

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月20日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19806

研究課題名(和文) 膵癌細胞の重粒子線による腫瘍免疫調節に関わる研究

研究課題名(英文) Tumor immunomodulation mechanism after carbon ion beam irradiation on pancreatic cancer cells

研究代表者

岡本 雅彦 (Okamoto, Masahiko)

群馬大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：10451725

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：膵癌細胞、胃癌細胞、頭頸部扁平上皮癌細胞、悪性黒色腫細胞、肺癌細胞等を用いて放射線照射(X線、重粒子線)によるPD-L1の発現を検証したが、上述のいずれの細胞においてもPD-L1の発現亢進は確認できなかった。タイムコースなどの条件を変えたが同様の結果であった。ヒト骨肉腫細胞であるU2OS株でのみ放射線照射の線量依存性のPD-L1の増加がウェスタンブロットならびにフローサイトメトリーにて確認された。特定の癌腫においては放射線照射によりPD-L1の発現が亢進し、それが放射線治療への抵抗性を獲得させる一因となっていることが推察される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究の当初の目的であった膵癌細胞では放射線によるPD-L1の発現増加は確認されなかったが、特定の癌腫(骨肉腫細胞)においては放射線照射によりPD-L1の発現が亢進されることが確認された。PD-L1の発現亢進は腫瘍免疫の抑制に繋がり、治療抵抗性の一因となり得る。即ち放射線治療と免疫チェックポイント治療の併用により、放射線治療抵抗性である骨肉腫等に対して、より強い治療効果が得られる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The expression of PD-L1 after irradiation (X-ray /carbon ion beam) was verified using pancreatic cancer cells, gastric cancer cells, head and neck squamous cell carcinoma cells, malignant melanoma cells, and lung cancer cells. No increase in PD-L1 expression was observed even after the conditions such as the time course were changed. But the irradiation dose-dependent increase of PD-L1 was confirmed at the human osteosarcoma cell line U2OS by Western blot and flow cytometry. In certain carcinomas, it is speculated that radiation enhances the expression of PD-L1, which contributes to the acquisition of resistance to radiation therapy.

研究分野：放射線治療

キーワード：放射線治療 重粒子線治療

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

膵癌の死亡率は近年増加の傾向を示しており、我が国の年次別膵癌死亡数をみると2010年の全癌死亡数のうち6位を占め、約2万8千人が膵癌で死亡している。発生率の割に死亡率が高く予後不良の癌として知られる。米国 NCCN のガイドラインにおいて、膵癌はその進行度合いによって、切除可能膵臓癌、切除不能膵臓癌およびその境界にあるボーダーライン膵臓癌に分類される。切除可能例については外科的切除術および術後化学療法が標準治療とされるが、治療が完遂できたとしても根治術後の5年生存率は20%程度と満足なものではない(Li D et al. Lancet 2004;363:1049-1057.) 切除不能膵癌に対しては、化学療法と放射線療法が治療選択肢とされるが、化学放射線療法による生存期間の中央値はおおむね8-9か月と報告されており(Abelson JA et al. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2012;82(4):e595-601., A.C. Koong et al. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2005;63:320-323.) 満足な治療成績が得られていないのが現状である。このような状況のもと、我々の施設では炭素イオンを用いた重粒子線治療と Gemcitabine を用いた化学療法の併用による第2相臨床試験を2013年7月より開始している。重粒子線治療は従来のX線による放射線治療と比較して線量分布がより急峻のため、放射線感受性が高く有害事象を来しやすい消化管や肝臓等の臓器を避けつつ腫瘍に線量を集中させることが可能である。加えて重粒子線は殺細胞効果がX線よりも高いため、従来の治療と比してより高い局所制御率が得られる可能性がある。具体的に先行施設である放射線医学総合研究所からは当初治療後2年での局所制御率が63%と良好な成績が得られていた。しかしながらその後経観察期間が延長するに従い、局所制御率は徐々に低下し、最新のデータでは46%の局所制御率となっている。(http://www.nirs.go.jp)。膵癌では腫瘍が消化管に包囲されているという解剖学的な位置関係から、現在使用されている炭素イオン線の量より、より多くの量を照射することは有害事象の増加が高率で予測されることから現在使用可能な技術では困難であり、さらなる局所制御率の向上のためには

1)腫瘍側の炭素イオン線に対する感受性の増加

2)抗腫瘍効果のある治療(分子標的薬、免疫治療など)の追加 といった手段を講じる必要がある。

近年ヘルパーT細胞、キラーT細胞を体外で培養し投与する活性化リンパ球療法、末梢血より採取した単球を体外で樹状細胞に分化させ、腫瘍特異的な抗原提示細胞を導入した後に体内に戻すという樹状細胞療法といった、医療が実施されるようになってきている。これらは自由診療として実施されているが、遠隔転移を有する症例においても、時に長期間の腫瘍制御が得られることが報告されている。(Iwai K et al. Cancer Immunol Immunother 2012)

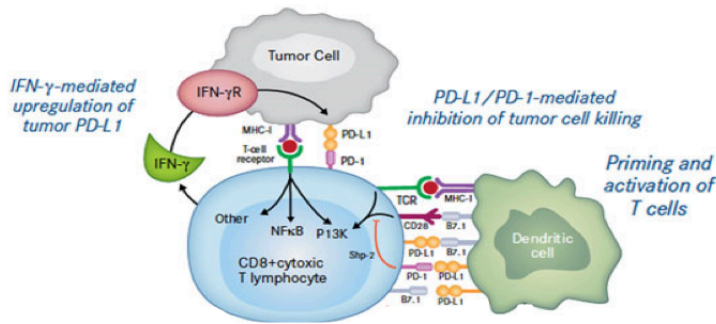
上記の報告では特に放射線治療や化学療法と併用して実施された場合に、化学療法単独、あるいは化学放射線療法のみと比して予後の改善が認められている。

放射線治療の領域においては、遠隔転移を有する症例に対して、原発巣のみに放射線治療を行ったにも関わらず遠隔転移が縮小する事がしばしば認められる事が知られており、これをアブスコパル効果と称している。アブスコパル効果のメカニズムとしては、放射線治療による腫瘍免疫の賦活が想像されているが、まだその全容は解明されていない。

一方で申請者は大学長の許可のもと、先に述べた活性化リンパ球療法、樹状細胞療法といった免疫細胞療法の実臨床に携わっている。これまでに200症例近い免疫細胞療法を行ったが、その大半は他治療が無効となり癌が全身に進行した病態であり、免疫細胞療法も有効な効果は得られなかった。一方で、放射線や化学療法などの初回標準治療と併用して免疫細胞療法を実施された症例では先に述べたアブスコパル効果等により、発表論文の如く予後の延長が感じられたが、症例数が少なく、また原発病変も様々であるため、統計的な評価は困難であった。そのため、現在申請者は膵癌に対するX線、Gemcitabine 併用の免疫化学放射線治療の前向II相試験を立ち上げ症例集積を行っている。(UMIN ID: 000013426)

一方で、その基礎となる細胞生物学的な解析は未だ不十分である。マウスにおける *in vivo* あるいは *in vitro* の実験によってある種の癌細胞では放射線照射により、細胞表面に免疫刺激分子の発現増強が見られたり、腫瘍細胞から免疫シグナル分子の放出が認められることがわかってきている (Kepp O, et al. Apoptosis 2009;14:364-375)

一方近年、免疫チェックポイント阻害薬という新たな腫瘍免疫治療の開発研究、臨床応用が急速に進んでいる。免疫チェックポイント阻害薬を投与することで腫瘍細胞への免疫寛容を破綻させ、細胞障害性リンパ球を活性化させることで抗腫瘍効果をもたらすという治療法である。2014年7月に悪性黒色腫に対する治療として認可されたニボルマブという薬剤はPD-1に対する抗体薬であるが、これは腫瘍に発現したPD-L1とキラーT細胞表面のPD-1抗体が結合し、NF κ B、PI3Kを介してキラーT細胞(cytotoxic T lymphocyte)が不活性化するという免疫抑制メカニズムを阻害し、キラーT細胞の殺細胞効果を維持することにより抗腫瘍効果を得る、というのがその機序である(下図参照)。他にもCTLA4抗体であるイピリマブも米国FDAでは承認されている。こちらは樹状細胞あるいは腫瘍細胞のB7とリンパ球上のCTLA4を介した免疫調節機構である。



我々はまずこの PD-L1 に注目し、各種胃癌細胞株に X 線を照射したところ、NUGC3、MKN 7 の 2 つの細胞株において PD-L1 の発現が著明に上昇したことが確認された。現在はこの胃癌細胞株において重粒子線治療での反応を検討しているところである。消化管に発生した腺癌である膵癌においても同様に PD-L1 の発現が亢進する可能性はあり、PD-L1 の発現は免疫の抑制に結びつく。一方で肺癌細胞においては microRNA の mir-200 あるいは mir-34a により PD-L1 発現が抑制されるという発表が近年されている。(Don Gibbons et al, ASCO 2014, James W Welth et al, AACR 2014)

しかしながら膵癌において、これまで重粒子線治療と免疫療法・免疫調節因子の併用についての報告はなされていない。局所制御効果が強い重粒子線治療と免疫療法の併用は局所ならびに遠隔転移の制御から長期的な予後を改善する可能性が期待される。

本研究ではまず X 線、重粒子線により膵癌細胞表面の PD-L1、B7、MHC Class I といった免疫調節因子がどのように変化するかを調査する。そして、microRNA を介した介入でそれらの発現を調整し、腫瘍免疫を賦活される方法を探求することを目的とする。

2. 研究の目的

膵癌に対する重粒子線治療と併用した免疫療法の併用効果について細胞生物学的な検討をするのが本研究の目的である

X 線照射で胃癌の細胞株の一部で PD-L1 発現が亢進することが確認された。PD-L1 の発現は腫瘍免疫を抑制する方向に働く。

一方で重粒子線照射と PD-L1 の発現については未だ検討がなされていない。当研究では重粒子線照射による免疫関連細胞表面抗原(PD-L1,B7 等)あるいは MHC class I の発現の変化を測定し、microRNA を介した干渉でそれらの発現を調整する方法を探求することを目的とする。

3. 研究の方法

in vitro の系を用意する。X 線/重粒子線照射により免疫調節因子の発現が変化するか否かについて検証する。検証方法としてはフローサイトメーター、ウェスタンブロット法、免疫蛍光染色を用いる。

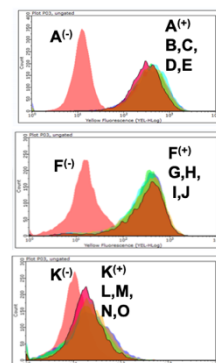
本研究の第一として、胃癌細胞株で PD-L1 が発現上昇したのと同じ条件で膵癌細胞株に対する X 線、重粒子線照射を行い、フローサイトメータ、ウェスタンブロット法、免疫蛍光染色にて PD-L1 の発現の変化について検証する。また同様に B7、MHC class I の発現についても検証をおこなう。

いずれかの表面抗原において発現の変化が見られるようであればその発現に至る経路の探求へと進む。

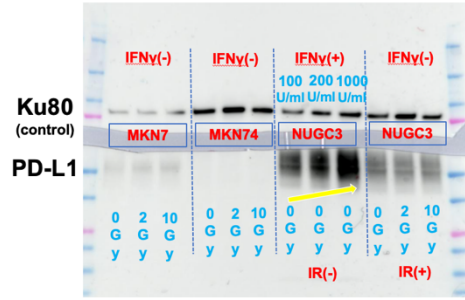
4. 研究成果

まず実験系の確認のため、予備実験で X 線照射によって PD-L1 の発現増加が確認された胃癌細胞株 NUGC3、MKN7、ならびに発現増加が確認されなかった MKN74 について重粒子線照射で PD-L1 の発現が上昇するかを確認を行った。結果は右図のごとくで、今回の実験では NUGC3、MKN7、MKN74 のいずれにおいても重粒子線(carbon)照射群、X 線照射群のいずれも非照射群と比較してフローサイトメトリー上で PD-L1 の発現増加は確認されなかった。

	0Gy Anti- body (-)	0Gy Anti- body (+)	X- rays 2Gy	X- rays 10Gy	Carb on 1Gy	Carb on 5Gy
N U G 3	A ⁽⁻⁾	A ⁽⁺⁾	B	C	D	E
M K N 7	F ⁽⁻⁾	F ⁽⁺⁾	G	H	I	J
M K N 74	K ⁽⁻⁾	K ⁽⁺⁾	L	M	N	O



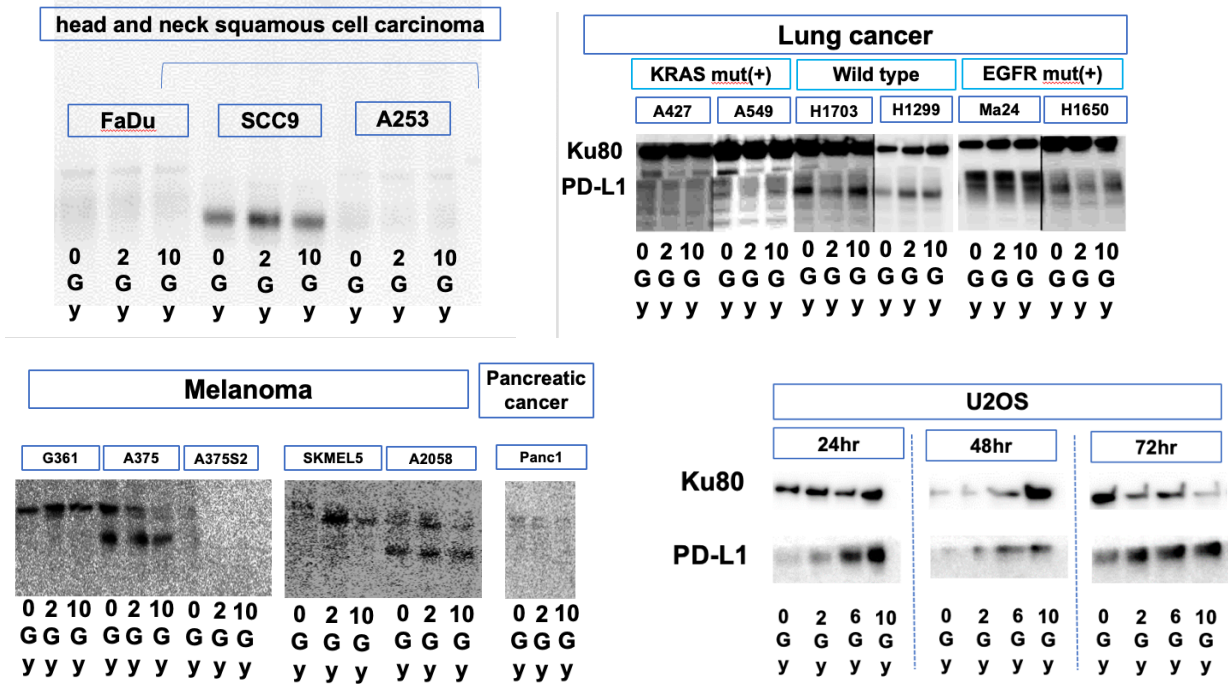
細胞培養の条件などを整えて再度のフローサイトメトリーの実験を行ったが、予備実験の際に確認されたPD-L1の増加は再現されなかった。Western blotの検証でも対照として用いたインターフェロンγ負荷群ではPD-L1の発現は見られたものの、NUGC3、MKN7、MKN74ではX線照射によるPD-L1の上昇はやはり確認されない状況であった(右図)



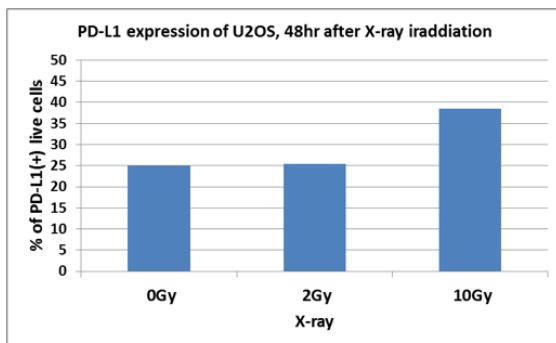
上記の結果から今回の研究の前提仮説である「胃癌、膵癌といった腺癌ではX線照射によりPD-L1の発現が増加し、腫瘍免疫の抑制に繋がることが、治療抵抗性の一因である」が崩れたために、研究方法の再構築が求められた。

結果として、まずは対象を腺癌から他の癌種へと広げて、「X線照射によって特定の癌種でPD-L1の発現が増加する」という仮説を立て、それを検証することとした。

結果は下図に示す如くで、免疫チェックポイント阻害剤が臨床的に使用される悪性黒色腫、肺癌、頭頸部癌、本研究の当初の目的であった膵癌細胞(panc-1, 放射線抵抗性株 panc-1Rを含む)についてX線照射とPD-L1発現の関係を検証した。いずれの細胞でもPD-L1の発現増加は見られなかったが、骨肉腫細胞であるU2OSでのみPD-L1の発現増加が得られた。またその増加には線量依存性が認められた。



U2OSにおいてはフローサイトメトリーでもX線照射によるPD-L1の発現増加が確認された(下図)。



結果として、特定の癌種においては、X線照射後にPD-L1を介した免疫抑制が亢進し、それが

放射線抵抗性の獲得に繋がることを推察された。特にこのような癌腫においては、X線治療と免疫チェックポイント阻害剤の併用が有用であることが示唆された。

X線によるストレスとPD-L1発現のメカニズムについての仮説を幾つか立案し探索を試みたが、今回の期間内では有効な結果は得られなかった。

X線照射に対するPD-L1の発現については当研究室の別チームで並列に実施していたプロジェクトで、U2OSを含む骨肉腫細胞においてX線照射による二重鎖切断後のDNA損傷シグナルがChk1を活性化させ、PD-L1が発現亢進することを明らかにしている。(Sato H. Nat Commun. 2017 Nov 24;8(1):1751. doi: 10.1038/s41467-017-01883-9.)

本研究期間では膵癌細胞でのChk1 pathwayについては検証ができなかったが、Gemcitabineの暴露によりChk1のリン酸化が促進されるという報告もあり、膵癌においてもChk1の阻害がPD-L1の発現抑制につながる可能性が考えられ、今後の検証課題である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 11 件)

1. Long-term outcome of hypofractionated intensity-modulated radiotherapy using TomoTherapy for localized prostate cancer: A retrospective study.

Takakusagi Y, Kawamura H, Okamoto M, Kaminuma T, Kubo N, Mizukami T, Sato H, Onishi M, Ohtake N, Sekihara T, Nakano T.

PLoS One. 2019 Feb 26;14(2) 査読あり

2. Prospective Study of Isolated Recurrent Tumor Re-irradiation With Carbon-Ion Beams.

Shirai K, Ohno T, Saitoh JI, Okamoto M, Katoh H, Murata K, Kawamura H, Musha A, Abe T, Mizukami T, Akahane K, Nakano T.

Front Oncol. 2019 Mar 27;9:181. 査読あり

3. A feasibility study of high-dose hypofractionated carbon ion radiation therapy using four fractions for localized hepatocellular carcinoma measuring 3 cm or larger.

Shibuya K, Ohno T, Katoh H, Okamoto M, Shiba S, Koyama Y, Kakizaki S, Shirabe K, Nakano T.

Radiother Oncol. 2019 Mar;132:230-235. 査読あり

4. Carbon-ion radiotherapy for locally recurrent rectal cancer: Japan Carbon-ion Radiation Oncology Study Group (J-CROS) Study 1404 Rectum.

Shinoto M, Yamada S, Okamoto M, Shioyama Y, Ohno T, Nakano T, Nemoto K, Isozaki Y, Kawashiro S, Tsuji H, Kamada T.

Radiother Oncol. 2019;132:236-240. 査読あり

5. SUVmax-based Parameters of FDG-PET/CT Reliably Predict Pathologic Complete Response After Preoperative Hyperthermo-chemoradiotherapy in Rectal Cancer.

Murata H, Okamoto M, Takahashi T, Motegi M, Ogoshi K, Shoji H, Onishi M, Takakusagi Y, Okonogi N, Kawamura H, Okazaki A, Asao T, Kuwano H, Nakano T.

Anticancer Res. 2018 Oct;38(10):5909-5916. 査読あり

6. Clinical Advantage of Chest-wall Post-mastectomy Radiation Therapy Without Bolus.

Shiba S, Okamoto M, Kiyohara H, Okano N, Yoshimoto Y, Murata H, Irie D, Katoh H, Nakano T.

In Vivo. 2018 Jul-Aug;32(4):961-965. 査読あり

7. Combination Therapy of Intravenously Injected Microglia and Radiation Therapy Prolongs Survival in a Rat Model of Spontaneous Malignant Glioma.

Okonogi N, Suzuki Y, Sato H, Oike T, Yoshimoto Y, Mimura K, Noda SE, Okamoto M, Tamaki T, Morokoshi Y, Hasegawa S, Ohgaki H, Yokoo H, Nakano T.

Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2018 Nov 1;102(3):601-608. 査読あり

8. Multi-institutional Study of Carbon-ion Radiotherapy for Locally Advanced Pancreatic Cancer: Japan Carbon-ion Radiation Oncology Study Group (J-CROS) Study 1403 Pancreas.

Kawashiro S, Yamada S, Okamoto M, Ohno T, Nakano T, Shinoto M, Shioyama Y, Nemoto K, Isozaki Y, Tsuji H, Kamada T.

Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2018 Aug 1;101(5):1212-1221. 査読あり

9. No Deterioration in Clinical Outcomes of Carbon Ion Radiotherapy for Sarcopenia Patients with Hepatocellular Carcinoma.

Shiba S, Shibuya K, Katoh H, Koyama Y, Okamoto M, Abe T, Ohno T, Nakano T.
Anticancer Res. 2018 Jun;38(6):3579-3586. 査読あり

10. Dose Escalation Improves Outcome in Stereotactic Body Radiotherapy for Pulmonary Oligometastases from Colorectal Cancer.

Jingu K, Matsuo Y, Onishi H, Yamamoto T, Aoki M, Murakami Y, Yamashita H, Kakuhara H, Nemoto K, Sakayauchi T, Okamoto M, Niibe Y, Nagata Y, Ogawa K.

Anticancer Res. 2017 May;37(5):2709-2713. 査読あり

11. Initial Results of Hypofractionated Carbon Ion Radiotherapy for Cholangiocarcinoma.

Abe T, Shibuya K, Koyama Y, Okamoto M, Kiyohara H, Katoh H, Shimada H, Kuwano H, Ohno T, Nakano T.

Anticancer Res. 2016 Jun;36(6):2955-60. 査読あり

〔学会発表〕 (計 2 件)

1. 口演 「切除非適応膵癌症例に対する Gemcitabine 併用炭素イオン線治療初期治療成績」
岡本雅彦、清原浩樹、岡野奈緒子、村田裕人、入江大介、渋谷圭、加藤弘之、柴慎太郎、大野達也、中野隆史

新木健一郎、久保憲生、調憲

2016 年 10 月 第 54 回日本癌治療学会学術集会

2. 口演 「Comparison of dose distributions between carbon ion beam and IMRT in locally advanced pancreas cancer」

Mashiko Okamoto, Hiroki Kiyohara, Kyohei Fukata, Hiroto Murata, Daisuke Irie, Shintaro Shiba, Naoko Okano, Kenichiro Araki, Tatsuya Ohno, Takashi Nakano

日本放射線腫瘍学会 第 29 回学術大会 2016 年 11 月 25 日

〔図書〕 (計 2 件)

1. 「放射線治療の位置づけ」岡本雅彦、中野隆史 コンセンサス癌治療 第 14 巻 4 号 195-197 ページ へるす出版 2017 年 3 月

2. 「膵癌の重粒子線治療」岡本雅彦、大野達也、 膵臓・胆道癌 基礎と臨床の最新研究動向 442-445 ページ 日本臨床社 2015 年

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究分担者

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：村田裕人

ローマ字氏名：Hiroto Murata

※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。