

平成 30 年 6 月 26 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26350516

研究課題名(和文) ナノ粒子による抗原特異的な免疫反応の制御とその細胞性機序の解明

研究課題名(英文) Control of antigen-specific immune response by nanoparticles and elucidation of its cellular mechanism

研究代表者

矢那瀬 紀子 (Yanase, Noriko)

東京医科大学・医学部・講師

研究者番号：10210303

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では親水性と疎水性のポリマーによる共重合体であるNPsに癌抗原ペプチド(TRP-2)およびアジュバント(CpG)を内包し、抗-DCs抗体(anti-DEC205)を表面に結合させNPs製剤(NPs-TRP2/CpG/anti-DEC205)を作成し、抗腫瘍作用を検討した。担ガン(悪性黒肉腫細胞株B16-F10)マウスにNPs製剤を投与したところ、15日目の腫瘍サイズは42mm³で、対照群では459mm³であり著明な抑制効果があった。またNPs製剤投与マウスのリンパ節で活性化DCsが増加していた。このことから、今回のNPs製剤はガンワクチンとして有用であることが示された。

研究成果の概要(英文)：NPs are composed for hydrophilic and hydrophobic polymers without side effects. To examine the antitumor effect of NPs, we prepared the NPs (NPs-TRP2 / CpG / anti-DEC 205) containing a tumor associated antigen peptide (TRP-2) and an adjuvant (CpG) with an anti-DCs Ab (anti-DEC 205) to its surface. The melanoma cell line B16-F10 was inoculated s.c. in mice, and the NPs was injected on days 5 and 12. The tumor growth was confirmed with the tumor size on the 15th day, it was 459 mm³ in the control group, but was strongly suppressed at 42 mm³ in the NPs injected group. Furthermore, number of CD11c + CD86 + cells increased compared to the control group in lymphnode of the NPs-treated mice, thus activated DCs were enhanced. From the above, it was shown that the NPs designed at this is useful as a cancer vaccine.

研究分野：免疫学

キーワード：ガンワクチン ナノ粒子 樹状細胞

1. 研究開始当初の背景

NPsは、ポリエチレングリコールからなる親水性ポリマーとポリアミノ酸誘導体からなる疎水性ポリマーによる共重合体(粒子系30-400nm)であることから、薬物キャリアとなり得て、がん組織等の病変部へ集積(標的化)し、副作用もないことが報告されている。NPsは目的とする組織・細胞への選択的な薬剤送達手段として用いられてきたが、近年免疫反応の制御法としても注目されている。

2. 研究の目的

免疫反応をコントロールできるナノ粒子の開発を目的としている。すなわち、ナノ粒子にタンパク質を初めとする抗原や免疫増強物質(アジュバント)を内包し、さらに免疫細胞に対して選択的に反応する抗体を結合することによって効率的かつ選択的な免疫細胞(例えば、樹状細胞(DCs)やT細胞)の活性化を誘導し、抗体が感染予防に関わっている微生物及び細胞性免疫が主体をなしている悪性腫瘍に対する制御法の開発を目指している。このようなアプローチによって治療・予防ナノ粒子ワクチンの開発につなげたい。

3. 研究の方法

(1)モデル腫瘍系を用いた癌ワクチンの作製
OVAをモデル腫瘍抗原として用いた系で、NP-OVAが抗腫瘍免疫反応を誘導できること明らかにしてきた。すなわちNP-OVAを予め免疫しておく、OVA発現EL-4腫瘍細胞(EG-7)の発育は抑制されたが、EL-4の増殖には影響を与えなかったことから、抗原特異的な抗腫瘍免疫反応が誘導できたことになる。以下に腫瘍に対する免疫反応を細胞レベルでの検討方法を述べる。

OVA特異的な細胞傷害性T細胞(CTL)反応の誘導テトラマー測定法を用いて、OVA257-264特異的CTL(OVA-tetramer+, CD8+)の誘導の有無を検討する。

NK細胞の関与: NK細胞数及び機能について評価する。数はマーカー(CD3-, NK1.1+)、機能はNK感受性細胞株K562を標的とした細胞傷害性で測定する。

(2) 癌ペプチドTRP-2及びアジュバント

CpG-ODNをナノ粒子に内包したワクチン製剤(NP-TRP2/CpG)を作製し、C57BL/6マウスに投与する。1週間後にB16-F10を皮下投与し、腫瘍サイズ、肺転移(サイズやコロニー数)、及び生存日数を測定する。TRP2/CpGおよびNP単独投与群をコントロールとする。

腫瘍組織における炎症性細胞浸潤の評価: 腫瘍組織を採取し、単個細胞を得る。特異抗体を用いたフローサイトメーター法により浸潤細胞(T細胞、B細胞、DC、NK細胞など)を測定する。また、病理標本作製し、浸潤細胞の程度を評価する。

4 脾臓及び病巣局所のリンパ節における抗

炎症性細胞(制御性T細胞、myeloid-derived suppressor cell(MDSC)など)を評価する。MDSC(CD11b+, Gr-1+)及び制御性T細胞(CD3+, CD4+, Foxp3+)はフローサイトメーターにより評価する。

4. 研究成果

1) OVAをモデル腫瘍抗原として用いた系で、OVA-NPsを予めマウスに免疫しておく、OVA発現腫瘍細胞(EG-7)の増殖はin vivoで抑制された。さらに、腫瘍に対して抑制効果が期待できるIL-7を封入したOVA-NPs-IL-7を用いると、抗腫瘍効果が増強した。しかしOVAを発現していない親細胞EL-4は増殖した。このことからNPs製剤は抗原特異的に効果を発揮することが示唆された。OVA特異的CTL(OVA-tetramer+, CD8+)を用いた解析でOVA-Nps-IL-7を腫瘍接種の1週間前に投与した群ではNps単独対照群に比べて著明にCTL反応が増加していた。

2) 内在性癌抗原ペプチドを用いた癌ワクチンの作製: 癌抗原ペプチドの TRP-2 およびアジュバント CpG に DCs 内包し、抗-DCs 抗体 (anti-DEC205) を NPs 粒子表面に結合した製剤 (NPs-TRP2/CpG/anti-DEC205) を作製した。マウス悪性黒肉腫細胞株 B16-F10 をマウス皮下に接種し、生着が確認された 5 日目、およびその一週間後の 12 日目に NP-TRP2/CpG/anti-DEC205 製剤を投与して、腫瘍増殖を経時的に確認した。比較対照群では 15 日目に腫瘍サイズが 459mm³であったが、NPs-TRP2/CpG/anti-DEC205 投与群では 42mm³と腫瘍の増殖を強く抑制していた。さらに NPs-TRP2/CpG/anti-DEC205 製剤が投与マウスの樹状細胞 (DCs) 活性化をフローサイトメーター解析にて確認した。NPs-TRP2/CpG/anti-DEC205 投与群では対照群と比較して所属リンパ節で CD11c⁺ CD86⁺ 細胞も増加していたことから、活性化した DCs が増強されていることが明らかになった。以上のことから、今回設計した NPs-TRP2/CpG/anti-DEC205 製剤は予防、治療ワクチンとして有用であることが示された。

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)

Toyota H, Yanase N, Yoshimoto T, Harada M, Kato Y, Mizuguchi J. Vaccination with OVA-bound nanoparticles encapsulating IL-7 inhibits the growth of OVA-expressing E.G7 tumor cells in vivo *Oncol Rep* 33(1):292-6 2015 査読あり

Yanase N, Toyota H, Hata K, Yagy S, Seki T, Harada M, Kato Y, Mizuguchi J. OVA-bound nanoparticles induce OVA-specific IgG1, IgG2a, and IgG2b responses with low IgE synthesis. *Vaccine*. 2014 Oct 14;32(45):5918-24. 査読あり

[学会発表](計 4 件)

矢那瀬紀子、豊田博子、秦喜久美、水口純一郎、原田充訓、横須賀忠 新規ナノパーティクルを用いた抗腫瘍ワクチンに関するマウス in vivo の基盤研

究 第 5 回医薬工 3 大学包括連携推進シンポジウム(2016.6.18)

矢那瀬 紀子、豊田 博子、秦 喜久美、原田 充訓、横須賀 忠、水口 純一郎 ミセル化ナノ粒子によるガンワクチンの開発 第 26 回日本生体防御学会学術総会(2015.7.11)

Yanase N, Toyota H, Mizuguchi J, Hata K, Harada M, Yokosuka T A novel micellar nanoparticle functions as an adjuvant to enhance anti-tumor immune responses in vivo 第 44 回日本免疫学会学術集会(2015.11.20)

矢那瀬 紀子、豊田 博子、秦 喜久美、水口 純一郎 腫瘍抗原結合ナノ粒子による効率的な免疫反応の誘導-新規癌ワクチン開発に向けて 第 173 回東京医科大学医学会総会(2014.6.7)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

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]
ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

矢那瀬 紀子 (YANASE, Noriko)

東京医科大学・医学部・講師

研究者番号: 10210303

(2) 研究分担者

秦 喜久美 (HATA, Kikumi)

東京医科大学・医学部・講師

研究者番号： 30287156

(3) 研究分担者

豊田 博子 (TOYOTA, Hiroko)

東京医科大学・医学部・助手

研究者番号： 80468660

(4) 研究分担者

水口 純一郎 (MIZUGUCHI, Juniro)

東京医科大学・その他部局・名誉教授

研究者番号： 20150188