

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591985

研究課題名(和文)凍結治療における抗腫瘍免疫賦活

研究課題名(英文)Cryo-therapy was indicated to induce tumor growth inhibition and immune reaction

研究代表者

長田 真二(OSADA, Shinji)

岐阜大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：80332683

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：マウス皮下に作成した腫瘍増殖(体積：mm³)は非治療群に対し凍結治療により2週間目で717.51に対し551.0、4週目で3147.1に対し2543.1と増殖を抑制することを確認しました。凍結治療による免疫学的機序の系時列的变化を観察する目的で、治療後0,6,12,24時間後の各マウス皮下腫瘍を採取し、腫瘍免疫に関わりの深いIL-2とTNF- α の発現をWestern Blottingにて確認しました。その結果、IL-2は1回目及び2回目治療後、TNF- α は初回治療時のみの、いずれも12時間後に発現することを確認しました。なお同反応は3回目以降の治療では認められませんでした。

研究成果の概要(英文)：In vivo experiments on mouse, the tumor growth was inhibited by cry-ablation treatment from 717.52 to 551.0 on two weeks and from 3147.1 to 2543.1 on four weeks, which compared to control with tumor size (mm³). To demonstrate the relation to immune reaction, IL-2 and TNF- α were evaluated. The expression of IL-2 in the tumor tissue was detected on 12hours after first and second treatment and TNF- α was appeared on 12 hours after first treatment. And the reaction was not shown after third treatment.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：肝癌 抗腫瘍免疫 凍結治療 サイトカイン 低侵襲治療 IL-2 TNF- α 免疫賦活

1. 研究開始当初の背景：当科における凍結療法は、外科的切除が不可能あるいは他治療を尽くした進行・再発肝癌を対象として開始した。当初は多発あるいは巨大ゆえ治療困難な肝腫瘍に、穿刺式凍結装置では一度に治療できる範囲は 3cm 程度であったので、週に一回のペースで少しずつ治療を継続した。その結果、門脈、動脈、胆管(閉塞性黄疸を合併)に直接浸潤する巨大胆管細胞癌症例にて8回の凍結治療により非治療部位を含めてほぼ完全に消失したり、胃癌再発例(肝・リンパ節・腹膜播種転移)では肝腫瘍に対する凍結処置により、(非治療部位の)大動脈前面リンパ節・播種巣も消失したという臨床的経験を得た。そこで凍結治療時の抗腫瘍免疫賦活に注目し、関連する血中因子を測定したところ(J Surg. Oncol, 95: 491-498, 2007、Hepatogastroenterol, 55: 231-234, 2008)全例で治療3回目以降に炎症反応の上昇があり、特に非治療部位にも効果のみられた症例は、治療部位の壊死のみに終始した例と比べ、治療回数に伴い血中 TNF- α が明らかに上昇すること、治療回数に伴い血中 Th1/Th2 比が明らかに上昇すること、が判明し、抗腫瘍免疫の関与が示唆するに至っている。
2. 研究の目的：これまでの臨床例では週に一度のペースで治療を継続してきたが、現実的にはおそらく症例毎で最適な間隔ないし凍結の程度などに相違があるものと考えている。そこで症例毎に治療体系を検討することを前提に、何を指標とするべきかを特定する必要があると考えてきた。この因子をモニタリングすることで、症例毎の最適な治療内容を模索することができることを前提に、これまで積み重ねてきた知識と経験を動物実験で再現し、最適な治療手段を確立することを目的としてこの度の研究を計画した。今回の研究は、サイトカインの変動の意義や治療効果への関連性に対する推察を、動物実験により証明し臨床面へ応用することで治療手段として確立するものであり、抗腫瘍免疫に関与すると考えられる他因子の解明のみならず、免疫賦活に必要な具体的な治療回数・頻度を特定し、最適な環境の設定を目指す。
3. 研究の方法：当科で確立している肝転移モデルでは、MC38 細胞 1×10^6 個をネブタール腹腔内麻酔下 BLB/c マウス(4-6 週齢)の脾臓内に注入すると2週間で脾臓はほぼ腫瘍により置き換わり、肝臓に 1-5 mm 程度の多発腫瘍が形成される。さらに同細胞を同数、肝臓内に直接注入すると、

2 週間で約 1cm 程度の単発腫瘍が形成される。いずれの場合でも、さらに2週間経過で全てのマウスは癌死する。そこで以下の手順にて研究を計画した。

凍結処理ペーストによる凍結治療モデルの作成

癌細胞注入により腫瘍に置き換わった脾臓を摘出して 2-4mm 片に細切後に液体窒素により凍結融解処理して組織癌ペーストを作成。肝転移モデルの肝臓に直接注入することでマウスにおける凍結治療モデルとする。臨床例に則り8回を1治療サイクルとし、以下の条件での抗腫瘍効果発現の程度を比較する。投与間隔として、臨床例と同様に1週間、および短期間で3日、長期間で2週間の投与間隔での相違を比較する。さらに投与量として組織癌ペーストを 5 μ l, 10 μ l, 20 μ l の各投与量で相違を観察することで、必要な凍結範囲を特定する。

血清因子の測定

マウスにおいて測定可能なサイトカインにつき測定することとした。具体的には IFN- γ /TNF- α (Th1系サイトカインで抗腫瘍免疫に関与)、IL-2 (腫瘍免疫賦活に関連するとの報告あり)、IL-4/IL-10 (Th2系サイトカインで炎症系免疫に関与)と IL-6 (CRP と同様に炎症時に上昇)である。臨床例では、3回目以降の治療翌日に Th1系サイトカインが明らかに上昇したことを確認。そこで組織癌ペースト注入後、超早期(1時間~6時間)、早期(24時間)及び中期(2-3日)に加え晚期(1週間、次の治療直前)のそれぞれの時期で適宜観察することとした。

組織標本での免疫染色

組織癌ペースト注入後の腫瘍あるいは注入周辺肝組織における以下の因子の発現を確認することとした。IL-2/TNF- α 、FADD/TRADD (TNF- α とそのリセプターに結合)および活性型 Caspase-3 (apoptosis の関与)である。

4. 研究成果：実際のマウス肝転移モデルでの評価は、治療効果の判定が大変煩雑であること(度重なる開腹のため致死状況に陥るマウスが多い)が判明した事を受け、二次的に皮下腫瘍モデルでの検討を進めることとし、若干の方針変更を要している。以下に研究成果を示す。

CT26 大腸癌細胞株をマウス皮下に注入して作成した皮下腫瘍モデルでは、CT26 細胞を凍結融解処理し完全に細胞が破壊することを確認した癌組織ペーストを、毎週腫瘍近傍に注入する群(凍結群: n=27)と、PBS を注入するコントロール群(非凍結群: n=28)で比較した。腫瘍体積(mm³)は、治療開始2週目の凍結群 551.0 ± 426.1 に対し、非凍結群が 717.5 ± 679.2 、4週目の凍結群

2543.1±2153.0 に対し、非凍結群が 3147.1 ± 2752.5 と明らかな治療効果の発現を確認いたしました。また各治療間隔における腫瘍体積の増加率の平均では、治療群が 3.35 倍であったのに対し、非治療群は 5.26 倍であった。

さらに腫瘍重量(g)を計測したところ、4 週目の凍結群 5.7±1.6 に対し、非凍結群が 6.7±2.1 と明らかな治療効果の発現を確認いたしました。また各治療間隔における腫瘍体積の増加率の平均では、凍結群は非凍結群を 60%に抑制していることが判明した。

一方癌細胞ペースト投与量を 2 倍ないし 4 倍にすると、腫瘍体積は非治療群に比し 1.3±0.23 倍ないし 1.46±0.11 倍と、投与量に応じて逆に腫瘍増大がみられ、過大な凍結治療はむしろ腫瘍縮小には不利であることが明らかであった。これは臨床上の経験から得られた、凍結融解組織量が多いと免疫寛容に至るとの推察を証明する結果とも評価しうるものと考えている。

凍結治療による免疫学的機序の系時列的变化を観察する目的で、治療後 0、6、12、24 時間後の各マウス皮下腫瘍を採取し、腫瘍免疫に関わりの深い IL-2 と TNF- α の発現を Western Blotting にて確認した。その結果、IL-2 は 1 回目及び 2 回目治療後、TNF- α は初回治療時のみの、いずれも 12 時間後に発現することを確認するに至った。なお同反応は、3 回目以降の治療では認められなかった。

現在同時採取した血清につき解析を進めており、結果そろい次第論文作成に取り掛かる所存であります。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 7 件)

長田真二 : Therapeutic effect of immune reaction due to cryoablation
2nd St. Gallen-EORCT, Gastrointestinal Cancer Conference 2014
2014 年 3 月 6 ~ 8 日 St. Gallen/Switzerland

長田真二 : 進行肝腫瘍に対する近未来型低侵襲治療戦略
第 113 回 日本外科学会・定期学術集会、
2013 年 4 月 11 ~ 13 日
福岡国際会議場 (福岡市)

山田敦子 : 進行肝腫瘍に対する凍結治療の検討
第 26 回 日本バイオセラピー学会学術集会
総会、2013 年 12 月 5 ~ 6 日、
いわて県民情報交流センター・アイーナ
(盛岡市盛岡駅西通)

山田敦子 : 抗免疫賦活を目的とした凍結治療
第 51 回 日本癌治療学会学術集会、2013 年
10 月 24 ~ 26 日、
国立京都国際会館 (京都市左京区)

山田敦子 : 進行肝腫瘍に対する生物学的特徴に基づく治療戦略
第 24 回 日本消化器癌発生学会
2013 年 9 月 5 ~ 6 日
石川県立音楽堂 (金沢市昭和町)

山田敦子 : 臨床応用可能な消化器外科領域の基礎研究 : 進行肝癌
第 68 回 日本消化器外科学会総会
2013 年 7 月 17 ~ 19 日、
シーガイア・コンベンションセンター
(宮崎市)

山田敦子 : 進行肝腫瘍に対する抗腫瘍免疫賦活による治療戦略
第 25 回 日本肝胆膵外科学会・学術集会
2013 年 6 月 12 ~ 14 日、
ホテル東日本宇都宮 (宇都宮市)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

長田真二 (OSADA, Shinji)

岐阜大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：80332683

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：