

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：87102

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K16802

研究課題名（和文）悪性骨軟部腫瘍における自然免疫賦活化による抗腫瘍効果の検討

研究課題名（英文）Investigation of Antitumor Effects through Natural Immune Activation in Malignant Bone and Soft Tissue Tumors

研究代表者

薛 宇孝（Setsu, Nokitaka）

独立行政法人国立病院機構（九州がんセンター臨床研究センター）・その他部局等・整形外科医長

研究者番号：40727020

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：TLR4が正常に機能している野生型（C3H/HeN）マウスと、TLR4の機能喪失型変異を持つTLR4欠失型（C3H/HeJ）マウスを用いてマウス由来の骨肉腫細胞株であるLM8を移植する実験系においてTLR4の活性化状態、リポ多糖（LPS）による自然免疫活性化を検討した。野生型マウスでは欠失型マウスと比較して腫瘍増殖が遅い傾向にありこの差異はLPS投与によりより顕著となった。この抑制効果はCD8陽性細胞を介していること、またヒトにおいても骨肉腫患者の切除検体においてもCD8浸潤と予後には相関が認められることを見出し、骨肉腫に対して自然免疫賦活による治療効果の可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

悪性骨軟部腫瘍全般において全身治療の効果が乏しく治療の選択肢が少ない状況は免疫チェックポイント阻害剤の選択肢が生まれた近年でも大きく変化していない。自然免疫の活性化が腫瘍抑制につながることを証明することにより、腫瘍の組織型や抗原性によらない免疫療法の選択肢が増えることになる。抗がん剤の選択肢も含めて治療選択肢が限られている悪性骨軟部腫瘍において新たな選択肢を提示するとともに腸内細菌叢などの宿主側の予後因子あるいは治療効果因子を探索する動機付けとなることが期待される。

研究成果の概要（英文）：In this experimental system using a mouse-derived osteosarcoma cell line (LM8), we examined the activation state of Toll-like receptor 4 (TLR4) and the activation of innate immunity by lipopolysaccharide (LPS) using wild-type (C3H/HeN) mice with normal TLR4 function and TLR4-deficient (C3H/HeJ) mice with impaired TLR4 function. Even in the absence of LPS stimulation, wild-type mice showed a tendency of slower tumor growth compared to the deficient mice. This difference became more pronounced with LPS administration, indicating that activation of innate immunity exerted inhibitory effects on the tumor. It was found that this inhibitory effect was mediated by CD8-positive cells, and in human samples of osteosarcoma resected from patients, a correlation was observed between CD8 infiltration and prognosis. These findings suggest the potential therapeutic effects of immune activation through natural immunity in the treatment of osteosarcoma.

研究分野：骨軟部腫瘍

キーワード：骨軟部腫瘍 肉腫 免疫 骨肉腫 TLR4

1. 研究開始当初の背景

肉腫は希少がんであり癌種と比較して発生メカニズムや治療方法の研究が遅れている。進行例の軟部肉腫に対しては近年バゾパニブなどいくつかの新規薬剤が適応となったが治療効果は限られており事実上は緩和的化学療法の位置づけとなっている。さらなる治療成績の向上のため新規治療の開発が求められている。

近年、がんに対する新規治療としてがん免疫治療が脚光を浴びており、すでに悪性黒色腫や肺がん等で適応となっている免疫チェックポイント阻害薬などが代表的な薬剤である。しかし肉腫におけるいくつかの前臨床試験では、他の癌種で一定の効果を示している免疫療法も含め奏効率は不十分であり、治療の適応やプロトコルの詳細な研究が必要と考えられているがその免疫治療の一つとして自然免疫による抗腫瘍効果にも注目が集まってきている。自然免疫を司る代表的な分子である TLR4 は細菌由来のリポ多糖(LPS)をリガンドとし自然免疫を活性化させる。宿主免疫を抑制することで成長および転移を続けるがんに対して TLR4 による自然免疫の活性化が抑制効果を担っている可能性がある。また最近の研究で放射線や抗がん剤も TLR4 を始めとする宿主免疫を介した抗腫瘍効果を発揮することが分かってきており、肉腫における TLR4 の働きを解明することは既存治療との併用療法など新規治療プロトコルの開発へと繋がる可能性がある。

2. 研究の目的

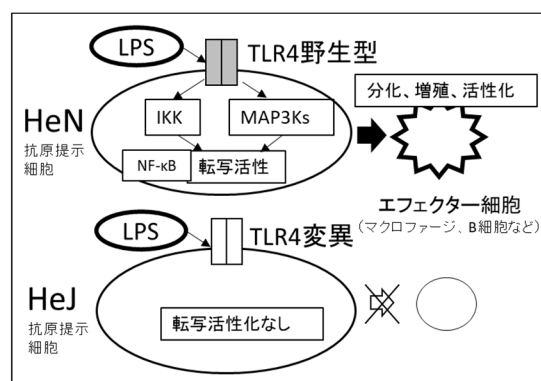
宿主の免疫の影響を評価可能な syngenic マウス骨肉腫モデルを用いて、LPS などの TLR4 アゴニストによる TLR4 刺激を介した自然免疫の活性化による腫瘍抑制効果を示す。その機序の解析のため、腫瘍に浸潤しているエフェクター免疫細胞を同定する。

3. 研究の方法

①自然免疫が肉腫に与える影響についての検討

(a) 骨肉腫 syngenic マウスモデルにおける TLR4 を介した自然免疫の影響

自然免疫に重要な役割を果たす TLR4 が正常に機能している C3H/HeN マウスと、TLR4 の機能喪失型変異を持つ C3H/HeJ マウスに対し syngenic な骨肉腫細胞株である LM8 を移植し、自然免疫が骨肉腫に与える影響について検討した(右図)。LM8 細胞株は皮下移植後ほぼ 100%肺転移を起こすことから、転移病変への影響も検討可能である。HeN マウスと HeJ マウスに LM8 を皮下移植した後、TLR4 リガンドである Lipopolysaccharide (LPS)を投与し、生存期間および経時的な腫瘍サイズについて組織学的に評価した。また浸潤している免疫細胞についても組織学的評価を行った。



LM8 細胞株は皮下移植後ほぼ 100%肺転移を起こすことから、転移病変への影響も検討可能である。HeN マウスと HeJ マウスに LM8 を皮下移植した後、TLR4 リガンドである Lipopolysaccharide (LPS)を投与し、生存期間および経時的な腫瘍サイズについて組織学的に評価した。また浸潤している免疫細胞についても組織学的評価を行った。

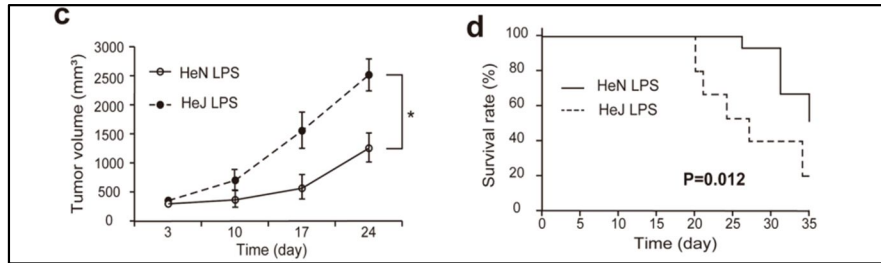
(b) 免疫エフェクター細胞の同定

腫瘍内に浸潤している免疫細胞のうち CD8 陽性 T 細胞を同定し、MACS を用いて腫瘍内免疫細胞を抽出し、HeN マウスと HeJ マウス間での免疫細胞の遺伝子や表面抗原などの発現の差異について PCR やフローサイトメトリーを用いて評価した。また抗体による免疫細胞の in vivo depletion を行い、エフェクターとしての機能を確認した。

4. 研究成果

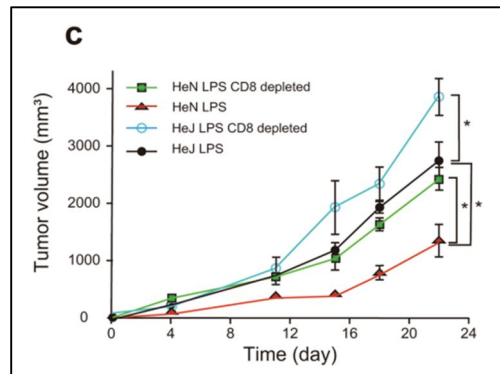
興味深いことに、LPS 刺激の無い状態においても野生型マウスでは欠失型マウスと比較して腫瘍増殖が遅い傾向にあった。この差異は LPS 投与によりより顕著となり、野生型マウスは LPS 投与により腫瘍増殖が

有意に抑制されたのにくらべ欠失型では LPS の投与による腫瘍増殖抑制効果は見られなかった。(右図、



Yahiro, Cancer Immunol Immunother. 2020 より一部抜粋) この腫瘍増殖抑制効果の機序の解析のため、腫瘍に浸潤している免疫細胞の差異について評価を行った。まずマクロファージに着目したものの野生型マウスと欠失型マウス、および LPS

刺激の有無で変化が認められなかった。一方で CD8 陽性 T 細胞は LPS 刺激により腫瘍組織内に浸潤する細胞数の増加が認められた。CD8 陽性細胞について in vivo depletion を行い、エフェクターとしての機能を確認することができた(右図、同上、一部抜粋)。また骨肉腫患者の切除検体においても CD8 浸潤と予後には相関が認められこの結果を



論文として発表した。(Cancer Immunol Immunother. 2020;69(5):745-758)

これ以外にも腫瘍免疫に関連する研究を併行して行った。免疫チェックポイントと呼ばれ免疫応答を抑制する分子の一つに PD-L1 があり、腫瘍細胞に発現することで免疫からの回避に関わっている。悪性骨軟部腫瘍の中でも PD-L1 の発現が高く免疫チェックポイント阻害薬の効果が期待されているものに「未分化多型肉腫」という腫瘍が存在する。この未分化多型肉腫において PDL1 の調節因子である CKLF-like MARVEL transmembrane domain containing 6 (CMTM6)が高発現している群が存在し、これらは PD-L1 発現を伴い予後不良であることを示し論文として発表した(J Cancer Res Clin Oncol. 2021 Jul;147(7):2003-2011)。末梢血から簡便に測定できる免疫マーカーとして好中球リンパ球比(NLR)、血小板リンパ球比(PLR)などが報告されており腫瘍免疫の状態を反映していると解釈されている。悪性軟部腫瘍においても NLR,PLR が低く腫瘍免疫が活性化していると思われる例の予後が良好であることが示されている。これらのマーカーが治療選択の補助になる可能性について探索した。進行期の悪性軟部腫瘍において標準的な二次治療は確立されておらずエリブリン、トラベクテジン、パゾパニブの 3 剤が主に選択されるがその選択に当たっての明確な根拠はない。我々の検討では PLR が低い症例でエリブリンを選択した群が全生存率において予後良好であった。エリブリンは腫瘍の微小環境を調節し後治療の効果を高め全生存期間を延長する作用も有すると考えられており、免疫応答が保持されている症例ではその効果が特に期待されることが示唆された(J Clin Med. 2021 Oct 26;10(21):4972)。さらに抗腫瘍効果に寄与するマクロファージに対して抑制的に働く SIRPα の発現に注目していくつかの腫瘍で解析を行った。未分化多型肉腫においては SIRPα の発現が 予後不良因子であり T cell immunoreceptor with immunoglobulin and immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif domains (TIGIT)の関与が疑われることを見出し論文として発表した。(J Cancer Res Clin Oncol. 2023 Jun;149(6)

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 0件）

1. 著者名 Ishihara Shin, Iwasaki Takeshi, Kohashi Kenichi, Kawaguchi Kengo, Toda Yu, Fujiwara Toshifumi, Setsu Nokitaka, Endo Makoto, Matsumoto Yoshihiro, Nakashima Yasuharu, Oda Yoshinao	4. 巻 149
2. 論文標題 Clinical significance of signal regulatory protein alpha and T cell immunoreceptor with immunoglobulin and immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif domain expression in undifferentiated pleomorphic sarcoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Cancer Research and Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 2425 ~ 2436
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00432-022-04078-y	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 Shimada Eijiro, Endo Makoto, Matsumoto Yoshihiro, Tsuchihashi Kenji, Ito Mamoru, Kusaba Hitoshi, Nabeshima Akira, Nawata Tomoya, Maekawa Akira, Matsunobu Tomoya, Setsu Nokitaka, Fujiwara Toshifumi, Iida Keiichiro, et al.	4. 巻 10
2. 論文標題 Does the Use of Peripheral Immune-Related Markers Indicate Whether to Administer Pazopanib, Trabectedin, or Eribulin to Advanced Soft Tissue Sarcoma Patients?	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Medicine	6. 最初と最後の頁 4972 ~ 4972
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jcm10214972	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 Ishihara Shin, Iwasaki Takeshi, Kohashi Kenichi, Yamada Yuichi, Toda Yu, Ito Yoshihiro, Susuki Yousuke, Kawaguchi Kengo, Takamatsu Dai, Kawatoko Shinichiro, Kiyozawa Daisuke, Mori Taro, Kinoshita Izumi, Yamamoto Hidetaka, Fujiwara Toshifumi, Setsu Nokitaka, et al.	4. 巻 147
2. 論文標題 The association between the expression of PD-L1 and CMTM6 in undifferentiated pleomorphic sarcoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Cancer Research and Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 2003 ~ 2011
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00432-021-03616-4	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 Yahiro Kenichiro, Matsumoto Yoshihiro, Yamada Hisakata, Endo Makoto, Setsu Nokitaka, Fujiwara Toshifumi, Nakagawa Makoto, Kimura Atsushi, Shimada Eijiro, Okada Seiji, Oda Yoshinao, Nakashima Yasuharu	4. 巻 69
2. 論文標題 Activation of TLR4 signaling inhibits progression of osteosarcoma by stimulating CD8-positive cytotoxic lymphocytes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Immunology, Immunotherapy	6. 最初と最後の頁 745 ~ 758
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00262-020-02508-9	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4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 戸田 雄, 孝橋 賢一, 山元 英崇, 石原 新, 伊東 良広, 薄 陽祐, 川口 健悟, 山田 裕一, 藤原 稔史, 薛 宇孝, 遠藤 誠, 松本 嘉寛, 中島 康晴, 馬渡 正明, 小田 義直
2. 発表標題 骨巨細胞腫における免疫微小環境の検討 デノスマブ前後で主にPD-L1とSIRP の発現に着目して
3. 学会等名 第55回日本整形外科学会 骨・軟部腫瘍学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 横山 信彦, 薛 宇孝, 吉本 昌人
2. 発表標題 骨・軟部肉腫における治療前好中球/リンパ球比(NLR)の予後予測因子としての有用性と治療後変化に関する検討
3. 学会等名 第55回日本整形外科学会 骨・軟部腫瘍学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 島田 英二郎, 松本 嘉寛, 花田 麻須大, 遠藤 誠, 薛 宇孝, 藤原 稔史, 飯田 圭一郎, 松延 知哉, 前川 啓, 鍋島 央, 中川 亮, 木村 敦, 廣瀬 毅, 金堀 将也, 中島 康晴
2. 発表標題 進行軟部肉腫に対する新規治療薬選択における末梢血免疫関連マーカーの有用性
3. 学会等名 第54回日本整形外科学会 骨・軟部腫瘍学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 八尋 健一郎, 松本 嘉寛, 山田 久方, 遠藤 誠, 薛 宇孝, 木村 敦, 島田 英二郎, 廣瀬 毅, 小田 義直, 中島 康晴
2. 発表標題 骨肉腫患者において肺転移巣のCD8+T細胞浸潤と予後は相関する
3. 学会等名 第53回 日本整形外科学会 骨・軟部腫瘍学術集会
4. 発表年 2020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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関