed and prepared by making use of drug delivery systems (DDS) and material technologies. In addition, we evaluated the possibility and mechanism of tumor immunotherapy with the nanostructures prepared.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：生体制御・治療

1. 研究開始当初の背景

がんに対する治療法として、「手術療法」、「化学療法」、「放射線療法」、および「免疫療法」がある。その中で「免疫療法」は、体内が本来持っている自然治癒力（免疫力）を高めてがんを治療する方法である。活性化マクロファージは、この「免疫療法」において中心的な役割を果たしている細胞である。活性化マクロファージは、がん細胞を貪食し、

抗原提示することによって、免疫系を活性化し、がん細胞の増殖を抑制、がん免疫療法に寄与する。活性化マクロファージを用いたがん免疫療法では、マクロファージを「いかに効率よくがん組織へ誘引するか」ならびに「いかに効率よく活性化させるか」が重要である。

これまでに、マクロファージをがん組織へ誘引する材料ならびにマクロファージを活

性化させる材料および方法論に関する研究が広く行われてきた。マクロファージを効率よくがん組織内へ誘引する方法としては、ケモカインをがん組織中で作用させることが試みられている。また、interferon- γ あるいは lipopolysaccharide などのマクロファージ活性化薬剤を内包した高分子からなる微粒子を用いて効率よくマクロファージを活性化し、がん免疫療法の効果を増強させた研究がある。これまでの研究で、一定の成果は得られている。しかしながら、マクロファージのがん組織への誘引と活性化とを同時に行う試みはなかった。

今回、マクロファージをがん細胞へ誘引するアイデアとして、“Find-me シグナル”に注目した。“Find-me シグナル”は、死細胞がその除去を促す時に放出する因子である。マクロファージが“Find-me シグナル”を感受して死細胞部位へ移動、貪食するため、死細胞の迅速な除去が可能となる。このことは、“Find-me シグナル”がマクロファージを死細胞部位へ誘引することを示している。“Find-me シグナル”として、lysophosphatidyl choline (LPC), sphingosine-1-phosphate (S1P) などのリン脂質が同定されている。この“Find-me シグナル”をがん組織へデリバリーできれば、マクロファージをがん組織へ誘引することが可能である。さらに、同時にマクロファージの活性化薬剤をがん組織へデリバリーできれば、さらに理想的である。

どのようにして“Find-me シグナル”をがん組織へデリバリーするか？ Find-me シグナルと活性化薬剤とを含む物質とは？この疑問に答えるのがサイズと表面状態が制御されたナノ構造体である。ナノ構造体は、そのサイズと表面状態の制御により、全身投与でがん組織へ集積することが知られている。また、材料学を駆使することによって、複数の因子をナノ構造体に含ませることが可能である。

上記の研究背景を踏まえ、本研究では、“Find-me シグナル”とマクロファージ活性化薬剤とを同時に含み、がん組織へデリバリー可能なナノ構造体を創製することを考えた。創製されたナノ構造体は、全身投与によってがん組織へ集積する。体内のマクロファージは、ナノ構造体に含まれた Find-me シグナルによって、がん組織へ誘引される。がん組織へ移動したマクロファージは、組み込まれた活性化薬剤によって活性化される。このように、効率よく誘引、活性化されたマクロファージによって、そのがん免疫療法の効果は増強される。これが本研究のシナリオである。

2. 研究の目的

本研究の目的は、“Find-me シグナル”と

マクロファージ活性化薬剤とを同時に含み、がん組織へデリバリー可能なナノ構造体を創製、がん免疫療法の可能性とそのメカニズムについて検討することである。具体的には、ナノ構造体として、表面に“Find-me シグナル”である LPC、マクロファージ活性化薬剤である lipopolysaccharide (LPS)、および血中滞留性ならびにがん組織送達性の向上のためのリン脂質が修飾されたポリエチレングリコール (PEG 脂質) を修飾したポリ(乳酸-グリコール酸) 共重合体 (PLGA) ナノ構造体(図 1)を作製する。得られたナノ構造体によるマクロファージの誘引および活性化を *in vitro* で検討するとともに、ナノ構造体を担がんマウスへ静脈内投与し、そのナノ構造体のがん組織内分布ならびに体内動態およびマクロファージの動態を経時的に調べ、ナノ構造体による本がん免疫療法のメカニズムを明らかにする。

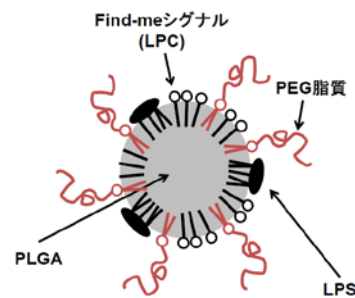


図 1. 本研究で開発するナノ構造体

3. 研究の方法

(1) LPC、LPS、および PEG 脂質が修飾された PLGA ナノ構造体の作製

水相として、LPC、LPS、および PEG 脂質を含む 4 wt%エタノール溶液、油相として、PLGA を含むアセトンを用いた。水相へ油相を加え乳化し、油相溶媒を蒸発、限外ろ過をへて、LPC、LPS、および PEG 脂質が表面へ修飾された PLGA ナノ構造体を得た。得られたナノ構造体のサイズは、動的光散乱装置 (DLS) を用いて測定した。用いた PLGA 添加濃度および PEG 脂質濃度がナノ構造体のサイズに与える影響について調べた。ナノ構造体表面に修飾された LPC の量は、コリンオキシダーゼ法にて、LPS の量は蛍光標識 LPS を用いた蛍光測定にて算出した。ナノ構造体を、リン酸緩衝生理食塩水中、37°C の条件でインキュベートし、経時的に限外ろ過後、ナノ構造体に残存する脂質量を測定することによって、脂質のナノ粒子からの放出挙動を評価した。

(2) ナノ構造体による単球/マクロファージの誘引性の検証

ヒト単球/マクロファージ株である THP-1 細

胞をカルセイン-AM を用いて蛍光標識した。ポアサイズ 8 μm のフィルターの上部に蛍光標識 THP-1 細胞 (1×10^5 個)、下部にナノ構造体 (LPC1LPS0、LPC 濃度: $12.5 \mu\text{g/ml}$) を添加した。添加後、 37°C 、3 時間の条件で培養した。フィルターの下部へ移動した (誘引された) THP-1 細胞数を蛍光測定にて算出した。LPC を含まないナノ構造体 (LPC0LPS0) を対照として用いた。

(3) ナノ構造体によるマクロファージの活性化の検証

THP-1 細胞 (5×10^5 個) へ、ナノ構造体 (LPC1LPS100、LPS 濃度: $0.6 \mu\text{g/ml}$) を添加した。添加後、 37°C 、所定時間培養した。培養上清を遠心回収し、マクロファージの活性化の指標であるインターロイキン 1β (IL- 1β) の濃度を、酵素結合免疫吸着法 (ELISA) にて測定した。培地のみ (Control) および LPS を含まないナノ構造体 (LPC0LPS0) を対照として用いた。

(4) ナノ構造体によるがん治療効果の検証

本実験には 4 種類のナノ構造体を用いた。すなわち、PEG 脂質のみ修飾されたナノ構造体 (LPC0LPS0)、PEG 脂質および LPC が修飾されたナノ構造体 (LPC1LPS0)、PEG 脂質および LPS が修飾されたナノ構造体 (LPC0LPS100)、ならびに PEG 脂質、LPC、および LPS が修飾されたナノ構造体 (LPC1LPS100) である。

脂溶性で近赤外領域に励起・蛍光波長を有するシリコンナフタロシアニンを内包したナノ構造体を作製した。マウス大腸がん細胞株 (colon 26、 1×10^6 個) をヌードマウス大腿部へ皮下移植した。移植 10 日前後で、がんサイズが 5 mm 程度の担がんマウスを以下の実験で用いた。担がんマウスの尾静脈より蛍光標識ナノ構造体を投与し、ナノ構造体のがん組織への集積を、蛍光イメージング装置と付属のソフトウェアを用いて経時的に調べた。

マウスメラノーマ細胞株 (B16F10、 1×10^6 個) を C57BL/6 マウス大腿部へ皮下移植した。移植 7 日前後で、がんサイズが 5 mm 程度の担がんマウスを以下の実験で用いた。担がんマウスの尾静脈よりナノ構造体を投与し、経時的にがん体積を測定した。

4. 研究成果

(1) LPC、LPS、および PEG 脂質が修飾された PLGA ナノ構造体の作製

図 2 に、PLGA 添加濃度および PEG 脂質濃度がナノ構造体のサイズに与える影響について示す。PLGA 添加濃度の上昇にともない、ナノ構造体のサイズは増大した (図 2A)。油相溶媒のアセトンは、水との相溶性が高いため、PLGA のアセトン溶液を水相への添加すると

速やかに拡散、PLGA が沈殿しナノ構造体を形成する。したがって、PLGA 添加濃度がナノ構造体のサイズに寄与したものと考えられる。一方、PEG 脂質濃度はナノ構造体のサイズに影響を与えなかった (図 2B)。

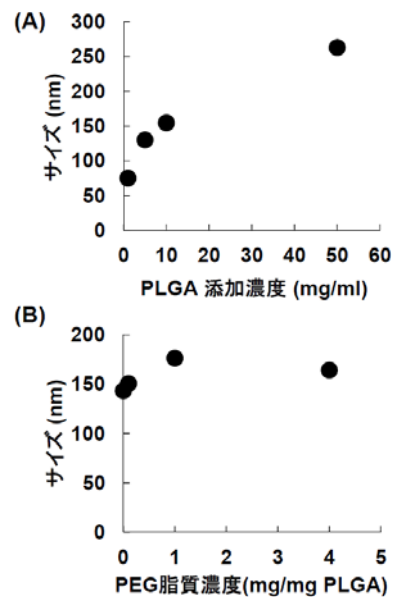


図 2. ナノ構造体のサイズに与える PLGA 添加濃度および PEG 脂質濃度の影響

ナノ構造体への LPC および LPS の修飾量を図 3 に示す。LPC および LPS の添加量依存的にナノ構造体への LPC および LPS の修飾量が増加した。以降の実験では、PLGA 添加濃度が 5 mg/ml、PEG 脂質濃度が 1 mg/mg PLGA、LPC 仕込み濃度が $200 \mu\text{g/mg PLGA}$ 、および LPS 仕込み濃度が $20 \mu\text{g/mg PLGA}$ の条件で形成されるナノ構造体を用いた。

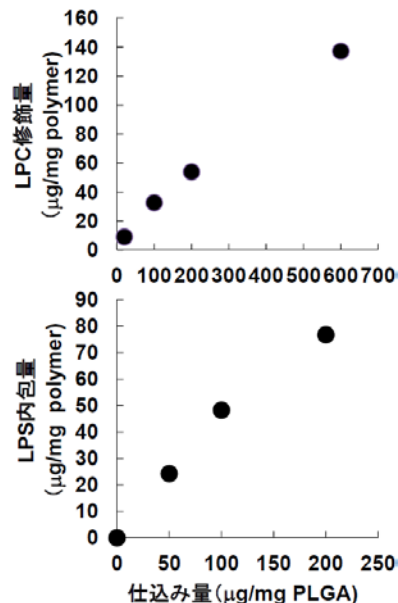


図 3. ナノ構造体への LPC および LPS の修飾量

ナノ構造体からの LPC および LPS の放出挙動を図 4 に示す。LPC および LPS は徐々にナノ構造体から放出されることがわかった。

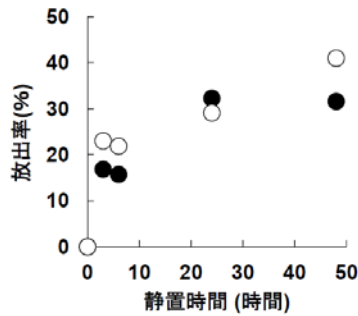


図 4. ナノ構造体からの LPC (○) および LPS (●) の放出挙動

(2) ナノ構造体による単球/マクロファージの誘引性の検証

図 5 は、ナノ構造体による THP-1 細胞の誘引率である。LPC を修飾しないナノ構造体 (LPC0LPS0) と比較して、LPC を修飾したナノ構造体 (LPC1LPS0) は、THP-1 細胞をより誘引することがわかった。これはナノ構造体表面に修飾された LPC に THP-1 細胞が誘引されたためと考えられる。

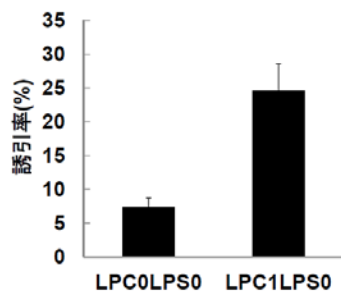


図 5. ナノ構造体による THP-1 細胞の誘引率

(3) ナノ構造体によるマクロファージの活性化の検証

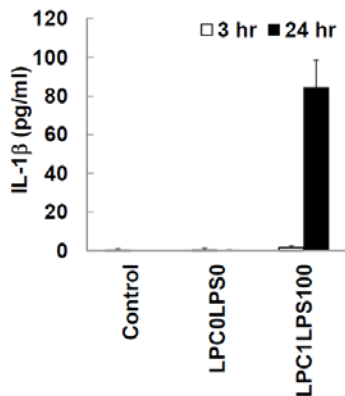


図 6. ナノ構造体添加により THP-1 細胞が産生した IL-1β 濃度

図 6 は、ナノ構造体添加後に THP-1 細胞が産生した IL-1β 濃度である。LPS を修飾しないナノ構造体 (LPC0LPS0) では、ナノ構造体を添加しなかった Control 群と同様、IL-1β の産生濃度は低かった。しかしながら、ナノ構造体へ LPS を修飾することによって (LPC1LPS100)、高い濃度の IL-1β を産生した。これは、ナノ構造体表面に修飾された LPS と相互作用することによって、THP-1 細胞が活性化されたためと考えられる。

(4) ナノ構造体によるがん治療効果の検証

図 7 は、蛍光イメージングによるナノ構造体の体内動態の経時変化である。LPC および LPS のナノ構造体への修飾の有無にかかわらず、ナノ構造体は徐々にがん組織へ集積、投与 24 時間後に最大の集積量を示した。これは、PEG 脂質によりナノ構造体の血中安定性が向上し、いわゆる enhanced permeability and retention (EPR) 効果によりがん組織に集積したためと考えられる。

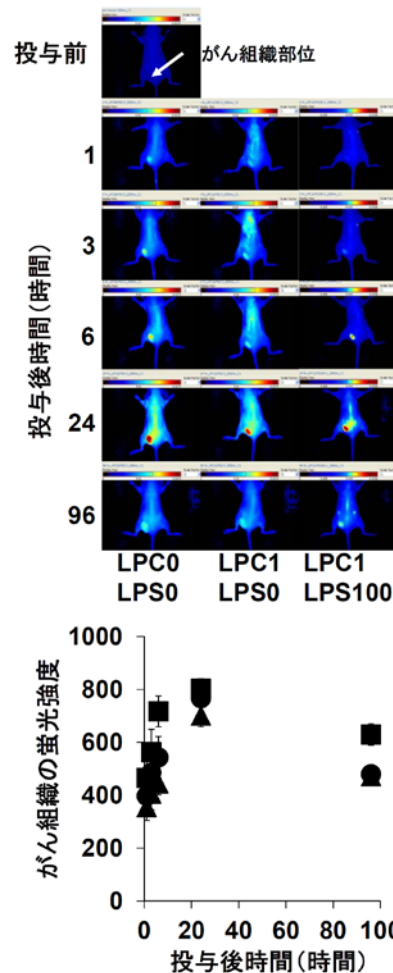


図 7. 蛍光イメージングによるナノ構造体の体内動態の経時変化。担がんマウス (矢印: がん組織部位) へナノ構造体 [LPC0LPS0 (●)、LPC1LPS0 (▲)、および LPC1LPS100 (■)] を投与した。

ナノ構造体を担がんマウスへ投与後のがん体積変化を図8に示す。LPCとLPSとが同時に修飾されたナノ構造体(LPC1LPS100)が、その他のナノ構造体と比較してがん体積の増加を抑制していることがわかった。これは、LPC1LPS100がEPR効果によってがん組織へ集積し、LPCの効果により単球/マクロファージが効率よく誘引され、さらにLPSの効果によりその単球/マクロファージが活性化されがん細胞を攻撃したためと考えられる。今後は、ナノ構造体投与後の単球/マクロファージの誘引について免疫組織学的に調べ、本がん免疫療法メカニズムを詳細に検証する予定である。

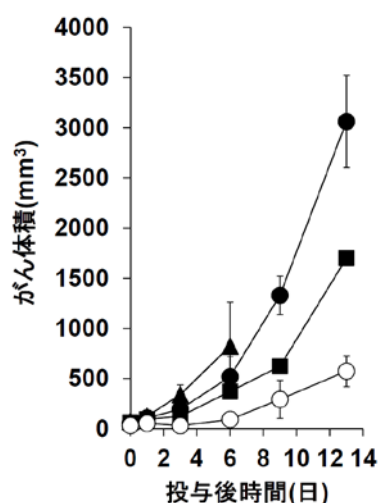


図8. ナノ構造体による抗がん効果。担がんマウスへナノ構造体[LPCOLPS0 (●)、LPC1LPS0 (▲)、LPCOLPS100 (■)、およびLPC1LPS100 (○)]を投与し、経時的にがん体積を測定した。

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計3件)

- ① 城 潤一郎ら、ナノ粒子によるがん組織への単球/マクロファージの誘引とがん治療への展開、第29回日本DDS学会、2013年07月04日～2013年07月05日(発表確定)、京都
- ② 城 潤一郎ら、がん免疫治療の効果増強を目指したDDS型Find meシグナルの作製、日本バイオマテリアル学会シンポジウム2012、2012年11月26日～2012年11月27日、仙台
- ③ 城 潤一郎ら、がん免疫治療の効果増強のためのDDS型Find meシグナルの作製、第28回日本DDS学会、2012年07月04日～2012年07月05日、札幌

6. 研究組織

(1) 研究代表者

城 潤一郎 (JO JUN-ICHIRO)
独立行政法人放射線医学総合研究所・

分子イメージング研究センター・研究員
研究者番号：60511243

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし