

令和 5 年 5 月 9 日現在

機関番号：27101

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19925

研究課題名（和文）核酸刺激を利用したがん細胞の表層着せ替え技術の構築

研究課題名（英文）Development of dress-up technology for cancer cell surface by stimulation with nucleic acids

研究代表者

望月 慎一（Shinichi, Mochizuki）

北九州市立大学・国際環境工学部・准教授

研究者番号：10520702

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）：ヒアルロン酸（HA）のカルボキシル基にアミノ基を修飾し、それを足場として1本鎖RNA（オリゴシチジル酸：rC40）を修飾させた（HA-rC40）。アミノ基の修飾率はカルボキシル基に対して6%程度であったが、ほぼその全てにrC40を結合させることが出来た。多角度光散乱を用いてキャラクタリゼーションを行ったところ、rC40を修飾してもHAの形態はほとんど変化していないことが分かり、その後の受容体（CD44）への結合も影響ないことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでのがんワクチン効果の向上のための研究は基本的には免疫細胞（抗原提示細胞）をコントロールすることにしか目が向けられていない。本申請の様ながん細胞に刺激を与えるような核酸（siRNAとは異なる二重鎖RNA）を送達させることで細胞の表層を改変させ（MHCクラスI分子を発現させ）、CTL活性の向上を試みる報告例はない。その中で、本提案の抗原性改変技術はがんワクチンに対する新たな戦略の一つになり得ると確信している。

研究成果の概要（英文）：After modification of carboxylic groups on hyaluronic acid (HA) with amino groups, single-stranded RNA (oligo cytidylic acid; rC40) was modified there. Although the modification rate of amino groups toward carboxylic groups was about 6%, all the amino groups were bound to rC40. From analysis with multi-angle light scattering, we found that the conformation of HA was maintained after modification of rC40, suggesting the resultant conjugates bind to the receptor CD44.

研究分野：生体高分子科学

キーワード：薬物動態システム がんワクチン 抗原提示 核酸センサー ヒアルロン酸

## 1. 研究開始当初の背景

免疫とは感染症ウイルスや病原性を持つ細菌等、侵入してくる外敵に対して働く生体防御機構である。この防御機構をがん治療に応用したのが、がんワクチンである。がん細胞はワクチンを投与することで誘導された細胞傷害性 T 細胞 (CTL) に認識され攻撃を受ける。しかし、「がん細胞」は CTL を克服するために進化する。その方法が「MHC クラス I 分子」の発現抑制である。CTL はがん細胞上の MHC クラス I 分子に提示されているがん抗原を目印に攻撃を行うが、MHC クラス I 分子の発現が抑制されると、もはや CTL は目印を失い攻撃できなくなってしまう (図 1 左)。近年、がんワクチン療法は免疫抑制 (ブレーキ) を解除するチェックポイント阻害剤が実用化され、新しい治療ステージに入りつつあるが、それでも奏効率は 3 割程度とされる。その原因の 1 つはこの MHC クラス I 分子発現抑制が起因している。そこで、がんワクチンの効果を向上させるためには、がん細胞の抗原提示を介した CTL 活性の回復技術の開発が求められている。

## 2. 研究の目的

申請者はナノテクノロジー、材料化学、免疫学を融合させた研究を通して、CTL にがん細胞を再び敵であると認識させるための細胞表層着せ替え技術の開発を目指す。がん細胞の細胞表層着せ替えとはどういうことか？がん細胞は MHC クラス I 分子の発現を抑制しているが、決して遺伝子が欠損しているわけではない。遺伝子発現を促すような刺激を入れることが出来れば再び MHC クラス I 分子が発現、次いで抗原が提示されるようになる。そこで、細胞内の様々な核酸を認識するタンパク質 (核酸センサー) に着目した。中でも二重鎖 RNA を認識する Toll 様受容体 3 (TLR3) はインターフェロン (IFN) 応答を誘導し、細胞はその刺激により MHC クラス I 分子の発現を増大させることが知られている。がん細胞への二重鎖 RNA (dsRNA) 送達分子 (キャリア) としてヒアルロン酸 (HA) に着目した。がん細胞表面には HA 受容体の 1 つである CD44 が過剰に発現しているため、本研究では、dsRNA 修飾 HA (HA-dsRNA) を作製、その詳細なキャラクター化を行いながらがん細胞の表層着せ替え (MHC クラス I 分子の発現誘導) を行い、CTL 活性の回復を目指す (図 1 右)。

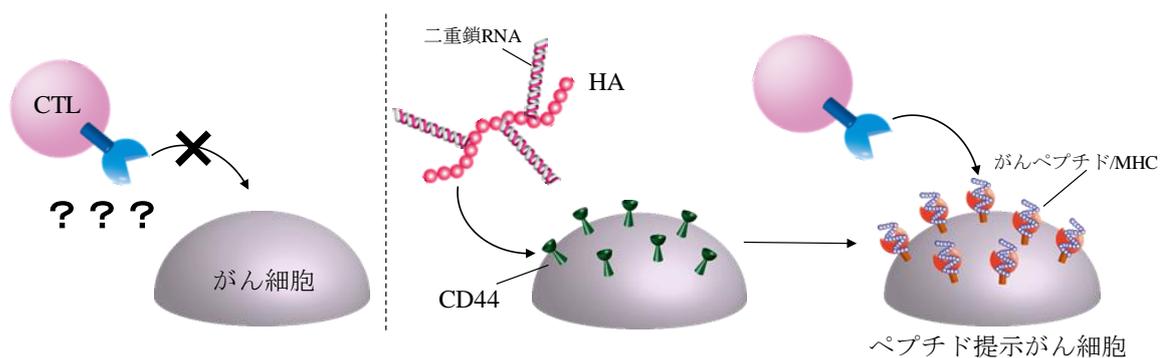


図 1、MHC クラス I 分子を発現していないがん細胞に対しては、CTL は攻撃できないが (左)、二重鎖 RNA 刺激により MHC クラス I 分子及びペプチド提示が可能になると攻撃が回復する (右)

## 3. 研究の方法

### (1) 二重鎖 RNA 刺激による MHC クラス I 分子の誘導

マウスメラノーマ細胞の B16F10 細胞を 48-ウェルプレートに  $1.0 \times 10^4$  cells で播種し、24 時間培養した。二重鎖 RNA であるポリイノシン酸-ポリシチジル酸 (poly I:C) を  $100 \mu\text{g/ml}$  で添加し、 $37^\circ\text{C}$  で 24 時間培養した。PBS で細胞を 3 回洗浄後、PE 修飾抗 MHC-class I (H-2K<sup>b</sup>) 抗体で染色を行い、蛍光顕微鏡観察を行った。

### (2) 分子量の異なる HA の調製

分子量 ( $M_w$ ) が  $1.0 \times 10^6$  の HA を超音波ホモジナイザーを用いて分子量の異なる HA の調製を行った。 $0.5 \text{ mg/mL}$  に調製した HA 溶液  $40 \text{ mL}$  を超音波 (QSONICA Q700) 処理 (5 分、10 分) し、ゲルろ過クロマトグラフィー (GPC) を用いて分子量測定を行った。分子量測定は多角度光散乱により絶対分子量を算出した。

### (3) HA-oligo-C コンジュゲート体の作製 (図 2)

本研究では二重鎖 RNA としてオリゴシチジル酸 (oligo-C) とポリイノシン酸 (poly I) から成る二重鎖 RNA を利用することにした。そこで、HA に対して oligo C の化学結合を試みた。HA のグルクロン酸のカルボキシ基に 1,3-ジアミノプロパンと反応させ、一級アミンを導入した。導入したアミノ基に対して今度は N-(6-maleimidocaproyloxy)succinimide (EMCS) を反応させ、マレイミド基を導入した。ここまでの反応の進行は  $^1\text{H-NMR}$  で確認し、導入率の算出も行った。マレイミド導入 HA に対し、チオール基修飾した oligo-C と混合させ、GPC で藩王を評価した。

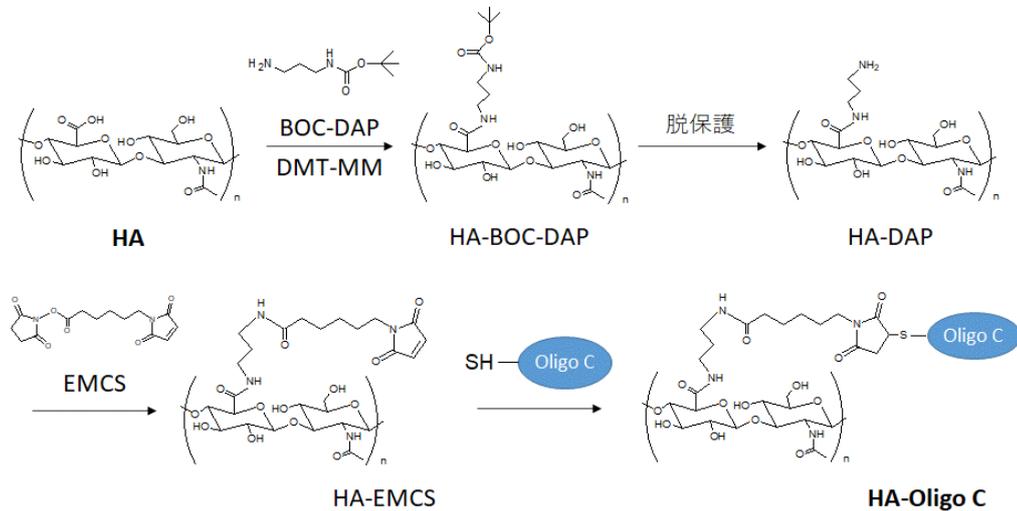


図 2、HA-oligo-C の作製

#### 4. 研究成果

##### (1) 二重鎖 RNA 刺激による MHC クラス I 分子の誘導

B16F10 細胞を PE 修飾抗 H-2K<sup>b</sup> 抗体で染色しても蛍光は観察されなかったことより、B16F10 細胞は MHC クラス I 分子を全く発現していないことが分かった。これに対し、poly I:C 刺激した細胞を染色すると、赤色の蛍光が色濃く観察された (図 3)。これより、B16F10 細胞が二重鎖 RNA に応答して (IFN- $\gamma$  が産生し)、MHC クラス I 分子の発現が誘導されることが分かった。

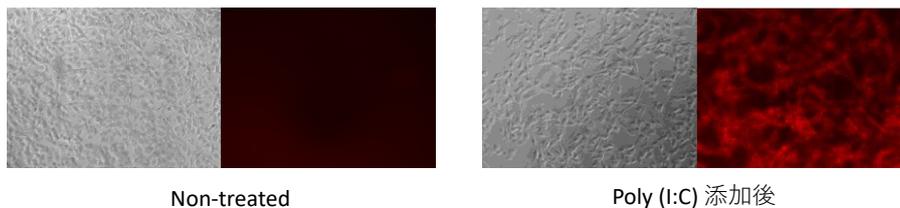


図 3、poly I:C 刺激有無での MHC クラス I 分子 (H-2K<sup>b</sup>) 染色。刺激無 (左)、刺激有 (右)

本研究では、poly I に対し oligo-C をハイブリダイゼーションさせて刺激を行うことになるが、ポリマー同士ではなく、ポリマーとオリゴ核酸から成る二重鎖 RNA でも同様に刺激が行えるかどうか検討した。poly I とオリゴシチジル酸 40mer (rC40) をアニーリングさせ、同様に B16F10 細胞に添加し、24 時間後に PE 修飾抗 H-2K<sup>b</sup> 抗体で染色し、蛍光顕微鏡観察を行った。rC40 と poly I から成る二重鎖 (rC40/poly I) 刺激においても細胞は抗体で染色されたことから、オリゴ核酸を用いた二重鎖でも細胞に刺激可能であることが分かった (図 4)。これより、本研究の基本コンセプトである二重鎖 RNA 刺激による MHC クラス I 分子の発現誘導が可能であることが分かった。

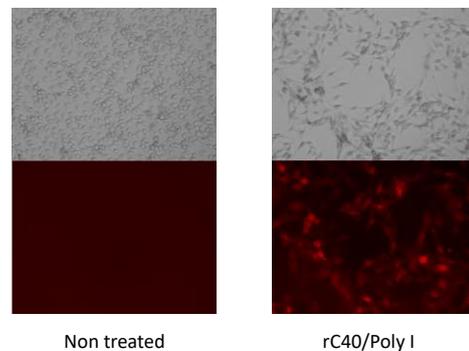


図 4、(rC40/poly I) 刺激有無での MHC クラス I 分子 (H-2K<sup>b</sup>) 染色。刺激無 (左)、刺激有 (右)

##### (2) 分子量の異なる HA の調製

購入した HA は分子量が  $1.0 \times 10^6$  と、非常に大きく水に溶解させると粘性が高い状態にある。このまま反応を行うと、効率が悪い上に最終的に poly I と二重鎖を組み合わせると分子間架橋によりさらに大きな分子に成り兼ねない。そこで、超音波処理により適度な大きさの HA を得ることをまず試みた。超音波処理 5 min と 10 min 後のサンプルに関して GPC 測定を行い、HA の分子量と大きさの関係を調べた。

図 5 に超音波処理時間毎の GPC 測定結果を示す。HA は UV 吸収がないため、屈折率増分の変化から大きさを見積もった。超音波処理前のクロマトグラムはピークが複数観察され、分子量分布の大きなサンプルであることが分かる (図 5 左)。超音波処理を行うと、時間依存的に溶出時間が遅くなった。これより、HA の大きさが徐々に小さくなっていることが分かった。さらにクロマトのピークが一つになり、分子量のそろったサンプルが調製されていることも分かった。さらに詳細な解析を行うため、分子量と慣性半径の両対数プロットから成るコンフォメーション

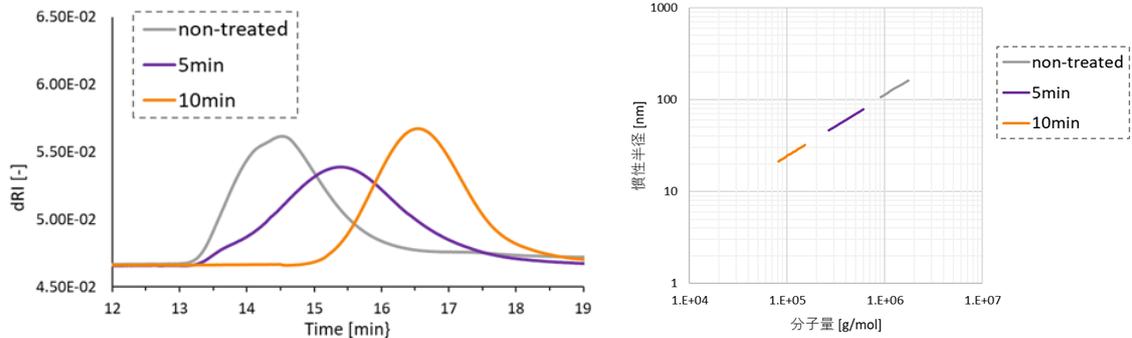


図5、超音波処理前後の GPC クロマトグラム (左) とコンフォメーションプロット (右)

ンプロットより、HA の形状を評価した。超音波処理の時間を長くすることで、徐々に分子量が小さくなっているのがよく分かる。また、未処理、10分処理、5分処理のプロットが全て一直線上に並んでいることより、形状を維持したまま分子量が小さくなっていることが分かった。直線の傾きから分子の形状が推察されるわけだが、今回、傾きが約 0.6 であったことより HA は分解前後でランダムコイル状の分子であることが分かった。

### (3) HA-oligo-C コンジュゲート体の作製

HA のカルボキシ基に対し 1,3-ジアミノプロパンを反応させた後、<sup>1</sup>H-NMR により算出したところ、修飾率は 7% (HA1 分子当たりアミノ基が 22 分子修飾) であり、仕込み比に対してほぼ 100%の効率で反応が進んでいることが分かった。HA のカルボキシ基にアミノ基を修飾すればするほど HA の CD44 に対する認識が弱くなると考えられるため、アミノ基の修飾率は 10%程度が適度と考えられる。続いて、導入されたアミノ基に対し、EMCS を 30 当量添加し 24 時間後に透析・凍結乾燥を行い、<sup>1</sup>H-NMR により EMCS の導入率を算出した。HA のアセチル基の水素とマレイミド基の水素の比から (図 6)、全てのアミノ基に対し EMCS が導入されていることが分かった。

導入されたマレイミド基に対して oligo-C を 1 当量添加し、24 時間後に GPC 測定を行った。40mer の oligo-C (rC40) には 260 nm の UV 吸収があるため、rC40 のピークの変化から反応の進行を評価した。rC40 は 19.5 分付近にピークが見られるが、マレイミド基導入 HA と反応させた後にはその溶出時間が 16 分前後と早くなっていた (図 7)。これは、高分子量の HA と反応したためだということが分かる。また、未反応の rC40 はほとんど見られないことより、全ての rC40

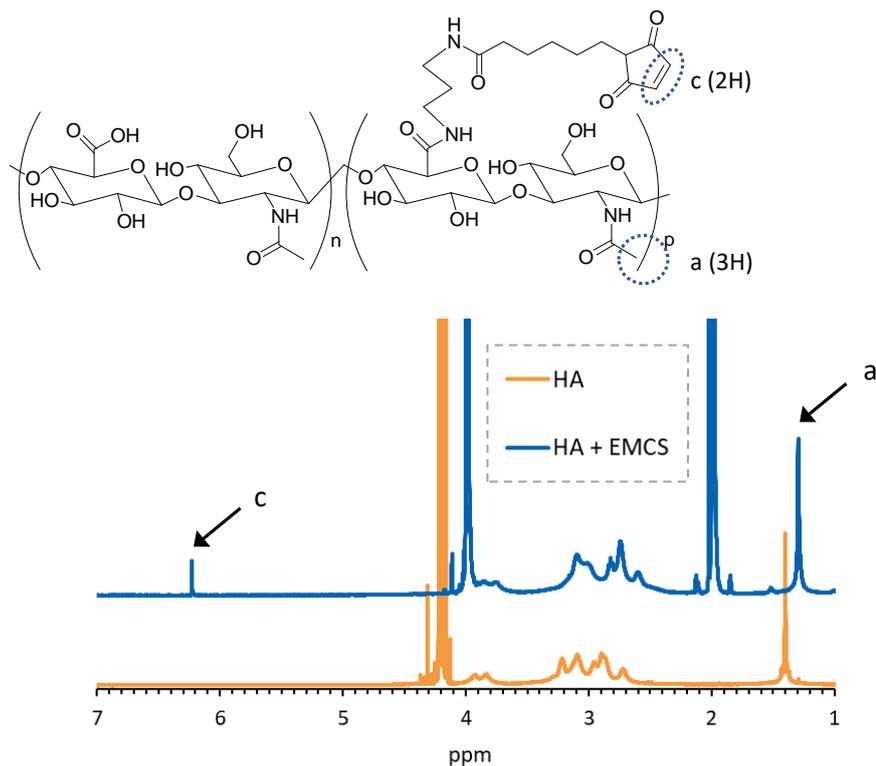


図6、HA-EMCS の <sup>1</sup>H-NMR

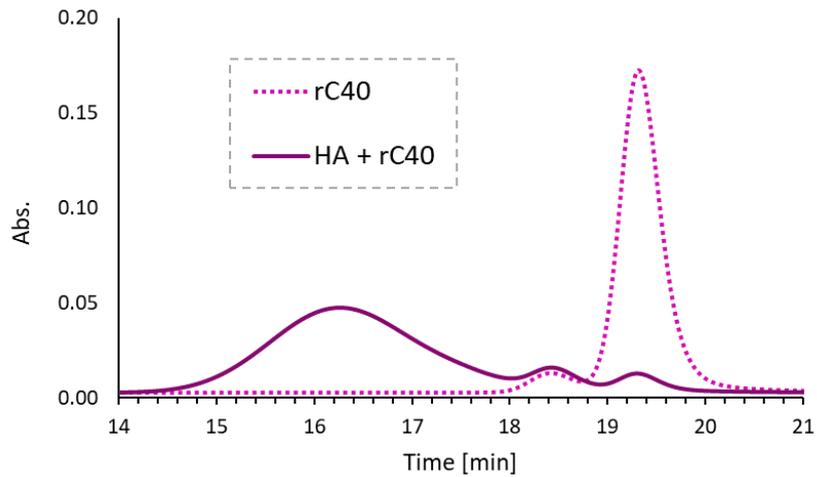


図7、マレイミド基導入 HA と rC40 反応前後の UV (260 nm) クロマトグラム

が HA と結合していることも分かった。これより、HA1 分子当たり 22 個の rC40 を結合させた新規コンジュゲート体の作製に成功した。また、コンフォメーションプロット解析より、rC40 結合後も図5に見られたのと同様の傾きを示し、分子量のみが増大しているのを確認した。これより、rC40 修飾後の HA も CD44 に対する被認識能は変化していないことが強く示唆される。

今後は、作製した本コンジュゲート体に対して poly I をアニーリングさせ、がん細胞に対する MHC クラス I 分子発現誘導が可能かどうか検討予定である。また、これまで負電荷を多く持つ HA と核酸から成る複合体の作製の例はほとんどなく、HA にアミノ基を導入して静電相互作用を利用した複合体が数例報告されている程度である。そんな中で静電反発し兼ねない高分子同士を化学結合させたコンジュゲート体を作製できたのは、今後の高分子化学に対して新しい知見をもたらすと考えられる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Tsuji Reika, Ogata Soichi, Mochizuki Shinichi	4. 巻 121
2. 論文標題 Interaction between CD44 and highly condensed hyaluronic acid through crosslinking with proteins	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bioorganic Chemistry	6. 最初と最後の頁 105666 ~ 105666
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bioorg.2022.105666	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Mochizuki Shinichi, Miyamoto Noriko, Sakurai Kazuo	4. 巻 42
2. 論文標題 Oligonucleotide delivery to antigen presenting cells by using schizophyllan	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Drug Metabolism and Pharmacokinetics	6. 最初と最後の頁 100434 ~ 100434
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.dmpk.2021.100434	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Irie Hitomi, Morita Koji, Matsuda Miyu, Koizumi Makoto, Mochizuki Shinichi	4. 巻 34
2. 論文標題 Tyrosinase-Related Protein2 Peptide with Replacement of N-Terminus Residue by Cysteine Binds to H-2K <sup>b</sup> and Induces Antigen-Specific Cytotoxic T Lymphocytes after Conjugation with CpG-DNA	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Bioconjugate Chemistry	6. 最初と最後の頁 433 ~ 442
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.bioconjchem.2c00592	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 Yoshihara Erika, Nabil Ahmed, Mochizuki Shinichi, Iijima Michihiro, Ebara Mitsuhiro	4. 巻 14
2. 論文標題 Preparation of Temperature-Responsive Antibody?Nanoparticles by RAFT-Mediated Grafting from Polymerization	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Polymers	6. 最初と最後の頁 4584 ~ 4584
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/polym14214584	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sumiya Kazuki、Izumi Hiroto、Adachi Yoshiyuki、Mochizuki Shinichi、Sakurai Kazuo	4. 巻 523
2. 論文標題 Binding assay of human Dectin-1 variants for DNA/ $\beta$ -glucan complex for active-targeting delivery of antisense DNA: Part II	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Carbohydrate Research	6. 最初と最後の頁 108731 ~ 108731
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.carres.2022.108731	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18件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Shinichi Mochizuki
2. 発表標題 Enhancement of cancer vaccine by modification of antigenicity for cancer cells
3. 学会等名 Pacifichem 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Miyu Matsuda, Hitomo Irie, Shinichi Mochizuki
2. 発表標題 Induction of potent cellular immunity by adjuvant nucleic acid-antigen peptide conjugates
3. 学会等名 Pacifichem 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Fuyu Yamamoto, Masashi Umeda, Shinichi Mochizuki
2. 発表標題 Induction of the antigen presentation for cancer cells using immune response by double-stranded RNA
3. 学会等名 Pacifichem 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山本芙優、梅田将史、望月慎一
2. 発表標題 がん抗原の提示誘導に向けたヒアルロン酸 - 二重鎖RNAコンジュゲート体の作製
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 緒方聡一、辻玲佳、望月慎一
2. 発表標題 がん細胞の抗原性改変を目指したヒアルロン酸-抗原タンパク質コンジュゲート体の作製
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 松田美悠、入江瞳、望月慎一
2. 発表標題 CpG核酸-抗原ペプチドコンジュゲートによる免疫誘導
3. 学会等名 日本核酸医薬学会第6回年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 辻玲佳、緒方聡一、望月慎一
2. 発表標題 がん細胞の抗原性向上を目指したタンパク質修飾ヒアルロン酸の作製
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 松田美悠、入江瞳、望月慎一
2. 発表標題 アジュバント核酸 - 抗原ペプチドコンジュゲートの作製及び免疫誘導
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 山本美優、望月慎一
2. 発表標題 二重鎖RNAによる免疫応答を利用したがん抗原提示誘導
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 望月慎一、緒方聡一
2. 発表標題 がんワクチン効果向上のための細胞抗原性改変システムの開発
3. 学会等名 第51回医用高分子シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松田美悠、望月慎一
2. 発表標題 アジュバント核酸を用いたがん抗原モデルに対する免疫誘導
3. 学会等名 第51回医用高分子シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 緒方聡一、望月慎一
2. 発表標題 がん細胞への抗原提示誘導を目指したHA-OVAコンジュゲート体の作製
3. 学会等名 第51回医用高分子シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岸本拓真、白石貢一、望月慎一
2. 発表標題 抗原抗体反応から見えてくるポリエチレングリコール分子集合体
3. 学会等名 第71回高分子討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 ホアンクオッククーン、山本英優、望月慎一
2. 発表標題 がん細胞の抗原提示誘導を目的としたヒアルロン酸による核酸送達技術の開発
3. 学会等名 第71回高分子討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 緒方聡一、望月慎一
2. 発表標題 がん細胞への外来抗原提示誘導を目指したHA-OVAコンジュゲート体の作製
3. 学会等名 第71回高分子討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 望月慎一、緒方聡一
2. 発表標題 ヒアルロン酸 - 抗原たんぱく質コンジュゲート体によるがん細胞の抗原性改変技術の開発
3. 学会等名 第44回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松田美悠、望月慎一
2. 発表標題 自己集合理化CpG-DNAを用いたがん抗原モデルに対する免疫誘導
3. 学会等名 第44回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 緒方聡一、望月慎一
2. 発表標題 CTL活性の向上を目指したがん細胞への外来抗原送達システムの開発
3. 学会等名 第44回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

北九州市立大学 望月研究室HP  
<https://www.mochizuki-lab.jp/>  
 北九州市立大学 教員紹介(望月)  
<https://www.kitakyu-u.ac.jp/env/faculty/d-life/introduction/shinichi-mochizuki.html>

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