

令和 6 年 5 月 30 日現在

機関番号：32682

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19930

研究課題名（和文）免疫系に働きかけるバイオセラミックスの機能発現機序の解明

研究課題名（英文）Clarification of Mechanism of Functional Expression of Bioceramics Acting on an Immune System

研究代表者

相澤 守（AIZAWA, MAMORU）

明治大学・理工学部・専任教授

研究者番号：10255713

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）：近年、がんの治療法として患者自身の免疫細胞を体外で培養・活性化し、再び患者体内に戻すことによってがんを治療する「養子免疫療法」が注目されている。我々は養子免疫療法に有用なバイオマテリアルの創製を目的とし、これまでに反応焼結法を用いてホウ素含有アパタイトを合成し、その免疫賦活効果を明らかにしている。本研究では、BApの作製方法を見直し、その条件で作製したセラミックス上にマウス由来脾臓細胞を播種し、その BAp セラミックスに対する免疫細胞の応答性を評価した。また、担がんマウスに BAp セラミックスによって活性化させた免疫細胞をマウスに投与して抗腫瘍効果を検証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体機能の一部あるいは全部を代替する目的で開発されている「バイオマテリアル」は人工材料であるため、免疫による拒絶がほとんど生じないことがメリットの一つである。しかしながら、細胞と接触する材料表面を巧みに設計することにより、材料が積極的に免疫系に働きかけ、免疫細胞を活性化することができれば、現在がんの治療法として注目されている「養子免疫療法」に新機軸を提案できる。バイオマテリアルという人工材料を主軸に据え、その表面での免疫細胞との相互作用により免疫賦活効果を発現・制御する試みは、社会的にも意義のある挑戦的な研究であると考えている。

研究成果の概要（英文）：Recently, adoptive immunotherapy, in which the patient's own immune cells are cultured and activated outside the body and returned to the patient's body, has attracted attention as a cancer treatment method. We have synthesized boron-containing apatite (BAp) using a reaction sintering method to create biomaterials useful for adoptive immunotherapy, and have clarified its immunostimulating effect. In this study, we modified the preparation method of BAp, seeded mouse-derived spleen cells on the ceramics prepared under the conditions, and evaluated the response of immune cells to the BAp ceramics. In addition, the anti-tumor effect of the BAp ceramics was verified by administering immune cells activated by the BAp ceramics to the mice.

研究分野：生体材料学

キーワード：バイオセラミックス バイオマテリアル 免疫細胞 抗腫瘍効果 イムノセラミックス

## 免疫系に働きかけるバイオセラミックスの機能発現機序の解明

## 1. 研究開始当初の背景

現在、日本の死亡率の第一位は悪性新生物（がん）である。がんの治療法として、外科療法、放射線療法、化学療法といった三大療法があるが、生体機能の損失や副作用による生活の質の低下が課題となっている。そこで、近年、「免疫療法」が注目されている。免疫療法の一つである養子免疫療法は、患者自身の免疫細胞を取り出し、体外で培養・活性化し、再び患者の体内に戻すことで、患者自身の免疫力を高める治療法である。患者自身の細胞を使用するため、副作用が少なく、他の三大療法との併用も可能であることから今後のがんの治療法の一つとして期待されている。本研究では、生体外で免疫細胞を活性化させる免疫賦活機能を備えたバイオセラミックス「イムノセラミックス」を創製し、新機能発現機構を解明する。

## 2. 研究の目的

近年、がんの治療法として患者自身の免疫細胞を体外で培養・活性化し、再び患者体内に戻すことによってがんを治療する「養子免疫療法」が注目されている。バイオマテリアルが免疫系に働きかける事例として、フェニルボロン酸基を持つポリマーの  $\text{BO}_2$  基が糖鎖認識部位として作用し、リンパ球活性を有することが報告されている。我々のこの  $\text{BO}_2$  基に着目した。実際、養子免疫療法に有用なバイオマテリアルの創製を目的とし、これまでに反応焼結法を用いてホウ素含有アパタイト ( $\text{Ca}_{9.5+0.5x}\{(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{BO}_3)_x\}\{(\text{BO}_2)_{1-x}\text{O}_x\}$  ( $0 \leq x \leq 1$ ); BAp) を合成し、その免疫賦活効果を明らかにしている [1]。しかしながら、その結晶相には一部  $\alpha$ -リン酸三カルシウム ( $\alpha$ -TCP) が含まれていた。本研究では、作製方法を見直し、 $\alpha$ -TCP を含まない BAp 単一相のセラミックスを作製するための実験条件を確立した。その条件で作製したセラミックス上にマウス由来脾臓細胞を播種し、その BAp セラミックスに対する免疫細胞の応答性を評価した。また、担がんマウスに BAp セラミックスによって活性化させた免疫細胞をマウスに投与して抗腫瘍効果を検証した。この一連の研究を通して、BAp セラミックスの免疫賦活機能について考察した。

## 3. 研究の方法

出発物質である HAp, CaO および  $\text{H}_3\text{BO}_3$  を、前述の BAp 一般式において  $x=0.4$  一定とし、Ca/P 比を 1.73, 1.79 となるように秤量し、粉碎・混合した。混合粉体を一軸加圧成形し、 $400^\circ\text{C}$  で 1h か焼し、再び乳鉢で粉碎して BAp か焼粉体を得た。得られた BAp か焼粉体を一軸加圧成形し、 $1200^\circ\text{C}$  で 5h 焼成して BAp セラミックスを作製した。X 線回折法 (XRD)、フーリエ変換赤外分光法 (FT-IR) により、得られたセラミックスの材料特性評価を行なった。

また、C57BL/6N マウスから脾臓細胞を採取し、細胞懸濁液を  $1 \times 10^6 \text{ cells} \cdot \text{cm}^{-3}$  となるように調製し、各セラミックス上に播種した。培養 1 日後、フローサイトメーターを用いて各免疫細胞の割合を調査した。さらに、がん細胞 (B16-F10-OVA) をマウス (C57BL/6J) に投与することによって担がんマウスを作出した。このマウスの尾静脈に BAp セラミックスによって活性化させた B16-F10-OVA 細胞に特異的な CD8 陽性 T 細胞 (OT-1 transgenic mice 由来キラー T 細胞) を投与し、腫瘍サイズを計測するとともに、その組織学的評価を行なった。

## 4. 研究成果

作製した各セラミックス試料の XRD 図を図 1 に示す。いずれの試料においてもアパタイト相が確認された。BAp-0.4(1.79) はアパタイト単一相であったが、これ以外の試料では一部  $\alpha$ -リン酸三カルシウム ( $\alpha$ - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ;  $\alpha$ -TCP) が検出された。また、FT-IR スペクトルの結果より、いずれも BAp に特徴的な  $\text{BO}_2$  基の存在を確認したことから、ここで生成したアパタイトは BAp であることが分かった。これらの結果は、特に BAp-0.4(1.79) において反応焼結法により BAp 単一相のセラミックスを作製できることを示している。

また、マウスの脾臓細胞を用いた *in vitro* 評価では、すべての BAp セラミックスにおいて、Control と比較してヘルパー T 細胞およびキラー T 細胞のどちらの割合も高くなっていた。特に、今回調べた範囲では、 $\alpha$ -TCP を含む BAp-0.4

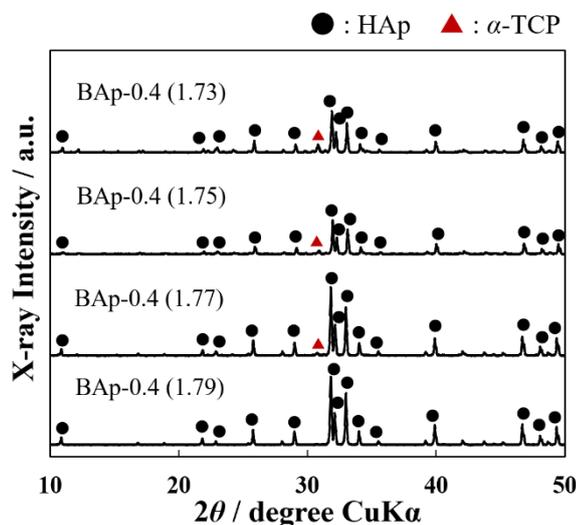


図 1 作製したセラミックスの XRD パターン

(1.73) が最も高い免疫賦活効果を示していた。*In vivo* 評価では、まず B16-F10-OVA 細胞をマウスに投与して担がんマウスを作出した。それと独立して、B16-F10-OVA 細胞を特異的に攻撃する CD8 (+) T 細胞を OT-1 transgenic mice から採取し、BAp セラミックス上で培養・活性化させ、担がんマウスに活性化させた細胞を投与した。その腫瘍サイズの変化を図 2 に示す。Control(ポリスチレン製)や HAp セラミックス上で培養した T 細胞を投与した場合、腫瘍サイズが増大したが、BAp セラミックス上で培養した T 細胞は腫瘍サイズを減縮させた。今回調べた範囲では、BAp-0.4(1.73)が最も高い効果を示した。この結果は、BAp セラミックス上で T 細胞を培養すると抗腫瘍効果が高まることを示している。この腫瘍近傍の組織を採取し、組織学的評価を行なったところ、腫瘍の外側付近で死んでいるがん細胞が散見され、その近傍で T 細胞およびマクロファージが浸潤している様子が確認できた。これらの組織学的所見より、BAp セラミックスによって活性化された T 細胞ががん細胞を攻撃し、さらにマクロファージが死細胞を貪食することによって抗腫瘍効果を発現しているものと考えられる。

これらの知見より、反応焼結法による作製した BAp セラミックスは、ヘルパーT 細胞およびキラーT 細胞を増加させたことから、免疫賦活効果および抗腫瘍効果を示し、養子免疫療法に有用なバイオマテリアルとして期待できる。

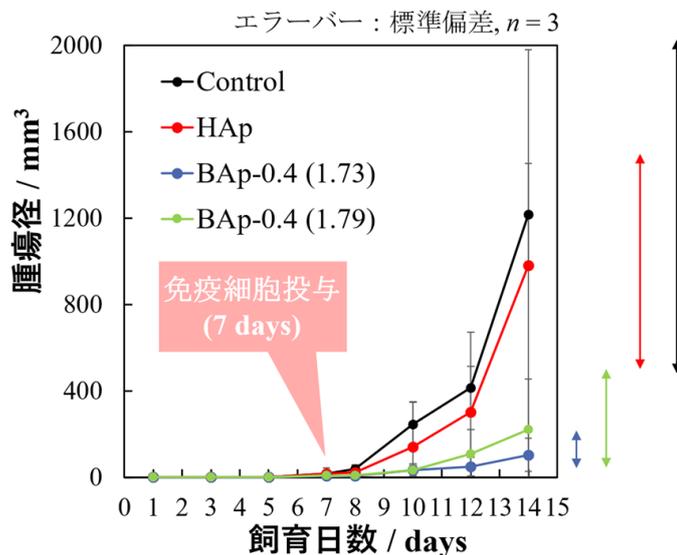


図 2 マウス腫瘍径の経時変化

[1] D. Nakagawa, M. Nakamura, S. Nagai, and M. Aizawa, "Fabrications of boron-containing apatite ceramics via ultrasonic spray-pyrolysis route and their responses to immunocytes", *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, **31**, 20(2020).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 鄭 允迪, 中川大輝, 新田藍子, 永井重徳, 相澤 守
2. 発表標題 反応焼結法によるホウ素含有アパタイトセラミックスの作製とその免疫細胞による <i>in vitro</i> 評価
3. 学会等名 無機マテリアル学会第144回学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 野瀬雅人, 木造理萌子, 永尾優季, 新田藍子, 鄭 允迪, 永井重徳, 相澤 守
2. 発表標題 養子免疫療法のためのCa0-P205-Si02-B203 系セラミックスの作製とその抗腫瘍効果
3. 学会等名 日本セラミックス協会第35回秋季シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鄭 允迪, 野瀬雅人, 福田龍一, 永井重徳, 相澤 守
2. 発表標題 反応焼結法によるホウ素含有アパタイトセラミックスの作製とその免疫機能
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 Y. Zheng, M. Nose, R. Fukuda, S. Nagai, M. Aizawa
2. 発表標題 Fabrication of boron-containing apatite ceramics via reaction sintering process and their immune functions
3. 学会等名 20th Asian BioCeramics Symposium 2022 (ABC2022) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 M. Nose, R. Kizukuri, Y. Nagao, A. Nitta, Y. Zheng, R. Fukuda, S. Nagai, M. Aizawa
2. 発表標題 Fabrication of ceramics in the CaO-P2O5-SiO2-B2O3 system for adoptive immunotherapy and their anti-tumour effects
3. 学会等名 Biomaterials International (BMI) Conference 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 野瀬雅人, 木造理萌子, 永尾優季, 新田藍子, 鄭允迪, 福田龍一, 永井重徳, 相澤守
2. 発表標題 養子免疫療法のための CaO-P2O5-SiO2-B2O3 系セラミックスの作製と担癌マウスを用いた抗腫瘍効果の検証
3. 学会等名 第32回無機リン化学討論会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 M. Nose, R. Kizukuri, Y. Nagao, A. Nitta, Y. Zheng, R. Fukuda, K. Suzuki, S. Nagai and M. Aizawa
2. 発表標題 Fabrication of ceramics in the CaO-P2O5-SiO2-B2O3 system for adoptive immunotherapy and their anti-tumor effects
3. 学会等名 Symposium and Annual Meeting of the International Society for Ceramics in Medicine (Bioceramics 33) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 野瀬雅人, 木造理萌子, 永尾優季, 新田藍子, 鄭允迪, 福田龍一, 相澤守, 永井重徳
2. 発表標題 養子免疫療法のためのCaO-P2O5 -SiO2 -B2O3系セラミックスの作製と黒色腫に対する抗腫瘍効果の検証
3. 学会等名 日本セラミックス協会第4回酸素酸塩材料科学研究会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 大嶋勇輝, 野瀬雅人, 福田龍一, 鄭允迪, 東医歯大, 永井重徳, 相澤守
2. 発表標題 反応焼結法によるホウ素含有アパタイトセラミックスの作製および担がんマウスによる抗腫瘍効果の検証
3. 学会等名 日本セラミックス協会2024年年会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 キラーT細胞の活性化方法	発明者 相澤守、新田藍子、 野瀬雅人、永井重徳	権利者 明治大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-117208	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

<a href="http://www.isc.meiji.ac.jp/~a_lab/">http://www.isc.meiji.ac.jp/~a_lab/</a> <a href="http://www.isc.meiji.ac.jp/~a_lab/institute/">http://www.isc.meiji.ac.jp/~a_lab/institute/</a>
--

#### 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
研究分担者	永井 重徳  (Nagai Shigenori)  (50348801)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・准教授   (12602)	

#### 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
---------	---------