

科学研費補助金研究成果報告書

平成24年 6月 11日現在

機関番号：84409

研究種目：新学術領域研究（研究課題提案型）

研究期間：2008～2010

課題番号：20200075

研究課題名（和文） 癌細胞の擬似的微生物化ツールの開発とワクチンへの応用

研究課題名（英文） Development of a useful tool adding a microbial component to tumor cell as vaccine adjuvant

研究代表者

赤澤 隆 (AKAZAWA TAKASHI)

地方独立行政法人 大阪府立病院機構 大阪府立成人病センター(研究所)・研究所・研究員

研究者番号：80359299

研究成果の概要（和文）：

がん免疫療法において強力なアジュバントの開発が期待されている。我々は、TLR2 リガンドであるマイコプラズマ由来リポペプチドの構造を基に、菌由来配列を機能配列に置換する、新しい創薬戦略（アジュバント・エンジニアリング）を考案した。本戦略において、付加機能を持つ人工 TLR2 リガンドの設計・評価を展開した結果、がん細胞微生物成分修飾ツールや免疫細胞標的化配列を持つリポペプチドなど、有用な合成アジュバントの開発に成功した。

研究成果の概要（英文）：

It is essential to develop effective immunoadjuvants for tumor immunotherapy. We created new adjuvants based on the structure of mycoplasmal lipopeptide, which is a toll-like receptor (TLR) 2 ligand. Adjuvant engineering, substituting a functional motif for bacterial origin sequence of lipopeptide, is our novel drug design strategy. We succeeded in development of useful synthetic adjuvants through the evaluation of new TLR2 ligands with additional functions such as targeting ability to immune cells or modification ability to tumor cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	7,000,000	2,100,000	9,100,000
2009年度	7,200,000	2,160,000	9,160,000
2010年度	7,200,000	2,160,000	9,160,000
年度			
年度			
総計	21,400,000	6,420,000	27,820,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理

キーワード：腫瘍，アジュバント，ワクチン

1. 研究開始当初の背景

癌患者に対してウシ結核菌弱毒化ワクチン株（BCG）の細胞骨格成分（Cell Wall Skeleton：CWS）を単独で定期的に皮内投与する免疫アジュバント療法が臨床の場で実施

されている。症例数も600人を超え、重篤な副作用はなく、良好な成績が挙げられている。申請者は、本治療法の科学的根拠を明確化する基礎研究を行ってきた。この作用メカニズムはBCG-CWSがトル様受容体（TLR）2及び

4 のリガンドであり、樹状細胞を定期的に成熟・活性化させることによって体内を監視させ、がん再発時に早急な応答を導くことにあると予想される。現在の免疫アジュバント療法は癌の再発防止など予防的な適用であるものの、癌抗原の適切な補充方法の開発、樹状細胞療法との組合せによって、がん治療への適用が期待できる。事実、申請者の研究で担がんマウス治療および予防モデルにおいて、BCG-CWS と不活化がん細胞の同時皮内投与により、in vivo のがん成長抑制効果を確認した。これまでの細胞・動物レベルでの研究成果や、既に当施設で臨床応用を進めている背景もあり、抗原補充を目的としたペプチドワクチン療法が強力なサポート・アジュバントとして、樹状細胞療法における樹状細胞の成熟・活性化剤としてなど、アジュバントの新たな臨床応用に、多方面から協力要請を受けていた。

2. 研究の目的

BCG-CWS は菌体から精製する巨大分子複合体であり、その複雑さゆえに、化学合成は困難である。また、複数の免疫活性化構造を持つと予想され、複合的かつ多様な免疫応答を誘導する。術後のがん患者さんに対しては低下した免疫力を総合的に底上げするなど、最適な効果が期待される。

しかしながら、化学合成可能な人工アジュバントが開発されたならば、菌体精製物・巨大分子複合体と比較して、純度・安定性・安定供給の面で、医薬品としてのアドバンテージがある。さらに作用機序の明確化により、機能設計や改良設計から、有効性の増強や副作用のコントロールも期待された。

そこで、申請者は化学合成可能で改良が容易な TLR リガンド構造としてマイコプラズマ由来マクロファージ活性化リポペプチド (MALP2) の基本骨格・Pam2Cys を選択した。リポペプチドは BCG-CWS と同じく TLR2 を刺激する。また、種々の知見から、アジュバント活性に有用な機能ペプチドを選定し、Pam2Cys 構造に結合させる (菌由来の配列を置換する) 生化学的創薬戦略 (アジュバント・エンジニアリング) を開始した (図 1)。

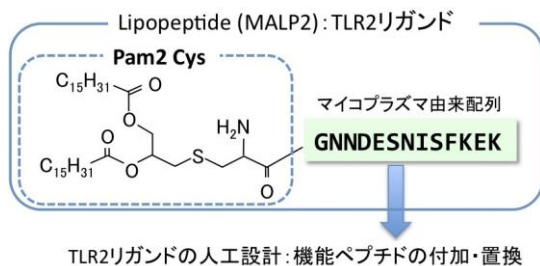


図 1 アジュバント・エンジニアリング戦略

3. 研究の方法

アジュバント・エンジニアリング・プロジェクトは本助成によって幅を広げ、候補化合物を選定する、開発研究へと展開した。

これまでに 10 機能コンセプトを選定後、それぞれ有用な配列を調査の上で、35 種の化合物 (リポペプチド) を設計し、in vitro、in vivo の活性を評価した。in vitro 活性としては、樹状細胞に対する IL12p40 誘導能と脾臓細胞に対する IFN γ 誘導能を、in vivo では C57BL6 マウスと E. G7-OVA 細胞の腫瘍移植モデルにおける抗がん効果を測定した。天然リポペプチド・MALP-2 および既報の人工リポペプチド・P2C-SK KKK と比較することで、その有用性を検証した。

4. 研究成果

(1) インテグリン配列により細胞接着性を高めた化合物 A (P2C-RGDS) (図 2)

本戦略の試作化合物として細胞接着能を高める目的でインテグリン結合配列 (RGDS) を組込んだ P2C-RGDS を設計し、評価を進めた。免疫細胞には種々のインテグリンが発現しており、より効果的に P2C-RGDS が免疫系を活性化し、抗がんアジュバント活性を増強することを目的とした。MALP-2 と比較して、効率的な樹状細胞活性化能と強力な抗がん効果を示す事を確認し、論文発表した。(発表論文 5)

化合物 A: Integrin binding (Cell adhesion)



図 2 インテグリン結合配列の応用

(2) 標的化配列による有効性の上昇と副作用回避を可能にした化合物 B (図 3)

インテグリンは免疫細胞のみならず上皮系や種々の細胞に発現しており、非特異的な細胞親和性を持つと考えた。そこで、より厳密に特定の免疫細胞を標的化可能な配列を利用したリポペプチドを開発し、評価した結果、既知の人工リポペプチド (P2C-SK KKK) と比較して優れた抗がん効果を示すとともに、ワクチンアジュバント投与部位に起こる過剰な炎症応答を回避可能な化合物 B を得る事に成功した。化合物 B は類似配列を含めた検討の後、特許出願した (特願 2012-076273)。

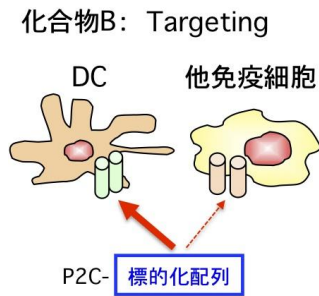


図3 免疫細胞標的化配列の応用

(3) IL12p40 の産生誘導を増強する化合物 C と IL12p40 および IFN γ の産生誘導を増強する化合物 CL (図4)

がん抗原・アジュバント複合体を考慮した際に、ビーズのような担体にこれらを結合させた複合体・集合体を形成させることで、より効果的なワクチンを作れると想定して、化合物Cを設計した。

本プロジェクトにおいて25化合物まで設計した段階で、MALP2やP2C-SK44と比較して、樹状細胞からのIL12p40産生を強力に誘導したのは化合物Cのみであった。想定した本来の機能とは異なるが、この免疫活性化能の違いは非常に興味深く、化合物Cをベースに改良型の化合物CLを作製した。化合物CLは樹状細胞からのIL12p40誘導が強く、同時に脾臓細胞からのIFN γ 誘導も強いものであった。抗がん免疫に密接に関わる両者のサイトカイン誘導活性が高い化合物はin vivo抗がん効果のさらなる増強が期待されるため、1年間の延長・繰越を申請した。しかしながら、化合物CLの持つ抗がん効果は化合物BやP2C-SK44と比較して強力ではなかったため、化合物C/CL開発を一時保留し、化合物B開発に注力した。

化合物C: 集合体形成サポート配列



図4 複合体・集合体形成能の応用

(4) がん細胞の微生物成分修飾ツールとして開発した化合物D (図5)

本申請課題のタイトルにあるがん細胞表面に微生物成分を付加するツールを開発し、疑似的微生物化がん細胞をワクチンとして調製

する、新たながん治療戦略を考案した。感染免疫に対する強力な免疫誘導を癌抗原に向けさせる事ができ、患者さんの癌細胞を用いる事で患者がもつ固有の癌抗原応答が期待される、まさにオーダーメイドワクチンが可能となる。

設計戦略として、化合物AのC末端にSH基フリーのシステインをつけたP2C-RGDSC、及び非特異的な細胞接着配列を有する化合物Dを作製した。P2C-RGDSCはpHに影響を及ぼすためか、in vitroの十分な活性が認められなかった。一方、化合物Dもin vitroでの活性は弱い物であったが、特定の治療方法では、既知のリポペプチドと同程度の抗がんアジュバント活性を示した。ここでは、移植がん細胞親株をX線照射によって不活性化し、この不活性化がん細胞と化合物Dを混合した(この配列は細胞表面に接着性があることも蛍光色素を用いた実験で確認している)。この化合物Dで修飾したがん細胞をワクチンとして使用した。しかしながら、投与部位にはP2C-SK44等で見られる皮膚局所炎症・壊死が認められた。手術後のがん患者さん由来のがん細胞を用いる事によってオーダーメイドワクチンが可能となるツールではあるが、皮膚応答が出る事を問題視し、この化合物の開発を一時保留した。

化合物D: 癌細胞微生物成分修飾ツール

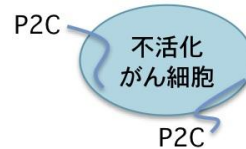


図5 接着・結合配列の応用

(5) まとめ

本研究課題・アジュバント・エンジニアリング戦略で10機能コンセプト35化合物を作製し、5種の興味深いオリジナル化合物を得ることができた(表1)。

本申請課題に掲げた、がん細胞の微生物成分修飾ツール(化合物D)の開発にも成功したが、同時に、ワクチン投与部位に起こる過剰な皮膚応答・壊死という副作用を改めて認識する事となった。化合物Dについては、治療プロトコルの改善などによって、より強力な治療効果を見出すことが、開発継続の判断ポイントになると考えている。

また、本課題内での改良・併行展開の中で、このワクチン投与部位の過剰な皮膚応答を回避可能で、既報の人工リポペプチドと同程度以上の有効性を示す化合物Bを開発することに成功した。本物質については、特許出願も

完了し、臨床応用に向けたさらなる開発研究を進めている。

評価項目		樹状細胞 IL12p40	脾臓細胞 IFN γ	治療効果	皮膚応答
天然	MALP2	+	+	+/-	無
人工	P2CSK4	+	++	++	壊死
独自	A (細胞接着)	+	+ / ++	++	壊死
独自	B (標的化)	+	++	+++	「無」
独自	C (集合体形成)	++	-	+/-	炎症
独自	CL (改良設計型)	++	++	+/-	炎症
独自	D (修飾ツール)	+	+/-	++	壊死

表1 独自設計5化合物のまとめ

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10件)

(1) Sawahata R, Shime H, Yamazaki S, Inoue N, Akazawa T, Fujimoto Y, Fukase K, Matsumoto M, Seya T. Failure of mycoplasma lipoprotein MALP-2 to induce NK cell activation through dendritic cell TLR2. *Microbes Infect.* 13(4): 350-8. 2011. 査読有

(2) Yabu M, Shime H, Hara H, Saito T, Matsumoto M, Seya T, Akazawa T, Inoue N. IL-23-dependent and -independent enhancement pathways of IL-17A production by lactic acid. *Int Immunol.* 23(1):29-41. 2011. 査読有

(3) Mito K, Sugiura K, Ueda K, Hori T, Akazawa T, Yamate J, Nakagawa H, Hatoya S, Inaba M, Inoue N, Ikehara S, Inaba T. IFN-gamma markedly cooperates with intratumoral dendritic cell vaccine in dog tumor models. *Cancer Res.* 70(18): 7093-101. 2010. 査読有

(4) Sugiura K, Wijewardana V, Fujimoto M, Akazawa T, Yahata M, Mito K, Hatoya S, Inoue N, Inaba T. Effect of IL-12 on canine dendritic cell maturation following differentiation induced by granulocyte-macrophage CSF and IL-4. *Vet Immunol Immunopathol.* 137(3-4):322-6. 2010. 査読有

(5) Akazawa T, Inoue N, Shime H, Kodama K, Matsumoto M, Seya T. Adjuvant engineering for cancer immunotherapy: Development of

a synthetic TLR2 ligand with increased cell adhesion. *Cancer Sci.* 101(7): 1596-603. 2010. 査読有 (corresponding author)

(6) Mimura Y, Takahashi K, Kawata K, Akazawa T, Inoue N. Two-step colocalization of MORC3 with PML nuclear bodies. *J Cell Sci.* 123(Pt 12):2014-24. 2010. 査読有

(7) Akao Y, Ebihara T, Masuda H, Saeki Y, Akazawa T, Hazeki K, Hazeki O, Matsumoto M, Seya T. Enhancement of antitumor natural killer cell activation by orally administered Spirulina extract in mice. *Cancer Sci.* 100(8):1494-501. 2009. 査読有

(8) Kodama K, Higashiyama M, Takami K, Oda K, Okami J, Maeda J, Akazawa T, Matsumoto M, Seya T, Wada M, Toyoshima K. Innate immune therapy with a Bacillus Calmette-Guerin cell wall skeleton after radical surgery for non-small cell lung cancer: a case-control study. *Surg Today.* 2009;39(3):194-200. 査読有

(9) Sugiura K, Akazawa T, Fujimoto M, Wijewardana V, Mito K, Hatoya S, Taketani S, Komori M, Inoue N, Inaba T. Construction of an expression vector for improved secretion of canine IL-18. *Vet Immunol Immunopathol.* 2008 Dec 15;126(3-4):388-91. 査読有

(10) Shime H, Yabu M, Akazawa T, Kodama K, Matsumoto M, Seya T, Inoue N. Tumor-secreted lactic acid promotes IL-23/IL-17 proinflammatory pathway. *J Immunol.* 2008 Jun 1;180(11):7175-83. 査読有

[学会発表] (計6件)

(1) Akazawa T, Inoue N. Adjuvant engineering for cancer immunotherapy: development of a synthetic TLR2 ligand with alternative functions. 第5回 国際ペプチドシンポジウム (ポスター). 2010年12月4-9日. 京都

(2) Akazawa T, Inoue N, Kodama K, Matsumoto M, Seya T. Adjuvant engineering for cancer immunotherapy: development of a synthetic TLR2 ligand with alternative functions. 第69回 日本癌学会 学術総会 (ポスター). 2010年9月22-24日. 大阪

(3) Akazawa T, Inoue N, Shime H, Kodama K, Matsumoto M, Seya T. Adjuvant engineering for cancer immunotherapy: development of a synthetic TLR2 ligand with additional function. 第14回 国際免疫学会(ポスター). 2010年8月22-27日. 神戸

(4) Akazawa T, Inoue N, Shime H, Kodama K, Matsumoto M, Seya T. A synthetic TLR2 ligand containing the RGD motif works as an effective adjuvant. 第68回 日本癌学会 学術総会 (ポスター). 2009年10月1-3日. 横浜

(5) 赤澤 隆. インテグリン結合モチーフを含む人工設計リポペプチドはトル様受容体2のリガンドとして機能し、効果的なアジュバント活性を持つ. 第13回 日本がん免疫学会 (一般口演). 2009年6月24-25日. 北九州

(6) Akazawa T, Inoue N, Matsumoto M, Seya T. Development of designed synthetic adjuvants based on structures of toll-like receptor ligands. 第67回 日本癌学会 学術総会 (ポスター). 2008年10月28-30日. 名古屋

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: 新規人工設計リポペプチド
発明者: 赤澤 隆, 井上 徳光
権利者: 大阪府立病院機構
種類: 特許
番号: 特願2012-076273
出願年月日: 平成24年3月29日
国内外の別: 国内

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

地方独立行政法人大阪府立病院機構
大阪府立成人病センター
<http://www.mc.pref.osaka.jp>

研究所
<http://www.mc.pref.osaka.jp/omc2/top.html>

分子遺伝学部門
<http://www.mc.pref.osaka.jp/omc2/genetics.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

赤澤 隆 (AKAZAWA TAKASHI)

地方独立行政法人 大阪府立病院機構 大阪府立成人病センター (研究所)・研究所・研究員

研究者番号: 80359299

(2) 研究分担者

該当者なし

(3) 連携研究者

井上 徳光 (INOUE NORIMITSU)

地方独立行政法人 大阪府立病院機構 大阪府立成人病センター (研究所)・研究所・部長

研究者番号: 80252708