

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：13601

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19935

研究課題名(和文)吸入療法イノベーションの実現：高分子・抗体医薬の経気道投与による肺癌治療戦略

研究課題名(英文)Development of innovative delivery systems of biologics to the lung

研究代表者

佐藤 隆(Sato, Takashi)

信州大学・先鋭領域融合研究群バイオメディカル研究所・特任教授

研究者番号：70510436

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、肺癌の次世代治療法として「吸入免疫治療」を提唱し、その素材に食品としてなじみ深く保健効果が期待される「乳酸菌」の活用を提唱する内容である。本研究グループは、人体に有用な生理活性物質や疾患の活動性に関わる物質を産生する乳酸菌の遺伝子組換え体を設計し、疾患をコントロールする生理活性物質を「生物資源医薬」と定義し次世代の医薬品としての活用を目指している。本研究では肺癌免疫治療に関わる免疫チェックポイント関連のProgrammed cell death-1を阻害する物質を産生する遺伝子組換え乳酸菌を作成し、マウス肺癌モデルへの乳酸菌投与により生存率の大幅な改善を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、肺癌の治療としても一般的になった免疫治療の柱である免疫チェックポイント阻害作用に着目し、免疫チェックポイントに関連し抗腫瘍免疫を賦活化しうる低分子の阻害物質を作成するシステムを構築したこと。さらに、低分子の物性により、肺癌病巣への直接送達性を高める経気道投与方法の実現可能性を呈示した点に大きな意義がある。また、安全性の高い乳酸菌を用いて安価に大量に産生可能なシステムの開発により、将来の抗体医薬や分子標的医薬のコスト削減を提案し、持続可能な医療保険システムに貢献する社会的意義が大きい研究内容である。

研究成果の概要(英文)：Our research focused on the potential therapeutics of the genetically modified Lactic Acid Bacteria (gmLAB) producing biological active molecules that could inhibit disease development/progression. Here we showed that the newly established gmLAB expressing programmed cell death 1 inhibitory single-chain variable fragment could improve survival either by local intranasal or by systemic administration in murine lung cancer model. Among several gmLABs, the use of lactis (*L. lactis*) has been favored because of 1) generally recognized as safe status, 2) absence of endotoxins, 3) easy manipulating property, and 4) low cost and easy administration. Our *L. lactis* system, we called “Biological Engineered Medicine” system, demonstrated potential therapeutics for human diseases including lung cancer, and thus we plan to establish as a next generation tool for target therapy.

研究分野：腫瘍免疫

キーワード：吸入免疫治療 肺癌 乳酸菌 遺伝子組換え乳酸菌 免疫チェックポイント PD-1

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

(1) 肺癌の治療背景

肺癌は2030年の全世界死因予測で第6位、全癌死亡原因の1位の予後不良な疾患である。臨床現場では、肺癌症例の一部で分子標的製剤や抗体製剤が使用可能となり、劇的な奏効の恩恵を享受する一方で、全身性の有害事象から治療中断を余儀なくされる例や、医療費高騰の一因を指摘され持続可能性に懸念が生じていた。このような背景から、抗腫瘍効果という有効性が担保される一方で標的臓器以外での有害事象の発生を可能な限り低減化することと、標的医薬や抗体医薬そのもののコスト削減をすすめ、持続可能な保険医療を担う次世代医薬の開発が求められている。

(2) 本研究グループの研究基盤背景

本研究グループは、2008年から呼吸器疾患をモデルとして経気道治療に関する実証研究により、致死性肺癌モデルにおいても経気道投与の有用性を報告していた。この研究成果を背景に、次世代の肺癌治療の中心となる高分子・抗体医薬による直達的な「経気道的治療法」の研究開発を行う準備をすすめていた。

2. 研究の目的

(1) 原発性肺癌モデルにおける経気道治療の有用性検証

本研究は、慢性呼吸器疾患の臨床で使用される吸入療法の高い忍容性を背景に、肺癌に対する経気道治療という「第3の投与経路」技術の確立による、忍容性と有効性のバランスを極めた次世代肺癌治療の提唱を目指すことを目的とする。

(2) 原発性肺癌モデルにおける抗体医薬の投与経路最適化

次世代医薬の中心となる抗体医薬は、長期使用に耐えうる経済性・安全性・忍容性が担保される必要があるが、既存の免疫チェックポイント阻害薬使用の多数症例で全身性の有害事象併発による治療中断を経験している。そこで、抗体医薬の投与経路の最適化をすすめ、特に原発性肺癌モデルに対する経気道投与による直達的な原発病巣のコントロールを検証し、安全性と有効性のバランスを最適化した新規投与方法の開発を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 抗体医薬用の「高機能マイクロ粒子作成」

本研究の基盤技術となる微粒子作成技術は「Fine Droplet Drying (FDD) technology」として株式会社リコーが開発した。このFDD技術を応用して、「肺胞領域における抗体医薬の停留性を高め」、「頻回投与による安全性・忍容性の低下」を抑えることを目指した。対照として、抗体製剤単独あるいは抗体産生キャリアーの投与とあわせた比較検証を行う。

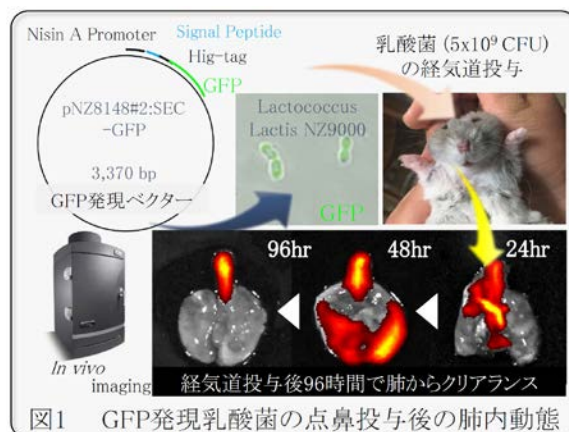
(2) 経気道投与に最適化した抗体分子設計と抗体産生乳酸菌の構築

従来の高分子抗体医薬（分子量 150kDa）の粒子化は、高分子体の粘稠度を考慮すると均一な粒子体の作成を困難とする可能性がある。このため、本課題では遺伝子組換え乳酸菌による低分子抗体（single chain antibody: scFv）作成技術により、生理活性を有する分子量 30,000 程度の scFv を設計する。あわせて、抗体産生乳酸菌の直接投与も念頭に乳酸菌の経気道投与特性を解析し、「乳酸菌」単独での吸入投与から「乳酸菌包埋高機能マイクロバイオ吸入医薬」の開発による吸入療法イノベーションの創出を目指す。

4. 研究成果

(1) 研究の主な成果

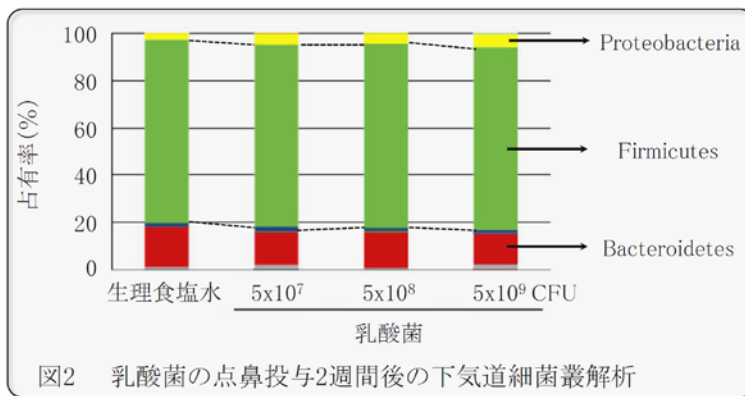
①乳酸菌の経気道投与による肺内移行特性
乳酸菌の菌体を直接経気道投与した場合の肺内移行について、緑色蛍光（GFP）産生乳酸菌（Shigemori *et al.* 2017）の点鼻投与後の肺内動態解析を行った。この結果、経時的に末梢気道への乳酸菌の移行が確認され、およそ 96 時間で肺外にクリアランスされる特性が確認された（図1参照）。一方で、中枢気道への親和性は高く長期間にわたる中枢気道粘膜への定着が示唆され（図1参照）、気道粘膜ワクチンキャリアーとしての応用が期待される。また、乳酸菌の点鼻投与は、 1×10^9 CFU までの単回投与は、高い忍容性が得られた。



②乳酸菌の経気道投与による下気道細菌叢への影響

乳酸菌の経気道投与による、下気道細菌叢への長期的な影響について検証を行った。

乳酸菌投与後に気管支肺胞洗浄による洗浄検体を用いた16S rRNAによる系統解析による菌叢解析を行ったところ、投与2週間後の下気道細菌叢に有意な変化は認めなかった(図2参照)。さらに詳細な解析により、気道の常在細菌として *Lactobacillus* 属が5~10%を占有していることが判明したことから、経気道投与された乳酸菌は気道常在細菌叢に長期的な影響を及ぼしにくいことが示唆された。



③原発性肺癌モデルにおける免疫チェックポイント関連蛋白の発現解析

本研究で使用するルイス肺癌細胞株の同所移植モデルにおける腫瘍組織内の免疫チェックポイント関連蛋白の発現を解析することで、免疫チェックポイント阻害作用を有する低分子抗体の有効性を予測することが可能となる。移植後21日目の腫瘍組織の免疫組織染色解析にて、腫瘍関連リンパ装置 (T-BALT) や腫瘍内で Programmed cell death (PD)-1 の高い発現が確認された(図3参照)。また、この変化は血清中の可溶性 PD-1 濃度の上昇としても見出され、抗 PD-1 抗体製剤の投与最適化を検討する上で有益な結果と考えられる。これらの結果から、経気道投与にて有効性を判定する遺伝子組換え体として、抗 PD-1scFv 産生乳酸菌および抗 PD-L1scFv 産生乳酸菌の構築とその特性解析を最優先に検証を進めた。

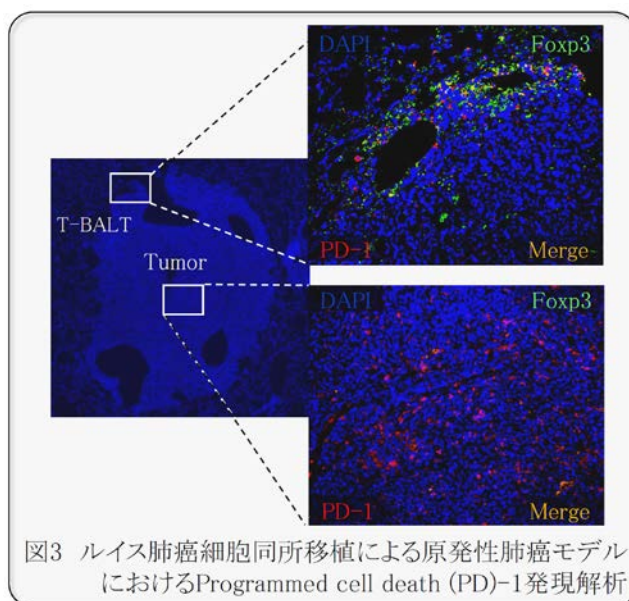


図3 ルイス肺癌細胞同所移植による原発性肺癌モデルにおけるProgrammed cell death (PD)-1発現解析

④PD-1scFv・PD-L1scFv 産生乳酸菌の構築

免疫チェックポイントを阻害する抗 PD-1scFv または抗 PD-L1scFv を産生する遺伝子組換え乳酸菌 (*Lactococcus lactis*) を、lactococcal plasmid vector pNZ8148#2 (Shigemori *et al.* 2013) をベースとして構築した。構築した遺伝子組み換え体の菌体破砕物を抽出し、抗 PD-1scFv あるいは抗 PD-L1scFv の産生と結合試験をウェスタンブロットあるいは ELISA 法による結合能比較試験により検証し、産生能が高い最適株の選抜を行い動物モデルに供した。

本研究では、ルイス肺癌細胞 (1.0x10⁶ cells) の経気道投与 (気管注) により同所移植原発性肺癌モデルを作成した(図4参照)。このモデルは、移植後7日目には腫瘍結節の形成がみられ、生存中央値が21日の致死モデルである (Sato *et al.* 2015)。このモデルに対して、移植1週間後より経腹腔投与 (全身投与) あるいは経鼻投与 (局所投与) による繰り返し投与を行った。

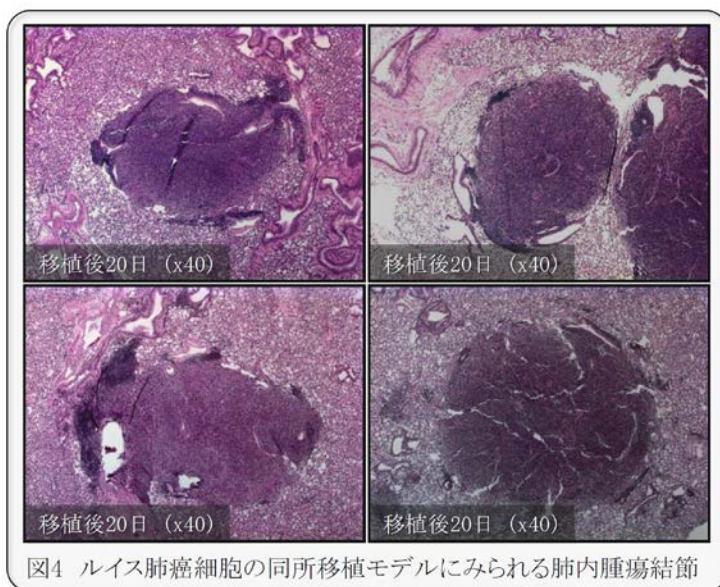


図4 ルイス肺癌細胞の同所移植モデルにみられる肺内腫瘍結節

抗 PD-L1scFv 産生乳酸菌の投与においては、全身投与において100%の長期生存が得られる結果が得られ(図5参照)、現在局所投与モデルにおける最適化を行っている。また、抗 PD-1scFv 産生乳酸菌の局所投与においても最適化をすすめ、移植後8週で生存率100%が確認されており (ベクターコントロールは33%の生存にとどまる)、肺癌に対する経気道免疫

治療の有用性と乳酸菌を用いた低分子抗体製剤の有用性を呈示する結果が示された。

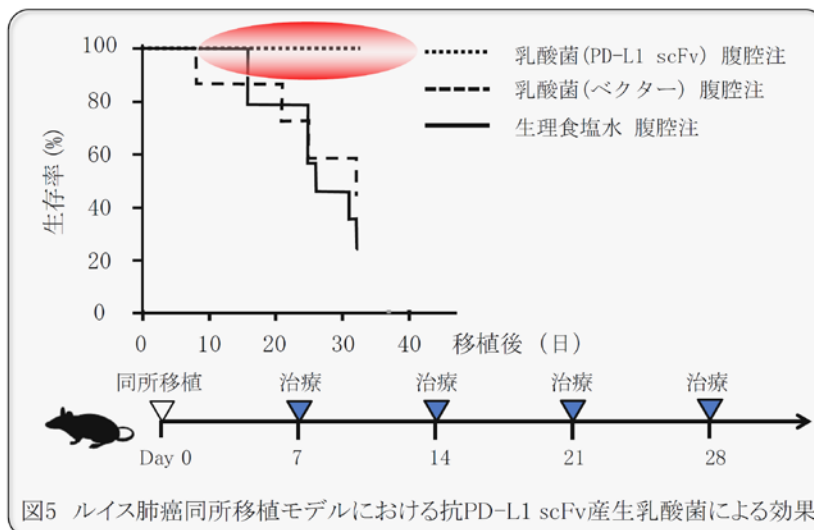


図5 ルイス肺癌同所移植モデルにおける抗PD-L1 scFv産生乳酸菌による効果

(2) 得られた成果の国内外における位置づけ

乳酸菌の経気道投与により肺組織へ標的分子を送達するシステムの研究は国内外で類がない。今回、免疫チェックポイント阻害乳酸菌の構築とその経気道投与にて生存率向上に寄与する有用性が示されたことで、米国 NIH で口演を行った際には多くの興味関心をもって迎えられた。結果として、2019 年度から米国テキサス大学 MD アンダーソンがんセンターとの国際共同研究として継続するに至っている。本研究の当初目標として、肺組織への送達能を向上させるための粒子体の作成にも取り組んだが、scFv 産生乳酸菌を包埋する FDD 粒子体の最適化にはさらなる検証を要すると判断し、現時点では小・中分子を包埋する FDD 粒子体の作成に関する知見をもって知財の確保を優先し（国際特許申請 PCT/JP2020/000711）、今後の国内・海外展開につなげる方針とした。今後、乳酸菌体包埋粒子の作成にあたり、多くの異分野エキスパートが参画する事業として継続する。

(3) 今後の展望

肺癌免疫治療に用いる乳酸菌の作成に関しては、生理活性を有する抗 PD-1scFv 抗体産生乳酸菌の開発に成功し、実際の肺癌モデルを用いた検証でも有用性が示されたことから、その他の免疫チェックポイントに関わる標的分子の一本鎖低分子抗体産生乳酸菌の開発に取り組んでいる。今後の展望として、①抗 CTLA-4scFv 抗体産生乳酸菌や抗 VEGF-A あるいは抗 VEGF-R2scFv 抗体産生乳酸菌の開発に着手し、さらに②scFv 産生乳酸菌の scFv 産生・分泌能の向上をリボソーム工学の観点から目指すとともに、③各種の抗腫瘍 scFv の組み合わせによる抗腫瘍効果の向上を検証。また④各種抗腫瘍 scFv と相乗効果を有する免疫調節性合成核酸 (CpG や乳酸菌由来 MsST、ID35 など) の組み合わせによる検証を予定している。いずれも 2019 年度から開始した国際共同研究強化 (B) (課題番号 19KK0208) にて検証する内容であり、テキサス大学 MD アンダーソンがんセンターとの国際共同研究として検証し臨床への導出を目指す。

<引用文献>

1. Shigemori S *et al.*, Genetically modified *Lactococcus lactis* producing a green fluorescent protein-bovine lactoferrin fusion protein suppresses proinflammatory cytokine expression in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells. *J Dairy Sci* 100, 7007-7015 (2017).
2. Shigemori S *et al.*, Generation of dipeptidyl peptidase-IV-inhibiting peptides from β -lactoglobulin secreted by *Lactococcus lactis*. *Biomed Res Int* 2014, 393598 (2014).
3. Sato T, Shimosato T *et al.*, Intrapulmonary Delivery of CpG Microparticles Eliminates Lung Tumors. *Mol Cancer Ther* 14, 2198-2205 (2015).

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 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Sato T and Shimosato T	4. 巻 2019
2. 論文標題 Development of a New Treatment Modality for Lung Diseases That Uses Innovative Fine Droplet Drying (FDD) Technology Offering Inhalable Nano/microparticles-incorporated Therapeutic Agents	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Science Impact Ltd.	6. 最初と最後の頁 56-58
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21820/23987073.2019.3.56	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Sato T, Shimosato T, Klinman DM	4. 巻 9
2. 論文標題 Silicosis and lung cancer: current perspectives.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Lung Cancer (Auckl)	6. 最初と最後の頁 91-101
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2147/LCCT.S156376	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Nakashima K, Sato T, Shimosato T	4. 巻 19
2. 論文標題 Regulatory role of heme oxygenase-1 in silica-induced lung injury.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Respiratory Research	6. 最初と最後の頁 144
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12931-018-0852-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 2件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Takashi Sato
2. 発表標題 Innovative therapy for lung cancer ~ Intratracheal delivery of nanomicroparticles-incorporated immune checkpoint-blocking single-chain variable fragment ~
3. 学会等名 US National Institute of Health/National Cancer Institute Seminar（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤 隆
2. 発表標題 吸入治療イノベーション～吸入薬で肺癌の制御を目指す研究開発の取り組み～
3. 学会等名 横浜市立大学先端医科学研究センター市民講座（招待講演）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 医薬組成物	発明者 佐藤隆、下里剛士、 森谷樹、森永匡彦、 佐藤祐一、小番昭宏	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2020/000711	出願年 2020年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔その他〕

<p>New Treatment Modality for Lung Diseases https://www.ingentaconnect.com/content/sil/impact/2019/00002019/00000003/art00022</p>
--

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	下里 剛士 (Shimosato Takeshi) (00467200)	信州大学・学術研究院農学系・教授 (13601)	
研究協力者	藤本 淳也 (Fujimoto Junya)	テキサス大学MDアンダーソンがんセンター	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 協力 者	Klinman Dennis (Klinman Dennis)	米国国立衛生研究所・国立がん研究所	