

論 文 概 要

○論文題目

Mycobacterium bovis BCG 由来の keto 型ミコール酸を用いた新規リ
ポソーム製剤の抗腫瘍活性に関する研究

○指導教員

人間総合科学研究科 疾患制御医学専攻 西山博之 教授

所属： 筑波大学大学院人間総合科学研究科疾患制御医学専攻

氏名： 吉野 喬之

目的: 膀胱癌のうちおよそ 75%は、初診時に非筋層浸潤性膀胱癌と診断され、経尿道的膀胱腫瘍切除術により治療されるが、比較的高い再発率と再発時の筋層浸潤性癌への進展が大きな問題である。結核の生ワクチンである *Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guérin* (BCG) の膀胱内注入療法は表在性膀胱癌の治療および再発・進展予防を目的とした標準免疫治療である。生菌を用いるため、感染性の副作用が生じることと、膀胱への投与に経路が限られることが、臨床上的問題である。また初めて報告されてから 40 年あまりが経過しているが、BCG 菌の膀胱癌細胞への接着、侵入と、NK 細胞や細胞障害性 T 細胞による癌細胞排除との間をつなぐ宿主免疫応答については、いまだ明らかとなっていない。結核感染においては壁成分に免疫増強活性があることが知られており、がん免疫においても BCG 細胞骨格 (Cell wall skeleton) や trehalose dimycolate (TDM) の抗腫瘍活性が報告されている。ミコール酸は BCG や結核菌といった抗酸菌に特徴的な壁構成脂質であり、Cell wall skeleton と TDM の脂質成分でもあるが、これまでその抗腫瘍活性に着目した研究は報告されていない。本研究では、BCG のミコール酸 (α 、keto、methoxy の 3 分画) により腫瘍免疫の活性化が起こるという仮説を検証するため、膀胱癌細胞へ確実にとどく、リポソームを開発し、その抗腫瘍活性を示すことを目的とした。

対象と方法: BCG 死菌からミコール酸を抽出し、薄層クロマトグラフィーにより各分画ごとに精製した。それぞれ α -、methoxy-、keto-ミコール酸 (MA) を含有するリポソームである、Lip-aMA, Lip-mMA, Lip-kMA を作成した。リポソームのサイズと表面電位を測定した後、細胞への取り込みを共焦点顕微鏡とフローサイトメトリーにて測定した。膀胱癌細胞株への直接細胞障害を WST8 法にて検討した後、マウスシンジェニックモデル (皮下腫瘍) にて in vivo での抗腫瘍活性を検討した。腫瘍浸潤リンパ球も免疫組織学的に評価した。無胸腺ヌードマウ

スと NK 活性の低下したベージュマウスを用いて同様の *in vivo* 実験を行った。

結果： MALDI-TOF 質量分析にて各分画ミコール酸が精製できたことを確認した。

ミコール酸は陰性に荷電しており疎水性も強いいため、同じく陰性に荷電した膀胱癌細胞への取り込みを効率化するため表面膜電位が陽性のリポソームを開発した。デンドロン脂質を用いることで表面膜電位を陽性にできた。細胞への取り込みは良好で、直接細胞障害は認めなかった。C57BL/6 マウスにおいては、Lip-kMA のみが腫瘍増殖抑制効果を示した (vs. PBS, $p=0.028$) が、Lip-aMA、Lip-mMA は効果を示さなかった (vs. PBS, それぞれ $p=0.086$, $p=0.16$)。一方 C3H/HeN マウスにおいては、Lip-kMA、Lip-mMA が腫瘍増殖抑制効果を示した (vs. PBS, $p=0.023$, 0.038)。

Keto 型ミコール酸によって活性化する免疫システムを明らかにするため、腫瘍組織免疫染色と免疫不全モデルマウスによる *in vivo* 実験を行った。C57BL/6 マウスのシンジェニックモデルで作成した腫瘍では、CD8 陽性細胞数が有意に増加していた (41.6/HPF vs 6, $p=0.0091$)。一方で、CD4 陽性細胞数は Lip-kMA で多い傾向にはあったが有意な差はなかった (42.3 vs. 6, $p=0.07$)。ヌードマウスにおいて、Lip-kMA の効果は消失した (図 6c)。一方で、ベージュマウスでは Lip-kMA の効果は保たれていた (vs. PBS, $p=0.045$)。

考察：

Beken らは、ミコール酸の構造の違いが、ミコール酸によって活性化する炎症反応に影響を与えることを報告した。Oxygenated ミコール酸である methoxy 型と keto 型のシス体が宿主の炎症反応を惹起した一方で、 α 型は不活性であった。Rhijin らは、ミコール酸分画の違いが、ミコール酸特異的 T 細胞の活性化に差異を生じさせることを示している。本研究では、keto 型ミコール酸を含有するカチオニックリポソーム (Lip-kMA) がマウスモデルにおいて、腫瘍増殖を有意

に抑制することが示された。今後本研究で作成したサブ分画ごとのリポソームが in vivo での副作用が異なるかどうか、検証する必要がある。このことは、副作用の少ないサブ分画の選択につながる可能性がある。

BCG による抗腫瘍効果のメカニズムの最初のステップは、膀胱癌細胞への接着、侵入とそれによる膀胱癌細胞のサイトカイン産生、major histocompatibility complex (MHC) class II や CD1 分子による抗原提示と考えられている。このステップが、CD4 や CD8 陽性 T 細胞、NK 細胞、顆粒球、マクロファージ、樹状細胞などの浸潤を促し、癌細胞への免疫反応を活性化する。本研究では腫瘍への CD8 リンパ球の有意な浸潤増加、ヌードマウスでの活性の消失が見られた。BCG 療法における T 細胞依存的な抗腫瘍活性においてミコール酸が少なくともその一部の役割を果たしていることが示唆される。

結論：BCG 壁成分であるミコール酸が、デンドロン脂質 D22 を用いたリポソーム化により抗腫瘍活性をもつ事が示された。BCG のミコール酸 3 分画のうち、keto 型、methoxy 型ミコール酸に活性があった一方で、 α 型は活性がなかった。またその効果発現メカニズムには、T 細胞の関与が示唆された。BCG の感染性副作用を克服する壁細胞成分を用いたがん免疫治療の開発につながる研究と考えられる。