

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：32403

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07224

研究課題名（和文）再発性悪性リンパ腫の完全根治を目指したリンパ移行性腫瘍標的型核酸製剤の創製

研究課題名（英文）Tumor targeted oligonucleotide therapy via lymphatic route for achievement of complete cure from relapsed malignant lymphoma

研究代表者

渡辺 知恵（WATANABE, Chie）

城西大学・薬学部・教授

研究者番号：30737747

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：悪性リンパ腫の治療において、放射線治療や化学療法に加え、分子標的薬を併用した多剤併用療法、造血幹細胞移植療法、CAR-T療法等の先端治療が行われているが、それでもなお、リンパ腫は血管・リンパ管を介して全身転移しやすい為、治療成功とされる寛解後の完全な再発防止が求められている。本研究では、再発性悪性リンパ腫の完全根治を目指した新規治療薬の創製を最終目的とし、リンパ管系への移行能を持ち、B細胞性腫瘍を標的とする為のキャリアーを保持した核酸製剤のプロトタイプの作製と、リンパ管系の解明を含めた開発基盤の構築を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究における悪性リンパ腫治療薬開発では、既存の療法に必要な複雑な治療ステップを必要とせず、化学療法を用いないことから、副作用や有害事象の回避や軽減が可能である。また経腸薬物送達システムを基盤とすることから、経腸システムを発展させ、将来的には経口服用も可能となる可能性が高い為、患者のQOL向上に大きく貢献することが可能となる。また、リンパ管経路は血管経路に比較して機序解明が遅れていたが、本研究の開発に伴い、新しい知見が得られ、学術的な貢献となる。総合的に本研究の成果は、再発性悪性リンパ腫の完全根治の新規治療法開発の基盤となる。

研究成果の概要（英文）：In the treatment of malignant lymphoma, several therapies, such as radiation therapy, combination chemotherapy with molecular targeted drugs, hematopoietic stem cell transplantation therapy, and CAR-T therapy are being used. However, lymphomas are still prone to systemic metastasis via blood vessels and lymphatic vessels, it is required to complete prevention of relapse after remission.

In this study, with the ultimate goal of creating a novel therapeutic agent for the complete cure of recurrent malignant lymphoma, we created a prototype of an oligonucleotide medicine that has the ability to transit to the lymphatic system and retains the carriers to target B-cell tumors and build a platform including the elucidation of the lymphatic system.

研究分野：免疫学

キーワード：リンパ管 悪性リンパ腫 B細胞 DDS 抗体医薬 核酸医薬

## 1. 研究開始当初の背景

悪性リンパ腫の罹患率は年々増加傾向にあるが、放射線治療や抗癌剤による従来の化学療法に加え、腫瘍化の原因分子や腫瘍細胞に発現している分子を標的とした分子標的薬を併用した多剤併用療法や造血幹細胞移植療法など、治療法・治療薬の飛躍的発展により、生存率自体は上昇傾向にある。治療法・治療薬の開発が進化してもなお、悪性リンパ腫はリンパ管や血管を介して全身に転移しやすく、「寛解後の再発防止」が未だ克服すべき重要な命題であり続けている。

本研究開始当初は、治療法においては、R-CHOP 療法や、CAR-T (キメラ抗原受容体 T 細胞) 療法等の開発研究および治療が進んでいた。悪性リンパ腫の治療法として、CHOP 療法が広く用いられるが、悪性リンパ腫全体の約 75% 程度を占める B 細胞性腫瘍に対しては、CHOP 療法に B 細胞表面抗原である CD20 を認識する抗体製剤リツキシマブを併用した R-CHOP 療法が特に良好な成績を上げている。しかし、再発を完全に制御することは未だ難しく、再発時や抗がん剤が効かない難治性の場合、CAR-T 療法となる。CAR-T 療法は、体内外で増殖が容易な T 細胞に体外で遺伝子改変を施し白血病細胞やリンパ腫細胞上の腫瘍抗原を認識させることにより、腫瘍細胞を駆逐する療法であり、一種のターゲティング療法である。現在、その成果は多数報告されてきているが、その治療過程は段階が多く、長期治療および入院を要する為、高額医療費制度の適応となるも、自己負担額は大きい。また、その適応となる疾患も詳細に限定されており、また認可を受けた施設のみで行われている。さらに、治療後の合併症や高率の有害事象もあり、治療後早期に患者の生活の質が改善するも、その長期生存率はまだ高いとはいえないなどの問題点も未解決である。

上記のように治療法が開発が盛んに進行する一方、治療薬の開発も盛んに行われており、本研究開始当初、PD-1/PD-L1 阻害薬をはじめとした様々な免疫チェックポイント阻害薬の開発ならびに悪性リンパ腫への適応が進められていた。また、高効率に抗がん剤を標的部位に作用させるというドラッグデリバリーシステムの観点からも、新たに抗がん剤に癌抗原や特定の細胞を標的とするような抗体を直接結合させた「抗体 薬物複合体 (ADC, Antibody-Drug conjugate)」の開発が脚光を浴び始めていたが、まだその創製には技術的困難も多くあり、その方法論に議論が重ねられている段階であった。

このように活発に行われている本研究領域の背景を踏まえても、なお悪性リンパ腫の寛解後の再発を完全に防止することは未だ難しいため、新たな視点に立った再発性悪性リンパ腫の再発を完全根治が可能な、低毒性かつ高性能で、患者にとって利便性の良い分子標的薬の開発および治療法の更なる構築が望まれていた。

一方、生体側や悪性リンパ腫自体に着目すると、悪性リンパ腫は、血管を介した血行性転移のみならず、リンパ節中のリンパ洞にて異常増殖し、リンパ管を介してリンパ節から別のリンパ節に転移したり、リンパ性転移により全身性に速やかに他臓器に転移したりする傾向があることから、抗がん剤のリンパ系移行の必要性がこれまでも論じられてきていた。しかし、実際には、ヒトの生体内にはリンパ節が全身で 600 箇所以上も存在し、その解析やトレースが難しく、薬物をリンパ管に直接注入することやリンパ液採取も技術的に困難であることから、実用化には至っておらず、基本的には、抗がん剤を含む既存のほとんどの治療薬は血行性での薬物体内動態しか検討されており、リンパ管経路を介した薬物体内動態は解明されていなかった。

## 2. 研究の目的

上記の背景より、本研究では「悪性リンパ腫の寛解後の再発防止」を克服すべき命題ととらえ、「再発性悪性リンパ腫の完全根治を可能にする新規治療薬の創製」を最終目的とし、リンパ管系への移行性を持ち、B 細胞性腫瘍を標的化出来、さらに B 細胞特異的遺伝子を標的とする新規核酸製剤の創製による悪性リンパ腫治療法の確立を目指し、その開発基盤の構築を行った。

## 3. 研究の方法

本研究では、リンパ移行型の抗体結合型核酸製剤のプロトタイプ構築とその検証を行うと共に、技術的に困難で解明があまり進んでいないリンパ管系組織における解析を行い、開発基盤となる知見の蓄積を行った。製剤のプロトタイプは、B 細胞特異的に発現するヒト CD19 分子に対する抗体の中でも分子量が小さい VHH 抗体 (Variable domain of Heavy chain of Heavy chain antibody) 由来ペプチドを B 細胞性腫瘍標的化用キャリアー部分に用いた。また、リンパ指向性を保持できるように製剤全体としての分子量サイズを 10K-40K 程度で収まるように構築した。また、本製剤を確実にリンパ系へ送達する為、申請者らが既に報告した核酸製剤の経腸経リンパ的全身性薬物送達システム (Murakami M. *et al*, Sci Rep. 2016) を技術基盤とし、経腸シ

システムを想定した系の構築を行った為、試作したプロトタイプは、*in vitro* では腸粘膜再構築モデルにて腸管透過性を検討し、*in vivo* ではリンパ移行性と体内動態を解析した。

#### 4. 研究成果

本研究の目標であるリンパ移行型 B 細胞性腫瘍標的型 核酸製剤の創製を行う為のプロトタイプ構築・試作を行う過程において、最初に B 細胞性腫瘍に対する標的効果を達成する為の B 細胞表面抗原分子に対する VHH 抗体部分の構築を行った。その後、作成した VHH 抗体部分の抗体親和性の評価およびリンカー配列の最適化を検討し、モデル核酸を用いてその試作を行った。

*In vitro* 評価系を用いた腸管透過性の検討の過程においては、まず腸管粘膜再構築モデルの改良を行った (Cheng Y, *et al.* *Pharmaceutics*, 2023)。本モデルでは、粘液層の再構築部位が当初難航していたが、最終的には、種々の条件を検討することにより、報告されているヒト結腸での粘液層の厚みである 100  $\mu\text{m}$  には及ばないものの、現段階では約 15  $\mu\text{m}$  の厚みがある粘液層の再構築に成功し、より実際に近い評価系への改良となった。この改良型モデルを用いて、腸管透過性促進キャリアーとプロトタイプの透過性評価を行った。

*In vivo* 評価系においては、プロトタイプのリンパ移行性の最適化検討の為、モデル抗体を用いて、全身投与後の血液中およびリンパ液中における経時的に検出する評価系を確立した。確立した評価系を用いて、抗体投与後の全身体内動態の検討を行い、核酸製剤のプロトタイプ試作の基盤となる知見を収集した。また、再発性悪性リンパ腫モデルにおける本核酸製剤による治療の有用性を判定するための評価法を確立するために、免疫不全マウスに移入するのに適した B 細胞性腫瘍細胞株の選定と、その B 細胞性腫瘍細胞を移入後、レシピエントマウスの所属リンパ節における腫瘍細胞数の定量的測定法の確立を行った。

これらの本研究過程において、研究開始当初の予想以上に、抗体の体内動態が血液中とリンパ液中では大きく異なる、という新たな知見が見出された。この事より、抗体のみならず核酸製剤を含む種々の医薬品において、血中動態とともにリンパ内動態の ADME (Absorption; 吸収、Distribution 分布、Metabolism 代謝、Excretion 排泄) を詳細に検証して、リンパ内動態を含めた全身の体内動態を再検討する必要性が考えられたとともに、リンパ移行性薬物による B 細胞リンパ腫治療への有用性が示唆された。

また、本研究を遂行する中で、リンパ管系に関して、リンパ管の形成や発生に関する知見は多く蓄積されてきているが、リンパ管系経路を介した全身性薬物動態やリンパ指向性に関してはその知見は古い研究に基づくものが多く、新しい知見や真の理解が未だ不十分であることが明らかとなった。本研究では、リンパ移行型の抗体結合型核酸製剤のプロトタイプの作製と、その開発基盤の構築を行ったが、最終目標であるリンパ移行能を有する標的型核酸医薬による再発性悪性リンパ腫の完全制御への到達には、リンパ管経路に関わる基盤研究によるさらなる知見の蓄積が必要である。今後、本研究を継続し、さらなるリンパ管経路への理解を深め、新規治療法開発へとつなげていきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Cheng Yi, Watanabe Chie, Ando Yusuke, Kitaoka Satoshi, Egawa Yuya, Takashima Tomoya, Matsumoto Akihiro, Murakami Masahiro	4. 巻 15
2. 論文標題 Caco-2 Cell Sheet Partially Laminated with HT29-MTX Cells as a Novel In Vitro Model of Gut Epithelium Drug Permeability	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 2338 ~ 2338
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/pharmaceutics15092338	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 Matsumoto Akihiro, Kitazawa Takeo, Hatori Yuta, Nakanishi Hiroshi, Watanabe Chie, Takashima Tomoya, Murakami Masahiro	4. 巻 17
2. 論文標題 Targeting cellular gaps using Janus nanoparticles containing cationic polymers and surfactant lipids	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Drug Discoveries & Therapeutics	6. 最初と最後の頁 104 ~ 113
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5582/ddt.2022.01118	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 村上正裕、松本昭博、渡辺知恵	4. 巻 5
2. 論文標題 経口核酸医薬開発への技術戦略	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Precision Medicine	6. 最初と最後の頁 1302-1305
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 村上正裕、渡辺知恵	4. 巻 36
2. 論文標題 経口核酸医薬開発へのアプローチ	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BIO Clinica	6. 最初と最後の頁 85-91
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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10件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 津久井 優希、橋本 拓馬、安藤 祐介、北岡 諭、江川 裕哉、Cheng Yi、高島 智之、松本 昭博、渡辺 知恵、村上 正裕
2. 発表標題 HT29-MTXの部分積層培養による腸管上皮薬物透過性のin vitro評価系としてのCaco-2単層膜の改良
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 石坂 勝太、安藤 祐介、徳山 憲人、松田 芳和、渡辺 知恵
2. 発表標題 抗体のリンパ管系における動態の解析
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 安藤 祐介、金子 豊、長谷川 晋也、築地 信、渡辺 知恵、奥 輝明
2. 発表標題 免疫細胞特異的アクチン結合タンパク質Coronin-1の発現制御機構の解析
3. 学会等名 日本薬学会 第142年会
4. 発表年 2021年～2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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	安藤 祐介  (Ando Yusuke)  (10805881)	城西大学・薬学部・助教    (32403)	

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