

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 14 日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23700567

研究課題名(和文) 物理・免疫融合療法に用いる *in situ* 癌免疫誘導のためのナノ構造アジュバント研究課題名(英文) Nanostructured Adjuvant for *in situ* Cancer Vaccination Used in Combined Physical-Immunotherapy

研究代表者

王 秀鵬 (WANG, XIUPENG)

独立行政法人産業技術総合研究所・ヒューマンライフテクノロジー研究部門・主任研究員

研究者番号：70598789

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：キャリアとして二価陽イオン含有TCPナノ粒子やポアサイズを調整したメソポーラスシリカ粒子を選択した。これに免疫刺激分子(菌体由来物質等)をリン酸カルシウム飽和溶液中で共沈現象によって複合化して、アジュバント候補材料とした。

新規のアジュバント候補材料は *in vitro* 実験によって免疫活性を示した。作製したアジュバント候補材料のがん免疫獲得に対する有効性を示した。新規のアジュバント候補材料を注入すると、マウス脾臓とリンパ球中に細胞性免疫に関連するサイトカイン(例えば、IL-2およびIFN γ)の分泌が増大され、細胞性免疫に関連する免疫活性が高まった事が要因であると分かった。

研究成果の概要(英文)：Zn-, and Mg-containing tricalcium phosphates (TCP) and mesoporous silica (MS) with controllable pore size were selected as carriers for immune stimulating molecules (pathogen-associated molecular patterns-PAMPs). Using a PAMPs-containing supersaturated calcium phosphate solution, PAMPs-apatite composites were coprecipitated with TCP/MS to prepare the TCP/MS based adjuvants.

The TCP/MS based adjuvants showed *in vitro* and *in vivo* immunogenic activities. The TCP/MS based adjuvants mixed with liquid-nitrogen-treated tumor tissue markedly inhibited the *in vivo* development of rechallenged Lewis lung carcinoma cells. The cellular immune related cytokines (IL-2, IFN γ , etc.) secretion in spleen and lymphocytes were improved after the TCP/MS based adjuvants injection. The TCP/MS based adjuvants contributed to eliciting cellular immune related antitumor immunity *in vivo*.

研究分野：総合領域

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：アジュバント 癌免疫

1. 研究開始当初の背景

今や癌は日本では第一位、世界でも主要な死亡原因となり、癌治療研究は社会的にも重要性が増している。今日、多くの研究者が種々の癌治療法を探索している。

中でも癌の免疫療法は、ヒトが元来持つ免疫系を利用し、免疫細胞(細胞傷害性細胞)を正常な細胞を傷つせずに腫瘍細胞のみを認識・破壊するよう活性化する新規の癌治療法として注目されている。

理論的には免疫細胞は腫瘍細胞上の抗原を認識し、腫瘍細胞を破壊する。しかし一般に腫瘍抗原は免疫系の刺激が弱いため、免疫細胞が腫瘍細胞を認識できないことが多く、免疫療法には免疫賦活剤(アジュバント)の投与が必須である。そこで本研究では新規の高性能アジュバントを開発する。

2. 研究の目的

本研究課題では、癌免疫療法に使用可能なナノ構造を有する無機粒子(ナノ構造無機粒子)とシグナル分子を組み合わせた高免疫活性を有するアジュバントの作製を行う。さらに、このアジュバント(必要に応じて自家がん抗原)を既存の物理療法や外科的処置を施した患部に注入することで *in situ* ワクチンとして機能させる、効果的な腫瘍特異免疫療法を開発するための基礎的研究を行う。

本研究課題の具体的な目的は以下の3点である。すなわち、(1)毒性が低くアジュバント能の高いナノ構造無機粒子を調製する、(2)シグナル分子の担持条件を最適化する、及び(3)作製したアジュバントを物理療法や外科的処置と併用して効果と安全性を *in vivo* で確認する。

3. 研究の方法

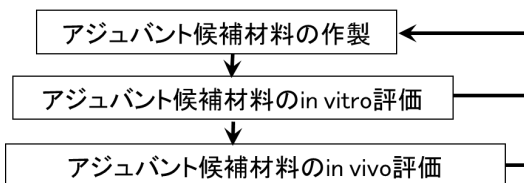


図1、本研究の実施状況

高い免疫活性が期待できるシグナル分子とナノ構造無機粒子を複合させたアジュバントは以下の点を踏まえて作製される。低毒性且つ高アジュバント能を達するため、(1)ナノ構造無機粒子の化学組成、粒子径及び表面特性を制御する、(2)シグナル分子の種類及び担持方法の最適化を検討する。候補

材料が作製された後、それらの安全性、及び抗腫瘍免疫応答の亢進について動物実験モデルを用いて評価する。

(1) アジュバント候補材料の作製

数種類のナノ構造無機粒子を調製し、シグナル分子を添加したリン酸カルシウム過飽和溶液に分散させる。シグナル分子は、リン酸カルシウムとの共沈現象によってナノ構造無機粒子と複合化され、アジュバント候補材料が作製される。安全性及び抗腫瘍免疫応答を同時に高めたアジュバント候補材料を得るため、複合化するシグナル分子種及びその担持条件、及びナノ構造無機粒子の組成(Mg、Znによる部分置換)、直径、表面特性等の各パラメータを最適化する。早期に有望な材料が得られた場合には、*in vitro* 評価と *in vivo* 評価を開始する。

(2) アジュバント候補材料の *in vitro* 評価

アジュバント候補材料は、安全性及び免疫活性能について以下の二段階で *in vitro* 評価を行なう。

安全性評価：細胞培養系にアジュバント候補材料を添加し、細胞増殖速度を評価する。アジュバント候補材料を添加しない系と比較して細胞増殖速度が同等であれば、安全性が高いと判断し、免疫活性能の評価に用いる。

免疫活性能評価：免疫担当細胞の培養系にアジュバント候補材料を添加し、約2日間培養する。その後培養液中の免疫活性マーカーの産生量を定量し、比較物質(リポ多糖:LPS)で刺激を与えた場合の産生量と比較することで免疫活性能を評価する。

安全性評価及び免疫活性能評価の結果は逐一アジュバント候補材料の作製行程にフィードバックさせる。

(3) アジュバント候補材料の *in vivo* 評価

安全且つ高い免疫活性能が認められたアジュバント候補材料は、腫瘍治療効果及び抗腫瘍形成効果を検討するため *in vivo* 評価に供する。

マウス背部皮下に腫瘍細胞を播種し、腫瘍を形成したモデルを作製する。この腫瘍を物理療法や外科的処置で治療した後にアジュバント候補材料(必要に応じて自己抗原)を注入する。一定期間後、別箇所同一の腫瘍細胞を再度播種し、腫瘍の成長の経過観察を行う。抗腫瘍免疫応答が高められれば、腫瘍の再発が起こらないはずである。*In vivo* 評価の結果は逐一アジュバント候補材料の作

製行程にフィードバックさせる。

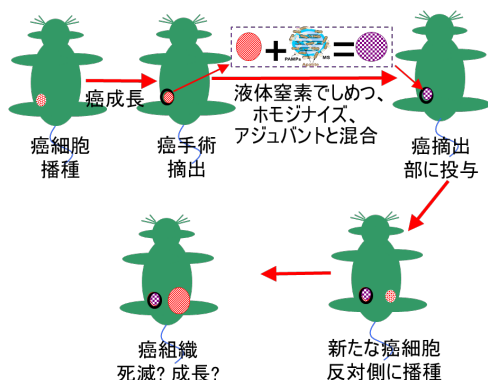


図2、アジュバントの in vivo 評価

4. 研究成果

本研究課題では、安全性を保持しつつ癌免疫療法に使用可能な、ナノ構造を有する無機粒子とシグナル分子を組み合わせた高免疫活性を有するアジュバントを開発した。成果の詳細は以下の通りである。

キャリアとなる無機粒子として二価陽イオン(マグネシウム、または亜鉛)含有のTCP(Mg-TCP、Zn-TCP)やポアサイズを調整したメソポーラスシリカ粒子を合成した。Mg-TCP、Zn-TCP 粒子の流体力学半径は500~600 nmであった。メソポーラスシリカ粒子のポアサイズは4~10 nmであった。シグナル物質には菌体由来物質を選択した。Mg-TCP、Zn-TCP やメソポーラスシリカ粒子と菌体由来物質はリン酸カルシウム飽和溶液中で共沈現象によって複合化して、アジュバント候補材料とした。

新規のアジュバント候補材料は in vitro 実験によって有効性のスクリーニングを行った。詳細には、癌免疫の活性化に重要な抗原提示細胞のモデルであるマクロファージ様細胞の培養系にアジュバント候補材料を添加し、40時間培養後に免疫活性の指標となる培養液中のサイトカイン量を定量した。In vitro 免疫活性評価では二価陽イオン含有TCP ナノ粒子やメソポーラスシリカ粒子を用いたアジュバント材料は免疫活性を示した。TCP 粒子同士を比較すると、二価陽イオン(マグネシウム、亜鉛)含有量が 1.5 mol% の TCP を用いたアジュバントでは、添加量が 1 µg/mL で最も in vitro 免疫活性が高まる事が分かった。メソポーラスシリカ粒子同士を比較すると、ポアサイズ 10 nm の粒子を用いたアジュバントの免疫活性が最も高かった。

これらのアジュバント候補材料は 1-10 µg/mL の濃度範囲であれば細胞毒性をほとんど示さず、この手法で安全性を保持しつつ

有効性を発揮させられるアジュバントが作製可能である事が示唆された。

作製したアジュバント候補材料のがん免疫獲得に対する有効性を確認した。まず、がん治療モデルマウスに固定化自家がん抗原と共存するようにメソポーラスシリカアジュバント材料を皮下注入した。コントロールグループには現在唯一臨床で使用可能のアラムアジュバントを注入した。免疫獲得に十分とされる飼育期間の後、それらのマウスに再度腫瘍細胞を皮下注入し、30日間観察を続けたところ、メソポーラスシリカ粒子を用いたアジュバント注入したマウスは腫瘍の成長速度は遅く、マウス体内でがん細胞に対する免疫が確立されたものと考えられた。

腫瘍の成長を抑制するメカニズムとして、新規のアジュバント候補材料を注入すると、マウス脾臓とリンパ球中に細胞性免疫に関連するサイトカイン(例えば、インターロイキン-2およびインターフェロン)の分泌が増大され、細胞性免疫に関連する免疫活性が高まった事が要因であると分かった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計5件)

[Xiupeng Wang, Xia Li, Atsuo Ito, Yu Sogo, Tadao Ohno](#), Pore size-dependent immunogenic activity of mesoporous silica-based adjuvants in cancer immunotherapy, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 査読有、vol.102A, 2014, pp. 967-974, doi: 10.1002/jbm.a.34783

[Xiupeng Wang, Xia Li, Atsuo Ito, Yu Sogo, Tadao Ohno](#), Particle-Size-Dependent Toxicity and Immunogenic Activity of Mesoporous Silica-Based Adjuvants for Tumor Immunotherapy, *Acta biomaterialia*, 査読有、vol.9, 2013, pp.7480-7489, <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2013.03.031>

[Xiupeng Wang, Xia Li, Kazuo Onuma, Yu Sogo, Tadao Ohno, Atsuo Ito](#), Zn- and Mg-Containing Tricalcium Phosphates-Based Adjuvants for Cancer Immunotherapy, *Scientific Reports*, 査読有、vol.3, 2013, pp.2203 (7pp), doi:10.1038/srep02203

[Xiupeng Wang, Xia Li, Yu Sogo, Atsuo Ito](#), Simple Synthesis Route of Mesoporous AlOOH Nanofibers to Enhance Immune Responses, 査読有、*RSC Advances*, vol.3, 2013, pp.8164-8167,

DOI: 10.1039/C3RA40881G

Xia Li, Xiupeng Wang, Yu Sogo, Tadao Ohno, Kazuo Onuma, Atsuo Ito, Mesoporous silica-calcium phosphate-tuberculin purified protein derivative composites as an effective adjuvant for cancer immunotherapy, *Advanced healthcare materials*, 査読有、vol.2、2013、pp.863-871、
doi: 10.1002/adhm.201200149

〔国際学会招待講演〕(計4件)

王秀鵬、伊藤敦夫、李霞、十河友、
“Ceramic-based adjuvants for cancer immunotherapy”, 13th Asian BioCeramics Symposium (ABC2013), Kyoto University, Japan, 2013.12.4 (invited speech).

伊藤敦夫、六崎裕高、鶴嶋英夫、伊藤嘉朗、王秀鵬、李霞、十河友、大矢根綾子、大野忠夫、
“Signal Molecules-Apatite Composites for Soft Tissue Regeneration and Cancer Immunotherapy”, The 4th Asian Biomaterials Congress, Hong kong (China), 2013.6.28 (invited speech)

伊藤敦夫、王秀鵬、李霞、十河友、大野忠夫、
“Ceramic-based adjuvants loaded with immunogenic molecules for cancer immunotherapy”, International Conference on Regenerative Biomedical Materials, Wuhan (China), 2013.6.3 (invited speech)

伊藤敦夫、十河友、大矢根綾子、王秀鵬、李霞、鶴嶋英夫、六崎裕高、
“Signal molecule-apatite composite layers; from enhanced tissue regeneration to cancer immunotherapy”, Asian Bioceramics Symposium, Tainan, 2012.11.19 (invited speech)

〔国際学会一般講演〕(計3件)

王秀鵬、李霞、伊藤敦夫、十河友、
“Nanoparticle-Signal Molecule-Apatite Composite Adjuvants for Cancer Immune Therapy”, 9th World Biomaterials Congress, Chengdu (China), (2012.6)

王秀鵬、李霞、伊藤敦夫、十河友、
“Novel Apatite-Pathogen-Associated Molecular Patterns Adjuvants for Cancer Immune Therapy”, 24th symposium and annual meeting of international society for

ceramics in medicine, Kyushu University (Japan), (2012.10)

王秀鵬、李霞、伊藤敦夫、十河友、
“Cytotoxicity and immunoreaction of nanoparticles coated with signal molecule-apatite composite layer”, The 11th Asian BioCeramics Symposium, Tsukuba (Japan), (2011.11)

〔国内学会一般講演〕(計7件)

王秀鵬、伊藤敦夫、辻典子、
“Mesoporous Silica-Based Adjuvants for Cancer Immunotherapy”, 第42回日本免疫学会学術集会、幕張メッセ(千葉市), 2013.12.12

王秀鵬、伊藤敦夫、李霞、十河友、
「がん免疫療法のためのシリカ系アジュバント」, 第35回日本バイオマテリアル学会、タワーホール船堀, 2013.11.26

王秀鵬、李霞、十河友、伊藤敦夫、
“Enhancing Immune Responses by Mesoporous AlOOH Nanofibers”, 公益社団法人日本セラミックス協会 第26回秋季シンポジウム、信州大学(長野キャンパス), 2013.9.4

王秀鵬、李霞、十河友、伊藤敦夫、
“Promising adjuvants prepared by Zn/Mg-doped tricalcium phosphate and pathogen-associated molecular patterns”, 日本セラミックス協会、東京工業大学(大岡山キャンパス), 2013.3.17

王秀鵬、李霞、伊藤敦夫、十河友、
「ツベルクリン-メソポーラスシリカ-リン酸カルシウム複合ナノ粒子の癌免疫療法アジュバントへの応用」, 公益社団法人日本セラミックス協会 2012 年年会、京都大学, 2012.3.19

王秀鵬、李霞、伊藤敦夫、十河友、
「がん免疫療法のためのセラミック系アジュバント」, 日本バイオマテリアル学会、宮城県仙台市, 2012.11.27

十河友、王秀鵬、李霞、伊藤敦夫、後藤康之、大野忠夫、内村英次、山崎淳司、
「免疫アジュバントとしての精製ツベルクリンアパタイト複合ナノ粒子の作製」, 公益社団法人日本セラミックス協会 2012 年年会、京都大学(吉田キャンパス), 2012.3.19

〔図書〕(計1件)

Xiupeng Wang, Ayako Oyane, and Atsuo

Ito, "Chapter 6, Signal Molecule-Calcium Phosphate Composites: Novel Approaches to Controlling Cellular and/or Biological Reactions and Functions," B. Ben-Nissan ed., Advances in Calcium Phosphate Biomaterials, Springer, 2014, pp 171-197

〔産業財産権〕

出願状況（計 1 件）

名称：免疫刺激因子担持微粒子
発明者：王秀鵬、李霞、伊藤敦夫、十河友、大野忠夫、坪井康次、Gerelchuluun Ariungerel
権利者：産業技術総合研究所、セルメディン株式会社
種類：特許
番号：特願 2012-256469
出願年月日：2012.11.22
国内外の別：国内

6 . 研究組織

(1)研究代表者

王 秀鵬 (Xiupeng Wang)
独立行政法人 産業技術総合研究所 主任
研究員

研究者番号：70598789

(3)連携研究者

伊藤 敦夫 (Atsuo Ito)
独立行政法人 産業技術総合研究所・研究グループ長

研究者番号：30356480