

平成22年 5月13日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2008～2009

課題番号：20011002

研究課題名（和文） 癌免疫療法のための新規ナノキャリアの開発

研究課題名（英文） Development of nanocarrier for cancer immunotherapy

研究代表者

秋吉 一成 (AKIYOSHI KAZUNARI)

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・教授

研究者番号：90201285

研究成果の概要（和文）：200字以内

本研究では、多糖ナノゲル-PEG 架橋ナノ微粒子の構築とサイトカイン IL12 との複合化による長期徐放制御に成功した。また、カチオン性（スペルミン置換）多糖ナノゲルは核酸と効率よく複合体を形成し、トランスフェクション効率が高く、毒性の低い新規遺伝子キャリアとして機能することが明らかになった。さらに、CpGDNA による IL12 産生の増強や siRNA による RNA 干渉においてもキャリアとしての有効性が認められた。

研究成果の概要（英文）：

Raspberry-like assembly of polysaccharide nanogels with a high potential as a carrier for protein delivery was prepared. The present study proposes a novel therapeutic intervention technology, taking advantage of slow and sustained release of bioactive cytokines such as IL12. New siRNA or CpG DNA delivery systems were also developed by functional cycloamylose nanogels.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	11,000,000	0	11,000,000
2009年度	11,000,000	0	11,000,000
年度			
年度			
年度			
総計	22,000,000	0	22,000,000

研究分野：特定領域研究

科研費の分科・細目：統合がん・A01

キーワード：癌免疫，サイトカイン，ナノゲル，遺伝子デリバリー，分子シャペロン，カチオン性多糖，

1. 研究開始当初の背景

癌に対する治療の一つとして、サイトカインや癌ワクチンなどの免疫療法が注目されている。免疫療法を効率よく行うために DDS の

概念の重要性が明らかになってきた。一般にサイトカインを用いた免疫療法においては、その短い半減期に示される生体内での不安定性や、大量・反復投与による副作用などが、

有効な抗腫瘍効果を得るための障壁となっている。一方、タンパク質癌ワクチンの開発においては、抗原タンパク質を dendritic cell などの抗原提示細胞へいかに効率よくデリバリーし、キラーTcell やヘルパーTcell を誘導しえるかが大きな課題である。また、抗原タンパク質の不安定性も大きな問題のひとつである。これまでに我々は、疎水化多糖の自己組織化法により、薬物やタンパク質を取り込めるナノゲルキャリアを世界に先駆けて開発した。特に、抗原タンパク質を取り込ませた多糖ナノゲルがキラーT細胞を効率よく誘導し、細胞性免疫による癌免疫治療法として有効に働くことを見だし、ヒトへの臨床研究が始まっている。この我々が開発したナノゲル工学による DDS 技術と癌免疫研究を融合させることで新しい概念の治療システムの構築が期待される。

2. 研究の目的

本研究では、我々が独自に開発した分子シャペロン機能を有する自己組織化ナノゲルを用いて、癌免疫治療における新しいドラッグデリバリーシステム (DDS) を設計、利用することを目的とする。具体的には、インターロイキンなどのサイトカインの徐放制御担体としてのナノゲル複合体の機能、および、Short Interfering RNA (RNAi) や免疫系を活性化することが知られている CpG DNA のキャリアとしてのナノゲルの利用を図り、癌治療における新規な DDS の開発を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 新規機能性ナノゲルの調製

自己組織化ナノゲル法によりさらなる効率のよい機能性ナノゲルシステムを開発するために、分岐構造を有するマンナン、樹状構造 (dendritic) を有するクラスターデキストリンなど糖鎖構造の異なる種々のコレステロール置換多糖を合成し、そのナノゲルの特性をサイズ排除クロマトグラフ法、蛍光スペクトル法、動的光散乱法、静的光散乱法により評価した。細胞内への取り込みを向上させるために、多糖に種々のカチオン性部位を導入した新規カチオン性ナノゲルを合成し、そのナノゲルの会合特性を検討した。

(2) ナノゲル架橋ゲルの設計と評価

(1) で検討したナノゲルにさらにアクリロイル基などの重合性基を化学的に導入した。アクリロイル基と反応しえるチオール基を末端に有する 4 本鎖ポリエチレングリコール誘導体を選択し、種々の条件で重合性ナノゲルと反応させてハイブリッドナノゲルの調製条件を検討した。

(3) 新規ナノゲルとタンパク質との相互作用解析および細胞との相互作用

新規ナノゲルのタンパク質取り込み能に

ついて、サイズ排除クロマトグラフ法、蛍光スペクトル法、動的光散乱法などにより検討した。蛍光標識したタンパク質をナノゲルに取り込ませ、細胞との相互作用をフローサイトメトリー法および共焦点蛍光レーザー顕微鏡により評価した。これらの知見をもとに、癌免疫治療実験に有効と期待されるナノゲルをスクリーニングし、選択されたナノゲルとインターロイキン 12 (IL-12) などのサイトカインおよび抗原タンパク質との相互作用を検討し、ナノゲル内への封入法を確立した。

(4) ナノゲルキャリアのサイトカイン癌免疫療法への応用

IL-12 封入ナノゲルおよびナノゲル架橋ゲルによる CD4 T cell の刺激および IFN-g の産生能を評価した。本実験から有効性の高いナノゲル系を選択し、担癌マウス (肝臓) の治療実験を行った。

(5) ナノゲル核酸キャリアの設計と機能

種々のカチオン性アミノ基を有するナノゲルと核酸 (プラスミド、siRNA、CpGDNA) との相互作用をゲル電気泳動法により検討した。プラスミドキャリア系においては種々のナノゲルのトランスフェクション効率を GFP 発現系やルシフェラーゼ発現系により検討した。CpG DNA に関しては、カチオン性ナノゲル系を用いたデリバリーシステムの有効性を、in vitro 系でのサイトカイン産生により評価した。

4. 研究成果

これまでの知見をもとに、独自に開発した分子シャペロン機能を有する自己組織化ナノゲル複合体を用いて、癌治療における新しい DDS の設計とその応用について研究を推進した。具体的には、サイトカインの徐放制御担体としてのナノゲル複合体の利用、および塩基性ナノゲルを用いたタンパク質や遺伝子 (プラスミド) などの核酸のキャリアとしての利用を図り、その有用性を実証した。

(1) ナノゲル架橋ナノ微粒子の開発: アクリロイル基を有するナノゲルとチオール基を有する 4 本鎖ポリエチレングリコール誘導体とのマイケル付加反応により、ナノゲルが数十から数百連結された粒径 50-100nm の新規ナノゲル架橋ナノ微粒子の合成に成功した。さらに、サイトカイン (IL12) と効率よく複合体を形成し、この複合体をラットの皮下に投与後、血中の IL12 濃度を測定したところ、ナノゲル架橋微粒子化によりナノゲルだけの時と比べて、徐放効果が長時間続き、タンパク質徐放性ナノキャリアとして有用であることを明らかとした。

(2) ナノゲル核酸キャリアの設計と機能:

カチオン性（スペルミン置換）多糖ナノゲルはプラスミドと相互作用し効率よく複合体を形成した。そのトランスフェクション効率をルシフェラーゼ発現系により検討し、毒性の低い新規遺伝子キャリアとして機能することが明らかになった。また、CpGDNAによるIL12産生の増強やsiRNAによるRNA干渉においてもキャリアとしての有効性が認められた。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計12件）

- ① Toita S, Morimoto N, Akiyoshi K, Functional cycloamylose -based biomaterial: application in a gene delivery system, Biomacromolecules, 11, 397-401(2010), 査読有
- ② Hasegawa U, Sawada S, Shimizu T, Kishida T, Otsuji E, Mazda O, Akiyoshi K, Raspberry-Like Assembly of Cross-Linked Nanogels for Protein Delivery, J Controlled Release, 140, 312-317(2009), 査読有
- ③ Ozawa Y, Sawada S, Morimoto N, Akiyoshi K, Self -assembled nanogel of hydrophobized dendritic dextrin for protein delivery, Macromol Biosci, 9, 694-701(2009), 査読有
- ④ Ayame H, Morimoto N, Akiyoshi K, Self-assembled cationic nanogels for intracellular protein delivery system, Bioconjugate Chem, 19, 882-890(2008), 査読有
- ⑤ Shimizu T, Kishida T, Hasegawa U, Ueda Y, Imanishi J, Yamagishi H, Akiyoshi K, Otsuji E, Mazda O, Nanogel DDS enables sustained release of a cytokine for tumor immunotherapy. Biochem Biophys Res Commun, 367, 330-335(2008), 査読有

〔学会発表〕（計6件）

- ① K. Akiyoshi, Polysaccharide nanogel engineering for protein delivery system KIFEE workshop on environment, Energy and Materials, 2009年9月8日, Trondheim, Norway
- ② 秋吉一成、ナノゲル工学による新規 DDS の設計、第27回物性物理化学研究会「DDS と製剤基材の物性」、2009年6月19日、京都
- ③ K. Akiyoshi, Nanogel Engineering for Protein Delivery, 8th International Symposium on Frontiers in Biomedical Polymers, 2009年5月20日, Mishima,

Japan

- ④ 秋吉一成、ナノゲル工学による新規タンパク質 DDS の開発、慶応大学大学院薬学研究科 DDS・薬物動態クラスター・ドラッグデリバリー・薬物動態ミニシンポジウム、2009年5月12日、東京
- ⑤ 秋吉一成、癌免疫治療のためのナノゲル DDS、第67回日本癌学会学術総会、2008年10月29日、名古屋

〔図書〕（計2件）

- ① 下田麻子, 秋吉一成, 田畑泰彦 監修、メディカルドゥ、遺伝子医学 MOOK 別冊 ますます重要になる細胞周辺環境の最新科学技術、2009、77-80
- ② 秋吉一成, 岸田晶夫 監修、シーエムシー出版、次世代医療のための高分子材料工学、2008、238

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

秋吉 一成 (AKIYOSHI KAZUNARI)
東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・教授
研究者番号：90201285

(2) 研究分担者

松田 修 (MATSUDA OSAMU)
京都府立医科大学・医学研究科・教授
研究者番号：00271164
森本 展行 (MORIMOTO NOBUYUKI)
東北大学・工学研究科・准教授
研究者番号：00313263
渡辺 昭彦 (WATANABE AKIHIKO)

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・
助教

研究者番号：30126263

澤田 晋一 (SAWADA SHINICHI)

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・
助教

研究者番号：50444104

(3) 連携研究者

()

研究者番号：