

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18H02934

研究課題名(和文) 抗酸菌表層糖脂質をリード化合物とする新規癌免疫治療法の開発

研究課題名(英文) Development of antitumor immunological agent using mycobacterial surface glycolipids as lead compounds.

研究代表者

西山 博之(NISHIYAMA, Hiroyuki)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：20324642

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：筋層非浸潤膀胱癌には術後の再発予防としてMycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin (BCG) の膀胱内注入療法が広く用いられている。BCG菌体の最大の免疫賦活物質は、抗酸菌に特有な長鎖脂肪酸であるミコール(MA)酸より構成されたtrehalose-6,6'-dimycolate(TDM)である。我々は疎水性の強いTDMを親水性リポソーム化することで製剤化し抗腫瘍活性を検証した。また、TDMを構成するMAのサブクラスの違いによるTDMリポソームの抗腫瘍活性の変化を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

TDMリポソーム製剤を最適化し、抗腫瘍活性が最大となるように調整することで、新しい癌免疫療法に向けたシーズとなる。TDMリポソームは非生菌製剤であることから、BCG菌のような尿路感染症や、全身播種性感染といった重篤な副作用が起こらない。また、生菌製剤のようなバイオハザード管理の必要もなく、通常の薬剤と同様に管理、供給運搬が可能である。感染の可能性がないため、静脈内投与も含めたあらゆる投与方法が可能である。したがって、TDMリポソーム製剤は安全性と有効性の点で優れた治療薬開発へつなげる見込みが高い。本研究は最も臨床的有用性の高い、安定した毒性の低い安価な癌免疫治療薬として期待される。

研究成果の概要(英文)：Intravesical infusion therapy of Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin (BCG) is widely used for the prevention of postoperative recurrence of non-muscle invasive bladder cancer. The most important immunostimulant of BCG bacteria is trehalose-6,6'-dimycolate (TDM), which is composed of mycolic (MA) acid, which is a long-chain fatty acid unique to acid fast bacteria. Since TDM has strong hydrophobicity, we made it into a hydrophilic liposome and we verified its anti-tumour activity. We also revealed changes in the anti-tumour activity of TDM liposome due to the different subclasses of MAs that compose TDM.

研究分野：泌尿器

キーワード：膀胱癌 BCG ミコール酸 TDM リポソーム

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)膀胱内注入療法が標準治療として広く用いられている。再発率を 30~40%程度減少させる非常に有効な免疫治療ではあるが、BCG の生菌注入は全身感染症のリスクなども存在する。そのため BCG は、泌尿器科領域以外においては悪性黒色腫に対する局所注射など、限られた範囲でしか抗腫瘍剤として用いられていない。

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。MA は  $\alpha$  位に分枝鎖を、 $\beta$  位に水酸基を有する、疎水性の極めて強い超高級分枝脂肪酸である。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)。

次いで我々は 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)に着目した。トレハロースを介して MA が 2 つ結合した構造をもつ 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。近年になって TDM は骨髄球などに発現する macrophage inducible C-type lectin (Mincle)という受容体に認識され、サイトカイン分泌を促す強力な immunomodulator として関心が持たれている。

当研究室ではすでに抗酸菌の菌体から MA および TDM を抽出する技術は確立しているが、TDM は MA 同様強い疎水性を示すため、生体投与には drug delivery system による親水化が必要であった。我々は単離した TDM からリポソーム製剤を作成して抗腫瘍効果を検証し、BCG の代替となる新規の抗腫瘍剤の開発を目指す。

## 2. 研究の目的

- (1) BCG コノート株から抽出した天然 TDM を用いた TDM リポソームを作成し、その抗腫瘍効果の検証を行う。
- (2) 天然 TDM リポソームの病原性について評価を行う。
- (3) 天然 TDM リポソームの抗腫瘍免疫のメカニズムについて解明する。
- (4) 人工合成 TDM を用いた TDM リポソームを作成し、その抗腫瘍効果の検証を行う。

## 3. 研究の方法

抽出した TDM を親水性リポソーム化する。

MA のリポソーム化の方法を我々はすでに確立している。同様の方法を用いて TDM のリポソーム化を図る。

作成したリポソームの測定を行う。

作成したリポソームを粒子径や電位の測定、電子顕微鏡で構造を観察する。リポソーム製剤規格の物性値として Z-Ave、Pk1、PDI、 $\zeta$  電位のほか、膜流動性の指標として相転移温度を測定する(測定は BCG 研究所に依頼する)。最終的に作成したリポソームに MA が包埋されているか電子顕微鏡で検証する。

TDM リポソームの直接細胞障害性を評価する。

WST-8 法を用いて、TDM リポソームの腫瘍細胞に対する直接障害性を評価する。96 ウェルマイクロプレートに C57BL/6 マウス由来の MB49 膀胱癌細胞株を  $1 \times 10^3$  cells ごとに各ウェルに播種し一晩培養を行う。その後 TDM リポソームを 50 $\mu$ g/ml になるよう培地に添加し、24 時間後、48 時間後の細胞の生存率を cell counting kit-8 を使用して評価する。

TDM リポソームの病原性・有害事象を評価する。

TDM リポソームの病原性・有害事象を評価するために、腹腔内注射もしくは静脈内注射でのマウスの体重変動および肺の肉芽腫形成を評価する。TDM リポソーム 100 $\mu$ l(TDM40 $\mu$ g 相当)と TDM w/o/w エマルジョン 100 $\mu$ l(TDM40 $\mu$ g 相当)をマウスに 1 日目、8 日目、10 日目に投与し、TDM 投与後 14 日目に肺を摘出し肉芽腫形成を評価する。肉芽腫の数は、100 倍の視野で、マウスあたり 3 枚の無作為な顕微鏡切片の焦点性単核細胞浸潤を数えることによって決定する。また、期間中のマウス体重の経時的変化を計測する。

マウス腫瘍皮下接種モデルでの抗腫瘍効果を検証する。

作成したTDMリポソームに対して、マウス皮下接種モデルを用いて抗腫瘍活性の検証を行う。MB49 膀胱癌細胞株、MC38 大腸癌細胞株、B16F10 メラノーマ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 3 時間後、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) を追加接種する。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。

作成した TDM リポソームの免疫誘導メカニズムを検証する。

フローサイトメトリー(FACS)を用いて、マウス皮下腫瘍の所属リンパ節中リンパ球および腫瘍局所の浸潤リンパ球(TILs)の解析を行い、TDM リポソーム投与による免疫細胞の活性を評価した。また、TDM 受容体である Mincle をノックアウトした Mincle<sup>-/-</sup>マウスを用いて皮下腫瘍移植モデルでの抗腫瘍評価および FACS を行い、TDM の抗腫瘍効果における Mincle からの刺激パスウェイの必要性を検証する。

MA サブクラスでの TDM リポソームの抗腫瘍活性変化について検証する。

イギリス Diagnostig 社の協力により MA サブクラスごとに人工合成した TDM をリポソーム化し、抗腫瘍効果を MB49 膀胱癌細胞株のマウス腫瘍皮下接種モデルで検証する。

#### 4. 研究成果

抽出した 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 コンノート株から TDM を単離した。TDM は疎水性のため投与方法に工夫の必要があり、リポソーム化し親水性にする必要がある。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 TDM リポソーム(Lip-TDM)を作成することができた。また比較実験用に含有物のない空のリポソーム(Lip-Con)を作成した。

作成したリポソームの測定を行う。

作成したリポソームを計測すると、Lip-TDM は正の電荷をもち、150nm 前後の一定の粒子径を保っていることが確認できた。(図 1)

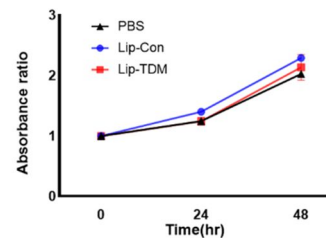
図1：リポソームの粒子径、径の分布、Z電位

	Diameter (nm)	Polydispersity index (Pdi)	Z potential (mV)
Lip-Con	106	0.144	18.4
Lip-TDM	157.2	0.225	17.9

TDM リポソームの直接細胞障害性を評価する。

作成した Lip-TDM 及び Lip-Con は培地に添加して MB49 腫瘍細胞を培養し WST-8 法を用いて生細胞数を計測した。結果、リポソーム製剤は MB49 腫瘍細胞の増殖能の影響を与えることはなかった(図 2)。これによりリポソーム製剤は腫瘍細胞に対して直接的な細胞障害性を持たないことが明らかになった。

図2：リポソーム添加した培地での腫瘍細胞の増殖曲線



TDM リポソームの病原性・有害事象を評価する

Lip-TDM の病原性について評価を行うため、抗酸菌感染症に特徴的な症状である体重減少や肺での肉芽腫形成についてマウスで評価を行った。TDM の病原性については、過去に w/o/w エマルジョン化した TDM をマウスに投与したことで、肺の肉芽腫形成や体重減少を来した報告がなされている。我々はまず等量の TDM を含有した Lip-TDM と w/o/w TDM を腹腔内注射し、マウスの体重変動を計測した。その結果、Lip-TDM 投与群では w/o/w TDM 投与群と異なり、体重減少が認められなかった(図 3)。また、マウスでの腹腔内注射モデルでは肺の肉芽腫形成を認めなかったため静脈内注射モデルに切り替えて肉芽腫形成能を評価したところ、Lip-TDM 投与群では w/o/w TDM 投与群に比べて肺の肉芽腫形成が著明に抑制されていた(図 4)。以上の結果から、TDM のリポソーム化は従来の w/o/w エマルジョン化に比べて病原性を減弱させ、有害事象の少ない優れた投与方法であることが明らかになった。

図3：TDM腹腔内投与によるマウスの体重変動

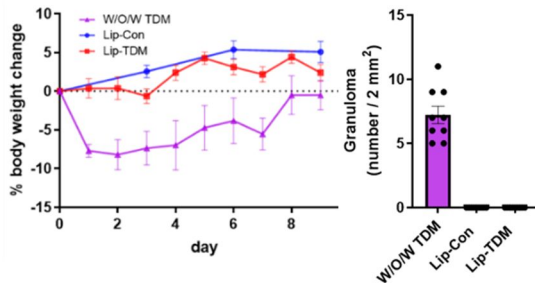
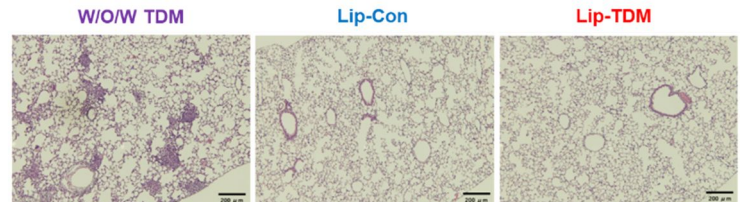


図4：TDM静脈内投与による肺の肉芽腫形成

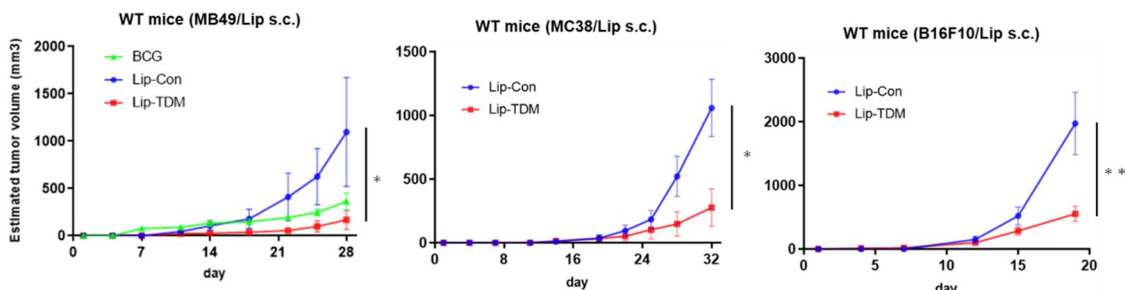


マウス腫瘍皮下接種モデルでの抗腫瘍効果を検証する。

MB49(膀胱癌)、MC38(大腸癌)、B16F10(メラノーマ)細胞株の皮下接種モデルでは、Lip-TDM 投与群では Lip-Con 投与群に比べて優位に皮下接種腫瘍の発育が抑制された(図 5)。また、MB49 膀胱癌細胞株においては BCG 菌の腫瘍局所投与と同等の抗腫瘍効果が確認された。以上の結果から TDM リポソーム製剤は膀胱癌のみならず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。

図5：マウス皮下腫瘍接種モデルでのTDMリポソームの抗腫瘍効果



作成した TDM リポソームの免疫誘導メカニズムを検証する。

マウス腫瘍皮下接種モデルの腫瘍所属リンパ節および腫瘍からリンパ節を分離し、FACS で免疫細胞の活性について評価を行った。その結果 Lip-TDM リポソーム投与群では Lip-Con 投与群に比べ、樹状細胞および CD8 陽性 T 細胞の有意な活性化が認められた(図 6)。同様の実験を Mincle<sup>-/-</sup> マウスで行ったところ、樹状細胞の活性化が消失することが確認された。また、Mincle<sup>-/-</sup>を用いたマウス腫瘍皮下接種モデルでは Lip-TDM の抗腫瘍効果自体が確認できなかった(図 7)。以上の実験結果から、Lip-TDM は Mincle 依存的に樹状細胞の活性化を誘導し、CD8 陽性 T 細胞を活性化させることで抗腫瘍効果を示しているという免疫学的機序が示唆された。

図6：Lip-TDMでの免疫細胞の活性化

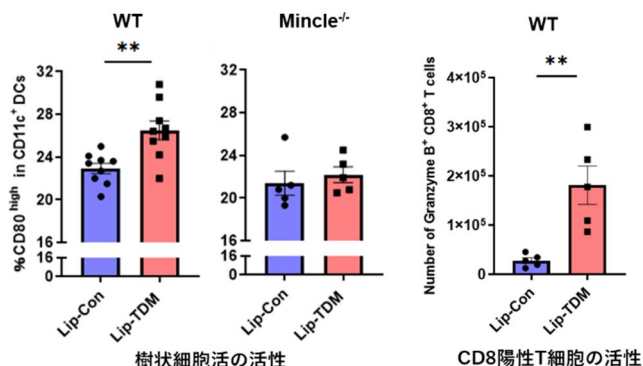
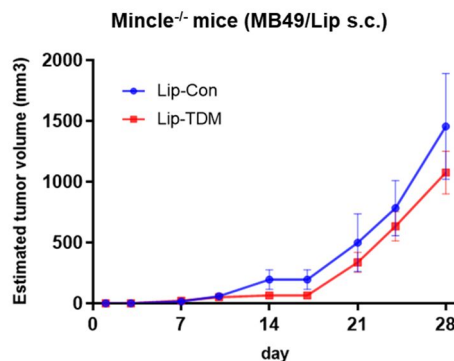


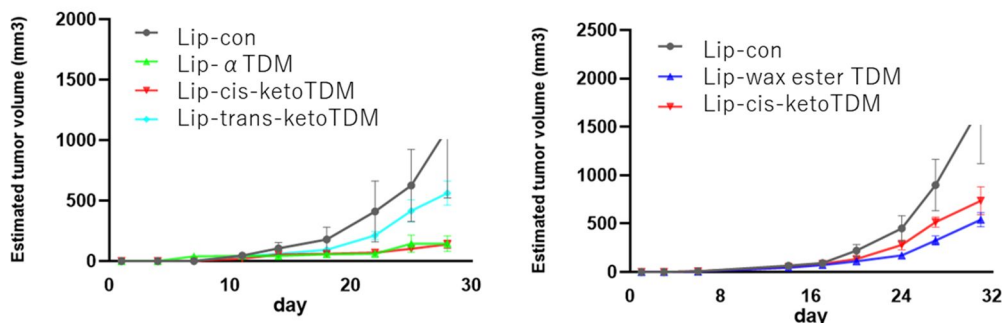
図7：Mincle<sup>-/-</sup>マウスでの抗腫瘍効果の消失



MA サブクラスでの TDM リポソームの抗腫瘍活性変化について検証する。

TDM を構成する MA は  $\alpha$ 、cis-keto、trans-keto、wax-ester など極性の異なるサブクラス成分から成り、各サブクラスによって MA の活性が異なることが知られている。また、我々は過去の研究で MA をマウスに投与するとサブクラス間で体重減少や抗腫瘍活性に差があることを明らかにしているが、TDM もそれを構成する MA のサブクラスにより抗腫瘍活性が異なることが予想された。MA サブクラスごとに人工合成した TDM でリポソーム製剤を作成し MB49 膀胱癌細胞株を用いたマウス腫瘍皮下接種モデルでの抗腫瘍効果を検証したところ、cis-keto、wax-ester MA から構成された TDM でより強い抗腫瘍効果が認められた(図 8)。今後他の癌細胞株での追加実験などが必要であるが、TDM を構成する MA のサブタイプを変化させることで、より抗腫瘍効果の強い Lip-TDM の開発につながる可能性が期待できる。

図8 MAサブクラスによるTDMリポソームの抗腫瘍効果の違い



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Shiga M, Miyazaki J, Tanuma K, Nagumo Y, Yoshino T, Kandori S, Negoro H, Kojima T, Tanaka R, Okiyama N, Fujisawa Y, Watanabe M, Yamasaki S, Kiyohara H, Watanabe M, Sato TA, Tahara H, Nishiyama H, Yano I.	4. 巻 -
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 <sup>+</sup> T cells.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Immunol Immunother.	6. 最初と最後の頁 -
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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Miyazaki J, Onozawa M, Takahashi S, Maekawa Y, Yasuda M, Wada K, Maeda Y, Masaki T, Yamaguchi A, Suzuki M, Sakai Y, Kimura T, Takai M, Seike K, Hashimoto T, Yamamoto S.	4. 巻 27;19(1)
2. 論文標題 The resonance(R) metallic ureteral stent in the treatment of malignant ureteral obstruction: a prospective observational study.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BMC Urol.	6. 最初と最後の頁 137
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12894-019-0569-y.	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 -

1. 著者名 Yoshino T, Miyazaki J, Kojima T, Kandori S, Shiga M, Kawahara T, Kimura T, Naka T, Kiyohara H, Watanabe M, Yamasaki S, Akaza H, Yano I, Nishiyama H.	4. 巻 1
2. 論文標題 Cationized liposomal keto-mycolic acids isolated from Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin induce antitumor immunity in a syngeneic murine bladder cancer model.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLoS One.	6. 最初と最後の頁 e0209196
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0209196.	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 志賀正宣、宮崎淳、西山博之、矢野郁也
2. 発表標題 The liposome of trehalose dimycolate from M.bovis BCG induce antitumor immunity via dendritic cells and CD8+ T cells
3. 学会等名 日本癌学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takayuki Yoshino, Jun Miyazaki, Takahiro Kojima, Shuya Kandori, Hideyuki Akaza, Ikuya Yano, Hiroyuki Nishiyama
2. 発表標題 Antitumor effect of cationic liposome incorporating keto-mycolic acid from Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin in mouse model.
3. 学会等名 ASCO-GU (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 非結核性抗酸菌感染症診断用キット、リポソーム	発明者 西山博之、志賀正宣、渡邊真広、宮崎淳、矢野郁也	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2019-047750	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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	宮崎 淳 (Miyazaki Jun) (10550246)	国際医療福祉大学・医学部・主任教授 (32206)	
研究分担者	神鳥 周也 (KANDORI Shuya) (50707825)	筑波大学・医学医療系・講師 (12102)	
研究分担者	小島 崇宏 (KOJIMA Takahiro) (40626892)	筑波大学・医学医療系・准教授 (12102)	
研究分担者	河合 弘二 (KAWAI Koji) (90272195)	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			
英国	Diagnostig 社			