

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26750162

研究課題名(和文) Multi-functional Hollow Mesoporous Silica Adjuvant for Cancer Immunotherapy

研究課題名(英文) Multi-functional Hollow Mesoporous Silica Adjuvant for Cancer Immunotherapy

研究代表者

王 秀鵬 (Wang, Xiupeng)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・健康工学研究部門・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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：癌免疫療法用アジュバントの開発を行なった。球状中空メソポーラスシリカを開発した。この球状中空メソポーラスシリカは、単独でも、抗腫瘍免疫を誘導できる。癌抗原や生体由来免疫刺激物質の併用が癌免疫療法に必須であることの常識を覆した。また、超音波や蛍光等による可視化アジュバントを開発した。具体的には、開発した球状中空メソポーラスシリカは、単独でもがんの免疫療法におけるアジュバントに使用できる。そのような生体由来免疫刺激物質を併用せずとも、癌抗原と併用するだけで癌抗原特異的な獲得免疫を誘導する、癌免疫療法用アジュバントに使用できることを、初めて、動物実験で示し、常識を覆した。

研究成果の概要(英文)：I developed a hollow mesoporous silica (HMS) nanosphere adjuvant in this study. The plain HMS nanosphere, without any immunomodulatory molecules, markedly improved anti-tumor immunity, significantly improved both Th1 and Th2 immunity, and significantly improved effector memory CD4+ and CD8+ T cell population in bone marrow in vivo. Moreover, we loaded fluorescence substance with the HMS nanospheres. These HMS nanospheres were visible under fluorescence microscope, IVIS imaging system and ultrasonic.

The HMS nanospheres showed smooth surface, uniform diameter about 200 nm, and shell thickness about 30-40 nm. The shell of the HMS nanospheres showed mesopores about 3-6 nm. The porous structure in this material is crucial for antigen adsorption and delivery, antigen cellular uptake, antigen cross-presentation, immune-related cytokines secretion, and anti-cancer immunity stimulation. The developed HMS nanospheres may be used as human cancer immunoadjuvant.

研究分野：総合領域

キーワード：アジュバント 癌免疫

1. 研究開始当初の背景

がん治療法の開発は社会的にも経済的にも重要な意義であり、多くの研究者が種々の新しい癌治療法を探索している。

癌免疫療法は体に優しく第4の癌治療法として注目されるが、癌抗原に対する免疫反応を活性化できてヒトに使用可能な免疫賦活剤(アジュバント)が極めて少ないことが問題である。そこで本研究では癌抗原による効率的な免疫系の活性化のための多機能免疫増強、可視化アジュバントを開発することが目的である。

2. 研究の目的

アジュバントの免疫活性を影響するパラメータとして、無機粒子の種類や構造最適化し、その安全性、有効性を *in vitro* 評価で検討し、一部試料に関しては *in vivo* 評価とメカニズム研究も行う。具体的には、アジュバントの免疫活性を影響するパラメータとして、無機粒子の種類、中空構造、免疫増強元素修飾、蛍光標識、表面電荷、超音波や蛍光可視化等の制御を行う。

3. 研究の方法

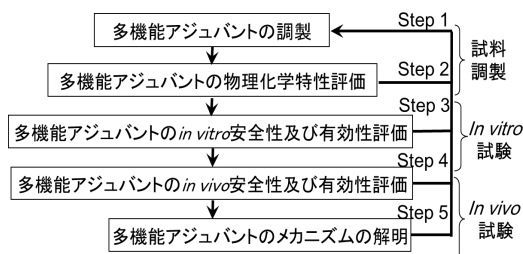


図1、本研究の実施状況

(1) 多機能アジュバントの調製

多機能免疫増強、可視化アジュバントを調製した。例えば、水酸化ナトリウム(NaOH)とヘキサデシルトリメチルアンモニウムブロミド(C₁₆H₃₃BrN, CTAB等)を水に溶解し、激しく攪拌しながらオルトケイ酸テトラエチル(Si(OC₂H₅)₄, TEOS)を滴下した。そのまま数時間攪拌を続け白色の沈殿を得た。沈殿は遠心分離し、超純水とエタノール(99.5%)で洗浄して乾燥させた。550℃で焼成し、最終生成物のメソポーラスシリカ微粒子とした。

アジュバントの免疫活性を影響するパラメータとして、無機粒子キャリアの種類、中空構造、免疫増強元素修飾、磁気修飾、蛍光標識、表面電荷、超音波や蛍光可視化等の制御に挑みました。

(2) 多機能アジュバントの物理化学特性評価

多機能アジュバントはX線回折分析(XRD)、赤外分光法(IR)、吸着・脱離等温線法(N₂)、ICP発光分光分析(ICP-AES)、走査型電子顕微鏡(SEM)、透過型電子顕微鏡(TEM)等を用いて解析した。

(3) 多機能アジュバントの *in vitro* 安全性及び有効性評価

安全性評価: 樹状細胞(BMDC)、マクロファージ様細胞(分化したTHP-1細胞)、線維芽細胞(NIH3T3)等系に多機能アジュバント候補材料を添加し、細胞増殖速度や乳酸脱水素酵素(LDH)アッセイを評価した。また、Annexin V染色とPI染色により細胞のアポトーシスやネクローシス(壊死)が評価した。

免疫活性評価: 樹状細胞(BMDC)、マクロファージ様細胞(分化したTHP-1細胞)に多機能アジュバント候補材料を添加し、1-2日間培養した。その後培養液中の免疫活性マーカーの産生量(腫瘍壊死因子(TNF- α)、インターフェロン- γ (Interferon- γ)、顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、インターロイキン-1(IL-1)、IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、IL-12等)を測定し、免疫活性を評価した。

安全且つ高い免疫活性が認められた多機能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* 評価に供した。

(4) 多機能アジュバントの *in vivo* 安全性及び有効性評価

アジュバントの *in vivo* 評価は以下の二つのモデルによって評価した。

(4-1) マウス背部皮下にアジュバント候補材料 腫瘍抗原を注入した。一定期間後、皮下別箇所腫瘍細胞を播種し、腫瘍の成長の経過観察を行った。抗腫瘍免疫応答が高められれば、腫瘍の成長が起こらないはずである(図2)。

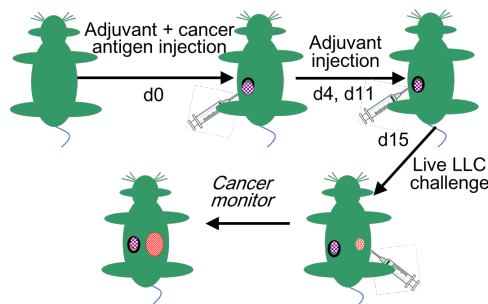


図2、アジュバントの *in vivo* 評価- 1

(4-2) 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。この腫瘍を物理治療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)を注入した。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った。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(図3)。

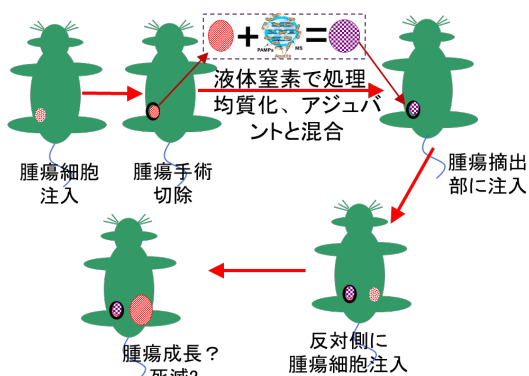


図3、アジュバントの in vivo 評価- 2

アジュバント注射したマウスの肝臓、脾臓、心臓、腎臓、肺など中にシリカの蓄積を ICP 発光分光分析によって解析した。多機能アジュバントの可視化は発光・蛍光イメージングや超音波によって解析した。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た。

(5) 多機能アジュバントのメカニズムの解明

(5-1) 抗腫瘍試験後(図2-3) マウスの骨髄、リンパ、脾臓細胞を獲得し、CD4+ T細胞や CD8+ T細胞やエフェクターメモリーT細胞 (CD44^{high}CD62L⁻)のポピュレーションをフローサイトメトリーによって解析した。

(5-2) マウス背部皮下にアジュバント候補材料 腫瘍抗原を注入した。一定期間後、注入にマクロファージや樹状細胞のポピュレーションをフローサイトメトリーによって解析した。

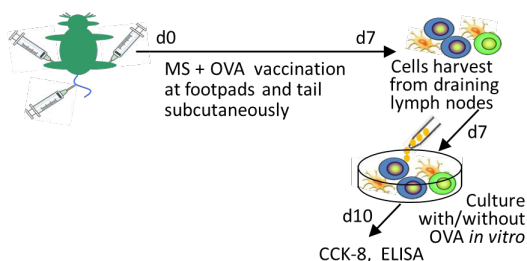


図4、アジュバントのメカニズム解析- 1

(5-3) マウスフットパッド、尾皮下にアジュバント候補材料 OVA を注入した。一定期間後、リンパ細胞を獲得した。回収したリンパ球は 10% FBS 添加 RPMI 1640 培養液中で、OVA 刺激を行いながら 72 時間培養を行った。一連の作業後のリンパ球の免疫活性は、リンパ球が産生するサイトカイン、具体的には IFN- γ 、IL-2、IL-4 及び IL-10 量によって比較した。IL-2 及び IFN- γ の産生量が増加すれば細胞性免疫が、IL-4 及び IL-10 の産生量が増加すれば体液性免疫が活性化されたと評価した(図4)。

(5-4) マウス腹腔内にアジュバント候補材料 腫瘍抗原を注入した。一定期間後、血液を獲得した。血液中の免疫活性マーカーの産生量(抗体)を測定し、疫活性を評価した(図5)。

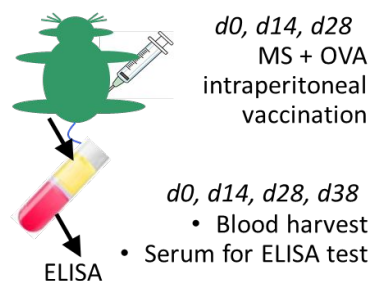


図5、アジュバントのメカニズム解析- 2

4. 研究成果

本研究課題では、癌抗原による効率的な免疫系の活性化のための多機能免疫増強、可視化アジュバント(メソポーラスシリカアジュバント、中空メソポーラスシリカアジュバント、ヒドロキシアパタイト ナノ粒子)を開発した。成果の詳細は以下の通りである。

アジュバントの免疫活性を影響するパラメータとして、無機粒子キャリアの種類、中空構造、免疫増強元素修飾、磁気修飾、蛍光標識、表面電荷、超音波や蛍光可視化等の制御に挑みました。例えば、開発したメソポーラスシリカ粒子は抗原付着を改善し、抗原提示を促進した。開発したメソポーラスシリカ粒子はの in vitro 免疫活性マーカーの産生量(TNF- α 、IL-1 β 、IL-4、GM-CSF 等)を促進した。

In vivo 安全性について、メソポーラスシリカは 50 μ g/mL までは細胞毒性が無く、生体適合性が高いということを示している。In vivo 注射部位の周囲に炎症、腫れ、壊死、肉芽腫、潰瘍などを観察されなかった。また、メソポーラスシリカ注入したマウスの肝臓、脾臓、心臓、腎臓、肺など中にシリカの蓄積

を見られなかった。

このメソポーラスシリカ単独を腫瘍抗原(腫瘍組織粉砕物や OVA)と混合するだけで、細胞性の獲得免疫である抗腫瘍免疫を誘導し、癌再発率を低減させることが出来ることを示している。

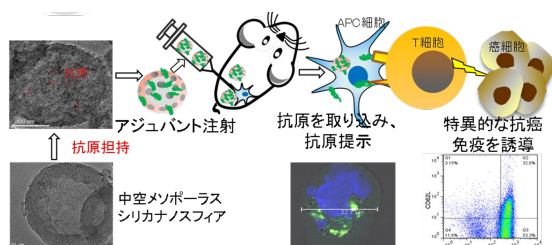


図6 メソポーラスシリカナノスフィアは、単独でもがんの免疫療法におけるアジュバントに使用できる

一例として抗原としてニワトリ卵白由来のアルブミン(以下 OVA と記載する)を使用し、OVA と被験物質であるメソポーラスシリカをマウスに皮下投与する。投与数日から数週間後にリンパ節等のリンパ組織や骨髄からリンパ球を採取して培養し、その際 OVA を加えて刺激する。OVA 刺激によりリンパ球が産生するサイトカインの種類と量から、抗原特異的な細胞性の獲得免疫や液性免疫の活性化を確認することができる。例えば IL-2、IFN- γ は細胞性の獲得免疫を、IL-4 及び IL-10 は液性免疫を特徴づけるサイトカインである。

球状メソポーラスシリカ粒子は、単独でモデル腫瘍抗原 OVA 投与マウスのリンパ球の IFN- γ 、IL-2、IL-4 及び/又は IL-10、血中抗体である IgA、IgG、Ig2G 等の産生量を増強させるか、もしくは、マウス肺癌由来 LLC 細胞破砕物を腫瘍抗原として又は OVA モデル腫瘍抗原としてマウスの皮下に形成させた腫瘍の成長を効果的に抑制することができることを確認した。次いで、形成された LLC 腫瘍組織を摘出して自家腫瘍抗原として用いた再発予防モデルマウスでの腫瘍再発防止効果を確認し、かつ免疫記憶を司るエフェクター記憶 T 細胞数の有意な増加を確認した。

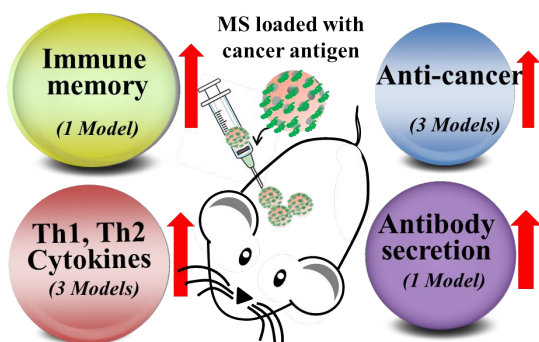


図6 多機能アジュバントのメカニズム

5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計7件)

Xiupeng Wang, Xia Li, Atsuo Ito, Kazuko Yoshiyuki, Yu Sogo, Yohei Watanabe, Atsushi Yamazaki, Tadao Ohno, Noriko M. Tsuji. Hollow structure improved anti-cancer immunity of mesoporous silica nanospheres in vivo. Small. Published online: 18 MAY 2016 (DOI: 10.1002/smll.201600677) **Back Cover**

Xiupeng Wang, Xia Li, Atsuo Ito, Yohei Watanabe, Noriko M. Tsuji. Rod-shaped and Fluorine-substituted Hydroxyapatite Free of Molecular Immunopotentiator Stimulates Anti-cancer Immunity in vivo. Chemical Communications. 52: 7078-7081 (2016) **Front Cover**

Xiupeng Wang, Xia Li, Kazuko Yoshiyuki, Yohei Watanabe, Yu Sogo, Tadao Ohno, Noriko M. Tsuji, Atsuo Ito. Comprehensive Mechanism Analysis of Mesoporous-Silica-Nanoparticle-Induced Cancer Immunotherapy. Advanced Healthcare Materials. 5: 1169-1176 (2016) **Back Cover**

Xiupeng Wang, Xia Li, Atsuo Ito, Yohei Watanabe, Yu Sogo, Noriko M. Tsuji, Tadao Ohno. Stimulation of In Vivo Antitumor Immunity with Hollow Mesoporous Silica Nanospheres. Angewandte Chemie International Edition. 55: 1899-1903 (2016)

Xiupeng Wang, Xia Li, Atsuo Ito, Yohei Watanabe, Yu Sogo, Motohiro Hirose, Tadao Ohno, Noriko M. Tsuji. Rod-shaped and substituted hydroxyapatite nanoparticles stimulating type 1 and 2 cytokine secretion. Colloids Surf B Biointerfaces. 139: 10-16 (2016)

王秀鵬、伊藤敦夫。「がん免疫療法のためのセラミック系アジュバント」、バイオマテリアル - 生体材料 -, 33: 154-161, (2015)

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. 102A:967-974 (2014)

〔国内学会一般講演〕(計 8 件)

- 1) Particle Size and Pore Size Dependent Immunogenic Activity of Mesoporous Silica-Based Adjuvants, 王 秀鵬、李 霞、伊藤 敦夫、十河 友, 第 36 回日本バイオマテリアル学会大会, タワーホール船堀, 東京、2014/11/17
- 2) A Simple Mesoporous Silica Adjuvant Stimulates Anti-tumor Immunity in vivo, 王 秀鵬、伊藤 敦夫、李 霞、十河 友, 第 37 回日本バイオマテリアル学会大会, 京都テルサ、2015/11/10
- 3) Mesoporous silica nanoparticles act as adjuvant for cancer immunotherapy, 王 秀鵬、辻 典子, The 44th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology, Venue Sapporo Convention Center (Sapporo)、2015/11/20
- 4) A Plain Hollow Mesoporous Silica Nanosphere Stimulates Anti-tumor Immunity in vivo, 王 秀鵬、伊藤 敦夫、李 霞、十河 友、渡邊 要平、辻 典子, つくば医工連携フォーラム 2016, 産業技術総合研究所つくばセンター、2016/01/22
- 5) Hollow mesoporous silica nanosphere for cancer immunotherapy, 王 秀鵬、李 霞、伊藤 敦夫、吉行 和子、渡邊要平、十河 友、Tadao Ohno (The Nippon Dental University) 辻 典子, LS-BT 合同研究発表会, 産総研つくば、2016/02/02
- 6) A Plain Hollow Mesoporous Silica Nanosphere Stimulates Anti-cancer Immunity in vivo, 王 秀鵬、李 霞、伊藤 敦夫、吉行 和子、渡邊 要平、十河 友、Tadao Ohno (The Nippon Dental University) 辻 典子, 第 4 回筑波大学-東京理科大学合同リトリート, つくば市吾妻 1 - 1364 - 1 オークラフロンティアホテル、2016/03/19
- 7) Si 置換アパタイトを用いた免疫アジュバント, 伊原秀 (早稲田大学大学院創造理工学研究科) 王 秀鵬、辻 典子、吉行 和子、十河 友、伊藤 敦夫、山崎 淳司 (早稲田大学大学院), 第 36 回日本バイオマテリアル学会大会, タワーホール船堀, 東京、2014/11/17
- 8) 放射線照射により誘導される免疫細胞死は脳内へもアプスコパル効果をもたらす, 坪井康次、ゲレルチュルン・アリウンゲレル、鈴木健之、王 秀鵬、伊藤 敦夫、大野 忠夫, 第 11 回がんワクチン療法研究会学術集会, 新宿、東京、2014/11/22

〔図書〕(計 1 件)

- 1) Xiupeng Wang, Ayako Oyane, Atsuo Ito. "Chapter 6, Signal Molecule-Calcium Phosphate Composites: Novel Approaches to Controlling Cellular and/or Biological Reactions and Functions", "Advances in Calcium Phosphate Biomaterials", Springer, B. Ben-Nissan

ed., pp 171-197 (2014)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: メソポーラスシリカ粒子
発明者: 王 秀鵬 (産総研) 辻 典子 (産総研) 吉行 和子 (産総研) 十河 友 (産総研) 伊藤 敦夫 (産総研) 小菅 勝典 (産総研) 大野 忠夫 (セルメディン(株)) 坪井 康次 (筑波大) 善光 純子 (筑波大) ゲレルチュルン アリウンゲレル (筑波大) 山崎 淳司 (早大)
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 2015-171512
出願年月日: 2015 年 8 月 31 日
国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者
王 秀鵬 (Xiupeng Wang)
国立研究開発法人 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)
国立研究開発法人 産業技術総合研究所・
研究グループ長

研究者番号: 30356480