

令和 6 年 5 月 31 日現在

機関番号：32206

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09410

研究課題名（和文）人工合成糖脂質で惹起される抗腫瘍免疫機序の解明と新規製剤の開発

研究課題名（英文）Development of a novel formulation based on anti-tumor immunity induced by artificial synthetic glycolipids

研究代表者

宮崎 淳（Miyazaki, Jun）

国際医療福祉大学・医学部・主任教授

研究者番号：10550246

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）：我々は、BCG細胞壁糖脂質の主成分であるトレハロース6,6'-ジマイコレート（TDM）を用いて、自然免疫を活性化し、アジュバント効果を有する毒性の低い治療法を開発した。TDMを組み込んだ親水性カチオン性リポソーム（Lip-TDM）の局所投与が樹状細胞の成熟を介してCD8+ T細胞の活性化を誘導することにより、皮下接種した腫瘍に対して抗腫瘍効果を発揮することを見出した。さらに、N-ブチル-N-(4-ヒドロキシブチル)ニトロソアミン誘発同所性膀胱がんモデルマウスにおいて、Lip-TDMの腹腔内投与が抗腫瘍効果を発揮することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

TDMが、抗腫瘍効果の中心となるCD8陽性T細胞や樹状細胞の誘導にどのように関わっているのかが検討できた。近年新しい癌免疫療法として、免疫チェックポイント阻害剤の開発が急展開を示している。免疫の活性化は癌治療において最重要な点である。TDMリポソームは、これら免疫チェックポイント阻害剤に、さらなる治療の上乗せ効果を期待できる免疫アジュバント活性製剤としての可能性がある。最も臨床的有用性の明らかな癌免疫療法であるBCG療法の課題である、生菌であることによる応用限界を克服でき、さらに、モデル腫瘍や投与法の違いによる活性の差を利用して新規の癌治療法を提案するものである。

研究成果の概要（英文）：We have developed a less toxic therapy using trehalose 6,6'-dimycolate (TDM), a major component of BCG cell wall glycolipids, to activate innate immunity and have adjuvant effects. local administration of hydrophilic cationic liposomes incorporating TDM (Lip-TDM) induced dendritic cell maturation. We found that local administration of TDM-embedded hydrophilic cationic liposomes (Lip-TDM) exerted an antitumor effect on subcutaneously inoculated tumors by inducing CD8+ T cell activation via dendritic cell maturation. Furthermore, we found that intraperitoneal administration of Lip-TDM exerted antitumor effects in a mouse model of N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine-induced orthotopic bladder cancer.

研究分野：癌免疫

キーワード：BCG ミコール酸 TDM 癌免疫

1. 研究開始当初の背景

Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guérin (BCG) は現在でも筋層非浸潤性膀胱癌に対する最大の癌免疫療法剤である。BCG 生菌の抗腫瘍効果は、癌細胞や癌組織内の抗原提示細胞へ生菌が取り込まれることから始まり、次に、BCG 生菌が癌細胞内へ直接作用しさらに、宿主の全身免疫系を介して生体内の細胞性免疫を活性化することで抗腫瘍効果を発揮するとされる (図 1)。この原理は、生体内のウイルス、細菌への感染防御システムを巧みに利用したがん免疫療法であるとされるが、いまだその作用メカニズムは完全に解明されていない。BCG に抗腫瘍効果があるのは、抗酸菌細胞壁の最も大きな特徴である、疎水性の極めて強い長鎖分枝脂肪酸のミコール酸(MA)によると考えられる

(Miyazaki J et al. Cationized liposomal ketomycolic acids isolated from *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin induce antitumor immunity in a syngeneic murine bladder cancer model. PLoS One. 2019 Jan 4;14(1):e0209196.) (図 2)。MA は α 位に分枝鎖を、 β 位に水酸基を有する超高級分枝脂肪酸である。しかし MA は宿主のレセプターが解明されておらず、その作用メカニズムはいまだ不明である。ペプチドや核酸などと違い、なぜ脂質が癌に効くのかという点が、この研究を開始するきっかけとなった。一方、糖脂質 TDM

(trehalose-6,6'-dimycolate) (図 3) は、当初 1950 年代から有毒結核菌の細胞壁を構成する疎水性成分で感染宿主に結核様肉芽腫病変を形成することから病原因子としてその性質が注目された。TDM の構造は、トレハロースの 6, 6' 位の水酸基に抗酸菌特有の脂肪酸である MA が 2 分子エステル結合した糖脂質である。TDM は抗酸菌に最も特徴的な細胞壁機能分子で免疫調節作用を有し、C 型レクチン受容体である Mincle が TDM の特異的レセプターであることが示され宿主/寄生体関係の面から注目されている。一方で、TDM は疎水性のため、単独では治療投与が不可能である。そのため、我々は BCG コンノート株から抽出した TDM を 1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholin(DOPC)、デンドリマー、コレステロールと混合することにより親水性の人工リポソームを作成し、その抗腫瘍効果を検討し、脂質免疫から T 細胞免疫の活性化経路について、本研究により解明する。

2. 研究の目的

我々は MA を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【特許第 7220472 号】**。TDM は、*Mycobacterium* 属を含め *Nocardia*、*Rhodococcus* 等の Actinomycetales に属する土壌細菌のいずれからも合成され、強力な immunomodulator として宿主/寄生体関係の面から関心が持たれている。TDM は当初、肉芽腫形成と体重減少を引き起こすと考えられていた。しかし、最近、マクロファージ誘導性 C 型レクチン (Mincle) として知られる TDM のレセプターに依存する細胞媒介性免疫応答に対する強力なアジュバント効果を持つことが認められている。TDM の顕著な疎水性と毒性作用を改善するために、我々は TDM を組み込んだ親水性カチオン性リポソームを開発した。この改良型カチオン性リポソーム TDM (Lip-TDM) の皮下または腹腔内投与は、膀胱がんを含む 3 つの細胞株で抗腫瘍効果を示したが、これは樹状細胞 (DC) を介した細胞傷害性エフェクター CD8+ T 細胞の活性化の結果であると考えられる。Lip-TDM を臨床応用するためには、Lip-TDM と新たに形質転換したがん細胞との時間的なメカニズムを明らかにするために、同所性膀胱腫瘍の発がん期に全身投与した Lip-TDM の抗腫瘍効果を確認

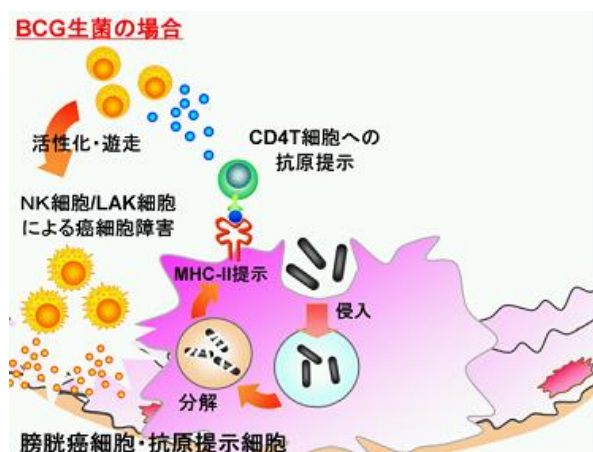


図1 BCG生菌の作用機序

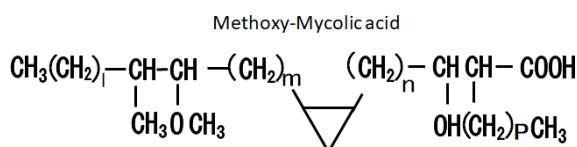


図2 ミコール酸の構造式

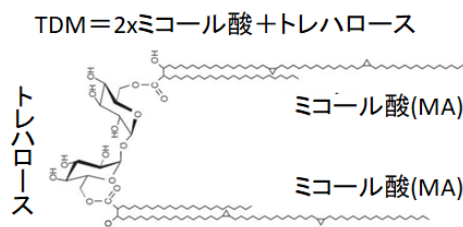


図3 TDMの構造式

する必要がある。そこで我々は、化学発がん物質 N-ブチル-N-(4-ヒドロキシブチル) ニトロソアミン (BBN) を用いたマウス同所性膀胱がんモデルにおいて、Lip-TDM の腹腔内投与による抗腫瘍効果を検討した。ここでは、Lip-TDM の腹腔内投与が、細胞傷害性細胞の活性化と自然免疫の仲介を介して、同所性膀胱癌に対する抗腫瘍効果を示し、この作用は主に NK 細胞の存在に依存していることを検討した。

3. 研究の方法

TDM 含有リポソーム (Lip-TDM) の調製 リポソームは、まず 200 μ g の TDM を 1.8mg の 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC) (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL)、200 μ g のコレステロール (Avanti Polar Lipids)、66 μ g のカチオン性デンドロン含有脂質 D22 (Hygieia Bioscience, Osaka, Japan) に溶解して調製した。この脂質混合物を Biorupter (コスモバイオ、東京、日本) を用いて超音波処理した後、凍結融解サイクルに供し、その後、孔径 200 nm のポリカーボネート膜 (Mini-Extruder ; Avanti Polar Lipids) を通してミニエクストルージョン (11 回) した。TDM 化合物を添加しない空のリポソームコントロール (Lip-CON) も同様に調製した。

マウス膀胱癌モデル 8 週齢の雌性野生型 (WT) C57BL/6 マウスに、0.025% の N-ブチル-N-(4-ヒドロキシブチル) ニトロソアミン (BBN) (東京化成工業、東京、日本) を添加した飲料水を与えた。16 週間の投与後、膀胱を摘出した。組織学的検査のため、膀胱を 10% 緩衝ホルマリンで固定した後、ヘマトキシリン・エオジン (H&E) 染色と免疫組織化学 (IHC) 染色で解析した。

皮下接種腫瘍発生マウスモデル 雌性 C57BL/6 マウス (6-8 週齢) に M49 細胞 (100 μ l の PBS に 3×10^5 細胞) を右背部に皮下接種した。得られた腫瘍体積を週 2 回モニターし、以下の式で算出した：(長軸 \times 短軸 2×0.52)。B6 マウスから NK 細胞を枯渇させるために、腫瘍細胞接種の 3 日前に抗 NK1.1 モノクローナル抗体 (PK136, Bio X Cell) をマウス 1 匹当たり絶対値で 100 μ g 腹腔内投与し、さらに腫瘍接種の 0 日目および 14 日ごとにモノクローナル抗体をマウス 1 匹当たり絶対値で 200 μ g 投与した。NK1.1 細胞の枯渇は、Gallios フローサイトメーター (Beckman-Coulter, Indianapolis, IN) で確認した。フローサイトメトリー 腫瘍、腫瘍排出リンパ節 (TDLN)、および脾臓を、あらかじめ定義した時点でマウスから摘出した。腫瘍はミンチにし、gentleMACS™ Dissociator (MiltenyiBiotec 社、ドイツ、ベルギー・グッドバッハ) を用いて単一細胞まで解離させたが、酵素処理は行わなかった。

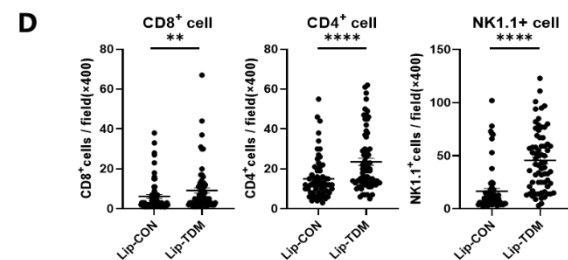
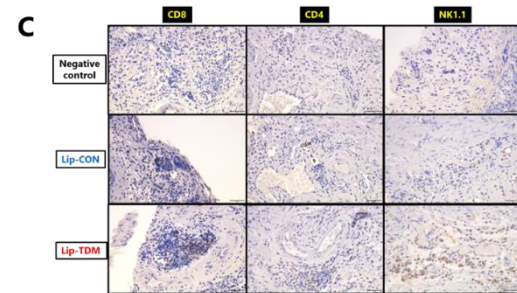
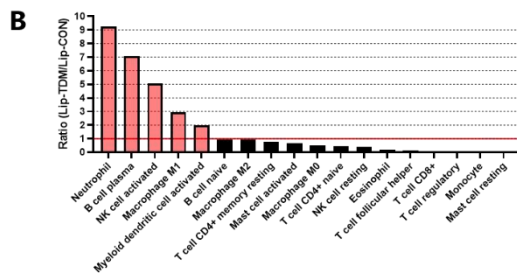
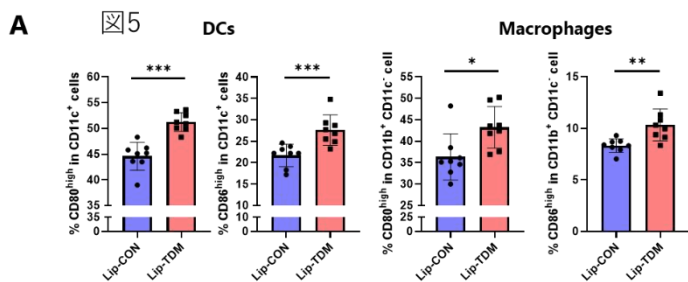
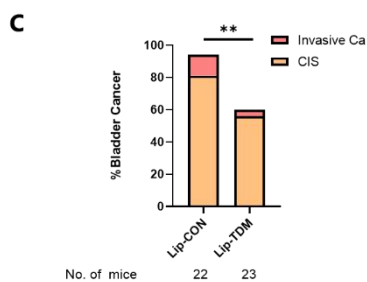
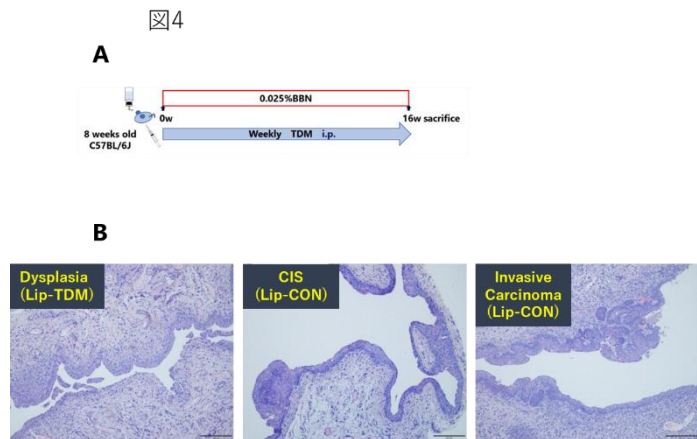
フローサイトメトリー解析 (FACS)。下の抗体を用いた：抗 CD45 (104, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ)、抗 CD3 (17A2, BioLegend, San Diego, CA)、抗 CD11b (M1/70, BioLegend)、抗 CD11c (N418, BioLegend)、抗 NK1.1 (PK136, BioLegend)、抗 CD27 (LG.3 A10, BioLegend)、抗 CD80 (16-10A1, BioLegend)、抗 CD86 (GL-1, BioLegend)、抗 CD62L (MEL-14, BD Biosciences)、抗 CD44 (IM7, BD Biosciences)、抗 IFN γ (XMG1.2, BioLegend)、抗 TNF α (MP6-XT22, BioLegend)、抗 グランザイム B (NGZB, Thermo Fisher Scientific)。細胞内 IFN- γ と グランザイム B の染色のために、細胞をプレフェルジン A (BioLegend) を含む細胞活性化カクテルで刺激した。4 時間のインキュベーション後、細胞表面染色を行い、続いて Fix/Perm Kit (BD Biosciences 社製) を用いて細胞内サイトカイン染色を行った。細胞は Gallios フローサイトメーターで定量し、データは FlowJo ソフトウェア (BD Biosciences) を用いて解析した。統計解析 連続変数および順序変数は Mann-Whitney U 検定、カテゴリー変数はカイ二乗検定を用いて群間関係を比較した。確率値 < 0.05 を有意とした。統計解析には GraphPad Prism8 (GraphPad Software, Boston, MA) を用いた。

4. 研究成果

同所性膀胱癌モデルにおける Lip-TDM の抗腫瘍効果 同所性膀胱癌における Lip-TDM の抗腫瘍効果を確認するため、BBN によって誘発される膀胱癌モデルを用いた。BBN による化学的ストレスの蓄積は、粘膜の肥厚と変性 (異形成) を引き起こし、最終的に CIS (carcinoma in situ) となり、浸潤癌へと進行する。BBN に暴露されたマウスは、0 週目から 15 週目まで週単位で Lip-

TDM (全 TDM の $40 \mu\text{g}$ に相当) または空のリポソーム対照 (Lip-CON) を腹腔内投与され、16 週目に犠牲になった (図 4A)。各治療群の代表的なヘマトキシリン-エオシン染色標本を図 4B に示す。Lip-TDM 投与群のその後の膀胱癌発生率は Lip-CON 投与群に比べ有意に低く、60.8% (23 例中 14 例) 対 95.4% (22 例中 21 例) であった ($p < 0.01$) (図 4C)。膀胱腫瘍の浸潤深さの比率については、Lip-CON 投与群 (14.3%, 21 例中 3 例) に対して Lip-TDM 投与群 (7.1%, 14 例中 1 例) では、有意ではないが浸潤癌が少なかった ($p = 0.51$)。これらの結果は、Lip-TDM の腹腔内投与が同所性膀胱癌を抑制し、悪性化を抑制する可能性を示している。

Lip-TDM の腹腔内投与が、同所性膀胱癌モデルにおいて自然免疫の全身的活性化も誘導するかどうかを調べるため、我々が確立した 16 週間の BBN 誘発膀胱癌マウスモデルにおいて、脾臓 DC およびマクロファージにおける CD80 および CD86 の発現レベルを解析した。Lip-TDM の腹腔内投与は、Lip-CON 投与と比較して、DC (CD11c+ DC) における CD80 および CD86 の発現を有意に増強した ($p = 0.0003$, $p = 0.0006$) (図 5A)。Lip-TDM による CD80 および CD86 の有意な発現増強 ($p = 0.0104$, $p = 0.0030$) は、マクロファージ (CD11b+CD11c macrophage) においても観察された。Lip-TDM 投与による自然免疫の全身的活性化の結果として膀胱に誘導された TIL サブセットを同定するため、本モデルで膀胱のデジタルサイトメトリー解析と免疫染色を行った。各実験群における免疫細胞の割合は、CIBERSORT を用いて評価した。図 5B に、各群の免疫細胞割合の平均値の比率を示す。好中球 (9.23)、形質細胞 (7.06)、活性化 NK 細胞 (5.06)、M1 マクロファージ (2.95)、活性化 DC (1.98) の比率は、他の免疫細胞 ($0 \sim 1$) に比べて顕著に高かった。次に、抗 CD4、抗 CD8、抗 NK1.1 という 3 つのマーカーを用いて、16 週齢のモデルマウスの膀胱の免疫染色を行った。免疫染色した膀胱の代表的な画像を図 5C に示す。腫瘍浸潤 CD8+ および CD4+ T 細胞の数は、Lip-CON 投与群に対して Lip-TDM 投与群で有意に増加した (図 5D)。さらに、Lip-TDM 投与群では NK 細胞の浸潤も有意に増加した。これらの結果を総合すると、同位膀胱がんに対する Lip-TDM の抗腫瘍効果は、DC、マクロファージ、好中球、NK 細胞などの自然免疫センチネルの全身的小よび局所的な活性化を通じて、獲得免疫、特にエフェクター T リンパ球の活性化によって媒介される可能性が示唆される。



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 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 70 |
| 2. 論文標題 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 2021年 |
| 3. 雑誌名 Cancer Immunology, Immunotherapy | 6. 最初と最後の頁 2529 ~ 2543 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00262-021-02870-2 | 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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 田沼光三郎 佐野啓介 志賀正宣 神鳥周也 宮崎淳 西山博之 |
| 2. 発表標題 Trehalose 6,6 -dimycolateリボソーム製剤の腹腔内投与による抗腫瘍効果の検証 |
| 3. 学会等名 泌尿器科分子細胞研究会 |
| 4. 発表年 2023年 |

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

| | | |
|--------------------------------|--------------|---------------|
| 産業財産権の名称 リボソーム、抗癌剤及び癌治療用キット | 発明者 宮崎淳 | 権利者 筑波大学 |
| 産業財産権の種類、番号 特許、7220472 | 取得年 2023年 | 国内・外国の別 国内 |

〔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 |
|-------|---|--------------------------------------|----|
| 研究分担者 | 西山 博之 (Nishiyama Hiroyuki) (20324642) | 筑波大学・医学医療系・教授 (12102) | |

6. 研究組織（つづき）

| | 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 |
|-------|--|--------------------------------------|----|
| 研究分担者 | 神鳥 周也 (Kandori Syuya) (50707825) | 筑波大学・医学医療系・講師 (12102) | |

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 |
|---------|---------|
| | |