

令和 3 年 5 月 19 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07923

研究課題名(和文) 2-deoxy-D-glucose封入PLGAナノ粒子による肝癌治療開発

研究課題名(英文) Development of an anticancer therapy against liver cancer using 2-deoxy-D-glucose encapsulated in polymer poly (lactic-co-glycolic acid) nanoparticles

研究代表者

仁科 惣治 (Nishina, Sohji)

川崎医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70550961

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：グルコース誘導体；2-Deoxy-D-Glucose (2DG) 封入poly (lactic-co-glycolic acid) ナノ粒子製剤(2DG-PLGA-NP)によるがん特異的解糖系阻害は、2DG投与で生じた有害事象もなくかつ強い肝癌抑制効果を認めた。その作用機序として細胞死誘導以外に、がん微小環境でのCD8+T細胞の相対的糖取り込み亢進、乳酸産生低下に伴うIFN $\gamma$ /STAT経路等を介した走化性因子(CXCL9-11)の発現亢進による腫瘍免疫活性化作用を見出した。さらに2DG-PLGA-NPIは、抗PD1抗体等との併用効果のみならず、抗PD1抗体抵抗性がんマウスに対しても抗腫瘍効果を発揮した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん研究において腫瘍免疫は最もactiveかつcompetitiveな分野のひとつである。また、がん代謝とがん微小環境における腫瘍免疫との関連についての研究も盛んに行われている。2DG-PLGA-NPによるがん特異的な糖代謝阻害作用は、現在実用化されている抗PD-1抗体等の免疫チェックポイント阻害剤とは異なる作用機序で腫瘍免疫を活性化する可能性があり、また肝細胞癌以外のがん治療に応用できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The 2DG-PLGA-NPs induced cytotoxic effects and antitumor immunity through enhanced T cell trafficking. Additionally, 2DG-PLGA-NPs induced decreased lactate production and increased IFN $\gamma$ -positive T cells in liver tumors. Human CD8+ T cells cocultured with 2DG-PLGA-NP-treated Huh7 cells revealed their increased IFN $\gamma$  production and glucose uptake compared to the CD8+ T cells cocultured with PLGA-NP-treated Huh7 cells. Chemotaxis of CD8+ T cells was suppressed by lactate and enhanced by glucose. IFN $\gamma$  enhanced CD8+ T cell chemotaxis in both an autocrine and paracrine manner. Notably, the 2DG-PLGA-NPs augmented chemokine (CXCL9-11) production in liver tumors via IFN $\gamma$ /STAT pathway and AMPK-mediated suppression of histone H3 lysine 27 trimethylation. These 2DG-PLGA-NPs not only amplified antitumor effects induced by anti-PD1 antibody but also suppressed anti-PD1-resistant tumors.

研究分野：肝臓学

キーワード：がん 解糖系 ドラッグデリバリー ナノ粒子 腫瘍免疫

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

がんは日本人の死亡原因の30%を超えており、まさにごん患者の予後改善は喫緊の課題である。免疫チェックポイント阻害剤の臨床応用はがん治療における画期的な局面を切り開いたがその効果はいまだ限定的であり、がんによる免疫抑制機構に焦点を当てた新たな治療開発が急務である。解糖系に依存したエネルギー産生 (Warburg 効果) はがん細胞の低酸素環境への適応結果と考えられてきたが、近年がんによる免疫抑制機構としても注目されている。

グルコース誘導体 2-Deoxy-D-Glucose (2DG) はがん細胞に蓄積すると、解糖系阻害による ATP 産生抑制、小胞体ストレス亢進に伴う細胞死や細胞増殖抑制等を介して抗がん作用を発揮する。既に固形癌に対する 2DG の抗腫瘍効果が報告されているが、研究代表者らもマウスを用いた実験で肝癌抑制効果を実証した。しかし、十分な抗腫瘍効果を得るのに必要な 2DG 用量では高血糖、意識障害等の有害事象が出現し、通常の全身投与では安全にかつ十分な抗腫瘍効果を得るのは困難であった。

がん組織の血管は未熟で血管外に高分子を漏出しやすく、また薬剤排出経路のリンパ管が未発達なためナノ粒子のような高分子化合物は血管外に漏出しがん組織に蓄積しやすい (Enhanced Permeability and Retention ; EPR 効果)。粒子径 50-150nm 程度のナノ粒子製剤は、enhanced permeability and retention (EPR) 効果を介してがん組織選択的に送達されると言われている。そこで研究代表者らは、EPR 効果を期待した腫瘍選択的集積性や徐放性に優れた生体適合性高分子である Poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) に 2DG を封入した 2DG-PLGA ナノ粒子製剤 (2DG-PLGA-NP) を開発し、がん細胞特異的な糖代謝阻害剤の drug delivery system (DDS) の開発に着手した。

研究代表者らは (株) SENTAN Pharma との共同開発で、2DG-PLGA-NP (平均径 150nm、2DG 充填率 約 8%) の開発に成功した。肝癌細胞皮下移植ヌードマウスに対する 2DG-PLGA-NP 800mg/kg の週 1 回静注は、2DG 100mg/kg の連日腹腔内注射と比べて、実質的 2DG 総投与量が約 9%程度であったにもかかわらず、有害事象なく有意な抗腫瘍効果を発揮し、既存の肝癌治療薬との併用でその抗腫瘍効果が増強した。その作用機序として、嫌気性解糖系抑制による ATP 産生低下に加えて、小胞体ストレス亢進によるアポトーシスの誘導が関与することを見出した。

さらに注目すべき点として、免疫応答性肝発癌マウス (STAM™ マウス) に対しては、免疫不全なヌードマウス xenograft の結果と比べ更に低濃度 (80mg/kg 週 1 回) の 2DG-PLGA-NP を投与しても強い抗腫瘍効果を認めたが、その腫瘍組織で強い CD3 陽性 T 細胞浸潤所見を認め、2DG-PLGA-NP による腫瘍免疫活性化という新たながん進展抑制機序を見出した。

### 2. 研究の目的

研究代表者らが既に免疫応答性肝発癌モデル (STAM™ マウス) において証明した 2DG-PLGA-NP による肝癌抑制効果に対して、解糖系阻害剤 2DG-PLGA-NP による新たな T 細胞性腫瘍免疫の活性化に関する分子機構を明らかにし、がん微小環境での免疫機能強化を基軸とする新たながん免疫制御のパラダイム創生を目的とした。

それとともに、既存の分子標的治療薬や現在腫瘍免疫療法として脚光を浴びている免疫チェックポイント阻害剤との併用効果や同薬剤の不適例に対する抗腫瘍効果を明らかにした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 2DG-PLGA-NP による腫瘍免疫活性化作用および分子機序解明

1. 肝癌細胞に対する解糖系抑制による T 細胞走化性因子活性化および分子機序解明 (in vitro)  
ケモカインの一つである CXCL9, 10, 11 は、T 細胞受容体である CXCR3 に結合して T 細胞の走化性を促進する。一方で、がん細胞からの直接的な CXCL10 分泌に対して、Warburg 効果に代表されるがん細胞の糖代謝亢進が抑制的に作用すると報告されている (*Cell Metab* 2018; 27; 977-987)。

そこで、IFN $\gamma$ +TNF $\alpha$  刺激による肝癌細胞 (Huh7) からの直接的な CXCL9, 10, 11 分泌に対して、2DG による解糖系抑制が亢進させるか否かを検討した (ELISA)。また、2DG による肝癌細胞からの CXCL9-11 分泌促進作用機序として、① 肝癌細胞での乳酸産生低下に伴う IFN $\gamma$ /JAK-STAT シグナル経路亢進、あるいは ② 肝癌細胞での AMPK 活性亢進を介したヒストンメチル化酵素 enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) のリン酸化による Histone H3 lysine 27 トリメチル化抑制 (H3K27me3) による CXCL9,10,11 転写活性への影響についての検討を行った (Western Blotting など)。

## 2. 2DG が T 細胞の走化性に及ぼす影響についての検討 (ex vivo)

リアルタイム細胞動態解析装置 (EZ-TAXIScan™) を用いて、上記 1. の実験にて得られた肝癌細胞 (Huh7) 培養上清に対する CD8 陽性 T 細胞 (健康人の末梢血から抽出) の走化性を観察した。さらには、CXCR3 (CXCL9,10,11 に対する T 細胞受容体) 中和抗体投与を用いて、2DG による T 細胞走化性に対する CXCL9,10,11-CXCR3 相互作用の関与について検討した。

## 3. 肝癌細胞との共培養が CD8 陽性 T 細胞の活性化へ及ぼす影響の検討 (ex vivo)

Transwell を用いて、肝癌細胞 (Huh7) ±2DG-PLGA-NP に対して、健康人の末梢血由来の CD8 陽性 T 細胞を共培養した。共培養直前の肝癌細胞における乳酸産生量 (解糖系最終産物) を測定し、共培養後の CD8 陽性 T 細胞における細胞走化性 (EZ-TAXIScan™ を用いたリアルタイム細胞動態解析) および IFN $\gamma$  mRNA 発現 (活性化能の指標として) を解析した。さらには、共培養後の肝癌細胞および CD8 陽性 T 細胞におけるグルコース取り込み能について、蛍光標識グルコース誘導体 2-deoxy-2-[(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]-D-glucose (2NBDG) を用いて解析を行った。

## (2) 2DG-PLGA-NP の抗 PD-1 抗体との併用効果および抗 PD-1 抗体抵抗性がんモデルに対する有効性解析 (in vivo)

### 4. 免疫応答性肝発癌モデルに対する 2DG-PLGA-NP の効果についての検討

免疫応答性肝発癌モデル (STAM™ マウス) に対して、抗 PD-1 抗体による抗腫瘍効果に対する 2DG-PLGA-NP の併用効果を検討した。

### 5. 抗 PD-1 抗体不応性腫瘍モデルに対する 2DG-PLGA-NP の効果についての検討

2DG-PLGA-NP が抗 PD-1 抗体不応性腫瘍モデル (B16F10 皮下移植 C57BL/6 マウス) に対する 2DG-PLGA-NP の抗腫瘍効果を検討した。また、その作用機序として腫瘍免疫が亢進しているか否かをみるため、CD3 陽性 T 細胞浸潤能を免疫染色にて検討した。

さらに、同マウスにおける 2DG-PLGA-NP による抗腫瘍効果に対して CXCL9,10,11-CXCR3 相互作用を介した T 細胞性腫瘍免疫の関与を明らかにするため、2DG-PLGA-NP に抗 CXCR3 中和抗体を併用し抗腫瘍効果がキャンセルされるか否かを検討した。

## (3) 2DG-PLGA-NP による代謝リプログラミングの網羅的解析

肝がん細胞において糖代謝を特異的に阻害することで解糖系による ATP 産生が低下すれば、脂質代謝などのリプログラミングが予測される。

そこで、STAM™ マウスの肝癌組織を用いて、2DG 非含有 PLGA-NP 投与群 (control) と比べた 2DG-PLGA-NP 投与群におけるがん組織の代謝リプログラミング変化について、liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) および capillary electrophoresis-mass spectrometry (CE-MS) を用いたメタボロミクスにより網羅的解析を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 2DG-PLGA-NP による腫瘍免疫活性化作用および分子機序解明

#### 1. 肝癌細胞に対する解糖系抑制による T 細胞走化性因子活性化および分子機序解明 (in vitro)

IFN $\gamma$  + TNF $\alpha$  刺激による肝癌細胞 (Huh7) からの直接的な CXCL9, 10, 11 産生量は、2DG との併用により濃度依存性に亢進された。

以上より、2DG によるがん細胞の解糖系阻害は、① 肝癌細胞での乳酸産生低下に伴う IFN $\gamma$  /JAK-STAT シグナル経路亢進、あるいは ② 肝癌細胞での AMPK 活性亢進を介したヒストンメチル化酵素 enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) のリン酸化による Histone H3 lysine 27 トリメチル化抑制 (H3K27me3) による CXCL9,10,11 転写活性の亢進が関与することが示唆された。

#### 2. 2DG が T 細胞の走化性に及ぼす影響についての検討 (ex vivo)

上記 1. の実験において IFN $\gamma$  + TNF $\alpha$  刺激された肝癌細胞培養上清に対する T 細胞走化性 (移動速度および方向性) は、2DG の併用群で有意に亢進していたが、CXCR3 中和抗体の併用によりその走化性亢進はキャンセルされた。

以上により、2DG は肝癌細胞に対して直接的な CXCL9, 10, 11 産生を亢進させることにより、CD8 陽性 T 細胞の受容体 CXCR3 に対する paracrine 作用を介して CD8 陽性 T 細胞の走化性を亢進させることが考えられた。

#### 3. 肝癌細胞との共培養が CD8 陽性 T 細胞の活性化へ及ぼす影響の検討 (ex vivo)

Transwell を用いた肝癌細胞 (Huh7) と CD8 陽性 T 細胞との共培養下において、PLGA-NP (2DG 非含有) と比べて 2DG-PLGA-NP は、肝癌細胞での乳酸産生およびグルコース取り込

機能を低下させ、一方で CD8 陽性 T 細胞への相対的な糖取り込みは亢進させた。さらに 2DG-PLGA-NP は、共培養された CD8 陽性 T 細胞における細胞走化性を亢進させ (EZ-TAXIScan™)、IFN $\gamma$  mRNA 発現も亢進させた。

以上の実験により、肝癌細胞における解糖系抑制 (それに随伴する相対的な T 細胞での解糖系亢進) もしくは乳酸産生抑制が、T 細胞機能に及ぼす可能性が示唆された。

## (2) 2DG-PLGA-NP の抗 PD-1 抗体との併用効果および抗 PD-1 抗体抵抗性がんモデルに対する有効性解析 (in vivo)

### 4. 免疫応答性肝発癌モデルに対する 2DG-PLGA-NP の効果についての検討

STAM™ マウスにおいて、2DG-PLGA-NP は抗 PD-1 抗体による抗腫瘍効果を増強させた (図 1)。

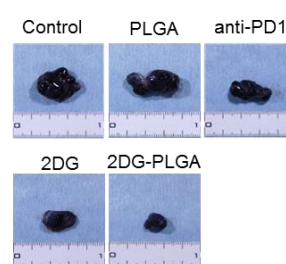
### 5. 抗 PD-1 抗体不応性腫瘍モデルに対する 2DG-PLGA-NP の効果についての検討

その一方で、抗 PD-1 抗体抵抗性がん細胞 (B16F10) 移植したシンジェニックマウス (C57BL/6) に対する 2DG-PLGA-NP の抗腫瘍効果も明らかにした (図 2)。また、抗 PD-1 抗体単独群と比べて抗 PD-1 抗体+2DG-PLGA-NP 併用群の腫瘍組織においては、CD3 陽性 T 細胞浸潤能が亢進しており、腫瘍免疫活性化機序の関与も示唆された。さらに、同マウスに対する 2DG-PLGA-NP の抗腫瘍効果は、抗 CXCR3 中和抗体の併用により部分的ながらキャンセルされた。すなわち、抗 PD-1 抗体抵抗性モデルに対しても、CXCL9,10,11-CXCR3 相互作用を介した T 細胞性腫瘍免疫の関与が考えられた。

以上の検討結果より、2DG-PLGA-NP による抗腫瘍効果の作用機序として細胞死誘導効果以外に、抗腫瘍免疫活性化を兼ね備えた作用機序を有することも明らかにした。また、2DG-PLGA-NP は現在のがん治療で脚光を浴びている免疫チェックポイント阻害剤 (抗 PD-1 抗体) との併用効果以外に、抗 PD-1 抗体抵抗性がんモデルにも抗腫瘍効果を発揮した。

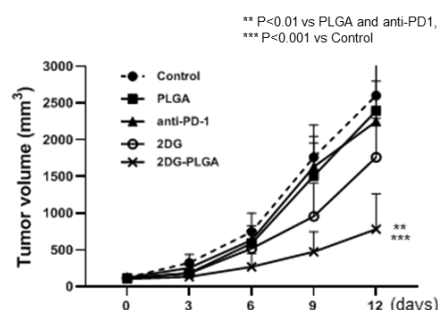
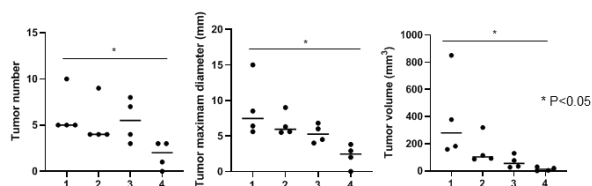
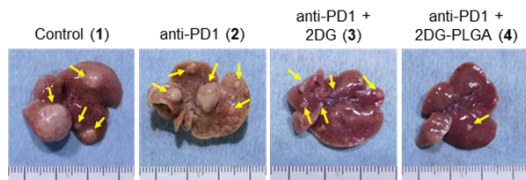
【図2】

Day12 の肝臓(腫瘍)肉眼写真



【図1】

Day21 の肝臓肉眼写真



## (3) 2DG-PLGA-NP による代謝リプログラミングの網羅的解析

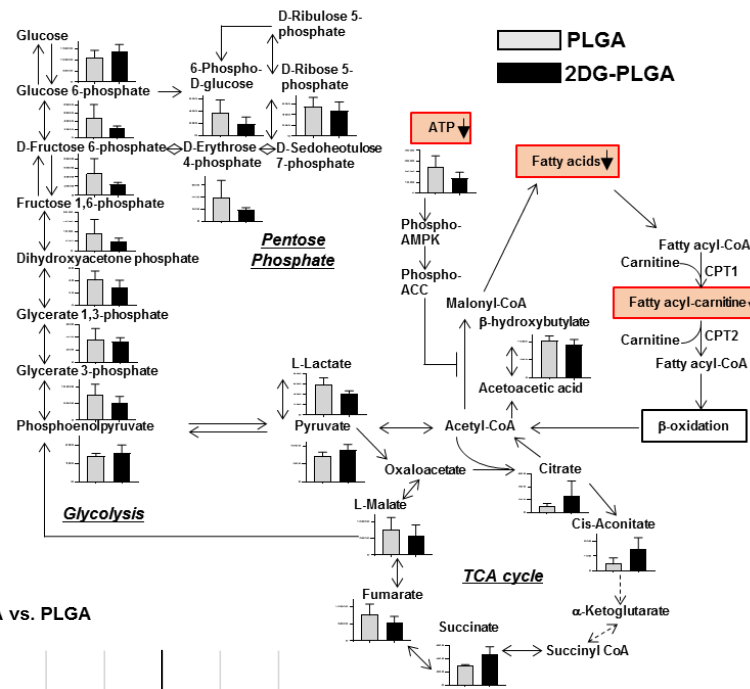
肝発癌マウス (STAM™ マウス) に対して 2DG-PLGA-NP 投与群および PLGA-NP 投与 (2DG 非含有; control) 群の 2 群に分けて、肝腫瘍組織に対してメタボロミクスによる網羅的解析を行った。

2DG-PLGA-NP 投与群では PLGA-NP 投与 (control) 群と比べ、肝腫瘍組織における乳酸 (L-Lactate) の産生量が減少していた (図 3)。一部の癌細胞では de novo 脂肪酸合成の促進を示すことも報告されているが、2DG-PLGA-NP 投与群では PLGA-NP 投与 (control) 群と比べ、大部分の脂肪酸代謝産物の含有量が低下していた (図 4)。がん細胞においては、解糖系の代用となる ATP 産生経路として、tricarboxylic acid cycle (TCA cycle) を介して細胞質に輸送されたクエン酸 (Citrate) がアセチル CoA に代謝される。細胞質に存在するアセチル CoA はマロニル CoA に変換され、脂肪酸合成経路へと進む (*Hom Res* 2007; 68: 72-82)。一方で、AMPK のリン酸化 (Ser79 もしくは Ser212) を介してアセチル CoA カルボキシラーゼ (ACC) がリン酸化を受けると、アセチル CoA からマロニル CoA への代謝が抑制され、脂肪酸合成を阻害することが報告されている (*Nat Med* 2013; 19: 1649-1654)。2DG-PLGA-NP 投与群では PLGA-NP 投与 (control) 群と比べ、AMPK リン酸化および ACC リン酸化が亢進されることを見出した (図 5)。したがって、2DG-PLGA-NP を投与された肝癌組織では、AMPK

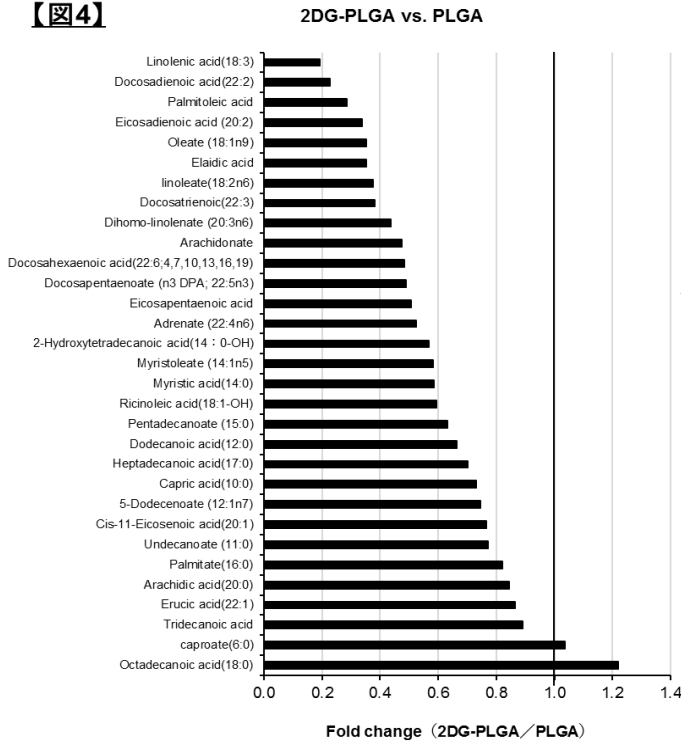
リン酸化亢進→ACC リン酸化亢進を介して脂肪酸合成能が低下している可能性が考えられた。また、2DG-PLGA-NP 投与群では PLGA-NP 投与 (control) 群と比べ、ATP 産生量も低下していた (図 3)。

以上より、2DG-PLGA-NP 投与による解糖系阻害により ATP 産性能が低下していたが、脂肪酸代謝による代償的な ATP 産生機構も破綻させている可能性が考えられた。

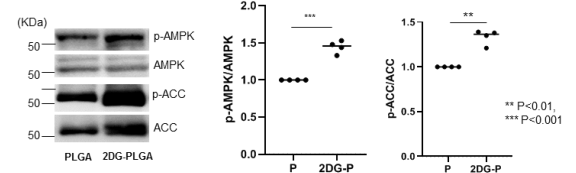
【図3】



【図4】



【図5】



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 1.Sasaki K, Nishina S, Yamauchi A, Fukuda K, Hara Y, Yamamura M, Egashira K, Hino K.	4. 巻 11
2. 論文標題 Nanoparticle-mediated delivery of 2-deoxy-D-glucose induces antitumor immunity and cytotoxicity in liver tumors in mice.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Mol Gastroenterol Hepatol	6. 最初と最後の頁 739-762
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jcmgh.2020.10.010.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件/うち国際学会 5件）

1. 発表者名 仁科惣治、佐々木恭、山内明、福田宏太郎、日野啓輔
2. 発表標題 2-deoxy-D-glucose encapsulated PLGA nanoparticles suppress hepatocellular carcinoma through cytotoxic effect and activation of antitumor immunity
3. 学会等名 American Association for the Study of Liver Diseases(AASLD) Annual Meeting（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 仁科惣治、佐々木恭、日野啓輔
2. 発表標題 肝細胞癌の糖代謝抑制による腫瘍免疫賦活化と治療展開
3. 学会等名 日本消化器病学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 仁科惣治、佐々木恭、日野啓輔
2. 発表標題 がん特異的解糖系阻害剤による肝細胞癌治療応用と腫瘍免疫活性化機構の解明
3. 学会等名 日本肝臓学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐々木恭、仁科惣治、山内明、原裕一、福田宏太郎、日野啓輔
2. 発表標題 Specific inhibition of cancer cell glycolysis enhances antitumor immunity in hepatocellular carcinoma
3. 学会等名 APASL Single Topic Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐々木恭、仁科惣治、山内明、原裕一、福田宏太郎、日野啓輔
2. 発表標題 Treatment of hepatocellular carcinoma using 2-Antitumor effects of 2-deoxy-D-glucose encapsulated PLGA nanoparticles against hepatocellular carcinoma in terms of tumor immunity
3. 学会等名 American Association for the Study of Liver Diseases(AASLD) Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐々木恭、仁科惣治、日野啓輔
2. 発表標題 Immuno oncologyからみた肝細胞癌に対する2-deoxyD-glucose封入PLGAナノ粒子の抗腫瘍効果
3. 学会等名 日本消化器病学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐々木恭、仁科惣治、日野啓輔
2. 発表標題 肝癌細胞の糖代謝抑制によるがん微小環境での腫瘍免疫賦活作用とその臨床応用
3. 学会等名 日本肝臓学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐々木恭、仁科惣治、日野啓輔ら
2. 発表標題 肝糖代謝阻害薬2-deoxy-D-glucose封入PLGAナノ粒子を用いた肝細胞癌治療開発
3. 学会等名 Japan Digestive Disease Week 2018 (JDDW 2018)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐々木恭、仁科惣治、日野啓輔ら
2. 発表標題 Treatment of hepatocellular carcinoma using 2-deoxy-D-glucose encapsulated in PLGA nanoparticles in mice
3. 学会等名 APASL Single Topic Conference (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐々木恭、仁科惣治、日野啓輔ら
2. 発表標題 Treatment of hepatocellular carcinoma using 2-deoxy-D-glucose encapsulated in PLGA nanoparticles in mice
3. 学会等名 American Association for the Study of Liver Diseases(AASLD) Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 ケモカイン産生促進剤、免疫チェックポイント阻害剤抵抗性癌治療薬及び抗腫瘍免疫賦活剤	発明者 日野啓輔、仁科惣治、佐々木恭、山内明	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2020/010894	出願年 2019年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-



6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	原 裕一  (Hara Yuichi)  (60550952)	川崎医科大学・医学部・講師    (35303)	
研究分担者	日野 啓輔  (Hino Keisuke)  (80228741)	川崎医科大学・医学部・教授    (35303)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関