ナノ DDS 技術を利用した がん免疫療法の開発

第 11 回 日本 DDS 学会奨励賞によせて

Development of cancer immunotherapy based on nano DDS technology : 11th Young Scientist Award, Japan Society of DDS

Takashi Nakamura*

1. はじめに

2019 年 7 月 4 日(木)・5 日(金)を会期とし、第 35 回日本 DDS 学会学術集会在パシフィコ横浜アネックスホールにて開催され、筆者は第 11 回日本 DDS 学会奨励賞を受賞し、受賞講演の機会をいただいた。筆者が初めて DDS 研究に魅力を感じたのは、Theresa M. Allen 先生の講演を拝聴したときであった。原島秀吉教授が担当している薬剤学の授業の一環として行われた。学部 2 年生のときであり、英語の講義にまったくついていけなかったが、ナノサイズのリポソームに薬物を搭載して標的へと効率的に送達するという技術があるということと、その絵は筆者に強烈なインパクトを与えた。2015 年には Allen 先生が再度、当研究室を訪問された際に特別講演会の座長をさせていただき、筆者が DDS 研究者を志したきっかけを感謝とともに伝えることができた。そして、

筆者は、2003 年、北海道大学薬学部 4 年生時に原島秀吉教授が主宰する薬剤分子設計学研究室(以下、当研究室)に所属することができ、DDS 研究をスタートさせた。5 つのテーマのうち、唯一免疫に関連していたテーマを選択したことが現在の研究テーマである「ナノ DDS 技術を利用したがん免疫療法の開発」につながっている。同大学院へと進学し、学位を取得後に同研究室の助教として着任、現在に至るまで 16 年にわたり DDS 研究に携わっている。そのようななかで、名誉ある本賞を受賞できたことは大変光栄に思う。

写真 1 授与式(左から 筆者、松村保広理事長)

* Laboratory for Molecular Design of Pharmaceutics,
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University
北海道大学 大学院薬学研究院 薬剤分子設計学研究室

写真2 受賞講演(筆者)

2. がん免疫療法の躍進と ナノ DDS 技術の位置づけ

筆者が研究を開始した 2004 年当時のがんに対する免疫療法は懐疑的に捉えられており、がんの三大療法からは随分と遠い位置にあった。しかしながら、免疫チェックポイント阻害剤の登場により、がん免疫療法は大躍進を遂げ、今やがんの薬物療法の中心となりつつある。免疫チェックポイント阻害療法は、免疫システムの抑制機構を阻害することによりがんに対する免疫応答を回復あるいは増強させる治療法である。世界初の免疫チェックポイント阻害剤である cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 (CTLA-4) 抗体が 2011 年に FDA に認可され、2014 年には日本発世界初の programmed cell death 1 (PD-1) 抗体が世界に先駆けてわが国で承認された。2016 年には世界初の programmed cell death ligand 1 (PD-L1) 抗体が承認され、2018 年には免疫チェックポイント分子の発見者である James P. Allison 博士と本庶 佑博士がノーベル生理学・医学賞を受賞した。このようにがん免疫療法は世界で最も注目される分野へと大躍進を遂げた。

ナノ DDS、すなわちナノサイズのキャリア型 DDS は、がん抗原、がん抗原を発現する核酸、アジュバント(免疫賦活化剤)などの免疫機能性分子の機能を発揮するための強力なツールである¹⁾。がん抗原はタンパク質やペプチドであるため分解されやすく、細胞への取り込み効率が悪い。核酸も同様である。アジュバントは多様であり、

多くの場合、安定性が低い、溶解性が悪いなどの特徴をもっている。これらはナノ DDS に搭載されることにより、安定性、細胞送達性、溶解性などの問題点が大幅に改善され、実用性を向上させることが可能となる^{2~7)}。また、ナノ DDS に搭載された薬物の動態は、ナノ DDS 側の性能(脂質組成やリガンドなど)によって決定される。本来、免疫チェックポイント分子は過剰な免疫応答を抑える働きを担うため、PD-1 抗体などにより、その機構が阻害されると自己免疫様の症状が副作用として現れる。例えば、免疫チェックポイント阻害剤をナノ DDS に搭載することにより、標的である腫瘍組織のみで作用させることができれば、副作用の大幅な軽減と薬効増強が期待できる。免疫チェックポイント阻害療法の副作用予測やコントロールは臨床現場における重要な課題となっており、このような観点からもナノ DDS 技術はがん免疫療法の発展に貢献できる。

筆者はがん免疫応答を強化するための脂質ナノ粒子(lipid nanoparticle : LNP)を基盤としたナノ DDS 開発を進めており、本稿では最近の成果を中心に紹介させていただく。

3. BCG 菌体成分搭載ナノ DDS の構築と がん免疫療法への展開

がんに対する免疫応答を活性化するためには、アジュバントの使用は不可欠である。弱毒化ウシ型結核菌(Bacillus Calmette-Guerin : BCG)は、表在性膀胱がん治療に使用されているアジュバントであり、有効率 90% を誇る臨床で最も成功しているがん免疫療法である。一方で、高頻度で起こる生菌ゆえの副作用が問題となっており、安全な非感染性製剤の開発が長年望まれてきた。このような状況下、BCG 菌の免疫活性化中心である細胞壁骨格(BCG cell wall skeleton : BCG-CWS)は、非感染性の製剤候補として期待されているが、数十~数百 μm の巨大分子かつ難溶性であるため、細胞への親和性が極端に低いという問題を抱えていた。この長年の問題を打破するために、筆者は BCG-CWS をナノサイズの LNP へと搭載する新規パッケージング法として、Liposome

図1 CWS-LNPの全身投与型がんアジュバントへの応用

BCG 生菌のもつ強力なアジュバント作用を膀胱がん以外のがん種へと応用することができれば、非常に優れたがん免疫療法となる。しかしながら、BCG 生菌や BCG-CWS は、感染や凝集などの問題により、全身投与型がんアジュバントとしての応用が困難である。CWS-LNP は、均一性の高い水性懸濁剤であるため、全身投与型がんアジュバントとして応用可能である。

evaporated via emulsified lipid (LEEL) 法を開発した⁸⁾。本方法は、BCG-CWS がコンパクトな構造をとる疎水環境を維持した状態で LNP への内封を可能にすることで、凝集することなく高い均一性を有する水性懸濁剤を実現した世界初の方法である。BCG-CWS 搭載 LNP (CWS-LNP) は、免疫細胞や膀胱がん細胞に効率的に取り込まれ、マウス膀胱がん皮下移植モデルやラット膀胱がん自然発症モデルに対して強力な抗腫瘍活性を示した⁸⁾。さらに、CWS-LNP による抗膀胱がん作用の誘導メカニズムは、BCG 生菌と同様のメカニズムであることが明らかになった⁹⁾。これらの結果は、CWS-LNP が BCG 生菌の代替え製剤として高いポテンシャルを有していることを示している。また、製剤学的観点から LNP の尿中での安定性を向上させる研究も進めており、カチオン性 LNP にポリエチレングリコール (PEG) 化脂質を導入することで、ヒト尿中での凝集を防ぐことができることを報告している¹⁰⁾。

BCG 菌がもつ高い有効性を膀胱がん以外へと応用することができれば、非常に有望ながん免疫療法となることは容易に想像できる。BCG 菌や BCG-CWS は感染性副作用や難溶性といった問題があるため使用が限定されるが、CWS-LNP

は非感染性かつナノサイズの水性懸濁剤であるため、全身投与、特に静脈内投与型のがんアジュバントとして膀胱がん以外のがんへの応用を試みた (図 1)。マウスの尾静脈より投与した CWS-LNP は、脾臓の抗原提示細胞に効率的に取り込まれ、がん免疫応答に重要な抗原特異的な cytotoxic T lymphocyte (CTL) の活性を増強させた¹¹⁾。また、リンパ腫である E.G7-OVA を皮下移植した担がんマウスモデルに対して、強力な予防的抗腫瘍活性を示した。さらに、CWS-LNP を静脈内投与した後の体重変化と生化学的検査の結果より、高い安全性が示唆されている。これらの結果は BCG-CWS を静脈内投与型のがんアジュバントとして応用した初めての例であり、CWS-LNP の新しい可能性を示したものである。

4. Simulator of interferon genes (STING) 経路を標的としたがんアジュバントシステムの開発

Simulator of interferon genes (STING) 経路は、2009 年に見出された I 型インターフェロン (IFN) 産生を誘導する細胞質 DNA センサーであり、がん免疫応答の開始に重要な経路であること

現在の免疫チェックポイント阻害療法(特にPD-1/PD-L1 抗体療法)の課題は、有効性が一部の患者(20~30%)に限られることである。この課題を解決するために、PD-1/PD-L1 抗体と他のがん治療法(薬物療法、放射線療法、アジュバントなど)を併用した複合がん免疫療法の開発・臨床試験が行われている。このようななか、筆者もPD-1 抗体療法に抵抗性を示すがんに対して、STING-LNP を併用した際の有用性の検証を進めている。先述したB16-F10細胞を用いた肺転移モデルマウスに対して、PD-1 抗体単剤を投与した場合、まったく抗腫瘍活性は認められ

図3 YSK12-MEND による免疫細胞への siRNA 送達

YSK12-MEND は、独自のカチオン性脂質 YSK12-C4 を主成分とした均一かつ保存安定性に優れたナノ粒子であり、マウスやヒト免疫細胞へと効率的に siRNA を導入することができる。

なかったことから、本モデルは PD-1 抗体療法抵抗性であることが示唆された。STING-LNP 単剤の投与は先述したように抗腫瘍活性を示すが、STING-LNP を投与後に PD-1 抗体を併用した結果、抗腫瘍活性の増強が認められた。この結果は STING-LNP の投与により、腫瘍微小環境の免疫状態が変化し、PD-1 抗体療法抵抗性が改善したことを意味している。詳細なメカニズムについては現在解明を進めているところであるが、STING-LNP が PD-1 抗体療法抵抗性を改善する有望なアジュバントシステムとして期待できる。

5. 免疫細胞の機能を遺伝子レベルで制御可能な siRNA デリバリーシステムの開発

siRNA を用いた免疫細胞の遺伝子発現抑制は、基礎研究における強力なツールである。ところが、免疫細胞への siRNA 導入は非常に難しく、ウイルスベクターやエレクトロポレーションなどの特殊な機器が必要である。当研究室では、遺伝子や核酸のデリバリーシステムとして、多機能性エンベロープ型ナノ構造体(Multifunctional envelop-type nano device : MEND)を提唱している^{14,15)}。

筆者は独自のカチオン性脂質 YSK12-C4 を含む MEND(YSK12-MEND)を新たに開発し、免疫細胞への効率的な siRNA デリバリーに成功した(図3)^{16~18)}。マウス樹状細胞を用いて遺伝子発現抑制効果を評価した結果、最も汎用されている強力な siRNA 導入試薬である Lipofectamine® RNAiMAX(RNAiMAX)と比較して、YSK12-MEND は 15 倍以上の効率で遺伝子発現抑制効果を示した¹⁶⁾。さらに、YSK12-MEND を用いて免疫抑制性遺伝子の発現を抑制した樹状細胞の投与は、マウスに皮下移植した腫瘍の増殖を顕著に抑制したことから、がんに対する樹状細胞の効果を増強させる技術として有用であることが示された。また、siRNA 導入が困難であるヒト免疫細胞株(Jurkat、THP-1、KG-1)を用いた検証の結果においても、RNAiMAX がほとんど遺伝子発現抑制効果を示さない siRNA 濃度域で、YSK12-MEND は 80% 以上の遺伝子発現抑制活性を示した¹⁷⁾。その際、細胞毒性はまったく認められなかった。これらの結果より、YSK12-MEND は世界トップクラスの効率で免疫細胞へ siRNA を導入可能なデリバリーシステムであることが示された。

しかしながら、ヒト NK 細胞株である NK-92

に対して YSK12-MEND を作用させた際、70% 以上の遺伝子発現抑制を示したが、顕著な毒性が観察された¹⁷⁾。NK-92 は NK 細胞療法として実用化が進められている特殊な細胞株であることから、NK-92 の遺伝子発現を効果的に制御する技術は高い実用性を秘めている。カチオン性脂質である YSK12-C4 は siRNA と静電的相互作用し、siRNA を搭載する役割も担っているため、YSK12-C4 由来の正電荷と siRNA 由来の負電荷の比率 (Charge ratio : CR) は 16.9 と脂質が過剰となっている。この過剰な YSK12-C4 が毒性の原因となっていると考えられたため、ポリカチオンであるプロタミンを用いて siRNA との静電的相互作用を介したコア粒子を形成させることで YSK12-MEND の脂質量を減らす戦略をとった¹⁸⁾。その結果、CR を 5 まで減らすことにより、細胞毒性が顕著に減少することが明らかになった。一方で、遺伝子発現抑制活性は同程度に維持されていた。細胞取り込み解析やヘモライシス活性評価より、エンドソーム脱出後の細胞内動態がコア粒子を導入することで促進された可能性が示唆されている。

免疫細胞の遺伝子レベルでの機能制御は、遺伝子改変 T 細胞 (CAR-T) 療法が成功したことで注目が高まっている。YSK12-MEND は核酸を免疫細胞へと導入する高いポテンシャルを有していると考えられることから、siRNA 以外の核酸導入も視野にいたれた研究を進め、がんに対する免疫細胞療法の発展に貢献したい。

文献

- 1) Nakamura, T., *et al.*, *Ther. Deliv.*, **8**, 987-1000 (2017)
- 2) Nakamura, T., *et al.*, *Mol. Ther.*, **16**, 1507-1514 (2008)
- 3) Nakamura, T., *et al.*, *Acc. Chem. Res.*, **45**, 1113-1121 (2012)
- 4) Nakamura, T., *et al.*, *Int. J. Pharm.*, **441**, 476-481 (2013)
- 5) Nakamura, T., *et al.*, *J. Control. Release*, **171**, 216-224 (2013)
- 6) Nakamura, T., *et al.*, *Mol. Pharm.*, **11**, 2787-2795 (2014)
- 7) Nakamura, T., *et al.*, *Mol. Pharm.*, **12**, 2791-2799 (2015)
- 8) Nakamura, T., *et al.*, *J. Control. Release*, **176**, 44-53 (2014)
- 9) Nakamura, T., *et al.*, *J. Control. Release*, **196**, 161-167 (2014)

6. おわりに

本稿では、筆者が取り組んできたナノ DDS 技術を利用したがん免疫療法の開発に関する研究を、最近の成果を中心に紹介させていただいた。がん免疫療法や腫瘍免疫学の分野は、この 5 年の間にパラダイムシフトが起こり、急速に発展を続けている。学生のころより、がん免疫療法を促進するための DDS 開発を進めてきた身として非常に嬉しく思う。がん免疫療法における DDS 技術への期待も高まっており、実用化に向けた重要な時期になっていると感じている。日本 DDS 学会奨励賞に恥じぬよう、最新のがん免疫療法開発の潮流を見極めたナノ DDS の設計・開発を進め、がん免疫療法の発展に貢献できる DDS 技術の実用化を目指したい。

謝辞

本研究は、北海道大学大学院薬学研究院 原島秀吉教授の主宰される薬剤分子設計学研究室において遂行されました。素晴らしい研究環境、御指導・御鞭撻を賜りました原島教授に心から御礼申し上げます。ならびに、いつも御協力いただいております同研究室のスタッフ・学生の皆様に心より感謝申し上げます。紙谷浩之教授 (広島大学大学院医歯薬保健学研究院)、小暮健太郎教授 (徳島大学大学院医歯薬学研究部)、秋田英万教授 (千葉大学大学院薬学研究院) には学生のころより多くの御指導を賜りました。ここに感謝の意を申し上げます。また、共同研究者の先生方をはじめ多くの方々には有益な御助言、御支援を賜りましたことを心より感謝いたします。

- 10) Nakamura, T., *et al.*, *Biol. Pharm. Bull.*, **40**, 234-237 (2017)
- 11) Masuda, H., *et al.*, *Mol. Pharm.*, **15**, 5762-5771 (2018)
- 12) Miyabe, H., *et al.*, *J. Control. Release*, **184**, 20-27 (2014)
- 13) Nakamura, T., *et al.*, *J. Control. Release*, **216**, 149-157 (2015)
- 14) Kogure, K., *et al.*, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **60**, 559-571 (2008)
- 15) Nakamura, T., *et al.*, *Biomaterials*, **218**, 119329 (2019)
- 16) Warashina, S., *et al.*, *J. Control. Release*, **225**, 183-191 (2016)
- 17) Nakamura, T., *et al.*, *Sci. Rep.*, **6**, 37849 (2016)
- 18) Nakamura, T., *et al.*, *Mol. Pharm.*, **15**, 2142-2150 (2018)