HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	バクテリアによるナノ粒子の腫瘍移行性の改善とその併用療法への応用［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	橋場, 月
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(薬科学)
Dissertation Number	甲第14841号
Issue Date	2022-03-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/85654
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Akari_Hashiba-Kato_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称　博士（薬科学）　氏　名　　橋場（加藤）　月

学 位 論 文 題 名

バクテリアによるナノ粒子の腫瘍移行性の改善とその併用療法への応用

CAR-T 療法の成功を皮切りに、細胞医薬の開発が加速している。現在の細胞医薬は ES 細胞や iPS 細胞などヒト由来細胞を用いるものが多いが、この“細胞”は哺乳類細胞にとどまらない。CAR-T 療法と同様にがんを標的とする細胞医薬の一つとしてバクテリア生菌によるがん治療がある。一部の偏性または通性嫌気性細菌は静脈内投与後、腫瘍組織特異的に生着し増殖する。これらのバクテリアは増殖に伴う栄養成分の消費や自身の免疫原性による免疫誘導などの複数の機序によって周囲のがん細胞の細胞死を誘導し、がんの治療効果を発揮することが前臨床における複数の研究によって示された。このようなバクテリアの特性が有望視され、サルモネラ菌の弱毒化株である VNP20009 を中心として複数の臨床試験も実施された。しかしながら、ヒトにおいてはバクテリアによる免疫誘導効果が小さく、いずれの試験においても腫瘍の退縮効果は得られなかった。さらに、投与量の加増により重篤な副作用が生じたことに加え副作用の制御のため抗生物質を投与するとがんの再増殖が認められた。これらの結果から、バクテリアによる免疫誘導のみに依存せずにより高い治療効果を発現しうる治療戦略の確立が求められている。

このような背景から、本研究ではバクテリアと抗がん剤の併用療法に着目した。バクテリアの投与は全身性の炎症反応を誘導し、血流増加ならびに血管透過性の亢進を引き起こすことが報告されている。また、腫瘍組織内へと到達したバクテリアは自身の運動能により腫瘍深部まで移動し増殖することで、腫瘍深部においてがん細胞の細胞死を誘導し、ネクローシス領域を形成すると考えられている。これらの作用は血中に投与された抗がん剤の腫瘍への移行量および腫瘍内分布を改善させると期待されるほか、一般に腫瘍深部は抗がん剤を含む物質送達が難しい領域であることから、ネクローシスを誘導するバクテリアの特性は抗がん剤の弱点を補い、より高い治療効果を実現しうる。

このようなバクテリアの作用により治療効果の向上が期待される薬剤は多岐にわたるが、本研究では特にリポソームなどのナノ粒子製剤に着目した。リポソームは脂質二重膜から成り、抗がん剤をはじめとする機能性分子を内包する、一般に 100 nm 程度の中性の粒子である。正常組織へ移行しにくいため副作用を低減するほか、機能性分子を保護し標的組織への送達率を向上させる。構成分子や表面修飾の自由度も高く、がん治療においても有望視されている技術である。一方で、腫瘍への移行量は投与したうちの数%程度であることに加え、その大きさから腫瘍深部への到達が難しいなど動態面での課題を有している。以上の点から、リポソーム製剤はバクテリアとの併用において安全性を備えた治療効果をもたらすことに加え、動態改善に伴い治療効果の向上が見込まれる薬剤であり、両者の併用は多様ながんに対して作用の向上と副作用の低減を両立した治療を実現しうると仮説を立てた。バクテリアとリポソーム製剤の併用に関する報告は極めて少なく、それぞれを独立して投与した際の動態および治療効果への影響は明らかとなっていな

い。そのため本研究では、上述したサルモネラ菌の弱毒化株である VNP20009 と併用した際のリポソームの動態変化および治療効果の評価を行った。

腫瘍組織への薬物送達は腫瘍組織構造や免疫状態などを含む腫瘍微小環境の影響を強く受けることが知られている。リポソームの腫瘍内分布はがん細胞や豊富な細胞外基質による間質液圧の高さ、線維構造などに影響されるほか、バクテリアに関しても腫瘍組織内では特に深部領域において活発な増殖が認められるなど、リポソームと同様に腫瘍微小環境の影響を受けることが想定された。腫瘍微小環境は動物種やがんの由来組織、発生部位、病態の進行の程度などによって大きく異なる。そのため本研究では腫瘍微小環境が異なる 3 種のがん（ヒト神経膠芽腫由来 U87MG 細胞、ヒト肺癌由来 A549 細胞、ヒト膵臓癌由来 BxPC3 細胞）を用いて評価を行った。

はじめに、VNP20009 の生着および増殖ががん種の違いによる影響を受けるか検証するため、対象とした 3 種のがんにおける VNP20009 の生着および増殖量を評価した。各がん細胞をそれぞれ皮下移植したマウスに VNP20009 を静脈内投与したところ、選定した 3 種のがんのいずれにおいても VNP20009 は投与後 4 日で 10^8-10^9 CFU（colony forming unit）/ g tumor 程度の高い生着および増殖量を示した。

次に、VNP20009 とリポソームを併用した際にリポソームの全身および腫瘍組織内動態の改善が認められるかどうかを検証した。担がんモデルマウスに対して VNP20009 投与直後または 3 日後にリポソームを静脈内投与し、腫瘍への移行量および腫瘍内分布を評価した。その結果、VNP20009 投与直後にリポソームを投与することで、A549 および BxPC3 腫瘍において腫瘍への移行量が増加した。移行量の増加が小さかった U87MG 腫瘍は VNP20009 非投与群においても他の 2 種と比較してリポソームの腫瘍への移行量が多かったことから、VNP20009 による腫瘍移行量の増加効果は比較的リポソームの移行が難しいがん種において特に効果的であることが示唆された。また、リポソームの腫瘍内分布は評価に用いたいずれのがん種においても VNP20009 との同時投与によって改善することが明らかになった。上述したように、一般にナノ粒子は腫瘍組織深部への移行が難しい。評価に用いた 3 種のがんにおいても VNP20009 非投与群においてはリポソームの多くは腫瘍組織の辺縁部および血管近傍に分布した一方で、VNP20009 との同時投与群においては 3 種のがんのいずれにおいても深部領域を含む腫瘍組織全域に分布している様子が観察された。

最後に、VNP20009 との同時投与によってリポソームの腫瘍への移行量および腫瘍内分布がいずれも改善した A549 および BxPC3 腫瘍に関して、これらの動態改善が治療効果を向上しうるか評価した。抗がん剤のドキソルビシンを封入したリポソーム（Dox-LP）を用い、VNP20009 および Dox-LP をいずれも投与しないコントロール群、VNP20009 または Dox-LP 単独投与群、VNP20009 と Dox-LP の併用投与群の 4 群に関して腫瘍の成長速度を比較した。その結果、VNP20009 または Dox-LP の単独投与群においてはわずかに腫瘍の成長が抑制されるにとどまった一方、併用投与群においてはほぼ完全に腫瘍の成長が抑制された。腫瘍成長の抑制効果は VNP20009 および Dox-LP の投与直後から認められたことから腫瘍内での VNP20009 の増殖と VNP20009 による動態改善を受けた Dox-LP 双方の治療効果が寄与したと考えられる。また、VNP20009 単独では治療効果が小さかったことから、バクテリア単独では治療効果が得られない投与量においてもナノ粒子と併用することで高い治療効果が得られる可能性が高く、バクテリアによる副作用の低減も同時に実現可能であることが示唆された。

以上、VNP20009 と Dox-LP の併用が難治性のがん種である膵臓癌由来の BxPC3 腫瘍を含む複数のがんに対して強力な抗腫瘍効果を示したことは、がん治療における新たな療法としてバクテリアとナノ粒子の併用療法の有用性を示すものと考えられる。