

## 慶應義塾大学学術情報リポジトリ

## Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	INTRAVESICAL INTERLEUKIN-12 GENE THERAPY IN AN ORTHOTOPIC CANCER MODEL
Sub Title	正所性膀胱癌モデルにおける膀胱内インターロイキン-12遺伝子治療
Author	堀永, 実(Horinaga, Minoru)
Publisher	慶應医学会
Publication year	2006
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.83, No.1 (2006. 3) ,p.31-
Abstract	
Notes	号外
Genre	Journal Article
URL	<a href="http://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20060302-0031">http://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20060302-0031</a>

# INTRAVESICAL INTERLEUKIN-12 GENE THERAPY IN AN ORTHOTOPIC BLADDER CANCER MODEL

(正所性膀胱癌モデルにおける膀胱内インターロイキン-12遺伝子治療)

堀 永 実

## 内容の要旨

表在性膀胱癌に対しては、Bacillus Calmette-Guerin (BCG) の膀胱内注入療法が術後の再発予防、浸潤癌への進展の予防、いずれの点においても最も有効であり標準的な治療法である。抗腫瘍効果の作用機序は、1型ヘルパーT細胞を賦活し、細胞性免疫を誘導すると考えられている。インターロイキン-12 (IL-12) は、1型ヘルパーT細胞の活性に重要なサイトカインの一つであり、インターフェロン $\gamma$ を介し癌に対して抗腫瘍免疫を誘導する。BCG膀胱内注入療法は、激しい膀胱刺激症状や血尿、発熱、萎縮膀胱の副作用を認める。また、長期的な抗腫瘍免疫が誘導されず、腫瘍の再発を認めてしまう事も多い。そのため、BCG無効再発膀胱癌には新しい治療法が求められている。申請者は、正電荷型リポソーム法を用いてIL-12遺伝子を腫瘍細胞に遺伝子導入する新たな癌免疫療法の開発を、マウス正所性膀胱癌モデルにて試みた。

〈方法〉 正所性膀胱癌モデルは、C3Hマウス由来の膀胱癌細胞株MBT-2を、雌C3Hマウスに経尿道的にカテーテルを用い膀胱内に注入し作成した。遺伝子導入は、マウスIL-12遺伝子または、大腸菌 $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -gal) レポーター遺伝子を組み込んだプラスミドと、正電荷型リポソームを混和し (リポブックス)、腫瘍細胞に投与した。リポソーム法による膀胱内遺伝子導入のマウス膀胱におけるBiodistributionを、 $\beta$ -galプラスミドを用いX-gal染色法にて検討した。膀胱内治療はMBT-2を膀胱内に移植後5日目より、IL-12リポブックス、 $\beta$ -galリポブックス (コントロール)、あるいはBCGの注入を開始し、3日毎に計6回投与した。第60日目まで生存したマウスに対しては、第60日目にMBT-2を膀胱内へ再度移植し、その後は特に治療を行わず第120日目まで観察した。

〈結果〉 膀胱内IL-12遺伝子治療群では約40%において、治療前に生着させた膀胱癌が完全に消退した。一方、同量の $\beta$ -galの遺伝子治療群では膀胱癌は成長し、マウスは膀胱癌により全例60日以内に死亡した。この結果より、膀胱内IL-12遺伝子治療は、遺伝子導入された腫瘍細胞からIL-12が局所的に産生され、その結果として宿主の腫瘍細胞に対する免疫応答を誘導し、抗腫瘍効果を示したと考えられる。さらに一度腫瘍を拒絶したマウスは、第60日目の二度目に移植したMBT-2腫瘍細胞をも拒絶し、計120日間生存し続けた。しかし、膀胱内BCG注入療法群で腫瘍を拒絶したマウスにおいては、IL-12遺伝子治療のように再移植された腫瘍細胞を拒絶する事ができなかった。X-gal染色では、マウスの膀胱腫瘍細胞のみに $\beta$ -galを発現し、腫瘍周囲の正常粘膜には肉眼的には明らかに $\beta$ -galの発現を認めなかった。また、膀胱内IL-12遺伝子治療群のマウスにおいては、重篤な副作用を認めなかった。

〈まとめ〉 リポソーム法による膀胱内IL-12遺伝子治療は、膀胱内BCG注入療法に比べ、長期的かつ腫瘍特異的な抗腫瘍効果を誘導すると考えられ、今後臨床応用の可能性が期待される。

## 論文審査の要旨

マウス由来膀胱癌細胞MBT-2を経尿道的にC3H/HeJマウスの膀胱へ移植する正所性膀胱癌モデルを用い、インターロイキン12 (IL-12) による膀胱内遺伝子治療について検討した。マウスIL-12遺伝子を組み込んだプラスミドを正電荷型リポソーム法により膀胱内へ注入することにより、腫瘍細胞への遺伝子導入を行なった。また同モデルを用いて膀胱内BCG療法との比較を行なった。単回、30分間の膀胱内 $\beta$ -galレポーター遺伝子導入では、X-gal染色のマクロ所見では腫瘍内への比較的選択的な発現が観察された。またIL-12遺伝子導入では尿中IL-12濃度の上昇を認めた。計6回の膀胱内IL-12遺伝子治療群は、 $\beta$ -gal遺伝子治療群 (コントロール) に比較して、生存期間の有意な延長が観察された。さらに、膀胱内IL-12遺伝子治療群で第60日まで生存したマウスに対してMBT-2細胞の再移植を施行したところ、全例再移植を拒絶できたため、腫瘍特異的な抗腫瘍免疫が誘導された事が示唆された。一方、計6回の膀胱内BCG治療群の生存マウスでは、同様のMBT-2細胞の再移植に対しては全例拒絶できなかった。これらの結果より、リポソーム法による膀胱内IL-12遺伝子治療は、BCG無効の再発膀胱癌に対して臨床応用の可能性が示唆された。

審査においては、今回使用されたC3H/HeJマウスは、リポ多糖 (LPS) に応答しない変異マウスであるため、膀胱内BCG療法の抗腫瘍効果を検討するには、C57BL/6マウスとMB-49膀胱癌細胞のような同種正所性膀胱癌モデルの方が良いのではないかと助言がなされた。また、腫瘍特異的な免疫が誘導される事を証明するためには、同じマウス由来の異なる癌種を再移植するなどの方法について質問がなされた。これに対しては、C3H/HeJマウス由来のメラノーマ細胞株であるK1735細胞と、今回使用したMBT-2細胞を第60日目まで生存したマウスを2群に分け、皮下に各々再移植し、その腫瘍を拒絶できるかを観察する事により検討できるのではと回答された。次に、このモデルの膀胱癌の肉眼所見からは膀胱粘膜内に限局し乳頭状に発育する表在性膀胱癌というよりは、非乳頭状の筋層浸潤性膀胱癌モデルに近いのではないかと指摘された。これに対しては、膀胱癌にて死亡したマウスの剖検では、肺や腹腔内のリンパ節へ転移を認めず、死因は膀胱内の腫瘍充満による機械的な閉塞による水腎症、腎不全が考えられるため表在性膀胱癌に近いのではと推測されるが、本研究においては膀胱癌の病理組織学的な検討が不十分であったと回答された。

本研究は今後検討すべき点が残されているものの、臨床例に近い正所性膀胱癌モデルにおいて膀胱内IL-12遺伝子治療が、膀胱内BCG療法よりも有用である可能性を示唆した点で有意義な研究であると評価された。

論文審査担当者 主査 泌尿器科学 村井 勝  
病理学 坂元 亨宇 先端医学 河上 裕  
病理学 岡田 保典  
学力確認担当者: 池田 康夫、坂元 亨宇  
審査委員長: 坂元 亨宇

試問日: 平成18年 1月30日