

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 31 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861274

研究課題名(和文)膀胱がんに対する新たなBCG注入療法の開発

研究課題名(英文)The challenge to develop a new BCG immunotherapy against non-muscle invasive bladder cancer

研究代表者

武内 在雄(TAKEUCHI, ARIO)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：30586756

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々はIL-17、好中球の効率的な誘導および自然免疫と獲得免疫の橋渡しというBCGの抗腫瘍効果の機序を増強するという目的でインターロイキン 15(IL-15)に着目した。最近になり、IL-15が好中球、IL-17の誘導に重要という報告もなされており、抗腫瘍効果を増強する可能性があると考えたからである。我々はIL-15を恒常的に産生するBCG株(BCG-IL-15)を入手することが出来、基礎的実験を行ってきた。結果、我々の予想した通り、BCG-IL-15を投与した群ではBCG投与群よりも有意に生存率が延長し、その膀胱局所にはより多くの好中球が誘導されていた。

研究成果の概要(英文)：BCG is used for the treatment of bladder cancer. The recruitment of neutrophils to the bladder after BCG instillation exerts anti-tumor activity against bladder tumor. We have recently demonstrated that interleukin (IL)-17A produced by gamma-delta (gd) T cells played a role in the recruitment of neutrophils to the bladder after BCG instillation. We previously constructed a recombinant BCG strain expressing the fusion protein of IL-15 and Ag85B (BCG-IL-15) for prevention of Mycobacterium tuberculosis infection. Here we compared the efficacy of the BCG-IL-15 in protection against bladder cancer with that of rBCG-Ag85B (BCG). BCG-IL-15 treatment significantly prolonged survival of mice inoculated with bladder cancer cells compared with BCG treatment. Infiltration of neutrophils was significantly elevated in BCG-IL-15 treated mice accompanied by increased chemokines in the bladder. Thus, BCG-IL-15 exerted additive effect on infiltration of neutrophils in the bladder.

研究分野：泌尿器がん

キーワード：膀胱癌 BCG

1. 研究開始当初の背景

筋層非浸潤性膀胱癌は、内視鏡下切除後の膀胱内再発を高頻度に認める。経尿道的膀胱腫瘍切除術 (TURBT) だけでは5年以内に約60%が再発する。さらに再発の過程で浸潤性膀胱癌への進展が見られ、臨床上大きな問題点である。一般的にTURBTだけでは膀胱内再発・進展を完全に防止することはできないと考えられており、現在TURBT施行後の再発を防止するために、Bacille de Calmette et Guérin (BCG) あるいは抗癌剤の膀胱内注入療法が幅広く行われている。BCG膀胱内注入療法は、筋層非浸潤性膀胱癌の治療において抗癌剤膀胱内注入療法よりも再発・進展抑制効果が優れることが確認されている。

BCG膀胱内注入療法の作用機序については、様々なことが言われているが、BCG膀胱内注入療法によって膀胱壁内に誘導される好中球が直接腫瘍を攻撃し、さらに自然免疫と獲得免疫の橋渡しをしているとされる。詳しく述べるとBCG膀胱内注入療法の初期にはBCGに刺激された好中球がTumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL/Apo-2L)を発現し、直接腫瘍を細胞死に導く。また繰り返しBCG膀胱内注入療法を行うことによって、刺激を受けた好中球がMIP-1 α 、MCP-1、IP-10等のサイトカインを産生しマクロファージ、CD4+Tリンパ球を活性化させる。結果CD4+Tリンパ球より産生されるInterferon-gamma (IFN- γ)等のサイトカインがCD8+Tリンパ球、NK細胞、マクロファージを活性化し、最終的に抗腫瘍効果を発現、腫瘍細胞を細胞死に導く。

我々は、それらの報告に関連して、BCG膀胱内注入療法によって好中球が膀胱壁内に効率的に誘導される為には膀胱壁内 $\gamma\delta$ Tリンパ球が産生するインターロイキン17(IL-17)の重要性を見出した。主にTリンパ球が産生するIL-17は好中球の誘導に関わることが知られていたが、実際IL-17欠損マウスではBCG

膀胱内注入後の好中球数が正常マウスに比べ低下していた。この好中球浸潤に関わるIL-17産生細胞を同定するため、 $\gamma\delta$ Tリンパ球ノックアウト(KO)マウスなど様々なKOマウスを使用し、BCG投与後の膀胱内の好中球数を測定したところ、 $\gamma\delta$ Tリンパ球KOマウスのみ好中球数の減少がみられた。よって $\gamma\delta$ Tリンパ球がIL-17の主な産生細胞と考えられた。さらに $\gamma\delta$ Tリンパ球KOマウスに腫瘍を接種し、BCG療法の効果を検討したところ、野生型マウスに比べて生存率は有意に低下した。以上によりBCG膀胱内注入療法によって膀胱壁内の $\gamma\delta$ Tリンパ球がIL-17を産生し、そのことにより好中球が膀胱壁内に効率的に誘導され、そのことが結果的に先述した好中球の自然免疫と獲得免疫の橋渡しのつながっていると考えられた。更に我々はIL-17、好中球の効率的な誘導および自然免疫と獲得免疫の橋渡しというBCGの抗腫瘍効果の機序を増強するという目的でインターロイキン15(IL-15)に着目した。最近になり、IL-15が好中球、IL-17の誘導に重要という報告もなされており、IL-15がBCG膀胱内注入療法の抗腫瘍効果を増強する可能性があると考えたからである。

2. 研究の目的

最近になり、IL-15が好中球、IL-17の誘導に重要という報告もなされており、IL-15がBCG膀胱内注入療法の抗腫瘍効果を増強する可能性があると考えたからである。我々は九州大学生体防御研究所感染制御学分野の吉開泰信教授のご厚意によりIL-15を恒常的に産生するBCG株(BCG-IL-15)を入手することが出来、基礎的実験を行った。

3. 研究の方法

我々は臨床に出来るだけ則した形で実験が行えるようマウスの膀胱癌の局所正着モデル確立している(Takeuchi A et al, Eur J

Immunol. 2011 Jan;41(1):246-510)。簡潔に示すと C57BL/6(B6) マウスに MB-49(mouse bladder tumor-49)を 2×10^5 膀胱内注入(Day0)し、翌日より BCG IL-15 を一週間毎に 2×10^5 CFU (Day1, 8, 15, 22) 膀胱内注入を行う。対象群には PBS、同量の BCG を使用。その抗腫瘍効果のメカニズムの解析を行う。我々は BCG-IL-15 によって膀胱内で膀胱癌に対する獲得免疫を惹起された CD8+ T リンパ球が遠隔転移にも効果を発揮する可能性も視野に入れており、その分析も行った。

4. 研究成果

我々の予想した通り、BCG-IL-15 を投与した群では BCG 投与群よりも有意に生存率が延長し、その膀胱局所にはより多くの好中球が誘導されていた。IL-15 はマクロファージや樹状細胞、上皮細胞から産生され、NK 細胞 $\gamma\delta$ T リンパ球などの自然免疫細胞、獲得免疫を司る CD8+ T リンパ球の増殖維持因子として、エフェクター CD8+ T 細胞のアポトーシスの阻止や、メモリー型 CD8+ T リンパ球の増殖維持に重要な役割を担うことが知られている。しかし結果的には BCG-IL-15 療法、BCG 療法に双方において細胞障害性 CD8+ T 細胞 (CTL) に代表されるような獲得免疫細胞が癌細胞を直接 (または間接的) に働きかけている証拠を見出せなかった。獲得免疫系の細胞が膀胱局所において活性化されない理由として癌抗原や MHC クラス I 分子などの発現低下による腫瘍の免疫原性の低下、がん細胞が産生 / 誘導する多様な免疫抑制分子や免疫抑制性の細胞が誘導されることなどが挙げられる。そこで我々は免疫抑制リガンドである programmed cell death-1 ligand-1 (PD-L1) に注目している。実際、膀胱癌患者由来の腫瘍細胞において、免疫抑制リガンドである PD-L1 の発現が高いことが報告されており、PD-L1 の発現が高い膀胱癌患者

は BCG 療法の享受が得られにくいことも報告されている。更に我々の基礎実験により膀胱癌細胞は BCG の直接刺激により PD-L1 の発現が上昇するということが分かっている。BCG 療法において、PD-L1/PD-1 シグナルを遮断し、CTL 等の獲得免疫細胞の活性化が起これば、そのことは膀胱癌局所の制御だけでなく、結果的には膀胱癌の転移の予防、筋層浸潤性膀胱癌、転移を有する膀胱癌 (転移性膀胱癌) の加療・克服に繋がることが予想される。我々は現在 BCG 療法と抗 PD-1 抗体の併用療法に焦点をあて、新たな膀胱内 BCG 注入療法の確立を進めている。

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1件)

Antitumor activity of recombinant BCG secreting interleukin-15-Ag85B fusion protein against bladder cancer. Takeuchi A, Eto M, Tatsugami K, Shiota M, Yamada H, Kamiryo Y, Dejima T, Kashiwagi E, Kiyoshima K, Inokuchi J, Takahashi R, Yokomizo A, Ohara N, Yoshikai Y. Int Immunopharmacol. 2016 Jun;35:327-31.

[学会発表](計2件)

学会: 31st Annual Congress of the European Association of Urology Meeting (Munich)

日程: 2016年3月11日~16日

演題: Efficacy of Recombinant Bacille Calmette-Guérin Secreting Interleukin-15 against bladder cancer

演者: Takeuchi A, Tatsugami K, Shiota M, Yamada H, Kamiryo Y, Dejima T, Kashiwagi E, Kiyoshima K, Inokuchi J, Takahashi R, Yokomizo A, Eto M

学会: 第104回日本泌尿器科学会総会(仙台)

日程：2016年4月21日～26日

演題：膀胱癌に対する BCG-IL-15 膀胱内注入
療法の有用性についての検討

演者：武内在雄、立神勝則、塩田真己、横溝
晃、江藤正俊

〔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

九州大学大学病院(助教)
武内在雄(TAKEUCHI, Ario)
研究者番号：30586756

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：