

悪性脳腫瘍（グリオブラストーマ）に対する免疫チェックポイント阻害剤の効果を飛躍的に高める“化学免疫療法”を実現するナノミセルの開発



喜納 宏昭
Kinoh Hiroaki

1 ナノ医療イノベーションセンターとナノミセル

羽田空港の多摩川対岸に位置し、川崎市キングスカイフロントの中核施設であるナノ医療イノベーションセンターに筆者らの研究室は、ある。筆者らの研究室では、高分子材料の自己組織化により形成される高分子ミセル型 DDS (Drug delivery system) を世界に先駆けて提唱し、様々な国から集まった研究員によって、世界トップレベルの研究開発を行っている。高分子ミセルは、構成するブロック共重合体の精密設計と分子修飾により、任意の薬剤の搭載と放出制御、30~70 nm での精密な粒径制御、標的指向性や環境応答性の賦与といった目的に応じた最適化と高機能化が可能であることから、リポソーム等の従来の DDS 技術とは大きく異なるナノ DDS 技術¹⁾であり、3種類の抗がん剤内包ミセルと核酸医薬搭載ミセルが臨床治験に進んでいる(図1)。抗がん剤内包ミセルは、高分子薬剤が腫瘍へ集積する EPR (enhanced permeability and retention) 効果によってがんへ集積し、がん環境中に応答して、がん細胞へ抗がん剤を放出し、高い抗腫瘍効果を示す。更に正常細胞への抗がん剤の集積、放出を抑えることによって、副作用を抑えることを可能にしている。

今回、グリオブラストーマ(膠芽腫:GBM)を化学免疫治療(エピルビシンミセルと免疫チェックポイント阻害剤(抗PD-1抗体)の併用)によってすべてのGBM脳移植マウスを全身投与(IV投与)によ

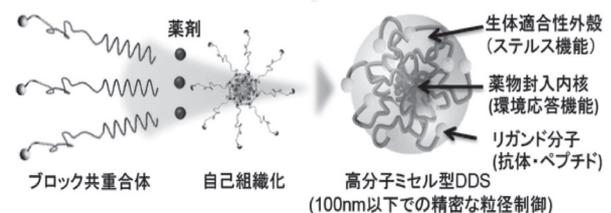


図1 ブロック共重合体の自己組織化に基づく高分子ミセル型 DDS

て完治させることに成功した。特に免疫チェックポイント阻害剤 (ICI) 単独では効果を示さない GBM (PTEN negative GBM) に対してもナノミセルと併用することで顕著な抗腫瘍効果を示した。化学免疫療法は、腫瘍浸潤 T 細胞 (TIL) の数が大幅に増加し、がん細胞を効果的に攻撃するのに対して、免疫反応を妨げる骨髄由来免疫抑制細胞 (MDSC) は有意に減少した。また、再移植に対する拒絶も確認され、再発を防止できることを明らかにした²⁾。

2 pH 応答性エピルビシンミセル

エピルビシンは、1975年にイタリアのファルミタリアカルロエルバ社の F. Arcamone らによって合成・開発されたアントラサイクリン系の抗腫瘍性抗生物質である。エピルビシンは、DNA に直接結合して細胞分裂を抑制し、またトポイソメラーゼ II の阻害によりがんに対して殺細胞性を持つ抗がん剤で心毒性及び造血器官に対して有害事象を及ぼす。

は約10~30%と低く、多くの患者に対して効果がない。(2)ICIには、免疫関連有害事象(immune-related adverse events: irAE)という独特な副作用(間質性肺炎、大腸炎、甲状腺機能低下症、肝障害等)がある。(3)薬価が高い。特に高い抗体薬を使用したにもかかわらず、全く効果のない患者が大半であるため、奏効率の低さを是正するために、化学療法と免疫療法を組み合わせる化学免疫療法(Chemo-Immunotherapy: CIT)の臨床治験が多く試みられている。しかしながら、現在は、ICI単独療法が主であり、有力な化学免疫療法となる抗がん剤が求められている。

4 グリオブラストーマ 膠芽腫

Glioblastoma (GBM)は、極めて病勢進行が速く予後の悪い(5年生存率:10.1%)脳腫瘍で、複数の化合物が医薬品候補物質として臨床開発の途上にあるものの、現時点で生存期間を大きく改善できる薬物療法はない。近年、ICIは、脳腫瘍の新しい治療薬として期待されていたが、GBM患者に対する早期試験で極めて有望とされたICIを含めた免疫療法のいくつかは、大規模第3相試験では奏効しなかった。そのため、膠芽腫腫瘍は特に、免疫応答を巧妙に抑制すると考えられている。最近の研究において、膠芽腫患者においてICI耐性の患者は、PTEN (Phosphatase and Tensin Homolog Deleted from Chromosome10)が変異もしくは欠失しているという報告が複数なされている。また、PTEN遺伝子は、子宮内膜癌と並び膠芽腫で変異していることが知られており、膠芽腫患者の4割近くに及ぶと報告されている。がん抑制遺伝子PTENは、PI3K/Aktシグナルを抑制制御しているため、この機能が変異もしくは欠失するとPI3K/Aktシグナルが異常に増幅し、がん化や転移を促進する。PTENの欠失は、PD-L1の発現を誘導し、更にPD-L1の過剰発現は、T細胞を疲弊(T cell exhaustion)させる。そのため、悪性膠芽腫に対して、ICIは、効果を示さないと考えられている。

5 免疫応答誘導性細胞死 (immunogenic cell death ; ICD)

従来の殺細胞性抗がん剤や放射線治療(RT)の免疫応答のメカニズムが解明されつつあり、その有

望な効果が明らかになってきている。殺細胞性抗がん剤では、がん細胞が死滅してがん抗原が放出されると免疫応答誘導性細胞死(ICD)が誘導され、免疫応答を惹起して、腫瘍細胞を細胞死に至らせることが明らかになっている。ICDとは、殺細胞性抗がん剤や放射線治療によってがん細胞が死ぬことによって、1)がん細胞膜表面に、CRT (Calreticulin)の表出、2)がん細胞からATPの細胞外への放出、3)がん細胞からのHMGB1 (High Mobility Group Box 1)の放出、4)HSP (Heat shock protein)の細胞表面への表出及び放出が確認され、そのシグナルは未成熟な樹状細胞にあるそれぞれの受容体を經由して、成熟した樹状細胞へと誘導する。したがって、脳腫瘍に対してエピルビシンミセルと免疫チェックポイント阻害薬を併用することは、エピルビシンミセルがこのICDを強く誘導することによって、高い相乗効果が期待でき、免疫が抑制されている脳腫瘍に対しても効果が見込めると考えた。

6 エピルビシンミセルとICIの化学免疫療法は、飛躍的に抗腫瘍効果を高める

そこで、筆者らは、2種類のマウス脳腫瘍(GL261 (PTEN positive)とCT2a (PTEN negative))同所モデルを作製し、IVIS (in vivo optical imaging system)及び核磁気共鳴画像法(MRI)で腫瘍の大きさを計測し、エピルビシンミセルとICIによる化学免疫療法の優位性を検証した²⁾。脳腫瘍患者の報告と同様に、PTEN positive GL261は、ICI単独投与(aPD1群)(◆)によって効果を示したのに対して(図3A)、PTEN negative CT2aモデルでは、ICI単独投与(aPD1群)(◆)に対して治療抵抗性を示した(図4C)。また、興味深いことに、GL261モデルにおいて、ミセル化していないエピルビシン投与(Epi)では、全く効果がないのに対して、エピルビシンミセル(Epi/m)投与群は、高い抗腫瘍効果を示す(図3A)。同所移植脳腫瘍へのエピルビシンのがんへの集積を調べてみると、エピルビシンミセルは、エピルビシン単体を投与した場合と比べて160倍腫瘍組織への集積し、正常な脳組織と腫瘍組織でAUCを比較すると、67倍腫瘍組織の方が高く、ナノミセルのエピルビシン脳移行性がGBM組織で顕著に高いことが分かった。次にエピルビシンミセルを用いた化学免疫療法を試みた。

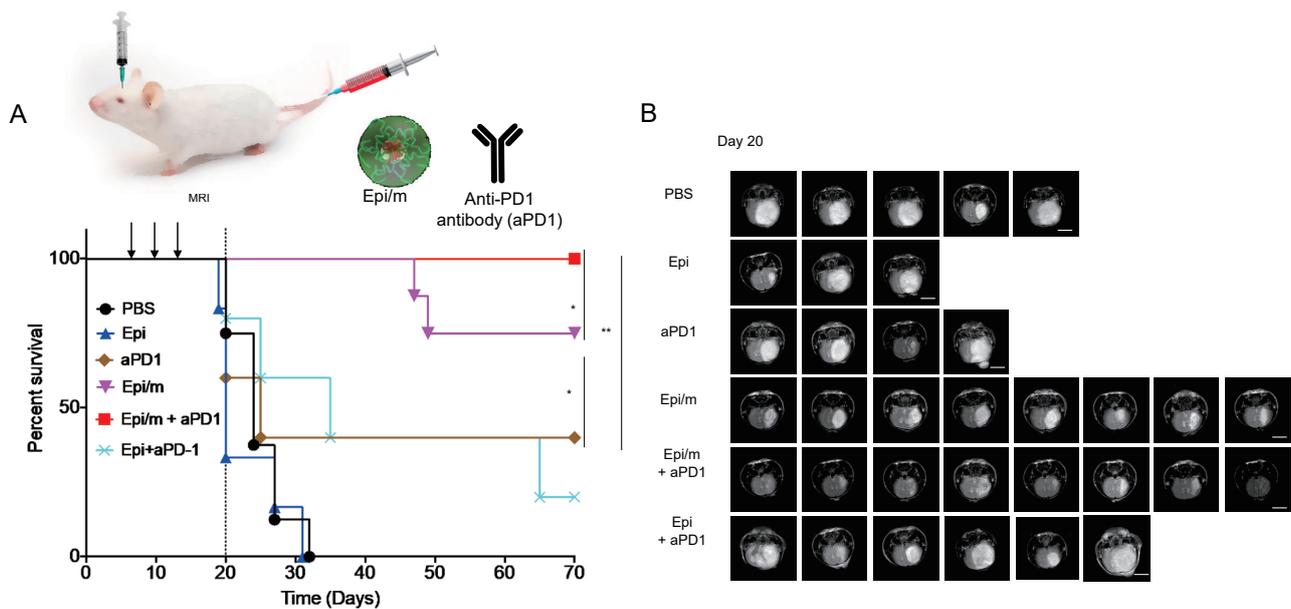


図3 GL261 脳腫瘍同所モデルに対するエピルピシンミセル (Epi/m) と ICI (aPD1) の併用の抗腫瘍効果

(A) 生存曲線 併用療法はがんを完全に殺傷した。(B) 移植 20 日目の各群の MRI 画像

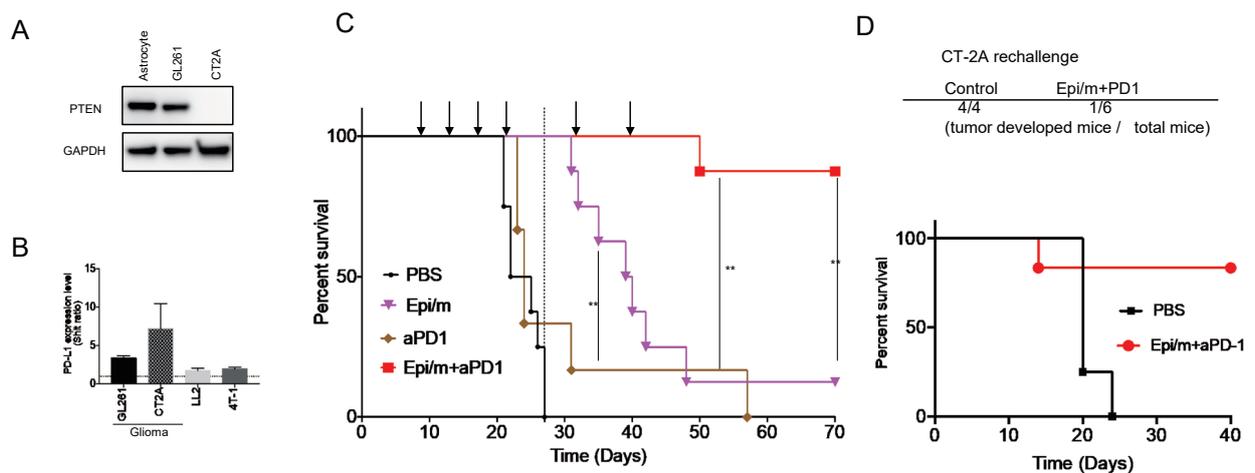


図4 PTEN 欠失 CT2A 脳腫瘍同所モデルに対するエピルピシンミセル (Epi/m) と ICI (aPD1) の併用の抗腫瘍効果

(A) CT2A は PTEN 欠失細胞株, (B) PTEN 欠失 CT2A は, PD-L1 の高い発現が確認される, (D) CT2A は, ICD (aPD1) 耐性 (◆) だが Epi/m との併用によって飛躍的にその効果を増強 (■), (D) 生存したマウスへの再移植の拒絶

GL261 同所移植モデルにおいて, Epi/m 5 mg/kg + 抗 PD1 抗体 5 mg/kg の同時投与 (■) によりすべてのマウスが 70 日以上生存し, エピルピシンミセルと ICI の併用によって顕著な生存期間の延長が観察された (図 3A)。また, 図 3B の MRI 像が示すように移植 20 日目には, Epi/m + aPD1 の治療マウスの白い脳腫瘍の領域がほとんどなくなっていることが確認できた。これに対し, PTEN が欠損した GBM 細胞

(CT2A-luc) を移植したモデルでは, 同一の併用投与量では十分な生存の延長ができなかったが, エピルピシンミセルの投与量を 3 倍増やし Epi/m 15 mg/kg + 抗 PD1 5 mg/kg (■) で生存期間を評価すると, 90% が 70 日以上生存できるようになり ICI 耐性がんに対しても顕著な延命効果を確認できた (図 4C)。長期生存しているマウスに更に CT2a を再移植すると有意に生着の拒絶が確認された (図 4D)。抗腫瘍

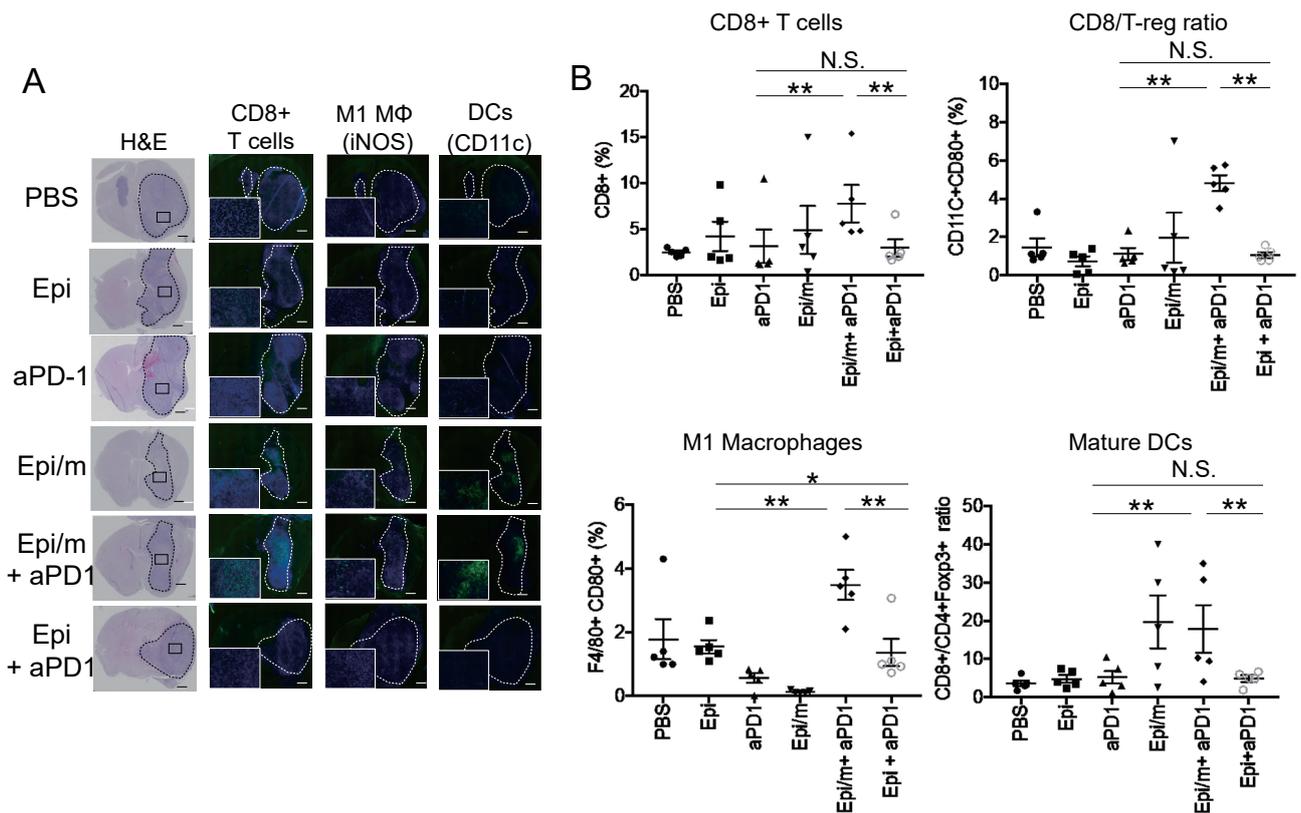


図5 脳腫瘍同所モデルに対するエピルピシンミセル (Epi/m) とICI (aPD1) の併用の抗腫瘍効果

(A) それぞれのマーカー CTL(CD8), M1macrophage(iNOS), DC(CD11c) 担癌マウス脳免疫組織染色像, (B) それぞれの薬剤を投与後, 8日目のがんを取り出し, Flow cytometry解析した

効果において、がん内部へ免疫担当細胞が浸潤することが重要であることが報告されている。そこで、この化学免疫療法による腫瘍浸潤 T 細胞 (TIL) の割合を免疫組織化学及び Flow cytometry によって確認した (図 5)。Epi/m と ICI (aPD1) の組合せによって、がんの内部への浸潤している T 細胞及び M1 macrophage (活性化型 macrophage), 樹状細胞 (DC) の数が大幅に増加し (図 5A,B), 反対に、骨髄由来免疫抑制細胞 (MDSC) の細胞が減少していることが分かった。また、難治がんでは高発現する PD-L1 が、CTL を T 細胞の疲弊によって不活性化する。エピルピシンミセルは、このがんの PD-L1 の発現を抑制し、T 細胞の疲弊を抑制する。更にミセル化は、脾臓や胸腺等への毒性を軽減する (図 6) ことによって、CTL 等の活性を維持し、高い免疫の効果によって腫瘍の攻撃を加速することができる。このエピルピシンミセルを使用した化学免疫療法は、ICI の効果のある患者の割合を上げるのみでなく、ICI の適応のなかった脳腫瘍においても優れた相乗効果があること

をモデルによって証明できた。

7 最後に

筆者らの研究室では、エピルピシンミセルの他にも、脳腫瘍に適応のあるピンブラスチンのミセル³⁾ リリース速度の異なるエピジェノム阻害剤 JQ1 ミセルの開発に成功している⁴⁾。また、血液脳関門 (Blood brain barrier) を越えて脳へ移行可能なりガンドミセル⁵⁾、Triple negative 乳癌に対する治験が進行中である Unit Poly Ion complex (uPIC) siRNA ミセル⁶⁾ の成功や、新型コロナウイルスとなる mRNA ミセルの開発に取り組んでいる。筆者らのセンターでは、常に実用化を目指し、知財の確保やベンチャー会社や製薬会社への導出等、より早く患者の元へ届けられるように体制を整えている。

謝辞

本研究は、COI プロジェクト / スマートライフケ

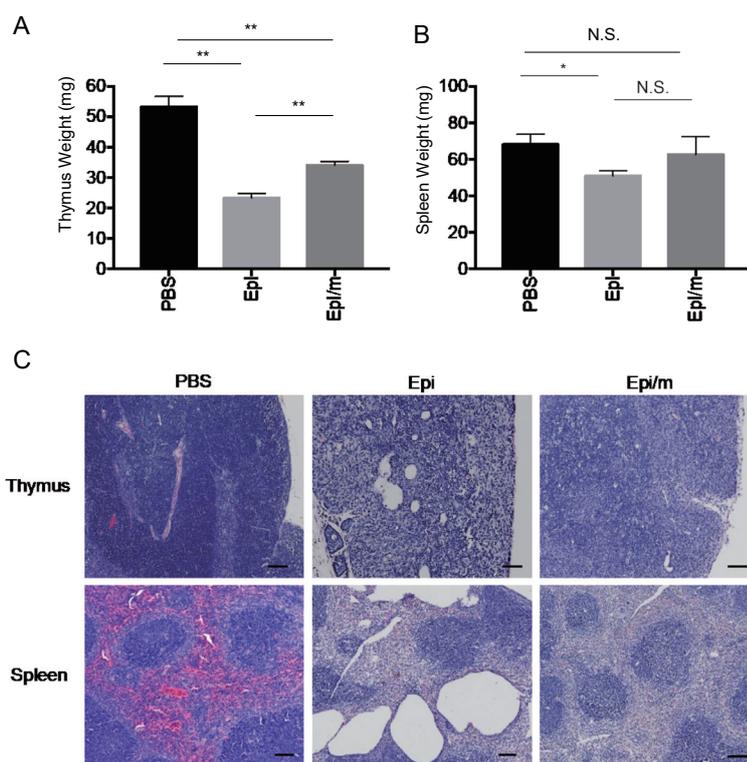


図6 エピルピシンミセルはエピルピシンの副作用を抑制する

PBS 5 mg/kg Epi, 5 mg/kg Epi/m 投与後の胸腺 (A) 脾臓 (B) の重量と HE 染色像 ミセル化によって免疫担当器官である胸腺, 脾臓の副作用の軽減がみられる

ア社会への変革を先導するものづくりオープンイノベーション拠点 (JPMJCE1305) の支援を受けたものである。本研究において、常に有効な議論及び指導していただいたナノ医療イノベーションセンター長 片岡一則先生, 東京大学大学院工学系研究科 カブラル先生, ナノ医療イノベーションセンターの片岡・喜納ラボの研究員, 技術員の皆様に感謝申し上げます。

参考文献

- 1) Cabral, *et al.*, *Chem. Rev.*, **118**, 6844 (2018)
- 2) Kinoh, *et al.*, *ACS Nano.*, **14**(8), 10127-10140 (2020)
- 3) Quader, *et al.*, *Biomaterials*, **267**, 120463 (2021)
- 4) Shibasaki, Kinoh, *et al.*, *ACS Nano*, in press (2021)
- 5) Anraku, *et al.*, *Nat. Commun.*, **8**, 1001 (2017)
- 6) Watanabe, *et al.*, *Nat. Commun.*, **10**, 1894 (2019)

((公財)川崎市産業振興財団 ナノ医療イノベーションセンター)