

機関番号：12102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21890029

研究課題名（和文） ビーシージー膀胱内注入療法における病原体宿主相互作用の解明

研究課題名（英文） The analysis of host pathogen interaction in the intravesical BCG therapy

研究代表者

宮崎 淳 (MIYAZAKI JUN)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・講師

研究者番号：10550246

研究成果の概要（和文）：NK細胞表面上に存在するNKG2Dレセプターに対する、標的細胞上のリガンドMICA、MICB、ULBP1～3の発現を検討した。BCG-CWSリポソームベクターをT-24膀胱癌細胞株と1時間共培養させると、MICBとULBP3の発現の増加が認められた。次にヒト末梢血リンパ球からIL-2存在下に誘導したNK細胞とリポソームを内包化したT-24膀胱癌細胞を共培養した結果、NK細胞に対する感受性が亢進した。以上より、BCG-CWSリポソームベクターは、自然免疫とくにNK細胞に対する感受性を増加させると考えられた。

研究成果の概要（英文）：The induction of surface NKG2D ligands by R8-liposome-BCG-CWS rendered cancer cells more susceptible to cytolysis by lymphokine-activated killer cells. T24 bladder cancer cells, even when cultured singly in the absence of immune cells, can directly respond to R8-liposome-BCG-CWS. The results obtained in the present study may therefore indicate a novel adoptive immunotherapy against bladder cancers.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,050,000	315,000	1,365,000
2010年度	940,000	282,000	1,222,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,990,000	597,000	2,587,000

研究分野：癌免疫

科研費の分科・細目：ライフサイエンス

キーワード：BCG、膀胱がん、膀胱内注入療法

1. 研究開始当初の背景

高用量の *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin (BCG) を膀胱内に注入することによるBCG膀胱内注入（膀注）療法は臨床的有効性が最も確立した癌に対する免疫治療であり、表在性膀胱癌の標準的治療となっている。しかしながらBCG膀胱内注入療法の問題点は、生菌を使用していることから、全身への菌播種の危険性を回避することができない。高い治療効果を有しながら、同様の理由で全身投与ができないことから、転移性膀胱腫瘍への応用拡大ができない。このため、BCGの高い免疫活性効果を有する作用機序の解明が望まれる。その作用機序については細胞傷害性Tリンパ球 (CTL) の関与が重視されているが、第1段階である膀胱粘膜上での尿路上皮細胞とBCGの相互作用に関してはほとんど解明されていない。この点に関してはBCG膀注後の膀胱上皮細胞ではMHC分子などの発現増強が持続することより尿路上皮細胞がノンプロフェッショナルな抗原提示細胞として機能していることが推定されている。

しかし、MHC分子を介した免疫監視機構以外の関与も我々の実験からは考察され、MHCに依存しない免疫機構の存在が必須と考えられた。そのような免疫を担う分子としてヒトグループ1CD1分子があげられる。CD1分子は、非蛋白質抗原である脂質を結合し、T細胞に提示する新しいタイプの抗原提示分子であり、最近の研究では結核菌感染によって誘導される脂質特異的免疫応答の意義が明らかになっている。

また、MHC分子の発現のない細胞に応答するNK細胞の関与も考えられる。NK細胞は微生物の感染により変化した宿主細胞を認識する。NK細胞の細胞傷害性機構はCTLが感染細胞を傷害するときに用いられる機構と同一である。

さらに抗腫瘍効果を発揮するには、BCG が細胞に侵入することが大切であることがわ

かっている。一般的に樹状細胞といった免疫細胞では、外来抗原をリソゾームで分解して表面抗原として提示するが、尿路上皮にも免疫細胞としての機能を有することが分かっており、膀胱癌に対する BCG 免疫治療のメカニズムの一つであると考えられる

BCG の免疫は、菌の細胞壁の特徴的な物質によって惹起されることが知られている。BCG 菌体から抽出した細胞壁 (BCGCW) は cell wall skelton (BCGCWS)、Mycolic acid、Lipomannan、lipoarabinomannan といった多数のワックス様脂質からなり、BCG が樹状細胞に貪食されても長期間細胞質内に生存し、宿主の免疫を刺激し続けるといった BCG 特有の性質に寄与している。このため、BCG の細胞壁成分を抽出した BCGCWS (cell wall skeleton) は高い生物学的活性を有する物質として注目されている。しかしながら、この抽出物を生体へ投与しても十分な抗腫瘍効果を発揮しない。その理由は BCGCWS が不溶性、大きな分子量、負表面電荷という特性を有している物質であり、抗腫瘍効果を発揮するために重要なステップである細胞親和性がきわめて低いためである。そこで、細胞親和性を高め、細胞質内に BCGCWS を効率的に輸送できるような vector を利用することにした。この vector は北海道大学大学院薬学研究院、薬剤分子設計学研究室で研究開発されたもので、octaarginine (R8) を liposome 表面に結合させることで通常の liposome と比べて飛躍的に細胞質内への物質輸送を高めている (多機能性エンベロープ型ナノ構造体 (Multifunctional Envelope-type Nano Device: MEND (R8-MEND))). 我々は、この octaarginin liposome vector (R8-liposome) に BCGCWS を搭載した、“R8-liposome-BCGCWS” を BCG 生菌に代る製剤として北海道大学、日

本 BCG 研究所、筑波大学泌尿器科により共同開発した。我々は、今後、臨床に使用できる製剤としての認可を将来の最終目的にしている。

2. 研究の目的

本研究では膀胱癌細胞と MHC 分子に関与しない CD1 分子、および NK 細胞の作用機序を解明する。まず、膀胱癌細胞における CD1 分子の遺伝子レベル、蛋白レベルでの発現を検討する。次に、BCG および R8-liposome-BCGCWS と膀胱癌細胞との接着、あるいは膀胱癌細胞への細胞内寄生モデルを作成し、その後のシグナル伝達に関与する CD1 分子と NK 細胞のリガンドの変化を同定する。さらに、NK 細胞を誘導し、BCG や R8-liposome-BCGCWS を共培養した膀胱癌細胞株に対する抗腫瘍効果を評価する。

表在性膀胱癌に対する BCG 膀胱内注入療法は現在、最も一般的に行なわれている治療であり、それなりの成果は得られているが、副作用のために治療を中断せざるを得ない例も多い。海外では、*Mycobacterium*由来の細胞壁抽出物を用いた臨床試験を実施している例もあるが、現在のところ萌芽的状況であり有効性は確立していない。BCGの宿主に対する免疫機構の解明は、今後の有効な治療の開発に対して極めて重要な研究課題である。

現在までに CD1 分子などの関連が指摘されたのは、樹状細胞や、マクロファージなどのプロフェッショナルな抗原提示細胞の報告が多いが、我々は、ノンプロフェッショナルな膀胱粘膜上皮に着目している点が特色である。また、膀胱癌細胞と BCG 膀胱内注入療法において CD1 分子や NK 細胞のリガンドとの関連を調べた報告はない。我々はすでに Toll-like receptor (TLR) を介した BCG 認識機構に着目した免疫系の解明は報告してい

る。今後は MHC 分子に依存しない免疫系の関与を考えて CD1 分子、NK 細胞に注目したい。感染免疫と癌免疫の両方に着目した本研究は、より効率的な治療法を開発する上での新しいアプローチである。

さらに、我々が開発した R8-liposome-BCGCWS は、表在性膀胱癌だけではなく、浸潤性膀胱癌や、転移性膀胱癌においても治療効果を発揮できる可能性があり、画期的な製剤となり得る。

3. 研究の方法

BCGの膀胱療法における膀胱癌細胞の抗原提示細胞としての機能発現を明らかにする

(1) BCG の接着に伴う CD1 発現の変化
膀胱癌細胞株あるいはプライマリーの正常尿路上皮細胞を用いて BCG を接着あるいは細胞内に一定期間寄生させた後に FACS scan を行い、定性的に CD1 の発現量を検討する。

(2) 膀胱癌細胞株における NK 細胞のリガンドの発現変化を検討する
NK 細胞上のレセプターである NKG2D のリガンドである MICA、MICB、ULBP1 の発現の変化を定量 PCR を用いて検討する。

(3) 膀胱癌細胞株のサイトカイン分泌の検討
BCGを接着させた際の膀胱癌細胞株のサイトカインの分泌を継時的に測定し、抗原提示細胞としての機能を検討する。

(4) 膀胱癌細胞株からの BCG 特異的 NK 細胞の誘導
今までの膀胱癌細胞株が抗原提示細胞として活性化し得る至適条件を検討し、これらの細胞を標的として NK 細胞を誘導し、

R8-liposome-BCGCWSと共培養した膀胱癌細胞に対する特異的傷害活性の有無を検討する。

4. 研究成果

(1) BCGの接着に伴うCD1発現の変化

BCG生菌とR8-liposome-BCGCWSをT-24膀胱癌細胞株と共培養して、CD1抗原の発現の変化をFACS scanで検討した。その結果BCG生菌では、CD1a、CD1b、CD1c、CD1d抗原の発現の増強が認められた。しかしR8-liposome-BCGCWSと共培養したT-24膀胱癌細胞株においては、CD1抗原の発現の変化は認められなかった。我々が、開発したリポソーム製剤はBCG生菌とは一部違う抗腫瘍効果を示す可能性が示唆された。

(2) 膀胱癌細胞株におけるNK細胞のリガンドの発現変化

NK細胞表面上に存在するNKG2Dレセプターに対する、標的細胞上のリガンドMICA、MICB、ULBP1～3の発現を検討した。R8-liposome-BCGCWSをT-24膀胱癌細胞株と1時間共培養させると、MICBとULBP3の発現の増加が認められた。一方、BCG生菌(凍結乾燥株)を膀胱癌細胞株と1時間共培養した際は、これらNKG2Dのリガンドの変動は認めなかった。

(3) 膀胱癌細胞株のサイトカイン分泌の検討

T-24膀胱癌細胞株からのサイトカインの分泌について検討した。BCGあるいはR8-liposome-BCGCWSとT-24膀胱癌細胞を共培養すると、IL-6とIL-8のみがT-24膀胱癌細胞株から分泌された。

(4) 膀胱癌細胞株からのBCG特異的NK細胞の誘導

次にヒト末梢血リンパ球からIL-2存在下にNK細胞を誘導した。2週間IL-2添加下にリンパ球を培養し、NK細胞を誘導した。リンパ球分画のうち40%以上のリンパ球がNK活性を持つリンパ球に誘導することができた。このNK細胞とR8-liposome-BCGCWSを送達したT-24膀胱癌細胞を共培養した結果、NK細胞に対する感受性が亢進した。さらに他の膀胱癌細胞株RT-4、RT-112、JON、253J株にR8-MENDを送達し、NK細胞との感受性を検討した結果も、T-24膀胱癌細胞株と同様に感受性が亢進していた。以上より、R8-MENDは自然免疫とくにNK細胞に対する感受性を増加させると考えられた。今後は、より抗腫瘍活性の強い、リポソームベクターを開発するとともに、あらゆる膀胱癌に治療効果を持つ製剤の開発につなげていく。

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3件)

① Miyazaki J, Kawai K, Kojima T, Oikawa T, Joraku A, Shimazui T, Nakaya A, Yano I, Nakamura T, Harashima H, Akaza H: The liposome-incorporating cell wall skeleton of *Mycobacterium bovis bacillus*

Calmette-Guérin can directly enhance the susceptibility of cancer cells to lymphokine-activated killer cells through up-regulation of natural-killer group2, member D ligands. *BJU Int* in press. 2011
査読有り

② 常楽晃、宮崎淳、中谷彰洋、中村孝司、河合弘二、矢野郁也、原島秀吉、赤座英之: BCG cell wall skeleton 内包リポソームベクターによるマウス膀胱癌治療モデル 泌尿器外科 23(2)184-186. 2010 査読無し

③Joraku A, Homhuan A, Kawai K,
Yamamoto T, Miyazaki J, Kogure K, Yano
I, Harashima H, Akaza H.:
Immunoprotection against murine bladder
carcinoma by octaarginine-modified
liposomes incorporating cell wall of
Mycobacterium bovis bacillus
Calmette-Guerin. BJU Int, 103: 686, 2009
査読有り

〔学会発表〕(計2件)

- ①宮崎淳、河合弘二、常楽晃、中村孝司、原島秀吉、小濱秀康、矢野郁也、赤座英之：
BCG-CWS 搭載オクタアルギニンリポソーム製剤膀胱内注入によるBBN発癌ラットの治療効果について
第3回BCG注入療法研究会 2010年11月26日 東京
- ②常楽晃、宮崎淳、中谷彰洋、中村孝司、河合弘二、矢野郁也、原島秀吉、赤座英之：BCG cell wall skeleton 内包リポソームベクターによるマウス膀胱癌治療モデル
第2回BCG注入療法研究会 2009年11月20日 東京

〔図書〕(計1件)

- ①宮崎淳、河合弘二、常楽晃、赤座英之、原島秀吉、矢野郁也：遺伝子医学 MOOK17 8. 泌尿器領域の臨床応用研究：BCG 細胞壁骨格成分 (BCG-CWS) 搭載多機能ナノ構造体による膀胱癌ワクチンの開発. メディカルドゥ社 p125-131, 2010年

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮崎 淳 (MIYAZAKI JUN)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・
講師

研究者番号：10550246