

令和 6 年 5 月 25 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08749

研究課題名(和文) 免疫チェックポイント阻害剤の耐性克服を目指した革新的温熱複合療法の開発

研究課題名(英文) Development of a innovative combination therapy of hyperthermia and immune checkpoint inhibitors

研究代表者

佐野 彰彦 (Sano, Akihiko)

群馬大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：20431702

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)：胃癌切除検体198症例について、免疫染色における核内におけるHSP110高発現群は、低発現群と比較し有意に予後不良であり、病理学的な静脈侵襲の有無とHSP110発現に有意な相関がみられ、PD-L1発現とHSP110発現は統計学的に有意な相関がみられた。マウス大腸癌細胞株(MC38)を用いた検証では、HSP阻害薬(KNK437) + 温熱療法(42℃, 2時間)により抗腫瘍効果が得られることが確認された。担癌マウスを用いた動物実験に対して、Hot Plate Methodを用いた温熱療法を実施することで、Tumor volumeの有意な減少がみられることが確立出来た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

難治性消化器癌に対する新たな治療戦略として、免疫チェックポイント阻害薬(ICI)を用いた治療が期待されているが、低免疫原性の腫瘍においては治療効果が乏しいことが報告されている。胃癌切除検体における検討で、腫瘍細胞核内におけるHSP110発現が予後不良因子として同定され、PD-L1発現とHSP110発現に有意な相関がみられた。また細胞実験によりHSP阻害薬と温熱療法を併用することにより、抗腫瘍効果が得られることが確認された。

本研究により、HSP阻害薬 + 温熱療法とICI療法の組み合わせが新たな治療戦略となり得ることが期待される。

研究成果の概要(英文)：In 198 gastric cancer resection specimens, the group with high nuclear HSP110 expression in immunostaining had a significantly poorer prognosis than the low expression group, and there was a significant correlation between the presence or absence of pathological venous invasion and HSP110 expression. There was a statistically significant correlation between PD-L1 expression and HSP110 expression. Verification using a mouse colon cancer cell line (MC38) confirmed that an HSP inhibitor (KNK437) plus hyperthermia (42 °C, 2 hours) had an antitumor effect. In an animal experiment using tumor-bearing mice, we were able to establish that a significant decrease in tumor volume was observed by implementing hyperthermia using the Hot Plate Method.

研究分野：消化管外科

キーワード：HSP110 PD-L1 Hyperthermia

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

消化管癌において、遠隔転移を来した治癒切除不能進行癌症例、再発症例で薬物療法に抵抗性を示す難治例の予後は依然として不良である。近年、免疫チェックポイント阻害薬(ICI)が開発され、消化管癌に対しても適応となっている。しかし治療前に PD-1/PD-L1 シグナルによる免疫寛容が誘導されておらず、CD8 陽性 T 細胞 (細胞傷害性 T 細胞: CTL)が腫瘍内に浸潤していない低免疫原性の腫瘍塊、いわゆる Cold tumor と言われる症例には ICI が治療効果を示さないことが報告されている。現在、DNA ダメージ誘導(温熱、抗がん剤、放射線)やがんワクチン・腫瘍溶解性ウイルス・TGF 阻害剤などを利用して、Cold tumor を ICI が薬効を示しうる Hot tumor (免疫原性が高く炎症細胞浸潤が活発な状態)に変換させる治療戦略が注目されている。

これまで温熱治療により誘導される Heat shock proteins (HSPs)と温熱治療による切除不能進行癌治療に関する研究が継続されてきた。腫瘍免疫と HSPs に関して、食道癌細胞質で高発現する HSP110 は腫瘍浸潤リンパ球の亢進と関連し予後マーカーとなることを報告している。また、温熱療法により誘導される HSPs(HSP70, HSP90, HSP110)が腫瘍免疫を活性化し、以前より癌抗原として免疫細胞を癌部に誘導するがんペプチドワクチンの候補としても報告されている。

これらの知見から、切除不能進行癌に対して有望な温熱治療は、HSPs 誘導を介して Cold tumor を Hot tumor に変換することが示唆されるが、温熱療法と ICI の関連については十分に検討されていない。

2. 研究の目的

温熱療法により Cold tumor を Hot tumor 化できるか、そのメカニズムとして HSPs がどう関与しているかを解明することを目的とする。また、HSP 阻害剤/温熱療法と免疫療法の組み合わせが、腫瘍細胞、宿主細胞(免疫細胞、間質細胞)に与える効果を検証する。

3. 研究の方法

1) 胃癌切除検体における免疫チェックポイントタンパク、HSPs 発現評価胃癌切除検体を用いて免疫染色法で PD-1/PD-L1/CTLA4, リンパ球マーカー(CD8, CD4), マクロファージマーカー(CD163), 制御性 T 細胞マーカー(FOXP3), 増殖能マーカー(Ki67), DNA ダメージマーカー(リン酸化 H2AX), HSPs (HSP70, HSP90, HSP110)発現を評価し、近年注目されている免疫関連タンパクと HSPs の発現相関を検証する。

2) マウス大腸癌細胞株を用いた担癌モデル(皮下腫瘍)に対する温熱治療と免疫チェックポイント阻害薬の併用効果の検証:

大腸癌細胞株をマウスの皮下に投与することで担癌モデルを作成する。皮下腫瘍に対する温熱ならびに免疫チェックポイント阻害剤の併用効果は腫瘍径で評価する。ICI と温熱との併用効果は不明であり、本研究で検討する。

Control 群 vs 温熱群(42℃, 120分) vs 抗 PD-1 抗体群(200 µg/mouse) vs 温熱+ICI 併用群(各群 n=6)

* 各種免疫チェックポイント阻害剤は、腫瘍移植後 Day3, 6, 9 に腹腔内投与する。温熱と併用する免疫チェックポイント阻害剤治療は抗 PD-1 抗体, 抗 PD-L1 抗体, 抗 CTLA4 抗体の3種類で実施予定とする。

治療開始後 1 週、2 週、4 週時点での皮下腫瘍巢を用いて HE 染色、Cold tumor から Hot tumor への変換を示唆する所見(PD-L1, CD8, IFN- γ , グランゼイム B, HSPs など)と温熱治療/ICI 治療の関係を検証する。

3) 動物実験で採取された腫瘍検体を用いて Whole transcriptome 解析を実施し腫瘍免疫関連 signature、HSPs 発現、並びに既存の腫瘍関連蛋白と温熱治療の関係を明らかにする。

4. 研究成果

1) 胃癌切除検体における免疫チェックポイントタンパク、HSP 発現評価：

治癒切除を行った臨床検体 198 症例について、免疫染色にて HSP110 発現を検討した。核内における HSP110 高発現群は、低発現群と比較し、有意に予後不良であった。臨床病理学的因子との検討では、腫瘍径、腹膜播種の有無、リンパ節転移の有無、分化度との相関は認めなかったが、病理学的な静脈侵襲の有無と HSP110 発現に有意な相関がみられた。リンパ球マーカー(CD8)との相関は認めなかった。PD-L1 発現と HSP110 発現は統計学的に有意な相関がみられた。

2) 細胞株を用いた温熱治療の意義の検証：

GeneX 抑制細胞株における温熱治療の意義の検討として、TE8 細胞株および HCT116 細胞株を用い、温熱および Gene X 抑制による細胞増殖の抑制が確認され、Gene X 抑制と温熱治療を併用することにより、有意に増殖が抑制された結果が得られた。また、膵癌細胞株である SUIT2 の CCK8 アッセイによる Gene Y 抑制と温熱感受性の変化に対する検討では、Gene Y 抑制により温熱治療の感受性が増強することが確認された。マウス大腸癌細胞株(MC38)を用いた検証では、HSP 阻害薬(KNK437) + 温熱療法(42℃, 2時間)により抗腫瘍効果が得られることが確認された。

3) 担癌モデルを用いた動物実験による検証：

担癌マウスを用いた動物実験に対して、Hot Plate Method を用いた温熱療法を実施することで、Tumor volume の有意な減少がみられることが確立出来た。胃癌腹膜播種モデルにおける腹腔内温熱加療の意義について、ルシフェラーゼアッセイを用いた腹膜播種モデルマウスによる定量的評価が可能となることが予備実験として確認出来ている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Okami Haruka, Ozawa Naoya, Sohda Makoto, Yokobori Takehiko, Osone Katsuya, Erkhem-Ochir Bilguun, Dorjkhloroo Gendensuren, Shiraishi Takuya, Okada Takuhisa, Sano Akihiko, Sakai Makoto, Miyazaki Tatsuya, Ogawa Hiroomi, Yao Takashi, Oike Takahiro, Sato Hiro, Shirabe Ken, Shibata Atsushi, Saeki Hiroshi	4. 巻 24
2. 論文標題 HLA Class I Expression Is Associated with DNA Damage and Immune Cell Infiltration into Dysplastic and Neoplastic Lesions in Ulcerative Colitis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 13648 ~ 13648
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms241713648	査読の有無 有
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 該当する

1. 著者名 SANO AKIHIKO, SOHDA MAKOTO, HOSOI NOBUHIRO, TATENO KOHEI, WATANABE TAKAYOSHI, UCHIDA SHINTARO, NAKAZAWA NOBUHIRO, OSONE KATSUYA, OKADA TAKUHISA, SHIRAISHI TAKUYA, SAKAI MAKOTO, OGAWA HIROOMI, SHIRABE KEN, SAEKI HIROSHI	4. 巻 43
2. 論文標題 Importance of Progression-free Survival in Second-line Chemotherapy in Patients With Advanced or Recurrent Gastric Cancer	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 5205 ~ 5213
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancer.16722	査読の有無 有
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 該当する

1. 著者名 Sano Akihiko, Sohda Makoto, Hosoi Nobuhiro, Tateno Kohei, Watanabe Takayoshi, Nakazawa Nobuhiro, Shioi Ikuma, Shibasaki Yuta, Okada Takuhisa, Osone Katsuya, Shiraishi Takuya, Sakai Makoto, Ogawa Hiroomi, Okabe Hiroshi, Shirabe Ken, Saeki Hiroshi	4. 巻 34
2. 論文標題 A Novel Method for Thoracoscopic Overlap Esophagogastric Reconstruction With Pleural Closure following Minimally Invasive Ivor-Lewis Esophagectomy for Esophagogastric Junction Cancer	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Surgical Laparoscopy, Endoscopy & Percutaneous Techniques	6. 最初と最後の頁 108 ~ 112
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/SLE.0000000000001250	査読の有無 有
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 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Akihiko Sano, Makoto Sohda, Kohei Tateno, Takayoshi Watanabe, Nobuhiro Nakazawa, Ikuma Shioi, Takuhisa Okada, Katsuya Osone, Takuya Shiraishi, Makoto Sakai, Hiroomi Ogawa, Ken Shirabe, Hiroshi Saeki
2. 発表標題 Risk Factor of Anastomotic Leakage after Transhiatal Resection for Esophagogastric Junction Cancer
3. 学会等名 The 15th International Gastric Cancer Congress (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Akihiko Sano, Makoto Sohda, Nobuhiro Nakazawa, Nobuhiro Hosoi, Takayoshi Watanabe, Ikuma Shioi, Takuya Shiraishi, Takuhisa Okada, Katsuya Osone, Makoto Sakai, Hiroomi Ogawa, Ken Shirabe, Hiroshi Saeki
2. 発表標題 Comparison of postoperative outcomes and QOL surveys by surgical procedure in patients with upper gastric and esophagogastric junction cancer
3. 学会等名 The 3rd International Congress of the Asian Oncology Society (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Akihiko Sano, Makoto Sohda, Kohei Tateno, Takayoshi Watanabe, Nobuhiro Nakazawa, Makoto Sakai, Hiroomi Ogawa, Ken Shirabe, Hiroshi Saeki
2. 発表標題 Optimal reconstruction method after proximal gastrectomy
3. 学会等名 78th General Meeting of The Japanese Society of Gastroenterological Surgery
4. 発表年 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
研究分担者	佐伯 浩司 (Saeki Hiroshi) (80325448)	群馬大学・大学院医学系研究科・教授 (12301)	

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	宗田 真 (Sohda Makoto) (70507326)	群馬大学・医学部附属病院・准教授 (12301)	
研究分担者	横堀 武彦 (Yokobori Takehiko) (60420098)	群馬大学・未来先端研究機構・准教授 (12301)	
研究分担者	酒井 真 (Sakai Makoto) (70420099)	群馬大学・医学部附属病院・講師 (12301)	

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