

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：23903
研究種目：若手研究
研究期間：2020～2023
課題番号：20K18006
研究課題名（和文）転移性骨腫瘍に対する凍結免疫と免疫チェックポイント阻害薬による治療法の開発

研究課題名（英文）The development of the strategy for the treatment of metastatic bone tumors with cryoimmunology

研究代表者
相羽 久輝 (Hisaki, Aiba)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院（医学）・助教

研究者番号：70793834
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：がん凍結免疫は、がん細胞を凍結することによりがん抗原が全身に放出される現象である。がん抗原が全身の免疫を賦活化効果はアブスコパル効果として報告されている。今回我々は、転移性骨腫瘍に対する凍結腫瘍骨移植による凍結免疫の賦活化作用、及び免疫チェックポイント阻害薬による併用療法の上乗せ効果検討する実験を行った。乳がん細胞株を用いた検証では、凍結腫瘍骨移植を行うことで、転移性骨腫瘍に対するアブスコパル効果は確認出来たが、免疫チェックポイント阻害薬との併用効果は認められなかった。現在、最終年度までのデータを検証し、他のがん腫での解析を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

転移性骨腫瘍は進行期に発見されることが多く難治性の病態とされているが、凍結免疫を用いた骨腫瘍の治療法により、予後改善につながる可能性がある。免疫状態が賦活化されることメカニズムが解明されることで、今後有効な薬物療法や手術方法の開発の一助となりうる。我々の行った実験は転移性骨腫瘍に対するアブスコパル効果の評価モデルとしてオリジナリティがあり、研究手法としても今後有用であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Cryo-immunology is a phenomenon in which cancer antigens are released throughout the body by freezing cancer cells. The activation effect of the immune system by these antigens has been reported as the Abscopal effect.

In this study, we conducted an experiment to investigate the activation effect of cryo-immunology by frozen tumor bone transplantation on metastatic bone tumor models, as well as the additional effect of combination therapy with immune checkpoint inhibitors. In verification using breast cancer cell lines, we confirmed the Abscopal effect on metastatic bone tumors by performing frozen tumor bone transplantation, but no additional effect was observed with the combination of immune checkpoint inhibitors. Currently, we are verifying the data up to the final year and proceeding with analysis of other cancer types.

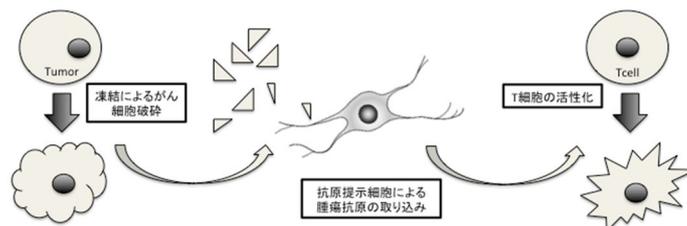
研究分野：Orthopaedic oncology

キーワード：metastatic bone tumor

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

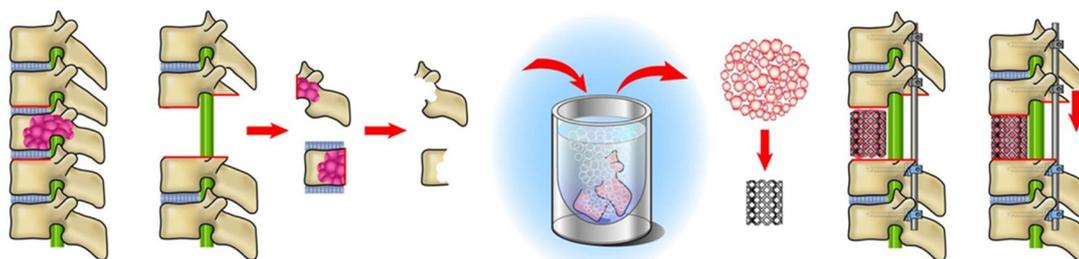
1. 研究開始当初の背景

癌凍結療法は 1840 年代より開発され、1960 年代より癌細胞を凍結することにより癌抗原が全身に放出される現象として報告された。また、放射線治療により破砕された癌細胞が全身の免疫を不活化する Abscopal 効果も同時期に報告されている(図 1)。これまで 2000 年代より、様々な癌種において凍結療法が臨床応用されているが、癌細胞独自の免疫回避機能により十分な効果があるとは言えない。



(図 1 凍結免疫の賦活化)

転移性脊椎腫瘍や原発性脊椎腫瘍に対して、腫瘍脊椎骨全摘術(total en bloc spondylectomy [TES])は、局所的な根治的切除であるが、我々は第二世代 TES として、切除した腫瘍脊椎骨から椎間板を含めた周囲の軟部組織と腫瘍部分を搔爬し、その腫瘍脊椎骨を液体窒素で凍結した凍結処理骨を再建に用いている。すなわち、凍結免疫を賦活化させることを目的に、凍結処理骨を小さく砕いて移植骨としてケージ内に十分にパッキングし、そのケージを椎体間に挿入することにより、凍結処理骨を生体内に戻している(図 2)。



(図 2 腫瘍脊椎骨全摘術)

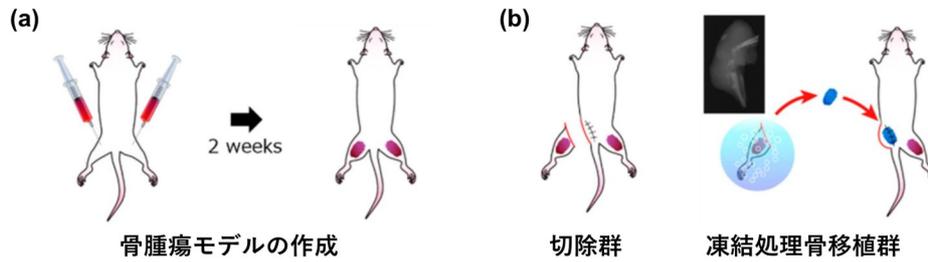
2010 年から 2017 年にかけて転移性脊椎腫瘍に対して、TES と同時に凍結腫瘍骨による椎体再建を行った転移性脊椎腫瘍 97 例のうち、肺転移やリンパ節転移を有していた症例を 46 例認めたが、うち約 10%程度の症例で術後全身治療を行わず、他の転移巣の自然縮小をみとめたと報告されている。また、進行期腎細胞癌では血管新生阻害薬治療後に増悪した転移性病変において、免疫チェックポイント阻害薬であるニボルマブの投与が腎癌診療ガイドラインにおいて適応となっているが、手術による凍結免疫の賦活化と免疫チェックポイント阻害薬を組み合わせることにより更なる免疫賦活効果が期待される。

2. 研究の目的

我々は凍結免疫の賦活化と免疫チェックポイント阻害薬の併用療法が有用であることを検証することを目的として基礎的・臨床的に研究を行う計画である。

3. 研究の方法

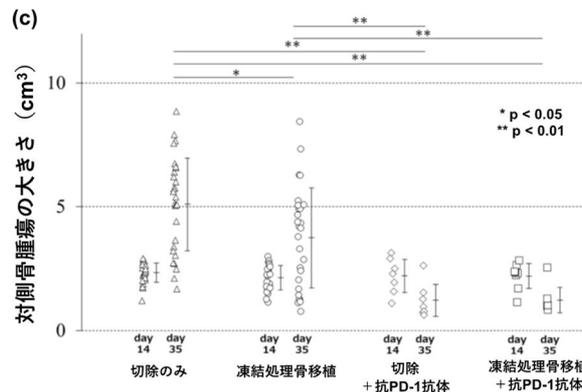
我々は、様々な癌種における細胞株(マウス乳癌細胞株 MMT、腎癌細胞株 RENCA、肺腺癌株 LLC)を用いて作成した転移性骨腫瘍マウスモデル(図 3)に対して、1)腫瘍切除群、2)腫瘍骨切除+抗 PD-1 抗体投与群、3)凍結処理骨移植群、4)凍結処理骨移植+抗 PD-1 抗体投与群、の 4 群に分けて比較検討を行い、治療後 3 週目に各群のマウスの脾臓を採取し、ELISA、フローサイトメトリー法、リアルタイム PCR 法による解析を行い、リンパ球の分布割合、M1/M2 マクロファージの割合、樹状細胞の活性化、サイトカイン定量の比較検討を行う。これにより凍結処理骨移植の免疫活性に与える影響を調査し、免疫賦活効果のメカニズムの解析を細胞・分子レベルで詳細に行うことで、次なる治療ターゲットとなる因子の模索を行う。



(図3 骨腫瘍モデルの作成および凍結処理骨移植の方法)

4. 研究成果

基礎研究としては、乳がん細胞株を用いた検証では、凍結処理骨移植後2週間の対側腫瘍の平均腫瘍体積は、切除群、凍結処理骨移植群、切除+抗PD-1治療群、凍結処理骨移植+抗PD-1治療群でそれぞれ 2.4 ± 0.4 、 2.1 ± 0.5 、 2.2 ± 0.6 、 2.2 ± 0.5 cm³であった。4群間で腫瘍体積に有意差はなかった ($p = 0.48$)。凍結処理骨移植後3週間での対側アプスコパル腫瘍の平均腫瘍体積は、切除群、凍結処理骨移植群、切除+抗PD-1治療群、凍結処理骨移植+抗PD-1治療群でそれぞれ 5.1 ± 1.9 、 3.7 ± 2.0 、 1.2 ± 0.6 、 1.2 ± 0.5 cm³であり、4つのグループ間で腫瘍の体積に有意差を認めた (図4)。凍結処理骨移植の対側腫瘍の体積は、切除群よりも有意に低かった ($p = 0.03$)が、この効果は抗PD-1治療での上乗せ効果は確認されなかった。



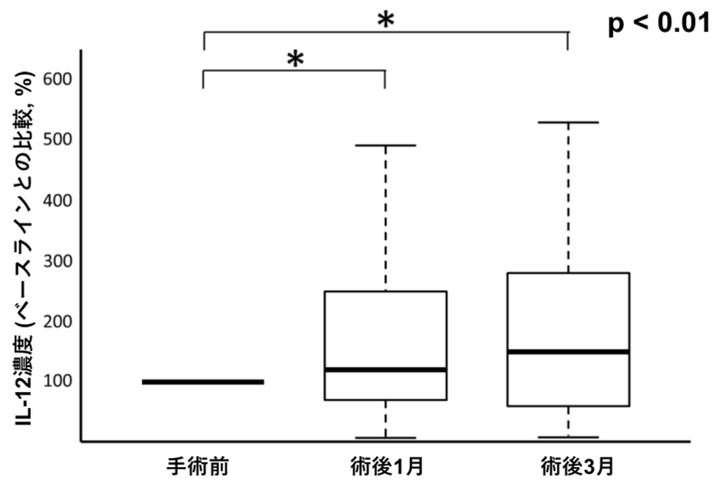
(図4 凍結処理骨移植を併用した第二世代 TES 後の免疫賦活効果)

また病理学的に対側腫瘍に浸潤する CD8+T 細胞は、切除群、凍結処理骨移植群、切除+抗PD-1治療群、凍結処理骨移植+抗PD-1治療群でそれぞれ 13.9 ± 11.0 、 18.8 ± 15.2 、 40.9 ± 25.5 、 45.7 ± 21.0 個であった (high power field)。4つのグループ間には有意差を認め ($p < 0.01$)、凍結処理骨移植+抗PD-1治療群における対側腫瘍への CD8+ T細胞浸潤数は、切除群 ($p = 0.0017$) および凍結処理骨移植 ($p = 0.0119$) よりも有意に多かった。また凍結処理骨移植+抗PD-1抗体治療群では、切除+抗PD-1抗体治療群よりも対側腫瘍に浸潤する CD8+ T細胞の数が多くなる傾向があったが、2つのグループ間に有意差はなかった ($p = 0.9623$)。

腫瘍特異的 T 細胞がエフェクター機能を発揮できるかどうかを調べるために、インターフェロン (IFN- γ) 分泌の酵素結合免疫スポット (ELISPOT) アッセイを実施した。凍結処理骨移植後、摘出した脾臓組織を乳がん細胞株である MMT-060562 細胞とともに 24 時間インキュベートし、腫瘍反応性細胞による IFN- γ 分泌を誘導した。腫瘍特異的 IFN- γ 産生細胞の数は、ELISPOT アッセイを使用して測定した。IFN- γ 産生脾臓細胞の平均スポット数は、切除群、凍結処理骨移植群、切除+抗PD-1治療群、凍結処理骨移植+抗PD-1治療群でそれぞれ 6.0 ± 3.9 、 20.5 ± 30.0 、 93.9 ± 96.3 、 59.3 ± 52.5 であった。4群間に有意差を認めた ($p < 0.05$)。凍結処理骨移植+抗PD-1抗体治療群における治療後の IFN- γ 産生脾細胞のスポット数は、切除群よりも有意に多かった ($p = 0.0051$)。切除+抗PD-1抗体治療群における治療後の IFN- γ 産生脾細胞のスポット数は、切除群よりも有意に多かった ($p = 0.0189$) が、切除群と凍結処理骨移植群の間には有意差はなかった ($p = 0.69$)。また、切除+抗PD-1抗体治療群と凍結処理骨移植+抗PD-1抗体治療群の間には有意差はなかった ($p = 0.93$)。

臨床的には、凍結処理骨移植を併用した第二世代 TES 後の免疫賦活効果を IL-12 に注目し、検証を行った。IL-12 は NK 細胞・CD8 陽性 T細胞を刺激する因子であり、樹状細胞から生成されるサイトカインである。2010 年以降に手術が行われた 56 例に関して、手術前・手術後 1 ヶ月・3 ヶ月の IL-12 を測定したところ、IL-12 は 52 例中 38 例 (73.1%) で手術後に

増加し、手術後 1 ヶ月と 3 ヶ月の両方で平均 IL-12 相対濃度は手術前と比較して有意に高値であった(図 4)。また、乳がん 1 例、甲状腺がん 2 例で、術後抗がん剤治療なしでリンパ節の縮小や腫瘍マーカーの減少が見られ、アブスコパル効果が関与していた可能性が示唆された



(図 5 凍結処理骨移植を併用した第二世代 TES 後の免疫賦活効果)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Aiba Hisaki, Nakazato Tomoharu, Matsuo Hideo, Kimura Hiroaki, Saito Shiro, Sakai Takao, Murakami Hideki, Kawai Jun, Kawasaki Shingo, Imamura Yasuhiro	4. 巻 11
2. 論文標題 Bone Metastases from Gastric Cancer Resembling Paget's Disease: A Case Report	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Medicine	6. 最初と最後の頁 7306 ~ 7306
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jcm11247306	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takeuchi Akihiko, Endo Makoto, Kawai Akira, Nishida Yoshihiro, Terauchi Ryu, Matsumine Akihiko, Aiba Hisaki, Nakamura Tomoki, Tandai Susumu, Ozaki Toshifumi, Hoshi Manabu, Kayano Daiki, Okuda Miho, Yamamoto Norio, Hayashi Katsuhiko, Miwa Shinji, Igarashi Kentaro	4. 巻 12
2. 論文標題 Randomized placebo-controlled double-blind phase II study of zaltoprofen for patients with diffuse-type and unresectable localized tenosynovial giant cell tumors: The REALIZE study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Oncology	6. 最初と最後の頁 0
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fonc.2022.900010	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Aiba Hisaki, Spazzoli Benedetta, Tsukamoto Shinji, Mavrogenis Andreas F., Hermann Tomas, Kimura Hiroaki, Murakami Hideki, Donati Davide Maria, Errani Costantino	4. 巻 30
2. 論文標題 Current Concepts in the Resection of Bone Tumors Using a Patient-Specific Three-Dimensional Printed Cutting Guide	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Current Oncology	6. 最初と最後の頁 3859 ~ 3870
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/curroncol30040292	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Aiba Hisaki, Suzuki Nobuyuki, Sagawa Hiroyuki, Hashimoto Hiroya, Kimura Hiroaki, Inoue Jumpei, Usami Takuya, Goto Yuta, Mizuno Yuichiro, Okubo Tomotaka, Ito Sunao, Takiguchi Shuji, Murakami Hideki	4. 巻 11
2. 論文標題 Protocol for a randomized study of the efficacy of ibandronic acid plus eldecacitol in patients with gastric cancer after gastrectomy: A comparative study of different routes of administration of ibandronic acid	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 F1000Research	6. 最初と最後の頁 796 ~ 796
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.12688/f1000research.122741.1	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	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 1件）

1. 発表者名 相羽久輝
2. 発表標題 Tail-like lesionを有する悪性軟部腫瘍に対する術前療法の効果に関する検討 東海骨軟部腫瘍コンソーシアム多施設共同研究
3. 学会等名 日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 相羽久輝
2. 発表標題 全身性の骨硬化病変を認めた胃癌患者の一例
3. 学会等名 日本骨粗鬆症学会
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 相羽久輝
2. 発表標題 胃切除後胃癌患者におけるエルデカルシトロール+イバンドロン酸の有用性の検討～内服製剤と注射製剤の比較試験～
3. 学会等名 日本骨粗鬆症学会
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 相羽久輝
2. 発表標題 ハイパーサーミアガイドラインの解説: 軟部肉腫
3. 学会等名 日本ハイパーサーミア学会
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 Aiba H
2. 発表標題 CLINICAL CHARACTERISTICS OF PRIMARY CUTANEOUS AND SUBCUTANEOUS EWING SARCOMA FAMILY OF TUMORS
3. 学会等名 Connective Tissue Oncology Society 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年～2023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	村上 英樹 (Murakami Hideki)		
研究協力者	木村 浩明 (Kimura Hiroaki)		
研究協力者	米澤 則隆 (Yonezawa Noritaka)		

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
---------	---------