

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 4 月 17 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2014～2016

課題番号：26713002

研究課題名(和文)「ヒトの免疫学」からアプローチする抗膀胱癌免疫療法ナノメディシンの開発

研究課題名(英文) Development of nano medicine for anti-bladder cancer based on human immunology

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) 18,300,000円

研究成果の概要(和文)：BCG生菌の抗膀胱がん作用を模倣したナノ粒子の構築に関する研究を行った。基盤技術として、膀胱内での凝集を抑制するナノ粒子設計理論、世界トップクラスのsiRNA導入技術を開発するとともに、BCG成分の膀胱がん細胞への内在化が抗腫瘍活性に及ぼす影響を明らかにした。また、BCG生菌とBCG成分搭載ナノ粒子のがん免疫応答の比較を行い、有効成分の抽出とNano-BCGの設計・構築を進めている。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to develop a nanoparticle system achieving live BCG mediated antitumor effects against bladder cancer. We successfully found that the modification of PEGylated lipid into nanoparticles efficiently inhibited the aggregation of nanoparticle in human urine. We also developed the novel nanoparticle for efficient siRNA delivery to immune cells. The internalization of BCG cell wall skeleton in bladder cancer cells is essential for induction of antitumor effect. Moreover, we found key cytokines associated with antitumor effect of BCG by analyses with microarray and qRT-PCR. We currently progress selection of BCG components and development of Nano-BCG.

研究分野：薬物送達学 腫瘍免疫学

キーワード：膀胱がん BCG ナノ粒子 がん免疫療法 ヒト免疫学

1. 研究開始当初の背景

がん免疫療法は、がん治療の第四の柱として期待されている。免疫系の複雑さ故、がんワクチンの開発は様々なアプローチで行われているが、それらの多くは、マウスを用いた研究結果である。しかしながら、ヒトとマウスの免疫系は全く異なっているため、「マウスの免疫学」を基にしたアプローチはリスクを伴う。事実、がんワクチン開発の筆頭であったペプチドワクチンのフェーズⅢ臨床試験の失敗が、近年立て続けに報告されており、ヒトとマウスの違いが大きな障壁になっている。

2. 研究の目的

膀胱癌に対する BCG 菌膀胱内注入療法は、1980 年代から行われている最も強力且つ成功したがん免疫療法である。即ち、BCG 菌は「ヒトの免疫学」に適したがん免疫を誘導できることを示している。それ故、BCG 菌の膀胱癌に対するがん免疫を模倣することで、「ヒトの免疫学」からアプローチするがん免疫療法剤の開発が可能であると考えられる。本研究では、ナノ粒子化技術と網羅的遺伝子発現解析を融合させることで、【膀胱癌細胞と免疫担当細胞】、【ヒトとマウス】に【BCG 菌体成分】を加えた多次元解析を行い、BCG 菌のがん免疫誘導の分子メカニズムに基づいたヒトがん免疫活性化ユニットを同定し、ナノ粒子へと再構築することで、“人工 BCG”とも言える Nano-BCG を創製する。基盤となるナノ粒子として、申請者が開発した弱毒化ウシ型結核菌 (BCG) の細胞壁骨格成分 (BCG-CWS) を搭載したナノ粒子 (CWS-NP) (Nakamura T, et al., JCR 176: 44-53, 2014) を用いる。

3. 研究の方法

(1) CWS-NP の抗膀胱がん作用の開始メカニズムの解明

① CWS-NP の調製

リン脂質 (EPC もしくは POPC)、コレステロール (Chol)、ステアリル化オクタアルギニン (STR-R8) もしくはカチオン性脂質 (DOTAP) 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 CWS-NP 内在化細胞の調製

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 培地中でマウス骨髄細胞由来樹状細胞 (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。

③ 抗腫瘍活性評価

以下の Case 1 から Case 4 までの条件で実験を行った。マウスは C3H/HeN (雌、8-10 週令) を用いた。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。

(2) 免疫細胞への siRNA 導入技術の開発

① siRNA 搭載脂質ナノ粒子 (LNP) の調製

アルコール希釈法を用いて調製した。当研究室で合成したカチオン性脂質 YSK12-C4、Chol、PEG 化脂質 (PEG2000-DMG) をモル比で 85/15/1 となるように 90% t-BuOH 溶液に溶解させ、siRNA 水溶液と混合することで LNP を形成させた (YSK12-LNP)。その後、限外濾過によりアルコールを除去し、PBS に置換した。YSK12-LNP は、粒子径: 180 ± 6 nm、PDI: 0.072 ± 0.024 、ゼータ電位: 5.8 ± 0.6 mV、siRNA 封入率: $94.2 \pm 0.8\%$ であった。

② 免疫細胞へのトランスフェクション

Opti-MEM に懸濁した細胞 (6×10^5 個) を 12 ウェルプレートに播種し、YSK12-LNP もしくは Lipofectamine RNAiMAX (RNAiMAX) を添加した。2 時間培養後、培養用培地を添加し、さらに 22 時間の培養を行った。

③ 遺伝子ノックダウン評価

mRNA レベルでの評価では、細胞を回収し、RNeasy mini kit を用いて RNA を抽出した。逆転写後に qRT-PCR により mRNA 発現を定量した。タンパク質の発現量はウエスタンブロッティング法により定量した。

(3) マウス膀胱がん同所移植モデルの構築

① MB49 同所移植モデルの作成

麻酔下で C57BL/6 (雌、7-8 週令) の膀胱内に poly-L-lysine (PLL) 水溶液と注入し、30 分間保持した。PLL 水溶液を除去後、マウス膀胱がん細胞 MB49 (2.5×10^5 個) を注入し、90 分間保持した。

② 抗腫瘍活性評価

MB49 (7×10^5 個) に BCG-CWS 換算で 0.25 mg の CWS-NP を取り込ませた。麻酔下で C57BL/6 (雌、7-8 週令) の膀胱内に poly-L-lysine 水溶液と注入し、30 分間保持した。

poly-L-lysine 水溶液を除去後、CWS-NP を取り込ませた MB49 (2.5×10^5 個) を注入し、90 分間保持した。10 日後に膀胱を回収し、腫瘍体積と腫瘍重量を測定した。

(4) CWS-NP の安定性向上

① カチオン性リポソームの調製

単純水和法にて調製した。モル比で DOTAP/Chol/POPC = 30/30/40 となるようにクロロホルムに溶解させた脂質をガラス試験管に添加し、2 モル%もしくは 5 モル%の PEG 化脂質 (DSG-PEG2k, DSPE-PEG2k, Chol-PEG2k) を必要に応じて加えた。脂質薄膜を調製後、5 mM HEPES (pH 7.4) を添加し、超音波処理によりリポソームを調製した。

② 尿中での安定性評価

ヒト尿を遠心分離 (15000 rpm, 15 分間) し、その上清を安定性評価に使用した。各リポソーム溶液をヒト尿で 10 倍希釈し、37°C で 30 分間インキュベーションした。その後、660 nm の吸光度変化を溶液の濁度変化の指標とし、尿中でのリポソームの凝集を評価した。

③ MB49 への取込み評価

0.01 モル%の DiD を含む各リポソームを調製し、ヒト尿で 10 倍希釈、37°C で 30 分間インキュベーションした。6 ウェルプレートに播種した MB49 (7×10^5 個) に上記のインキュベーション溶液と培地を添加し、1 時間培養した。細胞を回収し、フローサイトメトリーにより細胞への取込みを評価した。

④ CWS-NP の最適化

POPC, DOTAP, Chol, DSPE-PEG2k を用いて上述のように CWS-NP を調製した。さらに遠心分離により、BCG-CWS を含まないナノ粒子を除去した。

(5) CWS-NP と BCG 生菌のがん免疫プロファイルの比較

6 ウェルプレートにマウス膀胱がん細胞 (MBT-2, MB49) もしくはマウス脾臓細胞を播種し、血清不含培地中にて CWS-NP もしくは BCG 生菌 (イムノブラダー®) を作用させ、一定時間培養後、細胞を回収した。RNeasy mini kit により RNA を抽出後、マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を行った。また、抽出後の RNA を逆転写し、時間ごとのサイトカインの mRNA レベルを qRT-PCR により評価した。

4. 研究成果

(1) CWS-NP の抗膀胱がん作用の開始機構の解明

ポジティブコントロール群 (Case 1) と MBT-2 のみに CWS-NP を取り込ませたマウス群 (Case 2) 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 1)。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。一方で、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。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。以上のことから、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 (雑誌論文 7)。

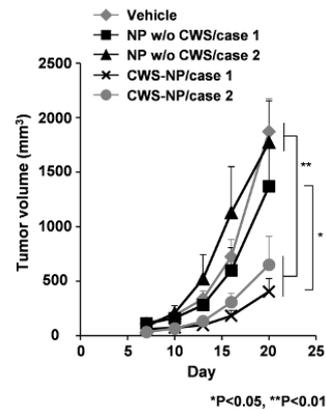


図 1

(2) 免疫細胞への siRNA 導入技術の開発

メカニズム解析のための手法の一つとして、免疫細胞の標的遺伝子をノックダウンするための技術開発を行った。新規合成したカチオン性脂質 YSK12-C4 を含む YSK12-LNP は、BMDC への siRNA 導入において、1.5 nM という非常に低用量の ED₅₀ を実現し、市販試薬で最も強力な RNAiMAX の ED₅₀ 25 nM を大きく上回った。また、ヒト免疫細胞株である Jurkat (T 細胞)、THP-1 (単球)、KG-1 (マクロファージ)、NK92 (NK 細胞) に対する siRNA 導入においても、RNAiMAX では 0% から最大で 60% のノックダウン効率であったのに対し、YSK12-LNP は全ての細胞で 70~90% のノックダウンを実現した (図 2)。またタンパク質レベルでのノックダウンも認められた。

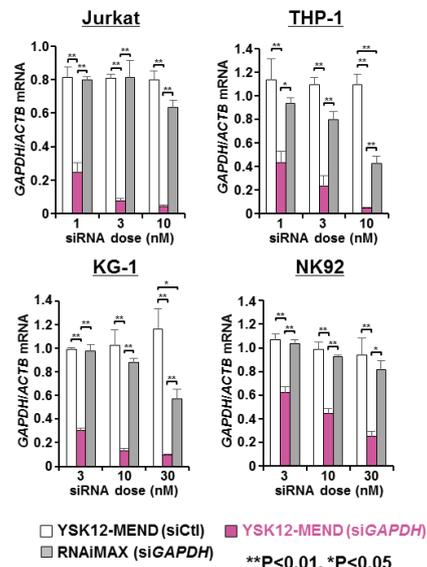


図 2

以上のことから、免疫細胞に効率的に siRNA を導入し、標的遺伝子の発現を抑制可能な技術として YSK12-LNP の開発に成功した (雑誌論文 3、6)。

(3) マウス膀胱がん同所移植モデルの構築

膀胱がんに対する抗腫瘍活性の評価系を確立することを目的とし、MB49 を用いた膀胱がん同所移植モデルの構築を行った。PLL 溶液の作用時間、MB49 の細胞数と保持時間を検討することで、同所移植モデルを構築することに成功した。続いて、CWS-NP の膀胱がん同所移植モデルにおける抗腫瘍活性を評価した。その結果、未処理の MB49 を移植した群と比較して、CWS-NP を取り込ませた MB49 を移植した群では腫瘍体積と腫瘍重量の有意な減少が認められた。このことから、膀胱がん同所移植モデルにおいても CWS-NP の膀胱がん細胞の内在化が抗腫瘍活性の誘導に重要であることが示唆された。

(4) CWS-NP の安定性向上

Nano-BCG の構築を目指すにあたり、尿中 (膀胱内) でのナノ粒子の安定性の向上に取り組んだ。まずは、一般的なカチオン性ナノ粒子として DOTAP ベースのリポソームを用いてヒト尿中での安定性を評価した。ヒト尿中でカチオン性リポソームをインキュベーションした結果、凝集が認められた。一方で、PEG 化脂質を導入することで、尿中での凝集は大幅に改善され、その効果は PEG 脂質の脂質足場と修飾密度によって変化することが明らかになった (図 3)。さらに、PEG 化脂質導入による尿中での凝集抑制効果は、効率的な MBT-2 への取込みを実現した。以上のことから、PEG 化脂質を導入することで、尿中におけるナノ粒子の安定性を大きく向上できることが示唆された (雑誌論文 1)。

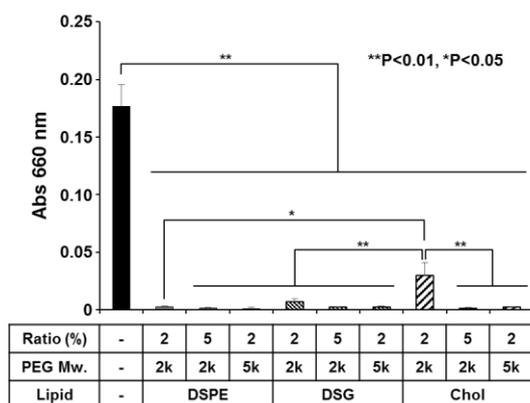


図 3

この成果をもとに、CWS-NP に PEG 化脂質を導入し、尿中での安定性向上を試みた。DSPE-PEG2k を導入することで、ヒト尿中での凝集を大幅に抑制することに成功した。さらに興味深いことに、PEG 化脂質の導入は、マ

ウス膀胱がん細胞への取込み効率の上昇と均一性を向上させた。改良型 CWS-NP をマウス膀胱がん同所移植モデルに膀胱内注入した結果、膀胱がん細胞に取り込まれている様子が観察されたことから、CWS-NP の安定性を向上させることに成功したと言える。

(5) CWS-NP と BCG 生菌のがん免疫プロファイルの比較

CWS-NP を作用させた MBT-2 のマイクロアレイ解析の結果、CWS-NP を作用させることで MBT-2 のサイトカイン関連遺伝子の発現が上昇することが明らかになった。この発現変動は qRT-PCR においても確認された。さらに、BCG 生菌と CWS-NP の膀胱がん細胞および脾臓細胞におけるサイトカイン産生を比較した結果、一部のサイトカインはマイクロアレイ解析の結果を一致した。現在、これらの解析結果に基づき、BCG 生菌のがん免疫誘導に関与する成分を同定し、Nano-BCG の設計・構築を行っている。

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 7 件)

1. Nakamura T, Noma Y, Sakurai Y, Harashima H. Modifying cationic liposomes with cholesteryl-PEG prevents their aggregation in human urine and enhances cellular uptake by bladder cancer cells. *Biol Pharm Bull* 40: 234-237 (2017). 査読有 doi: 10.1248/bpb.b16-00770.
2. Sato Y, Sakurai Y, Kajimoto K, Nakamura T, Yamada Y, Akita H, Harashima H. Innovative technologies in Nanomedicines: from passive targeting to active targeting/from controlled pharmacokinetics to controlled intracellular pharmacokinetics. *Macromol Biosci* 17: 1600179 (2017). 査読有 doi: 10.1002/mabi.201600179.
3. Nakamura T, Kuroi M, Fujiwara Y, Warashina S, Sato Y, Harashima H. Small-sized, stable lipid nanoparticle for the efficient delivery of siRNA to human immune cell lines. *Sci Rep* 6: 37849 (2016). 査読有 doi: 10.1038/srep37849.
4. Sato Y, Nakamura T, Yamada Y, Harashima H. Development of a multifunctional envelop-type nano device and its application to nanomedicine. *J Control Release* 244: 194-204 (2016). 査読有 doi: 10.1016/j.jconrel.2016.06.042.
5. Nakamura T. Development of a Drug

Delivery System for Cancer Immunotherapy. Yakugaku Zasshi 136: 1477-1484 (2016). 査読有 doi: 10.1248/yakushi.16-00187.

6. Warashina S, Nakamura T, Sato Y, Fujiwara Y, Hyodo M, Hatakeyama H, Harashima H. A lipid nanoparticle for the efficient delivery of siRNA to dendritic cells. J Control Release 225: 183-191 (2016). 査読有 doi:10.1016/j.jconrel.2016.01.042.
7. 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.

〔学会発表〕(計 7件)

1. 中村孝司、黒井萌花、藤原優希、藁科翔太、佐藤悠介、原島秀吉 脂質ナノ粒子を用いたヒト免疫細胞株への効率的 siRNA 導入 第32回日本 DDS 学会学術集会 2016年6月30~7月1日「グランシップ(静岡県・静岡市)」
2. 中村孝司 ナノテクノロジーで制御するがんアジュバントシステムの創製 日本薬学会第31年会 奨励賞受賞講演 2016年5月19日-21日「長良川国際会議場・岐阜都ホテル」(岐阜県・岐阜市)
3. 中村孝司、藁科翔太、佐藤悠介、兵藤守、畠山浩人、原島秀吉 樹状細胞への効率的 siRNA デリバリーシステムの開発 日本薬学会第30年会 2015年5月21~23日「長崎ブリックホール・長崎新聞文化ホール(長崎県・長崎市)」
4. 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回例会 奨励賞受賞講演 2015年5月16日「札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)」
5. 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日~28日「神戸学院大学・兵庫医療大学(兵庫県・神戸市)」
6. 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)」
7. 藁科翔太、中村孝司、佐藤悠介、兵藤守、畠山浩人、原島秀吉 免疫応答の増強を

可能とするエンドソーム脱出促進型 siRNA ナノキャリアの開発 第36回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム 2014年11月20日~21日「徳島大学(徳島県・徳島市)」

〔図書〕(計 4件)

1. 中村孝司、原島秀吉 「多機能性エンベロープ型ナノ構造体を用いた樹状細胞への siRNA 送達と細胞療法への展開」化学工業 vol. 67 No. 7: 477-482 (2016) 化学工業社
2. 秋田英万、佐藤悠介、中村孝司、原島秀吉 「多機能性エンベロープ型ナノ構造体(MEND)を基盤とした DDS」細胞工学 vol. 34 No. 10: 956-961 (2015) 秀潤社
3. 中村孝司、山田勇磨、秋田英万、原島秀吉 第6章 遺伝子医療・核酸医薬品と DDS 「多機能性エンベロープ型ナノ構造体の創製とナノ医療への応用」 DDS の研究 30年 PHARM TECH JAPAN 臨時増刊号 vol. 30 No. 2: 170-176 (2015) じほう
4. 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 搭載ナノ粒子の膀胱癌作用機序」医学図書出版 泌尿器外科 vol. 28 No. 3: 312-314 (2015) 医学図書出版株式会社

〔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〕

ホームページ情報
<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

(2) 研究分担者
無し

(3) 連携研究者
無し

(4) 研究協力者
無し