

平成 22 年 6 月 16 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008 ～ 2009

課題番号：20791121

研究課題名（和文）リポソーム法を用いた IL -15 遺伝子導入による膀胱癌治療および再発予防効果

研究課題名（英文）Liposomal Interleukin -15 Gene Therapy in an Orthotopic Bladder Cancer Model and Acquisition of Immunologic Memory

研究代表者

松本 一宏（MATSUMOTO KAZUHIRO）

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：80366153

研究成果の概要（和文）：リポソーム法を用い、MBT-2細胞に対して *in vitro* に IL -15 遺伝子を効率的に導入し、IL -15 を分泌させることができた。さらに *in situ* に IL -15 遺伝子をマウス膀胱癌（MBT-2細胞）モデルに導入することによって、膀胱腫瘍の生育が有意に抑制され、また生存率を上昇させることが証明された。またその抗腫瘍効果には、CD8陽性T細胞が関与していることが判明した。IL -15 遺伝子導入治療を受けたマウスに、再度 MBT-2細胞を皮下に移植したところ、その腫瘍生育が有意に抑制された。よって IL -15 遺伝子導入治療を受けたマウスは、膀胱癌に対する免疫記憶を獲得している可能性が示唆された。よって本治療法は、筋層非浸潤性膀胱癌の Adjuvant としての膀胱内注入治療に応用できる可能性があると考えられた。

研究成果の概要（英文）：In proportion to the liposomal transfection efficiency *in vitro*, the IL -15 concentrations in the culture supernatant were dose dependent after the IL -15 gene plasmid transfection. Our results *in vivo* showed that using liposome mediated *in situ* gene transfer via simple intravesical instillation, intravesical IL -15 plasmid transfection *in situ* exhibits significant tumor suppression in an orthotopic bladder cancer model, and that CD8⁺T-cells seemed to be associated with its anti-tumor effect. In mice that survived the intravesical IL -15 gene therapy, rechallenged MBT-2 cells were suppressed and they had the potential to acquire immunologic memory. In conclusion, the present data indicate that IL -15 gene therapy may be a promising new adjuvant therapy for non-muscle invasive bladder cancer and a useful substitute for BCG treatment.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

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：インターロイキン -15、遺伝子治療、免疫治療、筋層非浸潤性膀胱癌

1. 研究開始当初の背景

筋層非浸潤性膀胱癌に対しては再発予防のためadjuvant治療として、BCG膀胱内注入療法がスタンダードな治療として現在広く施行されている。BCGは免疫システムの非常に強力な賦活物質であるため、多数のサイトカインの産生が誘発され、それらにより宿主の免疫システムが誘導される。現時点で抗癌剤膀胱内注入療法に比べ、再発予防の点で有効である一方、現状のBCG膀胱内注入療法の問題点として、長期間の再発予防効果が乏しく、また効果が膀胱局所的であるため晩期の再発進展や転移が認められる、依然として3年以内に約40%のケースが再発している、誘導される免疫反応により、高頻度に排尿困難、血尿、発熱等の強い副作用を認める等が挙げられる。これらの問題を克服するためには、晩期の免疫応答を失わないよう、生涯にわたる免疫記憶を獲得させる、再発率、進展率をさらに減少させるため、より強力な抗癌反応を誘導する、あるいは他の抗癌剤を少量投与し治療の増強を図る、副作用を抑制するため、抗癌作用をもたらすサイトカインのみを選択的に増強することが必要である。これまで当教室においてリポソーム法を用い、IL-2(Y.Horiguchi *et al*, *Gene Therapy*, 2000)、およびIL-12(M.Horinaga *et al*, *Urology*, 2005)のサイトカインに関して、マウス膀胱癌同所性モデルを用いてその強い抗腫瘍効果を証明し報告してきた。これらは前述した問題点、を改善する大きな布石となると考えている。しかしながら、晩期の免疫応答を誘導することに対しては十分な効果が期待できないのが現状であった。今回我々は の問題点を克服すべく膀胱癌再発に対する生涯免疫の獲得を目的とした研究に着手すべく本研究を計画した。

2. 研究の目的

IL-15はマクロファージ、DC、上皮細胞が発現し、自然免疫系を担うNK細胞、NKT細胞、DCの機能成熟に寄与している。これまでのIL-2やIL-12同様に即時型の抗腫瘍反応に関与している。さらにIL-15の特徴としてCD8+メモリーT細胞の維持に非常に重要であることが最近報告された(Schluns *et al*, *J. Immunol.*, 2002 および Becker TC *et al*, *J.*

Exp. Med., 2002)。つまり、膀胱癌に対する長期の抗腫瘍効果を促す生涯免疫の獲得の可能性を秘めたサイトカインであると考えられる。またリポソーム法がウイルスベクターに劣る点として蛋白発現が一過性であることが挙げられるが、IL-15を用いる遺伝子治療においては一旦メモリーT細胞を賦活化できればその免疫記憶は長期間維持されるため十分効果が期待できる。これまで他癌においてIL-15遺伝子導入治療の抗腫瘍効果についての報告は散見されるが(Raffaela M *et al*, *Int. J. Cancer*, 2000 や K.Kimura *et al*, *Eur. J. Immunol*, 1999 および K.Tasaki *et al*, *Cancer Gene Ther.*, 2000) いずれも皮下腫瘍モデルを用いた研究であり、遺伝子導入方法も *ex vivo* であるため臨床応用には程遠いものであると考えられる。当教室では長年にわたりマウス膀胱癌正所性モデルの確立を維持してきた。これはC3H/HeNマウスの膀胱内にMBT-2細胞(マウス膀胱癌細胞)を注入し生着させる方法であり、100%近くの癌生着率を示すため十分に膀胱癌研究モデルとして使用できるものである(Kikuchi E *et al*, *J. Urol.*, 2003)。皮下腫瘍モデルと異なりより臨床のヒト膀胱癌に近く、さらにヌードマウスやSCIDマウスを使用しないため、免疫治療における動物実験での検討に非常に優れていると考えられる。今回はIL-15を前述したリポソーム法を用いて膀胱に *in situ* に遺伝子導入しその治療効果を検討する。

3. 研究の方法

1) まず *In vitro*にてMBT-2細胞にリポソーム法にてLacZプラズミド導入を行い、X-gal染色にてプラズミド導入効率を確認する。また同様にIL-15プラズミド導入もを行い、上清中のIL-15産生量をELISA法にて測定する。各濃度のプラズミドとリポソームは1:5の比率で30分間混ぜてリポプレックスを作成し、MBT-2細胞培養dishに添加する。

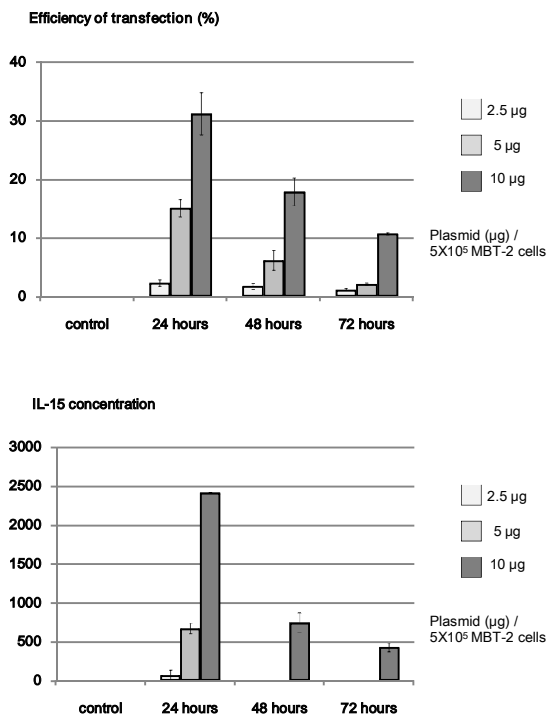
2) 全身麻酔下にC3H/HeNマウスの膀胱内へMBT-2細胞(5×10^5 cells)を注入し2時間尿道を結紮することにより、マウス膀胱癌正所性モデルを作成する。本研究はすでに共同研究者(菊地栄次)より論文発表を行っている(Kikuchi E *et al*, *J. Urol.*, 2003)。

3) IL -15プラズミドとリポソームを5 μ g : 25 μ gの比率で30分間混ぜてリポプレックスを作成し、RPMIに懸濁し、計0.2mlとする。これをDay5, 8, 11, 14, 17, 20の6回、全身麻酔下のマウス膀胱癌正所性モデルの膀胱内に注入する。同様にRPMI投与群、LacZ遺伝子投与群もコントロールとして作成する。連日マウス尿を採取しIL -15濃度をELISA法にて測定し、IL -15の分泌量を測定する。23日目に全マウスを安楽死させ、膀胱腫瘍を摘出し、その重量を測定し抗腫瘍効果を判定する。

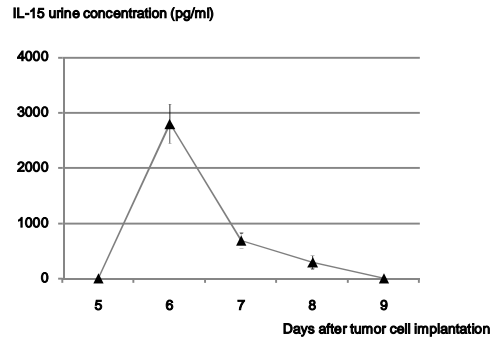
4) IL -15遺伝子治療を行い生存が確認されたマウスに対して再度MBT -2細胞を皮下移植する。IL -15による免疫応答が記憶されていれば、MBT -2細胞は拒絶されるはずである。

4 . 研究成果

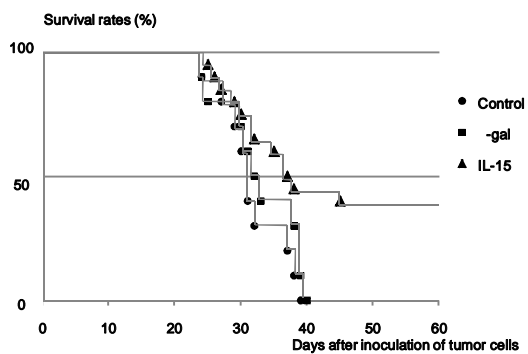
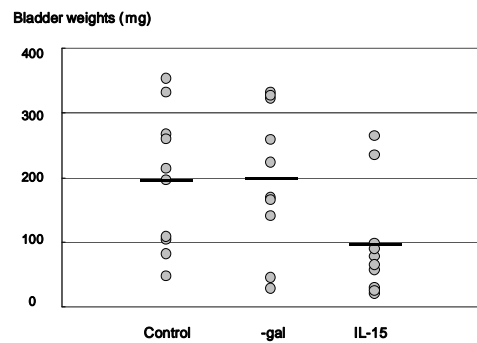
1) *In vitro* では10 μ g/5 $\times 10^5$ MBT2 cellsのプラズミド濃度において最も効率よく遺伝子導入を行うことができた。また遺伝子導入効率に並行して、上清中の IL -15 濃度の上昇も確認された。



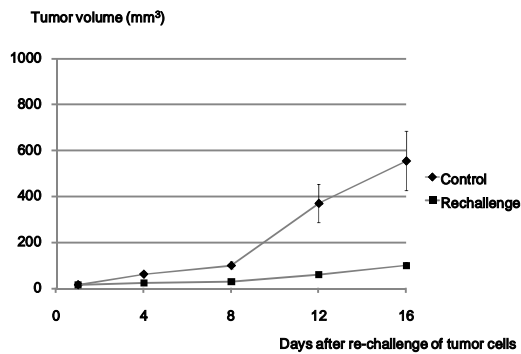
2) *In situ*での膀胱内への遺伝子導入では、特に腫瘍巣に強いX-gal染色を認め、効率的な遺伝子導入が行われていることが確認された。またIL -15遺伝子導入により、その後3日間の尿中IL -15濃度の有意な上昇を確認した。



3) IL -15治療群のマウスにおいては、コントロール群に比べ有意に腫瘍増殖抑制効果を認め、さらに生存率の延長を認めた。また摘出した腫瘍の免疫組織化学の結果、IL -15治療群の腫瘍では、腫瘍を取り囲むようにCD8陽性細胞の浸潤を認めた。



4)最後にIL -15治療にて生き延びたのマウス皮下に再度MBT -2細胞をRe-challengeした。皮下移植されたMBT -2細胞の増殖速度は、新たなコントロール群に比べ有意に抑制された。



以上により *In situ*による IL -15 遺伝子治療にて、効率的な遺伝子導入と IL -15 の発現が確認され、またマウス膀胱癌に対する腫瘍増殖抑制を認めた。その抗腫瘍効果には、CD8 陽性 T 細胞が関与しているものと考えられた。さらに Re -challenge された皮下腫瘍が拒絶されたことより、抗腫瘍免疫記憶を獲得している可能性が示唆された。

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0件)

〔学会発表〕(計3件)

松本一宏、菊地栄次、宮嶋哲、大家基嗣.

マウス膀胱癌に対する Interleukin -15 遺伝子治療. 第 13 回日本がん分子標的治療学会.2009/6/25.徳島.

Matsumoto, K., Kikuchi, E., Horinaga, M., Miyajima, A., Nakagawa, K., Oya, M. Intravesical Interleukin -15 Gene Therapy in an Orthotopic Bladder Cancer Model. The 105th annual meeting of American Urological Association.2009/4/27. Chicago.

Matsumoto, K., Kikuchi, E., Horinaga, M., Kohno, H., Miyajima, A., Nakagawa, K., Nakashima, J., Oya, M. Transduction of murine bladder cancer cells with interleukin -15 gene induces antitumor effects .第 67 回癌学会総会. 2008/10/29.名古屋.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)
取得状況(計0件)

〔その他〕特になし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

松本 一宏 (MATSUMOTO KAZUHIRO)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：80366153

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし