

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22700463

研究課題名(和文) 光線力学的療法を利用した感染症に対する免疫療法の確立

研究課題名(英文) Immunotherapy with photodynamic vaccination for infection disease.

研究代表者

宮崎 幸造 (MIYAZAKI, Kozo)

東京大学・医学(系)研究科(研究院)・特任研究員

研究者番号：40372164

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、レーザー光と光感受性物質さらに細菌やウイルスのタンパクを利用して、免疫を行う光線力学的免疫療法を、マウスを用いて作用機構や有効性を明らかにした。PEG-pLLys(12-46)鎖とDpCを用いて作成した50nm径のミセルは、リソソーム内に短時間で取り込まれた。さらに、皮下投与による生体反応試験においては、CD8陽性IFN γ 産生細胞を効率よく誘導した。しかしながら、記憶型T細胞の誘導は確認できなかった。今後、本免疫療法における免疫記憶反応の検証と解析が必要である。

研究成果の概要(英文)：In this study, we carried out immunotherapy with photodynamic vaccination for infection disease in vitro and in vivo. The polyion complex micelle which made with PEG-pLLys(12-46) and DpC was incorporated to lysosome within four hours. Additionally, this micelle induced CD8 positive and IFN γ secreted T cells after photo irradiation with laser. However, this reaction cannot detect the memory T cells. In future, we need to verification of immunological memory reaction in this immunotherapy.

研究分野：複合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

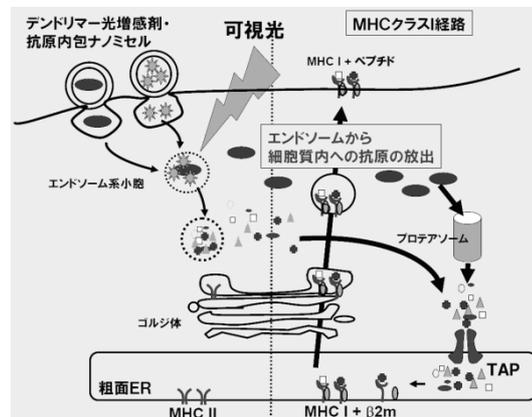
キーワード：光線力学的免疫治療 生体防御 生体制御

1. 研究開始当初の背景

1. 研究開始当初の背景

近年、SARS 等の新興感染症、結核等の再興感染症、新型インフルエンザ等の人畜共通感染症が問題となっており、これらの治療方法の確立、さらに、ワクチン、抗生物質の作成が早急に望まれる。現在の感染症治療方法の殆どは、抗生物質に頼るものであり、これが新たな薬剤耐性株を生み出すといった皮肉な結果になっているため、耐性株を生み出さない新規治療方法を検討しなくてはならない。一方で、現在使用されているワクチンは生ワクチンと不活化ワクチンがある。前者は、毒性を弱めた微生物やウイルスを使用し、液性免疫のみならず細胞免疫も獲得できるため、一般に不活化ワクチンに比べて獲得免疫力が強く免疫持続期間も長い。しかし、生きている病原体を使うため、ワクチン株の感染による副反応を発現する可能性もある。後者は、死ワクチンとも呼ばれ、狭義の不活化ワクチンでは、化学処理などにより死んだウイルス、細菌を使用している。取り扱いや効果において同様である抗原部分のみを培養したものを含めて不活化ワクチンと称されることもある。不活化ワクチンは、生ワクチンより副反応は少ないが、液性免疫しか獲得出来ないため、その分免疫の続く期間が短いことがあり、このため複数回接種が必要なものが多い。さらに、何れのワクチンも、作成までに時間もかかるため、緊急時における対応ができないのが現状である。つまり、効率よくウイルスや細菌、さらには寄生虫に対する免疫獲得ができる方法の確立は非常に重要である。

他方、光（レーザー光）の利用は、共焦点レーザー顕微鏡等の、観察機器をはじめ、レーザーメス等の外科手術用機器等、さらに、光線力学的療法等の早期がん治療法 (Nishiyama N, Miyazaki K, et al. J. Control Release. Vol.133, p245, 2009) と様々な分野で使用されている。しかしながら、感染症治療へは、細菌やウイルスに対して直接殺傷効果を上げようとする報告 (Hirayama J. et al. Photochem. Photobiol. Vol 66, p697, 2997) が過去にあるが、免疫系を惹起し治療を行おうとする報告 (Kumari S. et al. Eur. J. Immunol. Vol.39, p178, 2009) は少ない。これまで申請者のグループでは、腫瘍に対する光線力学的療法を行ってきた。その中で、エンドサイトーシスによって取り込まれた腫瘍抗原と光増感剤が、光増感剤の効果によって、腫瘍抗原がエンドソームから脱出していることを確認した。さらに、フローサイトメーターによる解析では、腫瘍特異的な CD8 陽性 T 細胞が誘導された。申請者は、免疫学を基盤として研究を進めてきたが、どの分野においても問題となる点は、感染症であった。Vaccination における副反応を少なくし、効率よく液性免疫や細胞傷害性 T 細胞を誘導できるシステムを構築することは、感染症にお



ける重篤な症状を低減させ、感染拡大を防ぐことが出来るのではないかと思索してきた。本研究では、レーザー光と光感受性物質を利用する光線力学的療法、さらに抗原となるウイルス・細菌ペプチドを用いて細胞傷害性 T 細胞を誘導させる、感染症への新規免疫療法であり、抗生物質に依存しすぎない治療方法確立を目指すものである。

2. 研究の目的

本研究では、光（レーザー光）と光感受性物質さらに細菌やウイルスのタンパクを利用して、免疫を行う光線力学的免疫療法 (Photodynamic Vaccination) という新規免疫療法を、マウスを用いて、作用機構や有効性を明らかにし、さらに、本方法の臨床応用に向けての研究基盤を確立することを目的とする。

- (1) リンパ節特異的集積性光増感剤内包ミセルの作製
- (2) 作製したミセルの細胞への取り込み及び生体内分布の解析
- (3) 光照射による生体反応性の解析 (in vivo)

3. 研究の方法

- (1) リンパ節特異的集積性高分子ミセルの作製

PEG2000、PEG12000 または PEG21000 と Poly-L-Lysine のブロック共重合体とデンドリマー型フタロシアニンを用いて任意の割合にて混合しミセルを作成する。

- (2) 高分子ミセルの細胞内挙動と生体内分布

作成した光増感剤内包高分子ミセルは、培養細胞への添加により、その細胞内挙動を解析する。さらに、マウスへの静脈内注射によりその生体内分布を解析する。

- (3) Photodynamic Vaccination による効果検証

ミセル皮下投与後 4 時間後、2J/cm² にて 685nm のレーザー光を照射し Photodynamic Vaccination を行う。照射 1 週間後に末梢血を回収し、リンパ球を分離。これに含まれる CD8 陽性 T 細胞の解析を行う。

4. 研究成果

- (1) 高分子ミセルの作製

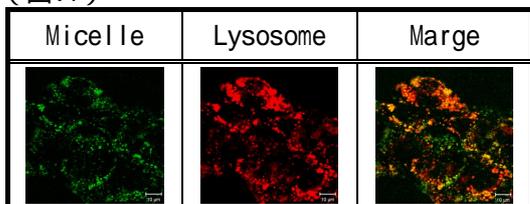
PEG2000 と Poly-L-Lysine の共重合体

(PEG-PLL2-61) を作製し、これを用いて約 30nm サイズのミセルを試みた。 dendriマフタロシアニン (DPc) と PEG-PLL2-61 を混合比 1:0.7 においてミセル作製を行った時、70nm 径の単分散ミセルの作製に成功した。しかしながら、予定の大きさにならないことから、PEG12000 と Poly-L-Lysine の共重合体 (PEG-PLL12-46) を作製し再度調整を行ったところ、DPc と PEG-PLL12-46 を混合比 1:0.8 においてミセル作製を行った時、50nm 径の単分散ミセルの作製に成功した。このミセルを用いて、実験を進めることとした。

(2) 高分子ミセルの細胞内挙動

作成したミセルを培養細胞に添加し、4 時間後の細胞内挙動を確認したところリソソーム内に取り込まれていることが判明した。

(図.1)



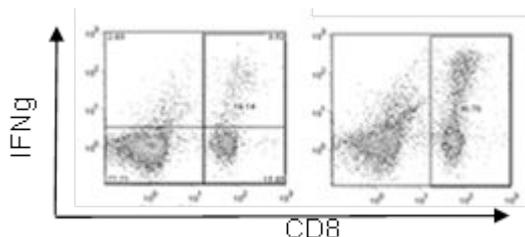
(図.1 ミセルの細胞内挙動)

上記のことから、4 時間を細胞取り込みの目安として実験を進めた。

一方、当初目的としていたリンパ節への集積について、本材料により作成できるミセルの大きさでは、困難であることが分かったため、(30nm 以下にならない) 50nm 径のミセルを用い、更に皮下投与により樹状細胞へ取り込ませ免疫させるという臨床で行われる手法を応用することとした。

(3) Photodynamic Vaccination による効果検証

ミセル皮下投与後 4 時間後、2J/cm² にて 685nm のレーザー光を照射し Photodynamic Vaccination を行った。照射 1 週間後に末梢血を回収し、リンパ球を分離。これに含まれる CD8 陽性 T 細胞の解析を行った。



(図.2 末梢血内細胞の解析 左: Pre、右: Post)

CD8 陽性 IFN γ 産生細胞は確認ができたことから、本実験における光増感効果が免疫を惹起していることが確認できた。しかしながら、ワクチン効果に重要なメモリー T 細胞の確認を得ることができなかった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 8 件)

英文

Miyazaki K, Morimoto Y, Nishiyama N,

Satoh H, Tanaka M, Shinomiya N, Ito K. Preconditioning methods influence tumor property in an orthotopic bladder urothelial carcinoma rat model. *Mol Clin Oncol.* Jan;2(1):65-70, 2014 査読有

Synatschke CV, Nomoto T, Cabral H, Förtsch M, Toh K, Matsumoto Y, Miyazaki K, Hanisch A, Schacher FH, Kishimura A, Nishiyama N, Müller AH, Kataoka K. Multicompartment micelles with adjustable poly(ethylene glycol) shell for efficient in vivo photodynamic therapy. *ACS Nano.* Feb 25;8(2):1161-72, 2014 査読有

Miyazaki K, Morimoto Y, Nishiyama N, Maekawa Y, Hu WZ, Nakatate K, Kaneda K, Shinomiya N, Kataoka K. A novel homogeneous irradiation fiber probe for whole bladder wall photodynamic therapy. *Lasers Surg Med.* 2012 Jul;44(5):413-20. 査読有

Ito Y, Kimura T, Ago Y, Nam K, Hiraku K, Miyazaki K, Masuzawa T, Kishida A. Nano-vibration effect on cell adhesion and its shape. *Biomed Mater Eng.* 2011;21(3):149-58 査読有

Herlambang S, Kumagai M, Nomoto T, Horie S, Fukushima S, Oba M, Miyazaki K, Morimoto Y, Nishiyama N, Kataoka K. Disulfide crosslinked polyion complex micelles encapsulating dendrimer phthalocyanine directed to improved efficiency of photodynamic therapy. *J Control Release.* 2011 Nov 7;155(3):449-57 査読有

邦文

宮崎幸造 レーザー医学この人 日本レーザー医学会誌 33(1): 80-81, 2012. 査読無

比留間瞳, 守本祐司, 宮崎幸造, 井上明季, 野本貴大, 福島重人, 四ノ宮成祥, 西山伸宏, 片岡一則 dendriマ型光増感剤内包高分子ミセルを用いた PDT, PDD 日本レーザー医学会誌 33(2): 104-109, 2012. 査読有

宮崎幸造, 守本祐司, 熊谷康顕, 福島重人, 堀江壮太, 村岡未帆, 胡尉之, 中楯健一, 金田恵司, 前川康弘, 四ノ宮成祥, 西山伸宏, 片岡一則 新規開発した膀胱がん対応型均質照射型光ファイバーによる PDT 効果増強 日本レーザー医学会誌 31(2): 122-130, 2010. 査読有

[学会発表](計 16 件)

国際学会

K Miyazaki, Y Morimoto, H Hiruma, A Inoue, T Nomoto, S Fukushima, K Iwaya, N Shinomiya, N Nishiyama and K Kataoka. Endoscopic diagnosis and treatment of esophageal tumor using a novel DDS-type photoactivatable agent. AACR 103rd Annual Meeting 2012. Chicago. Poster 3468

H Hiruma, Y Morimoto, K Miyazaki, A Inoue, T Nomoto, S Hukushima, N Shinomiya, N Nishiyama and K Kataoka. Photodynamic diagnosis (PDD) and therapy (PDT) with dendrimer porphyrin micelle. AACR 103rd Annual Meeting 2012. Chicago. Poster 3469

K Miyazaki, Y Morimoto, M Muraoka, M Kumagai, S Horie, S Fukushima, N Shinomiya, N Nishiyama and K Kataoka. A novel PDT system consisting of a DDS-type photosensitizer and a newly developed fiber probe for homogenous irradiation. AACR 101st Annual Meeting 2010. Washington DC Poster 501

Y Morimoto, M Muraoka, K Miyazaki, M Kumagai, S Horie, S Fukushima, H Matsuo, N Shinomiya, N Nishiyama and K Kataoka. Fluorometric imaging system for visualizing submillimeter level tumors using an ultrathin endoscope. AACR 101st Annual Meeting 2010. Washington DC Poster 5235

国内学会

宮崎幸造, 守本祐司, 比留間瞳, 岩屋啓一, 四ノ宮成祥, 西山伸宏, 片岡一則 極細内視鏡と蛍光標識化高分子ミセルによる小動物管腔臓器の観察システム 第 51 回日本生体医工学会大会、2012 年 5 月、福岡、福岡国際会議場

宮崎幸造, 守本祐司, 比留間瞳, 井上明季, 野本貴大, 福島重人, 岩屋啓一, 四ノ宮成祥, 西山伸宏, 片岡一則 ラット正所性食道がんモデルを用いた細径内視鏡下での光線力学的診断 第 32 回日本レーザー医学会総会、2011 年 11 月、神奈川、パシフィコ横浜

比留間瞳, 守本祐司, 宮崎幸造, 井上明季, 野本貴大, 福島重人, 四ノ宮成祥, 西山伸宏, 片岡一則 デンドリマーポルフィリンミセルの PDD・PDT 効果の検証 第 32 回日本レーザー医学会総会、2011 年 11 月、神奈川、パシフィコ横浜

宮崎幸造, 守本祐司, 四ノ宮成祥, 西山伸宏, 片岡一則 ラット正所性食道がんモデルを用いた細径内視鏡下での光線力学的診断 第 82 回日本消化器内視鏡学会総会、2011 年 10 月、福岡、福岡国際会議場

宮崎幸造, 守本祐司, 四ノ宮成祥, 西山伸宏, 片岡一則 ラット正所性食道がんモデルを用いた細径内視鏡下での光線力学的診断 第 70 回日本癌学会学術総会、2011 年 10 月、愛知、名古屋国際会議場

宮崎幸造, 守本祐司, 熊谷康顕, 福島重人, 比留間瞳, 四ノ宮成祥, 西山伸宏, 片岡一則 ヒト肺癌細胞に対する光増感剤内包ミセルの細胞傷害性の検証 第 29 回 日本ヒト細胞学会学術集会、2011 年 8 月、富山、パレプランス高志会館

宮崎幸造, 守本祐司, 村岡未帆, 伊藤敬一、

藤田昌敬、熊谷康顕、堀江壮太、福島重人、四ノ宮成祥、西山伸宏、片岡一則 高分子ミセルと新規光照射システムを用いた光線力学的療法の大型動物に対する安全性と操作性の検証 第 27 回日本 DDS 学会学術集会、2011 年 6 月、東京、東京大学

宮崎幸造, 守本祐司, 村岡未帆, 熊谷康顕, 堀江壮太, 福島重人, 四ノ宮成祥, 西山伸宏, 片岡一則 前臨床試験を目指した新規 PDT システムの安全性と操作性の検証 第 50 回日本生体医工学会大会、2011 年 5 月、東京、東京電機大学

宮崎幸造, 守本祐司, 村岡未帆, 伊藤敬一, 藤田真敬, 熊谷康顕, 福島重人, 堀江壮太, 四ノ宮成祥, 西山伸宏, 片岡一則 新規開発した均質光照射ファイバースコープを用いた PDT システム：大型動物を用いた前臨床試験による安全性と操作性の検証 第 31 回日本レーザー医学会総会、2010 年 11 月、愛知、ウインクあいち

宮崎幸造, 守本祐司, 村岡未帆, 熊谷康顕, 堀江壮太, 福島重人, 四ノ宮成祥, 西山伸宏, 片岡一則 A novel PDT system with a DDS-type photosensitizer and a homogenous irradiation fiber probe for urinary bladder cancer 第 49 回日本生体医工学会大会、2010 年 6 月、大阪、大阪国際交流センター

村岡未帆, 宮崎幸造, 熊谷康顕, 福島重人, 堀江壮太, 西山伸宏, 片岡一則, 守本祐司 Development of the ultrathin fluorescence endoscope and photodynamic diagnosis 第 49 回日本生体医工学会大会、2010 年 6 月、大阪、大阪国際交流センター

宮崎幸造, 村岡未帆, 熊谷康顕, 堀江壮太, 福島重人, 四ノ宮成祥, 西山伸宏, 片岡一則, 守本祐司 蛍光標識化高分子ミセル型光増感剤の生体内分布特性の評価 第 26 回 DDS 学会学術集会、2010 年 6 月、大阪、大阪国際交流センター

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮崎 幸造 (MIYAZAKI, Kozo)

東京大学・大学院医学系研究科・特任研究員
研究者番号：40372164