

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：24403

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22977

研究課題名(和文)超音波免疫治療のためのオールインワンナノメディシン開発

研究課題名(英文)Development of all-in-one nanomedicine for sonoimmunotherapy

研究代表者

原田 敦史(Harada, Atsushi)

大阪府立大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：50302774

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文):本研究では、超音波照射によるがん細胞の細胞死誘導によって免疫系を活性化する超音波免疫治療という免疫治療の新しい概念を提唱し、そのために必要な機能を合目的に創り込んだオールインワンナノメディシンの開発に取り組んだ。超音波照射によって活性酸素種を生成するTiO₂ナノ粒子を高分子材料と複合化させることにより、超音波照射による免疫細胞活性化能、免疫細胞活性化能、免疫細胞へのがん抗原送達能を一つのキャリアに創り込んだオールインワンナノメディシンが調製できたことが培養細胞実験及び動物実験を通して確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

三大がん治療方法(外科治療、化学治療、放射線治療)に加えて、第四のがん治療方法としてがん免疫治療が注目されている。この治療方法は副作用が少なく、侵襲性の低い治療法であることから、高齢化社会において患者のQOLを高める治療法として期待されている。低侵襲性を維持しつつ、治療効果を高めるために超音波を利用するシステムに開発に取り組み、新規な治療方法の開発につながる知見を得た。

研究成果の概要(英文): In this study, we proposed a new concept of immunotherapy called ultrasonic immunotherapy, which activates the immune system by inducing cell death of cancer cells by ultrasonic irradiation, and created an all-in-one nanomedicine with the purpose of creating the necessary functions. By complexing TiO₂ nanoparticles that generate active oxygen species by ultrasonic irradiation with synthetic polymer materials, the ability to activate immune cells, activate immune cells, and deliver cancer antigens to immune cells by ultrasonic irradiation can be achieved. It was confirmed through cultured cell experiments and animal experiments that the all-in-one nanomedicine created in one carrier could be prepared.

研究分野：生体機能材料学

キーワード：超音波免疫治療 酸化チタンナノ粒子 サイトカイン産生 樹状細胞活性化

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現在、がんの臨床における三つの主たる治療方法は、外科治療（手術）・化学治療（分子標的薬を含む抗がん剤による治療）・放射線治療であり、これらを総称して三大がん治療といわれている。これらのがん治療は、正常な細胞を弱らせたり、臓器を傷つけてしまうなどの副作用として患者の体に大きな負担を強いている。このような三大がん治療に加えて、“第四のがん治療方法”として注目されているのが「がん免疫治療」であり、体の中に侵入した異物を排除するために備えている能力である免疫を高める治療法である。がん免疫治療は、副作用が少なく、侵襲性の低い治療法であることから、高齢化社会において患者の QOL を高める治療法として期待されている。

これまでに、がん治療を目的としたさまざまなドラッグデリバリーシステム（DDS）の開発に取り組んできた。これまでの主な研究成果は、

(1) 化学療法: 抗がん剤を効果的に作用させるための DDS 研究において、がん組織への集積、可視化及び局所薬物リリース可能な DDS 開発に成功

(2) 免疫療法: モデル抗原としてオボアルブミンで樹状細胞の細胞質へデリバリーする DDS を開発し、*in vivo* 免疫誘導に成功

(3) 超音波療法: 超音波増感剤である TiO_2 ナノ粒子を細胞内へデリバリーする DDS を開発し超音波照射部位選択な細胞死誘導に成功であり、これら三つのがん治療のための DDS 開発に関する研究を展開する過程において、*in vivo* における効果的ながん組織の縮退誘導においては免疫系の活性化を伴う場合があるという知見を得た。さらに、超音波の利用において、超音波の照射タイミングによってはアポトーシスではなく、免疫系の活性化に誘導であるとされているネクローシスを誘導するという知見を得た。これらの知見を効果的に組み合わせることにより、超音波免疫治療が実現するという着想に至った。

2. 研究の目的

本研究では、超音波照射によるがん細胞の細胞死誘導によって免疫系を活性化する超音波免疫治療という免疫治療の新しい概念を提唱し、そのために必要な機能を合目的に創り込んだオールインワンナノメディシンを開発することを目的とする。超音波照射によって一重項酸素を含む活性酸素種 (ROS) を生成する超音波増感剤としての特性を有する TiO_2 ナノ粒子を、高分子材料と複合体形成させる。この複合体を EPR 効果によりがん組織へ送達し、がん細胞表面に分布した TiO_2 ナノ粒子への超音波照射により生成する ROS によってがん細胞のネクローシスを起こし、免疫系を活性化させる。さらに、このがん免疫療法においては、がん抗原を樹状細胞へ送達する機能も必要となる。 TiO_2 ナノ粒子のがん組織送達能、超音波照射による免疫細胞活性化能、免疫細胞へのがん抗原送達能を一つのキャリアに創り込んだオールインワンナノメディシンを構築する。

3. 研究の方法

(1) TiO_2 ナノ粒子への超音波照射による細胞死誘導評価

TiO_2 ナノ粒子と 3-ホスホプロピオン酸または、 α -ホスホリルエタノールアミンの脱水縮合により 2 種類の表面改質 TiO_2 ナノ粒子 ($\text{TiO}_2\text{-COOH}$, $\text{TiO}_2\text{-NH}_2$) を得た。得られた TiO_2 ナノ粒子について、熱重量 (TG) 測定を行い、表面改質剤の修飾量を決定した後、ゼータ電位の pH 依存性を評価した。次に、ROS 検出プローブである Hydroxyphenyl fluorescein を用いて表面改質 TiO_2 ナノ粒子への超音波照射による ROS 生成能を評価した。HeLa 細胞に対して表面改質 TiO_2 ナノ粒子を接触させた後、超音波照射を行い、ATP assay 及び CRT 提示の確認を行った。

(2) TiO_2 ナノ粒子内包三元複合体の調製と樹状細胞を用いた機能評価

TiO_2 重量の 10 倍濃度となるように調製したポリアリルアミン塩酸塩 (PAA) 水溶液に TiO_2 ナノ粒子分散液を加え攪拌した後、NaOH 水溶液を用いて中和した。限外ろ過により遊離の PAA を除去するとともに 10 mM Tris-HCl 緩衝液に溶媒置換し、二元複合体を調製した。種々ポリカルボン酸水溶液に二元複合体水溶液を滴下し、 TiO_2 ナノ粒子内包三元複合体水溶液を調製した。三元複合体調製は、動的光散乱 (DLS) 測定・ゼータ電位測定により確認した。調製した三元複合体の樹状細胞に対する細胞毒性を WST-8 assay により評価した後、細胞取込をフローサイトメーター及び共焦点レーザー顕微鏡観察により確認した。さらに、三元複合体を取り込ませた樹状細胞への超音波照射によるサイトカイン (IL-1 β) 産生を評価した。

(3) TiO_2 ナノ粒子内包三元複合体の抗原送達能評価

モデル抗原としてオボアルブミンを選択し、オボアルブミン封入三元複合体を調製した。樹状細胞への送達能をフローサイトメーター及び共焦点レーザー顕微鏡観察により評価した後、オボアルブミンの細胞質送達を共焦点レーザー顕微鏡観察により評価した。

4. 研究成果

(1) TiO₂ ナノ粒子への超音波照射による細胞死誘導評価

TiO₂-COOH と TiO₂-NH₂ が異なる表面荷電特性を有することがゼータ電位測定から確認された。この表面荷電特性の違いにより生体膜との相互作用の違いがあることを確認された。TiO₂-COOH では、アポトーシスよりネクローシスを誘導しやすい傾向が認められ、ATP リリース、CRT 提示が確認されたことから、免疫原性細胞死誘導が可能であることが示唆された。

(2) TiO₂ ナノ粒子内包三元複合体の調製と樹状細胞を用いた機能評価

PAA と TiO₂ ナノ粒子からなる二元複合体を調製した後、種々側鎖スパーサー構造を有するポリカルボン酸で被覆することにより三元複合体を得た。平均粒径 100nm で正のゼータ電位をもつ二元複合体がポリカルボン酸で被覆されることによって負のゼータ電位となり、平均粒径 150nm 程度に増大した。樹状細胞による三元複合体の取込をフローサイトメーターにより評価した結果を図 1 に示す。二元複合体 (PAA) と比較して三元複合体 (mGlu, cHex) では細胞取込が増大することが確認された。また、デキストラン硫酸を共存させると、取込量が減少したことからスカベンジャーレセプターを介した細胞取込であることが示唆された。さらに、WST-8 assay により二元複合体では細胞毒性が認められたが、三元複合体化することにより毒性が著しく抑制され、90%以上の細胞生存率が維持された。共焦点レーザー顕微鏡観察により細胞内局在を評価した結果、三元複合体の一部はエンドソーム脱出し、細胞質へ移行していることが確認された。

TiO₂ ナノ粒子を細胞質まで送達することができることが確認された三元複合体について、細胞取込後、超音波照射を行った。超音波照射を行うことで細胞内 ROS レベルが有意に増加することが確認された。さらに、その産生経路に ROS が関与しているサイトカインである IL-1β の産生量の評価した結果、超音波照射によって IL-1β 産生が誘導されることが確認された。これらの結果は、三元複合体が超音波照射による免疫細胞活性化能を有することを示している。

(3) TiO₂ ナノ粒子内包三元複合体の抗原送達能評価

樹状細胞による蛍光標識したオボアルブミンを封入した三元複合体の取込を共焦点レーザー顕微鏡観察により評価した (図 2)。細胞内に輝点状に存在するオボアルブミンが観察された。また、その分布はエンドソームとは重なっていないことから細胞質へ送達されていると考えられる。そこで、抗原提示には樹状細胞内で抗原タンパク質が抗原ペプチドに分解される必要がある。OVA の加水分解により消光が解消され緑色蛍光を発する DQ-OVA® (BODIPY ラベル化オボアルブミン) を用い、細胞に取り込まれた後のオボアルブミン分解を、共焦点レーザー顕微鏡観察により評価した。BODIPY 由来の緑色蛍光が確認され、細胞内でオボアルブミンが分解されていることが示された。細胞内のプロテアーゼによって加水分解が進行したと考えられる。オボアルブミンの分解を示す緑色蛍光とエンドソームを示す赤色蛍光が一部共局在化していることから、分解されたオボアルブミンがエンドソームに存在していることが示された。ポリカルボン酸由来のプロトンスポンジ効果によって三元複合体のエンドソーム脱出が起こる前に、エンドソーム内のプロテアーゼにより分解されたと考えられる。したがって分解されたオボアルブミンは (1) エンドソームがリソソームに融合する前にプロトンスポンジ効果が発揮され、サイトゾルに放出される、または (2) プロトンスポンジ効果が

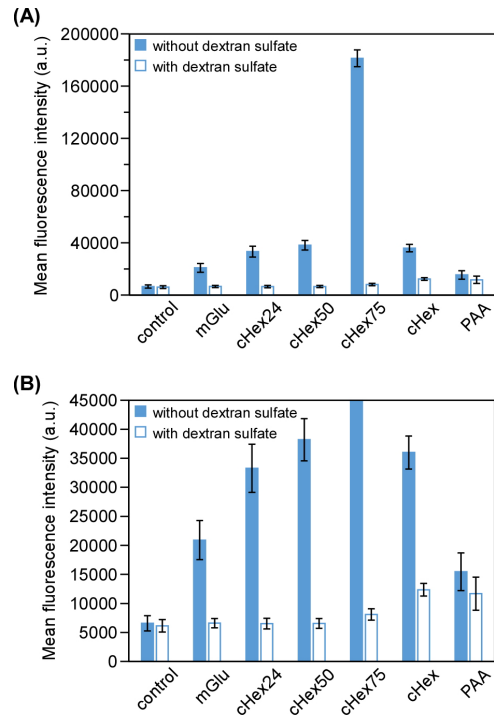


図 1 樹状細胞 (DC2.4) による細胞取込評価 (B は A の拡大図)

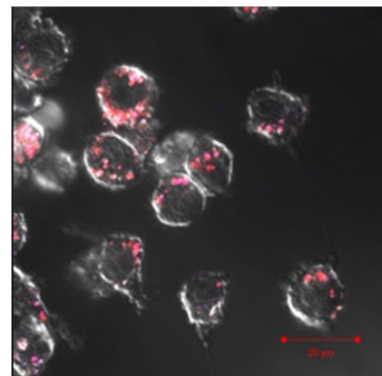


図 2 蛍光標識したオボアルブミン封入三元複合体で処理された樹状細胞の共焦点レーザー顕微鏡観察像

発揮される前にエンドソームがリソソームに融合し、リソソーム内に存在する、という二つのパターンが考えられ、MHC class I 分子依存性抗原提示および MHC class II 分子依存性抗原提示の両方を誘導することが示唆された。一方、緑色蛍光と赤色蛍光が共局在化していないところは分解されたオボアルブミンがサイトゾルに存在していることを示すと考えられる。(1) ポリカルボン酸由来のプロトンスポンジ効果が発揮され、エンドソーム脱出後にサイトゾルのプロテアーゼに分解された、または(2) エンドソーム内のプロテアーゼによる分解後、プロトンスポンジ効果によりエンドソームに放出された、という二つのパターンが考えられ、どちらにおいても MHC class I 分子依存性抗原提示を誘導することが示唆された。

以上の *in vitro* における評価より、作製した三元複合体の抗原送達によって細胞性免疫を誘導できることが示唆されたことから *in vivo* での検討を行った。樹状細胞から MHC class I 分子依存性抗原提示が行われると、CD8⁺T 細胞は抗原特異的なキラーT 細胞へ分化する細胞性免疫が誘導される。抗原を特異的に認識した細胞傷害性 T 細胞は、IFN- γ を産生して自身の細胞傷害活性の増強や他の免疫細胞の活性化を行いつつ、標的細胞死を誘導する。そこで三元複合体を投与したマウスの脾細胞とオボアルブミンとの共培養を *in vitro* において行い、脾細胞から産生される IFN- γ 量を ELISA 法によって測定した。三元複合体の抗原送達による細胞性免疫の誘導性を評価した。複合体を調製に用いた Tris-HCl 緩衝液、オボアルブミン、三元複合体を投与したマウスから得られた脾細胞を、オボアルブミンを含む 10% FBS 含有 RPMI-1640 中で培養し、5 日後に培養液の IFN- γ 濃度を測定した (図 3)。マウスに投与したサンプルに関わらず脾細胞のみを培養

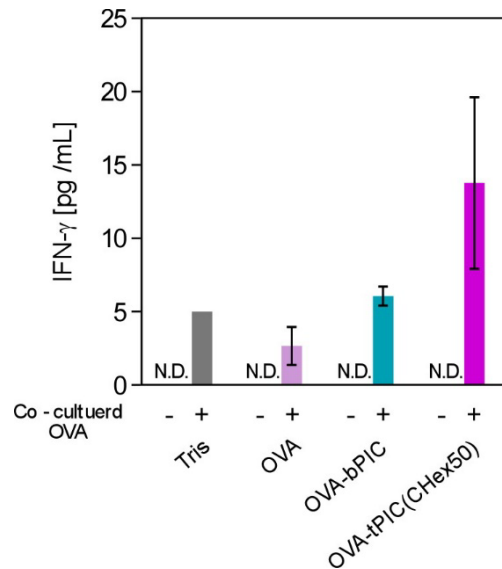


図 3 マウスから回収した脾細胞へのアルブミン播種による IFN- γ 産生

した時では IFN- γ の産生は確認されなかったが、オボアルブミンと共培養させたときでは IFN- γ の産生が確認された。このことから IFN- γ の産生にオボアルブミンの刺激が関与していることが示された。マウスに投与したサンプルの違いによる IFN- γ 産生量の差について考察する。初めに Tris-HCl 緩衝液を投与したマウスの脾細胞から IFN- γ が産生された理由として、脾細胞培養時の外的要因が考えられる。これまでにエンドトキシン (リポ多糖類) による刺激で IFN- γ が産生されることが明らかとなっている。今回脾細胞との共培養に用いたオボアルブミンは完全なエンドトキシンフリーではないため、オボアルブミンを含んでいない Tris-HCl 緩衝液をマウスに投与した場合でも IFN- γ が産生されたと考えられる。オボアルブミンのみを投与したマウスの脾細胞からは Tris-HCl 緩衝液と同程度の IFN- γ が産生され、今回のオボアルブミン濃度ではオボアルブミン特異的なキラーT 細胞が誘導できていないことが示された。さらに、三元複合体を投与した場合には IFN- γ の産生量の増加が確認され、OVA 特異的なキラーT 細胞が存在していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 北川 美咲, 弓場 英司, 原田 敦史
2. 発表標題 抗原タンパク質とポリカルボン酸誘導体を被覆した TiO ₂ ナノ粒子含有ポリイオンコンプレックスの作製
3. 学会等名 第65回高分子研究発表会（神戸）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木 咲和, 弓場 英司, 原田 敦史
2. 発表標題 TiO ₂ ナノ粒子の表面官能基と超音波増感剤特性に基づく生体膜破壊能の相関
3. 学会等名 日本バイオマテリアル学会関西ブロック 第14回若手研究発表会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 北川 美咲, 弓場 英司, 原田 敦史
2. 発表標題 抗原タンパク質とポリカルボン酸誘導体により被覆された TiO ₂ ナノ粒子含有ポリイオンコンプレックスの調整
3. 学会等名 日本バイオマテリアル学会関西ブロック 第14回若手研究発表会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 原田 敦史, 古川 和樹, 弓場 英司
2. 発表標題 TiO ₂ ナノ粒子内包三元複合体の表面制御と超音波照射を通じた免疫細胞活性化
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 鈴木 咲和, 弓場 英司, 原田 敦史
2. 発表標題 表層官能基が異なるTiO2ナノ粒子超音波増感剤のDDS材料としての機能評価
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 北川 美咲, 弓場 英司, 原田 敦史
2. 発表標題 抗原タンパク質とポリカルボン酸誘導体により被覆された TiO2ナノ粒子含有ポリイオンコンプレックスの作製
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

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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