

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：84409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24590500

研究課題名(和文) トル様受容体2リガンドの人工設計とアジュバントへの応用

研究課題名(英文) Development of designed TLR2 ligand as antitumor immunoadjuvant

研究代表者

赤澤 隆 (Takashi, Akazawa)

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪府立成人病センター(研究所)・その他部局等・主任研究員

研究者番号：80359299

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々は天然リポペプチドの菌由来ペプチド配列を機能配列へ置換することにより、付加機能を持つTLR2リガンドを人工設計するアジュバント・エンジニアリング戦略を展開してきた。この戦略において、樹状細胞の効率的な活性化と他の免疫細胞応答の低減を目的に、樹状細胞標的化リポペプチド・h11cを人工設計した。h11cは既知の人工リポペプチドP2C-SK4よりも低用量で抗がん効果を示し、ワクチン投与部位に誘発される皮膚炎症を回避した。h11cは人工設計によって有効性の向上と副作用の回避を実現した理想的アジュバントであり、抗がん免疫アジュバントの実用化候補として期待される。

研究成果の概要(英文)：We have developed adjuvant engineering strategy to design the TLR2 ligand with new ability by replacing the peptide of bacterial origin with a functional motif. We designed a new dendritic cell (DC)-targeting lipopeptide, h11c (P2C-ATPEDNGRSFS), which uses the CD11c-binding sequence of ICAM-1 to selectively and efficiently activate DCs but not other immune cells. Although P2C-SK4 is well known as artificial lipopeptide and has strong immunostimulatory activity, h11c induces stronger antitumor activity at low doses without local inflammation at vaccination site of skin. The h11c is the ideal antitumor immunoadjuvant that improvement of the efficiency and the evasion of the adverse effects were realized by functional design.

研究分野：腫瘍免疫

キーワード：腫瘍免疫 アジュバント ワクチン 人工設計 Toll-like receptor 癌 免疫 リポペプチド

1. 研究開始当初の背景

がん・感染症対策のワクチン戦略において強力なアジュバントの開発が期待されている。報告者は、これまでに、がん免疫療法で臨床応用されるウシ結核菌・細胞骨格成分 (BCG-CWS) の基礎・臨床研究に携わり、種々の TLR リガンドをがん治療へ応用する研究を進めてきた。TLR リガンド・微生物アジュバントには、菌体からの精製物も多く、安定性や供給面、多様すぎる活性など、種々の懸案事項も存在する。これらの問題を解決するためには、合成可能で免疫賦活作用を限定した人工アジュバントを開発する必要があった。

天然 TLR2 リガンドとして知られるマイコプラズマ由来マクロファージ活性化リポペプチド (MALP2) は BCG-CWS と同じ TLR2 リガンドとして働く。MALP2 はマイコプラズマ由来の 14 アミノ酸・ペプチドの N 末端システインがパルミチン酸 2 分子に修飾された構造を持つ。特殊修飾された N 末端システイン (Pam 2 Cys) は、TLR2 リガンドの基本骨格であり、化学合成可能である。さらに、結合するペプチド部分は改良・付加が容易である事に着目した。すなわちバクテリア由来のペプチド配列を種々の機能配列 (生理活性ペプチド) に置換する人工設計によって、「天然に存在しない」「追加サポート機能を持つ」TLR2 リガンドの作製が可能であった。これらを新規抗がんアジュバントとして開発する創薬戦略「アジュバント・エンジニアリング」を立案し、10 機能コンセプトを基に約 40 化合物を合成・評価を行った。

2. 研究の目的

報告者のアジュバント・エンジニアリング戦略よりオリジナルのアジュバント候補 6 化合物 (A、B、C、CL、D、E) が得られていた。これらのマウス in vivo 腫瘍移植モデルにおける抗がん免疫アジュバント効果を評価した上で、本研究課題における優先順位をつけ、化合物 B を実用化の第一候補として、特許出願を目的とした詳細評価を行った。

なお、化合物 A は本申請課題開始前に試作化合物として開発・評価を実施しており、既に報告済みである。化合物 C/CL は興味深いサイトカイン・IFN 産生プロファイルを示す人工設計 TLR2 リガンドとなったが、期待したほどの抗がん効果が得られなかったため、本研究課題における開発は中止した。また、化合物 D/E は電荷を利用して非特異的細胞接着性を高めた TLR2 リガンドであり、これを応用した自家がんワクチン療法の検討については現在も継続して進めている。

3. 研究の方法

機能性に基づいた設計で得られたアジュバント候補化合物は、細胞への単純刺激 (混合培養) 応答では、その機能性・利便性が判

断できない部分が多い。例えば化合物 B は特に副作用の回避に有効であり、化合物 D/E は自家がんワクチン調製において利便性を高めたツールとしてデザインしたため、付加価値の評価は、それぞれに適した評価系を準備する必要があった。このため、in vivo マウス腫瘍移植モデルでの抗がん効果を中心に評価を進め、付加価値・付加機能 (副作用の低減など) を同時に評価した。また、invitro 実験では、脾臓細胞のようなバルクの細胞集団を用いるなど、細胞間相互作用への影響を中心に評価を行った。なお、比較対象として、抗がん効果の弱い天然リポペプチド・MALP-2 (P2C-GNNDESNISFKEK)、強力な抗がん効果を持つことが知られる既報の人工リポペプチド P2C-SK4 ((P2C-SK4KK)) を使用した。

4. 研究成果

化合物 B (P2C-ATPEDNGRSFS, h11c):

化合物 A (P2C-RGDS) をはじめ、単純に抗がん効果の増強を示す人工リポペプチドの設計には成功したが、その多くは投与部位の皮膚に過剰な免疫応答・副作用 (炎症・壊死) を誘発する。既知の人工リポペプチド P2C-SK4 を含め、この副作用応答は抗がん効果に相関する傾向があった。しかし、この副作用を回避したのが、樹状細胞標的化リポペプチドの化合物 B・h11c であった。ICAM-1 内に存在する配列 (ATPEDNGRSFS) が樹状細胞マーカーである CD11c/CD18 に親和性を持つことが報告されており、これを応用した。(図 1)

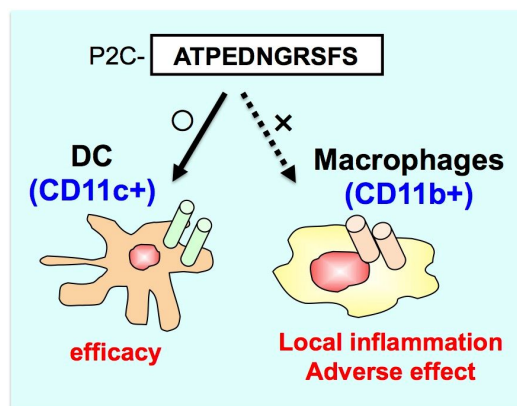


図 1 h11c の性質

h11c は樹状細胞選択性に基づき、効率的な樹状細胞の活性化 (低用量での有効性) への免疫細胞の応答低減 (副作用の回避) が期待された。実際、h11c は、P2C-SK4 と比較して、in vivo マウス腫瘍移植モデル (EG7-OVA) において、低用量でも有意な抗がん効果を示し (図 2)、さらに、ワクチン投与部位・皮膚における炎症応答 (肥厚・出血病変) を回避することが明らかとなった (図 3)。

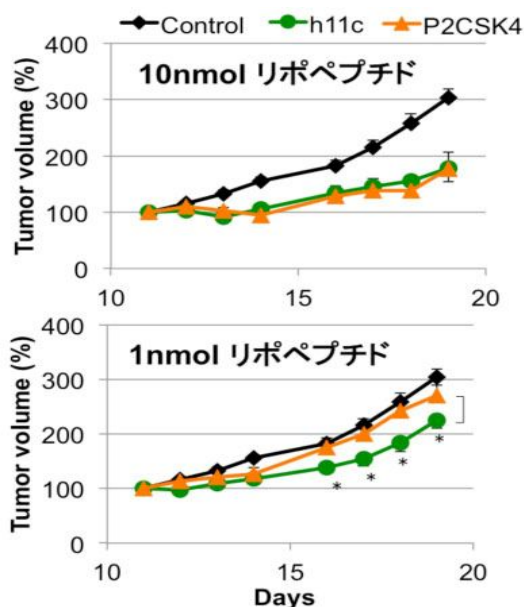


図2 マウス腫瘍移植モデルにおける抗がん免疫アジュバント活性

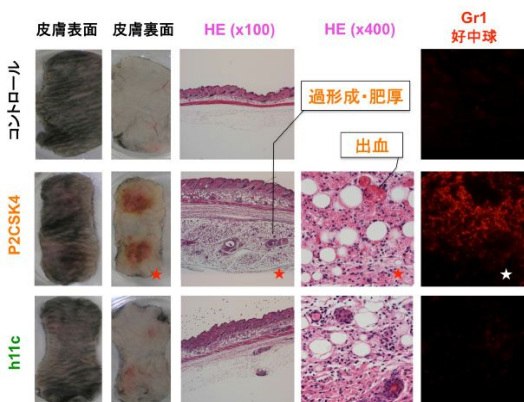


図3 ワクチン投与部位の皮膚応答

さらに、皮膚の炎症組織には好中球の集積（Gr1 陽性細胞）が認められたが、好中球走化因子である MIP-2 は通常、CD11c 陽性の樹状細胞は産生せず、CD11b 陽性のマクロファージが産生する。樹状細胞とマクロファージを含む脾臓細胞を刺激した場合、h11c はマクロファージよりも樹状細胞を選択的・優先的に刺激することが予想され、実際に h11c の誘導する MIP-2 量は P2C-SK4 よりも有意に少ないことが明らかとなった（図4）。

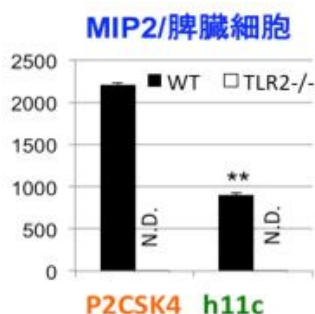


図4 好中球走化因子 MIP-2 産生量

これらの結果は、樹状細胞標的化という機能的な人工設計によって、有効性の上昇と副作用の回避が実現したことを示唆する。h11c は臨床応用の第一候補化合物として PCT 出願・国内移行の後、国内特許を取得した。（発表論文 ，出願・取得特許）

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計6件)

Takemura R, Takaki H, Okada S, Shime H, Akazawa T, Oshiumi H, Matsumoto M, Teshima T, Seya T. PolyI:C-Induced, TLR3/RIP3-Dependent Necroptosis Backs Up Immune Effector-Mediated Tumor Elimination In Vivo. *Cancer Immunol Res.* 2015 Aug;3(8):902-14. 査読有

Inoue N and Akazawa T IL17A (interleukin 17A). *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology.*2015. 19(1) 18-27. 査読有

Akazawa T, Ohashi T, Nakajima H, Nishizawa Y, Kodama K, Sugiura K, Inaba T, Inoue N. Development of a dendritic cell-targeting lipopeptide as an immunoadjuvant that inhibits tumor growth without inducing local inflammation. *Int J Cancer.* 2014 Dec 15;135(12):2847-56. 査読有

Kodama K, Higashiyama M, Okami J, Tokunaga T, Fujiwara A, Inoue N, Akazawa T and Seya T. A possible abscopal effect of post-irradiation immunotherapy in two patients with metastatic lung tumors. *In Canc Conf J.* 2014 Apr; 3(2): 122-7. 査読有

Wijewardana V, Sugiura K, Yahata M, Akazawa T, Wijesekera DP, Imamoto S, Hatoya S, Inoue N, Inaba T.
Production of canine soluble CD40 ligand to induce maturation of monocyte derived dendritic cells for cancer immunotherapy. Vet Immunol Immunopathol. 2013 Nov 15; 156(1-2):121-7. 査読有

Ohashi T, Akazawa T, Aoki M, Kuze B, Mizuta K, Ito Y, Inoue N.
Dichloroacetate improves immune dysfunction caused by tumor-secreted lactic acid and increases antitumor immunoreactivity. Int J Cancer. 2013 Sep 1;133(5):1107-18.
査読有

〔学会発表〕(計6件)

赤澤 隆, 大橋 敏光, 井上 徳光. 免疫細胞標的化トル様受容体2リガンドの人工設計と抗がんアジュバントへの応用. 日本がん免疫学会(2012年7月26~28日, 一般口演, 札幌)

Akazawa T, Ohashi T, Inoue N. Adjuvant engineering for cancer immunotherapy: Improved synthetic TLR2 ligand with DC targeting ability. 日本癌学会(2012年9月19~21日, ポスター, 札幌)

赤澤 隆, 大橋 敏光, 井上 徳光. アジュバントの人工設計: 樹状細胞標的化リポペプチドは局所炎症を起こさない理想的なアジュバントとして働く. 日本癌学会(2013年10月3~5日, 一般口演, 横浜)

赤澤 隆, 井上 徳光. CR4 サブユニットを標的とした抗がん免疫アジュバント. 補体シンポジウム(2013年6月5~6日, 一般口演, 旭川)

Akazawa T, Inoue N. Modification of tumor cells with bacterial components and application to vaccine. 日本癌学会(2014年9月25~27日, 一般口演(英語), 横浜)

Akazawa T, Inoue N. Development of bacteria-mimicked tumor cell vaccine modified with engineered TLR2 ligands
日本がん免疫学会(2015年7月9~11日, 一般口演+ポスター, 東京)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)
名称: 新規人工設計リポペプチド
発明者: 赤澤 隆, 井上 徳光
権利者: 地方独立行政法人大阪府立病院機構
種類: 特許
番号: PCT/JP2013/59317
出願年月日: 平成25年3月28日
国内外の別: 国際特許(PCT)
(国内移行: 平成26年9月30日・特願2014-508043)

取得状況(計1件)

名称: 新規人工設計リポペプチド
発明者: 赤澤 隆, 井上 徳光
権利者: 地方独立行政法人大阪府立病院機構
種類: 特許
番号: 特許第5845486号
取得年月日: 平成27年12月4日
国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ
地方独立行政法人大阪府立病院機構
大阪府立成人病センター
研究所 腫瘍免疫学部門
<http://www.mc.pref.osaka.jp/laboratory/department/shuyou/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者
赤澤 隆 (AKAZAWA Takashi)
地方独立行政法人大阪府立病院機構
大阪府立成人病センター(研究所)・
研究所・主任研究員(腫瘍免疫学部門)
研究者番号: 80359299

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者

井上 徳光 (INOUE Norimitsu)
地方独立行政法人大阪府立病院機構・
大阪府立成人病センター(研究所)・
研究所・部門長(腫瘍免疫学部門)
研究者番号: 80252708

杉浦 喜久弥 (SUGIURA Kikuya)
大阪府立大学・生命環境科学研究科・
准教授
研究者番号: 30171143