

平成21年 6月 10日現在

研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19790301  
 研究課題名(和文) BCG-CWSを用いた抗がん免疫応答の再構築とそのメカニズム  
 研究課題名(英文) Reconstruction of BCG-CWS activity for cancer immunotherapy  
 研究代表者  
 赤澤 隆(AKAZAWA TAKASHI)  
 地方独立行政法人 大阪府立病院機構 大阪府立成人病センター(研究所)・研究所・研究員  
 研究者番号：80359299

研究成果の概要： 現在、がん免疫療法において臨床応用されている BCG-CWS には種々の懸案事項があり、代替可能なアジュバントの開発が必要とされていた。我々はこれまでに携わってきた BCG-CWS 研究を基に、アジュバント療法のメカニズム、および必要な免疫応答を解析し、これらを考慮に入れた機能的創薬設計から、新規人工アジュバント・試作化合物を開発した。その活性は未だ十分なものではないが、より強力なアジュバントへ改良しうる可能性を見いだした。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	0	2,000,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	390,000	3,690,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：腫瘍、腫瘍免疫、アジュバント、BCG-CWS

## 1. 研究開始当初の背景

1970-80年代の抗がん免疫療法に用いられていた微生物成分アジュバントが近年、再評価されている。これはペプチドワクチン臨床応用において、抗原ペプチド単独ではT細胞を十分に活性化できないケースがあり、サポートアジュバントによる樹状細胞の活性化が注目されたためである。樹状細胞はサイトカイン産生・抗原提示によってT細胞をコントロールする重要な細胞である。また、微生物アジュバントの多くがトル様受容体のリガンドとして機能し、樹状細胞を活性化する

ことが明らかとなった。BCG-CWS(ウシ結核菌の細胞骨格成分)もまた微生物成分アジュバント・TLR2/4のリガンドであり、抗がん免疫療法の基礎/臨床研究が、大阪府立成人病センターで継続されていた。現在、その強力なアジュバント活性と臨床応用実績から、国内の多施設で様々なBCG-CWS臨床応用が企画されている。しかし、菌体から精製した巨大分子複合体であるため、混合物や安定供給を考慮すれば、BCG-CWSと同様の活性を持ち、化学合成可能なアジュバントの開発が必要とされていた。

## 2. 研究の目的

現在、臨床応用されている BCG-CWS の問題点（安定供給、純度、安定性）を解決するには、菌体精製物ではなく、化学合成可能な物質で BCG-CWS の免疫応答・抗がん免疫活性を代替・再構築することが必須である。そして、化学合成品でこの活性を再現できれば、これらの物質は人工アジュバントとして開発する事が可能となる。しかし、この人工アジュバント開発の前段階として、BCG-CWS 活性の何を再現すれば、抗がん免疫が誘導されるのかを明確にしなければならない。そこで、BCG-CWS の抗がん免疫応答・作用メカニズムを明確化し、新規化学合成品と比較・評価するためのポイントを選定する。すなわち、本プロジェクトでは、評価ポイント選定のための BCG-CWS 作用メカニズムの解析～BCG-CWS 活性の再現～代替人工アジュバント開発を大きな目的としていた。

## 3. 研究の方法

BCG-CWS はこれまでの基礎・臨床にわたる研究から、樹状細胞からの IL-23 産生、および生体での血中 IFN $\gamma$  の上昇が報告されている。IL-23 に関しては種々の報告が存在するが、抗がんサイトカインとして働く事が報告されている。また、IFN $\gamma$  は、腫瘍への直接的な障害や MHC class I 発現誘導など、免疫応答をサポートする現象を引き起こす。以上の点から、IL-23 及び IFN $\gamma$  誘導に焦点を絞って解析・人工アジュバント設計を進めた。

### (1) BCG-CWS による IFN $\gamma$ 産生細胞の同定

BCG-CWS を免疫したマウス・脾臓における IFN $\gamma$  産生細胞の同定を試みた。マウスに最終免疫した1週間後に脾臓を摘出し、*in vitro* において、BCG-CWS の再刺激を行い、細胞内 FACS で IFN $\gamma$  産生細胞を検出した。

### (2) BCG-CWS 刺激樹状細胞より産生されるサイトカインの同定

マウス骨髄より樹状細胞を誘導し、化合物および BCG-CWS で刺激した。この時に産生される各サイトカインを ELISA アレイによって、種類と産生量を測定し、抗がんサイトカインの候補選定を試みた。

### (3) 新規人工アジュバント・試作化合物の設計と評価

今回は BCG-CWS によって誘導されるサイトカイン・IL-23 と IFN $\gamma$  が抗がん活性に重要と想定し、これらの誘導を目的として、化合物を試作・設計した。BCG-CWS がトル様受容体 2 および 4 のリガンドであること、トル様受容体 2 のリガンドとして知られる MALP-2 (マイコプラズマ由来のリポペプチド) が樹状細胞を刺激して IL-23 を誘導すること等か

ら、MALP-2 の構造をベースに、自然界に存在しない、新しい人工リポペプチドを設計した。このリポペプチドには標的細胞である樹状細胞に効率的に結合するペプチド配列を組み込んでいる。化合物の樹状細胞活性化は IL12p40 および TNF $\alpha$  産生量 (ELISA アッセイ)、活性化マーカー CD80/CD86 の発現上昇 (FACS 解析) で評価した。また、化合物で脾臓細胞を刺激した際に産生される IFN $\gamma$  量を ELISA で測定した。一方、樹状細胞活性化経路の差異についても検討し、トル様受容体シグナルアダプター分子 (MyD88、TICAM-1) のノックアウトマウスから樹状細胞を誘導し、その活性化経路を比較した。さらに、*in vivo* 実験ではマウス担癌モデルを用いて、これらの化合物の抗がん効果を評価した。

## 4. 研究成果

(1) BCG-CWS による IFN $\gamma$  産生は主に CD4+細胞と CD8+細胞が担う。

BCG-CWS を週 1 回の投与間隔で 4 回以上免疫したマウスより、脾臓およびリンパ節を回収し、BCG-CWS による刺激を *in vitro* で与え、CD4/CD8 (T 細胞)、CD19 (B 細胞)、NK1.1 (NK 細胞)、CD11b (マクロファージ)、CD11c (樹状細胞) などのマーカー分子に対する抗体と共に IFN $\gamma$  に対する抗体を用いて細胞内 FACS を行った。その結果、BCG-CWS 免疫マウスの脾臓・リンパ節において、IFN $\gamma$  産生は主として CD4+細胞が担う事が示唆された。また、*in vitro* での BCG-CWS 刺激時間を長くすると CD8+細胞からの産生も確認された。他の細胞群では IFN $\gamma$ +細胞がわずかに検出された程度であった。

(2) BCG-CWS 刺激によって樹状細胞から産生される主要サイトカインは IL-6、IL-12p40、TNF $\alpha$  であった。

BCG-CWS 刺激によって樹状細胞より産生されるサイトカインを ELISA アレイで測定したところ、IL-6、IL-12p40、TNF $\alpha$  などが主要なサイトカインであり、IL-1 等の産生も認められた。なお、BCG-CWS による各サイトカインの産生誘導は、MALP-2 と比較して、種類の違いはあまり認められないが、数倍～数十倍以上の強力な活性を有していた。なお、樹状細胞からの IFN $\gamma$  産生は検出限界以下であった。

IL-23 (IL-12p40/IL-23p19 のヘテロダイマー) 産生量も今回の実験系においては ELISA 検出限界以下であったが、PCR の結果では IL-23 サブユニット p19 の誘導が認められており、重要な役割を持つと想定される。

(3) これまでの知見に基づいて機能設計した人工リポペプチド (P2C-RGDS:P2CR) は MALP-2 よりも強力な抗がん効果を有してい

た。  
 図 1 に BCG-CWS の模式図を示した。BCG-CWS は菌体から精製して得られる巨大分子複合体であるため、詳細な構造までは記載しきれしていない。

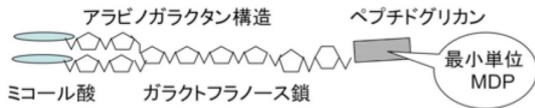


図 1 BCG-CWS の構造

一方、BCG-CWS と同様の TLR2 リガンド・MALP-2 は 13 アミノ酸ペプチドが 2 分子のアルミニウムによる修飾を受けた構造であり、分子量 2100 程度である (図 2)。我々は、このマイコプラズマ由来のペプチド配列をインテグリン結合モチーフ RGDS 配列に置き換えた P2C-RGDS を設計・作製した。樹状細胞は多くのインテグリンを発現しており、RGDS 配列が樹状細胞への接着に有効である事が報告されていた。P2C-RGDS は分子量約 1100 で、ペプチド部分の等電点や水溶性は MALP-2 に類似している (図 2)。

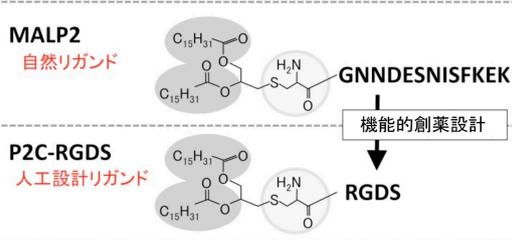


図 2 自然 TLR2 リガンド・MALP-2 と人工 TLR2 リガンド・P2C-RGDS

この化合物の樹状細胞活性化能力は基本構造とした MALP-2 と比較すると、樹状細胞活性化マーカーの変動やサイトカイン産生においては、ほぼ同等のものであった (図 3)。

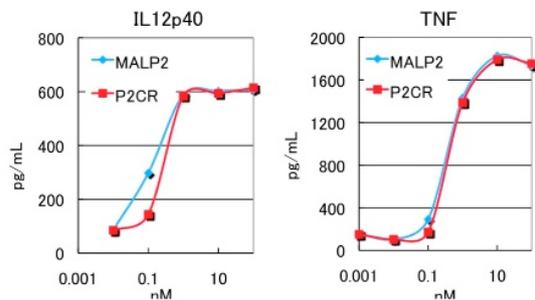


図 3 化合物刺激によって樹状細胞から産生されるサイトカイン

また、P2C-RGDS と MALP-2 の樹状細胞活性化経路において、トル様受容体シグナルアダ

プター分子、MyD88/TICAM-1 依存性を確認するため、これらの KO マウス由来の骨髄から樹状細胞を誘導して検討した。その結果 MALP-2 および P2CRGDS は MyD88 依存、TICAM-1 非依存の樹状細胞活性化経路をとることが明らかとなり、同様同質の樹状細胞活性化をおこすことが示唆された。(図 4)

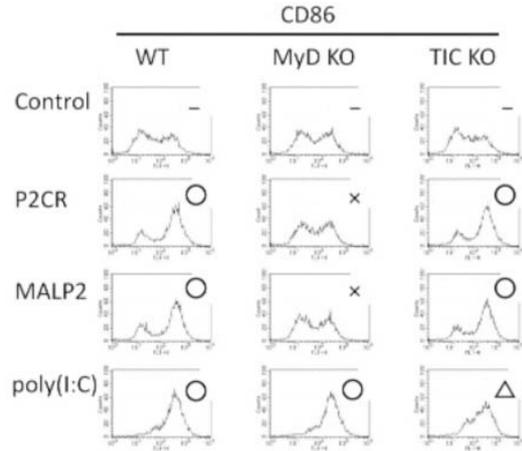


図 4 人工 TLR2 リガンド・P2C-RGDS のトル様受容体シグナルアダプター分子依存性

一方、脾臓を 72 時間 P2C-RGDS および BCG-CWS、MALP-2 存在下で刺激した場合では、BCG-CWS はこれらのリポペプチドよりも強力な IFN $\gamma$  誘導を示した。また、MALP-2 と P2C-RGDS はほぼ同等であった。しかしながら、刺激時間を 4 $^{\circ}$ C、60 分間に限定し、細胞を洗浄後、72 時間培養した場合では、BCG-CWS と P2C-RGDS はほぼ同等の活性を示し、MALP-2 はこれらよりも低い値を示した (図 5)。in vitro 実験において、長時間、これらの化合物と応答細胞が共存してしまう状況では明確な差異は見出せなかったが、接着効率が反映される実験系では P2C-RGDS の有効性が確認できた。

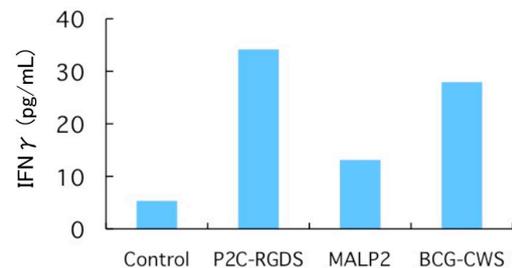


図 5 各化合物で短時間刺激した脾臓細胞からの IFN $\gamma$  産生量

我々は最後にこれらの化合物の抗がん活性を in vivo 実験で確認した。担がんモデルとして汎用されている EG7-C57BL6 マウスの移植実験系を用いた。腫瘍移植後 14 日で生着を確認後、群分けを行い、16、20、23 日に

EG7 細胞可溶化物と化合物を混合したワクチンを腫瘍から離れた部位に皮内投与した。この結果、P2C-RGDS と MALP-2 の間に有意差は得られていないが、P2C-RGDS はコントロールと比較して有意な腫瘍成長抑制効果を認めた (図 6)。これらの結果は、応答細胞に効率的に結合する能力が反映されたものと考えている。

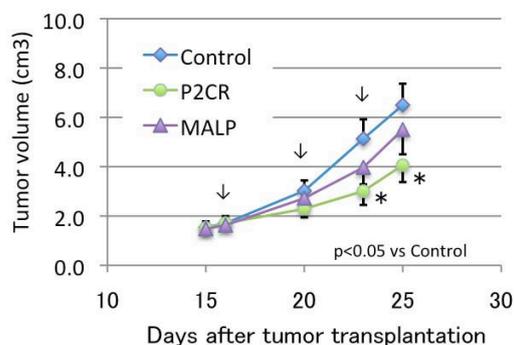


図 6 各化合物の抗がん効果 (EG7-C57BL6 マウス移植モデル)

今回は接着性に着目した化合物設計を行ったが、より厳密な標的化を視野に入れたペプチドの選定も行っている。標的化は、より低濃度での有効性発揮と、かつ副作用になる他細胞への応答軽減が期待される。この創薬戦略によって得られるリポペプチドは自然界には存在しない組み合わせであり、新たな活性が期待される。我々はこの生化学的創薬戦略をベースに異なる機能を付加させた 10 種類以上の TLR2 リガンド化合物を既に作製済みであり、今後これらの評価と改良を通じて最強のアジュバント化合物を作製していく計画である。

##### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

(1) Kodama K, Higashiyama M, Takami K, Oda K, Okami J, Maeda J, Akazawa T, Matsumoto M, Seya T, Wada M, Toyoshima K. Innate immune therapy with a Bacillus Calmette-Guérin cell wall skeleton after radical surgery for non-small cell lung cancer: A case-control study. *Surg Today*. 39(3): 194-200. 2009. 査読有

(2) Sugiura K, Akazawa T, Fujimoto M, Wijewardana V, Mito K, Hatoya S, Taketani S, Komori M, Inoue N, Inaba T. Construction of an expression vector for improved secretion of canine IL-18. *Vet*

*Immunol Immunopathol*. 26(3-4): 388-91. 2008. 査読有

(3) Shime H, Yabu M, Akazawa T, Kodama K, Matsumoto M, Seya T, Inoue N. Tumor-secreted lactic acid promotes IL-23/IL-17 proinflammatory pathway. *J Immunol*. 180(11): 7175-83. 2008. 査読有

(4) Ebihara T, Masuda H, Akazawa T, Shingai M, Kikuta H, Ariga T, Matsumoto M, Seya T. Induction of NKG2D ligands on human dendritic cells by TLR ligand stimulation and RNA virus infection. *Int Immunol*. 19(10): 1145-55. 2007. 査読有

(5) Akazawa T, Shingai M, Sasai M, Ebihara T, Inoue N, Matsumoto M, Seya T. Tumor immunotherapy using bone marrow-derived dendritic cells overexpressing Toll-like receptor adaptors. *FEBS Lett*. 581(18): 3334-40. 2007. 査読有

[学会発表] (計 2 件)

(1) Akazawa T, Inoue N, Matsumoto M, Seya T. Development of designed synthetic adjuvants based on structures of toll-like receptor ligands. 第 6 7 回 日本癌学会 学術総会 (ポスター)、2008 年 10 月 28 日、名古屋

(2) Akazawa T, Ebihara T, Inoue N, Matsumoto M, Seya T. Application of TLR adaptor over-expressing DC to cancer immunotherapy. 第 6 6 回 日本癌学会 学術総会 (一般口演)、2007 年 10 月 3 日、横浜

[その他]

ホームページ等

<http://www.mc.pref.osaka.jp>

##### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

赤澤 隆 (AKAZAWA TAKASHI)

地方独立行政法人 大阪府立病院機構 大阪府立成人病センター (研究所)・研究所・研究員

研究者番号 : 8 0 3 5 9 2 9 9