

《様式B》

研究テーマ	「無機-生体複合微粒子を用いた温熱治療と免疫療法の協奏による 新規がん治療法開発」	
研究責任者	所属機関名	静岡大学
	官職又は役職	講師
	氏名	田代陽介
	メールアドレス	tashiro.yosuke@shizuoka.ac.jp
共同研究者 1	所属機関名	静岡大学
	官職又は役職	准教授
	氏名	大多哲史
共同研究者 2	所属機関名	浜松医科大学
	官職又は役職	准教授
	氏名	清水広介

(令和3年度募集) 第34回 助成研究 完了報告書

1. 実施内容および成果ならびに今後予想される効果の概要

本研究では、がん治療として近年注目されている「磁性ナノ粒子」と「細菌膜小胞」の長所を融合した『ハイブリッド微粒子（無機-生体複合微粒子）』を作製し、今までにない新規がん治療法の開発を目的とした。

複合微粒子作製にあたり、生体に有益な作用をもたらすプロバイオティクス大腸菌 *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN) を1%グリシン添加培地で培養し、膜小胞産生を促進させた。培養上清から超遠心により抽出した膜小胞と磁性ナノ粒子 SH30 を混合し、エクストルーダーで数回通過させたところ、磁性ナノ粒子が膜小胞内に封入されており、磁性膜小胞作製法が確立された。作製した磁性膜小胞は磁性ナノ粒子に比べてサイズが大きいものの、磁気特性には顕著な変化は見られなかった。また、免疫細胞マクロファージへの取り込みに変化はないものの、磁性膜小胞はサイトカインの一種である IL-6 の産生を向上させることが示された。以上の結果から、今回作製した磁性膜小胞は磁気特性と免疫誘発能を有した微粒子であり、温熱治療と免疫療法の両効果に有望なナノマテリアルであると考えられる。

今後は動物実験を実施して、温熱治療と免疫療法によるがん腫瘍減衰効果を *in vivo* で検証する。十分な効果が見られれば新規がん治療法として期待でき、特許出願としての可能性も秘めている。さらに磁気特性により優れた磁性ナノ粒子の利用や、免疫誘発効果の向上、さらには膜小胞表層デザインにより腫瘍組織へのターゲティング能の付与などにより、がん治療への実用化に向けた開発を継続する。

2. 実施内容および成果の説明

2-1 緒言

本研究では、がん治療として近年注目されている「磁性ナノ粒子」と「細菌膜小胞」の長所を融合した『ハイブリッド微粒子（無機-生体複合微粒子）』を作製し、今までにない新規がん治療法の開発を目的とした。

がんは2人に1人がかかる日本で死因第一位の疾病であり、古往今来その治療法の開発が進められてる。副作用の少ない次世代低侵襲がん治療法として注目されているのが、磁性ナノ粒子を用いた局所的温熱治療である。磁性ナノ粒子は磁場に対して応答するベクトル量（磁化）を有しており、がん患部へ集積した際に体外から交流励磁することで温熱効果が期待できる。磁性ナノ粒子を用いたがん温熱治療は1999年に提唱されて以降（Jordan et al. 1999 J Magn Magn Mater 201:413）、世界中で研究され続けているが、がん患部における治療に十分な発熱が課題となっている。

一方、近年がん治療の新たな可能性として、細菌が細胞外に放出する膜小胞を利用した免疫療法が挙げられる（Kim et al. 2017 Nat Commun 8:626）。膜小胞には細菌由来の成分が含有されており、ヒト細胞内に侵入して免疫を活性化することから、副作用なく抗腫瘍免疫反応を効果的に誘導する新規治療剤として期待がかかる。しかし膜小胞と腫瘍細胞に関連する基礎的な知見は不足しており、実用化に至るまでにはさらなる機能の理解が必要である。

そこで本研究では、磁性ナノ粒子と細菌膜小胞の特性を生かしたハイブリッド微粒子を作製することで、局所的温熱治療と腫瘍免疫療法の利点を組み合わせた新しいがん治療法開発を目指した。疾患の症状改善に有益な効果のあるプロバイオティクス細菌を用いることで、感染リスクがなく、分解酵素等の外界ストレスに耐性を有するハイブリッド微粒子を本研究で作製し、新規治療法の基盤となる技術構築を目的とした。

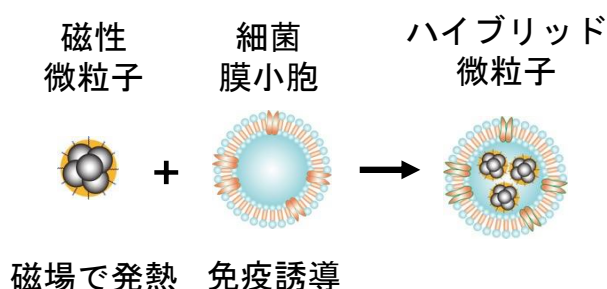


図1 本研究で作製するハイブリッド微粒子の概略図。

2-2 実験方法

2-2-1 磁性ナノ粒子の膜小胞コーティング

プロバイオティクス大腸菌 *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN) を供試菌株として用いた。膜小胞産生を促進させるため、1% グリシンを含有した LB 培地で 37 °C、200 rpm、一晚培養した。遠心で集菌後、上清を回収し、0.45 μm ならびに 0.22 μm 孔メンブレンフィルターにて大腸菌を取り除いた。上清を 150,000 × g、4 °C、2 h で超遠心して膜小胞を回収し、50 mM HEPES (pH 6.8)/0.85% NaCl で懸濁後、再度超遠心を行い洗浄した。

膜小胞と磁性ナノ粒子 SHA30 (Ocean Nanotech, 5 mg/mL) を混合し、ピペッティング後、エクストルーダー (Avanti) を用いて、孔径 100 nm メンブレンで 10 回、孔径 50 nm で 14 回通過させた。その後、磁気分離することにより磁性を持たない膜小胞を除去し、超遠心により濃縮した。

2-2-2 膜小胞の特性評価

0.01% poly-L-lysine をコーティングした Cu mesh 200 グリッドにサンプルを滴下後、2% (NH₄)₆[Mo₇O₂₄]₄H₂O でネガティブ染色を行い、透過電子顕微鏡で磁性膜小胞を観察した。膜小胞のタンパク質定量は Bradford 法を用いた。膜小胞のサイズ分布はナノ粒子トラッキング解析により評価した。磁性膜小胞の磁気特性は、作製した振動試料型磁力計を用いて行った。

2-2-3 磁性膜小胞の培養細胞への影響評価

培養細胞としてマウスのマクロファージ細胞株 J774.1 を用い、RPMI-1640 培地 (10% FBS、100 U/mL ペニシリン、100 μg/mL ストレプトマイシンを添加) で 37 °C、5% CO₂環境下で培養した。マクロファージへの微粒子取り込み評価では、微粒子を加えた J774.1 細胞を一晚培養し、磁気分離した後に細胞数を計測した。細胞傷害性の評価は、細胞質から放出される乳酸脱水素酵素 (LDH) 活性の定量により評価した。サイトカインの一種である IL-6 の産生量は、Enzyme-linked immuno-sorbent assay (ELISA) 法により行った。

2-3 結果

2-3-1 磁性膜小胞の調製法確立とその特性評価

磁性膜小胞を取得するために磁性ナノ粒子 SH30 と大腸菌由来膜小胞を混合し、エクストルーダーにより物理的に SH30 を膜小胞内に封入させた。25 $\mu\text{g/mL}$ の磁性ナノ粒子 SH30 に対して 200 $\mu\text{g/mL}$ タンパク質量の膜小胞を混合すると、磁気分離した微粒子においても十分なタンパク質濃度が確認された。また、作製された微粒子のサイズ分布のピークは SH30 に比べて右にシフトしていたことから (図 1)、磁性ナノ粒子への膜小胞コーティングの可能性が考えられた。さらに透過電子顕微鏡で観察したところ、SH30 の周りに生体膜状の物質が確認された (図 2)。以上のことから、エクストルーダーにより磁性膜小胞作製法が確立された。

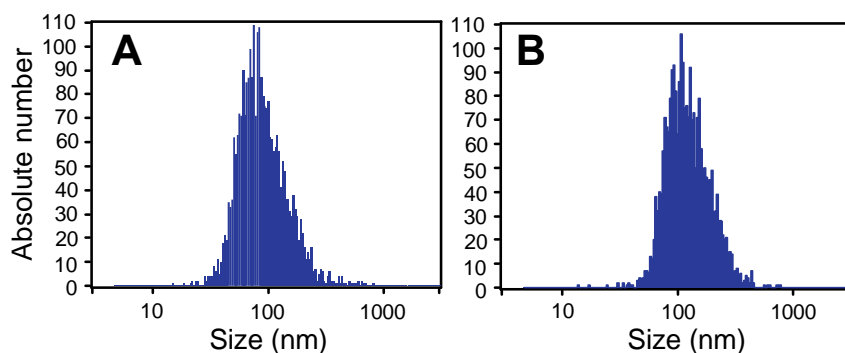


図 1 ナノ粒子トラッキング解析による微粒子のサイズ分布。(A) 磁性ナノ粒子 SH30、(B) 磁性膜小胞。

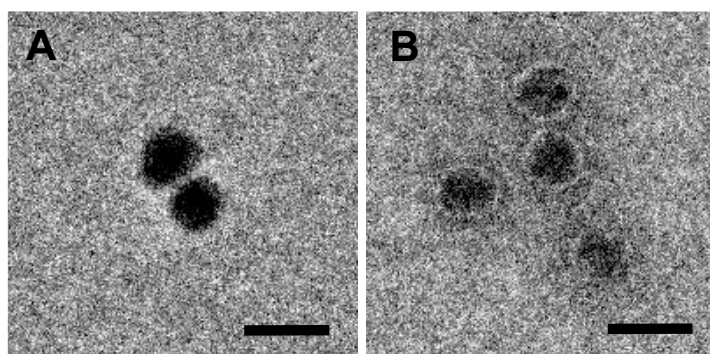


図 2 微粒子の透過電子顕微鏡観察。(A) 磁性ナノ粒子 SH30、(B) 磁性膜小胞。バー：50 nm。

作製した磁性膜小胞が、裸の磁性微粒子と同様に温熱効果を示すか検証するため、両微粒子の磁気特性を解析した。全く磁化されていない磁性体に磁界を加え、その際の磁界と磁束密度の関係をヒステリシス曲線で示した。磁気特性が異なるとヒステリシス曲線の形が変化することが知られているが、磁性膜小胞と磁性ナノ粒子の曲線を比較するとその曲線は重複することから、膜小胞に封入されていても磁性ナノ粒子の磁気特性は維持されていることが示された (図 3)。

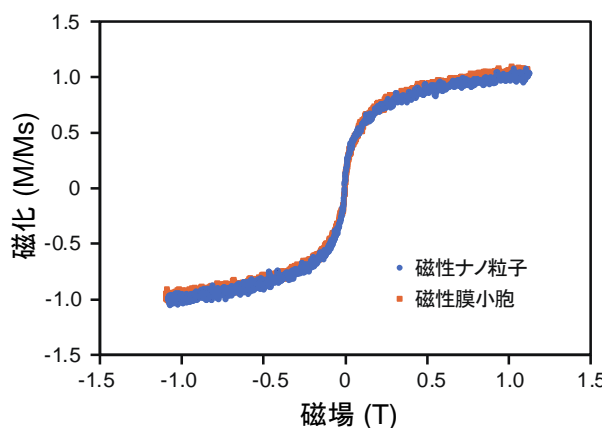


図 3 微粒子の磁気特性を示すヒステリシス曲線。

2-3-2 磁性膜小胞のマクロファージへの影響評価

磁性膜小胞の免疫誘発効果を調べるために、免疫細胞であるマクロファージ J774.1 株を用いて評価した。まず、マクロファージの貪食作用に変化が生じるかを評価するために、各微粒子（酸化鉄換算で $2.5 \mu\text{g/mL}$ ）をマクロファージと共に培養し、磁気分離することで貪食したマクロファージを単離して細胞数を計測した。その結果、磁性ナノ粒子と磁性膜小胞でマクロファージの取り込み量に変化は見られなかった（図 4）。

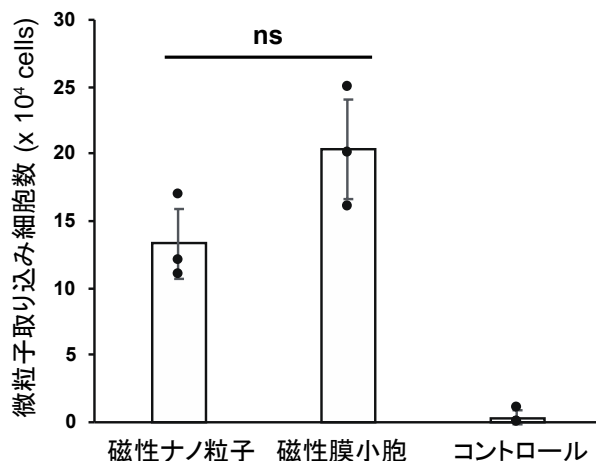


図 4 マクロファージの貪食作用により微粒子を取り込んだ細胞数。3 連の平均値と標準誤差を示しており、ns は有意差なしを表す。

次に、磁性膜小胞が細胞毒性を有するか評価するため、LDH 活性計測によるマクロファージへの細胞傷害性を解析した。その結果、タンパク質濃度で 400 ng/mL 、 $2 \mu\text{g/mL}$ 、 $4 \mu\text{g/mL}$ となるように磁性膜小胞を添加した際、マクロファージの LDH 活性はいずれも検出限界以下であり、磁性膜小胞の細胞傷害性は見られなかった。

さらに、実際に各粒子を添加した際のマクロファージのサイトカイン (IL-6) 産生量を評価した。IL-6 は急性炎症に関わるサイトカインであり、骨髄における好中球産生の誘導、IL-17 を特異的に高産生する Th17 細胞の分化を誘導し、癌細胞の生物学的活性に影響を与える。IL-6 産生量を解析したところ、磁性膜小胞は膜小胞や磁性ナノ粒子に比べてサイトカイン産生が多いことが示された（図 5）。

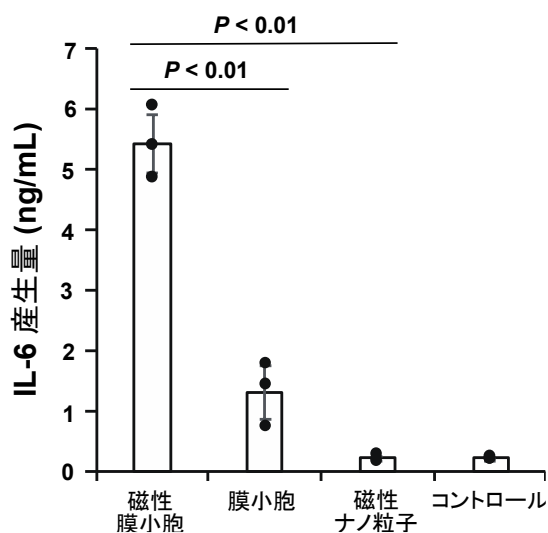


図 5 各微粒子添加によるマクロファージ IL-6 産生。磁性膜小胞と同じタンパク質濃度の膜小胞、ならびに同じ酸化鉄量の磁性ナノ粒子を添加した。3 連の平均値と標準誤差、*t*-test による有意差(*P*)を示す。

2-4 総括

本研究では、がん治療において温熱治療と免疫療法の両効果が期待できる磁性膜小胞の作製法を確立し、その特性を評価した。エクストルーダーを用いることで直径 30 nm 程の磁性微粒子をプロバイオティクス大腸菌内に封入可能であることが示された。膜小胞に封入されると粒子サイズは高くなるものの、磁気特性に大きな変化は生じないことが示された。さらにマクロファージへの影響を調べたところ、マクロファージの取り込み量に変化は生じなかったものの、磁性膜小胞はサイトカイン産生を顕著に誘発することが示された。以上の結果から、今回作製した磁性膜小胞は磁気特性を有し、かつ免疫細胞を刺激する効果を示しており、温熱治療と免疫療法の両効果を合わせ持つ有望なナノマテリアルであると考えられる。今後は動物実験により腫瘍組織の消失過程を観察して *in vivo* でその効果を検証するとともに、磁気特性と免疫誘発をより増強させた微粒子を作製する。さらに膜小胞表層に腫瘍組織に特異的な分子を提示させることで、ターゲティング能を付与させ、磁性膜小胞のがん治療実用化を目指す。