

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10604

研究課題名(和文) 難治性膀胱上皮内癌に対する新規治療法としての T細胞膀胱内注入療法の開発

研究課題名(英文) Development of intravesical human gdT cell based immunotherapy against urinary bladder cancer cell

研究代表者

中西 弘之 (Nakanishi, Hiyoyuki)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・客員講師

研究者番号：40398376

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)：主に自然免疫を司る T細胞は、MHC非拘束性に様々な癌種に対して抗腫瘍効果を発揮し、T細胞免疫療法の臨床試験が既に行われている。しかし全身投与による臨床試験では、治療効果は満足のものはない。そこで本研究では、T細胞の効果を最大限に発揮するために未だ臨床試験が行われていない T細胞膀胱内注入療法に着目し、その治療効果を正所性膀胱癌モデルマウスを用いて検証した。本研究の結果、T細胞膀胱内注入療法は強力な抗腫瘍効果を発揮した。膀胱内 T細胞注入療法は輸注療法に比較して、癌組織へのエフェクター細胞の直接の接触が可能な理想的な投与方法であり、今後、臨床応用に向けた展開が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Human T cell immunotherapy has shown promising results in clinical trials; however, its antitumor efficacy is limited, including results in solid tumors. Ex-vivo expanded T cells show potent cytotoxicity against various types of cancer cells in a major histocompatibility complex (MHC)-unrestricted manner. Although several clinical trials of systemic cancer immunotherapy using T cells have been conducted, the results are unsatisfactory. The effector (T cell)-to-target (tumor cell) (E/T) ratio is an important factor determining cytotoxicity. A bladder instillation approach was used to increase the E/T ratio. The efficacy of T cell immunotherapy was examined in an orthotopic xenograft model. In Vivo Imaging System (IVIS) analysis revealed the potent cytotoxicity of weekly intravesical administration of T cells. The results indicate that the bladder infusion approach may be clinically applicable and could have beneficial effects in refractory bladder cancer.

研究分野：膀胱癌

キーワード： T細胞 膀胱癌 膀胱注入療法 正所性膀胱癌モデル

1. 研究開始当初の背景

膀胱 CIS は、ときに難治性となり、膀胱全摘の適応となる場合もあるが、膀胱内 BCG 注入療法は特に CIS に対し高い奏効率を示し、治療法の第一選択となっている。その抗腫瘍メカニズムは、多岐にわたるが、癌細胞内に BCG 菌が取り込まれることによる細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の活性化が、大きな役割を担う。しかし、CTL が抗腫瘍効果を発揮するために必要な MHC を、一部の癌細胞は欠失しているとされ、BCG 無効症例も存在する。この為、膀胱 CIS に対するより低侵襲かつ確実性の高い治療法の開発が望まれている。

リンパ球ストレス監視機構を担うとされる

T 細胞は、CTL とは異なり MHC 非拘束性の抗腫瘍活性を有する。また、本来 T 細胞はリンパ球中の 2-3% を占めるに過ぎないが、ビスホスホネート製剤 (BP) などを用いた *ex vivo* での大量増幅法 (Tanaka et al, Nature 1995) が確立されたことから、近年進行肺癌や腎癌に対する臨床試験も開始されており、今後腫瘍免疫療法の一部を担うことが期待されている。

共同研究者である芦原らは、正所性膀胱癌マウスモデルを用いて、T 細胞の膀胱内注入療法の有効性、および BCG 注入療法が有効性を示さない MHC クラス I の欠失した膀胱癌細胞に対しても、T 細胞が抗腫瘍効果を示すことを報告した (T Yuasa, K Sato, E Ashihara., et al. *Cancer Immunol Immunother.* 58:493-502. 2009: 図 1)。そこで、我々は、T 細胞による免疫療法を膀胱癌とくに CIS に対する新規治療法として臨床応用することを最終目標として共同研究を実施する。

2. 研究の目的

主に自然免疫を司る T 細胞は、MHC 非拘

束性に様々な癌種に対して抗腫瘍効果を発揮し、T 細胞免疫療法の臨床試験が既に行われている。しかし全身投与による臨床試験では、治療効果は満足のものはない。そこで本研究では、T 細胞の効果を最大限に発揮するために未だ臨床試験が行われていない T 細胞膀胱内注入療法に着目し、その治療効果を正所性膀胱癌モデルマウスを用いて検証した。更に、 $\gamma\delta$ T 細胞の感受性を高めるべく、抗がん剤を併用した免疫複合療法の可能性を検証するため、標準治療薬であるゲムシタピン やシスプラチン、その他数種類の抗癌剤併用による T 細胞複合免疫療法による抗腫瘍効果を検討した。

3. 研究の方法

1) T 細胞の分化誘導

1. 書面にてインフォームドコンセントを得た健康人の末梢血から単核球を分離後、IL-2 およびゾレドロン酸 (ZOL) を用いて T 細胞を大量培養し、使用まで凍結保存した。

2) 正所性膀胱癌マウスモデルの作製

1. ヒト膀胱癌細胞株にルシフェラーゼ遺伝子を導入した Luc-膀胱がん細胞株を作製した。
2. Luc-膀胱がん細胞株を 5-6 週齢の雌の SCID マウスの尿道から投与し、*in vivo* imaging system (IVIS) にて低侵襲かつ経時的に評価できる正所性膀胱癌マウスモデルを作製した。

3) 正所性膀胱癌マウスモデルでの T 細胞の抗腫瘍効果の検討

1. 癌細胞投与 1 週間後に、膀胱がん細胞の生着を IVIS にて確認した。
2. 膀胱内に発光を認めた担がんマウスに対して、凍結保存した T 細胞を解冻し細胞治療に用いる。治療群: T 細胞 (1×10^7 個) + ZOL (5 μ M) 膀胱内注入、コントロール群: PBS (-) 膀胱内注入を、

それぞれ週1回合計4回経尿道投与し、各処置で細胞投与4時間後に尿道結紮糸を抜糸した。治療効果は、治療前にIVISを用いて週1回測定する。なお、評価項目としては2群での生体発光値の各個体での経時的変化を定量化した。

4) ゲムシタピン(GEM)前処置併用による

T細胞の抗腫瘍効果の検討

1. GEMの前処置併用により、治療群:GEM(5 μ M)経腹腔内前投与+ T細胞(1×10^7 個)+ZOL(5 μ M)膀胱内注入、コントロール群:GEM(5 μ M)経腹腔内前投与+PBS(-)膀胱内注入を、それぞれ週1回合計4回経尿道投与し、3)同様の方法で検討した。

5) T細胞療法の安全性の検討

本治療法の安全性の確認のため、血算、血液生化学検査を行った。また組織学的な評価のために両群の治療後マウスの膀胱を摘出して組織切片を作製して炎症細胞の浸潤の有無や正常尿路上皮に対しての障害の有無を検討した。

4. 研究成果

1) T細胞の分化誘導

健康人の末梢血から分離した末梢血単核球より、IL-2+ZOLによる T細胞の培養法を確立した。11日間の培養で増幅効率は約500-800倍と良好であった。

2) T細胞の抗腫瘍効果の検討

フローサイトメトリー法(FCM)、共焦点レーザー顕微鏡を用いた蛍光免疫染色法により抗腫瘍効果を確認しており、*in vitro*系における T細胞による抗腫瘍効果は、約60%以上と良好であった。

3) 標準治療薬併用による T細胞の抗腫瘍効果に及ぼす影響の検討

抗癌剤を併用した細胞免疫複合療法をテーマに標準治療薬であるGEM、CCDPならびに他抗癌剤を使用して癌細胞に前処置するこ

とで、GEMの前処置において、殺細胞効果を認めない低濃度にも関わらず、 T細胞の抗腫瘍効果に相乗効果をもたらす現象を発見した。

4) T細胞の抗腫瘍効果を増強させた分子の探索

FCMおよびRNA干渉法により、GEMの前処置による抗腫瘍効果が、 T細胞が認識するMICA/Bの膀胱がん細胞上での発現亢進であることを確認した。

5) 正所性膀胱癌モデルマウスにおける T細胞膀胱注入療法の有効性ならびにGEM併用による効果

Luc-膀胱がん細胞株を用いた正所性膀胱がんモデルにより、IVISを用いて非侵襲的に抗腫瘍効果を評価できる *in vivo*実験系を確立し、 T細胞膀胱注入療法の有効性ならびにGEM併用による効果を *in vivo*で検証した。第0日に 1×10^6 個のUMUC3-Luc細胞を経尿道的に膀胱内に移植した。第7日にIVISで生体発光を認めた担がんモデルマウスに対して、 1×10^7 個の $\gamma\delta$ T細胞とZOL(5 μ M)を同時に経尿道的に投与し治療を行った(第7日、第14日、第21日、第28日)。治療群のマウスでは無治療群のマウスと比較して、生体発光の著明な減弱を認めた。次にGEMの経腹膜の前処置を4回(第6日、第13日、第20日、第27日)を追加したところ、GEM処置無し群と比較してGEM処置群では $\gamma\delta$ T細胞治療効果が統計学的に有意に増強した。

以上より、膀胱がん細胞においてGEMの抗腫瘍効果増強の機序にMICA/B-NKG2D経路が関与していることが明らかにされ、 T細胞の抗腫瘍効果増強のためMICA/B-NKG2D経路が標的経路の1つであり、標準治療薬を低濃度で使用することでこの経路による T細胞の抗腫瘍効果を増強させることが推察された。本研究の結果から、 $\gamma\delta$ T細胞膀胱内注入療法は強力な抗腫瘍効果を発揮し、さらにGEMは $\gamma\delta$ T細胞の感受性を増強させることが示唆された。膀胱内 $\gamma\delta$ T細胞注入療法は輸注療法に比較して、癌組織へのエフェクター細胞の直接の接触が可能な理想的な投与方法であり、今後、臨床応用に向けた展開が期待できる。

ただし、本検討は細胞株での検討であり、今後は患者検体を用いた検討、さらに倫理委員

会の承認後、ヒトを対象とした臨床研究において T 細胞膀胱注入療法の安全性および有効性を検証する必要があると考える。

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 12 件)(全て査読有り)

1. Shimizu T, Tomogane M, Miyashita M, Ukimura O, Ashihara E. Low dose gemcitabine increases the cytotoxicity of human Vγ9Vδ2 T cells in bladder cancer cells in vitro and in an orthotopic xenograft model. *Oncoimmunology*: volume7, Issue5, e1424671, 2018.
2. Hongo F, Yamada Y, Ueda T, Nakamura T, Naya Y, Kamoi K, Okihara K, Ichijo Y, Miki T, Yamada K, Ukimura O. Preoperative lipiodol marking and its role on survival and complication rates of CT-guided cryoablation for small renal masses. *BMC Urol* 1817(1):10, 2017.
3. Shin T, Smyth TB, Ukimura O, Ahmadi N, de Castro Abreu AL, Oishi M, Mimata H, Gill IS. Detection of prostate cancer using magnetic resonance imaging/ultrasonography image-fusion targeted biopsy in African-American men, *BJU Int* 23, 2017
4. Nakamura T, Kawauchi A, Oishi M, Ueda T, Shiraishi T, Nakanishi H, Kamoi K, Naya Y, Hongo F, Okihara K, Miki T. Post-chemotherapy laparoscopic retroperitoneal lymph node dissection is feasible for stage IIA/B non-seminoma germ cell tumors. *Int J Clin Oncol* 21(4): 791-5, 2016.
5. Shin T, Ukimura O, Gill IS. Three-dimensional printed model of prostate anatomy and targeted biopsy-proven index tumor to facilitate nerve-sparing prostatectomy. *Eur Urol* 69(2): 377-9, 2016.
6. Nakamura T, Ueda T, Oishi M, Nakanishi H, Shiraishi T, Fujihara A, Naito Y, Kamoi K, Naya Y, Hongo F, Okihara K, Miki T. Importance of continuous sequential chemotherapy and multimodal treatment for advanced testicular cancer: a high-volume Japanese center experience *Medicine (Baltimore)* 94(11), 2015.
7. Nakamura T, Oishi M, Ueda T, Fujihara A, Nakanishi H, Kamoi K, Naya Y, Hongo F, Okihara K, Miki T. Clinical outcomes and histological findings of patients with advanced metastatic germ cell tumors undergoing post-chemotherapy resection of retroperitoneal lymph nodes and residual extraretroperitoneal masses. *Int J Urol*:12760, 2015.
8. Naya Y, Nakamura T, Oishi M, Ueda T, Nakanishi H, Naitoh Y, Hongo F, Kamoi K, Okihara K, Tanaka O, Yamagami T, Yamada K, Miki T. The efficacy of radio-frequency ablation for metastatic lung or liver tumors of male germ cell tumors as an alternative minimally invasive therapy after salvage chemotherapy. *Int J Clin Oncol*, 2015.

9. Nakamura T, Ueda T, Oishi M, Nakanishi H, Shiraishi T, Fujihara A, Naito Y, Kamoi K, Naya Y, Hongo F, Okihara K, Miki T. Importance of continuous sequential chemotherapy and multimodal treatment for advanced testicular cancer: a high-volume Japanese center experience. *Medicine (Baltimore)*. 94(11): 2015.
 10. Nakamura T, Ueda T, Oishi M, Nakanishi H, Fujihara A, Naya Y, Hongo F, Kamoi K, Okihara K, Miki T. Salvage combined chemotherapy with paclitaxel, ifosfamide and nedaplatin for patients with advanced germ cell tumors. *Int J Urol*.22(3)15: 288-93, 2015.
 11. Ueda T, Ito S, Shiraishi T, Taniguchi H, Kayukawa N, Nakanishi H, Nakamura T, Naya Y, Hongo F, Kamoi K, Okihara K, Kawauchi A, Miki T. PAX2 promoted prostate cancer cell invasion through transcriptional regulation of HGF in an in vitro model *Biochim Biophys* 1852(11), 484: 2467-73, 2015.
 12. Ashihara E, Takada T, Maekawa T. Targeting the canonical Wnt/ β -catenin pathway in hematological malignancies. *Cancer Sci*, 106: 665-671, 2015.
- 〔学会発表〕(計 7 件)
1. Shimizu T, Miyashita M, Tomogane M, Ukimura O, Ashihara E: Low dose gemcitabine increases the cytotoxicity of human $\gamma\delta$ T cell in in vitro and in an orthotopic xenograft model in bladder cancer. 33rd European Association of Urology (EAU) Congress (Copenhagen), 2018.3.15-2
 2. Teruki Shimizu, Mako Tomogane, Masatsugu Miyashita, Osamu Ukimura, Eishi Ashihara: Combined use of standard anticancer agents increases the cytotoxicity of human $\gamma\delta$ T cell in in vitro and in vivo in bladder cancer. 第 106 回日本泌尿器科学会総会. (京都), 2018.4.19-22
 3. 清水輝記、宮下雅亜、本郷文弥、浮村理、芦原英司: 難治性膀胱癌に対する T 細胞と標準治療薬併用による複合免疫療法の開発. 第 27 回泌尿器科分子細胞研究会 (東京), 2018.2.2-3
 4. Abreu A ,Chopra S Ukimura O et al . Technical Innovations to Robotic Level II and III Thrombectomy : Step by Step . American Urological Association Annual Meeting .2016 .5 .9; San Diego , USA
 5. Ueda T ,Ito S ,Shiraishi T ,Kayukawa N , Taniguchi H , Naya Y , Hongo F , Okihara K , Ukimura O . Target genes analysis of paired box2 , regulator of prostate cancer cell invasion . American Urological Association Annual Meeting .2016 .5 .9; San Diego , USA
 6. 中西 弘之 中村晃和 , 上田 崇 , 大石正勝 , 白石 匠 , 田原秀一 , 井上裕太 , 三木恒治 , 浮村 理 , 島田順一 , 加藤大志朗 , 井上 匡美 . 進行性精巣腫瘍肺転移に対する化学療法後の残存肺腫瘍切除に関する検討 . 第 104 回 日本泌尿器科学会総会 . 2016 . 4 . 24 ; 宮城 .
 7. 上田 崇 , 上田紗弥 , 粥川成優 , 谷口英史 , 大石正勝 , 中村晃和 , 納谷佳男 , 本郷文弥 , 鴨井和実 , 沖原宏治 , 浮村 理 . 前立腺器官形成因子 PAX2 標的遺伝子群

の発現制御機構およびアンドロゲン非依存性前立腺癌増悪メカニズムの解析 . 第 104 回 日本泌尿器科学会総会 2016 . 4 . 25 ; 宮城 .

〔図書〕(計 5 件)

1. 中村晃和 . 克誠堂出版、後腹膜リンパ節転移に対する 腹腔鏡リンパ節郭清術 外科医からの要望 . 最先端外科手術 麻酔管理 : 241-245 . 2016 .
2. 浮村 理 . 医学図書出版、前立腺癌の局所療法 -Targeted Focal Therapy of Prostate Cancer : 標的化前立腺癌局所療法- 泌尿器外科 29(2):107-111 2016 .
3. 本郷文弥, 浮村 理 . 医学図書出版、特集 進行性腎細胞癌に対する治療の最前線 薬物治療における効果・安全性予測マーカー . 泌尿器外科 29(6) : 975-980 . 2016 .
4. 中村晃和 , 浮村 理 . 医学図書出版、胚細胞腫に対する後腹膜リンパ節郭清術 . 泌尿器外科 29(12) : 1727-1730 . 2016 .
5. 中村晃和 , 浮村 理 . 医学書院出版、特集 進行期精巣腫瘍の診療-難治症例に挑む<導入化学療法で寛解が得られない症例への対処>二次以降の標準量化学療法 . 臨泌 7(70) : 500-504 . 2016 .

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :

番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕
ホームページ等

<http://kpum-urology.com/>

<http://labo.kyoto-phu.ac.jp/seiri/seiri-j.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

中西 弘之(NAKANISHI HIROYUKI)
京都府立医科大学・医学研究科・客員講師
研究者番号 : 40398376

(2)研究分担者

浮村 理 (UKIMURA OSAMU)
京都府立医科大学・医学研究科・教授
研究者番号 : 70275220

研究分担者

芦原 英司 (ASHIHARA EISHI)
京都薬科大学・薬学部・教授
研究者番号 : 70275197

研究分担者

中村 晃和(NAKAMURA TERUKAZU)
京都府立医科大学・医学研究科・客員教授
研究者番号 : 10381964

研究分担者

上田 崇 (UEDA TAKASHI)
京都府立医科大学・医学研究科・客員講師
研究者番号 : 50601598

研究分担者

三木 恒治 (MIKI TSUNEHARU)
京都府立医科大学・医学研究科・特認教授
研究者番号 : 10243239

(3)連携研究者

()

研究者番号 :

(4)研究協力者

清水 輝記 (SHIMIZU TERUKI)

松下記念病院泌尿器科・医長