

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 30 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591780

研究課題名（和文） 膀胱癌に対するBCG注入療法の作用機序の解明

研究課題名（英文） Analysis of mechanism of intravesical BCG therapy for bladder cancer

## 研究代表者

高橋 秀実 (TAKAHASHI HIDEMI)

日本医科大学・大学院医学研究科・大学院教授

研究者番号：40221361

## 研究成果の概要（和文）：

表在性膀胱癌に対する BCG 注入療法は腫瘍縮小及び再発防止に良好な成績を収めているが、その詳細な作用機序に関しては不明である。腫瘍免疫誘導の鍵を握る樹状細胞(dendritic cells: DC)は、体内に侵入した病原微生物や体内で発生した腫瘍等を監視するが、一般的に自身が癌化することは無いため、細胞外より取り込んだ腫瘍由来の癌抗原はクラス II MHC 分子より提示されるものの、CD4 陽性のヘルパーT 細胞がそれを認知するため、腫瘍を認識排除する特異的キラーT 細胞(cytotoxic T lymphocyte: CTL)は誘導されないと想定されてきた。ところが、捕捉した腫瘍断片由来の癌抗原をクラス I MHC 分子より提示する機能、すなわち”Cross-presentation” できる機能を有し、キラーT 細胞を誘導する樹状細胞亜群の存在が明らかとなり、その表面には DEC-205 分子が発現していることが明らかとなった。そこで末梢血由来の DC に生菌あるいは死菌 BCG を短時間作用させ DC 亜群の変動をみたところ、DEC-205 陽性 DC が選択的に活性化されることを見いだした。ただしこの際、生菌および死菌 BCG で処理した DC は細菌量に一致して傷害され、その数を減ずることが見いだされた。今後は、毒性を有する BCG ではなく、その亜成分であるミコール酸やリポアラビノマンナン(LAM)によってこのような選択的な DC 亜群の活性が誘導されるかを検討し、毒性のない BCG 亜成分を用いた膀胱癌の治療法の開発への道を拓く予定である。

## 研究成果の概要（英文）：

Intravesical bacillus Calmette-Guerin (BCG) therapy is considered the most successful immunotherapy against solid tumor of human bladder carcinoma, but the precise anti-tumor mechanism is still unknown. BCG-susceptible dendritic cells (DCs) have been thought as key cells to induce tumor-specific immunity. However, because these DCs will not be tumor cells generally and thus, they can present antigenic molecule obtained from external tumors via class II MHC molecules, by which tumor-specific class-I MHC molecule-restricted CD8-positive cytotoxic T lymphocytes (CTLs) will not be generated. Nevertheless, recent findings demonstrated that DC-subpopulation expressing DEC-205 can present captured antigenic molecules associated with their class I MHC by “cross-presentation”. In this study, we found that we could selectively activate DEC-205-expressing DCs when they were stimulated with viable BCG. Because such viable BCG seems to be toxic to DCs, we have currently examined the non-toxic components of BCG such as micolic acid or lipoarabinomannan (LAM) and found that these BCG-derived components have a potency to stimulate DEC-205-positive DCs. Based on the observation, we are trying to provide a new safer immunotherapy for human bladder carcinoma.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：樹状細胞(DC), BCG, DEC-205 陽性 DC, 共刺激分子, NKT 細胞,  $\gamma$   $\delta$  型 T 細胞

1. 研究開始当初の背景

表在性膀胱癌に対する BCG の膀胱内注入投与療法は、腫瘍縮小効果及び再発防止効果において非常に良好な成績をおさめていることが報告されているが、その作用機序に関しては殆ど分かっていない。

2. 研究の目的

ヒト表在性膀胱癌に対し、BCG 注入療法の有効性が広く認められるようになってきたが、その詳細な抗腫瘍機序に関してはほとんど分かっていない。本研究では、BCG 感染 DC による NKT 細胞及び  $\gamma$   $\delta$  型 T 細胞を主体とした自然免疫活性化のメカニズム解明のみならず、活性化自然免疫により破壊・放出された腫瘍産物抗原に対する特異的キラー T 細胞 (CTL) を主体とする獲得免疫活性化の可能性を探り、腫瘍免疫療法構築への新たな布石を確立することを目的とする。また、結核菌に感染した DC が死滅しやすいことから、結核菌由来の細胞傷害性のない成分によって同様の活性化が誘発されるかを検討する。

3. 研究の方法

生菌 BCG に感染した DC 上の抗原提示分子群 (MHC と CD1) ならびに共刺激分子群 (CD80 や CD86 等) の発現状態、各種サイトカインの放出能を比較し、生菌 BCG 感染 DC によって効率的に誘導される自然免疫担当細胞及び獲得免疫担当細胞の実体を明らかにする。次に、生菌 BCG 感染 DC により活性化された  $\gamma$   $\delta$  型 T 細胞や NKT 細胞の実体及びその認識抗原ならびに抗原提示分子を明らかにし、抗腫瘍作用を有するエフェクター群の実体を探る。そして、生菌 BCG 感染 DC により活性化された樹状細胞の特性を明らかにすると

ともに、この活性化が結核菌自身ではなく、結核菌由来の亜成分によっても、同様の活性化が誘導されるか否かを検討する。

4. 研究成果

腫瘍免疫誘導の鍵を握る樹状細胞 (DC) は、体表面に配置され体内に侵入した異物や体内で発生した腫瘍等を監視するが、一般的に自身が癌化することは無いため、細胞外より取り込んだ腫瘍由来の癌抗原はクラス II MHC 分子より提示され、CD4 陽性のヘルパー T 細胞がそれを認知する。このため、腫瘍を認識排除する特異的キラー T 細胞 (cytotoxic T lymphocyte: CTL) は誘導されない。ところが、捕捉した腫瘍断片由来の癌抗原をクラス I MHC 分子より提示する機能、すなわち” Cross-presentation” できる機能を有し、キラー T 細胞を誘導する樹状細胞亜群の存在が明らかとなり、その表面には DEC-205 分子が発現していることが示された (Cancer Immunol. Immunother, 59:1083-1095, 2010)。そこで末梢血由来の DC に生菌あるいは死菌 BCG を短時間作用させ DC 亜群の変動をみたところ、DEC-205 陽性 DC が選択的に活性化されることを見いだした。ただしこの際、生菌および死菌 BCG で処理した DC は細菌量に一致して傷害排除され、その数を減ずることが見いだされた。以上の観察結果に立脚し、毒性を有する BCG ではなく、その亜成分であるミコール酸やリポアラビノマンナン (LAM) によってこのような選択的な DC 亜群の活性が誘導されるかを検討したところ、こうした毒性のない BCG 亜成分により DEC-205 陽性 DC が優位に誘導されることを見いだした。以上の結果、結核菌亜成分を用いた膀胱癌のより安全で有効な治療法の開発への道を拓く可能性が見いだされた (論文作成中)。また、DEC-205 が強陽性の DC 群であり結核菌の感染

対象として知られている、表皮内 DC としてのランゲルハンス細胞の誘導法を見いだした (Eur. J. Immunol., 43(1): 270-280, 2013)。今後は、ランゲルハンス細胞に対する結核菌由来成分の影響も検討する予定である。

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 34 件)

1. Takahashi, H.: Species-specific CD1-restricted innate immunity for the development of HIV vaccine. *Vaccine*, 28S:B3-B7, 2010.
2. Takeuchi, H., Takahashi, M., Norose, Y., Takeshita, T., Fukunaga, Y., K., Takahashi, H.: Transformation of breast milk macrophages by HTLV-I: implications for HTLV-I transmission via breastfeeding. *Biomedical Res.*, 31:53-61, 2010.
3. Wakabayashi, A., Nakagawa, Y., Shimizu, M., Takahashi, H.; Development of anti-tumor immunity by oral vaccination with tumor antigen and cholera toxin. *J. Nippon Med. Sch.*, 77:50-52, 2010.
4. Inaba, K., Fukazawa, Y., Matsuda, K., Himeno, A., Matsuyama, M., Ibuki, K., Miura, Y., Koyanagi, Y., Nakajima, A., Blumberg, R. S., Takahashi, H., Hayami, M., Igarashi, T., Miura, T.: Small intestine CD4<sup>+</sup> cell reduction and enteropathy in SHIV-KS661-infected rhesus macaques in presence of low viral load. *J. Gen. Virol.*, 91:773-781, 2010.
5. Miyazaki, Y., Kamiya, S., Hanawa, T., Fukuda, M., Kawakami, H., Takahashi, H., Yokota, H.: Effect of probiotic bacterial strains of Lactobacillus, Bifidobacterium and Enterococcus on enteroaggregative Echerichia coli. *J. Infect. Chemother.*, 16:10-18, 2010.
6. Yagi, Y., Watanabe, E., Watari, E., Shinya, E., Satomi, M., Takeshita, T., Takahashi, H.: Inhibition of DC-SIGN-mediated transmission of HIV-1 by TLR3 signaling in breast milk macrophages. *Immunology*, 130:597-607, 2010.
7. Moriya, K., Wakabayashi, A., Shimizu, M., Tamiura, H., Dan, K., Takahashi, H.: Induction of tumor-specific acquired immunity against already established tumors by selective stimulation of innate DEC-205(+) dendritic cells. *Cancer Immunol. Immunother.*, 59:1083-1095, 2010.
8. Kondo, A., Yamashita, T., Tamura, H., Zhao, W., Tsuji, T., Shimizu, M., Shinya, E., Takahashi, H., Tamada, K., Chen, L., Dan, K., Ogata, K.: Interferon- gamma and tumor necrosis factor-alpha induce an immunoinhibitory molecule, B7-H1, via nuclear factor-kappaB activation in blasts in myelodysplastic syndromes. *Blood*, 116:1124-1131, 2010.
9. Nakagawa, Y., Watari, E., Shimizu, M., and Takahashi, H.: One-step simple assay to determine antigen-specific cytotoxic activities by single-color flow cytometry. *Biomedical Res.*, 32(2):159-166, 2011.
10. Takahashi, M., Matsumura, J., Inagaki, S., and Takahashi, H. Induction of CD56<sup>+</sup> T cells after prolonged activation of T cells in vitro: a possible mechanism for CD4<sup>+</sup> T-cell depletion in acquired immune deficiency syndrome patients. *Human Immunol.*, 72:783-790, 2011.
11. Kobayashi, F., Watanabe, E., Nakagawa, Y., Yamanishi, S., Norose, Y., Fukunaga, Y., and Takahashi, H. Production of Auto-antibodies by Murine B-1a Cells Stimulated with *Helicobacter pylori* Urease through TLR2 Signaling. *Infect. Immun.*, 79:4791-4801, 2011.
12. Ohkuni, H., Nagamune, H., Ozaki, N., Tabata, A., Todome, Y., Watanabe,

- Y., Takahashi, H., Ohkura, K., Kourai, H., Ohtsuka, H., Fischetti, V.A., and Zabriskie, J.B. Characterization of recombinant Streptococcus mitis-derived human platelet aggregation factor. *APMIS*, 120:56-71, 2011.
13. Atsukwa, M., Nakatsuka, K., Kobayashi, T., Shimizu, M., Tamura, H., Harimoto, H., Takahashi, H. and Sakamoto, C. Ribavirin downmodulates inducible costimulator on CD4+ T cells and their interleukin-10 secretion to assist in hepatitis C virus clearance. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 27(4):823-831, 2012.
  14. Inagaki, S., Takahashi, M., Fukunaga, Y., and Takahashi, H. HTLV-I-infected breast milk macrophages inhibit monocyte differentiation to dendritic cells. *Viral Immunol.*, 25(2):106-116, 2012.
  15. Negishi, Y., Wakabayashi, A., Shimizu, M., Ichikawa, T., Kumagai, Y., Takeshita, T., and Takahashi, H. Disruption of maternal immune balance maintained by innate DC subsets results in spontaneous pregnancy loss in mice. *Immunobiology*, 217(10):951-961, 2012.
  16. Kobayashi, T., Nakatsuka, K., Shimizu, M., Tamura, H., Shinya, E., Atsukawa, M., Harimoto, H., Takahashi, H. and Sakamoto, C. Ribavirin modulates the conversion of human CD4(+) CD25(-) T cell to CD4(+) CD25(+) FOXP3(+) T cell. *Immunology*, 137(3):259-270, 2012.
  17. Nakagawa, Y., Shimizu, M., Norose, Y., Takahashi, M., and Takahashi, H. Induction of rapid apoptosis for class I MHC molecule-restricted CD8+ HIV-1 gp160-specific murine activated CTLs by free antigenic peptide in vivo. *Int. Immunol.*, 25(1):11-24, 2013.
  18. Mayumi, N., Watanabe, E., Norose, Y., Watari, E., Kawana, S., Geijtenbeek, T.B., and Takahashi, H. E-cadherin interactions are required for Langerhans cell differentiation. *Eur. J. Immunol.*, 43(1): 270-280, 2013.
  19. Tamura, H., Ishibashi, M., Tonosaku, S., Okuyama, N., Kondo, A., Hyodo, H., Shinya, E., Takahashi, H., Dong, H., Tamada, K., Chen, L., Dan, K., and Ogata, K. Marrow stromal cells induce B7-H1 expression on myeloma cells, generating aggressive characteristics in multiple myeloma. *Leukemia*, 27(2): 464-472, 2013.
  20. Takaku, S., Nakagawa, Y., Owaki, A., Shimizu, M., Takahashi, M., and Takahashi, H. Induction of apoptosis-resistant and TGF- $\beta$ -insensitive murine CD8<sup>+</sup> CTLs specific for HIV-1 gp160. *Cell Immunol.*, 280(2):138-147, 2013.
  21. Takahashi, H., Mayumi, N., and Watanabe, E. Requirement of E-cadherin interactions for Langerhans cell differentiation. *J. Nippon Medical School*, 2013 80(2) (in press).
  22. 高橋秀実：免疫力による未病のガンの制御. *未病と抗老化*, 19:24-28, 2010.
  23. 高橋秀実：宿主免疫応答と各種病態. *臨床と微生物*, 38:9-14, 2011.
  24. 高橋秀実：漢方医学と近代医学との接点：免疫と漢方. *これからの漢方医学 (からだの科学増刊号)* 2011 (印刷中) .
  25. 本田和美, 井上有紀, 大藪英一, 野呂瀬嘉彦, 高橋秀実, 葉山修陽：手の衛生手技は透析液の清浄化に不可欠である. *日本透析医学会誌* 2010; 43(4):361-366.
  26. 村上努, 高橋秀実：HIVと闘う宿主防御因子, *日本エイズ学会誌* 14 (1): 1-2, 2012.
  27. 新谷英滋, 高橋秀実：ヒト免疫不全ウイルスHIV-1のNefによる樹状細胞CD1脂質抗原提示機能の低下. *臨床免疫・アレルギー科* 57(2): 269-274, 2012.

28. 高橋秀実：第 25 回日本エイズ学会シンポジウム記録：エイズウイルスの侵入・棲息部位である粘膜組織におけるウイルス制御法を探る。 **日本エイズ学会誌** 14(2)：11-14, 2012.
29. 高橋秀実：HIV 感染制御における新たな標的としての自然免疫。 **日本エイズ学会誌** 14(2)：15-19, 2012.
30. 高橋秀実：HIV ワクチン開発のための新たな指標。 **セフィーロ** 5:1-8, 2012.
31. 高橋秀実：ピロリ菌と自己免疫。 **臨床免疫・アレルギー科**, 58(3)：355-360, 2012.
32. 高橋秀実：Cross-presentation. **炎症と免疫**, 20(6)：638-641, 2012.
33. 高橋秀実：丸山ワクチンの新展開。 **遙か**, 8(1)：39-43, 2013.
34. 高橋秀実：免疫と漢方：黄帝内経に啓示された古代人の智慧 **日本東洋医学会雑誌**, 64(1)：1-9, 2013.

[学会発表] (計 92 件)

国際学会：15  
国内特別講演：15  
一般口演：62

[図書] (計 5 件)

1. 高橋秀実：[分担]細胞性免疫(CTL)の誘導と樹状細胞。 **臨床粘膜免疫学(清野宏)**, 2010; pp 195-223, シナジー
2. Takahashi, H. Co-operation of innate and acquired immunity for controlling tumor cells. In "Melanoma in The Clinic". (Ed. Murph. M.) Chaper 7: 107-114 (2011. 7 月発刊 (総ページ 310) by INTEC)
3. 高橋秀実：第 17 章「免疫応答不全」、**微生物学** (メディカル・サイエンス・インターナショナル社編) 2012 (4 月)
4. 高橋秀実：後天性免疫不全症候群。血液症候群 (別冊**日本臨床**) , 317-321 (2013 年 3 月 20 日) (総ページ 623、日本臨床社編) .

5. 高橋秀実：その他の二次性免疫不全症候群。血液症候群 (別冊**日本臨床**) , 322-325 (2013 年 3 月 20 日) (総ページ 623、日本臨床社編

[産業財産権]  
○出願状況 (計 1 件)

名称：ランゲルハンス細胞の調整方法  
発明者：高橋 秀実  
権利者：高橋 秀実  
種類：  
番号：特願 2012-118666  
出願年月日：平成 24 年 5 月 24 日  
国内外の別：国内

6. 研究組織  
(1) 研究代表者  
高橋 秀実 (TAKAHASHI HIDEKI)  
日本医科大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号：4 0 2 2 1 3 6 1

(2) 研究分担者  
なし

(3) 連携研究者  
なし