

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24650631

研究課題名(和文) 悪性骨腫瘍に対する凍結免疫療法の確立

研究課題名(英文) cryoimmunotherapy for malignant bone tumors

研究代表者

土屋 弘行(Tsuchiya, Hiroyuki)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号：40227434

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：主目的は悪性骨腫瘍に対し液体窒素処理した腫瘍組織が生体内に戻ると体内で腫瘍特異的な凍結免疫の活性を誘導し、結果として腫瘍の再発や転移の抑制を導くか追求することである。in vivoで液体窒素処理した腫瘍組織に樹状細胞療法を併用すると、サイトカインの上昇、肺転移の抑制を確認した。また、ヒト樹状細胞療法を標準治療抵抗性悪性骨軟部腫瘍患者に行う第1相臨床試験を遂行している。これまでに25名の患者に対し投与を行っており、現在経過観察中であるが3割の患者で免疫反応の上昇を確認している。これらの結果から今後、液体窒素処理骨移植患者に樹状細胞療法を併用する方法を確立していく。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is that the cryotreatment of tumor tissue may induced an anti tumor effect, and that suppressed tumor recurrence and metastases. We have treated 25 patients for malignant tumors who failed standard treatment of surgery, chemotherapy, and radiotherapy. Then we started dendritic cell immunotherapy generated extra vivo, which pulsed with cryotreated tumor tissue mixed with OK-432. 30% of patients induced immunological reactions. After that, we planned that the patients treated by cry treatment using liquid nitrogen combined with dendritic cell immunotherapy to reduce local recurrence and metastasis.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学整形外科学

キーワード：凍結免疫

1. 研究開始当初の背景

申請者らは悪性骨腫瘍の手術で切除した腫瘍罹患骨を-196度の液体窒素で凍結処理し、元の場所に戻して骨の再建に利用する液体窒素処理骨移植を1999年より世界で初めて行い、現在先進医療として臨床で行っている。一方、凍結した腫瘍組織を生体内に戻すと凍結壊死組織から多量の癌抗原が溶出し、これを免疫系細胞が認識、活性化して腫瘍特異的な抗腫瘍効果を認める凍結免疫 (Sabel MS et al. Breast Cancer Res Treat 2005)が報告されている。凍結免疫は基礎実験として、大腸がん、乳がん細胞で表在性の腫瘍に対し凍結処理後に免疫活性、転移の抑制が証明され (Urano et al. Cryobiology 2003, Sabel MS et al. Breast Cancer Res Treat 2005)、臨床では肝がんで生体内に直接凍結プローベを挿入して凍結手術を行うと免疫活性の上昇が報告されているが (Osada S et al. J Surg Oncol 2007)肉腫に関して凍結免疫の報告はない。申請者らはマウス骨肉腫モデルを用いて液体窒素処理移植後にサイトカイン (IFN- γ 、IL-12)、細胞障害活性 (CTL activity) を測定しそれぞれ上昇を認め、肉腫においてはじめて凍結免疫の活性を証明した (Nishida H et al. J Bone Joint Surg [Br] 2008)。さらに、肉腫の凍結処理組織に強力な抗原提示細胞である樹状細胞を併用すると相乗的に抗腫瘍効果と肺転移の抑制を確認した (Kawano M et al. Clin Orthop Relat Res. 2010)。今後、免疫療法により効果的な凍結免疫の活性と液体窒素処理骨移植に免疫療法の併用療法の臨床試験を行う。

2. 研究の目的

主目的は悪性骨腫瘍に対し液体窒素処理した腫瘍組織が生体内に戻ると体内で腫瘍特異的な凍結免疫の活性を誘導し、結果として腫瘍の再発や転移の抑制を導くか追求することである。また、免疫賦活剤や免疫系細胞の併用を行い凍結免疫が最も活性化する方法を開発する。さらに臨床に応用し、新たな悪性骨腫瘍に対する凍結免疫療法の治療体系を確立する。

3. 研究の方法

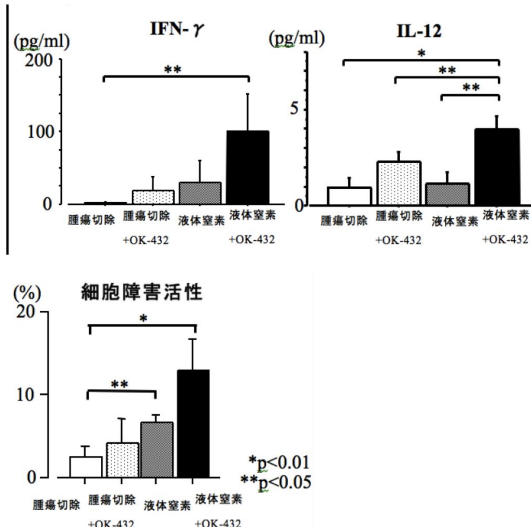
悪性骨腫瘍に対し、動物モデルで腫瘍の液体窒素による凍結処理に樹状細胞療法とを併用した凍結免疫療法を行い、免疫活性の増大と転移の抑制を観察。臨床において樹状細胞療法の安全性と液体窒素処理骨移植術と樹状細胞療法の併用療法の臨床試験をめざし、まず、臨床における悪性骨軟部腫瘍に対する樹状細胞を用いた免疫療法の安全性試験を行う。

4. 研究成果

動物モデルによる腫瘍の液体窒素による凍結処理組織移植と樹状細胞を用いた免疫

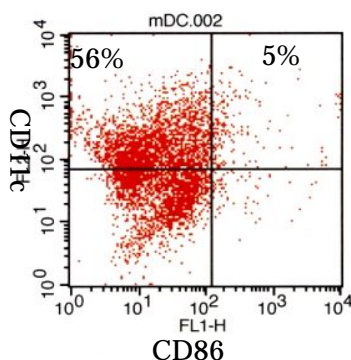
療法併用による免疫活性の確認

これまでに、マウス骨肉腫モデルで凍結処理群と免疫賦活剤で免疫活性の上昇と肺転移抑制を確認している。すなわち、In vivoでマウス骨肉腫細胞 (LM8細胞)とマウス (C3H)を用いた。皮下腫瘍を形成後、腫瘍を凍結処理群と腫瘍切除群とそれぞれに免疫賦活剤 (OK-432)を併用した群を作成した。凍結処理群は臨床に即して腫瘍を広範切除した後に腫瘍組織を-196度の液体窒素内へ20分間挿入し凍結壊死させ、15分間室温の蒸留水内に挿入しゆっくり溶解させたのち同一マウスの反対側の皮下に移植した。サイトカイン (IFN- γ 、IL-12)をELISA法で、また、脾臓より脾細胞を分離してクロム遊離試験によるLM8に対する細胞障害活性を測定したところ、いずれも凍結処理群が切除群に比べて優位に上昇していた。さらに免疫賦活剤のOK-432を併用すると強い免疫活性 (サイトカイン、細胞障害活性の上昇)と肺転移抑制を認めた。

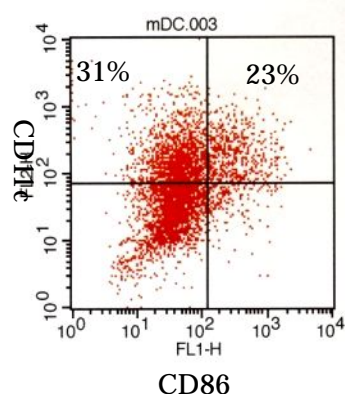


この結果をうけて、さらに免疫活性をあげる方法として免疫細胞の一つである樹状細胞を併用する方法を行った。樹状細胞は生体内の最も強力な抗原提示細胞の一つである。腫瘍組織を液体窒素で凍結処理を行うと腫瘍細胞は死滅するが中に含まれる腫瘍抗原であるタンパク物質は残存する。この腫瘍抗原タンパク物質を樹状細胞が補食し腫瘍抗原として感作されれば腫瘍特異的な免疫反応が得られる。そこで、vivoでマウスの骨髄単核細胞から recombinant mouse GM-CSF で分化させ (Lutz MB et al. Immunobiology. 2007)腫瘍破壊物質 (tumor lysate) を感作させ成熟樹状細胞を作成する。これらの細胞は FACS Calibur Flow Cytometer を用いて CD11c, CD80, CD86, I-Ad, CD40 の抗体を染色させ解析した。凍結処理群に樹状細胞を週2回、合計6回投与すると、免疫活性の増大と肺転移の抑制が相乗的に働き、凍結処理に免疫療法の有効

性が確認された。
樹状細胞



成熟樹状細胞



標準治療抵抗性の悪性骨軟部腫瘍に対するヒト樹状細胞を用いた免疫細胞療法
臨床試験の対象は手術療法、化学療法などで根治不可能でこれらの治療の有効性が低いと判断される原発性および転移性悪性骨軟部腫瘍患者で、以下の選択基準及び除外基準をすべて満たす症例である。

選択基準

画像所見、病理所見により、原発性もしくは転移性悪性骨軟部腫瘍と確定診断されている。

腫瘍組織が採取されている。

Performance Status が 0 ~ 2 である。

6 歳以上で、インフォームド・コンセントが得られている。

本試験の参加に関して同意が文書で得られる患者

除外基準

心疾患、腎疾患、呼吸器疾患、血液疾患、凝固障害その他の重篤な合併症を有し、担当医師により不相当と判断される。

4 週間以内に手術、化学療法、放射線療法を受けている。またはこれらの治療から十分に回復していない。

免疫不全症、脾摘の既往、脾照射を受けたことがある。

副腎皮質ステロイドまたは抗ヒスタミン剤の投与を必要としている。

追跡経過観察が困難であると予想される。
その他医師の判断により対象として不相当と判断された患者

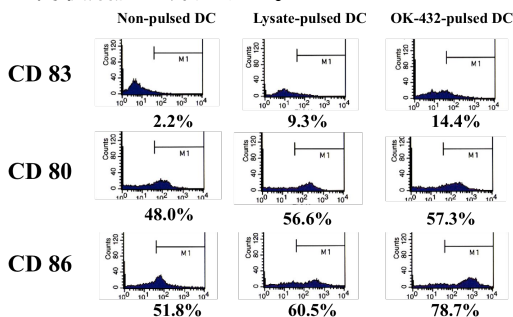
方法 (樹状細胞培養)

1 (樹状細胞の誘導)患者の末梢血 50 ml から得られた単核細胞より接着細胞を分離し、GM-CSF、IL-4 を含む無血清培養液中に浮遊させ、6 日間培養することにより未熟樹状細胞を誘導する。作成した未熟樹状細胞を半分に分けて以下の 2・3 に使用する。

2 (腫瘍溶解産物; Tumor lysate) 手術で得られた腫瘍組織を凍結処理し、tumor lysate を作成する。1 で誘導した未熟樹状細胞の半量に加えて 1 日間培養することにより腫瘍抗原感作させた樹状細胞を誘導する。

3 (成熟樹状細胞の作製) 免疫賦活剤 OK-432 を 1 で誘導した未熟樹状細胞の半数に加えて 1 日間培養することで成熟樹状細胞を作成する。

4 2・3 で作成した樹状細胞をギムザ染色標本での形態や CD80, CD83, CD86, CD123, HLA-DR, CD14, CD11c の表面抗原を指標として樹状細胞を算定する。



5 生食 1 ml に浮遊した樹状細胞を腫瘍の存在していた部位の最近位のリンパ節周囲の皮内 (ソケイ部もしくは腋窩部) に投与する。

プライマリーエンドポイント:

樹状細胞療法の皮内投与の安全性

セカンダリーエンドポイント:

免疫学的反応 (DTH、サイトカイン)
腫瘍効果判定

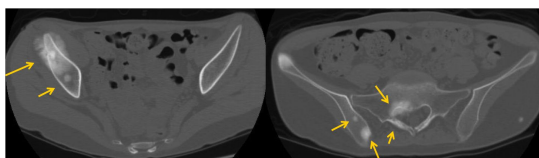
結果: 症例は 25 例 (男性 15 例、女性 10 例、平均年齢 41.1 歳) であった。悪性骨腫瘍 12 例 (骨肉腫 10 例、軟骨肉腫 2 例)、悪性軟部腫瘍 10 例 (淡明細胞腫 3 例、平滑筋肉腫 2 例、上衣腫 1 例、蜂巣状軟部肉腫 1 例、線維肉腫 1 例、悪性末梢神経鞘腫 1 例、血管肉腫 1 例)、転移性骨腫瘍 3 例である。全例原発巣以外に肺・骨転移などを認めていた。

プライマリーエンドポイントの安全性では注射部位で grade 2 の副作用が 1 例、grade 1 の副作用が 4 例認められたが、grade 3 以上は認めず、安全性は確認された。

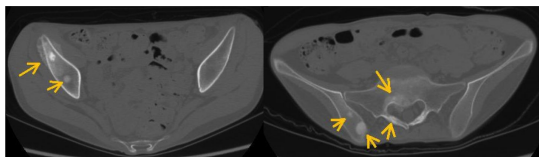
セカンダリーエンドポイントの免疫反応では、免疫系サイトカインである IL-12, IFN- γ の上昇が 16 例 (64%) に、腫瘍抗原もしくは OK-432 に対する遅発性皮膚反応 (DTH) を 9 例 (36%) に認めた。腫瘍効果判定では著効・有効例はいなかったが、5 例に不変、20 例に増悪であった。

1 例に局所の有効例を認めたので報告する。17 歳女性、左大腿骨骨肉腫、初診時より多発肺・骨転移。標準治療である術前化学療法、左大腿骨腫瘍広範切除、術後化学療法を行った後、残存腫瘍に対し樹状細胞療法を行った。治療前のサイトカインが治療後に上昇 (IL-12: 33.2 62.7 IU/ml, IFN- γ : 50.2 184 pg/ml) を認め、DTH は強陽性であった。骨盤の多発骨転移は樹状細胞療法後 3 ヶ月で縮小を認めた。

樹状細胞治療前



樹状細胞治療後 3 ヶ月



考察：マウス骨肉腫モデルを用いて悪性骨腫瘍に対する液体窒素処理移植と樹状細胞療法を併用することで最適な抗腫瘍効果の増強を確認することができた。また、臨床においてヒト樹状細胞療法の安全性を確認することができた。今後はヒト樹状細胞療法による治療効果をあげるために樹状細胞療法の更なる免疫反応の上昇を確認するとともに、臨床で行っている原発性および転移性悪性骨腫瘍に対し液体窒素処理自家腫瘍骨で再建術を行っている症例に樹状細胞療法を併用した凍結免疫療法の確立を目指したい。この凍結免疫療法が確立すれば肉腫の患者はもとより、現在癌難民として医療上問題になっている転移性骨腫瘍患者にもその治療を確立するとともに、患者の長期入院、臥床を減らし質の高い療養生活が望め、さらに医療費の削減にもつながると考えられる。

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)

[学会発表](計 2 件)

1. 26th European Musculoskeletal Oncology Society Meeting (ヨーテボリ、スウェーデン) 2013年5月29-31日. Immunotherapy based on dendritic cells is feasible for patients with malignant bone and soft tissue tumours. Hideji Nishida, Norio Yamamoto, Akihiko Takeuchi, Yoshikazu Tanzawa, Hiroaki Kimura, Munetomo Takata, Isei Nomura, Shinji Miwa, Takashi Kato, Hiroyuki Tsuchiya
2. 9th Asian Pacific Musculoskeletal Tumor Society (クアラルンプール、マレーシア) 2012年9月7-9日. Immunotherapy based on dendritic cells is feasible for patients with malignant bone and soft tissue tumours. Hideji Nishida, Yoshikazu Tanzawa, Norio Yamamoto, Katsuhiko Hayashi, Akihiko Takeuchi, Hiroaki Kimura, Shingo Shimosaki, Hiroyuki Tsuchiya

6. 研究組織

(1) 研究代表者

土屋 弘行(YSUCHIYA Hiroyuki)
金沢大学・医学系・教授
研究者番号：40227434