

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592323

研究課題名(和文)非生菌BCG製剤を用いた転移がんの治療

研究課題名(英文)Treatment of metastatic carcinoma using non-viable bacterial BCG formulation

研究代表者

河合 弘二 (Kawai, Kouji)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：90272195

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：非生菌BCG製剤を用いた転移がんの治療：Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guérin (BCG)膀胱内注入(膀注)療法は最も臨床的有用性が確立した癌免疫療法であるが、生菌を用いることによる副作用のため扱いが困難である。我々はBCG菌細胞壁骨格(BCG-CWS)をリポソーム化することによって生菌を用いないBCG製剤を開発するとともに、これを用いた進行がん、転移がんの新規BCG免疫治療の基礎的検討を行う。

研究成果の概要(英文)：Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guérin (BCG) intravesical therapy is a cancer immunotherapy which has been established. However, it is not applicable to metastatic lesion because of side effects caused by live bacteria. We have developed a small-diameter particles of liposome BCG-CWS (cell wall skeleton) with a view to industrialization.

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：泌尿器科 ビーシージー 癌免疫 リポソーム

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悪性黒色腫に対する局所注入療法をはじめとして 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を使用していることから、全身への BCG 播種の危険性を回避することができないことが 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 44:224-227,2008) 及び転移腎がん (Eur J Cancer 44:216-223,2008) を対象に行われ、有効性を示唆する結果が得られたものの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によって惹起されることが知られている。BCG 菌体から抽出した細胞壁 (BCGCW) は cell wall skeleton (BCGCWS)、Mycolic acid、Lipomannan、lipoarabinomannan といった多数のワックス様脂質からなり、BCG 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 BCG 特有の性質に寄与している。これらの中で BCG の細胞壁成分 (cell wall) を抽出した BCGCW は高い生物学的活性を有する物質として注目されている。しかしながら、BCGCW は大きい分子であり、かつ難溶性、負表面電荷という特性を持つため、BCGCW そのものを生体に投与しても抗腫瘍効果を発揮しない。この点に関して、我々は細胞親和性を高め、細胞質内に BCGCW を効率的に輸送できるような vector に着目した。この 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 表面に結合させることで通常の 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)))。我々は、この octaarginin liposome vector (R8-liposome) に BCGCW を搭載した、“R8-liposome-BCGCW”を BCG 生菌に代る製剤として北海道大学、日本 BCG 研究所との共同研究により開発した。

【これまでの研究成果】

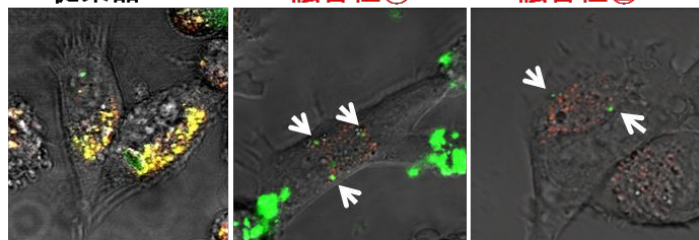
R8-liposome-BCGCW は径 200nm と小さ

く表面電荷は正であった。R8-liposome-BCGCW は in vitro で膀胱癌細胞と接触させると、細胞表面に接着した後に癌細胞質内へ輸送されることが確認された。より重要なポイントとして細胞質へ内在化した BCGCW が lysosome へ分布することが確認された。Lysosome は抗原提示細胞が外来抗原を表面抗原として提示する際に中心的な役割を果たしているが、尿路上皮細胞もノンプロフェッショナルな抗原提示細胞として機能することが知られている。この BCGCW の細胞内挙動は R8-liposome-BCGCW が免疫効果を発揮する際に有利な条件と考えられる。以上の検討を踏まえて、我々は R8-liposome-BCGCW による抗腫瘍効果を膀胱腫瘍 MBT-2 と同種マウス C3H/HeN を用いた膀胱腫瘍皮下

従来品

融合性①

融合性②



green : BCG-CWS red : endosome

接種モデルを用いて検討した。R8-liposome-BCGCW は MBT-2 細胞と同時に接種すると MBT-2 腫瘍の増殖を有意に抑制した。

2. 研究の目的

BCG-CW は単一な抽出物質ではなく、成分の安定したりポソーム化製剤を作成する観点からは問題があった。この点に関して日本 BCG 研究所で結核菌細胞壁の抽出物質をさらに高度に分離精製し、単一物質である BCG cell wall skeleton (BCG-CWS) を単離することが可能になったことをふまえて、本研究では我々は BCG-CWS と vector を組み合わせた R8-liposome-BCGCWS を作成し、抗腫瘍効果を検討することとした。本研究により生菌を用いない次世代 BCG 製剤の有用性を明らかにできれば、これまでの BCG 療法の限界を根本的に克服することができ臨床的には進行がん、転移がんを対象とした新規免疫療法が可能となる。このため本研究では膀胱がん細胞及び腎がん細胞を用いて進行がん、転移がんのマウスモデル系で R8-liposome-BCGCWS の抗腫瘍効果を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) R8-liposome BCG cell wall skelton (R8-liposome-BCG-CWS) の腫瘍に対する直接効果の検討

我々のこれまでの検討では R8-liposome-BCGCW は MBT-2 細胞と混合接種した場合に有意な腫瘍増殖抑制効果を示した。本研究では MBT-2 細胞と皮下接種し形成された腫瘍に対して R8-liposome-BCGCWS を同時に直接投与することにより抗腫瘍効果を検討する。

(2) 正所性モデルの作成

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。

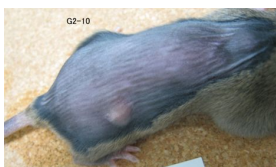
(3) 肺転移モデルの作成

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

R8-liposome-BCG-CWS を in vitro で細胞に添加すると lysosome に取り込まれていることが確認できた。

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。



BCG-CWSリポソーム

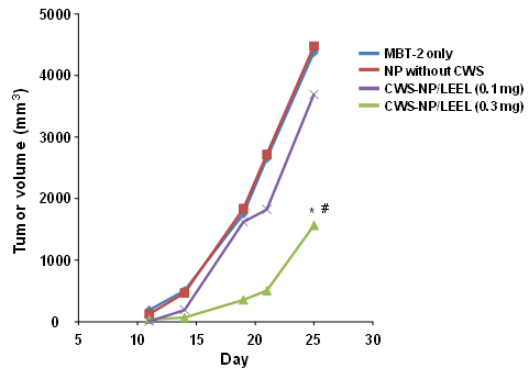


コントロールマウス

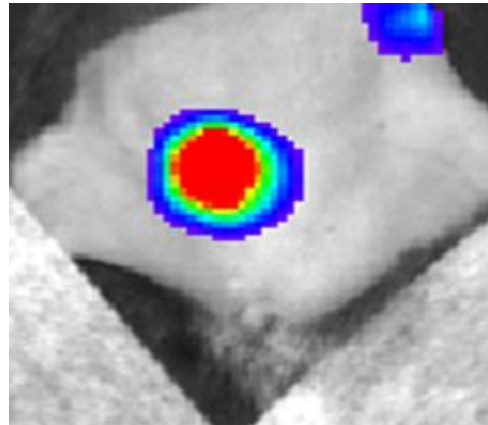
上図

コントロールマウスに比べて腫瘍径が著明に抑制された。

皮下注マウスの腫瘍径を経時的に計測すると、R8-liposome-BCG-CWS を投与した群が有意に腫瘍径が小さかった。腫瘍の増殖を抑制していることがわかった



(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 $2 \times 10^6/50 \mu\text{l}$ 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® (IVIS) 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。

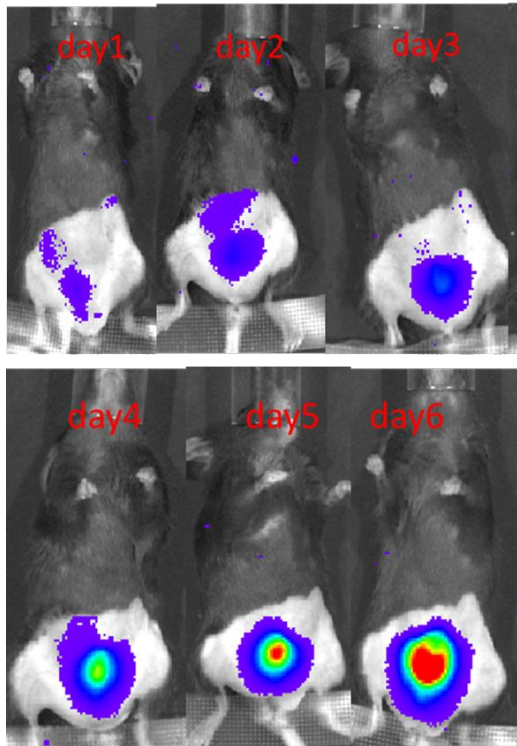


上図

正所性モデルが IVIS で確認することが出来た。

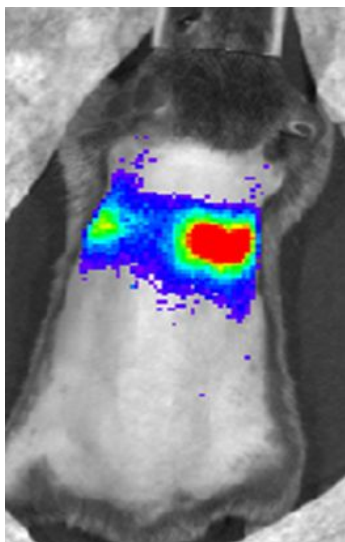
正所性モデルにおいて、経時的に膀胱を Ivis Spectrum で経過を見ることで、徐々に腫瘍が大きくなっていく様子が観察された。

腫瘍は膀胱内接種後 Day 3 から増大していくことが判明した。



上図
膀胱腫瘍の増大を経時的に観察した。
Day3 から確実に腫瘍は増大している。

(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

6 . 研究組織

(1)研究代表者

河合 弘二 (Kawai Kouji)
筑波大学・医学医療系・講師
研究者番号：90272195

(2)研究分担者

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