

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 7日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2011

課題番号：20591848

研究課題名（和文） 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

研究課題名（英文） Development of less-side effect intravesical nanoparticle BCG therapy

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

研究成果の概要（和文）：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、副作用が問題である。ナノパーティクル BCG は、生菌を物理的に破壊しナノメートルサイズとしたもので、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。臨床応用上、副作用の低減が示唆され、さらに再発例や無効例、他臓器腫瘍への応用が可能であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Intravesical BCG therapy is effective treatment for non-muscle invasive bladder cancer, however, side effect is remaining. Nanoparticle BCG was prepared by disrupting live BCG and sized 42 to 500 nm. Nanoparticle BCG had identical direct antitumor effect as live BCG, but had a different mechanism, had direct antitumor effect against live BCG-resistant cell lines, and did not influence to normal cell line. These results suggested that nanoparticle BCG might reduce side effect, and might be used to develop new therapeutic drugs against live BCG-failure cases, invasive bladder cancer, or other tissue cancer.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2008年度 | 800,000 | 240,000 | 1,040,000 |
| 2009年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 2010年度 | 800,000 | 240,000 | 1,040,000 |
| 2011年度 | 900,000 | 270,000 | 1,170,000 |
| | | | |
| 総計 | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

研究分野：泌尿器科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：BCG、ナノパーティクル BCG、膀胱癌、直接効果

1. 研究開始当初の背景

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。

2005 年度までは生菌を超音波処理やオー

トクレーブ処理して検討していたが、生菌と同等の効果は得られていなかった。ナノパーティクル化により不溶性成分にも直接効果があることが明らかとなったが、ナノパーティクル化後の可溶性成分、不溶性成分を混合したところ、生菌と同等の直接効果が得られた（盛 他、ナノ粒子化 BCG による抗腫瘍効果の検討、BCG・BRM 療法研究会会誌、2006）。

すなわち、生菌ではなくても同等の臨床効果が期待できると示唆されたことになり、BCG に関してはこれまでにない知見が得られた。

2. 研究の目的

ナノパーティクル BCG という新たな治療薬の有効性を広汎に実証することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) BCG 生菌の作用機序

対照となる生菌の日本株とコンノート株の作用機序を、アポトーシス誘導、細胞周期について検討した。

(2) 生菌との効果の比較

種々の細胞株を用いて生菌とナノパーティクル BCG の効果を比較した。

(3) 生菌との作用機序の比較

種々の細胞株を用いてアポトーシス誘導、細胞周期について生菌と比較した。

(4) 生菌無効例への効果

生菌が無効の細胞株に対してナノパーティクル BCG の効果を検討した。

(5) 正常繊維芽細胞への安全性

正常繊維芽細胞を用いて影響があるか検討した。

(6) 精製成分 PIM の有効性

ナノパーティクル BCG からさらに精製した成分である PIM の効果を検討した。

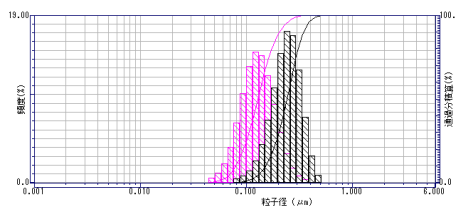


図 1. ナノパーティクル BCG の粒度分布
赤色：可溶性成分(sup)の粒度分布
黒色：不溶性成分(CW)の粒度分布
粒子径は 42~500nm

4. 研究成果

(1) BCG 生菌の作用機序

対照となる生菌の日本株とコンノート株は、生細胞数低下という現象は同等であるも

の、腫瘍細胞株や細胞外基質との組み合わせにより、コンノート株はアポトーシスを誘導しないなど、作用機序が異なることが明らかとなり、交替療法の有用性が示唆された。

(2) 生菌よりも優れた効果

膀胱癌細胞株 5637 細胞に対して、ナノパーティクル BCG は BCG 生菌よりも生細胞数低下効果が有意に高いことが明らかとなった。

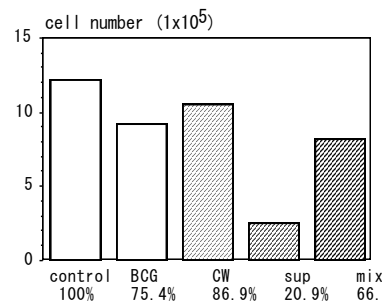


図 2. 5637 細胞に対する直接効果
可溶性成分(sup)が BCG 生菌よりも優れた効果を示した

(3) 生菌とは異なる作用機序

膀胱癌細胞株 J82 細胞、KK47 細胞に対しては、BCG 生菌と生細胞数低下効果は同等であるものの、アポトーシスは誘導せず、細胞周期にも影響を与えないことが明らかとなった。

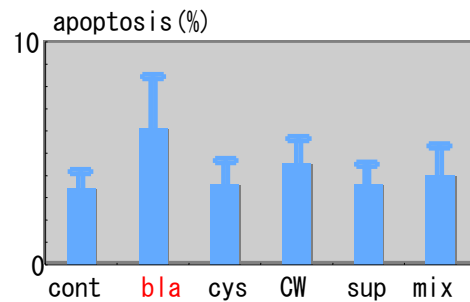


図 3. J82 細胞に対するアポトーシス誘導
bla: Tokyo 172 株 BCG 生菌は誘導
cys: Connaught 株 BCG 生菌は誘導しない
ナノパーティクル BCG も誘導しない

| Tokyo 172 | | | | |
|------------|-----|------------|----------|-------|
| cell line | 細胞数 | apoptosis% | total S% | G2/G1 |
| T24 | ↓ | ↑ | ↓ | N.S. |
| 5637 | ↓ | ↑ | ↑ | ↓ |
| sup | | | | |
| | ↓↓ | ↑ | ↑ | ↓ |
| KK47 | ↓ | ↑ | N.S. | N.S. |
| (Con N.S.) | | | | |
| mix | | | | |
| | ↓ | ↑ | N.S. | N.S. |
| J82 | ↓ | ↑ | ↑ | N.S. |
| (Con 弱) | | | | |
| mix | | | | |
| | ↓ | ↑ | N.S. | N.S. |

Con: Connaught, N.S.: not significant

表1. 細胞株に対する作用機序の一覧
枠で囲まれた部分は生菌とナノパーティクル BCG で作用機序が異なる部分あるいは細胞株に特徴的な部分を示している

(4) 生菌無効例への効果

KK47 細胞に対して BCG 生菌は生細胞数低下効果を示し、ナノパーティクル BCG も同等の効果があることを明らかにした。この細胞に糖転移酵素 C2GnT 遺伝子を導入した KK47C2GnT 細胞や、浸潤性膀胱癌由来の BOY 細胞、前立腺癌由来の PC-3 細胞を用いて検討したところ、BCG 生菌は生細胞数低下効果を示さないことが明らかとなった。その一方で、これら生菌無効例に対して、ナノパーティクル BCG は生細胞数低下効果を示すことが明らかとなった。

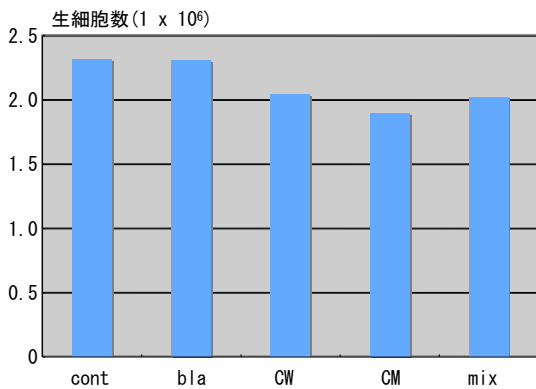


図4. KK47C2GnT 細胞に対する効果
bla: BCG 生菌は直接効果を示さない
ナノパーティクル BCG は直接効果を示す

(5) 正常繊維芽細胞への安全性

BCG 生菌は正常繊維芽細胞の増殖に影響しないことを明らかにしている。ナノパーティクル BCG も腫瘍細胞に特異的に効果を示し、正常細胞への影響はなく、安全であることが示唆された。

(6) 精製成分 PIM の有効性

ナノパーティクル BCG は、腎癌由来の ACHN 細胞に対しては生細胞数低下効果を示さないことが明らかとなった。ナノパーティクル BCG をさらに精製した PIM(phosphatidyl inositol mannoside)は ACHN 細胞に対して drastic な生細胞数低下効果を示し、正常細胞への影響はないことが明らかとなった。

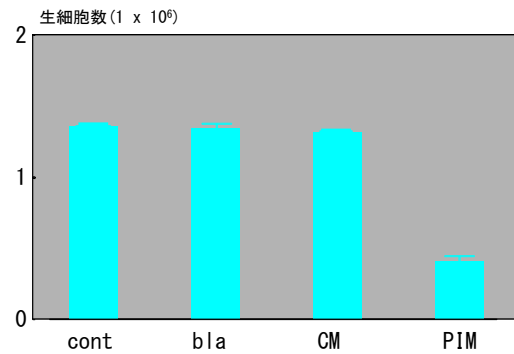


図5. ACHN 細胞に対する PIM の効果
bla: BCG 生菌は直接効果を示さない
CM(sup): ナノパーティクル BCG は効果を示さない
PIM: drastic な直接効果を示す

| 細胞株 | BCG 生菌 | CM | PIM | 細胞株由来 |
|-----------|--------|----|----------|-----------|
| KK47 | ○ | ○ | Not Done | 筋層非浸潤性膀胱癌 |
| KK47C2GnT | × | ○ | < | 糖転移酵素導入株 |
| BOY | × | ○ | Not Done | 筋層浸潤性膀胱癌 |
| PC-3 | × | ○ | Not Done | 前立腺癌 |
| ACHN | × | × | ⊙ | 腎癌 |
| NHDF | × | × | × | 正常繊維芽細胞 |

表2. ナノパーティクル BCG 及び PIM の効果一覧

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6件)

- ①坪井 滋、盛 和行 (16人中9番目)、大山 力 (16番目) 他、A novel strategy for evasion of NK cell immunity by tumours expressing core2 O-glycans. EMBO J 30(15), 3173-85 (2011)、査読有
- ②岩淵郁哉、盛和行 (10人中2番目)、大山力 (10番目) 他、膀胱癌における尿テロメラゼ活性簡易測定法の有用性、泌尿器科紀要、56(10), 551-7 (2010)、査読有
- ③盛和行、大山力、治療 膀胱内注入療法

BCG、日本臨床、68(Suppl 4), 323-326 (2010)、
査読有

④米山高弘、大山力(11人中2番目)、盛和行
(7番目)他、Low-dose instillation therapy
with bacille Calmette-Guérin Tokyo 172
strain after transurethral resection:
historical cohort study、Urology, 71(6),
1161-5 (2008)、査読有

〔学会発表〕(計 11 件)

①盛和行他、BCG 生菌は C2GnT 発現により無
効化されるがナノパーティクル BCG は有効で
ある、第 49 回日本癌治療学会総会
(2011. 10. 27-29) 名古屋国際会議場

②盛和行他、ナノパーティクル BCG は BCG 生
菌無効の細胞株に対して直接効果を有する、
第 99 回日本泌尿器科学会総会
(2011. 4. 27-30) 名古屋国際会議場

③盛和行他、ナノパーティクル BCG による直
接効果の作用機序は BCG 生菌と異なる、第 48
回日本癌治療学会総会(2010. 10. 28-30) 京都
国際会館

④盛和行他、日本株とコンノート株で異なる
膀胱癌細胞株 KK47 に対する BCG の直接効果
の作用機序、第 98 回日本泌尿器科学会総会
(2010. 4. 27-30) 盛岡

⑤米山高弘、盛和行、Post-BCG 膀胱内注入療
法;BCG failure に対する治療(シンポジウム)、
第 98 回日本泌尿器科学会総会
(2010. 4. 27-30) 盛岡

⑥盛和行他、BCG による直接効果の作用機序
は膀胱癌細胞株により異なる、第 47 回日本
癌治療学会総会(2009. 10. 22-10. 24) パシフ
ィコ横浜

⑦盛和行他、BCG 菌株により異なる直接的抗
腫瘍効果とフィブロネクチンとの相互作用、
第 46 回日本癌治療学会総会
(2008. 10. 30-11. 1) 名古屋国際会議場

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

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)

研究者番号：60047008