

令和 3 年 6 月 22 日現在

機関番号：27101
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2018～2020
課題番号：18K12082
研究課題名(和文) ヒアルロン酸を用いた外来抗原ペプチドデコレーションによるがん細胞の抗原性の改変
研究課題名(英文) Modification of antigenicity for cancer cells by foreign peptide decoration by using hyaluronic acid
研究代表者
望月 慎一 (Mochizuki, Shinichi)
北九州市立大学・国際環境工学部・准教授
研究者番号：10520702
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ヒアルロン酸(HA)と抗原オボアルブミン(OVA)から成るHA-OVAコンジュゲート体を作製し、がん細胞にHA依存的に取り込まれることが分かった。また、HA-OVA処理したがん細胞とOVA特異的免疫細胞との間で強力な免疫応答が観察された。こうした結果よりがん細胞の表面上にOVA抗原が提示されている、つまりがん細胞の抗原性の改変が行われていることが証明された。

研究成果の学術的意義や社会的意義
チェックポイント阻害剤等による免疫抑制が解除されたのち、実際に腫瘍を縮退させるのは患者がもともと体内に持っている免疫力、つまり細胞傷害性T細胞(CTL)の力である。CTLが十分に能力を発揮させるための技術開発は、がん免疫療法を次のステージに発展させる鍵と考えられる。その中で、本提案の抗原性改変技術はがんワクチンに対する新たな戦略の一つになり得ると確信している。

研究成果の概要(英文)：The prepared conjugates consisting of hyaluronic acid (HA) and ovalbumin (OVA) are incorporated into cancer cells through HA receptor CD44. When cancer cells treated with HA-OVA conjugates and splenocytes immunized with OVA and adjuvants, strong immune responses were observed. These results indicate OVA fragments are presented on the cancer cellular surface, and we succeeded in modification of cancer antigenicity.

研究分野：生体高分子化学

キーワード：薬物送達システム がんワクチン 多糖

1. 研究開始当初の背景

がんワクチンは生体が自ら持つ免疫機能を活性化させてがん細胞を攻撃する治療法である。1991年にがん抗原遺伝子が同定されたことを契機にがんワクチンを用いた臨床研究が始まった。しかし、当初の期待とは違い有意な腫瘍縮小に繋がる臨床効果は証明できていない。この大きな要因の一つとしてがん細胞の抗原性の強さの問題が挙げられる。がん細胞はワクチン(抗原)投与により誘導された細胞傷害性T細胞(CTL)に認識され攻撃を受けるが、使用されている抗原が自身由来ということもあり、その抗原性は決して高いわけではない(免疫とは、そもそも感染症ウイルスや病原性を持つ細菌等、侵入して来る外敵に対して働く防御機構である)。そこで、がんワクチンの効果を向上させるためには、これまでとは異なる新たな原理に基づく戦略が求められている。

2. 研究の目的

申請者はナノテクノロジー、化学、材料化学、免疫学を融合させた研究を通して、がん細胞特異的に抗原性の高いペプチドを送達させることでがん細胞の抗原性改変(抗原ペプチドデコレーション)を行い、CTLのがん細胞に対する感受性の向上を目指す(図1)。がん細胞表面上に過剰発現しているCD44(多糖ヒアルロン酸; HAの代表的な受容体の1つ)に着目し、(1)体内動態・細胞内動態の制御可能なコンジュゲート体(HAに抗原性の高いペプチド(pep)を化学修飾させたHA-pep)を設計・作製し、(2)HA-pepの精密キャラクタリゼーションを行い、(3)HA-pepにより抗原提示を誘導し、CTLのがん細胞感受性の向上を目指す。

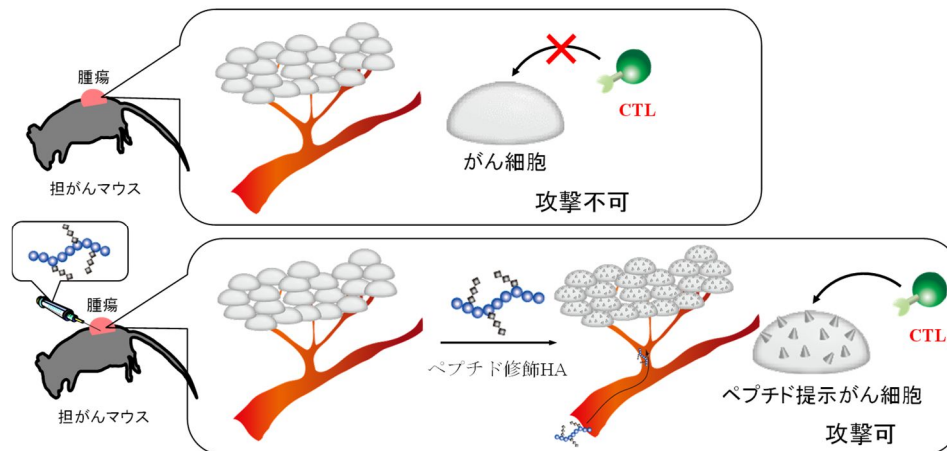


図1、抗原ペプチドデコレーションによるCTL感受性の向上。従来のがんワクチンではがん細胞表面上に抗原ペプチドが提示されておらずCTLががん細胞を攻撃できない(上図)。がん細胞に抗原ペプチドを送達し、ペプチド提示がん細胞を作製することでCTLが攻撃可能になる(下図)

3. 研究の方法

(1) 分子量の異なるHAの調製

分子量(M_w)が 1.0×10^6 のHAを超音波ホモジナイザーを用いて分子量の異なるHAの調製を行った。1 mg/mLに調製したHA溶液40 mLを超音波(QSONICA Q700)処理(10分、30分)し、ゲルろ過クロマトグラフィー(GPC)を用いて分子量測定を行った。分子量測定は多角度光散乱により絶対分子量を算出した。

(2) HA-抗原タンパク質コンジュゲート体の作製

(1)より分子量の異なるHA($M_w = 1.2 \times 10^5, 3.7 \times 10^5$)をそれぞれ調製出来たため、それらと抗原タンパク質であるオボアルブミン(OVA)との化学結合を行った。10 mM MES溶液にHAを溶解させ(1 mg/mL)、1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride(EDC-HCl)とN-hydroxysuccinimide(NHS)を添加し、HAのカルボキシル基を活性化させた。2時間氷上で静置した後、OVAを添加し、37°Cで24時間静置させた。GPC測定を行い、反応の確認を行いながらコンジュゲート体のフラクションを分取した(反応溶液中には未反応のOVAも多く観察されるため)。分取した溶液に対し水で十分に透析を行い、凍結乾燥することで目的のコンジュゲート体の精製を行った。

(3) HA-抗原タンパク質コンジュゲート体のがん細胞への取り込み

作製したコンジュゲート体の細胞への取り込みを可能にするためにコンジュゲート体に対して蛍光修飾を施した。OVA濃度で1 mg/mLになるようリン酸バッファー(pH 9.0)にコンジュ

ゲート体を溶解させフルオレセインイソシアネート (FITC) を添加し、2 時間攪拌させた。炭酸バッファー、続いて水で透析し凍結乾燥することで FITC 修飾したコンジュゲート体 (FITC-HA-OVA) を得た。マウス大腸がん細胞の CT26 細胞を 24 - ウェルに 2.0×10^5 cells ずつ播種し、FITC-HA-OVA あるいは FITC-OVA を 10 mg/mL になるよう添加した。5 時間後に細胞を回収し、蛍光量をフローサイトメトリーを用いて定量した。

(4) HA-OVA コンジュゲート体処理したがん細胞と CTL との免疫応答

7 週齢の Balb/c マウスに対し OVA 抗原タンパク質 100 μg とアジュバントとして CpG-DNA 30 μg を皮内へ免疫した。10 日後に同様の免疫を再び行い、1 週間後に脾細胞を回収した。CT26 細胞を 96 - ウェルに 5.0×10^4 cells ずつ播種し、作製した HA-OVA コンジュゲート体を 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で添加し 24 時間培養した。その後、回収した脾細胞を 1.0×10^6 cells ずつ添加しさらに 24 時間培養し、上清を回収した。上清中のサイトカイン (インターフェロン γ ; IFN γ) を ELISA により定量した。

4. 研究成果

(1) HA-抗原タンパク質コンジュゲート体の作製

異なる分子量の HA を OVA と反応させた後の反応溶液を GPC 測定を行った。検出は 280 nm の OVA の UV 吸収より評価した (HA には 280 nm の吸収はない)。OVA のピークが約 19.5 分頃に観察されるが、HA ($M_w = 1.2 \times 10^5$) との反応後のピークを見ると溶出時間が約 17 分頃に見られ、大きく早まっていることが分かる (図 2)。これは、OVA に HA が結合し分子量が増大したためと考えられる。図 2 では分取・精製後のピークを示しているが、このクロマトグラムより未反応の OVA が混在していない、また、凝集や分解等の反応も起きていないことが分かる。分子量が 3.7×10^5 の HA との反応後ではさらに溶出時間が早くなっていた (約 15.5 分)。これらより使用する HA の分子量を変えることで大きさの異なるコンジュゲート体を作製できることが分かった。

また、コンジュゲート体の分子量とタンパク質定量より、HA ($M_w = 1.2 \times 10^5$) を用いた場合のコンジュゲート体の組成は HA:OVA = 1:1、HA ($M_w = 3.7 \times 10^5$) を用いた場合のコンジュゲート体の組成は HA:OVA = 2:1 であることが分かった。

多角度光散乱より算出した分子量と慣性半径の関係よりコンジュゲート体の形状を推察した (図 3)。分子量と慣性半径の両対数プロット (コンフォメーションプロット) より得られる直線の傾きが 0.33 に近いと球状、0.5 に近いとランダムコイル状、1.0 に近いと棒状であることを示す。HA を解析するとそれぞれの傾きが 0.53 と、ランダムコイル状であることが分かる。また、それぞれのプロットが延長線上に存在していることが分かり、(分子量が $1.0 \times 10^5 - 5.0 \times 10^5$ の範囲では) 形状を維持したまま大きな分子となっていることが分かる。HA との反応後の傾きを見てみると、どちらも約 0.5-0.6 とであることがわかりランダムコイル状であることが分かる。OVA が結合し分子量が増加してもその形状が維持されていることがよく分かる。OVA には反応点 (リジンアミノ基) が 20 個あるが、複数の反応点で HA と結合すると HA が折りたたまれた構造をとると考えられるが、こうした結果より OVA の反応点としては 1 つか 2 つのリジンが使われていないのではと考えられる。また、OVA が細胞内で分解されペプチドとなり抗原提示される際に、HA と結合したリジンが抗原になり得るとしたら提示されない恐れがあるため、結合点が少ないということは免疫応答としては利点になるのではと考えられる。

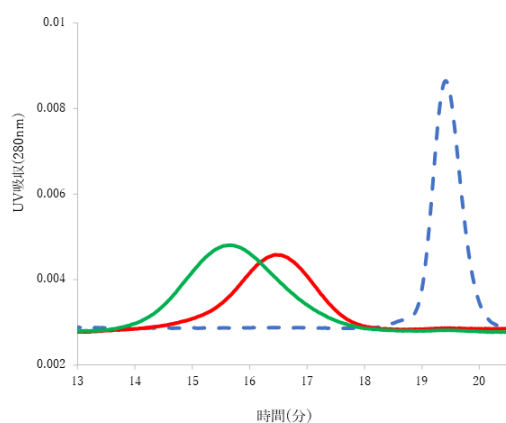


図 2. OVA と HA の縮合反応後の UV クロマトグラム。OVA のみ (青色点線)、HA ($M_w = 1.2 \times 10^5$) との反応後 (赤色)、HA ($M_w = 3.7 \times 10^5$) との反応後 (緑色)。

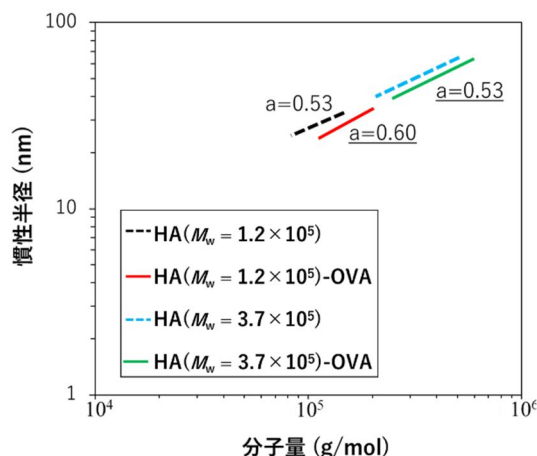


図 3. HA と HA-OVA コンジュゲート体のコンフォメーションプロット

(2) HA-抗原タンパク質コンジュゲート体のがん細胞への取り込み

CT26 細胞を FITC-HA-OVA 処理すると細胞から強い蛍光が観察されるようになった(図4)。一方、FITC-OVA 処理では細胞の蛍光はほとんど観察されなかったことより、OVA に HA を修飾することで細胞への取り込みが見られるようになったことが分かる。今回、HA の分子量は 2 種類用意しコンジュゲート体を作製したが、分子量の違いによる取り込み量には差が見られなかった。また、これらのコンジュゲート体に対し、CT26 細胞に添加時にコンジュゲート体中の HA の 10 倍の HA を阻害剤として添加しておく、コンジュゲート体の取り込み量が大きく減少した。このことよりコンジュゲート体が HA を介して細胞に取り込まれていることが分かった。以上より、当初掲げた戦略通りに抗原タンパク質を HA 修飾することで HA を介して細胞に取り込ませることに成功した。

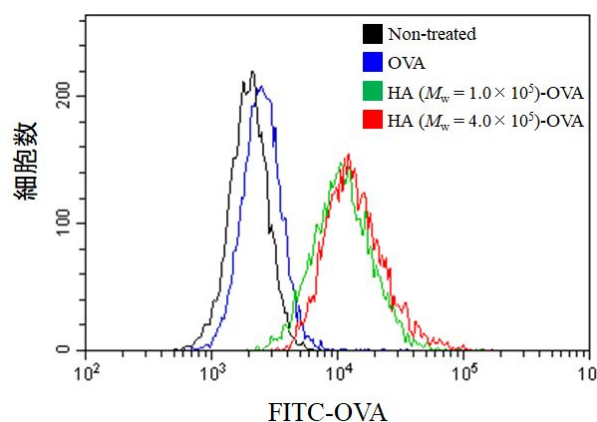


図4. FITC-OVA、FITC-HA-OVA コンジュゲート体の CT26 細胞への取り込み

(3) HA-OVA コンジュゲート体処理したがん細胞と CTL との免疫応答

HA-OVA 処理した CT26 細胞と OVA 特異的 CTL を含む脾細胞を混合培養すると強力な IFN- γ 応答を観察することが出来た(図5)。CT26 細胞を OVA のみ、(OVA+HA) 処理では全く IFN- γ 応答が誘導されなかったことから OVA と HA を結合させて初めて見られる現象であることが分かる。つまり、OVA が HA を介して CT26 細胞に取り込まれ、細胞内で断片化された OVA の一部が抗原提示され、OVA 特異的 CTL に認識されていることを示している。また、さらに培養を続け 48 時間後には HA-OVA 処理したがん細胞のほとんどが死滅していることも確認出来た。CT26 細胞は元より OVA 抗原を持ち併せていないため、本申請の戦略通りに、HA-OVA によりがん細胞の抗原性の改変に成功したことが言える。

今後は抗原をペプチドに代えても同様な改変が可能か、あるいは担癌マウスに対してもコンジュゲート体による抗原性が可能かどうか検討予定である。

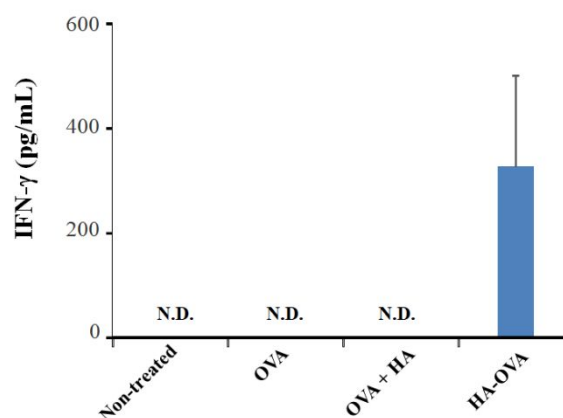


図5. HA-OVA 処理した CT26 細胞と OVA 特異的 CTL との免疫応答

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sakisaka Hideto, Takedatsu Hidetoshi, Mitsuyama Keiichi, Mochizuki Shinichi, Sakurai Kazuo, Sakisaka Shotaro, Hirai Fumihito	4. 巻 21
2. 論文標題 Topical Therapy with Antisense Tumor Necrosis Factor Alpha Using Novel β -Glucan-Based Drug Delivery System Ameliorates Intestinal Inflammation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 683 ~ 683
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21020683	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Dung Hyang Nguyen, Ngoc Bao Chau Nguyen, Linh T.P. Nguyen, Ly T. Do, Tung T. Nguyen, Nam H. Nguyen, Sakurai Kazuo, Mochizuki Shinichi, Kihara Takanori, Thang Dinh Nguyen, Anh Thi Van Nguyen, Houg T.T. Pham	4. 巻 48
2. 論文標題 An Agarose-Curdlan Nanogel That Carries Etanercept to Target and Neutralizes TNF- α Produced by Dectin-1-Expressing Immune Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Electronic Materials	6. 最初と最後の頁 6570 ~ 6582
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Nobuaki Fujiwara, Hiroto Izumi, Yasuo Morimoto, Kazuo Sakurai, Shinichi Mochizuki	4. 巻 26
2. 論文標題 Complex consisting of antisense DNA and β -glucan promotes internalization into cell through Dectin-1 and hybridizes with target mRNA in cytosol	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Gene Ther	6. 最初と最後の頁 32-40
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41417-018-0033-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Irie Hitomi, Morita Koji, Koizumi Makoto, Mochizuki Shinichi	4. 巻 31
2. 論文標題 Immune Responses and Antitumor Effect through Delivering to Antigen Presenting Cells by Optimized Conjugates Consisting of CpG-DNA and Antigenic Peptide	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bioconjugate Chemistry	6. 最初と最後の頁 2585 ~ 2595
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.bioconjchem.0c00523	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sasaki Shogo, Izumi Hiroto, Morimoto Yasuo, Sakurai Kazuo, Mochizuki Shinichi	4. 巻 28
2. 論文標題 Induction of potent cell growth inhibition by schizophyllan/K-ras antisense complex in combination with gemcitabine	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 115668 ~ 115668
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmc.2020.115668	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fujiwara Nobuaki, Izumi Hiroto, Kira Ryoma, Morimoto Yasuo, Mochizuki Shinichi, Sakurai Kazuo	4. 巻 500
2. 論文標題 Binding assay of human Dectin-1 variants to DNA/ α -glucan complex for active-targeting delivery of antisense DNA	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Carbohydrate Research	6. 最初と最後の頁 108219 ~ 108219
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.carres.2020.108219	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sumiya Kazuki, Matsunaga Takuya, Tanaka Motoko, Mochizuki Shinichi, Sakurai Kazuo	4. 巻 21
2. 論文標題 Oligo-DNA Stoichiometrically Binds α -1,3-Glucan with the Best Fit Length	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomacromolecules	6. 最初と最後の頁 4823 ~ 4834
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.biomac.0c01038	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takahara Mari, Mochizuki Shinichi, Wakabayashi Rie, Minamihata Kosuke, Goto Masahiro, Sakurai Kazuo, Kamiya Noriho	4. 巻 32
2. 論文標題 Extending the Half-Life of a Protein in Vivo by Enzymatic Labeling with Amphiphilic Lipopeptides	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioconjugate Chemistry	6. 最初と最後の頁 655 ~ 660
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.bioconjchem.1c00027	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Shinichi Mochizuki
2. 発表標題 Enhancement of cancer vaccine by modification of antigenicity for cancer cells
3. 学会等名 257th ACS National Meeting & Expo (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 望月慎一
2. 発表標題 ヒアルロン酸を利用した抗原送達によるがん細胞の抗原性の改変
3. 学会等名 第35回日本DDS学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 望月慎一
2. 発表標題 抗原修飾ヒアルロン酸を用いたがん細胞の抗原性改変
3. 学会等名 第68回高分子討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shinichi Mochizuki
2. 発表標題 Enhancement of cancer vaccine by modification of antigenicity for cancer cells
3. 学会等名 15th Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 望月慎一
2. 発表標題 CTL活性の向上を目指した免疫細胞・がん細胞への抗原デリバリーシステムの開発
3. 学会等名 第47回医用高分子シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shinichi Mochizuki
2. 発表標題 Induction of potent cytotoxic T-lymphocyte activity using two types of polysaccharides
3. 学会等名 256th ACS National Meeting & Exposition (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 望月慎一
2. 発表標題 シゾフィランを用いた核酸デリバリーの細胞内動態
3. 学会等名 第67回高分子学会年次
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 望月慎一、緒方聡一、辻玲香
2. 発表標題 生体内コミュニケーションを利用したDDSとそのがんワクチンへの応用
3. 学会等名 高分子学会九州支部大学間連携フォーラム (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 望月慎一
2. 発表標題 抗原提示誘導を目指した核酸、抗原送達システムの構築
3. 学会等名 第69回高分子討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 入江瞳、望月慎一
2. 発表標題 アジュバント核酸-抗原ペプチドコンジュゲート体による細胞性免疫の誘導
3. 学会等名 第36回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 ポリヌクレオチド-ペプチドコンジュゲートを含む免疫誘導剤およびそれを含む医薬組成物	発明者 望月慎一、小泉誠、 森田浩二	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-057249	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 抗原ペプチド-アジュバントヌクレオチドコンジュゲート体を含む免疫誘導剤及びそれを含む医薬組成物	発明者 望月慎一、小泉誠、 森田浩二	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-186093	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

北九州市立大学 櫻井・望月研究室HP http://www.sakurai-lab.jp/index.php/ 北九州市立大学 教員紹介(望月) https://www.kitakyu-u.ac.jp/env/faculty/d-life/introduction/shinichi-mochizuki.html Researchmap(望月) https://researchmap.jp/motti626
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------