

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：83802

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26350524

研究課題名(和文) 生体吸収性セラミックス  $\beta$ -TCPの新規ワクチン・アジュバントへの応用開発研究課題名(英文) Research toward the development of  $\beta$ -TCP as a novel vaccine adjuvant.

研究代表者

丸山 宏二 (Maruyama, Kouji)

静岡県立静岡がんセンター(研究所)・その他部局等・研究員

研究者番号：20311417

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)： $\beta$ -リン酸三カルシウム( $\beta$ -TCP)は、生体適合性の高い骨補填剤として臨床での実績をもつ。本研究計画では、 $\beta$ -TCPの免疫系賦活作用に着目、新規ワクチン・アジュバントとしての開発研究を行い以下の知見を得た。

(1)  $\beta$ -TCPはマクロファージ(M $\phi$ )と樹状細胞(DC)の活性化と成熟を誘導する。(2) Toll様受容体(TLR)リガンド存在下に  $\beta$ -TCPはM $\phi$ とDCにおけるインフラマソームを活性化する。(3) マウス腫瘍モデルにおいて、 $\beta$ -TCPはTLRリガンドと相乗的に作用し、がんワクチンの抗腫瘍効果を著しく増強する。以上より、 $\beta$ -TCPが有望なワクチン・アジュバントであることが示された。

研究成果の概要(英文)：Beta-tricalcium phosphate ( $\beta$ -TCP) has a reliable long carrier as a bone substituent used in the clinic. In the present study, we focused on the immuno-stimulating potential of  $\beta$ -TCP, and carried out research toward the development of  $\beta$ -TCP as a novel vaccine adjuvant, and obtained the following findings; 1)  $\beta$ -TCP activates and induces maturation of macrophages (M $\phi$ ) and dendritic cells (DC). 2)  $\beta$ -TCP activates inflammasomes in M $\phi$  and DC in the presence of ligands for Toll-like receptors (TLR). 3)  $\beta$ -TCP and TLR ligand synergistically enhances antitumor effect of a cancer vaccine in a mouse tumor model. These findings indicate that the potential of  $\beta$ -TCP as a novel vaccine adjuvant.

研究分野：腫瘍免疫学

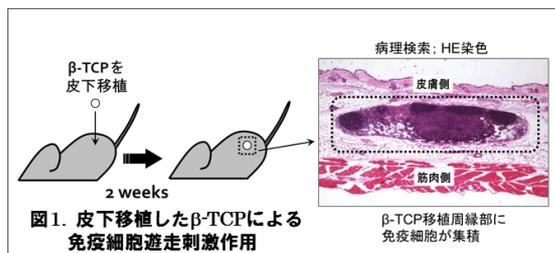
キーワード： $\beta$ -TCP 免疫賦活 マクロファージ 樹状細胞 インフラマソーム ワクチン・アジュバント 癌ワクチン

1. 研究開始当初の背景

免疫系は、Toll-like receptor (TLR) に代表されるパターン認識受容体により病原体関連物質を認識して免疫応答を引き起こす自然免疫系と、抗原受容体遺伝子の再構成により多様な抗原の各々に特異的な免疫応答を起こす獲得免疫系から成る。近年、自然免疫系の活性化がそれに引き続く獲得免疫応答の誘導につながるということが明らかになってきている。がんの免疫療法においては、がん抗原特異的なヘルパーT細胞、細胞傷害性T細胞(CTL)及び抗体産生B細胞による獲得免疫応答の誘導には、抗原提示細胞の機能を増強するアジュバントの使用が重要である。これまで感染症予防ワクチンと共に用いられてきた古典的アジュバントは、様々な問題点も指摘されてきており、適切な免疫増強作用と安全性を有する新たなアジュバントの開発が急務となっている。

骨主成分のリン酸カルシウムの化合物であるβ-リン酸三カルシウム(β-TCP)は、生体に対する毒性が低く、整形外科領域で骨補填材として使用されている。β-TCPの骨形成に対する作用は性状により異なり、製剤がブロック状あるいは顆粒状であるのか、また気孔含有率の違いによって骨細胞誘導能に差のあることが知られている[Lew et al, J Biomater Appl. 2012]。これまでに、骨再生におけるβ-TCPの作用に関しては様々な知見が集積しているが、免疫系に対する作用の詳細は明らかになっていない。申請者らは、これまでにβ-TCPに関して研究を行い、以下の知見を得ている。

(1) 正常 C57BL/6 (B6) マウス皮下へのβ-TCPの移植により、自然免疫系のマクロファージ(M $\phi$ )、樹状細胞(DC)及びNK細胞、獲得免疫系のT細胞、B細胞等が移植周辺部に集積した(図1、特許第5828470号、Tai et al. Int Immunopharmacol. 2014)。



(2) マウス担がんモデルでの抗腫瘍試験において、抗体、サイトカイン、抗原蛋白ワクチン投与(図2)と併用してβ-TCPを皮下に移植したところ[と はヌードマウス(T及びB細胞を欠損する免疫不全動物)、は正常B6マウスを各々用いた試験]全ての試験において抗腫瘍効果の増強が観察された(特許取得; 特許第5990752号、特許第5966129号、特許第6082901号)。

以上の結果より、β-TCPは抗腫瘍効果を増強するアジュバント作用を持つことが明らかとなった。また、試験管内の研究により、β-TCPは炎症に関わるインフラマソームを活性化作用をもつことが示唆された(図3、未発表成績)。本研究は、β-TCPを新規アジュバントとして臨床応用するための基盤研究であり、β-TCPによる免疫系活性化の作用機序の解明を目的とする。

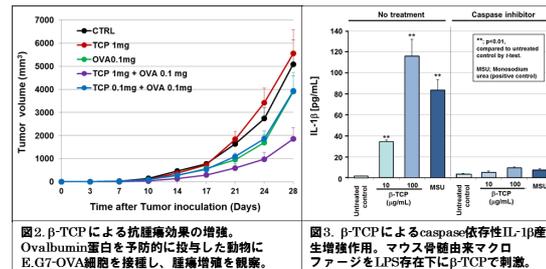


図2. β-TCPによる抗腫瘍効果の増強。Ovalbumin蛋白を予防的に投与した動物にE.G7-OVA細胞を接種し、腫瘍増殖を観察。

図3. β-TCPによるcaspase依存性IL-1 $\beta$ 産生増強作用。マウス骨髄由来マクロファージをLPS存在下にβ-TCPで刺激。

2. 研究の目的

β-TCPは、生体適合性の高い骨補填剤として臨床で幅広く使用されている。申請者らは、マウス皮下へ移植したβ-TCPが免疫細胞の遊走を刺激、移植周辺部に細胞集塊の形成されることを見出した。この結果を受け、免疫機能を増強するアジュバントとしてマウス担がんモデル抗腫瘍試験に用いたところ、抗体・サイトカイン・抗原蛋白ワクチンによる抗腫瘍効果の増強が観察された。試験管内の検討では、β-TCPが抗原提示細胞の成熟を促進し、インフラマソームを活性化作用のあることが示唆された。本研究は、β-TCPを新規アジュバントとして開発するための基盤研究であり、β-TCPによる免疫系活性化の作用機序解明を目的とする。

3. 研究の方法

(1) マウスM $\phi$ とDCの初代培養系を用いる検討

正常B6マウス骨髄細胞よりGM-CSFを用いてM $\phi$ とDCを各々分化させ、これらの細胞の培養系に粒径1~100 $\mu$ mの顆粒状β-TCPを添加して以下の検討を行う。

M $\phi$ とDCの成熟に対する影響

M $\phi$ とDCの培養系にβ-TCPを添加し、細胞表面の成熟マーカー分子、リンパ球活性化を促す共刺激分子(CD80、CD86、及びCD40)、抗原提示に重要なMHCクラスI及びII分子の発現量をフローサイトメトリーによって測定する。また、β-TCPの添加量の影響、細胞毒性の有無についても併せて検討する。

抗原提示細胞によるサイトカイン及びケ

## モカイン等の産生に対する影響

M と DC の培養系に  $\beta$ -TCP を添加し、培養上清中に分泌されたサイトカインやケモカインを市販のサイトカインアレイによってスクリーニングし、さらに候補分子を ELISA 法によって定量し、獲得免疫系活性化に關与する可能性のある分子を同定する。

## インフラマソームに対する影響

予備検討において  $\beta$ -TCP がインフラマソームを活性化することが示されている(図3)。アルミニウム塩等の粒子状物質や尿酸等の結晶状物質は、NOD-like receptor family に属する NLRP3 を含む蛋白複合体のインフラマソームを活性化する [Ogura et al. Cell 2006]。  $\beta$ -TCP のインフラマソームに対する作用をさらに明らかにするため、LPS の前処理をした M と DC の培養系に  $\beta$ -TCP を添加し、培養上清中または細胞内における成熟型 IL-1 $\beta$  及び活性化型 caspase-1 の発現等、インフラマソーム活性化のシグナルを ELISA 法及び Western blotting 法により解析する。また、caspase-1 阻害剤(図3)や活性酸素種産生阻害剤等、インフラマソームの活性化阻害作用をもつ薬剤を用いた詳細な検討を行う。

## (2) マウス腫瘍モデルを用いる抗腫瘍試験

予備検討においては、ovalbumin (以下 OVA) を遺伝子導入したマウスリンパ腫細胞 E.G7-OVA と OVA 蛋白を抗原ワクチンとして用いる予防的抗腫瘍試験を行い、 $\beta$ -TCP がワクチンの抗腫瘍効果を増強することが認められた(図2)。平成26年度には、この実験系を用いてワクチンと  $\beta$ -TCP の投与量、ワクチンの投与スケジュールを変えて試験を行い、 $\beta$ -TCP のアジュバントとしての作用を評価する。また、IFN- $\gamma$  等のサイトカインの血中濃度、抗原(OVA)特異的細胞障害性 T リンパ球の数と活性化状態、抗原(OVA)特異的抗体の抗体価を指標とし獲得免疫系の機能に対する  $\beta$ -TCP の作用を評価する。

## (3) マウス M と DC の初代培養系による検討

### M と DC の機能に対する影響

#### 1) リンパ球の増殖に対する影響の検討

M と DC の培養系に  $\beta$ -TCP を添加して24時間後に細胞を回収、PBS で洗浄後にマウス脾臓細胞と共培養し、脾臓細胞の増殖に対して影響があるかどうかを調べる。M と DC は BALB/c マウスの骨髄から、脾臓細胞は B6 マウスから採取して、異系リンパ球混合培養試験(allo MLR)を行う。

#### 2) リンパ球に対する遊走刺激作用の検討

$\beta$ -TCP を添加した M または DC の培養上清と脾臓細胞を用いて、transwell migration assay を行い、培養上清中の液性因子が免疫細胞の遊走を刺激するかどうかを調べる。

#### NLRP3 ノックアウトマウス骨髄細胞から分化させた M と DC を用いる検討

実験動物生産企業からの購入またはアカデミアからの分譲により NLRP3 ノックアウトマウスを導入し、当動物実験施設にて生産した動物を用いて研究を進めることを計画している。実験動物導入のための事務手続き、輸送、あるいは検疫といった諸手続きや交配による産仔の生産を考慮した場合、実験に安定供給できるのは平成27年度からと想定している。この動物からの M と DC を用いて、 $\beta$ -TCP のインフラマソームに対する作用を調べる。

## 4. マウス腫瘍モデルを用いる抗腫瘍試験

がん抗原ワクチンの抗腫瘍効果をさらに増強することを目的として、 $\beta$ -TCP と TLR リガンドの併用アジュバントを用いて検討を行う。実験には上記2に記載した E.G7-OVA の予防的抗腫瘍試験の系を使用し、TLR リガンドとして Poly(I:C) または Imiquimod を用いる。また、上記3-(2)に記載した NLRP3 ノックアウトマウスを用いて同様な抗腫瘍試験を行い、 $\beta$ -TCP による抗腫瘍効果の増強におけるインフラマソームの寄与について検討する。また、同マウス皮下に移植した  $\beta$ -TCP 周囲への免疫細胞遊走の程度を野生型マウスのものと比較し、 $\beta$ -TCP の免疫細胞遊走刺激作用におけるインフラマソームの果たす役割を検討する。

## 4. 研究成果

### (1) マウス M と DC に対する $\beta$ -TCP の影響

#### M と DC の成熟及び活性化に対する影響

マウス骨髄細胞からサイトカインにより分化させた M と DC の初代培養系に  $\beta$ -TCP を添加したところ、M ではマーカーの F4/80 と CD11b、及び共刺激分子 CD86 の発現が無処置の細胞と比べ有意に亢進した。一方 DC においてはマーカーの CD11c、MHC クラス I 及び II、共刺激分子の CD40、CD80 及び CD86、さらには成熟のマーカーである DEC205 (CD205) やケモカイン受容体 CCR7 の発現が有意に亢進した(共刺激分子の発現を図4に示す)。

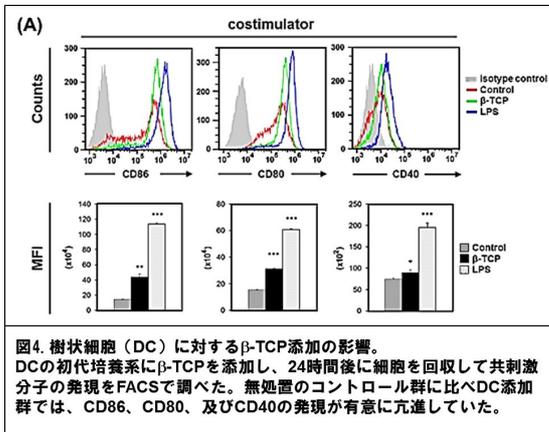


図4. 樹状細胞 (DC) に対するβ-TCP添加の影響。DCの初代培養系にβ-TCPを添加し、24時間後に細胞を回収して共刺激分子の発現をFACSで調べた。無処置のコントロール群に比べDC添加群では、CD86、CD80、及びCD40の発現が有意に亢進していた。

これら表面抗原の発現亢進は、M と DC の成熟と活性化を示唆する成績である。

M と DC によるサイトカイン及びケモカイン等の産生に対する影響

M と DC の初代培養系に β-TCP を添加して 24 時間後の培養上清を回収、サイトカインやケモカインの産生を市販のサイトカイン・アレイを用いてスクリーニングを行い、産生量の変化した候補分子について ELISA により定量した。その結果、M ではサイトカインの IL-1ra、ケモカインの CCL2、CCL3、CCL4、CCL5、及び CXCL2 の産生が有意に亢進していた。DC では、サイトカインの M-CSF と IL-1ra、ケモカインの CCL2、CCL3、及び CXCL2 の産生が有意に亢進していた。これらの成績より、β-TCP は M と DC のサイトカインやケモカインの産生を誘導することが明らかとなった。しかし、その刺激作用は、TLR リガンドの LPS ほど強くなく、より緩徐な作用であった。

M と DC の機能に対する影響

β-TCP の抗原提示細胞の機能に対する影響を調べる目的で、1) 異系リンパ球混合培養試験 (allo MLR)、2) 細胞内への外来物質取り込み機能試験、3) transwell migration assay を行った。

- 1) allo MLR: C57BL/6 マウス由来の DC と BALB/c マウスの脾臓細胞を用いて試験を実施したところ、無処置の DC と比較して β-TCP で処理した DC が脾臓細胞の増殖をより強く促進する傾向が見られたが、残念ながら統計的に有意な差はではなかった。
- 2) 細胞内への外来物質取り込み機能試験: DC を用いて FITC-標識デキストランの細胞内取り込みに対する β-TCP の影響を調べたところ、処置の DC と比較して β-TCP で処理した DC では取り込みが有意な低下が観察され、β-TCP によって DC の成熟が促進されることが示された。
- 3) transwell migration assay: β-TCP で処理した DC の培養上清は、無処置 DC のものと比べて脾臓細胞の遊走を有意に促進し、

β-TCP によって誘導されたサイトカインやケモカイン等の液性因子が免疫細胞の遊走を刺激することが明らかとなった。

*In vitro* で得られたこれらの成績より、生体に投与された β-TCP の作用の少なくとも一部は、M と DC の機能の亢進を介する作用であると考えられた。

インフラマソームに対する影響

本研究前の予備実験において、β-TCP は低濃度の TLR リガンド (LPS) 存在下に M によるインフラマソームを、caspase 依存性に活性化することが明らかとなっていた。本研究においては、まず DC を用いて同様な実験を行い、DC においても β-TCP がインフラマソームを caspase 依存性に活性化することを確認した。

次に、IL-1β の成熟・分泌に關与する caspase-1 の発現をウエスタンブロットで解析した (図 5)。β-TCP またはポジティブ・コントロール MSU の添加・非添加によらず細胞内には caspase-1 が存在する (左側最上段)。β-TCP 100 μg または MSU 100 μg を添加した場合には培養上清中に活性化型 caspase-1 が検出される (左側二段目)。一方 β-TCP または MSU の添加・非添加によらず細胞内には IL-1β 前駆体が観察される (左側3段目) が、細胞外に分泌された活性化型 IL-1β は β-TCP 100 μg または MSU 100 μg を添加したレーンにおいてのみ観察される。さらに、caspase インヒビターの Z-VAD-fmk を培養系に加えた場合、活性化型 caspase-1 は全く観察されず、活性化型 IL-1β は β-TCP 100 μg 添加レーンでうっすらと見えるだけで他のレーンでは観察されていない。これらの成績より β-TCP は caspase-1 依存性に活性化型 IL-1β を誘導することが明らかとなった。

また、β-TCP のインフラマソーム活性化能を証明するため、インフラマソーム構成蛋白を欠く NLRP3 ノックアウト・マウスから調製した DC の初代培養系に低濃度の LPS と β-TCP を添加し、IL-1β 産生に対する影響を調べた。その結果、NLRP3 欠損 DC では IL-1β の産生は完全に抑制され、β-TCP がインフラマソーム活性化能をもつことが証明された。

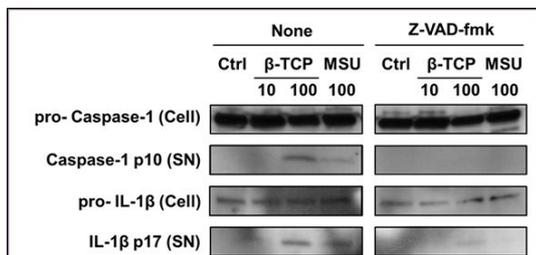


図5. IL-1β 産生に対する β-TCP の影響と caspase-1 の関与。MΦ の初代培養系に β-TCP を添加し、細胞内と培養上清中の IL-1β と caspase-1 分子型をウエスタン・ブロッティングで解析した。活性化型 IL-1β は、caspase-1 依存性に産生される。

#### 4. マウス腫瘍モデルを用いる抗腫瘍試験

本研究前の予備実験において、マウス腫瘍モデルにおいて $\beta$ -TCP が癌ワクチンの作用を増強することが明らかとなった(図2)。本研究においては、 $\beta$ -TCP による抗腫瘍効果増強作用をさらに強めることを目的として、TLR リガンドのひとつである Poly(I:C)との併用投与を行った。マウス腫瘍モデルには、E.G7-OVA の実験系を用いて、週1回、腫瘍抗原の OVA 蛋白、 $\beta$ -TCP、及び Poly(I:C)を3週間に亘って投与し、実験開始4週目に $10^5$ 個の E.G7-OVA 細胞を皮下投与して約1か月間に亘り腫瘍増殖をモニターした。実験群として以下の各群を設定した。

- (1) 無処置コントロール群
- (2) OVA +  $\beta$ -TCP (100 $\mu$ g) 投与群
- (3) OVA + Poly(I:C) (250 $\mu$ g) 投与群
- (4) OVA +  $\beta$ -TCP + Poly(I:C) (10 $\mu$ g) 投与群
- (5) OVA +  $\beta$ -TCP + Poly(I:C) (50 $\mu$ g) 投与群
- (6) OVA +  $\beta$ -TCP + Poly(I:C) (250 $\mu$ g) 投与群

腫瘍細胞接種28日後のデータで比較した場合、全ての処置群で無処置コントロール群と比べて有意な増殖抑制が観察された。無処置コントロール群の腫瘍体積と比較して、(2)群は65%、(3)群は33%、(4)群は37%、(5)群は19%の体積で、(6)群では全例で腫瘍の生着を認めなかった(図6)。

本成績から、インフラマソーム活性化能をもつ  $\beta$ -TCP と TLR リガンドの Poly(I:C)の併用投与により非常に強い抗腫瘍効果が惹起されることが明らかとなった。

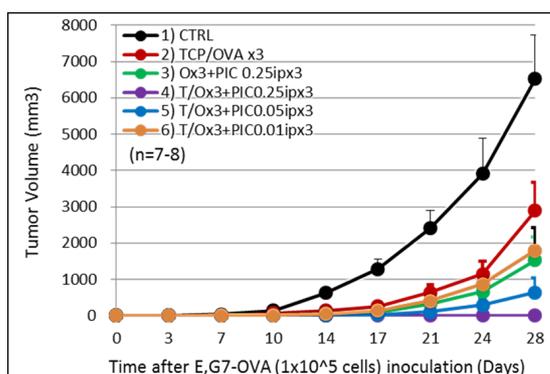


図6. マウス腫瘍モデルにおける  $\beta$ -TCP と Poly(I:C) の相乗的抗腫瘍効果増強作用。E.G7-OVA マウス腫瘍モデルに癌ワクチン (OVA蛋白)、 $\beta$ -TCP、Poly(I:C) を週に1回、3週に亘って投与し、4週目に $10^5$ 個のE.G7-OVAマウス腫瘍細胞を皮下に投与、約1か月にわたって腫瘍増殖をモニターした。腫瘍細胞接種後28日目では、無処置コントロール群と比べて全ての実験群で有意な腫瘍増殖抑制が観察された。この中で、 $\beta$ -TCP と Poly(I:C) の併用投与群では特に強い抗腫瘍効果の増強が認められた。

$\beta$ -TCP と Poly(I:C)の併用による抗腫瘍効果増強の作用機序を解明する目的で、サイトカイン等、マウス血中のパラメータをいくつか測定した。そのうち、 $\beta$ -TCP と Poly(I:C)併用投与群で有意に濃度の高かった(細胞数の多かった)ファクターとして、  
IFN- $\gamma$

#### OVA 特異的 IgG

OVA 特異的細胞障害性 T 細胞 (CTL) があげられる。抗腫瘍効果増強の要因として、これらのファクターが複合的に作用していたものと推察されるが、一つ一つのファクターを個別に阻害することにより貢献の度合や相互の関連性を、今後の研究において明らかにする必要があると考えられる。

また、NLRP3 ノックアウト・マウスを用いて同様な抗腫瘍試験を行った。当初の予測では、ノックアウト・マウスでは抗腫瘍効果の増強がキャンセルされると考えて実験を行ったが、抗腫瘍効果は減弱するものの完全にキャンセルされることはなかった。この結果からは NLRP3 類縁蛋白による代償の機構が存在する可能性が考えられた。

これまでに本研究で得られている成果を統合すると、インフラマソーム活性化能をもつ  $\beta$ -TCP は、新規のワクチン・アジュバントとして有望であること、そして免疫系の異なるシステム (例えば TLR シグナリングやインフラマソーム) を複数活性化するような物質や方法は、免疫賦活の方法論として有効であると考えられる。

#### <引用文献>

Ogura Y, Sutterwala FS, Flavell RA. The inflammasome: first line of the immune response to cell stress. Cell 2006, 126, 659-62.

Tai S, Cheng JY, Maruyama K, et al. Characterization of beta-tricalcium phosphate as a novel immunomodulator. Int Immunopharmacol. 2014, 19, 45-51.

#### 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)

Tai S, Cheng JY, Ishii H, Shimono K, Zangiacoimi V, Satoh T, Hosono T, Suzuki E, Yamaguchi K, Maruyama K. Effects of beta-tricalcium phosphate particles on primary cultured murine dendritic cells and macrophages. Int Immunopharmacol 2016, 40, 419-427.

[学会発表](計 2 件)

丸山宏二、田井祥子、石井秀衛、下野香澄、程錦雁、佐藤卓朋、山口建、免疫賦活物質としての $\beta$ -TCP のポテンシャルについて、第15回 日本再生医療学会総会(2016、大阪)

丸山宏二、田井祥子、程錦雁、下野香澄、石井秀衛、Vincent Zangiacomì、佐藤卓朋、細野哲司、鈴木恵美子、山口建、免疫賦活物質としてのβ-TCP のポテンシャル インフラマソーム活性化能について、第16回 日本再生医療学会総会(2017、仙台)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称:「ワクチン・アジュバント」  
発明者:丸山宏二、程錦雁ほか  
権利者:静岡県、オリンパス株式会社  
種類:特許(米国出願)  
番号:13/948, 273  
出願年月日:2012年1月30日  
国内外の別: 国外

取得状況(計 4 件)

名称:免疫誘導剤  
発明者:丸山宏二、程錦雁、他  
権利者:オリンパス株式会社、静岡県  
種類:特許  
番号:特許第5828470号  
取得年月日:2015年10月30日  
国内外の別:国内

名称:抗体療法の効果増強剤  
発明者:丸山宏二、程錦雁、他  
権利者:静岡県、オリンパス株式会社  
種類:特許  
番号:特許第5990752号  
取得年月日:2016年8月26日  
国内外の別:国内

名称:免疫賦活剤  
発明者:丸山宏二、程錦雁、他  
権利者:静岡県、オリンパス株式会社  
種類:特許  
番号:特許第5966129号  
取得年月日:2016年7月15日  
国内外の別:国内

名称:ワクチン・アジュバント  
発明者:丸山宏二、程錦雁、他  
権利者:静岡県、オリンパス株式会社  
種類:特許  
番号:特許第6082901号  
取得年月日:2017年2月3日  
国内外の別:国内

〔その他〕

#### JST 新技術説明会

2) 新規免疫賦活物質として期待される  
-TCP のポテンシャルについて  
静岡県立静岡がんセンター研究所 実験動物管理室 室長 丸山 宏二  
[https://shingi.jst.go.jp/past\\_abst/abst/2015/Pharmavalley/tech\\_property.html](https://shingi.jst.go.jp/past_abst/abst/2015/Pharmavalley/tech_property.html)

#### JST 新技術説明会 channel

「新規免疫賦活物質として期待される  
-TCP のポテンシャルについて」 静岡県立静岡がんセンター研究所 実験動物管理室 室長 丸山 宏二  
<https://www.youtube.com/watch?v=ss8oBnTW8hk>

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者  
丸山 宏二 (MARUYAMA, Kouji)  
静岡県立静岡がんセンター研究所・実験動物管理室・室長  
研究者番号: 20311417

(2) 研究分担者  
( )

研究者番号:

(3) 連携研究者  
石井 秀衛 (ISHII, Hidee)  
静岡県立静岡がんセンター研究所・実験動物管理室・研究員  
研究者番号: 60571213

(4) 研究協力者  
( )