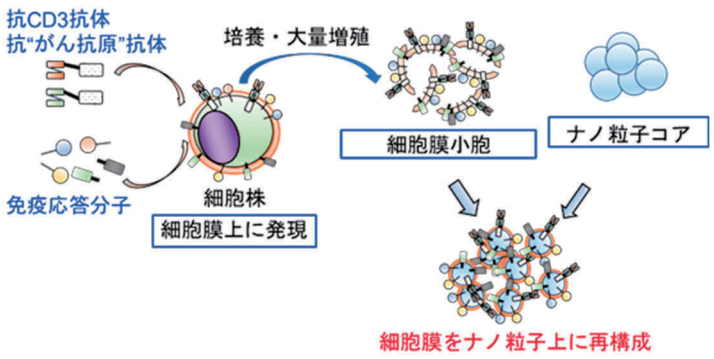
66　人工ナノ粒子による新規がん免疫療法の開発	籠谷　勇紀

【目的】がんに対する免疫療法の中でも、がん抗原を特異的に認識・攻撃できるキメラ抗原受容体（chimeric antigen receptor）導入 T 細胞を輸注する CAR-T 細胞療法は、難治がんを治癒に導き得る治療法として期待されている。しかし今のところ固形がんを含む多くの悪性腫瘍においてその治療効果は不十分であり、この原因として種々の免疫抑制環境による T 細胞機能の阻害が知られている。別の観点からの問題として、CAR-T 細胞を患者から個別に作製・準備するための極めて高い製造コストがあり、より規格化・一括化された製造方法の確立が現実的に必要である。CAR と類似した原理で細胞製剤を用いずに免疫応答を誘導する治療法として、抗 CD3 抗体とがん抗原に対する抗体を連結することにより、内在性の非特異的 T 細胞に抗腫瘍効果を誘導する二重特異性抗体（Bispecific T-cell engager：BiTE）が開発されており、コスト・安定供給性という面から優れているが、抗腫瘍効果が弱い。本研究ではこれらの治療モダリティの短所を克服して、効果、汎用性に優れる治療薬の導出に向けた基盤技術開発を目的とした。

【方法】我々は、がん抗原特異的な T 細胞の活性化に加えて、共刺激シグナルやサイトカインシグナルを一括して付与できる人工ナノ粒子を開発した。ナノ粒子表面に BiTE と同様の原理でがん細胞と T 細胞を引き寄せるためのがん抗原特異的な抗体と抗 CD3 抗体、共刺激分子、サイトカイン分子を発現させる目的で、これらを細胞表面に安定発現させた細胞株を準備して細胞膜小胞として単離した上で、PLGA などの粒子表面上に再構成した。この技術を背景として、固形がんにおける腫瘍微小環境を制御する目的で、免疫チェックポイント分子に対する阻害抗体、免疫抑制シグナル解除に寄与するサイトカイン分子を追加搭載したナノ粒子を作製した。同ナノ粒子が生体内の免疫細胞に対して有効な抗腫瘍効果を引き起こせることを示すために、固形がんマウスモデルを用いて検討を行った。一方、実用化に向けた検討では、ナノ粒子を作製する手順をより簡略化する目的で、（ナノ粒子コアを使用せずに）細胞膜断片から作製する膜小胞のみを使用した場合の免疫応答効果を検証した。

【結果】製法については、PLGA 上に細胞膜断片を被覆した場合と、膜小胞として得られたものを比較して、*in vitro* における機能では遜色ないことを確認した。また膜小胞の単離工程で、従来超遠心で分離していたところを磁気ビーズによる分離方法を試し、より簡便に分離を行えることを確認した。固形がんに対する治療効果の改善については、免疫チェックポイント分子（PD1／PDL1、CTLA など）に対する阻害抗体、及び免疫微小環境に改変に寄与することが知られているサイトカイン分子を表面に搭載したナノ粒子を作製して、マウス固形腫瘍モデルに局所注射を行った。腫瘍微小環境における作用を観察する目的、本実験ではマウス T 細胞に対するナノ粒子を別途作製し、大腸癌細胞株 CT26 を皮下移植する腫瘍モデルを用いて効果検証を行った。これまでに作製した BiTE 分子と共刺激分子のみを含むナノ粒子においても無治療と比較して有意な治療効果が示されたが、微小環境改変シグナルを搭載することで、さらに高い治療効果を示した。さらに、腫瘍内に存在する免疫細胞の構成を調べると、CD8 陽性 T 細胞の増加、免疫抑制マクロファージの減少などが見られたことから、目的とする微小環境改変効果が確かに得られていることが確認された。

難治がんに対する多様な免疫応答を誘導するナノ粒子の開発



66. 人工ナノ粒子による新規がん免疫療法の開発

籠谷　勇紀

愛知県がんセンター 研究所 腫瘍免疫応答研究分野

Key words：がん免疫療法，CAR-T 細胞，二重特異性 T 細胞誘導体，腫瘍微小環境

緒　言

がんに対する免疫療法の中でも、がん抗原を特異的に認識・攻撃できるキメラ抗原受容体（chimeric antigen receptor）導入 T 細胞を輸注する CAR-T 細胞療法は、難治がんを治癒に導き得る治療法として期待されている。しかし今のところ固形がんを含む多くの悪性腫瘍においてその治療効果は不十分であり、この原因として種々の免疫抑制環境による T 細胞機能の阻害が知られており、例えば免疫チェックポイント分子、免疫抑制性のサイトカイン、これらの発現や分泌に関わる腫瘍随伴マクロファージや線維芽細胞、制御性 T 細胞などが挙げられる［1］。我々は、現在臨床で用いられている共刺激シグナル付与型の第二世代・第三世代 CAR をもとに、T 細胞の長期生存能に有利なサイトカインシグナルを付与できる CAR の作製など、T 細胞機能を高めるための研究開発をこれまでに行っており、また国内外でも種々の機能付与を目的とした CAR-T 細胞改変が試みられている［2, 3］。しかし上記のように多数の分子群・細胞集団が T 細胞機能の抑制に関与するため、個々のシグナルに対応する修飾を CAR-T 細胞に全て搭載することは困難である［4］。

別の観点からの問題として、CAR-T 細胞を患者から個別に作製・準備するための極めて高い製造コストがある。現状の生産方法では国内で年間 100～200 人程度の治療規模が想定されており、今後 CAR-T 細胞療法の適用疾患を広げ、対象患者数を増やすためにはより規格化・一括化された製造方法の確立が現実的に必要である。健常人ドナーから遺伝子改変により HLA 分子等をノックアウトした上で CAR-T 細胞を大量製造し、同種移植として用いる方法が開発されているが［3］、やはり 1 ドナーから採取可能な T 細胞グラフトは数人分と考えられることから革新的な効率化にはつながっていない。一方、CAR と類似した原理で細胞製剤を用いずに免疫応答を誘導する治療法として、抗 CD3 抗体とがん抗原に対する抗体を連結することにより、内在性の非特異的 T 細胞に抗腫瘍効果を誘導する二重特異性抗体（Bispecific T-cell engager：BiTE）が開発されており、コスト・安定供給性という面から優れている。しかし共刺激分子やサイトカインによるシグナルを活用できる CAR-T 細胞とは異なり、T 細胞の刺激が抗 CD3 抗体のみによっていること、種々の接着・遊走分子などを発現する細胞とは異なり腫瘍部位への送達が受動的で非効率であり、CAR-T 細胞療法よりも抗腫瘍効果が弱い。治療効果、汎用性の両課題を同時に解決する治療モダリティ開発が求められている。

そこで我々は、がん抗原特異的な T 細胞の活性化、エフェクター機能の誘導に加えて、長期生存能や細胞障害活性の増幅につながる共刺激シグナルやサイトカインシグナルを一括して付与できる人工ナノ粒子を用いることで、細胞療法にはない汎用性と、BiTE では得られない複合的な免疫応答誘導を同時に得られるという仮説を立て、性造血器腫瘍細胞を標的として開発を進めてきた。ナノ粒子表面に BiTE と同様の原理でがん細胞と T 細胞を引き寄せるためのがん抗原特異的な抗体と抗 CD3 抗体、さらには種々の共刺激分子、サイトカイン分子を発現させる目的で、これらを全て細胞表面に安定発現させた細胞株を準備し、粒子表面上に再構成する技術を確立した。この方法で作製された抗腫瘍ナノ粒子は、T 細胞存在下でがん細胞特異的な抗腫瘍効果を誘導できることを *in vitro*、及び *in vivo* 造血器腫瘍モデルを示した。一方、固形がんにおける腫瘍微小環境では上述のように複数の免疫抑制分子、細胞群が存在することから、活性化された T 細胞の抗腫瘍効果が減弱することに加え、局所への遊走効率がさらに低いことが想定される。そこで本研究では、これらの免疫抑制環境を排除する複数の免疫制御分子をさらにナノ粒子に搭載することで、難治性固形腫瘍に対しても有効な抗腫瘍効果を誘導することを目的とした。同時に、実用化に向けたナノ粒子精製工程の簡素化、効率化も機能改良と並行して試みた。

方法および結果

1. 細胞膜膜小胞の作製

従来我々が開発した方法では、超遠心により段階的に細胞成分を分離する方法である。同手法は以前から確立されている方法であるが、単離工程が多く、また長時間の超遠心工程が含み、培養規模の拡大にどこまで応えられるかという点で課題がある。そこで本研究では、磁気ビーズにより細胞膜タンパク質を単離する方法を試みた。これについても、例えばConcanavalin A磁気ビーズなど、細胞膜タンパク質に結合する物質に磁気ビーズを付けて、磁性カラムを通して単離する方法が以前から報告されている。今回我々は、Concanavalin Aの代わりに細胞膜で発現する複数のタンパク質に対する磁気ビーズを試し、効率よく細胞膜タンパク質を分離できることをウェスタン・ブロッティングにより確認した（図1）。この方法では超遠心機を用いずに膜タンパク質を純度良く分離できることから、より簡便で効率的な単離方法である。

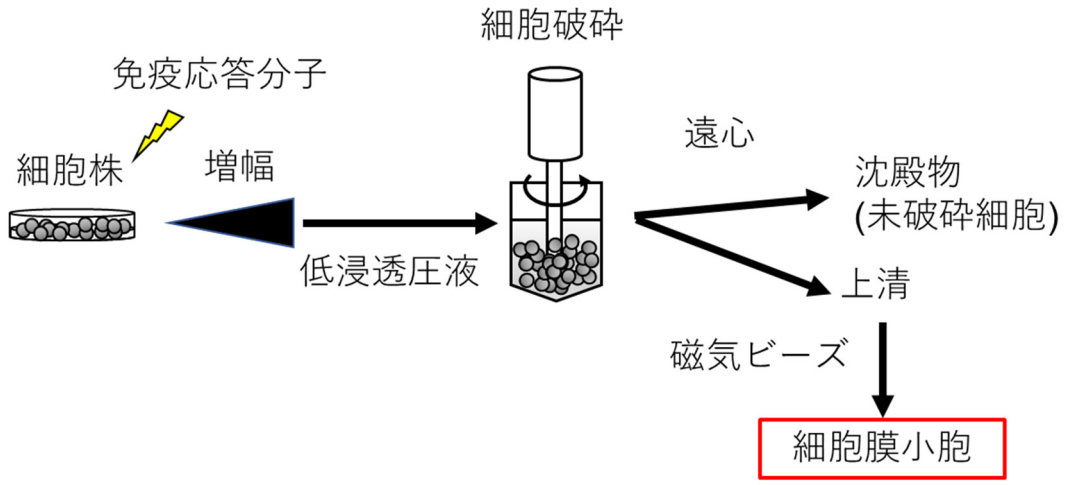


図1. 細胞膜小胞の分離
磁気ビーズを用いて細胞膜成分を分離することで、超遠心を用いずに膜小胞を得ることができる。

2. 免疫応答分子の追加搭載

次に、これまでに搭載したBiTE分子、共刺激分子といった基本的コンポーネントに追加して、免疫応答分子の追加搭載による効果を試験した。特に固形がんに対する治療効果を高めることを考えると、腫瘍微小環境に対する修飾因子の付加が望ましい。そこで免疫チェックポイント分子A、Bに対する阻害抗体、マクロファージなどの免疫微小環境を改善することが知られているサイトカインCを搭載した。逆に、免疫抑制作用が知られているサイトカインDについては、その受容体をナノ粒子上に搭載することで、阻害することを試みた。なお、これらの分子はいずれもマウス遺伝子を標的とした。

まずは*in vitro*の実験で、各免疫応答分子の機能を確認した。免疫チェックポイント分子A、Bについては、がん細胞株に発現させた上で、それぞれに対する阻害抗体を搭載したナノ粒子を加えたところ、その表面発現レベルが低下することが示された。また、サイトカインCについても、T細胞の増殖能、サイトカイン分泌能を亢進させられることを確認した。さらに、サイトカインDに対する受容体を搭載したナノ粒子を細胞培地に加えることで、そのサイトカインが減少した。このようにいずれの分子についてもその機能発現を*in vitro*の実験系で確認した後、*in vivo*における機能解析を行った。マウス腫瘍モデルとして、代表的な細胞株CT26、B16などを用いて、これらの細胞株にCD19分子を強制発現させた上で、CD19に対する免疫応答ナノ粒子で治療するモデルとした（図2）。

元のナノ粒子製剤と比較して、腫瘍微小環境を改善する分子を組み込んだナノ粒子は優れた治療効果を示し、治療されたマウスの生存期間を有意に延長することを確認した（論文投稿準備中）。また、一定期間経過後にマウス腫瘍組織中の免疫細胞構成を調べると、CD8 陽性 T 細胞の割合が増加しており、生体内の T 細胞の増殖を亢進させていることがわかった。さらには組織中の M2 マクロファージの割合が減少しており、これは元のナノ粒子治療では得られなかったことから、上記の免疫応答分子の効果であると考えられた。

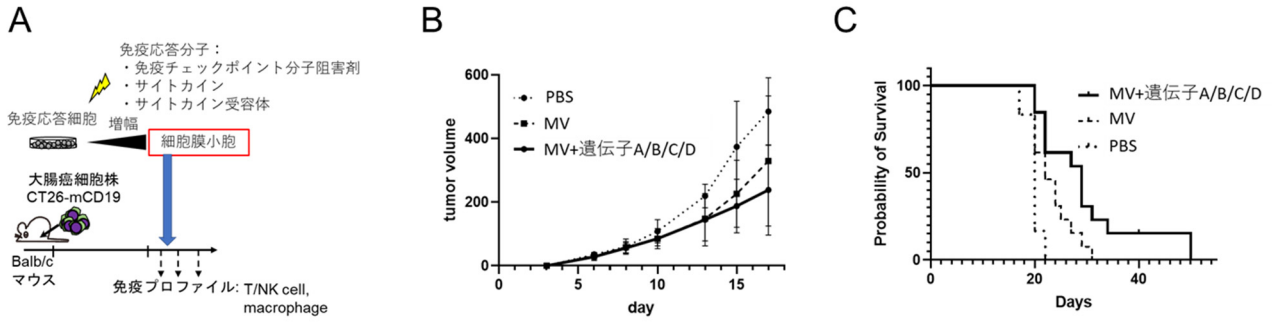


図2. 免疫応答ナノ粒子の治療効果

マウス固形がん腫瘍モデルを用いて、作製した免疫応答ナノ粒子の治療効果を検証した。

A) 本研究で開発した腫瘍微小環境に対する免疫応答分子を搭載した粒子と、従来のナノ粒子で個別に治療を行い、治療の上乗せ効果を検証することとした。腫瘍微小環境を評価するため、免疫が正常のマウスを用いて、マウス細胞に対する各免疫応答分子を搭載した。

B、C) 微小環境を改変する遺伝子群を導入したナノ粒子により治療することで（MV＋遺伝子 A／B／C／D）、非搭載のナノ粒子（MV）、無治療群と比較して優れた腫瘍抑制効果（B）、その結果としての生存期間の延長（C）を達成した。

考　察

本研究課題では、これまでに我々が開発したがん抗原特異的免疫誘導ナノ粒子の改良、及びその製造効率化に関するプロトコール整備を行った。本研究課題で開発を進めたナノ粒子は、細胞製剤にない汎用性と同時に、単一薬剤では得られない多様な免疫応答シグナルを一括して誘導できるという特長を併せ持つ。ナノ粒子体を活用して免疫制御分子を送り込む研究は、まだ実用化はされていないものの、基礎研究レベルでは近年多数の報告がある。これらは例えば、リポソーム上に BiTE 分子を結合させる方法や、またはエクソソームなどの細胞外小胞上に遺伝子改変により BiTE を発現させて回収する技術である。しかし粒子表面への化学的な結合は搭載分子の種類が増えるほどコストが上がるため、本研究のように多数の分子を組み込むことを想定する場合、細胞に製造させる方法の優位性が増すと考えられる。エクソソームへの導入は有望な方法の一つであるが、表面への発現にはテトラスパニン系の分子と融合させる必要があり、細胞膜表面の発現に比して複雑である。また、細胞外小胞の単離技術は純度、効率の面で発展途上であり、細胞を直接破砕して膜小胞を得る方法に比べて回収量がはるかに少ない。以上の点から、本研究開発手法は他の開発中のナノ粒子製剤と比較してもユニークで優位性のある製法であると言える。

一方、細胞膜小胞の単離方法については、磁気ビーズによる単離により工程の簡略化に成功したが、まだ課題がある。細胞膜成分とそれ以外を完全な純度で分離することは不可能で、また回収効率と純度はトレードオフの関係にある。一般的な薬剤と異なり、細胞由来製剤は求められる規格が異なっており、本ナノ粒子は細胞成分を用いる点で、細胞外小胞などと同じカテゴリーに属する。製法については一定のルールが確立されていない領域であるが、今後もさらにプロトコールを改良する必要があると考えられる。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、東京大学大学院工学系研究科総合研究機構の太田誠一である。

文　献

1） Kagoya Y. Dissecting the heterogeneity of exhausted T cells at the molecular level. Int Immunol. 2022;34:547-553. PMID: 35561668, DOI: 10.1093/intimm/dxac016

2） Yoshikawa T, Wu Z, Inoue S, Kasuya H, Matsushita H, Takahashi Y, Kuroda H, Hosoda W, Suzuki S, Kagoya Y. Genetic ablation of PRDM1 in antitumor T cells enhances therapeutic efficacy of adoptive immunotherapy. Blood. 2022;139:2156-2172. PMID: 34861037, DOI: 10.1182/blood.2021012714.

3） Wu Z, Yoshikawa T, Inoue S, Ito Y, Kasuya H, Nakashima T, Zhang H, Kotaka S, Hosoda W, Suzuki S, Kagoya Y. CD83 expression characterizes precursor exhausted T cell population. PMID: 36906640, DOI: 10.1038/s42003-023-04631-6.

4） Ito Y, Kagoya Y. Epigenetic engineering for optimal CAR-T cell therapy. Cancer Sci. 2022;113:3664-3671. PMID: 36000807, DOI: 10.1111/cas.15541.