

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462137

研究課題名(和文)凍結融解壊死療法後樹状細胞腫瘍内注入療法の最適化

研究課題名(英文)Optimized magnitude of cryosurgery facilitating anti-tumor immunoreaction in a mouse model of Lewis lung cancer

研究代表者

川村 雅文(Masafumi, Kawamura)

帝京大学・医学部・教授

研究者番号：70169770

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：Lewis 肺癌細胞株の両側大腿皮下腫瘍で両側腫瘍が5mmに達した時点で、片側腫瘍に凍結療法を施行した。14日後の組織像では凍結療法のサイクル数と非生存腫瘍領域の面積の間に比例関係を認めた。2サイクル群では対側腫瘍増大速度は他群に比較して有意に緩徐であった。免疫染色でCD4およびCD8陽性T細胞数が2サイクル群で3サイクル群を含む他群より有意な増加、Ki-67陽性腫瘍細胞は有意に低下を認めた。2サイクル群ではIL-1, IL-2, IL-6, IL-12, TNF- α の有意な増加を認めた。炎症性サイトカインを介し対側腫瘍のCD4/CD8陽性T細胞の浸潤が腫瘍の増大を抑制している可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Cryosurgery, consisted of 60 sec freezing with liquid nitrogen and 60 sec thawing cycle, was performed to one tumor of bilateral femoral tumors that originated from Lewis Lung Cancer cell. Histologically, there was a significant correlation between the number of cycles of cryosurgery and the area of nonviable tumor area. 75% of the nonviable tumor area was observed in the 2 cycle group, and the abscopal tumor growth rate was significantly slower than that in the other groups. In immunohistochemistry, both the CD4 and CD8 positive T cells infiltration was significantly increased and Ki-67 positive tumor cells were significantly decreased in the 2 cycle group. There was a significant increase in IL-1, IL-2, IL-6, IL-12, and TNF- α in the 2-cycle group as compared with the other groups. Our data suggest that infiltration of both CD4 positive and CD8 positive T cells into the abscopal tumor via the increased proinflammatory cytokines could suppress the tumor growth.

研究分野：呼吸器外科

キーワード：肺癌 腫瘍免疫 クライオセラピー 凍結壊死融解療法

1. 研究開始当初の背景

クライオアブレーションは固形腫瘍に対してプローベを穿刺して凍結融解のサイクルを繰り返すことにより腫瘍の壊死を引き起こす局所治療であり、その低侵襲性から注目されている。また、クライオアブレーションが抗腫瘍免疫反応を誘導しうることが報告されており、画期的な作用機序と持続的な抗腫瘍効果で注目を集める免疫チェックポイント阻害剤との併用が提唱される一方で、より有利な免疫反応を起こす最適なクライオアブレーション環境とその詳細なメカニズムについては知られていなかった。

クライオアブレーションの「強度」は線量分布が細かく計画できる放射線治療とは異なり、規定することが難しい。定量化が試みられてきたものの、穿刺したプローベの位置、低温保持を妨げる血管との位置関係、サイクル数など多くの因子によって変化するため、単純な定量化ができないのが現状である。

2. 研究の目的

以上のような背景からより有利な免疫反応を起こす最適なクライオアブレーション環境を検討すること、さらに液性因子や腫瘍への炎症細胞浸潤を評価することで関連するメカニズムについても検討することを目的として本研究を計画した。

3. 研究の方法

57/BL6 マウスに対して Lewis Lung Cancer Cell Line (LL/12) を 5e5 個、両側大腿に皮下注射を行って、だいたい腫瘍モデルを作製することから開始した。両側の腫瘍が約 5 mm に達した時点でクライオアブレーションサージカルシステム (Cryogenic System 社) 用いて、液体窒素での 60 秒間の凍結、室温での 60 秒間の融解を 1 サイクルとしてクライオアブレーションを行った。施術後 2 時間後および 2 日後に LPS を皮下に投与した。LPS 投与のみでクライオアブレーションを行わないコントロールの LPS 群、クライオアブレーションを 1-3 サイクル施行した群と分けて、クライオアブレーション施行後の腫瘍の変化の組織像、対側腫瘍の増大速度、生存、対側腫瘍の免疫組織化学および対側腫瘍周囲の洗浄液中のサイトカイン濃度を測定して比較検討を行った。

4. 研究成果

クライオアブレーション施行後 14 日後の術側腫瘍の組織像では非生存腫瘍領域の面積とクライオアブレーションのサイクル数と

の間に有意な相関を認めた。2 サイクル施行群では腫瘍面積に対して約 75% の非生存腫瘍領域を認めた。対側腫瘍の増大速度はクライオアブレーション 2 サイクル群で最も緩徐であり、3 サイクル群を含む他群との間に有意差を認めた。マウスの生存期間も 2 サイクル群が最も長かった。

対側腫瘍の CD4, CD8, FoxP3 および Ki-67 の免疫染色では、CD4 および CD8 陽性 T 細胞数がクライオアブレーション 2 サイクル群で有意な増加を示した一方で、FoxP3 陽性 T 細胞の数には各群間に有意差を認めなかった。また、Ki-67 陽性腫瘍細胞数は 2 サイクル群で有意に少なく、他群との間に有意差を認めた。

対側腫瘍周囲洗浄液のサイトカイン濃度測定では、クライオアブレーション 2 サイクル群において、IL-1, IL-2, IL-6, IL-12, TNF- α がそれぞれ他群に比較して有意に増加していた。

以上の結果より、クライオアブレーション 2 サイクル施行群が引き起こした、約 75% の非生存腫瘍領域が抗腫瘍免疫反応に最適な環境であること、また炎症性サイトカインの増加を介して、CD4 および CD8 陽性 T 細胞が対側腫瘍に対して浸潤増加することがそのメカニズムに関連していることが示唆された。

尚、この結果は Cancer Immunology, Immunotherapy 誌へ投稿し、すでに論文発表されている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 10 件)

1. Dejima H, Takahashi Y, Hato T, et al. Mediastinal pulmonary artery is associated with greater artery diameter and lingular division volume. Scientific Reports 2017;7(1):1273. (査読有)
2. Matsutani N, Kanai E, Hanawa R, et al. Pericardial Conduit for Pulmonary Artery Reconstruction by Surgical Stapling. Ann Thorac Surg 2017;103(5):e469-e471. (査読有)
3. Okamura R, Takahashi Y, Dejima H, et al. Efficacy and hemodynamic response of pleural carbon dioxide insufflation during thoracoscopic surgery in a swine vessel injury model. Surgery today 2016;46(12):1464-1470. (査読有)

4. Takahashi Y, Matsutani N, Dejima H, et al. Therapeutic potential of recombinant thrombomodulin for lung injury after pneumonectomy via inhibition of high-morbidity group box 1 in mice. J Trauma Acute Care Surgery. 2016;81(5):868-875. (査読有)
5. Takahashi Y, Matsutani N, Morita S, et al. Predictors of long-term compensatory response of pulmonary function following major lung resection for non-small cell lung cancer. Respirology 2016;22(2):364-361. (査読有)
6. Takahashi Y, Izumi Y, Matsutani N, et al. Optimized magnitude of cryosurgery facilitating anti-tumor immunoreaction in a mouse model of Lewin Lung Cancer. Cancer Immunology, Immunotherapy 2016;65(8):973-982. (査読有)
7. Takahashi Y, Matsuda M, Aoki S, et al. Qualitative Analysis of Preoperative High-Resolution Computed Tomography: Risk Factors for Pulmonary Complications After Major Lung Resection. Ann Thorac Surg 2016;101(3):1068-1074. (査読有)
8. Takahashi Y, Sakaguchi K, Horio H, et al. Urinary N1, N12-diacetylspermine is a non-invasive marker for the diagnosis and prognosis of non-small cell lung cancer. Brit J Cancer 2015;113(10):1493-1501. (査読有)
9. Takahashi Y, Kawamura M, Hato T, et al. Neutrophil-Lymphocyte Ratio as a Prognostic Marker for Lung Adenocarcinoma After Complete Resection. World J Surg 2016;40(2):365-372. (査読有)
10. Takahashi Y, Horio H, Hato T, et al. Prognostic Significance of Preoperative Neutrophil-Lymphocyte Ratios in Patients with Stage I Non-small Cell Lung Cancer After Complete Resection. Ann Surg Oncol 2015;22 Suppl 3:S1324-1331. (査読有)

〔学会発表〕(計 5 件)

1. Takahashi Y, Eguchi T, Lu S, et al. Histological subtyping of matched primaru and metastases site in lung adenocarcinoma: significance of solid predominance. World Conference of Lung Cancer 12/2016 Vienna (Austria)
2. 松谷 哲行, 川村 雅文
自己心膜を用いた代替血管による肺動脈吻合術
第 57 回日本肺癌学会学術集会 (福岡)
2016 年 12 月
3. 松谷 哲行, 川村 雅文
肺癌周術期血液中循環癌細胞に掛かる他施設前向き観察研究 IL01501
第 69 回日本胸部外科学会定期学術集会 (岡山) 2016 年 9 月
4. 松谷 哲行, 川村 雅文
肺癌手術症例における術前診断法の検討
第 39 回日本呼吸器内視鏡学会学術集会 (名古屋) 2016 年 6 月
5. Takahashi Y. Urinary N1, N12-diacetylspermine is a non-invasive marker for the diagnosis and prognosis of non-small cell lung cancer. Thoracic Surgical Oncology CME Conference 10/2015 New York (USA)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川村 雅文 (Masafumi Kawamura)
帝京大学・医学部・教授
研究者番号：70169770

(2) 研究分担者

高橋 祐介 (Yusuke Takahashi)
帝京大学・医学部・助教
研究者番号：00445214

松谷 哲行 (Noriyuki Matsutani)
帝京大学・医学部・講師
研究者番号：60621943

泉 陽太郎 (Yotaro Izumi)
埼玉医科大学・医学部・講師
研究者番号：90245506

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()