

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19888

研究課題名（和文）腫瘍微小環境のナノDDS関連免疫ステータス解析に基づいたナノがん免疫療法の開発

研究課題名（英文）Development of nano cancer immunotherapy based on immune status in tumor

研究代表者

中村 孝司（Nakamura, Takashi）

北海道大学・薬学研究院・助教

研究者番号：20604458

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、種々のマウス腫瘍モデルを用いて腫瘍内のがん免疫関連の遺伝子発現解析を行い、独自のアルゴリズムにより抗腫瘍活性を示す免疫ステータスを規定することに成功した。また、規定した免疫ステータスは、ナノDDSであるアジュバント搭載脂質ナノ粒子が誘導する抗腫瘍活性の評価にも有用であることを見出した。また、腫瘍微小環境の免疫ステータス解析に基づいて治療戦略を立案し、現行のがん免疫療法抵抗性の難治性がんに対する抗腫瘍活性を誘導することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現時点では、腫瘍微小環境の免疫状態を把握するための簡便な方法はなく、次世代シーケンシングによる網羅的な遺伝子発現解析が行われている。手間やコストの面から臨床での使用は困難であるが、少数の遺伝子発現を調べるだけで抗腫瘍活性を規定することができる可能性を示した本研究成果はコストや簡便性の面からがん免疫療法の発展に貢献できる。また、がん免疫療法を増強するためのナノDDS開発や複合がん免疫療法開発のためのツールとしても有用であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we analyzed the mRNA level of cancer immunity-related genes in tumors of various mouse models, and identified the immune status reflecting antitumor activity by using our algorithm. We also found that the defined immune status can be useful for evaluating the antitumor activity induced by an adjuvant-loaded lipid nanoparticle (nano-DDS). Furthermore, we designed a new strategy based on the analysis of tumor, and succeeded in inducing antitumor effect against a refractory tumor having a resistance to the current cancer immunotherapy.

研究分野：薬物送達学

キーワード：薬物送達学 ナノ粒子 がん免疫療法 腫瘍関連微小環境

## 1. 研究開始当初の背景

免疫システムによるがん細胞の排除は「がん免疫サイクル」(引用文献①)と呼ばれる腫瘍微小環境(所属リンパ節を含む)で起こる一連のメカニズムによって行われ、このサイクルを正常に回すことががん免疫療法成功の鍵となる。しかしながら、“がんが顕在化した”がん患者では、がん免疫サイクルが阻害されている。それ故、患者のがん免疫サイクルの状態を示す腫瘍微小環境の免疫ステータスは、がん免疫療法の治療方針を決定する上で非常に重要な情報である。免疫ステータスは、がん免疫サイクルに関連する分子の発現や免疫細胞の浸潤度などで表される。最近では、「がんイムノグラム」(引用文献②)や「がん免疫フェノタイプ」(引用文献③)といった腫瘍微小環境の免疫ステータスに関する概念が提唱されており、これらの情報に基づいた治療戦略の立案が重要であると考えられている。新しい概念であるため、それぞれの治療法特有の免疫ステータスパラメータや変動については全く知見がない状態であるが、治療法特有のパラメータや変動こそが今後のがん免疫療法開発の鍵であることは間違いない。

申請者はナノテクノロジーを駆使したドラッグデリバリーシステム(ナノ DDS)を基盤としたがん免疫療法、すなわち「ナノがん免疫療法」を提唱し開発を進めている。ナノ DDS は、単体での薬効発揮が困難なアジュバント成分、ペプチド、核酸などを用いたがん免疫療法に不可欠であり、分解の回避、送達効率の改善、標的化などの多くの恩恵を与える。しかしながら、現在のがん免疫療法に使用されるナノ DDS の開発は、搭載する物質の送達効率の改善や薬効増強などを目的とし、抗原提示細胞やリンパ節などへの送達や抗腫瘍活性を評価するといった尋常一様な戦略のもとで行われている。

## 2. 研究の目的

先述のがん免疫療法開発の流れを踏まえ、申請者は腫瘍微小環境の免疫ステータスに基づいたナノ DDS 設計がナノがん免疫療法の実現に重要であり、特にナノ DDS 特有の免疫ステータスパラメータや変化を見出すことが必要であるという着想を得た。なぜなら、ナノ DDS の最たる特徴が搭載物質の体内動態/細胞内動態の制御であり、この性質は免疫チェックポイント阻害剤などの現行のがん免疫療法にはない。本申請研究では、独自のアジュバント搭載ナノ DDS を用いて、① ナノ DDS の体内動態/細胞内動態に関連する特有の免疫ステータスパラメータや変動を明らかにし、腫瘍微小環境の免疫ステータスに応じた最適なナノ DDS 設計戦略を立案、② 現行のがん免疫療法抵抗性の難治性がんを克服するための新規ナノがん免疫療法の開発を目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) 腫瘍関連微小環境におけるナノ DDS 関連免疫ステータスの解析

#### ① マウス腫瘍関連微小環境の免疫ステータス解析とフェノタイプ分類

結腸がん MC38 細胞、リンパ腫 E. G7-OVA 細胞、メラノーマ B16-F10 細胞、乳がん 4T1 細胞を皮下移植したマウスから腫瘍組織を回収し、がん免疫応答に関連する遺伝子の発現を RT-qPCR により定量した。また、各担がんマウスに対して免疫チェックポイント阻害剤である programmed cell death-1 (PD-1) 抗体を腹腔内投与し(200  $\mu$ g/mouse、計 3 回)、抗腫瘍活性の評価および腫瘍組織の遺伝子発現を RT-qPCR により定量した。

#### ② 腫瘍微小環境のナノ DDS 関連免疫ステータスパラメータ・変動の同定

アジュバント搭載ナノ DDS として、細胞内の DNA/環状ジヌクレオチドの自然免疫センサーである stimulator of interferon genes (STING) 経路のアゴニスト (STING アゴニスト) を搭載した脂質ナノ粒子 (lipid nanoparticle: LNP) (STING-LNP) を用いた(引用文献④)。STING-LNP はアルコール希釈法により調製した。E. G7-OVA 細胞を皮下移植したマウスに STING-LNP を皮下投与し、抗腫瘍活性の評価および腫瘍組織の遺伝子発現を RT-qPCR により定量した。

### (2) がん免疫療法抵抗性の難治性がんに対する新規ナノがん免疫療法の開発

4T1 細胞を皮下移植したマウスを難治性がんモデルとして用いた。STING-LNP を皮下投与し、抗腫瘍活性の評価および腫瘍組織の遺伝子発現を RT-qPCR により定量した。

## 4. 研究成果

### (1) 腫瘍関連微小環境におけるナノ DDS 関連免疫ステータスの解析

#### ① マウス腫瘍関連微小環境の免疫ステータス解析とフェノタイプ分類

MC38 細胞、E. G7-OVA 細胞、B16-F10 細胞、4T1 細胞を皮下移植したマウスを作製し、一定期間後に回収した腫瘍組織のがん免疫応答に関連する遺伝子(22 種類)の発現を RT-qPCR により定量した。内因性コントロール遺伝子の発現量で補正した各遺伝子発現量を比較した結果、MC38 腫瘍と E. G7-OVA 腫瘍では、T 細胞などの免疫細胞の浸潤や炎症反応が起こっていることが示唆されたことから、免疫細胞浸潤型と分類した。B16-F10 腫瘍では、免疫細胞の浸潤や炎症反応がほとんど起こっていないことが示唆されたため、免疫不応答型と分類した。また、4T1 腫瘍では、免疫応答を抑制する因子の発現が多く認められたことから、がん免疫抑制が強く起こっている

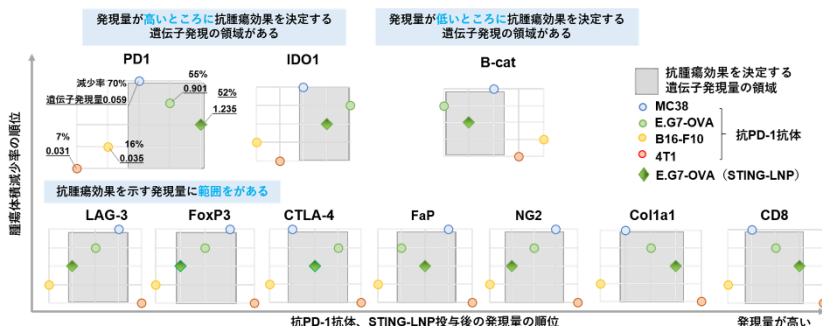
免疫抑制型に分類した。これらの結果より、腫瘍内の免疫ステータスに基づき、腫瘍を大別することに成功した。

続いて、ナノがん免疫療法開発に重要な指標となる抗腫瘍活性を示す腫瘍内免疫ステータスの探索を行った。PD-1 抗体が有効な腫瘍と無効な腫瘍の免疫ステータスを比較することで抗腫瘍活性を示す腫瘍内免疫ステータスを抽出することとした。MC38 細胞、E. G7-OVA 細胞、B16-F10 細胞、4T1 細胞を皮下移植したマウスに対し、PD-1 抗体を投与した後、抗腫瘍活性および腫瘍組織の遺伝子発現を評価した。その結果、MC38 腫瘍と E. G7-OVA 腫瘍では PD-1 抗体投与による有意な抗腫瘍活性が認められたが、B16-F10 腫瘍と 4T1 腫瘍では PD-1 投与は抗腫瘍活性を誘導することができなかった。この結果より、MC38 腫瘍と E. G7-OVA 腫瘍を PD-1 抗体が有効な腫瘍、すなわち抗腫瘍活性を示す腫瘍内免疫ステータスを持つ腫瘍とした。一方、B16-F10 腫瘍と 4T1 腫瘍を PD-1 抗体が無効な腫瘍、すなわち抗腫瘍活性を示さない腫瘍内免疫ステータスを持つ腫瘍とした。PD-1 抗体

を投与した各マウスの腫瘍組織の遺伝子発現解析を行い、発現量と抗腫瘍活性を順位づけし、遺伝子ごとにプロットした。独自のアルゴリズムに基づき、抗腫瘍活性を示す遺伝子群を探索した結果、驚くべきことに抗腫瘍活性を示す免疫ステータスは 10 個の遺伝子発現で規定できることが

明らかになった (図 1、論文執筆中)。また、ヒトのがんのデータベースを用いた解析を行った結果、見出した遺伝子はヒトのがんにおいても予後と関連性があることが明らかになった。これらの成果は、がん免疫療法による治療を進めていく際の指標の確立に大きく貢献する重要な知見である。

図1 腫瘍内免疫ステータス解析



## ② 腫瘍微小環境のナノ DDS 関連免疫ステータスパラメータ・変動の同定

続いて、10 個の遺伝子パラメータがナノ DDS を用いたがん免疫療法の抗腫瘍活性を規定できるかを調べた。E. G7-OVA 細胞を皮下移植したマウスに STING-LNP を皮下投与し、抗腫瘍活性および腫瘍組織の遺伝子発現を評価した。その結果、STING-LNP の投与は E. G7-OVA 腫瘍に対する有意な抗腫瘍活性を誘導した。次に、回収した腫瘍組織の遺伝子発現データが見出した 10 個の遺伝子パラメータで規定される範囲 (図 1) に合致するかを検証した。その結果、STING-LNP 投与により縮小した腫瘍における 10 個の遺伝子の発現は全て抗腫瘍活性を規定する範囲に収まっていた (図 1)。このことから、見出した 10 個の遺伝子パラメータはナノ DDS を用いたがん免疫療法の抗腫瘍活性を規定できる指標として有用であることが示唆された (論文執筆中)。

## (2) がん免疫療法抵抗性の難治性がんに対する新規ナノがん免疫療法の開発

4T1 腫瘍は PD-1 抗体療法が無効であったことから、がん免疫療法抵抗性の難治性がんのモデルとして用いた。まず、4T1 細胞を皮下移植したマウスに STING-LNP を皮下投与し、抗腫瘍活性および腫瘍組織の遺伝子発現を評価した。その結果、STING-LNP 投与は 4T1 腫瘍に対する抗腫瘍活性を全く誘導することができなかった。見出した 10 個の遺伝子パラメータで規定される範囲に基づき、STING-LNP 投与後の 4T1 腫瘍における遺伝子発現を検証した結果、抗腫瘍活性を規定する範囲から外れている遺伝子を標的とした治療法を組み合わせる戦略を立案することに成功した。併用療法を行った結果、4T1 腫瘍に対する顕著な抗腫瘍活性が認められた。この成果は、見出した 10 個の遺伝子パラメータが治療戦略の立案に有用であり、既存のがん免疫療法に抵抗性を示す難治性がんに対する有効なナノがん免疫療法の開発に貢献できる。

## <引用文献>

- ① Chen DS, et al., Immunity 39: 1-10 (2013)
- ② Blank CU, et al., Science 352: 658-660 (2016)
- ③ Chen DS, et al., Nature 541: 321-330 (2017)
- ④ Nakamura T, et al., J Control Release 216: 149-157 (2016)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yamada Yuma, Sato Yusuke, Nakamura Takashi, Harashima Hideyoshi	4. 巻 327
2. 論文標題 Evolution of drug delivery system from viewpoint of controlled intracellular trafficking and selective tissue targeting toward future nanomedicine	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Controlled Release	6. 最初と最後の頁 533 ~ 545
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jconrel.2020.09.007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sato Yusuke, Nakamura Takashi, Yamada Yuma, Harashima Hideyoshi	4. 巻 330
2. 論文標題 The nanomedicine rush: New strategies for unmet medical needs based on innovative nano DDS	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Controlled Release	6. 最初と最後の頁 305 ~ 316
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jconrel.2020.12.032	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakamura Takashi, Yamada Yuma, Sato Yusuke, Khalil A Ikramy, Harashima Hideyoshi	4. 巻 218
2. 論文標題 Innovative nanotechnologies for enhancing nucleic acids/gene therapy: Controlling intracellular trafficking to targeted biodistribution	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biomaterials	6. 最初と最後の頁 119329
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.biomaterials.2019.119329	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 3件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 中村孝司
2. 発表標題 脂質をベースとしたナノDDS（リポソーム、脂質ナノ粒子）の設計と評価方法
3. 学会等名 情報機構webセミナー（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中村孝司
2. 発表標題 ナノDDSを利用したがん免疫制御システムの開発
3. 学会等名 DDS (ドラッグデリバリーシステム) / 製剤技術ウェビナー (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中村孝司
2. 発表標題 ナノDDS技術を利用したがん免疫療法の開発
3. 学会等名 第35回 日本DDS学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Saro Takanori, Nakamura Takashi, Takahashi Nomichi, Sato Yusuke, Hyodo Mamoru, Hayakawa Yoshihiro, Harashima Hideyoshi
2. 発表標題 Improvement of PD-1 antibody resistance of melanoma lung metastasis by STING agonist loaded lipid nanoparticles
3. 学会等名 Liposome Research Days 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤孝紀、中村孝司、高橋直道、佐藤悠介、兵藤守、早川芳宏、原島秀吉
2. 発表標題 STINGアゴニスト搭載脂質ナノ粒子によるメラノーマ肺転移の抗PD-1抗体抵抗性の改善
3. 学会等名 第23回日本がん免疫学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村孝司、佐藤孝紀、高橋直道、佐藤悠介、兵藤守、早川芳宏、原島秀吉
2. 発表標題 STINGアゴニスト搭載脂質ナノ粒子を用いた抗PD-1抗体抵抗性メラノーマ肺転移に対するがん免疫療法
3. 学会等名 第35回 日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川上今日子、中村孝司、佐藤悠介、兵藤守、畠山浩人、早川芳宏、原島秀吉
2. 発表標題 ナノDDSを基盤としたがん免疫療法における腫瘍内免疫状態解析の有用性検証
3. 学会等名 日本薬学会北海道支部第146回例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤孝紀、中村孝司、高橋直道、佐藤悠介、兵藤守、早川芳宏、原島秀吉
2. 発表標題 STINGアゴニスト搭載脂質ナノ粒子の併用によるメラノーマ肺転移の抗PD-1抗体抵抗性の改善
3. 学会等名 日本薬学会北海道支部第146回例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 1. 川上今日子、中村孝司、佐藤悠介、兵藤守、畠山浩人、早川芳宏、原島秀吉
2. 発表標題 ナノDDSを基盤としたがん免疫療法開発における腫瘍微小環境の免疫状態解析の有用性検証
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

北海道大学大学院薬学研究院 薬剤分子設計学研究室ホームページ  
<http://www.pharm.hokudai.ac.jp/yakusetu/index.html>

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
---------	---------