

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：14101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24650259

研究課題名(和文)疎水化多糖ナノゲルのイムノトランスポーター機能の機構解析と新規がん治療法への展開

研究課題名(英文) Analysis of immunotransporter function of the hydrophobized polysaccharide-based nanogel and its application to cancer therapy

研究代表者

原田 直純 (Harada, Naozumi)

三重大学・医学(系)研究科(研究院)・リサーチアソシエイト

研究者番号：40520961

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)：疎水化多糖が水溶液中で形成するナノゲル(～50 nm)の内部には、ペプチドや蛋白等を包埋することができる。本研究では、がんペプチド抗原をナノゲル中に包埋し、がんワクチンとしてマウスに皮下投与したときのナノゲルのデリバリーシステムとしての機能を検討した。その結果、ナノゲルがペプチド抗原を近傍リンパ節内に細胞非依存的に輸送すること、ナノゲルの粒子径や表面電荷が輸送に大きな影響を及ぼすこと、輸送先は抗原提示活性の高い特定のマクロファージであることを見出した。このナノゲル応用リンパ節マクロファージ指向型がんワクチンは、従来型のがんワクチンよりも格段に優れた免疫誘導能力と抗がん効果を示した。

研究成果の概要(英文)：Hydrophobic polysaccharide was synthesized by partially modifying hydrophilic polysaccharide with cholesterol groups. In aqueous solution, it forms a nanogel with a diameter of ~50 nm, in which proteins or peptides can be embedded. In this study, we created a cancer vaccine consisting of the nanogel and a tumor antigen peptide, and the mechanism of antigen delivery function of the nanogel was investigated using mice. The nanogel efficiently transported antigen to unique subsets of lymph node macrophages with high antigen-presenting activity, at least partly in a cell-independent manner. This macrophage-oriented vaccine system showed an enhanced anti-tumor effect and immunogenicity, as compared to a conventional one.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：医用生体工学・生体材料学

キーワード：ナノゲル デリバリーシステム リンパ節 がんワクチン マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

近年、免疫疾患だけでなく、がんを初めとする他の様々な疾患にも免疫系が正負両側面で深く関わっていることが明らかとなってきた。抗原提示反応などの免疫反応の主要な過程は、全身に存在するリンパ節で進行する。よって、リンパ節に治療物質を送達することにより免疫反応を人為的に制御し、免疫系が関わる疾患に対し治療効果をもたらすというアプローチが考案されてきた。その典型例はワクチンである。しかしながら、リンパ節選択的デリバリーシステムの重要性については最近、注目され始めたところであり、その理論的基盤は世界的にも未発達である。

2. 研究の目的

我々は、独自に創製した疎水化多糖ナノゲルのドラッグデリバリーシステムとしての評価研究を通じ、当該ナノゲルがリンパ節に物質を選択的かつ高効率に送達する能力「イムノトランスポーター機能」を有することを見出した。疎水化多糖ナノゲルはペプチドや蛋白質と容易に複合体化でき、リンパ節へのペプチド医薬・蛋白質医薬の効率的送達を実現する。この独創的なデリバリーシステムを用いたリンパ節デリバリーの実験系を構築し、以下の点を目的として研究を進める。

- (1) 疎水化多糖ナノゲルのイムノトランスポーター機能の機序を解明し、革新的デリバリーシステムとしての理論的基盤を築く。
- (2) 疎水化多糖ナノゲルを応用した腫瘍局所リンパ節環境の人為的制御による新規がん治療技術を創出する。

3. 研究の方法

- (1) 疎水化多糖ナノゲルのイムノトランスポーター機能(リンパ節選択的送達)の機序を明らかにするため、まず送達細胞依存性か否かを明らかにする。次いで、ナノゲルが有する種々の物理化学的性質(サイズや電荷等)や投与条件のうち、どの因子がどのように送達に影響するのかを、in vivo 系で特定する。得られた情報に基づいて送達の機序を推定する。
- (2) (1)の成果を基に最も高性能の疎水化多糖ナノゲルを選択し、種々の治療薬との複合体を作製する。得られた複合体を腫瘍移植マウスの腫瘍局所リンパ節近辺に皮下投与し、リンパ節への治療薬送達、抗腫瘍効果、リンパ節内の免疫学的環境や腫瘍免疫応答の変化を解析する。他のがん治療法との併用療法も検討する。

4. 研究成果

- (1) 疎水化多糖ナノゲルのイムノトランスポーター

一機能(リンパ節選択的送達)の機序の解明

デリバリーシステム「疎水化多糖ナノゲル」がどのような機序でリンパ節選択的に物質を輸送するのか、マウスを用いた in vivo 系で解析した。輸送が細胞依存性か非依存性かを知るため、異なる種類の蛍光色素(FAMまたはTAMRA)で標識ペプチドを用意し、それぞれをナノゲルとの複合体を作製した。これらの疎水化多糖ナノゲル:ペプチド複合体をマウスの離れた部位、ただし従属リンパ節は同じとなる部位に皮下投与した。この系では、細胞依存性に輸送される物質は従属リンパ節内で異なる抗原提示細胞に含まれ、細胞非依存性に輸送される物質は同じ抗原提示細胞に含まれる形で検出される(図1)。結果として、疎水化多糖ナノゲル:ペプチド複合体の場合は後者のケースが認められ(データ省略)、細胞非依存性輸送が関わることが明らかになった。

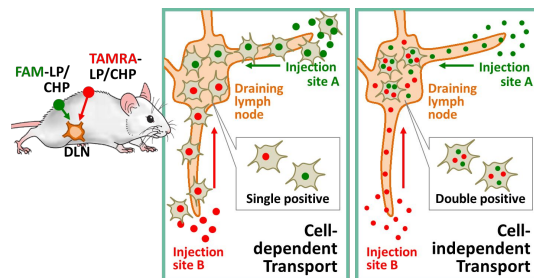


図1. リンパ節への細胞依存性・非依存性の物質輸送を判別するための実験系

リンパ節への細胞非依存性の粒子輸送では、粒子のサイズや表面電荷、粒子の材質に対する特異的レセプターの存在が輸送効率に大きく影響すると言われている。すなわち、粒子サイズは粒子がリンパ管の壁に存在する孔隙を通過するのに重要で、およそ100 nmより大きい粒子は通過できないと言われている。また、10 nmより小さいと容易に血管壁を通過し漏出するとも言われている。粒子の表面電荷は、陽性であれば陰性であれば、投与部位近辺の細胞や細胞外マトリクスへの吸着を促進することにより、リンパ管に到達する粒子を減らしてしまうと予想される。同様に粒子を構成する材質に対するレセプターがリンパ器官以外に存在する場合、投与した粒子はレセプターを発現する組織・器官に集積してしまい、リンパ器官に到達しにくくなると予想される。我々は、疎水化多糖ナノゲルのリンパ節への輸送がこうした粒子サイズや電荷により影響されない場合は、その輸送機構は細胞依存性であるという仮説を立てて検証した。その結果、皮下投与された疎水化多糖ナノゲルのリンパ節への輸送は、粒子サイズと電荷の存在により顕著に低下した(図2)。このことから、疎水化多糖ナノゲルのリンパ節への輸送はやはり細胞非依存性である可能性が高いと考えられた。なお、本研究

で用いている疎水化多糖ナノゲルは、材料としてプルランという多糖を使用している。ヒトではプルランに対するレセプターは肝臓にのみ発現していることが報告されており、したがって、プルランを用いた疎水化多糖ナノゲルは、皮下投与後に投与部位周辺でレセプターに捕捉されることはないと考えられる。つまり、プルランのようなレセプターが系に關与しない多糖を用いることで、疎水化多糖ナノゲルがリンパ節に移行しやすい条件が得られていると解釈している。

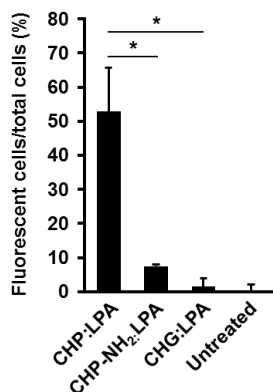


図 2. 疎水化多糖ナノゲルの粒子サイズと表面電荷がリンパ節輸送に及ぼす影響

各種の疎水化多糖ナノゲルを蛍光標識したペプチドとの複合体とし、マウスに皮下投与した。縦軸はリンパ節内の免疫細胞への疎水化多糖の取込み率を表す。CHP, 疎水化多糖ナノゲル。粒子径は 50 nm 程度であり、表面電荷は中性である。CHP-NH₂, 陽性荷電を付与した疎水化多糖ナノゲル。CHG, 粒子径が 200nm 近い疎水化多糖ナノゲル。*, $p < 0.05$ 。

皮下投与された物質のリンパ節への細胞依存性輸送では、皮内樹状細胞やランゲルハンス細胞が物質を貪食したのち、リンパ節に遊走し、他の免疫細胞に提示する。これに対して、細胞非依存的な機序でリンパ節に到達する疎水化多糖ナノゲルは、リンパ節内でいかなる免疫細胞に捕捉されるかは不明であった。リンパ節内には貪食能力が高い種々の樹状細胞やマクロファージが存在しているため、疎水化多糖ナノゲルはこれらの細胞にすべからず取り込まれていると予想した。しかしながら、蛍光標識法を用いて疎水化多糖ナノゲルを取り込んだ細胞集団を検索したところ、多くの樹状細胞やマクロファージでは取込みが認められず、特定の髄質マクロファージ (medullary macrophage) に効率良く取り込まれることを見出した (図 3)。疎水化多糖ナノゲルの標的細胞になぜこうした選択性が生まれるのかは、明らかでない。多くの樹状細胞やマクロファージが疎水化多糖ナノゲルを取り込めない理由、ならびに髄質マクロファージは高効率に取り込める理由を、今後明らかにしていく必要がある。

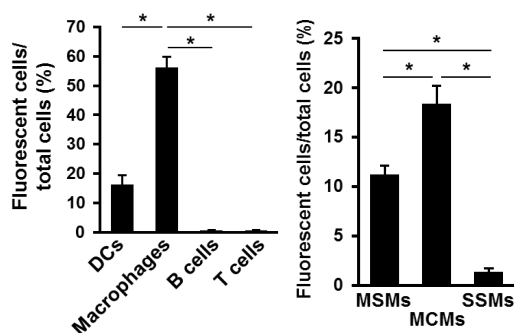


図 3. 皮下投与した疎水化多糖ナノゲルのリンパ節内免疫細胞への取込み

(左) 樹状細胞 (DC)、マクロファージ、B 細胞、T 細胞への取込み。(右) 各種のマクロファージへの取込み。MSM, medullary sinus macrophage, MCM, medullary cord macrophage, SSM, subcapsular sinus macrophage. *, $p < 0.05$ 。

疎水化多糖ナノゲルの標的細胞は髄質マクロファージであることが明らかとなったが、髄質マクロファージの機能については、これまでほとんど検討されていない。そこで、髄質マクロファージが T 細胞免疫における抗原提示細胞として機能し得るかどうかを調べた。疎水化多糖ナノゲル: ペプチド抗原複合体をワクチンとして皮下投与した後、近傍リンパ節から髄質マクロファージを精製し、特異的 T 細胞に対する抗原提示活性を評価した。その結果、髄質マクロファージは顕著な抗原提示活性を発揮した (図 4)。薬剤投与によりリンパ節内マクロファージを除去したマウスでは、同様のワクチンによる特異的な T 細胞誘導が著しく減少した (データ省略)。

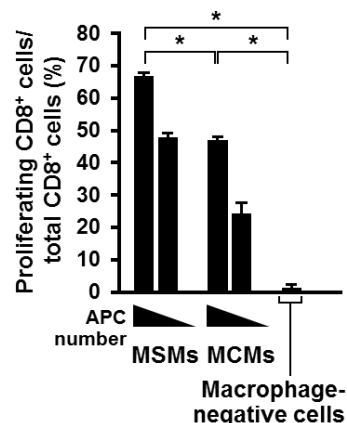


図 4. 疎水化多糖ナノゲル: ペプチド抗原複合体ワクチンを投与したマウスの近傍リンパ節から単離した髄質マクロファージによる in vitro 抗原提示反応

ワクチンを投与したマウスのリンパ節から髄質マクロファージ (MSM または MCM) を単離し、ワクチン抗原に特異的な T 細胞受容体を発現するマウス T 細胞を添加した。抗原刺激を受けた T 細胞の増殖を測定することで抗原提示反応

を観測した。*, $p < 0.05$ 。

以上の結果より、疎水化多糖ナノゲルによる物質輸送の機序として(1)細胞非依存性輸送により物質をリンパ節内に送達すること、(2)標的細胞は樹状細胞などではなく髄質マクロファージであることを明らかにした。その過程において、髄質マクロファージは強力抗原提示細胞となり得る可能性を他に先駆けて明らかにした。この所見は今後、基礎免疫学における髄質マクロファージの機能を解析するという研究方向性へ発展する可能性がある。

(2) 疎水化多糖ナノゲルを応用した腫瘍局所リンパ節環境の人為的制御による新規がん治療技術の創出

疎水化多糖ナノゲルが抗原提示活性の高い特定のマクロファージに選択的に物質輸送する能力を利用し、腫瘍所属リンパ節内の同様のマクロファージに活性化物質、例えば CpG オリゴヌクレオチド(CpG ODN)等の Toll 様受容体のリガンドなどを選択的に送達することを目的とし、疎水化多糖ナノゲルに CpG ODN を包埋する方法を検討した。疎水化多糖ナノゲルに包埋される物質は、ある程度の疎水性を有する必要がある。CpG ODN は疎水性が非常に低いため、コレステロール基や脂肪酸などで修飾することにより疎水性を付与した。この疎水化 CpG ODN を疎水化多糖ナノゲルと混合し複合体化反応を行った後に、マウスに皮下投与して従属リンパ節内のマクロファージの活性化を評価した。その結果、疎水化多糖ナノゲルと複合体化したか否かに関わらず、疎水化 CpG ODN は元の CpG ODN と比較してマクロファージ活性化能が劇的に向上した(データ省略)。原因としては、疎水性を付与した CpG ODN は両親媒性となり、ミセル形成により自発的にナノ粒子化した可能性があると考えた。そこで現在、ミセル形成防止のために疎水性を抑えた官能基を CpG ODN に付与する試みを継続している。この試薬が完成すれば、髄質マクロファージの基礎免疫学に迫るツールとなることも期待される。

一方で、疎水性多糖ナノゲルを用いたリンパ節内マクロファージ指向性がんワクチンを設計し、樹状細胞依存性のがんワクチンと性能比較した。樹状細胞依存性がんワクチンには、世界的に広く用いられているデポ型 0 デリバリーシステムであるフロイント不完全アジュバント(IFA)を採用したワクチンを用いた。その結果、Toll 様受容体リガンドをアジュバントとして併用すると、疎水性多糖ナノゲルがんワクチンは従来型ワクチンより格段に優れた免疫誘導能力と抗がん効果を示した(図 5 および図 6)。今後は、この疎水化多糖ナノゲルを用いた高性能がんワクチンの臨床応用が期待される。

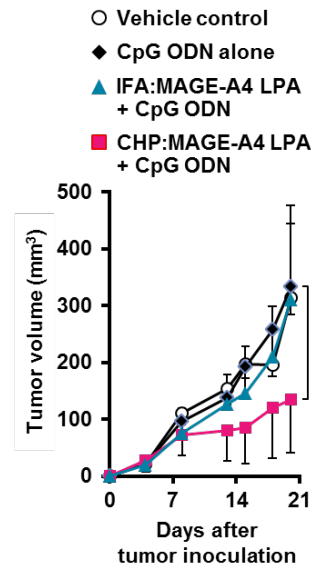


図 5. 疎水化多糖ナノゲル型ワクチン(マクロファージ指向性)とフロイント不完全アジュバント型ワクチン(樹状細胞指向性)の抗腫瘍効果

がん抗原のモデル抗原として MAGE-A4 蛋白を発現するマウス CT26 腫瘍をマウスに皮下移植し、その 4 日後と 11 日後に各種のワクチンを CpG ODN とともに投与した(治療的条件)。縦軸は、腫瘍容積の経時変化を示す。細胞を添加した。抗原刺激を受けた T 細胞の増殖を測定することで抗原提示反応を観測した。CHP, 疎水化多糖ナノゲル。IFA, フロイント不完全アジュバント。LPA, ペプチド抗原。*, $p < 0.05$ 。

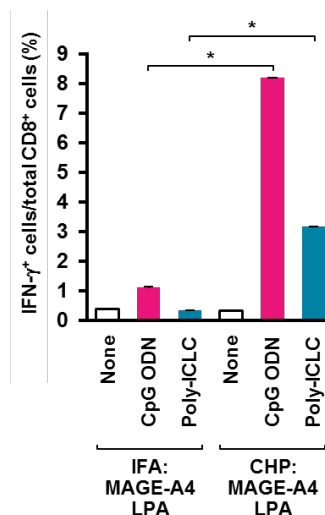


図 6. 疎水化多糖ナノゲル型ワクチン(マクロファージ指向性)とフロイント不完全アジュバント型ワクチン(樹状細胞指向性)の抗腫瘍効果

ナイーブマウスに各種のワクチンを CpG ODN または poly-ICLC RNA とともに 1 回投与し、1 週間後に脾臓細胞を回収してワクチン抗原特異的な CD8+ T 細胞応答を細胞内 IFN- γ 染色法で定量した。CHP, 疎水化多糖ナノゲル。IFA, フロイント不完全アジュバント。LPA, ペプチド抗原。*, $p < 0.05$ 。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(雑誌論文)(計 2 件)

1. Kageyama S, Wada H, Muro K, Niwa Y, Ueda S, Miyata H, Takiguchi S, Sugino SH, Miyahara Y, Ikeda H, Imai N, Sato E, Yamada T, Osako M, Ohnishi M, Harada N, Hishida T, Doki Y, Shiku H. J Transl Med. 2013 Oct 5;11:246. doi: 10.1186/1479-5876-11-246 (査読有).
2. Muraoka D, Nishikawa H, Noguchi T, Wang L, Harada N, Sato E, Luescher I, Nakayama E, Kato T, Shiku H. Vaccine. 2013 Apr 19;31(17):2110-2118. doi: 10.1016/j.vaccine.2013.02.056 (査読有).

(学会発表)(計 9 件)

1. Harada N, Muraoka D, Hayashi T, Momose F, Tahara Y, Sawada S, Akiyoshi K, Shiku H. A Novel Cancer Vaccine with Nanogel-based Antigen Transporter and Sequence-optimized Long Peptide Antigen. ITOC-1. 2014 年 3 月 12 ~ 14 日, ミュンヘン, ドイツ.
2. Muraoka D, Harada N, Hayashi T, Momose F, Sawada S, Akiyoshi K, Shiku H. Macrophage is a good target as antigen presenting cell to induce strong immune responses elicited with administration of vaccination antigen and immunological adjuvant. 日本免疫学会. 2013 年 12 月 11 ~ 13 日, 千葉.
3. Muraoka D, Harada N, Hayashi T, Akiyoshi K, Shiku, H. Peptide Sequence Design and Delivery System Are Critical for the Immunogenicity of Long Peptide-Based Cancer Vaccines. 日本癌学会, 2013 年 10 月 3 ~ 5 日, パシフィコ横浜, 横浜.
4. 原田直純, 村岡大輔, 林妙, 澤田晋一, 秋吉一成, 珠玖洋. 抗原デリバリーシステム・CHP ナノゲルはワクチン抗原をリンパ節内の抗原提示細胞に高効率輸送しワクチン性能を向上させる. 日本 DDS 学会, 2013 年 7 月 4 ~ 5 日, 京都.
5. 村岡大輔, 原田直純, 林妙, 百瀬文康, 澤田晋一, 秋吉一成, 珠玖洋. CHP ナノゲルはロングペプチド抗原をリンパ節内のマクロファージに抗原提示させる. 日本がん免疫学会, 2013 年 7 月 3 ~ 5 日, 宇部.
6. Muraoka D, Harada N, Hayashi T, Sawada S, Akiyoshi K, Shiku H. Control of in vivo spatiotemporal dynamics of antigen and adjuvant by a delivery system CHP nanogel markedly improves the immunogenicity and antitumor efficacy of long peptide cancer vaccine. the AACR Special Conference,

Tumor Immunology: Multidisciplinary Science Driving Basic and Clinical Advances. 2012 年 12 月 2 ~ 5 日, マイアミ, 米国.

7. 吉見公志, 村岡大輔, 原田直純, 林妙, 秋吉一成, 珠玖洋. ワクチン抗原の CHP ナノゲル複合体化によるリンパ節輸送の促進と抗腫瘍免疫応答の改善. 日本癌学会, 2012 年 9 月 19 ~ 21 日, ホテルロイトン札幌, 札幌.
8. 村岡大輔, 原田直純, 林妙, 吉見公志, 澤田晋一, 秋吉一成, 珠玖洋. ワクチン抗原の CHP ナノゲル複合体化によるリンパ節輸送の促進と抗腫瘍免疫応答の改善. 日本がん免疫学会, 2012 年 7 月 26 ~ 28 日, 北海道大学, 札幌.
9. Harada N, Muraoka D, Hayashi T, Yoshimi K, Sawada S, Akiyoshi K, Shiku H. Long Peptides Complexed with A Novel Delivery System CHP Nanogel Leads to the Improved Vaccine-induced Specific Immune Responses with CpG oligo DNA or poly-I:C RNAThe Association for Cancer Immunotherapy (CIMT) 2012 Annual Meeting, 2012 年 5 月 23 ~ 25 日, Rheingoldhalle Congress Center, Mainz, Germany.

(図書)(計 0 件)

(産業財産権)

出願状況(計 1 件)

名称:がん治療用ワクチン製剤
発明者:原田直純, 村岡大輔, 秋吉一成, 珠玖洋
権利者:三重大学・東京医科歯科大学
種類:特許
番号:PCT/JP2012/ 71979
出願年月日:2012 年(平成 24 年) 8 月 30 日
国内外の別:国際
注:JST 外国出願支援制度に採択. 2014 年に米国・欧州・豪州・カナダ・中国に移行予定(カナダは完了).

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

(その他)

JST イノベーション・ジャパン, JST 東海国立 3 大学新技術説明会, BIOtech 2013, BioJapan 2013 に出展。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

原田 直純 (HARADA, Naozumi)
三重大学大学院医学系研究科
リサーチアソシエイト

研究者番号: 40520961

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: