

令和 4 年 4 月 27 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K18389

研究課題名(和文) 薬剤徐放と細胞デリバリーを達成する生分解性ポリマーのがん免疫療法への展開

研究課題名(英文) Biodegradable injectable polymers to achieve sustained drug releasing and cellular delivery system for cancer immunotherapy

研究代表者

能崎 優太 (Yoshizaki, Yuta)

東北大学・薬学研究科・助教

研究者番号：90805889

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、生分解性インジェクタブルポリマー(注射可能ポリマー：IP)を用いて抗原と免疫応答を賦活する物質(アジュバント)の放出を制御可能な製剤や免疫細胞をデリバリーする製剤について開発した。抗原として卵白由来アルブミンを用い、アジュバントとしてオリゴ核酸(CpG-DNA)を用いた。IPの組成によってOVAやCpG-DNAの放出速度を遅延させることができた。マウスに皮下投与してOVA特異的な血中抗体価(IgG)を評価したところ、IPを用いた方が高い抗体価を長期間持続することができた。またIPに樹状細胞(DC)を混合して担がんマウスに投与したところ、腫瘍の成長を効率的に抑制することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

感染症やがんの抑制には免疫応答が重要な役割を担っている。本研究では温度応答型生分解性インジェクタブルポリマー(IP)を用いて抗原やアジュバント(免疫応答を賦活する物質)の徐放や免疫細胞をIPに混合することで、免疫応答を効率的に誘導できるワクチン製剤について研究を行った。抗原やアジュバントを徐放できるIPでは抗原特異的な抗体価を長期間、高く誘導できることを示した。免疫細胞を混合したIPでは、投与部位での免疫細胞の残存性が向上し、腫瘍に対する免疫応答が向上した。がん免疫療法やワクチン療法の発展に資する研究成果である。

研究成果の概要(英文)：In this study, we developed a biodegradable injectable polymer (IP) inducing immunity by controlling the rate of releasing antigen and adjuvant. Furthermore, immune cells (dendritic cells: DCs) were delivered by using IP to evaluate immune responses in vivo. Albumin from egg white was used as antigen and oligonucleotide (CpG-DNA) was used as an adjuvant, and the release rate of OVA and CpG-DNA was delayed by using IP exhibiting irreversible gelation. In subcutaneous administration to mice, OVA-specific antibody titer (IgG) in the blood showed that the IPs produced higher antibody titer for a longer period of time. DCs delivered by using IP enhanced antitumor effect. Therefore, this approach using IP systems can contribute to the field of cancer immunotherapy and vaccines.

研究分野：生体材料学

キーワード：インジェクタブルポリマー 温度応答性 生分解性 免疫 ワクチン 徐放 細胞デリバリー がん免疫療法

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

再生医療やワクチン分野では、細胞と薬剤を一緒に注入して体内で保持し、機能を発揮させるための足場材料の開発が求められている。このようなシステムを構築するためには、温度などの外部刺激に応答してゾル-ゲル転移を起こす、注入可能=インジェクタブルポリマー(IP)が有力な材料として挙げられる。

ポリエチレングリコール(PEG)とポリ(カプロラクトン-グリコール酸)共重合体(PCGA)から成るトリブロック共重合体(tri-PCG)の水溶液が体温付近でゾルからゲルへと転移し、温度応答型生分解性インジェクタブルポリマーとして応用可能であることなどを示してきた(*ACS Biomater. Sci. Eng.* 2017, 3, 56)。さらに近年では、tri-PCGの末端にアクリロイル基を導入した tri-PCG-Acryl を合成し、ポリチオール化合物と tri-PCG/tri-PCG-Acryl 混合ミセル溶液を混合することにより、マイケル付加反応により体温まで加熱したときのみ化学架橋ゲルを形成し、体内で長期間ゲル状態を維持できるシステムを構築することに成功している。特にこのシステムでは、ポリチオール化合物(DPMP)と tri-PCG-Acryl の混合比率を変えるという極めて簡便な手法により、体内でゲル状態を維持する期間を 1-90 日の範囲で自在に制御できることが大きな特徴である。またこの化学架橋 IP に脂肪由来幹細胞(AdSC)を含有させゲル化させて、*in vitro*で一週間ほど培養することに成功している。また、tri-PCGの両末端にスクシンイミド(OSu)基を導入した tri-PCG-OSu と tri-PCG の混合ミセル水溶液に水溶性ポリアミンであるポリリシン(PLys)を混合することで、温度に応答してゲル化する際に、OSu 基とアミノ基が反応してアミド結合を形成し、化学架橋を持つヒドロゲルを調製できることを明らかにした(*Polym J.*, 2014, 46, 632-635)。

免疫系を人為的に制御することにより、感染症予防やがん治療を達成する試みが行われている。免疫を制御するための薬剤はワクチンと呼ばれ、抗原と免疫を賦活する物質(アジュバント)から構成される。ワクチンによる免疫獲得の効率化のため、抗原の標的細胞への送達、抗原の持続的な供給(徐放)や投与の簡便性向上といった特性が求められており、実際にシリンジを使用して抗原とアジュバントを持続的に投与することにより、抗体産生が増強するといった報告がある(*Proc Natl Acad Sci*, 2016, 113, 6639-6648.)。従って、ヒドロゲルなどのマトリックスから抗原とアジュバントを徐放させることができれば、1回の投与で簡便に免疫応答を増強できると考えられる。

また、がん免疫療法は、がん抗原特異的な免疫反応を利用してがん細胞のみを攻撃することが可能で、副作用の少ない治療の実現が期待されている。中でも抗原提示細胞である樹状細胞(DC)を標的としたものが DC ワクチン療法である。その手法の例として、患者から採取した DC を体外で培養し、抗原を認識させたのちに再び患者に投与して抗原特異的な免疫を誘導する方法が提案されている。しかし、活性化 DC の生存期間は短く、投与後その大部分が死滅して十分な治療効果が持続しないといった問題がある。

2. 研究の目的

本研究の目的は、抗原タンパク質とアジュバント、DC の誘導因子を徐放させ、DC をデリバリーする IP システムを構築し、がん免疫療法へ展開することである。各物質の混合比を調整して徐放特性を変化させる、あるいは免疫誘導能力に及ぼす徐放特性の影響や DC をデリバリーすることの効果について調べるために以下の項目について検討した。

(1) 生理活性物質の徐放パターンが異なる IP システムの調製

抗原として卵白由来アルブミン(OVA)用い、アジュバントとして CpG-DNA を用いた。これらを IP に混合して、OVA と CpG-DNA の放出パターンとマウスに投与した際の免疫応答の関係について調べた(図 1)。免疫細胞が抗原やアジュバントに曝される濃度や頻度が免疫応答に重要であると考えられるので、免疫応答に最適な徐放パターンを見いだせば高活性なワクチンの開発に寄与できる。

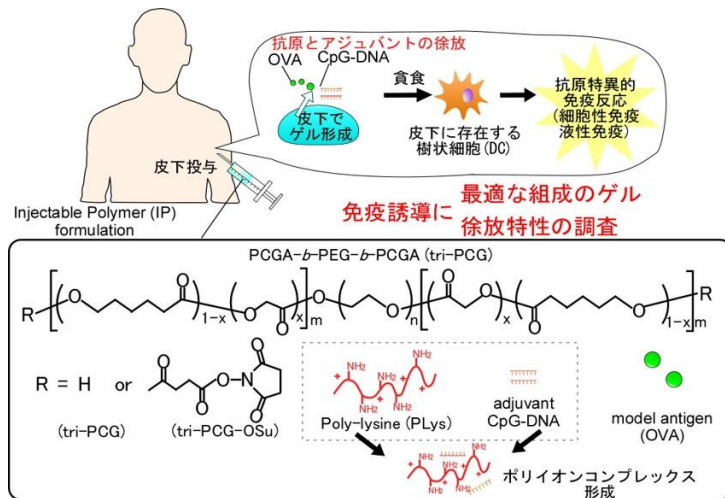


図 1 抗原とアジュバントを徐放できる IP の概要。

(2) 樹状細胞(DC)をデリバリーする IP の開発

IP に DC を混合して投与することで投与した DC が効率的に免疫誘導に関係するかを調べる。この際 DC と抗原、アジュバントを IP に混合することによって、体外での活性化を経ずに免疫応答が誘導されるか調べる。IP 中に混合された DC の細胞増殖性、抗原やアジュバントの取り込み、活性化状態を調べることで、IP ゲル内に保持された DC が免疫誘導に適した状態になっているかを調べる(図 2)。

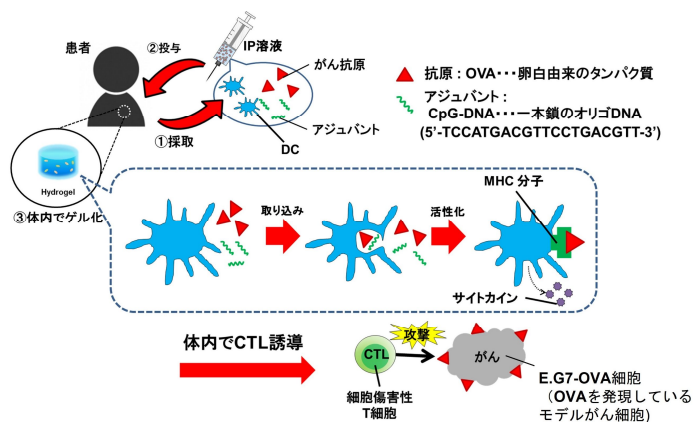


図 2 樹状細胞をデリバリーする IP の概要。

3. 研究の方法

(1) 生理活性物質の徐放パターンが異なる IP システムの調製

tri-PCG-OSu を用いた不可逆的なゲル化を示す IP システムにおいて正電荷を有するポリリシン(PLys)と負電荷をもつ抗原およびアジュバントとの静電相互作用による放出遅延を期待して、ローダミンでラベル化した OVA と FITC でラベル化した CpG-DNA を所定量含む PBS 溶液と tri-PCG, tri-PCG-Acryl, PLys(分子量: 94600)の PBS 溶液を 37 に加温することでゲル化させた。ゲル上部に PBS を加えて 37 で所定時間インキュベーションして上澄みの PBS を回収し、放出された OVA と CpG-DNA の蛍光をモニターすることで放出挙動を評価した。さらに、C57BL/6 マウスの背部皮下に OVA50 μg と CpG-DNA2 μg を含む溶液(Solution 投与群)または IP に混合して投与(tri-PCG-OSu IP gel 投与群)して、所定時間ごとに採血し、血中抗体価を測定した。

(2) 樹状細胞(DC)をデリバリーする IP の開発

マウス大腿骨から骨髓細胞を採取し、BMDC 用培地中で分化誘導因子として GM-CSF をくわえて培養し、骨髓由来 DC へと分化させた。蛍光標識抗 CD11c(DC マーカー)抗体を用いたフローサイ

トメトリーにより、分化の確認を行った。得られた DC を IP ゲル中に保持し、LIVE/DEAD assay 法により生存率を調査した。また、OVA と CpG-DNA を用い、IP ゲル中でこれらの蛍光標識物と DC とをインキュベートし、その細胞取り込み及び炎症性サイトカインの産性能を、蛍光顕微鏡及び PCR 法により評価した。DC をカルボキシルフルオレセインで蛍光ラベルし、マウス背部皮下に投与してインビロイメージングシステムで投与部位の蛍光強度を一定時間ごとに調べた。また OVA 発現マウス T リンパ腫 (E.G7-OVA) を背部に担がんしたマウスに担がんから 5 日後に IP を接種して、腫瘍のサイズの変化を計測することで治療効果を評価した。

4. 研究成果

(1) 生理活性物質の徐放パターンが異なる IP システムの調製

ローダミンでラベル化した OVA とフルオレセインでラベル化した CpG-DNA を所定量含む PBS 溶液と tri-PCG, tri-PCG-OSu, PLys (MW: 94,600) の PBS 溶液を 37 に加温することでゲル化させた。tri-PCG のみから構成される IP ヒドロゲルからは、インキュベーション開始 3 日後で 80% の CpG-DNA がリリースされた。tri-PCG に PLys を加えた系では CpG-DNA のリリースは、tri-PCG のみのゲルと比べて著しく遅くなること分かった。これは、IP 溶液中で CpG-DNA のリン酸エステル基と PLys のアミノ基が静電相互作用し、ポリイオンコンプレックスを形成して、見かけの分子量が増加したためであると考えられる。この系に tri-PCG-OSu を混合すると、CpG-DNA のリリースは、tri-PCG-OSu を混合しない系に比べてさらに遅くなった。OVA のリリースについても PLys, tri-PCG-OSu を混合した IP では遅延することが分かった (図 3)。PLys と tri-PCG-OSu を混合した tri-PCG-OSu IP gel 投与群は、Solution 投与群よりも高い OVA 特異的 IgG 抗体価を長期間維持した (図 4)。またアジュバントとして CpG-DNA を投与することで、上昇することが知られている IgG2a の抗体価について、tri-PCG-OSu IP gel 投与群の抗体価の上昇は Solution 投与群に比べて遅延した。これはマウス皮下においても CpG-DNA の放出が遅延したことを示唆している。免疫 22 週後のマウス脾臓を回収し、脾細胞から産生される抗原特異的な IFN- γ を定量したところ、tri-PCG-OSu IP gel 投与群で強い免疫応答を確認した。以上より、IP をワクチン徐放システムとして用いることで効率的に免疫応答を増強できた。

(2) 樹状細胞 (DC) をデリバリーする IP の開発

tri-PCG に DC を混合してゲル化させインキュベーションし、一定期間後ゲルを冷却して液状

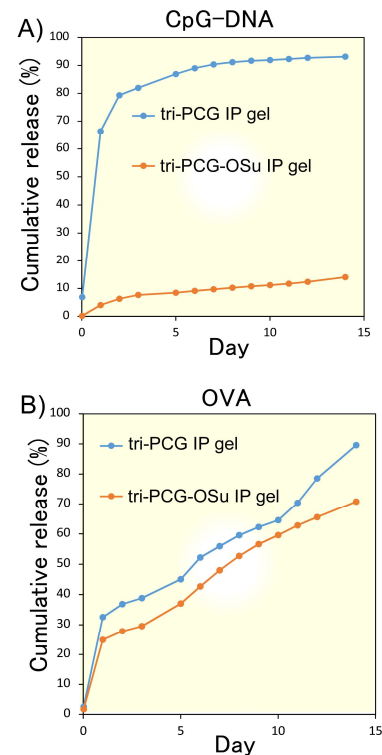


図 3 IP ゲルからの CpG-DNA および OVA の放出挙動。

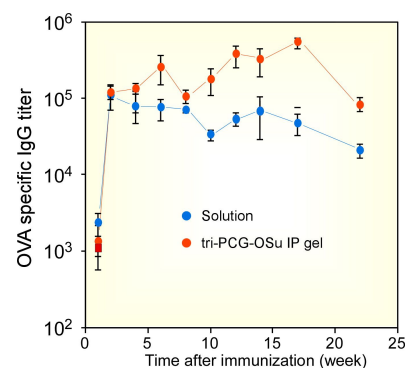


図 4 IP gel を投与したマウスの血中抗体価 (IgG)。

化させ回収した細胞の生存率は、インキュベーション 1~3 日間で 90%程度であった。通常の方法でインキュベーションした場合と IP ゲル内での培養で細胞生存率が変わらなかったことから本研究で用いた IP は細胞を保持するための材料として適合性が高いことが示唆された。蛍光ラベルした抗原やアジュバントの取り込みについては、IP 内に混合した DC は通常の方法で培養した DC と同等以上の取り込み量を示した。さらに DC が成熟したことを示すサイトカイン関連遺伝子 (IL-12 の mRNA) の発現を RT-PCR 法で評価したところ、抗原やアジュバントの取り込み量を反映して、IP 内で培養した DC でも通常の方法で培養した DC と同程度の mRNA 発現量であることが分かった。DC の細胞膜に発現する MHC class II 分子についても IP 内での培養と通常培養でほぼ同程度の発現強度であった。したがって、IP 内に抗原とアジュバントを添加した状態で DC を保持した場合でも DC が免疫誘導に適した状態に成熟したことが明らかとなった。マウス背部皮下に蛍光ラベルした DC を投与して投与部位の蛍光強度変化を調べたところ、IP に混合して DC 投与したグループでは、生理食塩水に懸濁して DC を懸濁して DC を投与したグループよりも投与部位での蛍光が長期間維持された。この結果は IP を用いることによって DC を投与することで、投与部位で長期間 DC を保持したことを示唆している。E.G7-OVA 細胞を担がんしたマウスを以下の 4 グループに分けて腫瘍の成長を評価した(図 5)。

リン酸緩衝生理食塩水(PBS)を投与したグループ、DC を抗原とアジュバントを含む培養液で 1 晩培養して投与したグループ(activate DC)、DC を含まず抗原とアジュバントのみを IP に混合して投与したグループ(tri-PCG(DC free))、活性化していない DC と抗原とアジュバントを IP に混合して投与したグループ(tri-PCG(non act DC))について比較した。tri-PCG を用いて DC と抗原、アジュバントを混合して投与したグループが最も効率的に腫瘍の成長を抑制した。さらに tri-PCG(non act DC)投与グループは血中抗体価の値も他のグループよりも高かった。以上より、本研究では抗原とアジュバントの徐放製剤を、生分解性 IP を用いて構築し、徐放によって抗体価を長期的に保持できることを明らかにした。さらに DC を、IP を用いて投与することで、予め DC を活性化させることなく腫瘍の縮退効果を示すことを明らかにした。IP による徐放、細胞デリバリーにより免疫系を繰り返し刺激することで効率的に免疫を誘導したと考えられる。近年、DC の分化因子、抗原、アジュバントを内包した体内埋め込み型の生分解性スキャホールドを皮下切開により移植してがん免疫療法に応用した研究がされており、米国で臨床試験が行われている。本研究では、注射により投与が可能であるため、投与のための外科手術が不要で、がん免疫療法をより簡便に非侵襲的に実施できる可能性がある。今後は DC だけでなく、他の免疫細胞 (T 細胞や血中の単球) を IP に混合して、細胞の状態を解析することによって、本課題を進展させた多細胞間のネットワークを利用した免疫細胞療法を実現することが可能になると考えられる。

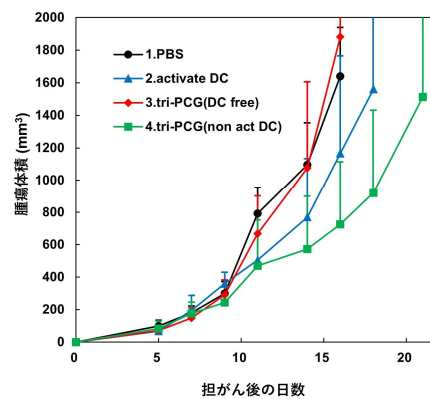


図 5. IP ゲルを用いた DC デリバリーによる腫瘍の成長抑制。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yoshizaki Yuta, Ii Masaaki, Takai Hiroki, Mayumi Nozomi, Fujiwara Soichiro, Kuzuya Akinori, Ohya Yuichi	4. 巻 22
2. 論文標題 Cellular therapy for myocardial ischemia using a temperature-responsive biodegradable injectable polymer system with adipose-derived stem cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Science and Technology of Advanced Materials	6. 最初と最後の頁 627 ~ 642
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/14686996.2021.1938212	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 Soichiro, Yoshizaki Yuta, Kuzuya Akinori, Ohya Yuichi	4. 巻 135
2. 論文標題 Temperature-responsive biodegradable injectable polymers with tissue adhesive properties	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Acta Biomaterialia	6. 最初と最後の頁 318 ~ 330
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.actbio.2021.08.033	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 Yoshizaki Yuta, Nagata Takuya, Fujiwara Soichiro, Takai Shinji, Jin Denan, Kuzuya Akinori, Ohya Yuichi	4. 巻 4
2. 論文標題 Postoperative Adhesion Prevention Using a Biodegradable Temperature-Responsive Injectable Polymer System and Concomitant Effects of the Chymase Inhibitor	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ACS Applied Bio Materials	6. 最初と最後の頁 3079-3088
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsbm.0c01467	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 能崎優太	4. 巻 39
2. 論文標題 特集：2020年度日本バイオマテリアル学会各賞紹介 日韓バイオマテリアル学会若手研究者交流AWARD 温度応答型生分解性インジェクタブルポリマーによるワクチンデリバリーシステムの開発	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 バイオマテリアル - 生体材料 -	6. 最初と最後の頁 22-23
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 無
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 Y. Yoshizaki, H. Yamamoto, A. Kuzuya, Y. Ohya	4. 巻 -
2. 論文標題 Sustained Drug-releasing Systems Using Temperature-responsive Injectable Polymers Containing Liposomes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ACS Symposium Series	6. 最初と最後の頁 -
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 -

〔学会発表〕 計16件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 堀井健大, 能崎優太, 村瀬敦郎, 大矢裕一
2. 発表標題 生分解性インジェクタブルポリマーゲル内での樹状細胞の活性化とがん免疫療法への応用
3. 学会等名 第43回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 堀井健大, 能崎優太, 村瀬敦郎, 大矢裕一
2. 発表標題 生分解性インジェクタブルポリマーの免疫細胞療法への応用
3. 学会等名 第70回高分子学会年次大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 堀井健大, 能崎優太, 村瀬敦郎, 大矢裕一
2. 発表標題 温度応答型生分解性インジェクタブルポリマーの細胞免疫療法への応用
3. 学会等名 第67回高分子研究発表会(神戸)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuta Yoshizaki
2. 発表標題 Development of vaccine delivery system using biodegradable temperature-responsive injectable polymers
3. 学会等名 The Korean Society for Biomaterials Fall Conference 2020 Korean Japanese Young Scientist Session (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 能崎優太, 葛谷明紀, 大矢裕一
2. 発表標題 温度応答型生分解性インジェクタブルポリマーを用いた 徐放型ワクチン製剤の開発
3. 学会等名 第69回高分子学会年次大会, 2H05
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 堀井健大, 能崎優太, 大矢裕一
2. 発表標題 温度応答型インジェクタブルポリマーの細胞免疫療法への応用
3. 学会等名 第66回高分子研究発表会(神戸) Pb-33
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 眞弓のぞみ, 能崎優太, 葛谷明紀, 大矢裕一
2. 発表標題 脂肪由来幹細胞の多能性を保持する温度応答型インジェクタブルポリマーゲル
3. 学会等名 第66回高分子研究発表会(神戸), F-13
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 眞弓のぞみ, 能崎優太, 葛谷明紀, 大矢裕一
2. 発表標題 生分解性インジェクタブルゲルポリマー内での脂肪由来幹細胞の未分化状態および多能性の保持
3. 学会等名 第69回高分子学会年次大会, 2F13
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 眞弓のぞみ, 能崎優太, 葛谷明紀, 大矢裕一
2. 発表標題 細胞療法を意図した幹細胞の多能性を保持する温度応答型生分解性インジェクタブルゲルの開発
3. 学会等名 第69回高分子討論会, PD0801
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 眞弓のぞみ, 能崎優太, 藤原壮一郎, 葛谷明紀, 打田裕明, 根本慎太郎, 大矢裕一
2. 発表標題 温度応答型生分解性インジェクタブルゲルを用いた脂肪由来間葉系幹細胞の多能性保持と細胞デリバリー
3. 学会等名 第19回日本再生医療学会総会, 0-29-4
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 能崎優太, 葛谷明紀, 大矢裕一
2. 発表標題 温度応答型生分解性インジェクタブルポリマーを用いた抗原・アジュバント徐放システムの構築
3. 学会等名 第68回高分子学会年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 能崎優太, 葛谷明紀, 大矢裕一
2. 発表標題 温度応答型生分解性インジェクタブルポリマーを用いた 抗原・アジュバントの徐放と抗体産生能増強
3. 学会等名 第35回DDS学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 能崎優太, 葛谷明紀, 大矢裕一
2. 発表標題 がん免疫療法への応用を意図した 生分解性インジェクタブルポリマー による抗原・アジュバント徐放システム
3. 学会等名 第41回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 能崎優太, 葛谷明紀, 大矢裕一
2. 発表標題 生分解性インジェクタブルポリマーを用いた抗原・アジュバント徐放による免疫増強
3. 学会等名 第40回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山本洋輝, 能崎優太, 葛谷明紀, 大矢裕一
2. 発表標題 リポソーム内包温度応答型生分解性インジェクタブルゲルによる水溶性薬物徐放システム
3. 学会等名 第40回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Y. Yoshizaki, H. Yamamoto, A. Kuzuya, Y. Ohya
2. 発表標題 Controlled Drug Releasing System Using Biodegradable Temperature-responsive Injectable Polymers Containing Liposome
3. 学会等名 CRS Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東北大学大学院薬学研究科 界面物性化学分野ホームページ http://www.pharm.tohoku.ac.jp/~bussei/index.html 関西大学機能性高分子研究室 http://www.chemmater.kansai-u.ac.jp/kinosei/
--

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
---------	---------