

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：37401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25420842

研究課題名(和文) 複合リポソームを用いたがんワクチンの創製に関する研究

研究課題名(英文) Study on Development of Novel Cancer Vaccine Using Hybrid Liposomes

研究代表者

後藤 浩一 (GOTO, Koichi)

崇城大学・生物生命学部・教授

研究者番号：30279377

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、リン脂質DMPCと非イオン性界面活性剤Tween 80からなるハイブリッドリポソームにムチンMUC-1の合成抗原ペプチドとT細胞活性化の組換え膜タンパクmB7-1を組み込んだ複合リポソーム(HL-MUC-1/mB7-1)を創製し、がん免疫誘導機能を細胞レベルおよび動物レベルで検討した。HL-MUC-1/mB7-1を投与したマウスのCD8+ T細胞は、in vitroにおいて、乳がん細胞に対する細胞傷害活性が増大する傾向が見られ、さらに、HL-MUC-1/mB7-1を投与したマウスに乳がん細胞を移植したところ、延命効果が観測され、新しいリポソームワクチンの可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined the induction effects of hybrid liposomes (HL-MUC-1/mB7-1) composed of phospholipids (DMPC) and nonionic surfactants (Tween 80) including synthetic mucin MUC-1 antigen peptides and recombinant mB7-1 membrane proteins on the cancer immunotherapy in vitro and in vivo. CD8+ T cells from the mice intravenously administrated HL-MUC-1/mB7-1 had a tendency to increase the cytotoxicity to the breast cancer cells in vitro, and the prolonged survival was observed in mice implanted with breast cancer cells after the administration of HL-MUC1/mB7-1, suggesting the possibility of novel cancer vaccine using hybrid liposomes.

研究分野：生体関連化学

キーワード：がん ワクチン リポソーム 免疫

1. 研究開始当初の背景

現在、日本人の死亡原因の第一位はがんであり、年間 30 数万人の人ががんで亡くなっている。一般的ながんの治療法として、外科療法、化学療法、放射線療法があるが、病状が進行したがんの根治は難しく、転移、再発の可能性があり、正常細胞・組織に傷害を与える副作用の問題も残されている。一方、近年、がんの免疫療法が注目されている。生体の持つ免疫機能を人為的に高め、がんの治療に応用するものであり、患者への負担が少ない新しい治療法として期待されている。

現在、最も有効ながん免疫治療として、患者の免疫系細胞を採取し、体外で培養処理した後、体内に戻して治療する細胞療法があるが、高度な医療設備・技術を必要とする個人療法となっている。一方、大量生産可能ながんワクチンとして、ペプチド、タンパク質、DNA、不活性化したがん細胞など種々の形態のものが研究対象となっている。いずれの場合も、樹状細胞に代表される抗原提示細胞に外来性のがん抗原を提示させ、獲得免疫を担う細胞傷害性 T 細胞 (CTL) を CD8⁺ T 細胞より誘導することが目的となっている。しかしながら、その治療法は確立しておらず、十分な効果が得られない場合も多い。

本研究で用いるハイブリッドリポソーム (HL) は、ベシクル分子とミセル分子を緩衝水溶液中で超音波照射するだけで得られる新しい医用素材である。長期間安定で毒性が無く、細網内皮系を回避可能な小さなサイズのリポソームを簡単に調製することができる。また、薬剤や生理活性分子を HL に含有することにより、溶解性や安定性の改善、さらに薬効効果の向上などが観測され、HL のドラッグキャリアーとしての有用性が明らかになっている。そこで、本研究では、HL に免疫賦活因子を組み込んだ複合リポソームを調製し、がんに対して獲得免疫を誘導するリポソームワクチンの創製を試みた。

2. 研究の目的

上皮細胞のがんに発現する糖タンパクのムチン MUC-1 は、一般的な抗原と異なり、主要組織適合性遺伝子複合体と複合体を形成することなく、MUC-1 単独で T 細胞に認識されることが報告されている。一方、T 細胞が活性化されるには、抗原による刺激だけでは不十分であり、抗原提示細胞の膜タンパクリガンド B7-1 (CD80) や B7-2 (CD86) による T 細胞の副刺激が必要であることも明らかにされている。本研究では、ヒトムチン MUC-1 の合成ペプチドをがん抗原とし、マウスの組換え膜タンパク mB7-1 を副刺激分子としてハイブリッドリポソームに組み込んだがんワクチンを創製し、細胞レベルおよび動物レベルでのがん免疫誘導機能を検討した。

3. 研究の方法

(1) ヒトムチン MUC-1 抗原ペプチドの固相合成

がん細胞で分泌される糖鎖修飾率の低いヒトムチン MUC-1 コアタンパクのペプチド抗原として、T 細胞が認識するエピトープ配列 (Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala) を含み、リポソームに効率的に組み込まれるように疎水性のバルミトイル基を有するリシン (Lys(Pal)) を付加した以下のペプチドを Fmoc 法により固相合成した。

H-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-Pro-Ala-His-Lys(Pal)-Lys(Pal)-OH

担持樹脂として、Wang 樹脂 (200 - 400 mesh, 0.9 - 1.2 mmol/g) (国産化学) Fmoc-L-アミノ酸には、Ala, Arg(Pmc) (国産化学) Gly, Pro, Val, Asp(OtBu), Asp(OtBu), His(Trt), Lys(Pal), Ser(tBu), Thr(tBu) (渡辺化学工業) を用いた。

固相合成は、マルチ固相合成器 (KMS-3, 国産化学) を用いた。Wang 樹脂に C 末端の Lys(Pal) をジソプロピルカルボジイミド (国産化学) と 4-ジメチルアミノピリジン (国産化学) を用いる対称無水物法で導入した。次に、20% のピペリジン (和光純薬工業) で脱 Fmoc 反応を行った後、Fmoc-L-アミノ酸をベンゾトリアゾール-1-イルオキシトリス (ピロリジン) ホスホニウムヘキサフルオロホスフェート (渡辺化学工業) 1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (国産化学) および *N,N'*-ジソプロピルエチルアミン (国産化学) を用い、ダブルカップリング法によりペプチド鎖を伸長した。脱 Fmoc 反応とカップリング反応は、サンプリングした樹脂の Kaiser テスト (国産化学) で確認した。また、トリフルオロ酢酸 (国産化学) とチオアニソール (渡辺化学工業) (95:5) でクレーベジ反応を行った。

粗生成物の精製は、ODS カラム (RP-18 GP, 10.0 mm × 250.0 mm, 関東化学) を用いた逆相 HPLC (移動相: 0.05% TFA 含有 H₂O/CH₃CN (20:80), 流速: 1.0 ml/min, 室温, 検出波長 220 nm) で行った。得られた合成ペプチドが逆相 HPLC で単一ピークを示すことを確認した後、複合リポソームの調製に用いた。

(2) T 細胞活性化副刺激 mB7-1 組換えタンパクの調製

マウスの T 細胞活性化副刺激膜タンパク mB7-1 を組換えタンパクとして調製した。マウス B リンパ腫瘍細胞 (A20 細胞) (ATCC) より抽出した全 RNA の RT-PCR (プライマー: 5'-cgggggtaccatggcttgcaattgtcagttg-3', 5'-ccgctcgagctaaggaagacgggtctg-3') により mB7-1 の cDNA を複製した。mB7-1 cDNA をプラスミドベクター (pcDNA3.1/Hygro(+)) (invitrogen) にライゲーションした後、大腸菌を形質転換した。

液体培養した大腸菌より組換えプラスミドを抽出し、リポフェクション法によりチャイニーズハムスター卵巣由来 CHO-S 細胞 (GIBCO) にトランスフェクションした。ハイグロマイシン B による選択培養後、FITC 標識ハムスター由来抗 mB7-1 抗体 (BD Pharmingen) と Anti-FITC MicroBeads (Milteny Biotec) を用いた磁気細胞分離法により mB7-1 発現細胞を分離した。フローサイトメトリー (Epics XL system II, Beckman Coulter) の測定より、96.5% の高い mB7-1 発現 CHO 細胞を得ることができた。抗マウス mB7-1 抗体 Anti-mouse CD80 (BD Pharmingen) を用いたアフィニティークロマトグラフィーと、ゲルろ過クロマトグラフィー (HiLoad 16/60 Superdex 75 pg, GE ヘルスケア) で mB7-1 発現 CHO 細胞の膜タンパクを処理し、デオキシコール酸 (同仁化学研究所) のミセルに可溶化した状態で精製物のフラクションを得た。RC 透析チューブ ポア 7 (Spectrum) を用いてフラクションを透析し、組換えタンパク mB7-1 を得た。mB7-1 (約 60 kDa) の精製を SDS-PAGE とウエスタンブロッティングにより確認した後、複合リポソームの調製に用いた。

(3) 複合リポソームの調製

リン脂質 L- α -ジミリスチルホスファチジルコリン (DMPC) (日本油脂) と非イオン性ミセル界面活性剤ポリオキシエチレン (20) ソルビタンモノオレエート (Tween 80) (ナカライテスク) を、リン酸緩衝液 (PBS(-)) 中でバス型超音波照射器 (VS-N300S, VELVO-CLEANER) により超音波照射処理 (45 °C, 1 ml/1 min) し、90 mol% DMPC/10 mol% Tween 80 ([DMPC] = 2.00×10^{-3} M, [Tween 80] = 2.22×10^{-4} M) のハイブリッドリポソーム (HL) を調製した。調製した HL にムチン MUC-1 合成ペプチド、あるいはムチン MUC-1 合成ペプチドと組換えタンパク mB7-1 ([MUC-1] = 50 μ g/ml, [mB7-1] = 10 μ g/ml) を加え、さらに超音波処理 (45 °C, 30 sec) して複合リポソーム (HL-MUC-1, HL-MUC-1/mB7-1) を調製した。調製したサンプルは、0.45 μ m フィルターで濾過し、4 °C で保存した。また、リポソームの膜サイズは、粒径分布測定装置 (ELS-800, 大塚電子) を用いて動的光散乱法により測定した。4 °C で保存したサンプルを室温で 1 h ~ 1.5 h 放置後、25 °C の条件で測定した。

(4) CD8⁺ T 細胞の細胞傷害試験

実験に用いた C3H/He マウス (5 ~ 9 週齢、雌、14 ~ 20 g) (日本クレア) は、室温 24 ± 2 °C、湿度 $55 \pm 10\%$ の環境で飼育し、水および餌はオートクレーブにより滅菌したものを自由に摂取させた。また、がん細胞として、ヒトムチン MUC-1 を外来性に発現しているマウス乳がん由来

MM46-APR-MuCl cl.1 細胞 (理研バイオリソースセンター) を用いた。MM46-APR-MuCl cl.1 細胞は、10% の FBS (Hyclone) を含有した RPMI 1640 (ThermoFisher Scientific) に、G418 (ThermoFisher Scientific) 200 μ g/ml とベンジル-2-アセトアミド-2-デオキシ- α -D-ガラクトピラノシド (Sigma-Aldrich) の 1 M DMSO 溶液を 2 mM 添加した培地で 37 °C、5% CO₂ の条件で培養して使用した (DMSO 最終濃度 0.2%)。

C3H/He マウスをコントロール (PBS(-) 投与) 群、HL 投与群、HL-MUC-1/mB7-1 投与群に群分け (各群 5 匹) し、サンプル 100 μ l (PBS(-)、DMPC 136 μ g、Tween 80 29 μ g、MUC-1 5 μ g、mB7-1 1 μ g) を尾静脈投与した。尾静脈投与は、1 週間間隔で 5 回行った。最終投与後 11 日目に、マウスより脾臓を採取し、EasySep Mouse CD8⁺ T Cell Isolation Kit (ベリタス) を用いて CD8⁺ T 細胞を回収した。

CD8⁺ T 細胞 (Effector 細胞 (E)) を PBS(-) で洗浄後、フェノールレッド非含有 RPMI 1640 (和光純薬工業) に 10% FBS を添加した培地を用いて 2.0×10^6 cells/ml の懸濁液を調製した。MM46-APR-MuCl cl.1 細胞 (Target 細胞 (T)) は、PBS(-) で洗浄後、PBS(-) を用いて 1.0×10^6 cells/ml の懸濁液を調製した。カルセイン-AM (ナカライテスク) の 1 mg/ml DMSO 溶液を細胞懸濁液 1 ml あたり 15 μ l 添加し、30 min インキュベート (37 °C、5% CO₂) した。培地で洗浄後、 2.0×10^5 cells/ml の懸濁液を調製した。V 字型 96 ウェルマルチプレート (Nunc) に 2.0×10^5 cells/ml の MM46-APR-MuCl cl.1 細胞の懸濁液 100 μ l を播種し、 2.0×10^6 cells/ml の CD8⁺ T 細胞の懸濁液と培地を E/T = 2.5/1、5/1、10/1 になるよう 100 μ l 加え、37 °C、5% CO₂ の条件で 4 h 共培養した。また、培地 (自然遊離) 4% の Triton X-100 (Roche) を含有した培地 (全遊離) 100 μ l を MM46-APR-MuCl cl.1 細胞の懸濁液に添加した。遠心処理 (1000 rpm, 5 min) 後、上澄み 100 μ l を平底 96 ウェルマルチプレート (住友ベークライト) に分取し、自動蛍光測定装置 (Fluoroskan Ascent CF, Thermo LabSystems) を用いて 527 nm の蛍光強度 (励起光 485 nm) を測定し、次式より細胞傷害活性 (%) を算出した。

細胞傷害活性 (%)

$$= \{ (ET \text{ 共培養の蛍光強度} - \text{自然遊離の蛍光強度}) / (\text{全遊離の蛍光強度} - \text{自然遊離の蛍光強度}) \} \times 100$$

(5) がん細胞移植マウスの延命試験

C3H/He マウスをコントロール (PBS(-) 投与) 群、HL 投与群、HL-MUC-1 投与群、HL-MUC-1/mB7-1 投与群に群分け (各群 5 匹) し、サンプル 100 μ l (PBS(-)、DMPC 136 μ g、

Tween 80 29 μg 、MUC-1 5 μg 、mB7-1 1 μg) を尾静脈投与した。投与は、1 週間間隔で 5 回行った。最終投与後 7 日目に、PBS(-)で懸濁した MM46-APR-MuC1 cl.1 細胞 (5.0×10^6 cells/body) をマウスの腹腔内に移植した。移植後、状態観察や体重測定を行った。

4. 研究成果

(1) 複合リポソームの物性

ハイブリッドリポソーム (HL) \ HL にムチン MUC-1 合成ペプチドと組換え膜タンパク mB7-1 を組み込んだ複合リポソーム (HL-MUC-1/mB7-1) のサイズの経時変化、および調製 1 日後のサイズ分布を図 1 に示した。HL、HL-MUC-1/mB7-1 とともに調製直後は直径が約 300 nm 以上の大きなサイズであったが、調製 1 日以降は、約 100 nm であり、サイズの分布幅も小さく、一か月間安定であった。

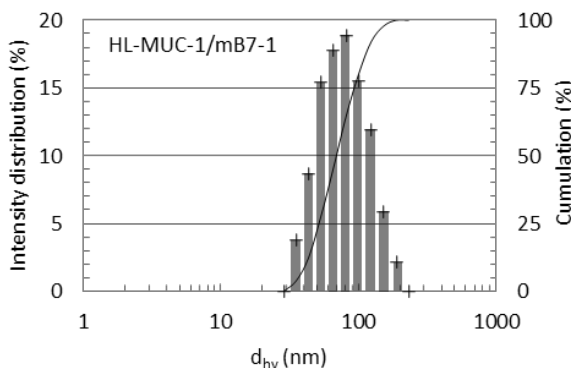
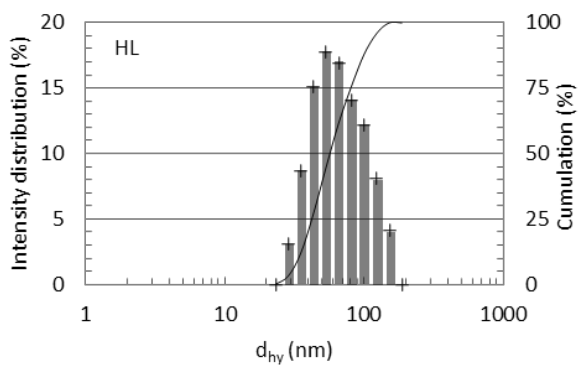
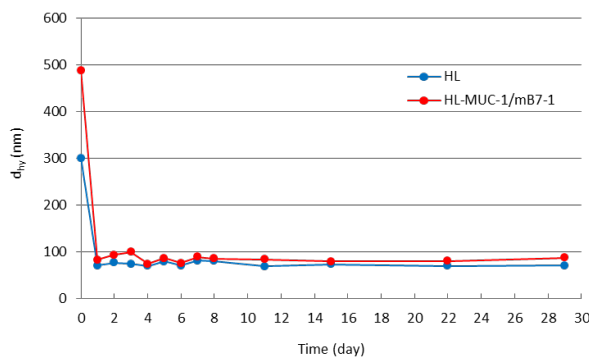


図 1 複合リポソームの膜サイズ

[DMPC] = 2.00×10^{-3} M、[Tween 80] = 2.22×10^{-4} M、[MUC-1] = 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、[mB7-1] = 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、25 $^{\circ}\text{C}$ 。

(2) 複合リポソームによる CD8^+ T 細胞の細胞傷害活性化

PBS(-) (コントロール)、HL、HL-MUC-1/mB7-1 を投与したマウスの脾臓より CD8^+ T 細胞を回収し、ヒトムチン MUC-1 を外来性に発現しているマウス乳がん MM46-APR-MuC1 cl.1 細胞に対する細胞傷害活性試験を *in vitro* で行った。結果を図 2 に示した。コントロールマウスと HL 投与マウスの CD8^+ T 細胞では殆んど変化はなかったが、HL-MUC-1/mB7-1 投与マウスから得られた CD8^+ T 細胞の細胞傷害活性は、E/T = 10 において高くなる傾向が見られ、HL-MUC-1/mB7-1 による CTL 誘導の可能性が示唆された。

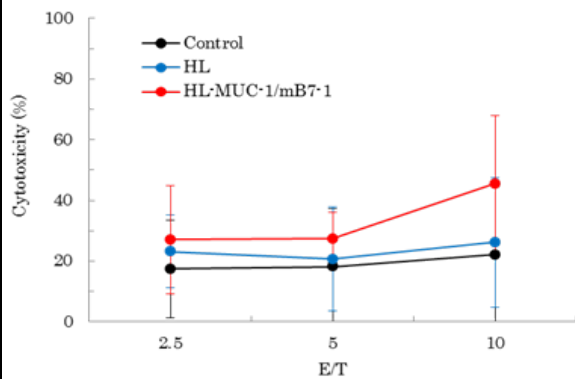


図 2 MM46-APR-MuC1 cl.1 細胞に対するマウス CD8^+ T 細胞の細胞傷害活性

E/T = 2.5 (CD8^+ T 細胞 2.5×10^5 cells/ml、MM46-APR-MuC1 cl.1 細胞 1.0×10^5 cells/ml)、5 (CD8^+ T 細胞 5.0×10^5 cells/ml、MM46-APR-MuC1 cl.1 細胞 1.0×10^5 cells/ml)、10 (CD8^+ T 細胞 1.0×10^6 cells/ml、MM46-APR-MuC1 cl.1 細胞 1.0×10^5 cells/ml)、4 h 共培養。

(4) 複合リポソームによるがん移植マウスの延命効果

PBS(-)、HL、HL にムチン MUC-1 合成ペプチドのみ組み込んだ HL-MUC-1、HL-MUC-1/mB7-1 を投与したマウスの投与期間中の体重変化を図 3 に示した。HL 投与群、HL-MUC-1 投与群および HL-MUC-1/mB7-1 投与群において、体重は順次増大し、コントロール群と比べて差異は観測されず、また、状態観察にも異常は見られなかった。

MM46-APR-MuC1 cl.1 細胞移植後のサンプル投与マウスの生存曲線を図 4 に示した。コントロール (PBS(-)投与) 群、HL 投与群と比べ、HL-MUC-1 投与群および HL-MUC-1/mB7-1 投与群の生存日数が増大する傾向があり、移植後 50 日目において、平均生存日数は、コントロール群 22.0 d、HL 投与群 21.6 d、HL-MUC-1 投与群 28.6 d、HL-MUC-1/mB7-1 投与群 29.8 d であった。がん細胞移植マウスの延命率は、コントロール群に対して、HL 投与群 98.2%、HL-MUC-1

投与群 130%、HL-MUC-1/mB7-1 投与群 135% であり、HL-MUC-1/mB7-1 投与群で最も高い延命効果が観測され、新しいリポソームワクチンの可能性が示唆された。

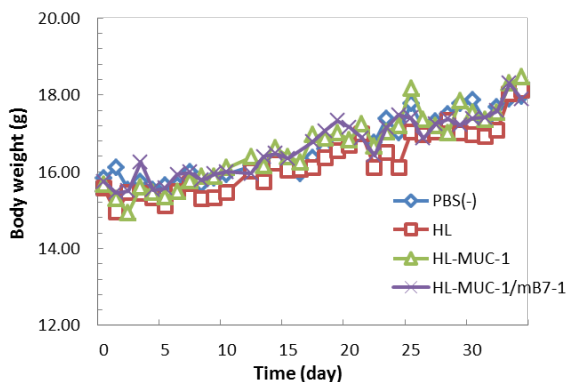


図3 複合リポソーム投与期間中のマウスの体重変化

C3H/He マウス (n = 5), サンプル 100 μ l (PBS(-), DMPC 136 μ g, Tween 80 29 μ g, MUC-1 5 μ g, mB7-1 1 μ g) 尾静脈投与 (週一回) \times 5 回。

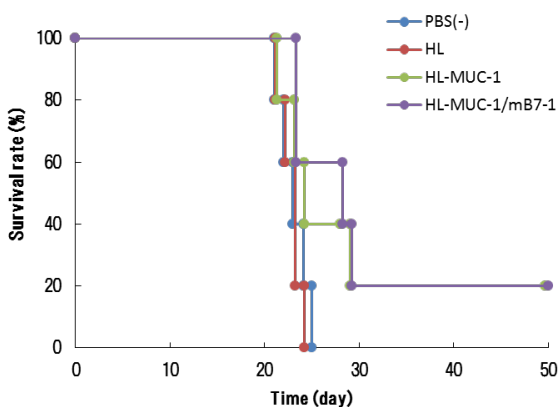


図4 MM46-APR-MuC1 cl.1 細胞移植マウスの生存曲線

サンプル投与 C3H/He マウス (n = 5) MM46-APR-MuC1 cl.1 細胞 5.0×10^6 cells/body 腹腔内移植。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

後藤 浩一 (GOTO Koichi)
 崇城大学・生物生命学部・教授
 研究者番号: 30279377

(2) 研究分担者

上岡 龍一 (UEOKA Ryuichi)
 崇城大学・生物生命学部・研究員
 研究者番号: 70099076