

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 5 月 26 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10963

研究課題名(和文) 進行期骨軟部肉腫に対する細胞外マトリックス制御による新規腫瘍免疫療法の開発

研究課題名(英文) Study of novel tumor immunotherapy by modulating extracellular matrix of advanced bone and soft tissue sarcoma

研究代表者

浦川 浩 (URAKAWA, HIROSHI)

名古屋大学・医学部附属病院・病院講師

研究者番号：60584753

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：骨軟部肉腫におけるヒアルロン酸を中心とした細胞外マトリックス・細胞膜上受容体・細胞内シグナル伝達のネットワークと腫瘍免疫との関係を明らかにし、これらをターゲットとした新規免疫療法の確立を目的として免疫チェックポイント分子とヒアルロン酸ネットワークの関係を評価した。骨軟部肉腫細胞においては豊富な細胞外マトリックスを認め免疫チェックポイント分子の発現との関係において一定の関係がみられ、骨軟部肉腫腫瘍組織においては豊富なヒアルロン酸発現を認め、一部の組織型において免疫細胞浸潤と免疫チェックポイント分子発現を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腫瘍内では腫瘍免疫により抗がん剤など既存治療への抵抗性が獲得されており、骨軟部肉腫においてヒアルロン酸を中心とした細胞外マトリックス・細胞膜上受容体・細胞内シグナル伝達のネットワークが腫瘍免疫にかかわっている可能性が示唆された。細胞外マトリックスの産生・蓄積の制御、あるいはマトリックス-細胞膜上受容体の相互作用を制御することにより、骨軟部肉腫において抗腫瘍免疫応答を引き起こすことが可能となり、新規腫瘍免疫療法の開発が期待される。

研究成果の概要(英文)：To clarify the relationship between tumor immunity and extracellular matrix / receptor / intracellular signal network mediated by hyaluronan and to establish new immunotherapy targeting in bone and soft tissue sarcoma, we evaluated the relationship between immune checkpoint molecules and hyaluronan network in bone and soft tissue sarcoma. Abundant extracellular matrix was observed in bone and soft tissue sarcoma cells, and a certain relationship between extracellular matrix/ receptor / intracellular signal network and immune checkpoint molecules was observed. Abundant expression of hyaluronan was observed in bone and soft tissue sarcoma tumor tissue, and the immune cell infiltration and immune checkpoint molecule expression were observed in certain type of sarcomas.

研究分野：整形外科学

キーワード：細胞外マトリックス 免疫応答 免疫チェックポイント阻害剤 ヒアルロン酸

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

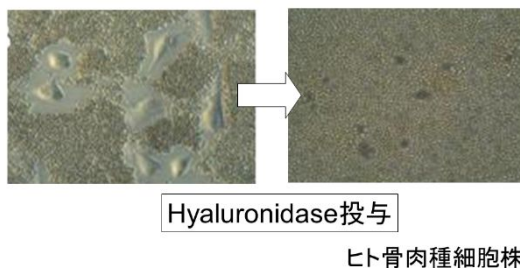
1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、進行期の骨軟部肉腫に対する治療成績は向上していない。骨肉腫に対しては抗がん剤治療が確立されているが、この30年近くめざましい治療成績の改善はみられない。軟部肉腫に対する抗がん剤治療については、近年、トラベクテジンやエリブリンなどの新規薬剤が保険承認されているが全生存期間を改善する薬剤は限られている。また、抗がん剤感受性は同じ組織型の肉腫であっても症例によって異なる。抗がん剤抵抗性を示す非小円形細胞肉腫の多くは不均一に構成された (heterogeneous) 腫瘍であること、また細胞外マトリックスが豊富であることが特徴である (図1)。肉腫が heterogeneous な腫瘍であることに対する抗がん剤治療成績向上は、特定の遺伝子発現や組織型を対象とした抗がん剤治療の開発といった対応が必要となるが、細胞外マトリックスの制御による治療は肉腫全体への応用が期待できる。

(2) 近年、腫瘍免疫療法は格段に進歩し、メラノーマなどに対して免疫チェックポイント阻害薬である抗 Programmed cell death 1 (PD-1) 抗体のニボルマブや抗 Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4 (CTLA-4) 抗体のイピリムマブが本邦において保険承認された。骨軟部肉腫の領域において現在承認されている腫瘍免疫療法はない。様々な悪性腫瘍の組織において過剰なヒアルロン酸蓄積が生じ、腫瘍免疫と関連することが知られている。骨肉腫、脊索腫においては Programmed death ligand 1 (PD-L1) 発現が無再発生存や遠隔転移と関連したとの報告があり PD-L1 抗体治療の効果が期待される一方、小児の軟部肉腫においては PD-L1 発現は予後と関連しなかったと報告されている。肉腫における免疫性はメラノーマよりも低いとする報告もあり、PD-L1 抗体単剤など免疫チェックポイント阻害剤の効果増強のためヒアルロン酸を介した新規免疫療法の確立が期待される。

図1

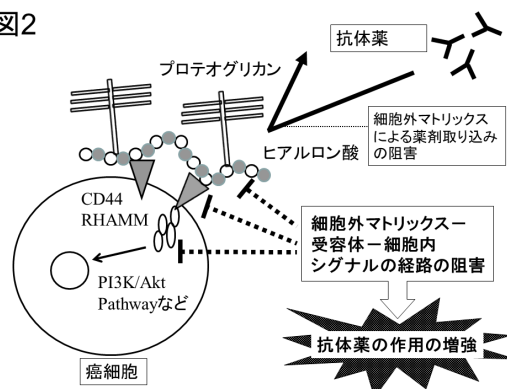
肉腫における細胞外マトリックスの抑制



2. 研究の目的

本研究は骨軟部肉腫において細胞外マトリックスの制御により抗腫瘍免疫応答を引き起こす新規腫瘍免疫療法を確立することすることを目的とする (図2)。

図2



(1) 骨軟部肉腫細胞株におけるヒアルロン酸合成酵素の mRNA やヒアルロン酸やヒアルロン

酸合成酵素の蛋白発現、ヒアルロン酸発現、細胞外マトリックスの評価

(2) 骨軟部肉腫細胞株における免疫チェックポイント分子の発現の評価

(3) 骨軟部肉腫腫瘍組織における免疫チェックポイント分子の発現と免疫細胞浸潤およびヒアルロン酸発現の評価

(4) マウス骨肉腫細胞株同種移植モデルを用いた細胞外マトリックス制御による免疫チェックポイント阻害への影響の評価

3. 研究の方法

本研究では、骨軟部肉腫の細胞外マトリックス・細胞膜上受容体・細胞内シグナル伝達のネットワークを明らかにし、これらを介して抗腫瘍免疫応答を引き起こす新規腫瘍免疫療法を確立するため、以下の方法でヒアルロン酸ネットワークおよび免疫への影響を検証した。

(1) 骨軟部肉腫細胞株におけるヒアルロン酸合成酵素の mRNA やヒアルロン酸やヒアルロン酸合成酵素の蛋白発現、ヒアルロン酸発現をみるために、各骨軟部肉腫細胞株(マウス骨肉腫細胞株 LM-8、K7M2、ヒト骨肉腫細胞株 MG-63、ヒト MPNST 細胞株 sNF96.2) を評価した。ヒアルロン酸量の評価に Particle exclusion assay、ヒアルロン酸免疫染色と ELISA による定量(培養液、細胞周囲、細胞内)、ヒアルロン酸合成酵素(HAS1、HAS2、HAS3)およびヒアルロン酸受容体 CD44 の mRNA 発現の評価に real time RT-PCR を行った。これらの項目についてヒアルロン酸合成阻害剤である 4-Methylumbelliferone(4-MU)投与による影響について評価した。

(2) 骨軟部肉腫細胞株における免疫チェックポイント分子の発現の評価を評価するため、ヒト骨軟部肉腫細胞株(マウス骨肉腫細胞株 LM-8、K7M2、ヒト骨肉腫細胞株 MG-63、ヒト MPNST 細胞株 sNF96.2) において抗 PD-L1 抗体を用いて免疫染色を行い各細胞株における発現をそれぞれ評価した。

(3) 骨軟部肉腫腫瘍組織において免疫チェックポイント分子(PD-L1、PD-1、CTLA-4)の発現と免疫細胞浸潤の評価を行った。同時に骨軟部肉腫腫瘍組織におけるヒアルロン酸発現の評価も実施した。

(4) マウス骨肉腫細胞株同種移植モデルを用いて細胞外マトリックス制御による免疫チェックポイント阻害への影響の評価するため、3-4 週齢の BALB/cJ マウスの側腹部に K7M2 マウス骨肉腫細胞を移植し同種骨肉腫細胞株移植モデルを作製した。腫瘍組織を採取し凍結後切片を作製し、抗 CD4、CD8、CD11c、B220、PD-1、PD-L1 抗体を用いて免疫染色を行い、顕微鏡を用いて観察した。

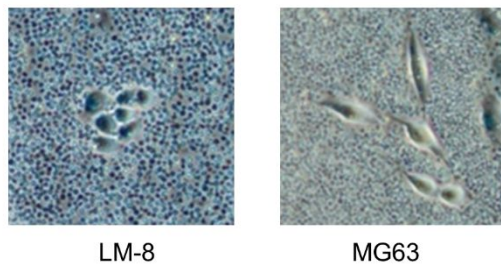
4. 研究成果

(1) 骨軟部肉腫細胞株におけるヒアルロン酸合成酵素の mRNA やヒアルロン酸やヒアルロン酸合成酵素の蛋白発現、ヒアルロン酸発現、細胞外マトリックスの評価

骨軟部肉腫細胞株における Particle exclusion assay の評価では、各骨軟部肉腫細胞株(マウス骨肉腫細胞株 LM-8、K7M2、ヒト骨肉腫細胞株 MG-63、ヒト MPNST 細胞株 sNF96.2) において豊富な細胞外マトリックスが観察された(図 3)。

図3

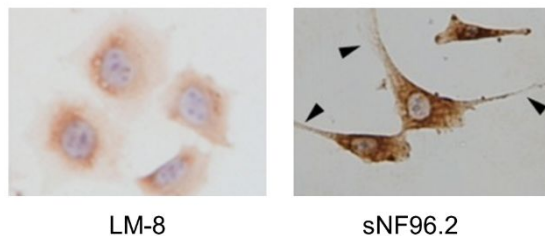
Particle exclusion assay



ヒアルロン酸免疫染色において各骨軟部肉腫細胞株において細胞質を中心としたヒアルロン酸の蓄積を認め（図 4）、その蓄積はヒアルロン酸合成阻害剤 4-MU の投与により低下した。sNF96.2 では葉状仮足がみられたが（図 4、矢頭）、4-MU 投与により葉状仮足の消失がみられた。

図4

ヒアルロン酸免疫染色



ELISA による定量ではそれぞれの骨軟部肉腫細胞株は細胞周囲に多くのヒアルロン酸蓄積を認めた。それぞれの細胞株においてヒアルロン酸合成酵素 HAS1、HAS2、HAS3 の mRNA 発現は様々であった。4-MU 投与によるヒアルロン酸合成酵素の mRNA 発現に対する影響は細胞株により異なっていた。

(2) 骨軟部肉腫細胞株における免疫チェックポイント分子の発現の評価

ヒト骨軟部肉腫細胞株（マウス骨肉腫細胞株 LM-8、K7M2、ヒト骨肉腫細胞株 MG-63、ヒト MPNST 細胞株 sNF96.2）のほとんどで PD-L1 発現を認めた。

(3) 骨軟部肉腫腫瘍組織における免疫チェックポイント分子の発現と免疫細胞浸潤の評価

骨軟部肉腫腫瘍組織中において腫瘍間質細胞および腫瘍の一部にヒアルロン酸発現を認めた。骨軟部肉腫腫瘍組織における免疫チェックポイント分子（PD-L1, PD-1, CTLA-4）の発現は多様であり、特に未分化多形肉腫などの組織型において腫瘍組織の免疫細胞浸潤がみられた。

(4) マウス骨肉腫細胞株同種移植モデルを用いた細胞外マトリックス制御による免疫チェックポイント阻害への影響の評価

マウス骨肉腫細胞株同種移植モデルを用いて細胞外マトリックス制御による免疫チェックポイント阻害への影響の評価するため、3-4 週齢の BALB/cJ マウスの側腹部に K7M2 マウス骨肉腫細胞を移植し同種骨肉腫細胞株移植モデルを作製した。腫瘍組織の免疫染色では CD4、CD8、CD11c 陽性細胞を認め、免疫能への影響を評価するモデルとして妥当であると考えられた。今後、抗 PD-L1 抗体又はアイソタイプコントロールの腹腔内投与を行いその影響を評価する予定である。

これらの結果より骨軟部肉腫においても腫瘍免疫により薬物療法などに対する抵抗性が獲得す

るような状況などで、ヒアルロン酸を中心とした細胞外マトリックス・細胞膜上受容体・細胞内シグナル伝達のネットワークが腫瘍免疫に関わっている可能性が示唆された。細胞外マトリックスの産生・蓄積の制御、あるいはマトリックス - 細胞膜上受容体の相互作用を制御し骨軟部腫瘍において抗腫瘍免疫応答を引き起こすことにより、新規腫瘍免疫療法の開発が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Urakawa Hiroshi, Ando Yuichi, Hase Tetsunari, Kikumori Toyone, Arai Eisuke, Maeda Osamu, Mitsuma Ayako, Sugishita Mihoko, Shimokata Tomoya, Ikuta Kunihiro, Ishiguro Naoki, Nishida Yoshihiro	4. 巻 146
2. 論文標題 Clinical value of serum bone resorption markers for predicting clinical outcomes after use of bone modifying agents in metastatic bone tumors: A prospective cohort study	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 3504 ~ 3515
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ijc.32836	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Shimizu Koki, Hamada Shunsuke, Sakai Tomohisa, Ito Shinji, Urakawa Hiroshi, Arai Eisuke, Ikuta Kunihiro, Koike Hiroshi, Ishiguro Naoki, Nishida Yoshihiro	4. 巻 63
2. 論文標題 MRI characteristics predict the efficacy of meloxicam treatment in patients with desmoid type fibromatosis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Medical Imaging and Radiation Oncology	6. 最初と最後の頁 751 ~ 757
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1754-9485.12940	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Urakawa Hiroshi, Nakanishi Kenichi, Arai Eisuke, Ikuta Kunihiro, Hamada Shunsuke, Ota Takehiro, Ishiguro Naoki, Nishida Yoshihiro	4. 巻 16
2. 論文標題 Single metastasis of myxoid liposarcoma from the thigh to thyroid gland: a case report	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 World Journal of Surgical Oncology	6. 最初と最後の頁 71
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12957-018-1370-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Ikuta Kunihiro, Nishida Yoshihiro, Sugiura Hideshi, Tsukushi Satoshi, Yamada Kenji, Urakawa Hiroshi, Arai Eisuke, Hamada Shunsuke, Ishiguro Naoki	4. 巻 117
2. 論文標題 Predictors of complications in heat-treated autograft reconstruction after intercalary resection for malignant musculoskeletal tumors of the extremity	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Surgical Oncology	6. 最初と最後の頁 1469 ~ 1478
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jso.25028	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Urakawa H, Ando Y, Hase T, Kikumori T, Arai E, Maeda O, Mitsuma A, Sugishita M, Shimokata T, Ikuta K, Ishiguro N, Nishida Y
2. 発表標題 Clinical value of serum bone resorption markers for predicting clinical outcomes after use of bone modifying agents in metastatic bone tumors: a prospective cohort study.
3. 学会等名 Orthopaedic Research Society 2020 Annual Meeting
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 浦川 浩, 西田佳弘, 新井英介, 前田 修, 満間綾子, 杉下美保子, 生田国大, 大田剛広, 酒井智久, 安藤雄一, 石黒直樹
2. 発表標題 転移性骨腫瘍に対する骨修飾薬治療の予後予測マーカーの検討
3. 学会等名 第92回日本整形外科学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 浦川 浩, 西田佳弘, 満間綾子, 前田 修, 杉下美保子, 下方智也, 水谷武史, 新井英介, 生田国大, 濱田俊介, 大田剛広, 石黒直樹, 安藤雄一
2. 発表標題 進行期骨原発肉腫に対する外来化学療法
3. 学会等名 第16回日本臨床腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 浦川 浩, 西田佳弘, 新井英介, 前田 修, 満間綾子, 杉下美保子, 生田国大, 大田剛広, 酒井智久, 安藤雄一, 石黒直樹
2. 発表標題 骨転移患者における骨修飾薬投与前後の疼痛に影響する因子の検討
3. 学会等名 第51回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 浦川 浩, 新井英介, 生田国大, 濱田俊介, 大田剛広, 石黒直樹, 西田佳弘
2. 発表標題 AYA世代高悪性度骨肉腫患者における受診の遅れと予後の検討
3. 学会等名 第51回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 浦川 浩, 西田佳弘, 新井英介, 前田 修, 満間綾子, 杉下美保子, 生田国大, 濱田俊介, 大田剛広, 安藤雄一, 石黒直樹
2. 発表標題 骨代謝マーカーによる転移性骨腫瘍に対する骨修飾薬の効果予測
3. 学会等名 第91回日本整形外科学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 浦川 浩, 新井英介, 生田国大, 濱田俊介, 石黒直樹, 西田佳弘
2. 発表標題 術後甲状腺転移で再発した粘液型脂肪肉腫の一例
3. 学会等名 第128回中部日本整形外科災害外科学会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	新井 英介 (Arai Eisuke) (40612841)	名古屋大学・医学部附属病院・病院助教 (13901)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	生田 国大 (Ikuta Kunihiro) (40732657)	名古屋大学・医学部附属病院・病院助教 (13901)	
研究分担者	西田 佳弘 (Nishida Yoshihiro) (50332698)	名古屋大学・医学部附属病院・病院教授 (13901)	
研究分担者	濱田 俊介 (Hamada Shunsuke) (90747289)	名古屋大学・医学部附属病院・医員 (13901)	
研究分担者	大田 剛広 (Ota Takehiro) (30801451)	名古屋大学・医学部附属病院・医員 (13901)	
研究分担者	酒井 智久 (Sakai Tomohisa) (40821971)	名古屋大学・医学部附属病院・医員 (13901)	