

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 13 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659632

研究課題名（和文）抗癌剤が腫瘍特異的免疫反応を増強するメカニズムの解析と臨床応用に関する検討

研究課題名（英文）The analysis of the mechanism to induce the tumor specific immune responses by the anti-cancer agents and its clinical utilization

研究代表者

土川 貴裕（TSUCHIKAWA TAKAHIRO）

北海道大学・北海道大学病院・助教

研究者番号：50507572

研究成果の概要（和文）：担癌患者において抗癌剤が免疫系に与える影響を、術前化学療法前後の食道癌、膵癌切除検体を比較し検討したところ局所に浸潤する免疫細胞が変化することが明らかになった（CD4,CD8,CD45RO の増加、Treg の減少）。各種 cell line が抗原提示能を増強（Immunogenic cell death）させる至適抗癌剤濃度を検定し、マウス片側背部に免疫原として皮下注射し、一定期間後に反対側に癌細胞を移植し腫瘍の増殖状況を解析したところ腫瘍の発育を抑制した。腫瘍周囲間質にはリンパ球、樹状細胞浸潤数が増えていた。現在、浸潤リンパ球内の分画や腫瘍抗原特異性を解析中である。

研究成果の概要（英文）：We investigated the immune responses induced by neoadjuvant chemotherapy in esophageal cancer and pancreatic cancer and clarified the increase of the CD4,CD8,CD45RO positive lymphocytes and the decrease of the Treg cells in the tumor microenvironment compared with the specimen without neoadjuvant chemotherapy. Next, we evaluated the optimal concentration of the anti cancer agents to induce immunogenic cell death, and injected them into the lateral side of the mouse followed by the transplantation of the fresh viable cells into the contralateral side. The implanted tumor did not grow with lymphocytes and dendritic cells infiltrated in the microenvironment. At the present, we are now analyzing the subpopulation of the lymphocytes and their specificity to the tumor.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

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：TMA 解析、胆道癌、マーカー

1. 研究開始当初の背景

近年、様々な癌種で術前化学療法が施行され、術後補助療法と比較して良好な治療成績を示している。従来、抗癌剤は宿主免疫を抑制すると考えられてきたが、ある種の抗癌剤は癌細胞が抗原提示細胞に取り込まれる際の、免疫原性を高める作用を有することが明らかになっている（M. Obeid et al.J

Immunol2008）。当教室では、切除組織や患者血液を用いた腫瘍免疫研究を行っており、食道癌症例において CD4 陽性リンパ球と CD8 陽性リンパ球の双方が多数浸潤している症例に限って有意に予後良好であることを世界で初めて報告し（Cancer Res 2003）、同様の現象が膵癌（Pancreas 2004）、肺癌（Br J Cancer 2006）などでも見られることを報

告してきた。

2. 研究の目的

本研究の主たる目的は、抗癌剤が、担癌宿主の局所免疫環境に与える影響とそのメカニズムを解析することである。これまでの、当科での動物モデルを用いた検討から、ある種の抗癌剤は、直接的殺細胞効果以外に、癌細胞が抗原提示細胞に取り込まれる際の、免疫原性を高める作用を有することが明らかになっている。近年、術前補助化学療法後に根治術を施行する症例が増えてきているが、これらの切除標本を用いた局所免疫環境の解析結果から、免疫原性増強作用のある至適抗癌剤の種類、投与量、投与スケジュールを同定し、再発予防を目的とする術後補助化学療法を計画する際の個別化情報として反映することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) *in vitro* および *in vivo* の系での calreticulin 発現検索

(2) 各種抗癌剤による、培養癌細胞の細胞表面 calreticulin 発現の変化の解析

(3) 抗癌剤処理培養細胞の免疫原性の検討と特異的免疫誘導の有無の解析

(4) 術前化学療法施行前後の局所免疫環境の変化の検討

(5) 食道癌・膵癌切除切片における抗癌剤投与後の局在変化の検討

4. 研究成果

研究期間内に各種癌切除切片における HLA の発現率とリンパ球浸潤の関係を主に食道癌について解析した (**Association of CD8+ T cell infiltration in oesophageal carcinoma lesions with human leucocyte antigen (HLA) class I antigen expression and survival.**, Tsuchikawa T, et al. *Clin Exp Immunol.* 2011、**Down-regulation of Human Leukocyte Antigen class I heavy chain in tumors is associated with a poor prognosis in advanced esophageal cancer patients.**, Tanaka K, et al. *Int J Oncol* 2012)。さらに、担癌患者において抗癌剤が免疫系に与える影響を、NAC 前後の食道癌切除検体を比較することにより検討したところ、術前抗癌剤投与により HLA 発現が亢進されリンパ球浸潤が促進されることが明らかとなった (**The Immunological Impact of Neoadjuvant Chemotherapy on the Tumor Microenvironment of Esophageal Squamous Cell Carcinoma.** Tsuchikawa T, et al. *Ann Surg Oncol.* 2012)。さらに膵癌術前化学療法後の切除標本においても局所で免疫修飾作用が起こっており、化学療法非

施行群と比較して Treg が減少していた (**Novel aspects of preoperative chemoradiation therapy improving anti-tumor immunity in pancreatic cancer.** Tsuchikawa T, et al. *Cancer Sci.* 2013)。

この抗癌剤が免疫系に与えるメカニズムを解析するために、マウスモデルでの実験系を新たに構築した。抗癌剤暴露により、抗原提示に関わる細胞内タンパクの一つである Calreticulin が細胞表面へ移行し癌細胞の抗原提示能が増強する事実 (Immunogenic cell death) に着目し、*in vitro* の系でいろいろな cell line が抗原提示能を増強させる至適抗癌剤濃度を検定した。次に Immunogenic cell death を誘発する至適抗癌剤濃度で前処置した細胞を、マウス片側背部に免疫原として皮下注射した。一定期間後に反対側に癌細胞を移植し腫瘍の増殖状況を解析した。この結果、至適抗癌剤濃度で Immunogenic cell death を起こした細胞は、免疫原性を増強し、Calreticulin の upregulation と相関して、マウス反対側背部に移植した腫瘍の発育を抑制することが確認された。さらに発育抑制された腫瘍周囲間質には CD3 陽性リンパ球浸潤数、DEC205 陽性樹状細胞数も増えていることが判明した (日本癌学会 2011、日本外科学会学術集会 2012、山村喜之発表)。現在、浸潤リンパ球内のメモリー T 細胞数や腫瘍抗原特異性を解析中であり、これまでの基礎実験検証結果を投稿準備中である。

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 7 件)

1. Tsuchikawa T, Hirano S, Tanaka E, Matsumoto J, Kato K, Nakamura T, Ebihara Y, Shichinohe T. Novel aspects of preoperative chemo(radiation)therapy improving anti-tumor immunity in pancreatic cancer. *Cancer Sci.* 査読有 104(5):531-5 2013

2. Tsuchikawa T, Hirano S, Tanaka E, Kato K, Matsumoto J, Nakayama T, Tabata Y, Shichinohe T. Surgical strategy for liver metastases of neuroendocrine tumors. *Hepato-Gastroenterol* 査読有 59(115):921-3. 2012

3. Tsuchikawa T, Hirano S, Tanaka E, Kato K, Matsumoto J, Shichinohe T. Multidisciplinary treatment strategy for advanced pancreatic neuroendocrine tumors: A single center experience. *Hepato-Gastroenterol.* Nov-Dec

; 査読有 59(120):2623-6 2012

4. Tsuchikawa T, Miyamoto M, Yamamura Y, Shichinohe T, Hirano S, Kondo S.
The immunological impact of neo-adjuvant chemotherapy on tumor microenvironment of the esophageal squamous cell carcinoma. Ann Surg Oncol 査読有 19(5):1713-9 2012

5. Tsuchikawa T, Kondo S, Hirano S, Tanaka E, Kato K, Matsumoto J, Kubota K, Shichinohe T.
Extensively spreading intraepithelial bile duct carcinoma causing multiple bile duct strictures: Report of 3 cases. Surg Today 査読有 41 1674-1679 2011

6. Tsuchikawa T, Ikeda H, Cho Y, Miyamoto M, Shichinohe T, Hirano S, Kondo S.
Association of CD8+ T cell infiltration in esophageal carcinoma lesions with human leucocyte antigen (HLA) class I antigen expression and survival Clin Exp Immunol 査読有 164 50-56 2011

7. Tsuchikawa T, Kondo S, Hirano S, Tanaka E, Kawasaki R, Kato K, Matsumoto J, Shichinohe T
Distal pancreatectomy and portal vein resection without vascular reconstruction for endocrine tumors with massive intraportal growth. Hepato-Gastroenterol 査読有 58 1029-1031 2011

[学会発表] (計 11 件)

①第20日本消化器関連学会週間 (JDDW)
開催日程: 12. 10. 10~12. 10. 13
会場: 神戸国際展示場、ポートピアホテル、神戸国際会議場(神戸市)
演題名: 局所進行膵体部癌の集学的治療における局所制御術式DP-CARの意義.
演者: 土川貴裕, 平野 聡, 田中栄一

②第2012北海道敗血症フォーラム
開催日程: 12. 08. 25
会場: 札幌グランドホテル別館(札幌市)
演題名: 消化器腫瘍術後にDICを合併した症例に対するリコモジュンTMの使用経験
演者: 土川貴裕

③第67回 日本消化器外科学会総会
開催日程: 12. 07. 18~12. 07. 20
会場: 富山国際会議場(富山市)
演題名: DP-CARによる局所制御と集学的治療による進行膵体部癌の治療戦略
演者: 土川貴裕, 平野 聡, 野路武寛, 加藤健太郎, 松本 譲, 七戸俊明, 田中栄一

④第10回World Congress of the International Hepato-Pancreato-Biliary Association (IHPBA)
開催日程: 12. 07. 01~12. 07. 05
会場: PALAIS DES CONGRES (Paris, France)
演題名: Modified DPPHR (Duodenum-Preserving Resection of the Head of the Pancreas) for the low grade malignant lesion in the pancreas head
演者: Tsuchikawa T

⑤第3回 北大病院腫瘍センター・市民公開講座
開催日程: 12. 06. 09
会場: 北海道大学(札幌市)
演題名: あきらめない。チームで支える膵がん外科治療
演者: 土川貴裕

⑥第24回日本肝胆膵外科学会
開催日程: 12. 05. 30~12. 06. 01
会場: 大阪国際会議場(大阪市)
演題名: Modified DPPHR (Duodenum-Preserving Resection of the Head of the Pancreas) for the benign or low grade malignant lesion in the pancreas head.
演者: Tsuchikawa T, Hirano S, Tanaka E, Matsumoto J, Kato K, Noji T, Shichinohe T

⑦第9回日本消化器外科学会大会
開催日程: 11. 10. 22~11. 10. 23
会場: 福岡国際センター、福岡サンパレス、福岡国際会議場、マリンメッセ福岡(福岡市)
演題名: 食道癌術前化学療法が癌局所環境に及ぼす免疫学的変化に関する検討.
演者: 土川貴裕, 宮本正樹, 山村喜之, 京極典憲, 黒田 晶, 真木健裕, 田中栄一, 七戸俊明, 平野 聡

⑧第47回 日本胆道学会
開催日程: 11. 09. 16~11. 09. 17
会場: ワールドコンベンションセンターサミット(宮崎市)
演題名: 胆管癌垂直進展範囲におけるMDCT-MPR像と病理像との対比.
演者: 土川貴裕, 平野 聡, 田中栄一

⑨第4回 AOPA&KPBA
開催日程: 11. 09. 02~11. 09. 03
会場: Lotte Hotel Jeju (Korea)
演題名: Treatment strategy for liver metastases of pancreatic neuroendocrine tumors.
演者: Tsuchikawa T, Hirano S, Tanaka E, Kato K, Matsumoto J, Nakayama T, Tabata Y, Shichinohe T

⑩第66回日本消化器外科学会総会
開催日程：11.07.13～11.07.15
会場：名古屋国際会議場(名古屋市)
演題名：当科における難治性胆汁瘻予防のための工夫と対策.
演者：土川貴裕，平野 聡，田中栄一，加藤健太郎，松本 譲，七戸俊明，近藤 哲

⑪第23回 日本肝胆膵外科学会
開催日程：11.06.08～11.06.10
会場：京王プラザホテル(東京)
演題名：膵頭十二指腸切除術後の膵液瘻 - 重症化の予測因子とその対策-
演者：土川貴裕，平野 聡，田中栄一，加藤健太郎，松本 譲，高田 実，田本英司，寺本賢一，村上壮一，川村武史，中山智英，三浦 巧，齋藤博紀，七戸俊明，近藤 哲

6. 研究組織

(1) 研究代表者

土川 貴裕 (TSUCHIKAWA TAKAHIRO)
北海道大学・北海道大学病院・助教
研究者番号：50507572

(2) 研究分担者

平野 聡 (HIRANO SATOSHI)
北海道大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：50322813

中村 透 (NAKAMURA TORU)
北海道大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：70645796

(3) 連携研究者

なし