

令和元年5月29日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15505

研究課題名(和文) がん移行性免疫細胞を用いた薬物デリバリー法の開発

研究課題名(英文) Development of cell-based intratumor drug delivery using immune cells

研究代表者

清水 太郎 (SHIMIZU, Taro)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(薬学域)・特任助教

研究者番号：30749388

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、免疫細胞を用いたがん組織への薬物送達法の開発を試みた。免疫細胞はがん組織へと移行する性質を持っているため、これを薬物送達システムとして用いた。種々の免疫細胞を含む脾臓細胞を投与したところ、T細胞や顆粒球のがん組織移行性が高いことが明らかになった。また脾臓細胞を投与する前に抗がん剤であるDoxilや免疫調節剤であるFTY720を前投与することにより、T細胞のがん移行性を向上させることに成功した。さらに免疫細胞に薬物を搭載することにも成功しており、これらを併用することによってより効率的ながん治療が可能になると期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ナノ粒子を用いてがん組織へと抗がん剤を送達する試みは古くから行われているが、必ずしも十分な治療効果が得られているわけではない。本研究では、がん組織への移行性を見出す免疫細胞候補を見出し、その移行性を向上させる方法を開発した。薬物搭載免疫細胞を用いることで、抗がん剤搭載ナノ粒子ではこれまで治療が難しかったがん種の治療も可能になる可能性が高く、臨床への応用が期待される。また細胞の体内動態制御に関して本研究で得られた知見は、今後の細胞治療にも応用できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we tried to develop a novel drug delivery system using immune cells. Immune cells were used as drug delivery system because they can migrate into tumor tissues automatically. We found that T cells and granulocytes migrated into tumor tissue following intravenous injection of splenocytes. In addition, the pretreatment with chemotherapeutic agent (Doxil) or immunomodulatory (FTY720) enhanced the intratumor migration of T cells. Further, we have succeeded to attach the chemotherapeutic agents to immune cells. These results suggest that immune cells attaching chemotherapeutic agents might show higher antitumor effect via enhanced intratumor migration of the cells.

研究分野：薬剤学

キーワード：がん 養子移入療法 薬物送達 細胞送達 がん免疫療法

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

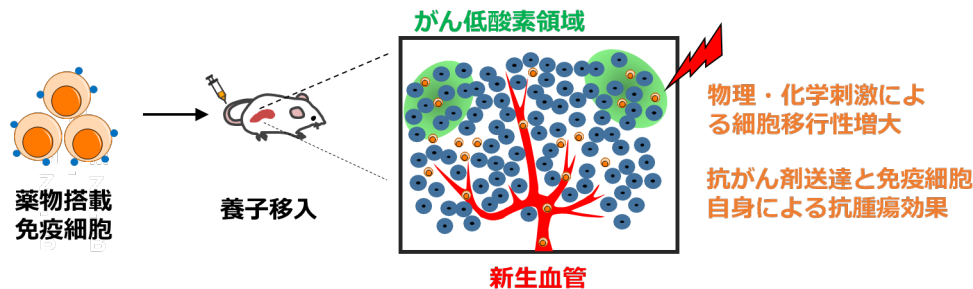
### 1. 研究開始当初の背景

抗がん剤をがん組織へと選択的に送達させるべく、Drug Delivery System (DDS) の研究開発が盛んに行われている。DDS として汎用されている各種ナノ粒子は、がん組織の未熟な新生血管から漏出しやすく、またがん組織のリンパ管が未発達なために、がん組織に蓄積しやすいことが明らかになっている (Enhanced Permeability and Retention ; EPR 効果)。実際、抗がん剤を封入したナノ粒子は、遊離型の抗がん剤と比較して多量かつ選択的にがん組織へと蓄積し、高いがん治療効果を発揮することが数多く報告されている。一方で、EPR 効果によるナノ粒子のがんへの蓄積には限界があることも近年報告されている。肝臓がんや腎臓がんでは EPR 効果がよく見られるものの、膵臓がんや前立腺がんでは EPR 効果が弱いとされている。また、血管から離れたがん内部の低酸素領域へのナノ粒子の拡散は制限されている。このような背景から、がん内部へと薬物を送達できる新規 DDS の開発が望まれている。

近年、新規 DDS として細胞をキャリアとして用いる試みがなされている。細胞キャリアは、ナノ粒子キャリアと比較して生体適合性が高く、滞留性もよい。さらに生きた細胞を用いることから、自発的遊走が可能であり、組織標的化能が高いと考えられる。実際にかん抗原特異的 T 細胞をキャリアとして用いることで、ナノ粒子キャリアより優れたがん集積性を示すことが明らかになっている。しかしながら、どのような細胞がかん細胞へ移行しやすいのか、またその移行性を制御できるのかといった観点からの研究はこれまで行われていなかった。がん組織内には様々な免疫細胞が存在しており、種々の刺激に応じてがん免疫環境が変化することが知られている。そのため抗原特異的 T 細胞だけでなく、他の免疫細胞もがん組織へと薬物を効率的に送達する新規細胞キャリアとなるのではないかと考えた。

### 2. 研究の目的

本研究では、免疫細胞を多量に含む脾臓細胞の中からがん組織移行性の高い免疫細胞サブセットを明らかにすることを目的とした。さらに物理的・化学的刺激を組み合わせることにより、免疫細胞のがん移行性を向上させるプロトコルを確立しようと試みた。最終的に、免疫細胞に抗がん剤を搭載し、がん細胞を殺傷することができるか検証した。



### 3. 研究の方法

#### (1) 蛍光標識脾臓細胞の調製

マウスから脾臓を回収して懸濁した後、溶血剤によって赤血球を除去して脾臓細胞懸濁液とした。調製した脾臓細胞懸濁液に蛍光色素である 5-(and 6)-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) を加えて 37 °C で 10 分間インキュベーションして蛍光標識脾臓細胞を調製した。

#### (2) 担がんマウスの作製および蛍光標識脾臓細胞の投与

マウスに OVA 発現マウス胸腺腫 (EG7-OVA)、マウスルイス肺がん (LLC)、もしくはマウス黒色腫 (B16-BL6) を皮下投与し、担がんマウスを作製した。担がんマウスに蛍光標識した脾臓細胞を静脈内投与し、24 時間後にかん組織を回収した。

脾臓細胞のがん移行性を向上させるために、抗がん剤であるドキソルピシン封入リポソーム (Doxil)、免疫調節剤であるフィンゴリモド (FTY720)、温熱処置を併用した。Doxil は脾臓細胞投与の 2 日前に 1 回静脈内投与、FTY720 は投与 3 日前から毎日腹腔内投与、温熱処置は投与 6 時間前から 38.5 °C で行った。

#### (3) がん細胞懸濁液の調製およびフローサイトメトリー解析

摘出したがん組織を細切した後、コラゲナーゼおよび Dispase を添加して 37 °C で 40 分間インキュベーションした。さらに DNase を添加した後に Gentle MACS dissociator を用いてホモジナイズし、がん細胞懸濁液を調製した。調製した細胞に各種抗体を加えて 4 °C で 20 分間インキュベーションして染色し、がん組織内に移行した免疫細胞をフローサイトメトリー解析した。

#### (4) 脾臓細胞への抗がん剤封入リポソームの搭載

抗がん剤としてはドキシソルピシンを用いた。脾臓細胞表面のチオール基にリポソームを結合させるために、マレイミド末端 PEG 脂質を含むリポソームを用いた。ドキシソルピシン封入リポソームは NanoAssemblr を用いて調製した。未封入のドキシソルピシンを除去した後、脾臓細胞とドキシソルピシン封入リポソームを 4 で 30 分間インキュベーションした。脾臓細胞へ結合したドキシソルピシン封入リポソームを抽出した後、結合量を蛍光マイクロプレートリーダーで評価した。

#### (5) 抗がん剤搭載脾臓細胞によるがん細胞のアポトーシスの評価

LLC を 24 ウェルプレートに播種して 24 時間前培養した後、ドキシソルピシン搭載脾臓細胞を添加し、さらに 24 時間培養した。LLC によるドキシソルピシンの取り込み量および LLC のアポトーシスをフローサイトメトリーによって評価した。

### 4. 研究成果

#### (1) がん種の違いによる脾臓細胞のがん移行性の違いの評価

各種がん細胞を皮下移植したマウスに脾臓細胞を養子移入し、がん組織移行性を評価した。B16-BL6 と比較して、EG7-OVA や LLC を移植したマウスにおいて、養子移入した脾臓細胞が有意に多くがん組織に移行していた。がん組織に移行した脾臓細胞中のサブセットを解析したところ、CD4+ T 細胞の流入が最も多く、その他に顆粒球、CD8+ T 細胞、マクロファージなども流入していた。この傾向はがん種によらず同一であったため、以降の検討では、LLC をモデルがん細胞として使用した。

#### (2) 温熱処置が脾臓細胞のがん移行性に与える影響

LLC を移植したマウスを 38.5 で 6 時間温熱処置した後に脾臓細胞を養子移入し、がん移行性を評価した。本温熱処置条件下においては、全脾臓細胞のがん移行性の向上も各免疫細胞サブセットの移行性の変化もみられなかった。

#### (3) Doxil の前処置が脾臓細胞のがん移行性に与える影響

LLC を移植したマウスに Doxil を静脈内投与した 2 日後に脾臓細胞を養子移入し、がん移行性を評価した。Doxil の前処置を行っていない場合と比較して、全脾臓細胞のがん移行性が約 3 倍に増加した。各細胞の移行性を比較したところ、CD4+ T 細胞の移行性のみが Doxil の前処置によって増加していた。

#### (4) FTY720 の前処置が脾臓細胞のがん移行性に与える影響

LLC を移植したマウスに FTY720 を 3 日間毎日腹腔内投与した 1 日後に脾臓細胞を養子移入し、がん移行性を評価した。FTY720 の前処置によって全脾臓細胞のがん移行性が約 2 倍に増加した。FTY720 の処置によって、CD4+ T 細胞だけでなく、CD8+ T 細胞のがん移行性も増加していた。

#### (5) Doxil と FTY720 の前処置によって脾臓細胞のがん移行性が向上したメカニズムの解析

Doxil と FTY720 を前処置した際のがん組織内の免疫環境変動について経時的に評価した。Doxil の投与 2 日後にはがん組織内のホスト由来の CD4+ T 細胞が減少していたが、3 日後には回復していた。また FTY720 の 3 日間投与の 1 日後にはがん組織内のホスト由来の CD4+ T 細胞や CD8+ T 細胞が減少していたが、2 日後には回復していた。がん組織内のホスト由来の免疫細胞を一過性に減少させることにより、それを補う形でドナー由来の各免疫細胞のがん移行性が増加することが示唆された。

#### (6) 抗がん剤封入リポソームの脾臓細胞への搭載とがん細胞傷害効果

ドキシソルピシンを封入したマレイミド末端 PEG 修飾リポソームと脾臓細胞を 4 で 30 分間反応させたところ、濃度依存的にドキシソルピシン封入リポソームが脾臓細胞に結合することが明らかになった。メトキシ末端の PEG 修飾リポソームを用いた場合ではこのような結合は観察されなかったことから、リポソーム表面のマレイミドと細胞表面のチオールが結合していることが示唆された。さらにドキシソルピシン搭載脾臓細胞を LLC に添加して培養したところ、LLC によるドキシソルピシンの取り込みと LLC のアポトーシスが観察された。このことから、抗がん剤搭載脾臓細胞は抗腫瘍効果を誘導できることが示唆された。

以上の結果より、がん組織移行性を示す免疫細胞候補として、従来用いられてきた抗原特異的 T 細胞だけでなく、様々な特異性の T 細胞を見出した。またこれらの T 細胞のがん組織への移行性を抗がん剤や免疫調節剤を用いることで向上させることに成功した。さらに免疫細胞に抗がん剤を搭載する方法を確立しており、これらを併用することにより、効率的にがん治療を行えることが期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計3件)

(1) 清水 太郎、異島 優、石田 竜弘、タンパクの PEG 修飾による抗 PEG 免疫応答の誘導、日本薬学会第 139 年会、2019 年

(2) 中見 祥一、清水 太郎、異島 優、石田 竜弘、Doxil 前処置による養子免疫細胞のがん移行性向上に関する検討、第 57 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会、2018 年

(3) Taro Shimizu, Development of marginal zone B cell-targeted cancer vaccine, 第 6 回日中ナノメディシンシンポジウム、2018 年

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

特になし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。