

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670013

研究課題名(和文)自己粒子化RNAスポンジを利用した免疫療法用DDS開発

研究課題名(英文)Development of DDS applicable for immune therapy by using self-assembling RNA sponge particle

研究代表者

高倉 喜信(Takakura, Yoshinobu)

京都大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号：30171432

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文):本研究では、ピロリン酸ナトリウムと塩化マグネシウムを混合することで形成されるピロリン酸マグネシウム微粒子(magnesium pyrophosphate particle; MgPP)を取り上げ、これに免疫刺激性核酸であるpoly I:Cを搭載したアジュバントシステムの開発を試みた。MgPP作製時にpoly I:Cを添加することでMgPPに搭載可能であった。poly I:CをMgPPに搭載することでpoly I:Cの免疫細胞による取り込み効率と免疫細胞活性化能が向上した。また、樹状細胞に抗原を添加する際に、poly I:C搭載MgPPを添加することで抗原特異的免疫誘導能が大きく上昇した。

研究成果の概要(英文):In the present study, we selected magnesium pyrophosphate particle (MgPP), and loaded poly I:C, an immunostimulatory nucleic acid, to MgPP to develop an adjuvant system. Poly I:C was loaded to MgPP by adding poly I:C to the MgPP preparation step. Loading poly I:C to MgPP enhanced the uptake of poly I:C by immune cells and following cytokine release. Moreover, the addition of poly I:C-loaded MgPP containing an antigen to dendritic cells resulted in improved antigen presentation.

研究分野：生物薬剤学

キーワード：ドラッグデリバリー アジュバント ワクチン TLR3

## 1. 研究開始当初の背景

Toll 様受容体 (TLR) は、病原体に特有の分子構造を認識し、自然免疫を活性化することで生体防御の役割を担っている。近年、TLR リガンドとなる核酸を免疫活性化アジュバントとして利用する試みが注目されており、がんや感染症を対象とした検討が進められている。CpG DNA を認識する TLR9 と比較して、RNA を認識する TLR3、7、8 が広範な免疫担当細胞で発現していることから、RNA を免疫刺激性核酸として利用した免疫活性化アジュバントの開発が期待されている。しかしながら、その実現には、RNA の分解酵素に対する安定性改善と免疫細胞への効率的な送達が必要である。

本研究では、近年報告された RNA の連続的な *in vitro* 転写反応の際に形成されるスポンジ状微粒子を用いた免疫刺激性核酸のデリバリーキャリアの開発研究を開始した。参考とした報告の続報において、このスポンジ状微粒子がピロリン酸ナトリウムとマグネシウムから形成されることが報告されたことから、ピロリン酸ナトリウムと塩化マグネシウムの混合により形成されるピロリン酸マグネシウム微粒子 (magnesium pyrophosphate particle: MgPP) を用いた、免疫刺激性核酸のデリバリーの可能性について検討することとした。MgPP は、核酸を搭載可能な微粒子であり、核酸を MgPP に搭載することで、分解酵素による核酸の分解を阻害できることが報告されていた。そこで申請者らは、MgPP の高い分解酵素抵抗性に着目し、これを用いた免疫刺激性核酸のデリバリーに基づくアジュバントシステムの開発に着手した。

## 2. 研究の目的

本研究では、MgPP を利用した免疫刺激性核酸の免疫細胞へのデリバリーに基づくアジュバントシステムの開発について検討を行った。モデルの免疫刺激性核酸として、2 本鎖 RNA アナログであり、TLR3 のリガンドである polyI:C を、モデル抗原として卵白アルブミン (ovalbumin: OVA) を選択した。PolyI:C の MgPP への搭載を確認した後、その免疫細胞による取り込みおよび免疫細胞の活性化を評価した。また、抗原提示細胞である樹状細胞によるモデル抗原 OVA の抗原提示に及ぼす polyI:C 搭載 MgPP の影響についても検討した。

## 3. 研究の方法

### PolyI:C 搭載 MgPP の調製

ピロリン酸ナトリウム (2mM) と塩化マグネシウム (16mM) を混合し、インキュベートすることで MgPP を調製した。MgPP の調製時に核酸アジュバントである polyI:C を 200  $\mu$ g/ml の濃度で添加することで MgPP に polyI:C を搭載した。調製した MgPP は、12000g で 10 分間で遠心することで沈降させたのち、

蒸留水で洗浄した後、再度遠心することで回収した。MgPP への polyI:C 搭載量については、調製した MgPP を EDTA により破壊した後、核酸に由来する 260nm の吸光度を測定することで推定した。

### 物性評価

調製した MgPP をスライドガラスに静置した後、走査型電子顕微鏡 (SEM) により観察した。別途、MgPP 中の polyI:C を SYBR Green II 試薬で染色し蛍光顕微鏡観察により MgPP 中の polyI:C を検出した。

### 免疫活性化能の評価

PolyI:C 搭載 MgPP をマウスマクロファージ様細胞株 RAW264.7 細胞に添加し、8 時間後の培養上清中の腫瘍壊死因子 (TNF) -  $\alpha$  量を ELISA 法により定量した。

### 細胞毒性の評価

PolyI:C 搭載 MgPP を RAW264.7 細胞に添加し、MTT assay により 8 時間後の生細胞数を評価した。

### 細胞の MgPP 取り込み

RAW264.7 細胞に Cy3 標識 polyI:C を添加し、4 時間後の細胞中の蛍光を蛍光顕微鏡観察およびフローサイトメトリーにより細胞取り込みを評価した。

### 抗原特異的免疫の誘導

マウス樹状細胞株 DC2.4 細胞と OVA 特異性 T 細胞はハイブリドーマ CD80VA1.3 細胞を共培養し、OVA と polyI:C 搭載 MgPP を添加 24 時間後の培養上清中インターロイキン (IL) -2 量を ELISA 法により定量し、抗原特異的免疫誘導の指標とした。

### 細胞の OVA 取り込み

DC2.4 細胞に FITC 標識 OVA を添加し、2 時間後の細胞の蛍光強度をフローサイトメトリーにより評価した。

### 共刺激分子の発現の評価

DC2.4 細胞に polyI:C 搭載 MgPP を添加し、24 時間後に mRNA を回収した。回収した mRNA について逆転写を行い cDNA を調製した。調製した cDNA について、共刺激分子である CD80 あるいは CD86 特異的プライマーセットを用いて定量的 PCR を行いそれぞれの mRNA 発現量を評価した。このとき、内部標準としてアクチン特異的プライマーセットを用いてアクチンの mRNA 量についても測定を行い、その値を内部標準として用いた。

## 4. 研究成果

### MgPP への polyI:C の搭載の確認と物性評価

予備検討により最適化した濃度でピロリン酸ナトリウムと塩化マグネシウムを 37  $^{\circ}$ C でインキュベートすることで、MgPP が効率的

に作製可能であった。また、SYBR Green II で染色した polyI:C 由来の緑色蛍光が MgPP 中に確認されたことから (図 1 左) MgPP 調製時に polyI:C を添加することで MgPP への polyI:C の搭載が可能であることが示された。また、調製した MgPP を EDTA で分解後、核酸濃度を測定することで搭載効率を見積もったところ、polyI:C の搭載効率は約 50% であった。形成された粒子を走査型電子顕微鏡により観察し、粒子径を測定したところ、核酸を含まない MgPP においては約 850nm、polyI:C 搭載 MgPP においては約 700nm 程度の大きさの球状粒子が観察された (図 1 右)。

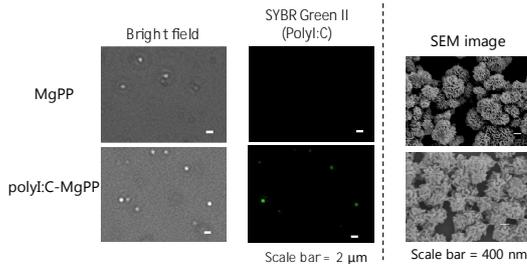


図1. MgPPおよびpolyI:C搭載MgPPの観察 左: SYBR Green II添加後の蛍光顕微鏡観察写真 右: 走査型電子顕微鏡写真

### 免疫細胞による polyI:C 搭載 MgPP の取り込みの評価

RAW264.7 細胞に対し Cy3 標識 polyI:C および Cy3 標識 polyI:C 搭載 MgPP を添加し、2 時間後の polyI:C の細胞への取り込みをフローサイトメトリーにより評価した。その結果、MgPP への搭載により polyI:C の取り込みが約 2.5 倍増加した (図 2)。また、蛍光顕微鏡観察においても、細胞内蛍光量の増大が観察された。

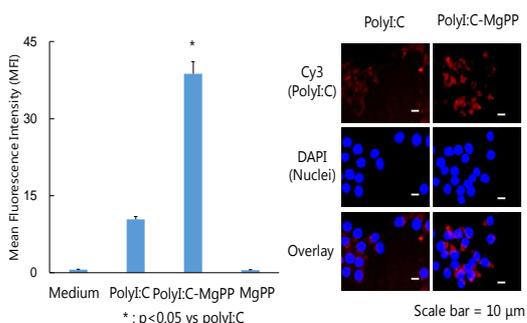


図2. RAW264.7細胞によるpolyI:C搭載MgPP取り込みの評価 左: フローサイトメトリーによる評価 右: 蛍光顕微鏡観察写真

### PolyI:C 搭載 MgPP の免疫活性の評価

RAW264.7 細胞に対し polyI:C または polyI:C-MgPP を添加後の上清中 TNF- $\alpha$  量を指標に、自然免疫の活性化能を評価した。その結果、MgPP に搭載することで RAW264.7 細胞からの TNF- $\alpha$  の産生量が上昇したことから、polyI:C を MgPP に搭載することで自然免疫の活性化能を増強可能であることが明らかとなった (図 3 左)。また、MTT assay により細胞生存率を評価したが、細胞生存率の有意な低下は認められなかったことから (図 3

右) polyI:C-MgPP は細胞毒性をほとんど示

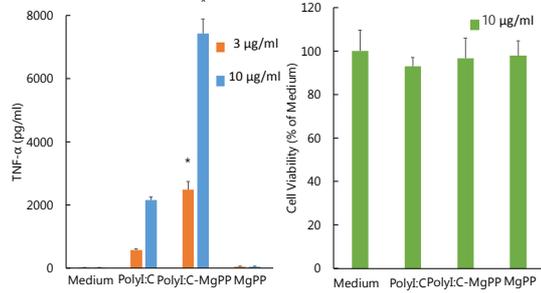


図3. polyI:C搭載MgPPによるRAW264.7細胞の活性化および細胞毒性評価 左: サイトカイン産生評価 右: 細胞生存率評価

さないことが明らかとなった。

### PolyI:C 搭載 MgPP による抗原特異的免疫誘導能の評価

抗原提示細胞としてマウス樹状細胞様細胞株 DC2.4 細胞、モデル抗原として OVA を用い、polyI:C-MgPP 添加による抗原特異的免疫応答を評価した。OVA のクラス 1 エピトープを特異的に認識する T 細胞ハイブリドーマである CD8OVA1.3 細胞と DC2.4 細胞を共培養し、OVA および polyI:C-MgPP を添加した 24 時間後の上清中 IL-2 量を指標に抗原特異的免疫応答を評価した結果、polyI:C-MgPP 添加群において IL-2 産生量の大幅な増加が認められた (図 4)。したがって、polyI:C-MgPP は抗原特異的免疫応答を増強可能であることが示された。

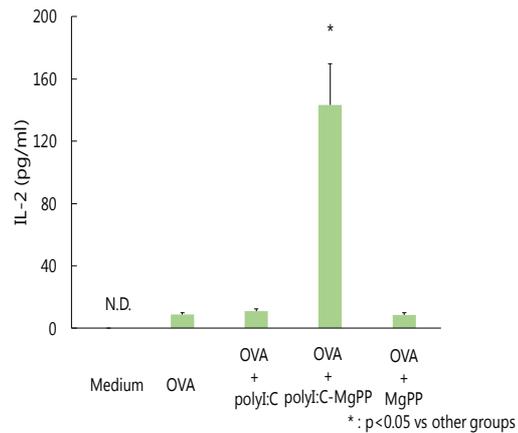


図4. polyI:C搭載MgPPおよびOVAを添加したDC2.4細胞による抗原提示能の評価

次に、polyI:C-MgPP による抗原特異的免疫応答の増強のメカニズムの一端を明らかにするために、FITC 標識 OVA を用いて DC2.4 細胞による OVA の取り込みについてフローサイトメトリー法を用いて評価した。その結果、FITC 標識 OVA の細胞取り込みは、polyI:C-MgPP を添加しても変化なかった (図 5)。したがって、polyI:C-MgPP による抗原特異的免疫応答の増強は抗原タンパク質の取り込み量の増大によるものではないことが示唆された。

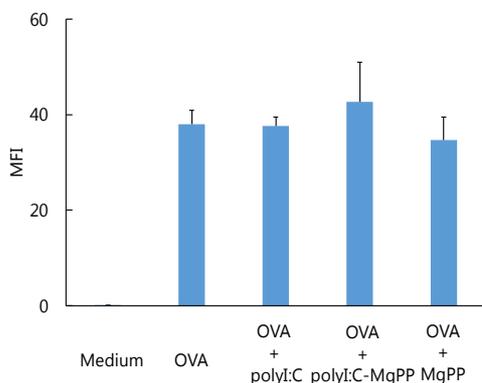


図5. フローサイトメトリーを用いたDC2.4細胞によるFITC-OVA取込みの評価

次に、抗原特異的免疫応答の増強は、共刺激分子であるCD80/CD86の発現上昇によるものではないかと考え、そのmRNA発現量の変化について評価した。その結果、CD86については有意な変化が見られなかったが、CD80の発現はpolyI:C-MgPPの添加で有意に上昇した(図6)。以上の結果から、polyI:C-MgPPによる抗原特異的免疫応答の増強には、樹状細胞でのCD80分子の発現の上昇が関与することが示唆された。

以上、polyI:CをMgPPに搭載することでその免疫活性化能が増強されることを示した。MgPPを基盤とした免疫刺激性核酸のデリバリーシステムは、効率的なアジュバントシステムとなりえると期待できる。

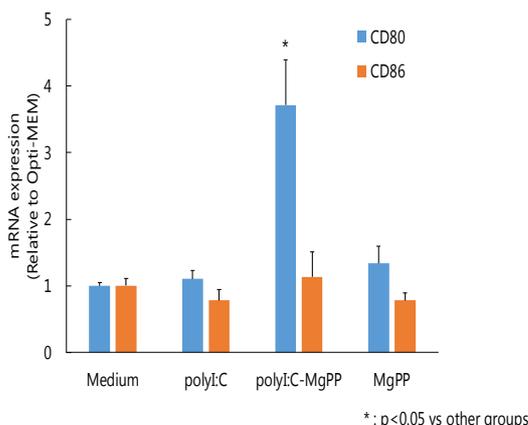


図6. 定量的RT-PCR法によるpolyI:C搭載MgPPを添加したDC2.4細胞における共刺激分子のmRNA発現量評価

## 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 1 件)

Takagi S, Takahashi Y, Sugimura K, Nishikawa M, Takakura Y. Application of magnesium pyrophosphate-based sponge-like microparticles to enhance the delivery efficiency and adjuvant effects of

polyriboinosinic-polyribocytidylic acid in immune cells. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2016, 105, 766-772. doi: 10.1016/j.xphs.2015.11.020.

〔学会発表〕(計 3 件)

高木翔一、高橋有己、杉村佳那子、西川元也、高倉喜信 核酸搭載ピロリン酸マイクロスポンジを利用した免疫アジュバントの開発. 日本バイオマテリアル学会 第9回関西若手研究発表会、2014年8月5日、京都大学船井哲良記念講堂(京都府・京都市)

高木翔一、高橋有己、杉村佳那子、西川元也、高倉喜信 ピロリン酸マグネシウム粒子を用いたワクチンシステムの開発. 日本薬学会第135年会、2015年3月26日、神戸サンボーホール(兵庫県・神戸市)

高木翔一、高橋有己、杉村佳那子、西川元也、高倉喜信 ピロリン酸マグネシウム微粒子を用いた免疫アジュバントのデリバリー. 第65回日本薬学会近畿支部総会・大会、2015年10月17日、大阪大谷大学(大阪府・富田林市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

高倉 喜信 (TAKAKURA, Yoshinobu)  
京都大学・大学院薬学研究科・教授  
研究者番号: 3 0 1 7 1 4 3 2

### (2) 研究分担者

西川 元也 (NISHIKAWA, Makiya)  
京都大学・大学院薬学研究科・准教授  
研究者番号: 4 0 2 7 3 4 3 7

高橋 有己 (TAKAHASHI, Yuki)  
京都大学・大学院薬学研究科・助教  
研究者番号: 0 0 5 4 7 8 7 0