

令和 6 年 5 月 8 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07925

研究課題名(和文)新規薬物送達法を用いた肝がん特異的解糖系阻害とがん免疫応答効率化に関する研究開発

研究課題名(英文)The study for liver cancer specific glycolysis inhibition and efficiency of cancer immunity using novel drug delivery system

研究代表者

仁科 惣治 (Sohji, Nishina)

川崎医科大学・医学部・教授

研究者番号：70550961

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：1)質量分析法を用いてマウス血漿中の2DG濃度測定法を確立後、2DG-PLGAナノ粒子(2DG-PLGA-NP)薬物動態解析の基盤を確立した。
2)がん微小環境での解糖系阻害による抗腫瘍免疫活性化機構の統括的評価：2DGは血管内皮細胞の増殖を抑制させた。また、通常免疫能を有するマウス肝臓組織において、2DG-PLGA-NP投与はCD11b+ Myeloid cell [T2腫瘍関連マクロファージ(TAM)等に発現]の浸潤を抑制させ、T2 TAMマーカー(CD63, Arg1)発現を抑制させた。
3)2DGにより乳酸産生抑制された肝臓細胞培養上清は、CD8+T細胞のPD-1 mRNA発現を亢進させた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

2DG-PLGA-NPは、従来の化学療法剤(分子標的薬、免疫チェックポイント阻害剤)と異なる機序での抗腫瘍作用{殺細胞効果+腫瘍免疫活性化を有するのみならず、免疫チェックポイント阻害剤(抗PD-1抗体)抵抗性がんモデルに対しても有意な抗腫瘍効果を発揮した。
また、2DG-PLGA-NPは膵癌、大腸癌、悪性黒色腫等のがん細胞移植マウスに対しても抗腫瘍効果を認めており、理論的にも2DGはがん細胞に共通した糖代謝亢進を標的とした抗がん剤であるため、将来的には様々な癌腫に対する適応拡大も可能となる。

研究成果の概要(英文)：1) We established the method for measuring plasma concentration of 2DG in mice using mass spectrometry, and the basis for pharmacokinetic analysis of 2DG-PLGA nanoparticles (2DG-PLGA-NP).
2) Comprehensive evaluation of the mechanism of antitumor immunity by glycolytic inhibition in the tumor microenvironment: 2DG suppressed the proliferation of vascular endothelial cells. In addition, 2DG-PLGA-NP suppressed the invasion of CD11b+ Myeloid cells [expressed in T2 tumor-associated macrophages (TAMs)] and suppressed the expression of T2 TAM markers (CD63, Arg1) in hepatocarcinoma (HCC) tissues of immunocompetent mice.
3) HCC cell culture medium in which lactate production was suppressed by 2DG enhanced PD-1 mRNA expression in CD8+ T cells.

研究分野：肝臓学

キーワード：がん 解糖系 2DG 腫瘍免疫 PLGA

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

免疫チェックポイント阻害剤は従来の免疫療法に比べて多種類のがんで高い治療効果を発揮しているが、その有効性はいまだ限定的であるため、更なる治療効果を目指してがんによる免疫抑制機構に焦点を当てた研究が活発に行われている。臨床的には免疫チェックポイント阻害剤と VEGF (vascular endothelial growth factor) 阻害剤の併用が固形がん (非小細胞肺癌、肝細胞癌等) に対して生存率を有意に改善することが相次いで報告されている (*N Engl J Med* 2018, 2019, 2019, *Lancet* 2019)。この理論背景としてがん微小環境での腫瘍血管の異常がもたらす腫瘍免疫の破綻が、VEGF 阻害剤によって是正されることが注目されている。また、近年、がん細胞の代謝機構の特徴である糖代謝亢進 (Warburg 効果) が免疫チェックポイント阻害剤とは異なる機序で腫瘍免疫逃避環境を形成することが報告されている。そこで“がん細胞選択的な糖代謝阻害で腫瘍免疫活性化は可能”という発想に至った。解糖系阻害剤であるグルコース誘導体 2-Deoxy-D-Glucose (2DG) は、細胞死誘導等の抗腫瘍効果が報告されている。がん患者対象の第 I/II 相臨床試験 (用量漸増試験等) で 2DG の最大耐用量は確認されたがその用量では有効性が認められず、次相試験の実施に至らなかった。そのため“生体毒性を最小限に抑えかつ標的がん組織へより効率的に集積する drug delivery system (DDS) を開発できれば 2DG の臨床応用が可能”と考えられた。

一方、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)。なかでも PLGA はその特殊応用が米国 FDA でも承認済みの生体適合性高分子であり、水と二酸化炭素に分解され安全性も高い。研究代表者らは H30 ~ R2 年度科研費事業において、2DG 封入ナノ粒子製剤である poly (lactic-co-glycolic acid) (2DG-PLGA-NP) を共同開発し、マウスモデルで有害事象なくがん特異的に解糖系を阻害する方法を確立した。興味深いことに、2DG によるがん細胞の解糖系阻害は、がん微小環境での CD8+T 細胞の相対的グルコース取り込み亢進に加え、乳酸産生低下に伴う IFN- γ /JAK-STAT 経路、または AMPK 活性化による epigenetic 経路 (ヒストンメチル化阻害) を介した走化性因子 (CXCL9-11) 発現亢進を介して抗腫瘍免疫を活性化させることを見出した。このような 2DG-PLGA-NP の殺細胞作用と腫瘍免疫活性化という dual-functional な作用は、免疫チェックポイント阻害剤 (抗 PD1 抗体) との併用による抗腫瘍効果を増強し、さらには抗 PD1 抗体耐性がん細胞移植マウスに対しても抗腫瘍効果を発揮した (*Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 7: 115-134; 2018)。

上記研究成果をもとに本研究開発では、2DG-PLGA-NP によるがん微小環境での糖代謝リプログラミングが、腫瘍血管や tumor associated macrophage (TAM) による抗腫瘍免疫逃避機構に及ぼす影響の検討が必要と考えた。また、2DG (原体) と比べて 2DG-PLGA-NP の優位な抗腫瘍効果がより効率的な腫瘍への薬剤 (2DG) 送達性に基づくのかを明らかにする必要があると考えられた。さらに、臨床試験の実施に必要不可欠である薬物動態解析の基盤確立のために、生体試料中 2DG 含有量測定系の確立が必要であると考えられた。

また近年、がん微小環境において、腫瘍免疫活性化にかかわる effector Tcell (CD8+Tcell) と腫瘍免疫抑制系細胞である制御性 Tcell (Treg) における免疫チェックポイント分子 PD-1 の発現バランスは、乳酸により調節されており、そのことが免疫チェックポイント阻害剤に対する反応性に関与することが明らかにされた (*Cancer Cell* 2022; 40: 201-218)。がん細胞の乳酸産生に対する解糖系阻害剤 (2DG) が“CD8+Tcell の PD-1 発現調節機構”に及ぼす影響は未だ不明である。

2. 研究の目的

本研究では、2DG-PLGA-NP によるがん微小環境での糖代謝リプログラミングが、腫瘍血管や tumor associated macrophage (TAM) による抗腫瘍免疫逃避機構に及ぼす影響の検討を行った。また、臨床試験の実施に必要不可欠である薬物動態解析の基盤確立のために、生体試料中 2DG 含有量測定系の確立を目指した。さらに、がん細胞の乳酸産生に対する解糖系阻害剤 (2DG) が“CD8+Tcell の PD-1 発現調節機構”にどのような影響を及ぼすのかについて明らかにした。

3. 研究の方法

(1) 2DG-PLGA ナノ粒子 (2DG-PLGA-NP) 薬物動態解析の基盤確立 (in vivo)

1. 質量分析法 (LC/MS/MS) を用いたマウス血漿中の 2DG 濃度測定法確立

既にヌードマウス (BALB/c-nu/nu) に対して、質量分析法 (LC/MS/MS) を用いた血漿中 2DG 濃度測定法を確立している (定量範囲: 100 ~ 10000 ng/mL)。今回、ヌードマウス (BALB/c-nu/nu) に対して 2DG-PLGA-NP 80mg/kg、週 1 回経静脈的投与を行った後に、血漿中 2DG 濃度を測定した (2DG-PLGA-NP 投与 1, 3, 6, 24 時間後)。

2. 2DG(原体)に対する 2DG-PLGA-NP の腫瘍への薬剤 (2DG) 送達性における優位性評価

2DG (原体) および 2DG-PLGA-NP 投与されたマウスの腫瘍組織に対して、質量分析法 (LC/MS/MS) を用いた 2DG および 2DG-6 リン酸含有量測定を行った。腫瘍組織中の 2DG 含有量は測定感度以下であったが、2DG の代謝物である 2DG-6 リン酸であれば測定可能ではないかと考えた。なぜなら、一般的にがん細胞内に到達した 2DG は 2DG-6 リン酸に代謝されその状態で比較的安定化することが知られているためである。そこで今回、ヌードマウス (BALB/c-nu/nu) 肝癌 (Huh7) 皮下腫瘍モデルに対して 2DG-PLGA-NP 80mg/kg、週 1 回尾静脈的投与を 2 週 (計 3 回) 行い、最終投与 24 時間後に皮下腫瘍サンプル採取し、腫瘍中 2DG-6 リン酸含有量を比較検討した。

(2) がん微小環境での解糖系阻害による抗腫瘍免疫活性化機構の統括的評価

3. がん微小環境における腫瘍血管内皮細胞に対して 2DG-PLGA-NP が及ぼす影響についての検討 (in vitro)

腫瘍血管内皮細胞の一部は腫瘍関連線維芽細胞 (CAF) に形質転換される (血管内皮間葉転換; EndMT)。CAF はケモカイン CCL2 (MCP1) を分泌することによりがん組織へ腫瘍関連マクロファージ (TAM) を誘導促進し、腫瘍免疫逃避機構を形成する。そこで、グルコースが腫瘍血管内皮細胞から CAF への EndMT 誘導、および TAM 誘導性ケモカイン CCL2 分泌を促進するか否かを明らかにし、それに対し 2DG が EndMT 抑制作用、および CCL2 分泌抑制 → がん組織への TAM 誘導抑制を介した 腫瘍免疫活性化 を来たすか否かを検証した。具体的には、血管内皮細胞株 (EAhy) に対し、グルコース ± 2DG を添加し培養後、血管内皮細胞における接着因子、EndMT 関連マーカーおよび TAM 誘導性ケモカイン (CCL2) の発現を検討した。

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 (in vivo)

正常免疫能を有する肝発癌マウス [Diethylnitrosamine (DEN) 誘発肝発癌マウス] の肝癌組織 (H-E 染色) において、Control 群 (PBS 週 1 回尾静脈注射) および 2DG (原体) 投与群 (100mg/kg 連日腹腔内投与) と比較して 2DG-PLGA-NP 投与群 (800mg/kg 週 1 回尾静脈注射) で CD11b+ Myeloid cell (腫瘍免疫抑制系細胞である M2 TAM もしくは MDSC に発現) の浸潤が抑制され、T2 TAM マーカー (CD63、Arg-1) および CCL2 (TAM 誘導性ケモカイン) の発現が抑制されるか否かを検討した。

(3) がん細胞の乳酸産生に対する解糖系阻害剤 (2DG) が “CD8+Tcell の PD-1 発現調節機構” に及ぼす影響評価

肝癌細胞 (Huh7) を下記 (a) ~ (f) の 6 群に分けた培養上清で 24 時間 incubate 後、培養上清中の乳酸濃度を測定し、肝癌細胞からの乳酸産生能を比較検討した:

(a) glucose 0mg/mL, (b) glucose 0mg/mL + 2DG 50mM, (c) glucose 45mg/mL, (d) glucose 45mg/mL + 2DG 50mM, (e) glucose 450mg/mL, (f) glucose 450mg/mL + 2DG 50mM

健康人より採取した末梢血に対し、MACS 磁気細胞分離法 / FACS sorting による細胞分離法で CD8+Tcell (CD3+CD8+Tcell) を分離。分離された CD8+Tcell に対し、上記 で得られた各群 { (a) ~ (f) 群 } の培養上清で 16 時間 incubate した。

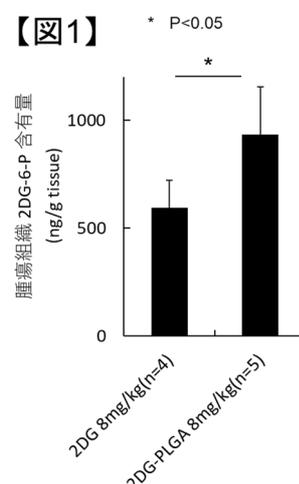
上記 で得られた CD8+Tcell の PD-1 発現率を mRNA レベル (real-time PCR) にて比較検討した。

4. 研究成果

(1) 2DG-PLGA ナノ粒子 (2DG-PLGA-NP) 薬物動態解析の基盤確立 (in vivo)

1. 質量分析法を用いたマウス血漿中 2DG 濃度測定法確立

ヌードマウス (BALB/c-nu/nu) に対して 2DG-PLGA-NP 80mg/kg、週 1 回尾静脈的投与を行った後に、質量分析法



(LC/MS/MS)を用いて血漿中 2DG-6 リン酸濃度を測定した(2DG-PLGA-NP 投与 1, 3, 6, 24 時間後)。その結果、投与後 1, 3, 6 時間後の 血漿中 2DG-6 リン酸濃度測定は可能であったが、24 時間後には検出感度以下となっていた。

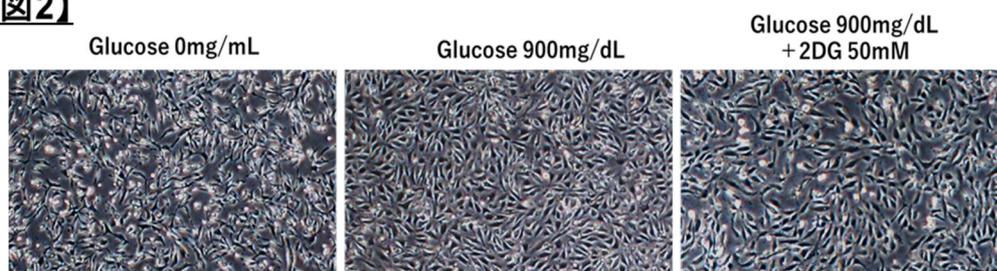
2. 2DG (原体) に対する 2DG-PLGA-NP の腫瘍への薬剤 (2DG) 送達性における優位性評価
 用量 (2DG として 8mg/kg) 及び用法 (週 1 回尾静脈投与) が同条件下では、2DG (原体) 群と比べ 2DG-PLGA-NP 群で腫瘍内 2DG-6-リン酸濃度が有意に高かった ($P < 0.05$) (図 1)。

(2) がん微小環境での解糖系阻害による抗腫瘍免疫活性化機構の統括的評価

3. がん微小環境における腫瘍血管内皮細胞に対して 2DG-PLGA-NP が及ぼす影響についての検討 (*in vitro*)

血管内皮細胞株 (EAhy) に対しグルコース 900mg/dL ± 2DG 50mM を添加し培養後、血管内皮細胞における接着因子 (E-cadherin) EndMT 関連マーカーおよび TAM 誘導性ケモカイン (CCL2) の発現を検討したが、2DG の投与で上記の蛋白発現は有意な変化を示さなかった。しかし一方で、2DG は血管内皮細胞 (EAhy) の細胞増殖を抑制した (図 2)。以上より、2DG が直接的に腫瘍血管内皮細胞の細胞増殖抑制を介して腫瘍血管新生を抑制する可能性が考えられた。

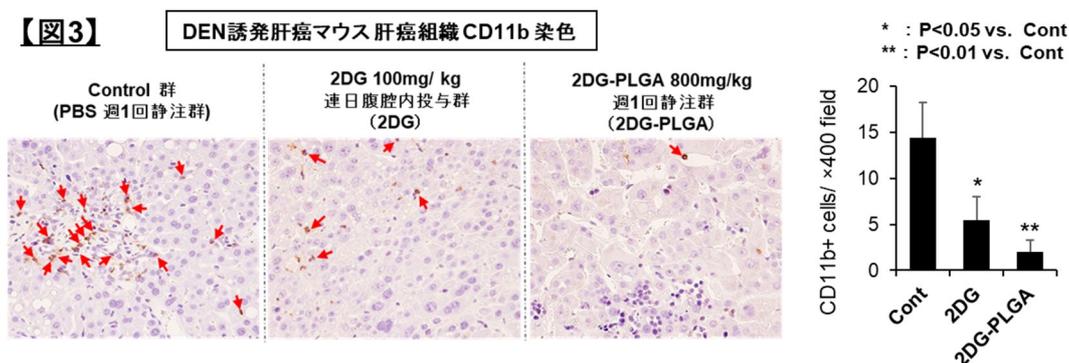
【図2】



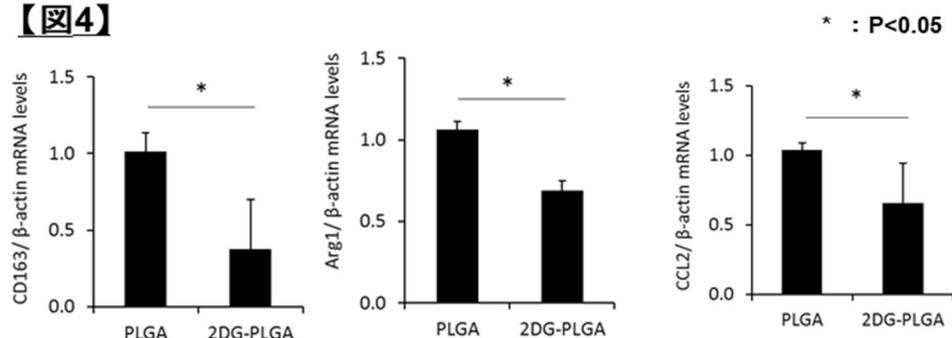
4. 免疫応答性肝発癌モデルに対する 2DG-PLGA-NP の効果についての検討 (*in vivo*)

DEN 誘発肝発癌マウスの肝臓組織 (H-E 染色) において、Control 群および 2DG (原体) 投与群と比較して 2DG-PLGA-NP 投与群では CD11b+ Myeloid cell (腫瘍免疫抑制系細胞である M2 type TAM もしくは MDSC に発現) の浸潤が抑制されており (図 3) さらに M2 type TAM マーカー (CD63, Arg-1) および CCL2 (TAM 誘導性ケモカイン) の mRNA 発現も抑制されていることを見出した (図 4)。以上より、2DG-PLGA-NP は何らかの機序で CD11b+ Myeloid cell の浸潤を抑制し、それが肝細胞癌に対する抗腫瘍免疫活性化の一機序である可能性が考えられた。

【図3】



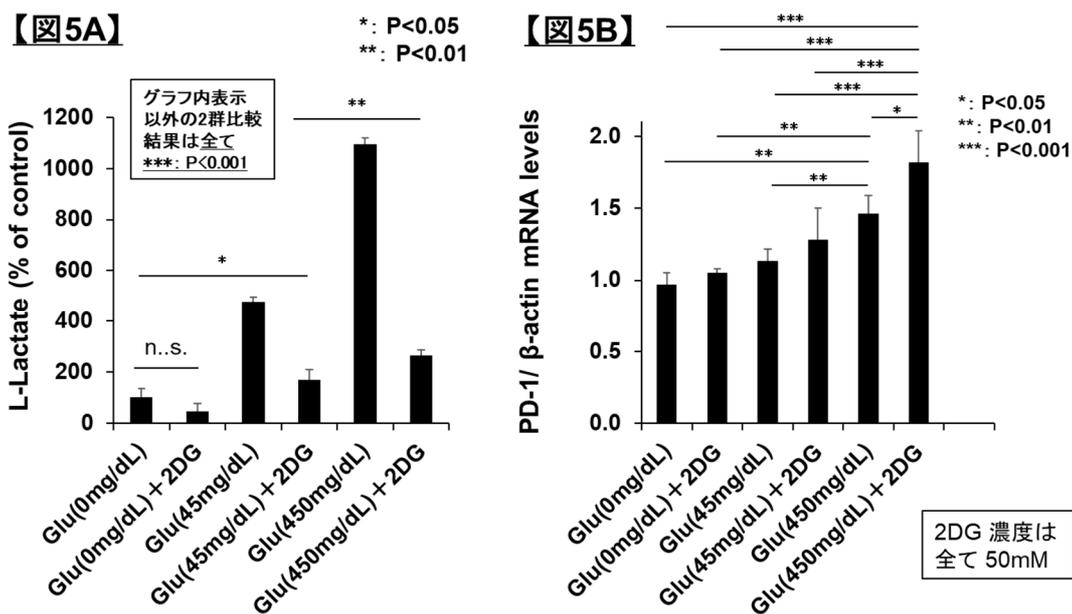
【図4】



(3) がん細胞の乳酸産生に対する解糖系阻害剤(2DG)が“CD8+TcellのPD-1発現調節機構”に及ぼす影響評価

肝癌細胞(Huh7)からのグルコース依存性乳酸産生量増加に対して、2DGは有意に抑制した(図5A)。さらに、CD8+T cellのPD-1 mRNA発現は、グルコース濃度依存性に亢進したが、2DGの併用によりさらに亢進した(図5B)。

以上より、解糖系阻害剤(2DG)は肝癌細胞の乳酸産生抑制を介して“(乳酸による)CD8+TcellのPD-1発現抑制を解除”し、免疫チェックポイント阻害剤(PD-1)に対する反応性を増強する可能性が示唆された。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 仁科惣治、日野啓輔
2. 発表標題 抗腫瘍免疫活性化作用を有するがん選択的解糖系阻害剤による肝がん治療開発
3. 学会等名 58回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 仁科惣治、日野啓輔
2. 発表標題 解糖系を標的とした肝がん特異的薬剤送達システムの開発
3. 学会等名 JDDW 2022（第30回日本消化器関連学会週間）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 仁科惣治、佐々木恭、日野啓輔
2. 発表標題 HEPATIC MITOPHAGY RESTORES MITOCHONDRIAL FUNCTION IN SKELETAL MUSCLE VIA REDUCTION OF SELENOPROTEIN P SECRETION IN NASH-RELATED HEPATOCARCINOGENIC MICE
3. 学会等名 American Association for the Study of Liver Diseases(AASLD) Annual Meeting（国際学会）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 仁科惣治、日野啓輔
2. 発表標題 新規抗腫瘍免疫活性化作用を標的としたがん特異的解糖系阻害剤による肝がん治療応用
3. 学会等名 第57回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 仁科惣治、日野啓輔
2. 発表標題 肝細胞癌に対するナノ粒子を用いたがん細胞特異的解糖系阻害と腫瘍免疫 応答効率化に関する検討
3. 学会等名 第44回日本肝臓学会西部会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 仁科惣治、日野啓輔
2. 発表標題 がん特異的解糖系阻害剤による腫瘍免疫活性化を標的とした肝がん治療
3. 学会等名 JDDW 2021 (第29回日本消化器関連学会週間)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 仁科惣治、佐々木恭、日野啓輔
2. 発表標題 Study of antitumor immunity activation based on cancer cell-specific glycolytic inhibition
3. 学会等名 American Association for the Study of Liver Diseases(AASLD) Annual Meeting (国際学会)
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
研究 分担 者	日野 啓輔 (Hino Keisuke) (80228741)	川崎医科大学・医学部・特任研究員 (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
---------	---------