

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：32643

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22505

研究課題名(和文)免疫療法抵抗性がんを克服する超音波応答性バブルの新規抗PD-1抗体併用療法の開発

研究課題名(英文)Development of the combination therapy with ultrasound stimulated microbubbles and anti PD-1 antibody to overcome resistance to cancer immunotherapy

研究代表者

宗像 理紗 (Munakata, Lisa)

帝京大学・薬学部・助教

研究者番号：90879694

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：近年注目されているがん免疫療法は、患者により反応性が異なるため奏効率を向上する併用療法の開発が求められている。本研究では、マイクロバブルが超音波照射された際に生じる機械的エネルギーを利用して、がん免疫療法治療薬である抗PD-1抗体の治療効果増強を試みた。マイクロバブルと超音波による治療を抗PD-1抗体治療に併用したところ、大腸がんや乳がんモデルマウスで腫瘍増殖の抑制が確認された。また、腫瘍内を解析したところ抗腫瘍的な免疫細胞の増加が確認された。このことから、本治療法が腫瘍内の免疫環境を変化させることで抗PD-1抗体の治療効果を増加させる有用な併用療法になるものと期待された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、マイクロバブルと超音波による治療をがん免疫療法治療薬である抗PD-1抗体治療に併用し、その抗腫瘍効果を評価した。その結果、大腸がんモデルマウスにおいて、腫瘍の完全退縮例の増加が確認された。また、乳がんモデルマウスにおいて、腫瘍増殖の抑制が確認された。これらの結果は、マイクロバブルと超音波による治療が、異なるがん種に対して抗PD-1抗体の治療効果を増強する有用な併用療法になることを示唆している。そのため、本治療法の最適化を進めることで、現在問題となっているがん免疫療法の奏効率を向上するための有用な併用療法になり得ると期待される。

研究成果の概要(英文)：Cancer immunotherapy is one of the most ideal therapies to prolong the lifetime of cancer patients. However, its overall response rate is not so high. To overcome this problem, we focused on the mechanical energy derived from ultrasound stimulated microbubbles and developed the combination therapy of this and immune checkpoint inhibitor (anti PD-1 antibody). To assess the antitumor effect, tumor inoculated mice were treated with ultrasound stimulated microbubbles and anti PD-1 antibody. As a result of this, the rate of tumor regression increased in murine colon carcinoma model. Moreover, it was confirmed the antitumor effect by this combination therapy in murine breast carcinoma model. Further, the number of antitumoral immune cells increased by this combination therapy. From these results, the combination therapy with ultrasound stimulated microbubbles and anti PD-1 antibody is expected as an useful cancer immunotherapy.

研究分野：薬学

キーワード：がん免疫 マイクロバブル 超音波 免疫チェックポイント阻害剤

1. 研究開始当初の背景

免疫チェックポイント阻害剤の抗 **PD-1** 抗体は、**T** 細胞上の **PD-1** に結合し、がん細胞による **T** 細胞の抑制を解除する画期的な治療薬である。しかし、世界で最初に認可されたニボルマブの奏効率は非ホジキンリンパ腫で **60%** を示すものの、非小細胞肺癌や悪性黒色腫において、**20 - 30%** に留まっている (**Zijun Y. Xu-Monette et al., Front. Immunol., (2017)**)。このような差が生じる背景に、がん種による免疫原性の違いが挙げられる。がん細胞の免疫原性は、抗腫瘍免疫応答の誘導に関わる性質である。免疫原性の低いがんでは、抗腫瘍的に働く樹状細胞や **T** 細胞などからがん細胞が認識されにくいいため、抗 **PD-1** 抗体によって **T** 細胞の抑制を解除しても抗腫瘍効果が得られにくい。そのため、腫瘍の免疫原性を高め、抗 **PD-1** 抗体が効果的に作用するための腫瘍免疫微小環境を構築することが重要である。

がんの免疫原性を高める治療法として、放射線療法や化学療法などを利用した、がん細胞の免疫原性細胞死 (**Immunogenic cell death; ICD**) を誘導する方法がある (**Bernardo L. Rapoport et al., Int. J. Mol. Sci., (2019)**)。この **ICD** は免疫応答が惹起されやすいがん細胞の殺傷であり、樹状細胞や **T** 細胞によるがん細胞の認識が促進し、抗腫瘍的な免疫応答が惹起される。近年、この **ICD** を誘導する治療法として、超音波を利用する取り組みが注目されている。超音波によって生じる熱エネルギーや機械的エネルギーは、がん細胞を傷害して **ICD** を誘導する。また、超音波は被爆の恐れがなく繰り返し利用できるため、放射線療法や化学療法による骨髄抑制などの全身性副作用がない安全性の高い治療法になると期待される。

このような背景のもと、本研究では超音波応答性バブル(バブル)を利用してがん細胞の **ICD** 誘導を試みる。このバブルは外殻成分に生体適合性の高いリン脂質を有し、疎水性の超音波応答性ガスを内包している。これにより、バブルは超音波照射によって収縮や膨張を繰り返す。また、超音波照射強度を高めることでバブルの圧壊が起こり、強力なジェット流を伴うエネルギーが放出され、細胞傷害やそれによるがん関連抗原の放出が可能となる。このバブルを利用することで、超音波単独より効率良くがん細胞の **ICD** 誘導が可能になると期待される。本研究では、超音波とバブルを併用し効果的にがん細胞の **ICD** を誘導することで、抗腫瘍的な腫瘍免疫環境を構築し、これまで抗 **PD-1** 抗体による効果が得られていなかった免疫原性の低いがんに対するがん免疫療法確立を試みる(図 1)。

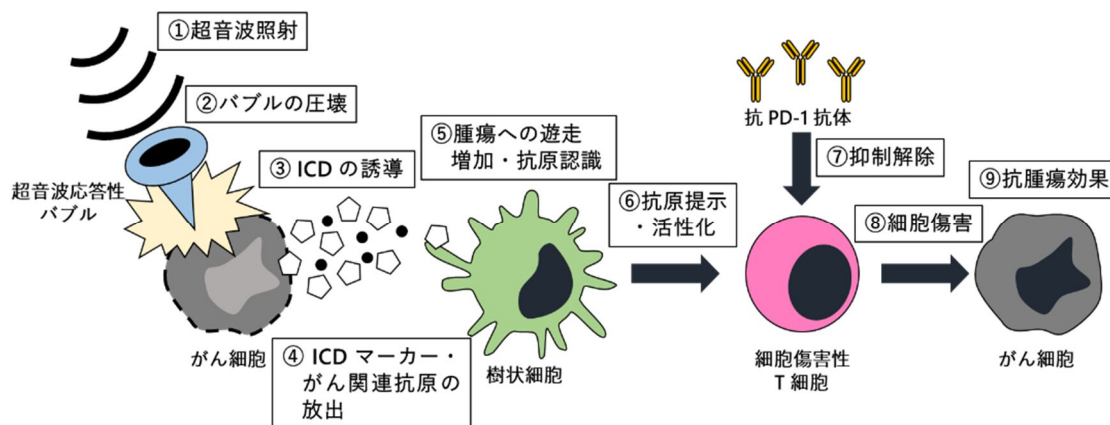


図 1 バブルの圧壊によって誘導される抗腫瘍免疫応答

2. 研究の目的

現在問題となっている、抗 **PD-1** 抗体などの免疫チェックポイント阻害剤における奏効率の低さは、がんの低い免疫原性による免疫監視機構からの逃避が一因となっている。この問題を解決するために、放射線療法や化学療法を用いたがん細胞の免疫原性を高める研究がなされているが、全身性副作用発現のおそれがある。本研究では、超音波と超音波応答性バブルの組み合わせに着目し、低侵襲かつ効果的ながん細胞の免疫原性細胞死 (**ICD**) を誘導するという他に類を見ない治療法の確立を試みる。これにより、がん固有の免疫原性という障壁を克服し、がん免疫療法治療薬が効果的に機能するための免疫微小環境の構築が期待される。

3. 研究の方法

BALB/c マウスの後背部にマウス大腸がん (**CT26**) 細胞またはマウス乳がん (**4T1**) 細胞を皮内投与し、担がんマウスを作成した。このマウスに対し、超音波応答性マイクロバブル(**MB**) を尾静脈内投与し、投与直後に腫瘍局所へ超音波照射した。その翌日から抗 **PD-1** 抗体を繰り返し腹腔内投与した。ノギスを用いて腫瘍径を測定し、腫瘍体積および生存日数を指標に抗腫瘍効果を評価した。

また、**4T1** 担がんマウスに対し前述の治療を行い、最終治療から翌日の腫瘍を回収した。腫瘍内の免疫細胞をフローサイトメトリーにて解析した。

4. 研究成果

マウス大腸がん (**CT26**) 担がんマウスに対し、超音波応答性マイクロバブル (**MB**) と超音波による治療 (**MB + US** 治療) および抗 **PD-1** 抗体治療を行った。その結果、無処置群、**MB + US** 治療群では、治療開始後 **40** 日以内に全例の死亡が確認された(図 2)。また、抗 **PD-1** 抗体治療群では、**5** 匹中 **1** 例のマウスで腫瘍の完全退縮が認められ、観察期間終了後も生存した。一方、**MB + US** 治療と抗 **PD-1** 抗体を併用したところ、**5** 匹中 **4** 例のマウスで腫瘍の完全退縮が認められ、観察期間終了後も生存した。このことから、**MB + US** 治療を併用することで、抗 **PD-1** 抗体の奏効率向上につながるものと推察された。

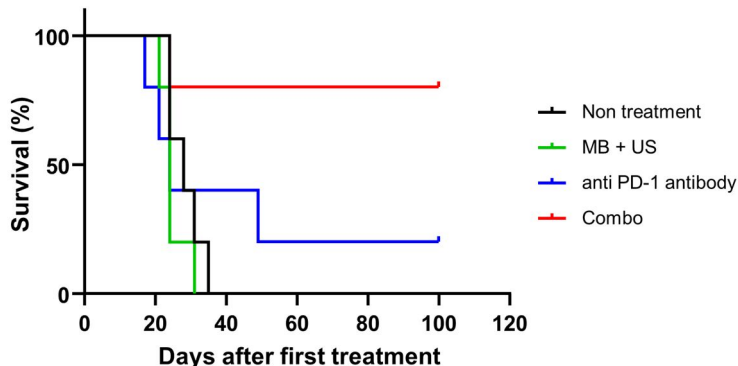


図 2 CT26 担がんマウスに対する延命効果

次に、マウス乳がん (**4T1**) に対して同様の治療を行った。**4T1** はトリプルネガティブ乳がん に分類される難治性の乳がんであり、免疫療法に対しても抵抗性を示す。この **4T1** を担がんしたマウスに対し、**MB + US** 治療と抗 **PD-1** 抗体治療を行った。その結果、**MB + US** 治療群、抗 **PD-1** 抗体治療群において抗腫瘍効果は認められなかった(図 3 左)。一方、**MB + US** 治療と抗 **PD-1** 抗体治療を併用することで、腫瘍の増殖が抑制された。このことから、**MB + US** 治療によって、抗 **PD-1** 抗体による治療効果が得られることが明らかとなった。これらの結果から、**MB + US** 治療によって腫瘍内の免疫微小環境が変化し、抗 **PD-1** 抗体による治療効果に繋がったのではないかと考えられた。

そこで、この治療による腫瘍内免疫微小環境変化を評価するため、**4T1** 担がんマウスに **MB + US** 治療と抗 **PD-1** 抗体の併用治療を行い、腫瘍組織を回収して腫瘍内の免疫細胞をフローサイトメトリーにて測定した。その結果、**MB + US** 治療と抗 **PD-1** 抗体を併用することで腫瘍内における **M1** マクロファージの増加が認められた(図 3 右)。**M1** マクロファージは、腫瘍細胞を直接攻撃するだけでなく、炎症性サイトカインの放出により細胞傷害性 **T** 細胞の活性化を誘導する細胞である。このことから、腫瘍内における **M1** マクロファージの増加は、腫瘍内免疫微小環境が抗腫瘍的な環境に構築されたことを示唆しており、抗 **PD-1** 抗体の作用標的である細胞傷害性 **T** 細胞の活性化に繋がったと推察された。

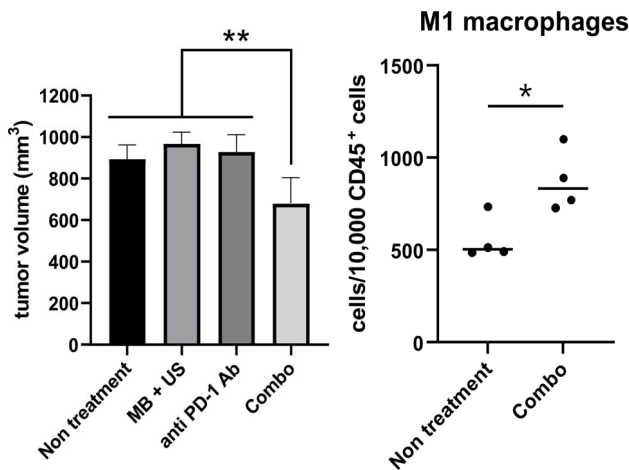


図 3 4T1 担がんマウスにおける抗腫瘍効果 (左) および腫瘍内における **M1** マクロファージの変化

これらの結果から、**MB + US** 治療によって腫瘍内免疫微小環境に変化が生じ、**M1** マクロファージのような抗腫瘍的な抗原提示細胞の活性化が誘導されたものと推察された。そして、この抗腫瘍的な腫瘍内免疫微小環境が構築されたことによって、これまで抗 **PD-1** 抗体治療に抵抗性とされた腫瘍においても抗腫瘍効果が得られることが明らかとなった。以上より、本研究課題によって **MB + US** 治療が、これまで抗 **PD-1** 抗体による効果が得られていなかった免疫原性の低いがんに対する有用ながん治療法になるものと期待される。

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 0件）

1. 発表者名 宗像理紗、青枝大貴、小山正平、小俣大樹、丸山 保、鈴木悠乃、萩原芙美子、岡田欣晃、吉岡靖雄、鈴木 亮
2. 発表標題 免疫抑制的な腫瘍内微小環境を有する腫瘍への効果的ながん免疫療法構築に向けた基礎的研究
3. 学会等名 日本薬学会 第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宗像理紗、小俣大樹、小山正平、岡田欣晃、吉岡靖雄、青枝大貴、鈴木 亮
2. 発表標題 免疫賦活化核酸搭載脂質ナノ粒子の抗腫瘍効果および生体内分布の検討
3. 学会等名 第30回 日本バイオイメージング学会 学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宗像理紗、丸山 保、小俣大樹、小山正平、岡田欣晃、吉岡靖雄、青枝大貴、鈴木 亮
2. 発表標題 Development of immunostimulatory oligodeoxynucleotide loaded lipid nanoparticles and application for cancer immunotherapy
3. 学会等名 日本核酸医薬学会第6年会
4. 発表年 2021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
---------	---------