

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20159

研究課題名(和文)膀胱尿路上皮癌における制御性 T 細胞誘導に關するケモカインの同定と治療応用

研究課題名(英文) The role of regulatory T cell and related chemokines in urothelial carcinoma of the bladder

研究代表者

三宅 牧人(Miyake, Makito)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：80601400

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、筋層非浸潤性膀胱癌における BCG 抵抗性や筋層浸潤癌における治療抵抗性に關連する局所微小環境中免疫細胞および全身炎症状態との關連を模索した。治療前の腫瘍組織切片に制御性 T 細胞および腫瘍関連マクロファージが多いと治療成績が不良であったことから、これら 2 つの免疫細胞が癌細胞の免疫寛容性に關与していることが示唆された。また、BCG 膀胱注実施中の患者の尿検体内免疫細胞の経時的变化解析では、B 細胞系リンパ球マーカーはほとんど変化せず、制御性 T 細胞マーカー FOXP3 をはじめとした多くの T 細胞系リンパ球表面抗原の発現上昇をとらえることができ、今後の臨床応用が期待された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this project is to evaluate the association between topical immunostatus/systemic inflammation and the risk of BCG refractory non-muscle invasive disease and metastatic muscle invasive disease. The immunohistochemical staining analysis of tumor tissue specimens with FOXP3 (Treg maker) and CD204 (TAM marker) antibodies revealed that high counts of Treg and TAM were associated with shorter recurrence-free survival and disease-free survival. The time-course analysis of urine obtained from patients treated with intravesical BCG demonstrated that the expression of T cell makers including FOXP3 was increased with time. On the otherhand, B cell-related antigens showed much less change compared to T cell-related antigens. We will accumulate the patients number.

研究分野：泌尿器腫瘍学

キーワード：膀胱癌 免疫細胞 制御性 T 細胞 腫瘍関連マクロファージ BCG 膀胱注入療法 骨髄由来免疫抑制細胞

1. 研究開始当初の背景

膀胱癌に対する BCG 膀胱注入療法、腎細胞癌に対するサイトカイン療法などは以前から臨床現場で用いられてきた。近年、免疫チェックポイントを標的とした癌免疫療法は、高い臨床効果をあげ急速に発展してきている。抗 CTLA-4 抗体 イプリムマブが切除不能悪性黒色腫に対して初めて FDA に認可されたのを皮切りに、腎細胞癌や尿路上皮癌を含む泌尿器癌などを対象に他のチェックポイント阻害剤である抗 Programmed death 1 (PD-1)/PD-L1 抗体の開発、臨床治験が進行している。これらの現状を鑑みると、膀胱癌をはじめとした固形癌においては、癌微小環境中の T リンパ細胞をはじめとする免疫細胞が治療に及ぼす影響・重要性は明確である。

これまでの大規模な癌組織を対象としたゲノム解析や遺伝子発現解析の結果から、変異や欠失などの遺伝子異常数が多いほど、癌細胞を非自己として認識する機構が活性化され、癌組織内への CD8 陽性細胞の浸潤レベルが高いことがわかっている。すなわち、癌細胞での遺伝子変異数が増加すればするほど、腫瘍特異的な抗原 (がん細胞を非自己と認識させる目印) が増加、これらの目印が誘引となり、癌細胞に対する癌免疫リンパ球の活性化が起こる。なかでも、制御性 T 細胞 (Treg) や 腫瘍関連マクロファージ (TAM) は、免疫寛容、すなわち自己反応性リンパ球の活性化および増殖を抑制する機能を有するとされる。これらの免疫細胞の存在は、抗腫瘍免疫を抑制し、結果として腫瘍の増殖を促進すると考えられてきた。

2. 研究の目的

膀胱尿路上皮癌の増殖、浸潤、転移および治療抵抗性に及ぼす Treg, TAM をはじめとした免疫細胞の役割や治療中変化を明らかにすることで、治療効果の予測、診断・創薬・治療の開発に役立てる。

3. 研究の方法

(1) **膀胱癌組織中の免疫細胞 (T 細胞・好中球・マクロファージ) を免疫組織学的染色で定量し、症例背景および治療成績との関連を検討**

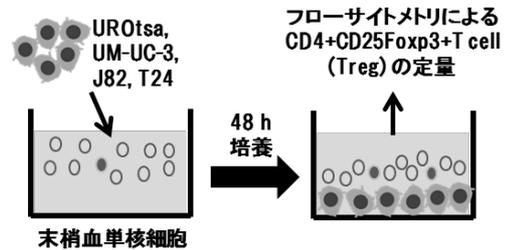
ヒト膀胱癌組織のパラフィン包埋切片を対象に免疫組織学的染色を行う

(2) **筋層浸潤性膀胱癌の癌局所免疫細胞の誘導に関連する血中および尿中サイトカインを同定**

膀胱癌治療前の インターロイキン (IL)-2, IL-6, IL-8, IL-17a, TGF-β1, TGF-β1 それぞれの濃度は各種 Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA 法) で定量した

(3) **膀胱癌細胞株から分泌される液性因子**

がヒト末梢血単核細胞を Treg へ誘導されるかを共培養モデルを用いて検討 (下図)



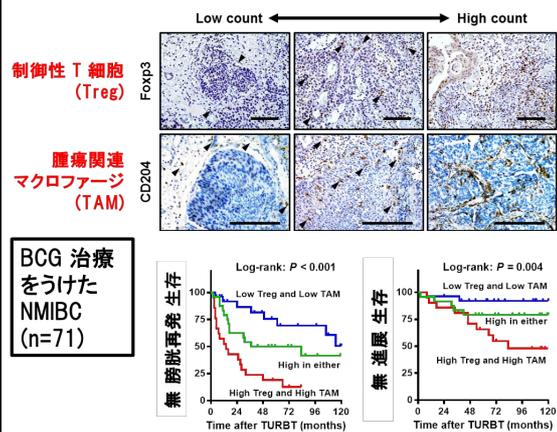
(4) **BCG 治療中の尿中免疫環境の変化を尿検体から同定し、臨床的に重要な変化を解析 (治療効果との関連性に着目)**

症例の治療前、治療中、治療後の末梢血中・尿中細胞から RNA を抽出し、以下のマーカーの発現量をリアルタイム RT-PCR で定量する

骨髄由来免疫抑制細胞 myeloid-derived suppressor cells: MDSC) マーカー : CD14, CD33, ITGAM (CD11b)
 Treg マーカー : FOXP3, CTLA4, ISG20 (CD25), ENTPD1 (CD39)
 PD-1/PD-L1 関連マーカー: CD274 (PD-L1), PDCDL1G2 (PD273, PD-L2) PDCD1 (PD-1)
 好中球マーカー: Elastase-1
 内因性コントロール: CD3E, CD20, Actin, GAPDH

4. 研究成果

(1) BCG 膀胱注が宿主免疫を賦活する Biological Response Modifier 療法であることから、まずは治療成績に関わる腫瘍周囲免疫微小環境について免疫細胞マーカーを用いた組織染色で検討した



上図の如く、治療前の腫瘍組織切片に制御性 T 細胞および 腫瘍関連マクロファージが多いと再発率・進展率が高かったことから、これら 2 つの免疫細胞が BCG 誘導免疫に対する癌細胞の免疫寛容性に関与していることが示唆された。

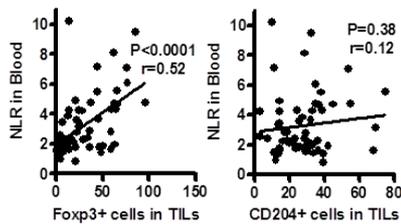
さらに、BBN 誘導同所性膀胱癌マウスモデルを用いた研究では、マイトマイシン C やアンスラサイクリンの膀胱注により膀胱腫瘍周囲の制御性 T 細胞および腫瘍関連マク

ファージいずれも減少した(報告論文)。これらの結果から、BCG 膀胱注前の抗癌剤膀胱注併用は、腫瘍免疫環境の調整を介し、後のBCG 膀胱注の治療効果の向上につながると推察される。

治療	腫瘍微小環境中の免疫細胞の変動 (vs PBS control)					
	CD4	CD8	CD56	CD204	Foxp3	PD-L1
BCG	↑	↑	↑	ns	ns	ns
MMC	ns	ns	↓	↓	↓	ns
ADM	ns	ns	ns	↓	↓	ns
GEM	ns	ns	ns	ns	ns	ns
DTX	ns	ns	ns	ns	ns	ns

ns: 差なし

(2) 筋層浸潤性膀胱癌の癌局所免疫細胞と、血中炎症マーカーやサイトカインとの関連を解析したところ、まず癌局所の Treg は治療前の好中球リンパ球比 (NLR) と正の相関を示すことが分かった。一方、TAM にはその傾向は認めなかった(下図)。



血中および尿中の種々のサイトカインレベルと、NLR や局所 Treg 量の相関を見てみると、血中・尿中ともに IL-6 と IL-8 がそれぞれと正の相関を示していた(下図)。すなわち筋層浸潤性膀胱癌における全身炎症状態であることと局所の免疫寛容状態が関連するという新しい知見を得ることができた。

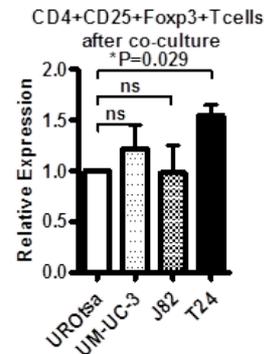
血清

		血清					
		IL-2	IL-6	IL-8	IL17a	TGF-β1	TGF-β2
NLR		P=0.29 r=0.22	P=0.019 r=0.47	P=0.047 r=0.29	P=0.26 r=0.24	P=0.42 r=0.17	P=0.91 r=0.022
	Foxp3	P=0.51 r=0.14	P=0.039 r=0.42	P=0.043 r=0.41	P=0.33 r=0.21	P=0.20 r=0.27	P=0.99 r=0.037
血清	IL-2		P=0.78 r=0.060	P=0.91 r=0.24	P=0.77 r=0.063	P=0.54 r=0.13	P=0.14 r=0.31
	IL-6			P=0.046 r=0.40	P=0.64 r=0.10	P=0.96 r=0.011	P=0.40 r=0.19
	IL-8				P=0.71 r=0.079	P=0.36 r=0.19	P=0.27 r=0.23
	IL-17a					P=0.87 r=0.035	P=0.84 r=0.044
	TGF-β1						P=0.88 r=0.032

尿

		尿					
		IL-2	IL-6	IL-8	IL17a	TGF-β1	TGF-β2
NLR		P=0.91 r=0.026	P=0.21 r=0.26	P=0.96 r=0.01	P=0.35 r=0.20	P=0.87 r=0.036	P=0.52 r=0.14
	Foxp3	P=0.15 r=0.31	P=0.037 r=0.43	P=0.54 r=0.13	P=0.12 r=0.33	P=0.96 r=0.096	P=0.068 r=0.38
尿	IL-2		P=0.036 r=0.44	P=0.49 r=0.15	P=0.43 r=0.18	P=0.66 r=0.097	P=0.095 r=0.39
	IL-6			P=0.001 r=0.70	P=0.53 r=0.13	P=0.97 r=0.087	P=0.37 r=0.19
	IL-8				P=0.23 r=0.26	P=0.69 r=0.086	P=0.76 r=0.065
	IL-17a					P=0.50 r=0.14	P=0.20 r=0.27
	TGF-β1						P=0.38 r=0.20

(3) 正常尿路上皮 UROtsa および 3 つの膀胱癌細胞株、それぞれをヒト末梢血単核細胞と共培養したところ、UROtsa との共培養(コントロール)と比較して T24 との共培養では、有意に Treg への誘導が促されていた。すなわち、一部の高悪性度の膀胱癌細胞から分泌される液性因子は末梢血中の Treg を誘導し得ると考えられる(右図)。



(4) BCG 膀胱注実施中の患者の尿検体内免疫細胞の経時的变化を解析すると、B 細胞系リンパ球マーカーはほとんど変化せず、制御性 T 細胞マーカー FOXP3 をはじめとした多くの T 細胞系リンパ球表面抗原の発現上昇をとらえることができた。ただ、現時点では解析症例数が少なく、今後の症例集積を待つ必要がある。

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 14 件)

Miyake M, Owari T, Iwamoto T, et al. Clinical utility of bioelectrical impedance analysis in patients with locoregional muscle invasive or metastatic urothelial carcinoma: a subanalysis of changes in body composition during neoadjuvant systemic chemotherapy. Support Care Cancer 査読有, 26: 1077-1086, 2018. DOI:10.1007/s00520-017-3924-0.

Miyake M, Tatsumi Y, Matsumoto H, et al. Outcomes of subsequent non-muscle-invasive bladder cancer treated with intravesical Bacillus Calmette-Guérin after radical nephroureterectomy for upper urinary tract urothelial carcinoma. BJU Int 査読有 121: 764-773, 2018. DOI:10.1111/bju.14111.

Hori S, Miyake M, Tatsumi Y, et al. Gamma-Klotho exhibits multiple roles in tumor growth of human bladder cancer. Oncotarget 査読有 13; 9: 19508-19524, 2018. DOI:10.18632/oncotarget.24628.

Miyake M, Morizawa Y, Hori S, et al. Clinical impact of postoperative loss in

psoas major muscle and nutrition index after radical cystectomy for patients with urothelial carcinoma of the bladder. BMC Cancer 査読有, 31; 17: 237, 2017. DOI:10.1186/s12885-017-3231-7.

Hori S, **Miyake M**, Tatsumi Y, et al. Topical and systemic immunoreaction triggered by intravesical chemotherapy in an N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine induced bladder cancer mouse model. PLoS One 査読有 13; 12: e0175494, 2017. DOI:10.1371/journal.pone.0175494.

Miyake M, Hori S, Morizawa Y, et al. Collagen type IV alpha 1 (COL4A1) and collagen type XIII alpha 1 (COL13A1) produced in cancer cells promote tumor budding at the invasion front in human urothelial carcinoma of the bladder. Oncotarget. 査読有, 30; 8: 36099-36114. DOI:10.18632/oncotarget.16432, 2017.

Miyake M, Morizawa Y, Hori S, et al. Integrative Assessment of Pretreatment Inflammation-, Nutrition-, and Muscle-Based Prognostic Markers in Patients with Muscle-Invasive Bladder Cancer Undergoing Radical Cystectomy. Oncology 査読有 93: 259-269, 2017. DOI:10.1159/000477405.

Miyake M, Morizawa Y, Hori S, et al. Diagnostic and prognostic role of urinary collagens in primary human bladder cancer. Cancer Sci 査読有 108: 2221-2228, 2017. DOI:10.1111/cas.13384.

Miyake M, Tatsumi Y, Gotoh D, et al. Regulatory T Cells and Tumor-Associated Macrophages in the Tumor Microenvironment in Non-Muscle Invasive Bladder Cancer Treated with Intravesical Bacille Calmette-Guérin: A Long-Term Follow-Up Study of a Japanese Cohort. Int J Mol Sci 査読有 19; 18, 2017. DOI:10.3390/ijms18102186.

三宅牧人, 堀 俊太, 辰巳佳弘ら. 同所性膀胱癌モデルマウスを用いた BCG および抗癌剤膀胱注入による誘導免疫の解析. 泌尿器外科 査読無 30: 439-441, 2017. DOI:無

Hori S, **Miyake M**, Onishi S, et al. Clinical significance of β -catenin and β -Klotho in urothelial carcinoma of the bladder. Oncol Rep. 査読有, 36: 2117-25, 2016. DOI: 10.3892/or.2016.5053.

Morizawa Y, **Miyake M**, Shimada K, et al. Neutrophil-to-lymphocyte ratio as a detection marker of tumor recurrence in patients with muscle-invasive bladder

cancer after radical cystectomy. Urol Oncol. 査読有, 34: 257. e11-7, 2016. DOI:10.1016/j.urolonc.2016.02.012.

Miyake M, Hori S, Morizawa Y, et al. CXCL1-Mediated Interaction of Cancer Cells with Tumor-Associated Macrophages and Cancer-Associated Fibroblasts Promotes Tumor Progression in Human Bladder Cancer. Neoplasia. 査読有, 18: 636-646. 2016. DOI:10.1016/j.neo.2016.08.002

Miyake M, Hori S, Morizawa Y, et al. Orthotopic mouse model of renal pelvic cancer using a human bladder cancer cell line. Int J Urol 査読有 23: 961-962, 2016. DOI:10.1111/iju.13220.

[学会発表](計 8 件)

三宅牧人 ほか

膀胱癌の浸潤様式 INF c (Tumor budding) 形成に関わる分子機構の解明と新規治療標的としての可能性. 2018 年 日本泌尿器科分子・細胞研究会

Makito Miyake et al

Altered deposition of collagens promote tumor budding at the tumor invasion front in urothelial carcinoma of the bladder. 第 33 回 欧州泌尿器科学会(国際学会), 2018.

Shunta Hori, **Makito Miyake** et al

Intravesical instillation of chemotherapeutic agents enhances immunomodulation of tumor microenvironment status in conventional BCG therapy. 第 33 回 欧州泌尿器科学会(国際学会), 2018.

Makito Miyake et al

Postoperative psoas muscle loss and nutritional deterioration after radical cystectomy for patients with invasive bladder cancer.

第 32 回 欧州泌尿器科学会, 2017.

三宅牧人 藤本清秀

局所進行性筋層浸潤膀胱癌の生存予後改善と QOL 維持のための治療戦略. 2017 年 日本泌尿器科学会総会(招待講演)

三宅牧人ほか

術後経時変化解析からみた膀胱全摘後の腹部筋量低下および栄養指標悪化が予後に及ぼす影響. 2017 年 日本泌尿器科学会総会

Makito Miyake et al

The diagnostic and prognostic potential of urine COL4A1 and COL13A1 in bladder cancer. 2017 年 日本癌学会

三宅牧人 藤本清秀

膀胱全摘術前の予後因子の評価と介入について. 2017 年 日本泌尿器科中部総会(招待講演)

〔その他〕

ホームページ等

<https://research-er.jp/projects/view/936843>

6 . 研究組織

研究代表者

三宅 牧人 (MIYAKE, Makito)

奈良県立医科大学, 医学部, 助教

研究者番号 : 80601400