

セラミックバイオマテリアルの抗がん免疫活性化の機序探索

産業技術総合研究所 健康工学研究部門 王 秀鵬

Anti-Tumor Immunity of Ceramic Biomaterials

Xiupeng Wang

Health Research Institute, National Institute of Advanced Industrial Science and
Technology (AIST)

ナノサイズのセラミックバイオマテリアルは体内での安定性・分解性があり、多孔質の形態など制御が可能な点で体に優しい第4のがん治療法として注目されるがん免疫療法用の新たな免疫賦活剤としての応用を期待させる。筆者らは近年、生体由来免疫刺激物質を含有しない球状中空メソポーラスシリカ粒子が、抗がん免疫を誘導することを動物実験で明らかにした。本研究では、中空の酸化亜鉛ナノ粒子や棒状ハイドロキシアパタイトを合成し、これらのセラミックバイオマテリアルにがん抗原を担持し、セラミックバイオマテリアルの物理化学特性とがん抗原担持量を評価した。セラミックバイオマテリアルと抗原提示細胞と一緒に培養し、セラミックバイオマテリアルの *in vitro* 免疫活性の評価を行った。また、がん抗原を担持したセラミックバイオマテリアルをマウスの背部皮下へ投与し、セラミックバイオマテリアルの *in vivo* 抗がん免疫活性化、及び抗がん免疫活性化の機序探索を行った。その結果、中空の酸化亜鉛ナノ粒子は、T細胞のポピュレーションを増加させるとともに、がん免疫療法のアジュバントとして使用できることを示した。また、棒状ハイドロキシアパタイトのサイズ依存的な抗腫瘍免疫活性を示した。

Nano-sized ceramic biomaterials are promising immunoadjuvants for cancer immunotherapy owing to their stability, degradability and tunable structure. We have shown in previous work that solo spherical hollow mesoporous silica particles induce anti-tumor immunity in animal models. In this study, hollow zinc oxide nanoparticles and rod-like hydroxyapatite were synthesized. The physicochemical properties, amount of cancer antigen loaded on the ceramic biomaterials and *in vitro* immunogenic activity were evaluated. In addition, the *in vivo* anti-tumor immunity and mechanism were analyzed using mouse models. The results showed that hollow zinc oxide nanoparticles increased T cell population *in vivo*, thus can be used as adjuvant for cancer immunotherapy. In addition, the rod-shaped hydroxyapatite exhibited a size-dependent anti-tumor immune activity *in vivo*.

1. はじめに

がん免疫療法は体に優しいがん治療法として注目されるが、がん抗原に対する免疫反応を安全且つ強力に活性化できるアジュバントがほとんどないことが問題である^{1, 2)}。我々は、生体由来免疫刺激物質を含有しない球状中空メソポーラスシリカ粒子が、抗がん免疫を誘導することを動物実験で明らかにした³⁾。本研究では、中空の酸化亜鉛(HZnO)ナノ

粒子や棒状ハイドロキシアパタイト(HA)を合成し、これらのセラミックバイオマテリアルにがんの物理化学特性、がん抗原担持量、*in vitro* 免疫活性、*in vivo* 抗がん免疫活性化、及び抗がん免疫活性化の機序探索を行った。

2. 実験方法

2.1 中空の酸化亜鉛(HZnO)ナノ粒子の合成

カーボンナノスフェア(1g、ref. 4により合成)を50 mLの1M $Zn(NO_3)_2$ 溶液に超音波処理により均一に分散させた。超音波処理を約6時間後、5サイクルの遠心分離 / 洗浄 / 再分散を超純水で行った。得られた生成物は80°Cで4時間乾燥させた後、550°Cで5時間熱処理してHZnO ナノ粒子を合成した⁴⁾。

2.2 棒状ハイドロキシアパタイト(HA)の合成

$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 、 $(NH_4)_2HPO_4$ 、ヘキサデシルトリメチルアンモニウムブロミド、アンモニア、クエン酸三ナトリウム、硝酸、尿素を用いてリン酸カルシウム溶液を作製し、pH5.40~11.22に調整し、180°Cで6-24時間水熱処理した。得られた生成物は超純水、エタノール、硝酸アンモニウム溶液で洗浄して凍結乾燥することで、長さ100nm~10umの棒状HAを合成した⁵⁾。

2.3 セラミックバイオマテリアルの物理化学的特性の評価

合成したセラミックバイオマテリアルは、電界放出型走査電子顕微鏡、透過型電子顕微鏡、X線回折装置、赤外分光光度計、ゼータ電位測定装置により評価した。セラミックバイオマテリアルの抗原担持量をタンパク質定量キットにより評価した。

2.4 セラミックバイオマテリアルの*in vitro*抗がん免疫活性の評価

セラミックバイオマテリアルと抗原提示細胞(マウス骨髄由来樹状細胞など)の培養系に添加し、抗原提示細胞によるセラミックバイオマテリアルの摂取量を共焦点レーザー走査顕微鏡とフローサイトメーター解析により評価した。セラミックバイオマテリアルの*in vitro* 免疫活性は、サイトカイン産生量をELISA法で定量し評価した。

2.5 セラミックバイオマテリアルの*in vivo*抗がん免疫活性、及び抗がん免疫活性化の機序探索

In vivo での抗腫瘍効果は、がん抗原を担持したセラミックバイオマテリアルをマウスの背部皮下へ投与し、移植してあった腫瘍の成長を経過観察して評価した。抗がん免疫活性化の機序探索は、脾臓で抗がん免疫に関連する細胞集団をフローサイトメーター解析によって測定した。また、脾臓中サイトカイン含量をELISAキットによって測定した。

3. 結果と考察

3.1 HZnOナノ粒子の合成と抗がん免疫活性

HZnO ナノ粒子は、カーボンナノスフェアをテンプレートとして使用し合成した。HZnO ナノ粒子は、壁厚が約20~40 nm、サイズが約100~200 nm、壁に小さな開口を持つ中空構造を示した。HZnO ナノ粒子は、*in vitro* での抗原提示細胞による癌抗原の細胞

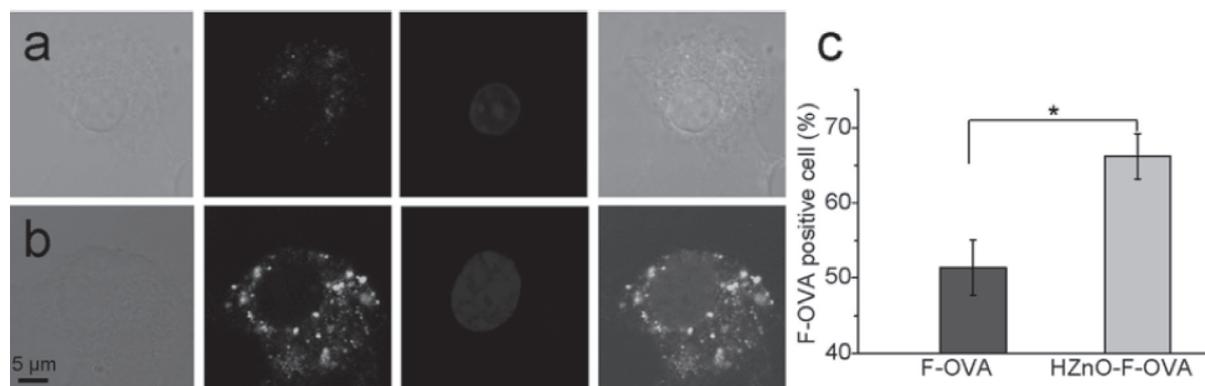


Fig. 1 HZnO nanospheres increased cellular uptake of model antigen by BMDCs *in vitro*. Representative confocal laser scanning microscopy images (from left to right, bright field, F-OVA, and cell nucleus and merged images), F-OVA (a), HZnO-F-OVA (b), and percentage of F-OVA positive cells after 4 h of culture (c). Reprinted with permission from ref. 4. Copyright 2017, John Wiley & Sons, Inc.

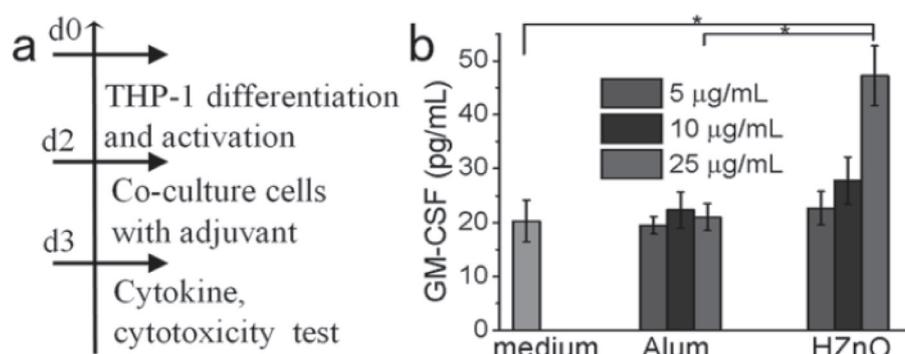


Fig. 2 HZnO nanospheres stimulated immunogenic activity *in vitro*. Experimental protocol (a), GM-CSF secretion by THP-1 differentiated macrophage-like cells *in vitro* (b). Reprinted with permission from ref. 4. Copyright 2017, John Wiley & Sons, Inc.

取り込み (Fig. 1) および GM-CSF 分泌 (Fig. 2) を促進し、癌免疫療法のアジュバントとしての可能性を示した。

HZnO ナノ粒子の抗がん免疫活性について、HZnO ナノ粒子で免疫化されたマウスは、alum で免疫化されたマウスより高い抗がん免疫効果を示した (Fig. 3)。HZnO ナノ粒子の抗がん免疫活性化の機序について、HZnO ナノ粒子は alum と比べて、マウス脾臓中の CD4⁺ および CD8⁺ T 細胞数を増加させることが分かった。しかし、HZnO ナノ粒子は alum と比べて、マウス脾臓中の TNF- α 、IFN- γ 、IL-2、IL-10 分泌の減少傾向を示した (Fig. 4)。

HZnO ナノ粒子の抗がん免疫活性化の機序は、中空メソポーラスシリカナノスフェアとは異なっていたことがわかった^{3, 6)}。HZnO ナノ粒子は alum と比べて TNF- α 、IFN- γ 、IL-2、IL-10 分泌の減少に対して (Fig. 5)、中空メソポーラスシリカは alum と比べて Th1 (IFN- γ 、IL-2) および Th2 (IL-4、IL-10) サイトカインの分泌を大幅に改善した^{3, 6)}。

3.2 棒状ヒドロキシアパタイトの合成と抗がん免疫活性

棒状ヒドロキシアパタイト (HA) のサイズを制御し、長さ 100nm (HA1)、200nm (HA2)、

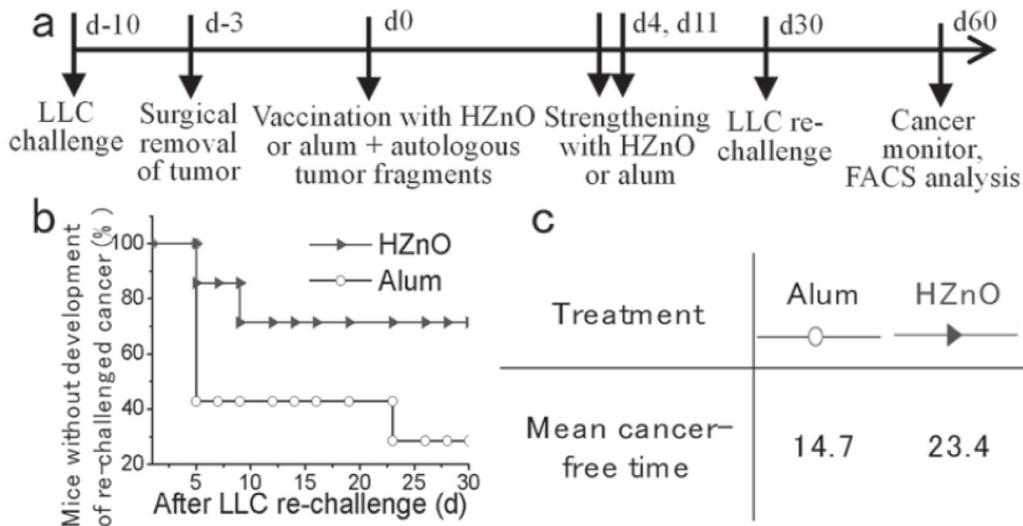


Fig. 3 HZnO nanospheres showed increased anti-cancer immunity than alum *in vivo*. Experimental procedure (a), percentage of mice without development of re-challenged cancer (b), and mean cancer-free time after LLC re-challenge (c). Reprinted with permission from ref. 4. Copyright 2017, John Wiley & Sons, Inc.

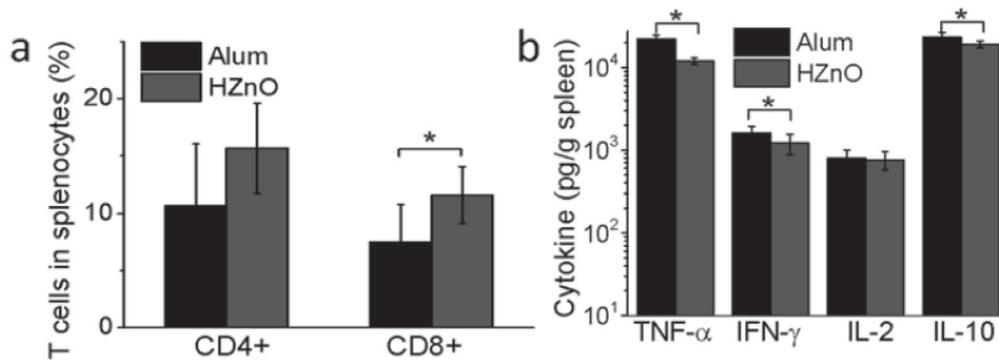


Fig. 4 Mice immunized with HZnO nanospheres exhibited higher percentage of CD4⁺ and CD8⁺ T cells in splenocytes (a-b), and lower TNF- α , IFN- γ , IL-2 and IL-10 secretion in spleen of mice (c) than those immunized with Alum at the endpoint. Reprinted with permission from ref. 4. Copyright 2017, John Wiley & Sons, Inc.

500 nm (HA3)、1 μ m (HA4)、10 μ m (HA5) の棒状 HA を合成した。長さ 100~500 nm の HA 短ロッドは抗原送達を促進し (Fig. 5)、長さ 500 nm~10 μ m の HA 長ロッドは局所に長期にわたる抗原放出を促進した (Fig. 6)。長さ 500 nm の HA は短ロッドと長ロッドの両方の特徴がバランスしていて、高い抗腫瘍効果をしめした (Fig. 7)。本研究は、棒状 HA のサイズ依存的な抗腫瘍免疫応答を解明し、免疫アジュバントの設計のための有用な情報を提供する。

4. 結論

本研究では、中空の酸化亜鉛ナノ粒子や棒状ハイドロキシアパタイトを合成し、これらのセラミックバイオマテリアルの物理化学的特性、*in vitro* 抗がん免疫活性、*in vivo* 抗がん免疫活性、及び抗がん免疫活性化の機序探索を行った。その結果、HZnO ナノ粒子は、

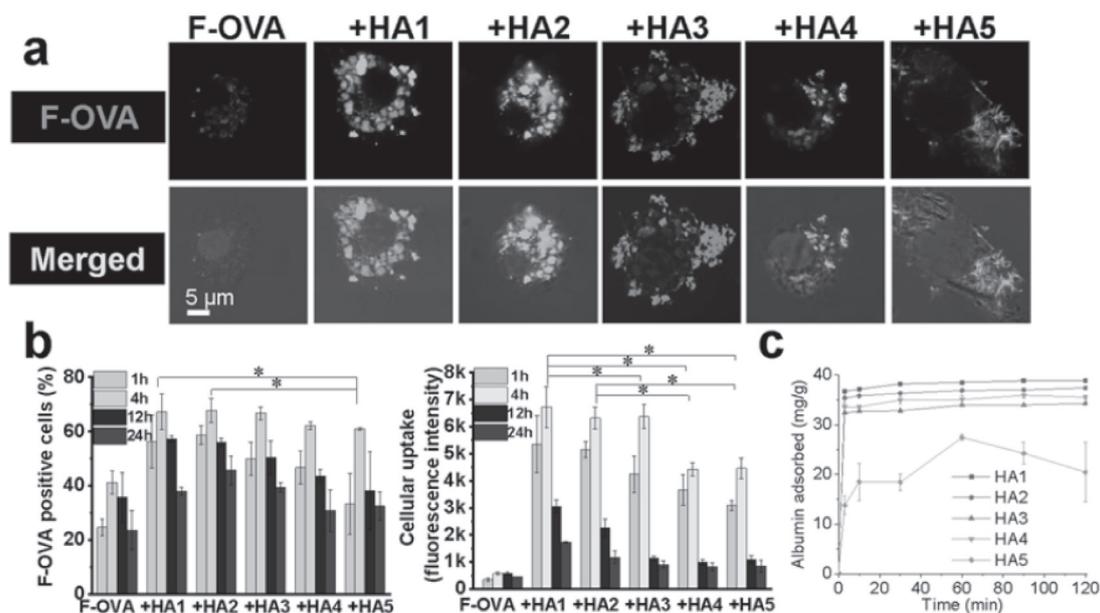


Fig. 5 Short HA rods increase the cellular uptake of F-OVA-loaded HA rods by BMDCs and BMDCs maturation. (a) Representative confocal laser scanning microscope images of free F-OVA and F-OVA-loaded HA rods after 4 h of culture. (c) Quantitative results of F-OVA positive BMDCs populations (Left) and fluorescence intensity (Right). (d) Albumin adsorption by HA rods. Reprinted with permission from ref. 5. Copyright (2019) American Chemical Society.

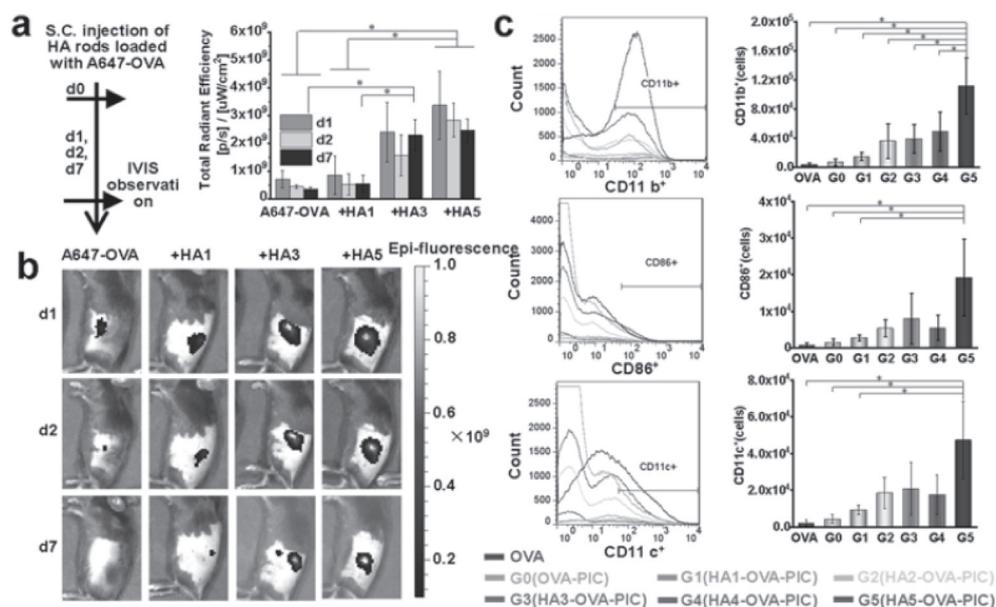


Fig. 6 Long HA rods prolong Alex Fluor 647-OVA release and increase CD11b⁺, CD86⁺ and CD11c⁺ cells around injection site *in vivo*. (a) Experimental procedure (Left) and radiant efficiency around injection site (Right). (b) IVIS images of mice 1-7d after injection. (c) Population of CD11b⁺, CD86⁺ and CD11c⁺ cells around injection site *in vivo*. Reprinted with permission from ref. 5. Copyright (2019) American Chemical Society.

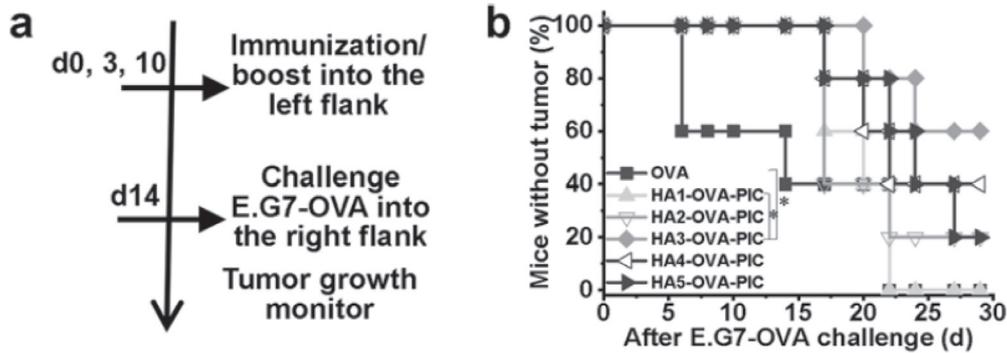


Fig. 7 HA rods with length of 500 nm exhibit best anti-cancer immunity in mice. (a) Experimental procedure, (b) percentage of tumor-free mice. Reprinted with permission from ref. 5. Copyright (2019) American Chemical Society.

in vitro での抗原提示細胞による癌抗原の細胞取り込みを促進し、マウス脾臓中の CD4+ および CD8+ T 細胞数を増加させるとともに、がん免疫療法のアジュバントとして使用できることを示した。棒状ハイドロキシアパタイトのサイズ依存的な抗腫瘍免疫活性を示して、長さ 500nm のハイドロキシアパタイトは、高い抗腫瘍効果を示した。

5. 謝辞

本研究の一部は、日本板硝子材料工学助成会、AIST、科研費の支援を受けた。ここに心より感謝いたします。

6. 参考文献

- 1) C. Clements and E. Griffiths, The Global Impact of Vaccines Containing Aluminium Adjuvants, *Vaccine*, 20, S24 (2002).
- 2) S. Reed, M. Orr and C. Fox, Key Roles of Adjuvants in Modern Vaccines, *Nat. Med.*, 19, 1597 (2013).
- 3) X. Wang, X. Li, A. Ito, Y. Watanabe, Y. Sogo, N. Tsuji and T. Ohno. Stimulation of In Vivo Antitumor Immunity with Hollow Mesoporous Silica Nanospheres, *Angewandte Chemie International Edition*, 55, 1899 (2016).
- 4) X. Wang, X. Li, A. Ito, Y. Sogo, Y. Watanabe and N. Tsuji. Hollow ZnO Nanospheres Enhance Anticancer Immunity by Promoting CD4⁺ and CD8⁺ T Cell Populations In Vivo, *Small*, 38, 1701816 (2017).
- 5) X. Wang, S. Ihara, X. Li, A. Ito, Y. Sogo, Y. Watanabe, A. Yamazaki, N. Tsuji and T. Ohno, Rod-Scale Design Strategies for Immune-Targeted Delivery System toward Cancer Immunotherapy, *ACS Nano*, 13, 7705 (2019)
- 6) X. Wang, X. Li, K. Yoshiyuki, Y. Watanabe, Y. Sogo, T. Ohno, N. Tsuji and A. Ito, Comprehensive Mechanism Analysis of Mesoporous-Silica-Nanoparticle-Induced Cancer Immunotherapy, *Advanced Healthcare Materials*, 5, 1169 (2016)