

対象研究テーマ：細胞死の分子機構と死細胞による炎症誘導機構に関する研究

研究期間：2012年4月1日～2013年3月31日

研究題目：BCGの抗癌活性発現における炎症反応および免疫応答の分子基盤の確立

研究代表者：琉球大学熱帯生物圏研究センター 教授 松崎吾朗

研究成果の概要：

膀胱がんに対する BCG 療法の作用機序に関する動物モデルの研究により、抗癌作用には炎症性サイトカインとして知られる Interleukin (IL)-17A の発現が必須であり、また非典型的な T 細胞である TCR $\gamma\delta$ 型 T 細胞が IL-17A 産生細胞として重要である。しかし、BCG 抗癌療法における IL-17A の誘導機序、ならびに IL-17A により誘導される抗腫瘍効果の発現機序について詳細は不明であった。BCG 療法において IL-17A 依存的に発現される遺伝子プロファイルを解析するため、BCG 接種した IL-17A 遺伝子欠損マウスを用いた DNA マイクロアレイ法による網羅的な発現解析を行った。現在、得られた解析データを詳細に検証しているところであるが、炎症局所へのエフェクター細胞の動員に関するケモカインの発現や組織を構築している細胞外マトリックスを分解するマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)類の発現レベルが IL-17A 依存的に変動している可能性が示唆されている。

研究分野：腫瘍免疫、膀胱がん、BCG 療法

キーワード：膀胱がん、IL-17A、遺伝子発現解析

1. 研究開始当初の背景

Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin (BCG) 製剤の膀胱内注入療法が膀胱癌、特に上皮内癌に対する治療として好成績を挙げている。しかしながら、BCG 膀胱内注入療法は血尿や発熱などの副作用が高頻度で認められ、また免疫不全状態の患者では BCG の全身感染の恐れもあるため、BCG 生菌を用いず副作用の少ない製剤の開発が必要である。BCG 療法を基盤として次世代の抗癌療法を開発するためには、BCG に対する炎症および免疫応答の分子基盤を解明することが重要である。

膀胱がんに対する BCG 療法の作用機序を検証するための動物モデルの解析より、抗癌作用には炎症性サイトカインの一つである IL-17A が必要であり、それを産生する細胞が非典型的な T 細胞亜集団である TCR $\gamma\delta$ 型 T 細胞であることが報告された。しかし、BCG 抗癌療法における IL-17A の誘導、ならびに IL-17A により誘導される抗腫瘍効果の発現機序は未だ不明瞭である。これらの点を解明することは、BCG 療法の副作用を軽減しつつより効果の高い治療法を開発するために重要な情報となる。

2. 研究の目的

本研究では、Fas-FasL 相互作用に誘発される

炎症反応と BCG に対する免疫応答の共通事項を考慮しつつ、膀胱がんに対する BCG 製剤の膀胱注による膀胱癌治療の免疫学的作用機序を明らかにし、さらに副作用の少ない製剤を開発するための基盤的研究である。本研究では、マウスの粘膜臓器における BCG 製剤に対する反応を、網羅的遺伝子プロファイリングにより解析することを目的とした。その結果から BCG 製剤による抗癌活性の本質が解明されるものと期待される。また、その情報を基に抗癌活性に必須な反応系を残しながら副作用を示さない製剤の要件を明らかにすることにより、新規の抗膀胱癌製剤の開発を促進することが可能な点で、本研究は今後の癌治療の開発に貢献するものと期待される。

3. 研究の方法

基本的な研究システムとして、マウスに BCG 製剤を接種したのちに認められる遺伝子発現プロファイルの変化について DNA マイクロアレイによる発現解析により検討した。モデル動物として、野生型 C57BL/6 マウスおよび IL-17A 遺伝子欠損(KO)マウスを用いた。BCG 製剤を経気道接種した後 14 日目および 28 日目に肺組織から total RNA を精製した。バイオアナライザで品質チェックした RNA を用い、Cyanine3 のラベル化

(1色法)、ハイブリダイゼーションを行った後、マイクロアレイをスキャニングし、データを抽出した。データ解析は Gene Spring GX (Agilent Technologies)を用いた。

同時に DNA マイクロアレイ解析に用いるサンプル(肺組織)はパラフィン切片を作製し H&E 染色で組織病理学的解析すると共に、BCG 接種により誘導される既知の遺伝子発現を real-time RT-PCR 法で標的遺伝子の発現レベルを調べた。

4. 研究成果

今回、マウスへの BCG 勝注の技術移転が困難であったため、BCG 注入した膀胱と同じ応答が起こると論理的に推定される粘膜臓器として、肺組織への BCG 注入を新たなモデルとして利用することとした。その根拠として、BCG 製剤の膀胱注および経気管内注入では、ともに IL-17A を発現する TCR $\gamma\delta$ 型 T 細胞が早期から誘導され、IL-17A が好中球誘導による炎症誘導に必須であることが挙げられる。

DNA マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析の結果より、BCG 接種局所へのエフェクター細胞の動員に関与するケモカインレセプターとして、CCR5、CCR8、CCR9、CXCR6などがIL-17A 依存的に発現上昇していることが明らかになった。また、エフェクター細胞が局所に速やかに浸潤するには、コラーゲンをはじめとする細胞周辺の細胞外基質(extracellular matrix, ECM)の分解が必要であり、そこに関与するマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)のうち、MMP-2やMMP-9の活性化を誘導するMMP-13の発現レベルの上昇がIL-17A KOマウスでは認められなかった。その他のBCG製剤によるIL-17A 依存的な遺伝子発現の変化は現在解析中である。

一方、同時に採取した肺組織の組織病理所見の比較では、BCG 製剤接種により形成されるマクロファージ集簇を取り囲むリンパ球浸潤、すなわち肉芽腫形成、の不全がIL-17A KOマウスで認められ、これはDNA マイクロアレイの解析結果から導き出せる現象に相関するものと考えられた。さらに、エフェクターT細胞の走化性に関与するケモカインとして CXCL9/MIG、CXCL10/IP10、CXCL11/I-TACなどの発現もIL-17A 依存的である可能性が示唆された。

今後、今回得られた結果からIL-17A 依存性抗癌メカニズムに関与する遺伝子候補を抽出することにより、その情報を活用して、有効かつ副作用の少ない膀胱癌治療製剤が開発できるものと期待している。

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、論文執筆中

[学会発表](計5件)

1. 梅村正幸, 岡本祐子, 矢作綾野, 當山清悟, 安田直子, 松崎吾朗「マイコバクテリア感染肺におけるインターロイキン(IL)-17A 依存性肉芽腫形成メカニズムの解明」(第 82 回実験結核研究会, 広島 (2012/05/09))
2. 梅村正幸, 當山清悟, 岡本祐子, 矢作綾野, 安田直子, 中江進, 岩倉洋一郎, 松崎吾朗「結核菌に対する感染防御におけるIL-17Fの関与」(第 77 回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会, 神戸商工会議所, 神戸市, 2012/06/21~22)
3. 梅村正幸, 當山清悟, 岡本祐子, 矢作綾野, 安田直子, 中江進, 岩倉洋一郎, 松崎吾朗「結核菌感染肺におけるIL-17Fの防御能」(第 23 回日本生体防御学会学術総会, 東京 (2012/07/09~11))
4. Umemura M., Touyama S., Fukui M., Nakae S., Iwakura Y., Matsuzaki G.「Role of IL-17F in chronic pulmonary mycobacterial infection」(第 41 回日本免疫学会学術集会, 神戸市, 2012/12/05~08)
5. Umemura M., Touyama S., Fukui M., Yoshida-Okamoto Y., Yahagi A., Nakae S., Iwakura Y., Matsuzaki G.「Role of IL-17F in protective immunity at earlier stage of chronic pulmonary mycobacterial infection」(第 86 回日本細菌学会総会, 千葉, 2013/03/18~20)

[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]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

琉球大学熱帯生物圏研究センター・教授
松崎吾朗

(2) 研究分担者

琉球大学熱帯生物圏研究センター・准教授
梅村正幸
琉球大学熱帯生物圏研究センター・研究員
福井雅之

(3) 本研究所担当者

免疫炎症制御・教授 須田貴司