

平成 31 年 4 月 29 日現在

機関番号：24403

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2018

課題番号：17K20110

研究課題名（和文）正電荷脂質・機能性多糖ハイブリッドによる腫瘍免疫抑制解除システムの創出

研究課題名（英文）Fabrication of immunosuppression cancel system in tumor using cationic lipid-functional polysaccharide hybrids

研究代表者

弓場 英司（Yuba, Eiji）

大阪府立大学・工学（系）研究科（研究院）・准教授

研究者番号：80582296

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究では、腫瘍内の免疫抑制細胞を免疫活性化型の細胞へ再極性化するためのがん抗原キャリアシステムを構築した。正電荷脂質と機能性多糖を導入したリポソームによって、免疫担当細胞への抗原導入、強力な細胞活性化に成功した。さらには免疫抑制的に傾いた細胞を免疫活性化型へ再極性化できることが示唆されたことから、本ナノキャリアシステムは、がん免疫療法用の免疫抑制解除システムとしての利用が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腫瘍内の免疫抑制に関わる免疫チェックポイント分子に対する阻害剤が開発され、劇的ながん治療効果を示しているが、その高額な薬価から、より安価な代替治療システムの開発が急務である。本研究は、腫瘍に存在する免疫抑制細胞を、強力な免疫賦活作用をもつ正電荷脂質・カードラン誘導体ハイブリッドを用いて、免疫活性化細胞へと変化させることを検討した。このような免疫抑制解除リポソームにより、非常に高い免疫誘導機能を持つ治療システムが実現でき、がん免疫療法の確立に大きく寄与できる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we developed cancer antigen delivery systems to achieve re-polarization of immunosuppressive cells in tumor microenvironments to immunoactivatable cells. Introduction of cationic lipids and functional polysaccharide derivatives into antigen-loaded liposomes achieved antigen delivery into immunocompetent cells and strong activation of immune cells. Furthermore, these liposomes could induce the activation of immunosuppressive macrophages. Therefore, these nanocarrier systems are promising as cancel system of immunosuppression in tumor towards cancer immunotherapy.

研究分野：生体関連高分子、ドラッグデリバリーシステム、免疫誘導システム

キーワード：リポソーム pH応答性高分子 アジュバント 免疫抑制解除 多糖 細胞傷害性Tリンパ球 がん免疫療法 正電荷脂質

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がん免疫療法が、副作用の少ない第4のがん治療として注目されている。がん免疫療法の実現には、がん抗原を免疫細胞へ導入し、免疫細胞を成熟化させてがん特異的に攻撃できる細胞性免疫を誘導することが必要である。申請者はこれまで、免疫細胞の中でも最も強力な抗原提示能を持つ樹状細胞に注目し、樹状細胞にがん抗原を導入して細胞性免疫を誘導するための抗原デリバリーシステムの開発を行ってきた。弱酸性 pH に応答して膜融合性となる機能性高分子を固定化した抗原封入リポソームを作製したところ、このリポソームが樹状細胞に効果的に取り込まれ、エンドソーム内の酸性 pH に応答して膜融合性となり、がん抗原を細胞内部に導入した結果、抗原特異的な細胞性免疫が誘導され、担がんマウスにおいて、がん治療効果を得ることに成功した(*Biomaterials*, **35**, 3091 (2014), *Biomaterials*, **34**, 3042 (2013)など)。

一方、腫瘍内の免疫抑制に関わる免疫チェックポイント分子に対する阻害剤(抗体医薬)が実用化され、劇的ながん治療効果を示していることから、がん免疫療法において、腫瘍の免疫抑制を解除することが高い治療効果を得るために重要であると考えられている。しかしながら、抗体医薬の薬価は非常に高額であり、より安価な材料で免疫抑制を解除することができる技術の開発が急務である。

2. 研究の目的

そこで本研究は、腫瘍組織内の免疫抑制に関わる細胞(腫瘍関連樹状細胞(TADC)、腫瘍関連マクロファージ(TAM)、ミエロイド由来抑制細胞(MDSC))を、免疫を活性化する細胞へと変化させることで、免疫治療効果を劇的に向上させ得る、腫瘍免疫抑制の解除システムの開発に挑戦する。具体的には、正電荷脂質と、カルボキシ基導入多糖誘導体を含有するリポソームを作製し、これを腫瘍内へ投与する。腫瘍内へ投与された正電荷脂質 多糖誘導体ハイブリッドリポソームは、免疫抑制細胞に作用して免疫を活性化する状態へと再極性化させる。同時に、リポソーム内に封入されたがん抗原がこれらの細胞に導入されることで、がん特異的な免疫が誘導され、免疫抑制解除・がん免疫誘導の相乗効果によって極めて強力ながん免疫治療効果を実現する(図1)。

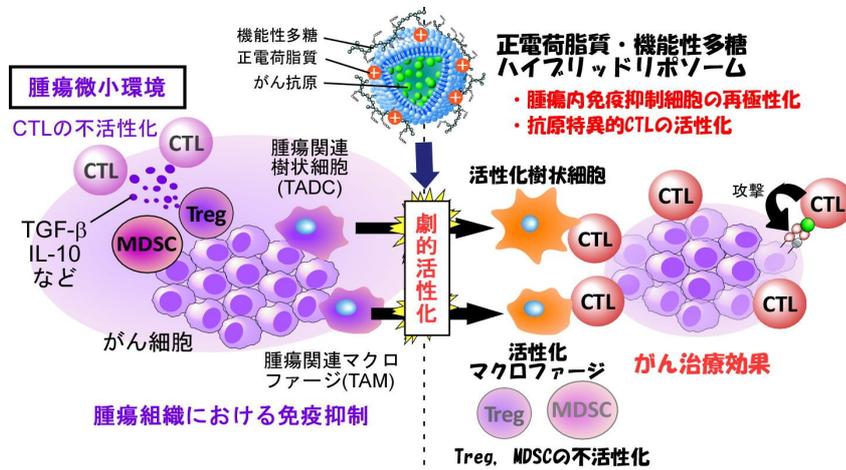


図1 本研究の概要。

3. 研究の方法

(1) 正電荷脂質とカルボキシ基導入多糖誘導体を含有するリポソームの作製

様々な多糖とジカルボン酸無水物を用いたエステル化反応により、様々なカルボン酸ユニットを持つ pH 応答性高分子の合成を行った。また、リポソームへの固定化のために長鎖アルキル基を5~10%導入した。化合物の同定はNMRにより行った。合成した各種高分子を、蛍光色素を封入したリポソームに添加し、pHを変化させることでそのpH応答性と脂質膜との相互作用を調べた。また各種高分子を固定化したリポソーム(正電荷脂質あり、なし)のマウス樹状細胞株DC2.4細胞またはマウスマクロファージ由来株RAW264.7細胞による取り込み、細胞内への抗原デリバリー機能を調べた。

(2) リポソームの免疫細胞活性化機能評価

各多糖誘導体を修飾したリポソーム(正電荷脂質あり、なし)をDC2.4細胞またはRAW264.7細胞に添加し、所定時間後に細胞から産生された各種サイトカインを測定することで、リポソームの免疫誘導機能を調べた。また、モデル抗原としてOVAを含むリポソームをDC2.4細胞に加え、OVA抗原ペプチドとMHCクラスI分子との複合体を認識して増殖するT細胞と共培養し、その増殖を調べることで、リポソームによる抗原提示機能を評価した。また、RAW264.7細胞をメラノーマ由来B16F10細胞の培養上清で培養し、通常の培養液で培養した細胞と比べて免疫抑制に関わるサイトカインの産生が促進されるかをELISA法により評価した。

4. 研究成果

(1) 研究の主な成果

pH 応答性官能基を導入したカードラン誘導体を修飾したリポソームに様々なモル比で正電荷脂質を加えたところ、モル比で15%以上ではリポソームの凝集が確認されたため、これ以下

の導入率で検討を行った。リポソームに正電荷脂質を導入すると、13%までは粒形に大きな変化がなかったが、ゼータ電位が大きく低下した。フェノール硫酸法を用いてリポソーム当たりの多糖修飾量を調べたところ、正電荷脂質の導入によってリポソーム当たりの多糖修飾量の増加が確認された。脂質膜に正電荷脂質が導入されることで、静電相互作用によりリポソームへの多糖誘導体の固定化量が増加したと考えられる。各リポソームは pH 6~5 の弱酸性領域において内包物を速やかに放出した。各リポソームで処理した DC2.4 細胞から産生されるサイトカイン量は正電荷脂質導入によって増加し、正電荷脂質の導入によって、樹状細胞を効果的に活性化できることがわ

かった(図2)。この傾向はデキストランやマンナンなどを主鎖とする多糖誘導体を用いた場合でも同様であったが、特にカードラン誘導体修飾リポソームへ正電荷脂質を導入すると、IL-12の産生が80倍に増加し、カードラン誘導体と正電荷脂質の組み合わせによって、相乗的に樹状細胞を活性化できることが示唆された。

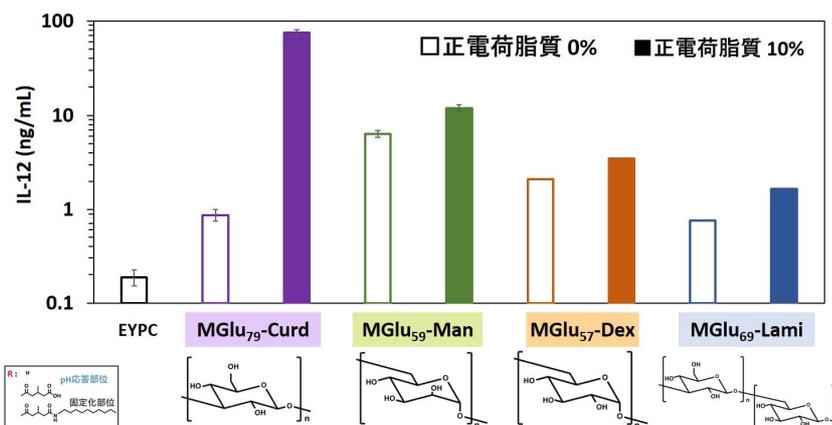


図2 多糖誘導体修飾リポソームへの正電荷脂質導入による免疫細胞の活性化。

正電荷脂質導入カードラン誘導体修飾リポソームは封入したモデル抗原タンパク質 OVA をサイトゾルへとデリバリーし、さらに OVA 抗原ペプチドと MHC クラス I 複合体を特異的に認識する T 細胞の増殖を強く促したことから(図3)、本リポソームによる強力な細胞性免疫の誘導が期待される。

さまざまな条件で培養したマクロファージのサイトカイン産生能、表面マーカーの発現量を調べ、腫瘍細胞の培養液で所定時間培養した細胞が、免疫抑制モデルとして利用できることがわかった。この細胞をリポソームで処理したところ、免疫活性化型である M1 型マクロファージから産生されるサイトカインの分泌が確認されたため、本リポソームが免疫抑制的に傾いた細胞を免疫活性化型へ再極性化できることが示唆された。

以上、本研究では、正電荷脂質を導入した多糖誘導体修飾リポソームによって、免疫抑制的に傾いた細胞を活性化型に再極性化し、がん免疫を強力に活性化するための抗原キャリアシステムを開発した。

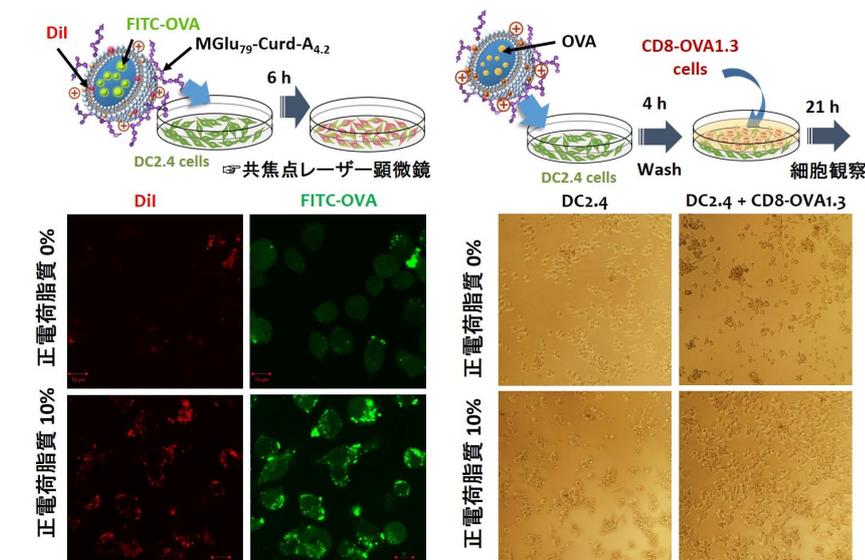


図3 リポソームの細胞内動態(左)と抗原特異的T細胞の増殖促進(右)

(2) 国内外における位置づけとインパクト

近年、腫瘍内の免疫抑制に関わる免疫チェックポイント分子に対する阻害剤が開発され、劇的ながん治療効果を示していることから、がん免疫療法の実効性、特に腫瘍の免疫抑制を解除することの重要性が広く認識されている。しかしながら、抗体医薬である免疫チェックポイント阻害剤は、薬価が極めて高額で(300万円/月)、より安価な代替治療システムの開発が急務である。本研究は、腫瘍に存在する腫瘍関連樹状細胞(TADC)、腫瘍関連マクロファージ(TAM)、ミエロイド由来抑制細胞(MDSC)などの細胞によって、がん免疫が強く抑制されていることに着目した。ここでは、樹状細胞を強力に活性化する正電荷脂質-カードラン誘導体ハイブリッドを、これらの免疫抑制細胞に作用させることで、免疫活性化細胞へと変化させることを目指した。このように、免疫細胞活性化用の機能性多糖と正電荷脂質をハイブリッド化したリポソームを

用いて、免疫抑制細胞を活性化細胞へ変化させ、強力な免疫誘導効果を狙う、というアプローチは世界的にも類例を見ないユニークな発想であり、従来の免疫誘導システムとは一線を画するものである。このような免疫抑制解除リポソームにより、非常に高い免疫誘導機能を持つ治療システムが実現でき、がん免疫療法の確立に大きく寄与できる。したがって、本研究の完成によって安全性が高く、しかも有効な先進医療の確立に貢献できることが、本研究の意義である。

(3) 今後の展望

免疫抑制的に傾いた細胞を活性化型に極性化できることが示唆されたため、まずは担がんマウスに本リポソームを投与して、腫瘍組織内の免疫細胞の分布にどのような変化を与えるかを検証する。同時に、その治療効果を明らかにする。得られた結果をリポソーム・機能性多糖の材料設計に反映させ、さらに強力な再極性作用を発現する抗原デリバリーシステムの作製を目指す。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計10件)

1. M. Okubo, M. Miyazaki, E. Yuba, A. Harada, "Chondroitin sulfate-based pH-sensitive polymer-modified liposomes for intracellular antigen delivery and induction of cancer immunity", **Bioconjugate Chemistry**, in press. DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.9b00221 査読有
2. 弓場英司, 「pH 応答性多糖とリポソームを基盤とした免疫誘導システムの開発」, **高分子論文集**, **75**, 433-443 (2018). DOI: 10.1295/koron.2018-0013. 査読有
3. 弓場英司, 「機能性高分子の表面修飾による細胞特異的リポソーム DDS の設計」, **J. Soc. Powder Technol., Japan**, **55**, 389-396 (2018). DOI: 10.4164/sptj.55.389. 査読有
4. E. Yuba, "Liposome-based immunity-inducing systems for cancer immunotherapy", **Molecular Immunology**, **98**, 8-12 (2018). DOI: 10.1016/j.molimm.2017.11.001. 査読有
5. M. Miyazaki, E. Yuba, H. Hayashi, A. Harada, K. Kono, "Hyaluronic acid-based pH-sensitive polymer-modified liposomes for cell-specific intracellular drug delivery systems", **Bioconjugate Chem.**, **29**, 44-55 (2018). DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.7b00551. 査読有
6. 弓場英司, 原田敦史, 「DDS 応用を指向した刺激応答性リポソームの設計」, **ファルマシア**, **54**, 11-15 (2018). DOI: 10.14894/faruawpsj.54.1_11. 査読有
7. S. Okazaki, T. Iwasaki, E. Yuba, S. Watarai, "Evaluation of pH-sensitive fusogenic polymer-modified liposomes co-loaded with antigen and β -galactosylceramide as an anti-tumor vaccine", **J. Vet. Med. Sci.**, **80**, 197-204 (2018). DOI: 10.1292/jvms.17-0491. 査読有
8. E. Yuba, N. Sakaguchi, Y. Kanda, M. Miyazaki, K. Koiwai, "pH-responsive micelle-based cytoplasmic delivery system for induction of cellular immunity", **Vaccines**, **5**, 41 (2017). DOI: 10.3390/vaccines5040041. 査読有
9. E. Yuba, S. Uesugi, M. Miyazaki, Y. Kado, A. Harada, K. Kono, "Development of pH-sensitive dextran derivatives with strong adjuvant function and their application to antigen delivery", **Membranes**, **7**, 41 (2017). DOI: 10.3390/membranes7030041. 査読有
10. Y. Yoshizaki, E. Yuba, N. Sakaguchi, K. Koiwai, A. Harada, K. Kono, "pH-sensitive polymer-modified liposome-based immunity-inducing systems: effects of inclusion of cationic lipid and CpG-DNA", **Biomaterials**, **141**, 272-283 (2017). DOI: 10.1016/j.biomaterials.2017.07.001. 査読有

[学会発表](計33件)

1. E. Yuba (Invited lecture), pH-Responsive polysaccharide-based antigen carriers for cancer immunotherapy. 2019 JSPS-NRF Joint Symposium (2019).
2. E. Yuba (Invited lecture), Development of immunity-activating interfaces by surface modification of pH-sensitive polymers onto lipid membranes and their application to cancer immunotherapy. Korea-Japan Joint Symposium: Smart Interface by Functional Polymers Complexes (2018).
3. E. Yuba (Invited lecture), Design of pH-responsive polymer/lipid-based intracellular delivery systems and their application to cancer immunotherapy. 18th Symposium for Gene·Design and Delivery (2018).
4. E. Yuba, T. Osaki, A. Harada, pH-Responsive polymer-lipid- incorporated nanovesicles for intracellular delivery of anticancer drug and antigens. 5th Symposium on Innovative Polymers for Controlled Delivery (2018).
5. X. Shu, E. Yuba, A. Harada, Synthesis of carboxylated PAMAM dendron-grafting

- polysaccharide derivatives as a design of adjuvant. 5th Symposium on Innovative Polymers for Controlled Delivery (2018).
6. E. Yuba (Invited lecture), pH-Responsive polymer/lipid-based antigen carriers for cancer immunotherapy. 14th IUPAC International Conference NMS-XIII (2018).
 7. E. Yuba, A. Harada (Invited lecture), pH-Responsive polysaccharide-based immunity-inducing systems. China-Japan Joint Symposium on Biomaterials 2018 (2018).
 8. Y. Fukaya, E. Yuba, A. Harada, K. Kono, Sugar moiety-introduced pH-sensitive curdlan-modified liposome for antigen presenting cell-specific antigen delivery system. The 12th SPSJ International Polymer Conference (2018).
 9. E. Yuba, A. Harada, pH-Sensitive polymer-based antigen carriers for cancer immunotherapy. 1st G' L' owing Polymer Symposium in KANTO (2018).
 10. 弓場英司, 門袖奈, 坂口奈央樹, 原田敦史, 河野健司, pH応答性多糖修飾リポソームへの正電荷脂質導入による免疫誘導機能の高活性化, 第67回高分子学会年次大会 (2018).
 11. 大久保みのり, 弓場英司, 原田敦史, 河野健司, コンドロイチン硫酸誘導体修飾リポソームを用いる多機能型免疫誘導システムの構築, 第67回高分子学会年次大会 (2018).
 12. 弓場英司, 浦崎拓真, 坂野貴宣, 加藤拓実, 原田敦史, 河野健司, pH応答性高分子で被覆した細胞由来ベシクルを用いるがん抗原デリバリーシステムの開発, 第34回日本DDS学会学術集会 (2018).
 13. 大久保みのり, 弓場英司, 原田敦史, 河野健司, pH応答性コンドロイチン硫酸修飾リポソームによる抗原デリバリーと免疫細胞活性化, 第64回高分子研究発表会 (神戸) (2018).
 14. 柳原慎, 弓場英司, 原田敦史, 分岐型 グルカンを用いたpH応答性多糖修飾リポソームの抗原キャリア機能, 第64回高分子研究発表会 (神戸) (2018).
 15. 宮崎麻衣子, 弓場英司, 林弘志, 原田敦史, 河野健司, pH 応答性ヒアルロン酸誘導体修飾リポソームの抗原キャリア機能と免疫誘導機能評価, 第47回医用高分子シンポジウム (2018).
 16. 深谷佳樹, 弓場英司, 原田敦史, 河野健司, 糖残基を導入したpH応答性カードラン修飾リポソームの抗原キャリア機能, 第47回医用高分子シンポジウム (2018).
 17. 深谷佳樹, 弓場英司, 原田敦史, 河野健司, pH応答性カードラン修飾リポソームの抗原デリバリー機能に及ぼす糖残基導入の効果, 日本バイオマテリアル学会関西ブロック 第13回若手研究発表会 (2018).
 18. 弓場英司, 門袖奈, 坂口奈央樹, 原田敦史, 河野健司, リポソーム表面へのアニオン性アジュバント集積による免疫細胞の活性化, 第67回高分子討論会 (2018).
 19. 大久保みのり, 弓場英司, 原田敦史, 河野健司, pH応答性と免疫賦活能を併せ持つコンドロイチン硫酸誘導体の開発と抗原デリバリーシステムへの展開, 第67回高分子討論会 (2018).
 20. 柳原慎, 弓場英司, 原田敦史, pH応答性とアジュバント作用を持つ分岐型 グルカン誘導体を修飾したリポソームの抗原デリバリー機能, 第67回高分子討論会 (2018).
 21. 柿原優佳, 弓場英司, Nadeeka De Silva H, 赤澤隆, 井上徳光, 金城綾二, 鳩谷晋吾, 稲葉敏夫, 杉浦喜久弥, 高効率免疫アジュバントを用いた腫瘍免疫治療の検討, 第161回日本獣医学会学術集会 (2018).
 22. 弓場英司 (依頼講演), 機能性高分子を用いた免疫反応の制御とがん免疫療法への展開, 第35回医用高分子研究会講座 (2018).
 23. 弓場英司 (招待講演), ポリカルボン酸誘導体とリポソームを基盤とした免疫誘導システムの構築, 九州地区高分子若手研究会・冬の講演会 (2018).
 24. E. Yuba, A. Yamaguchi, S. Uesugi, A. Harada, K. Kono, pH-Responsive polysaccharide-modified liposomes for antigen delivery and induction of immune responses. 255th ACS National Meeting & Expositions (2018).
 25. Y. Fukaya, E. Yuba, A. Harada, K. Kono, Mannose residue-introduced pH-sensitive curdlan-modified liposome for antigen presenting cell-specific antigen delivery system. 255th ACS National Meeting & Expositions (2018).
 26. M. Miyazaki, E. Yuba, H. Hayashi, A. Harada, K. Kono, Development of hyaluronic acid derivative-modified liposomes as dendritic cell-specific antigen delivery carriers. 255th ACS National Meeting & Expositions (2018).
 27. E. Yuba, A. Yamaguchi, A. Harada, K. Kono, pH-sensitive polysaccharides-based immunity-inducing systems, 第66回高分子学会年次大会 (2017).
 28. 弓場英司, 能崎優太, 原田敦史, 宇高恵子, 西村泰治, 河野健司, pH応答性多糖修飾リポソームの抗原ペプチドデリバリーキャリアとしての機能第33回日本DDS学会学術集会 (2017).
 29. 齊藤良典, 弓場英司, 原田敦史, 河野健司, マンノースを末端基とするデンドロン脂質の合成とその抗原キャリアの作製, 第63回高分子研究発表会(神戸) (2017).
 30. 深谷佳樹, 弓場英司, 原田敦史, 河野健司, マンノース残基導入pH応答性カードランを修飾したリポソームの抗原デリバリー機能, 第63回高分子研究発表会(神戸) (2017).
 31. 弓場英司, 免疫を活性化して、ワクチンを細胞内に運ぶ。カルボキシ化多糖のカイノベーシオン・ジャパン2017 (2017).

32. 弓場英司, 山口彩加, 上杉慎也, 原田敦史, 河野健司, 抗原送達・免疫誘導のためのpH応答性多糖修飾リポソームの設計第66回高分子討論会 (2017) .
33. E. Yuba (Invited lecture), pH-Responsive polysaccharide-modified liposomes for intracellular drug delivery. 13th IUPAC International Conference NMS-XIII (2017).

〔図書〕(計5件)

1. 弓場英司, 「pH 応答性リポソームの設計と DDS 応用」, **刺激応答性高分子ハンドブック**, 497-506 (2018) エヌ・ティー・エス .
2. E. Yuba, “ Stimuli-responsive polymer-modified liposomes and their application to DDS ”, In “Stimuli Responsive Polymeric Nanocarriers for Drug Delivery Applications ”, **Elsevier**, **2**, 305-319 (2018).
3. 弓場英司, 「機能性分子の表面修飾による刺激応答性リポソームの創製とそのバイオ応用」, **粉体の表面処理・複合化技術集大成-基礎から応用まで-**, 423-431 (2018) テクノシステム .
4. 弓場英司, 「抗原-サイトカイン同時デリバリーシステムの構築とナノワクチンの創製」, **ドラッグデリバリーシステム-バイオ医薬品創成に向けた組織、細胞内、核内送達技術の開発-**, 138-146 (2018) シーエムシー .
5. 弓場英司, 「がん免疫療法の抗原デリバリーシステム開発」, **DDS 先端技術の製剤への応用開発**, 270-282 (2017) 技術情報協会 .

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: pH 応答性リポソーム
発明者: 弓場英司、深谷佳樹
権利者: 公立大学法人大阪府立大学
種類: 特許
番号: 特願 2017-136235 号
出願年: 2017 年
国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等
<http://www2.chem.osakafu-u.ac.jp/ohka/ohka9/index.htm>

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。