

腫瘍免疫環境を可視化する 光音響応答性多糖ナノ粒子型免疫アジュバントの開発

三 浦 理 紗 子*

Development of Adjuvant-conjugated and Photoacoustic Imaging-responsive Polysaccharide Nanogel Probe for Diagnosis of Tumor Immune Environment

Risako MIURA*

Cancer immunotherapy shows low therapeutic efficiency against “cold tumor”, because of the immunosuppressive tumor microenvironment. Here, we have developed adjuvant-conjugated nanogel-based photoacoustic (PA) imaging probe to realize early diagnosis of cold tumor and tuning tumor immune environment from cold to hot by activating M2 macrophages. M2 macrophage-targeting nanogel-based PA probe (PMI nanogel) was conjugated with R848, a TLR7/8 adjuvant, via hydrophobic interaction, and then the characteristics of PMI-R848 nanogel were evaluated. PMI-R848 nanogel was interacted with M2 macrophages via mannose receptor-mediated endocytosis, and induced Th1 type activation of M2 macrophages effectively compared to R848 molecule only.

1. 緒言

がん免疫療法とは、患者の免疫システムを利用した治療法であることから、副作用が少なく完全奏効率が高い治療法として期待されている。その一方で、その治療効果は腫瘍免疫環境と大きく相関があり、免疫抑制性の M2 マクロファージが多く分布する Cold Tumor に対する奏効率が低いことが明らかになっている[1]。さらに、Cold Tumor は高い転移性や増殖性を有し、予後が悪いことから、Cold Tumor を早期に発見し、免疫療法に対する感受性が高い Hot な腫瘍免疫環境 (Hot Tumor) に転換する医薬品の開発が急務である。

そこで本研究では、腫瘍免疫環境を Hot な環境へ転換し得る医薬品の開発を目的とし、M2 マクロファージ特異的に免疫アジュバント分子を送達するドラッグデリバリーキャリアの開発を実施した。これまでに、親水性多糖であるプルランに、光音響造影剤として機能する疎水性近赤外蛍光色素 (NIR) と Cold Tumor に多く分布している M2 マクロファージのリガンドを同時に導入した新規「ナノゲル型光音響造影剤」の開発に成功している。この M2 標的性を有するナノゲル型光音響造影剤に、さらに免疫アジュバント分子を複合化させることにより、M2 マクロファージが多く分布する Cold Tumor の検出と Hot Tumor への転換誘導が実現可能であると考えられる。ここでは、免疫アジュバントとしてトル様レセプター7/8 (TLR7/8) のアゴニストである R848 を選択し、免疫アジュバント複合化多糖ナノゲルの合成と物性評価、および *in vitro* でのマクロファージ活性化について評価したため報告する。

2. 免疫アジュバント複合化多糖ナノゲルの合成と物性評価

まず、主鎖である親水性多糖のプルランに、疎水性近赤外蛍光色素 (IR820) と、M2 マクロファージに発現する表面抗原である CD206 に対するリガンド (マンノース) を修飾した Pullulan-mannose-IR820 (PMI) を合成した。この PMI は IR820 の疎水性相互作用を駆動力に、水中でナノゲルを形成することが明らかとなっており、PMI を HEPES Buffer に溶解し、超音波処理を行うことで、単分散な PMI ナノゲル溶液を得た (粒径 108 nm)。続いて、PMI ナノゲル溶液に R848 を添加し、一晩攪拌することで R848 複合化 PMI ナノゲル (PMI-R848 ナノゲル) 溶液を得た (図1)。

PMI-R848 ナノゲルの粒径を動的光散乱法により測定したところ 73 nm であり、R848 の複合化により粒径が減少したことが明らかとなった。また、

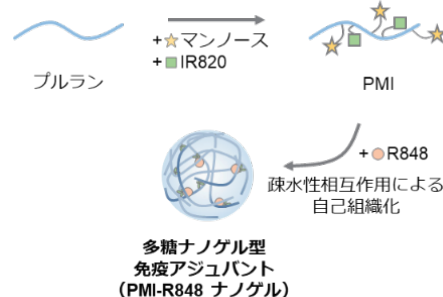


図1 PMI-R848 ナノゲルの模式図。

2024年3月1日 受理

* 豊田理研スカラー

京都大学大学院工学研究科 物質エネルギー化学専攻

紫外-可視吸収スペクトル測定から、PMI-R848 ナノゲルに R848 由来の吸収ピークが観測され、確かに R848 が複合化していることが分かった。R848 はベンゼン環を有する疎水性小分子であり、IR820 が形成している会合体中に挿入されることで、複合化していると考えられる。また、複合化に伴い粒径が減少していることから、R848 が複合化する際に IR820 が形成するナノゲル内の物理的架橋点同士を近づけ、ナノゲルを収縮させていることも示唆された。

3. M2 マクロファージ標的性と免疫活性化

R848 は、マクロファージや樹状細胞など抗原提示細胞のエンドソーム内に発現する TLR7/8 のアゴニストであり、Th1 型の免疫活性を誘導する[2]。この抗原提示細胞の Th1 型の免疫活性化によるサイトカインやケモカイン放出をトリガーとして、Cold Tumor から Hot Tumor への腫瘍免疫環境の転換が可能になる[2]。そこで、マウス由来マクロファージ細胞株 (RAW264.7) を用い、M2 マクロファージへの標的性、および、PMI-R848 ナノゲルによる M2 マクロファージの活性化を評価した。

まず、RAW264.7 細胞をサイトカインと共培養し、M1 あるいは M2 マクロファージに分化させた。M1 あるいは M2 分化 RAW264.7 細胞に PMI-R848 ナノゲルを添加し、その細胞溶解液の蛍光強度からナノゲルの取り込み量を比較したところ、PMI-R848 ナノゲルは M2 マクロファージ特異的に取り込まれていることが示された。この傾向は、R848 複合化前の PMI ナノゲルと同様であり、M2 マクロファージに発現するマンノースレセプターを介した能動的な相互作用によるものだと考えられる。続いて、M1 あるいは M2 マクロファージに対して、R848、PMI-R848 ナノゲルを添加し、一定時間共培養後の培養後の上清における TNF- α 量を評価したところ、M1 マクロファージに対しては R848 添加群と PMI-R848 ナノゲル添加群で TNF- α 産生量に差は見られなかった一方で、M2 マクロファージに対しては、PMI-R848 ナノゲル添加群の方が有意に TNF- α 産生量が多いことが示された (図 2)。これは、PMI-R848 ナノゲルがマンノースレセプターを介し、能動的に M2 マクロファージと相互作用したこと、さらに、エンドサイトーシスにより M2 マクロファージに取り込まれ、エンドソーム内に発現する TLR7/8 へ効率的に R848 を送達したことにより、M2 マクロファージの活性化に伴う、非常に強い TNF- α 産生を誘導したと考えられる。

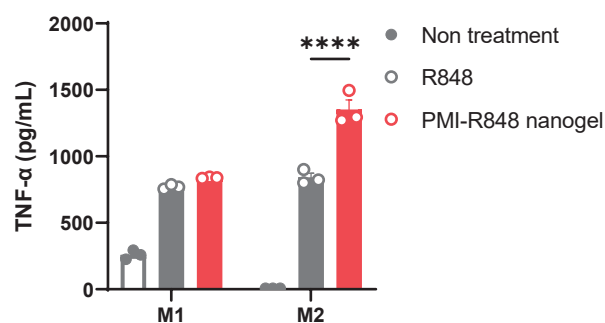


図2 M2マクロファージの活性化評価。

4. 結言

本研究では、免疫アジュバント複合化多糖ナノゲル (PMI-R848 ナノゲル) を設計・合成し、その M2 マクロファージ標的性および活性化について評価を行った。M2 マクロファージ標的性を有する PMI ナノゲルへ、TLR7/8 のアゴニストである R848 を混合したところ、ナノゲルの粒径減少および紫外-可視吸収スペクトル測定から、疎水性相互作用を駆動力に R848 が複合化されたことが示された。さらに、マンノースの修飾により M2 マクロファージと特異的に相互作用し、炎症性サイトカインである TNF- α の産生を強く誘導することが明らかとなった。以上の結果から、新規に開発した PMI-R848 ナノゲルは M2 マクロファージ特異的な活性化を誘導し得る、免疫アジュバントとして機能することが明らかとなった。今後は、腫瘍の PA 造影と同時に、腫瘍免疫環境の活性化を実現するセラノスティクスプローブとしての機能を明らかにする。

REFERENCES

- 1) P. Bonaventura, T. Shekarian, V. Alcazer, J. Valladeau-Guilemond, S. Valsesia-Wittmann, S. Amigorena, C. Caux and S. Depil, *Front. Immunol.*, **10** (2019) 1-10.
- 2) F. J. Van Dalen, M. H. M. E. Van Stevendaal, F. L. Fennemann, M. Verdoes and O. Ilina, *Molecules*, **24** (2019).