

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：34416

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19931

研究課題名（和文）マクロファージを担体とした腫瘍標的薬剤輸送

研究課題名（英文）Tumor-targeted drug delivery mediated by macrophages

研究代表者

岩崎 泰彦（Iwasaki, Yasuhiko）

関西大学・化学生命工学部・教授

研究者番号：90280990

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）：本研究は、マクロファージを薬物担体として利用し、腫瘍組織に対する高選択的な薬物輸送システムを構築することを目的として実施された。研究期間ではマクロファージ本来の機能を低下させない表面修飾法の開拓、マクロファージに搭載するナノ粒子の設計および調製、マクロファージ表面へのナノ粒子の固定化、マクロファージの固形がんに対する親和性を高める方法について検討した。これらの検討により、ラジカルを利用しない新たなマクロファージの表面修飾法や固形がんに対し高い親和性を示すマクロファージの獲得に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では元来免疫細胞に見られるがん細胞指向性に着目し、新たな薬物輸送システムの構築を目指した。近年、遺伝子操作により免疫細胞の表面にがん抗原受容体を発現させ、がん組織を攻撃する治療法が注目されているが、受容体の種類が限定的であるため、治療効果のばらつきが課題となっている。本研究で確立した手法は、化学的に任意の受容体をマクロファージに固定化することを可能にするため、従来法に比べ多様ながん種に適用できると期待される。「がん」という難題に挑戦する本研究課題の社会的意義が大きいことはもちろんのこと、細胞を利用した薬物輸送は、高分子化学、糖代謝工学、免疫学を融合した学術的にもユニークな戦略といえる。

研究成果の概要（英文）：This study was conducted to establish a highly selective drug delivery system to tumor tissues using macrophages as drug carriers. During the course of the study, we explored methods for surface modification of macrophages that do not reduce their natural functions, design and preparation of nanoparticles to be loaded onto macrophages, immobilization of nanoparticles on the surface of macrophages, and methods to increase the affinity of macrophages for solid tumors. Through these investigations, we succeeded in obtaining a new method of surface modification of macrophages that does not utilize radicals and macrophages that show high affinity for solid cancers.

研究分野：生体材料学

キーワード：マクロファージ がん免疫治療 ナノ粒子 細胞表面修飾 糖鎖 リン脂質ポリマー DDS

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我が国の死因の第1位はがんであり、国民の2人に1人ががんに罹患し、3人に1人ががんで死亡する。まさしく、がんは我々にとって最も重大かつ克服すべき疾患の一つである。本研究では腫瘍組織に認められる特殊性に着目した新たな治療法を提案する。最も一般的ながん治療の一つが化学療法である。これまでも様々な抗がん剤が開発され、進行がんや再発がんの治療成績は飛躍的に向上している。しかし、重篤な副作用が依然として問題となっている。薬剤を腫瘍組織に選択輸送するためのナノ粒子を中心とした担体の開発が精力的に行われているが、複雑な生体内環境において高い選択性を獲得するためには、全く新たなアプローチの提案が求められる。

2. 研究の目的

本研究は、マクロファージを薬剤担体として利用し、腫瘍組織に対する高選択的な薬剤輸送システムを構築することを目的として企画された。研究期間では主に①低侵襲なマクロファージ表面の機能化、②反応性リン脂質ポリマー被覆ナノ粒子の調製とマクロファージ表面への固定化、③マクロファージのがん細胞指向性を高めるための表面改質、④腫瘍転移モデルの作成について検討した。

3. 研究の方法

(1) マクロファージ表面の機能化

申請者らが報告(*Bioconjugate Chem.* 2018;29:4160)したマンノサミン類縁体(ManM)を用いた手法に基づきマクロファージの表面にメタクリロイル基を誘導した。脂溶性を高めたManMやより反応性に優れたマンノサミン類縁体の合成についても検討し、効率的な官能基誘導を試みた。

(2) 反応性リン脂質ポリマー被覆ナノ粒子の調製とマクロファージ表面への固定化

細胞内部に取り込まれず、かつ、腫瘍組織の特殊な環境で薬剤を徐放するナノ粒子を調製する。申請者は過去に双性イオン型ポリマーで被覆された粒子がマクロファージに貪食されないことを見出している。そこで、双性イオン基、細胞糖鎖と結合するピリジルジスルフィド基を有する両親媒性ポリマーを調製した。また、ナノ粒子内部にモデル薬物を担持することも試みた。糖鎖改変したマクロファージに末端チオール化4分岐PEGを反応させ、表面チオール化マクロファージを得た。続いて、双性イオン基とピリジルジスルフィド基で覆われたナノ粒子を接触させ、細胞表面に固定化されたナノ粒子を蛍光顕微鏡により確認した。

(3) マクロファージのがん細胞指向性を高めるための表面改質

糖鎖改変したマクロファージに、核酸アプタマーや抗体を修飾し、血球系がん細胞や乳がん細胞と共培養し、表面修飾がマクロファージとがん細胞との相互作用におよぼす影響を調査した。

(4) 腫瘍モデルの作成

ヒト乳がん細胞を免疫不全マウスの尾動脈に注入し、転移モデルの作成を試みた。がん細胞の体内動態をIVISシステムにより追跡するとともに、転移巣の組織切片を作成し、がん細胞の分布を観察した。本動物実験は関西大学動物実験委員会(#2207)ならびに関西大学遺伝子組換え生物使用安全委員会(#154)の承認を得て実施した。

4. 研究成果

(1) マクロファージ表面の機能化

我々はこれまでマンノサミンにメタクリロイル基を導入した *N*-メタクリロイルマンノサミン(ManM)を培地に添加し、哺乳動物細胞に代謝させ糖鎖の改変を実施してきた。この方法により糖鎖末端のシアル酸がメタクリロイル化され、チオール-エン反応に供することにより様々な分子を細胞表面に修飾することを示してきた。しかし、ManMは親水性の化合物であるため、細胞内への取り込み効率は必ずしも高くなく、糖鎖改変を行うには最低でも培地中に数十 μM の濃度になるよう添加する必要がある。

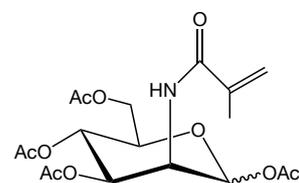


図1 Ac₄ManMの構造

た. そこで, 本研究では ManM をアセチル化し, 疎水化したアセチル化 ManM (Ac₄ManM, 図 1) を新たに合成した. 既報に従い合成した ManM と無水酢酸を反応させ, Ac₄ManM を得た. Ac₄ManM の構造は ¹H NMR および ESI-MS 解析によって確認した.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ=2.04 (app s, 6H), 2.07 (s, 3H), 2.10 (s, 3H), 2.20 (s, 3H), 4.07 (dd, 1H), 4.24 (dd, 1H), 4.70 (ddd, 1H), 5.23 (t, 1H), 5.36 (dd, 1H), 5.44 (app t, 1H), 5.75 (s, 1H), 5.99 (app t, 1H), 6.08 (s, 1H).

m/z : [M+Na] ⁺	
Calculated	: 438.13
Found	: 438.13

終濃度 50μM の Ac₄ManM を含む培地中でマクロファージ (RAW264.7) を 2 日間培養した後, 分子量 1 万の 4 分岐 PEG-SH, Alexa Fluor 488 C₅-maleimide で段階的に処理し, 共焦点蛍光顕微鏡で観察した. 図 2 に結果を示す. 糖を添加していない条件では細胞の輪郭に蛍光が確認されなかったのに対し, Ac₄ManM を含む培地中で培養した細胞の輪郭が Alexa Fluor 488 で染色された. このことは Ac₄ManM が細胞内で代謝され, 細胞表面の糖鎖にメタクリロイル基が誘導されたことを示している. また, 本研究で Ac₄ManM は従来の ManM に比べ約 1/1000 の濃度で細胞表面の改質を行えることが明らかとなった.

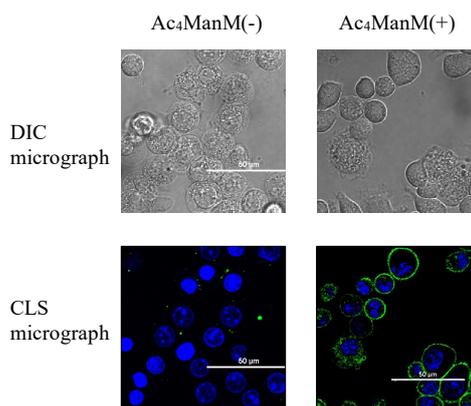


図 2 Ac₄ManM によるマクロファージ表面の改質

(2) 反応性リン脂質ポリマー被覆ナノ粒子の調製とマクロファージ表面への固定化

ARGET-ATRP 法により図 3 示す 3 元共重合体 [PMPC-b-P(BMA-co-Rh)] (PMBRh) を合成した. PMBRh の数平均分子量 (M_n) は 1.7×10^4 , 分子量分布 (M_w/M_n) は 1.2 であった. PMBRh を分散安定剤とし, ポリ乳酸をコアに有するナノ粒子を溶媒留去法で調製したところ, 粒径は 280 nm, ゼータ電位は -2.79 mV のナノ粒子が得られた. このナノ粒子に分子量 1 万の 4 分岐 PEG-SH を接触させ, ジスルフィド交換反応により表面をチオール化した. その後, 前項と同様に Ac₄ManM 処理したマクロファージにナノ粒子を接触させたところ, 図 4 に示すように細胞の輪郭からローダミン由来の蛍光が観察され, ナノ粒子の細胞表面の固定化が示唆された. しかし, その固定量は未だ乏しく, ばらつきも大きいため, 固定化の効率を高めるための分子設計の最適化が必要である.

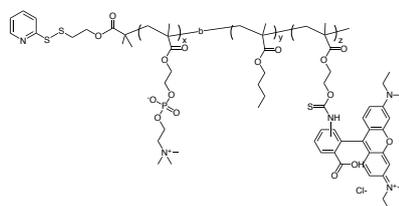


図 3 PMBRh の構造

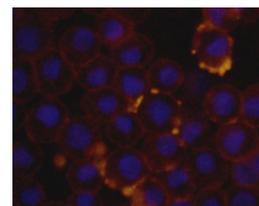


図 4 ナノ粒子を搭載したマクロファージの蛍光像

(3) マクロファージのがん細胞指向性を高めるための表面改質

我々はメタクリロイル基を誘導したマクロファージ表面に血球系のがん細胞 (CCRF-CEM) に高発現しているタンパク質と結合する核酸アプタマー (sgc8) を修飾することにより, CCRF-CEM をマクロファージが効率よく捉えることをすでに明らかにしている. しかし, 生きた CCRF-CEM の食効率低さが課題であった. これは CCRF-CEM の表面に存在する CD47 と RAW264.7 の SIRP α の結合が一因になっていると考えられる. そこで, 生きた CCRF-CEM に対するマクロファージの食作用を高めることを目指し, RAW264.7 表面に sgc8 と抗 CD47 抗体の共固定を試みた. メタクリロイル基を誘導したマクロファージに sgc8 とチオール化した抗 CD47 抗体を RAW264.7 の表面に共固定した. 図 5 は蛍光標識された抗 CD47 抗体と sgc8 を RAW264.7 に修飾した直後の蛍光顕微鏡像である. ManM 処理した RAW264.7 からは抗 CD47 抗体 (図 5A) およ

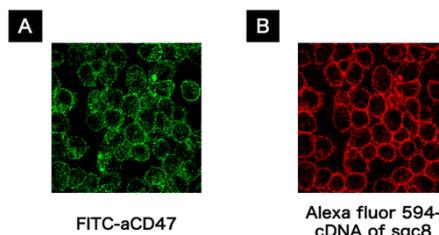


図 5 核酸アプタマーと抗 CD47 抗体を共修飾した RAW264.7 の蛍光写真

び sgc8(図 5B)にともなう蛍光が観察され, 抗 CD47 抗体と sgc8 を RAW264.7 に共固定できることがわかった. 続いて表面修飾を施した RAW264.7 と CCRF-CEM と共培養した. RAW264.7 表面に粘着した CCRF-CEM の数および食食指数を図 6A に, 共培養後の蛍光写真を図 6B に示す. 以前の検討で sgc8 のみを修飾した RAW264.7 は捕捉した細胞の 39%を食食したのに対し, sgc8 と抗 CD47 抗体を共固定した RAW264.7 は捕捉した CCRF-CEM の 87%を食食したことが明らかとなった. 図 6B から両種の細胞が重なることによって認められる黄色いシグナルが多く観察された. CCRF-CEM 以外のがん細胞に対しても, アプタマーを変更することにより同様な結果が認められており, 本技術が様々ながん細胞に対し有効であることが示されつつある.

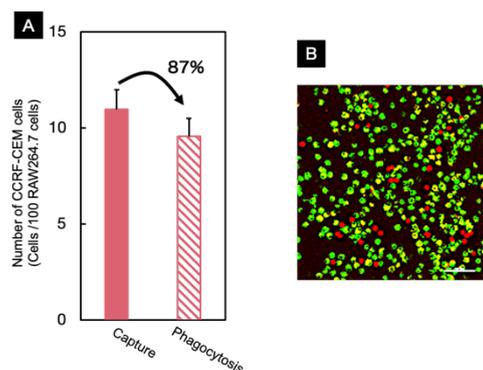


図 6 核酸アプタマーと抗 CD47 抗体を共修飾した RAW264.7 による CCRF-CEM の食食. (A) RAW264.7 による CCRF-CEM の食食効率. (B) 共培養後の蛍光顕微鏡写真. 緑: RAW264.7, 赤: CCRF-CEM

(4) 腫瘍モデルの作成

研究期間内に表面改質マクロファージによるがん組織縮退効果を *in vivo* で評価することはできなかったが, その前段階としてマウスの骨転移モデル作成を実施した. ヒト乳がん細胞を尾動脈より注入し, 3 週間飼育することにより大腿骨遠位部 (脛骨近位部) に転移が生じていることを確認した.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

1. 岩崎泰彦, 胡小蝶. 核酸アプタマーによるマクロファージの表面修飾. *オレオサイエンス* 2023;23:241-247.
2. Hiranphinyophat S, Iwasaki Y*. Controlled biointerfaces with biomimetic phosphorus-containing polymers. *Sci. Tech. Adv. Mater.* 2021;22:301-316.

[学会発表] (計 6 件)

1. 岩崎泰彦, バイオ界面で機能するポリマー材料, 令和 4 年度高分子学会中国四国支部研究会, 広島 (2022. 12).
2. 岩崎泰彦, 高分子材料の基礎～生体と機能する材料の多様性, 第 44 回日本バイオマテリアル学会, 東京(2022. 11).
3. 胡小蝶, 岩崎泰彦. 抗体/アプタマー共修飾マクロファージによるがん細胞の効率的除去, 第 71 回高分子年次大会, オンライン (2022. 5).
4. 胡小蝶, 岩崎泰彦. 表面改質マクロファージによるがん細胞の高効率除去, 日本バイオマテリアル学会関西ブロック 第 16 回若手研究発表, 大阪 (2021. 12).
5. 大高晋之, 岩崎泰彦, 糖鎖改変細胞を用いた光応答性の細胞構造体構築, 第 43 回日本バイオマテリアル学会大会, 愛知 (2021. 11).
6. X. Hu, Y. Iwasaki, Surface modification of macrophages to enhance the clearance of living cancer cells, The 15th International Symposium in Science and Technology 2021, Osaka (2021. 8).

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<https://wps.itc.kansai-u.ac.jp/biomat/>

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：遊佐 真一
ローマ字氏名：Yusa Shinichi
所属研究機関名：兵庫県立大学
部局名：工学研究科
職名：准教授
研究者番号 (8桁)：00301432

研究分担者氏名：平賀 徹
ローマ字氏名：Hiraga Toru
所属研究機関名：松本歯科大学
部局名：歯学部
職名：教授
研究者番号 (8桁)：00301432

(2)研究協力者

研究協力者氏名：胡小蝶
ローマ字氏名：Hu Xiaodie

研究協力者氏名：伊藤康生
ローマ字氏名：Ito Kosei

研究協力者氏名：田部勇仁
ローマ字氏名：Tabé Yuto

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hiranphinyophat S, Iwasaki Y	4. 巻 22
2. 論文標題 Controlled biointerfaces with biomimetic phosphorus-containing polymers	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci. Tech. Adv. Mater.	6. 最初と最後の頁 301-316
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/14686996.2021.1908095	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 岩崎 泰彦, 胡 小蝶	4. 巻 23
2. 論文標題 核酸アプタマーによるマクロファージの表面修飾	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 オレオサイエンス	6. 最初と最後の頁 241-247
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5650/oleoscience.23.241	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 2件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 X. Hu, Y. Iwasaki
2. 発表標題 Surface modification of macrophages to enhance the clearance of living cancer cells
3. 学会等名 The 15th International Symposium in Science and Technology 2021（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 胡 小蝶, 岩崎 泰彦
2. 発表標題 表面改変マクロファージによるがん細胞の高効率消去
3. 学会等名 日本バイオマテリアル学会関西ブロック
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大高晋之, 岩崎泰彦
2. 発表標題 糖鎖改変細胞を用いた光応答性の細胞構造体構築
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 胡小蝶, 岩崎泰彦
2. 発表標題 抗体/アプタマー共修飾マクロファージによるがん細胞の効率的消去
3. 学会等名 第71回高分子年次大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岩崎泰彦
2. 発表標題 高分子材料の基礎:生体と機能するマテリアルの多様性
3. 学会等名 第44回日本バイオマテリアル学会(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岩崎泰彦
2. 発表標題 バイオ界面で機能するポリマーマテリアル
3. 学会等名 令和4年度高分子学会中国四国支部研究会(招待講演)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究者ホームページ
<https://wps.itc.kansai-u.ac.jp/biomat/>

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	遊佐 真一 (Yusa Shinichi) (00301432)	兵庫県立大学・工学研究科・准教授 (24506)	
研究分担者	平賀 徹 (Hiraga Toru) (70322170)	松本歯科大学・歯学部・教授 (33602)	

	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
研究協力者	胡 小蝶 (Hu Xiaodie)		
研究協力者	伊藤 康生 (Ito Kosei)		

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	田部 勇仁 (Tabe Yuto)		

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