

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K18089

研究課題名（和文）BCG壁脂質リポソームと抗PD-1抗体の併用による転移性膀胱癌治療の開発

研究課題名（英文）Development of metastatic bladder cancer treatment using BCG cell wall lipid liposomes in combination with anti-PD-1 antibodies.

研究代表者

吉野 喬之（Yoshino, Takayuki）

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：40734348

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：筋層非浸潤癌の術後の再発進展予防としてBCG膀胱内注入療法は標準治療として用いられている。再発癌率を大きく低下させる非常に有効な治療だが、BCG生菌の投与が必要であるため重篤な感染症を発症するリスクなどが存在し、感染性のない非生菌製剤の開発が囑望されている。我々はBCG含む抗酸菌類に特異的な壁成分であり、強力な免疫活性を持つtrehalose-6,6'-dimycolate(TDM)に着目し、これを親水性リポソーム化し製剤化した。このTDMリポソームは膀胱内発癌モデルマウスに対して腹腔内投与を行うことで、有意に膀胱内発癌を抑制することが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々が今回開発したTDMリポソーム製剤はマウスモデルでの膀胱内発癌予防効果を認めたことで、BCGの代替となりつつも感染性のない全く新しい治療法の開発につながる可能性が示唆された。またこのTDMリポソーム製剤は腹腔内投与により発癌予防効果をもたらしたことから、投与方法が膀胱内注入に限られたBCGと異なり、転移性癌や膀胱癌以外の癌腫など、多様な疾患を対象とした抗腫瘍薬の開発につながる可能性があると考えている。

研究成果の概要（英文）：Intravesical BCG therapy is the standard therapy to prevent the recurrence and progression of non-muscle invasive bladder cancer. Although it is a highly effective treatment that significantly reduces recurrence rates, it requires the administration of live bacteria, which can lead to serious infections. Therefore, we are eager to develop a non-infectious, non-viable formulation. We focused on trehalose-6,6'-dimycolate (TDM), a wall component specific to acid-fast bacilli including BCG, which has strong immune activity, and we formulated it into hydrophilic liposomes. We found that intraperitoneal administration of TDM-liposome significantly suppressed intravesical carcinogenesis in a bladder carcinogenesis model mice.

研究分野：膀胱癌

キーワード：BCG ミコール酸 TDM 膀胱癌

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

泌尿器科領域では、非筋層浸潤性膀胱癌に対する経尿道的膀胱腫瘍切除術後の再発、腫瘍進展の予防として Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guérin (BCG)膀胱内注入療法は標準治療として広く用いられている。再発率を 30~40%減少させる非常に有効な免疫治療であるが、BCG の生菌注入は重篤な全身感染症のリスクなどが存在する。そのため BCG の菌体成分を用いた、感染性が排除されつつも抗腫瘍免疫を誘導する非生菌製剤の開発が長く囁望されている。

そこで我々は BCG 菌を含む抗酸菌類の壁成分に特徴的な長鎖脂肪酸であるミコール酸(MA)に注目した。我々のグループはこの MA を親水性カオチニックリポソーム化することで、マウス皮下接種モデルにおいて抗腫瘍効果があることを発見し特許化した(【発明名称】リポソーム、抗癌剤及び癌治療用キット【出願番号】特願 2017-042228)。さらに我々は MA 関連物質として、抗酸菌細胞壁に豊富に含まれている糖脂質である trehalose-6 6'-dimycolate(TDM)に着目している。TDM は、感染宿主に肉芽腫病変を形成する病原因子として古くから注目されていたが、近年になって TDM は樹状細胞やマクロファージなどに発現する macrophage inducible C-type lectin (Mincle)という受容体に認識され、自然免疫の亢進作用およびアジュバントでの獲得免疫賦活作用をもつ強力な immunomodulator として関心を集めている。

当研究室ではすでに抗酸菌の菌体から MA 及び TDM を分離抽出し親水性カオチニックリポソーム化する技術を確立している。この BCG 菌体成分を用いたリポソーム製剤の抗腫瘍効果を検証し、BCG の代替となる新規の抗腫瘍製剤の開発を目指す。

## 2. 研究の目的

- (1)MA リポソームと TDM リポソームの抗腫瘍効果の検証を行う。
- (2)TDM リポソーム腹腔内投与での抗腫瘍効果について検証する。
- (3)抗 PD-1 抗体との併用による、TDM リポソームのアジュバントでの抗腫瘍免疫賦活化について検証する。
- (4)膀胱内発癌マウスにおける TDM リポソームの発癌抑制効果について検証を行う。
- (5)TDM リポソームの抗腫瘍効果の機序について追加検証する。

## 3. 研究の方法

抽出した MA、TDM を親水性リポソーム化する

薄層クロマトグラフィーを用いて BCG 東京株から MA、TDM を抽出する。抽出、単離した TDM に DOPC やデンドロン脂質を添加することで親水性 MA リポソーム(Lip-MA)、TDM リポソーム(Lip-TDM)および比較実験用に含有物のない空のリポソーム(Lip-CON)を作成する。

MA リポソームと TDM リポソームの皮下投与での抗腫瘍効果を比較する。

MB49 膀胱癌細胞株を皮下接種腫瘍の細胞株として用いる。マウス 1 匹あたり腫瘍細胞  $3 \times 10^5$  cell を 100 $\mu$ l の溶液に懸濁しマウス背部皮下に接種する。腫瘍接種 1 日後、3 日後、5 日後、7 日後に MA リポソームもしくは TDM リポソーム 100 $\mu$ l(TDM40 $\mu$ g 相当)を腫瘍局所に皮下投与する。皮下に形成した腫瘍のサイズを経時的に 4 週まで記録し、腫瘍の発育を比較する。

TDM リポソーム腹腔内投与での抗腫瘍効果について検証する。

MB49 膀胱癌細胞株、MC38 大腸癌細胞株を皮下接種腫瘍の細胞株として用いる。マウス 1 匹あたり腫瘍細胞  $3 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$  cells を 100 $\mu$ l の溶液に懸濁しマウス背部皮下に接種する。腫瘍接種 1 日後、3 日後、5 日後、7 日後に TDM リポソーム 100 $\mu$ l(TDM40 $\mu$ g 相当)を腹腔内投与する。皮下に形成した腫瘍のサイズを経時的に 4 週まで記録し、腫瘍の発育を比較する。

抗 PD-1 抗体との併用による、TDM リポソームのアジュバント効果について検証する。

マウス 1 匹あたり、MB49 膀胱癌腫瘍細胞  $3 \times 10^5$  cells を 100 $\mu$ l の溶液に懸濁しマウス背部皮下に接種する。腫瘍接種 1 週間前から抗 PD-1 抗体 100  $\mu$ g を週 1 回腹腔内投与する。併せて腫瘍接種 1 日後、3 日後、5 日後、7 日後に TDM リポソーム 100 $\mu$ l(TDM40 $\mu$ g 相当)を腹腔内投与し、両者の併用効果について検証する。

膀胱内発癌マウスにおける TDM リポソームの発癌抑制効果について検証する。

化学発癌物質である BBN(N-butyl-N-4-hydroxybutyl nitrosamine)を飲料水に質量比 0.025%添加しマウスに自由飲水させることで膀胱内の段階的発癌を促す膀胱内発癌モデルマウス

スに対して、BBN 接種 0 週から 15 週までに週 1 回の TDM リポソーム 100 $\mu$ l(TDM40 $\mu$ g 相当)の腹腔内投与を行う。16 週でマウス膀胱を回収し HE 染色で評価することで、膀胱内発癌の変化について検証する。

発癌モデルマウス膀胱に対して RNA シークエンス(RNA-seq)を行い膀胱の免疫環境変化について検証する。

上記 BBN マウスの膀胱から Total RNA を抽出し、RNA-Seq を行う。発現変動遺伝子解析を行い IPA を用いて TDM リポソーム投与による膀胱内でのシグナル変化を検証する。

NK depleted マウスに対する Lip-TDM 抗腫瘍効果の変化を検証する。

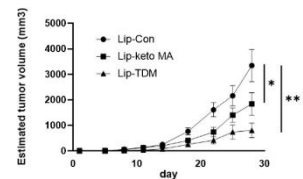
WT マウスに対して腫瘍接種 1 週間前に抗 NK1.1 抗体 100  $\mu$ g を投与し、以降週 1 回反復投与を行うことで NK 細胞消失マウスを作成する。このマウスに対して MB49 膀胱癌細胞  $3 \times 10^5$  cells を 100 $\mu$ l の溶液に懸濁しマウス背部皮下に接種する。腫瘍接種 1 日後、3 日後、5 日後、7 日後に TDM リポソーム 100 $\mu$ l(TDM40 $\mu$ g 相当)を腹腔内投与する。皮下に形成した腫瘍のサイズを経時的に 4 週まで記録し、腫瘍の発育を比較する。

#### 4. 研究成果

MA リポソームと TDM リポソームの皮下投与での抗腫瘍効果を比較する。

MA の中でも比較的強い抗腫瘍活性をもつと目される keto-MA を用いて MA リポソームを作成し(Lip-keto-MA)を作成し、Lip-TDM での抗腫瘍効果を比較した。Lip-keto-MA 投与群、Lip-TDM 投与群ともに Lip-CON 投与群と比べ腫瘍の発育が抑制されたが、Lip-TDM 投与群でより強い抗腫瘍効果が確認された(図 1)。この実験を受け、以降の実験には MA リポソームではなく TDM リポソームを用いることとした。

図 1: Lip-MA と Lip-TDM の抗腫瘍効果の比較



TDM リポソーム腹腔内投与での抗腫瘍効果について検証する。

MB49(膀胱癌)、MC38(大腸癌)、いずれの細胞株の皮下接種モデルでも、Lip-TDM 腹腔内投与群では Lip-CON 投与群に比べて有意に皮下接種腫瘍の発育が抑制された(図 2)。この結果から TDM リポソーム腹腔内投与は複数の癌腫で抗腫瘍剤として使用できる可能性が示唆された。

抗 PD-1 抗体との併用による、TDM リポソームのアジュバント効果について検証する。

Lip-TDM と抗 PD-1 抗体を併用することで、抗 PD-1 抗体による抗腫瘍免疫を TDM リポソームがアジュバントとして賦活化することができるかを検証した。しかし、腫瘍皮下接種マウスモデルにおいて抗 PD-1 抗体投与群では Lip-CON 群に比較して有意に腫瘍が抑制されたが、そこに Lip-TDM を併用したことによる抗腫瘍効果の増強は認めなかった(図 3)。

図 2: Lip-TDM 腹腔内投与による抗腫瘍効果

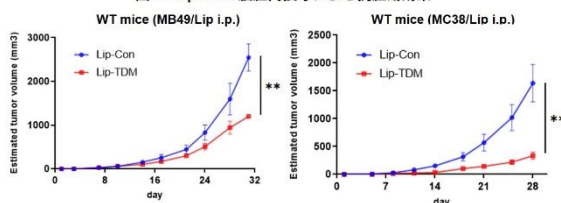
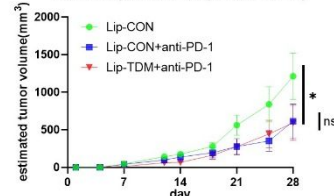


図 3: Lip-TDM と抗 PD-1 抗体併用効果

WT mice (MB49:SC, Lip/anti-PD-1:P)



TDM リポソームの膀胱内発癌予防効果について検証する。

BCG 膀胱内投与と同様に、Lip-TDM の腹腔内投与が膀胱内での発癌過程を抑制するかを検証するため、BBN 膀胱発癌マウスモデルに対して Lip-TDM の腹腔内投与を行った。結果として Lip-TDM の投与群では、Lip-CON 群に比較して有意に膀胱内発癌の抑制を認めた(図 4)。

TDM リポソーム腹腔内投与による膀胱内のシグナル変化を検証する。

上記の Lip-TDM 腹腔内投与による膀胱内発癌抑制の機序を調べるために BBN マウス膀胱 (Lip-TDM, Lip-CON 3 匹ずつ) から RNA を抽出し、RNA-seq を行った。p-value < 0.05, |fold change| > 2 の条件で発現変動遺伝子(DEGs)を抽出したところ、650 個の DEGs を認めた(図 4)。この DEGs に対して教師なしクラスタリングで heat map を作成したところ、明確に Lip-TDM 群と Lip-CON 群が 2 分され、その遺伝子発現が大きく異なっていることが明らかになった(図 5)。

図 4: Lip-TDM 腹腔内投与による膀胱内発癌の抑制

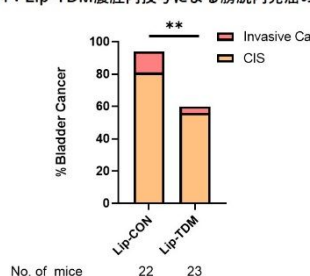


図 5: DEGs 650 個の volcano plot

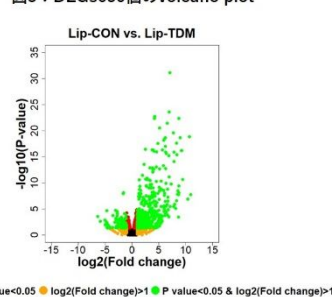
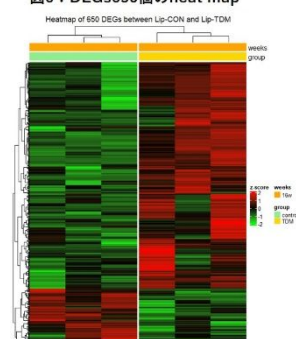


図 6: DEGs 650 個の heat map

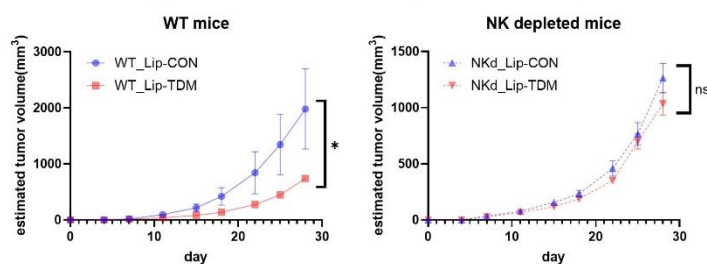


また、この 650 個の DEGs に対して ingenuity pathway analysis (IPA) によるパスウェイ解析を行ったところ、Lip-TDM 投与群では B 細胞・T 細胞などの獲得免疫細胞の活性化、自然免疫系および獲得免疫系細胞の相互作用亢進など、自然免疫細胞と獲得免疫細胞の活性化につながるシグナルの亢進が検出された。この結果からは、Lip-TDM の腹腔内投与は、BCG の膀胱内注入と同様に自然免疫応答と獲得免疫応答の両者を活性化させることが膀胱内発癌予防効果を来していることが推測された。

NK depleted マウスに対する TDM リポソームの抗腫瘍効果の変化を検証する。

WT マウスで認められる Lip-TDM 腹腔内投与による腫瘍発育抑制効果は、NK depleted マウスでは消失することが確認された(図 7)。このことから、TDM による獲得免疫機能の亢進による抗腫瘍免疫誘導には、NK 細胞の存在が何らかの重要な役割を果たしていることが推察された。詳細な機序の解明にはさらなる追加検証が必要である。

図7：NK depletedマウスでのLip-TDM抗腫瘍効果の消失



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<br>Shiga Masanobu, Miyazaki Jun, Tanuma Kozaburo, Nagumo Yoshiyuki, Yoshino Takayuki, Kandori Shuya, Negoro Hiromitsu, Kojima Takahiro, Tanaka Ryota, Okiyama Naoko, Fujisawa Yasuhiro, Watanabe Miyuki, Yamasaki Sho, Kiyohara Hideyasu, Watanabe Makoto, Sato Taka-aki, Tahara Hideaki, Nishiyama Hiroyuki, Yano Ikuya | 4. 巻<br>70                |
| 2. 論文標題<br>The liposome of trehalose dimycolate extracted from M.bovis BCG induces antitumor immunity via the activation of dendritic cells and CD8+ T cells  | 5. 発行年<br>2021年           |
| 3. 雑誌名<br>Cancer Immunology, Immunotherapy  | 6. 最初と最後の頁<br>2529 ~ 2543 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1007/s00262-021-02870-2   | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>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<br>-                 |

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名<br>（ローマ字氏名）<br>（研究者番号） | 所属研究機関・部局・職<br>（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 |
|---------|---------|
|---------|---------|