

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08989

研究課題名(和文)薬物動態に着目した腹膜播種に対する腹腔内免疫化学療法の開発

研究課題名(英文)Development of intraperitoneal immunotherapy for peritoneal metastasis

研究代表者

山口 博紀(Yamaguchi, Hironori)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：20376445

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：In vivo selection法にて作成した腹膜高転移株YTN16P2は、高い浸潤と足場非依存性増殖能を有し、1x10⁶個を腹腔内投与後2～3週で多数の腹膜播種を来した。このモデルにて、抗PD-1抗体を全身または腹腔内に投与すると、腸間膜上の播種巣を共に半分程度に減少させた。また、播種巣内に浸潤したCD3(+) T細胞の数を有意に増加させ、Gr1(+) MDSCの数を減少させた。しかし、これらの現象に関して全身投与と腹腔内投与で有意差を認めなかった。PD-1抗体は投与経路にかかわらず腹腔内免疫学的微小環境を抗腫瘍的な方向に変化させ、胃癌の腹膜播種を部分的に抑制することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胃癌腹膜播種に対する免疫チェックポイント阻害抗体の治療効果に関する基礎データは少ない。本研究で新たに作成したマウスモデルは様々な免疫療法の効果と作用機序を解明する上で大変有用である。今回、抗PD-1抗体は全身または腹腔内投与で腹膜播種を部分的に抑制することが確認された。その治療効果は予想と異なり投与経路によって顕著な差は認めなかったが、この抗体には腹膜播種巣内へのT細胞の浸潤を促進し、免疫抑制性のMDSCの浸潤を抑制する作用があり、これが播種抑制効果と関連する可能性があるという重要な新知見を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：Intraperitoneal (IP) inoculation of a highly metastatic subclone of murine gastric cancer, YTN16P2, (1x10⁶) resulted in multiple mesenteric metastases after 3 weeks.

Intravenous (IV) or IP administration of anti-PD-1 mAb reduced the number of metastases to the mesentery by 40-50% compared with isotype controls. However, no differences were observed depending on the route of administration. Although splenocyte phenotypes were not altered, the densities of CD8(+) T cells in peritoneal tumors were significantly increased, while those of Gr-1(+) myeloid derived suppressor cells (MDSC) were significantly reduced in mice treated with anti-PD-1 mAb. PD-1 blockade therapy remodels the cellular immune composition of peritoneal tumors which can partially suppress the peritoneal metastasis regardless of the route of administration. Anti-PD-1 mAb may enhance the effects of chemotherapeutic agents, leading to the better outcome of patients with gastric cancer with peritoneal involvement.

研究分野：臨床腫瘍学

キーワード：腹膜播種 免疫チェックポイント阻害 抗PD-1抗体 腫瘍浸潤リンパ球 骨髄由来抑制性細胞 フィブロネクチン

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

免疫チェックポイント(Immune Checkpoint, IC) 阻害抗体薬の優れた臨床成績はがんの治療体系に変革を起こした。しかし、その機序は解明されておらず、免疫関連の特殊な毒性が出ること、奏効を予測するバイオマーカーがないことが臨床的課題である。腹膜播種は難治性スキルス胃癌における最も頻度の高い再発形式であり、最大の予後規定因子である。過去の臨床データから、IC 阻害薬は胃癌の腹膜転移に対する治療効果は乏しいことが示唆されている。一般に、全身投与した薬剤は血液腹膜関門より腹膜病変への移行性が極めて悪い反面、腹腔内投与しても速やかに血中に吸収され、その薬物動態は全身投与と大差ないことが解っている。しかし、PD-1 抗体や CTLA-4 抗体などの免疫グロブリン製剤は高分子構造を持つため、血中半減期が長く、他の低分子抗癌剤と比べ腹腔内投与後の局所停留性も比較的高いことが解っている。しかし、これらの抗体薬の全身あるいは腹腔内投与後の薬物動態、特に播種病巣への集積効率に関する情報は極めて乏しい。

2. 研究の目的

免疫能を有するマウスの胃癌腹膜播種モデルを新たに作成し、IC 阻害抗体の全身投与と腹腔内投与を施行し、その播種抑制効果と免疫学的変化の相違を明らかにし、腹膜播種に対する新たな免疫療法の開発に繋げることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 新規マウスモデルの開発

C57/Bl6 マウスの同系胃癌細胞株 **YTN16**($5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 個)をマウス腹腔内に投与し、播種巣を回収、コラゲナーゼ処理しシングルセル化し、再度培養し同マウスの腹腔内に接種する。これを数回繰り返して、**In vivo selection** 法にて腹膜高転移株 (**YTN16P2**) を作成した。この **YTN16P2** と親株 **YTN16** の **phenotype**、遺伝子発現、および **In vitro** の細胞機能の相違を検討した。

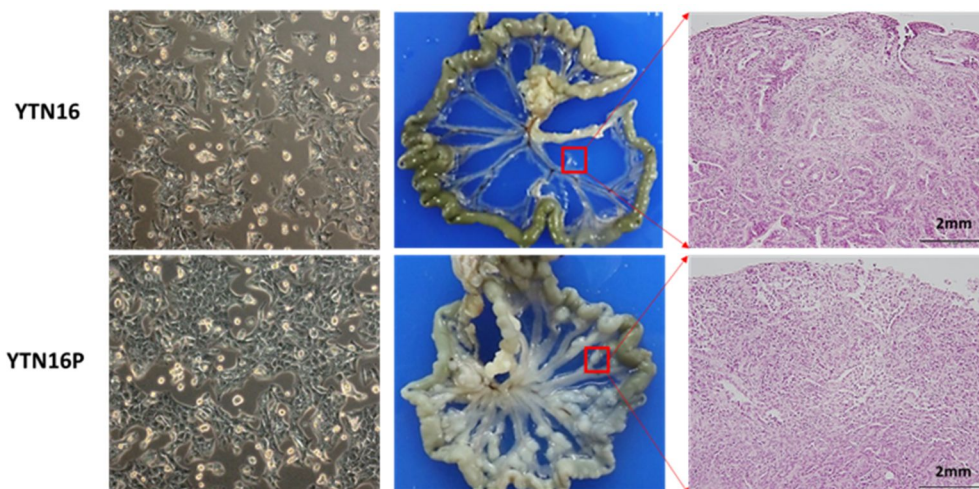
(2) 抗 PD-1 抗体の播種抑制効果の検討

(1)で作成した **YTN16P2**(1×10^6 個)を **C57/Bl6** マウスの腹腔内に接種し、投与後 7 日目から 3 日毎に計 4 回、抗 PD-1 抗体(RMP1-14)または **Isotypecontrol** 抗体(2A3) (**200ug**)を腹腔内または尾静脈から投与し、18 日目に安楽死させ腹膜播種数を観察した。また、これらのマウスの脾臓細胞、および腹腔内洗浄細胞を回収し、**flowcytometry** にて免疫細胞の割合を検討した。さらに、腹膜播種巣の切除検体の免疫染色を行い、播種巣局所における免疫細胞の浸潤様式を検討した。

4. 研究成果

(1) YTN16P の作成

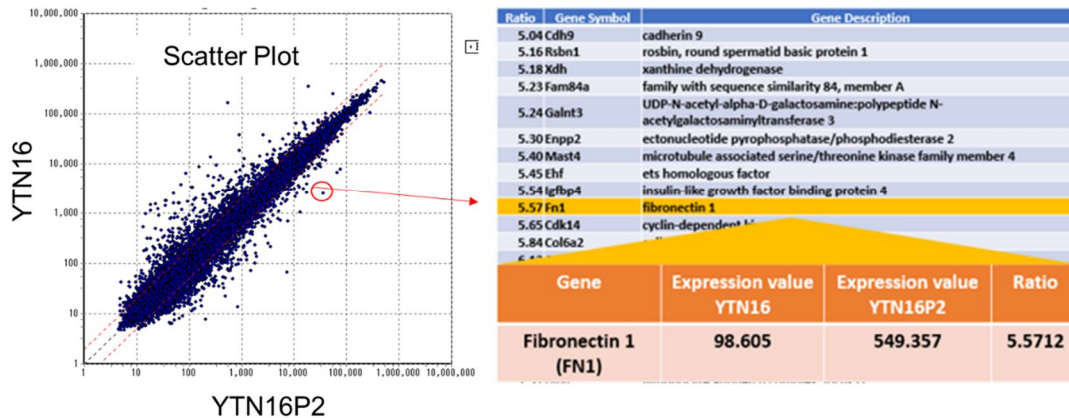
In vivo selection 法にて作成した腹膜高転移株 **YTN16P2** は、親株と比較して増殖能、遊走能、浸潤能、Soft agar を用いた足場非依存性増殖能が有意に亢進する一方、Fibronectin, Collagenn に対する接着能は低下傾向していた。また、PD-L1 より高率に発現しており、 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ 個を腹腔内投与すると 2 週目には多数の腹膜播種を来すことが確認された(図 1)。



(図 1) Microscopic observation and metastases on mesentery of cultured YTN16 and YTN16P.

また、mRNA の網羅的解析の結果から、親株と比べてフィブロネクチン(FN1)を多量に発現していることが解った(図 2)。そこで、shRNA を用いて YTN16P の FN knockdown 株を作成し、その機能を検討すると、浸潤能や腹膜播種形成能は有意に低下した。

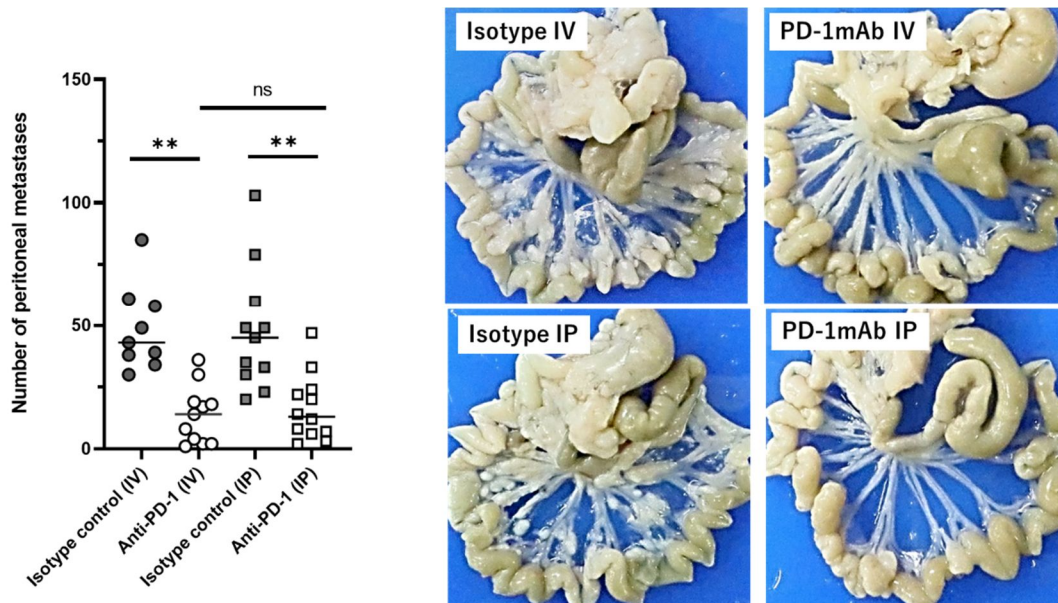
Comprehensive analysis of differential expression of mRNAs between YTN16 and YTN16P2



(図 2) Comprehensive analysis of mRNA expression between YTN16 and YTN16P2

(2) 抗 PD-1 抗体の全身投与、腹腔内投与による播種抑制効果

YTN16P2 接種により、アイソタイプ対照群のすべてのマウスで腸間膜に多くの転移が認められた。しかし、抗 PD-1 mAb の全身投与で治療したマウスでは転移数が 33%に減少した(中央値=14、1~36 vs 中央値=43、30~85、p=0.001)。抗 PD-1 mAb の腹腔内投与でも、腹膜転移数は同程度に抑制された(中央値=13、2~47 vs 中央値=45、20~103、p=0.009)。しかし、全身および腹腔内投与で治療した群間で抑制の程度に有意差は認めなかった。(図 3)

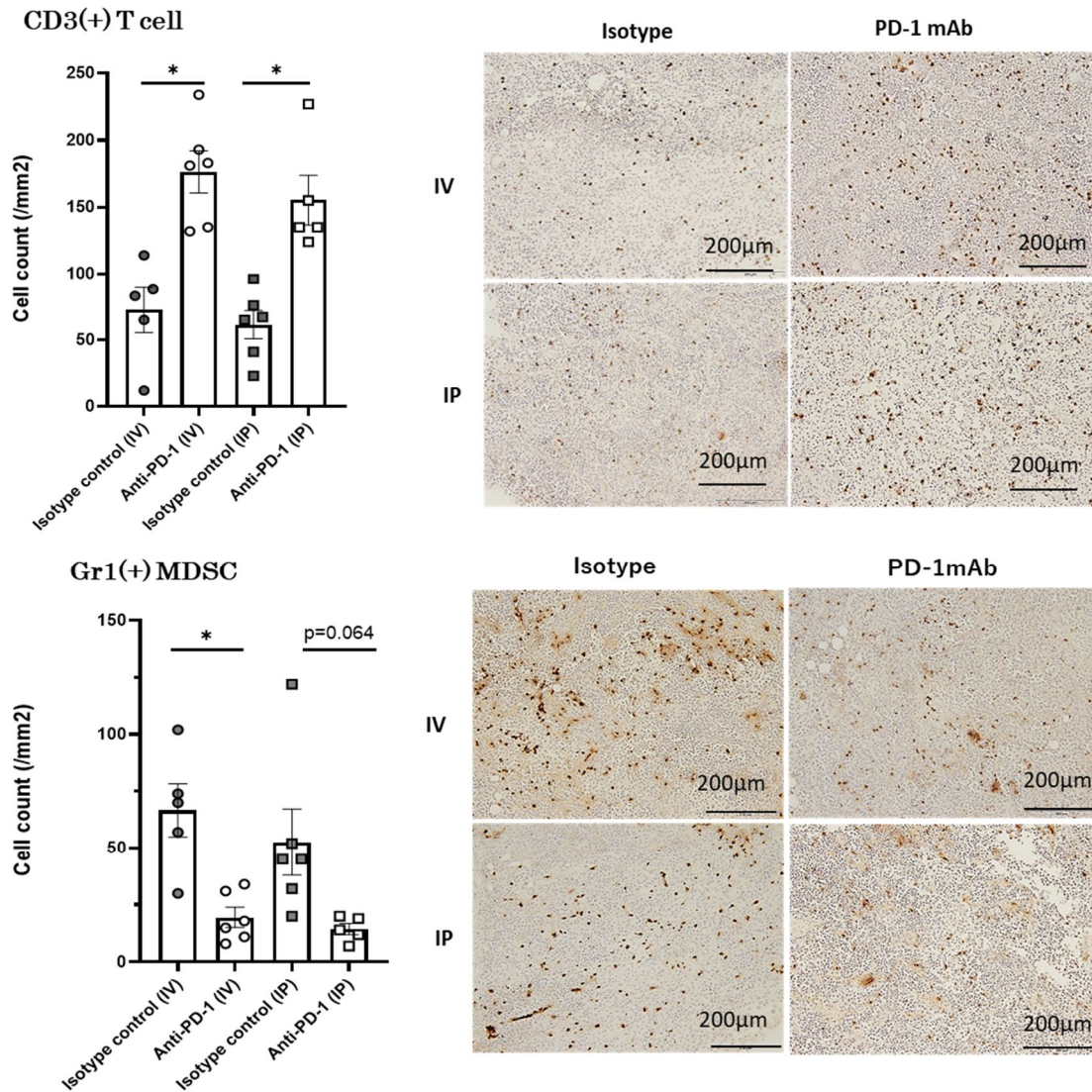


(図 3) The effects anti-PD-1 mAb for the treatment of peritoneal metastases in immunocompetent mice. YTN16P (1x10⁶) was intraperitoneal (IP) injected into B57/BL6 mice. Doses of 200 μg anti-mouse PD-1 antibody (RMP1-14) or isotype control (2A3) were injected at every 3 days from days 7 to 16 through intravenous or IP routes. Combined data of the results of 2 experiments (n=5 in each) are shown. **:p<0.01

(3) PD-1 抗体の腹腔内免疫に対する影響

これらのマウスの脾臓内免疫細胞の割合を検討すると、抗 PD-1 抗体投与群では、CD4(+)およびCD8(+)の T リンパ球の割合が増加し、CD11b(+)Gr-1(+)の Granulocytic-MDSC(G-MDSC)は低下する傾向を認めたが有意差は認めなかった。しかし、腹膜播種巣の切除切片の免疫染色では、PD-1 抗体治療群で CD8(+) T 細胞の密度がそれぞれの対照群よりも 2 倍以上増加していた(全身投与;72.4 ± 38.0 vs 176.3 ± 38.3、p=0.028、腹腔内投与; 61.3 ± 25.9 vs 155.2 ± 41.7、

p=0.042)。しかし、全身投与群と腹腔内治療群の間に差は検出されなかった。一方、Gr-1(+) MDSC の密度は、PD-1 治療群で減少傾向を認めた(全身投与;66.7 ± 26.2 vs 19.5 ± 10.7、p=0.046、腹腔内投与;52.7 ± 35.8 vs 14.4 ± 5.3、p =0.064) (図 4)。すべてのマウスで F4/80(+) マクロファージは多数浸潤していたが、抗 PD-1 抗体の投与による有意な差は認めなかった。また、腹膜播種マウスの腹腔内液中の免疫細胞を flowcytometry で検討すると、PD-1 抗体治療群にて、CD3(+) T 細胞が増加していた。磁気ビーズ法を用いてこの T 細胞を分離し、PMA で刺激すると IFN-gamma, granzyme 産生能が抗 PD-1 抗体投与群で上昇していた。一方、腹腔内の G-MDSC や F4/80(+)CD163(+) M2 マクロファージの割合が減少していた。以上のことから、PD-1 抗体は腹腔局所におけるがん免疫微小環境に変化をもたらし、腹膜播種に対しても抑制効果を発揮するが、投与経路による大きな相違は認めなかった。



(図 4) The effects of anti-PD-1 mAb on the ratio of T cells or myeloid derived suppressor cells in the spleen. Splenocytes from the sacrificed mice were stained with mAbs to CD4, CD8, CD11b, Gr-1 as well as CD45 and percentages of CD4(+) or CD8(+) T cells, CD11b (+) Gr-1(+) myeloid derived suppressor cells against CD45(+) cells were determined using flow cytometry. Data are shown as mean±standard error in 5 mice.

(4)まとめ

PD-1 阻害療法は腹腔内および腹膜播種巣内の免疫学的微小環境を抗腫瘍的な方向に変化させ、胃癌の腹膜播種を部分的に抑制するが、その治療効果は投与経路によって顕著な差はなかった。化学療法レジメンに抗 **PD-1 mAb** を追加すると、腹膜播種に対する抗腫瘍効果が強化される可能性があり、腹膜播種を有する胃癌患者の生存期間の延長につながる可能性があると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8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 8件）

1. 著者名 Kimura Yuki, Ohzawa Hideyuki, Miyato Hideyo, Kaneko Yuki, Saito Akira, Takahashi Kazuya, Tojo Mineyuki, Yamaguchi Hironori, Kurashina Kentaro, Saito Shin, Hosoya Yoshinori, Lefor Alan Kawarai, Sata Naohiro, Kitayama Joji	4. 巻 12
2. 論文標題 MiR-29b may suppresses peritoneal metastases through inhibition of the mesothelial?mesenchymal transition (MMT) of human peritoneal mesothelial cells	5. 発行年 2022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/s41598-021-04065-2	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 KUMAGAI YUKO, FUTOH YURIE, MIYATO HIDEYO, OHZAWA HIDEYUKI, YAMAGUCHI HIRONORI, SAITO SHIN, KURASHINA KENTARO, HOSOYA YOSHINORI, LEFOR ALAN KAWARAI, SATA NAOHIRO, KITAYAMA JOJI	4. 巻 36
2. 論文標題 Effect of Systemic or Intraperitoneal Administration of Anti-PD-1 Antibody for Peritoneal Metastases from Gastric Cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 In Vivo	6. 最初と最後の頁 1126 ~ 1135
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/invivo.12811	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 Saito Akira, Kimura Natsuka, Kaneda Yuji, Ohzawa Hideyuki, Miyato Hideyo, Yamaguchi Hironori, Lefor Alan Kawarai, Nagai Ryoza, Sata Naohiro, Kitayama Joji, Aizawa Kenichi	4. 巻 14
2. 論文標題 Novel Drug Delivery Method Targeting Para-Aortic Lymph Nodes by Retrograde Infusion of Paclitaxel into Pigs' Thoracic Duct	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 3753 ~ 3753
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers14153753	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 Tojo Mineyuki, Horie Hisanaga, Koinuma Koji, Miyato Hideyo, Tsukui Hidenori, Kaneko Yuki, Futoh Yurie, Kimura Yuki, Takahashi Kazuya, Saito Akira, Ohzawa Hideyuki, Yamaguchi Hironori, Lefor Alan Kawarai, Sata Naohiro, Kitayama Joji	4. 巻 24
2. 論文標題 Programmed cell death ligand 1 expression on monocytes is inversely correlated with tumour response to preoperative chemoradiotherapy for locally advanced rectal cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Colorectal Disease	6. 最初と最後の頁 1140 ~ 1149
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/codi.16167	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 Kitayama, J, Saito, S, Yamaguchi, H, Lefor, A. K, Ishigami, H, Sata, N.	4. 巻 28
2. 論文標題 ASO Author Reflections: Repeated Intraperitoneal Paclitaxel with Systemic Chemotherapy as the First-Line Treatment for Peritoneal Malignancy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Ann Surg Oncol	6. 最初と最後の頁 3871-3872
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1245/s10434-020-09417-2	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 Saito, S, Yamaguchi, H, Ohzawa, H, Miyato, H, Kanamaru, R, Kurashina, K, Hosoya, Y, Lefor, A. K, Sata, N, Kitayama, J.	4. 巻 28
2. 論文標題 Intraperitoneal Administration of Paclitaxel Combined with S-1 Plus Oxaliplatin as Induction Therapy for Patients with Advanced Gastric Cancer with Peritoneal Metastases	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Ann Surg Oncol	6. 最初と最後の頁 3863-3870
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1245/s10434-020-09388-4	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 Y. Meguro, H. Yamaguchi, J. Kitayama, R. Kanamaru, S. Matsumoto, T. Ui, H. Haruta, K. Kurashina, S. Saito, Y. Hosoya, A. K. Lefor, N. Sata.	4. 巻 6(1)
2. 論文標題 Pathological complete response after intraperitoneal paclitaxel and systemic combined chemotherapy in a patient with peritoneal metastases from gastric cancer: a case report	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Surg Case Rep	6. 最初と最後の頁 63
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s40792-020-00818-9	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 S. Saito, H. Yamaguchi, H. Ohzawa, H. Miyato, R. Kanamaru, K. Kurashina, Y. Hosoya, A. K. Lefor, N. Sata, J. Kitayama.	4. 巻 online
2. 論文標題 Intraperitoneal Administration of Paclitaxel Combined with S-1 Plus Oxaliplatin as Induction Therapy for Patients with Advanced Gastric Cancer with Peritoneal Metastases	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Ann Surg Oncol	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1245/s10434-020-09388-4	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 -

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山口 博紀, 金丸 理人, 高橋 和也, 加賀谷 文紘, 松本 志郎, 倉科 憲太郎, 齋藤 心, 大澤 英之, 細谷 好則, 佐田 尚宏, 北山 丈二
2. 発表標題 胃癌腹膜播種に対する腹腔内化学療法後 Conversion Surgery 治療成績の腹水量別解析
3. 学会等名 第60回日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 金丸 理人, 山口 博紀, 高橋 和也, 高木 徹, 倉科 憲太郎, 齋藤 心, 大澤 英之, 細谷 好則, 北山 丈二, 佐田 尚宏
2. 発表標題 4型スキルス胃癌・腹膜播種に対するパクリタキセル腹腔内投与（IP-PTX）併用SOX療法とConversion Surgery
3. 学会等名 第77回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高橋 和也, 大澤 英之, 金丸 理人, 松本 志郎, 倉科 憲太郎, 齋藤 心, 山口 博紀, 細谷 好則, 佐田 尚宏, 北山 丈二
2. 発表標題 胃癌腹膜播種における腹腔内免疫細胞の解析
3. 学会等名 第60回日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高橋和也, 大澤英之, 金丸理人, 倉科憲太郎, 齋藤心, 山口博紀, 細谷好則, 北山丈二, 佐田尚宏
2. 発表標題 Flow cytometryを用いた胃癌患者腹腔内免疫細胞の解析
3. 学会等名 第77回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松浦 博和, 金丸 理人, 金子 勇貴, 高橋 和也, 高木 徹, 倉科 憲太郎, 齋藤 心, 山口 博紀, 佐久間 康成, 川平 洋, 堀江 久永, 細谷 好則, 味村 俊樹, 北山 丈二, 佐田 尚宏
2. 発表標題 腹腔内化学療法後に胃切除術を施行しCRを認めた胃癌腹膜播種の2例
3. 学会等名 第94回日本胃癌学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 金丸 理人, 山口 博紀, 齋藤 心, 倉科 憲太郎, 大澤 英之, 高橋 和也, 金子 勇貴, 細谷 好則, 佐田 尚宏, 北山 丈二
2. 発表標題 IP-PTX+SOX療法に奏功を認めた腹膜播種陽性胃癌症例に対するconversion surgeryの適応と成績
3. 学会等名 第76回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 風當 ゆりえ, 北山 丈二, 田村 昂平, 金子 勇貴, 高橋 和也, 木村 有希, 齋藤 晶, 東條 峰之, 大澤 英之, 宮戸 秀世, 山口 博紀, 佐田 尚宏
2. 発表標題 マウス胃癌腹膜播種に対する抗PD-1抗体の治療効果の検討
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山口 博紀, 里井 壮平, 伊佐山 浩通, 高原 楠昊, 辻 靖, 藤井 努, 宮戸 秀世, 山田 豪, 島田 英昭, 北山 丈二
2. 発表標題 胃癌腹膜播種診療ガイドライン
3. 学会等名 第46回日本外科系連合学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 熊谷 祐子, 宮戸 秀世, 大澤 英之, 佐久間 康成, 堀江 久永, 細谷 好則, 佐田 尚宏, 山口博紀、北山 丈二
2. 発表標題 The effect of anti-PD-1 antibody for peritoneal metastasis of gastric cancer in immunocompetent mice.
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高橋 和也, 大澤 英之, 金丸 理人, 倉科 憲太郎, 齋藤 心, 山口 博紀, 細谷 好則, 佐田 尚宏, 北山 丈二
2. 発表標題 Flowcytometryを用いた胃癌患者腹腔内免疫細胞の解析
3. 学会等名 第58回日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山口 博紀, 石神 浩徳, 大澤 英之, 北山 丈二
2. 発表標題 胃癌腹膜播種に対する腹腔内化学療法とバイオマーカー
3. 学会等名 第58回日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山口 博紀, 北山 丈二, 金丸 理人, 齋藤 心, 倉科 憲太郎, 大澤 英之, 細谷 好則, 佐田 尚宏
2. 発表標題 胃癌腹膜播種、腹腔内投与併用化学療法奏効例におけるConversion Surgery
3. 学会等名 第50回胃外科・術後障害研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 北山丈二, 石神浩徳, 山口博紀, 大森健, 藪崎裕, 福島亮治, 今野元博, 伊藤誠二, 富田寿彦, 小寺泰弘
2. 発表標題 胃癌腹膜播種に対するタキサン腹腔内反復化学療法の現状と課題
3. 学会等名 第45回日本外科系連合会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shin Saito, Hironori Yamaguchi, Hideyo Miyato, Shiro Matsumoto, Rihito Kanamaru1, Hidenori Haruta, Kentaro Kurashina, Yoshinori Hosoya, Lefor Alan, Naohiro Sata, Joji Kitayama
2. 発表標題 Intraperitoneal paclitaxel treatment combined with SOX for gastric cancer with peritoneal metastasis
3. 学会等名 第92回日本胃癌学会総会
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
研究分担者	北山 丈二 (Kitayama Joji) (20251308)	自治医科大学・医学部・教授 (32202)	
研究分担者	佐田友 藍 (Sadatomo Ai) (40528585)	自治医科大学・医学部・助教 (32202)	
研究分担者	伊藤 大知 (Ito Daichi) (50447421)	東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・教授 (12601)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究 分 担 者	相澤 健一 (Aizawa Kenichi) (70436484)	自治医科大学・医学部・准教授 (32202)	
研究 分 担 者	宮戸 秀世 (Miyato Hideyo) (90813163)	自治医科大学・医学部・講師 (32202)	

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