



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	siRNA搭載脂質ナノ粒子による腫瘍微小環境のリプログラミングと新規がん治療法への展開 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	遠藤, 力斗
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(臨床薬学)
Dissertation Number	甲第14407号
Issue Date	2021-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/81485
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Rikito_Endo_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称 博士（臨床薬学） 氏 名 遠藤力斗

学 位 論 文 題 名

siRNA 搭載脂質ナノ粒子による腫瘍微小環境のリプログラミングと新規がん治療法への展開

【研究背景と目的】

近年、抗 PD-1 抗体に代表される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。しかしながら、抗 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の向上が必要である。この治療に対する抵抗性には、腫瘍微小環境 (tumor microenvironment: TME) における非常に複雑かつ様々な免疫抑制機構が関与している。故に、TME におけるがん免疫機構の正常状態へのリプログラミングは、これまで治療困難であったがん患者に対して利益をもたらす可能性を秘めている。しかしながら、TME における複雑な免疫システムを制御するためには、既存技術である低分子阻害剤や中和抗体だけでは困難である。そこで、これらの治療戦略に代わる新たなツールとして small interfering RNA (siRNA) を利用した遺伝子レベルでの制御が期待されている。理論上、siRNA は細胞表面や細胞内に関わらず、すべての遺伝子を標的にすることができ、がん免疫機構の多様性および複雑性に対応可能である。当研究室では核酸の送達技術として、多機能性エンベロープ型ナノ構造体 (multifunctional envelope-type nano device: MEND) の開発を進めており、免疫細胞および腫瘍血管内皮細胞 (tumor endothelial cell: TEC) への効率的な siRNA の送達に成功している。本研究では、siRNA 搭載 MEND を用いることで、TME における免疫機構のリプログラミングを行い、がん免疫療法の有効性を増強させることを目的とした。

【結果・考察】

1. siRNA 搭載 MEND による機能強化を施した樹状細胞を用いた免疫細胞療法

がん免疫療法の一つに、体外で患者の細胞から誘導した樹状細胞 (dendritic cell: DC) を活性化し再び体内に戻す DC 療法がある。しかし、活性化された DC は免疫抑制性因子であるインドールアミン 2,3-ジオキシゲナーゼ 1 (IDO1) を発現し、活性化 T 細胞の抑制やがん免疫抑制に関わる制御性 T 細胞 (regulatory T cell: Treg 細胞) を TME 内に誘導し、DC 療法の効果を減弱させる。故に、活性化した DC における IDO1 の抑制は有用な戦略となる。当研究室では、免疫細胞に効率的に siRNA を送達可能な独自のカチオン性脂質 YSK12-C4 を含む MEND (YSK12-MEND) の開発に成功している。本項では、IDO1 を標的とした siRNA (siIDO1) を搭載した YSK12-MEND (siIDO1/YSK12-MEND) を用いることで、IDO1 抑制 DC 療法による TME 内の免疫抑制機構の改善を目的とした。最初に、マウスの骨髄細胞から誘導した bone marrow-derived dendritic cell (BMDC) に siIDO1/YSK12-MEND をトランスフェクションした後、IDO1 のノックダウン効率を定量的 RT-PCR 法を用いて評価した。その結果、siRNA が 20 nM (134 ng) という低用量にも関わらず、約 70% の効率で IDO1 のノックダウンに成功した。さらに、市販の siRNA トランスフェクション試薬と IDO1 のノックダウン効果を比較したところ、YSK12-MEND は低用量で効率的に遺伝子ノックダウン活性を誘導することが示唆された。続いて、IDO1 をノックダウンした BMDC を用いて、マウスリンパ腫 (E.G7-OVA) 皮下移植モデルに対する DC 療法の有用性を評価した。E.G7-OVA 皮下移植モデルに YSK12-MEND を用いて IDO1 をノックダウンした BMDC を投与した結果、Control siRNA 搭載 YSK12-MEND をトランスフェクションした BMDC 投与群と比較して、有意な腫瘍増殖抑制効果が認められた。さらに、治療後マウスから腫瘍組織を摘出し、腫瘍

内における Treg 細胞の変化を定量的 RT-PCR 法を用いて評価した。その結果、IDO1 ノックダウン BMDC を投与した群において Treg 細胞のマーカーである forkhead box P3 (Foxp3) および CD25 の遺伝子発現の減少が確認された。このことから、IDO1 ノックダウン BMDC を用いることで腫瘍内の Treg 細胞が減少し、抗腫瘍活性の増強に繋がったことが示唆された。

2. siRNA 搭載 MEND を用いた TEC の機能制御によるがん治療の強化

TME におけるがん免疫機構の抑制システムの一つとして TEC による活性化 T 細胞の腫瘍内への浸潤抑制がある。TEC は Fas ligand (FasL) を細胞表面に発現しており、活性化 T 細胞を選択的にアポトーシスさせることで腫瘍内への浸潤を抑制している。故に、TEC 上の FasL の阻害は T 細胞の腫瘍内浸潤と抗腫瘍効果を促進する。当研究室では TEC に発現している $\alpha V\beta 3$ インテグリンに選択的に結合する cyclic RGD ペプチド (cRGD) を MEND に修飾した cRGD-MEND を開発し、TEC に効率的に核酸を送達することに成功している。本項では、FasL を標的とした siRNA (siFasL) を搭載した cRGD-MEND (siFasL/cRGD-MEND) を用いて TEC における負の要因を制御し、TME おける免疫機構のリプログラミングを行うとともに、様々ながん治療法を併用する複合がん免疫療法としての有用性を検討した。最初に、血管内皮細胞マーカーである CD31 を標的とした siRNA (siCD31) を搭載した cRGD-MEND (siCD31/cRGD-MEND) の TEC における遺伝子ノックダウンを試みた。これまでに報告された方法に従い cRGD-MEND (脂質組成: YSK05/Cholesterol/1,2-dimyristoyl-sn-glycerol, methoxypolyethylene glycol (PEG2000-DMG)/cRGD 修飾 N-(carbonyl-methoxypolyethylene glycol 2000)-1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (cRGD-PEG2000-DSPE) = 70/30/3/3 (mol%)) を調製し、TEC 上に FasL の発現が報告されているマウス結腸がん (CT26) を皮下移植したモデルマウスに投与後、腫瘍内の CD31 のノックダウン効率を定量的 RT-PCR 法を用いて評価した。その結果、従来の cRGD-MEND では腫瘍内における CD31 のノックダウン活性がほとんど確認されなかった。そのため、新たに CT26 皮下移植モデルに最適な cRGD-MEND の検討・調製を行うこととした。cRGD-MEND 表面の PEG や cRGD 修飾 PEG の密度が TEC への送達性や細胞内動態に影響を与えると考え、PEG2000-DMG および cRGD-PEG2000-DSPE の修飾量の最適化を行った。上記と同様の方法を用いて CT26 皮下移植モデルに cRGD-MEND を投与した結果、cRGD-PEG2000-DSPE に最適値があることが明らかとなり、1 mol% において約 80% の活性効率を示した。以上のことから、CT26 腫瘍組織内の TEC 由来遺伝子を高効率でノックダウン可能な cRGD-MEND を構築することに成功した。次に、最適化した cRGD-MEND に siFasL を搭載し、CT26 皮下移植モデルに対する FasL 制御の有用性を評価した。また、更なる治療効果の向上を期待して、がん免疫応答を促進する Stimulator of interferon genes (STING) 経路のアゴニストを YSK12-MEND に搭載した STING-MEND と siFasL/cRGD-MEND を併用することとした。CT26 皮下移植モデルに siFasL/cRGD-MEND および STING-MEND を投与した結果、PBS、コントロール siRNA (siLuciferase) 群と比較して顕著な治療効果が認められた。また、その治療効果発現は従来のがん免疫療法よりも明らかに早かった。続いて、マウスから腫瘍組織を摘出し、腫瘍内における種々の遺伝子発現変化を定量的 RT-PCR 法を用いて評価した結果、当初の予想に反し、併用療法群において T 細胞を含めた免疫細胞の腫瘍内浸潤が起こっていないことが示唆された。一方で、併用療法群では著しい TEC の減少が起きている可能性が示唆された。以上のことから、siFasL/cRGD-MEND と STING-MEND の併用による抗腫瘍活性は、従来とは異なるメカニズムにより誘導されている可能性がある。

【総括】

- YSK12-MEND は DC に発現する抑制性因子 IDO1 の発現を高効率に制御し、TME における免疫機構のリプログラミングにより DC 療法の効果増強を実現した。
- siFasL/cRGD-MEND と STING-MEND の併用療法は従来のがん免疫療法にはない迅速かつ顕著な抗腫瘍活性を示し、その効果は TEC の減少に起因している可能性が示唆された。