

令和 3 年 4 月 26 日現在

機関番号：12501

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22948

研究課題名(和文) 抗癌剤を利用しない癌治療用ナノDDS：RISET療法の提唱と機能検証

研究課題名(英文) Development of nanoDDS for cancer therapy without anti-cancer drug: Proposal of RISET therapy and its therapeutic function

研究代表者

秋田 英万 (Akita, Hidetaka)

千葉大学・大学院薬学研究院・教授

研究者番号：80344472

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では脾臓の炎症環境を標的とした抗腫瘍免疫の正常化による新たながん治療戦略として「RISET療法」を提唱した。水溶性ポリマーにて修飾したナノ粒子に抗炎症薬の脂質誘導体を搭載させ、担癌マウスに投与したところ、有意に腫瘍体積が減少することが判明した。本粒子による治療効果は脾臓内の免疫抑制細胞群の減少を介して発揮されることが明らかとなった。さらに、免疫チェックポイント阻害剤と本粒子を併用したところ、併用群において顕著な治療効果が観察され、既存薬との併用における有用性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来のナノ粒子を用いたがん治療戦略は、がん細胞に対して殺細胞効果を持った抗がん剤を効率的に送達することが重要視されていた。しかしながら、ヒト臨床試験のメタ解析により、EPR効果を利用したがん標的化の実用性に疑問が投げかけられ、根本的な技術改革が必要となった。本研究では上記の古典的な戦略を一新させる戦略として、抗がん剤を使わず、癌細胞を標的としないナノDDS技術を確立した。また、免疫チェックポイント阻害剤は約30%の患者しか有効性が認められないという問題を抱えている。RISET戦略は免疫チェックポイント阻害剤との併用療法で高い治療効果を発揮したため、本問題点の解決策となり得る。

研究成果の概要(英文)：In this study, we proposed "Reprogramming of Immuno-reaction in Spleen and Extra-parenchyma in Tumor (RISET) therapy" as a new cancer treatment strategy by normalizing antitumor immunity via targeting the inflammatory environment of the spleen. When nanoparticles modified with a water-soluble polymer were loaded with a lipid derivative of an anti-inflammatory drug, and administered to cancer-bearing mice, the tumor volume was significantly reduced. It was clarified that the therapeutic effect of this particle is exerted through the decrease of immunosuppressive cell group in the spleen. Furthermore, when this particle was used in combination with an immune checkpoint inhibitor, a remarkable therapeutic effect was observed in the combination group, demonstrating its usefulness in combination with existing drugs.

研究分野：薬剤学

キーワード：癌治療 抗炎症薬 脾臓 癌免疫

1. 研究開始当初の背景

抗がん剤を用いた化学療法は、薬物動態・薬理作用の双方において特異性が低く、腫瘍に対してだけでなく正常組織に対しても重篤な障害を引き起こす。この問題を解決する手法の一つとして、薬を必要な量、必要な場所へ送り届ける薬物送達技術(Drug Delivery System)が着目されてきた。固形がんを標的とする DDS では、ナノ粒子などの高分子が新生血管の広い間隙を介して腫瘍組織に漏出する EPR 効果(Enhanced Permeability and Reaction Effect)を利用した抗がん剤のナノ粒子化製剤が数多く開発されてきた。しかしながら、2016 年に報告されたヒト臨床試験のメタ解析において、マウス等の実験動物では抗がん剤のナノ粒子化により有意な治療効果の改善が認められた一方、ヒトでは抗腫瘍効果の向上が認められないことが明らかとなった。これは、ヒトの腫瘍組織がマウスなどの実験動物と比べ、構造が複雑であり、さらには間質液圧や細胞外マトリックスなどの物理的な障壁がナノ粒子製剤の体内動態に悪影響を与えることに起因している。この報告を受け、近年では EPR 効果が抱える問題を克服することが可能な、新たな薬物送達技術が求められている。

がん細胞は腫瘍間質や他臓器との相互作用を介してがん微小環境を形成し、生体に備わるがん免疫の働きを抑制している。近年、この微小環境を標的として、宿主本来の免疫機能を再活性化することでがんを攻撃する「がん免疫療法」が新たな治療方法として注目を集めている。特に、T 細胞上に発現する programmed death-1 (PD-1)分子とがん細胞の programmed death ligand-1 (PD-L1)分子との相互作用による抗腫瘍免疫の抑制を解除する抗 PD-1/PD-L1 抗体(Nivolumab)等が開発され、免疫チェックポイント阻害剤によるがん免疫療法が急激に発展した。一方、免疫チェックポイント阻害剤による治療効果は約 30%の患者しか有効性が認められず、その低い奏効率が問題視されている。免疫チェックポイント阻害剤の有効性を低下させる原因の一つとして、腫瘍微小環境に存在する免疫抑制細胞群が挙げられる。これらの免疫抑制細胞群は免疫チェックポイントとは異なる機序により T 細胞の機能を阻害し、治療効果の発揮を妨げていると考えられる。近年、これらの免疫抑制細胞群は二次リンパ組織である脾臓に蓄積し、脈管系を介して腫瘍組織に供給されることが明らかとなってきた。脾臓は末梢最大のリンパ器官であり、腫瘍存在下で形成される慢性的な炎症環境が、脾臓内の抑制性の免疫細胞群を強く誘導する。この脾臓と腫瘍組織間とのクロストークにより、免疫抑制性細胞群が腫瘍近傍に遊走し、抗腫瘍免疫が抑制されることが考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、「抗がん剤を使用しない」、「がん細胞を標的としない」ナノ DDS の開発を目的に、脾臓の炎症環境を標的とした新たな薬物送達戦略を確立し目指した。これを達成するため我々は、抗炎症薬をナノ粒子に搭載し、脾臓へと効率よく送達させることで脾臓内の慢性炎症環境を改善し、腫瘍組織に対する抗腫瘍免疫の正常化を介して治療効果が発揮されるか試みた。また、免疫チェックポイント阻害剤の一つである抗 PD-1 抗体と本技術を複合させることで、抗腫瘍効果が増強するか検証した。我々は本戦略を Reprogramming of Immuno-reaction in Spleen and Extra-prarenchyma in Tumor (RISET)療法と名付け、その有用性を実証すると共に、新たながん治療戦略として提唱する。

3. 研究の方法

当研究室では脂質ナノ粒子型の DDS キャリアとして SS-cleavable and pH-activated lipid-like material (ssPalm)を開発してきた。ssPalm は環境感受性ユニットとして、第三級アミンとジスルフィド結合を分子内に含んでいる。第三級アミンはナノ粒子化した際に pH 感受性を与え、血中や細胞外液などの生理的 pH では粒子が中性電荷を示す。このため、非特異的な静電的相互作用を起こさず、細胞毒性などを引き起こしにくい。また、ジスルフィド結合は細胞内の還元環境で積極的に崩壊し、薬物の放出を促進する。我々は現在までに、ssPalm を含むナノ粒子に核酸と抗炎症薬を同時に封入し、マウスの肝臓へ送達させることで遺伝子導入効率が上昇することを報告している。この報告は、本キャリア材料が低分子薬物の送達システムとしても応用可能であることを示している。そこで本材料を基盤とするナノ粒子に抗炎症薬の脂質誘導体を搭載させ、マウス大腸がん細胞である CT26 皮下移植マウスに静脈投与し、抗腫瘍効果が発揮されるか検証した。また、粒子としての組織分布、さらには脾臓内分布といった動態メカニズムを評価した。さらに、本戦略の標的である抑制性細胞群の誘導能を脾臓と腫瘍の双方の組織で解析すると共に、腫瘍浸潤 T 細胞の細胞様態を評価することで、本戦略の免疫学的機序を明らかとした。免疫チェックポイント阻害剤との併用評価では、抗 PD-1 抗体と本粒子を CT26 皮下移植マウスに対して投与した。抗 PD-1 抗体は、マウス大腸がん細胞 CT26 移植マウスに対しては、治療効果を発揮することが難しいことが報告されている。そのため、本粒子と抗 PD-1 抗体を併用して処置することで抗腫瘍効果が増強するか検証した。

4. 研究成果

抗炎症薬の脂質誘導体を搭載した脂質ナノ粒子は、単純水和法にて作製した。作製した粒子をマウスマクロファージ細胞である RAW264.7 細胞に曝露し、リポ多糖にて刺激した際の炎症性サイトカインの mRNA 量を評価した。その結果、粒子曝露群で、代表的な炎症性サイトカインである IL-1 と IL-6 の mRNA 量が減少した。また、RAW264.7 細胞と CT26 細胞に対する本粒子の毒性を評価した結果、高い生存率を示し、本粒子は細胞に対して直接障害しないことが示された。このことから、本キャリアは生体適合性を有し、抗炎症効果を発揮できることが確認された。さらに、本粒子が *in vivo* においても同様に抗炎症作用を示すか検証するため、CT26 皮下移植マウスに投与し、脾臓および腫瘍組織における炎症性サイトカインの mRNA 量を解析した。その結果、IL-1 や TNF- α 、IL-6 の mRNA 量が減少し、担癌マウスにおいても抗炎症作用を示すことが明らかとなった。次に、実際に本粒子を CT26 皮下移植マウスに投与し、抗腫瘍効果を評価したところ、コントロール群である PBS 群と比較して有意な治療効果を得た。一方、抗炎症薬の脂質誘導体を搭載していない空粒子の投与群では抗腫瘍効果の減弱が観察されたことから、腫瘍体積の減少は抗炎症薬によって発揮されたことが考えられる。加えて、T 細胞が欠損されているヌードマウスに対しても同様に CT26 を皮下移植させ、本粒子の抗腫瘍効果を評価した結果、抗腫瘍効果は認められないことが判明した。以上の結果から、本粒子は T 細胞に依存した抗腫瘍効果を発揮することが示唆された。

我々は標的の組織を明確化するために、水溶性ポリマーの修飾量を振り、体内動態が異なる粒子を作製した。水溶性ポリマーは貪食細胞による認識を回避するためのステルス能を粒子に付与するため、その修飾量に応じて血中や組織中の動態が変化すると期待される。水溶性ポリマーの量を 2%、9%と変化させ、各粒子の抗腫瘍効果、および組織分布を照らし合わせたところ、脾臓への集積量が高い、2%修飾群において高い治療効果を発揮した一方、脾臓ではなく腫瘍に対して集積量が高い、9%修飾群においては抗腫瘍効果の減弱が観察された。また最も抗腫瘍効果が高い、2%修飾粒子群を腫瘍内投与したところ、静脈内投与では観察されていた腫瘍体積の減少が観察されなかった。以上の結果から、本粒子の標的組織が脾臓であることが認められた。次に、我々は投与した粒子が脾臓でどのような影響を及ぼしているかを明らかとするために、粒子の脾臓内分布を観察した。その結果、本粒子は、脾臓内の白脾髄や辺縁帯からの捕捉を避けて赤脾髄まで広く分布していることが認められた。また、次世代シーケンサー解析より、本粒子を投与することで、コントロール群と比較して細胞分化や増殖に関わる因子が変化することが判明した。赤脾髄には、骨髄由来の単球系が存在しており、健常状態ではその存在比率が 2%程度であるが腫瘍存在下では 40%まで増加することが報告されている。これらを踏まえると、本粒子を投与することで腫瘍により増殖した脾臓内の未成熟な単球が減少していることが考えられる。実際に本粒子を投与する事でがんによる脾臓の肥大化が著しく抑制されることが判明し、本考察が裏付けられた。

未成熟な単球は、抑制性の免疫細胞群の前駆細胞である。そのため、未成熟な単球が減少することで本戦略の標的細胞である抑制性細胞群も減少すると考え、抑制性細胞群の誘導能を腫瘍、脾臓の双方の組織で経時的に解析した。その結果、脾臓においては投与後 3 時間後で抑制性細胞群が減少傾向を示し、投与後 18 時間後で有意に減少した。一方、腫瘍では投与後 3 時間後では変動しないものの、投与後 18 時間後において有意に減少する結果が示された。以上の結果より、本粒子は、脾臓内の炎症環境を改善することで抑制性の免疫細胞群を減少させ、脾臓からの供給を断ち切ることで腫瘍内の抑制性環境を二次的に改善させたと考察した。本考察を確認するため、粒子を投与した際の腫瘍内の免疫環境を解析した。その結果、粒子投与群において腫瘍浸潤 T 細胞の相対割合が増加した。また、浸潤した T 細胞の各サブセットにて解析したところ、抗腫瘍免疫を担う CD8 陽性 T 細胞の存在量は変化しないが、疲弊した腫瘍浸潤 CD8 陽性 T 細胞が有意に減少していることが明らかとなった。これは、相対的に抗腫瘍免疫を担う細胞群が腫瘍に多く存在していることを示しており、本粒子を投与することで抗腫瘍免疫の正常化を介して治療効果が発揮されていることが認められた。

我々は本戦略がどのがん腫において適応可能かを同定するために、抑制性細胞群の誘導能が異なるがん種を用いて本粒子の治療効果を検証した。その結果、抑制性細胞群の誘導能が高いがん種においてのみ、有意な腫瘍体積の減少が認められ、本粒子による治療効果は抑制性細胞群の誘導能に相関していることが示唆された。抑制性細胞群は免疫チェックポイント阻害剤の奏効率に深く関与しており、抑制性細胞群が多く誘導されるがん種で治療効果が減弱することが報告されている。そこで免疫チェックポイント阻害剤の治療効果を示さない CT26 担癌マウスに対して、本粒子と抗体を併用させ、治療効果が発揮されるか検証した。その結果、各種単剤群と比較して、併用群において高い治療効果が認められた。

上記より、脾臓内の炎症環境を改善することで、抗腫瘍免疫の正常化を目的とする R1SET 療法は、抗がん剤を使用せずに治療効果を発揮し、免疫チェックポイント阻害剤の奏効率に関する課題を克服する手法として有用であることが期待される。我々は、本戦略を新たながん治療戦略として提唱する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 9. Doi M, Ohto T, Tanaka H, Miura N, Sakurai Y, Tange K, Nakai Y, Yoshioka H, Akita H.
2. 発表標題 RISSET-therapy: a strategy for resetting tumor micro environment by the delivery of anti-inflammatory drugs to tumor and spleen
3. 学会等名 19th Symposium for Gene, Design and Delivery (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 4. 土井 瑞貴、大東 昂良、田中 浩揮、三浦 尚也、櫻井 遊、秋田 英万
2. 発表標題 脾臓に対する抗炎症薬送達(RISSET療法)の動態およびメカニズム解析
3. 学会等名 日本薬学会 第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 土井瑞貴、大東昂良、田中浩揮、三浦尚也、丹下耕太、中井悠太、吉岡宏樹、櫻井遊、秋田英万
2. 発表標題 抗腫瘍免疫の正常化を目的とした脾臓および腫瘍組織における炎症環境の同時改善：RISSET療法の提唱
3. 学会等名 第35回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------