

令和元年6月13日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08542

研究課題名(和文) 複合免疫療法による悪性黒色腫の実臨床を可能とする高機能分子標的薬の創生

研究課題名(英文) Development of highly functional molecular target drug that enables clinical practice of malignant melanoma using combined immunotherapy

研究代表者

菅波 晃子 (SUGANAMI, Akiko)

千葉大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号：10527922

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、光免疫誘導機能・免疫アジュバント機能・免疫チェックポイント認識機能によってがんの免疫編集機構を制御することが可能な“Cancer Immunoediting Regulate (CIR) リポソーム”を構築した。担がんマウスを用いてCIRリポソームの抗原特異的認識による免疫抑制解除に関する機能制御を評価したところ、腫瘍体積変化に有意な抑制効果が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の学術的意義は、これまでに培ってきた「がん微小環境の制御」「がん幹細胞の制御」に関する知見を礎にして、現状の「がん免疫療法」が抱える問題点を解決すべく、がん免疫編集機構(Cancer Immunoediting)の制御(Regulate)を目的とした“Cancer Immunoediting Regulate リポソーム”を構築したところにある。また、社会的意義としては、実臨床を視野に入れたトランスレーショナルリサーチに関する研究展開として、獣医師主導型臨床試験における効果の検証とフィードバックにより、患者に優しい非侵襲性治療として「がん複合免疫療法」の創生を目指したところにある。

研究成果の概要(英文)：In this study, we constructed a liposome which can regulate cancer immunoediting mechanism, designated as CIR Liposomes, by having photoimmune induction function, immune adjuvant function and immune checkpoint recognition function. We evaluated the immunosuppressive functional control on antigen-specific recognition of CIR Liposomes using tumor-bearing mice, and found that tumor volume change was significantly suppressed.

研究分野：生命情報科学

キーワード：光免疫誘導 リポソーム 免疫抑制解除 ペプチド医薬

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

がん免疫療法においては、Burnet (1960 年頃) によって「がんの免疫監視機構: Immunological Surveillance」が提唱されて以来、免疫系によるがんの認識と排除に大きな期待が寄せられてきた。その後、Dunn (2000 年頃) によって「がん免疫編集機構: Cancer Immunoediting」の存在が示されるとともに、T 細胞性免疫の機能抑制に関わる「免疫チェックポイント阻害剤」や「遺伝子改変 T 細胞」の開発をうけて、がん免疫療法は、臨床試験において顕著な効果を示していた。

ところで、申請者らは、がん微小環境での免疫抑制機能を担うことで「悪性黒色腫」の重篤化に関与している IL-10 を分子標的とした「抗体医薬」である“IL-10 Immunoadhesin”を構築し、がん微小環境の制御による免疫賦活効果を検討するとともに、「悪性黒色腫」の細胞系譜決定因子である「MITF」を発現するがん幹細胞を制御する“MSCT リポソーム”を構築し、(1) 腫瘍集積機能: EPR 効果と「RNA 医薬」による悪性黒色腫幹細胞の特異的認識機能、(2) 細胞系譜断絶機能: 悪性黒色腫幹細胞の分化・増殖・転移制御機能、(3) 光応答機能: ICG の物理化学的特性 (近赤外光照射による発熱と一重項酸素発生) を利用した内包薬剤放出制御・温熱効果・免疫誘導を可能にする機能を検討していた。

そこで、これまでに培ってきた「がん微小環境の制御」「がん幹細胞の制御」に関する知見を礎にして、現状の「がん免疫療法」が抱える問題点を解決すべく、がん免疫編集機構 (Cancer Immunoediting) の制御 (Regulate) を目的とした“Cancer Immunoediting Regulate (CIR) リポソーム”が有する、①光免疫誘導機能: ICG による一重項酸素を介した腫瘍特異性 T 細胞の誘導 (獲得免疫)、②免疫アジュバント機能: 核酸アジュバントによる抗腫瘍免疫の誘導 (自然免疫)、③免疫チェックポイント認識機能: ペプチド医薬による抗原特異的認識 (免疫抑制解除) による機能を効果的に利用した患者に優しい非侵襲性治療としての「がん複合免疫療法」を創生し、実臨床を視野に入れた新規の非侵襲性治療法の確立を進展させることを目的とした。

(1) 悪性黒色腫の治療に関するそれまでの取り組み

「悪性黒色腫」は悪性度が非常に高く、早期に所属リンパ節へ転移した後、脳・肺・肝臓などの主要な臓器へと転移する。進行した「悪性黒色腫」に対しては、外科療法の外、抗がん剤による化学療法、リンパ球などを用いた免疫療法、放射線療法などの手段を組み合わせた集学的治療が行われている。申請者らは、「悪性黒色腫」の重篤化に関与している IL-10 を分子標的とした「抗体医薬」を創生し、免疫賦活効果を確認してきた (Cancer Immunother.(2009)58,1307. 特許第 44635255 号)。さらに、「悪性黒色腫」の細胞系譜決定因子である「MITF」を分子標的とした「ペプチド医薬」を創生し、物理化学的特性と薬理効果を評価するとともに(若手研究 (B)「悪性黒色腫幹細胞の機能制御を可能とするペプチド分子の構築」平成 21-23 年度)、悪性黒色腫幹細胞を特異的に認識し結合する“Melanoma Stem Cell Targeting (MSCT) リポソーム”を構築し、腫瘍集積機能・光応答機能・細胞系譜断絶機能を評価してきた(基盤研究 (C) (一般)「悪性黒色腫の寛解を目指した高機能分子標的薬の構築」平成 25-27 年度)。

(2) 薬物送達システムに関するそれまでの取り組み

がん化学療法では、静脈内投与した抗がん剤の血中濃度を治療有効域に維持することが困難な上、標的の腫瘍組織に対する細胞毒性効果が正常組織に波及して重篤な副作用を生じる場合が多い。これらの問題を克服するため、抗がん剤を効率良く標的部位に到達させる運搬体の開発が精力的に行われている。しかし、薬物の「血中での安定な保持・運搬」と「標的部位での特異的放出」という、相反する性質を兼ね備えなければならないジレンマが存在する。申請者らは、近赤外蛍光剤であるインドシアニングリーン (ICG) が有する光吸収特性 (810nm 付近の光を吸収) を利用した「ICG 修飾リポソーム」(特許第 6057710 号) を創生し、EPR 効果 (腫瘍組織の未成熟な血管から 300nm 以下の粒子が漏れ出る現象) 等により腫瘍組織特異的に集積することを見出してきた (Bioorg. Med. Chem. Lett.(2012) 22 7481, J Orthop Res.(2015) 33 1034, Anticancer Res.(2015) 35 1353, Int J Pharm.(2015) 15 30271)

(3) 光免疫誘導に関するそれまでの取り組み

ナノデバイスである医薬品と光デバイスである医療機器を融合した光免疫誘導による非侵襲性治療法の確立を目指した取り組みを行うにあたり、ナノデバイスとしての ICG 修飾リポソームを構築するとともに、光デバイスとしての LED 治療機器 (800~810 nm の近赤外光を発生する: 特許第 6347910 号) を開発し、ICG が有する光吸収特性を利用した「光免疫誘導療法」(特許第 5979385 号) を創生し、平成 25 年 9 月より、ペットの犬や猫 (コンパニオンアニマル) を対象とした獣医師主導型臨床試験による各種がん治療を実施している。

2. 研究の目的

申請者らは、皮膚がんにおいて悪性度が最も高い「悪性黒色腫」の非侵襲性治療による「寛解」を可能とする“リポソーム製剤”の構築に取り組んでいる。本研究では、光免疫誘導機能・免疫アジュバント機能・免疫チェックポイント認識機能を有することで、がんの免疫編集機構 (Cancer Immunoediting) を制御 (Regulate) することが可能な“Cancer Immunoediting

Regulate (CIR) リポソーム”によって、獲得免疫・自然免疫・免疫抑制解除を誘導する「がん複合免疫療法」を創生し、実臨床を視野に入れた新規治療薬へ発展させることを目的とする。すなわち、“がん免疫療法の作用機序の本質は、がん細胞に対する直接的な殺傷効果ではなく、免疫応答の惹起・増強によるがんの制御を目指すものであり、従来の化学療法や分子標的薬とは大きく異なっている。”との観点から、光免疫誘導・免疫アジュバント機能・免疫チェックポイント認識機能を組み合わせた「がん複合免疫療法」を創生し、トランスレーショナルリサーチの更なる展開を目指した研究を行い、前臨床試験への礎を確立することを目指す。具体的には、がん複合免疫療法を創生するために、がんによる免疫編集機構 (Cancer Immunoediting) の制御 (Regulate) を可能とする“CIR リポソーム”を構築し、その物理化学的・生化学的機能を評価する。さらに、“CIR リポソーム”に付与した3つの機能 (光免疫誘導機能・免疫アジュバント機能・免疫チェックポイント認識機能) によって、獲得免疫・自然免疫・免疫抑制解除を誘導する「がん複合免疫療法」が、「悪性黒色腫」における免疫応答誘導性細胞死による「寛解」の可能性を有することを明らかにする。

3. 研究の方法

“CIR リポソーム”が有する3つの免疫機能 (光免疫誘導機能・免疫アジュバント機能・免疫チェックポイント認識機能) のうち光免疫誘導機能に関しては、他の研究費の支援等によって関連特許を取得 (特許第 6347910 号, 特許第 5979385 号) するとともに、コンパニオンアニマルを対象とした獣医師主導型臨床試験を実施してきたが、「悪性黒色腫」の治療においては芳しい結果が得られていない。

そこで、免疫アジュバント機能・免疫チェックポイント認識機能に関する機能を付与することにより、所期の目的である「悪性黒色腫」の「寛解」の実現に向けた、「がん複合免疫療法」の創生に関する基礎研究を遂行すると共に、獣医師主導型臨床試験における効果の検証とフィードバックによる改善を図ることで、実臨床を視野に入れたトランスレーショナルリサーチに関する応用研究を展開する。

(1) “Cancer Immunoediting Regulate (CIR) リポソーム”の構築

“CIR リポソーム”は、薬剤運搬体として開発したリポソームに次の3つの機能を付与することによって、がん微小環境での免疫抑制機構の調整を可能とする。

- ・光免疫誘導機能：ICG 誘導体による一重項酸素を介した腫瘍特異性 T 細胞の誘導 (獲得免疫)
- ・免疫アジュバント機能：核酸アジュバントによる抗腫瘍免疫誘導 (自然免疫)
- ・免疫チェックポイント認識機能：ペプチド医薬による抗原特異的認識 (免疫抑制解除)

(2) “CIR リポソーム”の機能評価

- ・ナノ粒子解析装置を用いて“CIR リポソーム”の物理化学的物性を検討する。
- ・「悪性黒色腫」培養細胞を用いて“CIR リポソーム”の生化学的機能を検討する。
- ・小動物 (担がんマウス等) を用いて“CIR リポソーム”の薬理効果を検討する。
- ・コンパニオンアニマルを対象とした獣医師主導型臨床試験により“CIR リポソーム”の「悪性黒色腫」治療効果の検証とフィードバックによる改善を図る。

4. 研究成果

(1) 「抗 PD-L1 ペプチド医薬」の分子設計

腫瘍反応性 T 細胞の表面マーカーである PD-1 を特異的に認識・結合することによって、がん免疫編集機構を成立させていることが報告されている、がん細胞の表面マーカーである PD-L1 を特異的に認識し結合する「抗 PD-L1 ペプチド医薬」を、以下の順に分子設計した。

- ・抗 PD-L1 ペプチド医薬の基本構造：ICG-Linker-Peptide-MiniPEG-Cholesterol
- ①PD-1/PD-L1 複合体の立体構造 (PDB：3BIK) に基づき複合体形成領域を選択した。
- ②物理化学的機能に基づき至適ペプチド配列を設定した。
- ③リポソーム親和性を付与するため、ペプチドと Cholesterol を結合させる化学修飾法を考案した。
- ④ペプチドの水溶性を確保するため、MiniPEG をペプチドと Cholesterol の間に挿入する方法を考案した。
- ⑤ICG の可動性を確保するため、Linker として CGGG をペプチドと ICG の間に挿入する方法を考案した。

(2) 「抗 PD-L1 ペプチド医薬」の化学合成

上記の分子設計に基づき、6 種類 (ペプチド部分の配列が異なる) の「抗 PD-L1 ペプチド医薬」を化学合成した。

(3) 「核酸アジュバント」の調整

CpG ODN と cGAMP は、既存の情報 (Nat Rev Immunol.(2004)4,249) に従って調整した。

(4) 「抗 PD-L1 ペプチド医薬」の物理化学的機能評価

上記の分子設計に基づき化学合成した 6 種類の「抗 PD-L1 ペプチド医薬」に関して、PD-L1 に対する生体分子間相互作用を BIACORE T-100 (GE 社製) によって測定し、結合特異性・相互作用速度・結合力等の物理化学的特性を評価した。

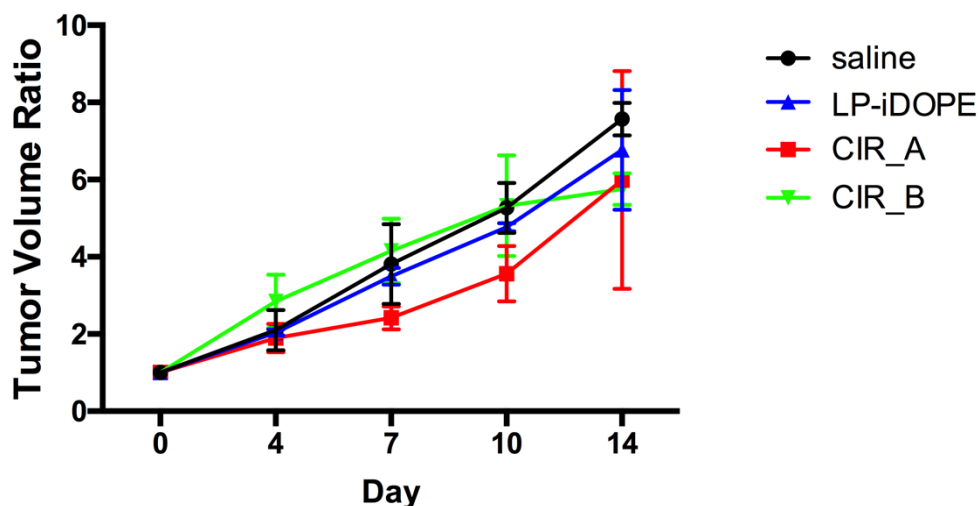
(5) “CIR リポソーム” の構築

上記の物理化学的機能評価によって PD-L1 に対する生体分子間相互作用が有望とみなされた「抗 PD-L1 ペプチド医薬」(2 種類) と「ICG 誘導体」をリポソーム膜に組み込むと共に、「核酸アジュバント」である CpG ODN と cGAMP を内包することにより、“CIR リポソーム”として、CIR_A と CIR_B を構築した。

(6) “CIR リポソーム” の *in vivo* 機能評価

上記により構築した 2 種類の“CIR リポソーム”(CIR_A と CIR_B) に関する光免疫誘導機能、免疫アジュバント機能、免疫チェックポイント認識機能を、以下の順に評価した。

- ①「悪性黒色腫」担がんマウスに“CIR リポソーム”を尾静脈投与し、腫瘍組織への特異的集積を「ICG 誘導体」が有する「近赤外蛍光特性」により確認した。
- ②「ICG 誘導体」が有する「光吸収特性」による光免疫誘導(一重項酸素発生による腫瘍反応性 T 細胞の誘導)を FACS 解析により評価した。
- ③「抗 PD-L1 ペプチド医薬」の抗原特異的認識による免疫抑制解除に関する機能制御を腫瘍体積変化により評価したところ(下図)、以下の結果が得られた。



上記の結果より、以下の

- ・ CIR_A においては、4 日目から免疫抑制解除に関する機能制御効果が顕在化した。
- ・ CIR_B においては、10 日目から免疫抑制解除に関する機能制御効果が顕在化した。

今後、生存期間、FACS 解析、次世代シーケンス解析(RNA-seq)、実験病理学的解析により評価を行う。

(7) “CIR リポソーム” のトランスレーショナルリサーチ

平成 25 年 9 月から実施している鳥取大学動物医療センターにおける獣医師主導型臨床試験による“CIR リポソーム”の「悪性黒色腫」に関する治療効果は検討するに至らなかった。

今後、上記の *in vivo* 機能評価を終えた後、実臨床に向けた課題等を明確にするために、治療効果の検討を実施する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 11 件)

- ① “Photo-immune therapy with liposomally formulated phospholipid-conjugated indocyanine green induces specific antitumor responses with heat shock protein-70 expression in a glioblastoma model.” Shibata S, Shinozaki N, Suganami A, Ikegami S, Kinoshita Y, Hasegawa R, Kentaro H, Okamoto Y, Aoki I, Tamura Y, Iwadate Y. *Oncotarget*. 査読有 2019 Jan 4;10(2):175-183. doi: 10.18632/oncotarget.26544.
- ② “Deletion of Eqtn in mice reduces male fertility and sperm-egg adhesion” Ito C, Yamatoya K, Yoshida K, Fujimura L, Sugiyama H, Suganami A, Tamura Y, Hatano M, Miyado K, Toshimori K. *Reproduction*. 査読有 2018 Oct 1. pii: REP-18-0394. doi: 10.1530/REP-18-0394.
- ③ “GLI1 Inhibitors Identified by Target Protein Oriented Natural Products Isolation (TPO-NAPI) with Hedgehog Inhibition.” Arai MA, Ochi F, Makita Y, Chiba T, Higashi K, Suganami A, Tamura Y, Toida T, Iwama A, Sadhu SK, Ahmed F, Ishibashi M. *ACS Chem Biol*. 査読有 2018 Sep 21;13(9):2551-2559. doi: 10.1021/acscchembio.8b00492.
- ④ “Inhibitory effect of Japanese rice-koji miso extracts on hepatitis A virus replication in association with the elevation of glucose-regulated protein 78 expression.” Win NN, Kanda T, Nakamoto S, Moriyama M, Jiang X, Suganami A, Tamura Y, Okamoto H, Shirasawa H. *Int J Med Sci*. 査読有 2018 Jul 30;15(11):1153-1159. doi: 10.7150/ijms.27489.
- ⑤ “Synthesis and Evaluation of Fuligocandin B Derivatives with Activity for Overcoming TRAIL Resistance.” Arai MA, Masuda A, Suganami A, Tamura Y, Ishibashi M. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 査読有 2018;66(8):810-817. doi: 10.1248/cpb.c18-00308.
- ⑥ “PGE1 and E3 show lower efficacies than E2 to β -catenin-mediated activity as biased ligands of EP4 prostanoid receptors.” Araki Y, Suganami A, Endo S, Masuda Y, Fukushima K, Regan JW, Murayama T, Tamura Y, Fujino H. *FEBS Lett*. 査読有 2017 Nov;591(22):3771-3780. doi: 10.1002/1873-3468.12878.
- ⑦ “Low-dose hyperthermia enhances the antitumor effects of chemotherapy in squamous cell carcinoma.” Hu X, Akutsu Y, Suganami A, Qin W, Hanari N, Murakam K, Kano M, Usui A, Suito H, Takahashi M, Matsumoto Y, Otsuta R, Tamura Y, Matsubara H. *Dis Esophagus*. 査読有 2017 Jul 1;30(7):1-7. doi: 10.1093/dote/dow026.
- ⑧ “Anti-cancer Effects of MW-03, a Novel Indole Compound, by Inducing 15-Hydroxyprostaglandin Dehydrogenase and Cellular Growth Inhibition in the LS174T Human Colon Cancer Cell Line.” Seira N, Yanagisawa N, Suganami A, Honda T, Wasai M, Regan JW, Fukushima K, Yamaguchi N, Tamura Y, Arai T, Murayama T, Fujino H. *Biol Pharm Bull*. 査読有 2017;40(10):1806-1812. doi: 10.1248/bpb.b17-00458.
- ⑨ “The Pluripotent Stem-Cell Marker Alkaline Phosphatase is Highly Expressed in Refractory Glioblastoma with DNA Hypomethylation.” Iwadate Y, Suganami A, Tamura Y, Matsutani T, Hirono S, Shinozaki N, Hiwasa T, Takiguchi M, Saeki N. *Neurosurgery*. 査読有 2017 Feb 1;80(2):248-256. doi: 10.1093/neuros/nyw026.
- ⑩ “Human DP and EP2 prostanoid receptors take on distinct forms depending on the diverse binding of different ligands.” Suganami A, Fujino H, Okura I, Yanagisawa N, Sugiyama H, Regan JW, Tamura Y, Murayama T. *FEBS J*. 査読有 2016 Nov;283(21):3931-3940. doi: 10.1111/febs.13899.
- ⑪ “Effects of novel small compounds targeting TrkB on neuronal cell survival and depression-like behavior.” Fukuda M, Takatori A, Nakamura Y, Suganami A, Hoshino T, Tamura Y, Nakagawara A. *Neurochem Int*. 査読有 2016 Jul;97:42-8. doi: 10.1016/j.neuint.2016.04.017.

〔学会発表〕 (計 7 件)

- ① 岡本芳晴、田村 裕、菅波晃子、山下真路、東 和生、大崎智弘、村端悠介、柄 武士、伊藤典彦、今川智敬「インドシアニングリーン修飾リボソームと光を用いた新しいがん治療」第 56 回日本癌治療学会学術集会 2018 年
- ② 林奈留美、荒井緑、菅波晃子、田村裕、石橋正己「NICD ビーズを用いた Notch シグナル阻害剤の探索」第 22 回天然薬物の開発と応用シンポジウム 2018 年
- ③ 三瓶真菜、荒井 緑、菅波晃子、田村 裕、石橋正己「リグナン骨格を有する神経幹細胞分化促進剤の創成研究」日本薬学会第 138 年会 2018 年
- ④ Suganami A, Yamashita M, Azuma K, Okamoto Y, Tamura Y 「Combination therapy of anti-cancer drugs with photo-induced immunotherapy」 第 76 回日本癌学会学術総会 2017 年
- ⑤ Takano K, Kanno E, Suganami A, Tamara Y, Endo T. 「Molecular mechanism of DA-Raf-mediated Ras-ERK cascade inhibition」 第 68 回日本細胞生物学会大会 2017 年
- ⑥ Fujino H, Suganami A, Okura I, Yanagisawa N, Sugiyama H, Regan, J. W., Mizuguchi H, Tamura Y, Murayama T. 「Human DP and EP2 prostanoid receptors take on distinct forms depending on

the diverse binding of different ligands」第90回日本薬理学会年会 2017年

- ⑦ Suganami A, P. K. R. Kumar, Shinoda K, Suzuki A, Saito K, Okamoto Y, Motohashi S, Nakayama T, Shirakawa H, Tamura Y. 「Construction of the multifunctional nanoparticle for malignant melanoma」第75回日本癌学会学術総会 2016年

〔産業財産権〕

○取得状況 (計2件)

名称：近赤外線波長特性を利用した非侵襲性医療装置

発明者：岡本 芳晴、田村 裕、菅波 晃子、豊田 太郎、林 秀樹、真殿 智行、松原 久裕

権利者：同上

種類：特許

番号：第6347910号

取得年：2018年

国内外の別：国内

名称：リポソーム複合体

発明者：岡本 芳晴、田村 裕、菅波 晃子、林 秀樹、真殿 智行、松原 久裕、豊田 太郎

権利者：同上

種類：特許

番号：第5979385号

取得年：2016年

国内外の別：国内・国外

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.m.chiba-u.ac.jp/class/bioinfor/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：白澤 浩

ローマ字氏名：SHIRASAWA Hiroshi

所属研究機関名：千葉大学

部局名：大学院医学研究院

職名：教授

研究者番号 (8桁)：00216194

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：P. K. R. Kumar

ローマ字氏名：P. K. R. Kumar

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。