

Title	肺悪性腫瘍に対する凍結融解壊死療法と免疫賦活剤の併用療法の開発
Sub Title	Development of the combination therapy with cryoablation and immune checkpoint inhibitor for lung cancer
Author	加勢田, 馨(Kaseda, Kaoru)
Publisher	
Publication year	2019
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2018. )
JaLC DOI	
Abstract	<p>ルイス肺癌細胞を大腿皮下に注入したマウスモデルを用いた。約1.5cm大に成長した腫瘍に対して凍結融解壊死療法あるいは凍結免疫療法を施行し、Day60にマウスを犠牲死させた後、凍結腫瘍の病理組織学的評価を施行した。結果として、凍結免疫療法は凍結融解壊死療法に比較し、より高い局所制御能を有することが示唆された。また、免疫チェックポイント阻害薬の投与経路としては、腫瘍局所投与の方がより局所制御能を高める結果であった。一方、投与する免疫チェックポイント阻害薬ごとの抗腫瘍効果に差異は認めなかった。</p> <p>Cryotherapy and cryoimmunotherapy were performed to 1.5cm femoral tumor that originated from Lewis Lung Cancer cell. Histologically, the area of nonviable tumor was significantly increased in size in cryoimmunotherapy group than cryotherapy group (Average: 88% vs 73%). Our data suggest that cryoimmunotherapy is superior than cryotherapy in local control and the most effective route is local administration. On the other hand, there was no difference in the effectiveness of local control between these three immune checkpoint inhibitors.</p>
Notes	<p>研究種目：若手研究(B)</p> <p>研究期間：2016～2018</p> <p>課題番号：16K19982</p> <p>研究分野：呼吸器外科</p>
Genre	Research Paper
URL	<a href="https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_16K19982seika">https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_16K19982seika</a>

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

令和 元 年 5 月 19 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19982

研究課題名（和文）肺悪性腫瘍に対する凍結融解壊死療法と免疫賦活剤の併用療法の開発

研究課題名（英文）Development of the combination therapy with cryoablation and immune checkpoint inhibitor for lung cancer

研究代表者

加勢田 馨（Kaseda, Kaoru）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・助教

研究者番号：70624435

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）：ルイス肺癌細胞を大腿皮下に注入したマウスモデルを用いた。約1.5cm大に成長した腫瘍に対して凍結融解壊死療法あるいは凍結免疫療法を施行し、Day60にマウスを犠牲死させた後、凍結腫瘍の病理組織学的評価を施行した。結果として、凍結免疫療法は凍結融解壊死療法に比較し、より高い局所制御能を有することが示唆された。また、免疫チェックポイント阻害薬の投与経路としては、腫瘍局所投与の方がより局所制御能を高める結果であった。一方、投与する免疫チェックポイント阻害薬ごとの抗腫瘍効果に差異は認めなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

凍結免疫療法は凍結融解壊死療法単独に比較し、より高い局所制御能を有することが示唆された。また、免疫チェックポイント阻害薬の投与経路としては、腫瘍局所投与の方がより局所制御能を高める結果であった。一方、投与する免疫チェックポイント阻害薬ごとの抗腫瘍効果に差異は認めなかった。本研究におけるマウスモデルでの結果から、現在臨床で行っている凍結療法に免疫チェックポイント阻害薬を併用する臨床試験を計画するにあたり、今後の研究課題として、凍結免疫療法による遠隔病巣への治療効果を評価する必要性が挙げられる。

研究成果の概要（英文）：Cryotherapy and cryoimmunotherapy were performed to 1.5cm femoral tumor that originated from Lewis Lung Cancer cell. Histologically, the area of nonviable tumor was significantly increased in size in cryoimmunotherapy group than cryotherapy group (Average: 88% vs 73%). Our data suggest that cryoimmunotherapy is superior than cryotherapy in local control and the most effective route is local administration. On the other hand, there was no difference in the effectiveness of local control between these three immune checkpoint inhibitors.

研究分野：呼吸器外科

キーワード：肺癌 腫瘍免疫 凍結融解壊死療法

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 凍結融解壊死療法

肺腫瘍に対する凍結融解壊死療法は、CT ガイド下に肺腫瘍に凍結針を穿刺し、腫瘍を凍結して壊死させる治療法である。凍結針内部にアルゴンガスを還流させることで-140~-150 の超低温を作り出し (Joule-Thompson 効果) 凍結針周囲に 3cm 大のアイスボール (=治療範囲) を形成する。慶應義塾大学病院では 2001 年から肺腫瘍に対する凍結融解壊死療法を約 240 例に施行してきた。凍結融解壊死療法は、局所麻酔下に施行可能、手術より低侵襲で呼吸機能低下が少ない、放射線治療と異なり同一病変に繰り返し施行可能、ラジオ波と異なり中枢病変に対しても安全に施行可能、などの長所を持つ。当院のデータでは凍結融解壊死療法の CTCAE grade3 以上の合併症発生率は 2.3%、30 日死亡率は 0%であった(Inoue, J Vasc Interv Radiol.2012)。最も頻度が高い合併症は気胸で、18%の症例に胸腔ドレナージを要したが、ほとんどの症例が数日で軽快した。過去 10 年以上の臨床経験から凍結融解壊死療法は他の癌治療と比較しても安全な治療法と言える。また、原発性肺癌に対する凍結融解壊死療法の有効性に関しては、過去に研究代表者らの研究グループから報告している。耐術不能な I 期非小細胞肺癌 22 例に凍結療法を施行し、3 年全生存率は 88%、3 年無再発生存率は 67%であった(Yamauchi, PLoS one,2012)。I 期非小細胞肺癌に対する凍結融解壊死療法の治療成績は放射線治療やラジオ波と同等以上と言える。一方で凍結融解壊死療法にはいくつかの課題もある。径 2cm 以上の腫瘍は 2cm 以下の腫瘍と比較して治療成績が悪いことが明らかになっており(3 年無再発生存率 70% vs. 36%) (Yashiro, J Vasc Interv Radiol,2013)、径 2cm 以上の腫瘍に対する治療成績の向上は今後の課題である。また、凍結融解壊死療法はあくまで肺病変に対する局所治療であり、凍結融解壊死療法後にリンパ節再発や遠隔再発をいかに抑制するかという課題を手術や放射線治療と同様に抱えている。

### (2) 免疫チェックポイント阻害薬

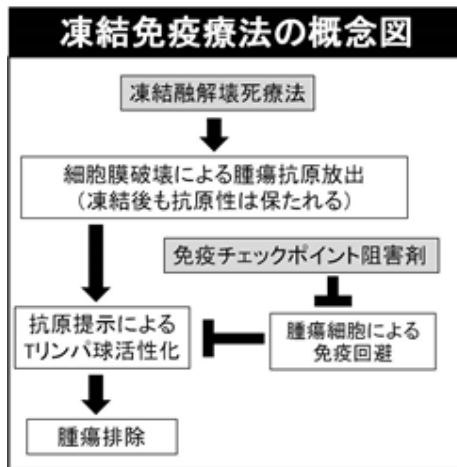
近年、非小細胞肺癌の免疫回避機構とそれを抑制する免疫チェックポイント阻害薬に注目が集まっている。通常、リンパ節内において癌細胞を認識した樹状細胞は、抗原を細胞表面に提示し、それを T 細胞が認識し活性化する。しかし、その際に T 細胞の表面に発現した CTLA-4 が樹状細胞と結合すると、T 細胞の働きが抑制される。また、腫瘍局所において、活性化した T 細胞の表面には PD-1 という分子が発現し、癌細胞には PD-L1 という分子が発現する。PD-1 と PD-L1 が結合すると、T 細胞の働きが抑制される。これが腫瘍の免疫回避機構であり、それらの分子に対する抗体 (PD-1 抗体、PD-L1 抗体、CTLA-4 抗体) の非小細胞肺癌に対する有効性が近年各種臨床試験で示され(Brahmer, N Engl J Med, 2015)(Paz-Ares, J Clin Oncol, 2015)、注目が集まっている。しかし、現状では免疫チェックポイント阻害薬単独での奏効率は 20%前後にとどまるため、他の治療法との併用療法も模索されている。現在、分子標的薬や細胞障害性抗癌剤、放射線治療との併用の臨床試験が 10 以上米国で行われているが、凍結療法との併用の臨床試験はまだない。

### (3) 凍結融解壊死療法と免疫チェックポイント阻害薬の併用療法

凍結融解壊死療法後に凍結病変以外の遠隔病変が消失するという現象は従来から知られていた(Soanes, J Urol, 1970)。凍結融解壊死療法によって腫瘍抗原が抗原性を保ったまま大量に放出され(den Brok, Cancer Res, 2006)、T 細胞が活性化することがこの現象の機序として推定されている。ただし、通常の場合、腫瘍細胞は前述の免疫回避機構で T 細胞の攻撃を免れており、実際には凍結融解壊死療法単独で腫瘍に対する免疫応答が惹起されることはまずない。しかし、免疫チェックポイント阻害剤を併用することにより、大量に放出された腫瘍抗原により T 細胞が活性化する可能性はある。これを裏づけるように、マウスの前立腺癌移植モデルで凍結融解壊死療法と CTLA-4 抗体の併用により抗腫瘍効果が向上したと報告されている(Waitz, Cancer Res, 2012)。凍結免疫療法は、腫瘍に対する免疫応答を惹起することで、局所制御の向上、治療後のリンパ節再発・遠隔再発の抑制、遠隔転移を有する状態での遠隔病変の制御、など多様な抗腫瘍効果をもたらす可能性がある。もし、それらの効果をマウスモデルで認めれば、現在臨床で行っている凍結融解壊死療法に免疫チェックポイント阻害薬を併用する臨床試験を計画することが可能である。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、肺癌に対する凍結融解壊死療法と免疫チェックポイント阻害薬の併用療法を開発することである。凍結融解壊死療法と免疫チェックポイント阻害薬との併用効果の前臨床研究知見の蓄積は少なく、特に肺癌に関しては全く報告がないことから本研究は独創的と言える。両者は異なる機序で腫瘍免疫を誘導することから、併用による相乗効果が期待される。マウスモデルにおいて凍結免疫療法の効果を認めれば、臨床応用への道が開ける。凍結療法も免疫チェックポイント阻害薬もすでに臨床で用いられている治療法であり、臨床応用の実現可能性は高い。また、国内で凍結融解壊死療法を行っている大学病院は当施設だけであり、将来的な臨床応用の可能性を考慮すると、当施設でこの研究を行う意義は大きいと考える。



### 3. 研究の方法

- (1) マウスの異所性肺腫瘍移植モデルを用いて、凍結融解壊死療法の効果および腫瘍に対する免疫応答を評価する。
- (2) 前述のモデルを用いて、凍結免疫療法の抗腫瘍効果を検証する。また、腫瘍に対する免疫応答が免疫チェックポイント阻害薬の併用によりどのように変化するかを検討する。
- (3) 最も併用効果の高い免疫チェックポイント阻害薬およびその投与経路（腫瘍局所 or 全身）を明らかにする。

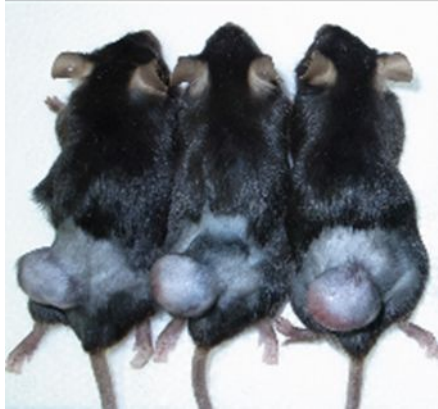
### 4. 研究成果

平成 28 年度はマウスの異所性肺腫瘍細胞移植モデルの作成および、同モデルに対する凍結装置の確立を中心に行った。肺腫瘍細胞株としてルイス肺腫瘍細胞を用い、培養したルイス肺腫瘍細胞  $5 \times 10^6$  個を 6 週齢の BALB/c マウスの左大腿皮下に注入すると、4 週間後に約 1.5cm 大の皮下腫瘍を形成する。これをもって異所性肺腫瘍細胞移植モデルとした。マウスに凍結融解壊死療法を行うために簡易な凍結装置 (50cc のシリンジに 14G ロングサーフロー針の内針を装着し、屈曲させたもの) を考案した。14G 針をマウスの皮下腫瘍に貫通させ、シリンジ内に液体窒素を 50cc 流し込むと、2 分間かけて腫瘍が凍結される。続いて、シリンジ内に 40 度の温水 50cc を注入すると腫瘍が融解される。この凍結・融解を実臨床と同様に 3 回繰り返し、1 セットの凍結融解壊死療法とした。培養したルイス肺腫瘍細胞を BALB/c マウスの左大腿皮下に注入することで、皮下腫瘍を形成することが確認出来た。また、作成した凍結装置を用いた凍結融解壊死療法も再現性を伴い施行可能であることが確認出来た。



平成 29 年度は上記マウスの異所性肺腫瘍細胞移植モデルにおける形成腫瘍の差異について検討した。培地 (DMEM+10%PBS+1%抗生剤) および培養条件 (37℃、5% CO<sub>2</sub>) の統一化を図り、培養したルイス肺腫瘍細胞のマウス大腿への移植を継続した。成功要因は不明であったが、徐々に 1-1.5cm 大の皮下腫瘍が形成可能となった。しかし、形成される皮下腫瘍の大きさの均一化が困難であり、今後、凍結免疫療法を施行するにあたり、適切な治療効果判定が困難と考えられた。一方、凍結融解壊死療法については、凍結・融解操作ともに安定的に施行可能であった。施行後の腫瘍においては、病理組織学的に広範な壊死・線維化を確認し得、凍結融解壊死療法単独でも、腫瘍への局所制御能を十分に有していることが示唆された。マウスの異所性肺腫瘍細胞移植モデル作成を継続したが、形成される皮下腫瘍の大きさの均一化が困難であり、凍結免疫療法を施行するにあたり、適切な治療効果判定が困難と考えられた。

#### マウスの異所性肺癌細胞移植モデル



平成 30 年度は、公益財団法人実験動物中央研究所にてルイス肺癌細胞を大腿皮下に注入したマウスモデルを用いた。約 1.5cm 大に成長した腫瘍に対して凍結融解壊死療法を施行した日を Day0 とし、Day60 にマウスを犠牲死させた後、凍結腫瘍の病理組織学的評価を施行したところ、プローベ周囲に広範な壊死性変化を生じていた。以上より、凍結融解壊死療法による腫瘍への局所治療効果が確認された。凍結融解壊死療法を施行した日を Day0 とし、Day0、3、7、10 に免疫チェックポイント阻害薬( PD-1 抗体、 PD-L1 抗体、 CTLA-4 抗体 )の投与を行った(凍結免疫療法群、n = 12: n = 4、 n = 4、 n = 4)。投与方法は腫瘍局所投与と腹腔内投与に群分けした。Day60 にマウスを犠牲死させた後、凍結腫瘍の病理組織学的評価を施行し、凍結融解壊死療法のみを施行した群(凍結融解壊死療法単独群、n = 12)と比較検討した。凍結免疫療法群では、凍結融解壊死療法単独群と比較し、非生存腫瘍領域の面積の有意な増加を認めた(平均値 88% vs 73%)。投与した免疫チェックポイント阻害薬ごとの比較では、非生存腫瘍領域の面積に有意差を認めなかった。一方、投与方法については、腫瘍局所投与群は腹腔内投与群と比較し、非生存腫瘍領域の面積に有意な増加を認めた(平均値 92% vs 85%)。凍結腫瘍の CD4、CD8、FoxP3 および Ki-67 の免疫染色では、CD4 および CD8 陽性 T 細胞数が凍結免疫療法群で有意な増加を示した一方で、FoxP3 陽性 T 細胞の数には両群間に有意差を認めなかった。以上の結果より、凍結免疫療法は凍結融解壊死療法単独に比較し、より高い局所制御能を有することが示唆された。また、免疫チェックポイント阻害薬の投与経路としては、腫瘍局所投与の方がより局所制御能を高める結果であった。一方、投与する免疫チェックポイント阻害薬ごとの抗腫瘍効果に差異は認めなかった。今後の研究課題として、凍結免疫療法による遠隔病巣への治療効果の評価が挙げられる。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)  
〔学会発表〕(計 0 件)  
〔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：  
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：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6．研究組織

### (1)研究分担者

### (2)研究協力者

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。