

令和 5 年 5 月 25 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09431

研究課題名（和文）転移性骨・脊椎腫瘍に対する局所凍結療法のがん特異的免疫増強効果の検証

研究課題名（英文）Immunoenhancing Effects after Local Cryoablation for Metastatic Bone Tumor

研究代表者

加藤 仁志 (Kato, Satoshi)

金沢大学・附属病院・助教

研究者番号：30584841

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）：C3H/HeSlcマウスの両側脛骨に乳癌細胞を植え込み、左側は局所治療としてCryoablation（CA）を施行し、右側は未治療としてAbscopal効果を評価した（Abscopal tumor: AT）。CAと、抗PD-1抗体腹腔内投与（PD）の2種類の治療の組み合わせにより4群に分けた（Control、CA、PD、CA+PD、各群n=8）。ATのサイズ変化、ELISPOT assayによる定量的免疫評価、免疫染色を用いたATへのCD4、CD8、FoxP3陽性T細胞の浸潤強度を比較検討した。本研究において、CA単独によるがん特異的免疫の上昇および抗PD-1抗体による増強効果が確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究より、Cryoablationのがん特異的免疫効果と抗PD-1抗体による増強を示した。この結果は骨転移に対する局所治療の意義をさらに高める。骨関連事象に対する手術にCryoablation併用することで、腫瘍の局所制御効果の増強に他の遠隔転移巣に対するがん免疫効果の増強が付加されるHybrid surgeryの開発を目指している。特に、Performance Status低下や手術介入の機会が多い脊椎転移の患者にとっては本研究が目指すHybrid surgery恩恵は大きい。今後はがん免疫上昇効果におけるCryoablationの有利性について他の局所療法を比較検討する予定である。

研究成果の概要（英文）：We investigated the abscopal effect after cryoablation (CA) on bone metastasis using a mouse model. Breast cancer cells were implanted in the bilateral tibiae of mice. The left tumor was treated locally with CA, and the right abscopal tumor (AT) was left untreated. The mice were divided into four groups based on the combination of CA and intraperitoneal administration of anti-PD-1 antibody (PD) as treatment interventions (Control, CA, PD, and CA + PD). The reduction ratio of the size of AT, the quantitative immune effects at enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay, and the intensity of infiltration of immune-related cells to AT were compared among the groups. The results suggested that the abscopal effect associated with the local cryotherapy of metastatic bone tumors was activated by CA and enhanced by its combination with PD.

研究分野：整形外科

キーワード：転移性骨腫瘍 凍結療法 免疫増強

1. 研究開始当初の背景

脊椎は骨転移の好発部位である。近年のがんに対する集学的治療の進歩により生命予後は延長され、脊椎転移を有するがん患者は急増している。脊椎転移は多発病変のことが多く、除圧術や固定術といった局所治療に加え遠隔転移巣の制御が期待できる免疫療法を付加する方法が望まれている。近年、放射線療法、塞栓療法、焼灼療法、凍結療法等のがん局所治療後に未治療の遠隔転移巣が縮小する現象が報告されている。腫瘍細胞死を引き金とするがん特異的免疫賦活化と考えられており、Abscopal 効果と総称され注目されている。局所療法のうち、凍結療法の一つとして Cryoablation (CA) があり、腎癌などに対し施行されている。低侵襲性、放射線抵抗性腫瘍への応用可能性などから脊椎をはじめとする骨転移に対しても臨床応用が検討されている。一方で、骨転移に対し CA を施行した際の Abscopal 効果についてはまだ検証がされていない。さらに、臨床分野においては、局所療法単独では十分な Abscopal 効果を得にくいとする考え方が主流となってきており、抗 PD-1 抗体等のアジュバントを用いて治療効果を高める方法が提唱されている。

2. 研究の目的

本研究ではマウス骨転移モデルを用い、CA による Abscopal 効果を検証するとともに、免疫チェックポイント阻害薬との相乗効果について調査することを目的とした。

3. 研究の方法

C3H マウスの両側脛骨に乳がん細胞 MMT を植え込み、骨転移モデルを作成した(図1)。過去の報告を参考に作成したデバイスを用い、左側腫瘍は局所治療として CA を施行し(図2)、右側腫瘍は未治療として Abscopal 効果の評価した (Abscopal tumor: AT)。治療介入として CA と、抗 PD-1 抗体腹腔内投与 (PD) の 2 種類を行い、それらの組み合わせにより 4 群に分けた (Control 群、CA 群、PD 群、CA + PD 群、各群 n=8)。評価項目として、治療介入日から 7 日目、14 日目における AT の腫瘍サイズ変化、脾臓細胞から採取した末梢血単核球細胞を用いた ELISPOT assay による定量的免疫上昇効果、そして免疫染色を用いた AT への CD4、CD8、FoxP3 陽性 T 細胞浸潤の強度を比較検討し、各群で Abscopal 効果の評価を行った。統計学的解析には、Kruskal-Wallis 検定を用い、 p 値が 0.05 未満を統計学的に有意と判定した (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)。

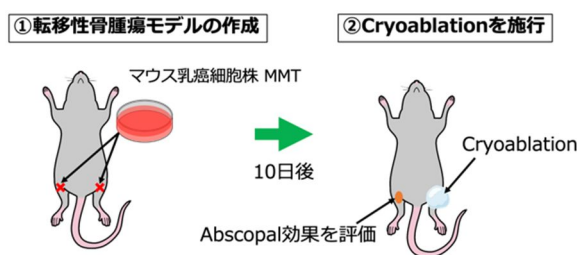


図1 転移性骨腫瘍モデルの作成

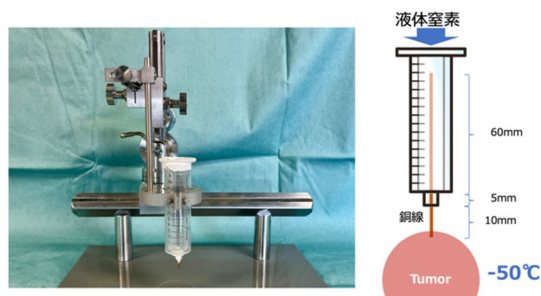


図2 腫瘍の凍結デバイスと方法

4. 研究成果

治療介入後 7 日目において、Control 群に比較し PD 群、CA+PD 群に有意な AT サイズの縮小効果が認められた。治療介入後 14 日目では、Control 群に比較し CA 群、PD 群、CA+PD 群に有意な腫瘍縮小効果が認められた(図3)。ELISPOT assay においては、Control 群に比較し、CA 群と、CA+PD 群がそれぞれ有意に SPOT 数の増加を認めた(図4)。さらに、AT 組織の免疫染色においては、Control 群に比較し、PD 群、CA+PD 群において CD8⁺ T 細胞が有意に増加しており、CA 群、CA+PD 群間にも有意差を認めた(図5)。

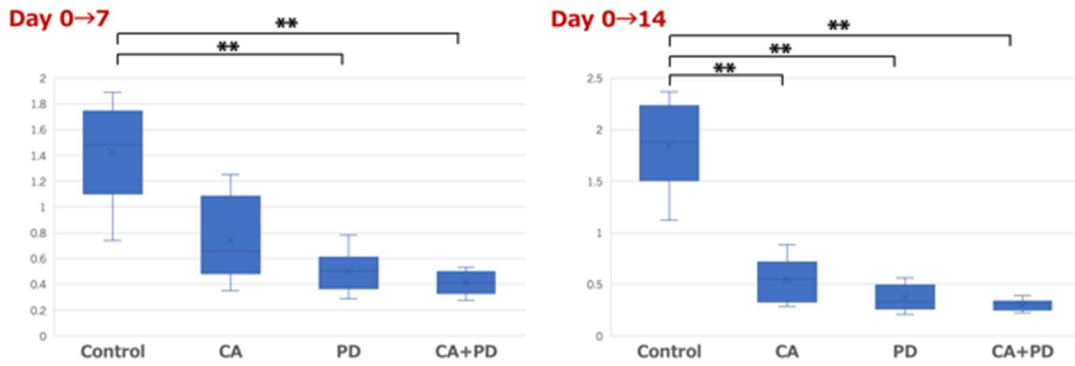


図3 ATサイズの変化

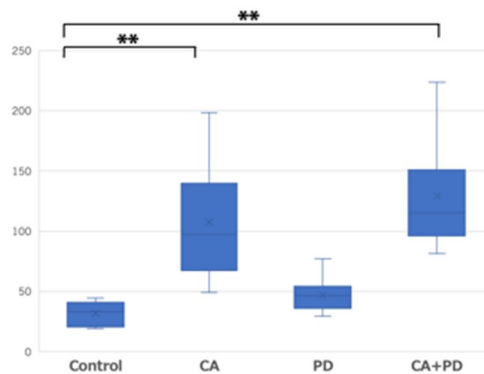


図4 ELISPOT assay の SPOT 数

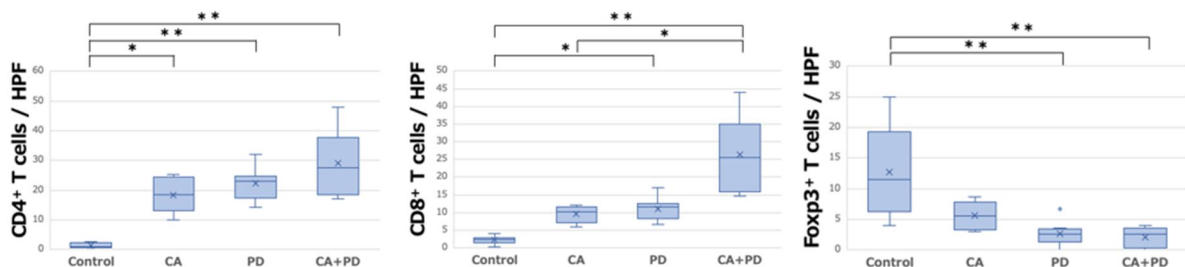


図5 免疫染色の陽性細胞数

これまでの報告において、焼灼療法等の局所療法単独では十分な免疫上昇効果が得られないとする報告がある。しかし、Cryoablation においては他の局所療法に比較し、腫瘍抗原の変性が少ない点、免疫反応の応答性が良い点等からがん免疫賦活化による全身的治療効果が期待される。本研究でえられた結果のうち、腫瘍サイズ、ELISPOT assay、免疫染色における遠隔腫瘍への免疫関連細胞浸潤のカウントにおいて、Cryoablation 単独による有意な免疫上昇効果を確認することができた。これは局所療法単独では Abscopal 効果が得られにくいとされる報告に対し、凍結療法の優位点と考えられた。

さらに、過去の基礎研究、臨床研究いずれにおいても Cryoablation と抗 PD-1 抗体等のアジュバントを併用することで、がん免疫の相乗効果がえられるとする報告がある。今回の実験においても免疫染色での CD8、Foxp3 陽性 T 細胞数のカウントにおいて Cryoablation 単独治療介入では有意な T 細胞数の増加あるいは減少を認めなかったのに対し、抗 PD-1 抗体を併用した CA+PD 群において有意な T 細胞数の増加・減少を認めた。これにより Cryoablation と抗 PD-1 抗体による免疫効果の増強が確認された。

本研究は、骨関連事象予防としての手術介入に加え、Cryoablation 等の局所療法を行うことで、遠隔転移兼治療としての全身のがん免疫が付加される Hybrid surgery への可能性を示唆したと考える。特に、増加の一途をたどっているにもかかわらず、有効な治療法が少なく、個別化医療が実施されているとは言い難い脊椎転移を有する患者にとっては本研究の臨床応用によって享受される恩恵は多大なものと考えられる。今後はがん免疫上昇効果の観点において、他の局所療法に対する Cryoablation の有利性を検討していくことが望まれる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Satoshi Kato, Satoru Demura, Kazuya Shinmura, Noriaki Yokogawa, Takaki Shimizu, Hideki Murakami, Norio Kawahara, Katsuro Tomita, Hiroyuki Tsuchiya	4. 巻 26
2. 論文標題 Surgical Metastasectomy in the Spine: A Review Article	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oncologist	6. 最初と最後の頁 e1833-e1843
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/onco.13840.	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 Ryohei Annen, Satoshi Kato, Satoru Demura, Shinji Miwa, Akira Yokka, Kazuya Shinmura, Noriaki Yokogawa, Noritaka Yonezawa, Motoya Kobayashi, Yuki Kurokawa, Toshifumi Gabata and Hiroyuki Tsuchiya	4. 巻 23
2. 論文標題 Tumor-Specific Immunoenhancing Effects after Local Cryoablation for Metastatic Bone Tumor in a Mouse Model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 9445
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms23169445.	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5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 安念遼平、加藤仁志、出村諭、新村和也、横川文彬、米澤則隆、半田真人、小林源哉、山田遥平、長谷賢、土屋弘行
2. 発表標題 転移性骨腫瘍に対する局所凍結療法のがん特異的免疫増強効果
3. 学会等名 第94回日本整形外科学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 安念遼平、加藤仁志、出村諭、新村和也、横川文彬、米澤則隆、半田真人、小林源哉、山田遥平、土屋弘行
2. 発表標題 転移性骨腫瘍に対する局所凍結療法のがん特異的免疫増強効果
3. 学会等名 第36回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 安念遼平、加藤仁志、出村諭、新村和也、横川文彬、米澤則隆、半田真人、小林源哉、山田遥平、長谷賢、土屋弘行
2. 発表標題 転移性骨腫瘍に対する局所凍結療法のがん特異的免疫増強効果
3. 学会等名 第51回日本脊椎脊髄病学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 安念遼平、加藤仁志、出村諭、新村和也、横川文彬、米澤則隆、半田真人、小林源哉、山田遥平、長谷賢、土屋弘行
2. 発表標題 転移性骨腫瘍に対する局所凍結療法のがん特異的免疫増強効果
3. 学会等名 第95回日本整形外科学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 安念遼平、加藤仁志、出村諭、新村和也、横川文彬、米澤則隆、半田真人、小林源哉、山田遥平、長谷賢、土屋弘行
2. 発表標題 転移性骨腫瘍に対する局所凍結療法のがん特異的免疫増強効果
3. 学会等名 第37回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2022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
研究協力者	安念 遼平 (Annen Ryohei)		

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
研究協力者	米澤 則隆 (Yonezawa Noritaka)		
研究協力者	野島 孝之 (Nojima Takayuki)		
研究協力者	土屋 弘行 (Tsuchiya Hiroyuki)		

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