

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 23 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26560231

研究課題名(和文) ナノ粒子によるBCG菌体成分の細胞内動態制御が及ぼす抗腫瘍増強効果

研究課題名(英文) The effect of intracellular trafficking of BCG-CWS loaded nanoparticles on anti-bladder cancer activity

研究代表者

中村 孝司 (NAKAMURA, Takashi)

北海道大学・薬学研究科(研究院)・助教

研究者番号：20604458

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：BCG菌の免疫活性化中心とされている細胞壁骨格成分(BCG-CWS)を搭載したナノ粒子を用いることで、膀胱がんに対する免疫応答を担う細胞の同定とBCG-CWS搭載脂質ナノ粒子の細胞内動態ががん免疫に及ぼす影響について調べた。その結果、膀胱がんに対する免疫応答の誘導にはBCG-CWSが膀胱がん細胞に取り込まれることが必須であることを明らかにした。さらには、CD1分子に提示される脂質抗原を搭載したナノ粒子の細胞内動態と脂質抗原効率の関係性を調べた結果、エンドソーム/ライソソームに集積する場合に最も抗原提示効率が高くなることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：We previously reported on the development of a water soluble formulation of the cell wall skeleton of BCG (BCG-CWS), a major immune active center of BCG, by encapsulating it into a nanoparticle (CWS-NP). The CWS-NP allowed us to clarify the machinery associated with the BCG mediated anti-bladder tumor effect, especially the roles of bladder cancer cells and dendritic cells (DCs) in the initial step, which remains poorly understood. We show herein that the internalization of BCG-CWS by bladder cancer cells, but not DCs, is indispensable for the induction of an antitumor effect against bladder cancer. Moreover, we investigated the effect of intracellular trafficking of lipid antigen loaded nanoparticles on CD1 antigen presentation. The CD1 antigen presentation is appeared to influence to anti-bladder cancer immune responses. Our study revealed that the accumulation of lipid antigen loaded nanoparticles in endosomes/lysosomes efficiently enhanced CD1 antigen presentation.

研究分野：薬物送達システム がん免疫

キーワード：膀胱がん BCG 脂質ナノ粒子 がん免疫療法

1. 研究開始当初の背景

BCG 生菌の膀胱内投与は、臨床で行われているがん免疫療法の中で最も強力なものであり、世界的なゴールドスタンダードとなっている。膀胱がんに対する免疫応答は通常のがん免疫とは異なり、膀胱がん細胞自体が抗原提示細胞様の機能を有していることから、抗原提示細胞を介したがん免疫誘導に加え、膀胱がん細胞を介したがん免疫誘導が関与していると考えられている。しかしながら、両者のどちらが主要なメカニズムであるか、未解決となっていた。BCG 生菌は多くの免疫活性化成分や生物活性物質を含んでいることが、分子レベルでのメカニズム解明を困難なものにしている主な原因であった。一方で、BCG 生菌の免疫活性化中心として細胞壁骨格 (BCG-CWS) が候補とされているが、巨大分子且つ難溶性という物理学的性質により、取り扱いが非常に困難であった。

2. 研究の目的

我々は、BCG-CWS を脂質ナノ粒子に搭載する独自のパッケージング技術である LEEL 法を開発し、世界に先駆けて BCG-CWS 搭載ナノ粒子 (CWS-NP) の構築に成功した。CWS-NP は非常に効率的に膀胱がん細胞や抗原提示細胞に取り込まれることから、BCG 生菌による抗膀胱がん免疫応答の誘導に寄与する細胞を同定できるのではという着想を得た。それ故、本研究では CWS-NP を用いて抗膀胱がん免疫応答の誘導に寄与する細胞を同定するとともに、細胞に取り込まれた後のナノ粒子の細胞内動態ががん免疫応答に与える影響を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) CWS-NP の調製

卵黄リン脂質 (EPC)、コレステロール (Chol)、ステアリル化オクタアルギニン (STR-R8) を含む脂質薄膜を調製し、緩衝液で水和させることでリポソームを調製した。BCG-CWS を分散させたペンタン溶液にリポソーム溶液を加え、プローブ型ソニケーターを用いて超音波処理を行い、O/W エマルジョンを形成させた。その後、エバポレーターを用いてペンタンを除去、エクストリューダーを用いた整粒を行うことで CWS-NP を調製した。

(2) マウス骨髄由来樹状細胞の調製

本研究では、抗原提示細胞としてマウス骨髄由来樹状細胞 (BMDC) を用いた。マウスの大腿骨から採取した骨髄細胞を GM-CSF 存在下で 6-7 日間培養することで、BMDC へと分化させた。

(3) CWS-NP の細胞への取り込み

血清不含 RPMI1640 培地中でマウス膀胱がん細胞 (MBT-2) 2×10^6 個に対して、BCG-CWS 換算で 0.1 mg の CWS-NP を添加し、1 時間培養した。細胞を洗浄した後、回収し CWS-NP を取り込んだ MBT-2 として使用した。

血清不含 RPMI1640 培地中で BMDC (1×10^6

個) に対して、BCG-CWS 換算で 0.1 mg の CWS-NP を添加し、30 分間培養した。細胞を洗浄した後、回収し CWS-NP を取り込んだ BMDC として使用した。

(4) MBT-2 に対する CWS-NP の直接作用評価

CWS-NP を取り込んだ MBT-2 と未処理の MBT-2 を 5 日間にわたり培養し、細胞数を計測することで CWS-NP が増殖に与える影響を評価した。

(5) 抗腫瘍活性評価

図 1 に示すように Case 1 から Case 4 までの条件で実験を行った。MBT-2 (1×10^6 個)のみを皮下に移植したマウス群を Vehicle 群とした。Case 1 は、ポジティブコントロールとして MBT-2 (1×10^6 個) と CWS-NP (BCG-CWS 換算 0.1 mg) を混合し、マウス皮下に移植した。Case 2 は、CWS-NP を取り込んだ MBT-2 (1×10^6 個) をマウス皮下に移植した。Case 3 は、MBT-2 (1×10^6 個) を皮下に移植し、同じマウスの別の皮下部位に CWS-NP (BCG-CWS 換算 0.1 mg) を投与した。Case 4 は、MBT-2 (1×10^6 個) を皮下に移植し、同じマウスの別の皮下部位に CWS-NP を取り込んだ BMDC (100 もしくは 5000 個) を投与した。CWS-NP のコントロールとして、BCG-CWS を含まないナノ粒子 (NP w/o CWS) を用いた。抗腫瘍活性は腫瘍体積を測定することで評価した。

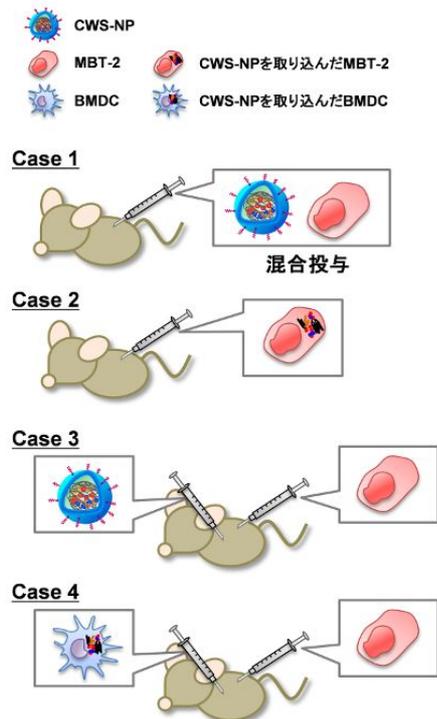


図 1

(6) 脂質抗原搭載ナノ粒子の調製

脂質抗原として CD1d 分子に提示されるガラクトシルセラミド (GC) を用いた。ナノ粒子の基本組成として、EPC、Chol、STR-R8 を含むナノ粒子 (EPC-NP) を用いた。また EPC を膜融合性脂質 (DOPE) や高安定性脂質 (DSPC) に変更した組成のナノ粒子 (DOPE-NP、

DSPC-NP)も調製した。調製法は各脂質成分と GC を含む脂質薄膜を調製し、緩衝液で水和させることで調製した。

(7) 共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) 観察

35 mm ガラスベース dish に抗原提示細胞株 (JAWSII) を 1×10^5 個播種し、蛍光ラベルした各ナノ粒子を処理した。一定時間後に LysoTracker Red を用いて、エンドソーム/ライソソームを染色し、CLSM 観察を行った。また anti-GC:CD1d 抗体を用いて、CD1d 上に提示されている GC を染色した。画像解析は Image-Pro を用いて行った。

(8) フローサイトメトリー解析

6 ウェルプレート上で JAWSII (2×10^5 個) に対して各ナノ粒子もしくは蛍光ラベルした各ナノ粒子を処理し、一定時間後にフローサイトメーターを用いてナノ粒子の細胞への取り込みと CD1d への GC 抗原提示を評価した。GC 抗原提示の検出には anti-GC:CD1d 抗体を用いた。

(9) siRNA によるプロサポシン (PSAP) のノックダウン

6 ウェルプレート上で JAWSII (2×10^5 個) に対して、PSAP に対する siRNA (80 nM) を Lipofectamine RNAiMAX を用いて導入した。さらに 2 日、4 日後に同様に siRNA 導入を行うことで PSAP をノックダウンした。ノックダウンはリアルタイム RT-PCR 法により mRNA レベルで評価した。

4. 研究成果

(1) MBT-2 に対する CWS-NP の直接作用

まず、CWS-NP による抗腫瘍活性が免疫応答を介したものであることを調べるために、MBT-2 に対する CWS-NP の直接殺細胞活性を評価した。その結果、未処理の MBT-2 と CWS-NP を取り込んだ MBT-2 細胞の細胞増殖に有意な差は認められなかったことから、CWS-NP は MBT-2 に対して直接殺細胞活性を示さないことが明らかになった (データ未提示)。

(2) 膀胱がん細胞が抗膀胱がん活性の誘導に及ぼす寄与

CWS-NP による抗膀胱がん活性に CWS-NP が膀胱がん細胞に取り込まれることが必要か否かを検証するために、Case 1 と 2 (図 1) の実験を行った。その結果、MBT-2 のみに CWS-NP を取り込ませたマウス群とポジティブコントロール群において有意な抗腫瘍活性が認められ、その効果は同程度であった (図 2)。このことは、CWS-NP が MBT-2 に取り込まれることが抗腫瘍活性誘導に必須であることを示している。

(3) 抗原提示細胞が抗膀胱がん活性の誘導に及ぼす寄与

続いて、CWS-NP による抗膀胱がん活性に CWS-NP が抗原提示細胞に取り込まれることが必要か否かを検証するために、Case 1、3、4 (図 1) の実験を行った。CWS-NP を直接皮下に投与し、皮下の抗原提示細胞に取り込ませる Case 3 の実験ではコントロール群に対

して有意な抗腫瘍活性は認められなかった (データ未提示)。さらに BMDC のみに CWS-NP を取り込ませたマウス群 (Case 4) においても抗腫瘍活性の促進効果は認められなかった (図 3)。以上のことから、CWS-NP の抗原提示細胞への取り込みは抗腫瘍活性誘導に關与しないことが示唆された。

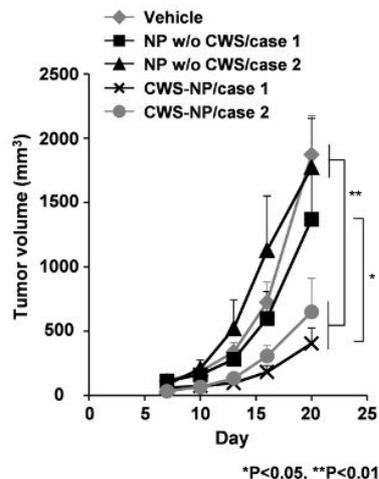


図 2

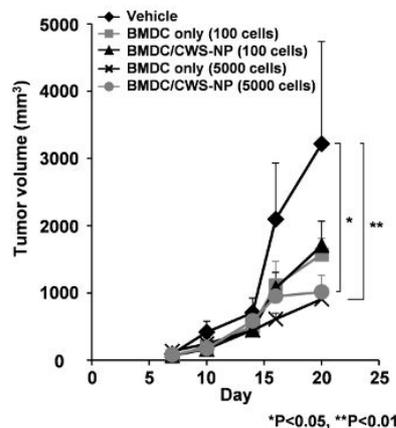


図 3

以上の成果より、BCG 生菌の抗膀胱がん免疫応答の開始には、BCG-CWS が抗原提示細胞ではなく、膀胱がん細胞に取り込まれることが必須であることが明らかとなった (発表論文 2)。

続いて、細胞に取り込まれたナノ粒子の細胞内動態と脂質抗原提示の関係を調べることで CWS-NP の抗腫瘍活性向上のための知見を得ることを試みた。BCG 生菌の抗腫瘍活性メカニズムの 1 つに脂質抗原の CD1 分子群への抗原提示が考えられている。評価系が確立されていないため、本研究では脂質抗原として CD1d に提示されるガラクトシルセラミド (GC) をモデル脂質抗原として使用した。CD1d はエンドソーム/ライソソームに局在していることから、ナノ粒子のエンドソームからの脱出とエンドソーム/ライソソームでのナノ粒子の安定性に着目し、研究を進めた。

(4) エンドソーム脱出性ナノ粒子と脂質抗原提示の関係性

まず、エンドソーム脱出性ナノ粒子 (DOPE-NP) とエンドソーム非脱出性ナノ粒子 (EPC-NP) を用いて、GC の CD1d への抗原提示を比較した。その結果、DOPE-NP を処理した細胞群の方では EPC-NP を処理した群と比較して、有意に抗原提示効率が低下した (図 4)。この結果は、GC の CD1d への抗原提示においてナノ粒子のエンドソーム脱出性は抗原提示効率の低下を引き起こすことを示している。

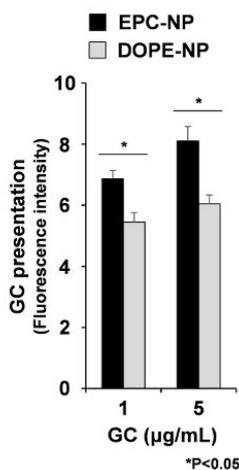


図 4

(5) エンドソーム/ライソソームにおけるナノ粒子の安定性と脂質抗原提示の関係性

次に EPC-NP と高安定性ナノ粒子 (DSPC-NP) を用いて、GC の CD1d への抗原提示を比較した。EPC-NP はエンドソーム/ライソソームにて分解されるが、DSPC-NP はエンドソーム/ライソソームにてナノ粒子構造を保持した状態で存在する (データ未提示)。両者を比較することで、エンドソーム/ライソソームにおけるナノ粒子の安定性が脂質抗原提示に及ぼす影響調べた。その結果、EPC-NP と DSPC-NP 処理による抗原提示効率に有意な違いは認められなかった (図 5)。このことから、ナノ粒子の分解に依存しない GC の CD1d への搭載機構が存在することが示唆された。

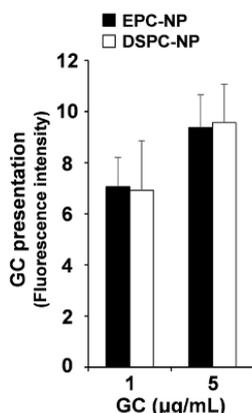


図 5

(6) GC 搭載ナノ粒子からの CD1d への GC 搭載機構

CD1 分子への脂質抗原の搭載にはサポシンというタンパク質が関与することが報告されている。そこで、siRNA を用いてサポシンの前駆体である PSAP をノックダウンすることで、GC 搭載ナノ粒子から CD1d への GC 搭載にサポシンが関与しているか否かを調べた。PSAP のノックダウン効率は約 90%であった (データ未提示)。PSAP をノックダウンした JAWSII 細胞に EPC-NP もしくは DSPC-NP を処理した場合の抗原提示効率と通常の JAWII 細胞に処理した場合の抗原提示効率を比較した。その結果、PSAP をノックダウンした JAWSII 細胞では EPC-NP 及び DSPC-NP の抗原提示はバックグラウンドレベルであった (図 6)。このことから、EPC-NP と DSPC-NP からの GC の CD1d への搭載にはサポシンが大きく関与していることが明らかになった。

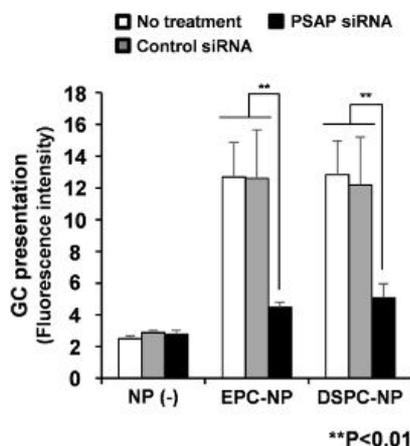


図 6

以上の結果より、脂質抗原搭載ナノ粒子からの CD1d 分子への脂質抗原提示を促進するためには、エンドソーム/ライソソームに脂質抗原搭載ナノ粒子を集積させることが重要であり、ナノ粒子自体の安定性は関与しないことが示された (発表論文 1)。

本知見は、CWS-NP の細胞内動態制御戦略に重要なものであり、CWS-NP をエンドソーム/ライソソームに集積させることで、抗腫瘍活性の増強に繋がることが期待される。

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 2 件)

1. Nakamura T, Kuroi M, Harashima H Influence of Endosomal Escape and Degradation of β -Galactosylceramide Loaded Liposomes on CD1d Antigen Presentation. Mol. Pharm. 12: 2791-2799 (2015) 査読有 doi: 10.1021/mp500704e
2. Nakamura T, Fukiage M, Suzuki Y, Yano

I, Miyazaki J, Nishiyama H, Akaza H, Harashima H Mechanism responsible for the antitumor effect of BCG-CWS using the LEEL method in a mouse bladder cancer model. J. Control. Release 196: 161-167 (2014) 査読有 doi: 10.1016/j.jconrel.2014.10.007.

(2)研究分担者
無し

(3)連携研究者
無し

〔学会発表〕(計 3件)

1. 中村孝司 がん免疫療法を促進する Drug Delivery System の開発 日本薬学会北海道支部第 142 会例会 2015 年 5 月 16-17 日 札幌コンベンションセンター(北海道・札幌)
2. 中村孝司、吹上雅文、鈴木嘉晃、矢野郁也、宮崎淳、西山博之、赤座英之、中山俊憲、原島秀吉 BCG-CWS 搭載ナノ粒子を用いた膀胱がん免疫療法剤の開発 日本薬学会第 135 年会 2015 年 3 月 25-28 日 神戸学院大学・兵庫医療大学(兵庫・神戸)
3. 中村孝司、吹上雅文、鈴木嘉晃、矢野郁也、宮崎淳、西山博之、赤座英之、原島秀吉 BCG-CWS 搭載ナノ粒子の抗膀胱がん作用機序 第 7 回 BCG 注入療法研究会 2014 年 11 月 21 日 如水会館(東京都千代田区)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

<http://www.pharm.hokudai.ac.jp/yakusetu/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

中村 孝司 (NAKAMURA, Takashi)
北海道大学・大学院薬学研究院・助教
研究者番号：20604458