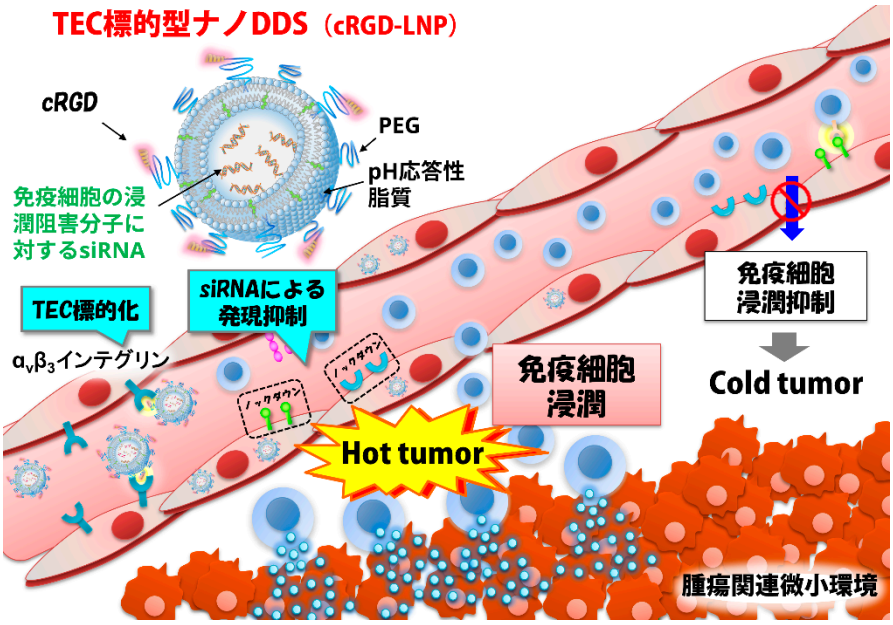
85　多機能型ナノDDSによる腫瘍血管内皮のがん免疫制御	中村　孝司

【目的】免疫チェックポイント阻害剤である programmed cell death 1（PD-1）抗体が有効な患者は全体の 20〜30%であり、残りの患者に対する有効性を向上させることが焦点となっている。この治療効果の違いには、腫瘍関連微小環境の免疫ステータスの違いが大きく関連している。免疫細胞が腫瘍内に浸潤しているがブレーキがかかっている腫瘍（hot tumor）と免疫細胞の活性化が起こっていないあるいは免疫細胞が腫瘍内に浸潤できない腫瘍（cold tumor）の 2 つに大別され、PD-1 抗体などは hot tumor に対して有効性を示す。70〜80%の PD-1 抗体療法抵抗性の患者のがんの多くは cold tumor であり、cold tumor から hot tumor へ改善することが重要である。非常に複雑な機構により cold tumor が形成されているが、その機構の 1 つに腫瘍血管内皮細胞（TEC：tumor endothelial cell）による免疫細胞の腫瘍組織への浸潤抑制がある。TEC 表面には、免疫細胞の腫瘍組織への浸潤を阻害する分子が発現していることが知られている。一方で、TEC はがん免疫応答の活性化に関与しているという報告もある。それ故、TEC の機能を制御することで cold tumor を hot tumor に変えるだけではなく、がん免疫応答のさらなる増強も期待できる。本研究では、ナノバイオテクノロジーを駆使したキャリア型 Drug Delivery System（ナノ DDS）を基盤技術とし、TEC 標的化能と先述した負の機能の阻害と正の機能の促進を同時に実現するナノ DDS を創製することを目的とした。

【方法】TEC 株を用いたナノ DDS の取り込み評価をフローサイトメトリーにより行った。続いて、TEC に発現する免疫細胞の浸潤抑制分子の発現が認められる cold tumor モデルの選定を行った。さらに、TEC 株および担がんマウスを用いた標的遺伝子のノックダウン評価に基づいたナノ DDS の最適化を行った。最適化したナノ DDS を担がんマウスへと投与し、抗腫瘍活性を評価した。

【結果】PD-1 抗体投与による抗腫瘍活性評価と腫瘍組織の遺伝子発現解析の結果、腫瘍モデルとして、マウス直腸がん細胞 CT26 を移植したマウスを選択した。TEC 標的化ナノ DDS として、cyclic RGD（cRGD）ペプチドを修飾した脂質ナノ粒子（lipid nanoparticle：LNP）を構築し、TEC 株に対する取り込みを評価した結果、cRGD ペプチド修飾 LNP（cRGD-LNP）は未修飾の LNP と比較して、飛躍的に細胞への取り込みが増加した。続いて、cRGD-LNP の最適化を行うことで、TEC における標的遺伝子を効率的にノックダウンすることに成功した。さらに、CT26 担がんマウスに対して最適化 cRGD-LNP を投与した結果、コントロール群と比較して高い抗腫瘍活性を示した。以上のことから、TEC の機能を遺伝子レベルで制御可能なナノ DDS の構築に成功した。

TEC 標的型ナノ DDS によるがん免疫療法戦略



85. 多機能型ナノ DDS による腫瘍血管内皮のがん免疫制御

中村　孝司

北海道大学 大学院薬学研究院 薬剤分子設計学研究室

Key words：ナノ DDS，脂質ナノ粒子，がん免疫療法，腫瘍血管内皮

緒　言

最近の免疫チェックポイント阻害療法の成功により、がん治療における免疫療法の有用性が証明された。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」と呼ばれる時空間的な一連のステップで行われる［1］。腫瘍組織において樹状細胞ががん抗原を捕食、リンパ節へと移行し、T 細胞を活性化する。活性化した T 細胞は血管を介して腫瘍内へと浸潤し、がん細胞を排除する。ところが、がん患者ではこのサイクルの一部もしくは複数のステップが阻害されている。Programmed cell death 1（PD-1）抗体などは腫瘍内に浸潤した T 細胞が、がん細胞に発現する PD-1 リガンド（PD-L1）を介して抑制されているのを阻害することで T 細胞を再活性化させる。しかしながら、PD-1 抗体が有効な患者は全体の 20～30%であり、残りの患者に対する有効性を向上させることが焦点となっている。この治療効果の違いには、腫瘍関連微小環境の免疫ステータスの違いが大きく関連している。免疫細胞が腫瘍内に浸潤しているがブレーキがかかっている腫瘍（hot tumor）と免疫細胞の活性化が起こっていないあるいは免疫細胞が腫瘍内に浸潤できない腫瘍（cold tumor）の 2 つに大別され［2］、PD-1 抗体などは hot tumor に対して有効性を示す。先述した 70～80%の PD-1 抗体療法抵抗性の患者のがんの多くは cold tumor であり、cold tumor から hot tumor へ改善することが重要である

非常に複雑な機構により cold tumor が形成されているが、その機構の 1 つに腫瘍血管内皮細胞（TEC：tumor endothelial cell）による免疫細胞の腫瘍組織への浸潤抑制がある［3］。TEC 表面には、免疫細胞の腫瘍組織への浸潤を阻害する分子が発現しており、それらの働きによって cold tumor が形成される。一方で TEC は、がん免疫応答を促進する機能も有している。このように TEC は正と負の両面でがん免疫応答に関与していることから、TEC の機能を制御することで cold tumor を hot tumor に変えるだけではなく、がん免疫応答のさらなる増強も期待できる。

TEC の様々な機能を制御するためには、低分子阻害剤や中和抗体などの従来の技術を単純に組み合わせるだけでは不可能である。現在のがん免疫療法の開発は、作用の異なる治療法を組み合わせた複合がん免疫療法が主流であるが、薬効の増強に伴い、副作用発現も顕著に増加する。また、低分子阻害剤や中和抗体は全身投与であるため、TEC のみを狙うことは困難である。これらを解決するために、本研究ではナノバイオテクノロジーを駆使したキャリア型 Drug Delivery System（ナノ DDS）を基盤技術とし、TEC 標的化能と先述した負の機能の阻害と正の機能の促進を同時に実現する複数の生物活性を有するナノ DDS を創製することを最終目的としている。

脂質ナノ粒子（LNP：lipid nanoparticle）をベースとし、TEC 標的化リガンドを表面に修飾することで細胞選択性を付与、免疫細胞の浸潤を阻害する分子に対する siRNA を搭載することで負の機能を阻害、TEC のがん免疫応答を強化する分子を搭載することで正の機能を促進させる。我々は LNP を基盤としたがん免疫療法の開発を進めており、抗原やアジュバントを搭載した LNP によるがん免疫応答の促進［4～7］、siRNA 搭載 LNP による免疫細胞の機能制御など［8，9］を報告してきた。さらに、TEC 標的化リガンドとして cyclic RGD（cRGD）ペプチドを用いることで TEC への標的化に成功している［10］。cRGD ペプチドは Arg-Gly-Asp-D-Phe-Lys からなる環状ペプチドであり、TEC 表面に特異的に発現している $\alpha_v\beta_3$ インテグリンに強い親和性を有している。本報告では、免疫細胞の浸潤を阻害する分子 X（標的 X）に対する siRNA を搭載した cRGD ペプチド修飾 LNP（cRGD-LNP）の構築と TEC 株を用いた機能評価、担がんマウスモデルの選定、腫瘍組織における標的遺伝子の抑制効果および抗腫瘍活性の評価を行い、

TEC における負の阻害戦略の有用性を示すことを目的とした。

方　法

1.　siRNA 搭載 cRGD-LNP の調製

pH 応答性カチオン性脂質 YSK05、cholesterol、1,2-dimirystoyl-sn-glycerol methoxyethyleneglycol 2000 ether（PEG2000-DMG）を含むアルコール溶液（0.4 mL）に対し、siRNA を含むクエン酸緩衝液（0.2 mL）を撹拌下で滴下した。次いで、その混合溶液をクエン酸緩衝液（2 mL）に対し、撹拌下で滴下した。PBS を加えて希釈しながら、限外濾過を行い、アルコールを PBS に置換した。その後、cRGD ペプチドが結合した N-[N'-(Succinimidyloxy glutaryl) aminopropylpolyoxyethylene oxycarbonyl]-1,2-distearoyl-sn-glycero-3- phosphoethanolamine （cRGD-PEG2000-DSPE）を含むクエン酸緩衝液と混合し、60℃で撹拌した。PBS を加えて希釈しながら、限外濾過を行うことで siRNA 搭載 cRGD-LNP を調製した。

2.　OSRC-2 細胞および MS-1 細胞を用いた siRNA 搭載 cRGD-LNP の機能評価

cRGD ペプチドのリガンドである $\alpha v \beta 3$ インテグリンを発現している細胞株として、MS-1 細胞（マウス TEC）と OSRC-2 細胞（ヒト腎がん）を用いた。各細胞に対し、蛍光マーカーである DiD を修飾した siRNA 搭載 cRGD-LNP を作用させ、2.5 時間後にフローサイトメーターにより取り込みを評価した。また、MS-1 細胞に対して siRNA 搭載 cRGD-LNP を作用させ、24 時間後に遺伝子ノックダウン効果を RT-qPCR 法にて解析した。内因性遺伝子として *GAPDH* を用いた。

3.　担がんマウスモデルの選定

B16-F10 細胞（マウスメラノーマ）、CT26 細胞（マウス結腸がん）、4T1 細胞（マウス乳がん）をマウス皮下に移植し、約 500 mm^3 に成長した腫瘍を回収した。回収した腫瘍から RNA を抽出し、RT-qPCR 法にて腫瘍内の標的 X の発現量を比較した。

4.　CT26 担がんマウスモデルにおける siRNA 搭載 cRGD-LNP の機能評価

CT26 細胞をマウスに皮下移植した。移植から 10 日後に siRNA 搭載 cRGD-LNP を尾静脈内投与し、24 時間後に腫瘍を回収した。回収した腫瘍から RNA を抽出し、RT-qPCR 法にて *CD31* の遺伝子ノックダウンを評価した。また、CT26 細胞をマウスに皮下移植し、7 日、11 日、15 日後に siRNA 搭載 cRGD-LNP を尾静脈内投与した。腫瘍体積を測定することにより、抗腫瘍活性を評価した。

結果および考察

1.　siRNA 搭載 cRGD-LNP の調製および機能評価（*in vitro*）

我々の以前の報告に基づき、YSK05/cholesterol/ PEG2000-DMG/ cRGD-PEG2000-DSPE = 70/30/3/3（mol 比）の組成の siRNA 搭載 cRGD-LNP を調製した［10］。粒子径およびゼータ電位は 100 nm、−23 mV であった。続いて、TEC 標的化リガンドである cRGD ペプチドが TEC への細胞取り込みを促進するかを *in vitro* の細胞系にて評価した。DiD 標識した siRNA 搭載 cRGD-LNP および cRGD ペプチド未修飾の siRNA 搭載 LNP を MS-1 細胞と OSRC-2 細胞に作用させ、2.5 時間後に細胞を回収し、フローサイトメーターを用いて細胞取り込みを解析した。その結果、MS-1 細胞および OSRC-2 細胞の両方において、siRNA 搭載 cRGD-LNP は cRGD ペプチド未修飾の siRNA 搭載 LNP と比較して、顕著な細胞取り込みの増加を示した（図 1）。このことから、cRGD ペプチドが機能し、$\alpha v \beta 3$ インテグリンを介した特異的な取り込みが促進されたことが示唆され、siRNA 搭載 cRGD-LNP の調製に成功した。

2.　担がんマウスモデルの選定

続いて、本研究の戦略を評価するために、担がんマウスモデルの選定を行った。条件として、PD-1 抗体療法に抵抗性を示し標的 X の発現が高いこととした。文献情報から PD-1 抗体療法に抵抗性を示すモデルとして、B16-F10、CT26、4T1 担がんマウスを選出した。それぞれの細胞をマウス皮下に移植し、500 mm^3 に成長した腫瘍組織内の

標的Xの遺伝子発現をRT-qPCR法にて評価した。その結果、CT26担がんマウスモデルが最も高く標的Xを発現していたことから、CT26担がんマウスをモデルマウスとして選定した。

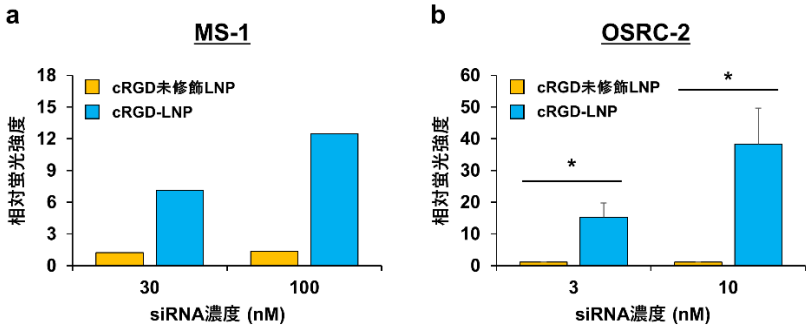


図1. siRNA搭載cRGD-LNPの細胞取り込み評価

a) MS-1細胞によるsiRNA搭載cRGD-LNPの取り込みを示している（n = 2）。DiDを修飾したsiRNA搭載cRGD-LNPをMS-1細胞に作用させ、2.5時間後にフローサイトメーターを用いて解析した。

b) OSRC-2細胞によるsiRNA搭載cRGD-LNPの取り込みを示している（n = 3）。DiDを修飾したsiRNA搭載cRGD-LNPをOSRC-2細胞に作用させ、2.5時間後にフローサイトメーターを用いて解析した。統計処理はunpaired t-testを用いて行った（*P < 0.05）。

3. CT26担がんマウスを用いたsiRNA搭載cRGD-LNPの機能評価（*in vivo*）

次に、CT26担がんマウスを用いて、TECにおける遺伝子ノックダウン活性と抗腫瘍活性の評価を行った。CT26細胞の移植から10日後に、血管内皮マーカーである*CD31*を標的とするsiRNAを搭載したcRGD-LNPを尾静脈内投与し、24時間後に腫瘍組織における*CD31*の遺伝子発現をRT-qPCR法を用いて評価した。予想に反して、*CD31*の遺伝子ノックダウンは全く認められなかった。以前の報告とは使用した担がんマウスモデルが異なったことが原因だと考えられた。そこで、CT26担がんマウスに最適な脂質組成を検討した結果、70%以上の遺伝子ノックダウン活性を示す組成を見出すことに成功した。

抗腫瘍活性を調べるために、CT26細胞の移植から7日、11日、15日後に標的Xに対するsiRNAを搭載したcRGD-LNPを尾静脈内投与し、腫瘍体積を経時的に測定した。PBS投与群やコントロールsiRNAを搭載したcRGD-LNP投与群では同様の腫瘍増殖を示した（図2）。一方で、標的Xに対するsiRNAを搭載したcRGD-LNP投与群では、初回の投与から腫瘍増殖抑制効果が認められ、終了時点の19日目では有意な腫瘍体積の減少が認められた（図2）。このことから、TECにおける標的Xの阻害が抗腫瘍活性を誘導する可能性が示唆された。

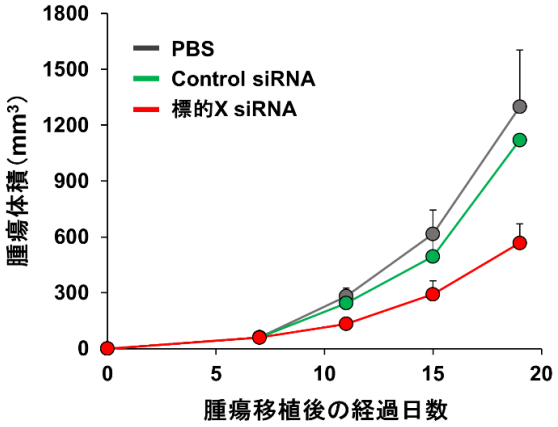


図2. CT26担がんマウスを用いたsiRNA搭載cRGD-LNPの抗腫瘍活性評価

CT26細胞の移植から7日、11日、15日後にPBS、コントロールsiRNAもしくは標的Xに対するsiRNAを搭載したcRGD-LNPを尾静脈内投与し、腫瘍体積を経時的に測定した（n = 3～4）。

以上の結果から、我々は TEC を標的としたナノ DDS、cRDG-LNP の開発に成功し、TEC に発現する標的 X を siRNA を用いて阻害することにより、抗腫瘍活性を誘導できることを明らかにした。今後は標的 X をノックダウンすることによるがん免疫応答の促進メカニズムの解明と TEC のがん免疫応答を強化する分子を送達することで正の機能の促進を行う予定である。

共同研究者・謝辞

本研究は、北海道大学大学院薬学研究院の薬剤分子設計学研究室にて行いました。ご助力頂きました研究室のスタッフならびに学生に厚く御礼申し上げます。

文　献

1) Chen DS, Mellman I. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. Immunity. 2013 Jul 25;39(1):1-10. PMID: 23890059 DOI: 10.1016/j.immuni.2013.07.012
2) Sharma P Allison JP. The future of immune checkpoint therapy. Science. 2015 Apr 3;348(6230):56-61. PMID: 25838373 DOI: 10.1126/science.aaa8172
3) Joyce JA, Fearon DT. T cell exclusion, immune privilege, and the tumor microenvironment. Science. 2015 Apr 3;348(6230):74-80. PMID: 25838376 DOI: 10.1126/science.aaa6204
4) Nakamura T, Moriguchi R, Kogure K, Harashima H. Incorporation of polyinosine-polycytidylic acid enhances cytotoxic T cell activity and antitumor effects by octaarginine-modified liposomes encapsulating antigen, but not by octaarginine-modified antigen complex. Int J Pharm. 2013 Jan 30;441(1-2):476-81. Epub 2012 Nov 16. PMID: 23159346 DOI: 10.1016/j.ijpharm.2012.11.006.
5) Nakamura T, Yamazaki D, Yamauchi J, Harashima H. The nanoparticulation by octaarginine-modified liposome improves α-galactosylceramide-mediated antitumor therapy via systemic administration. J Control Release. 2013 Oct 28;171(2):216-24. Epub 2013 Jul 13. PMID: 23860186 DOI: 10.1016/j.jconrel.2013.07.004.
6) Nakamura T, Fukiage M, Higuchi M, Nakaya A, Yano I, Miyazaki J, Nishiyama H, Akaza H, Ito T, Hosokawa H, Nakayama T, Harashima H. Nanoparticulation of BCG-CWS for application to bladder cancer therapy. J Control Release. 2014 Feb 28;176:44-53. Epub 2013 Dec 31. PMID: 24389133 DOI: 10.1016/j.jconrel.2013.12.027.
7) Nakamura T, Miyabe H, Hyodo M, Sato Y, Hayakawa Y, Harashima H. Liposomes loaded with a STING pathway ligand, cyclic di-GMP, enhance cancer immunotherapy against metastatic melanoma. J Control Release. 2015 Oct 28;216:149-57. Epub 2015 Aug 14. PMID: 26282097 DOI: 10.1016/j.jconrel.2015.08.026.
8) Warashina S, Nakamura T, Sato Y, Fujiwara Y, Hyodo M, Hatakeyama H, Harashima H. J Control Release. 2016 Mar 10;225:183-91. Epub 2016 Jan 26. PMID: 26820519 DOI: 10.1016/j.jconrel.2016.01.042.
9) Nakamura T, Kuroi M, Fujiwara Y, Warashina S, Sato Y, Harashima H. Small-sized, stable lipid nanoparticle for the efficient delivery of siRNA to human immune cell lines. Sci Rep. 2016 Nov 28;6:37849. PMID: 27892533 DOI: 10.1038/srep37849.
10) Sakurai Y, Hatakeyama H, Sato Y, Hyodo M, Akita H, Ohga N, Hida K, Harashima H. RNAi-mediated gene knockdown and anti-angiogenic therapy of RCCs using a cyclic RGD-modified liposomal-siRNA system. J Control Release. 2014 Jan 10;173:110-8. Epub 2013 Oct 11. PMID: 24120854 DOI: 10.1016/j.jconrel.2013.10.003.