

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390340

研究課題名（和文） 免疫制御プログラムを組み込んだ新しい放射線治療の開発

研究課題名（英文） Novel radiation therapy with regulation of immune response

研究代表者

垣見 和宏（KAKIMI KAZUHIRO）

東京大学・医学部附属病院・特任准教授

研究者番号：80273358

研究成果の概要（和文）：放射線治療による抗腫瘍効果を、直接作用による腫瘍の細胞死に加えて、生体の免疫応答を介した間接的な抗腫瘍効果を含めて再評価することにより、免疫細胞治療を併用し、免疫応答を介した生体に与える効果を増幅し、全身的な治療効果が期待できる集学的な治療法を「免疫化学放射線治療」として確立することを目的に研究した。放射線治療とCTL治療を併用すると、骨髄性抑制細胞の誘導が抑制され、CTL浸潤が増強し、抗腫瘍効果を担うIFN $\gamma$ の産生が増加した。このような免疫反応の制御が放射線治療の効果を増強することに重要であることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：The objective of this study is to develop novel effective radiation therapy (RT) based on Radiation Immunobiology. In addition to the induction of apoptosis, we investigate the secondary anti-tumor activity of ionizing radiation mediated by the immune response to the irradiated tumor and host. When RT was followed with cytotoxic T lymphocyte therapy (CTL), antitumor activity of CTLs was markedly enhanced by prior RT, because RT inhibited the recruitment of myeloid derived suppressor cells. We demonstrated that the regulation of anti-tumor immune response contributed to the improvement of RT.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	7,000,000	2,100,000	9,100,000
2010年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2011年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
総計	13,900,000	4,170,000	18,070,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・放射線治療学

キーワード：放射線治療、免疫細胞治療、腫瘍免疫、免疫抑制

## 1. 研究開始当初の背景

従来、細胞傷害作用に基づく化学療法や放射線治療などは、免疫系に対して負の作用を持つ治療であると考えられていた。しかしながら放射線が生体に与える影響と腫瘍に対する免疫応答に関する理解が進むに伴い、放射線と免疫応答は相反するものではなく、放射線治療と免疫応答を介した治療の併用に

より、局所制御能を高めさらに全身的な治療効果を得ることができる治療法が開発できると考えられるようになった。さらに、従来の化学療法や放射線治療においても、その抗腫瘍効果には自然免疫や獲得免疫の両者が深く関与しており、DNA damage に対する反応として NKG2D リガンドの発現や、p53 の作用による CCL2 や IL-15 の発現による自然免疫

系の活性化、カルレティキュリンを介した腫瘍の取り込み、傷害を受けた腫瘍細胞からの HMGB1 の放出に伴う樹状細胞 (DC) の成熟とクロスプレゼンテーションなどを介して免疫応答が活性化されることが明らかになった。担癌個体における腫瘍による免疫抑制性の環境が詳細に解析され、化学療法や放射線治療を用いた免疫抑制解除を治療戦略に組み込むことは新たな集学的治療の開発につながると期待されている。

## 2. 研究の目的

腫瘍を取り巻く微小環境では、がんに対する生体の免疫応答を抑制している多くの因子が発現していると考えられている。化学療法や分子標的薬も、腫瘍に対する直接的な抗腫瘍効果のみならず、免疫系の制御に関わる作用を持つことが明らかになってきた。ゲムシタビンは抑制性 T 細胞を除去することにより免疫応答を活性化し、オキザリプラチンやフルモルピシンによる癌細胞の細胞死は、カルレティキュリンの発現を伴い、効率よく抗原提示細胞に貪食され抗原特異的な免疫応答を誘導する事が知られている。Radiosensitizer として評価を得た薬剤、cytotoxic drug として開発された抗癌剤、腫瘍細胞の増殖シグナルを阻害する分子標的薬などを Radiation Immunobiology という新しい視点に基づいて再評価することにより化学放射線治療の新しい戦略を検討したい。同時に放射線照射そのものを免疫制御技術としてとらえ、腫瘍による抑制性の環境を改善するためには、従来の治療に用いる線量や照射回数とは全く異なる新しい放射線治療法の検討が必要である。免疫応答を介して生体に与える効果を増幅し、照射部位局所だけに限局されるのではなく全身的で継続的な治療効果が期待できる革新的ながんの治療法の開発を試みたい。本研究は、このような新しい治療法を開発するための科学的な根拠を、分子レベル、細胞レベル、個体レベルで確立することを目的とし、放射線治療に化学療法と免疫細胞治療を併用した癌治療を開発することを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) C57BL/6 マウスの皮下に  $1 \times 10^6$  個の B16F10 メラノーマ細胞を接種し、担癌マウスモデルを作成した。腫瘍接種後第 7 日に少量の Cyclophosphamide (50 mg/Kg) を腹腔内に投与した。Tadalafil (0.04mg/mouse) を経口で連日投与した。第 8 日に 2Gy の電子線照射を行った。第 22 日にその腫瘍径を比較するとともに、腫瘍内浸潤リンパ球を単離し、免疫応答を詳細に解析した。

(2) 腫瘍内の免疫応答を再現するために、B16 担癌マウスの腫瘍特異的 CTL 治療モデル

を用いた。C57BL/6 マウスに B16 メラノーマ細胞を接種し皮下腫瘍を形成した後、①処置なし、②腫瘍特異的 CTL (Thy1.1<sup>+</sup>,  $1.0 \times 10^7$ /匹) 治療を行った。CTL 治療後 1 日、3 日、5 日、7 日に腫瘍を摘出し腫瘍内へ浸潤したリンパ球 (CD45<sup>+</sup>細胞) を解析した。

(3) B16 担癌マウスに対して 2Gy の電子線照射を行ったのち、腫瘍特異的 CTL 治療を併用した。抗腫瘍効果を解析するとともに、腫瘍内へ浸潤したリンパ球 (CD45<sup>+</sup>細胞) を解析した。

## 4. 研究成果

(1) 単独では十分な抗腫瘍効果が得られない (腫瘍体積比 83.7%) 少量の Cyclophosphamide の投与により MDSC は  $4.9 \times 10^6$  個に減少していた。単独では十分な抗腫瘍効果が得られない量の電子線照射を受けた群 (腫瘍体積比 83.4%) でも MDSC は  $4.7 \times 10^6$  に減少していた。Cyclophosphamide と電子線照射の併用では、著明な抗腫瘍効果の増強 (腫瘍体積比 33.9%) が得られた。免疫制御能を持った薬剤の併用により、放射線治療の効果を増大させることが可能であることが明らかになった。一方同様に MDSC に作用する薬剤でも Tadalafil と電子線照射を併用した群では、腫瘍体積は 73.4% と、併用効果は見られなかった。免疫制御のメカニズムに基づいた併用治療の選択が必要であることが明らかになった。

(2) 腫瘍体積は治療群では 3 日後以降から増加が抑制され 7 日後で無治療群と比較して有意な差を認めた。腫瘍内に浸潤した CD45<sup>+</sup>細胞数は無治療群では大きく変動しなかったが、治療群では 1 日後と比較して 5 日後に 7.5 倍に増加した。腫瘍内の Thy1.1<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>細胞数と CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>+</sup>Gr1<sup>+</sup>細胞数はそれぞれ治療後 3 日後と 5 日後に最大となった。治療後 5 日後の腫瘍内の CD45<sup>+</sup>細胞の内 60%以上が CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>+</sup>Gr1<sup>+</sup>細胞であった。またそれらの細胞は Reactive oxygen species (ROS) と Nitric oxide (NO) を産生していた。腫瘍内に腫瘍特異的 CTL による免疫応答を誘導すると、抗腫瘍効果を示したが、腫瘍特異的 CTL の腫瘍内浸潤に伴って ROS と NO を産生する免疫抑制性の CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>+</sup>Gr1<sup>+</sup>細胞 (Myeloid derived suppressor cell; MDSC) が腫瘍内に浸潤した。放射線治療後の免疫応答を増強するためには、腫瘍内に浸潤する MDSC の制御を合わせて治療戦略を構築する必要があると考えられた。

(3) 腫瘍に 2Gy の電子線照射を施すと、未治療の腫瘍と比較して腫瘍体積は 66% に抑制することが可能であったが、CTL 治療を併用すると、腫瘍体積は 9.9% に抑制され、強い抗腫瘍効果が得られた。B16 特異的 CTL を移入して腫瘍内に免疫応答を誘導すると、免疫

応答を抑制すると言われている

GR1<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>Myeloid Derived Suppressor Cell (MDSC)が浸潤してきた。フローサイトメーター (FACS) を用いて解析したところ、腫瘍内には Tumor associated macrophage (TAM): CD11b<sup>+</sup>Gr-1<sup>-</sup>Ly6c<sup>-</sup>, granulocytic MDSC (G-MDSC): CD11b<sup>+</sup>Gr-1<sup>+</sup>Ly6c<sup>+</sup>, monocytic MDSC (Mo-MDSC): CD11b<sup>+</sup>Gr-1<sup>-</sup>Ly6c<sup>+</sup>が存在し、特に Mo-MDSC が腫瘍内に誘導され、Arginase、iNOS、VEGF、IL-6 を産生し免疫応答を抑制することが明らかになった。放射線治療と CTL 治療を併用すると、MDSC の誘導が抑制され、腫瘍内の抗原特異的な CTL 浸潤が増強し、抗腫瘍効果を担う IFN $\gamma$  の産生が増加した。このような免疫反応の増強が放射線治療の効果の増強につながる事が明らかになった。

(4) 従来の抗腫瘍効果の検討は、腫瘍細胞に対する細胞死の誘導によって評価されてきたが、放射線照射によって誘導した腫瘍の細胞死に対する生体反応に着目し、さらに放射線照射に対する生体の生物学的な反応を、免疫応答を中心に分子レベル・細胞レベル・個体レベルで詳細に解析することで、新しい放射線治療戦略の基盤を構築することが可能であることを示した。生体の免疫応答の制御を治療プログラムに組み込み、放射線照射による直接効果に、免疫応答を介した抗腫瘍効果を併せることにより、次世代の放射線治療を免疫化学放射線治療として確立することが期待される。

#### 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 11 件)

1. Yoshida Y, Nakajima J, Wada H, Kakimi K.  $\gamma$   $\delta$  T-cell immunotherapy for lung cancer. *Surgery today.* 2011;41(5): 606-11. 10.1007/s00595-010-4478-7 査読有
2. Toda M, Wang L, Ogura S, Torii M, Kurachi M, Kakimi K., Nishikawa H, Matsushima K, Shiku H, Kuribayashi K, Kato T. UV irradiation of immunized mice induces type 1 regulatory T cells that suppress tumor antigen specific cytotoxic T lymphocyte responses. *International journal of cancer.* 2011;129(5):1126-36. 10.1002/ijc.25775 査読有
3. Sakamoto M, Nakajima J, Murakawa T, Fukami T, Yoshida Y, Murayama T, Takamoto S, Matsushita H, Kakimi K. Adoptive immunotherapy for advanced non-small cell lung cancer using zoledronate-expanded  $\gamma$   $\delta$  T cells: a phase I clinical study. *Journal of immunotherapy.* 2011;34(2):202-11. 10.10

97/CJI.0b013e318207ecfb 査読有

4. Matsushita H, Kakimi K. Exploring immune therapy for renal cancer. *International journal of urology : official journal of the Japanese Urological Association.* 2011;18(6):412-13. 10.1111/j.1442-2042.2011.02762.x 査読有
5. Kurachi M, Kurachi J, Suenaga F, Tsukui T, Abe J, Ueha S, Tomura M, Sugihara K, Takamura S, Kakimi K., Matsushima K. Chemokine receptor CXCR3 facilitates CD8(+) T cell differentiation into short-lived effector cells leading to memory degeneration. *The Journal of experimental medicine.* 2011;208(8): 1605-20. 10.1084/jem.20102101 査読有
6. Kondo M, Izumi T, Fujieda N, Kondo A, Morishita T, Matsushita H, Kakimi K. Expansion of human peripheral blood  $\gamma$   $\delta$  T cells using zoledronate. *Journal of visualized experiments : JoVE.* 2011(55). 10.3791/3182 査読有
7. Kakimi K., Isobe M, Uenaka A, Wada H, Sato E, Doki Y, Nakajima J, Seto Y, Yamatsuji T, Naomoto Y, Shiraishi K, Takigawa N, Kiura K, Tsuji K, Iwatsuki K, Oka M, Pan L, Hoffman EW, Old LJ, Nakayama E. A phase I study of vaccination with NY-ESO-1f peptide mixed with Picibanil OK-432 and Montanide ISA-51 in patients with cancers expressing the NY-ESO-1 antigen. *International journal of cancer Journal international du cancer.* 2011;129(12):2836-46. 10.1002/ijc.25955 査読有
8. Nakajima J, Murakawa T, Fukami T, Goto S, Kaneko T, Yoshida Y, Takamoto S, Kakimi K. A phase I study of adoptive immunotherapy for recurrent non-small-cell lung cancer patients with autologous  $\gamma$   $\delta$  T cells. *European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery.* 2010;37(5):1191-7. 10.1016/j.ejcts.2009.11.051 査読有
9. Ikeuchi N, Futami J, Hosoi A, Noji S, Kurachi M, Ueha S, Fujii S, Yamada H, Matsushima K, Moriyasu F, Kakimi K. Efficient cross-presentation of soluble exogenous antigens introduced into dendritic cells using a weak-based amphiphilic peptide. *Biochemical and biophysical research communications.* 2010;392(2):217-22. 10.1016/j.bbrc.2010.01.019 査読有
10. Sato K, Kondo M, Sakuta K, Hosoi A, Noji

- S, Sugiura M, Yoshida Y, Kakimi K. Impact of culture medium on the expansion of T cells for immunotherapy. *Cytotherapy*. 2009;11(7):936-46. 10. 3109 /14653240903219114 査読有
11. Kakimi K, Nakajima J, Wada H. Active specific immunotherapy and cell-transfer therapy for the treatment of non-small cell lung cancer. *Lung cancer*. 2009;65(1):1-8. 10. 1016/j. lungcan. 2008 . 10. 018 査読有

[学会発表] (計 23 件)

1. 野地秀一, 細井亮宏, 竹田和由, 松下博和, 瀬戸泰之, 垣見和宏. 抗4-1BB抗体はCTLの増殖・生存ではなく、エフェクター活性化作用して抗腫瘍効果を増強する. 第70回日本癌学会学術総会. 2011年10月4日(名古屋)
2. 近藤 篤, 藤枝奈緒, 森下岳晴, 近藤 真, 泉 謙道, 前川隆司, 松下博和, 垣見和宏.  $\gamma$   $\delta$ T細胞移入治療により末梢血中に蓄積された $\gamma$   $\delta$ T細胞の機能評価. 第49回日本癌治療学会総会/学術集会. 2011年10月29日(名古屋)
3. 泉謙道, 近藤真, 松下博和, 近藤篤, 森下岳晴, 藤枝奈緒, 垣見和宏. 共通 $\gamma$ 鎖ファミリーサイトカインによる $\gamma$   $\delta$ T細胞の増殖に対する影響. 第15回日本がん免疫学会総会. 2011年6月30日-7月1日(大阪市)
4. 松下博和, 榎本 裕, 久米春喜, 永田政義, 細田千尋, 福原浩, 藤村哲也, 鈴木基文, 西松寛明, 石川晃, 本間之夫, 垣見和宏. 転移性腎細胞癌に対するsunitinib併用DCワクチン治療. 第49回日本癌治療学会総会/学術集会. 2011年10月28日(名古屋)
5. 松下博和, Schreiber RD, 垣見和宏. がん免疫エディティングと腫瘍拒絶のメカニズム. 第20回日本癌病態治療研究会. 2011年6月17日(東京都)
6. 坂本未紀, 村山智紀, 村川和弘, 中島淳, 垣見和宏. 進行再発非小細胞肺癌に対する $\gamma$   $\delta$ T細胞移入治療. 第28回日本呼吸器外科学会総会. 平成23年5月13日(大分県由布市)
7. 細井亮宏, 野地秀一, 竹田和由, 松下博和, 瀬戸泰之, 垣見和宏. 抗CD137抗体併用による腫瘍特異的CTL移入治療の増強. 第15回日本がん免疫学会総会. 2011年6月30日-7月1日(大阪市)
8. 垣見和宏, 中島淳, 村川和弘, 吉田幸弘, 坂本美紀, 村山智紀, 松下博和, 和田尚, 中山睿一. NY-ESO-1fペプチドワクチン治療経験から見たRECISTガイドラインとimmune-related response criteria. 第20回日本癌病態治療研究会. 2011年6月18日(東京都)
9. Matsushita H, Kakimi K, Schreiber RD. Antigen immunoselection as a mechanism of cancer immunoediting. 第40回日本免疫学会総会/学術集会. 2011年11月27-29日(幕張メッセ)
10. Kakimi K, Izumi T, Kondo M, Fujieda N, Kondo A, Tamura N, Maekawa R. Requirement for common gamma chain cytokines for adoptive transferred gd T cell function and homeostasis in vivo. The 2nd Meeting of Asian Cellular Therapy Organization. Oct 17-20, 2011(Miyazaki, Japan)
11. Kakimi K, Izumi T, Kondo M, Fujieda N, Kondo A, Morishita T, R. Maekawa, Matsushita H. Requirement for common gamma chain family cytokines for adoptive transferred gd T cell function and homeostasis in vivo. *Immunology 2011: 98th Annual Meeting The American Association of Immunologist*. May 16, 2011(San Francisco, CA, USA)
12. Kakimi K, Hosoi A, Matsushita H. CTL therapy-induced accumulation of CD11b+Gr-1+ myeloid-derived suppressor cells in tumors. *Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology: Cancer Control by Tumor Suppressors and Immune Effectors*. February 12-17, 2011(Santa Fe, New Mexico, USA)
13. Kakimi K. Efficient Cross-presentation of Soluble Exogenous Antigens Introduced into Dendritic Cells. *HAA-ISHAPD 2011*. November 1, 2011(Sydney, Australia)
14. Hosoi A, Shuichi N, Kazuyoshi T, Hirokazu M, Kakimi, K. The discriminatory activation of tumor specific cytotoxic T lymphocytes localized in the tumor by anti-4-1BB mAb. 第40回日本免疫学会総会

/学術集会. 2011年11月27-29日(幕張メッセ)

16. 細井亮宏, 前川隆司, 垣見和宏. CTL 治療の二面性: 免疫抑制活性を持つ MDSC を腫瘍内に誘導する. 第69回日本癌学会学術総会. 2010;2010年9月22-24日(大阪市)
16. 細井亮宏, 前川隆司, 垣見和宏. CTL 治療は免疫抑制活性を持つ CD11b+Gr1+細胞を腫瘍内に誘導する. 第14回 日本がん免疫学会総会. 2010年7月22-23日(熊本市):53
17. 泉謙道, 近藤真, 垣見和宏. がんに対する $\gamma$   $\delta$ T 細胞治療. 第69回日本癌学会学術総会. 2010年9月22-24日(大阪市)
18. 吉田幸弘, 村山智紀, 金子亨, 後藤重則, 村川俊弘, 坂本末紀, 中島淳, 垣見和宏. 自己活性化 $\gamma$   $\delta$ T 細胞による非小細胞肺癌免疫療法. 第48回日本癌治療学会学術集会. 2010年10月28-30日(京都市)
19. 垣見和宏. CTL 治療の二面性: 抗腫瘍効果と抑制性細胞の誘導. 第69回日本癌学会学術総会. 2010年9月22-24日(大阪市)
20. Sakuta K, Noguchi A, Ariyoshi N, Nakata J, Maekawa R, Kakimi K. Adoptive gamma/delta T cell for the treatment of cancer. 14th International Congress of Immunology. August 22-27, 2010 (Kobe, JAPAN)
21. Hosoi A, Maekawa R, Kakimi K. CTL therapy-induced accumulation of CD11b+Gr-1+myeloid-derived suppressor cells in tumors. 14th International Congress of Immunology. August 22-27, 2010 (Kobe, Japan)
22. 細井亮宏, 前川隆司, 吉田幸弘, 垣見和宏. 抗腫瘍エフェクター細胞 免疫抑制因子阻害剤と腫瘍特異的細胞傷害性 T 細胞移入の併用療法による抗腫瘍効果の検討. 第13回 日本がん免疫学会総会. 2009年6月24-25日(北九州市小倉)
23. 垣見和宏. Cell therapy (細胞療法) の新たなアプローチ: プレドロン酸を用いて培養した $V\gamma 9V\delta 2T$  細胞による免疫細胞治療. 第13回 日本がん免疫学会総会. 2009年6月24-25日(北九州市小倉)

## 6. 研究組織

- (1) 研究代表者  
垣見 和宏 (KAKIMI KAZUHIRO)  
東京大学・医学部附属病院・特任准教授  
研究者番号: 80273358
- (2) 研究分担者  
中川 恵一 (NAKAGAWA KEIICHI)  
東京大学・医学部附属病院・准教授  
研究者番号: 80188896
- (3) 連携研究者  
白石 憲史郎 (SHIRAIISHI KENSHIRO)  
東京大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号: 40447404  
  
山下 英臣 (YAMASHITA HIDEOMI)  
東京大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号: 70447407  
  
吉田 幸弘 (YOSHIDA YUKIHIRO)  
東京大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号: 00529050  
  
上羽 悟史 (UEHA SATOSHI)  
東京大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号: 00447385  
  
倉知 慎 (KURACHI MAKOTO)  
東京大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号: 00396722