

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K09551

研究課題名(和文) マクロファージ吸着物質による牛結核菌BCGの抗腫瘍効果増強と副作用減弱法の開発

研究課題名(英文) Development of a method for enhancing the antitumor effect and reducing the side effects in therapy for Bladder cancer with Mycobacterium Bovis (BCG) by Macrophage adsorbent

研究代表者

能見 勇人 (Nomi, Hayahito)

大阪医科薬科大学・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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：Meth A (MA) 腫瘍細胞をBALB/cマウス腹腔に移植するとマウスは腫瘍死する。しかしBCG感作マウスでは、腹腔にMA細胞とBCGを同時に移植した場合、MA細胞は駆除された。M 吸着物質によりM を腹腔から先に除くとMA細胞は完全に抑制された。MAの増殖にM が腫瘍関連M (TAM)として利用されるものと考察した。BCG感作マウスでは、M が活性化されM1-M となりM1-shiftされTAMが抑制される。この際、腹腔内にINF- が長期間発現することも確認した。まとめるとBCG療法の機序は、INF- 存在下にM はM1-shiftされTAMが抑制されることによる抗腫瘍効果と考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

BCG療法の機序として、マクロファージ(M)を炎症性の活性化し、腫瘍関連M として腫瘍発育に利用されるM を減少させる機序があることを示した。また、BCG療法は、Meth A (MA) 線維肉腫細胞は著効するが、腫瘍の完全駆逐後もINF- はマウス腹腔内で高値が続くことを確認した。別に、肥満細胞腫P815に対しては、BCGの抗腫瘍効果はMAより低かったことからBCG療法の効果は腫瘍の種類により変化するものと考えられた。BCG療法の機序の正しい理解がすめば、より効率的なBCGの投与方法や副作用の低減方法や、さらにはBCG療法に代わる抗腫瘍的な治療の開発に将来つながる可能性があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：When Meth A (MA) tumor cells are implanted into the peritoneal cavity of BALB/c mice, the mice die from the tumor. However, in BCG-sensitized mice, when MA cells and BCG were simultaneously transplanted into the peritoneal cavity, MA cells were completely eradicated. Furthermore, when M was first removed from the peritoneal cavity using an M-adsorbing substance, MA cells were completely suppressed. Based on this, we considered that the proliferation of MA requires the use of M as tumor-associated M (TAM). In the BCG-sensitized mouse model, we confirmed that M was activated as M1-M, and TAM was suppressed by M1-shifting. At this time, we also confirmed that INF- was expressed in the peritoneal cavity for a long period term. In summary, the antitumor mechanism of BCG therapy was thought to be an effect by M1-shifting of M and suppression of TAM, in the presence of INF-.

研究分野：移植

キーワード：BCG M1腫瘍関連 BCG療法 尿路上皮癌 膀胱注入療法 牛結核菌 マウス M1 shift

1. 研究開始当初の背景

牛弱毒結核菌 (BCG : Bacille Calmette-Guerin) は表在性膀胱癌の内視鏡的切除術の術後、膀胱癌の再発予防療法として臨床的に広く使用されている。BCG 療法は、他の抗がん剤の膀胱注入療法と比較しても、その高い再発予防効果が確認されている。現在、臨床では膀胱癌の領域において、再発率が高い High-grade の尿路上皮癌の表在性膀胱癌を中心に、経尿道的切除術の術後以降に BCG 膀胱注入療法は行われるが、副作用がかなり多い点が問題である。この BCG による免疫賦活療法においては、週 1 回膀胱にカテーテルを挿入し BCG を 40-80mg 注入し 2 時間排尿を我慢して排尿と同時に放出するといったことを 6-8 週間に渡って数回繰り返し行う方法である。またメンテナンスとして場合によりその半年後などにも 3 週間の投与を行うこともあり比較的患者の肉体的負担は多い。通院回数の多くが、昨今の診療時の外来での待ち時間の負担さらに、注入後の初回排尿までの 2 時間の待ち時間を含めると、時間的な負担も相当大きい上に、尿道に毎回カテーテルを通す必要がある点も心理面も含め患者負担は多い。そして、最も問題であるのが、注入後の頻尿、発熱、排尿時痛、膀胱の萎縮、ライター症候群などの副作用である。特に膀胱の萎縮が顕著になると極めて、一定の確率でおこることも知られている。膀胱萎縮を来したことにより、膀胱全摘に至った症例も少数ではあるが存在する。

BCG の抗腫瘍効果について、その作用機序に関する研究は多数行われてきたが、現在においても謎の部分も多く、その作用機序の解明が待たれる領域ともいえる。BCG の抗腫瘍効果を維持したままでの副作用のより良い低減法は開発が期待されている。

2. 研究の目的

BCG 療法の作用機序のさらなる解明と BCG 療法の効率化を図りたい。BCG 膀胱注入療法の作用機序としては単球/マクロファージ (M ϕ) 系が、BCG により活性化され炎症性の BCG-M ϕ (M1-M ϕ) となり、BCG-M ϕ 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 ϕ 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考察しており、その考察の正誤を検証する。

また、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 吸着物質併用の療法を開発したい。

3. 研究の方法

1) BCG は臨床で膀胱癌再発予防療法に用いられているイムノブラダグ®を購入して用いる。Meth A 細胞は本学の吉田先生にご提供いただいたものを継代したものを使用し、BALB/c マウスは、日本 SLC より購入したものを使用する。

それぞれのマウスの腹腔浸潤細胞数と腫瘍細胞の数は、マウスを安楽死させたうえで直ちに腹腔を計 20mL の PBS で洗浄し採取し、腹腔滲出細胞 (PEC) を含む液として集める。マウスの腹腔に、Meth A 繊維肉腫細胞に対する BCG の抗腫瘍効果を検証した。(通常、 3×10^6 個の Meth A 腫瘍細胞を BALB/c マウスの腹腔内に移植すると自然経過では約 21-23 日でマウスは腫瘍死にいたる。)

BCG を 1week 前などに投与した BCG 感作マウスモデル作成。BCG 感作モデルと非感作モデルとの比較実験を行う。これらのマウスに Meth A 腹腔移植時にも BCG を投与するモデル、BCG を投与していないマウスモデルをそれぞれ作成し比較する。すなわち、BCG 1 mg を 1 週

間前に腹腔内に投与して感作させたマウスにおいて、2回目の BCG1mg と Meth A 腫瘍を同時に投与したモデルと、感作の無いマウス間でのマウス腹腔内の Meth A 細胞数の推移を経過した日数ごとにそれぞれ PEC を採取して比較する。

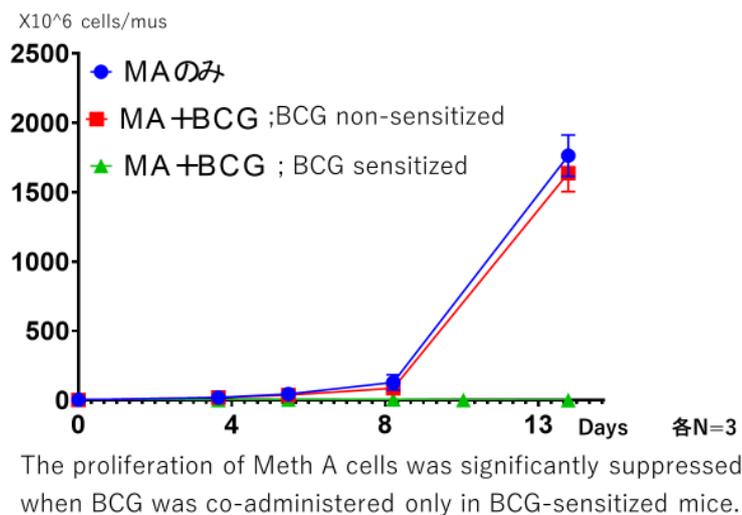
2) BCG の感作ありと感作なしのモデルで腹腔右内の PEC 細胞の推移を細胞分析装置 Facs で検討し、その細胞の組成を調査し、PEC 細胞の撮影には、活性化された Mφ と NKT 細胞をガラスプレートに付着させ抗体蛍光 Mac-1。抗蛍光 NK-1.1 と Fc-Blocker も使用し、蛍光顕微鏡で観察し確認する。また腹腔洗浄液を ELISA 法で INF γ や IL2R の推移について検証する。

3) 今回の事象が Meth A 腫瘍特有のものかほかの腫瘍細胞でも成立するものか否かを検証するため、上記 1) と同様の実験をマウスの肥満細胞腫である P815 と BALB/c マウスを用いて行う。

4. 研究成果

Meth A 線維肉腫腫瘍 (MA) 細胞を Balb/c マウス腹腔内に移植すると約 21-23 日でマウスは腫瘍死する。マウス腹腔に MA 細胞に対する BCG の抗腫瘍効果をまずは検証、 3×10^6 の Meth A 腫瘍細胞を腹腔内に移植しても、先行して BCG を感作させたマウスにおいては、BCG と Meth A 腫瘍を同時に投与することで、MA 細胞がマウス腹腔内から完全に駆除された。このマウスは腫瘍再発なく 12 か月以上の長期生存が可能であった。BCG 感作なしマウスでは、MA 細胞の増殖しマウスは約 23 日で死に至り決定的な差が存在する (図 1)。

図 1



BCG 活性化マクロファージ (Mφ) 自体にも殺腫瘍細胞の効果があることを過去に確認したが、BCG 感作ありと MA 細胞を投与した群で活性化された Mφ と T 細胞が認め、T 細胞や Mφ が強く活性化が BCG の抗腫瘍効果の主と考えていた。

しかし、今回の一連の実験で、Mφ 吸着物質により Mφ を先に除くと MA 細胞の増殖が完全に抑制されることが判明し、Mφ が腫瘍関連 Mφ (TAM) としての利用されること抑制する効果の存在を推測した。BCG の感作あり無しの群間で決定的な予後の差が生じる原因は、TAM として利用されることとなりうる Mφ を BCG により先に活性化し M1-Mφ としておくと (Mφ の M1-shift) TAM として利用されず、TAM の抑制から BCG の抗腫瘍効果がでているものと考えられた。また、BCG 感作マウスでは、Mφ が活性化され M1-Mφ となり M1-shift され TAM が抑制される。この際、腹腔内に INF- γ が長期間発現することも確認した。

マウス腹腔内のサイトカインの調査として INF- γ を今回、主に検証した。BCG の先行感作ありのモデル、先行感作無しのモデルの群間では INF- γ の発現量に有意差があり、感作ありの群

が多い。INF γ の発現時期は MA 腫瘍細胞が駆除された後にさらに増加することから、INF γ は持続的な M ϕ の活性化を行い、次の腫瘍もしくは BCG の侵入に備えて増加しているものと考えた。マウス腹腔内に INF γ が発現していると、M ϕ の強い M1-shift を来すことが可能であり TAM が抑制されると考えられた。

なお、マウス肥満細胞腫 P815 を用いた検証では MA 細胞のような、強い BCG 療法の効果は確認できず、マウスは腫瘍死した。このことから、BCG 療法は腫瘍の種類とくに、腫瘍の増殖に TAM が必要か否かにより状況が大きく異なるものと考えられた。

以上を一文にまとめると、「**BCG 療法の機序は、IFN- γ 存在下にマクロファージが繰り返しの BCG 投与により炎症性に活性化 (M1-shift) され、腫瘍関連マクロファージ (TAM) が抑制されることによるものである**」と考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 能見勇人、藤原裕也、加納陽祐、松永知久、前之園良一、吉川勇希、西村一希、内本泰三、上原博史、小村和正、稲元輝生、東 治人
2. 発表標題 マウスのMeth A繊維肉腫細胞に対するBCG療法の効果と機序の検証
3. 学会等名 第71回日本泌尿器科学会中部総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 能見勇人、松永知久、前之園良一、堤 岳之、市橋 淳、吉川勇希、谷口俊理、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 マウスのMeth A繊維肉腫細胞に対するBCG療法の効果の検証とその機序の解明について
3. 学会等名 第109回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 能見勇人、松永 知久、前之園 良一、堤 岳之、平野 一、藤原 裕也、市橋 淳、吉川 勇希、谷口 俊理、小村 和正、上原 博史、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

1. 発表者名 Hayahito Nomi, Tomota Okabe, Kohei Kimura, Takaki Hanamori, Takuya Shinmyo, Kazuki Goji, Tomohisa Matsunaga, Rhochi Maenosono, Takuya Tsujino, Kazumasa Komura, Hirofumi Uehara, Teruo Inamoto, Haruhito Azuma
2. 発表標題 Investigation of the antitumor effect and mechanism of BCG therapy in the peritoneal cavity of mice
3. 学会等名 第111回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2024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)	大阪医科薬科大学・医学部・教授 (34401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------