

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：90101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670305

研究課題名(和文)がん局所の凍結による病巣破壊を介した免疫監視機構の強化

研究課題名(英文)Cryo-immunology; booster effects of cryotherapy on the anti-tumor immune response

研究代表者

齋藤 博哉 (Saito, Hiroya)

医療法人徳洲会札幌東徳洲会病院附属臨床研究センター・がん研究部・副部門長

研究者番号：80524769

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍の局所制御の選択肢として凍結治療がある。この治療法により原発巣のみならず転移巣が縮小するケースがあり、免疫学的効果を誘導している可能性が指摘されている。本研究では「凍り付いた腫瘍は、腫瘍崩壊とがん抗原分散を介し腫瘍免疫を賦活化する」という仮説のもと、これを裏付ける基礎データを得ることを目的とし、膵癌自然発症マウスより樹立した初代膵癌細胞を同系マウスへ移植する系を用い治療実験を行った。凍結治療により、原発巣の腫瘍縮小効果と仮想転移腫瘍の腫瘍縮小および腫瘍拒絶効果を認めた。このことから全身性免疫が誘導されることが示唆され、原発巣に対する介入に伴う転移性腫瘍への抗腫瘍効果の裏付けが得られた。

研究成果の概要(英文)：Cryotherapy (also called cryosurgery) is a treatment that uses extremely cold temperature to freeze and destroy cancer tissue. Although mainly employed in cases of prostate cancer, the therapeutic option can be used to treat a number of different types of cancer. Curiously, distant and untreated sites of disease can also be regressed after freezing a primary lesion, suggesting cryotherapy may stimulate an anti-tumor immune response. Given the tremendous potential of the local therapy that could also have systemic benefits, we sought to validate the ability of cryotherapy to stimulate a tumor recognition using allograft mouse pancreatic cancer system as a pre-clinical model. The tumor bearing animals treated by cryotherapy decreased growth of either primary or secondary tumor (an imaginary metastasis) relative to the controls. Cryotherapy offers an option for treating cancers that do not respond to standard treatments, and more studies are needed to determine the long-term effects.

研究分野：IVR、がん

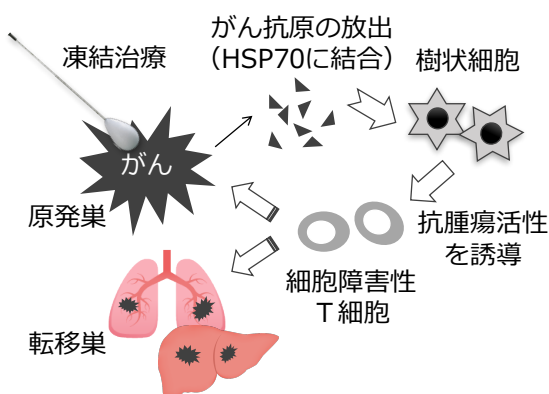
キーワード：Cryotherapy IVR がん

1. 研究開始当初の背景

腫瘍の局所制御の選択肢に「凍結治療 (Cryotherapy)」があげられる。この治療法は、古くより研究がすすめられ、国内においても効果や安全性についての先駆的な知見が蓄積されている。治療法の原理は、腫瘍内に穿刺したプローブ針から高压のアルゴンガスを噴射し、その先端に-20~-40℃のアイスボールを作ることで、周辺のがん細胞を瞬時に死滅させるものである。この治療法の利点として、正確な治療範囲の設定とモニタリングが可能で、正常組織へのダメージを最小限にした腫瘍壊死をもたらすことが挙げられる。本邦では医療用焼灼器汎用冷凍手術ユニットが腎臓癌において保険収載されているが、肝細胞癌、膵癌、乳癌等に対する治療経験も報告されている。興味深いことに、この治療法によって原発巣のみならず、転移巣が縮小するケースも時に見られ、免疫学的効果が誘導される可能性がある (Cryo-immunology)。

熱凝固治療等の局所療法の場合とは異なり、凍結により破壊死滅されたがん細胞から免疫監視機構の活性化に必要ながん抗原が適度に保存、分散されることが予測される。このため、凍結治療に伴う副次効果として「自然な状態で免疫細胞ががんを攻撃するように導く」ことは概念的に理解されやすい (図1)。しかし、このことを適切な *in vivo* 系を用いた実証はされておらず、そのメカニズムも不明であった。

図1：腫瘍崩壊に伴う腫瘍免疫の賦活化 (仮説)



2. 研究の目的

本研究では「凍り付いた腫瘍は、腫瘍崩壊とその後のがん抗原分散を介して、腫瘍免疫を賦活化する」という仮説のもとに、これを裏付ける基礎データを得ることを目的とした。

Cryotherapy は除痛等の症状緩和にも役立つ固形がんの局所制御法であるが、本治療法が全身疾患である癌の予後に及ぼすインパクトを明らかにする。

3. 研究の方法

凍結治療に伴う抗腫瘍効果を検討するためにマウス allograft モデルを用いた。膵癌を自然発症する *Pdx1-Cre;LSL-KrasG12D;p53lox/+* (マサチューセッツ総合病院がん研究センター Bardeesy 博士より供与) より初代膵癌細胞を樹立し、これを同系 FVB マウスへ皮下移植した。

はじめに腫瘍生着後にマウスを2群に分け、実験群には液体窒素による凍結処理を施した初代細胞を別の部位に移植し (Cryotherapy = Vaccination)、移植腫瘍の縮小効果が得られるかを検証した。Cryotherapy により、移植腫瘍の縮小を認めた。

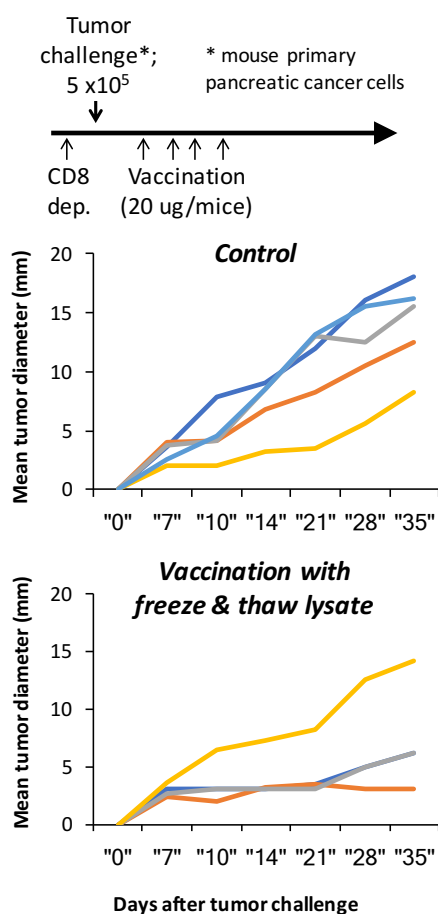
次に、凍結治療に伴う転移巣縮小が起こるかを観察するために、マウス左側側背部に癌細胞を移植し、腫瘍生着 (仮想原発巣) の後に、右側側背部に新たな移植腫瘍を作成し、これを仮想転移巣として評価した。

4. 研究成果

Cryotherapy により、原発巣の腫瘍縮小効果と転移腫瘍の腫瘍縮小および腫瘍拒絶効果を認めた。このことから、Cryotherapy によって全身性腫瘍免疫が誘導されることが示唆され、原発巣の凍結破壊に伴い、転移性腫瘍に対する抗腫瘍効果が観察されるという臨床データの裏付けが得られた (図2; 次ページ)。凍結腫瘍から放出されるであろう HSP 蛋白の挙動と、これに伴う樹状細胞の活性化についての評価を進めているが、研究期間内にデータを取得することが困難であった。

なお、研究計画時には当院に導入された医療用焼灼器汎用冷凍手術ユニット Cryo-Hit (株式会社日立製作所) を用いて、がん凍結治療の前後において患者血液検体を用いた腫瘍免疫の挙動について検証を行う予定であったが、研究期間中に対象患者の登録が得られず、人での Proof of Concept を得ることはできなかった。

図2：凍結腫瘍のチャレンジによる移植腫瘍の縮小



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) Patra KC, Bardeesy N, and Mizukami Y. Diversity of precursor lesions for pancreatic cancer: Lessons from genetics and biology of intraductal papillary mucinous neoplasm (Review). *Clin Transl Gastroenterol* 8(4):e86 (2017)
- 2) Saha S, Gordan JD, Kleinstiver BP, Vu P, Najem MS, Yeo JC, Shi L, Kato Y, Levin RS, Webber JT, Damon LJ, Egan RK, Greninger P, McDermott U, Garnett MJ, Jenkins RL, Rieger-Christ KM, Sullivan TB, Hezel AF, Liss AS, Mizukami Y, Goyal L, Ferrone CR, Zhu AX, Joung JK, Shokat KM, Benes CH, Bardeesy N. Isocitrate dehydrogenase mutations confer dasatinib hypersensitivity and SRC-dependence in cholangiocarcinoma. *Cancer Discov*

- 6(7):727-39 (2016)
- 3) Matsuzaka S, Karasaki H, Ono Y, Ogata M, Oikawa K, Tamakawa S, Chiba S, Muraki M, Yokochi T, Funakoshi H, Kono T, Nagashima K, Mizukami Y. Tracking the clonal evolution of adenosquamous carcinoma, a rare variant of intraductal papillary mucinous neoplasm of the pancreas. *Pancreas* 45:915-8 (2016)
- 4) Driscoll DR, Karim SA, Sano M, Gay DM, Jacob W, Yu J, Mizukami Y, Gopinathan A, Jodrell DI, Evans J, Bardeesy N, Hall MN, Quattrochi BJ, Klimstra DS, Barry ST, Sansom OW, Lewis BC, Morton JP. mTORC2 signaling is required for pancreatic cancer development and progression. *Cancer Res* 76:6911-6923 (2016)
- 5) Sugiyama Y, Sasajima J, Mizukami Y, Koizumi K, Kawamoto T, Karasaki H, Yusuke Ono, Tanabe H, Fujiya M, Kohgo Y. The protein expression level of Gli2 is a feasible marker of ligand-dependent hedgehog activation in pancreatic neoplasms. *Pol J Pathol* 67(2):136-44 (2016)
- 6) Sasajima J, Uehara J, Goto T, Fujibayashi S, Koizumi K, Mizukami Y, Ishida-Yamamoto A, Fujiya M, Okumura T. Pancreatic metastasis of angiosarcoma (Stewart-Treves syndrome) diagnosed using endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration: A case report. *Medicine* 95:e4316 (2016)
- 7) Sugiyama Y, Kawamoto T, Sasajima J, Koizumi K, Karasaki H, Mizukami Y. A Rare Case of Epidermoid Cyst in the Pancreatic Tail Invaginated from the Splenic Hilum: Long-term Alteration in Imaging Findings. *Intern Med* 55(24): 3591-3594 (2016)
- 8) Imai K, Karasaki K, Ono Y, Sasajima J, Chiba S, Funakoshi H, Muraki M, Hanaoka H, Furukawa T, Furukawa H, Kono T, Nagashima K and Mizukami Y. Metachronous pancreatic cancer originating from disseminated founder pancreatic intraductal neoplasias (PanINs). *The Journal of Pathology: Clinical Research* 1;76-82 (2015) DOI: 10.1002/CJP2.8
- 9) Gala MK, Mizukami Y, Le LP, Moriichi K, Austin T, Yamamoto M, Lauwers GY, Bardeesy N, Chung DC. Germline mutations in oncogene-induced senescence pathways are associated with multiple sessile

serrated adenomas. *Gastroenterology* 146:520-9 (2014) DOI:

10.1053/j.gastro.2013.10.045

- 10) Watanabe K, Karasaki H, Mizukami Y, Kawamoto T, Kono T, Imai K, Einama T, Taniguchi M, Kohgo Y, Furukawa H. Cyst infection of intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas: management of a rare complication: report of 2 cases. *Pancreas* 43(3):478-81 (2014) doi: 10.1097/MPA.0000000000000036.

[学会発表] (計 19 件)

- 1) 齋藤博哉. 胆道系 IVR の現況. 第 53 回北近畿画像診断 IVR 研究会 (2016 年 7 月 23 日 福知山市)
- 2) Mizukami Y, Ono Y, Karasaki H, Ando K, Asahara S, Nagashima K. Plasma DNA genotyping using digital PCR for early detection of pancreatic cancer; 2nd report (UMIN000012810) 第 75 回日本癌学会学術総会 (2016.10.6-8 横浜)
- 3) Mizukami Y, Ono Y, Karasaki H, Koizumi K, Asahara S, Maguchi H. Plasma DNA genotyping using digital PCR; Novel diagnostic tool for early detection of pancreatic cancer. Joint Conference of JPS&IAP&AOA 2016 (2016.8.4-7 仙台)
- 4) Omori Y, Takahashi K, Karasaki H, Mizukami Y, Maguchi H. Precise Tracing of IPMN-related carcinoma; Defining the Molecular Underpinnings of Distinct Routes to Invasive Carcinomas of the Pancreas. Joint Conference of JPS&IAP&AOA 2016 (2016.8.4-7 仙台)
- 5) 齋藤博哉, 和田玲緒名, 前島 拓, 唐崎秀則, 片田竜司, 山北圭介. 生分解ステントを留置した先天性総胆管拡張症術後狭窄による肝内胆管結石の 1 例. 第 29 回北日本インターベンショナルラジオロジー研究会 (2016 年 9 月 3 日 秋田市)
- 6) 齋藤博哉. IVR とパートナーシップ—構築と人材育成— 第 49 回神奈川 IVR カンファレンス (2016 年 10 月 8 日 横浜市)
- 7) Ono Y, Omori Y, Takahashi K, Ambo Y, Shinohara T, Nishihara H, Tanaka S, Maguchi H, Karasaki H, Mizukami Y. MOLECULAR TRACING OF INVASIVE IPMN LESIONS AND RELATED ADENOCARCINOMA TO DEFINE DISTINCT ROUTES TO INVASIVE CARCINOMAS OF THE
- PANCREAS. 2016 Annual Meeting - American Pancreatic Association. Poster session (October 26-29, 2016; Boston)
- 8) Mizukami Y, Ono Y, Karasaki H, Ogata M, Sugitani A, Koizumi K, Asahara S, Kawakubo K, Takahashi K, Maguchi H, Nagashima K. LIQUID BIOPSY FOR EARLY DETECTION OF PANCREATIC CANCER. 2016 Annual Meeting - American Pancreatic Association. Poster session (October 26-29, 2016; Boston)
- 9) Karasaki H, Mizukami Y, Ono Y, Ogata M, Yoshikawa D, Maejima T, Nagashima K, Toru K. A CASE PRESENTATION OF DISTAL BILE DUCT ADENOCARCINOMA; DISTINGUISHING BETWEEN CHOLANGIOCARCINOMA AND PANCREATIC DUCTAL ADENOCARCINOMA. 2016 Annual Meeting - American Pancreatic Association. Poster session (October 26-29, 2016; Boston)
- 10) 松原 悠, 水上裕輔, 正宗 淳, 水谷彰吾, 太田智之. SPINK1 遺伝子 p.P45S 変異が確認された遺伝性膵炎の 1 例. 第 117 回日本消化器病学会北海道支部例会 086 (消) (2015 年 8 月 29 日 ; 札幌)
- 11) Mizukami Y, Ono Y, Karasaki H, Ogata M, Koizumi K, Ando K, Yokochi T, Yamada M, Kono T, Nagashima K. Plasma DNA genotyping using digital PCR for early detection of pancreatic neoplasm. 46th Annual Meeting of the American Pancreatic Association; San Diego, November 4-7, 2015
- 12) 水上裕輔, 真口宏介, 小泉一也. 液体生検による膵癌リスク評価 第 23 回日本消化器関連学会週間 (JDDW 2015) デジタルポスターセッション 消 P-258 (2015 年 10 月 9 日 ; 東京)
- 13) Mizukami Y, Ono Y, Karasaki H, Asahara S, Ando K, Shinohara T, Nagashima K. Plasma DNA genotyping using digital PCR for early detection of pancreatic cancer (液体生検による膵癌診断). 第 74 回日本癌学会学術総会 [E14-4] 一般口演 (英語) 消化器がんに対する網羅的遺伝子解析. (2015 年 10 月 9 日 ; 名古屋)
- 14) Ono Y, Karasaki H, Chiba S, Nagashima K, Mizukami Y. Tracking the clonal evolution of adenosquamous carcinoma, a rare variant of intraductal papillary mucinous neoplasm (膵管内乳頭粘液性腫瘍より発生した膵腺扁平上皮癌). 第 74 回日本癌学会学術総会 [P14-21] ポスター

セッション 臓器がんの基礎・診断・治療 (21) (2015年10月9日;名古屋)

- 15) Ono Y, Karasaki H, Imai K, Sasajima J, Chiba S, Funakoshi H, Muraki M, Hanaoka H, Furukawa T, Furukawa H, Kono T, Nagashima K, Mizukami Y. Metachronous pancreatic cancer originating from disseminated founder pancreatic intraductal neoplasias. General Poster Session B (Board #B51): Cancers of the Pancreas, Small Bowel, and Hepatobiliary Tract, 2015 Gastrointestinal Cancers Symposium: J Clin Oncol 33, 2015 (suppl 3; abstr 330): San Francisco, Jan 16, 2015
- 16) 齋藤博哉. 胆道系 IVR のための経皮的穿刺・ドレナージ法. 第1回日本穿刺ドレナージ研究会 (2015年5月16日 大阪市)
- 17) Karasaki H, Kono T, Ono Y, Maejima T, Mizukami Y. Adenosquamous cell carcinoma derived from intraductal papillary mucinous neoplasm of the pancreas confirmed by genetic analysis. General Poster Session B (Board #A46): Cancers of the Pancreas, Small Bowel, and Hepatobiliary Tract, 2015 Gastrointestinal Cancers Symposium: J Clin Oncol 33, 2015 (suppl 3; abstr 275): San Francisco, Jan 16, 2015
- 18) 齋藤博哉. 胆道系 IVR の手技と実際—メタリックステントの功罪を含めて— 第50回京滋 IVR 懇話会 (2015年10月31日 京都市)
- 19) Mizukami Y, Imai K, Chiba S, Ono Y, Sasajima J, Karasaki H, Kono T, Nagashima K. A case of metachronous ductal adenocarcinomas with unique KRAS mutation (膵がん異時多発の1例). 第73回日本癌学会学術総会 膵臓、その他. ポスター発表 (2014年10月26日; 横浜)

[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
http://www.higashi-tokushukai.or.jp/clinical_study/index.php

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤 博哉 (SAITO, Hiroya)
医療法人 徳洲会 札幌東徳洲会病院
附属臨床研究センター
がん研究部
副部門長
研究者番号: 80524769

(2) 研究分担者

水上 裕輔 (MIZUKAMI, Yusuke)
医療法人 徳洲会 札幌東徳洲会病院
附属臨床研究センター
がん研究部
部門長
研究者番号: 30400089

田村 保明 (TAMURA, Yasuaki)
北海道大学
産学・地域協働推進機構
特任教授
研究者番号: 80322329

(3) 連携研究者

該当者なし

(4) 研究協力者

Nabeel Bardeesy
Massachusetts General Hospital Cancer
Center
Associate Professor