

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：32206

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11124

研究課題名(和文) 土壌抗酸菌細胞壁成分の糖脂質によるアジュバント製剤の開発

研究課題名(英文) Development of new adjuvant using glycolipids from mycobacterium bovis BCG

研究代表者

宮崎 淳 (Miyazaki, Jun)

国際医療福祉大学・医学部・主任教授

研究者番号：10550246

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：筋層非浸潤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。その最大の免疫賦活細胞壁成分は、天然では疎水性の極めて強い長鎖脂肪酸のミコール酸を含んだ糖脂質trehalose-6,6'-dimycolate(TDM)である。TDMは、宿主免疫細胞表面に発現するC型レクチンのMincleにより認識される。そのため、近年アジュバント製剤としての可能性が考慮されているものの、結核菌TDMは毒性があり疎水性も強いいため、製剤開発が出来なかった。そこで、TDMをリポソーム化し親水性にすることで、新規アジュバント製剤を開発し、新しい癌免疫治療の提案を行う。

研究成果の学術的意義や社会的意義

TDMのリポソームを最適化し、アジュバント活性を最大限有効になるよう調節することで、新しい癌免疫療法にむけたシーズとなる。TDMリポソームは、非生菌であることから、BCG菌のような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、静脈内投与も含めたあらゆる投与方法が可能である。したがって、安全性と有効性の点で最も優れた治療薬として期待される。本研究は最も臨床的有用性の明らかな、安定した毒性の低い安価な癌免疫アジュバント製剤として期待される。

研究成果の概要(英文)：Mycobacterium bovis BCG is given for non-muscle invasive bladder cancer. Its largest immunostimulatory cell wall component is the glycolipid trehalose-6,6'-dimycolate (TDM) which contains long chain fatty acid mycolic acid. TDM is recognized by the Mincle, a C-type lectin expressed on the surface of host immune cells. Therefore, we develop a new adjuvant formulation by using TDM into liposome and make TDM hydrophilic, TDM liposome propose a new cancer immunotherapy.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：BCG 癌免疫 TDM Mincle 自然免疫

1. 研究開始当初の背景

筋層非浸潤性膀胱癌には抗酸菌である *Mycobacterium bovis* BCG 生菌の膀胱内注入療法が行われる。以前、我々は親水性カチオンリポソームによる BCG 細胞壁の製剤化を試み、細胞親和性を高め、癌細胞質内に菌体細胞壁脂質成分を効率的に輸送できる製剤を開発した(図1)(特許取得、J Control Release. 2014 Feb 28; 176: 44-53., J Control Release. 2014 Dec 28; 196:161-7. 【欧州特許番号 2891495】、【米国特許番号 9,717,687】、【日本特許第 6238366 号】)。これによりラット BBN 発癌モデルにおいて、抗腫瘍効果が示されることを報告し、BCG 生菌でなくとも、BCG 細胞壁成分に抗腫瘍効果があることを証明した。しかし、このときの製剤は粒子径が大きく、取り扱いが困難であった。BCG も含めて、*Mycobacterium*、*Nocardia*、*Rhodococcus* 等の Actinomycetales Mycolata に属する細菌細胞壁の最も大きな特徴は、天然では疎水性の極めて強い長鎖分枝脂肪酸であるミコール酸(MA) (図2) を含む糖脂質 TDM (trehalose-6,6'-dimycolate(TDM)(図3)である。TDM は、当初 1950 年代から有毒結核菌の細胞壁を構成する疎水性成分で感染宿主に結核様肉芽腫病変を形成することから病原因子としてその性質が注目された。その後 TDM は殆ど全ての抗酸菌に広く分布することが明らかになり、強力な immunomodulator として宿主/寄生体関係の面から関心が持たれている。TDM の構造は、トレハロースの 6、6' 位の水酸基に、Actinomycetales Mycolata 特有の脂肪酸である MA が 2 分子エステル結合した糖脂質である。MA は 1 位に分枝鎖を、6 位に水酸基を有する超高級脂肪酸である。

近年新しい癌免疫療法として、PD-1、PD-L1 阻害剤などの免疫チェックポイント阻害剤による治療が急展開を示している。しかし、免疫チェックポイント阻害剤による癌免疫療法はまだ奏効率も低いため、より免疫を活性化させる方法が必要である。そこで、免疫チェックポイント阻害剤の効果を、TDM がアジュバント製剤としてより活性化させることができれば、新しい癌治療法を提示できる。しかし、TDM は高分子の分枝脂肪酸を構成成分としているため、油性懸濁液としてしか投与ができず、活性の解析は困難であった。これまでに、我々は MA をリポソーム化しマウス皮下接種モデルに投与できる製剤の開発を行ってきたことから (PLoS One. 2019 Jan 4;14(1):e0209196.doi: 10.1371/journal.pone.0209196. eCollection 2019.)、本研究では、TDM をリポソーム化し親水性にすることで、ヒトに対して有用なアジュバント製剤を開発することを目的とする。

TDM は天然で免疫アジュバント活性があるといわれていたものの、炭素数が C80 前後と長いことから、疎水性が強く臨床応用された例はない。また抗腫瘍効果について検討した報告もない。TDM は種々の土壌中抗酸性細菌の細胞壁成分であることから、有望視される菌種から TDM をスクリーニングして抽出単離することで、TDM を用いた新規アジュバント製剤の開発を行う。

2. 研究の目的

Nocardia や *Rhodococcus* は、*Mycobacteria* に近縁で自然界に広く分布する土壌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 TDM を産生するが毒性は低い。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。そこで我々はこれらの菌の細胞壁から TDM を抽出単離し、どのような構造の TDM が強力な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。TDM の構成 MA には、炭素数をはじめ、不飽和度、メトキシ、ケト、ワックスエステルミコール酸など極性の異なる物が多数あり、各 MA の生物活性も多彩である。これら種々の TDM は、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

抽出した TDM を親水性リポソーム化する。

親水性カチオンリポソームによる抗腫瘍効果

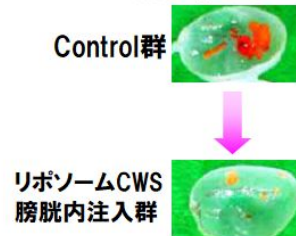


図1 BCG-cell wall skeletonにより抗腫瘍効果が得られた。

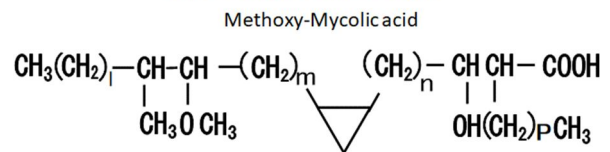


図2 ミコール酸の構造式

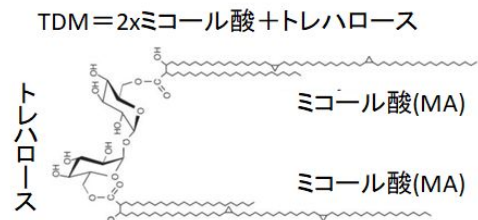


図3 TDMの構造式

MA のリポソーム化の方法はすでに我々の研究室で確立している（特許申請中）。同様の方法を用いて、TDM のリポソーム化をはかる。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。そのために表面電位が高く膜結合性の良好な、さらには膜透過性の高い、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。TDM リポソーム製剤は、一般に TDM 中の 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 TDM を使うことと、これを運搬するリポソーム基剤のリン脂質も膜流動性が高いことが必要である。そこで、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の測定をする。

リポソームの粒子径、表面電位および粒子の分散性の測定、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。すでに、測定方法は実験室で確立している。また TDM、リポソームの原料である DOPC やコレステロールの仕込み濃度、TDM 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した

マウス皮下接種モデルでの抗腫瘍効果を検証する。

選択した TDM リポソーム製剤を、マウス皮下接種モデルを用いて、抗腫瘍活性の有無を検証する。

<マウス膀胱癌皮下接種モデルについて>（図4）

皮下接種に使用する細胞株：C57BL/6 マウス由来の MB49 膀胱癌細胞株、MC38 台帳癌細胞株、メラノーマ細胞株を用いる。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学的に解析する。実験方法は確立している。抗腫瘍効果を確認したため、腹腔内投与モデル、後打ちモデルでも検討した。

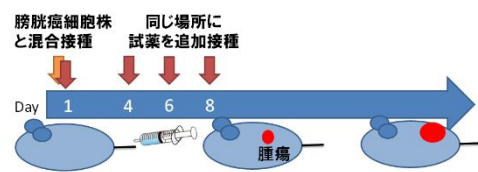


図4

作成したリポソームの活性を評価する。

TIL (tumor infiltrating lymphocytes) の解析を行い、リンパ球や樹状細胞の活性を評価した。

4. 研究成果

BCG に抗腫瘍効果があるのは、抗酸菌細胞壁の最も大きな特徴である、疎水性の極めて強い長鎖分枝脂肪酸のミコール酸(MA)によると考えられる。そのなかでもケトミコール酸は活性が高く、マウスモデルでの抗腫瘍効果には CD8 リンパ球が関与していることを明らかにした(PLoS One. 2019 Jan 4;14(1):e0209196.doi: 10.1371/journal.pone.0209196. eCollection 2019.)。現在はミコール酸単剤より、TDM のほうが活性が高いため、TDM を用いて癌免疫ワクチンの開発を行っており、論文投稿準備中である。

抗酸菌である BCG は筋層非浸潤性膀胱癌に対する最大の癌免疫療法剤である。その抗腫瘍効果は、宿主の全身免疫系を介して生体内の細胞性免疫を活性化することで発揮するとされる。この原理は、生体内のウイルス、細菌への感染防御システムを巧みに利用したがん免疫療法であるとされるが、いまだその作用メカニズムは完全に解明されていない。抗酸菌を利用した癌治療は、いずれも生菌による長期の刺激に伴う高い効果が期待できる反面、感染のリスクが避けられないこと、死菌では短期間の刺激に止まり、効果が持続しない欠点がある。また、大手製薬企業の BCG 製造からの撤退は、世界中の BCG shortage を引き起こしており、生菌を使わない、新しい癌ワクチン製剤の開発は、期待されている製剤である。そこで BCG の活性本体と考えられる TDM (trehalose-6,6'-dimycolate) を合成した製剤を開発できれば、生菌であることによる応用限界を克服でき、新規の癌治療法を提案するものである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yoshino T, Miyazaki J, Kojima T, Kandori S, Shiga M, Kawahara T, Kimura T, Naka T, Kiyohara H, Watanabe M, Yamasaki S, Akaza H, Yano I, Nishiyama H.	4. 巻 1
2. 論文標題 Cationized liposomal keto-mycolic acids isolated from Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin induce antitumor immunity in a syngeneic murine bladder cancer model.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLoS One.	6. 最初と最後の頁 e0209196
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0209196.	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 Miyazaki J, Onozawa M, Takaoka E, Yano I.	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Bacillus Calmette-Guerin strain differences as the basis for immunotherapies against bladder cancer	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Int J Urol	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/iju.13538	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Masanobu Shiga, Jun Miyazaki, Ikuya Yano and Hiroyuki Nishiyama
2. 発表標題 The liposome trehalose dimycolate extracted from M. Bovis BCG induce antitumor immunity via dendritic cells and CD8 T cells
3. 学会等名 第79回日本癌学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takayuki Yoshino, Jun Miyazaki, Takahiro Kojim, Shuya Kandori, Hideyuki Akaza, Ikuya Yano, Hiroyuki Nishiyama
2. 発表標題 Antitumor effect of cationic liposome incorporating keto-mycolic acid from Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin in mouse model.
3. 学会等名 ASCO-GU (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takayuki Yoshino, Jun Miyazaki, Takahiro Kojima, Shuya Kandori, Hideyuki Akaza, Ikuya Yano, Hiroyuki Nishiyama
2. 発表標題 Antitumor effect of cationic liposome incorporating keto-mycolic acid from Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guérin in mouse model
3. 学会等名 ASCO-GU (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takayuki Yoshino, Jun Miyazaki, Hiroyuki Nishiyama, Hideyuki Akaza, Ikuya Yano
2. 発表標題 Antitumor effect of liposome incorporating mycolic acid of Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin in mouse model
3. 学会等名 第74回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 非結核性抗酸菌感染症診断用キット、リポソーム	発明者 西山博之、志賀正宣、渡邊真広、宮崎淳、矢野郁也	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2019-047750	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 リポソーム、抗癌剤及び癌治療用キット	発明者 宮崎淳、赤座英之、吉野喬之、西山博之	権利者 筑波大学、東京大学
産業財産権の種類、番号 特許、】PCT/JP2018/008560	出願年 2018年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔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	木村 友和 (Kimura Tomokazu) (10633191)	筑波大学・医学医療系・講師 (12102)	

6. 研究組織 (つづき)

	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	西山 博之 (Nishiyama Hiroyuki) (20324642)	筑波大学・医学医療系・教授 (12102)	
研究 分担者	神鳥 周也 (Kandori Syuya) (50707825)	筑波大学・医学医療系・講師 (12102)	
研究 分担者	矢野 郁也 (Yano Ikuya) (60047008)	大阪市立大学・大学院医学研究科・名誉教授 (24402)	