

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462397

研究課題名(和文) BCG細胞莢膜成分を用いた、全身投与可能な新規癌治療剤の開発

研究課題名(英文) Antitumor effect of liposome incorporating mycolic acid of Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guérin in mouse model.

研究代表者

宮崎 淳 (MIYAZAKI, Jun)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：10550246

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：MAの抽出をおこなった。メトキシ、ケトミコール酸のMAの抽出及びカラム精製後のマス解析による脂質の同定した。安定的にMAの抽出技術を確立することが出来た。MA抽出後のリポソーム化を行った。DOPCやデンドリマーを用いることで親水性にすることが出来た。リポソーム後は電子顕微鏡で確認すると、200nm以下の粒子になっていることが確認できた。マウス皮下接種モデルによる抗腫瘍効果を検証した。選択したMA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した。その結果、抗腫瘍効果を得ることが出来た。この成果を元に、特許を申請した。

研究成果の概要(英文)：Introduction and Objectives. Intravesical instillation of live bacillus Calmette-Guerin (BCG) is established immuno therapy of non-muscle invasive bladder cancer. Mycolic acids (MA) are the dominant lipids found in the cell wall of Mycobacterium species. We developed novel liposome incorporating MA and examined antitumor effects of MA. Methods. MA was isolated from M. bovis BCG Tokyo, and separated into three subclasses (alpha, methoxy and keto). Liposomes are prepared by sonication and extrusion. C57BL/6 mice were subcutaneously inoculated with a mixture of MB49 cells and PBS or liposome with/without MA followed by additional injection of PBS or liposome. Tumor growth was monitored. Results. Tumor growth was significantly suppressed in mice treated with Keto MA-liposome (p=0.007 vs PBS). Conclusion. Keto MA-liposome showed antitumor effects in mouse.

研究分野：泌尿器科

キーワード：膀胱癌 ビーシージー ミコール酸 癌免疫 感染免疫 脂質免疫

### 1. 研究開始当初の背景

Mycobacterium bovis BCG は現在でも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。BCG 生菌の抗腫瘍効果は、癌細胞や癌組織内の抗原提示細胞へ生菌が取り込まれることから始まる。BCG 生菌は癌細胞内や抗原提示細胞で分解酵素の貯蔵庫であるライソソームまで輸送されて分解を受け、その際生じる BCG 由来の抗原が MHC Class II を介して細胞膜表面に提示される。生体内の免疫担当細胞である CD4T 細胞は、BCG 由来の抗原を提示した細胞を異物として認識し、IFN、IL-2 等の各種サイトカインを産生して、非特異的な細胞殺傷能力を有する NK 細胞や LAK 細胞を活性化することで癌細胞を殺傷する。このように、BCG 生菌は癌細胞内へ

#### BCG生菌の場合



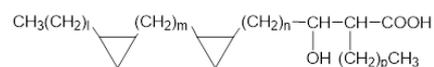
直接作用するばかりではなく、宿主の全身免疫系を介して生体内の細胞性免疫を活性化することで抗腫瘍効果を発揮する。この原理は、生体内のウイルス、細菌への感染防御システムを巧みに利用したがん免疫療法である。しかし、筋層浸潤癌や転移性癌、進行癌に対しては使用されていない。そもそも、BCG の進行がん、転移がんへの応用は悪性黒色腫に対する局所注入療法をはじめとして 1960-70 年代に精力的に行われた。最近では加熱処理された Mycobacterium vaccae を用いた臨床試験が進行非小細胞肺癌 (Eur J Cancer 44:224-227, 2008) 及び転移腎がん (Eur J Cancer 44:216-223, 2008) を対象に行われ、さらに、最近 M. Obuense 加熱死菌体を用いた進行性膵癌に対する化学療法剤との併用効果についても報告がある (Dalglish et al. 2016)。これらは、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。これらの欠点を避けて転移腫瘍や進行癌に対する応用拡大を図るため、高い免疫効果を示す菌体成分を利用する方法が最も期待される所以である。以前、我々のグループは親水性ミセルとして、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 (BCG-cell wall skeleton) を効率的に輸送できる製剤の開発を試みた。その結果ラット 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 (\*Anticancer Research 2011)。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、世界で初めて証明した。しかし、このときの製剤は粒子径が大きく、製剤化には取り扱いが困難であった。そこで一旦は、粒子径を均一にする方法も開発したが (\*J Control Release 2014) 包埋率の点や、スケールアップの困難さから BCG-cell wall skeleton を使用することは断念した。そこで、より粒子径も小さく、細胞壁成分を用いた製剤の開発を試みることにした。

### 2. 研究の目的

Mycobacterium や 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脂肪酸であるミコール酸 (MA) を含んでいる点である。結核菌や BCG 菌の MA の代表的なものは、メトキシ、ケトの 3 つのサブクラス成分から成り立っている (図; MA の分子構造)。また、MA は天然で

#### alpha-Mycolic acids



#### Methoxy-Mycolic acids



#### Keto-Mycolic acids



免疫アジュバント活性があるといわれていたものの、実臨床応用された例はなく、また抗腫瘍効果について検討した報告もない。我々は、実臨床で膀胱癌に対して Mycobacterium bovis BCG を使用していることから、BCG の細胞壁の基本的な成分である MA に注目した。MA は種々の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 MA をスクリーニングして抽出し、この MA を用いた新規癌治療薬の開発及び製剤化を目的とする

### 3. 研究の方法

(1) MA を抽出する菌種の選定をする。  
 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 属から Actinomycetales 属菌の細胞壁成分にも MA を含有している。しかし、MA は基本構造が 2 本の長鎖アルキル鎖からなる ヒドロキシ酸で特徴的であるばかりでなく、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。さらに、人型結核菌や BCG 菌の 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お

り、アルキル鎖上の極性期が抗原提示分子との結合性に大きく関与している。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。すでに、MA の基本的な抽出方法は確立している。

(2)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。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基剤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<sub>m</sub>) の低い脂質成分の組み合わせがよいことになる。一方不飽和度の高い脂質は脂肪酸酸化を受けやすいので適当な脂質組成を選ぶ必要がある。

(3)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。測定は BCG 研究所清原秀泰博士に依頼する。また MA、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、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。

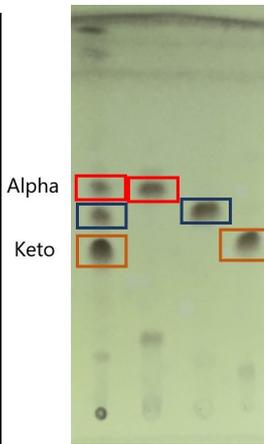
(4)マウス皮下接種モデルでの抗腫瘍効果を検証する。選択した MA リポソーム製剤を、マウス皮下接種モデル、正所性モデル、肺転移モデルを用いて、抗腫瘍活性の有無を検証する。

(5)抗腫瘍効果のある MA リポソームの特許申請と製剤化を目指す  
抗腫瘍活性のある MA リポソーム製剤の特許申請および製剤化を目指す。

#### 4. 研究成果

##### (1)MA の抽出

、メトキシ、ケトミコール酸の MA の抽出及びカラム精製後のマス解析による脂質の同定。安定的に MA の抽出技術を確認することが出来た。、メトキシ、ケトの 3 分画をわけて精製した。TOF/MS 分析にてそれぞれのミコール酸の質量が、これまでの報告と一致した。

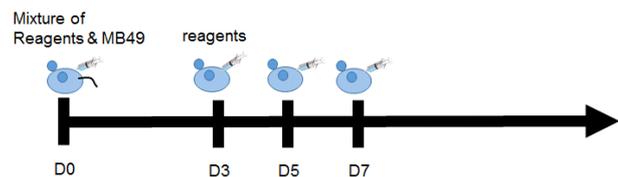


(2)MA 抽出後のリポソーム化  
MA は脂質で疎水性のため、投与方法に工夫が必要である。そのためリポソーム化し親水性にする必要がある。DOPC やデンドリマーを用いることで親水性にすることが出来た。リポソーム後は電子顕微鏡で確認すると、200nm 以下の粒子になっていることが確認できた。

リポソームの粒子径、粒子径の分布、Z電位

	Diameter (nm)	Polydispersity index (Pdi)	Z potential (mV)
w/o MA	106	0.144	18.4
Alpha-	120.5	0.153	2.96
Methoxy-	118.5	0.214	8.01
Keto-	154.1	0.256	10.4
Total MA	120.2	0.182	13.6

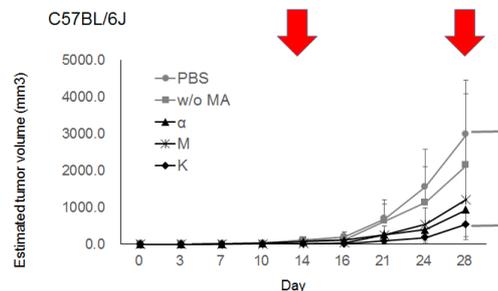
(3)マウス皮下接種モデルによる抗腫瘍効果  
選択した MA リポソーム製剤を、マウス皮下接種モデルを用いて、抗腫瘍活性の有無を検証した。その結果、抗腫瘍効果を得ることが出来た。



Mice were subcutaneously administrated with a mixture of reagents (PBS, liposome with MA, or liposome w/o MA) and mouse bladder cancer cells (MB49).

Day14  
PBS vs Keto p=0.0067  
vs Methoxy p=0.012

Day28  
PBS vs Keto p=0.014  
Alpha p=0.059  
Methoxy p=0.14



#### 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16件)

1. Kandori S, Yoshino T, Tsutsumi M, Yamauchi A, Ohtani M, Fukuhara Y, Miyanaga N, **Miyazaki J**, Nishiyama H, Shimazui T. Feasibility of classical secondary hormonal therapies prior to docetaxel therapy in Japanese patients with castration-resistant prostate cancer: Multicenter retrospective study. *Prostate Int*. 2016 Dec;4(4):140-144. PubMed PMID: 27995113 DOI:10.1016/j.prnil.2016.09.001. 査読あり
2. Kojima T, Kawai K, **Miyazaki J**, Nishiyama H. Biomarkers for precision medicine in bladder cancer. *Int J Clin Oncol*. 2016 Nov 29. [Epub ahead of print] Review.PubMed PMID: 27896485. DOI:10.1007/s10147-016-1068-8. 査読あり
3. Takaoka EI, **Miyazaki J**, Ishikawa H, Kawai K, Kimura T, Ishitsuka R, Kojima T, Kanuma R, Takizawa D, Okumura T, Sakurai H, Nishiyama H. Long-term single-institute experience with trimodal bladder-preserving therapy with proton beam therapy for muscle-invasive bladder cancer. *Jpn J Clin Oncol*. 2016 Oct 13.[Epub ahead of print] PubMed PMID: 27737963. DOI:10.1093/jjco/hyw151. 査読あり
4. Kawahara T, Kawai K, Yoshino T, Ikeda A, Ishizuka R, Kandori S, Takaoka EI, Kojima T, Joraku A, Suetomi T, **Miyazaki J**, Nishiyama H. The clinical presentation and favorable prognosis of patients with isolated metachronous brain metastasis from germ cell tumors. *Jpn J Clin Oncol*. 2016 Aug 27. [Epub ahead of print]. PMID:27566974.DOI:10.1093/jjco/hyw116. 査読あり
5. Ishitsuka R, **Miyazaki J**, Ichioka D, Inoue T, Kageyama S, Sugimoto M, Mitsuzuka K, Matsui Y, Shiraishi Y, Kinoshita H, Wakeda H, Nomoto T, Kikuchi E, Kawai K, Nishiyama H. Impact of acute kidney injury defined by CTCAE v4.0 during first course of cisplatin-based chemotherapy on treatment outcomes in advanced urothelial cancer patients. *Clin Exp Nephrol*. 2016 Aug 26. [Epub ahead of print]. PMID:7565169.DOI:10.1007/s10157-016-1327-z. 査読あり
6. Ikeda A, Kawai K, Tsutsumi M, Yoshimura K, Ohno G, Hasegawa T, Ooe H, Watanabe K, **Miyazaki J**, Nishiyama H. Impact of Living at the Japanese Antarctic Research Expedition Base on Urinary Status. Low Urin Tract Symptoms. 2016 Jul 20. doi: 10.1111/luts.12137. [Epub ahead of print] PubMed PPMID:27438338.DOI:10.1111/luts.12137. 査読あり
7. Matsui Y, Ogawa O, Ishitsuka R, **Miyazaki J**, Inoue T, Kageyama S, Sugimoto M, Mitsuzuka K, Shiraishi Y, Kinoshita H, Wakeda H, Nomoto T, Kikuchi E, Fujie K, Keino N, Nishiyama H. Current status of systemic chemotherapy for

- octogenarians with advanced urothelial cancer in Japan: a Japanese multi-institutional study (CURE study). *Int J Clin Oncol*. 2016 Jun 27. [Epub ahead of print] PubMed PMID:27349431. DOI:10.1007/s10147-016-1007-8. 査読あり
8. Koie T, Ohyama C, Fujimoto H, Nishiyama H, **Miyazaki J**, Hinotsu S, Kikuchi E, Sakura M, Inokuchi J, Hara T; Cancer Registration Committee of the Japanese Urological Association. Diversity in treatment modalities of Stage II/III urothelial cancer in Japan: sub-analysis of the multi-institutional national database of the Japanese Urological Association. *Jpn J Clin Oncol*. 2016 May;46(5):468-74. PubMed PMID: 26851754. DOI:10.1093/jjco/hyw005. 査読あり
  9. **Miyazaki J**, Nishiyama H, Fujimoto H, Ohyama C, Koie T, Hinotsu S, Kikuchi E, Sakura M, Inokuchi J, Hara T. Laparoscopic versus open nephroureterectomy in muscle-invasive upper tract urothelial carcinoma: Subanalysis of the multi-institutional national database of the Japanese Urological Association. *J Endourol*. 2016 May;30(5):520-5. PubMed PMID: 26669358. doi: 10.1089/end.2015.0757. 査読あり
  10. Inokuchi J, Naito S, Fujimoto H, Hara T, Sakura M, Nishiyama H, **Miyazaki J**, Kikuchi E, Hinotsu S, Koie T, Ohyama C; Cancer Registration Committee of the Japanese Urological Association. Impact of multimodal treatment on prognosis for patients with metastatic upper urinary tract urothelial cancer: Subanalysis of the multi-institutional nationwide case series study of the Japanese Urological Association. *Int J Urol*. 2016 Mar;23(3):224-30. PubMed PMID: 26659912. DOI:10.1111/iju.13031. 査読あり
  11. Kikuchi E, **Miyazaki J**, Yuge K, Hagiwara M, Ichioka D, Inoue T, Kageyama S, Sugimoto M, Mitsuzuka K, Matsui Y, Yamamoto S, Kinoshita H, Wakeda H, Hanai K, Nishiyama H. Do metastatic upper tract urothelial carcinoma and bladder carcinoma have similar clinical responses to systemic chemotherapy? A Japanese multi-institutional experience. *Jpn J Clin Oncol*. 2016 Feb;46(2):163-9. PubMed PMID: 26657277. DOI:10.1093/jjco/hyv180. 査読あり
  12. Nozawa M, Mukai H, Takahashi S, Uemura H, Kosaka T, Onozawa Y, **Miyazaki J**, Suzuki K, Okihara K, Arai Y, Kamba T, Kato M, Nakai Y, Furuse H, Kume H, Ide H, Kitamura H, Yokomizo A, Kimura T, Tomita Y, Ohno K, Kakehi Y. Japanese phase I study of cabazitaxel in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Int J Clin Oncol*. 2015 Oct;20(5):1026-34. PMID:25809824.DOI:10.1007/s10147-015-0820-9. 査読あり
  13. **Miyazaki J**, Nishiyama H, Fujimoto

- H, Ohyama C, Koie T, Hinotsu S, Kikuchi E, Sakura M, Inokuchi J, Hara T; Cancer Registration Committee of the Japanese Urological Association. Impact of smoking on the age at diagnosis of upper tract urothelial carcinoma: Subanalysis of the Japanese Urological Association multi-institutional national database. **Int J Urol.** 2015 Nov;22(11):1023-7. PMID:26238570.DOI:10.1111/iju.12886. 査読あり
14. Hara T, Fujimoto H, Sakura M, Inokuchi J, Nishiyama H, **Miyazaki J**, Ohyama C, Koie T, Kikuchi E, Hinotsu S; Cancer Registration Committee of the Japanese Urological Association. Prognostic factors of recurrent disease in upper urinary tract urothelial cancer after radical nephroureterectomy: Subanalysis of the multi-institutional national database of the Japanese Urological Association. **Int J Urol.** 2015 Nov;22(11):1013-20. PMID:26242807.DOI:10.1111/iju.12884. 査読あり
15. Ichioka D, **Miyazaki J**, Inoue T, Kageyama S, Sugimoto M, Mitsuzuka K, Matsui Y, Shiraishi Y, Kinoshita H, Wakeda H, Nomoto T, Kikuchi E, Nishiyama H. Impact of renal function of patients with advanced urothelial cancer on eligibility for first-line chemotherapy and treatment outcomes. **Jpn J Clin Oncol.** 2015 Sep; 45(9):867-73. PMID:26056328.DOI:10.1093/jjco/hy
- v082. 査読あり
16. Nakamura T, Fukiage M, Suzuki Y, Yano I, **Miyazaki J**, Nishiyama H, Akaza H, Harashima H. Mechanism responsible for the antitumor effect of BCG-CWS using the LEEL method in a mouse bladder cancer model. **J Control Release.** 2014 Dec 28; 196:161-7. 査読あり
- 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、吉野喬之、西山博之、赤座英之  
 権利者: 筑波大学、東京大学  
 種類: 特願  
 番号: 2017-042228  
 出願年月日: 2017年3月6日  
 国内外の別: 国内
6. 研究組織  
 (1) 研究代表者  
 宮崎 淳 (MIYAZAKI Jun)  
 筑波大学・医学医療系・准教授  
 研究者番号: 10550246
- (2) 研究分担者  
 西山博之 (NISHIYAMA Hiroyuki)  
 筑波大学・医学医療系・教授  
 研究者番号: 20324642
- 河合 弘二 (KAWAI Koji)  
 筑波大学・医学医療系・講師  
 研究者番号: 90272195
- 高岡 栄一郎 (TAKAOKA Ei-ichiro)  
 筑波大学・医学医療系・講師  
 研究者番号: 50625340 (2016年3月31日辞退)