

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462409

研究課題名(和文)膀胱癌に対するBCG膀胱注療法における制御性T細胞の意義と治療応用

研究課題名(英文)Regulatory T cells in intravesical BCG therapy for non-muscle invasive bladder cancer

研究代表者

成田 充弘(Narita, Mitsuhiro)

滋賀医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00263046

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：制御性T細胞が膀胱癌の再発や進展に関与しているかを検討した。まず臨床標本を解析し、105例の初発筋層非浸潤膀胱癌を解析した結果、腫瘍組織中にTreg浸潤が多い症例で有意に再発率が高く、BCG膀胱注療法に限っても同様の傾向が見られた。以上から制御性T細胞が膀胱癌の再発や進展に関連していると考えられた。つぎに膀胱癌に対するBCG注療法で制御性T細胞がどのように働くか検討するためラット膀胱癌モデルで制御性T細胞の変化を解析した。BCG膀胱注療法治療群ではコントロール群に比べて末梢血中のTregが高い傾向が見られた。引き続き、Treg除去体外循環治療を併用する治療実験を行っている。

研究成果の概要(英文)：We investigated the affection of regulatory T cells in recurrence of bladder cancer. From analysis of 105 cases of non-muscle invasive bladder cancer, patients with high Treg invasion in the tumor had high intravesical recurrence rate. Similar results were found in the group treated with intravesical BCG. Therefore, we considered that regulatory T cells may affect to recurrence and progression of bladder cancer. Next, to investigate how regulatory T cells work with intravesical BCG therapy for bladder cancer, we evaluated the change of regulatory T cells among intravesical BCG therapy using a rat bladder cancer model. Tregs in the peripheral blood tended to be higher in the intravesical BCG treatment group than in the control group. We continue the treatment experiment combined intravesical BCG and Treg-adsorbing hemodialysis.

研究分野：泌尿器癌

キーワード：制御性T細胞 膀胱癌 BCG

1. 研究開始当初の背景

20 世紀前半より結核菌の抗腫瘍効果が想定され、1960~70 年代には BCG による抗腫瘍治療が注目を集めたが、様々な癌での比較試験では対照と同等または一時的な抗腫瘍効果が認められたに過ぎなかった。しかしながら、1976 年、Morales は筋層非浸潤膀胱癌 (non-muscle invasive bladder cancer, NMIBC) 患者において BCG 膀胱内注入によるきわめて優れた再発予防効果を発表した (Morales, J Urol, 1976)。その後 CIS (carcinoma in situ) における高い完全寛解率 (~70%) も示され、現在では NMIBC に対する揺るぎない標準治療の地位を獲得している。しかし、BCG が著しい効果を有すとは言え、その効果は完璧ではない。長期的には 30~50% の症例で再発・進展を来し、膀胱全摘を余儀なくされる。また、当初から全く奏効しない不応例もあり、治療中にいたずらに進行を招いてしまう場合もある。BCG 膀胱注による抗腫瘍効果の機序はいまだ解明されていないが、非特異的または特異的免疫反応が複雑に絡み合い、結果として腫瘍細胞の排除に繋がっていると考えられている。これらの免疫反応の個人差が BCG 膀胱療法不応性または抵抗性の原因の一つであろうことは想像に難くない。

正常な免疫系は自己臓器・組織には反応せず、また異物に反応する場合も異物の性状や量によって排除のために適切なレベルで免疫反応を終了する。この巧妙な調節メカニズムの一端として、坂口らは CD4+CD25+T 細胞が T 細胞機能を負にコントロールしていることを見出した (Sakaguchi, J Immunol, 1995)。この T 細胞は制御性 T 細胞 (regulatory T cells, Treg 細胞) と命名され、免疫寛容を構成する重要な要素の一つとされている。Treg 機能不全では関節リウマチや若年性糖尿病などの自己免疫疾患が関わっていると考えられており、また、Treg の作用を調節することができれば、癌細胞に対する効果的な免疫応答の惹起法や移植臓器を安定に受容させる方法の開発に繋がることも期待されている。泌尿器癌を含むいくつかの癌で血中 Treg と病期や予後との逆相関が報告されている。腎細胞癌では腫瘍組織中の Foxp3 (Treg 特異的転写因子) 陽性細胞が予後と逆相関する (Kang, Transl oncol, 2013)、腫瘍の浸潤部分では Foxp3 陽性細胞が集積し局所的免疫寛容が窺われる (Sell, Tumor Biol, 2012)、患者血中 Treg は健常者のそれに比べて高い (Liotta, BJU Int, 2010)、など 30 編以上が報告されている。一方、尿路上皮癌では Loskog らが腫瘍標本中の Foxp3 陽性細胞の存在ならびに健常者と比較して患者血中 Treg が高いことを示す (J Urol, 2007) など少数の報告があるが、BCG 膀胱療法との関連を示したものは見当たらない。以上の知見から NMIBC に対する BCG 膀胱療法において Treg が重要な意義を有しているのでは

ないかと着想するに至った。

当該研究の連携研究者である滋賀医科大学病理学講座疾患制御病理学部門の小笠原一誠教授らグループでは癌免疫療法の研究を長年にわたり行ってきた (Kontani, Cancer Gene Ther, 2002; Kajino, Immunology, 2007, など)。その一端として Treg に関する研究成果をあげるとともに、体外循環に使用可能な Treg 選択吸着カラムを開発した (特許公開 2010-201345)。すでに行った動物実験では坦癌ラット (肝細胞癌株移植) を用いた体外循環により Treg の補足や CTL 活性の増強などが観察されるなど、抗腫瘍効果が確認されている。

泌尿器癌細胞株におけるこのカラムの実験は未実施であり、BCG 治療膀胱癌モデル動物での検討はもちろん行われていない。先述のとおり BCG の腫瘍免疫反応において Treg が負の役割を演じているならば、本カラムによる体外循環の併用が治療抵抗性の克服に大きく寄与する可能性があり、非常に興味深い。以上の背景より当該研究を計画した。

2. 研究の目的

本研究では、①日常臨床において行われている NMIBC に対する BCG 膀胱注入治療において、Treg がもつ意義を明らかにしバイオマーカーとしての有用性を検討すること、②動物実験において NMIBC の BCG 膀胱注入療法における体外循環を用いた Treg 除去療法の併用による治療有効性を検討することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 膀胱癌患者組織における Treg 浸潤の免疫組織学的検討

①臨床材料: 当科で TUR-Bt を行った初発 NMIBC105 例のパラフィン包埋切片。

②免疫組織化学:

1 次抗体抗: Foxp3 モノクローナル抗体 (Abcam 社)、抗 CD3 モノクローナル抗体 (Dako 社)

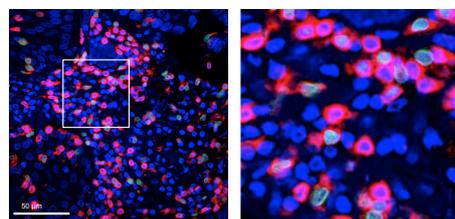
2 次抗体: HRP 標識抗マウス IgG 抗体 (Nichirei 社)

蛍光発色: Opal 蛍光発色キット (Perkin Elmer 社)

共焦点蛍光顕微鏡を用いて対物 40 倍で組織の 5 箇所ずつを観察し、CD3 陽性細胞における Foxp3 陽性細胞の割合を算出した。(図 1)

赤: CD3 陽性細胞、緑: Foxp3 陽性細胞

図1 免疫組織化学



X 400

左図白枠内拡大図

③データ解析

上記結果と臨床病理学的因子、膀胱内再発との関連をそれぞれ解析した。

(2)ラット膀胱癌モデルを用いた動物実験

①ラット NMIBC モデルの作成

Wistar ラットに 0.05%N ブチル N ニトロソアミンを 12 週間自由飲水させ、20 週目に NMIBC の発生を確認した。

②ラット NMIBC モデルに対する BCG 膀胱注入治療における免疫反応の解析

ラット NMIBC モデルに対して、BCG(イムノブラダー膀胱注用 日本化薬)1.35mg/ml 200ul を週 1 回 1 時間ずつ、5 週にわたって毎週膀胱注入治療を行い、治療時に血液を採取してフローサイトメトリーにて Treg をふくめた末梢血免疫細胞の分画を測定した。BCG 群 4 匹、生食治療群 4 匹で検討を行った。治療後の膀胱重量を測定し、治療効果を予測した。

③ラット膀胱癌モデルに対する BCG 膀胱注入治療と Treg 除去体外循環治療併用の検討

ラット NMIBC モデルに対して、週 1 回 1 時間ずつ、4 週にわたって BCG 膀胱注入治療をおこない、2 週目と 4 週目の BCG 膀胱注入治療の翌日に Treg 除去カラムを用いた体外循環治療をおこなって膀胱腫瘍のサイズを無治療群と比較した。生食膀胱注入治療群 2 匹、BCG 膀胱注入治療群 2 匹、BCG 膀胱注入治療と Treg 除去カラム治療併用群 2 匹での比較を行った。

4. 研究成果

(1)膀胱癌患者組織における Treg 浸潤の免疫組織学的検討

①NMIBC105 例において、腫瘍周囲の CD3 陽性細胞中における Foxp3 陽性細胞 (Treg) の割合は、平均 $18.0 \pm 8.7\%$ であった。

②Treg と各臨床因子との関連を検討したところ、グレード、T ステージ、リスク分類との相関が見られた。(図 2)

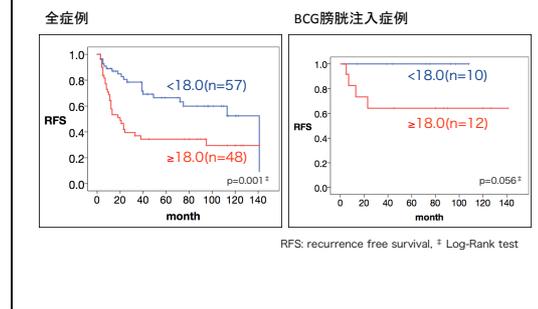
図2 臨床組織学的因子とTreg

因子	%Treg 平均(±SD)	P value
全体	18.0(±8.7)	
性別		0.060*
男性	18.8(±8.5)	
女性	14.9(±8.7)	
年齢(歳)		0.908*
<69	18.1(±8.9)	
≥69	17.9(±8.6)	
T Stage		0.000*
Ta	15.2(±8.1)	
T1	22.3(±8.0)	
Tis	22.4(±8.0)	
Grade		0.028*
G1	15.5(±9.4)	
G2	18.1(±7.7)	
G3	22.5(±8.7)	
リスク分類		0.000*
低	12.4(±6.4)	
中	18.2(±8.9)	
高	22.0(±7.8)	

*Student t-test, *Kruskal-Wallis test

③Treg の多い症例と少ない症例で膀胱内再発を比較したところ、Treg の多い群で優位に膀胱内再発が多かった。BCG 膀胱注入治療症例では Treg の少ない群では再発を認めていなかった。(図 3)

図3 Tregと再発の関連

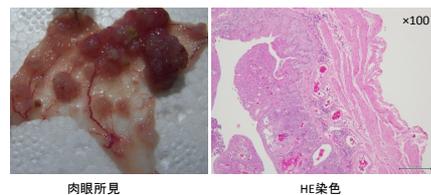


(2)ラット膀胱癌モデルを用いた動物実験

①前述のラット NMIBC モデル作成方法により、100%のラットに NMIBC の発生を確認できた。

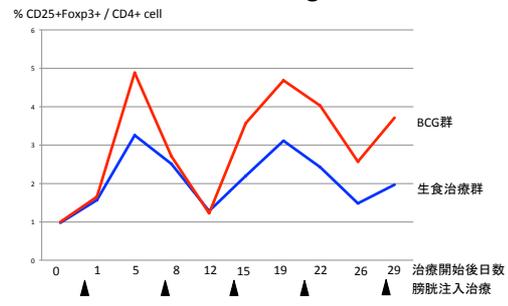
(図 4)

図4 ラットNMIBC



②BCG 膀胱注入治療群では、生食注入治療群と比較して、経過中に Treg の割合がやや高い傾向が見られたが、少数例の比較であり統計学的な差は不明であった。(図 5)

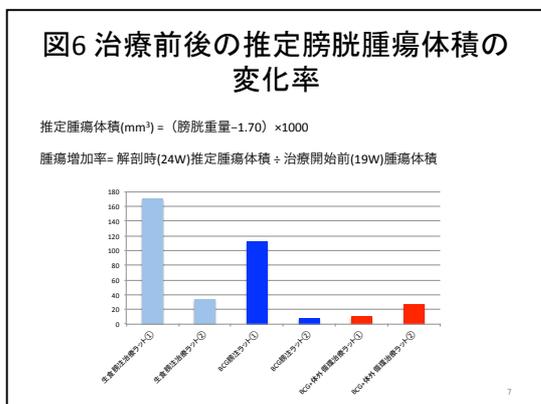
図5 ラットNMIBCモデルBCG膀胱注入療法におけるTregの変化



BCG 膀胱注入治療群の治療後膀胱重量は 2.20g、生食注入治療群では 2.23g であり差を認めなかった。

③生食膀胱注入治療ラット、BCG 膀胱注入治療ラット、BCG 膀胱注入 Treg 除去体外循環併用ラットの膀胱腫瘍体積の治療前後の変化率を比較した。

BCG膀胱注入Treg除去体外循環併用ラットで最も膀胱腫瘍の増大が抑制されていたが、こちらも少数例での検討であり、統計学的な差は不明であった。(図6)



動物実験による治療実験については個体数が少数であり、一定の結果には至っていない。現在、個体数を増やして追試を継続している。

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 0 件)
現在作成中である。

[学会発表] (計 5 件)

1. 村井亮介, 影山進, 仲山美沙子, 石垣宏仁, 寺本和雄, 伊藤靖, 富田圭司, 小林憲市, 和田晃典, 永澤誠之, 小笠原一誠, 河内明宏, 筋層非浸潤膀胱癌の膀胱内再発における制御性 T 細胞の検討. 第 105 回日本泌尿器科学会総会, 2017. 4. 21. 鹿児島市
2. 村井亮介, 影山進, 仲山美沙子, 石垣宏仁, 寺本和雄, 伊藤靖, 富田圭司, 小林憲市, 和田晃典, 永澤誠之, 小笠原一誠, 河内明宏, 筋層非浸潤膀胱癌に対する BCG 膀胱注入における制御性 T 細胞の検討. 第 9 回 BCG 注入療法研究会, 2016. 12. 2. 東京
3. 村井亮介, 影山進, 仲山美沙子, 石垣宏仁, 寺本和雄, 伊藤靖, 富田圭司, 小林憲市, 和田晃典, 永澤誠之, 窪田成寿, 小笠原一誠, 河内明宏, 筋層非浸潤膀胱癌の膀胱内再発における制御性 T 細胞の病理組織学的検討. 第 54 回日本癌治療学会学術集会, 2016. 10. 20. 横浜市
4. 村井亮介, 影山進, 仲山美沙子, 石垣宏仁, 寺本和雄, 伊藤靖, 富田圭司, 小林憲市, 和田晃典, 永澤誠之, 小笠

原一誠, 河内明宏, 筋層非浸潤膀胱癌における制御性 T 細胞の検討. 第 45 回京阪泌尿器腫瘍セミナー, 2016. 10. 3. 京都市

5. 村井亮介, 影山進, 仲山美沙子, 石垣宏仁, 寺本和雄, 伊藤靖, 富田圭司, 小林憲市, 和田晃典, 永澤誠之, 小笠原一誠, 河内明宏, 筋層非浸潤膀胱癌の再発に関連する免疫抑制性細胞の病理組織学的検討. 第 104 回日本泌尿器科学会総会, 2016. 4. 23. 仙台市

[図書] (計 0 件)

[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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

成田 充弘 (NARITA Mitsuhiro)
滋賀医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 00263046

(2) 研究分担者

花田 英紀 (HANADA Eiki)
滋賀医科大学・医学部・助教
研究者番号: 40555067

影山 進 (KAGEYAMA Susumu)
滋賀医科大学・医学部・講師
研究者番号: 50378452

吉貴 達寛 (YOSHIKI Tatsuhiko)
滋賀医科大学・医学部・客員教授
研究者番号: 80230704

河内 明宏 (KAWAUCHI Akihiro)
滋賀医科大学・医学部・教授
研究者番号：90240952

村井 亮介 (MURAI Ryosuke)
滋賀医科大学・医学部・助教
研究者番号：80748583

(3) 連携研究者

小笠原 一誠 (OGASAWARA Kazumasa)
滋賀医科大学・医学部・教授
研究者番号：20169163

(4) 研究協力者

()