

研究成果報告書

(国立情報学研究所の民間助成研究成果概要データベース・登録原稿)

研究テーマ (和文) AB		c-di-GMP 封入 MEND による新規免疫不活化システムの創製			
研究テーマ (欧文) AZ		Invention of new adjuvant system with c-di-GMP encapsulated MEND			
研究氏 代表名 者	カタカナ CC	姓)ヒヨウドウ	名)マモル	研究期間 B	2013 ~ 2015 年
	漢字 CB	兵藤	守	報告年度 YR	2015 年
	ローマ字 CZ	Hyodo	Mamoru	研究機関名	愛知工業大学
研究代表者 CD 所属機関・職名		愛知工業大学工学部 講師			
概要 EA (600 字~800 字程度にまとめて下さい。)					
<p>環状ビス 3'-5'ジグアニル酸 (c-di-GMP) は 1990 年にバクテリアから発見されたセルロース生合成の補酵素である。我々のグループでは 2007 年に世界で初めて c-di-GMP がいわゆる病原体関連分子パターン (PAMPs) として免疫を活性化させる機能を持つこと、2013 年にはそのレセプターが哺乳類細胞などの細胞質に存在する免疫関連アダプター分子である STING (Stimulator of interferon genes) であることを突き止めた。これらの知見から c-di-GMP は免疫賦活剤として使用できる可能性が示された。</p> <p>しかしながら c-di-GMP を医薬として使用する場合、その作用機序から大きな問題が浮かび上がった。即ち、c-di-GMP は分子内にホスホジエステル結合を有し、中性では-2 の電荷を示す分子であるが、その標的である STING は細胞質に存在するため単純に c-di-GMP を細胞にふりかけても免疫誘導するのは難しいという問題である。</p> <p>我々はこの問題の克服のためリポソームを用いるドラッグデリバリーの手法を導入することとした。リポソームは脂質二重膜からなる直径 100 nm 程度のナノキャリアでその内水相に水溶性の医薬を封入して細胞膜を超えて細胞に医薬小分子や核酸分子などを運ぶことができる。このシステムを利用すれば効率的に免疫誘導できると考えた。</p> <p>我々はまず c-di-GMP の封入条件と使用する脂質の最適化を行った。その結果、我々が開発した pH 応答性合成脂質である YSK05 を用いたリポソームを使用するとより高い 1 型インターフェロンの誘導を達成し、さらなるチューニングにより c-di-GMP/YSK05 リポソームを完成させた。次いで、我々はこの c-di-GMP/YSK05 リポソームを用い、共刺激分子である CD80, CD86, MHC class I and II の発現、cytotoxic T cells 活性などを確かめ、c-di-GMP/YSK05 リポソームが宿主の免疫を活性化し、1 型インターフェロンを誘導することを示した。最後に我々は OVA を発現したがん細胞を植えたマウスに OVA および c-di-GMP/YSK05 リポソームで免疫して、そのがん細胞の生着および成長を調べたところ、コントロール群などと比較してほぼがん細胞は成長しない、即ち in vivo におけるがん免疫治療を行い得るシステムであることを示すことができた。</p> <p>さらに我々は研究を進め、c-di-GMP/YSK05 リポソームは in vivo にてがん治療に必要なサイトカインである IFN-γ を誘導すること、ナチュラルキラー細胞を誘導できることを示し、最終的には抗原を導入することなく、免疫賦活剤として c-di-GMP/YSK05 リポソーム単独で転移性をもつメラノーマを駆除できることを示すことができた。これらの結果から我々は c-di-GMP/YSK05 リポソームという医薬品としての利用が期待できる免疫賦活剤であるドラッグデリバリーシステムを開発することに成功した。</p>					
キーワード FA	c-di-GMP	リポソーム	免疫賦活剤	がん免疫治療	

(以下は記入しないで下さい。)

助成財団コード TA					研究課題番号 AA								
研究機関番号 AC					シート番号								

発表文献（この研究を発表した雑誌・図書について記入して下さい。）									
雑誌	論文標題 ^{GB}	A new adjuvant system ‘cyclic di-GMP/YSK05 liposome’ for cancer immunotherapy							
	著者名 ^{GA}	H. Miyabe et al.	雑誌名 ^{GC}	Journal of Controlled Release					
	ページ ^{GF}	20~27	発行年 ^{GE}	2	0	1	4	巻号 ^{GD}	184
雑誌	論文標題 ^{GB}	Liposomes loaded with a STING ligand, cyclic di-GMP, enhance cancer immunotherapy against metastatic melanoma							
	著者名 ^{GA}	T. Nakamura et al.	雑誌名 ^{GC}	Journal of Controlled Release					
	ページ ^{GF}	149~157	発行年 ^{GE}	2	0	1	5	巻号 ^{GD}	216
雑誌	論文標題 ^{GB}								
	著者名 ^{GA}		雑誌名 ^{GC}						
	ページ ^{GF}	~	発行年 ^{GE}					巻号 ^{GD}	
図書	著者名 ^{HA}								
	書名 ^{HC}								
	出版者 ^{HB}		発行年 ^{HD}					総ページ ^{HE}	
図書	著者名 ^{HA}								
	書名 ^{HC}								
	出版者 ^{HB}		発行年 ^{HD}					総ページ ^{HE}	

欧文概要 EZ

Cyclic bis 3'-5' diguanylate (c-di-GMP) was found from *Acetobactor xylinum* in 1990 as a cofactor of cellulose synthase. We have proved that c-di-GMP activated immune system and its receptor was STimulator of INterferon Genes (STING) which was located on cytosol and acted as an adaptor molecule for immune response. We tried to apply c-di-GMP for cancer immunotherapy but it had a problem. C-di-GMP had two phosphoriester linkage and had two negative charge on it. Therefore it was difficult to penetrate cellular membrane even the target receptor was located on cytosol.

To solve this problem, we have employed liposomal drug delivery system. c-di-GMP encapsulated liposome could penetrate cellular membrane and c-di-GMP might be exposed into a cytosol, bind to STING and induce type I interferons which triggered to kill cancer cells.

We first conducted in vitro experiments to prove the benefit of the YSK05 lipid which was the synthetic pH-sensitive lipid in the induction of IFN-β and we have proved that the high fusogenicity of the YSK05 liposomes resulted in the efficient induction of IFN-β. Next, we have examined the expression of co-stimulatory molecules and confirmed the expression of CD80, CD86 and MHC class I which have the ability to help to activate T lymphocytes. Finally, we have carried out preventive anti-tumor experiments and found that c-di-GMP/YSK05 liposomes significantly inhibited the growth of tumor cells compared to c-di-GMP only, empty YSK05 liposomes and proved the availability of c-di-GMP/YSK05 liposome as an adjuvant.

Moreover, we have proved that c-di-GMP/liposome could induced the production of type I interferon (IFN), inflammatory cytokines and IFN-γ, as well as the activation of NK cells, resulting in a significant antitumor effect in a lung metastasis mouse model using B16-F10 melanoma cells. Consequently, c-di-GMP/YSK05-Lip represents a potentially adjuvant system for use in immunotherapy against malignant melanomas.