

平成 30 年 6 月 17 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15685

研究課題名(和文) 土壌菌菌体成分であるミコール酸による抗腫瘍免疫製剤の開発

研究課題名(英文) Development of antitumor immunological agent using mycolic acid of soil bacterial cell components

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) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：膀胱癌にはBCGが使用されるが、そのメカニズムは不明である。我々は、BCGの細胞壁であるミコール酸(MA)に注目した。本研究の結果、安定的にMAを抽出することができ、さらにはMAのサブクラスである、メトキシ、ケトMAの分離も同様に可能となった。同時にMAのリポソーム化にも成功した。リポソームの粒子径は200nm以下まで縮小させることが可能となった。電子顕微鏡でも小径粒子であることが確認できた。皮下接種モデルでは、ロドコッカスやT172の MAでは全く抗腫瘍活性を得ることができなかった。しかし、BCGのケトMAにおいては、抗腫瘍活性を得ることができ、この結果を基に特許申請を行った。

研究成果の概要(英文)：Intravesical therapy using Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin (BCG) is the most established cancer immunotherapy for bladder cancer, but its underlying mechanisms are unknown. Mycolic acid (MA), the most abundant lipid of the BCG cell wall, is suspected to be one of the essential active components of this immunogenicity. Here, we developed liposomes incorporating three subclasses (, keto, methoxy) of MA separately purified from BCG. The laser-Doppler velocimetry with the ZEN 3600 demonstrated that the particle sizes of all types of liposomes were between 120 and 150 nm. We also confirmed the size of the liposome by TEM. A liposome containing keto-MA, presented strong antitumor activity in two murine syngeneic graft models using MB49 and MBT-2 murine bladder cancer cell lines in comparison to alpha MA of BCG and Rhodococcus, respectively.

研究分野：癌治療

キーワード：抗酸菌 ビーシージー 癌免疫 癌治療 ミコール酸

1. 研究開始当初の背景

土壤菌菌体成分であるミコール酸による抗腫瘍免疫剤の開発

表在性膀胱癌には抗酸菌である *Mycobacterium bovis* BCG 膀胱内注入療法が行われるが、その最大の免疫賦活菌体成分としてはミコール酸 (Mycolic acid (MA)) が考えられる。MA は抗酸菌に最も特徴的な細胞壁機能分子で、長鎖アルキルヒドロキシ大長鎖脂肪酸であるが、*Mycobacteria*、*Rhodococcus* 及び *Nocardia* に広く分布し、その構造は菌種により著しく変化に富む。MA はこれらの菌の疎水性や抗酸性の維持に必須の細胞表層脂質成分であるが、最近結核菌 MA はフロイドのコンプリートアジュバントの免疫増強活性を担う中心的な役割を演じていることが明らかとなっている。また MA の抗原提示分子として CD1b や CD1d の存在も解明され(1994)、MA がヒト結核抗体と特異的に反応することも報告されている(1999)。さらに結核菌 MA のリポソーム製剤が気道過敏症モデルでマクロファージの泡沫化を介して自然免疫による Th1 免疫を誘導し、Th1 サイトカイン産生により治療効果を発揮することが報告された(2005)。そこで MA を安定的に抽出し、これを用いることで新しい癌治療に応用できるかを検証する。

2. 研究の目的

Rhodococcus や *Nocardia* は、*Mycobacteria* に近縁で自然界に広く分布する土壤細菌であるが結核菌と同様の抗酸性を示すものが多数あり、いずれも MA を産生するが毒性は低く、発育環境は、好低温性、低栄養性で迅速性とみ培養は容易である。そこでわれわれはこれらの菌の細胞壁から MA 及び MA 含有糖脂質 (TDM、TTM、TMM や GM) を抽出単離し、どのような構造の MA が強力な Th1 免疫増強効果を示すかについて、リポソーム化するとともに検証を試みる。MA には炭素数が長鎖の

ものから短鎖のものまで種々あり、また不飽和度についても各種ある。これら種々の MA は、MA リポソームを形成する際に、膜構造と相転移温度等 MA の物理化学的性質がリポソームの形状に反映し、免疫調節活性に大きく関与していることが予想される。

3. 研究の方法

種々の *Mycobacteria* 属から MA を抽出する方法を確立する。

DOPC、DMPC、DLPC とデンドリマーを用いて**カチオンリポソーム**を作成する

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

マウス皮下接種モデルで抗腫瘍効果の検討する。

MA を抽出する菌種の選定

一般に抗酸菌に属する菌種はすべて、MA を含有している。さらに *Nocardia* や *Rhodococcus* 属ら *Actinomycetales* 属菌の細胞壁成分にも MA を含有している。しかし、MA は菌種により構造が異なり、C30 程度のものから、C88 以上の長鎖のものまで多岐にわたる。また、MA は、メトキシ及びケトミコール酸の3脂質から構成されている。現時点では、膀胱癌治療に用いている BCG Tokyo172 株や *Rhodococcus aurantiacs* から MA を抽出しているが、他菌種に、より活性が強く、安定した MA が存在するか検証する。すでに、MA の基本的な抽出方法は確立している。

抽出した MA を親水性リポソーム化する。

リポソーム化の方法はすでに確立しているが、リポソーム製剤は、生体へ投与したとき、薬物運搬 (D.D) を効率的に行い、細胞内へシグナルを完全に送達出来ることが必要である。そのために膜透過性の高い、シグナル伝達分子 (Kinase 類) との結合性のよい脂質組成を選びだす必要がある。ゆえに脂質の膜流

動性は高いほうがよい。MA リポソーム製剤は、一般に MA 自身の膜流動性が低いので、できるだけ膜流動性の高い MA を使うことと、これを運搬するリポソーム粗材のリン脂質も膜流動性が高いことが必要である。従ってできるだけ相転移温度 (T_m) の低い脂質成分の組み合わせがよいことになる。

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、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。また MA、リポソームの原料である DOPC、DLPC、DMPC やコレステロールの仕込み濃度、相転移温度、MA の破碎条件など決定すべき条件が種々あるので、これらパラメータを検討する。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。

マウス皮下接種モデルで抗腫瘍効果の検討



上: MA
 下: コントロール

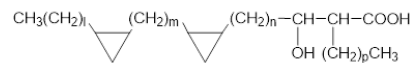
マウス膀胱癌皮下接種モデルを用いた抗腫瘍効果に最適な製剤のスクリーニングを行う。

皮下接種に使用する細胞株: C3H/HeN マウス由来の膀胱癌細胞株 (MBT-2) および C57BL/6 マウス由来の MB49 膀胱癌細胞株を用いる。マウス一匹あたり 5×10^4 cells を 50ul の溶液に懸濁して使用し、23G の注射針を用いてマウスの背部皮下に製剤とともに接種する。形成した腫瘍のサイズを経時的に皮下接種から 4 週まで記録し、各群の腫瘍サイズを統計的に解析する。

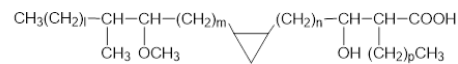
4. 研究成果

1. MA の抽出: 安定的に MA を抽出することが可能となった。さらに MA のサブクラスである、メトキシ、ケト MA に分離し、それぞれをマス解析し、正しく抽出されていることを確認した。

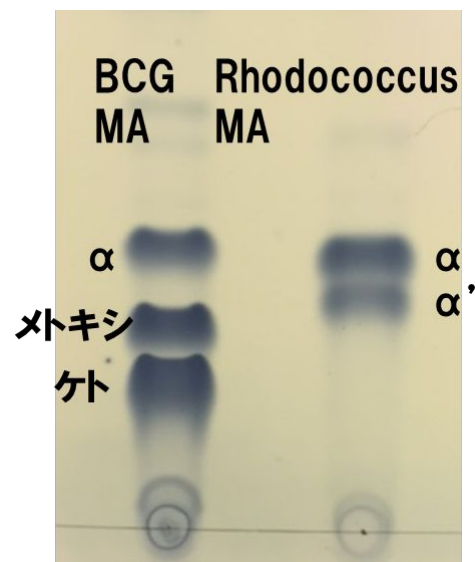
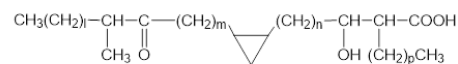
alpha-Mycolic acids



Methoxy-Mycolic acids



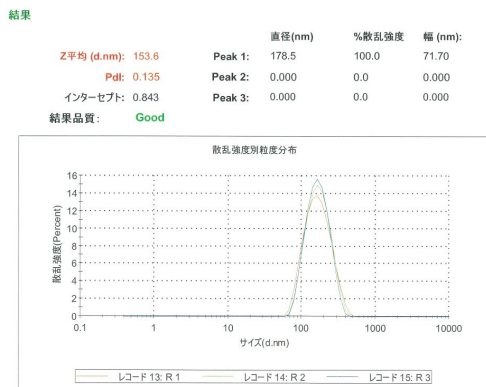
Keto-Mycolic acids



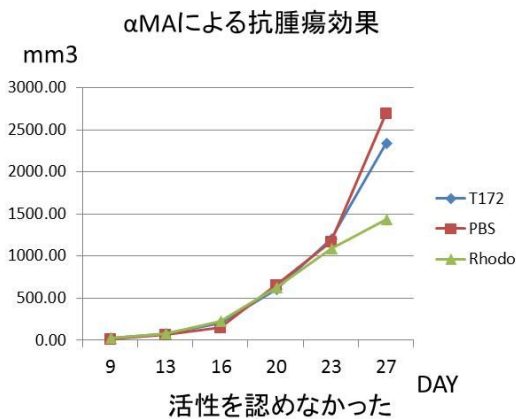
2. MA リポソームの作成: DOPC、DLPC、卵黄

レクチンなどを用いてリポソーム化を図った。その結果毒性のないリポソームは DOPC を用いることで、作成可能となった。

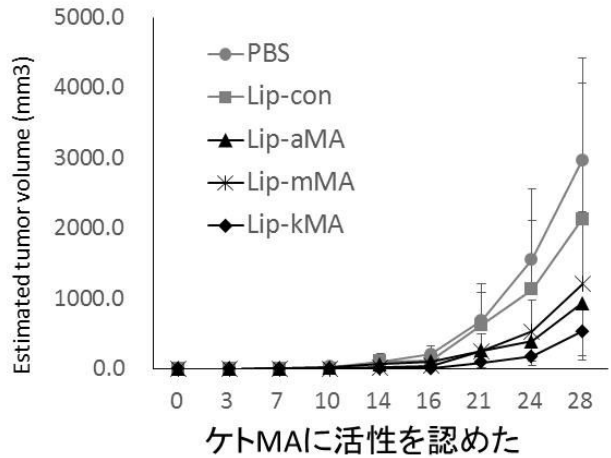
3. 作成したリポソームの性質：粒子径は 200nm 以下まで縮小させることが可能となった。MA は陰性の電荷であり、細胞送達性に問題が生じたため、デンドリマーを付加することで陽性の電荷に変化し、細胞送達性が格段と上昇した。電子顕微鏡でも小径粒子であることが確認できた。



4. 正所性モデルによる抗腫瘍効果：ロドコッカスや T172 の MA で抗腫瘍活性を評価すると、全く活性を得ることができなかった。



すなわち MA には抗腫瘍活性がないことがわかった。メトキシおよびケト MA においては、抗腫瘍活性を得ることができ、この結果を基に特許申請を行った。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

1. Antitumor effect of cationic liposome incorporating keto-mycolic acid from *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin in mouse model.
Takayuki Yoshino, Jun Miyazaki, Takahiro Kojima, Shuya Kandori, Hideyuki Akaza, Ikuya Yano, Hiroyuki Nishiyama; 2018 Genitourinary Cancers Symposium サンフランシスコ 2018年2月9日
2. Antitumor effect of liposome incorporating mycolic acid of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin in mouse model, Takayuki Yoshino, Jun Miyazaki, Hiroyuki Nishiyama, Hideyuki Akaza, Ikuya Yano 第74回日本癌学会学術総会パシフィコ横浜 2017年9月28日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 1 件）

名称：リポソーム、抗癌剤及び癌治療用キット

発明者：宮崎淳、西山博之、吉野喬之、赤座英之

権利者：筑波大学、東京大学

種類：特許願

番号：2017-042228

出願年月日：平成 29 年 3 月 6 日

国内外の別：国内

6 . 研究組織

(1)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