

腫瘍免疫環境をリアルタイムで可視化・活性化する がん診断治療法の創成

大 多 哲 史^{*1} 三 浦 理 紗 子^{*2}

Cancer Theranostics under Real-time Observation and Activation of Tumor Immune Microenvironment

Satoshi OTA^{*1} and Risako MIURA^{*2}

Immune therapy has attracted attention as the cancer treatment in addition to surgical, chemical, and radiation treatments. While the activation of T-cells was inhibited by non-inflammatory M2-type macrophages, immunoadjuvants transformed M2-type macrophages to M1-type macrophages, which indicates that the tumor microenvironment affected the therapeutic effects. In addition, the tumor microenvironment was characterized by observing the magnetic relaxation of magnetic nanoparticles under a magnetic field. We purposed synthesis of the nanogels targeting M2-type macrophages including immunoadjuvants and iron oxide magnetic nanoparticles. The real-time characterization of the transformation of tumor immune microenvironment contributes the enhancement of the effects of the immune therapy.

1. 研究背景・目的

免疫療法は、患者の免疫システムを利用した治療法で、副作用が少なく完全奏効率の高い治療法として期待されている。体内では、T細胞が活性化することで腫瘍の増大を防いでいる一方で、腫瘍はT細胞を抑制する免疫チェックポイント分子を有している。この分子を阻害する薬剤により、T細胞の活性を維持する方法が免疫治療である。元来T細胞は、樹状細胞などからがん抗原の提示を受けて、がん細胞を認識して活性化するが、非炎症性のM2マクロファージにより、この抗原提示が抑制されると、T細胞の活性が断たれてしまう。これが免疫抑制性の高い腫瘍環境を有するCold tumorに対して奏効率が低下する免疫治療の問題点であり、免疫治療効果や予後は、免疫機能に関わる腫瘍微小環境（腫瘍内免疫環境）に大きく関連する⁽¹⁾。また、免疫抑制性のCold tumorに分布するM2マクロファージを活性化して、抗腫瘍性のM1マクロファージが分布するHot tumorへの転換を誘導する免疫アジュバントを用いることで、T細胞の活性を促し、免疫治療の奏効性を向上させることができる。

以上の背景から本研究では、腫瘍免疫環境のリアルタイムでの制御・観測を実現する技術として、M2マクロファージへの標的と光音響造影が可能で、免疫アジュバントおよび酸化鉄磁性ナノ粒子を搭載した機能性ゲル材料（多糖ナノゲル）の開発と、磁性ナノ粒子の磁界に対する応答から、腫瘍環境を非侵襲に観測するシステム構築を目的とした。磁界は生体に対して安全性が高く、磁性ナノ粒子は内在する磁化の磁界に対する応答により、非接触に動態制御可能である。現状、腫瘍環境を観測するためには、組織を切除して顕微鏡で観察するという手法が一般的だが、本手法は腫瘍を切らずに形質評価できるという点で革新的である。

図1に示すように、多糖ナノゲルを投与した際の、Cold tumorからHot tumorへの転換過程の腫瘍免疫環境を、磁化応答によりリアルタイムで観測するという、奏効性の高い免疫治療技術の創成と、免疫環境の転換メカニズムの解明を目指す。Cold tumorからHot tumorへの遷移や治療過程における腫瘍環境をリアルタイムで観測することで、最適な免疫治療薬の投与量・タイミングに関する情報をアウトプット可能な診断治療の実現に繋がる。

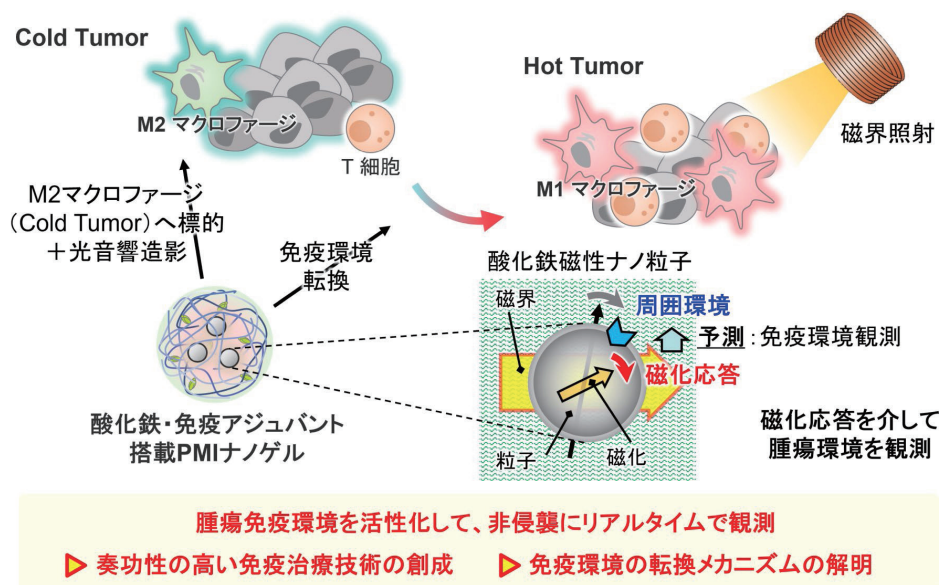


図1 研究構想と目的.

2. 研究成果 (i) : 多糖ナノゲルの合成と物性評価

これまでに、親水性多糖であるプルランに、疎水性近赤外蛍光色素 (IR820) と、M2 マクロファージに発現する表面抗原である CD206 に対するリガンド (マンノース) を修飾した Pullulan-mannose-IR820 (PMI) を合成し、M2 マクロファージ標的性を有するナノゲルを開発した. 本研究では、この PMI ナノゲルに、免疫アジュバントである R848 分子と、酸化鉄ナノ粒子の2つを同時に複合化したナノゲルの合成が目標である. そこでまずは、それぞれを別々に複合化したナノゲルの合成を行った.

まずは、PMI ナノゲルと R848 分子の複合化について検討を行った. PMI ナノゲルは、IR820 の疎水性相互作用を駆動力にナノゲルを形成しており、その疎水性ドメインを介して疎水性物質を複合化することが可能である. R848 分子は疎水性の低分子であるため、PMI ナノゲルと単純混合することにより、疎水性相互作用により複合化されると考えられる. 実際に PMI ナノゲルと R848 分子を HEPES Buffer 中で一晩混合したところ、粒径と UV-Vis 吸収スペクトルが変化したことから、R848 複合化 PMI ナノゲル (R848/PMI ナノゲル) が得られたことが示された. 続いて R848/PMI ナノゲルを M2 マクロファージに添加したところ、R848 分子のみを添加した群と比較して、有意に TNF- α の産生量が増大していた (図2). TNF- α 産生量が増大はマクロファージの炎症方向への活性化 (M1 への分極) を示唆しており、PMI ナノゲルにより R848 分子を TLR7/8 が発現しているエンドソーム内へ効率的に送達できた結果と考えられる. 以上より、M2 マクロファージを標的化し、活性化可能なナノゲルの開発に成功した.

続いて、酸化鉄ナノ粒子複合化ナノゲルの合成について検討した. ナノゲルと複合化するため、疎水性表面を有する酸化鉄ナノ粒子の合成を行った. $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ と Sodium Oleate を水中で混合して Microwave 法により加熱後、有機溶媒による洗浄および遠心操作により凝集体を除去し、オレイン酸被覆酸化鉄ナノ粒子を得た. 動的光散乱法により粒径を測定し、透過型電子顕微鏡により観察したところ、粒径約 22 nm の単分散な粒子が合成されていることが明らかとなった. さらに、ナノゲルとの複合化に際して、先行研究においてオレイン酸被覆酸化

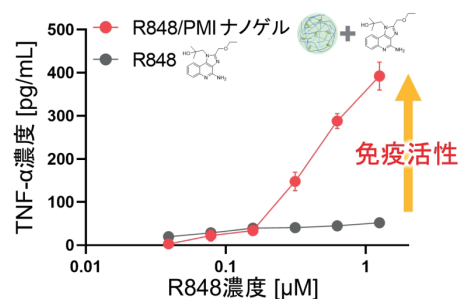
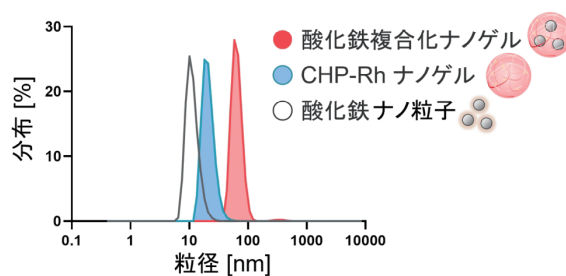
図2 M2マクロファージによるTNF- α 産生量評価.

図3 粒径評価.

鉄ナノ粒子との複合化が報告されているコレステリル基置換プルラン (Cholesterol-bearing Pullulan; CHP) ナノゲルを用いて、予備検討を実施した⁽²⁾。CHP ナノゲル溶液に対し、ソニケーションをかけながら、シリンジポンプを用いてオレイン酸被覆酸化鉄ナノ粒子を少量ずつ注入し、複合化を行った。その後、磁力により精製し、酸化鉄ナノ粒子複合化 CHP ナノゲルを得た。粒径を測定したところ、CHP ナノゲルは粒径約 75 nm であったのに対し、酸化鉄ナノ粒子複合化後は粒径約 190 nm であり、粒径が増大したことから、酸化鉄ナノ粒子の CHP ナノゲルとの複合化が示された (図 3)。以上より、酸化鉄ナノゲルの複合化プロトコルを確立したため、PMI ナノゲルとの複合化について、今後検討を進める。

3. 研究成果 (ii) : 磁性ナノ粒子の磁化応答を介した腫瘍環境の解析技術

磁性ナノ粒子は、内部に磁化を有しており、粒子の構造や周囲の環境により磁化応答は変化する。特に、粘性の異なる溶媒に分散された磁性ナノ粒子について、時間経過に対する磁化の磁界方向への配向時間 (磁気緩和時間) を観測すると、粘性が高い方が磁化配向に時間を要する (磁気緩和時間が長くなる) 様子が観測される。このような磁性ナノ粒子の物理的回転に起因する磁気緩和機構をブラウン緩和と呼び、ブラウン緩和時間は、 $\tau_B = 3\eta V_H / (k_B T)$ と表現される。ここで、 η は溶媒の粘度、 V_H は粒子の流体力学的体積、 k_B はボルツマン定数、 T は環境の温度である。本計測では、腫瘍組織の形質を粘性に着目して評価する。腫瘍環境は、がん細胞や間質、血液などの複数の異なる形質の組織から構成され、各構成要素における粘性は異なる。このため、粘性分布を解析することで、腫瘍の組織構成を評価可能と考えられる。

解析手法としては、複数の粘性の異なる溶媒に分散させた、磁性ナノ粒子の磁気緩和時間分布のデータから構成するシステム行列を用いて、動物実験において得られた、腫瘍内磁性ナノ粒子の磁気緩和時間分布を再現できるように、各粘度条件の成分比を解析するものである (図 4)⁽³⁾。比較試料の溶媒粘度は、0.87–45 mPa·s の範囲で用意した。マウスに移植した腫瘍に、酸化鉄磁性ナノ粒子を 140 mg-Fe/mL の濃度で 10 μ L 投与し、磁化計測用のコイルを用いて磁界を加えて計測した。種類の異なるがん細胞 (ヒト線維肉腫 HT1080, 睪がん細胞 BxPC3) の腫瘍において、計測した緩和時間分布から粘性分布を解析した。動物実験としては、マウスに皮下移植した腫瘍を覆うように、励磁および信号検出用コイルのセットを設置して、オシロスコープによって信号波形を計測した。各腫瘍の切片観察も行い、磁気緩和計測から得られた形質の情報と照らし合わせた。

図 4 に、比較試料の溶媒粘度は、0.87–45 mPa·s の範囲で用意した。マウスに移植した腫瘍に、酸化鉄磁性ナノ粒子を 140 mg-Fe/mL の濃度で 10 μ L 投与し、磁化計測用のコイルを用いて磁界を加えて計測した。種類の異なるがん細胞 (ヒト線維肉腫 HT1080, 睪がん細胞 BxPC3) の腫瘍において、計測した緩和時間分布から粘性分布を解析した。動物実験としては、マウスに皮下移植した腫瘍を覆うように、励磁および信号検出用コイルのセットを設置して、オシロスコープによって信号波形を計測した。各腫瘍の切片観察も行い、磁気緩和計測から得られた形質の情報と照らし合わせた。

図 5 に、磁性ナノ粒子を投与してから 70 分経過後の計測および解析結果を一例として示す。HT1080 腫瘍は、血管が多い腫瘍であり、粘度 7.7 mPa·s にピークが立つような粘度分布を得た。これは、血液 (全血) の粘度解析結果と類似していた。対して BxPC3 腫瘍は、がん細胞間の間質が比較的多く分布する腫瘍であり、粘度 4.2 mPa·s を極大点もつ広い粘度分布を得た。これは、血漿 (全血を遠心分離して得た上澄み液) の粘度解析結果と類似しており、間質液は血漿と類似した成分を含むことが知られているため、妥当な結果であると考えられる。

図 5 に、磁性ナノ粒子を投与してから 70 分経過後の計測および解析結果を一例として示す。HT1080 腫瘍は、血管が多い腫瘍であり、粘度 7.7 mPa·s にピークが立つような粘度分布を得た。これは、血液 (全血) の粘度解析結果と類似していた。対して BxPC3 腫瘍は、がん細胞間の間質が比較的多く分布する腫瘍であり、粘度 4.2 mPa·s を極大点もつ広い粘度分布を得た。これは、血漿 (全血を遠心分離して得た上澄み液) の粘度解析結果と類似しており、間質液は血漿と類似した成分を含むことが知られているため、妥当な結果であると考えられる。

将来的には、磁性ナノ粒子を静脈投与して、腫瘍に送達する必要があるが、腫瘍に直接投与する場合と比べて、腫瘍への磁性ナノ粒子集積量が大幅に減少するため、計測システムの高感度化が必要である。計測システムの高感度化には、信号対ノイズ比の増加が必要であり、特に信号検出コイルでは、磁性ナノ粒子の磁化由来の磁束の他に、印加磁界由来の磁束も背景信号として検出される。このため、この背景信号成分を除去して、磁性ナノ粒子由来の信号成分のみを検出することが理想的である。図 5 に示した実験時には、約 1.4 mg-Fe の粒子量で計測を実施したが、現状では 280 μ g-Fe の粒子量での計測が十分に行えるまでに感度を向上させた。

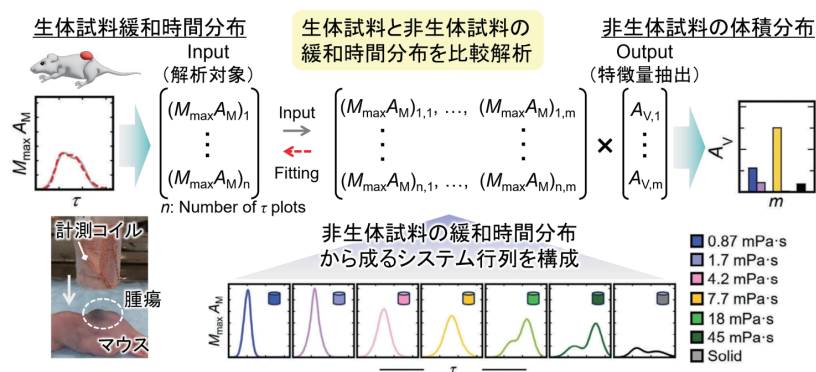


図 4 磁気緩和時間による腫瘍性状の解析手法。

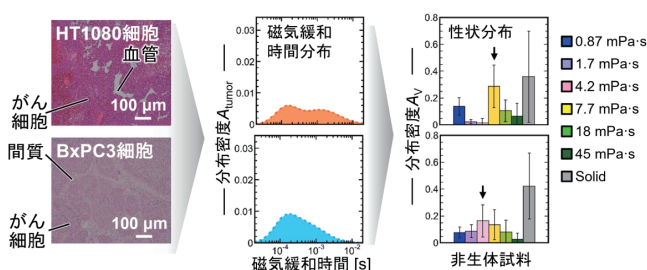


図 5 異なるがん細胞種の腫瘍における粘度分布解析結果。

4. 今後の研究計画

現状では、免疫アジュバント分子複合化ナノゲルと酸化鉄ナノ粒子複合化ナノゲルの2種類を合成でき、免疫アジュバントの複合化によるマクロファージの活性化の誘導、酸化鉄ナノ粒子の複合化による磁気応答性を確認した。腫瘍内の形質解析としては、一連の解析システムの構築と動物実験を通じた実現性の確認に取り組んだ。今後は、免疫アジュバントと酸化鉄ナノ粒子の双方を同時に複合化する方法を確立し、その物性評価および *in vitro* または *in vivo* における、腫瘍免疫環境の転換効果の検証、磁気緩和時間解析を通じた腫瘍の形質評価、腫瘍への送達性の検証を実施する。磁化計測システムについては、現状の20倍程度以上の高感度化（10 $\mu\text{g-Fe}$ 以下の磁性ナノ粒子量の検出）を目指す。

最終的には、動物実験による腫瘍免疫環境のリアルタイムでの観測と免疫治療効果の確認をして、腫瘍における分泌物、腫瘍微小環境の形質、免疫治療奏功性についての対応を評価することで、腫瘍免疫環境の転換メカニズム解明と、奏功性の高い免疫治療システムの創成という目標の達成に繋げる。

REFERENCES

- 1) J. Galon and D. Bruni, *Nat. Rev. Drug Deliv.*, **18** (2023) 197-218.
- 2) R. Kawasaki, Y. Sasaki, K. Katagiri, S. Mukai, S. Sawada and K. Akiyoshi, *Angew. Chemie – Int. Ed.*, **55** (2016) 11377-11381.
- 3) S. Ota, H. Kosaka, K. Honda, K. Hoshino, H. Goto, M. Futagawa, Y. Takemura and K. Shimizu, *Adv. Mater.*, **36** (2024) 2404766.