

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：14501
研究種目：若手研究
研究期間：2019～2022
課題番号：19K18559
研究課題名（和文）尿路上皮癌に対する経口癌免疫療法薬と免疫チェックポイント阻害薬の併用療法の開発
研究課題名（英文）Combination immunotherapy of oral vaccination with immune checkpoint inhibitor for bladder cancer
研究代表者
北川 孝一（Koichi, Kitagawa）
神戸大学・科学技術イノベーション研究科・特命助教
研究者番号：00822884
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では尿路上皮癌に対する新規複合癌免疫療法の開発を目標とし、Wilms' tumor 1 (WT1) タンパクを表面発現する組換えビフィズス菌を用いた経口癌ワクチン (B. longum 420) と免疫チェックポイント阻害薬 (抗PD-1抗体)との併用による、その癌治療効果を検討した。その結果、本併用療法はWT1発現ビフィズス菌単独投与群や抗PD-1抗体単独投与群と比較してマウス尿路上皮癌MBT-2に対する有意な抗腫瘍効果を示した。併用療法の後にはWT1特異的な細胞性免疫が活性化されており、当該併用療法がWT1特異的免疫応答の増強により尿路上皮癌治療効果を高めることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果により、組換えビフィズス菌の経口投与が免疫チェックポイント阻害薬の尿路上皮癌に対する癌治療効果を増強することが明らかになった。進行性尿路上皮癌は患者数が多く予後不良であり、また近年適応となった免疫チェックポイント阻害薬の奏効率も20パーセント台と高くは無いため、その奏効率を高める新規併用療法薬の開発が待たれている。当該組換えビフィズス菌はそのような併用療法薬として応用できる可能性があり、研究の進展により尿路上皮癌患者の治療に貢献することができると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the feasibility of combination therapy of oral vaccination of recombinant Bifidobacterium expressing Wilms' tumor 1 (WT1) and immune checkpoint inhibitor (anti-PD-1) for advanced bladder cancer. As the results, the combination therapy of B. longum 420 with anti-PD-1 therapy showed significantly higher anti-tumor efficacy compared with B. longum 420 alone or anti-PD-1 therapy alone in mice bearing MBT-2, a murine bladder cancer cells. The combination therapy induced significantly higher activity of WT1-specific immune responses in mice after treatment. These findings suggested that the combination therapy enhanced the therapeutic efficacy by inducing WT1-specific anti-tumor immune responses against bladder cancer.

研究分野：腫瘍免疫

キーワード：腫瘍免疫 ビフィズス菌 免疫療法 粘膜免疫 尿路上皮癌

1. 研究開始当初の背景

尿路上皮癌に対する癌免疫療法

2018年にノーベル医学・生理学賞を受賞した Programmed death-1 (PD-1)/PD-ligand 1 (PD-L1) を始めとする免疫チェックポイント機構の発見ならびに免疫チェックポイント阻害薬の開発は癌治療に革命を起こし、癌免疫療法を急速に普及させた (Cousin-Frankel. *Science*. 2013)。尿路上皮癌、特に非筋層浸潤性の中リスク以上の膀胱癌に対しては 1970 年代より BCG (ウシ型弱毒結核菌) の膀胱内注入による免疫療法がなされてきた。わが国では 2017 年、切除不能な進行性尿路上皮癌へ対して免疫チェックポイント阻害薬である抗 PD-1 抗体が保険適応となり、尿路上皮癌に対する免疫療法の普及が進んでいる。免疫チェックポイント阻害薬ではこれまでの治療に抵抗性を示す例においても抗腫瘍効果を得られることが利点であるが、尿路上皮癌に対する臨床試験では奏効率は約 2 割と高くはない (Bellmunt, et al. *N Engl J Med*. 2017)。免疫チェックポイント阻害薬の適応となる化学療法抵抗性の進行性尿路上皮癌に対する他の有効な治療法は限られており予後不良であることから、免疫チェックポイント阻害薬の治療効果を向上させる新規癌免疫療法薬を用いた複合癌免疫療法の開発が期待されている (Chowdhury, et al. *J Intern Med*. 2018)。

癌ワクチン療法と複合癌免疫療法の開発への期待

様々な癌免疫療法が盛んに研究開発されているが、癌免疫療法の根本原理は癌抗原特異的な細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の誘導である。癌免疫療法の 1 つである癌ワクチン療法は癌抗原の投与により癌抗原特異的 CTL を誘導して癌を治療する。その際免疫チェックポイント阻害薬が CTL 活性のブレーキを解除する働きを担うことで CTL 活性が増強される。従って癌ワクチンは免疫チェックポイント阻害薬の治療効果を向上させることが期待され、有効な癌ワクチンの開発により複合癌免疫療法薬開発が可能であると考えた。

2. 研究の目的

本研究では尿路上皮癌に対する WT1 経口癌ワクチンと免疫チェックポイント阻害薬との併用療法すなわち複合癌免疫療法の開発を目標として、癌抗原 “Wilms' tumor 1 (WT1)” を表層発現する *Bifidobacterium longum* 420 (*B. longum* 420) を経口癌ワクチン候補としたマウスにおける尿路上皮癌治療効果を検証した。*B. longum* 420 は *Bifidobacterium longum* の膜タンパク “GLBP” を介して WT1 抗原を菌体表層に提示する組換え *Bifidobacterium longum* である。研究代表者らは先行研究において *B. longum* 420 を作成し、その経口投与がマウスにて WT1 特異的 CTL を誘導して白血病および前立腺癌に対して治療効果を示すことを報告してきた (Kitagawa, et al. *Cancer Immunol Immunother*. 2017 等)。WT1 は癌遺伝子の 1 種であり、多くの悪性腫瘍に高発現し、かつ免疫原性が高いことから最も優れた癌抗原と考えられている (Cheever, et al. *Clin Cancer Res*. 2009)。特に尿路上皮癌の WT1 陽性率は 65%以上と他の泌尿器癌に比べて高く、その治療対象として適している。

また、本研究で効果を検討する *B. longum* 420 は経口癌ワクチンとして腸管免疫系を介して強力な全身性の抗腫瘍免疫を誘導すると考えられる。これまでペプチドワクチン等の非経口 WT1 ワクチンの開発が進められてきたが、いずれも臨床試験における奏効率は低い。これら非経口ワクチンの課題点として 抗原が短く十分な免疫応答を惹起できない点、患者のヒト白血球抗原 (HLA) の遺伝子型に治療効果が左右される点、CTL のみ誘導するため CTL の抗腫瘍活性が長期間持続しない点が報告されている (Borst, et al. *Nat Rev Immunol*. 2018)。

B. longum 420 は WT1 タンパク全長を有するため抗原性を担保し、HLA 分子への親和性を高めた配列により患者自身の HLA 型に適した免疫が誘導され、CD4 および CD8 エピトープ両方を有することから腫瘍特異的 CTL に加え抗腫瘍効果を担う Th1 細胞をも誘導するため、上記の問題点を克服できると考えられる。また近年のマイクロバイーム解析により、*Bifidobacterium longum* の経口投与が免疫チェックポイント阻害薬の治療効果を高めることが報告されている (Sivan, et al. *Science*. 2015)。従って本経口癌ワクチンは従来の非経口癌ワクチンと比較して免疫チェックポイント阻害薬との相乗効果が期待でき、これを実現することで尿路上皮癌患者により効果的な治療法を提供し、患者予後改善に貢献できると考えられる。

3. 研究の方法

B. longum 420 と免疫チェックポイント阻害薬との併用による尿路上皮癌治療効果の検討

マウス尿路上皮癌細胞 MBT-2 (WT1 陽性) を皮下移植した C3H/He マウスに対し *B. longum* 420 を経口投与し、抗腫瘍効果を検討した。さらに免疫チェックポイント阻害薬である抗 PD-1 抗体の腹腔内投与を併用し、*B. longum* 420 により誘導された CTL を免疫チェックポイント阻害薬で活性化することによる相乗的癌治療効果を検討した。

B. longum 420 の尿路上皮癌治療効果の作用機序についての免疫学的検討

B. longum 420 の有効性について免疫学的解析を行った。具体的には、B. longum 420 を投与したマウスから脾臓を回収して抗原再刺激を行い、細胞性免疫の活性化に關与する各種サイトカイン産生を定量した。また、抗腫瘍免疫で大きな役割を担う T 細胞の活性化につき調べるため、脾臓細胞の抗原再刺激後に各種サイトカインを産生する T 細胞を細胞内サイトカイン染色により解析した。直接の抗腫瘍効果を担う WT1 特異的 CTL の癌細胞に対する WT1 特異的細胞傷害活性も、併せて測定した。

腸管免疫系における WT1 特異的免疫応答の検討

B. longum 420 の経口投与による腸管免疫系の活性化についてその作用機序を検討するため、B. longum 420 を経口投与したマウスの腸間膜リンパ節および小腸パイエル板を回収し、これらの免疫組織に存在する樹状細胞およびリンパ球集団について解析した。これらの解析により B. longum 420 がいかに腸管免疫系を活性化して全身性の抗腫瘍免疫を發揮するのかを検証した。

腫瘍浸潤性リンパ球の解析

B. longum 420 を経口投与したマウスより腫瘍を回収し、腫瘍浸潤リンパ球の数・分布について病理組織学的解析およびフローサイトメトリーを用いて解析した。これらの解析により腫瘍浸潤リンパ球の集団組成を解析し、どのような腫瘍浸潤リンパ球が抗腫瘍効果を担うのかについて検証した。また、腫瘍内の制御性 T 細胞 (Treg) の存在比率についてフローサイトメトリーにより解析し、B. longum 420 と免疫チェックポイント阻害薬の併用療法が抑制性の腫瘍微小環境をどのように変化させるのかを検証した。

4. 研究成果

B. longum 420 と免疫チェックポイント阻害薬との併用による尿路上皮癌治療効果の検討

B. longum 420 を C3H/He マウスに週 5 回、5 週間にわたり経口投与を行った結果、Phosphate Buffered saline (PBS) 経口投与群および B. longum 2012 (GLBP 導入コントロール) と比較して顕著に腫瘍増殖を抑制し、マウスの生存率を改善した。さらに B. longum 420 の経口投与と免疫チェックポイント阻害薬 (抗 PD-1 抗体) の腹腔内投与を併用した結果、併用療法は B. longum 420 単独投与群や抗 PD-1 抗体単独療法と比較して顕著に腫瘍の増殖を抑制し、PBS 投与群と比較して有意に生存率を向上させた。また、抗 CD4 抗体および抗 CD8 抗体の腹腔内投与により CD4T 細胞および CD8T 細胞を枯渇させ、B. longum 420 の経口投与を行った結果、これらの抗体を投与しない場合と比較して顕著に抗腫瘍効果の喪失を認めたことから、B. longum 20 の経口投与による抗腫瘍効果には CD4T 細胞および CD8T 細胞が關与していることが示唆された。

B. longum 420 の尿路上皮癌治療効果の作用機序についての免疫学的検討

B. longum 420 を経口投与した C3H/He マウスより脾臓を採取し、*in vitro* においてマイトマイシン C 処理 MBT-2 を用いて脾臓細胞への抗原再刺激を行った結果、PBS 経口投与群および B. longum 2012 経口投与群と比較して有意に脾臓細胞の細胞増殖を促進し、脾臓細胞のインターフェロン (IFN- γ) の産生を増加させた。さらに T 細胞について調べた結果、B. longum 420 の経口投与後の脾臓細胞中には他経口投与群と比較して WT1 特異的に IFN- γ を産生する CD4T 細胞および CD8T 細胞が有意に増加し、TNF- α を産生する CD8T 細胞が有意に増加していた。また、経口投与後の脾臓細胞を *in vitro* にて WT1 の CD4T 細胞エピトープおよび CD8T 細胞エピトープで再刺激した結果、特定のエピトープ特異的に IFN- γ を産生する CD4T 細胞および CD8T 細胞が PBS 経口投与群と比較して有意に増加していた。

B. longum 420 の経口投与により、他の経口投与群と比較して CD8T 細胞の有意に高い WT1 特異的細胞傷害活性が認められた。これらの結果により、B. longum 420 は C3H/He マウスにおいて WT1 特異的 T 細胞を介した細胞性免疫応答を誘導することが示唆された。

腸管免疫系における WT1 特異的免疫応答の検討

B. longum 420 を経口投与した C3H/He マウスより腸間膜リンパ節を採取した結果、腸間膜リンパ節内の WT1 特異的 CD4T 細胞および CD8T 細胞が他経口投与群と比較して有意に増加していた。また、腸間膜リンパ節中の樹状細胞についても解析した結果、B. longum 420 の経口投与により有意ではないものの樹状細胞の CD80、CD86 の発現上昇が認められた。小腸パイエル板についても同様の解析を行った結果、樹状細胞の CD80 発現の上昇が認められた。これらの結果から、B. longum 420 の経口投与は腸管関連リンパ組織内の樹状細胞および T 細胞を活性化することで抗腫瘍効果を發揮することが示唆された。

腫瘍浸潤性リンパ球の解析

B. longum 420 を経口投与したマウスより腫瘍を回収し腫瘍浸潤リンパ球について病理組織学的に解析した結果、PBS 経口投与群および B. longum 2012 経口投与群と比較して顕著に腫瘍

浸潤性 CD4T 細胞および CD8T 細胞が増加していた。さらに、*B. longum* 420 の経口投与と抗 PD-1 抗体の腹腔内投与との併用により、これらの T 細胞の腫瘍内浸潤はさらに増加していた。また、腫瘍浸潤リンパ球についてフローサイトメトリー解析を行った結果、*B. longum* 420 の経口投与と抗 PD-1 抗体の腹腔内投与との併用療法により、他の投与群と比較して有意に CD4T 細胞、CD8T 細胞ならびに CD107a 陽性 CD8T 細胞の腫瘍浸潤が増加した。対して、同併用療法は腫瘍内の Treg (CD25⁺FoxP3⁺CD4T) の腫瘍内浸潤を顕著に減少させた。これらの結果により、*B. longum* 420 の経口投与が WT1 特異的な T 細胞の腫瘍内浸潤を賦活し、抗 PD-1 抗体がさらにそれを促進して抗腫瘍効果を増強することが示唆された。

以上の結果から、*B. longum* 420 の経口投与は尿路上皮癌モデルマウスにおいて腸管免疫系を賦活することにより全身性の WT1 特異的 T 細胞を誘導し、腫瘍局所へのリンパ球浸潤を誘導することにより抗腫瘍効果を示すことが示唆された。さらに免疫チェックポイント阻害薬である抗 PD-1 抗体が腫瘍浸潤性リンパ球を増加させることで、*B. longum* 420 の抗腫瘍効果を増強することが示されたことから、*B. longum* 420 は経口癌ワクチン候補として免疫チェックポイント阻害薬との複合癌免疫療法の候補となる可能性がある。今後は当経口癌ワクチン技術の臨床応用を目指し、さらなる効果・メカニズムの解明を行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kitagawa Koichi, Tatsumi Maho, Kato Mako, Komai Shota, Doi Hazuki, Hashii Yoshiko, Katayama Takane, Fujisawa Masato, Shirakawa Toshiro	4. 巻 22
2. 論文標題 An oral cancer vaccine using a Bifidobacterium vector suppresses tumor growth in a syngeneic mouse bladder cancer model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Therapy - Oncolytics	6. 最初と最後の頁 592 ~ 603
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.omto.2021.08.009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Koichi Kitagawa, Mako Kato, Shota Komai, Ryota Sako, Hazuki Doi, Yoshiko Hashii, Takane Katayama, Toshiro Shirakawa
2. 発表標題 Preclinical Study of Oral Cancer Vaccine Using Recombinant Bifidobacterium Expressing WT1 Protein in Murine Bladder Cancer Model and Non-human Primate
3. 学会等名 American Society of Gene & Cell Therapy 23rd Annual Meeting（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 北川 孝一, 國村 尚人, 加藤 真子, 駒井 翔太, 土井 葉月, 末田 菜花, 橋井 佳子, 片山 高嶺, 白川 利朗
2. 発表標題 Oral cancer vaccine using recombinant Bifidobacterium expressing WT1 protein and anti-PD1 antibody induced WT1 specific immune responses via gut immune system in murine bladder cancer model
3. 学会等名 CRI-CIMT-EATI-AACR INTERNATIONAL CANCER IMMUNOTHERAPY CONFERENCE（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 白川 利朗, 北川 孝一, 辰巳 真帆, 門脇 雅英, 片山 高嶺, 橋井 佳子, 藤澤 正人
2. 発表標題 WT1 oral cancer vaccine combined with anti-PD-1 antibody completely suppressed tumor growth in a murine bladder cancer model
3. 学会等名 CIMT 2019 Annual Meeting（国際学会）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------