

令和元年6月11日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11028

研究課題名(和文)放射線誘導型の内因性ワクチン効果と癌由来cfNA・mtDNAに関する研究

研究課題名(英文) Endogenous vaccine effect induced by radiotherapy and the association with cfNA  
mtDNA DNA in prostate cancer patient serum

研究代表者

久保 誠 (Kubo, Makoto)

北里大学・医療衛生学部・講師

研究者番号：40464804

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：前立腺癌に対する放射線治療は重要な治療法の一つであり、腫瘍免疫応答解析の進歩は抗腫瘍免疫応答の誘導を示唆している。我々は先行研究で、放射線治療を実施した前立腺癌患者で治療後に活性化T細胞の割合が増加することを確認し、放射線治療が誘導する内因性ワクチン効果の存在を推測してきた。今回、この機序を明らかにする目的で、樹状細胞を活性化し得る可能性のある癌細胞が血清中に放出すると考えられるcell free nucleic acid (cfNA)について解析を行った。その結果、治療によるcfNA量の変化が認められた患者はいるものの、活性化T細胞増加との関連性は明確化できなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、放射線治療によって障害された癌細胞から放出される様々な物質の中で、免疫系を活性化し得る可能性のあるものとして血清中のcell free nucleic acid (cfNA)に着目した。このcfNAが免疫活性化物質となりうるのであれば、放射線治療によって誘導される抗腫瘍効果の機序の一端を説明し得るとともに、将来的には放射線照射時に核酸を併せて投与する等、放射線治療の効果を上げることに繋がると期待される。また、照射量の減少に繋がることも予想され、本研究で得られる成果の社会的意義は大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Radiation therapy (RT) is one of the most important treatments for prostate cancer. RT may induce an effective anti-tumor immune response. Actually, we have already confirmed the increase of T cell proportion in patients receiving low-dose-rate brachytherapy. Then, we have predicted the induction of endogenous vaccine effect by RT. However, the mechanism involved has remained unclear. Peripheral blood samples were collected periodically after prostate RT, and we analyzed cell free nucleic acid in patient serum. Moreover, lymphocyte subsets were also analyzed by flow cytometry. As the results, some patients receiving RT were detected the alteration of cell free nucleic acid (cfNA) quantity after treatment. However, we have not clarified the association with the cfNA detection and the activated T cell increase.

研究分野：腫瘍免疫

キーワード：前立腺癌 放射線治療 内因性ワクチン cfNA

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

### 1. 研究開始当初の背景

(1)放射線治療が腫瘍に及ぼす影響は、これまではダイレクトな殺細胞効果によると考えられてきた。しかしながら、原発巣に対して放射線照射を行ったにも関わらず「放射線照射が直接なされていない転移巣においても腫瘍が縮小する現象 (abscopal effect)」が臨床的にも確認されており、これは局所から全身への抗腫瘍免疫応答の誘導なしには説明ができない。また、我々の先行研究においても、永久挿入密封小線源療法を実施した前立腺癌患者の末梢血で、活性化 T 細胞の割合が治療後に増加することを確認している。

(2)放射線照射が免疫と密接に関わりがあることは Stone らによって、T 細胞欠損マウスでは放射線照射の効果が明らかに減弱すること、正常マウスと同等の効果を発揮させるには 2 倍も多い線量が必要であったことが 40 年前に報告されている。また、*in vivo* にて高線量の放射線を照射した腫瘍細胞を体内に戻すとワクチン効果を持つことなども確認されている。さらに、前立腺癌の実臨床においても、高頻度にリンパ節転移や遠隔転移をきたしている可能性が高いハイリスク群と呼ばれる予後不良の前立腺癌症例においても原発巣のみの照射によって転移が生ずることなく外科的切除術を上回る成績が得られている。

(3)現在、癌に対する放射線治療は世界的にも高線量を照射する傾向にあり、(2)で述べた *in vivo* での照射に近い状況が推測され、照射によって破壊された腫瘍細胞が抗原となり得ることは勿論であるが、その他の免疫活性化を促す因子を放出することが考えられる。近年の放射線治療機器やコンピュータソフトの進歩による高精度放射線照射は、より強い抗腫瘍免疫応答を誘導し得る可能性を有している。

(4)我々の先行研究で、永久挿入密封小線源療法を実施した前立腺癌患者の末梢血で、活性化 T 細胞の割合が治療後に増加することを確認し、実臨床においても高精度放射線照射による免疫応答の誘導は示唆されるものの、その誘導機序の詳細は明らかでない。

### 2. 研究の目的

(1)近年、我々の当該施設においても外部照射と比較して高線量を照射可能である組織内照射によって、外科的切除が困難とされる超ハイリスク前立腺癌症例でさえも優れた制癌効果を確認している。また、我々は先行研究で組織内照射を実施した前立腺癌患者で、治療後に活性化 T 細胞の割合が増加したことを確認している。このように、放射線治療による抗腫瘍免疫応答の誘導が示唆されるものの、それらの詳細については未だに明らかになっていない。我々がこれまでの臨床研究で観察した T 細胞活性化機序の明確化は、放射線照射が誘導する内因性ワクチン効果を効率良く制御でき、放射線治療と免疫誘導を兼ね備えた新たな治療ストラテジーの確立に繋がると考えられる。

(2)近年、腫瘍細胞から血流に放出される cell free nucleic acid (cfNA) は腫瘍の悪性度、スクリーニングや治療効果に関連する因子としても注目され、その収量は健常者 (0-100 ng/ml) に比べ、癌患者 (0->1000 ng/ml) で明らかに多いとされる。腫瘍細胞から放出される cfNA には自身の DNA や RNA、ミトコンドリアが独自に持つミトコンドリア DNA (mtDNA) も腫瘍細胞死に伴って血清中へ放出される。この mtDNA は、細菌 DNA と同じく非メチル化 CpG 配列を多く有しているため、mtDNA は内因性の樹状細胞活性化因子としても機能できると考えられる。

(3)我々が観察した放射線治療による T 細胞活性化の機序には、樹状細胞の活性化が重要であると考えており、放射線治療が誘導した細胞死で放出された cfNA や mtDNA が内因性の免疫活性化因子として樹状細胞を刺激し、T 細胞活性化を惹起している可能性を予測した。本研究では、放射線治療によって誘導される抗腫瘍免疫応答の機序を、放射線治療を実施した前立腺癌患者で解析し、放射線治療の有効性の評価を免疫学的、分子生物学的観点から明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 対象患者の選定と放射線治療の実施

前立腺癌患者における対象症例の選定と治療の実施については、研究分担者の佐藤威文 (平成 28 年度まで) と石山博條が実施した。また本研究は、北里大学医学部・病院倫理委員会にて審議され承認を得た前向き非介入観察試験である (承認番号 B13-62, B16-50)。前立腺癌患者に対する放射線治療としては、ヨウ素 125 永久密封小線源療法 (LDR)、イリジウム 192 高線量率組織内照射法 (HDR)、強度変調放射線療法 (IMRT)、定位的放射線治療 (SRT)、塩化ラジウム ( $^{223}\text{Ra}$ ) 注射液投与のいずれかが実施された。治療法の選択については、インフォームドコンセントを実施し、本研究参加の同意を得た上で、患者自身の選択によるものでランダム化は実施していない。

#### (2) 放射線治療施行患者における末梢血白血球の動態解析

放射線治療前、治療開始日から起算して凡そ3ヵ月毎に患者から約10ml採血した。末梢血のリンパ球、単球、顆粒球の動態は、CD3、CD4、CD8、CD11b、CD14、CD16、CD19、CD56、メモリーT細胞はCD45RA、CD45RO、CD62L、CCR7、細胞傷害性T細胞を含む活性化リンパ球はCD38、HLA-DR、制御性T細胞はCD25、FoxP3、樹状細胞はCD11c、CD83、CD86、HLA-DRに対する蛍光標識モノクローナル抗体を用いてフローサイトメトリー解析を行った。腫瘍免疫抑制に関与すると注目されている骨髄由来抑制性細胞(MDSC)についても解析した。

### (3) 放射線治療施行患者における血漿中サイトカインの定量解析

末梢血の動態解析(2)を実施する際に、血漿は分離し-80°Cに保存した。この保存しておいた血漿を用いて放射線治療前後の血漿中サイトカインの測定をELISA法により実施した。測定したサイトカインの種類は、Interleukin(IL)-1 $\beta$ 、IL-2、IL-4、IL-8、IL-10、IL-12、Interferon- $\gamma$ 、Tumor necrosis factor- $\alpha$ である。

### (4) 放射線治療施行患者における血漿中 cell free nucleic acid (cfNA) の検出

末梢血より分離保存しておいた血漿から、Plasma cell free circulating DNA 精製キットを用いて血漿中のcfNAを回収した。回収後、cfNAの濃度については、極微量分光高度計を用いて測定した。

## 4. 研究成果

### (1) 放射線治療(組織内照射)施行患者における末梢血白血球の動態解析

本研究への参加の同意を得られた患者末梢血を用いて解析を実施した。なお、その内訳は、ヨウ素125永久密封小線源療法(LDR)を実施した患者が35名、イリジウム192高線量率組織内照射法(HDR)を実施した患者が17名である。動態解析にはフローサイトメーターを使用した。今回、新たに解析したHDR施行患者について、FSCとSSCで展開した白血球分画については、リンパ球と単球分画において大きな変化は観察されなかった。リンパ球分画についても、B細胞、T細胞、ヘルパーT細胞、キラーT細胞、ナチュラルキラー細胞サブセットに大きな変化は認められなかった。LDRにおける先行研究と同様にHDRでも活性化T細胞に関して解析を実施した。その結果、活性化T細胞の割合は治療開始後からLDRと同様に徐々に増加していた(図1)。

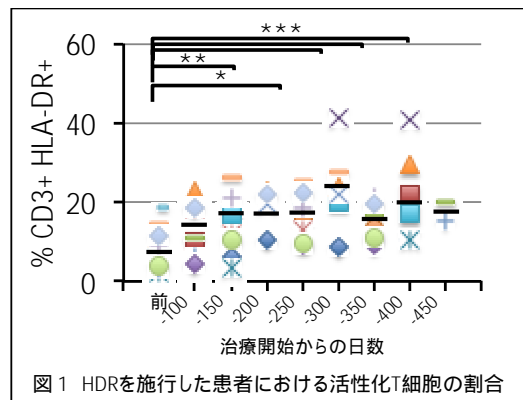


図1 HDRを施行した患者における活性化T細胞の割合

活性化CD4陽性T細胞、活性化CD8陽性T細胞の割合も同様に増加した。組織内照射法でT細胞の活性化が誘導されていたことから、腫瘍免疫において重要であるNK細胞のサブセットについても解析を行った。FSCとSSCで展開したリンパ球分画をゲートし、細胞障害活性に関与するCD8+CD16/56+ NK細胞とサイトカイン産生に関与するCD8-CD16/56+ NK細胞について解析した。その結果、LDRとHDRの違いに関わらず、CD8+CD16/56+ NK細胞は治療開始後に徐々に増加する傾向を認め、治療開始から200日以降は有意な増加を示した(図2)。一方、CD8-CD16/56+ NK細胞については、有意な差を認めなかった。次に、単球分画についてもサブセット解析を実施した。FSCとSSCで展開した単球分画をゲートし、高い貪食能を有し樹状細胞への分化能を持つとされるCD14+CD16-古典的単球、活性酸素の産生、抗原提示能、T細胞増殖、炎症や血管新生に携わるCD14+CD16+Intermediate単球、炎症性サイトカイン産生、抗原提示能、T細胞刺激に関与するとされるCD14lowCD16+非古典的単球について解析した。その結果、LDRとHDRの違いに関わらず、非古典的単球とIntermediate単球については、治療に伴って大きな変動を観察しなかった一方、古典的単球については治療開始150日から300日の間に有意な減少を示した(図3)。

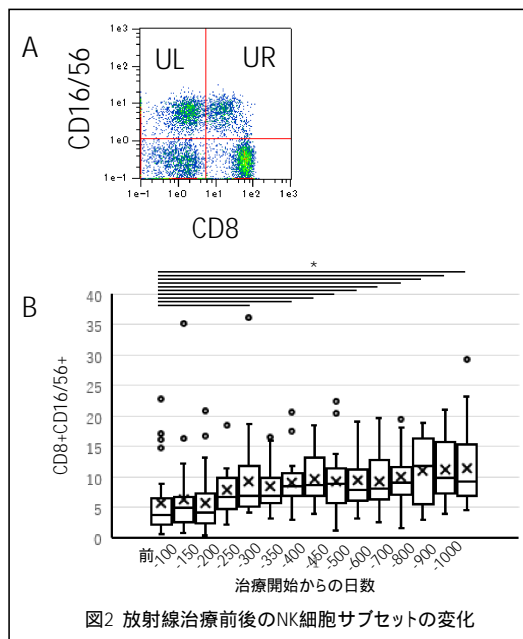


図2 放射線治療前後のNK細胞サブセットの変化

### (2) 放射線治療(組織内照射)施行患者における血漿中サイトカインの定量解析

血漿中のサイトカイン定量に関しては次の通りである。LDRを施行した症例35名中、IL-2

は 17 名 (48.6%)、IL-12 は 5 名 (14.3%)、IFN- $\gamma$  は 2 名 (5.7%)、IL-1 $\beta$  は 2 名 (5.7%)、TNF- $\alpha$  は 1 名 (2.9%) で検出した。IL-10 は 6 名 (17.1%)、IL-4 は 5 名 (14.3%) で検出した。IL-8 は 5 名 (14.3%)、GM-CSF は 2 名 (5.7%) で検出した。HDR を施行した症例 17 名中、IL-2 は 7 名 (41.2%)、IL-12 は 1 名 (5.2%)、IFN- $\gamma$  は 2 名 (11.8%)、TNF- $\alpha$  は 1 名 (5.9%)、IL-10 は 3 名 (17.6%)、IL-4 は 1 名 (5.9%)、IL-8 は 1 名 (5.9%)、GM-CSF は 1 名 (5.9%) で検出した。LDR 症例の中には、治療前から IL-2 産生が亢進しているものもあり、これは前立腺癌に伴う抗腫瘍免疫応答が既に惹起されており、そのことが結果に反映されていると推察された。治療後に IL-2 が増加する症例も複数で認められ、これらの患者では、放射線により徐々に傷害された癌細胞からの抗原や免疫応答賦活化物質の放出により惹起された抗腫瘍免疫応答が影響している可能性が示唆された。HDR に関しては、2 名で IL-2 が治療前から更新しているものがあつたが、治療に伴って顕著に増加する例は認められなかった。この違いは、HDR 実施前の内分泌療法時にステロイドを使用することがあり、これがサイトカイン産生に影響しているかもしれない。しかしながら IL-2 以外のサイトカインについては殆どの症例で検出されず、放射線治療による影響と関連づけるのは現時点では困難と考えられた。

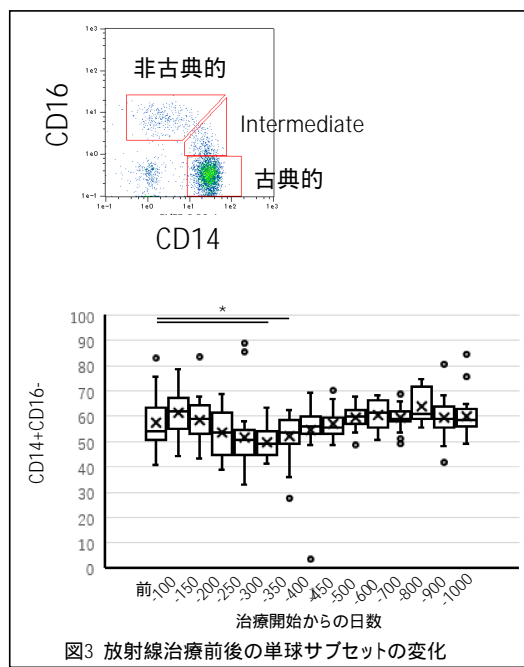


図3 放射線治療前後の単球サブセットの変化

(3) 放射線治療 (組織内照射) 施行患者における血漿中 cfNA の検出と動態

cfNA が放射線治療による T 細胞活性化機序に関与している可能性を考え、放射線治療を実施した前立腺癌患者血漿中の cfNA 量を測定した。その結果、LDR を施行した症例 35 名中、23 名 (65.7%) で cfNA を検出した (図 4)。

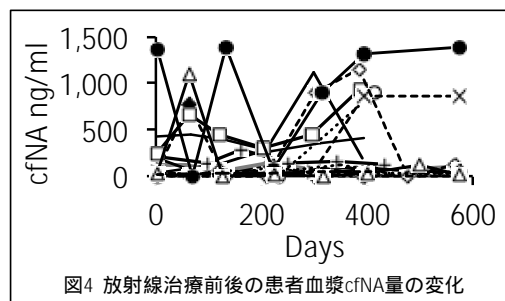


図4 放射線治療前後の患者血漿cfNA量の変化

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Enhanced activated T cell subsets in prostate cancer patients receiving iodine-125 low-dose-rate prostate brachytherapy. Kubo Makoto, Satoh Takefumi, Ishiyama Hiromichi, Tabata Ken-ichi, Tsumura Hideyasu, Komori Shoko, Iwamura Masatsugu, Baba Shiro, Hayakawa Kazushige, Kawamura Toshihiko, Obata Fumiya. *Oncol Rep.* 39:417-424 2018 (査読有)

〔学会発表〕(計 2 件)

Analysis of immune responses in prostate cancer patients received iridium-192 high-dose-rate prostate brachytherapy. Kubo Makoto, Satoh Takefumi, Ishiyama Hiromichi, Tabata Ken-ichi, Tsumura Hideyasu, Igarashi Yasuyuki, Iwamura Masatsugu, Baba Shiro, Hayakawa Kazushige, Obata Fumiya, Kawamura Toshihiko. 第 46 回日本免疫学会総会・学術集会 (仙台) 2017

前立腺癌に対するヨウ素 125 永久挿入密封小線源療法:末梢血における抗腫瘍免疫応答の検討 佐藤威文、久保 誠、田畑健一、津村秀康、石山博條、早川和重、小幡文弥、岩村正嗣 第 104 回日本泌尿器科学会総会 (仙台) 2016

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名: 石山 博條

ローマ字氏名: ISHIYAMA HIROMICHI

所属研究機関名：北里大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号（8桁）：60343076

(2)研究協力者

研究協力者氏名：佐藤 威文

ローマ字氏名：SATOH TAKEFUMI

（2016年 研究分担者）

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。