

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293318

研究課題名(和文) 悪性骨腫瘍に対する液体窒素処理と樹状細胞療法の併用療法

研究課題名(英文) Use of combination of frozen tumor tissue and dendritic cell immunotherapy

研究代表者

西田 英司(Nishida, Hideji)

金沢大学・医学系・協力研究員

研究者番号：50569374

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,000,000円

研究成果の概要(和文)：37例の悪性骨軟部腫瘍患者に対し、樹状細胞療法を行なった。患者から得た単核球をG-CSFとIL-4により成熟させ、OK-432、液体窒素処理した腫瘍組織から得られたtumor lysateによって樹状細胞を刺激した。得られた樹状細胞を患者に皮下注射するという治療を6回くり返した。結果として、樹状細胞療法による重篤な副作用は見られなかった。また、OK-432、tumor lysateにより樹状細胞の成熟度は上昇した。効果として、6例でSD、1例でPRであり、3年生存率は42.3%、3年無増悪生存率は2.9%であった。

研究成果の概要(英文)：Thirty seven patients with metastatic or recurrent sarcomas were enrolled in this study. Peripheral blood mononuclear cells obtained from the patients were suspended in media containing IL-4 and GM-CSF. These cells were treated with tumor lysate, TNF- $\alpha$ , and OK-432. One treatment course comprised weekly DC injection for 6 times. Toxicity, clinical response (tumor volume, serum IFN- $\gamma$ , and serum IL-12), and oncological outcomes were observed. DC therapy were performed in 37 patients. No severe adverse event and death associated with the DC injections were observed in the study patients. Increased serum IFN- $\gamma$  and IL-12 were observed 1 month after DC injection. 6 cases had stable disease, and 1 case showed partial response 3 months after DC therapy. Of the 37 patients, 13 patients were alive and 1 patient was progression free at the time of the final follow-up. Overall survival rates and progression free survival rates of the patients at 3 years were 42.3% and 2.9%, respectively.

研究分野：整形外科

キーワード：骨腫瘍 軟部腫瘍 樹状細胞 免疫療法

## 1. 研究開始当初の背景

悪性骨腫瘍の外科的治療は他の癌腫のように腫瘍を切除するだけでなく、切除した骨を何らかの方法で補わないと(再建術)もとの機能を得られない。再建術の一つに切除した腫瘍を含む骨を処理して腫瘍を不活化させた後、処理骨として利用する方法がある。腫瘍を不活化させる方法としてこれまで熱処理(オートクレーブ、パストール)や放射線処理があったが、申請者らは1999年に悪性骨腫瘍の手術で切除した腫瘍罹患骨を-196度の液体窒素で凍結処理し、元の場所に戻して骨の再建に利用する液体窒素処理骨移植を世界で初めて行い、先進医療として臨床で行ってきた。(Yamamoto N et al. J Orthop Sci 2003, Tsuchiya H et al. J Bone Joint Surg [Br] 2005, Tsuchiya H et al. J Orthop Sci 2010)

一方、凍結した腫瘍組織を生体内に戻すと凍結壊死組織から多量の癌抗原が溶出し、これを免疫系細胞が認識、活性化して腫瘍特異的な抗腫瘍効果を認める凍結免疫(Sabel MS et al. Breast Cancer Res Treat 2005)が報告されている。凍結免疫は基礎実験として、大腸がん、乳がん細胞で表在性の腫瘍に対し凍結処理後に免疫活性、転移の抑制が証明され(Urano et al. Cryobiology 2003, Sabel MS et al. Breast Cancer Res Treat 2005)、臨床では肝がんで生体内に直接凍結プローブを挿入して凍結手術を行うと免疫活性の上昇が報告されているが(Osada S et al. J Surg Oncol 2007)、肉腫に関して凍結免疫の報告はない。

申請者らはマウス骨肉腫モデルを用いて液体窒素処理移植後にサイトカイン(IFN- $\gamma$ 、IL-12)、細胞障害活性(CTL activity)を測定しそれぞれ上昇を認め、肉腫においてはじめて凍結免疫の活性を証明した(Nishida H et al. J Bone Joint Surg [Br] 2008)。さらに、肉腫の凍結処理組織に強力な抗原提示細胞である樹状細胞を併用すると相乗的に抗腫瘍効果と肺転移の抑制を確認した(Kawano M et al. Clin Orthop Relat Res. 2010)。

また、癌腫と異なり骨肉腫などの肉腫は一般的に抗原性が低いといわれている。従って肉腫に対する免疫療法の成功例の報告はほとんどない。今回、液体窒素処理を行うことで腫瘍組織から多量の腫瘍抗原が溶出され抗原性が上がり、これらの腫瘍抗原を抗原提示細胞(樹状細胞など)が取り込み、成熟し、他の免疫系細胞を活性化して抗腫瘍効果が増強する、免疫療法により効果的な凍結免疫の活性と液体窒素処理骨移植に免疫療法の併用療法の臨床試験を行うことでこれまで困難といわれていた肉腫において免疫療法を可能にする凍結免疫療法という新たな治療法となる。

## 2. 研究の目的

主目的は悪性骨腫瘍に対し液体窒素処理

した腫瘍組織が生体内に戻ると体内で腫瘍特異的な凍結免疫の活性を誘導し、結果として腫瘍の再発や転移の抑制を導くか追求することである。また、免疫賦活剤や免疫系細胞の併用を行い凍結免疫が最も活性化する方法を開発する。これらの基礎実験をもとに臨床で悪性骨腫瘍に対する液体窒素処理骨移植術による凍結免疫の活性を確認する。さらに液体窒素処理骨移植術に免疫賦活剤や免疫系細胞(樹状細胞)の併用を行うことで凍結免疫と新たな悪性骨腫瘍に対する凍結免疫療法の治療体系を確立する。

## 3. 研究の方法

研究1. 腫瘍ライセートを用いた骨軟部腫瘍に対する樹状細胞療法の臨床試験

標準治療に抵抗性を示す骨軟部肉腫患者の腫瘍組織を凍結処理し、腫瘍ライセートを作成した。それぞれの患者から血液を採取し、Lymphoprep<sup>TM</sup>を用いて単核球を集める。単核球をIL-4、GM-CSFを含む培養液(GMP CellGro DC medium)で培養することにより樹状細胞へ分化・成熟させた。この樹状細胞を腫瘍ライセート、TNF- $\alpha$ 、OK-432で刺激したのちに回収し、患者のリンパ節近くの皮下に注射した。この治療を6回くりかえすことで1コースの治療とした。

評価方法として、副作用(肝機能障害、腎機能障害、骨髄抑制、アレルギー反応)の有無と程度、治療前後の免疫反応(IFN- $\gamma$ 、IL-12)、抗腫瘍効果、全生存率、無増悪生存率により治療の有用性を評価した。

研究2. 転移性骨腫瘍モデルを用いた凍結治療による免疫活性変化

Balb/cマウスの脛骨内にマウス乳癌細胞株MMTを注射し、生着を確認した後に腫瘍を切除した。マウスを2つのグループに分類し、一方は切除のみ、もう一方は切除した腫瘍を液体窒素処理して元の位置に戻すというしよりを行った。液体窒素処理は-196度の液体窒素に20分間腫瘍を入れた後、大気中で20分、その後蒸留水に15分入れることで解凍した。5週後にマウスを安楽死させ、脾臓からPBMCを採取した。PBMCの一部を培養して3日後にELISAによりIL-12、IFN- $\gamma$ を測定した。残りのPBMCを癌細胞を共培養し、ELISPOTアッセイによりIFN- $\gamma$ のスポット形成により腫瘍特異的免疫活性化を評価した。

## 4. 研究成果

研究1. 腫瘍ライセートを用いた骨軟部腫瘍に対する樹状細胞療法の臨床試験

37例の骨軟部肉腫患者に対して樹状細胞療法を行なった。骨原発肉腫17例(骨肉腫14例、軟骨肉腫3例)、軟部肉腫20例(MFH5例、明細胞肉腫4例、平滑筋肉腫3例、滑膜肉腫2例、ユーイング肉腫1例、脂肪肉腫1例、胞巣状軟部肉腫1例、血管肉腫1例、上衣腫1例、悪性末梢神経腫瘍1例)であった。

すべての患者で再発または転移性腫瘍を認めた。樹状細胞療法後、明らかな副作用は認められなかった。血液中の IFN- $\gamma$ 、IL-12 はいずれも樹状細胞療法後1ヶ月の時点で上昇していた。37例中35例で腫瘍の変化を評価でき、28例がPD、6例がSD、1例がPRであった。3年無増悪生存率は2.9%、3年全生存率は42.3%であった。

研究2．転移性骨腫瘍モデルを用いた凍結治療による免疫活性変化

腫瘍を切除したマウスと、切除した腫瘍を液体窒素処理して戻したマウスのいずれにおいてもELISAで検出可能なサイトカインの放出は認めず、両グループ間に有意差を認めなかった。

各グループから採取したPBMCとMMTを共培養し、ELISPOTアッセイによりIFN- $\gamma$ のスポットを形成させ、腫瘍特異的免疫の活性化を評価したが、両群間のスポット形成に優位さは認められなかった。

#### 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27件)

1. Miwa S, Yano S, Kimura H, Yamamoto M, Toneri M, Murakami T, Hayashi K, Yamamoto N, Fujiwara T, Tsuchiya H, Hoffman RM. Heterogeneous cell-cycle behavior in response to UVB irradiation by a population of single cancer cells visualized by time-lapse FUCCI imaging. *Cell Cycle* 14: 1932-7, 2015. (査読あり)
2. Miwa S, Yano S, Kimura H, Yamamoto M, Toneri M, Matsumoto Y, Uehara F, Hiroshima Y, Murakami T, Hayashi K, Yamamoto N, Bouvet M, Fujiwara T, Tsuchiya H, Hoffman RM. Cell-cycle fate-monitoring distinguishes individual chemosensitive and chemoresistant cancer cells in drug-treated heterogeneous populations demonstrated by real-time FUCCI imaging. *Cell Cycle* 14: 621-9, 2015. (査読あり)
3. Miwa S, Yokogawa A, Kobayashi T, Nishimura T, Igarashi K, Inatani H, Tsuchiya H. Risk factors of recurrent lumbar disc herniation: A single center study and review of the literature *J Spinal Disord Tech* 28: E265-9, 2015. (査読あり)
4. Miwa S, Yano S, Yamamoto M, Matsumoto Y, Uehara F, Toneri M, Murakami T, Kimura H, Hayashi K, Yamamoto N, Efimova EV, Tsuchiya H, Hoffman RM. Real-time fluorescence imaging of the DNA damage repair response during mitosis. *J Cell Biochem* 116: 661-6, 2015. (査読あり)
5. Toneri M, Miwa S, Zhang Y, Hu C, Yano S, Matsumoto Y, Nakanishi H, Hoffman RM, Zhao M. Tumor-targeting *Salmonella typhimurium* A1-R inhibits human prostate cancer experimental bone metastasis in mouse models. *Oncotarget* 6: 31335-43, 2015. (査読あり)
6. Yano S, Miwa S, Kishimoto H, Uehara F, Tazawa H, Toneri M, Hiroshima Y, Yamamoto M, Urata Y, Kagawa S, Bouvet M, Fujiwara T, Hoffman RM. Targeting tumors with a killer-reporter adenovirus for curative fluorescence-guided surgery of soft-tissue sarcoma. *Oncotarget* 6: 13133-48, 2015. (査読あり)
7. Yano S, Miwa S, Kishimoto H, Toneri M, Hiroshima Y, Yamamoto M, Bouvet M, Urata Y, Tazawa H, Kagawa S, Fujiwara T, Hoffman RM. Experimental curative fluorescence-guided surgery of highly invasive glioblastoma multiforme selectively labeled with a killer-reporter adenovirus. *Mol Ther* 23: 1182-8, 2015. (査読あり)
8. Matsumoto Y, Miwa S, Zhang Y, Zhao M, Yano S, Uehara F, Yamamoto M, Hiroshima Y, Toneri M, Bouvet M, Matsubara H, Tsuchiya H, Hoffman RM. Intraperitoneal administration of tumor-targeting *Salmonella typhimurium* A1-R inhibits disseminated human ovarian cancer and extends survival in nude mice. *Oncotarget* 6: 11369-77, 2015. (査読あり)
9. Yano S, Miwa S, Mii S, Hiroshima Y, Uehara F, Kishimoto H, Tazawa H, Zhao M, Bouvet M, Fujiwara T, Hoffman RM. Cancer cells MIMIC in vivo spatial-temporal cell-cycle phase distribution and chemosensitivity in 3-dimensional gelfoam histoculture but not 2-dimensional culture as visualized with real-time fucci imaging. *Cell Cycle* 14: 808-19, 2015. (査読あり)
10. Zhang Y, Miwa S, Hoffman RM, Zhao M. Tumor-targeting *Salmonella typhimurium* A1-R arrests growth of breast-cancer brain metastasis. *Oncotarget* 6: 2615-22, 2015. (査読あり)
11. Yano S, Zhang Y, Miwa S, Kishimoto H, Urata Y, Bouvet M, Fujiwara T, Hoffman RM. Precise navigation surgery of

- tumors in the lung in mouse models enabled by in situ fluorescence labeling with a killer-reporter adenovirus. *BMJ Open Respir Res* 2: e000096, 2015. (査読あり)
12. Uehara F, Hiroshima Y, Miwa S, Tome Y, Yano S, Yamamoto M, Matsumoto Y, Maehara H, Tanaka K, Bouvet M, Kanaya F, Hoffman RM. Fluorescence-guided surgery of retroperitoneal-implanted human fibrosarcoma in nude mice delays or eliminates tumor recurrence and increases survival compared to bright-light surgery. *PLoS One* 10: e0116865, 2015. (査読あり)
  13. Subhadrabandhu S, Takeuchi A, Yamamoto N, Shirai T, Nishida H, Hayashi K, Miwa S, Tsuchiya H. Frozen autograft-prosthesis composite reconstruction in malignant bone tumors. *Orthopedics* 38: e911-e918, 2015. (査読あり)
  14. Hiroshima Y, Zhao M, Zhang Y, Zhang N, Maawy A, Murakami T, Mii S, Uehara F, Yamamoto M, Miwa S, Yano S, Momiyama M, Mori R, Matsuyama R, Chishima T, Tanaka K, Ichikawa Y, Bouvet M, Endo I, Hoffman RM. Tumor-targeting *Salmonella typhimurium* A1-R arrests a chemo-resistant patient soft-tissue sarcoma in nude mice. *PLoS ONE* 10: e0134324, 2015. (査読あり)
  15. Shirai T, Tsuchiya H, Terauchi R, Tsuchida S, Mizoshiri N, Ikoma K, Fujiwara H, Miwa S, Kimura H, Takeuchi A, Hayashi K, Yamamoto N, Kubo T. Treatment of a simple bone cyst using a cannulated hydroxyapatite pin. *Medicine* 94: e1027, 2015. (査読あり)
  16. Hiroshima Y, Zhang Y, Zhao M, Zhang N, Murakami T, Maawy A, Mii S, Uehara F, Yamamoto M, Miwa S, Yano S, Momiyama M, Mori R, Matsuyama R, Chishima T, Tanaka K, Ichikawa Y, Bouvet M, Endo I, Hoffman RM. Tumor-targeting *Salmonella typhimurium* A1-R in combination with Trastuzumab eradicates HER-2-positive cervical cancer cells in patient-derived mouse models. *PLoS One* 10: e0120358, 2015. (査読あり)
  17. Hiroshima Y, Zhang Y, Zhang N, Maawy A, Mii S, Yamamoto M, Uehara F, Miwa S, Yano S, Murakami T, Momiyama M, Chishima T, Tanaka K, Ichikawa Y, Bouvet M, Murata T, Endo I, Hoffman RM. Establishment of a Patient-Derived Orthotopic Xenograft (PDOX) Model of HER-2-Positive Cervical Cancer Expressing the Clinical Metastatic Pattern. *PLoS One* 10: e0117417, 2015. (査読あり)
  18. Hiroshima Y, Zhang Y, Zhang N, Uehara F, Maawy A, Murakami T, Mii S, Yamamoto M, Miwa S, Yano S, Momiyama M, Mori R, Matsuyama R, Chishima T, Tanaka K, Ichikawa Y, Bouvet M, Endo I, Hoffman RM. Patient-derived Orthotopic Xenograft (PDOX) Nude Mouse Model of Soft-tissue Sarcoma More Closely Mimics the Patient Behavior in Contrast to the Subcutaneous Ectopic Model. *Anticancer Res* 35: 697-701, 2015. (査読あり)
  19. Igarashi K, Yamamoto N, Hayashi K, Takeuchi A, Miwa S, Odani A, Tsuchiya H. Effectiveness of Two Novel Anionic and Cationic Platinum Complexes in the Treatment of Osteosarcoma. *Anticancer Agents Med Chem* 15: 390-9, 2015. (査読あり)
  20. Igarashi K, Yamamoto N, Shirai T, Nishida H, Hayashi K, Tanzawa Y, Kimura H, Takeuchi A, Miwa S, Inatani H, Shimozaki S, Kato T, Tsuchiya H. Late recurrence of osteosarcoma: a report of two cases. *J Orthop Surg (Hong Kong)* 22: 415-9, 2014. (査読あり)
  21. Kimura H, Yamamoto N, Shirai T, Nishida H, Hayashi K, Tanzawa Y, Takeuchi A, Igarashi K, Inatani H, Shimozaki S, Kato T, Aoki Y, Higuchi T, Tsuchiya H. Efficacy of triplet regimen antiemetic therapy for chemotherapy-induced nausea and vomiting (CINV) in bone and soft tissue sarcoma patients receiving highly emetogenic chemotherapy, and an efficacy comparison of single-shot palonosetron and consecutive-day granisetron for CINV in a randomized, single-blinded crossover study. *Cancer Med*. 2015 Mar;4(3):333-41. (査読あり)
  22. Miwa S, Takeuchi A, Shirai T, Yamamoto N, Hayashi K, Nishida H, Kimura H, Igarashi K, Tsuchiya H. Outcomes and complications of reconstruction using tumor-bearing frozen autografts in patients with metastatic bone tumors. *Anticancer Res*. 2014 Oct;34(10):5569-77. (査読あり)
  23. Kimura H, Yamamoto N, Nishida H, Hayashi K, Takeuchi A, Nojima T, Ikeda H, Sawada-Kitamura S, Tsuchiya H. Synovial sarcoma in knee joint, mimicking low-grade sarcoma confirmed by molecular detection of SYT gene split. *Anticancer Res*. 2014

- Jun;34(6):3105-11. (査読あり)
24. Shirai T, Tsuchiya H, Nishida H, Yamamoto N, Watanabe K, Nakase J, Terauchi R, Arai Y, Fujiwara H, Kubo T. Antimicrobial megaprotheses supported with iodine. J Biomater Appl. 2014 Oct;29(4):617-23. (査読あり)
  25. Shimozaki S, Yamamoto N, Shirai T, Nishida H, Hayashi K, Tanzawa Y, Kimura H, Takeuchi A, Igarashi K, Inatani H, Kato T, Tsuchiya H. Pedicle versus free frozen autograft for reconstruction in malignant bone and soft tissue tumors of the lower extremities. J Orthop Sci. 2014 Jan;19(1):156-63. (査読あり)
  26. Miwa S, Takeuchi A, Ikeda H, Shirai T, Yamamoto N, Nishida H, Hayashi K, Tanzawa Y, Kimura H, Tsuchiya H. Prognostic value of histological response to chemotherapy in osteosarcoma patients receiving tumor-bearing frozen autograft. PLoS ONE 8: e71362, 2013. (査読あり)
  27. Miwa S, Takeuchi A, Shirai T, Taki J, Yamamoto N, Nishida H, Hayashi K, Tanzawa Y, Kimura H, Kentaro I, Ooi A, Tsuchiya H. Prognostic value of radiological response to chemotherapy in patients with osteosarcoma. PLoS ONE 8: e70015, 2013. (査読あり)

〔学会発表〕(計5件)

1. Nishida H, Yamamoto N, Takeuchi A, Tanzawa Y, Kimura H, Takata M, Nomura I, Miwa S, Kato T, Tsuchiya H. Immunotherapy based on dendritic cells is feasible for patients with malignant bone and soft tissue tumours. 26th European Musculoskeletal Oncology Society Meeting (EMSOS)(Gothenburg, Sweden) 平成 25 年 5 月 29 - 31 日
2. Nishida H, Yamamoto N, Shirai T, Hayashi K, Takeuchi A, Tanzawa Y, Kimura H, Igarashi K, Shimozaki K, Tsuchiya H. Reconstruction of malignant bone tumors using pedicle frozen autograft treated with liquid nitrogen. 14th European Federation of National Associations of Orthopaedics

and Traumatology (EFORT)(Istanbul, Turkey) 平成 25 年 6 月 5 - 8 日

3. Nishida H, Yamamoto N, Shirai T, Hayashi K, Takeuchi A, Tanzawa Y, Kimura H, Miwa S, Igarashi K, Tsuchiya H. Immunotherapy based on dendritic cells is feasible for patients with malignant bone and soft tissue tumours. 17th International Society of Limb Salvage (ISOLS)(Bologna, Italy) 平成 25 年 9 月 11 - 13 日
4. 三輪真嗣, 上原史成, 木村浩明, 林克洋, 山本憲男, Robert M. Hoffman, 土屋弘行. 骨肉腫マウスモデルに対する蛍光ガイド下手術の検討. 第 88 回日本整形外科学会学術総会 平成 27 年 5 月 21-24 日 (神戸)
5. 三輪真嗣, 山本憲男, 林克洋, 武内章彦, 稲谷弘幸, 青木裕, 樋口貴史, 阿部健作, 土屋弘行. 骨肉腫の術前化学療法後の画像変化と予後の相関についての検討. 第 48 回 日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会 平成 27 年 7 月 9-10 日 (香川)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕  
該当なし

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

西田 英司 (Nishida Hideji)  
金沢大学・医学系・協力研究員  
研究者番号: 50569374

(2)研究分担者

三輪 真嗣 (Miwa Shinji)  
金沢大学・大学病院・医員  
研究者番号: 40753455