

令和 6 年 9 月 6 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09407

研究課題名(和文) 後腹膜肉腫におけるプレシジョン術前補助免疫化学療法の確立を目指した基盤研究

研究課題名(英文) Precision medicine with neoadjuvant chemotherapy for retroperitoneal sarcoma

研究代表者

藤本 清秀 (Fujimoto, Kiyohide)

奈良県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：50264867

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)：後腹膜肉腫は希少癌の一種であることから、診断・治療関連研究の進捗は乏しい。本研究では、後腹膜肉腫の術後局所再発抑制を介する治療戦略の充実化を目的とした。昨今、注目されている免疫チェックポイント阻害薬を中心とした治療研究を試みた。使用したマウス肉腫細胞株PD-L1、PD-L2発現を認めるものの、腎細胞癌といった免疫原性の強い腫瘍と比較した場合、その発現量は低かった。In vivoでsyngenicマウスモデルの作成を試みたが、治療評価を行い得るまでの安定した成果を得ることができなかった。今後の課題としては、このマウス肉腫モデルの安定的な確立である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、後腹膜肉腫の標準治療は外科的切除である。局所再発時の治療介入手段として再手術を実施すること、実施できることが予後良好因子であることが臨床研究で判明している。十分な治療研究を行う上では、希少癌ゆえ動物実験での前臨床研究が必須不可欠である。腫瘍関連研究において、腫瘍免疫環境の評価には、syngenicモデルが最も適した実験系であることは間違いない。そのため、今後の課題としては、この肉腫モデルの確立の安定な樹立が必要不可欠であろう。さらには、局所再発モデルを樹立することで、術前補助療法の意義も同時に評価できる手段となりえると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Retroperitoneal sarcoma is a rare cancer, and the number of patients with retroperitoneal sarcoma is much smaller than that with other cancers, making treatment research more difficult. This study aimed to improve the treatment of retroperitoneal sarcomas by reducing local recurrence. We conducted therapeutic research focusing on immune checkpoint inhibitors, which are currently in the spotlight. We attempted to establish an in vivo syngenic mouse model; however, we were unable to obtain results to evaluate the treatment. Future studies will focus on establishing a stable murine sarcoma model. We believe that the use of genetically engineered mice to treat this sarcoma is necessary in the future.

研究分野：泌尿生殖器系腫瘍

キーワード：後腹膜肉腫 マウスモデル 免疫チェックポイント阻害剤 PD-L1 PD-L2

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

後腹膜腔に発生する肉腫は、外科摘除が治療の基本であるが、腹部主要臓器や大血管に隣接・浸潤することから、周囲組織を含めた広範摘除が望ましく、術後局所再発も高率で、根治率を向上のため顕微鏡的完全切除を目指した集学的治療が必要である。しかし、抗癌化学療法や放射線治療による周術期補助療法には限界があり、近年、免疫チェックポイント阻害剤 (ICI) が切除不能軟部肉腫の分野にも台頭し、有望な治療オプションとなりつつある。本研究では、CTLA-4・PD-1/PD-L1 標的 ICI、分子標的薬、化学療法を駆使し、理想的な術前補助治療の構築を介した precision medicine の確立を目指す。

2. 研究の目的

後腹膜肉腫の治療成績向上として、術前の治療 (neoajvant 療法) による局所再発の抑制に關与する可能性を追求した

3. 研究の方法

1) 後腹膜肉腫細胞株の選定

ヒト肉腫細胞株である NCC-LMS1 (SCC12) 平滑筋肉腫、NCC-UPS1-C1 (SCC16)と NCC-UPS2-C1(SCC59)未分化多形肉腫、NCC-DDLS-C1 (SCC299); 脂肪肉腫、の細胞株を使用。またマウス肉腫細胞株には NCTC2472 細胞株と MAC205 細胞株を使用。

2) 異所性マウス肉腫モデルの作成

ヒト肉腫細胞株には BALB/c-nu mice を使用し、マウス肉腫細胞株には C3H/HeNcr mice を使用した。それぞれ、背部の皮下に肉腫細胞とマトリゲルを混注して同種異所性肉腫モデルの樹立を目指した。

3) PD-L1、PD-L2 の発現を免疫化学染色法や qPCR 法で評価

ヒト肉腫細胞株、マウス肉腫細胞株、そして、それぞれの in vivo の腫瘍における PD-L1、PD-L2 の発現量をリアルタイム PCR 法も用いて調べた。

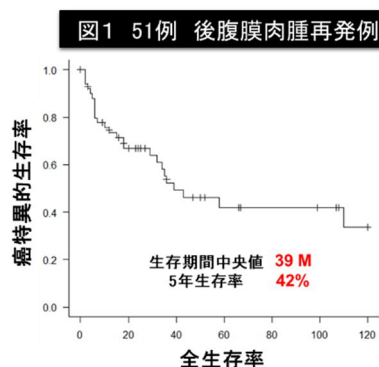
4) 臨床現場における術後再発のリスク因子の調査

後腹膜肉腫の患者の術後再発の予後に関して救済療法による予後の違いを解析した。

4. 研究成果

多施設共同研究において、摘出術を実施した後腹膜肉腫患者 73 例を対象とした後方視的に調査した。73 例のうち、51 例が術後に再発し、再発症例における生存期間中央値が 39 ヶ月、5 年生存率 42% であった。(図 1)

後腹膜肉腫治療のアンメットニーズは局所再発抑制にあると我々は考えている。そこで術前治療 (免疫チェックポイント阻害薬など) により局所再発を抑制、もしくは増生を抑制できないかを in vitro, in vivo で実験を行うこと



にした。まず、C3H マウスから樹立した肉腫細胞株 NCTC2472 を用いて syngenic model を作成することとした。C3H マウスの皮下に NCTC2472 を注入し、同種性異所性肉腫モデルを構築することとした。皮下腫瘍の増生を確認し、ある程度増大したところで、外科的切除した後、一部の腫瘍では再発することを確認した。(図2) NCTC2472 を用いた syngenic model の再現性を確認したが、術前化学療法や術前補助療法のモデルとして使用できるほどの安定した実験系の確立には至らなかった。そのため別のマウス肉腫細胞株である MCA 205 に変更して、同様に実験モデルとしての再現性を検証したところ、NCTC2472 の細胞株よりは安定して細胞増殖を *in vitro*, *in vivo* で行えていた。(図2) しかし、同種異所性肉腫モデルとしては、NCTC2472 細胞株と同様に、術前化学療法や術前補助療法のモデルとして使用できる程度の安定した実験系に至らなかった。

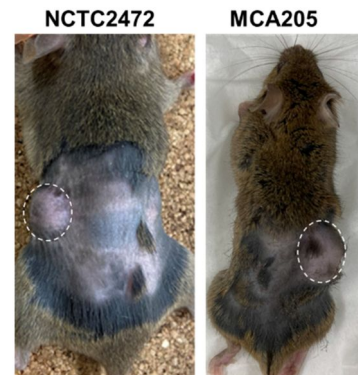


図2 C3Hマウス異所性肉腫モデル成功例

また、マウス肉腫細胞株を対象として、PD-1、PD-L1 などの免疫チェックポイント分子の発現を、逆転写リアルタイム PCR ,免疫細胞染色を行った。逆転写リアルタイム PCR では、PD-L1 の発現が報告されている泌尿器科系悪性腫瘍 (腎細胞癌 (RENCA) ,膀胱癌 (MB49,MBT-2)) や前立腺癌 (Myc-Cap)) と比較するとマウス肉腫細胞株は前立腺癌よりは PD-L1,PD-L2 の発現は高いものの、他の細胞株に比べて低い免疫チェックポイント分子の発現は確認できた。(図3)

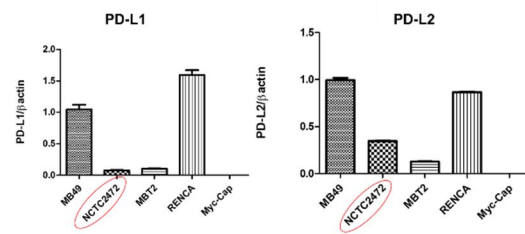


図3 マウス肉腫細胞株とその他のマウス泌尿器腫瘍細胞でのq-PCR法

免疫細胞染色、免疫組織染色でも同様にマウス肉腫細胞株に PD-L1 の発現をみとめた。(図4)

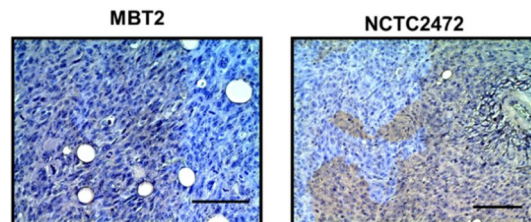


図4 マウス肉腫腫瘍とマウス膀胱癌の免疫染色法
スケールバーは100μm

我々が以前行った後腹膜肉腫の臨床検体の病理学的評価においても、肉腫における PD-L1、PD-L2 発現は膀胱癌や腎癌と比べると低いものであり、基礎実験の結果と相関することが分かった。

もう一方は、ヒト肉腫細胞株を用いた免疫不全マウスの異種性異所性皮下腫瘍モデルも試みた。免疫不全マウスのため免疫療法の有効性を検討することはできないが、術前補助療法として化学療法や放射線療法の比較実験を考えて起こった。しかし、マウス肉腫細胞株と同様に定着する個体もいたものの、こちらも薬物療法を行うまでの生着率を樹立することは困難であった。

同時期に行った臨床研究において、後腹膜肉腫術後再発の救済療法が最も効果的であったのは再手術であった。(図5)

化学療法、放射線療法を行われた症例も存在したが体系に行われておらず、まだまだ併用療法による研究を重ねていく必要があると考えられる。

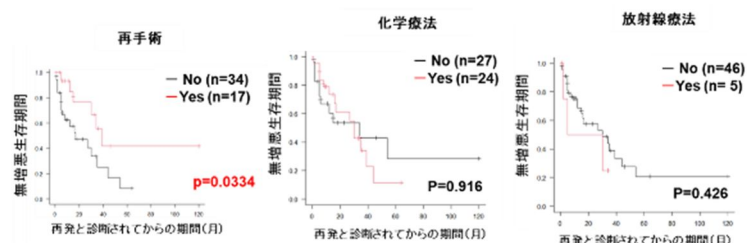


図5 後腹膜術後再発した51例の救済療法の解析

今回の研究では、基礎実験として作成するマウス肉腫モデルの樹立が困難であった。マウス肉腫局所再発モデル作成の再現性を確認できれば、化学療法（アドリアマイシン、ボトリエント）と免疫チェックポイント阻害薬の単剤投与群や併用群の比較を行い術前補助療法としてどの治療が適切か、また、ここに放射線治療の比較、併用なども行うことができると考えている。現在、syngenic 肉腫モデルの作成に難渋しているが、肉腫の性質上腫瘍免疫環境の評価を行うためには syngenic model が最も適した実験系であることは間違いない。この方法は技術的に困難であると判断し別の方法、例えば遺伝子改変マウスを使用した同種性同所性もしくは異所性肉腫マウスモデルの構築を行っていく必要があると考える。後腹膜肉腫は希少癌故、臨床検体が他の癌と比べ少なく、新規治療法の研究のためにも、マウスモデルの樹立が後腹膜肉腫の局所治療における研究の要になる。そのため、今後も更なる研究を重ねる必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 小田 侑希、三宅 牧人、福井 真二、森澤 洋介、堀 俊太、後藤 大輔、中井 靖、伊丹 祥隆、岡島 英二郎、田中 宣道、藤本 清秀
2. 発表標題 Association between treatment factors and recurrence in patients with Retroperitoneal Sarcoma; A Multicenter Collaborative Study
3. 学会等名 第110回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yuki Oda, Makito Miyake, Kiyohide Fujimoto
2. 発表標題 Treatment related prognostic factors in patients with retroperitoneal sarcoma: A multicenter retrospective study.
3. 学会等名 第39回 日韓泌尿器科学会（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小田侑希，三宅牧人，藤本清秀
2. 発表標題 後腹膜肉腫における臨床病理学的因子とPD-L1、PD-L2、PD-1 発現の統合的評価
3. 学会等名 第 109回 日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小田侑希，三宅牧人，藤本清秀
2. 発表標題 後腹膜肉腫における臨床病理学的パラメーターとPD-L1，PD-L2，PD-1 発現を統合的に評価した多施設共同研究.
3. 学会等名 第7回 日本泌尿器腫瘍学会
4. 発表年 2021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	堀 俊太 (Hori Shunta) (30623681)	奈良県立医科大学・医学部・助教 (24601)	
研究分担者	藤井 智美 (Fujii Tomomi) (50623477)	大阪大学大学院医学系研究科・変革的医療情報システム開発学寄附講座・准教授 (24601)	
研究分担者	三宅 牧人 (Miyake Makito) (80601400)	奈良県立医科大学・医学部・准教授 (24601)	
研究分担者	中井 靖 (Nakai Yasushi) (90445065)	奈良県立医科大学・医学部・講師 (24601)	

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