慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	リポソーム法を用いたIL-21・15遺伝子導入の併用による再発予防に関する研究
Sub Title	Liposomal IL-21/IL-15 gene therapy in an orthotopic bladder cancer model and prevention of tumor invasion and metastasis
Author	松島, 将史(Matsushima, Masashi) 松本, 一宏(Matsumoto, Kazuhiro) 菊地, 栄次(Kikuchi, Eiji) 宮嶋, 哲(Miyajima, Akira) 大家, 基嗣(Oya, Mototsugu)
Publisher	
Publication year	2013
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2012.)
JaLC DOI	
Abstract	

様式Ｆ－１９

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2011～2012
課題番号：23791788
研究課題名（和文）　リポソーム法を用いたＩＬ－２１・１５遺伝子導入の併用による再発予防に関する研究
研究課題名（英文）　Liposomal IL-21/IL-15 Gene Therapy in an Orthotopic Bladder Cancer Model and Prevention of Tumor Invasion and Metastasis
研究代表者
松島　将史（MATSUSHIMA MASASHI）
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：00464850

研究成果の概要(和文):MBT-2 細胞に in vitro で IL-21 プラスミド導入を行い、上清中の IL-21 分泌を ELISA にて定量的に測定、IL-21 の発現を確認した。次にマウス膀胱癌同所性モデルを作成、IL-21 プラスミドを用いた膀胱内遺伝子導入を行った。その結果、コントロール群と比較して IL-21 導入群は有意に膀胱重量が低い結果であった($p < 0.05$)。よって本手法は、膀胱癌に対する膀胱内注入治療確立の布石となる可能性があると考えられた。

研究成果の概要（英文）：We transfected IL-21 plasmid to MBT2 cells, and the supernatant IL-21 level was measured by ELISA after the transfection of IL-21 gene. The peak IL-21 level was observed 24 hr after the transfection of IL-21 plasmids. Next, we established the orthotopic bladder cancer model. Intravesical IL-21 gene therapy in situ resulted in a significant reduction of bladder weight compared with those of the control group ($p < 0.05$). In conclusion, the present findings indicate that IL-21 gene therapy may be a promising new adjuvant therapy for bladder cancer.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

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：膀胱癌、インターロイキン 21、遺伝子導入、膀胱内注入

１．研究開始当初の背景

筋層非浸潤性膀胱癌に対しては通常 TUR-BT（経尿道的膀胱腫瘍切除術）を施行するが、3 年以内に約 70%のケースが再発し、また進行癌に進展するものも少なくない。再発予防のための adjuvant 治療として、BCG 膀胱内注入療法がスタンダードな治療法として現在世界中で広く施行されている。現時点で各種抗癌剤膀胱内注入療法に比べ、再発予防の点で有効であることが判明している。しかし現状の BCG 膀胱内注入療法の問題点として、ⓐ依然として 3 年以内に約 40%のケースが再発しており進展するものも少なくない、ⓑ長期間の再発予防効果が乏しく、また効果が膀胱局所的であるため晩期の再発進展や転移が認められる、ⓒ誘導される免疫反応により、高頻度に排尿困難、血尿、発熱等の強い副作用を認める等が挙げられる。これらの問題を克服するためには、ⓐ再発率、進展率をさらに減少させるため、より強力な抗癌反応を誘導する、ⓑ晩期の免疫応答を失わないよう、生涯にわたる免疫記憶を獲得させる、ⓒ副作用を抑制するため、抗癌作用をもたらすサイトカインのみを選択的に増強することが必要である。

当教室ではBCG膀胱内注入療法に代わる次世代の治療としてインターロイキンによる遺伝子治療の研究を行ってきた。癌に対する遺伝子導入治療の臨床におけるその有効率はこれまでのところ非常に低い。生体内局所の癌細胞に効率良く目的の遺伝子を導入することが現実的に困難であることが、その原因のひとつであると考えられる。しかし膀胱癌の場合、膀注という簡単な手法で膀胱内に一定時間ベクターを注入し貯留させることができるため、従来の in situ の他の治療法と比べ、高い遺伝子導入効率が期待できる。これまで当教室において、リポソーム法を用い、IL-2 (Y.Horiguchi et al, Gene Therapy, 2000)、IL-12(M.Horinaga et al, Urology, 2005)および IL-15(K. Matsumoto *et al*, Hun gene therapy, 2011) のサイトカインに関して、マウス膀胱癌同所性モデルを用いてその強い抗腫瘍効果を証明し報告してきた。これらは前述した問題点ⓐ、ⓒを改善する大きな布石となると考えている。しかしながらこれまでのところ、抗腫瘍効果に関してはBCGより有用であることは証明できているものの、腫瘍の Complete rejection は達成できていない。また晩期の免疫応答を誘導することに対しては、未だ十分な検討が行われていない。今回我々はⓐ抗癌効果のさらなる改善(腫瘍の Complete rejection の達成)およびⓑ長期免疫記憶の獲得のために、IL-21 遺伝子導入による治療法を計画した。

２．研究の目的

IL-21はIL-2サイトカインファミリーの一員であり、IL-2 や IL-15 と構造上有意な相同性を有するサイトカインである。IL-21 は活性化 CD4＋T 細胞から分泌され、自然免疫系の NK 細胞、適応免疫系のナイーブおよびメモリーCD8＋T細胞に作用し，これらの細胞の増殖、分化、活性化を促進し、IFN-γ産生を誘導する。IL-21 はこのような多様な免疫賦活作用を介して、抗腫瘍反応に関与しているものと考えられている。マウスに腫瘍細胞を移植する実験系で IL-21 を投与すると抗腫瘍免疫が誘導されるとする報告は複数散見されるものの (Moroz A et al, J Immunol. 2004 Jul 15;173(2):900-9、Wang G et al, Cancer Res. 63:9016-9022, 2003、Ma H L. et al, J. Immunol. 171: 608-615, 2003、Ugai S et al, Cancer Gene Ther. 10: 771-778, 2003、Nakano H et al, J. Gene Med. 8: 90- 99, 2005.)、膀胱癌における IL-21 を用いた実験は、MBT-2皮下腫瘍モデルを用いたものが一つ報告されているのみである (Furukawa J et al, J Urol. 2006 Sep;176(3):1198-203.)。また、他癌種ではあるが、海外で悪性黒色腫、腎細胞癌に対し IL-21 の第Ⅰ相、第 II 相臨床試験が行われており、IL-21 の静脈内投与の安全性が確認され，臨床上での有効性も示唆されている (Curti B et al, J. Clin. Oncol. 23 (Suppl., abstr.) : 2502, 2005、Thompson JA et al, J Clin Oncol. 2008 Apr 20;26(12):2034-9. Epub 2008 Mar 17. Davis ID et al, Clin Cancer Res. 2009 Mar 15;15(6):2123-9. Epub 2009 Mar 10.)。膀胱内注入により Target となる臓器にのみ遺伝子導入される点、ウイルスベクターに比べ安全なリポソームを使用する点、既に臨床試験での安全性が確認されている点により、本治療法は将来的に臨床応用が十分に可能であると考えられる。

膀胱腫瘍の免疫治療の研究を行う際、宿主―癌との関連を見る上で当然、in vitro よりも in vivo での動物実験の検証が重要となる。さらに皮下腫瘍モデルではなく、同所性に膀胱腫瘍を確立し、膀胱内注入を行う研究は現在の膀胱癌臨床に即したモデル研究である。当教室では長年にわたりマウス膀胱癌同所性モデルの確立を維持してきた。これは C3H/HeN マウスの膀胱内に MBT-2 細胞（マウス膀胱癌細胞）を注入し生着させる方法であり、技術的に安定している現在ではほぼ100％の癌生着率を示す(Kikuchi E et al, J. Urol., 2003)。また生着した膀胱癌の Biology は臨床のヒト膀胱癌に類似しており、時間とともに筋層浸潤へと進展していくことが既に確認されており、実際の臨床に則した十分に研究モデルとして使用できるものである。本研究により膀胱癌への IL-21 遺伝子導入治療の効果を証明することができれば、長年 BCG 膀胱内注入療法で停留していた膀胱癌治療に変革を起こすことができると考える。具体的には、BCG 抵抗性の CIS や high grade の膀胱癌において本治療で Complete rejection が達成できれば、膀胱全摘術を回避することが可能になり、膀胱癌の治療戦略そのものを根底から変える可能性がある。また、BCG よりも高い再発予防効果が得られれば再発腫瘍への TUR-BT や膀胱全摘術、抗癌化学療法の抑制につながり、医療コストの削減にもつながる。それとともに、IL-21 の役割を明らかにすることで、本研究の結果は膀胱癌にとどまらず、あらゆる癌種の今後の抗腫瘍免疫研究における礎となりうると期待された。

３．研究の方法

(1)In vitro での IL-21 遺伝子導入実験
種々の濃度のリポータープラズミド (LacZ) とリポソームを混ぜリポプレックスを作成、RPMI に懸濁し、MBT-2 細胞培養 dish に 30 分間加え遺伝子導入する。遺伝子導入効率を X-gal 染色を用い測定し、最も導入効率のすぐれたリポソーム製剤およびプラズミドと

リポソームの比率を同定する。また遺伝子導入に伴う細胞毒性を WST アッセイにて確認し、至適濃度を決定する。次にその導入手法に基づき、IL-21 プラズミドを同様に MBT-2 細胞に導入し、上清中の IL-21 濃度を ELISA 法にて測定する。

(2)マウス膀胱癌同所性モデルの作成
MBT-2 細胞を用いて、C3H/HeN マウスに膀胱腫瘍を膀胱移植する。具体的にはマウスをネンブタール 50mg/kg 腹腔内注射にて麻酔を行い、仰臥位とする。経尿道的に 24G 血管カテーテル外筒を挿入し、MBT-2 細胞浮遊液 5×105 個/0.05ml を注入し、2 時間尿道を糸で縛り内溶液を貯留させる。準備段階として、我々は当教室にて再現性を持って、MBT-2 同所性膀胱腫瘍モデルの確立に成功している。この手法により技術的に安定している現在ではほぼ 100%の癌生着率を示す。

(3) LacZ プラスミドを用いたリポソーム法による膀胱内遺伝子導入効率の検討
LacZ プラズミドとリポソームを上記実験で求めた至適比率、至適濃度で混ぜてリポプレックスを作成し、RPMI に懸濁し、計 0.2ml とする。これを全身麻酔下のマウス膀胱癌正所性モデルの腫瘍形成後の膀胱内に注入する。その後膀胱を摘出し腫瘍細胞内に遺伝子が導入されていることを X-gal 染色で確認する。

(4) MBT-2 同所性膀胱腫瘍モデルを用いた IL-21 遺伝子治療の検討 (in situ の検討)
IL-21 プラスミドとリポソームにて(3)と同様にリポプレックス懸濁液を作成し膀胱内に注入する。マウスの体重の連日測定、連日マウス尿の採取を行う。30 日目にマウスを安楽死させ、膀胱腫瘍を摘出する。膀胱重量をコントロール群と比較検討する。また転移の有無（特にリンパ節、肺転移）もあわせて調べる。また、マウス尿の IL-21 濃度を ELISA 法にて測定し、それぞれの分泌量を測定する。

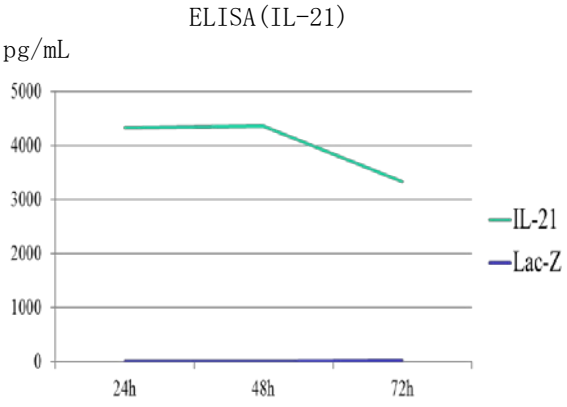
４．研究成果

(1)In vitro での IL-21 遺伝子導入実験

60-mm culture dish 上の 5 x 10^5MBT-2 細胞に対し 5μg または 10μg の LacZ プラズミドをそれぞれ 25μg または 50μg の各種リポソームを用い遺伝子導入を行った。X-gal 染色の結果、50μg の LipofectamineTM LTX を用いた際に最も高い導入効率を示した。

リポソーム	dose	導入効率
GenePORTER	25μg	14.0%
GenePORTER	50μg	11.4%
GenePORTER +Nupherin	25μg	6.1%
GenePORTER +Nupherin	50μg	20.7%
GenePORTER3000	25μg	25.8%
GenePORTER3000	50μg	30.4%
GenePORTER3000 +Nupherin	25μg	5.4%
GenePORTER3000 +Nupherin	50μg	40.2%
FuGENE	25μg	18.3%
FuGENE	50μg	22.5%
FuGENE +Nupherin	25μg	34.6%
LipofectamineTM LTX	25μg	46.0%
LipofectamineTM LTX	50μg	55.8%
LipofectamineTM LTX+Nupherin	25μg	46.3%
LipofectamineTM LTX+Nupherin	50μg	41.9%

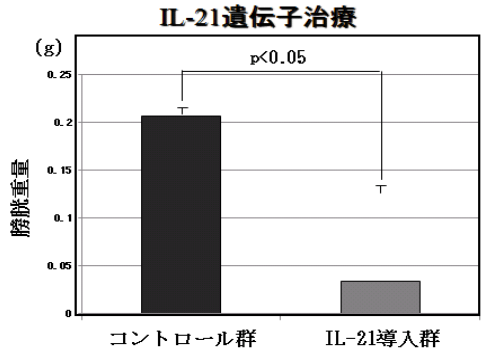
次に上記手法に従い、MBT-2 細胞に in vitro で LipofectamineTM LTX を用いたリポフェクション法により IL-21 および Lac-Z プラスミド導入を行い、導入後 24 時間、48 時間、72 時間の上清中の IL-21 分泌を ELISA にて定量的に測定。IL-21 プラスミド導入により IL-21 の発現を確認した。



(2)マウス膀胱癌同所性モデルの作成
全身麻酔下に C3H/HeN マウスの膀胱内へ MBT-2 細胞(5 × 10^5cells)を注入し 2 時間尿道を結紮した。この手法により 100%の腫瘍生着を確認できた。顕微鏡下に Day3 には腫瘍巣の形成を認め、Day10 には肉眼的にも腫瘍の確認が可能であった。

(3) LacZ プラスミドを用いたリポソーム法による膀胱内遺伝子導入効率の検討
LacZプラズミド10μgとリポソーム50μgをRPMIに懸濁し、計0.2mlとし、上記モデルマウスDay5の膀胱内に注入し、2時間尿道を結紮した。翌日膀胱を摘出し、Xgal染色を行ったところ、腫瘍形成部分に特異的なLacZ遺伝子の導入を認めた。

(4) MBT-2 同所性膀胱腫瘍モデルを用いた IL-21 遺伝子治療の検討（in situ の検討）
IL-21 プラスミドを用いたリポソーム法による膀胱内遺伝子導入を行った。その結果、コントロール群と比較して IL-21 導入群は有意に膀胱重量が低い結果であった(IL-21 導入群 :0.0340 ± 0.0140g 、 コ ン ト ロ ー ル群:0.2066±0.1549g、p < 0.05)。



IL-21 プラスミドを用いた膀胱内遺伝子導入によるタンパク発現の確認として、マウス尿を採取し IL-21 濃度を ELISA 法にて測定し、分泌量を測定した。しかし再現性ある結果が出ておらず、現在継続実験中である。その上で今後 IL-21 遺伝子導入による浸潤抑制、転移抑制効果の有無について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０件）

〔学会発表〕（計０件）

〔図書〕（計０件）

〔産業財産権〕
○出願状況（計０件）
○取得状況（計０件）

〔その他〕
ホームページ等特になし

６．研究組織
(1)研究代表者
松島　将史（MATSUSHIMA MASASHI）
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：00464850

(2)研究協力者
松本　一宏（MATSUMOTO KAZUHIRO）
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：80366153

菊地　栄次（KIKUCHI EIJI）
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号：10286552

宮嶋　哲（MIYAJIMA AKIRA）
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号：90245572

大家　基嗣（OYA MOTOTSUGU）
慶應義塾大学・医学部・教授
研究者番号：00213885