

令和 6 年 5 月 17 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19897

研究課題名（和文）脳腫瘍移行性の高い免疫細胞の探索と免疫細胞への薬物搭載による脳腫瘍治療法の開発

研究課題名（英文）Treatment of glioblastoma with immune cells loaded with anticancer therapeutics

研究代表者

清水 太郎（Shimizu, Taro）

大阪大学・微生物病研究所・特任講師（常勤）

研究者番号：30749388

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）：免疫細胞はがん治療における薬物送達システムとして期待されている。本研究では、抗がん剤を搭載した脾臓細胞を作製した。抗がん剤を封入したリポソームを用いることで脾臓細胞に搭載することに成功し、さらに還元環境下で抗がん剤放出を促進できることが明らかになった。本細胞を皮下腫瘍モデルマウスに投与すると腫瘍成長が有意に抑制された。またglioblastoma同所移植モデルマウスを作製し、腫瘍部へと免疫細胞が浸潤していることを確認した。免疫細胞浸潤を促進するためにがん細胞を薬物処置すると、ケモカイン発現が上昇することも明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Glioblastomaは中枢神経系に生じるがんの17%を占め、悪性度が非常に高く、平均生存率はわずか12-15ヶ月であり、新規治療法の開発が望まれている。本研究では、抗がん剤を搭載した免疫細胞を設計し、がん皮下移植モデルマウスで抗腫瘍効果を示すことが明らかになった。また脳腫瘍への免疫細胞浸潤を増加させる手法も見出した。抗がん剤搭載免疫細胞と免疫細胞浸潤調節法を併用することで脳腫瘍治療効果が増強することが期待される。また脳腫瘍時における免疫細胞浸潤に関して本研究で得られた知見は、脳腫瘍の病態解明につながることも期待される。

研究成果の概要（英文）：Immune cells are promising drug delivery system for the treatment of cancer like glioblastoma. In this study, we developed spleen cells loaded with anticancer drugs. Anticancer drug-encapsulated liposomes were successfully loaded onto spleen cells and the drug release was enhanced in reducing environment. Treatment with spleen cells loaded with anticancer drug suppressed the growth of tumor which was subcutaneously inoculated. In addition, we established orthotopic glioblastoma mouse model and confirmed the immune cell infiltration into tumor. To enhance the infiltration of immune cells, chemokine expression in tumor was modulated with pre-treatment with drugs.

研究分野：生物薬剤学

キーワード：脳腫瘍 免疫細胞 薬物送達 遊走

1. 研究開始当初の背景

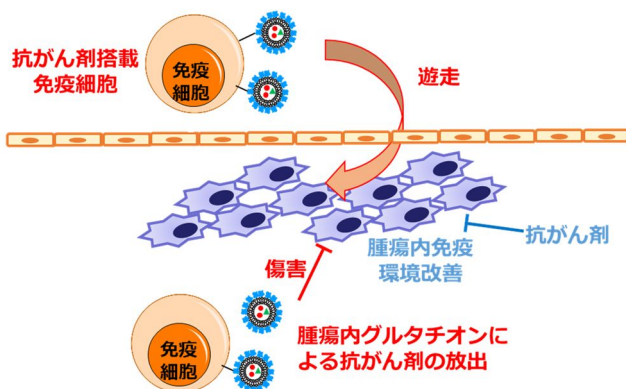
脳腫瘍の中で最も一般的な Glioblastoma は、中枢神経系に生じるがんの 17% を占め、悪性度が非常に高く、平均生存率はわずか 12-15 ヶ月である。治療法として、外科療法、放射線療法、化学療法があり、新規低分子薬物や抗 PD-1 抗体による治療も試みられているが、期待された成果は得られていない。脳への薬物送達は血液脳関門や血液腫瘍関門の影響で著しく制限されており、画期的な薬物送達法の開発が求められている。

近年、新規 DDS として免疫細胞をキャリアとして用いる試みがなされている。免疫細胞は、ナノ粒子をキャリアとして用いる場合と比較して、生体適合性が高く、滞留性もよい。さらに免疫細胞は炎症に反応して能動的に遊走する性質を持つため、新規の薬物送達システムとして注目されている。実際ががん抗原特異的 T 細胞をキャリアとして用いることで、ナノ粒子キャリアより優れたがん集積性を示すことが明らかになっている。

一方で、脳への物質の透過制限は薬物だけでなく、免疫細胞にも当てはまり、T 細胞などは脳腫瘍病態時においてリンパ節に閉じ込められることが報告されている。がん組織内には様々な免疫細胞が存在しており、種々の刺激に応じてがん免疫環境が変化することが知られている。そのため、脳腫瘍病態時に適した薬物搭載免疫細胞の選定および免疫細胞が遊走しやすい腫瘍環境の調整が必須である。

2. 研究の目的

脳腫瘍移行性の高い免疫細胞を探索するとともに、腫瘍環境調節によって免疫細胞移行性を向上させ、免疫細胞に搭載した抗がん剤によって脳腫瘍を治療することを最終目的とした。本研究では、まず抗がん剤を封入したリポソームを用いて、免疫細胞に抗がん剤を搭載する手法の開発を行い、抗がん剤の放出性やがん細胞に対する傷害性をモデルがん細胞で評価した。続いて脳腫瘍モデルマウスを作製し、腫瘍内浸潤免疫細胞の同定や免疫細胞浸潤に関わるケモカイン発現を促進するための手法の検討を行った。



3. 研究の方法

(1) 抗がん剤封入リポソームの作製

搭載する抗がん剤としてドキソルビシンを使用した。リポソームとしてはマレイミド末端の PEG 脂質を含むリポソーム、カチオン性脂質を含むリポソームの 2 種類を用いた。前者はマレイミド基が細胞表面のチオール基と反応してリポソームを免疫細胞に共有結合させ、後者はリポソームの正電荷と細胞膜の負電荷の静電相互作用を利用して物理的に結合させた。Bangham 法でリポソームを作製した後、リモートローディング法を用いてドキソルビシンをリポソーム内に封入した。未封入のドキソルビシンは透析によって除去した。

(2) 抗がん剤封入リポソームの免疫細胞への搭載

免疫細胞としてはマウス由来の脾臓細胞を用いた。脾臓細胞に調製したドキソルビシン封入リポソームを添加して 30 分間インキュベーションした後、未搭載のドキソルビシン封入リポソームを除去した。免疫細胞に搭載されたドキソルビシン量は、ドキソルビシンの蛍光強度を測定することによって求めた。

(3) 抗がん剤封入リポソーム搭載免疫細胞からの抗がん剤保持・放出

ドキソルビシン封入リポソーム搭載免疫細胞をインキュベーションした 6 時間後、24 時間後に遠心を行った。上清を除去した後、細胞に残存したドキソルビシンの蛍光強度を測定することによってドキソルビシン保持能を評価した。また還元環境下におけるドキソルビシン放出を評

価するために、10 mM のグルタチオン存在下において 6 時間インキュベーションし、ドキシソルピシンの蛍光強度を測定した。

(4) 抗がん剤封入リポソーム搭載免疫細胞による皮下腫瘍に対する抗腫瘍効果

C57BL/6 マウスに LLC 細胞を皮下移植した (3×10^5 cells/mouse)。腫瘍体積が平均 100 mm³ になった時点をも 0 日とし、0 日目、4 日目、7 日目に治療を行った。投与群は PBS、脾臓細胞、ドキシソルピシン封入リポソーム (3 mg/kg)、ドキシソルピシン封入リポソーム搭載脾臓細胞 (3 mg/kg) であり、2 日おきに腫瘍体積を測定することで抗腫瘍効果を評価した。

(5) がん細胞の抗がん剤処置によるケモカイン発現変化

マウス膠芽腫細胞である CT-2A を播種したプレートに種々の濃度の 5-FU を添加して培養し、48 時間後に細胞を回収した。免疫細胞の遊走に關与するケモカインに対する抗体で染色し、フローサイトメトリー解析を行った。

(6) 脳腫瘍モデルマウスの作製

C57BL/6 マウスに三種混合麻酔を施した後、脳定位固定装置であるステレオタキシクおよびマイクロインジェクターを用いて CT-2A を脳室内投与した (10^5 cells/mouse)。

(7) 脳腫瘍中の免疫細胞浸潤評価

脳腫瘍モデルマウスから腫瘍を回収した。摘出した腫瘍を細切した後、消化酵素であるコラゲナーゼおよび Dispase を添加して 37 °C で 40 分間インキュベーションした。さらに DNase を添加した後に Gentle MACS dissociator を用いてホモジナイズし、がん細胞懸濁液を調製した。調製した細胞懸濁液に各種免疫細胞に対する抗体を加えて 4 °C で 20 分間インキュベーションして染色し、がん組織内に移行した免疫細胞をフローサイトメトリー解析した。

4. 研究成果

(1) 抗がん剤封入リポソームの免疫細胞への搭載と保持性評価

マレイミド末端の PEG 脂質を含むリポソーム、もしくはカチオン性脂質を含むリポソームを用いて脾臓細胞にドキシソルピシンを搭載した。マレイミド末端 PEG 脂質を用いた場合、リポソームの大部分が細胞表面に結合していることが確認され、ドキシソルピシン量として約 0.3 pg/cell 搭載されていた。一方でカチオン性脂質を用いた場合、リポソームは細胞表面だけでなく内部にも存在しており、搭載効率は 0.9 pg/cell であった。ドキシソルピシン搭載の観点ではカチオン性脂質を含むリポソームを使用する方がよいことが示唆された。また搭載されたドキシソルピシンの細胞保持率を評価したところ、いずれのリポソームを用いた場合でも 24 時間までに 80% 程保持されることが明らかになった。さらにマレイミドを介したリポソームと細胞との結合がグルタチオン存在下で切断されるか評価したところ、10 mM グルタチオンの存在下でドキシソルピシン保持率が低下した。このことから、マレイミド PEG 脂質を用いることで還元環境下での抗がん剤放出を促進できることが示された。

(2) 抗がん剤封入リポソーム搭載免疫細胞による抗腫瘍効果

調製したドキシソルピシン封入リポソーム搭載脾臓細胞を LLC 皮下移植マウスに静脈内投与し、腫瘍成長抑制効果を評価した。カチオン性脂質を含むリポソームを用いてドキシソルピシンを搭載した免疫細胞を投与しても、腫瘍成長抑制効果は全く見られなかった。マレイミド末端 PEG 脂質を含むリポソームを用いてドキシソルピシンを搭載した脾臓細胞の投与した場合は、腫瘍成長抑制効果が見られた。一方で、脾臓細胞単独やマレイミド末端 PEG 脂質を含むリポソームに封入されたドキシソルピシンのみの投与では抗腫瘍効果はみられなかった。以上の結果より、脾臓細胞にドキシソルピシンを搭載することで抗腫瘍効果が増強されることが示唆された。

(3) がん細胞の抗がん剤処置によるケモカイン発現変動

CT-2A 細胞に濃度の異なる 5-FU で暴露した際のケモカイン (CXCL-10、CCL-2) 発現量変化を測定した。1 μM の 5-FU の添加によって CXCL-10、CCL-2 の発現量が増加し、5 μM 以降では発現量がプラトーに達した。CXCL-10 は T 細胞、NK 細胞、樹状細胞の遊走を、CCL-2 は T 細胞、単球、樹状細胞の遊走を促すことが知られている。そのため、これらの細胞を薬物キャリアとして使用する際は、5-FU でがん細胞を前処置することが有用であることが示唆された。

(4) 脳腫瘍モデルマウスの作製と免疫細胞浸潤評価

腫瘍が定着・成長していることを体重変動によって評価した。CT-2A 細胞を細胞数を変化させて脳室内投与したところ、 10^5 cells/mouse で投与した際に全マウスにおいて移植 3 週間後以降に体重減少が観察された。また脳を摘出したところ、注射部位において腫瘍が定着していることが確認され、脳腫瘍モデルマウスを作製することができた。腫瘍組織中への免疫細胞の浸潤を評価したところ、生細胞中 3% 程度の免疫細胞が検出された。免疫細胞の構成についても評価したところ、CD11b 陽性細胞や CD11c 陽性細胞が大半を占めており、T 細胞は 10% 程度、B 細胞は 1%

以下であった。T 細胞や B 細胞を薬物キャリアとして用いる場合は、免疫細胞浸潤を促進する手法の併用が必要であることが示唆された。

以上の結果より、マレイミド末端 PEG 脂質を含むリポソームを用いることで、免疫細胞に抗がん剤を搭載することができ、抗がん剤による抗腫瘍効果を増強できることが明らかになった。また脳腫瘍モデルマウスを作製して腫瘍内の免疫細胞を評価したところ、CD11b 陽性細胞や CD11c 陽性細胞の割合が多いことが明らかになった。さらにがんを抗がん剤処理することにより、CXCL-10 や CCL-2 のケモカイン発現が増加しており、免疫細胞のがん組織への浸潤を促進できる可能性があることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松木佑樹、清水太郎、安藤英紀、異島優、石田竜弘
2. 発表標題 ドキシソルピシン封入りポソーム搭載脾臓細胞による抗腫瘍効果の検討
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023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
研究分担者	石田 竜弘 (Ishida Tatsuhiko) (50325271)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(薬学域)・教授 (16101)	
研究分担者	異島 優 (Ishima Yu) (00457590)	京都薬科大学・薬学部・教授 (34306)	

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