

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09224

研究課題名(和文) ナノ粒子化免疫調節剤の呼吸器疾患への治療応用の研究

研究課題名(英文) Study of nanoparticles-incorporating immune modulating oligodeoxynucleotide for the treatment of lung diseases

研究代表者

佐藤 隆 (SATO, Takashi)

横浜市立大学・医学部・講師

研究者番号：70510436

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、粒子化した合成核酸の経気道投与による呼吸器疾患制御の検証を行った。同所性移植による原発性肺癌モデルの検証では、Th1刺激性合成核酸の経気道投与により得られた治療後長期生存モデルにおける残存腫瘍結節の免疫組織学的解析で、CD3(-)Foxp3陽性細胞を多数認め、未治療群にみられるCD3(+) Foxp3陽性細胞との機能上の差異が示唆されたほか、未治療群にみられるPD-1陽性細胞の著明減少が確認され、長期間の抗腫瘍免疫効果が示唆された。実際に治療生存群では、腫瘍細胞の同所再移植後も無治療で100%の長期生存を達成した。これらの検証により、肺癌に対する局所免疫治療の意義を明らかとした。

研究成果の概要(英文)：We have developed inhalable particles-incorporating synthetic oligodeoxynucleotides (ODN) for treating lung diseases. To evaluate the efficacy against lung cancer, we developed a lethal model mimicking primary lung cancer by intratracheal instillation of Lewis lung carcinoma (LLC) cells in C57BL/6 mice, resulting in peribronchial tumor formation with an approximately 22-day median survival. Long-term survivors after treatment with intratracheal administration of particles-incorporating Th1 stimulating ODN were further re-challenged with LLC cells. Although mild-to-moderate alopecia was seen in about 30% of mice that survived for 1 year after previous particle-incorporating ODN treatment, other markers/symptoms of organ damage were not apparent. Histological analysis showed down-regulation of CD3(+)Foxp3(+) and PD-1(+) cells in lung residual tumors in re-challenged mice, leading 100% survival at 1 year by maintaining long-term tumor immunity, and thus preventing cancer recurrence.

研究分野：呼吸器病学

キーワード：ナノメディシン ドラッグデリバリー 肺癌 肺気腫 動物モデル

1. 研究開始当初の背景

本研究は、免疫調節性合成核酸による呼吸器疾患モデルへの治療応用の研究をベースとして、気道粘膜免疫機能の調節を目的とする吸入型合成核酸 (oligodeoxynucleotide: ODN) 治療薬の開発研究と、経気道投与が可能なナノドラッグデリバリーシステムの開発研究を融合させるべくして開始された。

本研究に先立って行った「免疫調節性合成核酸による呼吸器疾患モデルへの治療応用」の検証過程で、ODN による局所免疫機能の効果的賦活化をもたらす、肺局所へのデリバリーシステム構築の重要性が明らかとなった。この認識のもと、呼吸器疾患における革新的治療法の開発を念頭に、経気道投与が可能で、標的組織・細胞に効果的な薬物集積と薬物効果発現が可能なドラッグキャリアの開発という着想に至った。この着想のもと、研究代表者は2009年からODNの肺局所へのデリバリーを可能とするキャリアの開発をすすめ、経気道投与が可能な生分解特性を有するポリマー系ナノ粒子キャリアの開発に至った。

2. 研究の目的

本研究は、これまでの研究成果に基づき呼吸器疾患に対する次世代の革新的治療法の開発を目指して、ナノ粒子化免疫調節剤による疾患制御効果を明らかにすることを目的とする。本研究で用いる免疫調節性合成核酸 ODN 包埋ポリマー系ナノ粒子は、中分子量の各種 ODN の包埋が可能で、ナノ粒子の凍結乾燥を経て、吸入投与に適したマイクロサイズに調整可能である。さらに、pH 依存性生分解性を有し、酸性条件下にある炎症巣や腫瘍病巣で効果的に薬剤放出が可能となり、分解産物を含め非毒性などの特性を有する。本研究では、各種免疫調節機能を有する ODN 包埋粒子を用いて、各種呼吸器疾患モデルにおいて、疾患活動性に関わる標的細胞と ODN による作用機序を明らかにし、臨床応用を目指すことを目的とする。

3. 研究の方法

本研究は、1) 原発性肺癌モデルの治療後長期生存モデルの解析を行うとともに、2) 呼吸器炎症性疾患モデルの治療効果解析を行った。1)の原発性肺癌モデルを用いた研究は、治療後長期生存モデルにおける残存腫瘍の腫瘍微小環境の解析を中心に行うとともに、ナノマイクロ粒子化 ODN 投与後の長期安全性にかかる評価も行う。また、2)の炎症性呼吸器疾患モデルを用いた研究は、近年の臨床試験の主要評価項目が経年呼吸機能低下の抑制であることを念頭に、各種炎症性呼吸器疾患モデルに経気道投与ナノマイクロ ODN 粒子の効果を呼吸機能から検証し、疾患モデルとナノマイクロ ODN の最良の組み合わせを選定し、呼吸機能低下を抑制する機序の裏付けとなる組織学的・分子生物学的解析を行う。

4. 研究成果

1) 原発性肺癌モデルの治療後長期生存モデルの解析結果

本研究で用いた原発性肺癌モデルの概要を、図1に示す。

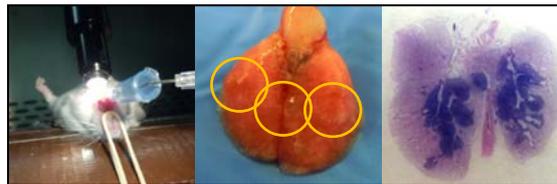


図 1.同所性移植による原発性肺癌モデル

このモデルは、Lewis lung carcinoma (LLC)細胞を経気道的に気管挿管下で同所性移植を行い作成する(図 1 左図)。このモデルでは、移植後 7~10 日で肺画像診断 (Computed Tomography) にて腫瘍結節の形成が確認される。移植後 3 週間、肺組織外観にて臓側胸膜下に結節状肥厚が確認されるまでに腫瘍結節の増大がみられる(図 1 中央)。移植後 3 週間での肺組織ルーペ像(図 1 右図)から、LLC 細胞は気道周囲に腫瘍結節を形成することが分かる。

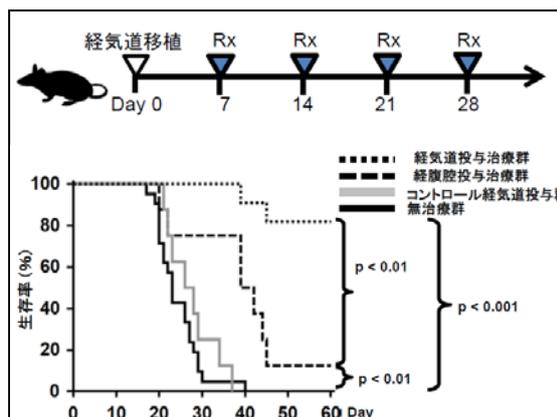


図 2.原発性肺癌モデルの治療スケジュールと生存曲線

この同所性移植モデルは、生存中央値が 22 日の致死性モデルだが、Th1 刺激作用を有する ODN を包埋したナノマイクロ粒子の反復経気道投与により、60 日後の生存率は 80% を超えるまでに改善する(図 2)。

今回使用したポリマー系ナノマイクロ粒子キャリアーは、中分子の包埋に適しており、中分子の ODN を包埋することで、通常は経気道投与で速やかに肺外に排除される ODN の肺内定着が向上し、間欠的投与を可能とした(米国特許取得 No.9,919,058)。今回原発性肺癌モデルに対して使用した粒子化 Th1 刺激性 ODN の経気道投与においても、比較的短時間に全身性の免疫応答が惹起されることを確認した(図 3 参照: 非粒子体 ODN (Free-ODN) の腹腔投与 (i.p.) を陽性コントロールとして、粒子体 ODN (Nano-ODN) を経気道投与 (i.t.) 後 36 時間で脾細胞を抽出し、ODN で再刺激した際の IFN-gamma の産生を

検証)。

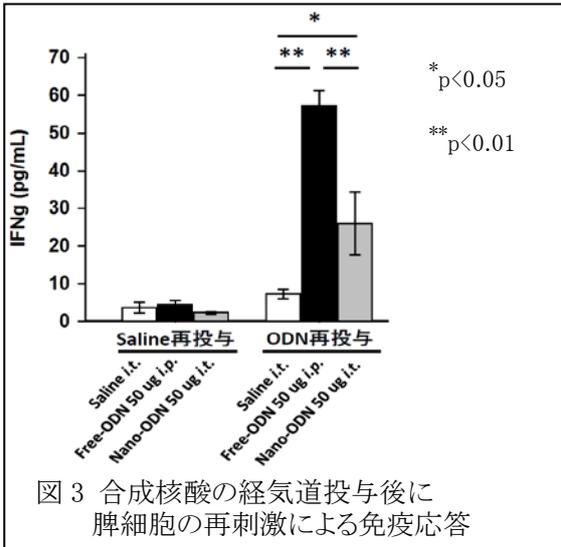


図3 合成核酸の経気道投与後に脾細胞の再刺激による免疫応答

この全身性免疫応答を惹起するメカニズムにより、経気道投与においても包埋化 Th1 刺激性 ODN は抗腫瘍免疫を長期間維持しうると考えられた。これらの治療後生存モデルに対して、さらに LLC 細胞の同所性再移植を行ったところ、前治療で合成核酸高容量粒子体投与群 (50 μ g/body) においては、再移植後も無治療で 1 年以上の長期生存が得られることが示された (図 4)。

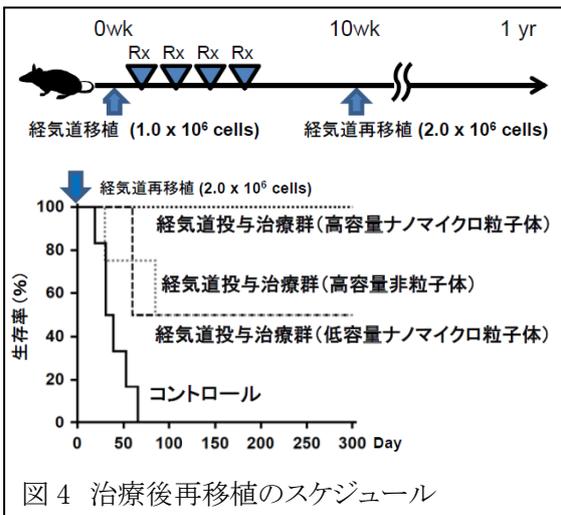


図4 治療後再移植のスケジュール

これらの治療後長期生存モデルでは平均 8.2 個/最大肺冠状断面の残存腫瘍結節を確認した (図 5)。この残存腫瘍結節の免疫組織学的解析で、CD3(-)Foxp3 陽性細胞を多数認め、未治療群にみられる CD3(+) Foxp3 陽性細胞との機能上の差異が示唆されたほか (図 6)、未治療群にみられる PD-1 陽性細胞の著明減少が確認され、長期間の抗腫瘍免疫効果が示唆された (図 7)。実際にナノマイクロ粒子キャリアー包埋 Th1 刺激性 ODN による治療生存群では、腫瘍細胞の同所再移植後も無治療で 100% の 1 年長期生存を達成した。これらの検証により、肺癌に対する局所免疫治療の意義を明

らかとした。

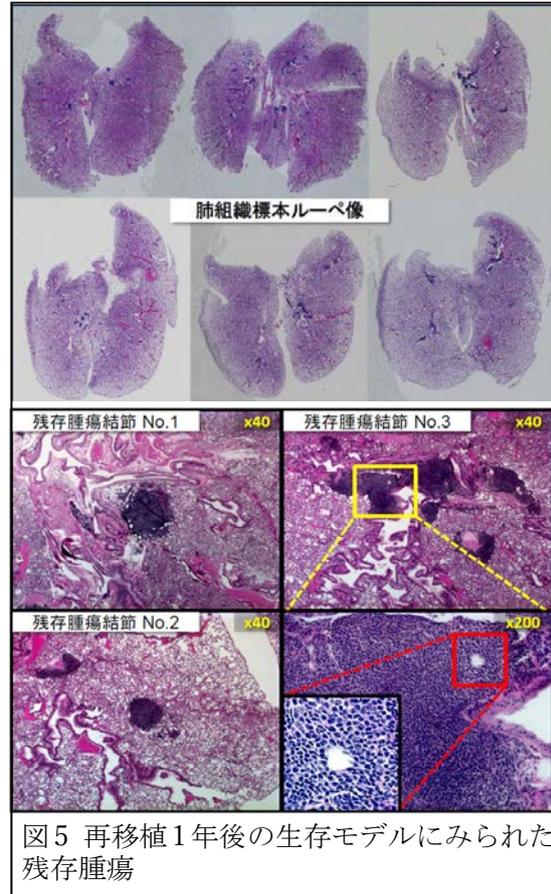


図5 再移植1年後の生存モデルにみられた残存腫瘍

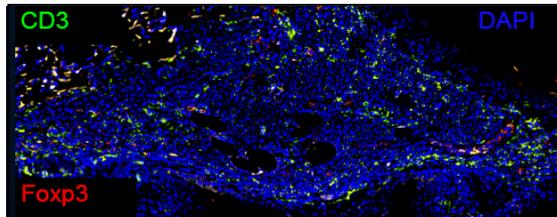


図6 再移植1年後の生存モデルの残存腫瘍結節にみられる Foxp3 陽性細胞

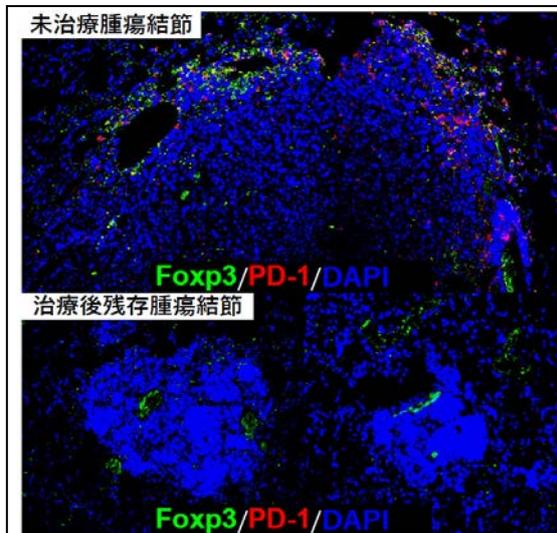


図7 未治療群と治療群における PD-1 陽性細胞数の変化

2) 呼吸器炎症性疾患モデルの検証

Th1/Th2 抑制性 ODN の経気道投与による治療効果解析過程で、創傷治癒に関与する Toll-like receptor (TLR) 9 の欠損マウスが肺気腫進展と関与する可能性が示唆されたが (図 8)、実際のヒト肺気腫組織の検証では健康肺組織との比較で有意な TLR9 の発現差は確認できなかった。

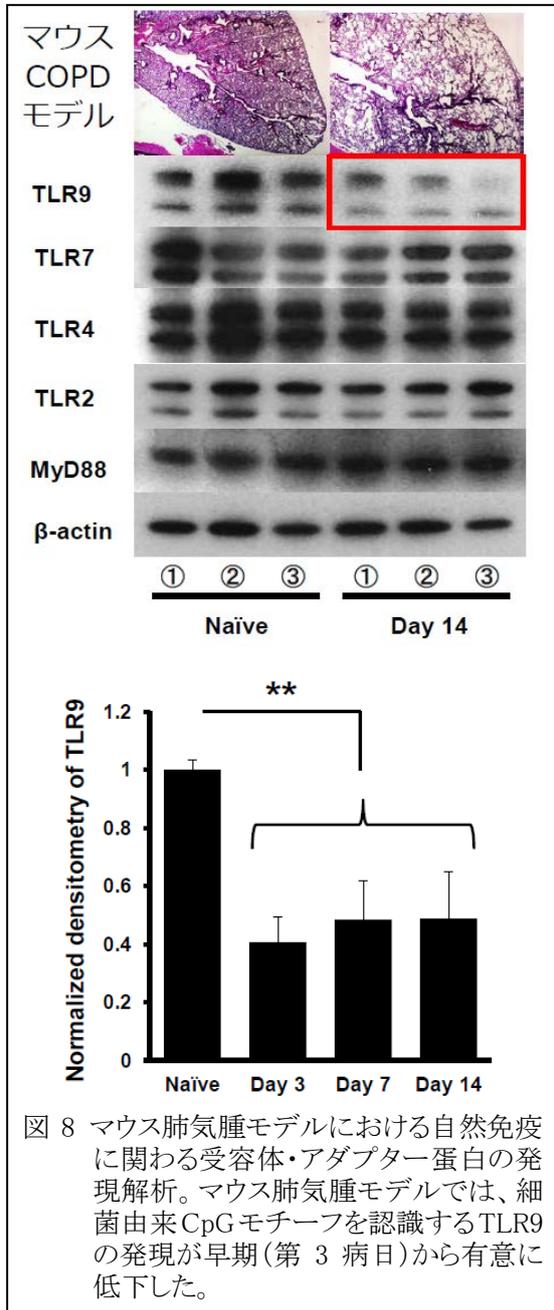


図 8 マウス肺気腫モデルにおける自然免疫に関わる受容体・アダプター蛋白の発現解析。マウス肺気腫モデルでは、細菌由来 CpG モチーフを認識する TLR9 の発現が早期 (第 3 病日) から有意に低下した。

しかしながら、TLR9 欠損マウスを用いた精密呼吸機能測定による検証では、TLR9 欠損肺気腫モデルマウス (豚腭エラスターゼ 1U の経気道投与により作成) は、野生型マウスと比較して、3 週間後の Elastance, Tissue elasticity, Tissue hysteresis, Static elastance 等の複数の呼吸機能パラメータの有意な低下が認められた。

TLR9 は皮膚をはじめとする創傷治癒に関与することが示されており (Sato T et al.

Accelerated wound healing mediated by activation of Toll-like receptor 9. *Wound Repair Regen.* 2010;18:586-593)、肺気腫モデルの進展に関与する可能性が生理学的検証において示された。そこで、TLR9 の低下を抑制する目的で、同じく肺気腫進展への関与が示唆されている NADPH オキシダーゼ活性を抑制する抑制性 ODN (iODN) の投与を検証したところ、肺気腫モデルで Day3 から認められる TLR9 の発現低下を有意に抑制することが示された (図 9)。

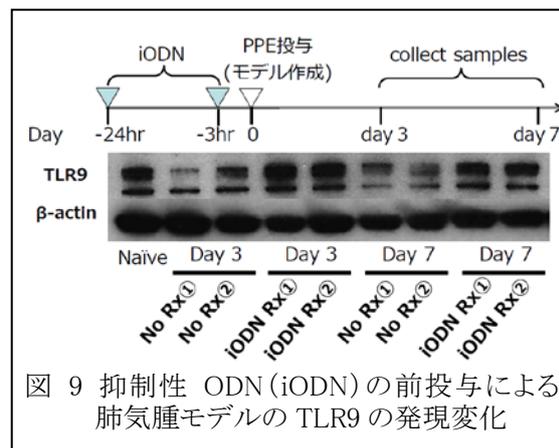


図 9 抑制性 ODN (iODN) の前投与による肺気腫モデルの TLR9 の発現変化

この結果に基づき、抑制性 ODN を用いた呼吸機能の改善を検証した結果、抑制性 ODN の前投与もでもるにおいて、Elastance, Tissue elasticity, Static elastance の改善が示された。さらに、豚腭エラスターゼの反復投与 (Day1 および Day14) による増悪モデルを作成し、増悪直前に抑制性 ODN を投与した場合の呼吸機能変化について検証を行い、増悪モデルにおいても Elastance, Tissue elasticity, Static elastance の有意な改善を確認した。現在、豚腭エラスターゼ投与によるモデル作成後に LPS にて増悪を惹起するモデル (Kobayashi et al. *Am J Res Cell Mol Biol* 2013;49:971) を用い、iODN 包埋粒子の経気道投与による COPD 増悪後の呼吸機能低下を抑制効果の検証を行っている。

以上の研究成果により、幅広い疾患に対する経気道治療の適応可能性に関して、国内外で興味関心を喚起し、平成 29 年度からは産官学共同研究体も立ち上げ、より大規模な汎用性の高い研究内容へと応用展開を開始するに至った (日本医療研究開発機構・創薬基盤推進事業・課題 17ak0101079h0001)。また、臨床応用を視野に、経気道治療用ナノマイクロ粒子キャリアの経気道投与に最適化した、圧電素子を用いた噴霧式経気道投与デバイスの開発研究も開始し (横浜市経済局・ライフイノベーションプラットフォーム事業)、次世代の経気道治療の確立に向けた基盤を構築した。

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 Klinman DM, Sato T, Shimosato T. Use of nanoparticles to deliver immunostimulatory oligonucleotides. Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology 2016;8:631. 査読有

② Sato T, Shimosato T, Ueda A, Ishigatsubo Y, Klinman DM. Intrapulmonary Delivery of CpG Microparticles Eliminate Lung Tumors. Molecular Cancer Therapeutics 2015;14:2198-2205. 査読有

③ Masuda M, Sato T, Sakamaki K, Kudo M, Kaneko T, Ishigatsubo Y. The effectiveness of sputum pH analysis in the prediction of response to therapy in patients with pulmonary tuberculosis. PeerJ 2015;3:e1448. 査読有

[学会発表](計 5 件)

① Sato T, Shimosato T, Klinman DM. Effect of Intratracheal Immunostimulatory-Oligonucleotides with Biodegradable Polyketal Nanoparticles on Murine Lung Cancer. American Thoracic Society Annual Meeting, Denver, CO, USA, May 17, 2015

② Sato T, Shimosato T, Klinman DM. Intratracheal delivery of immunostimulatory oligonucleotides using biodegradable polyketal nanoparticle: effect of murine lung cancer. 13th US-JAPAN Symposium on Drug Delivery System, Maui, HI, USA, Dec 18, 2015

③ Sato T, Shimosato T, Klinman DM. Intratracheal delivery of immuno- stimulatory oligonucleotides using biodegradable polyketal nanoparticles: effect on murine lung cancer. MD Anderson Cancer Center Young Investigator Workshop 2017, Houston, TX, USA, Feb 9, 2017

④ Sato T. Toll-like receptor 9, a key to attenuate disease progression in a murine model of COPD. American Thoracic Society Annual Meeting, Washington DC, USA, May 23, 2017.

⑤ Sato T, Shimosato T. Intratracheal delivery of immunostimulatory oligonucleotides using biodegradable polyketal nanoparticles: effect on long-term immune responses on murine lung cancer. 14th US-JAPAN Symposium on Drug Delivery Systems, Maui, HI, USA, Dec 16, 2017

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況(計 1 件)

名称: Polyketal particles including a CpG oligodeoxynucleotide for the treatment of lung cancer

発明者: Sato T and Klinman DM

権利者: National Institute of Health

種類: 特許

番号: PCT/US2015/039574

出願年月日: 2015年7月8日

国内外の別: 外国

○取得状況(計 1 件)

名称: Polyketal particles including a CpG oligodeoxynucleotide for the treatment of lung cancer

発明者: Sato T and Klinman DM

権利者: National Institute of Health

種類: 特許

番号: US PAT No. 9,919,058

取得年月日: 2018年3月20日

国内外の別: 外国

[その他]

ホームページ等

横浜市立大学呼吸器病学教室ホームページ

<http://ycu-dp.umin.jp/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

佐藤 隆(SATO Takashi)

横浜市立大学・医学部・講師

研究者番号: 70510436

(2)研究分担者

下里 剛士(SHIMOSATO Takeshi)

信州大学・学術研究院農学系・准教授

研究者番号: 00467200

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

Klinman Dennis