

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 5 月 8 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11164

研究課題名(和文) マクロファージ制御による膀胱癌再発予防の新規療法の開発

研究課題名(英文) Investigation of new therapy for prevention of recurrence of the bladder cancer by macrophage control.

研究代表者

能見 勇人 (Hayahito, Nomi)

大阪医科大学・医学部・准教授

研究者番号：80418938

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：膀胱の代わりにマウス腹腔内にて、活性化マクロファージ(M<sub>1</sub>)の抗腫瘍効果と腫瘍関連M<sub>2</sub>(TAM)を抑制する物質Xを投与したモデルにおいて比較検証した。M<sub>1</sub>-M<sub>2</sub>による攻撃細胞としての作用とTAM抑制の比較ではTAM抑制の方が抗腫瘍効果は著しく高かった。腹腔内に移植した同種異型移植により得たアロ活性化M<sub>2</sub>には、アロのMeth A腫瘍細胞に対して強い細胞障害活性を有するが、腹腔内の腫瘍細胞を除くために約2週間の時間を要する。一方、物質XによりTAMを除くと、同種同系移植されたMeth Aなどの腫瘍細胞の発育は早期に完全に抑制された。また物質Xのin vivoでの安全性に問題のないことも確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

免疫を活性化させ腫瘍を抑制するいわゆる免疫療法は、膀胱癌を含む、多種の癌に臨床応用され、一定以上の成果をあげている。しかし、薬剤費が相当高額であることと時に強い副作用が起こることがある点が、大きな問題点である。より安価で安全な免疫療法の開発を行うことを目標に、マクロファージといわれる免疫担当細胞が、癌の発育と抑制にいかに関与しているかにつき、検証を行った。癌細胞の発育に利用されるマクロファージを抑制することで、抗腫瘍効果を与えることができた。マクロファージを抑制する効果のある物質X(詳細未公表)は、マウスを用いての実験では、画期的な制癌効果をもたらし、強い副作用もみとめず、良い結果を得られた。

研究成果の概要(英文)：The antitumor effect of activated macrophages (M<sub>1</sub>) and the model in which substance X that suppresses tumor-associated M<sub>2</sub> (TAM) was administered were compared and verified in mice abdominal cavity, instead of the urinary bladder. Comparing the effect of M<sub>1</sub>-M<sub>2</sub> as the attacking cell with the effect of inhibiting TAM, the effect of inhibiting TAM was remarkably high. The Allograft-induced M<sub>2</sub> obtained by allogeneic transplantation into the abdominal cavity had strong cytotoxic activity against allogeneic Meth A tumor cells, but it took 2 weeks to remove the intraperitoneal tumor cells. On the other hand, when TAM was removed by substance X, the growth of allogeneic transplanted tumor cells such as Meth A were completely suppressed in very early stages. It was also confirmed that there is no problem with the safety of substance X in vivo.

研究分野：泌尿器科学、免疫学

キーワード：マクロファージ マクロファージ吸着物質 腫瘍関連マクロファージ マウス 膀胱癌 BCG 牛結核菌 再発予防

## 1. 研究開始当初の背景

活性化マクロファージ (M<sub>1</sub>) による抗腫瘍効果と腫瘍関連 M<sub>2</sub> による腫瘍の増進作用については、過去にも様々な報告がある。しかし、抗体、B 細胞、T 細胞といった獲得免疫の強い作用のために、M<sub>1</sub> などの自然免疫には、過去には、やや注目されにくい状況でもあったが、最近では、活性化マクロファージ (M<sub>1</sub>) による抗腫瘍効果と腫瘍関連 M<sub>2</sub> による腫瘍の増進作用については様々な報告がされている。

牛結核菌 (BCG; Bacille de Calmette et Guerin) を用いた表在性膀胱癌に対する BCG 膀胱内注入療法 (BCG 療法) は、筋層非浸潤性膀胱癌の経尿道的膀胱腫瘍切除術後の標準治療として、臨床で広く行われている。エピルピシンやピラルピシンなどの抗癌剤膀胱内注入療法に比べ BCG 療法の膀胱癌再発予防の効果は高く、BCG 療法は臨床的に重要である。ただし BCG 療法には頻尿、熱発、排尿時痛などの副作用を生じることも多く、頻度は低いものの重篤な副作用として不可逆な委縮膀胱や Reiter 症候群なども報告されている。BCG は生菌であることが抗腫瘍効果のある免疫反応を得るために必須と考えられているが、BCG が生菌であるがために副作用も比較的発生しやすいと考えられる。この BCG 療法の副作用を低減する目的で殺菌した BCG や BCG の莢膜のみや DNA のみを投与するといった実験も施行されたが、生菌のような効果は得られなかったと報告されている。BCG 療法の作用機序についてであるが、BCG により誘導されるマクロファージ (M<sub>1</sub>) である BCG-M<sub>1</sub> が直接腫瘍を攻撃する抗腫瘍効果をもつことを我々は実験で確認している。また、BCG-M<sub>1</sub> が炎症性 M<sub>2</sub> である M1 型 M<sub>2</sub> であることから、M2 型 M<sub>2</sub> である腫瘍関連マクロファージ (TAM; Tumor Associated Macrophage) の作用を減少させることにより抗腫瘍効果をあげている可能性も推定される。この TAM は癌の発育に重要な働きをするとは多数報告されている。そこで我々は BCG 以外に M1 型 M<sub>2</sub> をより活性化し、TAM を減少させる方法があれば、BCG 療法に代わるより有効で安全な抗腫瘍療法が開発できる可能性があると考えた。

マウスにおいて M<sub>1</sub> を誘導させる方法としてカゼインやチオグリコレートの腹腔投与などの方法が知られるが、これらより誘導した M<sub>1</sub> の抗腫瘍効果は BCG-M<sub>1</sub> よりも有意に弱いものであることを我々はすでに確認していた。我々の研究成果として M1 型 M<sub>2</sub> として最も強い細胞障害血清を示すものは、アロ移植細胞にたいするアロ活性化 M<sub>1</sub> (AIM; Allograft-induced-M<sub>1</sub>) である。例えば、DBA マウス (H-2d) 由来の線維肉腫細胞である Meth A 腫瘍細胞を C57Bl/6 マウス (H-2b) 腹腔に同種異型 (アロ) 移植すると多数の活性化 M<sub>1</sub> が誘導される。このアロ移植により誘導される M<sub>1</sub> (AIM) は、アロの腫瘍細胞に対して BCG-M<sub>1</sub> の 2 倍以上の抗腫瘍効果を持ち、マウスのアロ移植腫瘍細胞は当初は腫瘍として増殖するが、20 日以内完全に拒絶されることを我々は以前に報告した。このことから、M1 型 M<sub>2</sub> としてマクロファージを最大限活性化することができれば、比較的高い抗腫効果を示し、完全な制癌も可能とも考えられるが、逆に上述のように、逆に腫瘍に利用され腫瘍の増殖の補助をさせられてしまう M<sub>2</sub>、つまり TAM の作用もしくは TAM としての機能を減じることができれば、腫瘍の発育を抑制できる可能性が高いと考えられた。

## 2. 研究の目的

腫瘍細胞が、アロ抗原同等の強い抗原性をもっていれば、発癌したとしても、上述の AIM による作用で進展せず、体内で駆逐されるものと考えられるため、臨床的に体内で発育する癌細胞や肉腫細胞は、抗原性が比較的低い場合と、抗原性が高くとも免疫担当細胞を抑制する作用を持っているものと考えられる。これまでの我々の得てきた知見からは、アロ活性化 M<sub>1</sub> によるアロ腫瘍に対する直接障害機構が存在する。腫瘍関連 M<sub>2</sub> の除去により一部の腫瘍の生着を完全に抑制できる。これら のことから、M<sub>1</sub> を制御することからより強い抗腫瘍効果を得る方法を確立したい。特に上記 の予備実験結果は画期的なものであり M<sub>1</sub> の制御法が膀胱癌の再発予防や制癌にむけた新たな治療法となりうるものと考えている。

すなわち、我々は、移植免疫における活性化 M<sub>1</sub> の攻撃 (Effector) 細胞としての作用について研究をこれまで行ってきたが、TAM を抑制することにより得られる抗腫瘍効果にも着目し、AIM (M1-M<sub>2</sub>) と TAM (M2-M<sub>2</sub>) のバランスをより M1 方向に変更することから強い抗腫瘍効果を得る方法を開発することが、本研究の目的である。

腫瘍存在部に滲出する免疫担当細胞のうち、特に M<sub>1</sub> の M1 と M2 のバランスを変更する方法の開発と、我々の仮説が正しいことを実験的に示すことを目指した研究を行い、膀胱癌に対する BCG 膀胱注入療法の効果の向上と BCG 療法の欠点である頻度の高い副作用、特に、全身 BCG 感染症や委縮膀胱といった重篤な合併症の回避するための知見を得る。そして、さらには M<sub>1</sub> 制御による新たな膀胱癌や他の腫瘍の再発予防法や癌治療法を開発したい。

そして、膀胱癌にたいする再発予防療法として行われる BCG 膀胱注入療法の欠点である頻度の高い副作用の発現や、全身 BCG 感染症といった重篤な合併症の回避が望まれており、M<sub>1</sub> 制御による新たな膀胱癌の再発予防法や癌治療法を開発したい。

### 3. 研究の方法

#### (1) マウスにおける基礎的実験。

まず、マウスの腹腔を腫瘍移植のスペースとして使用することとした。Balb/c マウスの腹腔内に Meth A 繊維肉腫細胞、P8-15 肥満細胞の腫瘍細胞をそれぞれ  $3 \times 10^6$  移植することによる基礎的実験から行った。移植 1 日 3 日 6 日のポイントで、それぞれマウスの腹腔を PBS で洗浄し腹腔浸潤細胞数をカウントし腫瘍細胞数、腹腔浸潤細胞 (PEC; Peritoneal exudate cells) 数の時系列をトリパンブルー染色し調査した。腹腔浸潤細胞の構成細胞を FacsARIA でさらに分析した。

さらに、PEC より M 分画を抽出し、12 時間~18 時間の 51Cr 放出アッセイを予定していたが、実験環境の変化を来したことにより、LDH 放出アッセイに切り替えて細胞障害を行うこととした。

上記と同様の方法での検索を、同腹腔内に M 吸着物質 X (個体) を腫瘍細胞と同時に腹腔注入するモデルを作成し、同様に腫瘍細胞と腹腔浸潤細胞を検証した。物質 X の注入するタイミングは、腫瘍細胞と同時、3 日後として検証した。

#### (2) BCG 使用時におけるマウス腹腔内 M の変化の検索。

BCG による BCG マクロファージの誘導時に TAM が減少についての検証。BCG1mg もしくは 3mg をマウス腹腔内に投与し、3 日後と 6 日後のマウスの腹腔内を PBS で洗浄し腹腔浸潤細胞 (PEC) を得る。この PEC 中から、BCG-M を含む分画を FacsARIA による細胞のソーティングにより分離した。この BCG-M 分画における M 分画の細胞の組成を蛍光抗体で標識しその表面マーカーをさらに FacsARIA で分析するとともに、mRNA をそれぞれのタイミングで抽出し IL-2、IL-10、IFN- の mRNA の発現の程度を定量的 PCR で確認した。

と同様の実験を BCG の代わりに Meth A 細胞  $3 \times 10^6$  をアロ移植した C57BL/6 マウスの腹腔浸潤細胞から抽出するこの際浸潤細胞を 3 日後と 6 日後に抽出した。他、同様に M1 型、M2 型 M の比と絶対数を確認した。

#### (3) BCG-M は Meth A 抗腫瘍細胞に対して一定の細胞障害活性をもつことは既に確認しているが、この細胞障害活性が他の腫瘍細胞に対してどの程度の細胞障害活性を持つのか否かを検証し、BCG-M によりすべての腫瘍が障害されるのか否か、また細胞障害されない腫瘍にはどのような系統のものがあるのか、in vitro で BCG-M の効果をそれぞれの細胞で確認したい。この細胞障害活性についても LDH 放出実験で計測した。

BCG-M により障害される腫瘍細胞に対して、腫瘍と同系マウス由来の AIM を確保し、これらの Meth A 腫瘍細胞に対する細胞障害活性を同様に計測する。AIM による細胞障害活性が弱い腫瘍株においては、BCG-M をさらにアロ細胞で賦活したアロで賦活化 BCG-M (Allo-BCG-M) を作成し、この細胞障害活性も測定する。Allo-BCG-M に関しては、マウス腹腔内に BCG1mg を投与しさらに 5 日後に同腹腔内に Meth A 細胞を  $3 \times 10^6$  個投与し、さらに 6 日経過した後に腹腔細胞を PBS 洗浄することにより確保した。また、物質 X と腫瘍細胞が直接反応するかしないかを in vitro の細胞培養で確認する。物質 X の存在下と非存在下でそれぞれ腫瘍を CO<sub>2</sub> インキュベーターで培養し、細胞数、物質 X への接着などの問題がないか確認した。

### 4. 研究成果

#### (1) 膀胱の代わりにマウス腹腔内にて腫瘍細胞の移植実験を行った。

マウスの腹腔に腫瘍細胞を移植すると、抗腫瘍効果のある免疫担当細胞が滲出してくる。この腹腔浸潤細胞を我々は PEC と称している。この PEC 中の活性化マクロファージ (M) の抗腫瘍効果を調査したが、活性化 M の抗腫瘍効果 (細胞障害活性) を 51Cr 放出実験で確認する予定としていたが、実験環境の変化により、LDH 放出実験に切り替える必要が生じた。

Balb/c マウスの腹腔内に投与した腫瘍細胞は増殖をつづけ、約 20 日でマウスは腫瘍死する。しかし、Meth A 繊維肉腫細胞を腫瘍細胞とした実験では腫瘍と同日に新規免疫制御物質であると考えられる物質 X (物質名; 未公表) をマウス投与したところ、マウスは長期間にわたり生存することが可能であった。一方、P815 (肥満細胞腫) を移植する実験では物質 X を投与しても、残念ながら腫瘍の増殖が続いた。

Meth A 腫瘍細胞を用いた実験では、M1-M による攻撃細胞としての作用と TAM 抑制の比較では TAM 抑制の方が抗腫瘍効果は著しく高いといえるが、これは Meth A 細胞の増殖には TAM を必要とすることが原因となっていると考えられた。

腹腔内に移植した同種異型移植により得たアロ活性化 M には、アロの Meth A 腫瘍細胞に対して強い細胞障害活性を有するが、腹腔内の腫瘍細胞を除くために約 2 週間の時間を要する。一方、物質 X により TAM を除くと、同種同系移植された Meth A などの腫瘍細胞の発育はごく

早期に完全に抑制された。つまり、Balb/c マウス腹腔内へ Meth A 腫瘍細胞に対する、物質 X による腫瘍抑制効果が相当高いことを確認することができた。

我々は Balb/c マウスでの実験で、M を吸着する物質 X を腫瘍移植部に投与することでマウスにおける Meth A 線維肉腫の増殖を完全に抑制できたが、この機序は TAM が除かれ腫瘍が生着しなかったものと考察している。

また物質 X の *in vivo* での安全性に問題のないことも確認した。すなわち、マウス腹腔内に物質 X を 2.5g 投与したところ、マウスはその後 2 年近く生存し、マウスの寿命をほぼ全うできた。物質 X 投与後、約 2 年後、自然死したマウスを解剖したところ、マウス腹腔内に物質 X は、著変なく残存していたが、腸管や腸間膜にわずかに癒着傾向をみるものの、腸閉塞などの問題を来すこともなく、物質 X は生体使用しても比較的安全的な物質と考えられた。Meth A 腫瘍細胞  $3 \times 10^6$  個を物質 X を Balb/c マウスの腹腔内に同時投与することで、マウスの腹腔内の腫瘍は増殖することなく、このマウスがその後 1 年 6 カ月以上生存することも確認した。

(2) BCG 療法による BCG-マクロファージ (M ) の誘導時において腫瘍関連マクロファージ (TAM) が減少するの否かの検証：BCG をマウス腹腔内に投与し、3 日後と 6 日後のマウスの腹腔内を PBS で洗浄し腹腔浸潤細胞を抽出、この中から遠心分離より BCG-M を含む分画を抽出した。この分画の M は CD11b 陽性、F4/80 陽性、CD11c 陽性であり M1-M が主体と考えられた。また PEC 中の M 分画における IL-10 の mRNA の増加は認めず、M2-M は BCG 投与下においては、抑制されているものであると推察した。M2-M の出現の程度に関してはその検出法も含めさらに検討をしているが、M2-M は極めて少ないものであると現時点では考えている。

したがって、BCG 療法の作用機序が BCG-M (M1-M ) の活性化のみであるのかもしくは M2-M の抑制にも関与するのかが結論を得るには至っていない。結論を導くためには、今後も検討と検証を重ねる必要がある状況であるが BCG により単球/M 系が M2 ではなく M1 方向に活性化されることは確認できた。M2-M のマーカーでの検証結果が安定しないことは、M2-M の表面マーカーの発現が低い可能性、急性炎症時には M2-M 自体の発現が少ない可能性などが考えられる。また、M1, M2 よりさらに詳しくマクロファージを分類すべきとの意見もあり、マウス腹腔に BCG 投与を投与して活性化されるマクロファージをそもそも M1, M2 の 2 分画のみに分類することに難がある可能性もあり、BCG-M の分類とその同定方法の再考まで含めるべきとも考えている。

膀胱癌の再発予防として、BCG (牛結核菌) 膀胱注入療法は最も有効な治療法であるが、その反面、副作用が多く、投与回数も多く 6-8 回にわたり毎週通院する必要がある。今回、BCG 療法の作用機序のさらなる解明へ向けた解析を続ける予定である。

BCG 膀胱注入療法的作用機序としては単球/マクロファージ (M ) 系が、BCG により活性化され炎症性の BCG-M (M1-M ) となり、BCG-M が直接抗腫瘍効果を発揮する経路などが推定されてきた。しかし、我々は BCG が単球/M 系を局所で枯渇させ、悪性腫瘍に利用される腫瘍関連マクロファージ (TAM) を著減させることが抗腫瘍効果の主な作用ではないかとも考えている。一方、吸着物質 X を用いて TAM を除去し腫瘍の発育を抑制するという我々の発案した方法 (TAM 吸着除去法) は、マウスにおいて顕著な抗腫瘍効果を発揮する。BCG 療法にこの TAM 吸着除去法を併用することにより、より有効で副作用の少ない BCG-TAM 吸着物質併用療法の開発を今後行いたいと考えている。

(3) LDH 放出実験では、AIM と BCG-M の比較では、AIMの方が 2 倍以上高い細胞障害活性を有した。*in vitro* の実験では、物質 X と Meth A 腫瘍細胞を同一シャーレで培養下において、特に物質 X と Meth A 腫瘍細胞が特に癒着やロゼット形成は認めなかった。

(4) なお、M1 型 M の活性化方法、M2 型マクロファージの減衰にもっとも有効な方法とタイミングを勘案し、最も有効と考えられる方法を用いる環境を検討したうえで、ヒト由来の腫瘍の細胞をヌードマウスに移植し、この腫瘍の制御実験を検討している。

すなわち、ヌードマウスにヒト由来の膀胱癌細胞をマウスの腹腔内や膀胱壁に異種移植し発育させる。このヒト膀胱癌移植モデルにおいて、膀胱癌の発育の過程において、前述の物質 X の投与や AIM や BCG-M 、Allo-BCG-M の投与することで抑制できるの否かを検証する予定である。しかし、現在この予定は、<sup>51</sup>Cr 放出実験を LDH 放出実験に切り替えるなどのことから、上記 (1)(2) の実験に想定以上の時間を要し、この実験は先延ばしになっている。

ヌードマウスは、T 細胞からのサイトカインを欠いている。M1 型 M の活性維持に主に T 細胞より分泌されるサイトカインである顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) や IFN を投与する必要性がありうる。M1 型 M の活性化を維持する目的でリコンビナントのサイトカインの投与も場合により検討したいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Tsujino Takuya, Sugito Nobuhiko, Taniguchi Kohei, Honda Ryo, Komura Kazumasa, Yoshikawa Yuki, Takai Tomoaki, Minami Koichiro, Kuranaga Yuki, Shinohara Haruka, Tokumaru Yoshihisa, Heishima Kazuki, Inamoto Teruo, Azuma Haruhito, Akao Yukihito	4. 巻 110
2. 論文標題 MicroRNA 143/Musashi 2/ KRAS cascade contributes positively to carcinogenesis in human bladder cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2189 ~ 2199
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1111/cas.14035	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 能見勇人、辻野拓也、松永知久、加納陽介、藤原裕也、市橋淳、小林大介、谷口俊理、堤岳之、林 和賢、大北恭平、小村和正、伊夫貴直和、稲元輝生、東治人
2. 発表標題 テガフル・ウラシル (UFT) 単独療法が奏功した手術不能な膀胱腫瘍の2症例の検討
3. 学会等名 第67回日本泌尿器科学会中部総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Naokazu Ibuki, Teruo Inamoto, Kazumasa Komura, Kiyoshi Takahara, Hajime Hirano, Hayahito Nomi, Haruhito Azuma
2. 発表標題 Evaluation of the safety and short term pathological effects of tri-modal therapy in patients with bladder cancer: a multicenter prospective trial.
3. 学会等名 European Association of Urology 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小村和正、稲元輝生、伊夫貴 直和、上原博史、西田 剛、小山耕平、平野 一、能見勇人、東 治人.
2. 発表標題 放射線化学療法耐性尿路上皮がんにおけるError-Prone DNA Repairの異常亢進と臨床への治療応用
3. 学会等名 第107回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 能見 勇人、堤 岳之、上原 博史、小村 和正、伊夫貴 直和、稲元 輝生、東 治人
2. 発表標題 腫瘍関連細胞の吸着による抗腫瘍効果の検討
3. 学会等名 第108回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	東 治人  (Azuma Haruhito)  (40231914)	大阪医科大学・医学部・教授    (34401)	