

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2016

課題番号：24592372

研究課題名(和文) BCG抵抗性膀胱癌の糖鎖プロファイル同定とナノパーティクルBCGによる治療薬開発

研究課題名(英文) The identification of glyco-form profile in BCG-resistant bladder cancer and the creation of therapeutic drug using nanoparticle BCG

研究代表者

盛 和行 (Mori, Kazuyuki)

弘前大学・医学研究科・助教

研究者番号：40266903

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：筋層非浸潤性膀胱癌に対するBCG膀胱内注入療法は有効な治療法であるが、BCG抵抗性と生菌感染による副作用の存在が重要な問題である。本研究では、BCG抵抗性のモデルとして細胞株とBCG生菌を継続培養することによりBCG抵抗性細胞を樹立した。BCG抵抗性細胞に対してBCG菌株を交替すると有効であるが、継続すると短期でdouble抵抗性となった。このdouble耐性細胞株に対してもナノパーティクルBCGが有効であることが明らかとなった。臨床的に菌株交替療法からナノパーティクルBCGへのsequential療法の有用性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Intravesical BCG therapy is effective treatment for non-muscle invasive bladder cancer, however, BCG failure and side effect through live bacterial infection are remaining. In this study, the model of BCG failure were developed by continuous co-culture of tumor cell lines with live BCG. The change of BCG strain (e.g. Tokyo 172 strain to Connaught strain) was effective against BCG resistant cells, however, cells became double resistant shortly. Nanoparticle BCG was effective against BCG double resistant cells. These results suggested that the sequential therapy, the change of BCG strain, and then nanoparticle BCG, might be effective in clinical setting.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：BCG ナノパーティクルBCG 糖鎖構造解析 膀胱癌

1. 研究開始当初の背景

(1) 関連研究動向

BCGやマイコバクテリウムの菌体成分は、国内ではBCG-CWS (BCG細胞壁成分)が肺癌、白血病、前立腺癌DC療法などへの臨床応用が行われ、さらにリポソーム化した製剤の基礎研究が行われている。海外ではMCWE (*M. phlei* cell wall extract) や mycobacterial cell wall-DNA complexがヒト膀胱癌への臨床応用が試みられている。菌体成分は広く免疫能活性化能があると報告されているが、まだ十分に臨床応用されているとは言えない。また、細胞壁成分以外の可溶性成分についても十分な研究は行われていない。

core 2 *N*-acetylglucosaminyltransferase (C2GnT) (注1)は糖転移酵素の一つであり、C2GnTが発現する前立腺癌、膀胱癌は悪性度が高いことが報告されている。膀胱癌においては、C2GnT発現によりNK細胞が腫瘍細胞を認識するリガンドであるMICAに糖鎖を付加させることで、NK細胞の認識や活性化を回避し、転移能を獲得することを明らかにした (Tsuboi S他, EMBO J, 2011)。C2GnTは膀胱癌の悪性化においてキーとなる分子であるが、BCG生菌やナノパーティクルBCGの効果とメカニズムの関連は明らかではない。

(2) 着想経緯・研究状況

筋層非浸潤性膀胱癌に対するBCG療法は有効な治療法であるが、BCG生菌感染に由来する副作用の存在が依然残存している。申請者はBCGを物理的に破壊し菌体成分とすることにより、効果は生菌と同等で副作用の少ない新たなBCGをつくることを目指してきた。

申請者は、平成20年度～平成23年度において科研費基盤研究(C)「ナノパーティクルBCGによる副作用のない膀胱療法の開発」により研究を行った。その結果、ナノパーティクルBCGは、BCG生菌と異なる作用機序で効果を発揮し、生菌無効例でも有効であることが示され、正常細胞には影響しないことが明らかとなった。このことは臨床応

用上、再発例や無効例、他臓器腫瘍への応用が可能であることを示唆し、副作用の低減も示唆されることから、有効性を公証に実証することができた。

さらに申請者は、C2GnTを発現する細胞ではBCG生菌は効果がなく、一方ナノパーティクルBCGは有効であることを明らかにした。腫瘍細胞は、C2GnTを発現することで細胞表面の糖鎖構造を変化させ、BCG生菌の接触や内在化を阻害し、BCG生菌の直接効果を無効化すると考えられ、C2GnT発現は臨床的にBCG failureの原因の一つと示唆された。このことから、BCG膀胱前にC2GnT発現や糖鎖プロファイルを解析することで、事前に抵抗性を判定することが期待される。一方、ナノパーティクルBCGはナノメートルサイズとしたことにより接触や内在化が阻害されず、直接効果を示すと考えられた。

注1：C2GnTは現在、Glucosaminyl(*N*-Acetyl)Transferase, Core 2 (GCNT1)と表記されている。

2. 研究の目的

本研究では、GCNT1発現と糖鎖構造変化の解析によるBCG抵抗性膀胱癌判定法の開発と、ナノパーティクルBCGの生菌無効例への治療薬としての開発を最終目的とし、本研究で樹立したBCG failureモデルを用いた基礎的検討を中心に行った。

3. 研究の方法

(1) BCG failureモデルの作成

膀胱癌細胞株T24、5637を用いてBCG生菌(日本株またはコンノート株)と継続的混合培養を行った。継代時に生細胞数を測定し、対照のBCG無添加と有意差がなくなった時点耐性を判定した。図1に日本株を用いた作成の概要を示す。

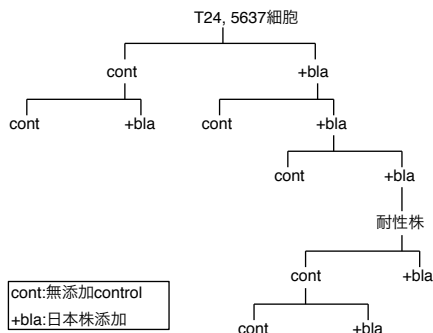


図1. 日本株BCGを用いたBCG failureモデル作成の概要

(2)BCG菌株交替療法モデルの検討

得られた耐性化細胞をBCGの菌株を交替して混合培養し、生細胞数を測定、チールネルゼン染色によりBCG生菌の接触率を測定した。

(3)ナノパーティクルBCGの効果検討

得られた耐性化細胞をナノパーティクルBCGと混合培養し、生細胞数を測定した。

(4)double耐性株の作成

5637細胞を用いて日本株→コンノート株、コンノート株→日本株の順に両株に耐性化した細胞を作成した。得られたdouble耐性化細胞をナノパーティクルBCGと混合培養し、生細胞数を測定した。

(5)KK47細胞を用いた遺伝子発現解析

KK47細胞を用いて耐性株を作成し、無添加の対照と日本株耐性株を用いて遺伝子発現解析に着手した。

4. 研究成果

(1)BCG failureモデル細胞の樹立

図2に耐性化までの生細胞数の推移の一例を示す。T24細胞では耐性化に45代、5637細胞では20代を要した。耐性化する前にBCGを一旦除去すると増殖は回復した。このことから、maintenance療法の必要性が示唆された。一方、耐性化後一旦BCGを除去し再び添加しても耐性化したままであり、臨床的にBCG failureになった場合に同株の追加のBCG

療法は無効であることが示唆された。

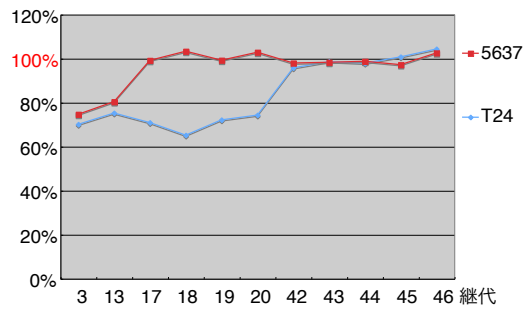


図2. T24細胞及び5637細胞の耐性化までの生細胞数の推移の一例

(2)BCG菌株交替療法モデルの有効性

BCG failureに対する治療optionとしてBCG菌株交替療法が考えられる。T24細胞ではコンノート株に耐性化すると日本株も無効となることが明らかとなり、日本株は1st lineとして利用した方がいいと示唆された。5637細胞ではいずれの向きでも有効であり、菌株交替療法の有用性が示唆された。(注2)

チールネルゼン染色の結果、耐性化するとBCG生菌の接触率が低下することが明らかとなった(図3)。一方、菌株を交替すると交替したBCG生菌の接触率は対照と同等であった。このことからBCG生菌が接触できなくなることが耐性化の一因であることが示唆された。

注2：平成28年(2016年)末にコンノート株の製造中止が決定された。BCG failureへの一つのoptionである菌株交替療法は、国内に新たな株が導入されるまでは実現されない見通しとなった。国内にとどまらず、今回のBCG shortage(供給停止)は世界的に問題となっており、今後は次世代BCGの開発が期待されている。

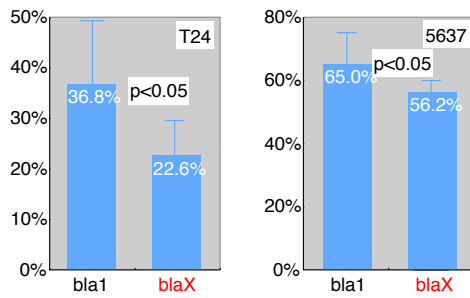


図3. チールネルゼン染色による耐性細胞株での染色率(%)低下

bla1: 親株に1回だけ日本株BCGを添加

blaX: 日本株BCG耐性細胞株に日本株BCGを添加

(3) ナノパーティクルBCGの有効性

5637細胞では耐性株に対してナノパーティクルBCGが有効であり(図4)、BCG failureに対する治療薬としての可能性が示唆された。

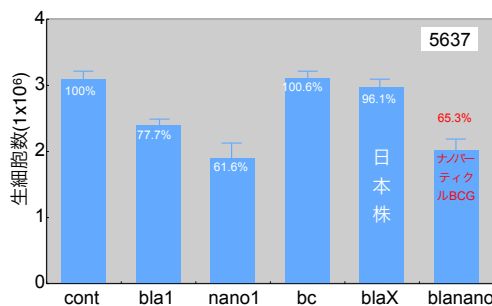


図4. 5637細胞に対するナノパーティクルBCGの効果

cont: 親株無添加培養

bla1: 親株に1回だけ日本株BCGを添加

nano1: 親株に1回だけナノパーティクルBCGを添加

bc: 日本株BCG耐性細胞株無添加培養

blaX: 日本株BCG耐性細胞株に日本株BCGを添加

blanano: 日本株BCG耐性細胞株にナノパーティクルBCGを添加

(4) double耐性株の樹立

BCG failureに対する菌株交替療法は一つのoptionであった(注2)が、菌株を交替してもやがて耐性化するのか検討した。最初の耐性化には約20代を要したが、菌株を交替した

double耐性株は日本株→コンノート株、コンノート株→日本株いずれも約10代で耐性化した。このことから、臨床的に交替療法は有効ではあるものの、BCG注入を継続した場合BCG failureは最初の株よりも早期に訪れる可能性が示唆された。

ナノパーティクルBCGはいずれのdouble耐性株でも生細胞数を有意に低下させた(図5)。細胞は一部の視野でdrasticな細胞死を示した。結果のまとめを表1に示す。今後、経時的動画撮影により形態学的変化を捉える予定である。

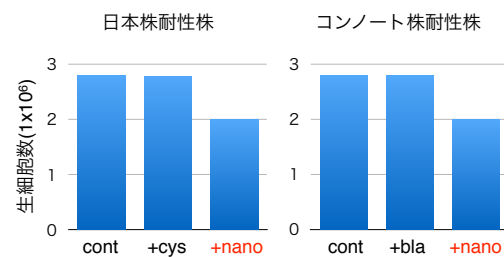


図5. 5637double耐性株に対するナノパーティクルBCGの効果

cont: 無添加培養

+cys: 日本株→コンノート株の耐性状態

+bla: コンノート株→日本株の耐性状態

+nano: ナノパーティクルBCGを添加

表1. 5637double耐性株のまとめ

	日本株→ コンノート株	コンノート株 →日本株
耐性化	20代	20代
接触率*	低下	低下
交替	○	○
接触率*	不変	不変
double耐性化	10代	10代
ナノパーティクルBCG	○	○

*: vs 親株

(5) KK47細胞を用いた遺伝子発現解析

KK47細胞では耐性化に日本株、コンノート株いずれも約86代を要し、他の細胞株よりも長期であった。耐性化した細胞は菌株により形態が異なり、異なるメカニズムで耐性化したことが示唆された。耐性化するとBCG生菌の接触率は低下したが、菌株を交替すると接触率は対照と同等であった。いずれもナ

ノパーティクルBCGは有効であった。(未発表データ)

KK47細胞はGCNT1を発現させるとBCG生菌に耐性化することを明らかにしている。この点を証明するため、無添加の対照と日本株BCG耐性細胞株を用いて遺伝子発現解析に着手した。平成29年度現在、結果の解析を行っているところである。

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3件)

①古家 琢也、大山 力 (11人中2番目)、盛 和行 (11番目) 他、Oncological outcomes of a single but extensive transurethral resection followed by appropriate intra-vesical instillation therapy for newly diagnosed non-muscle-invasive bladder cancer. *Int Urol Nephrol.* 47(9): 1509-14(2015). 査読有

②盛 和行、薬物療法の新展開 - ナノパーティクルBCG- *泌尿器外科.* 28(2):151-4(2015). 査読無 (総説)

③鈴木 裕一郎、盛 和行 (14人中4番目)、大山 力 (13番目) 他、MUC1 carrying core 2 O-glycans functions as a molecular shield against NK cell attack, promoting bladder tumor metastasis. *Int J Oncol.* 40(6):1831-8(2012). 査読有

〔学会発表〕(計13件)

①盛 和行他、BCG生菌double耐性株に対するナノパーティクルBCGの直接効果、第9回BCG注入療法研究会(2016年12月02日)ベルサール東京日本橋(東京都中央区)

②盛 和行他、BCG菌株交替療法についての基礎的検討と耐性化メカニズムの解析、第104回日本泌尿器科学学会総会(2016年04月22日~2016年04月25日)仙台国際会議場他(宮城県仙台市)

③盛 和行他、BCG菌株交替療法についての基礎的検討、第8回BCG注入療法研究会(2015年11月13日)都市センターホテル(東京都千代田区)

④盛 和行他、コンノート株BCG生菌耐性細胞株に対する日本株BCG生菌の効果:交替療法への示唆、第53回日本癌治療学会学術集会(2015年10月29日~2015年10月31日)国立京都国際会館他(京都府京都市)

⑤盛 和行他、日本株BCG耐性細胞株に対するナノパーティクルBCGによる新たな治療薬としての可能性、第7回BCG注入療法研究会(2014年11月21日)如水会館(東京都千代田区)

⑥盛 和行他、日本株BCG耐性膀胱癌細胞株に対するコンノート株及びナノパーティクルBCGの直接効果、第52回日本癌治療学会学術集会(2014年08月28日~2014年08月30日)パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

⑦盛 和行他、コンノート株BCGは日本株BCG耐性膀胱癌細胞株に対して直接効果を有する、第102回日本泌尿器科学会総会(2014年04月24日~2014年04月26日)神戸国際会議場他(兵庫県神戸市)

⑧盛 和行他、日本株BCG耐性膀胱癌細胞株の作出、第6回BCG注入療法研究会(2013年11月22日)如水会館(東京都千代田区)

⑨盛 和行他、BCG抵抗性膀胱癌細胞株作出の試み:BCG failureの原因を探るために、第51回日本癌治療学会学術集会(2013年10月24日~2013年10月26日)京都国際会館他(京都府京都市)

⑩盛 和行他、BCG細胞膜成分PIMによるナノパーティクルBCG無効株に対する直接効果、第5回BCG注入療法研究会(2012年11月30日)経団連ホール(東京都千代田区)

⑪盛 和行他、BCG細胞膜成分PIMのBCG failure 治療薬としての可能性、第50回日本癌治療学会学術集会(2012年10月25日~2012年10月27日)パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

⑫盛 和行他、Nanoparticle BCG has identical direct antitumor effect as live BCG, but has a different antitumor mechanism、第107回米国泌尿器科学会(AUA)(2012年05月19日~2012年05月23日)アトランタ(米国)

⑬盛 和行他、BCG細胞膜成分PIMはBCG生菌やナノパーティクルBCG無効細胞株に対し直接効果を示す、第100回日本泌尿器科学会総会（2012年04月21日～2012年04月24日）パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）

〔図書〕（計 0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

盛 和行 (MORI KAZUYUKI)
弘前大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：40266903

(2)研究分担者

大山 力 (OHYAMA CHIKARA)
弘前大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：80282135

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

矢野 郁也 (YANO IKUYA)
日本ビーシージー製造株式会社・研究開発顧問（研究職）（平成28年退職）