

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：34306

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24650284

研究課題名(和文) 痛くないワクチンによる抗がん治療

研究課題名(英文) Development of anticancer therapy by painless vaccination

研究代表者

小暮 健太郎 (Kogure, Kentaro)

京都薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：70262540

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、イオントフォレシスとナノ粒子を組み合わせ、非侵襲的に皮膚表皮層に抗原ペプチドを送達しランゲルハンス細胞に取り込ませることによる抗がん免疫療法システムの確立を目的とした。その結果、正電荷PEG化ナノゲル表面にヒトメラノーマ抗原ペプチドhgp100(25-33)を結合させ、マウス皮膚上でイオントフォレシスに供することで、皮膚表層領域への抗原送達に成功した。また、抗原ペプチド/ナノゲル複合体のイオントフォレシスにより皮内ランゲルハンス細胞の活性化に成功した。さらに、メラノーマ移植マウス皮膚への抗原ペプチド/ナノゲル複合体のイオントフォレシスにより、有意な腫瘍成長抑制に成功した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we attempted to develop a novel anticancer immunotherapeutic system, which can induce effective immune response by noninvasive delivery of antigen peptide to Langerhans cells via combination of iontophoresis and nanoparticles. As the results, specific delivery of antigen peptide to epidermal region was successfully achieved by iontophoresis of cationic PEGylated nanogels modified with human melanoma antigen peptide hgp100(25-33), and activation of Langerhans cells in the skin was accomplished by iontophoresis of antigen peptide/nanogel complexes. Moreover, we succeeded in the significant inhibition of tumor growth in melanoma bearing mice by iontophoresis of antigen/nanogel complexes.

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：薬物送達システム イオントフォレシス 癌ワクチン

### 1. 研究開始当初の背景

申請者は、これまでにイオントフォレシス (IP) によって非侵襲的に効率よく siRNA やオリゴ核酸を皮内深部にまで送達するテクノロジーの確立に成功している (Kigasawa, Kogure 他 Int.J.Pharm.(2010), J.Control.Release(2011))。IP は、微弱電流負荷による静電的反発と電気浸透流により荷電性薬物の経皮送達を促進する技術であり、非侵襲的で理想的な投薬法として注目されている。皮内、特に表皮層には免疫担当細胞 (ランゲルハンス細胞 LC) が豊富 (表皮細胞の 2~5%) なことから、ワクチン接種の理想的部位である。さらに LC は、樹状突起を進展させ (手を伸ばして) 表皮上層の抗原を補足することが発見されている (Kubo 他 J.Exp.Med(2009))。注射による皮膚へのワクチン接種が一般的だが侵襲的で表皮領域に効率よく抗原を投与するには高度な技術を要する。そのため、IP は理想的なワクチン接種法である。しかし、現在の IP では深部まで物質が浸透してしまい、表皮層上部 (表面から数十  $\mu\text{m}$  領域) に限局的に抗原を意図的に留めておくことは困難である。最近、申請者は IP の微弱電流刺激が皮膚細胞間隙を開裂させ、数十 nm ほどの隙間を形成することを見出していた。そこで、IP で形成される隙間に引っかかるキャリアーに抗原 / アジュバントを担持させておけば、表皮上層で限局的に抗原 / アジュバントを留めることができ、手を伸ばさず LC に効率よく提示できるのではないかと仮説を立てるに至った。

### 2. 研究の目的

本研究では、イオントフォレシスと 40 nm のナノ粒子を組み合わせることで、非侵襲的に皮膚表皮層に限局的に抗原ペプチドとアジュバントを送達しランゲルハンス細胞に取り込ませることで抗がん効果を誘導し、効率的な抗がん免疫療法システムを確立することを目的とした。申請者は、これまでにイオントフォレシスによる高分子物質 (リポソームおよび核酸) の皮内送達に成功している。イオントフォレシスは非侵襲的であり理想的な薬物送達法である。本研究のポイントは、皮膚内奥ではなく皮膚表面から数十  $\mu\text{m}$  の深さ領域に限局的に抗原とアジュバントを送達する点にあり、ランゲルハンス細胞による効率的な抗原取り込みと免疫誘導が期待された。

### 3. 研究の方法

皮膚層上部に限局的に抗原 / アジュバントを送達できる技術の確立

1) IP に供したナノゲルの動態追跡と最適化条件の決定: ナノゲルとは高分子化合物の架橋によるヒドロゲルがナノ粒子化したものであり、連携研究者である筑波大学の長崎教授によって調製された PEG 化ナノゲル (粒子径 40nm) を用いる。蛍光標識化したナノゲル

を、毛をそった BALB/c マウス背部に麻酔条件下で Ag/AgCl 電極を用いて IP を行った後、当該部位の皮膚を回収し、OTC コンパウンド中で凍結固定したものをマイクロトームにより切片とする。得られた切片を共焦点レーザー顕微鏡により観察することで皮膚内の動態を評価する。様々な電流強度、負荷時間、ナノゲル濃度における皮膚内動態を比較し、最適な条件を決定する。

2) ペプチド・CpG オリゴ DNA / ナノゲル複合体の IP とペプチド限局用最適条件の決定 蛍光色素とアニオン性ペプチド結合 gp100 ペプチドおよび CpG オリゴ DNA をカチオン性表面を有するナノゲルに静電的相互作用により結合させ、同様に皮膚切片を共焦点レーザー顕微鏡によりナノゲルおよびペプチドの動態を評価する。ペプチド・CpG オリゴ DNA / ナノゲル比率の異なる場合について動態を評価し、ペプチド / CpG オリゴ DNA が皮膚上部に限局する最適条件を決定する。

ランゲルハンス細胞への効率的な抗原提示の確認

1) ランゲルハンス細胞の動態とナノゲル限局部位の位置関係の評価: における最適なペプチド / CpG オリゴ DNA の限局的送達条件で IP を行い、異なる時間に作成した切片に対して抗 LC 抗体を用いた免疫染色による LC の動態を観察することで、ナノゲル限局部位との位置関係を評価する。さらに、蛍光標識ペプチド / CpG オリゴ DNA を用いた動態評価を行い、ナノゲルデリバリーの最適条件が LC に対して最適であるのかを検証する。

2) 皮膚に限局したペプチドの所属リンパ節への送達の検証: さらに、蛍光標識ペプチド / CpG オリゴ DNA 結合ナノゲルの IP を行った後、一定時間経過後に所属リンパ節を回収し、凍結切片したものを共焦点レーザー顕微鏡で観察することにより、蛍光標識ペプチドおよび CpG オリゴ DNA の有無を評価し、皮膚上部に限局させた抗原ペプチドが取り込まれ、所属リンパ節に送達されたか否かを検証する。

高効率での細胞性免疫の誘導

1) サイトカイン産生量の定量による細胞性免疫誘導の評価: 抗がん効果を期待するためには、細胞性免疫の誘導が重要であるので、LC へのペプチド送達を確認したら、血液 (血漿) を回収し細胞性免疫誘導のマーカーである IL-2、インターフェロン (IFN- $\gamma$ )、TNF- $\alpha$ 、TNF- $\beta$ 、GM-CSF 等の産生を、市販の ELISA キットを用いて定量する。

2) CTL アッセイによる細胞性免疫誘導の評価: がん細胞に対する直接的な細胞性免疫誘導を評価するために、CTL (細胞傷害性リンパ球) アッセイを行う。C57BL/6 マウスにメラノーマ抗原ペプチド gp100 を IP により免疫した後、naïve マウスより得た標的細胞を投与し、一定時間後に回収した脾臓細胞について蛍光色素 CFSE 陽性細胞数を FACS によって測定することで CTL 活性を評価する。メラ

ノーマ抗原 gp100 については CTL エピトープが同定されているので、効率よく CTL アッセイを行うことは可能である。この時点で、サイトカイン産生および CTL アッセイの結果が予想よりも低い場合には、抗原ペプチドおよび CpG オリゴ DNA の充填量や IP の範囲の拡大など、より効率よく細胞性免疫を誘導可能な条件を見出す。

がんペプチドを抗原とすることでの高い抗腫瘍効果の誘導:培養したマウスメラノーマ細胞 B16F1 を C57BL/6 マウスの背部皮膚に移植することでがんモデルを作成する。がん細胞移植後、1 週間経過時にナノゲル/がんペプチド・CpG オリゴ DNA 複合体を腫瘍部位から離れた場所で IP を行い、ペプチドを投与する。投与後、経日的に腫瘍径および体重変化を測定する。同時に、血液中のサイトカイン量を ELISA 法によって定量し、細胞性免疫誘導の変化を追跡する。

#### 4. 研究成果

初年度は、(1) 皮膚上部に限局的に抗原/アジュバントを送達できる技術の確立と(2) ランゲルハンス細胞への効率的な抗原提示の確認、を計画しており、これらについて検討をおこなった。(1)については、連携研究者が開発した正電荷を有する PEG 化ナノゲル表面に抗原ペプチドを担持させるため、ヒトメラノーマ抗原ペプチド hgp100(25-33)の末端にグルタミン酸配列を付与した蛍光(緑)標識化ペプチドを委託合成した。ペプチドを蛍光(赤)標識化ナノゲルと混合することで表面に結合されることを確認し、マウス皮膚上でイオントフォレシスに供した後、切片を共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ、皮膚表層領域に赤と緑の蛍光が共局在していることが確認されたことから、皮膚上部に限局的に抗原を送達可能な技術の確立に成功したと考えている。一方、ランゲルハンス細胞に関して、抗 MHCII 抗体を用いて免疫染色することで、皮膚中のランゲルハンス細胞の存在の確認を検討した。免疫染色の条件検討に時間を費やしたが、コントロール皮膚において、ランゲルハンス細胞と思われる細胞の検出技術を確立することができた。この免疫染色技術を利用して、無処理皮膚、ナノゲルのみのイオントフォレシス処置後の皮膚および抗原ペプチド/ナノゲル複合体をイオントフォレシスした皮膚におけるランゲルハンス細胞を評価した。免疫染色陽性シグナルは、無処理皮膚およびナノゲルのみのイオントフォレシス処理皮膚でも見られたが、抗原ペプチド/ナノゲル複合体のイオントフォレシス処理皮膚においては、より強力な陽性シグナルが検出された。このことから、抗原ペプチド/ナノゲル複合体をイオントフォレシスし、皮膚上部に限局的に存在させることにより、免疫担当であるランゲルハンス細胞を活性化できることが示唆された。

最終年度は、申請通り、ヒトメラノーマ抗原ペプチド hgp100(25-33)の末端にグルタミン酸配列を付与したペプチドを連携研究者が開発した正電荷を有する PEG 化ナノゲル表面に静電的相互作用を利用して担持させたものを、メラノーマ細胞移植マウス皮膚上でイオントフォレシスに供した後、腫瘍成長を追跡した。その結果、抗原ペプチド非投与群においては顕著な腫瘍成長が観察されたのに対して、抗原ペプチド/ナノゲル複合体をイオントフォレシス投与したマウスにおいては、有意な腫瘍成長の抑制が認められた。対照としてナノゲル単独をイオントフォレシスした場合には、腫瘍成長は抑制されず、むしろ若干促進されたことから、抗原ペプチドをナノゲルと合わせてイオントフォレシス投与することで腫瘍成長が抑制されたことが示唆された。このとき、抗原ペプチド/ナノゲル複合体のイオントフォレシス投与によって、特段の体重減少なども見られなかったことから、本システムの安全性は問題ないことが確認された。今回は、完全な腫瘍成長抑制効果が得られたわけでないが、予備的検討から、CpG オリゴ DNA などのアジュバントを組み合わせることで抗腫瘍免疫を増強できることを確認している。抗原ペプチドと CpG オリゴ DNA の混合物とナノゲルとの複合体をイオントフォレシス投与することで、より強力な腫瘍成長抑制効果を実現できると確信している。そのため、本システムは当初計画通り、非侵襲的に抗腫瘍免疫を誘導可能な「痛くないがん治療ワクチン」として確立したと考えている。

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 4 件)

Toyoda M. Hama S. Ikeda Y. Nagasaki Y. Kogure K. Transdermal delivery of antigen peptides for anti-cancer vaccine by combination of iontophoresis with nanogel. Asian Federation for Pharmaceutical sciences Conference (Jeju, Korea) 2013.11.

豊田真央、池田 豊、長崎幸夫、濱 進、小暮健太郎 癌ワクチンを目指した硬質ナノ粒子の微弱電流による皮膚表層デリバリー:ナノゲルとイオントフォレシスを組み合わせた新しいワクチン.第 63 回日本薬学会近畿支部総会・大会(京都) 2013.10.

豊田真央、吉富 徹、長崎幸夫、濱 進、小暮健太郎 表皮貯留型がんワクチンデリバリーシステムの開発.日本薬剤学会第 28 年会(名古屋) 2013.5.

豊田真央、塩田佳菜子、三上綾、土谷博之、長崎幸夫、瀨進、小暮健太郎 表皮局在型ワクチンデリバリーシステムの開発 第 62 回日本薬学会近畿支部総会・大会 2012. 10. (兵庫)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://labo.kyoto-phu.ac.jp/bukka/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小暮健太郎 (KOGURE Kentaro)  
京都薬科大学・薬学部・教授  
研究者番号：70262540

### (2) 連携研究者

長崎幸夫 (NAGASAKI Yukio)  
筑波大学・数理物質科学研究科・教授  
研究者番号：90198309