

平成 30 年 6 月 17 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26293349

研究課題名(和文)多系統動物モデルを用いた尿路上皮癌の発癌進展における腫瘍微小環境の解明

研究課題名(英文)Clarification of the tumor microenvironment in the development of urothelial carcinoma using animal model

研究代表者

西山 博之(Nishiyama, Hiroyuki)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：20324642

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,200,000円

研究成果の概要(和文)：モルモットにワラビを経口摂取させ膀胱癌が発癌するという過去の報告に従い再検討した。1.ワラビ膀胱癌のHEと免疫染色、2.ワラビ膀胱癌から樹立した細胞のMorphologyを確認し、3.細胞株の増殖能(in vitro)、4.ワラビ膀胱癌の免疫染色した結果、モルモット膀胱癌と確認できた。樹立した細胞株は100回以上継代できているため、筋層非浸潤癌のモルモット膀胱癌が完成したと考えられた。モルモットは脂質免疫に関して、ヒトと同じCD1bを持っている。CD1bはミコール酸のレセプターであり、今後この膀胱癌細胞株を用いることで、脂質免疫とT細胞性免疫の関与の解明につながると考える。

研究成果の概要(英文)：We tested that guinea pigs can have bladder cancer by orally ingesting bracken. As a result of HE staining and immunostaining of the tumor of the bladder in the guinea pigs, it was confirmed that the tumor were non-muscle invaseve bladdere tumora. Guinea pigs have the same CD1b as human for lipid immunity. CD1b is a receptor for mycolic acid and we believe that future use of this bladder cancer cell line will elucidate the involvement of lipid immunity and T cell immunity.

研究分野：尿路上皮癌

キーワード：モルモット膀胱癌 脂質免疫 ミコール酸 Mycobacterium bovis BCG CD1b

### 1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍の発癌・転移には、腫瘍細胞自体の遺伝子変異、腫瘍細胞と間質細胞や免疫細胞との相互反応が重要である。特に、癌幹細胞から epithelial-mesenchymal transition (EMT) を経て浸潤・転移に至る経路に関する知見から、この経路に炎症や免疫制御にかかわる微小環境が重要な役割を果たしていることが分かってきた。これらの知見は将来的に腫瘍微小環境や免疫を標的とした抗腫瘍薬の開発に重要である。しかし免疫環境が維持された状態での発癌・転移に関する研究は限定的であるため、ヒトの多様な免疫環境下での発癌・転移や免疫治療の作用機序を解析するには複数の系統での動物モデルが必要である。

我々は筋層非浸潤性膀胱癌における BCG 膀胱内注入療法の有効性に着目し、BCG 菌体成分を用いた新規免疫治療薬の開発を行ってきた。この過程で、BCG 菌体成分の組成の中から細胞壁脂質成分であるミコール酸 (Mycolic acid (MA)) が効果の中心的役割を果たす可能性をみいだしている。MA は CD1 分子に提示され、CD1 拘束性 T 細胞に認識されることが示されているが、CD1 脂質免疫機構がマウスとヒトとでは異なっている。MA の効果検証にあたりヒトの免疫環境に類似するモルモット等での動物モデルの確立が必要である。

### 2. 研究の目的

本研究では、多系統動物における尿路上皮発癌モデルおよび同種移植モデル作成する。そして新規免疫治療薬の薬効評価、作用機序を明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

モルモットに乾燥ワラビ投与をし膀胱癌を誘導し、腫瘍からモルモット膀胱癌細胞株を樹立する。

遺伝子改変改変マウスを用いて BBN 膀胱発癌モデルによる発癌メカニズムを検討する。

MA を BCG Tokyo 172 からサブ分画毎に抽出し、リポソーム化する。

MA リポソーム製剤の抗腫瘍効果について膀胱癌マウス皮下モデルを用いて検討する。

MA リポソーム製剤によって活性化する免疫システムを明らかにするために、CD4/8 の組織免疫染色ならびにヌードマウス、beige マウスで検討する。

MA を 2 分子もつ糖脂質である TDM (trehalose 6,6' - dimycolate) を BCG Tokyo 172 から抽出、リポソーム化し抗腫瘍効果ならびに作用機序について検討する。

### 4. 研究成果

モルモットに 5 週齢より乾燥ワラビを 30% 含有した飼料を 100 日間自由経口摂取させることにより膀胱発癌を確認した(図 1)。免疫染色では cytokeratin 陽性、vimentin 陰性であることから上皮系腫瘍と考えられた。

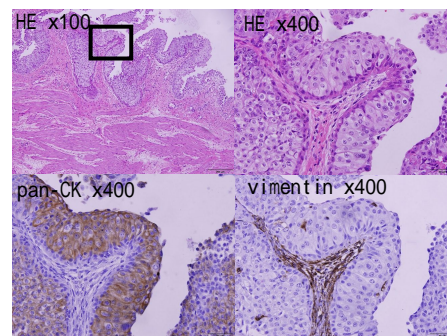


図 1 ワラビ膀胱癌の HE と免疫染色

ワラビ膀胱癌から樹立した細胞の Morphology を確認し (GPUC-1 と命名した) 細胞株の増殖能 (in vitro) 細胞株 DNA の PCR を確認した。ワラビ膀胱癌細胞株の免疫染色では cytokeratin 陽性、vimentin 陰性でありモルモット膀胱癌細胞株であることを確認できた。(図 2)。しかし腫瘍形成能が in vivo で証明できなかった点が問題ではあるものの、樹立した細胞株は 100 回以上継代で

きているため、筋層非浸潤性膀胱癌のモルモット膀胱癌が完成したと考えられた。

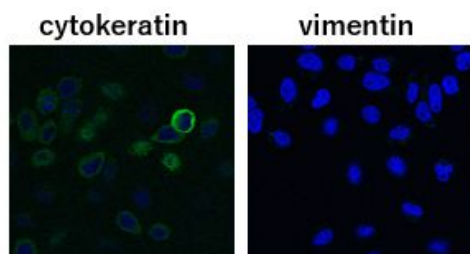


図2 ワラビ膀胱癌細胞株の免疫染色

脂質代謝酵素 PLD(PLD1、PLD2)に着目し、6~8週齢の PLD-WT、PLD1-KO、PLD2-KO マウスに対して 0.025%BBN を自由飲水にて投与し、16 週後、20 週後における膀胱癌発生の有無、浸潤度の評価を行った(図3)。膀胱癌の発生率に差異は認めなかったが、PLD1-KO、PLD2-KO 群において浸潤性膀胱癌の発生率が低下している傾向がみられた。以上の結果から、PLD1、PLD2 が膀胱癌の浸潤において重要な役割を有している可能性が示唆された。

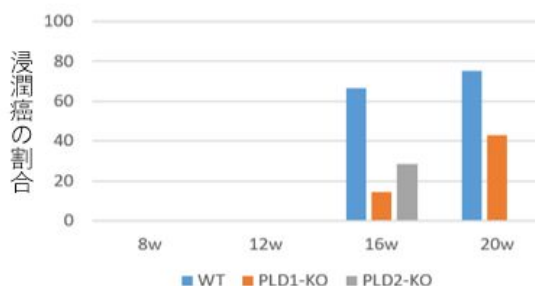


図3 PLD-KO マウスにおける BBN 膀胱発癌

MA の抽出およびリポソーム化について  
 1) BCG Tokyo 172 加熱死菌から -、methoxy-、keto-の各 MA を薄層クロマトグラフィーにより抽出した(図4)。それぞれの分画を MALDI-TOF/MS にて確認し、過去に Uenishi らが報告した結果と一致した。  
 2) 抽出した各 MA を DOPC、コレステロール、デンドロン脂質 D22 と混合することでサイズが 120 から 150nm のカチオンリポソームを作成した。NBD コレステロールによって蛍光標識したリポソーム

を用いて癌細胞への内包化を観察した(図5)。

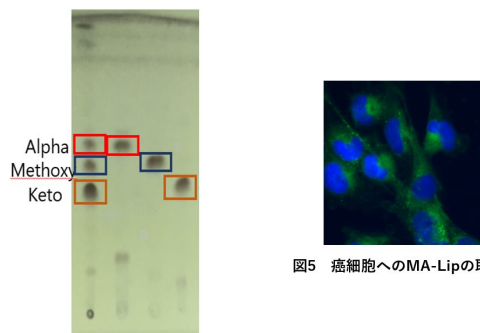


図4 MAの薄層クロマトグラフィー

図5 癌細胞へのMA-Lipの取り込み

### MA リポソーム製剤の抗腫瘍効果

C57BL/6 マウスに、同 strain から樹立された膀胱癌細胞株 MB49 ( $1 \times 10^5$  cells) と 100  $\mu$ L の試薬 (リポソーム溶液(40  $\mu$ g の MA に相当)か PBS) を混合接種した (day0)。その後 100  $\mu$ L の試薬を day3、5、7 に追加した。Keto-MA リポソームのみが腫瘍増殖抑制効果を示したが (vs. PBS,  $p=0.028$ )。-MA、m-MA リポソームは効果を示さなかった (vs. PBS, それぞれ  $p=0.086$ 、 $p=0.16$ ) (図6)。

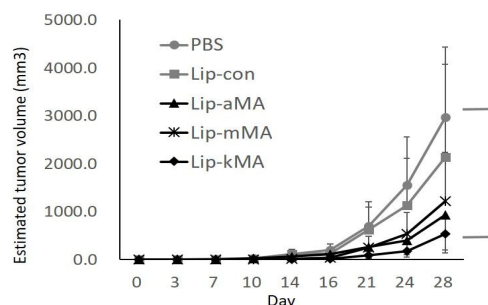


図6 MA リポソーム製剤の抗腫瘍効果

Keto-MA リポソーム製剤の T 細胞性免疫誘導について

先と同様のモデルで治療開始から 10 日目に腫瘍底を切除し、CD4/8 の免疫染色を行った。Keto-MA リポソーム群の腫瘍において、CD8 陽性細胞数が有意に増加していた。一方で、CD4 陽性細胞数は Keto-MA リポソーム群の腫瘍において多い傾向にはあったが有意な差はなかった(図7)。

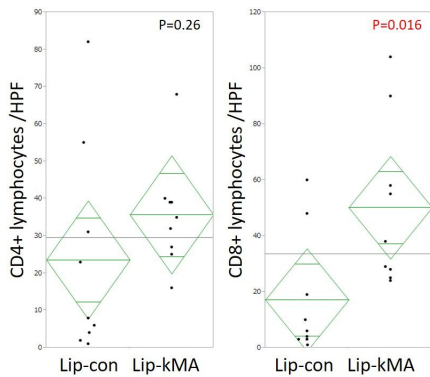


図7 腫瘍に浸潤したCD4/8陽性細胞数

T細胞の欠如したヌードマウスでは Keto-MA リポソームの抗腫瘍効果は消失した(図8)。一方でNK活性の低下した beige マウスでは Keto-MA リポソームの抗腫瘍効果は保たれていた。

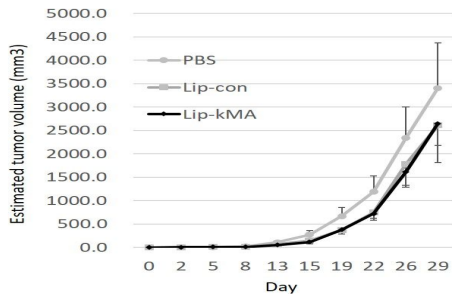


図8 ニードマウスにおける腫瘍径の変化

TDM リポソーム製剤の抗腫瘍効果、作用機序について

1) MA 同様に BCG Tokyo 172 から TDM を抽出、リポソーム化し抗腫瘍効果について検証したところ TDM リポソーム製剤は腫瘍増殖抑制効果を示した(図9)。

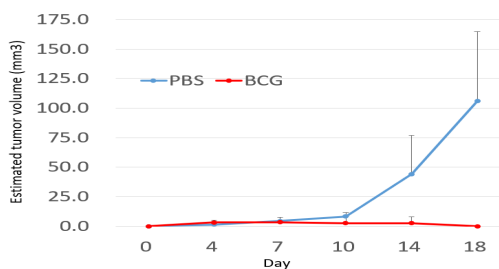


図9 TDM リポソーム製剤の抗腫瘍効果

2) TDM をリガンドとするレセプターとして Mincle レセプターがある。Mincle-KO 骨髄由来樹状細胞(BMDC)を用いた in vitro 実験ではサイトカイン産生が抑制された(図10)。

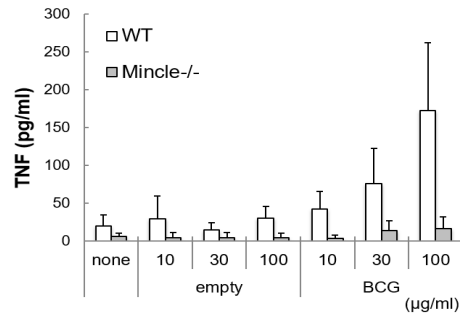


図10 TDM リポソーム製剤のBMDC活性化

今回、ヒト免疫に近いとされるモルモットにおいて、膀胱癌細胞株は樹立できたが、免疫環境が維持された発癌モデルの作成までには至らなかった。

一方、BCG 細胞壁脂質成分である MA および TDM の抽出、リポソーム化に成功し、抗腫瘍効果を示すことを見出した。MA リポソーム製剤の抗腫瘍活性には CD8 陽性 T 細胞が必要であることが示され、TDM リポソーム製剤の活性には Mincle の関与が示唆された。今後は Mincle KO マウスを用いて抗腫瘍活性を検証する予定である。MA、TDM の抗腫瘍活性の解明は BCG 膀胱内注入療法の解明ならびに結核免疫、脂質免疫の解明につながると考えられる。

## 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 2 件)

- Ryutaro Ishitsuka, Jun Miyazaki, Daishi Ichioka, Takamitsu Inoue, Susumu Kageyama, Mikio Sugimoto, Koji Mitsuzuka, Yoshiyuki Matsui, Yusuke Shiraishi, Hidefumi Kinoshita, Hironobu Wakeda, Takeshi Nomoto, Eiji Kikuchi, Koji Kawai, Hiroyuki Nishiyama.

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. 2017  
Aug;21(4):732-740.  
doi:10.1007/s10157-016-1327-z.

査読有

2. Daishi Ichioka, Jun Miyazaki, Takamitsu Inoue, Susumu Kageyama, Mikio Sugimoto, Koji Mitsuzuka, Yoshiyuki Matsui, Yusuke Shiraishi, Hidefumi Kinoshita, Hironobu Wakeda, Takeshi Nomoto, Eiji Kikuchi, Hiroyuki Nishiyama  
Impact of renal function of patients Withadvanced urothelial cancer on Eligibilityfor first-line chemotherapy andtreatment outcomes, Japanese Journal of ClinicalOncology, 2015, 45(9) 867-873, doi:10.1093/jjco/hyv082 査読有

〔学会発表〕(計 4 件)

1. Antitumor effect of cationic liposome incorporating keto-mycolic acid from Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guérin in mouse model. Takayuki Yoshino, Jun Miyazaki, Takahiro Kojima, Shuya Kandori, Hideyuki Akaza, Ikuya Yano, Hiroyuki Nishiyama; 2018 Genitourinary Cancers Symposium サンフランシスコ 2018年2月9日
2. Extraction of wax ester mycolic acid from Mycobacterium phlei, Masahiro WATANABE, Takayuki YOSHINO, Masanobu SHIGA、Jun MIYAZAKI、第6回 ITAM Workshop 千里ライフセンター 2018年2月2日
3. Separation of trehalose di mycolate(TDM) subclasses, Masanobu SHIGA, Takayuki YOSHINO, Jun MIYAZAKI, 第6回 ITAM Workshop 千里ライフセンタ

— 2018年2月2日

4. Antitumor effect of liposome incorporating mycolic acid of Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin in mouse model, Takayuki Yoshino, Jun Miyazaki, Hiroyuki Nishiyama, Hideyuki Akaza, Ikuya Yano 第74回日本癌学会学術総会パシフィコ横浜 2017年9月28日

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

1. 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、西山博之、吉野喬之、赤座英之  
権利者：筑波大学、東京大学  
種類：特許願  
番号：2017-042228  
出願年月日：平成29年3月6日  
国内外の別：国内

6. 研究組織

(1)研究代表者

西山博之 (NISHIYAMA HIROYUKI)  
筑波大学・医学医療系・教授  
研究者番号：20324642

(2)研究分担者

宮崎 淳 (MIYAZAKI JUN)  
国際医療福祉大学・医学部・教授  
研究者番号：10550246

小島 崇宏 (KOJIMA TAKAHIRO)  
筑波大学・医学医療系・講師  
研究者番号：40626892

常樂 晃 (JORAKU AKIRA)  
筑波大学・医学医療系・講師  
研究者番号：60436277

河合 弘二 (KAWAI KOJI)  
筑波大学・医学医療系・講師  
研究者番号：40626892