

平成 30 年 5 月 9 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15102

研究課題名(和文)c-di-GMP搭載脂質ナノ粒子と抗PD-1抗体による複合的がん免疫療法

研究課題名(英文)Combined cancer immunotherapy of PD-1 antibody and c-di-GMP loaded lipid nanoparticles

研究代表者

中村 孝司(NAKAMURA, Takashi)

北海道大学・薬学研究院・助教

研究者番号：20604458

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：Stimulator of interferon genes経路アゴニストであるcyclic di-GMPを搭載した脂質ナノ粒子と免疫チェックポイント阻害剤である抗programmed cell death 1(PD-1)抗体の併用療法が抗PD-1抗体療法抵抗性のがんに対して有用であり、併用することで抗PD-1抗体の投与量を削減することに成功した。以上のことから、cyclic di-GMP搭載脂質ナノ粒子は、抗PD-1抗体療法との併用療法における新しい候補として期待できる。

研究成果の概要(英文)：The present study demonstrated that the combination therapy of programmed cell death 1 (PD-1) antibody and lipid nanoparticles (LNP) carrying cyclic di-GMP (c-di-GMP), an agonist for the stimulator of interferon genes pathway, was effective against the PD-1 therapy resistant tumor. Moreover, the dose of PD-1 antibody was reduced by combining the lipid nanoparticles. Thus, the c-di-GMP loaded LNP can be potent candidate for the combination therapy with PD-1 antibody.

研究分野：薬物送達学

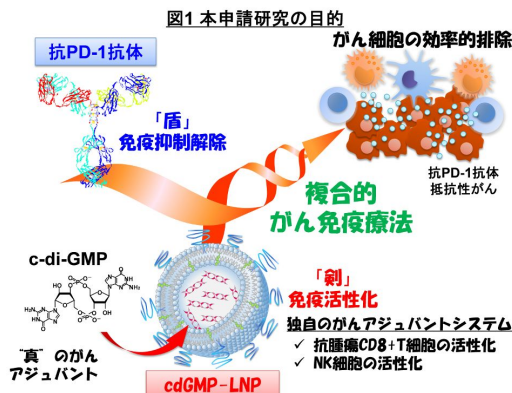
キーワード：薬物送達学 がん免疫療法 脂質ナノ粒子 アジュバント STING 免疫チェックポイント阻害

1. 研究開始当初の背景

抗 PD-1 (programmed cell death 1) 抗体は日本発の免疫チェックポイント阻害剤であり、がん治療に革新をもたらした。しかしながら、PD-1 とそのリガンドである PD-L1 によるがん免疫抑制が起こっている患者であっても、preexisting な抗腫瘍 CD8+T 細胞が少ない場合は効果が弱いことが明らかになってきた。それ故、他のがん免疫療法との併用が重要であると考えられている。一方、cyclic di-GMP (c-di-GMP) は細胞質 DNA センサーである DDX41 に結合し、STING (stimulator of interferon genes) 経路を活性化することで I 型インターフェロン (IFN) 産生を誘導する。従来のアジュバントとは異なる経路を介することから新規のがんアジュバントとして期待されている。しかしながら、c-di-GMP は細胞膜の透過性が悪く、標的である DDX41 が存在する細胞質への送達効率が悪いという問題点から、がんアジュバントへの応用が困難であった。

2. 研究の目的

申請者は独自の脂質ナノ粒子 (LNP: lipid nanoparticle) に c-di-GMP を搭載することで、c-di-GMP を非常に効率よく細胞質へと送達し、in vivo での抗腫瘍 CD8+T 細胞とナチュラルキラー (NK) 細胞の活性化を介した強力ながん免疫誘導に成功した (Miyabe H, et al., J Control Release 2014; Nakamura T, et al., J Control Release 2015)。加えて、STING 経路が生来の免疫監視によるがん細胞排除機構の活性化に必須であるという報告 (Woo SR, et al., Immunity 2014) から、c-di-GMP 搭載 LNP (cdGMP-LNP) が従来のがんアジュバントとは異なる「真のがんアジュバント」になると考えた。そして、抗 PD-1 抗体と併用することで、preexisting な抗腫瘍 CD8+T 細胞に加え、NK 細胞も活性化した状態での最も効果的な抗 PD-1 抗体療法が実現できるという着想に至った。本研究では、抗 PD-1 抗体によるがん免疫抑制解除と cdGMP-LNP による免疫活性化を併用する戦略が抗 PD-1 抗体抵抗性のがんに対して有用であることを示すことを目的とした (図 1)。



3. 研究の方法

(1) 新規 cdGMP-LNP の構築

cdGMP-LNP はアルコール希釈方により調製した。90% t-BuOH に YSK12-C4、リン脂質、コレステロール、ポリエチレングリコール脂質を溶解させ、クエン酸緩衝液 (pH 4.5) に溶解させた c-di-GMP 溶液と混合した。混合溶液にクエン酸緩衝液 (pH 4.5) を加え、限外ろ過により、PBS へと置換した。粒子径、粒度分布、ゼータ電位はゼータサイザーを用いて測定した。LNP への c-di-GMP の搭載率は、調製した cdGMP-LNP 溶液の UV 吸収から c-di-GMP 濃度を計算し、c-di-GMP の仕込み量から搭載率を算出した。

(2) cdGMP/YSK12-LNP の機能評価

cdGMP/YSK12-LNP の臓器分布評価

蛍光色素 DiD を用いて cdGMP/YSK12-LNP 及び従来型 cdGMP-LNP を標識した。各 DiD 標識 LNP をマウス尾静脈から投与し、1 時間後に肝臓、腎臓、脾臓、肺を回収し、蛍光強度を測定した。臓器移行率は各 DiD 標識 LNP の投与量の蛍光強度から算出した。

血清中の IFN- γ 濃度測定

cdGMP/YSK12-LNP もしくは従来型 cdGMP-LNP をマウス尾静脈内に投与し、2.25 時間後に血液を回収した。遠心分離により、血清を回収した後、市販の ELISA キットを用いて血清中の IFN- γ 濃度を測定した。

マウスメラノーマ肺転移モデルに対する抗腫瘍活性評価

B16-F10 細胞 (2×10^5 個) をマウス尾静脈から投与し、2、4、8 日後に各 LNP (c-di-GMP として $6 \mu\text{g}$) を尾静脈から投与した。19 日後に肺を回収し、抗腫瘍活性を評価した。

(3) マウスリンパ腫皮下移植モデルに対する cdGMP/YSK12-LNP と抗 PD-1 抗体の併用療法

E.G7-OVA 細胞 (8×10^5 個) をマウス皮下に移植し担がんマウスモデルを作製した。cdGMP/YSK12-LNP (c-di-GMP として $0.3 \mu\text{g}$) は、がん細胞移植から 6、10、14 日後に皮下投与した。また、抗 PD-1 抗体 ($50 \mu\text{g}$) は、がん細胞移植から 8、12、16 日後に腹腔内投与した。腫瘍体積を経時的に測定することで抗腫瘍活性を評価した。

(4) マウスメラノーマ肺転移モデルに対する cdGMP/YSK12-LNP と抗 PD-1 抗体の併用療法

B16-F10 細胞 (2×10^5 個) をマウス尾静脈から投与し肺転移モデルを作製した。cdGMP/YSK12-LNP (c-di-GMP として $6 \mu\text{g}$) は、がん細胞移植から 6、10、14 日後に尾静脈内投与した。また、抗 PD-1 抗体 ($50 \mu\text{g}$) は、がん細胞移植から 8、12、16 日後に腹腔内投与した。がん細胞移植から 19 日後に肺を回収し、抗腫瘍活性を評価した。

4. 研究成果

(1) 新規 cdGMP-LNP の構築

c-di-GMP の LNP への搭載率向上を目的とし、当研究室で開発した新規カチオン性脂質 YSK12-C4 (Warashina S, Nakamura T, et al., J Control Release 2016) を主成分とした cdGMP-LNP の構築を試みた。粒子径、粒度分布、ゼータ電位、c-di-GMP の LNP への搭載効率を指標に脂質組成の最適化を行った。その結果、最適化 cdGMP-LNP (以下、cdGMP/YSK12-LNP) は、粒子径 180 nm、正電荷を帯びた非常に均一な LNP であり、さらに従来型の cdGMP-LNP と比較して c-di-GMP の搭載率が 2 倍に向上した。

(2) cdGMP/YSK12-LNP の機能評価

続いて、*in vivo* における cdGMP/YSK12-LNP の機能評価を行った。従来型 cdGMP-LNP を比較対象とし、マウスへ尾静脈内投与後の各 LNP の臓器分布、IFN- γ 産生、マウスメラノーマ肺転移モデルに対する抗腫瘍活性を調べた。各 LNP をマウスに尾静脈内投与し、1 時間後に臓器分布を調べた結果、cdGMP/YSK12-LNP は従来型 cdGMP-LNP と比較して、肝臓への集積率が減少し、肺への集積率が増加した。これは cdGMP/YSK12-LNP の正電荷に起因すると考えられる。一方で、がん免疫応答誘導に重要なリンパ組織である脾臓への集積率は同等であった。また、cdGMP/YSK12-LNP を投与した後の血中 IFN- γ 濃度を測定した結果、非常に強力に IFN- γ 産生を誘導できることが明らかになり、その効率は従来型 cdGMP-LNP と同程度であった。さらに、マウスメラノーマ肺転移モデルに対する抗腫瘍活性評価においても、cdGMP/YSK12-LNP は非常に高い抗腫瘍活性を示し、その効果は従来型 cdGMP-LNP と同程度であった。以上のことから、cdGMP/YSK12-LNP は従来型 cdGMP-LNP と同等の機能を有し、c-di-GMP の搭載率が優れた LNP であることが示された。

(3) マウスリンパ腫皮下移植モデルに対する cdGMP/YSK12-LNP と抗 PD-1 抗体の併用療法

マウスリンパ腫 E.G7-OVA 腫瘍を皮下移植したモデルを用いて、cdGMP/YSK12-LNP と抗 PD-1 抗体の併用による治療効果を調べた。抗 PD-1 抗体単剤投与群はコントロールである PBS 投与群と比較して、有意な腫瘍増殖抑制効果が認められたが、非常に弱い活性であった。これは抗 PD-1 抗体の投与量が 50 μ g と通常使用される投与量の半分以下であることに起因すると考えられた。また、cdGMP/YSK12-LNP 単剤投与群においても PBS 投与群と比較して、有意な腫瘍増殖抑制効果が認められ、その効果は抗 PD-1 抗体単剤投与群よりも強いものであった。一方で、cdGMP/YSK12-LNP と抗 PD-1 抗体の併用群では PBS 投与群や各単剤投与群と比較して、非常

に強力な腫瘍増殖抑制効果が認められた。この効果は、cdGMP/YSK12-LNP による抗原特異的な免疫活性化と抗 PD-1 抗体による免疫抑制解除が相乗的に機能することで発揮されたと考えられる。また、cdGMP/YSK12-LNP を併用することにより、通常の半分以下の抗 PD-1 抗体投与量にて十分な抗腫瘍活性を誘起できることが明らかになった。

(4) マウスメラノーマ肺転移モデルに対する cdGMP/YSK12-LNP と抗 PD-1 抗体の併用療法

抗 PD-1 抗体療法に抵抗性を示すマウスメラノーマ B16-F10 を用いて、cdGMP/YSK12-LNP と抗 PD-1 抗体の併用療法の有用性を評価した。B16-F10 細胞をマウスの尾静脈から投与し、肺転移モデルを作製後、抗 PD-1 抗体単剤投与、cdGMP/YSK12-LNP 単剤投与、cdGMP/YSK12-LNP と抗 PD-1 抗体の併用投与を行った。抗 PD-1 抗体単剤投与群では、コントロールの PBS 投与群と比較して、全く抗腫瘍活性が認められなかった。このことは、B16-F10 腫瘍が抗 PD-1 抗体療法に抵抗性であることを示している。一方で、cdGMP/YSK12-LNP 単剤投与群は PBS 投与群と比較して、有意な抗腫瘍活性を示した。さらに興味深いことに、抗 PD-1 抗体と併用することで、その抗腫瘍活性がさらに増強する事が明らかになった。この併用効果は、cdGMP/YSK12-LNP による免疫活性化が腫瘍内の PD-1/PD-L1 の免疫抑制系を成立させ、その抑制を抗 PD-1 抗体が解除したことにより誘導されたと考えられる。以上のことから、cdGMP/YSK12-LNP と抗 PD-1 抗体を併用することは抗 PD-1 抗体療法に抵抗性を示すがん種に対して有用であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

Nakamura T, Harashima H. Integration of nano DDS with cancer immunotherapy. Ther Deliv 8: 987-1000 (2017). 査読有 DOI: 10.4155/tde-2017-0071

Nakamura T. Development of a Drug Delivery System for Cancer Immunotherapy. Yakugaku Zasshi 136: 1477-1484 (2016). 査読有 DOI: 10.1248/yakushi.16-00187

[学会発表](計 7 件)

中村孝司 脂質ナノ粒子を基盤としたがん免疫療法のためのナノ DDS 開発 日本薬学会第 138 年会 平成 30 年度奨励賞受賞講演 (2018 年)

Takahashi N, Nakamura T, Sato Y, Hyodo M, Hayakawa Y, Harashima H. Cancer immunotherapy by STING ligand loaded

lipid nanoparticles. The 36th Sapporo International Cancer Symposium (2017年)

高橋直道、中村孝司、佐藤悠介、兵藤守、早川芳宏、原島秀吉 脂質ナノ粒子によるSTING経路活性化を介したがん免疫療法 第33回日本DDS学会学術集会(2017年)

中村孝司、高橋直道、宮部寛子、佐藤悠介、兵藤守、早川芳宏、原島秀吉 STINGリガンド搭載ナノDDSを基盤としたがん免疫療法 第21回日本がん免疫学会総会(2017年)

高橋直道、中村孝司、佐藤悠介、兵藤守、早川芳宏、原島秀吉 STINGリガンド搭載脂質ナノ粒子を用いたがん免疫療法 日本薬学会北海道支部第144回例会(2017年)

Nakamura T, Miyabe H, Hyodo M, Sato Y, Hayakawa Y, Harashima H. STING ligand loaded lipid nanoparticles enhance cancer immunotherapy. 3rd International Conference on Biomaterials Science (2016年)

中村孝司 ナノテクノロジーで制御するがんアジュバントシステムの創製 日本薬剤学会第31年会 奨励賞受賞講演(2016年)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ情報
<http://www.pharm.hokudai.ac.jp/yakusetu/index.html>

新聞記事

中村孝司 奨励賞受賞研究 「脂質ナノ粒子

を基盤としたがん免疫療法のためのナノDDS 開発」 「日本薬学会第138年会」薬事日報 第11995号 2018年3月19日(22面)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 孝司 (NAKAMURA, Takashi)
北海道大学・大学院薬学研究院・助教
研究者番号：20604458

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

無し

(4) 研究協力者

無し