

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03644

研究課題名(和文) 肝がん微小環境の代謝リプログラミングによる腫瘍免疫活性化機構と治療応用

研究課題名(英文) Activation of tumor immunity by metabolic reprogramming in liver cancer microenvironment

研究代表者

日野 啓輔 (Hino, Keisuke)

川崎医科大学・医学部・教授

研究者番号：80228741

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,500,000円

研究成果の概要(和文)：2-deoxy-D-glucose (2DG)をナノ粒子(poly[lactic-co-glycolic acid])(PLGA)に封入した2DG-PLGA-Npsは肝がん組織に特異的に集積し、がん細胞に対する細胞障害性(酸化ストレスと小胞体ストレス)とがん微小環境での抗腫瘍免疫賦活化(ケモカイン産生、IFN- $\gamma$ 陽性リンパ球の集簇および乳酸産生抑制)の両面から肝がん組織の発育を抑制することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在がんに対する免疫療法は注目を浴びているが、本研究はがん細胞のWarburg効果を抑制する2DGが新たにかん微小環境における抗腫瘍免疫を活性化することを初めて明らかにした点で学術的意義が高い。また2DGをナノ粒子に封入することでenhanced permeability retention効果を介して腫瘍特異的なdrug delivery systemを開発し、新たな肝がん治療薬の開発に繋がる可能性を示した点で社会的意義も高い。

研究成果の概要(英文)：2-deoxy-D-glucose (2DG) encapsulated poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) nanoparticles (2DG-PLGA-Nps) preferentially accumulated in liver tumor in mice. 2DG-PLGA-Nps induced cytotoxic effects (oxidative stress and endoplasmic reticulum stress) and antitumor immunity through enhanced T cell trafficking induced by increased chemokine production and decreased lactate production. Consequently, 2DG-PLGA-Nps inhibited liver tumor growth in mice.

研究分野：肝臓病学

キーワード：腫瘍免疫 がん微小環境 肝細胞癌 Warburg効果 ナノ粒子 2-deoxy-D-glucose

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、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

切除不能の進行肝細胞癌に対して分子標的治療薬や免疫チェックポイント阻害剤の使用が可能になってきたが、今なお進行肝細胞癌の予後は不良であり更なる治療薬の開発は喫緊の課題である。一方、がん細胞は Warburg 効果と呼ばれる解糖系の亢進という代謝リプログラミングが存在するが、未だその意義については十分に明らかにはされていない。とくにがん細胞における解糖系の抑制ががん微小環境に及ぼす影響は不明である。

### 2. 研究の目的

がん細胞における解糖系の抑制ががん細胞とがん微小環境へ及ぼす効果の分子機構を明らかにするとともに、新たな作用機序に基づく肝細胞癌治療薬開発のための基礎的検討を行う。

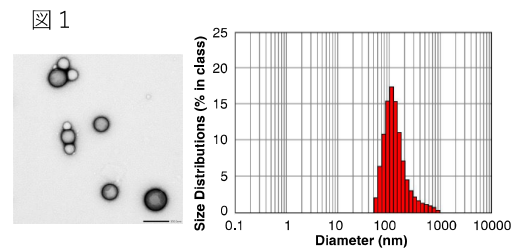
### 3. 研究の方法

解糖系阻害剤として 2-deoxy-D-glucose (2DG) を用い、さらにはがん微小環境での薬剤送達法として 2DG を poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) nanoparticles に封入した 2DG-PLGA-NPs を作成した。また、indocyanine green を PLGA ナノ粒子に封入した ICG-PLGA-NPs を作成し、腫瘍集積性を検討した。2DG ならびに 2DG-PLGA-NPs の抗腫瘍効果について *in vitro* (肝がん細胞株) ならびに *in vivo* (xenograft tumor, hepatocarcinogenic mouse model, syngeneic mouse model) で検討した。

### 4. 研究成果

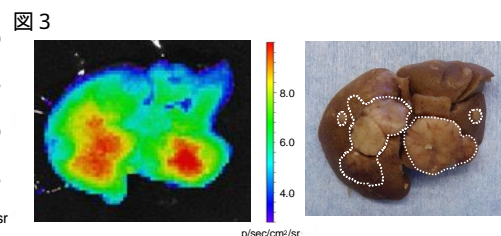
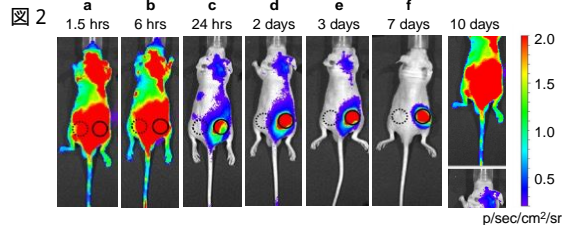
#### (1) 2DG-PLGA-NPs の物理学的特性

2DG-PLGA-NPs のサイズ分布は一峰性で、その  $D_{50}$  は 120 nm であり、電子顕微鏡観察ではほぼ均一な球形を示し、電位は -16.4 mV であった (図 1)。



#### (2) PLGA-NPs の腫瘍特異的集積

ヌードマウスの xenograft tumor における ICG-PLGA-NPs の経時的な蓄積を図 2 示す。ICG-PLGA-NPs は経時的に腫瘍に集積し、投与後約 10 日目まで認められた。さらに、肝発癌マウスモデルに ICG-PLGA-NPs 投与し 1 週間後の肝臓の ICG 蓄積分布では、ほぼ肝腫瘍に一致して ICG の蓄積が認められた (図 3)。



#### (3) 2DG、2DG-PLGA-NPs の細胞障害性

2DG は glucose の取り込みを抑制して細胞の ATP 産生を抑制したが、ミトコンドリアの酸素消費量は変化なくミトコンドリアの ATP 産生量は抑制されなかった。また、AMPK のリン酸化と小胞体ストレスを亢進し、mTOR 活性を抑制した。さらに活性酸素種 (ROS) の産生も亢進し酸化ストレスを誘導した。これらの結果より 2DG は *in vitro* でがん細胞のアポトーシスを亢進し、2DG-PLGA-NPs は xenograft tumor を縮小させた。

#### (4) 2DG-PLGA-NPs の抗腫瘍免疫活性化

2DG-PLGA-NPs の抗腫瘍効果はヌードマウスの xenograft tumor に対してよりも免疫能を有する肝発癌マウス (STAM マウス) に対しての方が大きかった (図 4)。その理由として 2DG-PLGA-NPs はがん微小環境に IFN- $\gamma$  陽性 T 細胞を誘導した。この T 細胞誘導機構としては 2DG-PLGA-NPs によるケモカイン (CXCL9/10) 産生亢進と乳酸産生抑制が関与していた。さらに CXCL9/10 の産生亢進には 2DG-PLGA-NPs による IFN- $\gamma$ -JAK/STAT シグナル活性化と AMPK を介した histone H3 lysine 27 trimethylation (H3K27me3) の抑制が関与することを明らかにした。

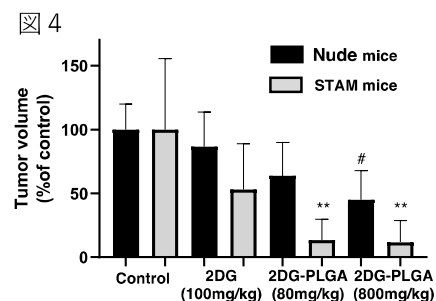
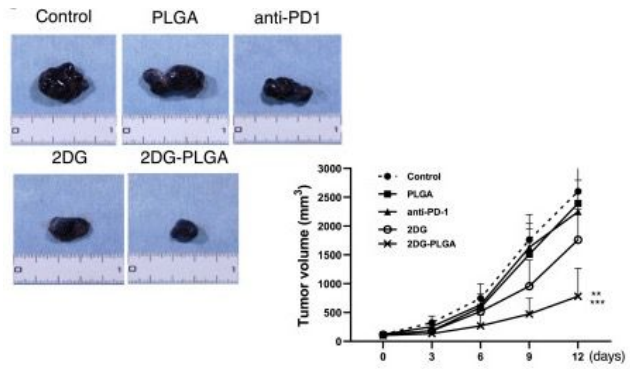


図5

(5) 2DG-PLGA-NPsによるソラフェニブと抗PD-1抗体の抗腫瘍効果増強作用と抗PD-1抗体抵抗性腫瘍に対する抗腫瘍効果

2DG-PLGA-NPsはソラフェニブあるいは抗PD-1抗体による抗腫瘍効果を増強するだけでなく、抗PD-1抗体抵抗性腫瘍(メラノーマ)に対しても有意な抗腫瘍効果を発揮した(図5)。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Nishina S, Hino K.	4. 巻 14
2. 論文標題 CD26/DPP4 as a Therapeutic Target in Nonalcoholic Steatohepatitis Associated Hepatocellular Carcinoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 454
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cancers14020454	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 Hino K, Yanatori I, Hara Y, Nishina S.	4. 巻 ahead of print
2. 論文標題 Iron and liver cancer: an inseparable connection	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 FEBS J	6. 最初と最後の頁 ahead of print
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/febs.16208	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 Nishina S, Tomiyama K, Ikuta Y, Tatsumi Y, Toki A, Kato K, Yoshioka N, Sasaki K, Hara Y, Hino K.	4. 巻 21
2. 論文標題 Long-term phlebotomy successfully alleviated hepatic iron accumulation in a ferroportin disease patient with a mutation in SLC40A1: a case report	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Gastroenterol	6. 最初と最後の頁 111
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12876-021-01674-z	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 Sasaki K, Nishina S, Yamauchi A, Fukuda K, Hara Y, Yamamura M, Egashira K, Hino K.	4. 巻 11
2. 論文標題 Nanoparticle-mediated delivery of 2-deoxy-D-glucose induces antitumor immunity and cytotoxicity in liver tumors in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Mol Gastroenterol Hepatol	6. 最初と最後の頁 739-762
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jcmgh.2020.10.010	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 Nishina, S. Yamauchi, A. Kawaguchi, T. Kaku, K. Goto, M. Sasaki, K. Hara, Y. Tomiyama, Y. Kuribayashi, F. Torimura, T. Hino, K.	4. 巻 7
2. 論文標題 Dipeptidyl Peptidase 4 Inhibitors Reduce Hepatocellular Carcinoma by Activating Lymphocyte Chemotaxis in Mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Mol Gastroenterol Hepatol	6. 最初と最後の頁 115-134
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jcmgh.2018.08.008	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5件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 仁科惣治、日野啓輔
2. 発表標題 肝細胞癌に対するナノ粒子を用いたがん細胞特異的解糖系阻害剤と腫瘍免疫応答効率化に関する検討
3. 学会等名 第44回日本肝臓学会西部会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 仁科惣治、日野啓輔
2. 発表標題 新規抗腫瘍免疫活性化作用を標的としたがん特異的解糖系阻害剤による肝がん治療応用
3. 学会等名 第57回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 仁科惣治、日野啓輔
2. 発表標題 がん特異的解糖系阻害剤による肝細胞癌治療応用と免疫賦活化機構の解明
3. 学会等名 第107回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 仁科惣治、佐々木 恭、日野啓輔
2. 発表標題 がん特異的解糖系阻害剤による肝細胞癌治療応用と免疫賦活化機構の解明
3. 学会等名 第56回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Sasaki K, Nishina S, Yamauchi A, Hara Y, Fukuda K, Hino K
2. 発表標題 Anti tumor effects of 20deoxy-D-glucose encapsulated PLGA nanoparticles against hepatocellular carcinoma in term of tumor immunity
3. 学会等名 Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 医薬組成物及び腫瘍免疫促進剤	発明者 日野啓輔、仁科惣治、佐々木 恭、福田宏太郎	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2018/024528	出願年 2020年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 医薬組成物及び腫瘍免疫活性促進剤	発明者 仁科 惣治 日野啓輔 佐々木 恭 福田 宏太郎	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、6888239	取得年 2021年	国内・外国の別 国内

〔その他〕

-

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	仁科 惣治  (Nishia Sohji)  (70550961)	川崎医科大学・医学部・准教授    (35303)	

6. 研究組織（つづき）

	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	山内 明  (Yamauchi Akira)  (80372431)	川崎医科大学・医学部・教授    (35303)	

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