

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2021

課題番号：20K20965

研究課題名（和文）がん微小環境をターゲットとするマイクロパーティクルを用いた新規がん治療法への挑戦

研究課題名（英文）Challenge to novel cancer treatment method using micro-particles targeting cancer microenvironment

研究代表者

中島 雄太（Nakashima, Yuta）

熊本大学・大学院先端科学研究部（工）・准教授

研究者番号：70574341

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、がんの新しい治療法を開発することを目的とし、がん組織の中に大量に存在する免疫細胞に微粒子を与えることによって強制的に免疫応答を生じさせ、がん組織内部から治療する方法を考案した。マウスの免疫細胞に対して微粒子を投与したところ、炎症反応が活性化する微粒子サイズがあることを明らかにした。この微粒子を免疫細胞に投与し、炎症反応により産生された物質を含む培養上清を回収してがん細胞に投与した。その結果、がん細胞に傷害を与えることを実証し、がんの新しい治療法につながることを示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

免疫細胞を用いてがんを弱体化あるいは消滅させることができれば、既存のがん治療法に比べて生体の損傷や医療被曝などの患者や生体の負担が少ない治療法となり、大きな社会的意義を持つ。また、本成果は、既存の治療法と組み合わせることによっても効果を発揮できるため、がん患者の死亡率減少に貢献できる。

研究成果の概要（英文）：This research objective is to develop the novel cancer treatment method. We have devised a cancer treatment method from the inside of cancer tissue by inducing a forced immune response by giving microparticles to the large number of immune cells that exist inside cancer tissue. In the result of the various size of microparticles were administered to mouse immune cells, the microparticle size of activating inflammatory response was clarified. The microparticles were administered to immune cells, and the culture supernatant containing the substance produced by the inflammatory response was collected and administered to cancer cells. As a result, we demonstrated the cancer cells were injured by produced substance from microparticles stimulated immune cells. This result suggests that this technique will become to novel cancer therapy method.

研究分野：バイオメディカルエンジニアリング

キーワード：がん治療 マイクロパーティクル 免疫応答

### 1. 研究開始当初の背景

日本人にとってのがんは国民病と言うべき病であると共に、世界的にも大きな課題である。効果的ながん治療の実現は日本のみならず世界中で期待される課題の一つである。がんの治療においては、主として3大療法と呼ばれる外科(手術)療法、放射線療法、化学療法が用いられている。これらの治療法は現在のがん治療を支える重要な手法であるが、臓器の切除による体の損傷や臓器機能の喪失や、X線などの放射線照射による医療被曝、抗がん剤投与による健康被害など、副作用による患者の負担が大きい点が課題である。これらの課題を克服するため、免疫系をターゲットとしてがんを治療する技術(免疫療法)の確立が期待されてきたが、免疫系を使ったがんの治療には懐疑的な視線が送られてきた。しかし、がん細胞による免疫システム抑制を阻害し、抗腫瘍免疫を高めるがん免疫チェックポイント阻害剤が開発され、がん免疫系との関係に再び注目が集まっている。

一方、種々のがん組織の中には免疫細胞が大量に浸潤していることが明らかにされており、がん組織内ではがんの微小環境を整えて、がんの増殖・維持・浸潤をサポートすることが明らかにされている。がん組織内の免疫細胞に効果的な免疫応答を起こすことができる技術を構築し、自己の免疫系でがんを治療することができれば、生体損傷や副作用を軽減し、負担の少ないがん治療法を確立することができる。

我々はこれまでに、人工関節から発生する摩耗粉が生体に及ぼす影響に関する研究に取組み、人工関節から発生する摩耗粉を免疫細胞が貪食した際、サイズに伴って免疫応答の仕方が変わることを突き止めた。これは、免疫細胞に意図的に任意のサイズの微粒子を与えることによって、免疫応答をコントロールできることを証明した知見であり、本研究を推進するための基礎的知見となった。

### 2. 研究の目的

本研究では、がんの組織内に大量に浸潤し、がん組織に取込まれた免疫細胞の失われた機能を再起させることによって、新たながん治療を実現することを目的とする。具体的には、免疫細胞の一種であるマクロファージへの微粒子の投与により、免疫応答をコントロールし、がん組織の内部からがんを弱体化・消滅させる技術の開発を目指す。本計画を実現するために、まずは、マクロファージに微粒子を与え、貪食させた際の免疫応答の検証と最適化を行う。そして、免疫応答により産生された物質を基に、がん細胞を弱体化・消滅できることを実証する。

### 3. 研究の方法

本研究では、免疫細胞としてマウスの単球性白血病由来の細胞(RAW264)を用い、がん細胞としてマウスのルイス肺がん由来細胞(LLC)を用いた。また、ヒトへの適応を見据え、ヒトの末梢血から単離したヒト末梢血由来初代マクロファージ(HMDM)を用いた検証も行った。また、微粒子として形状の整った直径0.16 μm、0.43 μm、0.8 μm、1.6 μm、5.6 μmのPMMA(Polymethyl methacrylate)粒子を用いて検証を行った。実験の手順を図1に示す。まず、粒子サイズに応じて免疫応答が変わることを明らかにするために、12ウェルプレート上にRAW264を培養し、直径の異なるPMMA粒子をそれぞれ投与し24時間培養した。その後、培養上清を回収しELISA(酵素結合免疫吸着検査法)を用いて免疫細胞が産生したサイトカインを評価した。この際、ポジティブコントロールとして粒子の代わりにLPS(リポポリサッカライド)を使用し、免疫応答を強制的に惹起した。また、同時に粒子の投与量とRAW264の生存状態を評価した。

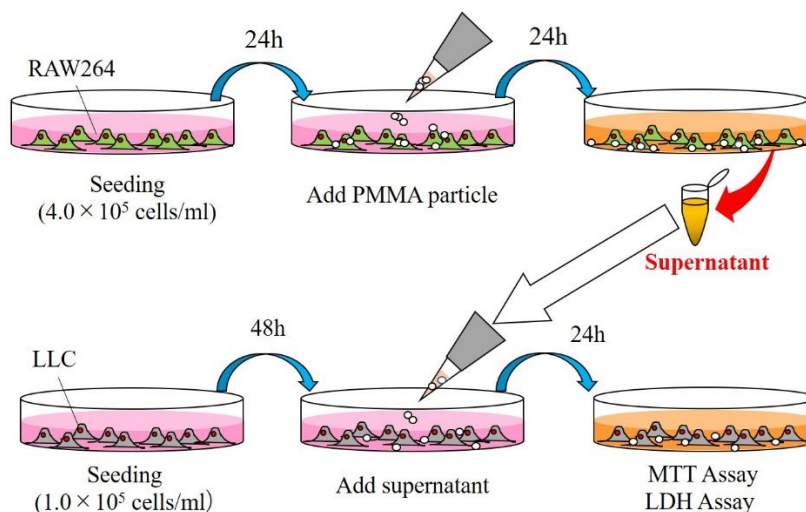


図1 実験の手順

次に、免疫応答を用いることによってがん細胞を減縮できることを実証するために、粒子を与えて培養した RAW264 の培養上清をがん細胞に添加した。この際のがん細胞の生存率を MTT アッセイにより評価し、細胞毒性を LDH アッセイにより評価した。さらに、LIVE-DEAD 蛍光試薬を用いることにより生細胞と死細胞の蛍光染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡を用いてがん細胞の生死判別を行った。これらの評価により、免疫応答ががん細胞に与える影響を評価した。

#### 4. 研究成果

(1) RAW264 に PMMA 粒子を与え、24 時間培養した際の RAW264 の様子を図 1 に示す。C はコントロール実験の結果であり、PMMA 粒子を投与していない場合の RAW264 の様子である。PMMA 粒子を投与した場合、細胞が、PMMA 粒子を細胞体の中に取込む様子が観察され、どのサイズの PMMA 粒子でも細胞体全体を満たすように取り込むことがわかった。本結果は、ヒト末梢血由来の HMDM でも同様の結果が得られ、由来の違いによる細胞体への取り込み方に違いがないことを確認した。図 2 にサイズの異なる PMMA 粒子を貪食した際の RAW264 の生存率を示す。5 種類の直径を持つ微粒子を用いたが、いずれのサイズの PMMA を用いた場合でも、生存率は 90% 以上を保持しており粒子サイズの違いが細胞の死滅に影響しないことを示した。

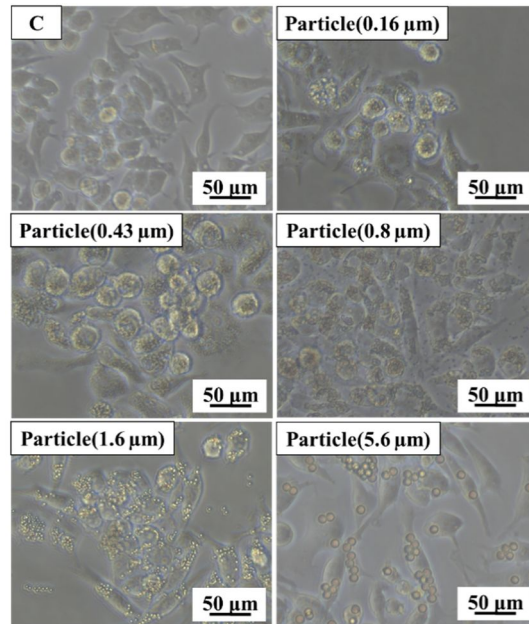


図 1 PMMA 粒子を与えて培養した免疫細胞

(2) 次に、サイズの異なる PMMA 粒子を貪食した RAW264 の免疫応答評価として、培地中に産生される TNF- $\alpha$  を評価した(図 3)。通常の培地を用いて培養した際 (NC) の RAW264 は、TNF- $\alpha$  の産生量が 0 であることにに対し、PMMA 粒子を貪食した RAW264 は全ての条件で TNF- $\alpha$  を産生した。特に、0.43  $\mu\text{m}$  粒子を投与した RAW264 は 1.6  $\mu\text{m}$  粒子を投与した場合の約 2.5 倍、5.6  $\mu\text{m}$  粒子を投与した場合の約 6 倍の産生量であった。本実験より、マウス由来の免疫細胞は、直径が 0.43  $\mu\text{m}$  近傍の粒子に高い免疫反応を起こし、炎症性を示すことを明らかにした。

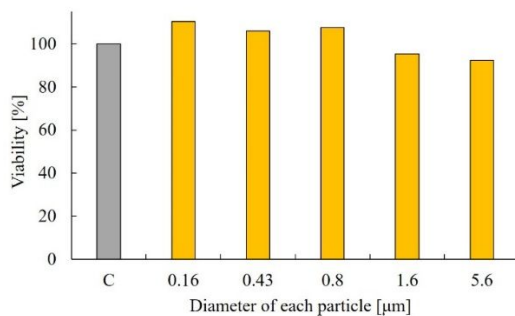


図 2 PMMA 粒子を与えて培養した免疫細胞の生存率

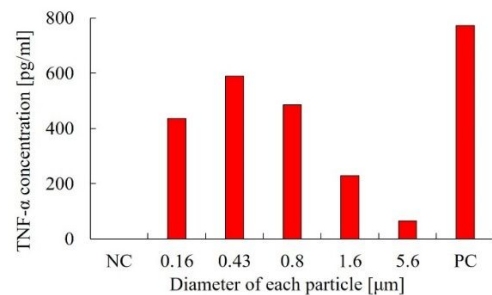


図 3 PMMA 粒子径の投与により培地中に産生された TNF- $\alpha$  の量

(3) さらに、炎症性サイトカインによりがん細胞を傷害できることを実証するために、最も高い免疫反応を起こした 0.43  $\mu\text{m}$  の PMMA 粒子を与えて培養した RAW264 の上清をがん細胞に添加し、細胞への傷害性を評価した(図 4)。本実験では、コントロール(C)として通常培養した RAW264 の上清を投与した LLC を、ポジティブコントロール(PC)として、炎症反応を促す成分である LPS を RAW264 に添加して培養した RAW264 の上清を投与した LLC を用いた。その結果、0.43  $\mu\text{m}$  の PMMA 粒子を投与された RAW264 の上清により、C 実験と比べ、LLC は有意に傷害されることを実証した。また、画像的に細胞の生死を評価するために、共焦点レーザー顕微鏡を用いて生死細胞の蛍光観察を行った(図 7)。C の上清を添加して培養した LLC は多くの細胞が生存しており、死細胞はほとんど確認されなかった。一方、0.43  $\mu\text{m}$  の PMMA 粒子を投与した RAW264 の上清を添加して培養した LLC は、半数程度は生存しているものの死細胞が増加し、傷害されていることを示した。これらの結果より、PMMA 粒子で免疫細胞の免疫応答を活性化させることが可能であり、この方法を用いることによってがん細胞を傷害しがんの治療に寄与できることが示唆された。

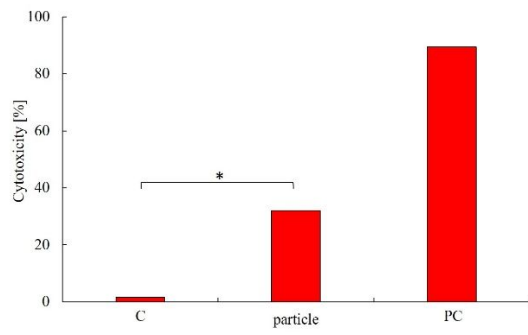


図4 がん細胞の毒性評価

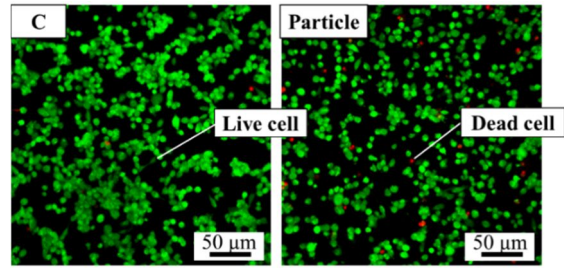


図5 生細胞と死細胞

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 瀧上斗誠、長野雅也、西東洋一、藤原章雄、中西義孝、中島雄太
2. 発表標題 PMMA粒子を貪食したマクロファージの生存・応答評価及びがん細胞への影響
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 瀧上斗誠、長野雅也、西東洋一、藤原章雄、中西義孝、中島雄太
2. 発表標題 マイクロプラスチックが免疫細胞に与える毒性の評価
3. 学会等名 第32回バイオフィロンティア講演会講演
4. 発表年 2022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
---------	---------