

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15573

研究課題名(和文)放射線照射とiPS細胞による新たながん治療

研究課題名(英文)A novel cancer treatment by a combination of irradiation and application of iPS cells

研究代表者

坪井 康次(Tsuboi, Koji)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：90188615

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍に対する放射線治療後に骨髄やiPS細胞由来の樹状細胞(BM-DC、iPS-DC)の局所投与と抗PD-1抗体の腹腔内投与により、抗腫瘍免疫応答が賦活されるかどうかを検討した。マウスの左大腿部皮下に移植したメラノーマ細胞にX線または陽子を照射した後、BMまたはiPS-DCを4回投与し、さらに抗PD-1抗体を3回投与した。またアブスコパル効果の評価するために、腫瘍細胞を右大腿部へも接種し、左側の原発腫瘍のみを治療した。その結果、原発および転移腫瘍の増殖は有意に遅延され、マウスの生存時間を有意に延長した。X線と陽子、BMとiPS-DCの間には有意な効果の差はなかった。

研究成果の概要(英文)：Local irradiation to tumors may act as antitumor immune adjuvant. We tested whether a combination of local injection of bone marrow or iPS-cells derived dendritic cells (DCs) and intraperitoneal administration of anti-PD-1 antibody after radiotherapy was effective or not to induce antitumor immune response. X-rays and proton beams were used as radiotherapy. After irradiation to B16 melanoma cells implanted subcutaneously at the left thigh of C57BL/6 mice, DCs were injected to the tumor site 4 times, and anti-PD-1 antibody were administrated 3 times. To examine the abscopal effect, tumor cells were inoculated to the right thigh as metastatic tumors, and only the primary tumors on the left side were treated. As a result, the growth of both the primary and the metastatic tumors were significantly inhibited, extending survival times of mice significantly. There were no significant differences in effects between X-rays and protons, and between BM- and iPS-DCs.

研究分野：放射線腫瘍学、腫瘍免疫学

キーワード：Radiotherapy Dendritic cells anti-PD1 antibody abscopal effect

## 1. 研究開始当初の背景

がんに対する定位的放射線治療では、その局所性から照射野外での再発や遠隔転移が予後を制限する大きな壁となっている。全身的ながん免疫の賦活によりそれを予防できれば副作用の少ない画期的ながん治療が実現できる。

放射線照射により腫瘍細胞では、ICAM-I、CEAなどの免疫関連分子の発現が亢進するが、我々も、エックス線照射後の悪性脳腫瘍細胞ではMHC-IとFasの発現が亢進することを報告した。さらに、局所的放射線治療には、直接的な腫瘍細胞殺傷効果に加え、放出される「がん抗原」と「DAMPs」に基づくがん免疫賦活作用があることが明らかになったが、放射線単独ではその効果は十分に発揮されているとは言えない。

その大きな原因の一つとして、がん細胞が「免疫の監視」から逃れる状態（がん免疫逃避）を作り上げていることがあげられる。最近、この「がん免疫逃避」機構を阻害できる有望な手段として「免疫チェックポイント阻害剤」が注目を集めている。中でも多くのがんが発現する「PD-L1」は、活性化したリンパ球に発現する「PD-1」に結合してその機能を抑制することが明らかにされ、抗PD-1抗体により免疫逃避を解除できることが実証されたため、その有効性に期待が集まっている。

さらに、このようなT細胞の活性化による獲得免疫の誘導には、マクロファージや樹状細胞を主体とする自然免疫の活性化が必須であることから、特に強力な抗原提示細胞である樹状細胞（DC）を用いた外因性免疫増強が有望視されていた。しかし、これまでヒトの骨髄から十分な数のDCを分化誘導し投与することは技術的に極めて困難であった。

2006年、山中らによって、あらゆる組織や細胞に分化する能力を持つ人工多能性幹細胞（iPS細胞）が開発され、この成果を受けて、千住はマウスのiPS細胞から樹状細胞（iPS-DC）が分化誘導させた。近年マウス腫瘍モデルに於いて、このiPS-DCワクチンが骨髄由来のBM-DCワクチンと同様の効果を持つことが報告され（Iwamoto H. 2013）、その利用に期待が高まっている。

## 2. 研究の目的

がん細胞に対する放射線照射により誘導される細胞死を起点として、がん特異的免疫反応を賦活してがんの治療を得るために、動物モデルを対象として以下の目的で研究を行った。

- 1) がんの免疫逃避機構を阻害するために、抗PD-1抗体を投与してその効果を明らかにする。
- 2) 放射線照射部位に人工多能性幹細胞（iPS細胞）から分化誘導した高い抗原提示能を持つ樹状細胞「iPS-DC」を投与してその免疫賦活増強効果を明らか

にする。

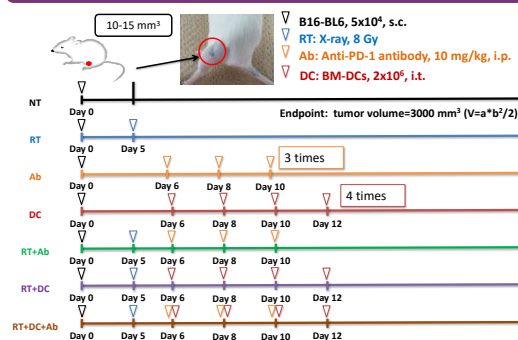
以上から、放射線照射、抗PD-1抗体、iPS-DCの投与を融合したがん治療法の有効性を明らかにする。

## 3. 研究の方法

X線とBM-DCによる治療：原発性腫瘍モデル

- 1) 難治性固形腫瘍モデルとして、マウス悪性黒色腫細胞B16/BL6を同系の雄Albino C57BL/6 mice皮下移植したモデルを作製した。
- 2) 同じマウスの大腿骨および脛骨から採取した骨髄細胞から骨髄由来樹状細胞（BM-DC）を誘導し、Phenotype assayを行い、さらに抗原取り込み能とT-cell増殖テストを行なった。
- 3) 下図に示したプロトコルで、大腿皮下腫瘍に8 GyのX線を照射し、1日後、3日後、5日後および7日後に、 $2 \times 10^6$ 個のBM-DCを50  $\mu$ LのPBS( $4 \times 10^7$  / mL)に懸濁させ、照射された腫瘍部位に直接注射した。また同様に、照射後1日、3日および5日に抗PD-1抗体（InVivoPlus抗マウスPD-1、クローン：J43、BioXcell、West Lebanon、NH、USA）を腹腔内注射したて、腫瘍のサイズを計測し、生存解析を行った。

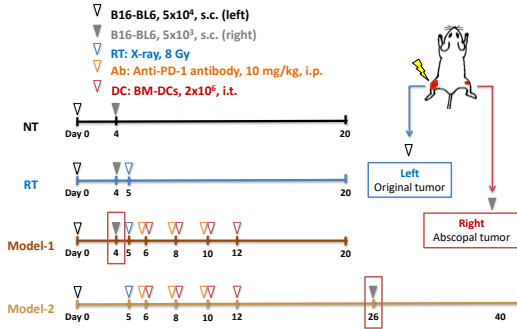
### Protocols of treatment for primary tumors



X線とBM-DCによる治療：Metastatic 腫瘍モデル

- 1) 同じマウスモデルを用いた。
- 2) 下記のプロトコルに従い、1) 原発腫瘍として左大腿に同じ腫瘍細胞を接種し、治療を行わないコントロール群（NT）、2) 放射線治療を単独で行った群（RT）、3) 原発腫瘍移植後4日目に右大腿部に転移腫瘍を接種し、左大腿の原発腫瘍のみに対して3者併用治療を行った群（Model-1: RT + DC + Ab）、4) 左大腿に原発腫瘍を移植後にまず同じ3者併用治療を行い、治療終了後14日目に左大腿に転移性腫瘍を接種した（Model-2: RT + DC + Ab）群で効果を解析した。

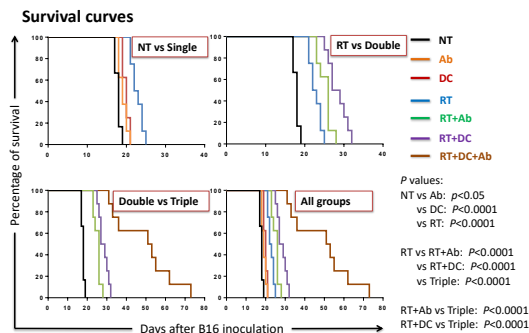
## Protocols on metastatic model



### 4-1. 研究成果-1: X線とBM-DCによる治療

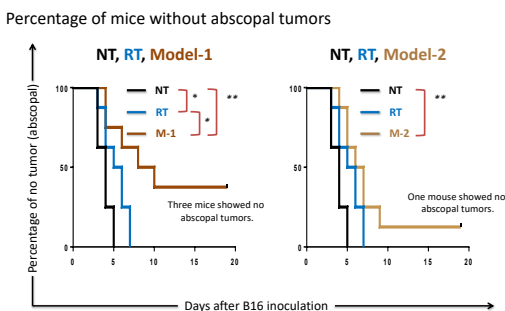
- 1) X線照射、BM-DC投与、抗PD1抗体投与の3療法の併用は、各治療の単独または2つの組み合わせと比較して、原発腫瘍の増殖を優位に遅延させ、下図に示すように生存期間も有意に延長させた。

### Results: Survival analysis



- 2) さらに反体側に移植された転移腫瘍に対しても優位な増殖抑制効果が見られ、下図のように生存期間も有意に延長された。以上からこれらの併用により、腫瘍免疫反応が賦活され、局所制御のみならず転移腫瘍の制御も可能であることが示された。

### Results: Abscopal tumor free survival



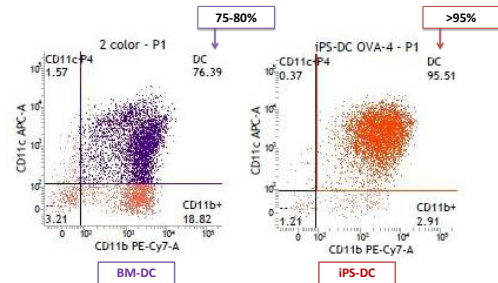
### 4-2. 研究成果-2: 陽子線とマウス多能性幹細胞 (iPS細胞) による治療

千住らの方法に従い、マウス多能性幹細胞 (iPS細胞) から樹状細胞 (iPS-DC) を分化誘導し、その機能を確認した。さらに、腫瘍に対して陽子線を照射し、その後誘導した「iPS-DC」を投与して原発腫瘍に対する局所制御効果を検討した。

- 1) 誘導した BM-DC と iPS-DC の Phenotype を下記に示す。iPS細胞から誘導したDCはBM-DCに比べてマクロファージの混入がなく均一であった。

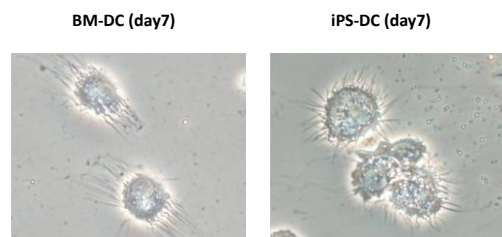
### BM-DC vs iPS-DC

Percentage of DCs from harvest cells

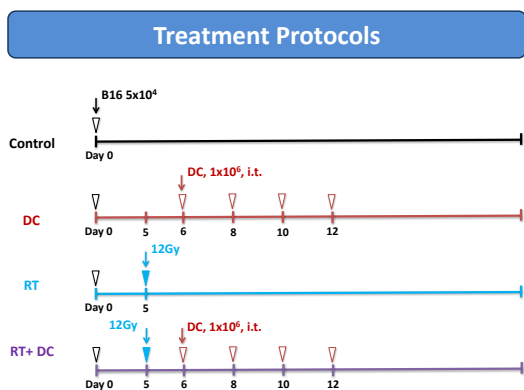


- 2) 両方のDCの形態を下に示すが、iPS-DCはBM-DCよりもサイズが大きく、抗原取り込みの能も高いことが分かった。

### BM-DC vs iPS-DC



- 3) 同様に同様のマウス腫瘍モデルを作製し、下図に示したプロトコールに従って併用治療を行なった。1) 無治療群 (Control)、2) 大腿皮下腫瘍に4回2x106個のiPS-DCのみを投与した群 (DC)、3) 腫瘍に12Gyの陽子線で単独治療した群 (RT)、4) 陽子線照射後1日、3日、5日、7日に計4回のiPS-DCを投与した群 (RT+DC) の合計4群で腫瘍のサイズを計測した。

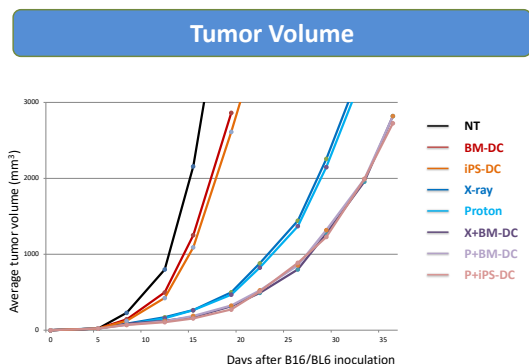


4) 現在得られている成果を以下に示す。同じマウス腫瘍モデルにおける腫瘍の増殖抑制効果の解析では、無治療群(N)、BM-DC 投与群(BM-DC)、iPS-DC の単独投与群(iPS-DC)、X 線単独治療群(X-ray)、陽子線単独治療群 (Proton)、X 線照後 1 日、3 日、5 日、7 日に計 4 回の iPS-DC を投与した群(X+BM-DC)、陽子線照後 1 日、3 日、5 日、7 日に計 4 回の BM-DC を投与した群(P+iPS-DC)、陽子線照後 1 日、3 日、5 日、7 日に計 4 回の iPS-DC を投与した群(P+iPS-DC)の 7 群で比較検討した。

その結果、iPS-DC 群と BM-DC 群では前者の方がやや腫瘍増殖抑制効果が認められたが有意差はなかった。また、X-ray 群と Proton 群、) は同等の効果が認められた。さらに、X+BM-DC 群、P+iPS-DC 群、P+iPS-DC の 3 群ではさらに腫瘍増殖抑制効果が認められたが、3 群間では有意差はなかった。

生存解析とアブスコパル腫瘍に対する効果の解析は現在進められている。

以上からは、iPS-DC は少なくとも BM-DC と同等な効果があることが明らかにされた。また陽子線と X 線の効果や DC との併用効果が同等であることから、iPS 細胞を利用することにより、DC の細胞数や投与タイミングにおける現在の制限を有意に軽減できる可能性が示唆された。



また、放射線治療、DC 投与、抗 PD-1 抗体投与により、免疫原性が低いマウス悪性黒色腫細胞 (B16/BL6) のモデルにおいても、従来の同様な研究報告と比較して、強い局所制御効果とアブスコパル効果が認められたことは注目に値する。

## 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 2 件)

① Zenkoh J, Gerelchuluun A, Wang Y, Miwa Y, Ohno T, Tsuboi K. The abscopal effect induced by in situ-irradiated peripheral tumor cells in a murine GL261 brain tumor model. *Transl Cancer Res*, 6(1):136-148, 2017. [DOI]10.21037/tcr.2017.01.32 査読有

[学会発表] (計 5 件)

① The 33rd International Symposium of Radiation Biology Center, December, 2017. The Abscopal Effect Induced by a Combined Local Treatment with Anti-PD-1 Antibody and Bone Marrow Derived Dendritic Cells after X-ray Irradiation to Subcutaneous Melanoma in a Murine Model.

Yu-zi Wang, Lue Sun, Xiaokang Li, Koji Tsuboi

② The 76th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Yokohama, Japan, October 2017.

Abscopal Effect Induced by a Combined Treatment with Anti-PD-1 Antibody and BM-DCs after X-ray in a Melanoma Mouse Model.

Yu-zi Wang, Lue Sun, Xiaokang Li, Koji Tsuboi

③ The 60th Annual Meeting of the Japanese Radiation Research Society, Chiba, Japan, October 2017.

The Anti-tumor Effect of Localized X-ray Irradiation was Enhanced by the Combination treatment with Bone Marrow Derived Dendritic Cells and Anti-PD-1 Antibody.

Yu-zi Wang, Lue Sun, Xiaokang Li, Koji Tsuboi

④ The 53rd American Society of Clinical Oncology Annual Meeting, McCormick Place, Chicago, U.S., June 2017.

A combined local treatment with anti-PD-1 antibody and bone marrow derived dendritic cells after x-ray irradiation to subcutaneous melanoma in a murine model.

Yuzi Wang, Lue Sun, Xiaokang Li, Koji Tsuboi

⑤The 75th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Yokohama, Japan, October 2016.

Combination Treatment of Bone Marrow DCs and X-ray Irradiation in a Melanoma Mouse Model.

Yuzi Wang, Junko Zenkoh, Ariungerel Gerelchuluun, Xiaokang Li, Koji Tsuboi

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等 特になし。

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

坪井 康次 (TSUBOI Koji)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：90188615

### (2)研究分担者

梨井 康 (Rii Kou)

国立成育医療研究センター・移植免疫研究室・室長

研究者番号：60321890