

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659710

研究課題名(和文) ビーシージーミコール酸を用いた新規癌治療剤の開発

研究課題名(英文) Development of new cancer therapeutic formulation with BCG mycolic acid

研究代表者

宮崎 淳 (MIYAZAKI, JUN)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：10550246

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：ミコール酸(MA)リポソーム製剤はプロトタイプが完成し、マウス皮下接種モデルでの抗腫瘍効果を検討した。コントロールマウスに比べて、著明な腫瘍径の縮小を認めた。病理学的には壊死組織を中心に周囲にリンパ球と思われる細胞を多数認め、局所に免疫反応を引き起こしている可能性が示唆された。今後の課題として、工業化を目指すには、ロット間での製剤のパラッキをなくすことが必要である。MAをリポソームに包埋する際の圧力や、装填温度の検討を行う必要がある。現在皮下接種モデルでの抗腫瘍効果の再検をしているとともに、正所性モデルでの膀胱内注入による抗腫瘍効果判定を検討している。

研究成果の概要(英文)：We have developed a mycolic acid liposomal formulation. Using subcutaneous inoculation model, we are investigating the anti-tumor effect. We are now using an orthotopic model to examine the anti-tumor effect in the future.

研究分野：泌尿器科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

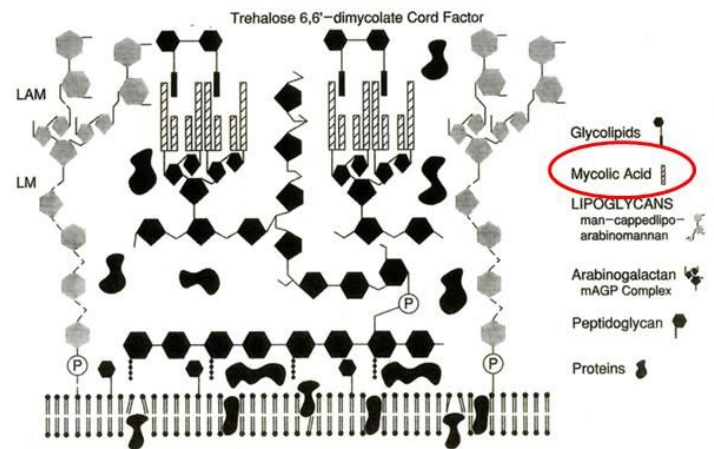
キーワード：ミコール酸 ビーシージー リポソーム 癌免疫

# 様式 C - 19、F - 19、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

BCG の進行がん、転移がんへの応用は、1960-70 年代に精力的に行われた。しかしながらウシ型結核菌の生菌であることから、全身への BCG 播種の危険性を回避できず、これが汎用性の高い BCG 免疫療法の開発の大きな障害となった。最近では加熱処理された *Mycobacterium vaccae* を用いた臨床試験が進行非小細胞肺癌 (Eur J Cancer 2008) 及び転移腎がん (Eur J Cancer, 2008) を対象に行われ、有効性を示唆する結果が得られてはいるが、十分な生存期間の延長は得られなかった。この点で、今後の最も重要な課題は BCG の高い免疫活性効果を有する成分を利用した、安定かつ安全な非生菌製剤を開発することにあると考えられる。これまでの基礎研究から BCG による免疫反応は、菌の細胞壁の特徴的な物質すなわち、cell wall skelton (CWS)、ミコール酸、Lipomannan、lipoarabinomannan といった多数のワックス様脂質が、樹状細胞に貪食されても長期間細胞質内に生存し、宿主の免疫を刺激し続けるといった特有の性質に関連している。特に細胞壁のなかでもミコール酸 (MA) は最も多量に存在する、BCG の生存に必須な構造因子である。MA は CD1 抗原として強力な細胞性免疫誘導を示すことが明らかとなっており、さらにこれら MA は T リンパ球に作用し IFN- $\gamma$  を産生し、樹状細胞に作用して IL-12 を産生することで主として Th-1 型免疫を活性化させる。しかし MA は、安定的に精製することは容易ではなく、また MA を生体へ投与しても十分な抗腫瘍効果を発揮しない。その理由は、MA は不溶性、大きな分子量、負表面電荷という特性を有している物質であり、抗腫瘍効果を発揮するために重要なステップである細胞親和性が極めて低いためである。そこで、細胞親和性を高め、細胞質内に効率的に輸送できるような vector を利用することにした。vector を利用すると、感染性がないため、全身投与が可能になる可能性を秘めている。vector は北海道大学大学院薬学研究院、薬剤分子設計学研究室で研究開発されたもので、octaarginine (R8) を liposome 表面に結合させ、通常の liposome と比べて飛躍的に細胞質内への物質輸送を高めている (多機能性エンベロープ型ナノ構造体 (Multifunctional Envelope-type Nano Device: MEND (R8-MEND)) (Nakamura, et al. Molecular Therapy, 14(8):682, 2007) (PCT/JP2008/000351)。我々は、この octaarginine liposome vector

(R8-liposome) に MA を搭載したりポソームを開発し BCG 生菌に代る製剤として日本 BCG 研究所、筑波大学泌尿器科により共同開発した。今後は、臨床的治療に実際に使用できる製剤としての認可を将来の最終目的にしている。本研究では BCG 菌の特定ミコール酸を用いてナノ粒子化し、温度感受性を高めて徐放性を調節することにより膀胱内のみならず全身投与の可能な新規癌治療製剤の開発を目指す。



上図 結核菌細胞莢膜図

## 2. 研究の目的

今回我々が開発中のリポソームは、脂質 2 重膜エンベロープの構造を有し、核酸や抗原タンパク質などの様々な物性を有する高分子を濃縮的にパッケージすることが可能である。また表面を膜透過性ペプチドのオクタアルギニンで修飾することで、ほぼ 100% の細胞に効率的に内在化することができる。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る。BCG 生菌はその後細胞内の分解貯蔵庫であるライソソームで分解され、その際生じる BCG 由来の抗原が MHC 上に提示されることで、免疫担当細胞が BCG 由来の抗原を認識し、サイトカインを産生する。一方 MA はそのままでは生菌とは異なり、その物性から水と油に不溶性であるため、自ら癌細胞内へ進入することができず、抗腫瘍効果はきわめて低い。しかしながら、我々の開発した、リポソームに搭載することで、BCG 生菌を用いた場合よりさらに多くの機能を発揮することが可能となる。まず、膀胱癌細胞はバリ

アーが破綻しているため、効率的かつ選択的にリポソーム-MA を癌細胞へ送達可能となる。確実に、癌免疫を惹起することができる。次に、非生菌であることから、BCG 生ワクチンによる BCG 菌の全身播種性感染という重篤な副作用が起こらない。非生菌製剤であるため、生ワクチンのようなバイオハザードの管理も必要がなく、通常の薬剤と同様に管理、供給搬送が可能である。感染の可能性がないため、投与方法も膀胱内注入だけでなく、静脈内投与も可能である。したがって、安全性と有効性の点で最も優れた免疫治療剤として期待され、膀胱癌治療薬としての実用化だけでなく、転移性癌の治療薬としての可能性もある。我々の研究目的は、膀胱癌に対する最も有効な治療薬は BCG しかない現状に対し、新しい治療薬を提示するとともに、さらには、転移癌に対しては、抗癌剤以外の治療法も提示できる。すなわち BCG の全身免疫療法にむけたシーズになる可能性を秘めている。最終的には、あらゆる癌に対する全身療法としての応用も可能である。

### 3. 研究の方法

(1) BCG 社において、preliminary に高压乳化法で製造した、MA リポソーム製剤を開発した。この製剤を凍結乾燥後再溶解したが、粒子径や電位に変化を検討した。

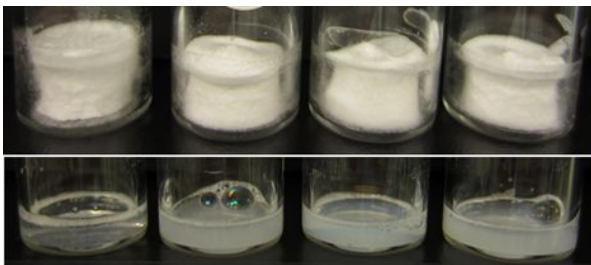
この MA リポソーム製剤を用いて、抗腫瘍効果の有無について検討した。まずは評価系として、同種皮下接種モデルでの検討を行った。

(2) 皮下接種モデル以外に、実際の人での薬剤投与経路と同じ膀胱内注入での抗腫瘍効果評価のため、正所性モデルの作成を行った

(3) 皮下接種モデルおよび正所性モデル以外に、転移性病変への抗腫瘍効果を検討するために、肺転移モデルを作成し、in vivo imaging system での評価系を作成した。

### 4. 研究成果

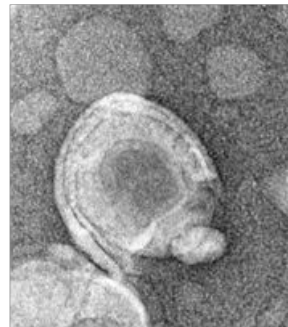
(1) MA リポソーム製剤のプロトタイプが完成した。リポソーム製剤を凍結乾燥後再溶解するも、粒子径や電位に変化は認めなかった。



上図  
凍結乾燥後再溶解しても製剤に大きな変化は認めなかった。

(2) MA リポソーム製剤を電子顕微鏡で観察すると、図のように円形になっており、リポソームの中心部に脂質であるミコール酸が包埋されている形と考えられた。

## MAリポソーム 電子顕微鏡



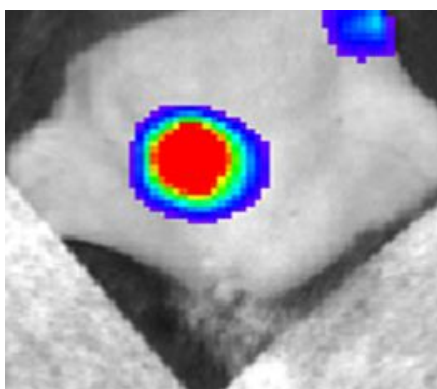
(3) 皮下接種モデルによる抗腫瘍効果判定では抗腫瘍効果を認めた。



上: MA  
下: コントロール

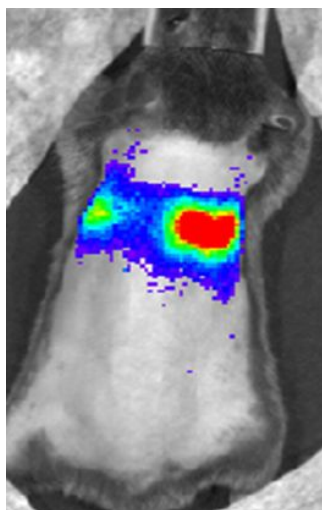
MA 製剤を接種すると著明に腫瘍径は抑制された。十分な抗腫瘍効果を認めた。

(4) 正所性モデルの作成を行った。マウス C57BL/6 系の膀胱癌細胞株 MB49 細胞にルシフェラーゼ遺伝子を導入。マウス膀胱を Poly-L-lysine で前処置後  $2 \times 10^6$  /50ul の細胞数を膀胱内投与し一時間把持したところ、約 90%以上の生着率が得られることが分かった。また、Ivis Spectrum®を用いて腫瘍細胞投与後から検討し、マウス膀胱に腫瘍が生着していることが確認できた。今後はこの系を用いて膀胱内注入療法下での抗腫瘍効果を検討する予定である。



上図  
正所性モデルが IVIS で確認することが出来た。

(5) 同じ膀胱癌細胞である MB49 細胞をマウス尾静注することで肺転移モデルの作成を行った。肺転移を Ivis Spectrum®で評価することが可能であったため、MA リポソーム製剤による転移モデルの抗腫瘍効果検定に使う予定である。



上図  
肺転移を起こしたマウスモデル  
肺転移を IVIS で確認することが出来た。

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1件)

Kawai K, Miyazaki J, Joraku A, Nishiyama H, Akaza H. Bacillus Calmette-Guerin (BCG) immunotherapy for bladder cancer: current understanding and perspectives on engineered BCG vaccine. Cancer Sci. 2013 Jan; 104(1):22-7. doi: 10.1111/cas.12075.査読有り

[学会発表](計1件)

中村孝司、吹上雅文、中谷彰洋、矢野郁也、宮崎淳、西山博之、赤座英之、伊藤俊宏、細川裕之、中山俊憲、原島秀吉：BCG-CWS 搭載ナノ粒子を基盤とした膀胱癌治療剤の開発。第6回 BCG 注入療法研究会。平成25年11月22日 如水会館(東京都千代田区)

6. 研究組織

(1)研究代表者

宮崎 淳 (MIYAZAKI JUN)  
筑波大学・医学医療系・准教授  
研究者番号：10550246

(2)研究分担者

西山 博之 (NISHIYAMA HIROYUKI)  
筑波大学・医学医療系・教授  
研究者番号：20324642  
高岡 栄一郎 (TAKAOKA EIICHIRO)  
筑波大学・附属病院・病院講師  
研究者番号：50625340  
木村 友和 (KIMURA TOMOKAZU)  
筑波大学・附属病院・病院講師  
研究者番号：10633191