

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15185

研究課題名(和文)腫瘍関連マクロファージの標的化による効率的表現型転換を基盤とした革新的癌免疫療法

研究課題名(英文)Development of a novel carrier for tumor associated macrophage and its application to cancer immunotherapy

研究代表者

丸山 徹 (MARUYAMA, TORU)

熊本大学・薬学部・教授

研究者番号：90423657

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：増殖/再発/転移といった難治性癌に対する新規治療戦略として、腫瘍関連マクロファージ(TAM)が注目され、TAMをM1様細胞へ表現型転換する悪性化微小環境の改善と、M1様細胞による癌細胞死を誘導する”TAMのre-education”療法が有望視されている。本研究では、TAM表面に高発現するCD206を選択的に認識する組換え型アルブミンをTAM標的化担体として開発し、これにアルブミン工学を駆使してM1誘導剤を付加した結合体を創製した。本結合体は優れたTAM認識能を保持しており、担癌マウスの腫瘍組織におけるM1様TAMの効率的な増加を介して抗腫瘍効果を発揮した。

研究成果の概要(英文)：We have been constructed the albumin DDS platform that is able to create albumin derivatives with active targeting potency and multiple functions. The purpose of the present study is to attempt a development of novel immunotherapy which convert M2 type tumor associated macrophage to its M1 type. To achieve this strategy, it must be necessary to construct a novel DDS system to TAM. Here, we originally develop a TAM targeting carrier based on recombinant mannoseylated albumin with PEGylation (PEGylated Man-HSA). Actually, this carrier preferentially distributed to tumor tissues and simultaneously reduced the distribution to liver. Using albumin fusion technology, M1-inducers were attached to PEGylated Man-HSA, and it retained M1 inducing ability. Administration of M1-PEGylated Man-HSA caused the alternation of TAM phenotype from M2 type to M1 like type, and hence, suppressed the tumor growth significantly. Thus, M1-PEGylated Man-HSA has a potential as a novel immunotherapy against cancer.

研究分野：薬剤学

キーワード：ドラッグデリバリーシステム

1. 研究開始当初の背景

近年の分子生物学の進歩により、マクロファージの多様性、可塑性と病態との関係が見出され、新たな治療標的として注目されている。マクロファージは、炎症惹起性の古典的活性化(M1)マクロファージと、抗炎症性に働く代替的活性化(M2)マクロファージに大別される。癌組織では、M2 様マクロファージの存在が見出され、腫瘍関連マクロファージ(TAM)と呼ばれている。TAM は、悪性腫瘍の発生初期から転移巣の形成までの過程、すなわち増殖、浸潤、転移に深く関与し、腫瘍の微小環境を悪性化する治療抵抗性因子として位置付けられている。興味深いことに、TAM(M2)への分化を抑制し、M1 様マクロファージの割合を増加させると、腫瘍の増殖や転移が抑制される。このことは、TAM(M2)が抗腫瘍免疫を抑制することで腫瘍増殖に関与する反面、M1 マクロファージは抗腫瘍免疫を活性化することで腫瘍の増殖を抑制していることを意味している。従って、TAM を M2 様から M1 様へと表現型転換させる "re-education" が効率良く実現できれば、腫瘍組織での免疫特性と微小環境を劇的に改善する合理的な癌免疫療法となることが期待されるものの、そのためには TAM に対するデリバリーシステムの構築が必要不可欠である。残念ながら、TAM の M1 誘導剤は複数見出されているが、未だ効率的な TAM 標的化担体は開発されていない。

2. 研究の目的

本研究では、我々が独自に構築したアルブミン DDS プラットホームを駆使して、TAM 標的化担体を創製し、それに M1 化誘導剤を融合することで、*in vivo* において M2 化 TAM の "re-education" システムの構築を試みる。本システムは、腫瘍組織における微小環境の改善を介して抗腫瘍効果を発揮する合理的な癌免疫療法の実現を可能とする。ここで、本開発戦略の成否の鍵を握るのは担体の TAM 標的化能、M1 化誘導剤担持力、腫瘍移行性であるが、今回使用するポリエチレングリコール(PEG)修飾化マンノース含有ヒト血清アルブミン(HSA)は TAM 表面の CD206 を選択的に認識する高マンノース糖鎖を、腫瘍移行性や薬物担持能に優れている HSA へ結合させているため、上述した課題を克服することが期待される。

3. 研究の方法

これまで我々が構築してきた組換え型ア

ルブミン培養・精製を用いて 3 つの分子サイズが異なる Man-HSA を調製し、それらを PEG で修飾することにより PEG 化 Man-HSA を作製する。各種 M2 様マクロファージを調製し、CD206 の発現を確認した後に PEG 化 Man-HSA の細胞結合性や取り込み効率を評価する。次いで、PEG 化 Man-HSA の体内動態特性 (血中滞留性、腫瘍及臓器分布)を健常及び担癌マウスで解析する。得られた結果から、M2 様マクロファージに対する高い認識能と腫瘍組織への移行性を有する PEG 化 Man-HSA を TAM 標的化担体として選択する。この TAM 標的化担体に M1 誘導剤を結合させた後、*in vitro* で M1 様マクロファージと反応させて M1 様誘導能を評価し、最も優れた M1 化能を有する M1-PEG 化 Man-HSA (M1-Man-HSA)を選択する。最後に、選択した M1-Man-HSA を担癌マウスに繰り返し投与し、腫瘍組織における TAM の極性変化と抗腫瘍効果を評価する。さらに、M1-Man-HSA の安全性についても解析する。

4. 研究成果

本研究では、我々が独自に確立したアルブミン融合技術を基盤として TAM 標的化担体を開発した。具体的な開発戦略としては、CD206 を選択的に認識する Man-HSA を PEG で修飾することにより、CD206 に対する認識能を保持しつつ、腫瘍への移行性の亢進を企図した。事実、Man-HSA 及び PEG 化 Man-HSA の体内動態を、健常及び B16 担癌マウスで比較したところ、Man-HSA に比べて、PEG 化 Man-HSA は肝臓をはじめとする CD206 発現臓器への移行性が抑制される結果、腫瘍組織及び TAM への分布が増加していた(Fig. 1)。

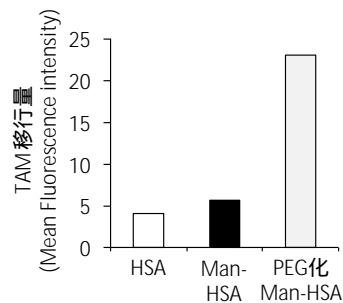


Fig. 1 担癌マウスにおける各 FITC 標識 HSA の TAM 移行量

ここで、HSA のサイズを変化させた Man-HSA 2 量体及び Man-HSA ナノ粒子を PEG 化し、CD206 認識能及び体内動態を解析したところ、PEG 化 Man-HSA 2 量体が TAM 担体とし

て最も適していた。

そこで、この PEG 化 Man-HSA 2 量体を TAM 標的化担体とし、それにアルブミン工学を駆使して M1 誘導剤を付加した 6 種類の結合体(M1-Man-HSA)を創製することに成功した。その際、M1 誘導剤付加による Man-HSA の体内動態特性の変化は観察されなかった。

次に、各種 TAM を含む M1 及び M2 マクロファージを用いて、M1-Man-HSA のマクロファージ極性に及ぼす影響を検討したところ、M2 様細胞に対しては、いずれも極性を M1 様に転換させた。他方、M1 様細胞に対しては変化を及ぼさなかった。また、一酸化窒素付加体は M1 と類似した環境を誘導することを見出した。

最後に、M1-Man-HSA を担癌したマウスへ投与したところ、腫瘍組織における M1 様 TAM の増加が観察された。このことから、M1-Man-HSA は *in vivo* においても TAM の表現型転換能を発揮することが示された。また、M1-Man-HSA 投与群では、腫瘍微小環境の改善を反映して、腫瘍増殖が有意に抑制されていた。その際、体重減少や外観・運動性への影響、各種血液及生化学的検査値への有意な変動は認められなかったことから、安全性の問題は少ないことが推察された。これらの結果から、TAM “re-education” を基盤とする新規癌免疫療法に対する M1-Man-HSA の応用が期待される。

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 3 件)

1. Polythiol-containing, recombinant mannosylated-albumin is a superior CD68⁺/CD206⁺ Kupffer cell-targeted nano-antioxidant for the treatment of two acute hepatitis models. Maeda H, Hirata K, Watanabe H, Ishima Y, Chuang VTG, Taguchi K, Inatsu A, Kinoshita M, Tanaka M, Sasaki Y, Otagiri M, Maruyama T, *J Pharmacol Exp Ther.* 査読有, 352, 244-57 (2015). doi: 10.1124/jpet.114.219493.
2. S-Nitrosated human serum albumin dimer as novel nano EPR enhancer applied to macromolecular anti-tumor drugs such as micelles and liposomes. Kinoshita R, Ishima Y, Ikeda M, Kragh-Hansen U, Fang J, Nakamura H, Chuang VTG, Tanaka R,

Maeda H, Kodama A, Watanabe H, Maeda H, Otagiri M, Maruyama T, *J Control Release.* 査読有, 217:1-9 (2015). doi: 10.1016/j.jconrel.2015.08.036.

3. Ishima Y, Inoue A, Fang J, Kinoshita R, Ikeda M, Watanabe H, Maeda H, Otagiri M, Maruyama T, Poly-S-nitrosated human albumin enhances the antitumor and antimetastasis effect of bevacizumab, partly by inhibiting autophagy via the generation of nitric oxide, *Cancer Sci.* 査読有, 106(2):194-200 (2015). doi: 10.1111/cas.12577.

〔学会発表〕(計 22 件)

1. 皆吉 勇紀、前田 仁志、渡邊 博志、異島 優、小田切 優樹、丸山 徹 肝ケッパ細胞指向性インターフェロン 2b の設計と肝保護効果 第 33 回日本薬学会九州支部大会 2016/12/3-12/4 (鹿児島：鹿児島大学 群元キャンパス)
2. 前田 仁志、異島 優、皆吉 勇紀、一水 翔太、柳澤 洋輝、渡邊 博志、小田切 優樹、丸山 徹 NASH 病態における DDS 戦略の限界と一酸化窒素による治療抵抗性の克服 第 38 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム 2016/11/17-18 (名古屋：名古屋市立大学 大学院薬学研究科・薬学部)
3. 前田 仁志、田中 基彦、佐々木 裕、丸山 徹 NAFLD/NASH の病態進展機序に基づいた肝指向性ナノ酸化剤の治療戦略 日本消化器関連学会週間 JDDW 2016 2016/11/3-6 (神戸：神戸コンベンションセンター)
4. 木下 遼、異島 優、池田 真由美、中村 秀明、方 軍、前田 浩、渡邊 博志、小田切 優樹、丸山 徹 ナノ EPR 増強剤である NO 付加アルブミンダイマーは Abraxane® の腫瘍移行を促進することで治療効果並びに安全性を向上させる 第 31 回日本薬物動態学会 2016/10/13-15 (長野：キッセイ文化ホール 松本市総合体育館)
5. Ryo Kinoshita, Yu Ishima, Mayumi Ikeda, Jun Fang, Hiroshi Maeda, Masaki Otagiri, Toru Maruyama. S-Nitrosated human serum albumin dimer as a novel nano EPR enhancer applied to nanotechnology based anticancer drugs 2016 Controlled Release Society Annual Meeting & Exposition 2016/7/17-20 (Washington State

- Convention Center,USA)
6. 前田 仁志、田中 基彦、佐々木 裕、丸山 徹 クッパー細胞を標的としたナノ酸化剤による NAFLD/NASH の治療効果 第 23 回肝細胞研究会 2016/7/7-8 (大阪：大阪大学中之島センター)
 7. 皆吉 勇紀、前田 仁志、渡邊 博志、異島 優、小田切 優樹、丸山 徹 組換え型高マンノース付加アルブミンを担体とした肝クッパー細胞指向性インターフェロン 2b の設計と肝保護効果(口頭発表)第 32 回日本 DDS 学会学術集会 2016/6/30-7/1 (静岡：グランシップ 静岡コンベンションアーツセンター)
 8. 前田 仁志、異島 優、皆吉 勇紀、一水 翔太、渡邊 博志、小田切 優樹、丸山 徹 NASH モデルの病態生理に基づいた肝指向性ナノ酸化剤の有用性評価第 32 回日本 DDS 学会学術集会 2016/6/30-7/1 (静岡：グランシップ 静岡コンベンションアーツセンター)(口頭発表)
 9. Hitoshi Maeda, Yu Ishima, Yuki Minayoshi, Shouta Ichimizu, Hiroshi Watanabe, Masaki Otagiri, Toru Maruyama Therapeutic Impact of Liver-Targeted Nitric Oxide Releasing Nano-Antioxidant on NASH 第 1 回 日韓若手薬剤学研究者ワークショップ (The 1st Workshop for Japan-Korea Young Scientists on Pharmaceutics)
 10. Ryo kinoshita, Yu Ishima, Mayumi Ikeda, Jun Fang, Hiroshi Maeda, Masaki Otagiri, Toru Maruyama S-Nitrosated human serum albumin dimer as a novel nano EPR enhancer applied to nanotechnology-based anticancer drug 2016/6/24-25 (京都：京都教育文化センター)
 11. 木下 遼、異島 優、池田真由美、中村 秀明、方 軍、前田 浩、小田切優樹、丸山 徹 ナノ EPR 増強剤である NO 付加アルブミンダイマーは 難治性癌における高分子抗癌剤抵抗性を改善する 日本薬剤学会 第 31 回 年会 2016/5/19-21(岐阜：長良川国際会議場、岐阜都ホテル)
 12. Ryo Kinoshita, Yu Ishima, Mayumi Ikeda, Jun Fang, Hiroshi Maeda, Masaki Otagiri, Toru Maruyama S-Nitrosated human serum albumin dimer as novel nano EPR enhancer applied to nano-anticancer drugs Asian Federation for Pharmaceutical Sciences 2015 (Bangkok) 2015/11/25-27 (Thailand , Rama Gardens Hotel)
 13. 木下 遼、異島 優、池田 真由美、方 軍、前田 浩、渡邊 博志、小田切 優樹、丸山 徹 新規ナノ EPR 増強剤である一酸化窒素付加アルブミンダイマーを用いた高分子抗癌剤治療の効率化 第 22 回日本血液代替物学会年次大会 2015/10/22-23 (熊本：熊本大学薬学部)
 14. 木下 遼、異島 優、池田 真由美、方 軍、前田 浩、渡邊 博志、小田切 優樹、丸山 徹 高分子抗がん剤の腫瘍利用率向上を目的とした生体適合性ナノ EPR 増強剤の設計と有用性評価 第 5 回日本バイオマテリアル学会九州ブロック講演会 2015/9/18 (福岡：九州大学伊都キャンパス)
 15. Hitoshi Maeda, Kenshiro Hirata, Hiroshi Watanabe, Yu Ishima, Ayaka Suenaga, Masaki Otagiri and Toru Maruyama Development of CD68⁺/CD206⁺ Kupffer cell-targeted nano-antioxidant for the treatment of two acute hepatitis models APSTJ Global Education Seminar 2015-1 2015/9/12 (Kumamoto : Kumamoto University)
 16. 異島 優、井上 亜希、小田切 優樹、渡邊 博志、丸山 徹 Poly-S-ニトロソ化ヒト血清アルブミンの HIF-1alpha 抑制効果 第 31 回 日本 DDS 学会学術集会 2015/7/2-3 (東京：京王プラザホテル)
 17. 前田 仁志、一水 翔太、渡邊 博志、異島 優、小田切 優樹、丸山 徹 急性及び慢性肝炎モデルマウスにおける CD68⁺/CD206⁺クッパー 細胞由来活性酸素種を標的としたナノ酸化アルブミンの治療効果 第 31 回 日本 DDS 学会学術集会 2015/7/2-3 (東京：京王プラザホテル)
 18. 木下 遼、異島 優、池田 真由美、方 軍、前田 浩、渡邊 博志、小田切 優樹、丸山 徹 新規ナノ EPR 増強剤の一酸化窒素付加アルブミンダイマーによる腫瘍内環境改善作用 第 31 回 日本 DDS 学会学術集会 2015/7/2-3 (東京：京王プラザホテル)
 19. 異島 優、木下 遼、池田 真由美、渡邊 博志、小田切 優樹、丸山 徹 高分子抗癌剤治療における新規ナノ EPR 増強剤としての一酸化窒素付加アルブ

- ミン二量体の有用性評価 第 15 回 日本 NO 学会学術集会 2015/6/27-28 (大阪：千里ライフサイエンスセンター)
20. 前田 仁志、木下 学、田中 基彦、佐々木 裕、丸山 徹 急性及び慢性肝炎モデルマウスにおける CD68⁺/CD206⁺クッパー細胞由来活性酸素種の役割と CD206 標的抗酸化アルブミンの治療効果 第 2 回 肝臓と糖尿病・代謝研究会 2015/5/23 (山口：シーモールパレス)
21. 皆吉 勇紀、前田 仁志、異島 優、渡邊 博志、小田切 優樹、丸山 徹 組換え型高マンノース 付加アルブミンを担体とした 肝指向性インターフェロン 2b の設計と肝保護効果 日本薬剤学会 第 30 年会 2015/5/21-23 (埼玉：長崎ブリックホール、長崎新聞文化ホール)
22. 前田 仁志、木下 学、田中 基彦、佐々木 裕、丸山 徹 急性肝障害における CD68⁺/CD206⁺クッパー細胞由来活性酸素種の役割と CD206 標的化ナノ抗酸化剤による治療効果 第 51 回 日本肝臓学会総会 2015/5/21-22 (熊本：崇城大学市民ホール、他 4 施設)

〔図書〕(計 3 件)

1. Hiroshi Watanabe, Toru Maruyama, Albumin as a biomarker. Human serum albumin: Pharmaceutical and medical applications, edited by Masaki Otagiri et al. Springer (2016)
2. 渡邊博志、丸山徹 タンパク結合率の臨床的な意義を教えてください。月刊薬事 3 月号 じほう vol.58 No.4, 41-45 (2016)
3. 田中元子、伊藤和子、奥田智子、今福匡史、渡邊博志、丸山徹、小泉賢洋、角田隆俊、深川雅史 CKD-MBD におけるリン吸着薬の進歩と治療選択～リンと鉄の関連を含めて～最新透析医療 先端技術との融合 医薬ジャーナル社 699-701 (2016)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.pharm.kumamoto-u.ac.jp/Labs/Yakuzai/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

丸山 徹 (MARUYAMA, Toru)
熊本大学・薬学部・教授
研究者番号：90423657

(2)研究分担者

渡邊 博志 (WATANABE, Hiroshi)
熊本大学・薬学部・准教授
研究者番号：70398220

異島 優 (ISHIMA, Yu)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部 (薬学系)・准教授
研究者番号：00457590