

令和 6 年 5 月 16 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09325

研究課題名(和文) 免疫回避の阻害と自然免疫活性化を併用した、新しい骨肉腫肺転移治療法の開発

研究課題名(英文) Development of a new treatment for pulmonary metastasis of osteosarcoma using a combination of inhibition of immune evasion and activation of innate immunity

研究代表者

松本 嘉寛 (Matsumoto, Yoshihiro)

福島県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：10346794

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：悪性骨軟部腫瘍の予後を規定する最大の因子は肺転移であり、転移症例の予後は不良である。予後改善のため、腫瘍免疫療法の応用が試みられているが、免疫療法の効果は乏しく、骨軟部腫瘍が何らかの免疫回避機構を持つことが予想された。本課題では、悪性軟部腫瘍での原発巣と肺転移巣の免疫プロファイルの違いを検討した。その結果、平滑筋肉腫においては、転移巣ではEPCAMの発現が有意に上昇し、CD8+ T細胞の腫瘍への集積を阻害することで、免疫逃避に関与していると推定された。そのため、EPCAMの発現や機能を阻害する事でCD8+T細胞の腫瘍浸潤が回復し、転移性平滑筋肉腫予後が改善する可能性がある事が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

悪性骨軟部腫瘍の予後を規定する最大の因子は肺転移である。今回の研究により、悪性軟部腫瘍が原発巣から肺転移を来す際に、腫瘍の免疫プロファイルがどのように変化するかの詳細が明らかとなった。さらに、平滑筋肉腫における免疫逃避機構の一旦も解明した。同様の手法は他の悪性軟部腫瘍に関しても応用可能である。そのため本研究は、悪性軟部腫瘍の肺転移に対する腫瘍免疫療法の確立、ひいては予後の改善に重要であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Pulmonary metastasis is the greatest factor defining the prognosis of malignant bone and soft tissue tumors, and the prognosis of metastatic cases is poor. Tumor immunotherapy has been attempted to improve prognosis, but immunotherapy has been less effective, and it was expected that bone and soft tissue tumors have some immune evasion mechanism. In this project, we investigated the differences in immune profiles between primary tumors and pulmonary metastases in malignant soft tissue tumors. As a result, it was inferred that in leiomyosarcoma, EPCAM expression was significantly upregulated in metastases, and that it was involved in immune escape by inhibiting CD8+ T cell accumulation in the tumor. Therefore, it was suggested that inhibition of EPCAM expression and function may restore tumor infiltration of CD8+ T cells and improve the prognosis of metastatic leiomyosarcoma.

研究分野：整形外科 骨軟部腫瘍

キーワード：骨軟部腫瘍 腫瘍免疫 免疫逃避 EPCAM 細胞障害性T細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

2017年に施行された、第3期がん対策基本法では、希少がん治療の重要性が謳われている。骨肉腫や軟部肉腫(Soft tissue sarcoma: STS)を含む悪性骨軟部腫瘍は、代表的な希少がんである。手術手技の改善や、全身化学療法 of 進歩などにより悪性骨軟部腫瘍の治療成績は改善しているが、肺転移を中心とする遠隔転移を来した進行例での予後は未だに不良であり、新規治療法の開発が望まれている。

近年、手術、薬物、放射線治療に加え、腫瘍免疫療法が第4の治療法として脚光を浴びており、代表的な腫瘍免疫療法として免疫チェックポイント阻害薬があり、肺がんや胃がんなどへの優れた効果が確認されている。しかしながら、免疫チェックポイント阻害薬のSTSに対する有効性は、一般的に乏しいことが、いくつかの臨床試験で示されている。

このことから、悪性骨軟部腫瘍においては、何らかの免疫回避機構、すなわち腫瘍細胞が、自身の性質を変化させ、生体の免疫システムから逸脱させ転移を成立させている可能性がある。しかしながら、STSにおける免疫回避機構に関する解析は、ほとんどなされていない。

## 2. 研究の目的

本課題においては、STSにおける原発巣と転移巣における免疫環境の違いを検討し、STSの免疫回避機構を解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

上記の目的達成のため、悪性骨軟部腫瘍症例の臨床情報、腫瘍組織の組織学的解析、nCounter法およびバイオインフォマティクの手法を用いた網羅的遺伝子解析を行った。さらに、腫瘍細胞株を用いて分子細胞生物学的解析を行った。また、得られた結果に対する、統計学的解析も行った。

## 4. 研究成果

### (1) STSの原発巣と肺転移巣の免疫プロファイルの違いに関する組織学的検討

STS症例の原発巣と肺転移巣における、腫瘍組織浸潤リンパ球を評価し、その特徴や臨床成績との相関を解析した。肺転移巣の切除を行われたSTS患者43例(平滑筋肉腫12例、未分化多型肉腫9例、滑膜肉腫6例、悪性末梢神経鞘種4例、脂肪肉腫4例、孤立性線維性腫瘍3

例，粘液線維肉腫3例，胞巣状軟部肉腫2例)を対象とした。

原発巣の生検または外科的切除標本および肺転移巣の外科的切除標本を用いて，CD4，CD8，FoxP3，CD20，CD56，CD68，CD163，PD-1，PD-L1に対する免疫組織化学的染色を行った。評価は，異なる5視野(400倍)での陽性細胞数を合計する事で行った。低浸潤群と高浸潤群で，overall survival (OS)の比較検討も行った。

原発巣ではCD8陽性T細胞が多く(32.4 vs 22.6,  $p=0.02$ )，肺転移巣では制御性T細胞のマーカーであるFoxP3陽性細胞(23.4 vs 14.3,  $p=0.002$ )，腫瘍随伴マクロファージのマーカーであるCD68(32.6 vs 22.4,  $p=0.02$ )，CD163(20.5 vs 13.0,  $p=0.02$ )陽性細胞，PD-L1(19.4 vs 15.0,  $p=0.02$ )陽性細胞が多かった。Pleomorphic sarcomaとTranslocation-associated sarcomaの比較では，CD8陽性T細胞のみ前者で有意に多かった(30.6 vs 20.8,  $p=0.03$ )。OSの中央値の比較では，いずれの分子でも低浸潤群と高浸潤群の間で有意な差はなかった。さらに、平滑筋肉腫において、肺転移では原発と比較してCD8陽性T細胞の浸潤が著明に低下していた。

## (2) STSの原発巣と肺転移巣の免疫プロファイルの違いに関する網羅的遺伝子解析

引き続き、LMSの肺転移でCD8陽性T細胞の浸潤が減少するメカニズムを解明するため，原発と肺転移のFFPE切片からtRNAを採取、nCounter法にて網羅的遺伝子発現解析を行った。その結果、原発巣と比較して肺転移で発現が上昇している遺伝子としてC4BPA，CEACAM6，EPCAM，LAMP3，DMBT1，MUC1の6つが同定された。また、発現量と浸潤CD8陽性T細胞数との相関解析の結果，最も相関が強い遺伝子はEPCAMであった( $p=0.050$ )。

## (3) 平滑筋肉腫の免疫逃避機構の細胞生物学的解析

平滑筋肉腫細胞株を用いて，EPCAMがCD8+ T細胞の遊走に及ぼす影響を検討した。平滑筋肉腫細胞株にてEPCAMの発現を阻害した後に培養上清を採取し、培養上清によるCD8陽性T細胞の遊走刺激作用をtranswell assayで評価した。その結果、EPCAMの発現阻害に伴い、培養上清によりCD8陽性T細胞の遊走が促進された。また同様の効果は、EPCAMの機能をTACE阻害薬と $\alpha$ -セクターゼ阻害薬などの薬剤で阻害することでも得られた。これらの結果から、平滑筋肉腫細胞は肺転移に際してEPCAMを発現し、CD8陽性T細胞の腫瘍内への浸潤を阻害していると予測された。

## (4) EPCAMによる平滑筋肉腫の免疫逃避機構の解明

次に、培養上清中のCD8陽性T細胞の遊走を促進するケモカイン含有量を計測した。しかし、CCL5、CXCL9,10,11などのケモカインの上昇は見られなかった。そのため、EPCAMの発現阻害によって変化する遺伝子群をmRNA-seqを用いて解析した。2種類の平滑筋肉腫細胞株を用いて検討した結果、EPCAMの発現阻害に伴い、SNAP25が共通して上昇することが確認された。

さらに、平滑筋肉腫細胞株において、EPCAMとSNAP25を同時に阻害することで、EPCAM単独の発現阻害により観察されたCD8陽性T細胞の遊走性の亢進がキャンセルされることが確認された。

#### (5)研究成果の臨床的意義

上記の結果から、平滑筋肉腫は肺転移の過程においてCD8陽性T細胞の腫瘍内浸潤を抑制することで、免疫から逃避していること、そのメカニズムの一つはEPCAMの発現上昇、引き続くSNAP25の発現抑制によるCD8陽性T細胞の遊走能の阻害である事が明らかとなった。よって、EPCAMの阻害と、免疫チェックポイント阻害剤などを併用することで、平滑筋肉腫の肺転移が制御できる可能性があり、今後さらに検討を続ける予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 8件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kimura Atsushi, Toda Yu, Matsumoto Yoshihiro, Yamamoto Hidetaka, Yahiro Kenichiro, Shimada Eijiro, Kanahori Masaya, Oyama Ryunosuke, Fukushima Suguru, Nakagawa Makoto, Setsu Nokitaka, Endo Makoto, Fujiwara Toshifumi, Matsunobu Tomoya, Oda Yoshinao, Nakashima Yasuharu	4. 巻 12
2. 論文標題 Nuclear -catenin translocation plays a key role in osteoblast differentiation of giant cell tumor of bone	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 13438
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-17728-5	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 Ishihara Shin, Iwasaki Takeshi, Kohashi Kenichi, Kawaguchi Kengo, Toda Yu, Fujiwara Toshifumi, Setsu Nokitaka, Endo Makoto, Matsumoto Yoshihiro, Nakashima Yasuharu, Oda Yoshinao	4. 巻 1
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 1
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 Oda Yoshinao, Matsumoto Yoshihiro, Kawai Akir et al	4. 巻 22
2. 論文標題 Standardization of evaluation method and prognostic significance of histological response to preoperative chemotherapy in high-grade non-round cell soft tissue sarcomas	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BMC Cancer	6. 最初と最後の頁 35062915
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12885-022-09195-y	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 Shimada Eijiro, Matsumoto Yoshihiro, Nakagawa Makoto, Susuki Yosuke, Endo Makoto, Setsu Nokitaka, Fujiwara Toshifumi, Iida Keiichiro, Nabeshima Akira, Yahiro Kenichiro, Kimura Atsushi, Hirose Takeshi, Kanahori Masaya, Oyama Ryunosuke, Oda Yoshinao, Nakashima Yasuharu	4. 巻 126
2. 論文標題 Methylation-mediated silencing of protein kinase C zeta induces apoptosis avoidance through ATM/CHK2 inactivation in dedifferentiated chondrosarcoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 British Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 1289 ~ 1300
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41416-021-01695-1	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 Oda Yoshinao, Tanaka Kazuhiro, Matsumoto Yoshihiro, et al	4. 巻 22
2. 論文標題 Standardization of evaluation method and prognostic significance of histological response to preoperative chemotherapy in high-grade non-round cell soft tissue sarcomas	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BMC Cancer	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12885-022-09195-y	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 Ishihara Shin, Yamamoto Hidetaka, Iwasaki Takeshi, Toda Yu, Yamamoto Takeo, Yoshimoto Masato, Ito Yoshihiro, Susuki Yousuke, Kawaguchi Kengo, Kinoshita Izumi, Yamada Yuichi, Kohashi Kenichi, Fujiwara Toshifumi, Setsu Nokitaka, Endo Makoto, Matsumoto Yoshihiro, Kakuda Yuko, Nakashima Yasuharu, Oda Yoshinao	4. 巻 -
2. 論文標題 Histological and immunohistochemical features and genetic alterations in the malignant progression of giant cell tumor of bone: a possible association with TP53 mutation and loss of H3K27 trimethylation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Modern Pathology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41379-021-00972-x	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, 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 Toda Yu, Matsumoto Yoshihiro, Nakashima Yasuharu, Mawatari Masaaki, Oda Yoshinao, et al	4. 巻 11
2. 論文標題 Tumor microenvironment in giant cell tumor of bone: evaluation of PD-L1 expression and SIRP infiltration after denosumab treatment	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-94022-w	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 Kanahori Masaya, Shimada Eijiro, Matsumoto Yoshihiro, Endo Makoto, Fujiwara Toshifumi, Nabeshima Akira, Hirose Takeshi, Kawaguchi Kengo, Oyama Ryunosuke, Oda Yoshinao, Nakashima Yasuharu	4. 巻 130
2. 論文標題 Immune evasion in lung metastasis of leiomyosarcoma: upregulation of EPCAM inhibits CD8+ T cell infiltration	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 British Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 1083 ~ 1095
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41416-024-02576-z	査読の有無 無
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 Takeuchi Ryouhei, Tarukado Kiyoshi, Matsumoto Yoshihiro, Iida Kei-ichiro, Kobayakawa Kazu, Saiwai Hirokazu, Kawaguchi Kenichi, Nakashima Yasuharu	4. 巻 10
2. 論文標題 Development of a clinical prediction score for perioperative complications following metastatic spinal surgery (PERCOM) score	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 e25180 ~ e25180
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.heliyon.2024.e25180	査読の有無 無
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3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 金堀 将也, 松本 嘉寛, 遠藤 誠, 藤原 稔史, 飯田 圭一郎, 鍋島 央, 島田 英二郎, 廣瀬 毅, 大山 龍之介, 小田 義直, 中島 康晴
2. 発表標題 悪性軟部腫瘍の転移過程における腫瘍浸潤リンパ球プロファイルの変化
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 金堀 将也, 松本 嘉寛, 遠藤 誠, 藤原 稔史, 飯田 圭一郎, 鍋島 央, 島田 英二郎, 廣瀬 毅, 大山 龍之介, 小田 義直, 中島 康晴
2. 発表標題 平滑筋肉腫の肺転移における免疫逃避メカニズム EpCAM発現上昇によるCD8+T細胞遊走の阻害
3. 学会等名 日本整形外科学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 松本 嘉寛, 八尋 健一郎, 遠藤 誠, 石原 幹也, 藤原 稔史, 飯田 圭一郎, 鍋島 央, 影山 慎一, 中島 康晴
2. 発表標題 骨・軟部腫瘍における腫瘍免疫療法の可能性
3. 学会等名 日本整形外科学会
4. 発表年 2023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
---------	---------