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
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k14407
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/84555
Type	doctoral thesis
File Information	Rikito_Endo.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

博士学位論文

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

遠藤力斗

北海道大学大学院生命科学院

臨床薬学専攻

薬剤分子設計学研究室

2021 年 3 月

【目次】

略語表 4

序論 7

本論

第 1 章：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 12

緒言 13
実験結果 16
1-1. siRNA 搭載 YSK12-MEND の調製 16
1-2. BMDC における YSK12-MEND による IDO1 遺伝子ノックダウンの評価 17
1-3. BMDC における YSK12-MEND の細胞内取り込み効率の評価 19
1-4. YSK12-MEND と各トランスフェクション試薬間における物性値の比較 20
1-5. YSK12-MEND による IDO1 ノックダウンが BMDC の表現型に及ぼす影響 20
1-6. IDO1 をノックダウンした BMDC の投与による抗腫瘍活性の評価 21
1-7. IDO1 ノックダウン BMDC による抗腫瘍活性メカニズムの解析 22
考察 24
小括 26

第 2 章：siRNA 搭載 MEND を用いた腫瘍血管内皮細胞の機能制御によるがん治療の強化27

緒言 28
実験結果 31
2-1. siRNA 搭載 cRGD-MEND の調製 31
2-2. TEC における cRGD-MEND による CD31 遺伝子ノックダウン活性の評価 33
2-3. cRGD-MEND が標的外組織の血管に及ぼす影響 33
2-4. TEC における cRGD-MEND による FasL 遺伝子ノックダウン活性の評価 35
2-5. cyclic di-GMP 搭載 YSK12-MEND の調製 35
2-6. siFasL 搭載 cRGD-MEND と STING-MEND の併用療法による抗腫瘍効果の評価 37

2-7. siFasL 搭載 cRGD-MEND と STING-MEND の併用療法後におけるの腫瘍内の免疫ステータスの解析 39
2-8. siFasL 搭載 cRGD-MEND と STING-MEND の併用療法後における腫瘍内の血管関連因子の解析 40
2-9. siFasL 搭載 cRGD-MEND と STING-MEND の併用療法による抗腫瘍活性誘導における T 細胞の影響 41
2-10. siFasL 搭載 cRGD-MEND と STING-MEND の併用療法による抗腫瘍活性誘導における I型 IFN の影響 41
考察 43
小括 46

総括 47

実験材料・実験方法 48

参考文献 62

謝辞 69

【略語表】

Ang1	angiopoietin 1
APC	allophycocyanin
BMDC	bone marrow- derived dendritic cell
BSA	bovine serum albumin
cGAMP	cyclic-GMP-AMP
cGAS	cyclic-GMP-AMP synthase
cdGMP	cyclic di-GMP
cRGD	cyclic RGD
CSF1R	colony stimulating factor 1 receptor
CTL	cytotoxic T lymphocyte
CTLA-4	cytotoxic T lymphocyte associated protein 4
DC	dendritic cell
DDS	drug delivery system
DDW	double distilled water
DDX41	DEAD-box helicase 41
DEPC	diethylpyrocarbonate
DNA	deoxyribonucleic acid
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EPR	enhanced permeability and retention
FACS	fluorescence activated cell sorting
FasL	fas ligand
FBS	fetal bovin serum
FDA	food and drug administration
Foxp3	forkhead box P3
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GCN2	general control nonderepressible 2
GS	GeneSilencer
GSDMD	gasdermin D
HEPES	4- (2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
IARC	international agency for research on cancer
IDO1	indoleamine 2,3-dioxygenase 1
IFN	interferon
IL-1β	interleukin-1β

IL-12	interleukin-12
IL-18	interleukin-18
IFNAR-1	interferon alpha/beta receptor 1
IRF3	interferon regulator factor 3
Luc	luciferase
LNP	lipid nanoparticle
RNAi MAX	Lipofectamine RNAi MAX
MDSC	myeloid derived suppressor cells
MEND	multifunctional envelope-type nano device
MHC	major histocompatibility complex
Ng2	neuron-glial antigen 2
NK	natural killer
OVA	ovalbumin
PBS	phosphate-buffered saline
PD-1	programmed cell death 1
PD-L1	programmed cell death ligand 1
PDI	polydispersity index
PEG	polyethylene glycol
PEG_{2000}-DMG	1,2-dimyristoyl-rac-glycero-3-methoxypolyethylene glycol-2000
PEG_{2000}-DSPE	N-(carbonyl-methoxypolyethylene glycol 2000)-1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine
pH	potential of hydrogen
PRRs	pathogen-recognition receptor
RT-PCR	reverse transcription PCR
RISC	RNA-induced silencing complex
RNA	ribonucleic acid
siRNA	small interfering RNA
SOCS1	suppressor of cytokine signaling 1
STING	stimulator of interferon genes
TAM	tumor associated macrophage
t-BuOH	tert-butyl alcohol
TBK-1	tank binding kinase 1
TEC	tumor endothelial cell
TME	tumor microenvironment
TNF	tumor necrosis factor
Treg	regulatory T cell

VEGF	vascular endothelial growth factor
VEGFR-2	vascular endothelial growth factor receptor 2
WHO	world health organization

【序論】

現在、世界の死因としてその大部分が非感染性疾患で占められており、中でも悪性新生物（がん）は世界各国における主要な死因として位置づけされている。2018 年、世界保健機関（world health organization : WHO）の外部組織である国際がん研究機関（international agency for research on cancer : IARC）は、世界各国における主な部位のがん罹患、死亡に関するデータベースである「GLOBOCAN」を用いて、185 ヵ国、36 種類のがんにおけるがんの発症や死亡に関する統計を報告した [1]。その統計によると、世界で 2018 年に新たにがんに罹患した人は 1810 万人、がんにより死亡した人は 960 万人と推計されており、「GLOBOCAN」を用いた過去の推計と比較して、その人数は大きく上昇していることが明らかとなった。また、日本においてもがんは 1981 年以降、原因疾患別死亡者数の割合で第 1 位を占めており、さらに厚生労働省の報告では 2019 年における死亡者のうち、がんにおける割合は 27.3%であり、近年この数値は大きく変動していない。現在、がんに対する治療戦略は外科手術療法・化学療法・放射線療法の三大療法、または複数の治療法を組み合わせた複合療法が主流であり、これまでに様々ながん治療戦略が提案され多くのがん患者に利益をもたらした。ところが、これらの治療法はがんの進行初期では高い有効性を示したものの、末期ではがん細胞が全身に転移するため、外科療法や放射線療法による治療は極めて困難であり適用できない場合が多い。一方で、化学療法は全身のがん細胞を標的とすることができるためがん末期でも適用が可能である。しかしながら、その有効性はがんの進行を遅延させる程度であり、がんの性質や病期によってもその効果は大きく異なるため、未だに多くのがん種において十分な成果を得られていないのが現状である。以上のように、既存のがん治療戦略だけでは全てのがん患者に対して十分に対応できないため、がんに対する新たな治療法の開発が世界中で強く求められている。

近年、上記で示した治療法に代わる第 4 のがん治療戦略として「がん免疫療法」が登場し、がん治療においてパラダイムシフトをもたらした [2]。がん免疫療法は、ヒトの体内に元々備わる免疫システムを制御することでがんを排除する治療法であり、その代表例として免疫チェックポイント阻害剤が挙げられる [3]。免疫チェックポイント分子は、生体内における免疫機能の恒常性を維持するために存在しており、自己に対する免疫応答や過剰な免疫応答を制御するための分子として機能している。一方、がん組織では、この制御システムが逆に利用されてしまい、がん細胞の排除に関わる免疫系を抑制することで、がんの増殖を助長している。現在までに、programmed cell death 1（PD-1）、programmed cell death ligand 1（PD-L1）、cytotoxic T lymphocyte associated protein 4（CTLA-4）など、いくつかの免疫チェックポイント分子とそのリガンドの存在が確認されており、これらの分子を標的とする免疫チェックポイント阻害剤は、非小細胞性肺がん、結腸・直腸がん、ホジキンリンパ腫、頭頸部扁平上皮がん、皮膚がん、肝臓がん、腎細胞がん、悪性黒色腫など、様々ながん種において強

力ながん治療効果を誘導することに成功している[4-11]。しかしながら、これらによる治療効果は一部のがん患者でのみでしか認められず、ほとんどの患者では十分な成果を得ることができなかった[12,13]。この治療に対する抵抗性の原因の一つとして、腫瘍微小環境（tumor microenvironment：TME）の存在が挙げられる。TME はがん組織とその周辺に存在する免疫細胞、線維芽細胞、血管、細胞外マトリックス、および複数の細胞外可溶性分子（サイトカイン、ケモカイン、がん成長因子など）から構成されており、がんの成長・転移の促進と宿主の免疫システムの制御に大きく関与することから、がん分野の研究において非常に重要な位置づけとされている[14]。また、がんは TME が示す免疫状態の違いにより、「hot tumor」および「cold tumor」に大別される（図１）[15]。

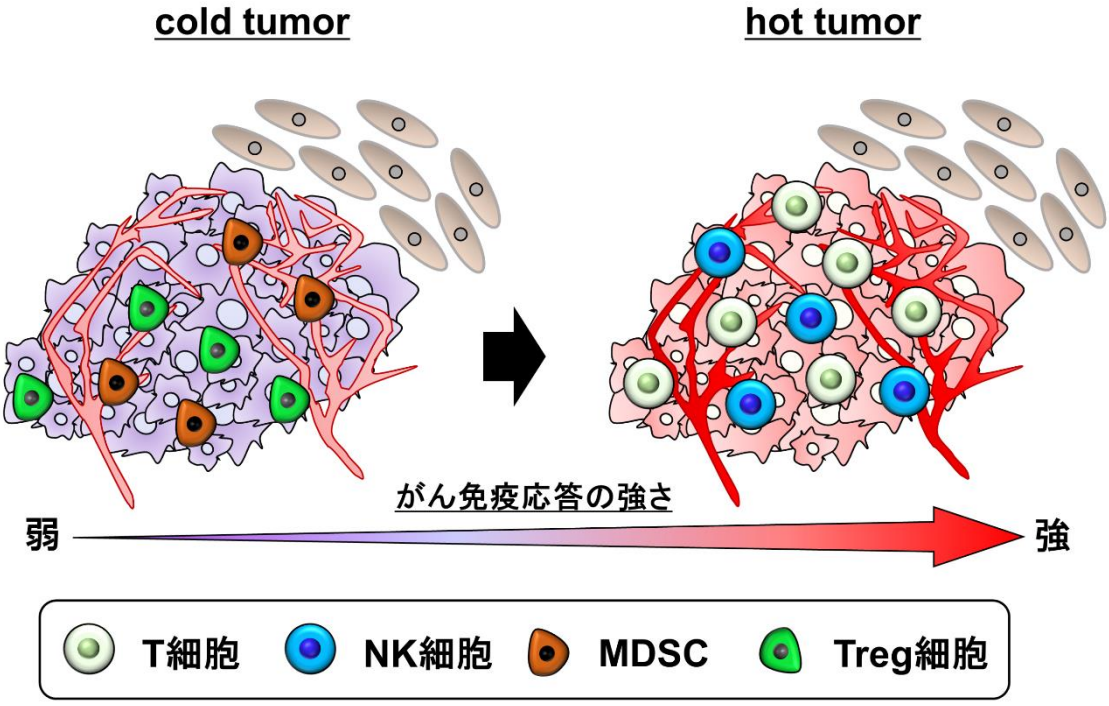


図１　cold tumor および hot tumor の特徴

hot tumor は、がん組織内に T 細胞の浸潤が認められるものの、その機能が免疫抑制因子により著しく制限されたタイプの腫瘍であり、一般的に既存の免疫チェックポイント阻害剤は hot tumor に対してのみ有効性を示す[16]。一方で、cold tumor は T 細胞のプライミングと活性化が完全に誘導されない、またはがん組織内への細胞傷害性 T 細胞（cytotoxic T lymphocyte：CTL）の浸潤が阻害されたタイプの腫瘍であり、がん免疫療法に対して耐性を示すがん患者の多くは cold tumor の特徴を有している。故に、cold tumor から hot tumor への改善は、がん免疫療法による治療効果を高める上で重要である。また、がんの cold tumor 化は、TME 内の免疫抑制細胞（腫瘍関連マクロファージ（tumor associated macrophage：TAM）、骨髄由来抑制性細胞（myeloid derived suppressor cells：MDSC）、制御性 T 細胞（Treg 細胞）

など)、血管、間質、抑制性サイトカインなどの様々な免疫抑制因子が複雑に絡むことで誘導されるため、がんの根治を達成するためには多角的な治療アプローチが必要であり、これまでに複数の治療戦略が提案されてきた。例えば、cold tumor の代表例であるマウス神経膠芽腫を移植したマウスに対して、T 細胞やナチュラルキラー（NK）細胞の増殖・活性化に寄与する Interleukin-12（IL-12）と免疫チェックポイント阻害剤である抗 CTLA-4 抗体を併用投与した結果、TME 内における T 細胞と NK 細胞の活性化および Treg 細胞の大幅な減少に起因する強力な抗腫瘍活性を誘導することに成功している [17]。また別の研究報告では、TAM の形成に関与するコロニー刺激因子 1 受容体（colony stimulating factor 1 receptor：CSF1R）の阻害剤をマウス神経膠芽腫モデルに投与した結果、TAM の中でもがん免疫応答の抑制に寄与する M２型マクロファージのみを抑制することに成功し、腫瘍体積の有意な減少と生存率の増加を可能とした [18]。従って、cold tumor を hot tumor に変換する治療戦略を開発することは、これまで治療困難であった腫瘍に対するがん免疫療法の感受性を増幅させ、強力な抗腫瘍活性の誘導に繋がる可能性がある。しかし、これらの低分子医薬品や抗体医薬品などの既存技術は細胞外分子の制御は可能であるものの、細胞内分子には対応することができないため、TME に存在する全ての免疫関連因子を制御することは極めて困難であり効果が発現するがん種も限られている。故に、これらの技術に代わるより高度な治療戦略が求められている。

近年、TME における複雑な免疫システムを制御する新たなツールとして small interfering RNA（siRNA）を用いた遺伝子レベルでの機能制御が注目されている。siRNA は 21 塩基程度の小さな二本鎖 RNA であり、細胞内に導入された siRNA は細胞質で RISC（RNA-induced silencing complex）と呼ばれる複合体を形成し、siRNA のアンチセンス鎖と相補的な塩基配列を有する messenger RNA（mRNA）を切断し、タンパク質への翻訳を阻害することで標的分子の機能を抑制することができる [19]。また、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、既存技術では対応が困難であった複雑ながん免疫ネットワークを制御することが可能である。一方で、siRNA は分子量約 13,000 の負電荷を有する親水性高分子であるため、siRNA 単独では TME を構成する細胞内に導入することが難しい。また、血中に投与した場合、腎排泄により速やかに体内から除去されてしまう。さらに、siRNA は生体内に豊富に存在するヌクレアーゼによって容易に分解される。故に、TME を構成する種々の細胞に対して siRNA を効率的に送達できる技術の開発が強く望まれており、その有力な候補の一つとして脂質ナノ粒子（lipid nanoparticle：LNP）を用いた核酸送達システムが挙げられ、世界中で研究・開発が盛んに行われている。LNP は生体膜の構成成分であるリン脂質等を主成分とする非ウイルスベクターであり、従来の遺伝子導入ベクターであるレトロウイルスやアデノウイルスなどのウイルスベクターと比較して毒性や抗原性が低いことから、安全性の高い核酸送達システムとして期待されている。また、遺伝子の導入効率の面では、核内まで遺伝子の送達が可能であるウイルスベクターに優位性があるものの、siRNA による RNA 干渉に基づいた遺伝子発現の制御は細胞質で起こる現象であるた

め、LNP でも十分にその役割を果たせると考えられている。実際、2018 年には RNA 干渉を利用した世界初の LNP 製剤である「Patisiran」[20] が food and drug administration（FDA）により承認されたこともあり、今後 LNP を利用した様々な核酸ナノ医薬品の実用化が期待される。

また、全身投与によりがん組織に LNP を送達するために、polyethylene glycol（PEG）で LNP 表面を修飾する手法が汎用されている。がん組織では細胞の分裂・増殖を永続的に行うために、大量の酸素や栄養を必要とする。そのため、がんは周囲の毛細血管から新たに「新生血管」を作り出すことで、成長に必要な因子を効率的に取り込む機能を有している。新生血管の血管壁は正常血管よりも荒く、100〜200 nm 程度の隙間が多数存在しているため、血管透過性が著しく亢進している。基本的に、血中に長時間滞留する高分子化合物はこの間隙を介して受動的にがん組織へ移行する。また、がん組織では高分子化合物の組織外への排除に関与するリンパ管が未発達であるため、がん組織に移行した高分子化合物は徐々に蓄積される。このような特徴は enhanced permeability and retention（EPR）効果 [21,22] と呼ばれ、がんに対する受動的なターゲティングを行う上で重要な因子となっている。先述した LNP への PEG 修飾は、LNP 表面に水和層の形成を誘導し血漿タンパク質の吸着を抑制する。その結果、100〜200 nm 程度の大きさに制御された PEG 修飾 LNP は血中で長時間滞留することが可能となり、最終的に EPR 効果によってがん組織へ蓄積される。現在、がんに対するナノ粒子製剤のほとんどが EPR 効果を介した受動的な標的化能を有するものである。しかし近年、EPR 効果を利用したドキソルビシン封入リポソーム（商品名：Doxil）における複数の臨床試験のメタ解析の結果より、ヒトにおいて統計学的に有意な治療効果が認められないことが報告され [23]、ヒトでの EPR 効果を利用したがん治療戦略において懐疑的な見方が広まっている。現在、この問題はナノ医薬品の開発において大きな障壁となっており、EPR 効果を介さない drug delivery system（DDS）の研究・開発が世界中で精力的に行われているが、未だ十分な成果は報告されていない。

当研究室では、siRNA 送達システムとして、独自の非ウイルスベクターである多機能性エンベロープ型ナノ構造体（multifunctional envelope-type nano device：MEND）の研究・開発を進めており、これまでに様々な組織・細胞への効率的な siRNA の送達および標的因子の制御に成功している [24-30]。例えば、*in vivo* において MEND は TME 内のがん免疫機構の抑制に深く関与する腫瘍血管内皮細胞（tumor endothelial cell：TEC）に siRNA を送達することが可能であり、血管内細胞マーカーである CD31 遺伝子を効率的にノックダウンすることに成功している [27]。さらに、腫瘍内の血管新生に関与する血管内皮増殖因子（vascular endothelial growth factor：VEGF）受容体を標的とした siRNA を搭載した MEND をヒト腎臓がん皮下移植モデルに投与した結果、兵糧攻めによるがんの退縮と TEC のリモデリングを誘導することに成功した [28]。また、MEND は TME 内の免疫システムを制御するがん治療戦略の一つとして非常に期待されている「免疫細胞療法」への応用も可能であり、siRNA の導入が極めて困難である T 細胞、NK 細胞、樹状細胞（dendritic cell：DC）などの免疫細胞に対して効率

的な siRNA 送達と遺伝子発現の抑制に成功している[25,26]。さらに、MEND を用いて DC 内の抑制性因子である suppressor of cytokine signaling 1（SOCS1）をノックダウンした DC をマウスリンパ腫担癌モデルに投与した結果、SOCS1 をノックダウンした DC 投与群において、がんに対する高い予防効果および治療効果を示したことから免疫細胞療法としての有用性が証明された[25]。このことから、MEND は TME を構成する様々な免疫抑制機能を有する細胞にも応用可能であることが示唆され、これまでに治療効果が全く認められなかった種々のがん種に対して、がん免疫療法の感受性を増強させる可能性を秘めたツールであると考えられる。

本研究では siRNA 送達キャリアである MEND を基盤技術として、これまで実現が困難であった EPR 効果に依存しないナノ DDS を設計・構築し、TME を構成する種々の免疫抑制因子を制御することで、cold tumor 状態のがん組織を hot tumor に変換するとともに、様々ながん治療法を併用した複合がん免疫療法としての有用性を検討することを目的とした。第一章では siRNA 搭載 MEND による機能強化を施した DC を用いた免疫細胞療法により TME における免疫抑制機構をリプログラミングすることで DC 療法の効果増強を目指した。次に、第二章ではがんの排除に関与する活性化 T 細胞の腫瘍組織内への浸潤を阻害する TEC 上の分子を標的とした siRNA 搭載 MEND を構築し、TEC における負の要因を制御することで、がんの hot tumor への誘導およびがん免疫療法の有効性を増強させることを目的とした（図２）。

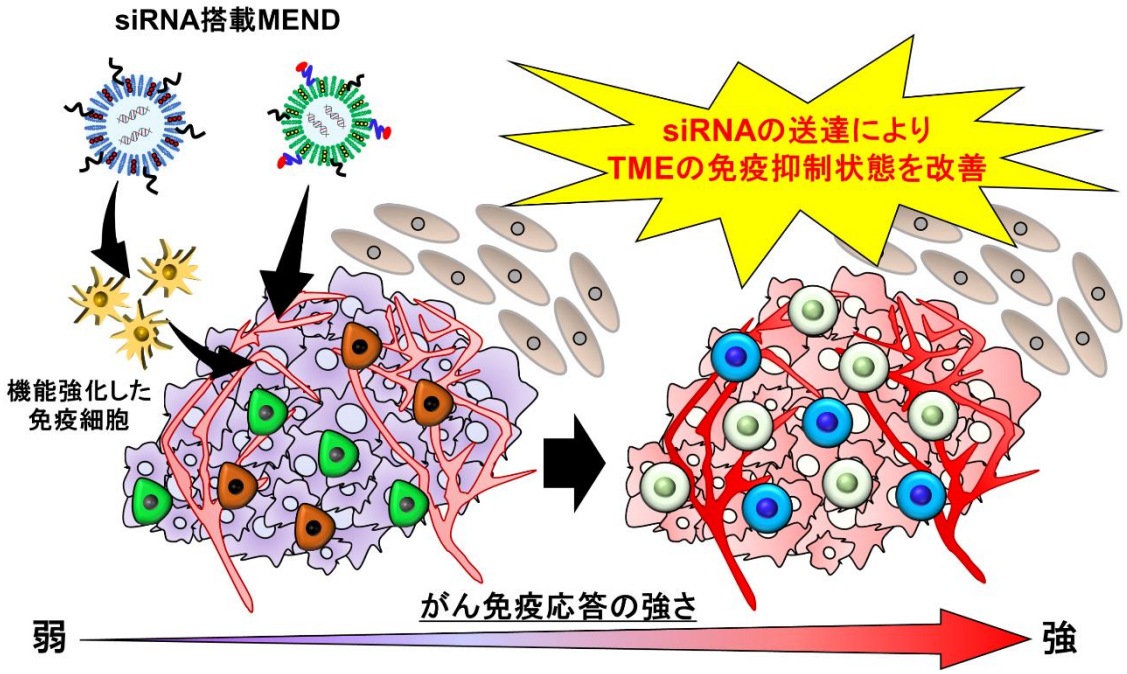


図２　研究目的の概略図

【第１章】
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

■ 緒言

序論でも述べた通り、がんに対する強力な免疫療法として「免疫細胞療法」があり、その代表例として DC を用いた細胞療法（DC 療法）がある。DC は、1973 年に Ralph M. Steinman らによりその存在や機能が明らかにされ、この功績により同氏は 2011 年にノーベル生理学・医学賞を受賞している。DC は生体内において最も強力な抗原提示能を有する細胞であり、自然免疫と獲得免疫を繋ぐ架け橋的な存在として機能している。特に、がん免疫応答では T 細胞を中心としたエフェクター細胞を調節することで腫瘍抗原特異的な免疫応答の誘導に関与している。故に、DC 療法は強力かつ幅広い免疫応答を誘導することで強力な抗腫瘍活性を誘導できると推察され、さらに 2010 年にはホルモン療法抵抗性の転移性前立腺がんに対する世界初の DC 療法である sipuleucel-T（商品名：PROVENGE）が FDA により承認されたことから、DC 療法によるがん治療は高い期待が寄せられた。しかしながら、臨床における DC 療法の効果は乏しく十分な結果を得ることができなかったため、現在、臨床の場では は積極的な利用はされていない状態である[31]。この不十分な治療効果の原因として、DC の免疫機能の低下が考えられている。DC には外来抗原やサイトカインなどによる過度な免疫応答の活性化あるいは自己免疫応答を防ぐために、免疫活性化シグナルを抑制するいくつかの因子（SOCS1、A20、indoleamine 2,3-dioxygenase 1（IDO1）など）が存在する[32-35]。また、DC 療法は免疫チェックポイント阻害剤と同様に、TME に存在する免疫抑制性因子の影響によりがんに対する免疫応答が抑制されることも報告されている[36,37]。従って、DC 由来の抑制性因子や TME におけるがん免疫抑制機構を制御することは、がん治療効果を増強させるための有用な戦略であると考えられ、本研究では DC 内に存在する抑制性因子の一つである IDO1 に着目し研究を進行した。

DC 療法で使用する細胞は、がん抗原、サイトカインまたはアジュバントなどにより刺激を受けた活性化 DC が用いられるが、その活性化シグナル伝達を抑制するために IDO1 と呼ばれる抑制性因子も同時に誘導される[35]。IDO1 はトリプトファンの代謝に関連する酵素であり TME 内の免疫抑制に関与し[38]、ヒトでの様々ながんにおいて予後不良と大きく関連している[39]。特に、腫瘍内の DC における IDO1 の発現はトリプトファン枯渇による活性化 T 細胞の抑制や、がん免疫抑制の成立に大きく関わる Treg 細胞を誘導し、TME におけるがん免疫応答を抑制することが報告されている（図３）[40]。故に、抗原感作による DC の活性化だけではなく、活性化した DC に起因する IDO1 の発現を抑制することは TME における負の免疫状態を改善する有用な戦略となり得る。

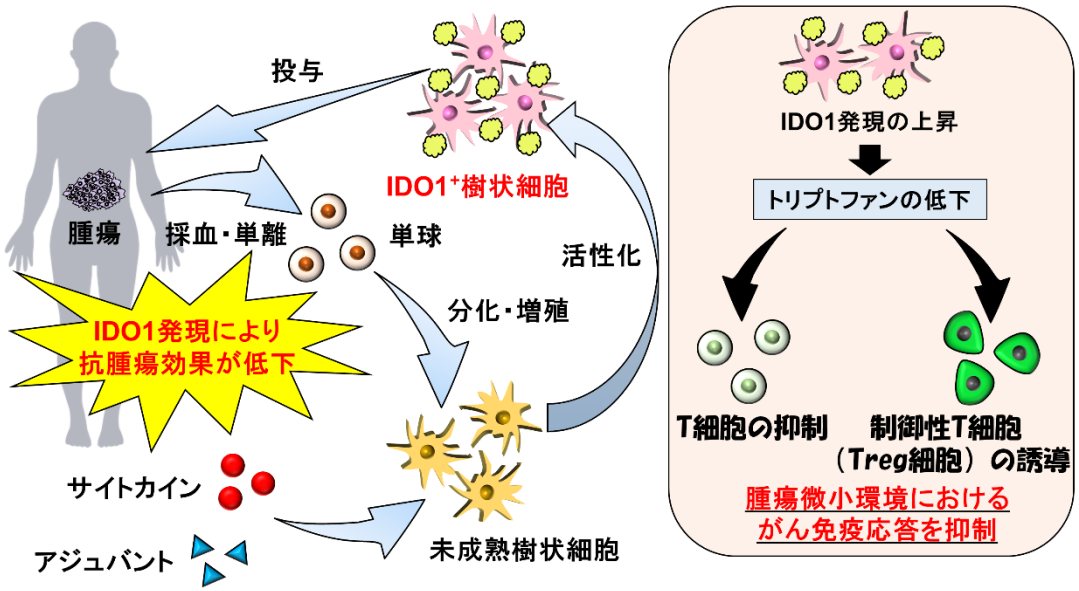


図３　Indoleamine 2,3-dioxygenase 1（IDO1）発現によるがん免疫抑制機構

これまでに IDO1 の阻害を組み合わせた DC 療法を実現させる手段として、低分子化合物による免疫抑制性シグナルを誘起する受容体の遮断、または抗体を用いた免疫抑制性因子の中和など様々なものが行われたが、これらの技術は細胞外分子の制御に特化したものであり、DC 内に存在する IDO1 を制御するには不向きである。また、これらの技術は臨床の場において十分な成果を挙げることができなかったことも報告されている[31]。そのため、近年ではこれらの技術に代わる新たなツールとして siRNA などの核酸医薬を利用した遺伝子レベルでの制御が次世代戦略として期待されており、DC 療法における上記の問題点を克服できる可能性を秘めている。しかしながら、DC への siRNA 導入は非常に困難であり、これまでの報告では DC 療法としての有用性は示されたものの、特殊装置を必要とするエレクトロポレーション法や従来の siRNA 試薬を用いた場合では多量の siRNA を必要としており、コストや簡便性など未だに課題が残されている[41,42]。

序論でも述べたが、当研究室では免疫細胞に効率的に siRNA を送達するシステムとして MEND を利用している。これまでに様々な機能を有する MEND を開発してきたが、中でも独自に開発したカチオン性脂質 YSK12-C4（図４）を含む MEND（YSK12-MEND）は、従来の MEND やトランスフェクション試薬と比較して非常に高いノックダウン活性を誘導することに成功しており、DC 療法としての有用性も示している[25,43,44]。そこで本項では、IDO1 抑制 DC 療法における YSK12-MEND の有用性を評価することを目的とした。（図５）。

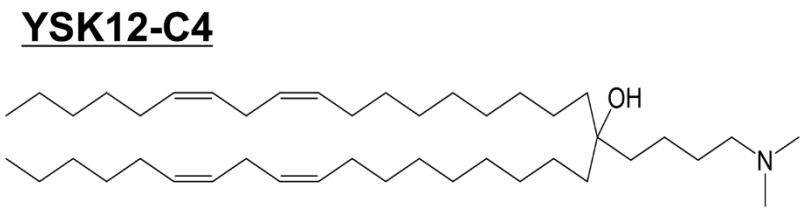


図４　YSK12-C4 の構造式

YSK12-C4 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であり、その特徴として、エンドソーム脱出促進に寄与する疎水基と、正電荷を付与する親水基を有する。

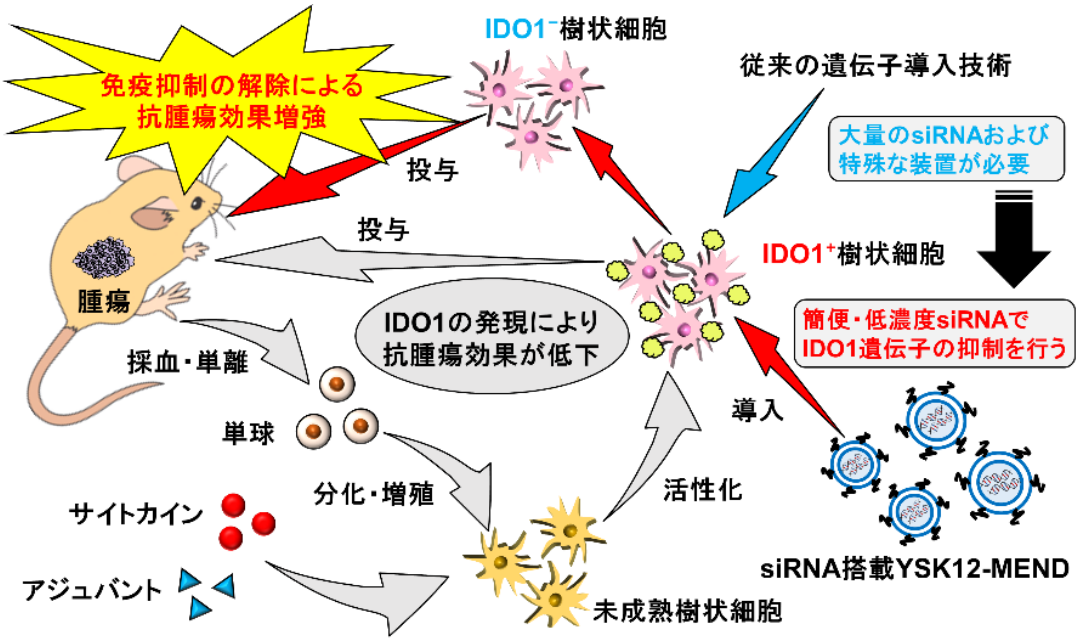


図５　YSK12-MEND を用いた IDO1 抑制 DC 療法による治療戦略の概要図

■　実験結果

1-1　siRNA 搭載 YSK12-MEND の調製

siRNA を搭載した YSK12-MEND はこれまでの報告に従い [25]、ブタノール希釈法により調製した（図６）。ブタノール溶液中に溶解させた YSK12-C4、cholesterol、1,2-dimyristoyl-rac-glycero-3-methoxypolyethylene glycol-2000（PEG_{2000}-DMG）の脂質混合溶液（YSK12-C4/cholesterol/PEG_{2000}-DMG = 85/15/1 mol%の割合で混合）と siRNA を溶解した溶液を混合し、クエン酸緩衝液（pH 6.0）を用いて YSK12-C4 を正に荷電させたままブタノール濃度を低下させることで粒子を形成させた。その後、さらにブタノール溶液を PBS で希釈し、限外濾過を繰り返すことで YSK12-MEND を調製した。調製した YSK12-MEND の粒子径は約 160 nm 程度であり、ζ電位は正の値を示した。また、粒子分布の均一性を示す polydispersity index（PDI）値は極めて低い値であり、非常に均一性の高い粒子を調製することに成功した（図７）。YSK12-MEND に搭載される siRNA の封入率は siRNA に結合することで蛍光を発する Ribogreen を用いた RNA 定量法（Ribogreen assay）により算出した。その結果、siRNA の約 90%が YSK12-MEND に内封されていることが示された。

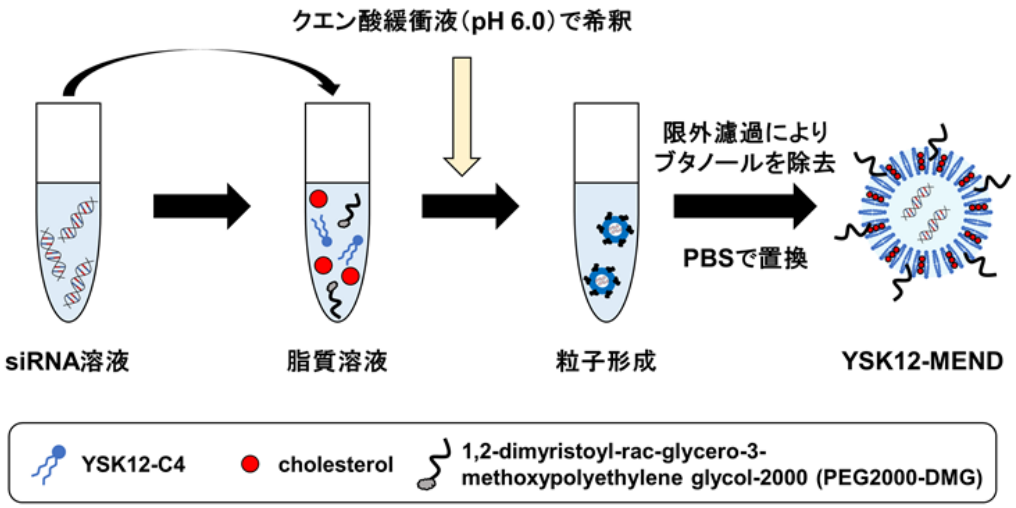
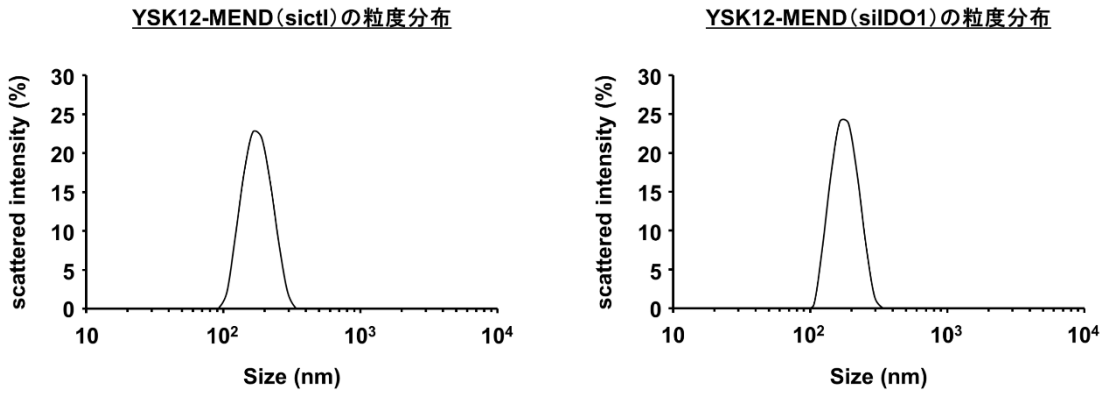


図６　YSK12-MEND の調製

YSK12-MEND の調製には、ブタノール希釈法を用いた。siRNA や脂質を溶解させたブタノール溶液の濃度を徐々に下げることで、siRNA が内封された構造を有する YSK12-MEND を調製した。本項では IDO1、に対する siRNA（siIDO1）および対照として control siRNA（siCtl）を YSK12-MEND に封入した。



	粒子径（nm）	PDI	ζ電位（mV）	siRNA 封入率（%）
Control siRNA（siCtl）	164 ± 5.0	0.05 ± 0.01	3.5 ± 0.4	87 ± 5.3
siIDO1	166 ± 6.1	0.02 ± 0.01	5.1 ± 0.3	90 ± 3.0

図 7　YSK12-MEND の物理的性質

YSK12-MEND（siCtl または siIDO1）の粒度分布、直径、PDI、およびゼータ電位は、Zeta Sizer Nano を用いて解析した。また、siRNA の封入率は Ribogreen assay によって評価した。mean ± SEM（n = 4–5）

1-2　BMDC における YSK12-MEND による IDO1 遺伝子ノックダウンの評価

続いて、siRNA を搭載した YSK12-MEND による DC に発現する IDO1 遺伝子のノックダウンを試みた。本研究では、マウスの骨髄細胞より分化・誘導した DC である bone marrow-derived dendritic cell（BMDC）を用いた。しかしながら、定常状態の BMDC では IDO1 の発現が認められないため、*in vitro* での遺伝子ノックダウン活性を評価することが困難である。そこで、本研究では人為的に BMDC 内に IDO1 遺伝子を発現させることで *in vitro* での評価が可能な IDO 1 発現 BMDC を調製した。interferon-γ（IFN-γ）による刺激は BMDC 内に IDO1 を誘導することが報告されているため [41]、IFN-γ 刺激による IDO1 遺伝子発現の変化を定量的 RT-PCR 法により評価した。その結果、IFN-γ 刺激により IDO1 発現が顕著に増加した（図８a）。次に、この IDO1 を誘導した BMDC に対して YSK12-MEND をトランスフェクションし、24 時間後 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ところ、siRNA の濃度依存的に IDO1 のノックダウンが認められ、20 nM において約 70%の効率で IDO1 のノックダウンに成功した（図８b）。以上より、YSK12-MEND は低用量の siRNA で効率的に BMDC 内における IDO1 遺伝子のノックダウンを誘導できることが示された。

続いて、YSK12-MEND と市販されている siRNA トランスフェクション試薬間での IDO1 遺伝子のノックダウン効率を比較した。本研究では、RNAiMAX および GeneSilencer（GS）、２つのトランスフェクション試薬を選択し、先程の検討と同様に IDO1 を発現した BMDC に対し、YSK12-MEND で検討したときと同じ量の siRNA（10 nM、20 nM）と、それぞれのトランスフェクション試薬を添加後、定量的 RT-PCR 法を用いてノックダウン効率を評価した。その結果、IDO 1 遺伝子のノックダウン効果が RNAiMAX および GS では認められなかった（図８c、d)。この結果より、YSK12-MEND は市販のトランスフェクション試薬と比較して、少量の siRNA で効率的にノックダウン活性を誘導できることが示された。

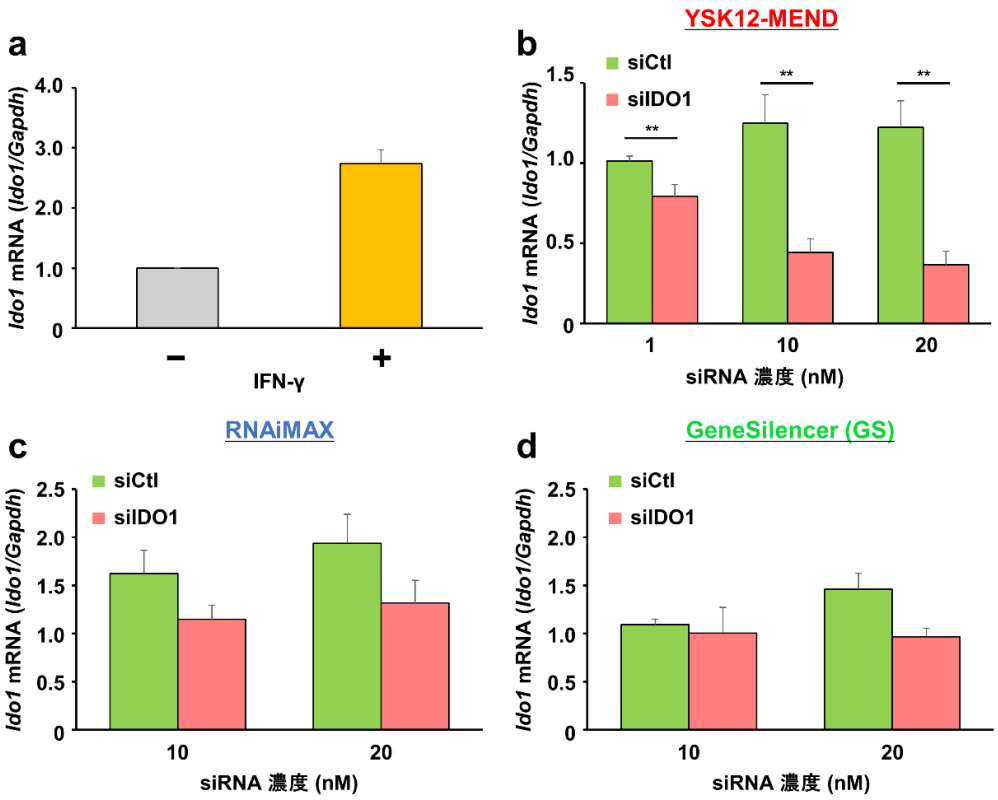


図８　BMDC における YSK12-MEND による IDO1 遺伝子のノックダウン効率

（a）IFN-γ 処理による IDO1 のアップレギュレーション。BMDC に IFN-γ を添加し、2 時間後に培地を交換した。22 時間後、IDO1 遺伝子の発現を定量的 RT-PCR 法により評価した。mean ± SEM（n = 3）（b）BMDC における YSK12-MEND による IDO1 遺伝子のノックダウン活性。BMDC を IFN-γ で 2 時間刺激した後、YSK12-MEND（siIDO1 または siCtl）をトランスフェクションした（siRNA 量: 1、10、20 nM）。mean ± SEM（n = 3、** P<0.01）（c、d）BMDC における RNAiMAX、GeneSilencer による IDO1 遺伝子のノックダウン活性。BMDC を IFN-γ で 2 時間刺激した後、RNAiMAX または GeneSilencer（siIDO1 または siCtl）をトランスフェクトした（siRNA 量: 10、20 nM）。mean ± SEM（n = 3）

1-3　BMDC における YSK12-MEND の細胞内取り込み効率の評価

続いて、YSK12-MEND と市販のトランスフェクション試薬の細胞内取り込み効率を比較した。IDO1 を発現した BMDC を調製した後、Cy5 標識した siRNA を搭載した YSK12-MEND、RNAiMAX および GS を添加後、細胞の蛍光強度をフローサイトメトリーにより解析し、各蛍光強度の値を未処理の DC の値により補正した。その結果、GS で処理した BMDC では YSK12-MEND および RNAiMAX と比較して、有意な相対蛍光強度の増加が確認された（図９）。一方で、YSK12-MEND の導入効率は RNAiMAX と比較してわずかに優れていた。この結果より、YSK12-MEND は低い細胞内取り込み効率にもかかわらず、強力な遺伝子ノックダウン活性を誘導できることが示された。

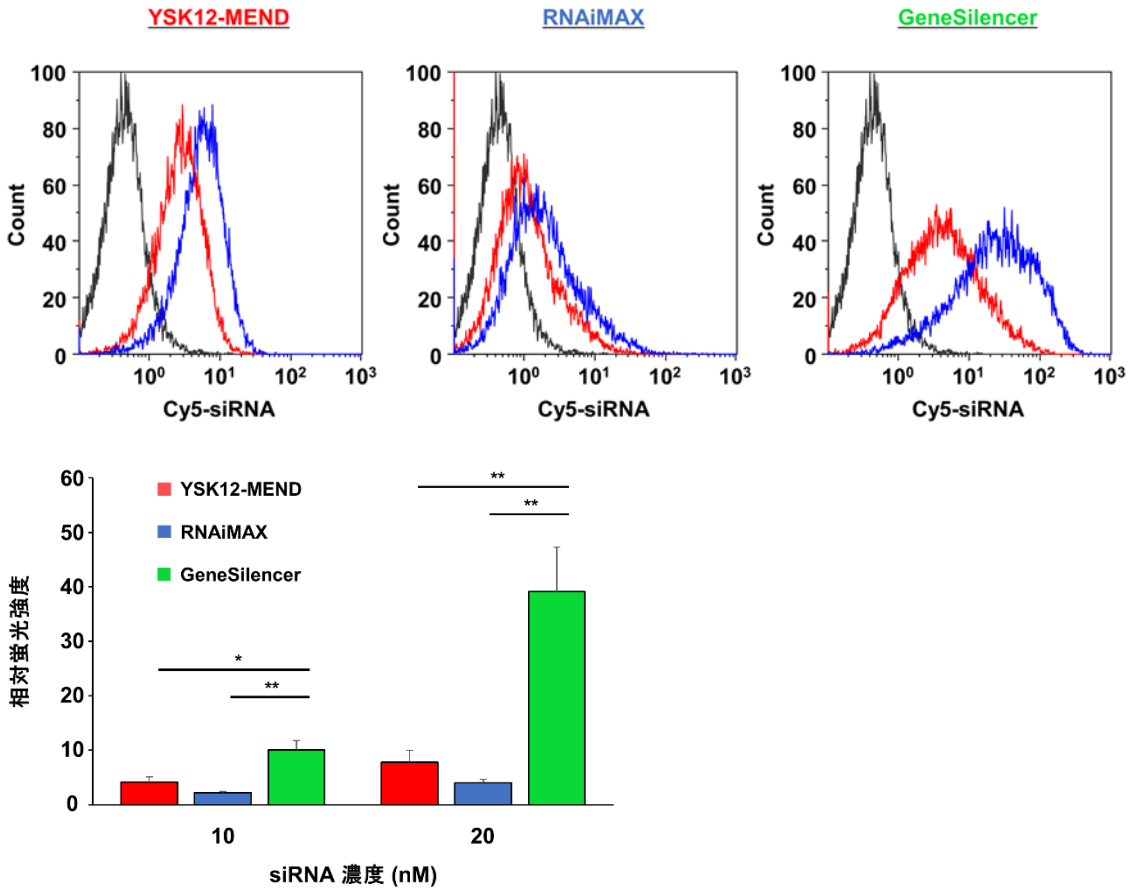


図９　BMDC における YSK12-MEND の細胞内取り込み効率

BMDC に Cy5-siRNA を内封した YSK12-MEND、RNAiMAX、または GeneSilence を添加し、2 時間（YSK12-MEND および RNAiMAX）または 4 時間（GeneSilencer）のインキュベーション後、細胞を回収し、フローサイトメトリーにより Cy5 由来の蛍光を測定した。(a) 横軸に蛍光強度、縦軸に細胞数をとった典型的なヒストグラム（黒線：未処理の BMDC、赤線：siRNA 濃度＝10 nM、青線：siRNA 濃度＝20 nM)。(b) 相対蛍光強度の平均値。mean ± SEM（n＝3、* P <0.05、** P <0.01）

1-4　YSK12-MEND と各トランスフェクション試薬間における物性値の比較

続いて、YSK12-MEND と siRNA と相互作用した各トランスフェクション試薬間における物性値を比較した。本研究で調製された YSK12-MEND は PBS に常時溶解しており、粒子径を測定する際も PBS 中に溶解した状態で測定している。そのため、トランスフェクション試薬も同様に PBS に溶解したものを用いて評価した。また、BMDC に対するトランスフェクション実験において YSK12-MEND は血清非含有 Opti-MEM 中に溶解したものを細胞に添加しているため、各トランスフェクション試薬を血清非含有 Opti-MEM 中に溶解させたときの物性値も評価した。その結果、RNAiMAX と GS の粒子径、PDI、ゼータ電位は、YSK12-MEND で評価したときよりも高い値を示した（表１）。以上より、YSK12-MEND は各トランスフェクション試薬とは大きく異なる物性であることが示された。

表１　RNAiMAX および GeneSilencer 調製時における物理学的性質

試薬名	Buffer	粒子径（nm）	PDI	ζ電位（mV）
RNAiMAX	OPTI-MEM I	1268 ± 143.8	0.27 ± 0.05	26.2 ± 1.3
	PBS	632 ± 81.6	0.19 ± 0.01	27.5 ± 4.7
Gene silencer	OPTI-MEM I	1705 ±15.7	0.30 ± 0.02	29.8 ± 1.1
	PBS	667 ± 24.6	0.39 ± 0.03	28.0 ± 3.3

（mean ± SEM, n = 3）

1-5　YSK12-MEND による IDO1 ノックダウンが BMDC の表現型におよぼす影響

アジュバントやサイトカインなどの活性化シグナルによって誘導される DC の成熟は、T 細胞のプライミングを行う上で重要なプロセスである。一般的に、DC 療法で使用される細胞は、抗原および活性化シグナルで刺激されたものを使用している。そこで本研究では、YSK12-MEND による IDO1 のノックダウンが、活性化した DC の表現型に影響を及ぼすかを評価した。IFN-γ 処理による IDO1 発現の誘導後、BMDC に YSK12-MEND をトランスフェクトした。24 時間後、DC の主要マーカーである CD11c 陽性細胞の割合と、成熟化マーカーである CD40、CD80、CD86、および MHC クラス II（MHC-II）の発現変化をフローサイトメトリーで解析し、各蛍光強度の値を未処理細胞の値で補正した。その結果、CD11c 陽性細胞の割合は全てのサンプル間で同等であり、YSK12-MEND によるトランスフェクションと IDO1 遺伝子の抑制効果が BMDC の特性に影響を与えなかったことが示された（図１０）。一方で、CD40、CD80、CD86 および MHC-II の発現増強効果は、IFN-γ、IFN-γ+ YSK12-MEND（siCtl）および IFN-γ+ YSK12-MEND（siIDO）で処理された BMDC において観察され、その発現レベルはサンプル間で同等でした（図１０）。以上より、YSK12-MEND によるトランスフェクションと IDO1 遺伝子の抑制効果が BMDC の成熟化能に影響を与えないことが示唆された。

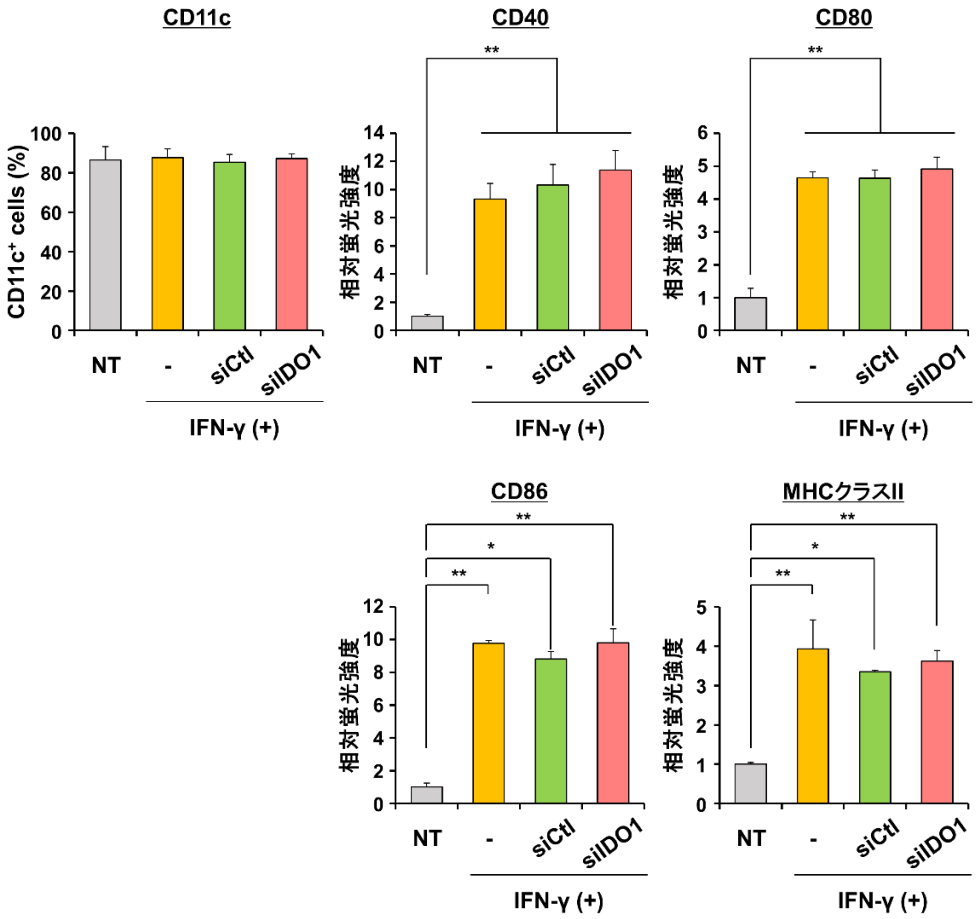


図１０　IDO1 ノックダウン後の BMDC における細胞表面マーカー発現測定

BMDC を IFN-γ で 2 時間刺激した後、YSK12-MEND（siIDO1 または siCtl、siRNA 量: 20 nM）をトランスフェクトした。その後、BMDC を各種蛍光染色抗体を用いて CD11c、CD40、CD80、CD86、MHC クラス II およびそれらの isotype control で染色した。染色された BMDC の蛍光強度はフローサイトメトリーにより測定した。蛍光強度の Geo Mean 値は、未処理の BMDC の値で補正した。mean ± SEM（n = 3、* P <0.05、** P <0.01）

1-6　IDO1 をノックダウンした BMDC の投与による抗腫瘍活性の評価

続いて、IDO1 をノックダウンした BMDC を用いてがんに対する治療効果ついて検討した。初めに、IFN-γ 処理による IDO1 の誘導後、BMDC に YSK12-MEND をトランスフェクションした。その後、余剰の YSK12-MEND を取り除き、ovalbumin（OVA）および OVA の H-2Kb CD8 エピトープである $OVA_{257-264}$ ペプチドにより刺激した IDO1 ノックダウン BMDC を、マウスリンパ腫細胞（E.G7-OVA）を移植したマウスの foot pad から投与し、腫瘍の体積を経時的に測定した。BMDC の投与は腫瘍移植後 4 日目、8 日目、11 日目、16 日目に行った。その結果、IDO1 ノックダウン BMDC 投与群は siCtl 処理 BMDC 群と比較して、E.G7-OVA 移植後 12 日以降から腫瘍増殖が有意に抑制された（図１１）。以上より、YSK12-MEND により IDO1 をノックダウンすることで、DC 療法の抗腫瘍活性が増強できることが示された。

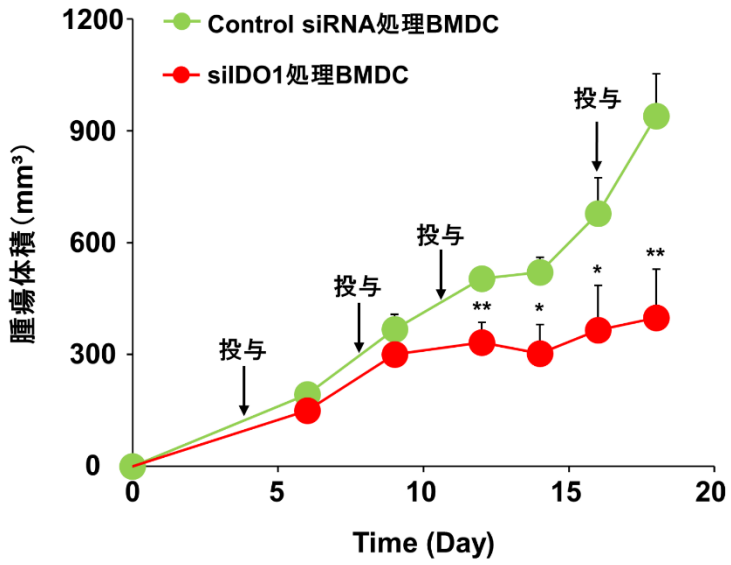


図１１　IDO1 ノックダウン BMDC による治療的抗腫瘍効果

マウスに E.G7-OVA 細胞を皮下移植した後、4、8、11 および 16 日目に YSK12-MEND（siIDO1 または siCtl、siRNA 量: 20 nM）をトランスフェクトした BMDC をマウスに投与し、腫瘍の成長を観察した。mean ± SEM（n = 4–5、* P <0.05、** P <0.01）

1-7　IDO1 ノックダウン BMDC による抗腫瘍活性メカニズムの解析

先述した通り、DC における IDO1 の発現は Treg 細胞を誘導し、がん免疫応答を抑制方向に傾ける[35,45]。また、ヒト患者において IDO1 を抑制していない DC ワクチンを接種したとき、Treg 細胞の産生が増強されることが報告されている[46]。そこで、IDO1 ノックダウン BMDC による治療後マウスの E.G7-OVA 腫瘍内における Treg 細胞の変化を評価した。DC 療法により治療したマウスから腫瘍組織（腫瘍移植後 18 日目）を摘出し、組織から RNA を抽出後、Treg 細胞を同定するマーカーである forkhead box P3（Foxp3）および CD25 の mRNA レベルを定量的 RT-PCR 法で測定することで Treg 細胞の変化を評価した。その結果、腫瘍内における Foxp3 の mRNA 発現量は YSK12-MEND（siCtl）群と比較して、YSK12-MEND（siIDO1）により処理された BMDC 投与群では有意に減少した。また、CD25 の mRNA 発現量も YSK12-MEND（siIDO1）処理 BMDC の投与により減少したが、有意差は確認されなかった（図１２）。以上より、YSK12-MEND を用いた IDO1 ノックダウン DC 療法による抗腫瘍活性の増強が、Treg 細胞の減少に起因している可能性が示唆された。

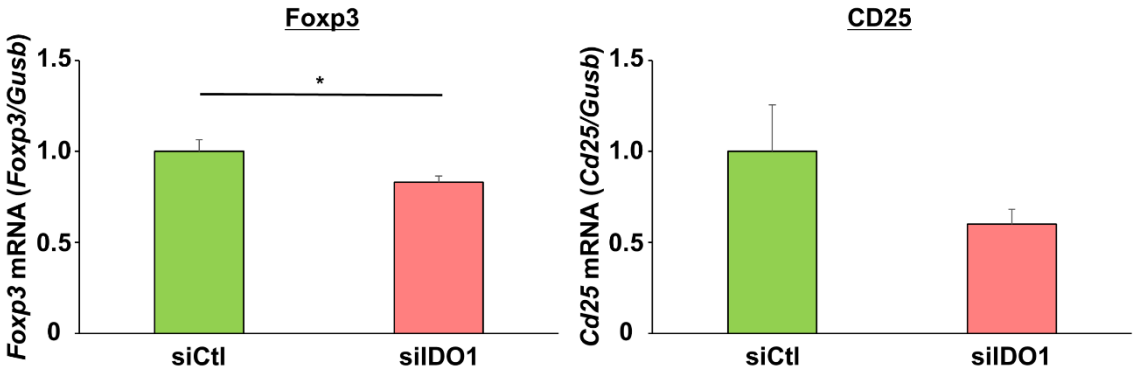


図１２　IDO1 ノックダウン DC 療法後の腫瘍内における Treg 細胞マーカー遺伝子の変化

マウスに E.G7-OVA 細胞を皮下移植した後、4、8、11 および 16 日目に YSK12-MEND（siIDO1 または siCtl、siRNA 量: 20 nM）をトランスフェクトした BMDC をマウスに投与した。その後、18 日目に腫瘍を回収し、Foxp3 と CD25 の mRNA レベルを定量的 RT-PCR 法で測定した。また、PBS で処理した担癌マウスの値を 1 としたときの相対値を縦軸とした。mean ± SEM（n = 4–5、* $P < 0.05$）

■ 考察

第 1 章では、IDO1 に対する siRNA を搭載した YSK12-MEND により機能強化を施した DC を用いて TME における免疫抑制機構の制御を試みた。

siRNA を搭載した YSK12-MEND を用いて DC に発現する IDO1 遺伝子のノックダウン活性と細胞内取り込み効率を評価した結果、YSK12-MEND は市販のトランスフェクション試薬と比較して高いノックダウン活性を誘導できることが示された（図８b、c、d)。以前の報告より [41,47]、市販のトランスフェクション試薬（GS）を使用した場合、YSK12-MEND と同等のノックダウン活性を示すには大量の siRNA (2 μg) が必要であることが確認されている。また今回の結果は、タンパク質レベルでの IDO1 抑制が十分に確認できた以前の報告 [41] と同程度のノックダウン活性を示したため、YSK12-MEND は DC における IDO1 をタンパク質レベルで抑制できたと思われる。一方で、YSK12-MEND の細胞内取り込み効率は RNAiMAX とほぼ同等であり、また GS と比較した場合、その効果は明らかに劣っていた（図９)。これは、GS のインキュベーション時間（4 時間：製造業者が推奨する時間）が YSK12-MEND および RNAiMAX (2 時間) よりも長かったことが原因と考えられる。加えて、YSK12-MEND と GS の物理学的性質を評価したとき、その値は大きく異なっていた（表１)。ナノ粒子の細胞内への取り込みは、粒子サイズや表面物性の違いにより大きく影響されるため [48,49]、今回の結果に繋がったものと思われる。一方で、RNAiMAX は YSK12-MEND よりも高い細胞取り込み効率を示すことが、以前の検討より明らかにされている [25]。しかしながら、今回はその報告とは矛盾した結果となっており、その原因については未だ不明である。

以前の報告より、YSK12-MEND は優れたエンドソーム脱出能を有していることが証明されており、従来のトランスフェクション試薬と比較して細胞質内に効率的に siRNA を送達できることが確認されている [25]。故に、YSK12-MEND は低い細胞内取り込み効率にもかかわらず、強力な遺伝子ノックダウン活性を誘導できたと考えられる。また、YSK12-MEND を取り込んだ BMDC のヒストグラムの形状は、未処理の BMDC のヒストグラムと非常に類似していた（図９)。この結果は、YSK12-MEND の細胞内への移行程度が RNAiMAX および GS と比較して非常に均一であるということを示している。さらに、YSK12-MEND によるトランスフェクションと IDO1 遺伝子の抑制効果が BMDC の特性や成熟化能に影響を与えないことも示唆された（図１０)。以上より、YSK12-MEND は siRNA を BMDC 内に均一に送達することが可能であり、また DC の特性に影響を与えなかったことから、高品質かつ細胞の機能に影響を与えない DC 療法を実現できる可能性が示唆された。

続いて、IDO1 をノックダウンした BMDC を用いてがんに対する治療効果ついて検討した。遺伝子発現の制御を利用した DC 療法において標的遺伝子のノックダウン活性を十分に維持することは、DC 療法による効果的ながん治療を実現するために極めて重要な点である。本研究で使用した siRNA は特殊な化学修飾が施されており、標的遺伝子の特異的なノックダウン活性を長時間維持できることが予想される。また、以前の報告より YSK12-MEND によるノックダウン効果は、48 時間持続できることをタンパク質レベルで証明している [26]。

さらに、マウスの foot pad から投与した BMDC のリンパ節への移行は、投与後 12 時間でほぼ達成されるため [50]、YSK12-MEND により処理された BMDC は IDO１ノックダウン活性を十分に維持しつつ、抗原特異的な免疫応答を惹起する場であるリンパ節に送達することができると考えられる。従って、YSK12-MEND による IDO１のノックダウン効果はがんに対する治療効果を誘導するために十分な時間維持できたと考えられる。

次に、実際に E.G7-OVA 皮下移植モデルに対して IDO1 ノックダウン BMDC を投与した結果、siCtl 処理 BMDC 群と比較して、有意な腫瘍の増殖抑制効果が確認された（図１１）。OVA による免疫化は E.G7-OVA 腫瘍に対する OVA 特異的 CTL および抗腫瘍効果を誘導できるため [51-53]、E.G7-OVA 腫瘍細胞を破壊したエフェクター細胞は OVA 抗原に特異的に反応する CTL である可能性が示唆された。

さらに IDO１ノックダウン BMDC による抗腫瘍効果の増強は、腫瘍内における Treg 細胞の低下に起因する可能性が示唆された（図１２）。TME における IDO1 の発現は、トリプトファンの枯渇とキヌレニン（トリプトファンの代謝産物）の増加をもたらすことが報告されており、トリプトファンの枯渇はアミノ酸欠乏に反応するタンパク質キナーゼの一つである general control nonderepressible 2（GCN2）の発現を誘導し、Treg 細胞への分化を促進させる [54]。一方で、IDO1 により誘導されたキヌレニンは、ナイーブ T 細胞に発現する aryl hydrocarbon receptor（AhR）転写因子に結合することで Treg 細胞への分化を誘導することが報告されている [55]。故に、YSK12-MEND による IDO1 のノックダウンは、IDO1 非制御状態の DC 療法により活性化されるこれらの経路への影響を減少させる可能性が示唆された。

これまでに IDO1 阻害剤（低分子医薬）を用いた治療戦略による多くの臨床試験が行われており、従来のがん免疫療法に次ぐ新たな治療法として期待されてきた。しかし序論でも述べた通り、現状十分な成果は得られていない。一方で、IDO1 阻害剤に関わる多くの先行研究では、標的因子（IDO1）の可否ではなく、その薬剤の特性や対象患者の適正が問題であると考察されてきた [31]。従って、低分子医薬に代わる新たな戦略が切望されており、YSK12-MEND を用いた IDO1 制御に基づく DC 療法は有用な戦略になり得ることが期待される。

■ 小括

1. YSK12-MEND は市販試薬と比較して低い siRNA 濃度でマウス DC における IDO1 を効率的にノックダウンできることを明らかとした。

2. YSK12-MEND による IDO1 ノックダウン効果はマウス DC の性質および成熟化能に影響を与えない可能性が示された。

3. YSK12-MEND により IDO1 をノックダウンしたマウス DC はがんに対する DC 療法の効果を増強させ、それは Treg 細胞の減少に起因している可能性が示唆された。

【第２章】

siRNA 搭載 MEND を用いた腫瘍血管内皮細胞の機能制御によるがん治療の強化

■　緒言

近年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の排除には「がん免疫サイクル」と呼ばれる一連の免疫応答を成立させる必要がある（図１３）[56]。①がんが発生すると、がん細胞からがん抗原が放出され DC によって貪食される。その後、②DC はリンパ節へ移行し、MHC 分子上に抗原を提示する。③リンパ節内に存在する T 細胞は DC から抗原を受け取ることで活性化し、④CTL として腫瘍組織へ移行する。⑤移行した CTL が血管を介して腫瘍組織内に浸潤すると、⑥CTL は T 細胞受容体を介してがんを認識し、⑦がん細胞を特異的に攻撃する。そして攻撃されたがん細胞は再び抗原を放出し、一連のサイクルが再び動き出す。しかしながら、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。

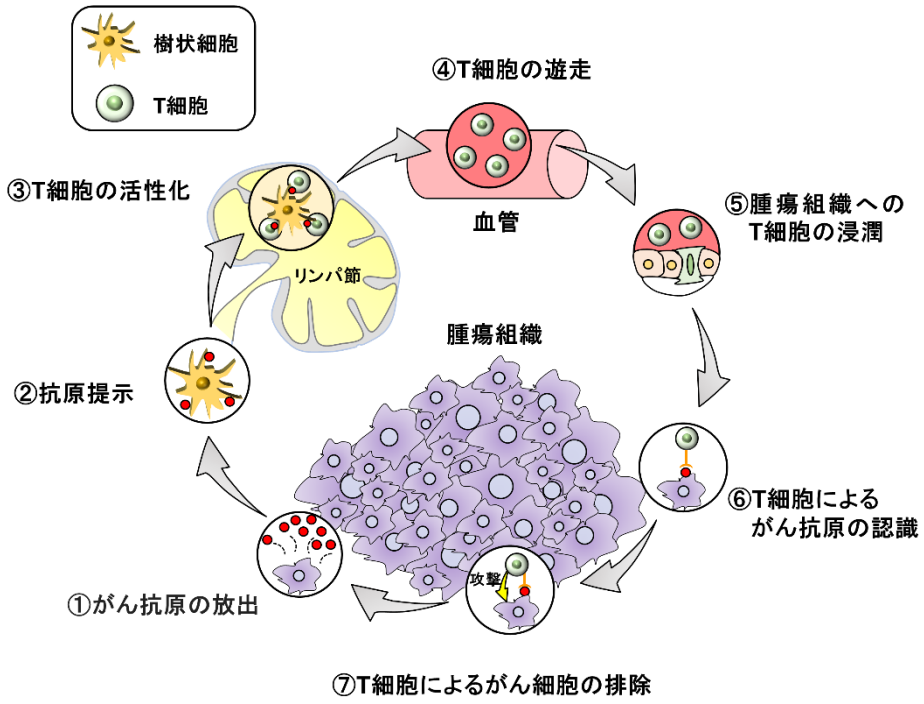


図１３　がん免疫サイクル

抗 PD-1 抗体は腫瘍内に浸潤した T 細胞が、がん細胞に発現する PD-L1 を介して抑制されるのを阻害することで T 細胞を再び活性化させる。ところが、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。序論でも述べたが、この治療に対する抵抗性には、TME における免疫ステータスの違いが大きく関与しており、腫瘍内に T 細胞が浸潤しているが、その機能が著しく抑制されている状態の腫瘍である「hot tumor」と T 細胞の活性化が完全に誘導されない、または腫瘍内への活性化 T 細胞の浸潤が抑制された腫瘍である「cold tumor」２つに大別されている。先述した 70-80%の抗 PD-

1 抗体抵抗性のがん患者の多くは cold tumor の状態であり、cold tumor から hot tumor への改善が、がん免疫療法による治療効果を高める上で重要である。腫瘍の cold tumor 化は様々な要因が挙げられるが、その一つとして TEC による活性化 T 細胞の腫瘍内への浸潤抑制がある。TEC はその細胞表面に Fas ligand（FasL）を発現しており、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阻害することが報告されている（図１４）[57]。

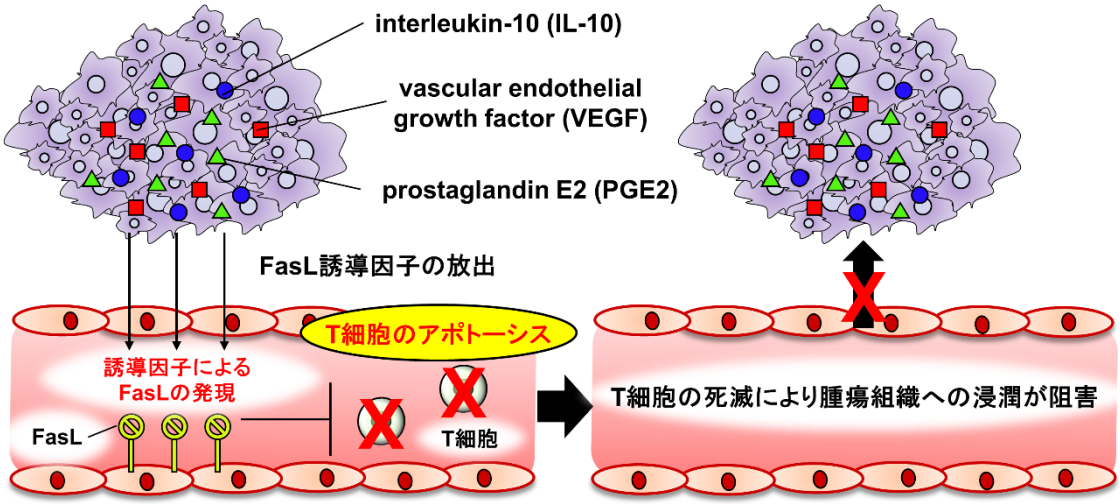


図１４　TEC 上に発現した FasL による活性化 T 細胞の浸潤抑制機構

故に、FasL の阻害は T 細胞の腫瘍内浸潤を増加させることでがん免疫応答を促進させることが可能であり、免疫機能が抑制された TME の改善につながる可能性がある。当研究室では、通常の血管内皮細胞や正常細胞ではほとんど発現が認められず、TEC において特に高い発現が確認されている $\alpha_v\beta_3$ 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 を開発している。cRGD-MEND は当研究室で合成された pH 応答性カチオン性脂質 YSK05 を含有したナノ粒子であり、TEC に効率的に siRNA を送達することに成功し（図１５）、がん治療における有用性をこれまで多く証明してきた [27-30,58]。そこで本研究では、FasL を標的とした siRNA を搭載した cRGD-MEND を用いて TEC における負の要因を制御し、cold tumor を hot tumor に変換するとともに様々ながん治療法を併用した複合がん免疫療法へと応用することを目的とした（図１６）。

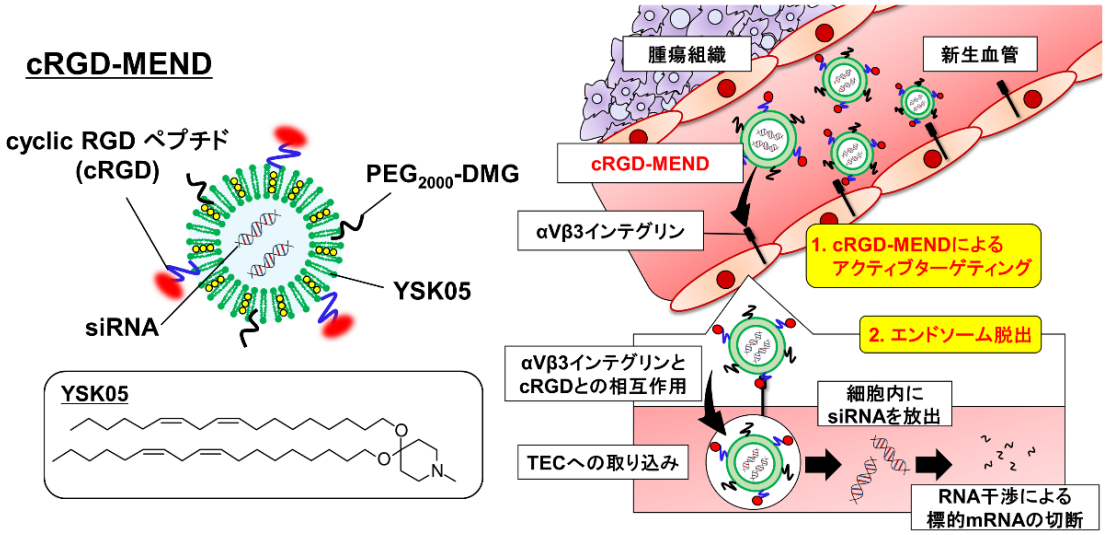


図１５　cRGD-MEND の概要図と TEC における siRNA 送達メカニズム

cRGD-MEND は YSK05、cholesterol、PEG_{2000}-DMG、cRGD が修飾された PEG 脂質および siRNA により構成されており、siRNA が脂質膜により覆われた状態で存在する。また cRGD-MEND は TEC に発現する $\alpha_v\beta_3$ インテグリンと相互作用した後、細胞内に取り込まれる。その後、エンドソームの成熟化に伴いエンドソーム内の pH が低下すると cRGD-MEND はカチオン性に変化し、エンドソーム膜との静電気的相互作用を介することで siRNA を細胞質に送達し、標的遺伝子の切断を開始する。

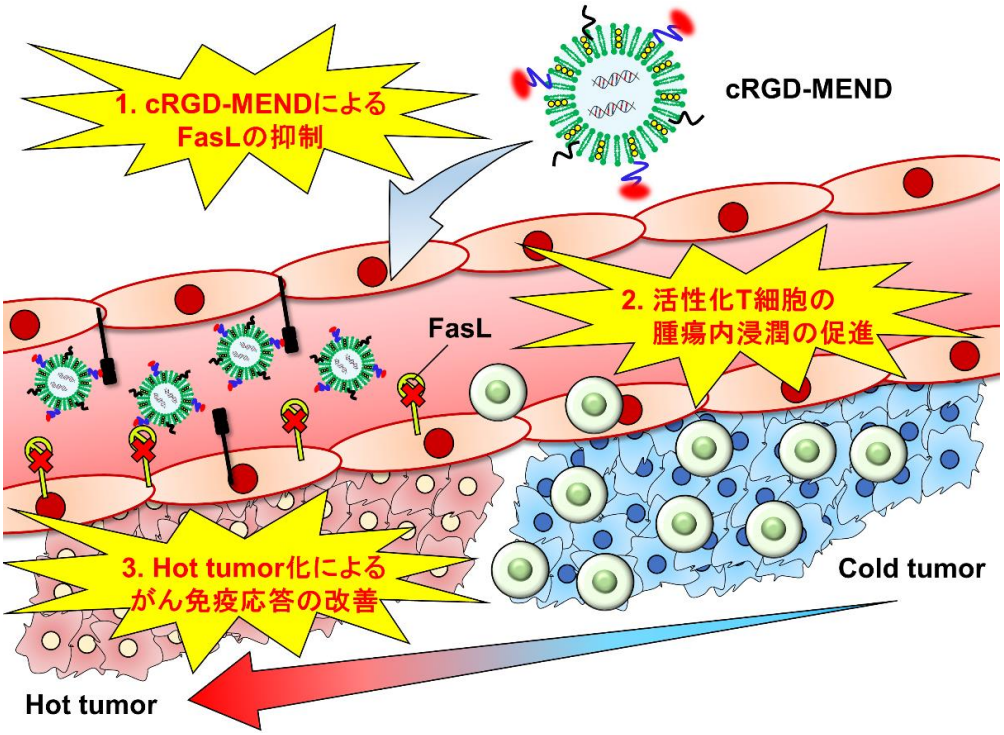


図１６　cRGD-MEND を用いた TEC の FasL 制御によるがん免疫療法の概要

■ 実験結果

2-1 siRNA 搭載 cRGD-MEND の調製

これまでに報告された方法に従い [29]、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（脂質組成：YSK05/cholesterol/PEG_{2000}-DMG）/cRGD 修飾 N-（carbonyl-methoxypolyethylene glycol 2000）-1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine（cRGD-PEG_{2000}-DSPE）＝70/30/3/3（mol%））を調製し、TEC 上に FasL の発現が報告 [57] 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 遺伝子のノックダウン効率を定量的 RT-PCR 法を用いて評価した。ところが、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（図１８、青色バー）。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。

最適な cRGD-MEND を調製する戦略として、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、PEG_{2000}-DMG および cRDG-PEG_{2000}-DSPE の修飾量の最適化を行った。siRNA を搭載した cRGD-MEND は、ブタノール希釈法により調製した（図１７）。ブタノール溶液中に溶解させた YSK05、cholesterol、PEG_{2000}-DMG の脂質混合溶液と siRNA を DDW に溶解した水溶性溶液を混合し、クエン酸緩衝液（pH 4.0）を用いて YSK05 を正に荷電させたままブタノール濃度を低下させることで粒子を形成させた。その後、さらにブタノール溶液を PBS で希釈し、限外濾過を繰り返すことでナノ粒子を調製した。その後、調製したナノ粒子に cRGD-PEG_{2000}-DSPE を添加後、熱反応により cRGD-PEG_{2000}-DSPE をナノ粒子に修飾し cRGD-MEND とした。また、本研究で調製した cRGD-MEND に含まれる YSK05、cholesterol の割合は 70/30 mol%で固定し、PEG_{2000}-DMG および cRDG-PEG_{2000}-DSPE は総脂質量に対して様々な割合で混合した（表２）。調製された cRGD-MEND の粒子径は、約 100～160 nm 程度であり、ζ電位は全ての粒子で負の値を示した。また、cRDG-PEG_{2000}-DSPE の増加に伴い、cRGD-MEND のζ電位は減少した。最後に cRGD-MEND に搭載される siRNA の封入率および回収率を Ribogreen assay により算出した結果、全ての cRGD-MEND において高い封入率および回収率を示した（表３）。

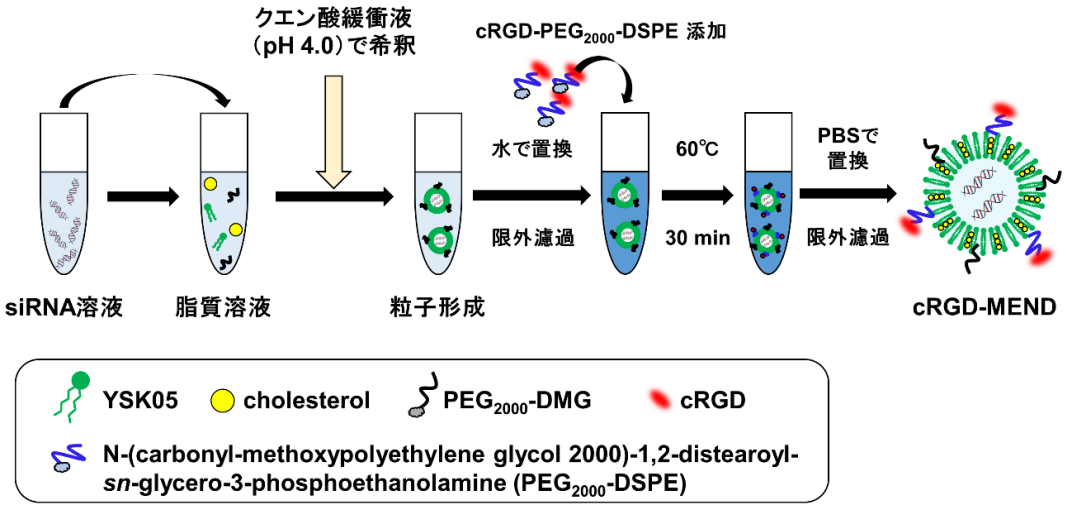


図１７　siRNA 搭載 cRGD-MEND の調製

表２　siRNA 搭載 cRGD-MEND の脂質組成表

	YSK05 (mol%)	cholesterol (mol%)	PEG_{2000}-DMG (mol%)	cRGD-PEG_{2000}-DSPE (mol%)
No.1	70	30	1	0.1
No.2				0.5
No.3				1
No.4				2
No.5				3
No.6			3	3
対照群			1	PEG_{2000}-DSPE (mol%)
				1

(n = 1)

表３　siRNA 搭載 cRGD-MEND の物理学的性質

	粒子径（nm）	PDI	ζ電位（mV）	siRNA 封入率（%）	siRNA 回収率（%）
No.1	159	0.12	-4.6	102.8	104.3
No.2	154	0.12	-9.0	104.0	97.5
No.3	130	0.11	-16.2	100.7	98.3
No.4	137	0.10	-21.4	100.4	103.7
No.5	136	0.12	-25.1	98.9	108.1
No.6	101	0.27	-22.7	111.1	173.3
対照群	156	0.07	-5.4	102.0	105.8

(n = 1)

2-2　TEC における cRGD-MEND による CD31 遺伝子ノックダウン活性の評価

続いて、先ほど調製した種々の cRGD-MEND を用いて TEC に発現する CD31 遺伝子のノックダウンを試みた。CT26 皮下移植モデルに cRGD-MEND を投与し腫瘍内の CD31 遺伝子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、cRGD-PEG_{2000}-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（図１８）。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。以降の実験ではこの最適化された cRGD-MEND を用いて実験を行った。

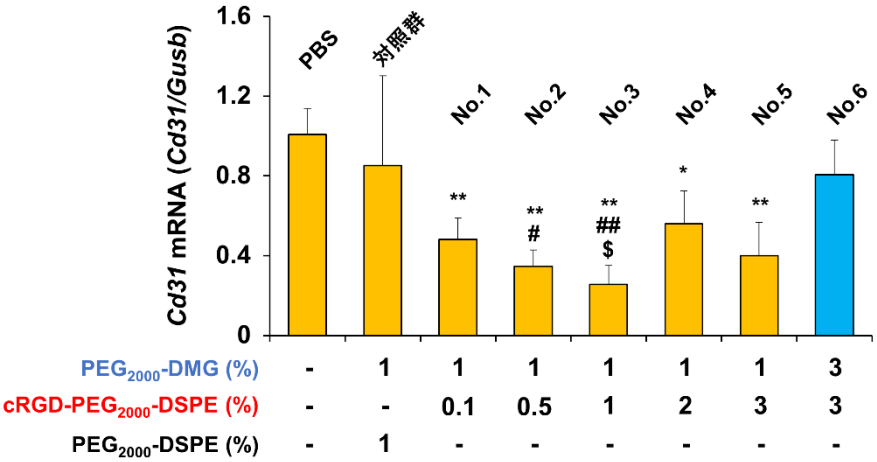


図１８　TEC における cRGD-MEND による CD31 遺伝子ノックダウン活性

マウスに CT26 細胞を皮下移植し、腫瘍移植後 10 日目に PBS、cRGD-MEND または cRGD 未修飾 MEND（対照群）を静脈内投与した（siRNA 量: 2 mg/kg (No.6 のみ 3 mg/kg)）。24 時間後、腫瘍を回収し CD31 の mRNA レベルを定量的 RT-PCR 法で測定した。mean ± SEM (n = 3-9、PBS vs No.1~6、対照群、*$p<0.05$、**$p<0.01$。対照群 vs No.1~6、$^{\#}p<0.05$、$^{\#\#}p<0.01$。No.6 vs No.1-5、$^{\$}p<0.01$)

2-3　cRGD-MEND が標的外組織の血管に及ぼす影響

標的組織以外でのナノ粒子によるノックダウン活性の誘導は予期せぬ副作用を引き起こす恐れがあり、安全な核酸ナノ医薬品を開発するにあたり注視しなければならない点である。そこで本研究では、cRGD-MEND によるノックダウン効果が腫瘍組織以外の血管内皮細胞に影響を及ぼすかを評価した。CT26 皮下移植モデルに cRGD-MEND を投与したのち、脾臓、肺、肝臓を摘出し、各組織における CD31 遺伝子のノックダウン効率を定量的 RT-PCR 法により評価した。また、対照として luciferase に対する siRNA（siLuc）を搭載した cRGD-MEND を用いた（表４）。その結果、脾臓、肺では cRGD-MEND による CD31 遺伝子のノックダウン活性は認められなかった。一方で、肝臓では腫瘍組織ほど高効率ではないものの約 60%のノックダウン効率を示した（図１９）。この結果より、cRGD-MEND は脾臓、肺の血

管内皮細胞には特に大きな影響を与えないが、肝臓では遺伝子発現の低下が認められたため、cRGD-MEND は TEC だけではなく一部の臓器の血管内皮細胞に影響を及ぼす可能性が示された。

表４　siLuc 搭載 cRGD-MEND の物理学的性質

	粒子径（nm）	PDI	ζ電位（mV）	siRNA 封入率（%）	siRNA 回収率（%）
siLuc	172 ± 7.6	0.09 ± 0.02	- 20.4 ± 3.9	97.5 ± 7.4	85.6 ± 7.6

（mean ± SEM, n = 5）

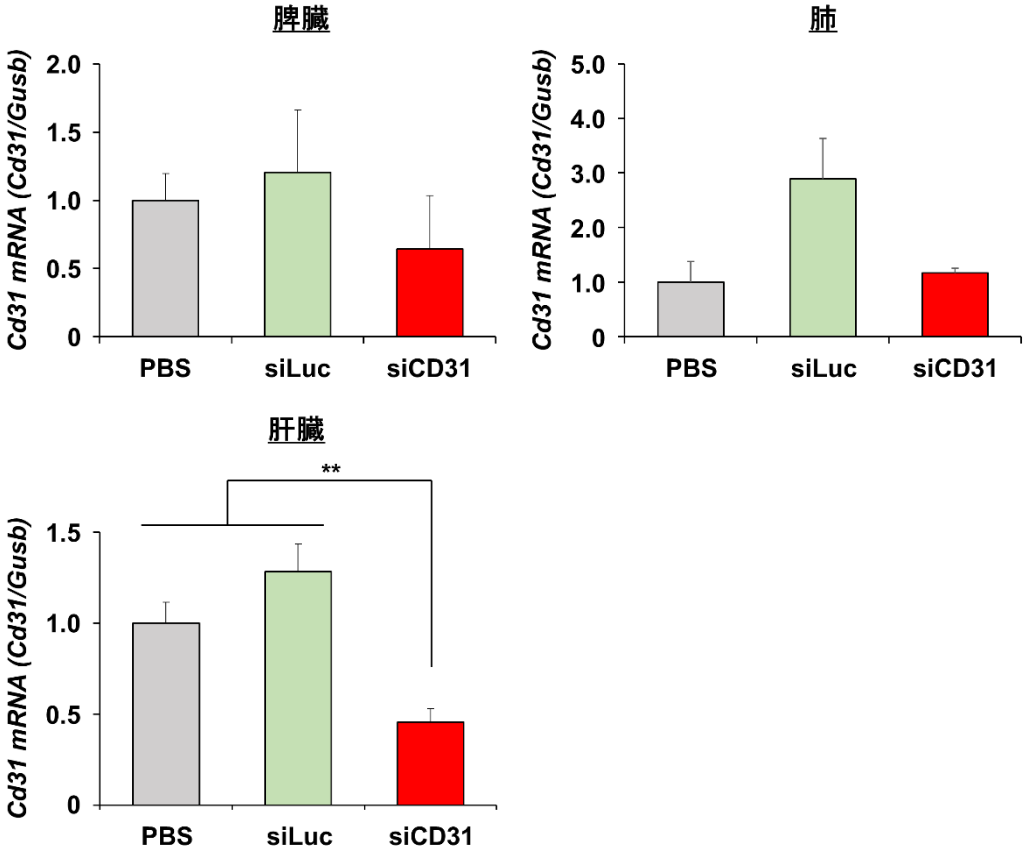


図１９　主要組織の血管内皮細胞における CD31 遺伝子ノックダウン活性

マウスに CT26 細胞を皮下移植し、腫瘍移植後 10 日目に PBS、cRGD-MEND（siCD31 または siLuc、siRNA 量: 2 mg/kg）を静脈内投与した。24 時間後、脾臓、肺、肝臓を回収し CD31 の mRNA レベルを定量的 RT-PCR 法で測定した。mean ± SEM（n = 3、**p<0.01）

2-4　TEC における cRGD-MEND による FasL 遺伝子ノックダウン活性の評価

続いて、最適化した cRGD-MEND を用いて TEC に発現する FasL 遺伝子のノックダウンを試みた。FasL に対する siRNA（siFasL）を搭載した cRGD-MEND を調製後（表５）、CT26 皮下移植モデルに投与し、腫瘍内の FasL 遺伝子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、CD31 遺伝子ではノックダウン効率が約 80%と高い値を示したにもかかわらず、FasL ではその活性効率は約 30%と低値であった（図２０）。一方で、CD31 遺伝子では高いノックダウン活性が確認されたため、TEC 上における FasL の遺伝子発現も十分に抑制できたと仮定して以後の実験を進めた。

表５　siFasL 搭載 cRGD-MEND の物理学的性質

	粒子径（nm）	PDI	ζ電位（mV）	siRNA 封入率（%）	siRNA 回収率（%）
siFasL	144 ± 8.5	0.08 ± 0.01	-19.9 ± 3.5	99.3 ± 4.3	84.3 ± 7.5

（mean ± SEM, n = 5）

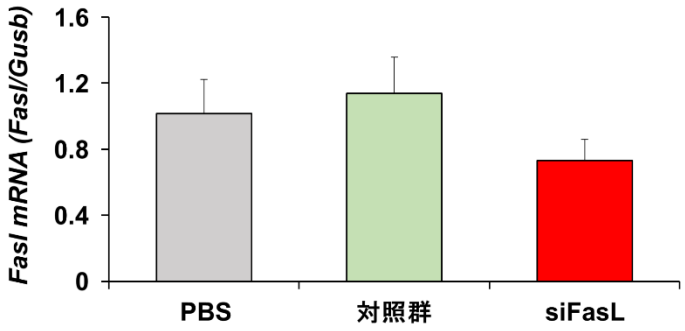


図２０　TEC における cRGD-MEND による FasL 遺伝子ノックダウン活性

マウスに CT26 細胞を皮下移植し、腫瘍移植後 10 日目に PBS、siFasL 搭載 cRGD-MEND または cRGD 未修飾 MEND（対照群）を静脈内投与した（siRNA 量: 2 mg/kg）。24 時間後、腫瘍を回収し FasL の mRNA レベルを定量的 RT-PCR 法で測定した。mean ± SEM（n = 3）

2-5　cyclic di-GMP 搭載 YSK12-MEND の調製

本研究では FasL 制御による腫瘍内への T 細胞の浸潤促進効果に加え、浸潤した T 細胞のがんに対する免疫応答をさらに強化することで、より強力な抗腫瘍活性の誘導を試みた。T 細胞の活性化には DC によるがん抗原の提示と成熟化が必要である。DC 内には細胞質 DNA センサーである cyclic-GMP-AMP（cGAMP）synthase（cGAS）が存在しており、がん細胞由来の DNA を認識することで下流の stimulator of interferon genes（STING）経路を活性化させ、

DC の成熟化を促進させると考えられている[36]。また、免疫原性が高い腫瘍に対するがん免疫応答には cGAS-STING 経路が必須であり、他の自然免疫受容体の関与がほとんどないことが報告された[59]。故に、cGAS-STING 経路を活性化させるアゴニストは有用ながんアジュバントとして期待されている。そこで本研究では、併用する薬物として STING アゴニスの一つである環状ジヌクレオチド「cyclic di-GMP（cdGMP）」を選択した。cdGMP は、細胞質の DNA センサーの 1 つである DEAD-box helicase 41（DDX41）に結合し STING 複合体を形成することで、tank binding kinase 1（TBK-1）-interferon regulator factor 3（IRF3）を介したシグナル伝達を活性化させ、I 型 IFN の産生を促しがんの排除の関与する T 細胞や NK 細胞を活性化させる[60,61]。当研究室では cdGMP を YSK12-MEND に搭載したナノ粒子（STING-MEND）を開発し、効率的かつ強力ながん免疫応答を誘導することに成功している[62]。そこで、siFasL 搭載 cRGD-MEND と STING-MEND の併用療法により、免疫細胞の浸潤促進と機能強化を同時に行うことで、更なるがん治療効果の増強を目指した（図２１）。

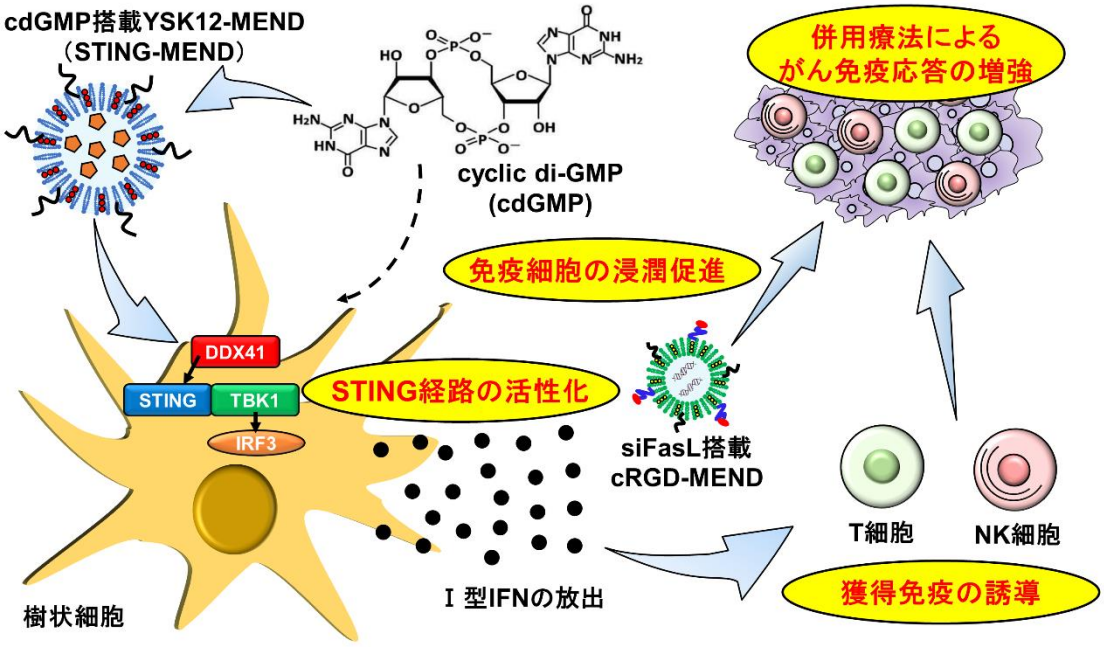


図２１　siFasL 搭載 cRGD-MEND/STING-MEND 複合がん免疫療法による治療戦略

これまでの報告に従い[62]、ブタノール希釈法により STING-MEND を調製した。ブタノール溶液中に YSK12-C4、cholesterol、PEG_{2000}-DMG を溶解させた脂質混合溶液（YSK12-C4/cholesterol/PEG_{2000}-DMG = 85/15/1 mol%の割合で混合）と cdGMP を溶解した溶液を混合し、クエン酸緩衝液（pH 4.5）を用いて YSK12-C4 を正に荷電させたままブタノール濃度を低下させることで粒子を形成させた。その後、さらにブタノール溶液を PBS で希釈し、限外濾過を繰り返すことで STING-MEND を調製した。その結果、STING-MEND は非常に均一性の高い約 160 nm 程度の粒子を形成し、ζ電位は正の値を示した（表６）。

表６　STING-MEND の物理学的性質

	粒子径（nm）	PDI	ζ電位（mV）	cdGMP 回収率（%）
STING-MEND	161.4 ± 9.3	0.082 ± 0.05	8.2 ± 2.1	14.3 ± 1.2

（mean ± SEM, n = 3）

2-6　siFasL 搭載 cRGD-MEND と STING-MEND の併用療法による抗腫瘍効果の評価

siFasL 搭載 cRGD-MEND と STING-MEND の併用療法によるがんに対する治療効果について検討した。また、CT26 に加えて他のがん種についても検討を行うことで、がん治療における本併用療法の汎用性も評価した。TEC 上に FasL が発現するがん種の一つとしてヒトの乳がんが挙げられる[57]。そこで本研究では、乳がんのモデルとしてマウス乳癌（4T1）を皮下移植したモデルマウスを用いて実験を進めた。cRGD-MEND および STING-MEND を CT26 または 4T1 皮下移植モデルマウスの尾静脈から投与し、腫瘍の体積を経時的に測定した。cRGD-MEND の投与は腫瘍移植後 7 日目、12 日目、17 日目に、STING-MEND の投与は 8 日目、13 日目、18 日目に実施した。その結果、CT26 腫瘍において併用療法群では PBS、siLuc、各単独投与群と比較して顕著な治療効果が確認された。一方で、4T1 腫瘍においても他群と比較して併用療法群では有意な抗腫瘍効果が確認されたが、CT26 腫瘍の時と比較してその効果の程度は明らかに低かった（図２２）。

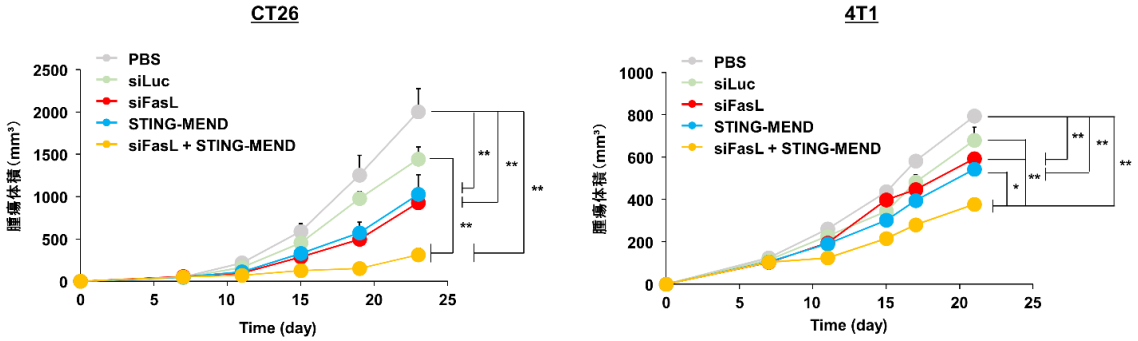


図２２　併用療法による治療的抗腫瘍効果の評価

マウスに CT26 または 4T1 細胞を皮下移植した後、腫瘍移植後 7 日目、12 日目、17 日目に PBS、cRGD-MEND（siFasL または siLuc、siRNA 量: 2 mg/kg）を、8 日目、13 日目、18 日目に STING-MEND（cdGMP 量：3 μg/mouse）を静脈内投与し、腫瘍の成長を観察した。mean ± SEM（n = 5、* P <0.05、** P <0.01）

続いて、既存のがん治療法では根治することが難しい、ある程度成長したがんに対する治療効果について検討した。先程と同様に、cRGD-MEND および STING-MEND を CT26 皮下移植モデルマウスの尾静脈から投与し、腫瘍の体積を経時的に測定した。cRGD-MEND の投与は腫瘍移植後 17 日目、21 日目に、STING-MEND の投与は 18 日目、22 日目に実施した。その結果、本併用療法は大きく成長したがんに対し治療開始後わずか 3 日で腫瘍の急速な壊死と体積の減少を引き起こした（図２３）。以上より、siFasL 搭載 RGD-MEND と STING-MEND による併用療法は、従来のがん治療法にはない迅速かつ強力な抗腫瘍活性を誘導することが可能であり、また CT26 と 4T1 腫瘍において治療効果に差はあったものの、本併用療法はがん治療において一定の汎用性を有する治療法である可能性が示唆された。

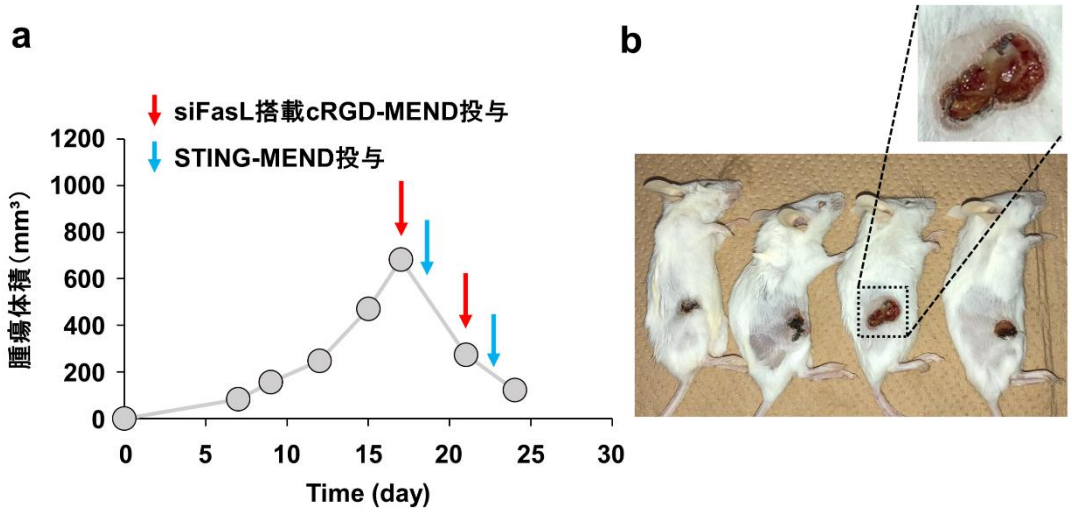


図２３　併用療法による大きな腫瘍に対する治療的抗腫瘍効果の評価

(a)腫瘍体積の推移(b)治療終了後（腫瘍移植後 24 日目）のマウスと腫瘍の拡大図。マウスに CT26 細胞を皮下移植した後、腫瘍移植後 17 日目、21 日目に siFasL 搭載 cRGD-MEND（siRNA 量：2 mg/kg、赤矢印）を、18 日目、22 日目に STING-MEND（cdGMP 量：4 μg/mouse、青矢印）を静脈内投与し、腫瘍の成長を観察した。mean ± SEM（n = 4）

2-7　siFasL 搭載 cRGD-MEND と STING-MEND の併用療法後における腫瘍内の免疫ステータスの解析

先述した通り、FasL の発現はがんの排除に関わる T 細胞を選択的にアポトーシスし、腫瘍内への浸潤を阻害することでがんに対する免疫応答を低下させる。従って、cRGD-MEND による FasL 遺伝子の抑制は腫瘍内における免疫応答の改善をもたらすと考えられる。さらに STING-MEND の併用により、その効率はさらに増加すると予想される。そこで次に、siFasL 搭載 cRGD-MEND/STING-MEND 併用療法後の腫瘍内におけるがん免疫関連因子の変化を評価した。それぞれの MEND で処理した治療後マウス（CT26、腫瘍移植後 15 日目）から腫瘍組織を摘出し、腫瘍内における種々のがん免疫に関連する因子の遺伝子発現変化を定量的 RT-PCR 法を用いて評価した。その結果、予想に反して、最も高い抗腫瘍活性が認められた併用療法群において腫瘍内における T 細胞の増加が確認されなかった。また、B 細胞、マクロファージ、DC など他の免疫細胞マーカーを評価したところ、PBS、siLuc、各単独投与群と比較して遺伝子発現の有意な減少が認められた。さらに、NK 細胞の活性化マーカーである NKG2D 遺伝子および種々の免疫細胞の活性化により発現する PD-1、FasL の遺伝子発現も低下が認められた。加えて、がん免疫応答の増強に関与するI型 IFN（IFN-α、IFN-β）および IFN-γ の増加も認められなかった（図２４）。以上より、siFasL 搭載 cRGD-MEND/STING-MEND 併用療法による抗腫瘍活性の誘導には免疫系の寄与が低い可能性が示唆された。

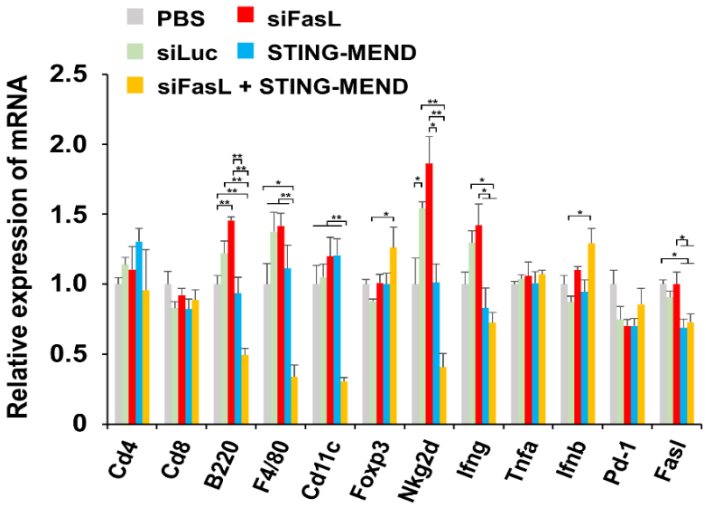


図２４　治療後マウスにおける腫瘍内の免疫ステータス評価

マウスに CT26 細胞を皮下移植した後、腫瘍移植後 7 日目、12 日目に PBS、cRGD-MEND（siFasL または siLuc、siRNA 量 : 2 mg/kg）を、8 日目、13 日目に STING-MEND（cdGMP 量 : 3 μg/mouse）を静脈内投与した。その後、15 日目に腫瘍を回収し、各遺伝子の mRNA レベルを定量的 RT-PCR 法で測定した。PBS で処理した担癌マウスの値を 1 としたときの相対値を縦軸とした（Cd4、Cd8 : T 細胞、B220 : B 細胞、F4/80 : マクロファージ、Cd11c : DC、Foxp3 : Treg 細胞、Nkg2d : NK 細胞の活性化マーカー、Ifng、Tnfa、Ifnb : 炎症性サイトカイン、Pd-1、Fasl : T 細胞、NK 細胞などの免疫細胞の活性化マーカー）。mean ± SEM（n = 3、* P <0.05、** P <0.01）

2-8　siFasL 搭載 cRGD-MEND と STING-MEND の併用療法後における腫瘍内の血管関連因子の解析

上記の検討より、免疫細胞の腫瘍内浸潤および種々のサイトカイン産生の増加が認められなかったことから、siFasL 搭載 cRGD-MEND/STING-MEND 併用療法による直接的ながん細胞の排除メカニズムとして免疫系以外の要因が寄与している可能性が示唆された。一方で、併用療法による腫瘍体積の減少は MEND 投与後わずか 3 日で認められ、それは急速な壊死および出血を伴うものであった（図２３b)。以上より、本併用療法における抗腫瘍メカニズムの主要な要因として腫瘍内血管の破壊が寄与しているのではないかと考え、腫瘍内における血管の構築に関与する因子の遺伝子発現変化を評価した。それぞれの MEND で処理した治療後マウス（CT26、腫瘍移植後 15 日目）から腫瘍組織を摘出し、腫瘍内における血管関連因子の遺伝子発現変化を定量的 RT-PCR 法を用いて評価した。その結果、併用療法群のみにおいて血管密度の指標である CD31 遺伝子の著しい低下が確認された（図２５)。一方で、血管新生促進に関与する vascular endothelial growth factor A （Vegfa）および血管の正常化マーカーである neuron-glial antigen 2（Ng2）の遺伝子発現レベルは大きく変化しなかった。この結果より、本併用療法による抗腫瘍活性は急速な TEC の破壊により誘導される可能性が示唆された。

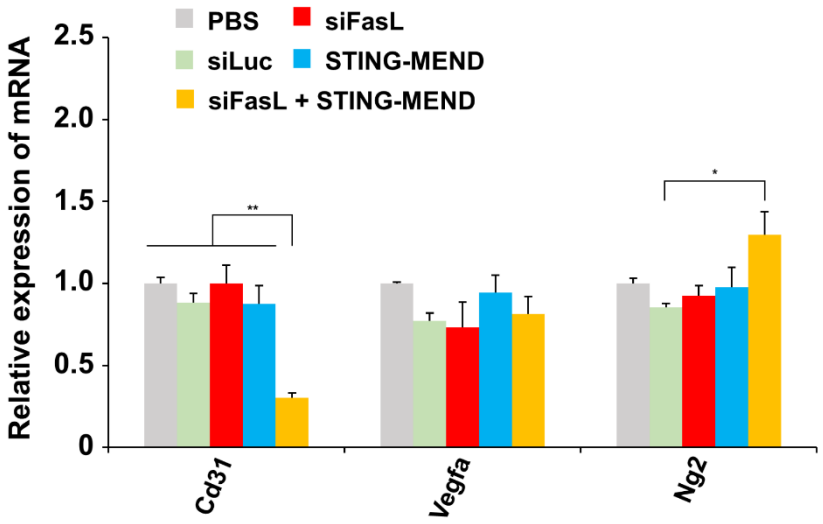


図２５　治療後マウスにおける腫瘍内血管関連因子の解析

マウスに CT26 細胞を皮下移植した後、腫瘍移植後 7 日目、12 日目に PBS、cRGD-MEND（siFasL または siLuc、siRNA 量 : 2 mg/kg）を、8 日目、13 日目に STING-MEND（cdGMP 量 : 3 μg/mouse）を静脈内投与した。その後、15 日目に腫瘍を回収し、各遺伝子の mRNA レベルを定量的 RT-PCR 法で測定した。PBS で処理した担癌マウスの値を 1 としたときの相対値を縦軸とした。（Cd31 : 血管内皮細胞、Vegfa : 血管内皮増殖因子、Ng2 : 血管周皮細胞)。mean ± SEM（n = 3、* P<0.05、** P <0.01）

2-9　siFasL 搭載 cRGD-MEND と STING-MEND の併用療法による抗腫瘍活性の誘導における T 細胞の影響

2-7、2-8 における遺伝子解析の結果より、siFasL 搭載 cRGD-MEND/STING-MEND 併用療法による抗腫瘍活性の誘導には T 細胞が寄与していない可能性が示唆された。そこで、T 細胞を保有していないマウスにおいても同様の抗腫瘍活性が誘導されるかを評価した。本研究では、T 細胞が欠如したヌードマウスを用いて検証を進めた。それぞれの MEND を CT26 皮下移植モデルの尾静脈から投与し、腫瘍の体積を経時的に測定した。その結果、併用療法では T 細胞が欠如しているにも関わらず、他群と比較して有意な腫瘍増殖抑制効果が確認された（図２６）。以上より、本併用療法による抗腫瘍活性の誘導には T 細胞の寄与が小さいことが示唆された。

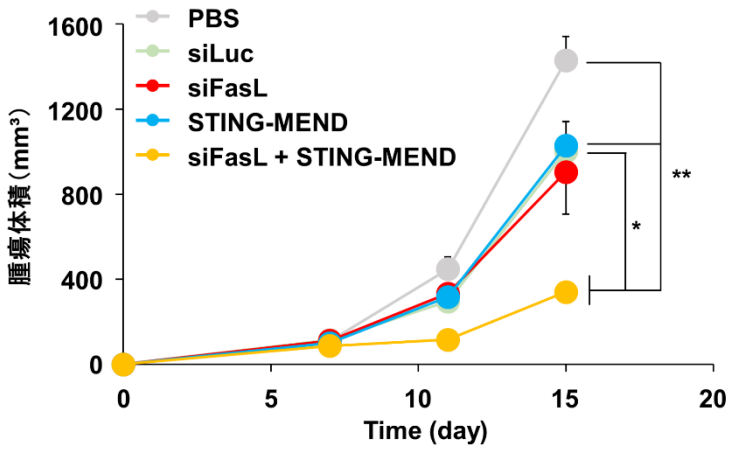


図２６　併用療法による抗腫瘍活性の誘導における T 細胞の影響

ヌードマウスに CT26 細胞を皮下移植した後、腫瘍移植後 7 日目、12 日目に PBS、cRGD-MEND（siFasL または siLuc、siRNA 量：2 mg/kg）を、8 日目、13 日目に STING-MEND（cdGMP 量：3 μg/mouse）を静脈内投与し、腫瘍の成長を観察した。mean ± SEM（n = 3-4、* P <0.05、** P <0.01）

2-10　siFasL 搭載 cRGD-MEND と STING-MEND の併用療法による抗腫瘍活性の誘導における I型 IFN シグナル経路の影響

がんの排除に関わる免疫システムには T 細胞や B 細胞などの獲得免疫系だけではなく自然免疫系の寄与も挙げられる。その一例として、I 型 IFN シグナル経路の活性化は自然免疫応答を誘導し、がんに対する免疫応答を増強することが報告されている。そこで、次にI型 IFN シグナル経路の機能を抑制したマウスを用いて抗腫瘍活性に対する自然免疫系の影響を評価した。初めに、このシグナル経路の機能を抑制するために CT26 皮下移植モデルに対してI型 IFN 受容体（interferon alpha/beta receptor 1：IFNAR-1）の阻害抗体を併用療法開始 1 日前に腹腔内投与した。その後は 2-6 と同様のスケジュールで MEND を投与し、腫瘍の

体積を経時的に測定した。その結果、これまで確認された併用療法による強力な抗腫瘍活性が IFNAR-1 を阻害したマウスでは大きく抑制された（図２７）。このことから、siFasL 搭載 cRGD-MEND/STING-MEND 併用療法による強力な抗腫瘍活性を誘導するメカニズムとして I型 IFN シグナル経路の活性化が寄与している可能性が示唆された。

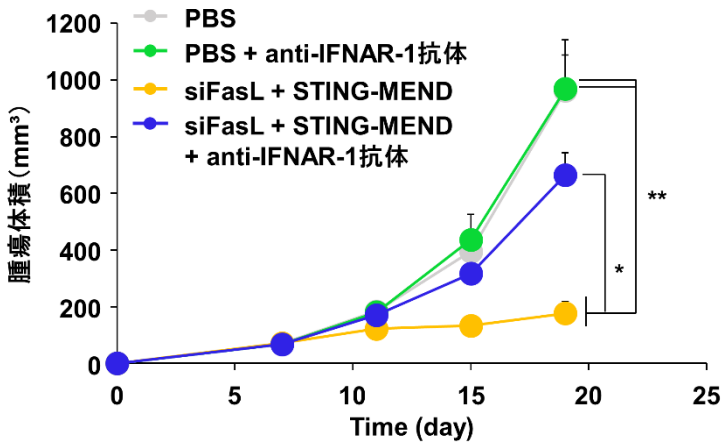


図２７　併用療法による抗腫瘍活性の誘導における I 型 IFN シグナル経路の影響

マウスに CT26 細胞を皮下移植した後、腫瘍移植後 6 日目、11 日目、16 日目に anti-IFNAR-1 抗体（200 μg/mouse）を腹腔内投与し、7 日目、12 日目、17 日目に PBS、siFasL 搭載 cRGD-MEND（siRNA 量：2 mg/kg）を、8 日目、13 日目、18 日目に STING-MEND（cdGMP 量：3 μg/mouse）を静脈内投与した後、腫瘍の成長を観察した。mean ± SEM（n = 6、* P <0.05、** P <0.01）

■ 考察

第２章では、TME のがん免疫機構の抑制に寄与する TEC の機能制御に基づくがん治療法の構築を試みた。

CT26 腫瘍における TEC 由来遺伝子をノックダウン可能な新規の cRGD-MEND を調製するために脂質組成の最適化を行った結果、従来法により調製された cRGD-MEND（旧 cRGD-MEND）と比較して、ノックダウン活性を 3.5 倍程度上昇させることに成功した（図１８）。一方で、旧 cRGD-MEND はヒト腎がん細胞を皮下移植したモデルマウスに投与した場合、TEC 由来遺伝子を効率的にノックダウンすることに成功している[29]。このことから、cRGD-MEND を用いた TEC 由来遺伝子の制御は、cRGD-MEND の組成やがん種固有の特徴に大きく左右される可能性が示唆された。今後の検討予定である他のがん種あるいは転移がんモデルを用いて評価する場合もこの点は十分に注視する必要があると予想される。

次に、TEC 以外の主要組織（脾臓、肺、肝臓）の血管内皮細胞における cRGD-MEND による CD31 遺伝子のノックダウン活性を評価した結果、脾臓、肺ではその効果が確認されなかった（図１９）。従って、cRGD-MEND によるこれらの組織への影響は低いと考えられる。一方で、肝臓では約 60%のノックダウン活性が確認された（図１９）。cRGD-MEND の特性として、そのほとんどが肝臓に集積することが確認されており、また肝内皮細胞は老廃物の除去に関与する非特異的なピノサイトーシス能を有しいる[63,64]。これらの特性は、cRGD-MEND の非特異的な細胞内取り込みを可能にし、結果的に CD31 遺伝子の発現を抑制したと考えられる。そのため、TEC に特異性が高くかつ他の正常組織の血管内皮細胞に対して影響を与えないより高度なナノ DDS の開発が望まれるが、このメカニズムを回避するのは極めて難しい。一方で、FasL は正常な肝臓の血管内皮細胞上ではほとんど発現していないことが報告されている[57]。従って、cRGD-MEND のオフターゲット効果による副作用発現のリスクは低いことが予想される。さらに、FasL は角膜や精巣といった免疫特権組織、脳や心臓の血管内皮細胞、種々の活性化した免疫細胞または腫瘍組織などナノ粒子製剤の送達が極めて困難な組織において発現が確認されいる[57,65-68]。よって、cRGD-MEND はこれらの組織に発現する FasL に対してほとんど影響を及ぼさないことが推測される。以上より、cRGD-MEND による FasL を標的としたがん治療戦略は、非常に特異性が高くかつ安全性に優れたシステムであると考えられる。

最適化した cRGD-MEND を用いて TEC に発現する FasL 遺伝子のノックダウン効率を評価したところ、CD31 遺伝子では高い活性効率が確認されたのにもかかわらず、FasL ではそれほど大きな効果は認められなかった（図２０）。FasL は TEC だけではなく腫瘍細胞や免疫細胞など他の細胞でも発現が確認されており、ノックダウン効率の低下は cRGD-MEND では抑制することができないこれらの細胞に発現する FasL 遺伝子を同時に検出したことが原因であると考えられる。従って、今後は腫瘍から TEC のみを単離し、その中での FasL 遺伝子およびタンパク質レベルでの変化を評価する必要がある。

次に、siFasL 搭載 cRGD-MEND と STING-MEND の併用療法によるがんに対する治療効

果ついて評価した結果、CT26 腫瘍では高いがん治療効果が確認されたものの、4T1 腫瘍ではその効果が明らかに低下していた（図２２）。先ほども述べたが、cRGD-MEND による遺伝子抑制の効果はその組成やがんの種類により大きく変動することが予想されるため、治療効果の差についても同様の原因が考えられる。また、ヒトの TEC 上に発現する FasL の程度は、そのがん種により大きく異なることが報告されているため[57]、結果として治療効果に差が生じたものと思われる。そのため、今回最適化した cRGD-MEND が 4T1 腫瘍に対して問題なく機能しているかどうかを CD31 遺伝子のノックダウン活性を評価することで確認し、cRGD-MEND が機能しない場合は更なる改良を施す必要がある。

最後に、本併用療法による抗腫瘍効果のメカニズムを解析したところ、TEC の減少に起因している可能性が示唆された（図２５）。腫瘍内における急速な血管の消失は、兵糧攻めによる腫瘍の退縮を引き起こすことが報告されている[69-71]。また、この考えをもとに開発された血管新生阻害剤であるベバシズマブ（商品名：アバスチン）は、抗がん剤の売上で世界トップクラスに位置するブロックバスターとなっており、血管新生阻害に基づくがん治療戦略は世界中で大きな期待が寄せられた。しかしながら、その理想的な抗腫瘍メカニズム理論からの期待に反し実際の臨床現場における治療効果は十分ではなく、継続使用による薬剤耐性の出現も問題となったため[72,73]、従来の治療法に代わる新たな血管新生阻害療法の実現が期待されている。一方で、本併用療法は血管新生阻害に基づく兵糧攻めによるがん治療という点では同じであると予想されるが、治療開始後わずか 3 日で腫瘍体積の減少を引き起こしたという点から（図２３）、従来の血管新生阻害療法とは異なり爆発的な速度で TEC の破壊を誘導できる可能性が示唆された。さらに、FasL の制御と STING アゴニストの組み合わせにより血管の破壊を誘導することが可能という知見はこれまでに報告されていない。従って、本併用療法は従来のシステムとは異なる性能を有する新たな血管新生阻害療法になりうると考えられる。しかしながら、腫瘍内血管量の変化は遺伝子レベルでしか確認していないため、この仮説を証明するにはデータとして不十分である。今後は、腫瘍内の血管が消失しているかどうか、また従来の血管新生阻害療法と比較して血管の消失速度が異なるのかなど、組織切片やフローサイトメーターなどを用いてタンパク質レベルでの変化を評価する必要がある。

本併用療法による抗腫瘍効果が血管の破壊により誘導される可能性が示唆されたが、それがどのようなメカニズムにより誘発されるのかは未だ不明である。一方で、これまで確認された抗腫瘍効果は、Ⅰ型 IFN シグナル経路の阻害より大きく抑制された（図２７）。この結果を踏まえ、本併用療法による血管破壊メカニズムについて以下のような考察を行った。Ⅰ型 IFN に分類される IFN-β は、血管内皮細胞増殖、生存、および毛細血管網形成を阻害する強力な抗血管新生サイトカインであり、angiopoietin-1（Ang1）のアップレギュレーションを介して腫瘍の血管成熟を誘導することが報告されている[74-76]。また、Ⅰ型 IFN はインフラマソーム形成に伴うカスパーゼ 1 の活性化を誘導することが確認されており[77,78]、カスパーゼ 1 の活性化は Gasdermin D (GSDMD)の切断を誘導し、細胞膜孔を形成させることで細胞

質成分の流出および interleukin-1β（IL-1β）や interleukin-18（IL-18）などの炎症性サイトカインの産生を特徴とする細胞死である「パイロトーシス」を引き起こすことも報告されている[79-84]。そのため、STING-MEND により誘導されたI型 IFN が TEC の破壊に直接的に寄与しているのではないかと推測した。一方で、TEC の破壊は STING-MEND 単独では誘導されず、FasL の抑制が不可欠であることが示唆された（図２５）。従って、TEC に発現する FasL はI型 IFN により誘導される TEC の破壊に対して防御因子として機能しているのではないかと予想している（図２７）。現状、血管機能における恒常性の維持と FasL との関係性については特に報告がないため、本併用療法による抗腫瘍活性は、これまでにはない新たな分子メカニズムにより引き起こされている可能性が示唆された。

さらに、本併用療法によるがん治療は EPR 効果を必要としないがん治療戦略である。序論でも述べた通り、ヒトでの EPR 効果は疑問視されているが、現在もがんに対するナノ医薬品の開発では EPR 効果に基づいた戦略からは脱却できていない。そのため、EPR 効果に依存しない新たな DDS 技術の構築が望まれている。一方で、本併用療法によるがん治療は TEC 特異的な因子を標的としたアクティブターゲティング能を有する DDS 技術や人に元々備わる免疫システムを利用した戦略であるため、従来の EPR 効果に依存したシステムからの脱却に成功したと考えられる。

以上より、本併用療法はがんに対する新たな治療法として期待できると考えられる。

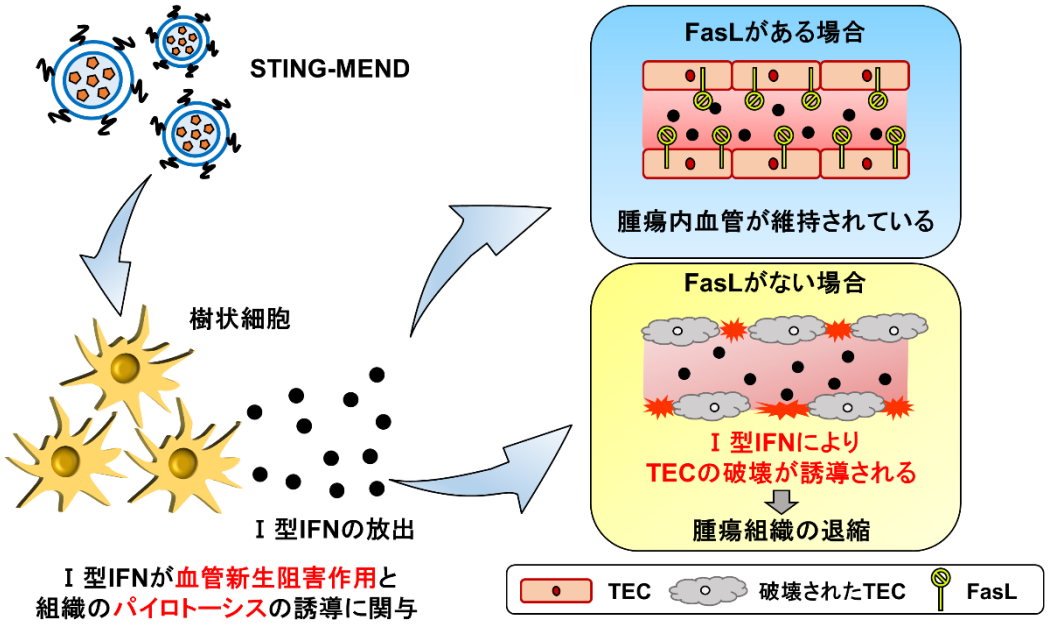


図２７　併用治療による抗腫瘍活性メカニズムの考察

小括

1. 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。

2. siFasL 搭載 RGD-MEND と STING-MEND による併用療法は迅速かつ強力な抗腫瘍活性を誘導した。

3. 本併用療法における抗腫瘍活性の発現は TEC の急速な減少に起因している可能性が示唆された。

【総括】

本研究により得られた成果は以下の通りである。

- **YSK12-MEND は DC に発現する抑制性因子 IDO1 の発現を効率的に制御し、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 [85]。**

- **cRGD-MEND は TEC に発現する抑制性因子 FasL を制御し、STING-MEND との併用療法により従来のがん免疫療法や血管新生阻害療法にはない迅速かつ強力な治療効果と未知のメカニズムによりがん治療効果を増強させることを見出した。**

がん免疫療法はこれまでのがん治療法に代わる新たな治療戦略として大いに期待されている。しかしながら、その恩恵を受けている患者は一部であり未だに多くの課題を残している。本研究では、TME における免疫機構のリプログラミングに基づくナノ DDS の開発に成功しており、がん免疫療法に抵抗性のあるがん患者に対して応用可能であると予想される。また、TEC の機能制御によりがん免疫療法の強化を試みた研究では、初めに立てた仮説は立証できなかったものの、従来のがん治療法にはない分子メカニズムにより強力ながん治療効果を誘導する治療法を見出した。本研究により得られた成果はこれまで治療が困難であったがん患者に対して有益なアプローチとなり得るものである。これらの知見が今後のがん治療および DDS 分野の研究に寄与し、更なる医療の発展に貢献することを期待して本項を終える。

【実験材料・実験方法】

1　試薬・細胞・動物・機器

1-1 MEND 調製関連試薬

- Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Devices　Merck Millipore
- Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter Devices　Merck Millipore
- Merck Millipore　Merck Millipore
- YSK05　本研究室にて合成 [58]
- YSK12-C4　本研究室にて合成 [25]
- Cholesterol　SIGMA-ALDRICH
- PEG_{2000}-DMG　日油
- PEG_{2000}-DSPE　日油
- RGD (cyclic (Arg-Gly-Asp-D-Phe-Lys)　PEPTIDES INTERNATIONAL
- Triton X-100　SIGMA-ALDRICH
- Quant-iTTM RiboGreen RNA　ThermoFisher Scientific
- HEPES　同仁化学研究所
- Ethanol　富士フィルム和光純薬
- tert-butyl alcohol (*t*-BuOH)　富士フィルム和光純薬
- クエン酸一水和物　富士フィルム和光純薬
- D-PBS (-)　富士フィルム和光純薬
- Cyclic di-GMP　ヤマサ醤油株式会社

1-2 細胞培養

- RPMI-1640　SIGMA-ALDRICH
- RPMI-1640 (4,500mg/l Glucose) with L-Glutamine, Phenol Red, HEPES and Sodium Pyrvate　富士フィルム和光純薬
- FBS　SIGMA-ALDRICH
- Penicillin-Streptomycin　GIBCO
- Trypan Blue　同仁化学研究所
- 2.5% Trypsin　GIBCO
- EDTA・2Na・$2H_2O$　富士フィルム和光純薬
- sodium pyruvate solution　SIGMA-ALDRICH
- HEPES　SIGMA-ALDRICH
- ACK Lysing Buffer　Lonza
- 2-mercaptoethanal　ThermoFisher Scientific

- Recombinant mouse GM-CSF　R&D Systems
- Opti-MEM I Reduced Serum Medium　gibco
- Culture Sure Freezing Medium　富士フィルム和光純薬

1-3　抗体・細胞染色試薬

- PE anti-mouse CD11c Antibody (clone: N418)　BioLegend
- APC anti-mouse CD40 Antibody (clone: 3/23)　BioLegend
- APC anti-mouse CD80 Antibody (clone: 16-10A1)　BioLegend
- APC anti-mouse CD86 (clone: GL-1)　BioLegend
- APC anti-mouse I-Ab Antibody (clone: M5/114.15.2)　BioLegend
- PE Armenian Hamster IgG Isotype Ctrl Antibody　BioLegend
- APC Rat IgG2a, κ Isotype Ctrl Antibody　BioLegend
- APC Armenian Hamster IgG Isotype Ctrl Antibody　BioLegend
- APC Rat IgG2b, κ Isotype Ctrl Antibody　BioLegend
- Purifide anti-mouse CD16/32 Antibody　BioLegend

1-4　siRNA・定量的 RT-PCR 関連試薬

- ON-TARGET plus Non-targeting pool　Dharmacon
- ON-TARGET plus Mouse Ido1 (15930) siRNA-SMART pool　Dharmacon
- Cy5 標識 siRNA　Bioneer

  -sense　AcA uGA AGc AGc ACG ACu U (dT*dT)

  -anti-sense　AAG UCG UGC UGC UUC AUG U (dTdT)

大文字は DNA を、小文字は RNA を、*は 2’-Ome 修飾されていることをそれぞれ示す。

- CD31、FasL、Luciferase に対する siRNA は、北海道システムサイエンス株式会社より購入し Nuclease-Free Water に溶解後分注して凍結保存した。

標的遺伝子名		配列 5’→3’
CD31	sense	gug cau agu uca agu gac aTT
	anti-sense	ugu cac uug aac uau gca cTT
FasL	sense	gac uga uaa gcu aga gac uTT
	anti-sense	agu cuc uag cuu auc agu cTT
Luciferase	sense	ccg ucg ucu ucg uga gca aTT
	anti-sense	uug cuc acg aau acg acg gTT

大文字は DNA を、小文字は RNA を、*は 2’-Ome 修飾されていることをそれぞれ示す。

- THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix　TOYOBO

1-5 プライマー

プライマーは、北海道システムサイエンス株式会社および SIGMA-ALDRICH（標的遺伝子名に下線あり）から購入し、Nuclease-Free Water に溶解して凍結保存した。

標的遺伝子名		配列 5’→3’
Ido1	forward	CAA AGC AAT CCC CAC TGT ATC C
	reverse	ACA AAG TCA CGC ATC CTC TTA AA
Foxp3	forward	TGC AGG GCA GCT AGG TAC TTG
	reverse	TCG GAG ATC CCC TTT GTC TTA TC
Cd25	forward	AAC TTT GGC ATT GTG GAA GG
	reverse	GTC TTC TGG GTG GCA GTG AT
Cd31	forward	TAC AGT GGA CAC TAC ACC TG
	reverse	GAC TGG AGG AGA ACT CTA AC
Fasl	forward	TCC GTG AGT TCA CCA ACC AA
	reverse	CAC TCC AGA GAT CAG AGC GG
Cd4	forward	CTT CGC AGT TTG ATC GTT TTG AT
	reverse	CCG GAC TGA AGG TCA CTT TGA
Cd8	forward	AAG AAA ATG GAC GCC GAA CTT
	reverse	AAG CCA TAT AGA CAA CGA AGG TG
B220	forward	TGC CAG CTA CAT TGA TGG CTT
	reverse	GCC AGT ATT CTG CGC ACT TG
F4/80	forward	TTG TAC GTG CAA CTC AGG ACT
	reverse	GAT CCC AGA GTG TTG ATG CAA
Cd11c	forward	CTG GAT AGC CTT TCT TCT GCT G
	reverse	GCA CAC TGT GTC CGA ACT CA
Nkg2d	forward	GCA CTA ACT ACC AGT CAA CCT G
	reverse	CTC GAA CAA CGA ACA TTG GAG A
Tnf-α	forward	CAGGCGGTGCCTATGTCTC
	reverse	CGATCACCCCGAAGTTCAGTAG
Ifn-β	forward	AAG AGT TAC ACT GCC TTT GCC ATC
	reverse	CAC TGT CTG CTG GTG GAG TTC ATC
Ifn-γ	forward	ATG AAC GCT ACA CAC TGC ATC
	reverse	CCA TCC TTT TGC CAG TTC CTC
Pd-1	forward	ACC CTG GTC ATT CAC TTG GG
	reverse	CAT TTG CTC CCT CTG ACA CTG

標的遺伝子名		配列 5’→3’
Vegfa	forward	CTG TGC TCT GGG ATT TG
	reverse	GAT TTG AGG GAG TGA AGA AC
Ng2	forward	GCT GTC TGT TGA CGG AGT GTT
	reverse	CGG CTG ATT CCC TTC AGG TAAG
Gapdh	forward	AAC TTT GGC ATT GTG GAA GG
	reverse	GTC TTC TGG GTG GCA GTG AT
Gusb	forward	GTG GTA TGA ACG GGA AGC AAT
	reverse	AAC TGC ATA ATA ATG GGC ACT GT

1-6　合成品

Ovalbumin の H-2Kb CD8 エピトープである Ovalbumin 257-264 ペプチド（SIINFEKL）は（株）東レリサーチセンター(JAPAN) に合成を依頼した。

1-7　その他

- RNeasy Mini Kit　QIAGEN
- Recombinant RNase Inhibitor　Takara
- Recombinant DNase Inhibitor　Takara
- フェノール:クロロホルム 5:1　ナカライテスク
- クロロホルム　富士フィルム和光純薬
- Glycogen Solution　ナカライテスク
- Prime Script RT reagent kit　Takara
- Ovalbumin　SIGMA-ALDRICH
- G-418 Sulfate　富士フィルム和光純薬
- Heparin Sodium　富士フィルム和光純薬
- Lipofectamine RNAiMAX Reagent　Life technologies
- GeneSilencer　Genlantis
- RNAiso Plus　Takara
- Direct-zolTM RNA MiniPrep　ZYMO RESEARCH
- 1.4 mm ジルコニアビーズ　TOMY
- Nuclease-Free Water　Ambion

1-8 細胞

- E.G.7-OVA — American Type Culture Collection
- CT26 — American Type Culture Collection
- 4T1 — American Type Culture Collection

1-9 動物

C57BL/6JJcl（C57BL/6）および BALB/cCrSlc（BALB/c）、BALB/c Slc-nu/nu（雌性、6~10 週齢）は三協ラボサービスより購入した。マウスは全て SPF 環境下で飼育したものを用いた。動物実験は国立大学法人北海道大学動物実験に関する規定に基づき実施した。

1-10 機器

- MCO-175（CO2 インキュベーター） — SANYO
- EX-125 および MX-200（遠心機） — TOMY
- CF7D2（遠心機） — HITCHI
- Zeta Sizer Nano-ZS（粒子径・ζ電位の測定） — Marvern
- Enspire 2300 multilabel reader — Perkin Elmer
- Nano drop　LITE — ThermoFisher Scientific
- Docu-pH Meter — Sartorius
- VORTEX-GENIE 2 — Scientific Industries
- Real-time qPCR Light Cycler 480 System — Roche
- Gallios（フローサイトメーター） — Beckman Coulter
- SONY SH800（フローサイトメーター） — SONY
- CytoFLEX（フローサイトメーター） — Beckman Coulter
- Ultra Sonic Cleaner — アイワ医科工業
- シェイキングインキュベーターSI-300 — アズワン
- Micro SmashTM MS-100R（組織破砕機） — TOMY
- DIVAC（ダイヤフラムポンプ型真空ポンプ） — 東京理科機器
- FD-1000（凍結乾燥機） — 東京理科機器
- Ultraflex II（MALDI-TOFMS） — Bruker
- LBS-325（オートクレーブ機） — TOMY
- MCV-710ATS（クリーンベンチ） — SANYO
- NS-13B（クリーンベンチ） — BIOLAND
- VG-1304L（クリーンベンチ） — AIRTECH
- DU730 (吸光光度計) — Beckman Coulter

2　実験方法

2-1　溶液調製

- **脂質溶液**

t-BuOH を 50℃で加温し溶解した後、450 mL 量り、DDW（50 mL）を加えて 90%t-BuOH 溶液を調製した。YSK12-C4、YSK05 は 10 mM となるように、Cholesterol は 2 mM となるように、PEG_{2000}-DMG は 0.2 mM、0.5 mM もしくは 2 mM となるように 90%*t*-BuOH 溶液に溶解し、-20℃で保存した。

- **10 mM HEPES Buffer**

HEPES 119 mg を秤量し、DDW 40 mL に溶解後、1 N NaOH で pH 7.4 に合わせた。その後、DDW で 50 mL にメスアップし、0.2 μm のフィルターろ過により滅菌し、4ºC で保存した。

- **20 mM、10 mM、1 mM クエン酸 Buffer**

クエン酸一水和物 192 mg を秤量し、DDW 40 mL に溶解後、1 N NaOH により任意の pH に調製した（pH 4、5.5、6）。その後、DDW で 50 mL にメスアップし、0.2 μm のフィルターろ過により滅菌し、4ºC で保存した。また、20 mM より低い濃度の溶液を用いる場合は適宜 DDW で希釈して使用した。

- **10 w/v% Triton X-100**

Triton X-100 を 5 g 秤量し、DDW を用いて 50 mL にメスアップした。

- **非働化胎児牛血清（FBS）**

胎児牛血清を 37℃で溶解し、56℃で 30 分間加熱を行った後、50 mL ずつ分注し-20℃で保存した。

- **0.5%　Trypsin/5 μM EDTA 溶液**

EDTA・2Na・$2H_2O$ 0.19 g、NaCl 0.63 g、NaH_2PO_4・$2H_2O$ 0.19g を DDW に溶解後、1N NaOH で pH 7.4 に調製し、80 mL にメスアップした。. オートクレーブ後、クリーンベンチ内で 2.5% Trypsin 20 mL を添加し 4ºC で保存した。

- **フローサイトメーター用緩衝液（FACS Buffer）**

PBS 500 mL にアジ化ナトリウム 1 g および BSA 2.5 mg を添加し 4℃で保存した。

- **細胞培養用の培地調製**

【E.G.7 – OVA 細胞】

RPMI-1640	500 mL
FBS	50 mL
penicillin/streptomycin	5 mL
HEPES buffer（1 M）	5 mL
sodium pyruvate（100×）	5 mL
2-Mercaptoethanol（0,55 mM）	0.5 mL
G418	400 μg/mL

【CT26 細胞】

RPMI-1640 (4,500mg/l Glucose) with L-Glutamine, Phenol Red, HEPES and Sodium Pyrvate	500 mL
FBS	50 mL
penicillin/streptomycin	5 mL

【4T1 細胞】

RPMI-1640	500 mL
FBS	50 mL
penicillin/streptomycin	5 mL

2-2　一般操作

E.G.7-OVA 細胞の培養

E.G.7-OVA 細胞は、培地の色が赤からオレンジに変色するのを目安に継代を行った。細胞を 50 mL コニカルチューブに回収し遠心分離（4 ºC、300 g、5 min）した。上清を除去し、細胞を計数後、細胞を 5×10^5 cells/10 mL の濃度で非コーティングシャーレに添加し、37 ºC、5 %CO_2 条件下で培養した。細胞のストックは 1×10^6 cells/mL となるように Culture Sure Freezing Medium に懸濁し-80 ºC 条件下で保存した。

CT26 および 4T1 細胞の培養

CT26 および 4T1 は、培地の色が赤からオレンジに変色するのを目安に継代を行った。細胞を 50 mL コニカルチューブに回収し遠心分離（4 ºC、300 g、3 min）した。上清を除去し、細胞を計数後、細胞を 5×10^5 cells/10 mL の濃度でシャーレに添加し、37 ºC、5 % CO_2 条件下で培養した。細胞のストックは 1×10^6 cells/mL となるように Culture Sure Freezing Medium に懸濁し-80 ºC 条件下で保存した。

担癌マウスからの腫瘍組織の回収

何らかの処置を施したがん細胞皮下移植マウスの腫瘍組織を、1.4 mmジルコニアビーズが充填された2 mLのスクリューキャップマイクロチューブ内に25 mg回収し、液体窒素で凍結させ-80 ℃条件下で保存した。

■ 第 1 章の実験操作

YSK12-MEND の調製

YSK12-MEND は *t*-BuOH 希釈法により調製した。マイクロチューブに規定した脂質組成となるように各脂質溶液を調製した。また、別のマイクロチューブに 600 pmol 分の siRNA と Nuclease-Free Water を混合し 200 µL とした siRNA 溶液を調製した。脂質溶液を撹拌しながら siRNA 溶液を徐々に添加し、その後 1 mL シリンジ（27G 針）にとり、20 mM クエン酸緩衝液（pH 6.0）2 mL が入った 15 mL コニカルチューブを攪拌しているところへ徐々に注入した。その後、PBS 3.5 mL を添加し、あらかじめ PBS 7 mL の入った Amicon Ultra-15-100K にデカントで移した。PBS 3.5 mL で 15 mL コニカルチューブを共洗いし、同様にデカントで Amicon Ultra-15-100K に移した。1000 × g、室温、12 min の条件下で遠心し、その後 PBS 12 mL を添加し、再度同じ条件で遠心した。MEND を回収後、適量の PBS でフィルターを共洗いすることで MEND の容量を調節した。

BMDC の誘導

滅菌シャーレに RPMI1640 培地及び PBS をそれぞれ 10 mL 添加し、頚椎脱臼した C57BL/6J マウス（6~10 週齢）より大腿骨及び頸骨を摘出し、70% Ethanol で消毒した後、PBS に浸した。骨の両端を切断し、培地入りの 26G 針装着 1 mL シリンジで骨髄細胞を培地中に押し出した。細胞懸濁液を 40 µm のセルストレイナーを通して 50 mL コニカルチューブに移し、遠心分離（4 ℃、450 g、5 min）後、上清を除去し ACK Lysing Buffer（Lonza, Walkersville, MD）1 mL を添加し、室温で 3-5 分間静置した。培地 10 mL を添加後、遠心分離して上清を除去し、さらに培地 10 mL で 2 回洗浄した。次に、細胞を培地 10 mL に懸濁し、10 cm 細胞培養ディッシュに添加し、37 ℃、5 % CO_2 条件下で 4 時間以上培養した。軽くピペッティングして浮遊細胞のみを 50 mL コニカルチューブに回収し、遠心分離（4 ℃、450 g、5 min）、上清除去後、培地 10 mL に懸濁して計数した。その後、1×10^6 cells/mL となるよう培地に懸濁し、GM-CSF（終濃度 10 ng/mL）を添加後、24 well plate に 1 mL ずつ播種し、37 ℃、5 % CO_2 条件下で 2 日間培養した。2 日後及び 4 日後に浮遊細胞を除去した後、新しい GM-CSF 含有 RPMI1640 培地 1 mL を添加した。その後、6 日目の浮遊および弱付着細胞を回収し BMDC として以後の実験で使用した。

BMDC における IDO1 遺伝子ノックダウンの評価

12 well plate に Opti-MEM I 培地、GM-CSF（10 ng/mL）含有 Opti-MEM I 培地、BMDC（6 × 10^5 cells）を添加した後、IFN-γ を 100 units/mL となるように添加して全量を 0.5 mL とし、37 ºC、5 % CO_2条件下で 2 時間インキュベーションした。その後、培地を新しいものに交換し、YSK12-MEND、RNAiMAX、GS を適切な siRNA 濃度となるように添加して全量を 0.5 mL とし、37 ºC、5 % CO_2 条件下で 2 時間（GS は添加後 4 時間）インキュベーションした。その後、GM-CSF（10 ng/mL）含有 RPMI1640 培地 0.5 mL を添加し、さらに 22 時間（GS は添加後 20 時間）培養した。BMDC をマイクロチューブに回収し、遠心分離後（4 ºC、800 g、3 min）、上清を除去し、RNeasy mini kit の Lysis buffer と 2-Mercaptethanol を 100 : 1 で混合したものを 350 µL 添加し、よく撹拌した後-80 ºC で凍結保存した。RNA の抽出は RNeasy mini kit（QIAGEN）が推奨する方法に従って行った。抽出した RNA 溶液に 10 × DNase I buffer（TaKaRa）10 µL、Ribonuclease inhibitor（TaKaRa）1 µL、DNase I（TaKaRa）4 µL を添加し、37 ºC で 30 分インキュベートした。その後、フェノール/クロロホルム抽出、Ethanol 沈殿（Ethanol 沈殿時、Glycogen Solution（20mg/mL）を 1µL 添加）により精製後、Nano drop LITE を用いて吸光度を測定することで濃度及び純度を算出した。逆転写は、 PrimeScript RT reagent kit（TaKaRa）のオリゴ dT プライマー、Random 6 mers を用いて添付の方法に従い行った。得られた cDNA を下記の組成で混合し、定量的 RT-PCR 法により Gapdh を内因性遺伝子として、⊿⊿Ct 法による相対定量を用いて IDO1 の mRNA 量を算出した。

[反応液]

cDNA	2.0 µL
forward primer (10 µM)	0.1 µL
reverse primer (10 µM)	0.1 µL
SYBR Green Realtime PCR Master Mix (TOYOBO)	2.5 µL
DDW	0.3 µL
Total	5 µL

[反応条件]

95 ºC、1min に続き、95 ºC、15 min と 60 ºC、1 min を 40 サイクル繰り返した。

BMDC による細胞内取り込み評価

12 well plate に Opti-MEM I 培地、GM-CSF（10 ng/mL）含有 Opti-MEM I 培地、BMDC（6 × 10^5 cells）を添加した後、IFN-γ を 100 units/mL となるように添加して全量を 0.5 mL とし、37 ºC、5 % CO_2条件下で 2 時間インキュベーションした。その後、培地を新しいものに交換し、YSK12-MEND、RNAiMAX、GS を適切な siRNA 濃度となるように添加して全量を 0.5

mL とし、37 ºC、5 % CO_2条件下で、さらに 2 時間（GS は添加後 4 時間）インキュベーションした。BMDC をマイクロチューブに回収し、遠心分離後（4 ºC、800 g、3 min）、上清を除去し、ヘパリン溶液（20 units/mL）を 1mL 添加し細胞表面に吸着した余剰の粒子を取り除いた。その後、細胞を FACS Buffer に懸濁し、フローサイトメーターにより Cy5 標識 siRNA 由来の蛍光を測定した。

BMDC における細胞表面マーカーの評価

12 well plate に Opti-MEM I 培地、GM-CSF（10 ng/mL）含有 Opti-MEM I 培地、BMDC（6 × 10^5 cells）を添加した後、IFN-γ を 100 units/mL となるように添加して全量を 0.5 mL とし、37 ºC、5 % CO_2条件下で 2 時間インキュベーションした。その後、培地を新しいものに交換し、YSK12-MEND、RNAiMAX、GS を適切な siRNA 濃度となるように添加して全量を 0.5 mL とし、37 ºC、5 % CO_2条件下で、さらに 2 時間（GS は添加後 4 時間）インキュベーションした。BMDC をマイクロチューブに回収し、遠心分離後（4 ºC、 800 g、3 min）、上清を除去し、ヘパリン溶液（20 units/mL）を 1mL 添加し細胞表面に吸着した余剰の粒子を取り除いた。その後、anti-mouse CD16/32 (10 μg/mL)を用いて BMDC をブロッキングした後、APC anti-mouse I-A/I-E、APC anti-mouse CD40、APC anti-mouse CD80、APC anti-mouse CD86、PE anti-mouse CD11c またはそれらの isotype control で染色した。染色された BMDC の蛍光強度は、フローサイトメトリー（SH800、SONY）用いて測定した。

IDO1 ノックダウン BMDC の投与による抗腫瘍活性の評価

IDO1 を誘導した BMDC（6 × 10^5 cells）に siRNA 濃度が 20 nM となるように YSK12-MEND を添加し、4 時間後に血清入り培地と交換した。その 2 時間後に OVA（終濃度 50 μg / mL）および OVA クラス I ペプチド（終濃度 750 nM）を添加し、37ºC, 5% CO_2条件下で 90 分間培養した。培養後、細胞を 15 mL コニカルチューブに回収し、PBS 3 mL で 2 回洗浄した後、PBS に懸濁した。続いて、E.G.7-OVA 細胞をわき腹皮下に移植した C57BL/6J マウス（1 × 10^6 cells/mouse、26G 針）の foot pad に、上記の処置を施した BMDC（3 × 10^5 cells/mouse、27G 針）をイソフルラン麻酔下で投与した（投与は腫瘍移植後 4 日目、8 日目、11 日目、16 日目に実施）。その後、がんの大きさを経時的に計測し、腫瘍体積（mm^3）＝長径 × 短径 × 短径 ×0.52 の式により算出した（腫瘍の大きさは 6 日目、9 日目、12 日目、14 日目、16 日目、18 日目に測定）

腫瘍組織中の Treg 細胞の評価

腫瘍組織からの RNA 抽出は Direct-zolTM RNA MiniPrep（ZYMO RESEARCH）が推奨する方法に従い行った。簡潔に述べると、回収した腫瘍組織（25 mg）に RNAiso Plus 600 μL を添加し、Micro SmashTM MS-100R（TOMY）を用いて腫瘍組織を破砕した（破砕条件 : 4ºC、4000 rpm、40 sec× ３回）。破砕後、溶液を遠心分離（4ºC、12000 g、5 min）したのち、100%

Ethanol 350 µL を添加し、遠心分離（20 ºC、12000 g、30 sec）した。上清を除去した後、 Direct-zol RNA PreWash 400 µL を添加し、再度遠心分離（20 ºC、12000 g、2 min）を行い、上清を除去した。その後、RNA Wash Buffer 700 µL を添加し、遠心分離（20 ºC、12000 g、2 min）、上清除去により RNA を精製し、Nano drop LITE により吸光度を測定することで濃度及び純度を算出した。続いて、上記と同様の方法で逆転写を行い、定量的 RT-PCR 法により Gusb を内因性遺伝子として、⊿⊿Ct 法による相対定量を用いて Foxp3 および Cd25 の mRNA 量を算出した。

■ 第 2 章の実験操作

cRGD-PEG 合成

以下の反応物を混合しシェイキングインキュベーターSI-300で37℃、1500 rpm、Overnight（O/N）で反応させた。

cRGDfK	1.2 eq
PEG_{2000}-DSPE	1 eq
PBS	850 µL

反応後に半透膜（Molecular weight cut-off (MWCO)：1000 Da）に回収し、十分量のPBS中で1時間透析し、PBSを換えてさらに2時間透析した。次にPBSをDDWに入れ換えて1時間透析し、再度新しいDDWに入れ換えて透析を行った（O/N）。透析膜中の溶液を回収して凍結乾燥させた後、PEG_{2000}-DSPEが残留していないことの確認はMatrix Assisted Laser- Desorption / Ionization Time of Flight Mass Spectrometry（MALDI-TOFMS）を用いて行った。合成したcRGD-PEGは終濃度が5 mMになるようEthanolで溶解した。

cRGD-MEND の調製

- 以下に示す溶液を混合し siRNA 溶液を調製。

2 mg/mL siRNA 溶液（Cd31, FasL, Luciferase）	80 µL
20 mM クエン酸緩衝液（pH 4.0）	100 µL
DDW	20 µL

- *t*-BuOH に溶解させた以下の溶液を混合し脂質溶液を調製。

10 mM YSK05	210 μL
10 mM cholesterol	90 μL
2 mM PEG_{2000}-DMG	45 μL（3 mol%）
	15 μL（1 mol%）
90% *t*-BuOH	55 μL（PEG_{2000}-DMG が 45 μL の場合）
	85 μL（PEG_{2000}-DMG が 15 μL の場合）

調製した脂質溶液をボルッテクスミキサーで撹拌しながら siRNA 溶液を少しずつ添加した。混合した溶液は 27G 注射針を装着した 1 mL テルモシリンジに充填し、20 mL クエン酸緩衝液（pH 4.0）2 mL に注入した。その後 PBS を加えて希釈しながら、Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Devices（MWCO 100,000）を用いて限外濾過（25 ºC、1000 g、25 min）を行った。次に、Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Devices（MWCO 100,000）用いて PBS を DDW に置換し（25 ºC、1000 g、25 min）、500 μL になるように回収した。その後、以下の溶液を添加した 2 mL チューブに MEND 溶液を少しずつ添加した。

5 mM cRGD-PEG (in EtOH)	18 μL（3 mol%）
	12 μL（2 mol%）
	6 μL（1 mol%）
Ethanol	57 μL（cRGD-PEG が 18 μL の場合）
	63 μL（cRGD-PEG が 12 μL の場合）
	69 μL（cRGD-PEG が 6 μL の場合）
20 mM クエン酸緩衝液（pH 5.5）	425 μL

上記を混合した溶液をシェイキングインキュベーターで 60℃、1100 rpm、30 分間インキュベートした。その後、PBS を加えて希釈しながら、Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Devices（MWCO 100,000）を用いて限外濾過（25 ºC、1000 g、25 min）を行いバッファー置換、濃縮を行った。最後に任意の容量に PBS を用いてメスアップした。粒子径及びζ電位の測定には、Zeta Sizer Nano-ZS を使用した。調製した cRGD-MEND を PBS で 7 倍希釈し粒子径を、10 mM HEPES Buffer（pH7.4）で 75 倍希釈しζ電位を測定した。siRNA 封入率は Ribogreen assay を用いて定量した。調製した cRGD-MEND 溶液に対して 10 mM HEPES Buffer、10% triton（triton を添加しない場合はこれを、10 mM HEPES Buffer に置き換える）、Ribogreen を混合し添加した後シェイキングインキュベーターSI-300 で振とう（700 rpm、30 sec）した。その後、プレートリーダー(EnSpire)を用いて蛍光強度を測定した。封入率は【[(Triton(+)における siRNA 濃度)-(Triton(-)における siRNA 濃度)] / Triton(+)における siRNA 濃度×100】として算出し、回収率は【Triton(+)における siRNA 濃度/回収率 100%としたときの siRNA の濃度×100】として算出した。

cRGD-MEND による Cd31、Fasl ノックダウン活性の評価

CT26 細胞をわき腹皮下に移植した BALB/c マウス（8×10^5 cells / mouse、26G 針）を用意し、10 日後マウスの尾静脈から siRNA 搭載 cRGD-MEND を投与した。24 時間後、腫瘍組織、脾臓、肺、肝臓（各組織 25 mg）を 1.4 mm ジルコニアビーズを入れた 2 mL スクリューキャップマイクロチューブに回収し、液体窒素で凍結させ-80 ºC で冷凍保存した。各組織からの RNA 抽出は、Direct-zolTM RNA MiniPrep（ZYMO RESEARCH）を用いて製造業者が推奨する方法に従って行った。その後、Nano drop LITE を用いて吸光度を測定することで濃度及び純度を算出した。逆転写は、PrimeScript RT reagent kit（TaKaRa Bio）のオリゴ dT プライマー、Random 6 mers を用いて添付の方法に従い行った。その後、定量的 RT-PCR により Gusb を内因性遺伝子として、⊿⊿Ct 法による相対定量を用いて Cd31 および Fasl の mRNA 量を算出した。

STING-MEND の調製

脂質組成が YSK12-C4/Cholesterol/ PEG_{2000}-DMG = 85/15/1.1 (mol%) となるよう 10 mM YSK12-C4 (34 μL)、2 mM Cholsterol (30 μL)、0.5 mM PEG_{2000}-DMG (8.8 μL)、90% *t*-BuOH 溶液 228 μL を混合して脂質溶液を調製した。1 mM クエン酸 Buffer (pH 4.5) 75 μL に 500 nmol 相当の cdGMP 溶液 75 μL を加え撹拌しながら、調製した脂質溶液に滴下した。続いて 25G 針付シリンジで cdGMP/脂質混合溶液を回収し、攪拌しながら 1 mM クエン酸 Buffer 1.6 mL に全量を滴下し、PBS 4 mL を加えて十分に混合した。Amicon Ultra-4（MWCO 100,000）を用いて限外濾過（25℃、1000g、20 min）を行い、PBS 4 mL を加えて再度限外濾過(25℃、1000 g、30 min)を行った。PBS で洗い込みしながら 1.5 mL コニカルチューブに LNP 溶液を回収し、PBS で 250 μL にメスアップした。

cdGMP の定量

STING-MEND 溶液 15 μL に 50 mM デオキシコール酸ナトリウム 10 μL を加えて LNP を可溶化し DDW を加えて全量を 100 μL とした。その後、ボルテックスミキサーでよく混合し、DU730（Beckman Coulter）にて吸光度を測定した。252 nm における吸光度から LNP 中の cdGMP 濃度を求め、cdGMP の回収率を算出した。(ε= 24700、252 nm)

cRGD-MEND /cdGMP 搭載 YSK12-MEND 併用療法による抗腫瘍効果の評価

CT26 あるいは 4T1 細胞をわき腹皮下に移植した BALB/c マウス（8×10^5 cells/mouse、26G 針）を用意し、尾静脈から siRNA 搭載 cRGD-MEND（siRNA 量 : 2 mg/kg）及び STING-MEND（cdGMP 量 : 3 μg/mouse）を投与した（腫瘍移植後 7 日目、12 日目、17 日目に cRGD-MEND を、8 日目、13 日目、18 日目に STING-MEND を投与）。その後、がんの大きさを経時的に計測し、腫瘍体積（mm^3）＝長径 × 短径 × 短径 ×0.52 の式により体積を算出した（腫瘍の大きさは CT26 では 7 日目、11 日目、15 日目、19 日目、23 日目に、4T1 では 7 日目、11

日目、15 日目、17 日目、19 日目、21 日目に測定)。

cRGD-MEND 投与後の腫瘍微小環境内のステータス変化の評価

CT26 細胞をわき腹皮下に移植した BALB/c マウス（8×10^5 cells /mouse、26G 針）を用意し、尾静脈から siRNA 搭載 cRGD-MEND（siRNA 量 : 2 mg/kg）及び STING-MEND（cdGMP 量 : 3 μg/mouse）を投与した（腫瘍移植後 7 日目、12 日目に cRGD-MEND を、8 日目、13 日目に STING-MEND を投与)。腫瘍移植後 15 日目に腫瘍組織を 1.4 mm ジルコニアビーズを入れた 2 mL スクリューキャップマイクロチューブに回収し液体窒素で凍結させ-80 ºC で冷凍保存した。その後、上記と同様の方法で RNA 抽出、逆転写を行い、定量的 RT-PCR により Gusb を内因性遺伝子として、⊿⊿Ct 法による相対定量を用いて各標的因子の mRNA 量を算出した。

T 細胞欠損担癌マウスに対する siFasL 搭載 cRGD-MEND/STING-MEND による併用療法

CT26 細胞をわき腹皮下に移植した BALB/c Slc-nu/nu マウス（8×10^5 cells/mouse、26G 針）を用意し、尾静脈から siFasL 搭載 cRGD-MEND（siRNA 量: 2 mg/kg）及び STING-MEND（cdGMP 量 : 3 μg/mouse）を投与した（腫瘍移植後 7 日目、12 日目に cRGD-MEND を、8 日目、13 日目に STING-MEND を投与)。その後、がんの大きさを経時的に計測し、腫瘍体積（mm^3）＝長径 × 短径 × 短径 ×0.52 の式により体積を算出した（腫瘍の大きさは 7 日目、11 日目、15 日目に測定)。

I型 IFN による影響を抑制した担癌マウスに対する siFasL 搭載 cRGD-MEND/STING-MEND による併用療法

CT26 細胞をわき腹皮下に移植した BALB/c マウス（8×10^5 cells/mouse、26G 針）を用意し、併用療法開始 1 日前に PBS に溶解した anti-IFNAR-1 抗体（200 μg/mouse）を腹腔内投与した（腫瘍移植後 6 日目、11 日目、16 日目に anti-IFNAR-1 抗体を投与)。その後、尾静脈から siFasL 搭載 cRGD-MEND（siRNA 量 : 2 mg/kg）及び STING-MEND（cdGMP 量 : 3 μg/mouse）を投与し（腫瘍移植後 7 日目、12 日目、17 日目に cRGD-MEND を、8 日目、13 日目、18 日目に STING-MEND を投与)、がんの大きさを経時的に計測し、腫瘍体積（mm^3）＝長径 × 短径 × 短径 × 0.52 の式により体積を算出した（腫瘍の大きさは 7 日目、11 日目、15 日目、19 日目に測定)。

統計解析

データは複数回の実験で得られた平均値±標準誤差で表示した。２群のデータ比較では Unpaired t-testにより検定を行い、$P<0.05$の場合を有意差ありと判断した。３群以上のデータ比較では、一元配置分散分析により検定を行い、$P<0.05$の場合、さらにTukey-Kramer testによる多重比較検定を行い、$P<0.05$の場合を有意差ありと判断した。

【参考文献】

1 World Health Organization. Global Health Observatory. Geneva: World Health Organization; 2018. who.int/gho/database/en/. Accessed June 21, 2018.

2 Sharma, P., Wagner, K., Wolchok, J. D. & Allison, J. P. Novel cancer immunotherapy agents with survival benefit: recent successes and next steps. *Nat Rev Cancer* **11**, 805-812, doi:10.1038/nrc3153 (2011).

3 Couzin-Frankel, J. Breakthrough of the year 2013. Cancer immunotherapy. *Science* **342**, 1432-1433, doi:10.1126/science.342.6165.1432 (2013).

4 Armand, P. *et al.* Programmed Death-1 Blockade With Pembrolizumab in Patients With Classical Hodgkin Lymphoma After Brentuximab Vedotin Failure. *J Clin Oncol* **34**, 3733-3739, doi:10.1200/JCO.2016.67.3467 (2016).

5 Borghaei, H. *et al.* Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* **373**, 1627-1639, doi:10.1056/NEJMoa1507643 (2015).

6 El-Khoueiry, A. B. *et al.* Nivolumab in patients with advanced hepatocellular carcinoma (CheckMate 040): an open-label, non-comparative, phase 1/2 dose escalation and expansion trial. *Lancet* **389**, 2492-2502, doi:10.1016/S0140-6736(17)31046-2 (2017).

7 Ferris, R. L. *et al.* Nivolumab for Recurrent Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck. *N Engl J Med* **375**, 1856-1867, doi:10.1056/NEJMoa1602252 (2016).

8 Le, D. T. *et al.* PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *N Engl J Med* **372**, 2509-2520, doi:10.1056/NEJMoa1500596 (2015).

9 Nghiem, P. T. *et al.* PD-1 Blockade with Pembrolizumab in Advanced Merkel-Cell Carcinoma. *N Engl J Med* **374**, 2542-2552, doi:10.1056/NEJMoa1603702 (2016).

10 Hodi, F. S. *et al.* Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med* **363**, 711-723, doi:10.1056/NEJMoa1003466 (2010).

11 Topalian, S. L. *et al.* Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med* **366**, 2443-2454, doi:10.1056/NEJMoa1200690 (2012).

12 Robert, C. *et al.* Nivolumab in previously untreated melanoma without BRAF mutation. *N Engl J Med* **372**, 320-330, doi:10.1056/NEJMoa1412082 (2015).

13 Prasad, V. & Kaestner, V. Nivolumab and pembrolizumab: Monoclonal antibodies against programmed cell death-1 (PD-1) that are interchangeable. *Semin Oncol* **44**, 132-135, doi:10.1053/j.seminoncol.2017.06.007 (2017).

14 Binnewies, M. *et al.* Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy. *Nat Med* **24**, 541-550, doi:10.1038/s41591-018-0014-x (2018).

15 Sharma, P. & Allison, J. P. The future of immune checkpoint therapy. *Science* **348**, 56-61,

doi:10.1126/science.aaa8172 (2015).

16 Zemek, R. M. *et al.* Sensitization to immune checkpoint blockade through activation of a STAT1/NK axis in the tumor microenvironment. *Sci Transl Med* **11**, doi:10.1126/scitranslmed.aav7816 (2019).

17 Vom Berg, J. *et al.* Intratumoral IL-12 combined with CTLA-4 blockade elicits T cell-mediated glioma rejection. *J Exp Med* **210**, 2803-2811, doi:10.1084/jem.20130678 (2013).

18 Pyonteck, S. M. *et al.* CSF-1R inhibition alters macrophage polarization and blocks glioma progression. *Nat Med* **19**, 1264-1272, doi:10.1038/nm.3337 (2013).

19 Fire, A. *et al.* Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans. *Nature* **391**, 806-811, doi:10.1038/35888 (1998).

20 Adams, D. *et al.* Patisiran, an RNAi Therapeutic, for Hereditary Transthyretin Amyloidosis. *N Engl J Med* **379**, 11-21, doi:10.1056/NEJMoa1716153 (2018).

21 Matsumura, Y. & Maeda, H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Res* **46**, 6387-6392 (1986).

22 Maeda, H., Sawa, T. & Konno, T. Mechanism of tumor-targeted delivery of macromolecular drugs, including the EPR effect in solid tumor and clinical overview of the prototype polymeric drug SMANCS. *J Control Release* **74**, 47-61, doi:10.1016/s0168-3659(01)00309-1 (2001).

23 Petersen, G. H., Alzghari, S. K., Chee, W., Sankari, S. S. & La-Beck, N. M. Meta-analysis of clinical and preclinical studies comparing the anticancer efficacy of liposomal versus conventional non-liposomal doxorubicin. *J Control Release* **232**, 255-264, doi:10.1016/j.jconrel.2016.04.028 (2016).

24 Nakamura, T., Yamada, Y., Sato, Y., Khalil, I. A. & Harashima, H. Innovative nanotechnologies for enhancing nucleic acids/gene therapy: Controlling intracellular trafficking to targeted biodistribution. *Biomaterials* **218**, 119329, doi:10.1016/j.biomaterials.2019.119329 (2019).

25 Warashina, S. *et al.* A lipid nanoparticle for the efficient delivery of siRNA to dendritic cells. *J Control Release* **225**, 183-191, doi:10.1016/j.jconrel.2016.01.042 (2016).

26 Nakamura, T. *et al.* Small-sized, stable lipid nanoparticle for the efficient delivery of siRNA to human immune cell lines. *Sci Rep* **6**, 37849, doi:10.1038/srep37849 (2016).

27 Sakurai, Y. *et al.* RNAi-mediated gene knockdown and anti-angiogenic therapy of RCCs using a cyclic RGD-modified liposomal-siRNA system. *J Control Release* **173**, 110-118, doi:10.1016/j.jconrel.2013.10.003 (2014).

28 Sakurai, Y. *et al.* Remodeling of the Extracellular Matrix by Endothelial Cell-Targeting siRNA Improves the EPR-Based Delivery of 100 nm Particles. *Mol Ther* **24**, 2090-2099,

doi:10.1038/mt.2016.178 (2016).

29 Hada, T., Sakurai, Y. & Harashima, H. Optimization of a siRNA Carrier Modified with a pH-Sensitive Cationic Lipid and a Cyclic RGD Peptide for Efficiently Targeting Tumor Endothelial Cells. *Pharmaceutics* **7**, 320-333, doi:10.3390/pharmaceutics7030320 (2015).

30 Yamamoto, S., Kato, A., Sakurai, Y., Hada, T. & Harashima, H. Modality of tumor endothelial VEGFR2 silencing-mediated improvement in intratumoral distribution of lipid nanoparticles. *J Control Release* **251**, 1-10, doi:10.1016/j.jconrel.2017.02.010 (2017).

31 Garber, K. A new cancer immunotherapy suffers a setback. *Science* **360**, 588, doi:10.1126/science.360.6389.588 (2018).

32 Hanada, T. *et al.* Suppressor of cytokine signaling-1 is essential for suppressing dendritic cell activation and systemic autoimmunity. *Immunity* **19**, 437-450, doi:10.1016/s1074-7613(03)00240-1 (2003).

33 Lee, E. G. *et al.* Failure to regulate TNF-induced NF-kappaB and cell death responses in A20-deficient mice. *Science* **289**, 2350-2354, doi:10.1126/science.289.5488.2350 (2000).

34 Boone, D. L. *et al.* The ubiquitin-modifying enzyme A20 is required for termination of Toll-like receptor responses. *Nat Immunol* **5**, 1052-1060, doi:10.1038/ni1110 (2004).

35 Mellor, A. L. & Munn, D. H. IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nat Rev Immunol* **4**, 762-774, doi:10.1038/nri1457 (2004).

36 Spranger, S. Mechanisms of tumor escape in the context of the T-cell-inflamed and the non-T-cell-inflamed tumor microenvironment. *Int Immunol* **28**, 383-391, doi:10.1093/intimm/dxw014 (2016).

37 Munn, D. H. & Bronte, V. Immune suppressive mechanisms in the tumor microenvironment. *Curr Opin Immunol* **39**, 1-6, doi:10.1016/j.coi.2015.10.009 (2016).

38 Munn, D. H. & Mellor, A. L. IDO in the Tumor Microenvironment: Inflammation, Counter-Regulation, and Tolerance. *Trends Immunol* **37**, 193-207, doi:10.1016/j.it.2016.01.002 (2016).

39 Godin-Ethier, J., Hanafi, L. A., Piccirillo, C. A. & Lapointe, R. Indoleamine 2,3-dioxygenase expression in human cancers: clinical and immunologic perspectives. *Clin Cancer Res* **17**, 6985-6991, doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-1331 (2011).

40 Prendergast, G. C., Malachowski, W. P., DuHadaway, J. B. & Muller, A. J. Discovery of IDO1 Inhibitors: From Bench to Bedside. *Cancer Res* **77**, 6795-6811, doi:10.1158/0008-5472.CAN-17-2285 (2017).

41 Zheng, X. *et al.* Silencing IDO in dendritic cells: a novel approach to enhance cancer immunotherapy in a murine breast cancer model. *Int J Cancer* **132**, 967-977, doi:10.1002/ijc.27710 (2013).

42 Sioud, M. *et al.* Silencing of indoleamine 2,3-dioxygenase enhances dendritic cell

immunogenicity and antitumour immunity in cancer patients. *Int J Oncol* **43**, 280-288, doi:10.3892/ijo.2013.1922 (2013).

43 Nakamura, T., Yamada, K., Fujiwara, Y., Sato, Y. & Harashima, H. Reducing the Cytotoxicity of Lipid Nanoparticles Associated with a Fusogenic Cationic Lipid in a Natural Killer Cell Line by Introducing a Polycation-Based siRNA Core. *Mol Pharm* **15**, 2142-2150, doi:10.1021/acs.molpharmaceut.7b01166 (2018).

44 Nakamura, T., Yamada, K., Sato, Y. & Harashima, H. Lipid nanoparticles fuse with cell membranes of immune cells at low temperatures leading to the loss of transfection activity. *Int J Pharm* **587**, 119652, doi:10.1016/j.ijpharm.2020.119652 (2020).

45 Chen, W., Liang, X., Peterson, A. J., Munn, D. H. & Blazar, B. R. The indoleamine 2,3-dioxygenase pathway is essential for human plasmacytoid dendritic cell-induced adaptive T regulatory cell generation. *J Immunol* **181**, 5396-5404, doi:10.4049/jimmunol.181.8.5396 (2008).

46 Wobser, M. *et al.* Dendritic cell based antitumor vaccination: impact of functional indoleamine 2,3-dioxygenase expression. *Cancer Immunol Immunother* **56**, 1017-1024, doi:10.1007/s00262-006-0256-1 (2007).

47 Zheng, X. *et al.* RNAi-mediated CD40-CD154 interruption promotes tolerance in autoimmune arthritis. *Arthritis Res Ther* **12**, R13, doi:10.1186/ar2914 (2010).

48 Rejman, J., Oberle, V., Zuhorn, I. S. & Hoekstra, D. Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis. *Biochem J* **377**, 159-169, doi:10.1042/BJ20031253 (2004).

49 Verma, A. *et al.* Surface-structure-regulated cell-membrane penetration by monolayer-protected nanoparticles. *Nat Mater* **7**, 588-595, doi:10.1038/nmat2202 (2008).

50 Noh, Y. W., Lim, Y. T. & Chung, B. H. Noninvasive imaging of dendritic cell migration into lymph nodes using near-infrared fluorescent semiconductor nanocrystals. *FASEB J* **22**, 3908-3918, doi:10.1096/fj.08-112896 (2008).

51 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* **441**, 476-481, doi:10.1016/j.ijpharm.2012.11.006 (2013).

52 Miyabe, H. *et al.* A new adjuvant delivery system 'cyclic di-GMP/YSK05 liposome' for cancer immunotherapy. *J Control Release* **184**, 20-27, doi:10.1016/j.jconrel.2014.04.004 (2014).

53 Miura, N., Shaheen, S. M., Akita, H., Nakamura, T. & Harashima, H. A KALA-modified lipid nanoparticle containing CpG-free plasmid DNA as a potential DNA vaccine carrier for antigen presentation and as an immune-stimulative adjuvant. *Nucleic Acids Res* **43**,

1317-1331, doi:10.1093/nar/gkv008 (2015).

54 Fallarino, F. *et al.* The combined effects of tryptophan starvation and tryptophan catabolites down-regulate T cell receptor zeta-chain and induce a regulatory phenotype in naive T cells. *J Immunol* **176**, 6752-6761, doi:10.4049/jimmunol.176.11.6752 (2006).

55 Mezrich, J. D. *et al.* An interaction between kynurenine and the aryl hydrocarbon receptor can generate regulatory T cells. *J Immunol* **185**, 3190-3198, doi:10.4049/jimmunol.0903670 (2010).

56 Chen, D. S. & Mellman, I. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity* **39**, 1-10, doi:10.1016/j.immuni.2013.07.012 (2013).

57 Motz, G. T. *et al.* Tumor endothelium FasL establishes a selective immune barrier promoting tolerance in tumors. *Nat Med* **20**, 607-615, doi:10.1038/nm.3541 (2014).

58 Sato, Y. *et al.* A pH-sensitive cationic lipid facilitates the delivery of liposomal siRNA and gene silencing activity in vitro and in vivo. *J Control Release* **163**, 267-276, doi:10.1016/j.jconrel.2012.09.009 (2012).

59 Woo, S. R. *et al.* STING-dependent cytosolic DNA sensing mediates innate immune recognition of immunogenic tumors. *Immunity* **41**, 830-842, doi:10.1016/j.immuni.2014.10.017 (2014).

60 Burdette, D. L. *et al.* STING is a direct innate immune sensor of cyclic di-GMP. *Nature* **478**, 515-518, doi:10.1038/nature10429 (2011).

61 Parvatiyar, K. *et al.* The helicase DDX41 recognizes the bacterial secondary messengers cyclic di-GMP and cyclic di-AMP to activate a type I interferon immune response. *Nat Immunol* **13**, 1155-1161, doi:10.1038/ni.2460 (2012).

62 Nakamura, T. *et al.* Liposomes loaded with a STING pathway ligand, cyclic di-GMP, enhance cancer immunotherapy against metastatic melanoma. *J Control Release* **216**, 149-157, doi:10.1016/j.jconrel.2015.08.026 (2015).

63 Smedsrød, B. *et al.* Cell biology of liver endothelial and Kupffer cells. *Gut* **35**, 1509-1516, doi:10.1136/gut.35.11.1509 (1994).

64 De Leeuw, A. M., Brouwer, A. & Knook, D. L. Sinusoidal endothelial cells of the liver: fine structure and function in relation to age. *J Electron Microsc Tech* **14**, 218-236, doi:10.1002/jemt.1060140304 (1990).

65 Griffith, T. S. & Ferguson, T. A. The role of FasL-induced apoptosis in immune privilege. *Immunol Today* **18**, 240-244, doi:10.1016/s0167-5699(97)81663-5 (1997).

66 Saas, P. *et al.* Fas ligand expression by astrocytoma in vivo: maintaining immune privilege in the brain? *J Clin Invest* **99**, 1173-1178, doi:10.1172/JCI119273 (1997).

67 Yang, J. *et al.* Endothelial cell overexpression of fas ligand attenuates ischemia-reperfusion injury in the heart. *J Biol Chem* **278**, 15185-15191, doi:10.1074/jbc.M211707200 (2003).

68 Suda, T. *et al.* Expression of the Fas ligand in cells of T cell lineage. *J Immunol* **154**, 3806-3813 (1995).

69 Folkman, J. Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? *Nat Rev Drug Discov* **6**, 273-286, doi:10.1038/nrd2115 (2007).

70 Hurwitz, H. *et al.* Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* **350**, 2335-2342, doi:10.1056/NEJMoa032691 (2004).

71 Folkman, J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* **285**, 1182-1186, doi:10.1056/NEJM197111182852108 (1971).

72 Ellis, L. M. & Hicklin, D. J. VEGF-targeted therapy: mechanisms of anti-tumour activity. *Nat Rev Cancer* **8**, 579-591, doi:10.1038/nrc2403 (2008).

73 Bergers, G. & Hanahan, D. Modes of resistance to anti-angiogenic therapy. *Nat Rev Cancer* **8**, 592-603, doi:10.1038/nrc2442 (2008).

74 Jia, H. *et al.* Endothelial cell functions impaired by interferon in vitro: Insights into the molecular mechanism of thrombotic microangiopathy associated with interferon therapy. *Thromb Res* **163**, 105-116, doi:10.1016/j.thromres.2018.01.039 (2018).

75 Dickson, P. V. *et al.* Continuous delivery of IFN-beta promotes sustained maturation of intratumoral vasculature. *Mol Cancer Res* **5**, 531-542, doi:10.1158/1541-7786.MCR-06-0259 (2007).

76 Sidky, Y. A. & Borden, E. C. Inhibition of angiogenesis by interferons: effects on tumor- and lymphocyte-induced vascular responses. *Cancer Res* **47**, 5155-5161 (1987).

77 Anand, P. K., Malireddi, R. K. & Kanneganti, T. D. Role of the nlrp3 inflammasome in microbial infection. *Front Microbiol* **2**, 12, doi:10.3389/fmicb.2011.00012 (2011).

78 Franchi, L., Muñoz-Planillo, R. & Núñez, G. Sensing and reacting to microbes through the inflammasomes. *Nat Immunol* **13**, 325-332, doi:10.1038/ni.2231 (2012).

79 Saeki, N., Kuwahara, Y., Sasaki, H., Satoh, H. & Shiroishi, T. Gasdermin (Gsdm) localizing to mouse Chromosome 11 is predominantly expressed in upper gastrointestinal tract but significantly suppressed in human gastric cancer cells. *Mamm Genome* **11**, 718-724, doi:10.1007/s003350010138 (2000).

80 Lamkanfi, M. & Dixit, V. M. Mechanisms and functions of inflammasomes. *Cell* **157**, 1013-1022, doi:10.1016/j.cell.2014.04.007 (2014).

81 Kayagaki, N. *et al.* Caspase-11 cleaves gasdermin D for non-canonical inflammasome signalling. *Nature* **526**, 666-671, doi:10.1038/nature15541 (2015).

82 Shi, J. *et al.* Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death. *Nature* **526**, 660-665, doi:10.1038/nature15514 (2015).

83 Broz, P., Pelegrín, P. & Shao, F. The gasdermins, a protein family executing cell death and inflammation. *Nat Rev Immunol* **20**, 143-157, doi:10.1038/s41577-019-0228-2 (2020).

84 Ding, J. *et al.* Pore-forming activity and structural autoinhibition of the gasdermin family. *Nature* **535**, 111-116, doi:10.1038/nature18590 (2016).

85 Endo, R., Nakamura, T., Kawakami, K., Sato, Y. & Harashima, H. The silencing of indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1) in dendritic cells by siRNA-loaded lipid nanoparticles enhances cell-based cancer immunotherapy. *Sci Rep* **9**, 11335, doi:10.1038/s41598-019-47799-w (2019).

【謝辞】

本研究を遂行するにあたり、終始ご指導・ご鞭撻を受け賜りました、北海道大学大学院薬学研究院薬剤分子設計学研究室教授 原島秀吉先生に心より感謝申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、様々な場面で多大なるご指導・ご助力を頂きました、北海道大学大学院薬学研究院薬剤分子設計学研究室助教 中村孝司先生に深く感謝申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、有益なご助言と多くの励ましを頂きました、北海道大学大学院薬学研究院薬剤分子設計学研究室准教授 山田勇磨先生、同研究室助教 佐藤悠介先生、千葉大学大学院薬学研究院薬物学研究室特任助教 櫻井遊先生に深く感謝申し上げます。

本論文を審査していただきました、北海道大学大学院薬学研究院生体分析化学研究室教授 小川美香子先生、同研究室講師 高倉栄男先生に深く感謝申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、日々温かな励ましを頂きました、北海道大学大学院薬学研究院薬剤分子設計学研究室 佐藤孝紀学士、川上今日子さん、舘野寛直学士、Alaa Mohamed Aly Khalifa 学士、佐々木駿さん、中出泰誠さん、上田智貴さん、野村桃花さんに深く感謝申し上げます。

研究生活において様々な場面でお世話になりました、北海道大学大学院薬学研究院薬剤分子設計学研究室の皆様に心より感謝申し上げます。

２０２１年３月