

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2023

課題番号：19K09702

研究課題名(和文) NAD+ (ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド) による新規癌免疫療法の研究開発

研究課題名(英文) Studies on a novel immunotherapy for bladder cancer by NAD+

研究代表者

上原 博史 (Uehara, Hirofumi)

大阪医科薬科大学・医学部・准教授

研究者番号：20822555

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：膀胱癌は、再発が多い腫瘍であり再発を繰り返す症例では腫瘍が進行し転移を来すことも少なくない。再発症例に対する治療は、BCG膀胱内注入療法が標準治療とされているが、約4割以上の症例に再発を認め、これらの症例では膀胱摘除を余儀なくされる。比較的頻度が高い非筋層浸潤性膀胱癌に対する新規治療の開発は臨床極めて重要、かつ、必須の命題である。今回の研究によって、NAD+の腹腔内投与は、CD4+T細胞及びCD8+T細胞の存在下で膀胱癌の発生、発達を抑制することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本実験の目的は、再発が極めて多く臨床問題となっている膀胱癌に対し、新たな治療薬を開発しようとするものである。BBN(N-Butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine)誘発マウス膀胱癌モデルを用い、NAD+が誘導する免疫応答の賦活化によって腫瘍に対する治療効果、および、再発予防効果がもたらされるかを検討する。そして、その結果を今後さらに発展させ将来的にはNAD+が癌治療の一端を担うことを目指すものである。現時点までの効果で限定的ではあるが、NAD+の腹腔内投与による、CD4+T細胞、CD8+T細胞を介した免疫賦活は膀胱癌の発生、進展を抑制することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The present study suggests that intraperitoneal administration of NAD+ inhibits bladder cancer initiation and development in the presence of CD4+ T cells and CD8+ T cells.

研究分野：免疫学

キーワード：NAD+ BCG 膀胱癌 免疫賦活

1. 研究開始当初の背景

膀胱癌は、腫瘍が粘膜内、あるいは、粘膜下層以内にとどまる症例では経尿道的手術での治療が可能であるが、再発が多い腫瘍であり（経尿道的膀胱腫瘍切除後の膀胱内再発は3年で50%以上にみられ、うち10%程度が筋層浸潤癌に進展）。再発を繰り返す症例では腫瘍が進行し転移を来すことも少なくない。再発症例に対する治療は、BCG膀胱内注入療法が標準治療とされているが、約4割以上の症例に再発を認め、これらの症例では膀胱摘除を余儀なくされる。放射線照射と抗癌剤投与を併用する集学的治療も一つの治療オプションとされているが、これらの治療は副作用が強いため、進行性の筋層浸潤性膀胱癌に対して施行することが一般的であり、比較的頻度が高い非筋層浸潤性膀胱癌に対する新規治療の開発は臨床上極めて重要、かつ、必須の命題である。

これまで一般的に行われている癌治療は、外科治療、化学療法、放射線治療の三つで、これらを総称して三大癌治療といわれている。近年、この三大癌治療に加えて、“第四の癌治療”とも称される免疫療法が注目されている。そのような中、京都大学特別教授である本庶 佑氏とジェームズ・P・アリソン氏が、後述する癌細胞にかかわる免疫チェックポイント分子の発見と、それによる癌治療法の確立という業績を評価され2018年のノーベル医学生理学賞を受賞することに決まった。これを契機に癌治療における免疫療法はより一層注目され、学術的にも社会的にも発展、臨床的応用が期待される領域となっていくことは間違いない。

2. 研究の目的

本実験の目的は、再発が極めて多く臨床上問題となっている膀胱癌に対し、新たな治療薬を開発しようとするものである。BBN(N-Butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine)誘発マウス膀胱癌モデルを用い、NAD+が誘導する免疫応答の賦活化によって①腫瘍に対する治療効果、および、②再発予防効果がもたらされるかを検討する。そして、その結果を今後さらに発展させ将来的にはNAD+が癌治療の一端を担うことを目指す。NAD+は、古典的な補酵素であり全ての生物種に存在し、酸化還元反応で中心的な役割を果たし、かつ物質として安定している。申請者は、これまでこのNAD+の投与によってCD4陽性T細胞が分化誘導されサイトカインの産生が増強されるデータを発表した。さらにはこのNAD+の誘導するCD4陽性T細胞の活性化によって、マウスリスティア・モノサイトゲネス感染への抵抗性が増強されることも示した。このマウスの感染モデルによって示したNAD+投与でみられた抗病原性は、免疫応答の賦活によるもので、同時に抗腫瘍効果も示すと考えられる。NAD+は、もともと生体内に広く存在するものであり、この研究が発展すれば安全に生体に投与できる癌免疫療法薬としての臨床創薬への可能性を開くことができる。

本実験ではC57BL/6マウスを用いた、BBN誘発マウス膀胱癌モデルを使用する。本モデルは癌研究で一般的に用いられる免疫不全マウスの癌移植モデルとは異なり、免疫系が正常の野生型のマウスを使用するため免疫療法の研究に適しており、かつ同所性発癌のため、より臨床のヒト膀胱癌に近い実験モデルであり、本研究のモデルとして最適といえる。また、膀胱癌は、BCGの膀胱内注入が上皮内癌、および非筋層浸潤癌（表在性癌）に対する標準治療となっているという免疫療法が確立されている数少ない癌種である。このことより、免疫賦活による抗腫瘍効果を検証するモデルとして、BBN誘発マウス膀胱癌モデルは最適である。

3. 研究の方法

- (1) NAD+投与によるマウス膀胱癌に対する抗腫瘍効果を明らかにする
- (2) 担癌マウスにおけるNAD+投与時の免疫学的変化を明らかにする。
- (3) BCG膀胱内注入療法と治療効果を比較検討し、臨床応用への可能性を明らかにする。

担癌マウスモデルの作成確立とNAD+の抗腫瘍効果の確認

①BBN誘発マウス膀胱癌は、多くの報告がなされている膀胱癌発生マウスモデルである(Int J Cancer. 2010;127:1180-7)。これまでの研究成果から、BBN誘発マウス膀胱癌モデルでは、BBN投与後10週前後にDysplasiaが発症し、24週頃には浸潤性の膀胱癌が発症することが判明している。今回の実験において膀胱癌に対する最適なNAD+投与タイミングを検討すべく、BBNを経口投与したC57BL/6マウスにおける膀胱内の経時的な腫瘍発生を評価する。これまでの研究成果から、BBN投与後12週、16週、20週、24週、28週のマウスの膀胱を摘出し腫瘍発生及びその悪性度、深達度を肉眼的、病理学的に検証する。

②浸潤性の膀胱癌が発症する前段階において、BBN投与後にDysplasiaが発生する週数を明らかにし、②-i) その4週前からNAD+の腹腔内投与を開始し、腫瘍発生に対する予防的効果を検証するサブグループ、および、②-ii) CISが発症する週数からNAD+の投与を開始し治療的効果を検証するサブグループを作成する。

③前段階において、BBN投与後にDysplasiaが発生する週数を明らかにし、その4週前からNAD+の腹腔内投与を開始し、腫瘍発生に対する予防的効果を検証する。また他のグループではCISが

発症する週数から NAD+の投与を開始し治療的效果を検証する。

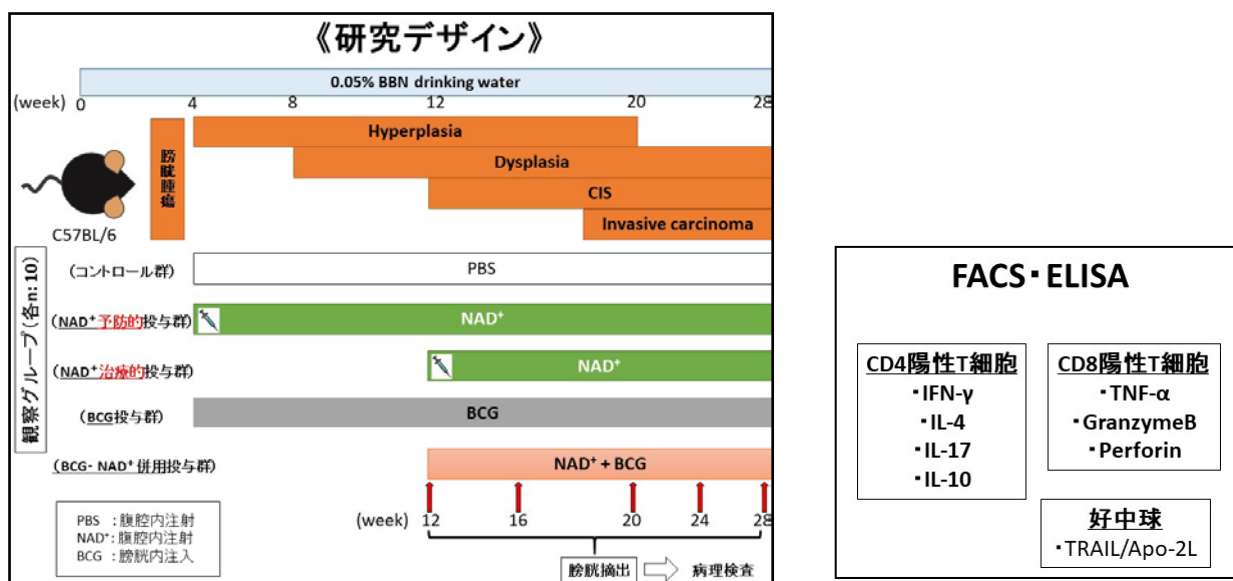
In vivo 及び In vitro 実験系で免疫学的な解析を行う。

①In vivo 実験系：NAD+が投与された発癌マウスの膀胱及び脾臓を摘出さらには血液も採取し、その各々において CD4 陽性 T 細胞が分泌するサイトカインである、IFN- γ 、IL-4、IL-17、IL-10 を、また CD8 陽性 T 細胞が分泌する TNF- α 、グランザイム B、パーフォリンの測定を ELISA 及び FACS によって行う。

②In vitro 実験系：C57BL/6 マウスの脾臓を摘出し、そこから免疫磁気細胞分離方法によって CD4 陽性 T 細胞及び CD8 陽性 T 細胞を分離し、NAD+存在下で膀胱癌細胞と共培養し In vivo 実験系で行ったもの同様の ELISA、FACS で評価する。

膀胱癌に対する標準治療である BCG 膀胱内注入療法との比較検討

①BCG の膀胱内注入の効果は、CD8 陽性 T 細胞と好中球が関連しているとされている。そこで、BCG 膀胱内注入療法と NAD+腹腔投与の比較検討を行う。それぞれのグループにおいて膀胱の腫瘍組織に存在する、CD8 陽性 T 細胞、好中球及び CD4 陽性 T 細胞の割合を FACS によって示す。またこの段階で、ELISA、FACS、PCR といった手段で各免疫細胞の活性化を示す。前段階のサイトカイン、グランザイム B、パーフォリンに加えて、好中球においては、Tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL/Apo-2L)を評価する。



4. 研究成果

・ BBN 誘発マウス膀胱癌：

BBN（東京化成）を水道水にて 0.05%濃度となるように溶解調整し、自由飲水下に経口投与。C57BL/6 マウスに対して BBN0.05%濃度を投与する事によって膀胱癌が発生することが確認。18 週・異形成、18 週・CIS、20 週・浸潤性とした。

・ NAD+のマウス腹腔内投与に対する CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞の免疫学的変化の確認：

NAD+の腹腔内投与がなされたマウスにおいて、FACS で CD4+IL10+T 細胞及び、CD4+IFN γ +T 細胞の発現が PBS を腹腔内に投与したコントロール群に比較して、優位に 上昇していることを確認。CD8 陽性 T 細胞に関して解析を行い NAD+の腹腔内投与がなされたマウスにおいて CD8+IFN γ +T 細胞及び CD8+TNF α +T 細胞の発現が PBS を腹腔内に投与したコントロール群に比較して、優位に 上昇していることを確認。

BBN 誘発マウス膀胱癌モデルに対して NAD+の腹腔内投与を行う適切なタイミングの検討：

BBN を 18 週間投与した、CIS の状態に対して NAD+の腹腔内投与の効果を 確認することとした。18 週にわたり NAD+の腹腔内投与をすることはコスト的にもマウスに対する侵襲的にも適切ではないと考え、異形成となる 16 週のまえ 15 週の 時点で NAD+の腹腔内投与を開始した。投与の間隔、部位などを工夫し行ったが 3 週間の連続した NAD+の腹腔内投与はマウスの状態を悪化させる 要因ともなった。また、摘出した膀胱病理では悪性腫瘍は発現していないものの NAD+投与の影響と思われる炎症所見が非常に強く、判定が困難である個体が大半であった。

・ BCG の膀胱内注入による膀胱癌の発育予防の確認：

BCG 膀胱内注入マウスモデルの作成：イムノブラダー膀胱用 80 mg を用いて 26.7 mg/ml の濃度に調製し、ムノブラダー懸濁液 50 μ l を膀胱内に注入することとした。A 群は BBN 投与のみのコントロール群。B 群は BCG を週 1 回、BBN 投与終了 1 週間後より合計 6 回膀胱内注入。C 群は

生理食塩水を B 群の BCG 同様に投与。D 群は BBN 投与開始 16 週間後より同量の BCG を週 1 回、合計 6 回膀胱内注入。E 群は生理食塩水を D 群の BCG 同様に投与した。F 群は BBN を投与せず、D 群と同時期に同量の BCG を週 1 回、合計 6 回膀胱内注入。実験開始から 24 週で膀胱を摘出した。

病理組織学的には、BCG を予防的に投与した B・D 群において膀胱癌の発生は生理食塩水を投与した C・E 群と比較して抑制されていた。BCG 膀胱内注入療法はマウスにおいては膀胱癌発生に対して予防的な効果があることが確認できた。

・ NAD+ の腹腔内投与が膀胱癌の発育に及ぼす影響の確認 :

上記に示した如く、NAD+ を連続して腹腔内投与すると投与自体が膀胱に与える炎症を含む影響が強かった。そこで BCG の膀胱内投与のスケジュールに倣って投与を行うこととした。1 群は BBN 投与のみのコントロール群。2 群は NAD+ を週 1 回、BBN 投与終了 1 週間後より合計 6 回腹腔内投与。3 群は生理食塩水を B 群の NAD+ 同様投与。D 群は BBN 投与開始 15 週間後より同量の NAD+ を週 1 回、合計 6 回腹腔内投与。E 群は生理食塩水を D 群の NAD+ 同様に投与した。F 群は BBN を投与せず、D 群と同時期に同量の NAD+ を週 1 回、合計 6 回膀胱腹腔内投与。実験開始から 24 週で膀胱を摘出した。

病理組織学的には、NAD+ を投与した B・D 群において膀胱癌の発生は生理食塩水を投与した C・E 群と比較して抑制されていた。しかしながらその効果は BCG と比較して限定的であった。

・ T 細胞除去マウスに対する NAD+ の腹腔内投与が膀胱癌の発育に及ぼす影響の確認 :

モノクローナル抗体投与により T 細胞各サブセットを除去した抗 CD4 抗体投与群、抗 CD8 抗体投与群、CD4+抗 CD8 抗体投与群、さらに T 細胞を除去していない PBS 投与群に分け先の実験のスケジュールに沿って観察を行った。しかしながら全ての群において、先の実験で認めた癌の発育抑制効果は得られなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 ICHIHASI A, INAMOTO T, UCHIMOTO T, NAKAMURA K, KOMURA K, YANO Y, NISHIMURA K, KINOSHITA S, NISHIO K, FUKUSHIMA T, NAKAMORI K, MATSUNAGA T, TSUTSUMI T, TSUJINO T, UEHARA H, TAKAHARA K, YAMAMOTO K, KATO R, IJIRI Y, HAYASHI T, AZUMA H.	4. 巻 37
2. 論文標題 Tissue Distribution of Cisplatin by Intra-arterial Infusion Route in Comparison to Systemic Route: Implication to Therapy for Node-positive Bladder Cancer	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 In Vivo	6. 最初と最後の頁 143~8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/invivo.13063	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 Quante M, Iske J, Uehara H, Minami K, Nian Y, Maenosono R, Matsunaga T, Liu Y, Azuma H, Perkins D, Alegre ML, Zhou H, ElKhal A, Tullius SG.	4. 巻 22
2. 論文標題 Taurodeoxycholic acid and valine reverse obesity-associated augmented alloimmune responses and prolong allograft survival.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 American Journal of Transplantation	6. 最初と最後の頁 402-13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ajt.16856.	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 該当する

1. 著者名 Hirofumi Uehara, Hajime Hirano, Tomohisa Matsunaga, Koichiro Minami, Kazumasa Komura, Naokazu Ibuki, Teruo Inamoto, Hayahito Nomi, Haruhito Azuma	4. 巻 5
2. 論文標題 Management of alpha-herpesvirus infection following kidney transplantation: Our experience (7 cases)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Transplantation Reports	6. 最初と最後の頁 100051
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tpr.2020.100051	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 Minami K, Bae S, Uehara H, Zhao C, Lee D, Iske J, Fanger MW, Reder J, Morrison I, Azuma H, Wiens A, Van Keuren E, Houser B, ElKhal A, Kang PM, Tullius SG.	4. 巻 -
2. 論文標題 Targeting of intragraft reactive oxygen species by APP-103, a novel polymer product, mitigates ischemia/reperfusion injury and promotes the survival of renal transplants.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Am J Transplant.	6. 最初と最後の頁 online
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ajt.15794.	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 該当する

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 上原博史, 田中恵美子, 本村友希, 辻野拓也, 南 幸一郎, 小村和正, 平野 一, 稲元輝生, 能見勇人, 東 治人.
2. 発表標題 膀胱癌診療における超音波検査の有用性
3. 学会等名 日本超音波医学会第95回学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 上原 博史、伊夫貴 直和、岡部 知太、木村 孝平、高倉 一平、寺本 昌司、西村 一希、堤 岳之、小村 和正、平野 一、稲元 輝生、能見 勇人、東 治人
2. 発表標題 当施設における腎細胞癌に対するpresurgical therapyの臨床的検討
3. 学会等名 第108回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Uehara H, Hirano H, Matsunaga T, Minami K, Kazumasa K, Ibuki N, Inamoto T, Nomi H, Azuma H.
2. 発表標題 Management of alpha-herpesvirus infection following kidney transplantation: Our experience (7 cases)
3. 学会等名 CAST2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上原博史, 平野 一, 岡部知太, 木村孝平, 寺 昌司, 高倉一平, 西村一希, 木下将宏, 徳永雄希, 中森啓太, 小林大介, 堤 岳之, 小村和正, 伊夫貴 直和, 稲元輝生, 能見勇人, 東 治人.
2. 発表標題 2型損傷腎を抗凝固・抗血小板薬内服患者に移植し生着を得た献腎移植症例
3. 学会等名 第55回日本移植学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上原博史、伊夫貴 直和、藤原裕也、加納陽祐、小林大介、堤 岳之、児島 彬、小村和正、平野 一、稲元輝生、能見勇人、東 治人。
2. 発表標題 転移性腎細胞癌における2nd line Axitinibの治療効果。
3. 学会等名 第57回日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上原博史、堤 岳之、小村和正、伊夫貴 直和、稲元輝生、能見勇人、東 治人。
2. 発表標題 生体腎移植前のドナー検査において腫瘍性病変が指摘され、根治的治療が可能であった3症例
3. 学会等名 第53回日本臨床腎移植学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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	東 治人 (Azuma Haruhito) (40231914)	大阪医科薬科大学・医学部・教授 (34401)	
研究 分担者	小村 和正 (Komura Kazumasa) (10789853)	大阪医科薬科大学・医学部・講師 (34401)	

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
---------	---------