

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月13日現在

機関番号：34416

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K20119

研究課題名(和文) 癌免疫療法を革新する細胞表面操作技法の開拓

研究課題名(英文) Cell surface engineering for cancer immunotherapy

研究代表者

岩崎 泰彦 (Iwasaki, Yasuhiko)

関西大学・化学生命工学部・教授

研究者番号：90280990

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)：本研究ではマクロファージの表面修飾を行い、がん細胞に対する親和性を格段に高め、体内よりがん細胞を消去する新たな手法を構築することを目的とし研究を遂行した。糖の代謝経路を利用して生きたマクロファージの表面に誘導した非天然糖鎖にがん細胞に過剰発現している膜タンパク質と結合する核酸アプタマーを修飾し、このマクロファージでヒト急性リンパ芽球性白血病を高効率に捕捉することに成功した。さらに、抗がん剤処理によりアポトーシス誘導されたがん細胞をアプタマー修飾マクロファージが積極的に貪食することを確認し、がん細胞を免疫細胞で消去する新たな方法を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、低侵襲ながんの治療法として免疫治療が注目されている。この治療では自己の細胞を用いるために副作用を伴わず、採血と点滴による治療のため患者への負担が極めて少ない。しかし、生体内には免疫原性の低いがん細胞が存在することやがん細胞が免疫細胞の活性化を抑制することががん免疫を機能させない理由のひとつとして指摘されている。本研究によって、免疫細胞にがん細胞を新たに認識させる機能を付与することに成功した。この結果は、がん免疫治療の効率化に資する新たな方法として社会的意義は極めて高いと言える。また、本研究で確立した細胞表面修飾は、生物学と化学を融合した学術的にもユニークな手法と言える。

研究成果の概要(英文)：Antigen-presenting cells play a dominant role in cancer immunotherapy. Tumor cells, however, can still resort to several mechanisms of immune evasion that ultimately lead to the development of tumor tissues. In the current study, we revealed that the surface modification of macrophages with nucleic acid aptamers improved the capture of tumor cells and enhanced their anticancer immune response. Regardless of the tumor cells condition (apoptotic or not), the number of tumor cells captured by surface modified macrophages was significantly higher than that captured by nontreated analogs. Phagocytosis of captured tumor cells, secretion of proinflammatory cytokines, and expression of MHC class molecules were accelerated in nucleic aptamer-modified macrophages when these were in contact with apoptotic tumor cells instead of living tumor cells.

研究分野：生体材料学

キーワード：シアル酸 糖鎖改変 表面改質 マクロファージ がん免疫治療 核酸アプタマー サイトカイン クリック反応

## 1 . 研究開始当初の背景

厚生労働省の統計にもあるように我が国の死因の一位は悪性新生物、すなわちがんであり、現代では3人に1人ががんで死亡し、その割合は年々増加している。がん治療の腫瘍組織を外科的に摘出し、その後、継続的な放射線療法や化学療法が行われる。これらが延命のために有効な治療法であるが、侵襲や重篤な副作用を伴うこと、また、複雑な経路で体内に拡散したがんを壊滅させることが困難であることなど、克服すべき課題も残されている。最近、免疫細胞を用いたがん治療が注目されている。これらは自己の細胞を用いるために副作用を伴わず、採血と点滴による治療のため患者への負担が極めて少ない。しかし、生体内には免疫原性の低いがん細胞が存在することやがん細胞が免疫細胞の活性化を抑制することががん免疫を機能させない理由のひとつとして指摘されている。そこで、免疫細胞にがん細胞を新たに認識させる機能を付与することが、免疫治療の効果を高めるために有効と考えられる。

## 2 . 研究の目的

本研究ではマクロファージの表面修飾を行い、腫瘍細胞に対する親和性を格段に高め、体内より腫瘍細胞を消去する新たな手法を構築することを目的とした。具体的には、研究期間において糖の代謝経路を利用して生きたマクロファージの表面に誘導した非天然糖鎖に腫瘍細胞に過剰発現している膜タンパク質と結合する核酸アプタマーを修飾すること、*in vitro* で表面改質したマクロファージによる腫瘍細胞の捕捉作用の検討、表面改質マクロファージと抗がん剤の併用による白血病細胞の消去について検討した。生きた免疫細胞の表面を改質し、がん細胞に対する認識能を向上させた検討はこれまでになく、本研究の成果ががん免疫療法の発展に貢献できるものと確信した。

## 3 . 研究の方法

### 1) マクロファージの表面修飾

申請者らが確立した *N*-メタクリロイルマンノサミン (ManM) の合成法 (*Macromol Biosci* 2011; 11: 1478) を改良し、メタクリル酸クロリドとマンノサミンを反応させることにより ManM を合成することに成功した。所定量の ManM を含む培地でマウスマクロファージ (RAW264.7) を 24 時間培養し、RAW264.7 の表面にメタクリロイル基を誘導した。メタクリロイル基を誘導した RAW264.7 細胞の表面にがん細胞に過剰発現している膜タンパク質 (PTK7) と結合するアプタマー (sgc8) を光活性型チオール-エン反応により修飾した。その後、RAW264.7 を PBS で洗浄し、以降の実験に用いた。糖鎖末端に修飾したアプタマーの維持期間を確認するため、sgc8 により表面改質を行なったマクロファージを所定時間 DMEM 中で培養し、蛍光色素 (TAMRA) が標識された相補鎖を作用させた。PBS で洗浄後、単位細胞あたりの TAMRA 由来の蛍光強度を蛍光光度計により測定した。

### 2) 表面改質マクロファージによるがん細胞の捕捉

細胞培養用シャーレに接着させた RAW264.7 細胞の表面に上記の方法でアプタマーを修飾した。次に PTK を過剰発現しているヒト白血病細胞 (CCRF-CEM) を振盪器中で 30 分間穏やかに接触させ。それぞれの細胞を異なる蛍光色素で染色することにより、RAW264.7 細胞と CCRF-CEM 細胞の接着に及ぼす修飾アプタマーの影響について調べた。また、あらかじめドキシソルピシン処理したアポトーシス化 CCRF-CEM 細胞の接着についても同様に調べた。

### 3) 表面改質マクロファージと抗がん剤の併用による白血病細胞の消去

RAW264.7 細胞表面に捕捉された CCRF-CEM 細胞が RAW264.7 細胞に取り込まれる様子を共焦点レーザー顕微鏡により継続的に観察した。続いて CCRF-CEM 細胞との接触に伴うマクロファージの免疫応答をみるため、30 分間の振盪培養後、RAW264.7 細胞に接着していない CCRF-CEM 細胞を洗浄除去し、さらに 1 日培養し、培地に放出された炎症性サイトカイン (TNF- $\alpha$ 、IL-12) を ELISA 法により定量した。また、RAW264.7 細胞の抗原提示に関する主要組織適合抗原 (MHC クラス I および II) の発現量をフローサイトメーターを用いて調査した。

## 4 . 研究成果

図 1 a に RAW264.7 細胞表面に修飾したアプタマーの密度と RAW264.7 細胞に接着した CCRF-CEM 細胞の数の関係を示す。この結果から RAW264.7 細胞表面に修飾したアプタマーの密度が増加するにつれて CCRF-CEM 細胞の接着数が増し、RAW264.7 細胞による

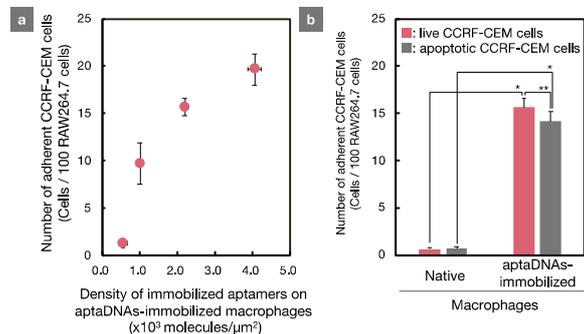


図 1 (a) RAW264.7 細胞表面に修飾したアプタマーの密度と RAW264.7 細胞に接着した CCRF-CEM 細胞の数の関係 . (b) RAW264.7 細胞と CCRF-CEM 細胞の接着に与えるアプタマー修飾の効果 .

CCRF-CEM 細胞の捕捉にアプタマーが機能していることがわかる。図 1b ではアプタマーの修飾の有無により RAW264.7 細胞に接着した CCRF-CEM 細胞の数を比較した。なお、RAW264.7 細胞に修飾したアプタマーの密度は  $2.2 \times 10^3$  molecules/ $\mu\text{m}^2$  である。未処理の RAW264.7 細胞に比べアプタマーを修飾した RAW264.7 細胞の表面には多くの CCRF-CEM 細胞が粘着した。また、アポトーシス誘導に関係なく CCRF-CEM 細胞はアプタマー修飾 RAW264.7 細胞

の表面に接着した。図 2a はアプタマー修飾 RAW264.7 細胞に粘着した CCRF-CEM 細胞の貪食指数を示す。生きた CCRF-CEM 細胞に比べ、アポトーシス誘導された CCRF-CEM 細胞が著しく貪食された。これは、アポトーシスにより CCRF-CEM 細胞表面にホスファチジルセリンが露出することによるものである。図 2b は RAW264.7 細胞に接着した CCRF-CEM 細胞が RAW264.7 細胞に貪食される割合を示している。生きた CCRF-CEM 細胞では接着した細胞の 39% のみが貪食されたのに対し、アポトーシス誘導された CCRF-CEM 細胞は接着した細胞の 93% が貪食され、ほぼ全ての細胞が貪食されることがわかった。図 3 は CCRF-CEM 細胞と共培養した RAW264.7 細胞から産生される TNF- $\alpha$  の定量結果を示している。表面修飾を行っていない RAW264.7 細胞 (Native) の TNF- $\alpha$  の産生量は CCRF-CEM 細胞を接触させてない RAW264.7 細胞と同程度であった。一方で、アプタマーを介して CCRF-CEM 細胞と接触させた RAW264.7 からは TNF- $\alpha$  の産生が著しかった。さらに、アポトーシスを誘導した CCRF-CEM 細胞を同様に捕捉させたところ、さらに多くのサイトカインが放出され、CCRF-CEM 細胞の貪食指数に応じて TNF- $\alpha$  の産生量が多くなった。さらに、MHC 分子の発現量も同様な傾向が認められた。

以上の結果から、本研究課題を遂行することにより細胞表面修飾と抗がん剤を併用することによりがん細胞を効率よく捕捉、消去できる方法を新たに提案することに至った。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Sugimoto S, Iwasaki Y. Surface modification of macrophages with nucleic acid aptamers for enhancing the immune response against tumor cells, *Bioconjugate Chem.* 2018;29:4160-4167. (査読有り)  
DOI:10.1021/acs.bioconjugchem.8b00793

〔学会発表〕(計 5 件)

Y. Iwasaki, Metabolic glycoengineering for cell-based cancer therapy, *Advanced Biomaterials and Medical Membranes Symposium - Bio-inspired interfaces and membranes (ABMMS)*, TAIWAN (2018.11) Keynote lecture

杉本駿介, 山内柊平, 大高晋之, 岩崎泰彦, 表面改変マクロファージによる生きたがん細胞の捕捉と消去, 第 40 回日本バイオマテリアル学会大会, 神戸 (2018.11).

岩崎泰彦, 細胞表面工学とセルベースバイオマテリアルの設計, 第 5 回レクチン利用技術研究会・ワークショップ技術講演, 東京 (2018.1). (招待講演)

杉本駿介, 森健, 岩崎泰彦, 糖鎖改変技術を利用した細胞間接着の誘導, 第 66 回高分子討論会, 愛媛 (2017.9).

Y. Iwasaki, S. Sugimoto, T. Mori (Kyushu Univ.), Immobilization of nucleic acid aptamers on macrophages for the capture of tumor cells, *Society for Biomaterials 2017 Annual Meeting and Exposition, USA* (2017.4).

〔図書〕(計 0 件)

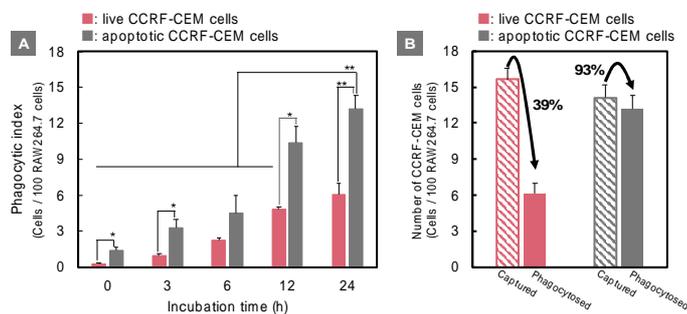


図 2 (a) RAW264.7 細胞により貪食された CCRF-CEM 細胞の経時的数変化. (b) 24 時間培養後の貪食効率.

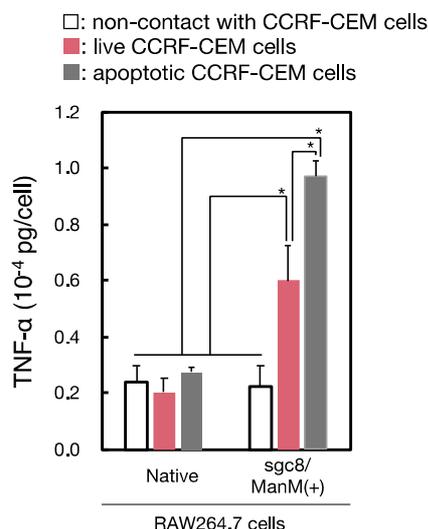


図 3 CCRF-CEM 細胞と接触後 24 時間培養された RAW264.7 細胞により産生された TNF-

〔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

<http://biomat.chemmater.kansai-u.ac.jp/index.html>

## 6．研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：杉本 俊介

ローマ字氏名：(SUGUMOTO, Shunsuke)