

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：13401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17994

研究課題名(和文)肉腫に対する温熱化学療法後の腫瘍内免疫環境の解析

研究課題名(英文)Analysis of the immune environment in tumors after hyperthermic chemotherapy for sarcoma

研究代表者

出淵 雄哉 (Izubuchi, Yuya)

福井大学・学術研究院医学系部門・特別研究員

研究者番号：20795041

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：マウス骨肉腫細胞株を用いて免疫チェックポイント阻害剤である抗PD-1抗体と温熱療法の単独療法および併用療法の治療効果およびメカニズムの解析を行った。抗PD-1抗体および温熱療法の併用療法では単独療法と比べて治療効果が増強を示した。併用療法では腫瘍内免疫担当細胞(CD4陽性T細胞およびCD8陽性T細胞)の増加を認めた。また骨肉腫細胞株は免疫チェックポイント分子であるPD-L1の発現が乏しいが、温熱刺激を行うことでPD-L1の発現が増加することをウエスタンブロッティング法やリアルタイムPCR、免疫組織学的評価を行い、*in vitro*および*in vivo*にて確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨肉腫に対する免疫チェックポイント阻害剤の治療は効果が低いと報告されている。今回の研究では、温熱療法を併用することで骨肉腫に対する免疫チェックポイント阻害剤の治療効果が増強される可能性が示唆された。また骨肉腫は希少癌という特性もあり新規薬剤や治療法の開発が進みにくい現状があり、今回の免疫チェックポイント阻害剤と温熱療法の併用は骨肉腫の今後の新しい治療法になる可能性があると考えられる。またPD-L1発現増加や腫瘍内免疫担当細胞が増加していることは、温熱療法の治療メカニズムと推測され、今後の研究・解析が期待される。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the therapeutic effects and mechanisms of monotherapy and combination therapy with an immune checkpoint inhibitor, anti-PD-1 antibody, and hyperthermia using a mouse osteosarcoma cell line. Combination therapy with anti-PD-1 antibody and hyperthermia showed enhanced therapeutic efficacy compared to monotherapy. Combination therapy increased the number of intratumoral immunocompetent cells (CD4-positive T cells and CD8-positive T cells). Osteosarcoma cell line (LM8) has poor expression of PD-L1, an immune checkpoint molecule, but we confirmed *in vitro* and *in vivo* by Western blotting, real-time PCR, and immunohistological evaluation that PD-L1 expression is increased by thermal stimulation.

研究分野：肉腫

キーワード：骨肉腫 免疫チェックポイント阻害剤 温熱療法

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

肉腫の治療成績は、集学的治療の進歩により向上しつつあるが、遠隔転移を来し予後不良の経過をとる場合もある。希少癌という特性もあり、新規薬剤や治療法の開発・応用は進みにくい現状がある。

近年、進行した大腸癌や子宮癌においては、温熱化学療法により、腫瘍細胞がアポトーシスに陥ることが示されており、既に臨床応用されるに至っている。一方、肉腫においても、温熱化学療法の基礎的・臨床的な報告が散見されるが、その有効性については不明な点が多い。また、がんに対する免疫チェックポイント阻害薬の有効性が注目されているが、肉腫に対する効果は極めて限定的である。そこで免疫チェックポイント阻害剤を併用した温熱療法の抗腫瘍効果と腫瘍内免疫環境の変化との関係を解析した。

### 2. 研究の目的

骨肉腫に対する免疫チェックポイント阻害剤(抗 PD1 抗体)と温熱療法の単独療法の効果および併用療法の効果を検討する。また抗腫瘍効果のメカニズムを解析することで、骨肉腫の新たな治療法の開発につなげることを目的とした。

### 3. 研究の方法

- (1) C3H/He マウス由来の骨肉腫高 肺転移細胞株 : LM8 を研究に用い、免疫チェックポイント阻害剤の投与方法(投与経路、投与時期、投与量など)や温熱療法の方法(温度、治療方法など)を小スケールの予備実験で検証し、再現性のある研究ができる治療プロトコルを確立した。その後、LM8 移植マウスに温熱化学療法を行い、造腫瘍性の変化を腫瘍のサイズを計測することで経時的に観察した。マウスの死後摘出した腫瘍組織は病理組織学的に検討した。またマウスの生存率の改善を検討するために、生存率を Kaplan-Meier 法で検討した。肺転移の評価を病理組織学的に行った。
- (2) 骨肉腫細胞 LM8 への温熱刺激の影響を検討するために、温熱刺激の有無での細胞増殖数を比較した。また温熱刺激が免疫チェックポイント分子である PD-L1 の発現に影響するかどうかを評価するために、ウエスタンブロッティング法で PD-L1 の発現を検討した。さらに PD-L1 の発現への影響も解析するために、経時的に PD-L1 の発現量が変化するかどうか、ウエスタンブロッティング法やリアルタイム PCR 法にて解析を行った。
- (3) PD-L1 の発現や免疫担当細胞である CD4 陽性 T 細胞や CD8 陽性 T 細胞の浸潤について免疫組織学的にマウス腫瘍組織を用いて評価した。マウスの各治療後の腫瘍組織を用いて、PD-L1 の発現量をウエスタンブロッティング法にて比較した。

### 4. 研究成果

- (1) 骨肉腫罹患マウスを無治療群、免疫チェックポイント阻害薬単独群、温熱療法単独群、免疫チェックポイント阻害薬と温熱療法の併用群の 4 群にわけて生存率、局所腫瘍増大抑制効果、遠隔転移(肺転移)の評価を行った。併用療法群は他 3 群とくらべて有意な生存期間の延長を認めた。温熱療法単独群および併用療法群で腫瘍増大抑制効果を認め、免疫チェックポイント阻害薬および併用療法群で肺転移抑制効果を認めた。併用療法は局所腫瘍効果および遠隔転移に対しても効果があり、温熱療法は免疫チェックポイント阻害薬の効果増強作用がある可能性が示唆された。
- (2) 温熱刺激を加えた場合、LM8 の増殖は温熱刺激の無い場合とくらべて増殖が抑制されていた。しかし完全に細胞が死滅するわけではなく mild な細胞増殖抑制効果を示した。LM8 には温熱刺激の無い状態でも PD-L1 分子は発現していたが、温熱刺激を加えたあと経時的に PD-L1 の発現量が増大していた。
- (3) 温熱療法を行っていないマウス腫瘍組織には免疫組織学的に PD-L1 の発現は認めなかったが、温熱療法後の腫瘍組織には PD-L1 の発現を認めた。また各治療における PD-L1 分子の発

現をウエスタンブロッティング法で比較した場合、併用療法群では他の群と比べ PD-L1 の発現が増加していた。免疫組織学的評価にて、併用療法群では他の治療群と比べて原発腫瘍において CD4 陽性 T 細胞や CD8 陽性 T 細胞の増加が見られた。

以上の結果から骨肉腫に対する免疫チェックポイント阻害薬（抗 PD-1 抗体）と温熱療法の併用療法は単独療法と比べ治療効果が高く、新規治療法となる可能性を示した。また温熱療法によって免疫チェックポイント分子である PD-L1 の発現を増加させたり、免疫担当細胞浸潤を増加させることが、免疫チェックポイント阻害薬の効果を増強させるメカニズムの 1 つだと推測される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 出淵 雄哉
2. 発表標題 Combination therapy with local hyperthermia and immune checkpoint inhibitor for osteosarcoma in mice
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
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
---------	---------