

令和 3 年 6 月 23 日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07740

研究課題名(和文)放射線照射ががん免疫に与える影響の機序解明

研究課題名(英文)analysis of cancer immune reaction by irradiation

研究代表者

影山 俊一郎 (Shun-Ichiro, Kageyama)

国立研究開発法人国立がん研究センター・東病院・医員

研究者番号：60644979

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：我々はRNA sequenceにより食道癌細胞株に対して30Gy/10frのX線照射によりPD-L1, MHC class Iを含むType Iインターフェロン依存的な免疫応答が生じることを見出した。また、遺伝子ノックアウト細胞株を用いた検証によりこの免疫応答がSTING-Type I IFN-STAT1-IRF1カスケードのポジティブフィードバックにより生じることを明らかにした。さらにこのpathway依存的にヒトPBMCの癌細胞への浸潤を誘導することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

放射線治療に免疫チェックポイント阻害剤を併用する試みは現在世界中で行われており、今後放射線治療の主座になることが予測されている。現在その効果は唯一肺非小細胞癌でのみ立証されているが、2/3が再発するのが現状である。このため、バイオマーカー確立や更なる治療精液向上の妙の併用治療等を検証するために、放射線によるがん免疫応答誘導の分子メカニズムを解明することは必須である。本研究は放射線によるがん免疫誘導、type Iインターフェロン誘導から周囲の免疫細胞誘導まで一連のカスケードを明らかにしており、今後の放射線治療の向上に役立つ知見を提供する。

研究成果の概要(英文)：We identified a Type I interferon-dependent immune response, including PD-L1 and MHC class I, by X-ray irradiation of 30 Gy / 10 fr on esophageal cancer cell lines by RNA sequence.

Furthermore, we established gene knockout cell line and revealed that this immune response is caused by positive feedback of the STING-Type I IFN-STAT1-IRF1 cascade. Furthermore, it was clarified that this pathway-dependent induction of human PBMC infiltration into cancer cells.

研究分野：放射線治療

キーワード：放射線治療 食道癌 STING PD-L1 免疫チェックポイント

1. 研究開始当初の背景

放射線治療は古くからアブスコパル効果を始めとするがん免疫応答に関与する可能性は示されていた。2017年に報告された PACIFIC study の結果により、免疫チェックポイント阻害薬と放射線治療の組み合わせが肺非小細胞癌の治療成績を向上することが立証された。

一方で免疫チェックポイント阻害薬併用下でも進行期肺非小細胞癌は 2/3 が再発することが明らかとなっており、治療成績の向上は必須となっている。しかし、バイオマーカーや併用療法を確立するためには分子メカニズムの理解が重要となるが、放射線による免疫応答は分子レベルで殆ど明らかにされていなかった。

我々はこれまでに通常の細胞実験で用いる放射線照射に比較し、より臨床で用いる放射線治療に近い実験系を確立した。さらにこの実験系を用いて放射線照射開始後細胞内で生じる遺伝子発現変化を RNA-seq を用いて解析した結果、照射開始後、30Gy/10fr 前後で MHC Class 遺伝子群や PD-L1 等の interferon 応答に関与する遺伝子群の発現が顕著に上昇し、JAK-STAT pathway が活性化されているという興味深い結果を得た。

2. 研究の目的

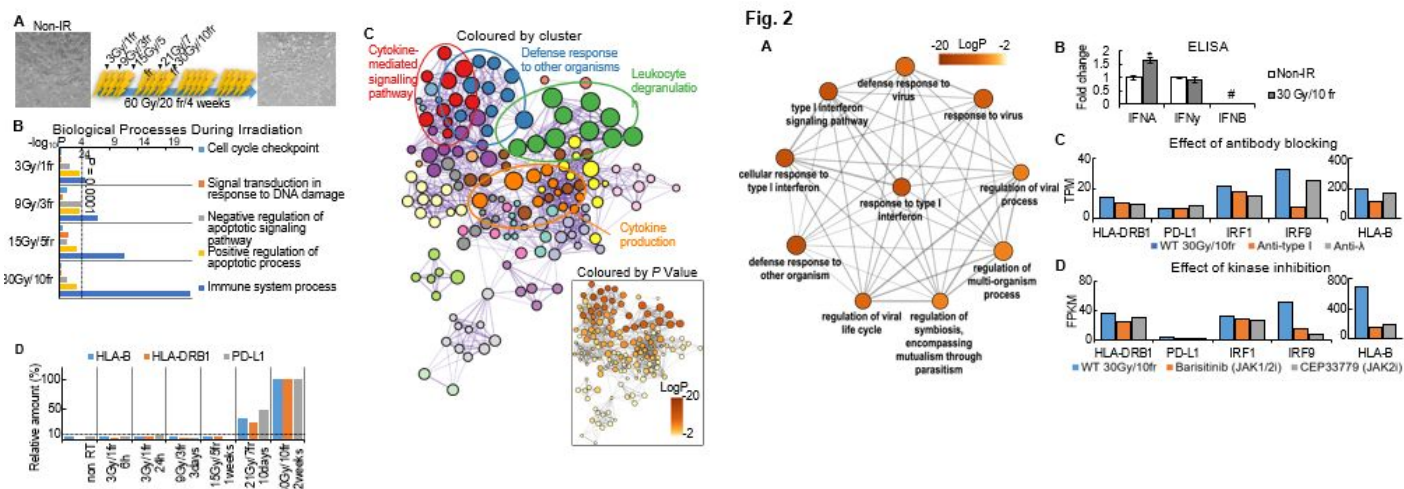
本研究の目的は放射線照射中に癌細胞内で生じる遺伝子発現変化を網羅的に解析し、細胞内で生じている生化学的過程、生物学的過程を明らかにすることである。

3. 研究の方法

本研究では主に細胞株を用いた研究で仮説モデルを作成し、in vitro での遺伝子ノックアウトによる仮説の検証、臨床検体解析によるヒトがん組織での仮説モデルの検証をおこなう。

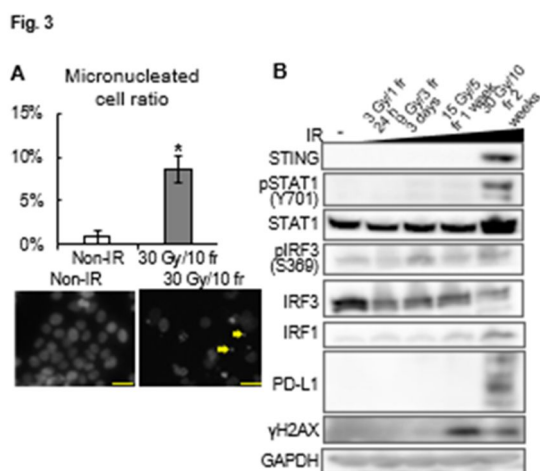
4. 研究成果

1. 食道扁平上皮癌細胞株 KYSE450, OE-21 に 30Gy/10fr の放射線照射を行い、トランスクリプトーム解析を行った。その結果、時間依存的、線量依存的に免疫関連 pathway が有意に活性化されること (BC)、MHC class I, PD-L1 等の癌免疫関連遺伝子の発現上昇が確認されること (D) 等が明らかとなった (下、左図)。



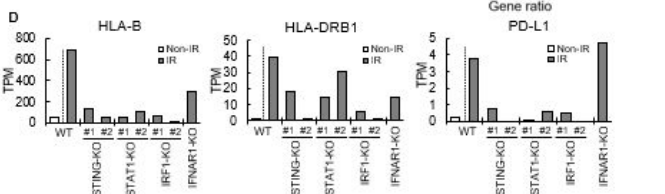
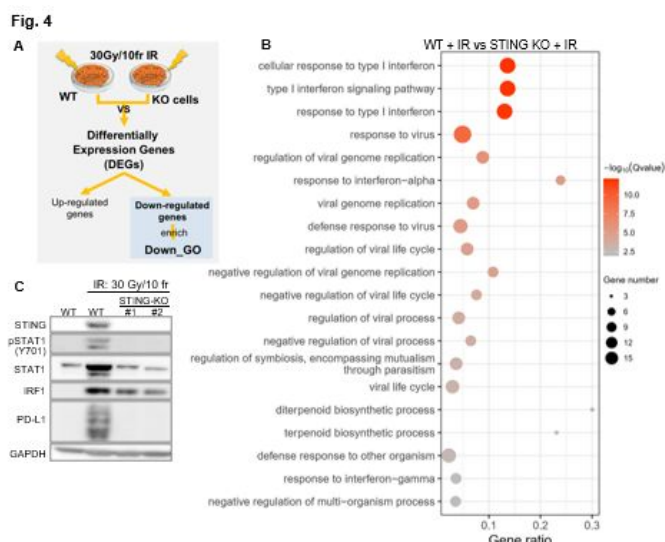
2. また、gene enrichment 解析によりこれらの免疫応答が Type I インターフェロン依存的に生じることが明らかとなった(A)。インターフェロンが実際にタンパク質レベルで上昇することを ELISA で検証し (B),中和抗体によるインターフェロンブロッキングが放射線による免疫応答を抑制することを確認した (前頁右図)。

3 . 次に放射線により micronucleus が有意に形成されることを確認し、放射線により STING-IFN-STAT 1-IRF1 pathway が強く活性化していることを WB で確認した (下左図)。

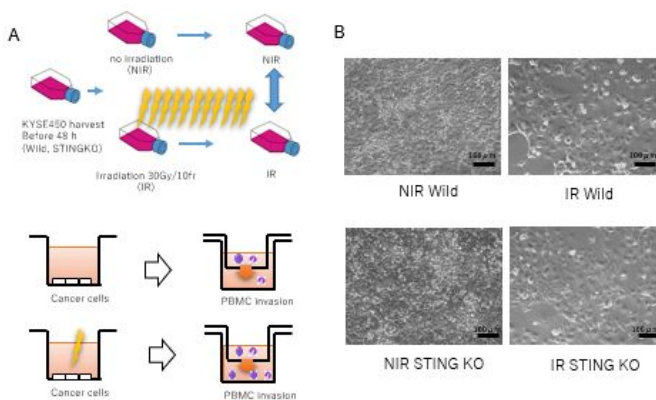


4 . 放射線による免疫応答が、STING-IFN-STAT 1-IRF1 pathway により制御していることを検証した。STING、IFNAR1、STAT1、IRF1 のノックアウト細胞を作成し、放射線による免疫応答への影響を調べた。

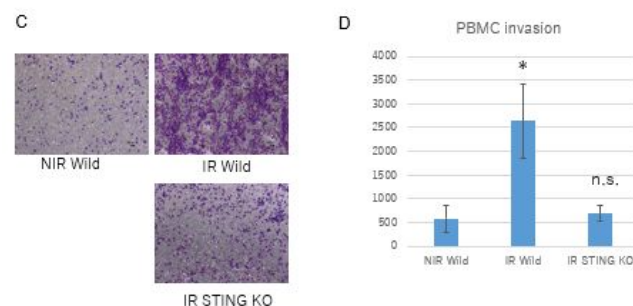
その結果、これらの遺伝子が一つでも欠損すると放射線による免疫応答は有意に低下することが証明された (上右図)。



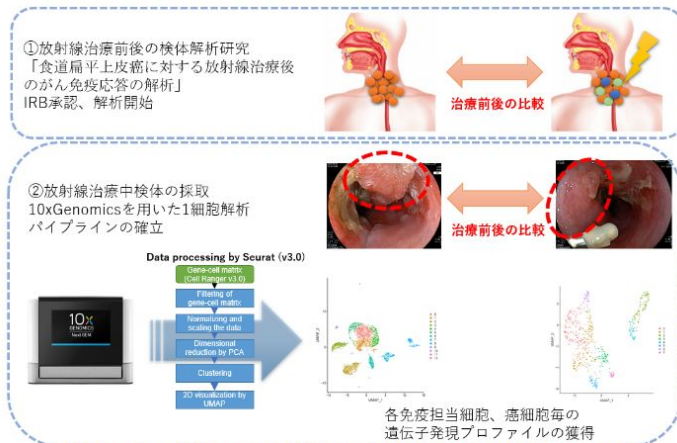
5 . 放射線による癌細胞の免疫応答が、周囲の免疫細胞に与える影響を検証した。放射線照射群、非照射群の癌細胞培養液を用いて、ヒト PBMC の走化性を比較した。その結果、放射線によりヒト PBMC 浸潤が有意に増加し、STING ノックアウトではその機能が消失することを明らかにした (右図)。



6 . 最後に放射線治療中の癌組織における免疫応答の検証を行った。これまでに我々の研究室では、上記のように[食道扁平上皮癌に対する放射線治療後のがん免疫応答の解析] (IRB 承認番号 2018-101)を立ち上げ、食道扁平上皮癌において放射線治療ががん免疫応答に与える影響についての検討を開始している。既に当研究で登録された1例



を東京大学鈴木穰研究室との共同研究において、Clomium TenX を用いた single cell RNA sequence により解析を行っている。その結果、癌組織中で免疫応答、特に in vitro の解析で得られた結果と同様の免疫担当細胞に大きな変化を生じること、組織内のリンパ球の減少とマクロファージの増加、さらには IL-6 や TGF、PD-L1 といった遺伝子が強く活性化していること、などが明らかとなっている（未発表データ、下図）。



これらの成果については現在論文投稿中である。
その他研究期間内の成果について以下に示す。

1. Radiation pneumonitis after palliative radiotherapy in cancer patients with interstitial lung disease
Masayuki Okumura, Hidehiro Hojo, Masaki Nakamura, Takashi Hiyama, Naoki Nakamura, Sadamoto Zenda, Atsushi Motegi, Yasuhiro Hirano, **Shun-Ichiro Kageyama**, Raturi Vijay Parshuram, Takeshi Fujisawa, Hirofumi Kuno, Tetsuo Akimoto
Radiother Oncol. 2021 Jun 2;161:47-54.
2. A CDC7 inhibitor sensitizes DNA-damaging chemotherapies by suppressing homologous recombination repair to delay DNA damage recovery
Kenichi Iwai, Tadahiro Nambu, Yukie Kashima, Jie Yu, Kurt Eng, Kazumasa Miyamoto, Kazuyo Kakoi, Masamitsu Gotou, Toshiyuki Takeuchi, Akifumi Kogame, Jessica Sappal, Saomi Murai, Hiroshi Haeno, **Shun-Ichiro Kageyama**, Osamu Kurasawa, Huifeng Niu, Karuppiyah Kannan, Akihiro Ohashi
Sci Adv. 2021 May 21;7(21):eabf0197.
3. Identification of the mutation signature of the cancer genome caused by irradiation
SI Kageyama, J Du, S Kaneko, R Hamamoto, S Yamaguchi, R Yamashita, ...
Radiother Oncol. 2021 155, 10-16
4. TENERGY: multicenter phase II study of Atezolizumab monotherapy following definitive Chemoradiotherapy with 5-FU plus Cisplatin in patients with unresectable locally advanced esophageal squamous cell carcinoma
Hideaki Bando, Daisuke Kotani, Takahiro Tsushima, Hiroki Hara, Shigenori Kadowaki, Ken Kato, Keisho Chin, Kensei Yamaguchi, **Shun-Ichiro Kageyama**, Hidehiro Hojo, Masaki Nakamura, Hidenobu Tachibana, Masashi Wakabayashi, Miki Fukutani, Yosuke Togashi, Nozomu Fuse, Hiroyoshi Nishikawa, Takashi Kojima
BMC Cancer. 2020 Apr 20;20(1):336.
5. Differences in failure patterns according to the EGFR mutation status after proton beam therapy for early stage non-small cell lung cancer
M Nakamura, **S Kageyama**, H Udagawa, Y Zenke, K Yoh, S Niho, H Hojo, ...
Radiother Oncol. 2020 Aug;149:14-17.

Enhanced tumor response to radiotherapy after PD-1 blockade in metastatic gastric cancer
A Sasaki, Y Nakamura, Y Togashi, H Kuno, H Hojo, **S Kageyama**, ...
Gastric Cancer. 2020 Sep;23(5):893-903.

PARP inhibitor olaparib sensitizes esophageal carcinoma cells to fractionated proton irradiation
S Kageyama, D Junyan, H Hojo, A Motegi, M Nakamura, K Tsuchihara, ...
Journal of radiation research 2020 61 (2), 177-186

Impact of EGFR mutation and ALK translocation on recurrence pattern after definitive chemoradiotherapy for inoperable stage III non-squamous non-small-cell lung cancer
M Nakamura, **S Kageyama**, S Niho, M Okumura, H Hojo, A Motegi, ...
Clinical lung cancer 2019 20 (3), e256-e264

Effect of 5-fluorouracil on cellular response to proton beam in esophageal cancer cell lines according to the position of spread-out Bragg peak
H Hojo, T Dohmae, K Hotta, **SI Kageyama**, H Baba, R Kohno, A Motegi, ...
Acta Oncologica 2019 58 (4), 475-482

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Masayuki Okumura, Hidehiro Hojo, Masaki Nakamura, Takashi Hiyama, Naoki Nakamura, Sadamoto Zenda, Atsushi Motegi, Yasuhiro Hirano, Shun-Ichiro Kageyama, Raturi Vijay Parshuram, Takeshi Fujisawa, Hirofumi Kuno, Tetsuo Akimoto	4. 巻 161
2. 論文標題 Radiation pneumonitis after palliative radiotherapy in cancer patients with interstitial lung disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Radiother Oncol	6. 最初と最後の頁 47-54
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.radonc.2021.05.026	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Kenichi Iwai, Tadahiro Nambu, Yukie Kashima, Jie Yu, Kurt Eng, Kazumasa Miyamoto, Kazuyo Kakoi, Masamitsu Gotou, Toshiyuki Takeuchi, Akifumi Kogame, Jessica Sappal, Saomi Murai, Hiroshi Haeno, Shun-Ichiro Kageyama, Osamu Kurasawa, Huifeng Niu, Karuppiiah Kannan, Akihiro Ohashi	4. 巻 7
2. 論文標題 A CDC7 inhibitor sensitizes DNA-damaging chemotherapies by suppressing homologous recombination repair to delay DNA damage recovery	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Adv.	6. 最初と最後の頁 21
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciadv.abf0197.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 SI Kageyama, J Du, S Kaneko, R Hamamoto, S Yamaguchi, R Yamashita,	4. 巻 155
2. 論文標題 Identification of the mutation signature of the cancer genome caused by irradiation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Radiother Oncol	6. 最初と最後の頁 10-16
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.radonc.2020.10.020. Epub 2020 Oct 17.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Hideaki Bando, Daisuke Kotani, Takahiro Tsushima, Hiroki Hara, Shigenori Kadowaki, Ken Kato, Keisho Chin, Kensei Yamaguchi, Shun-Ichiro Kageyama, Hidehiro Hojo, Masaki Nakamura, Hidenobu Tachibana, Masashi Wakabayashi, Miki Fukutani, Yosuke Togashi, Nozomu Fuse, Hiroyoshi Nishikawa, Takashi Kojima	4. 巻 1
2. 論文標題 TENERGY: multicenter phase II study of Atezolizumab monotherapy following definitive Chemoradiotherapy with 5-FU plus Cisplatin in patients with unresectable locally advanced esophageal squamous cell carcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC Cancer.	6. 最初と最後の頁 20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12885-020-06716-5.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 A Sasaki, Y Nakamura, Y Togashi, H Kuno, H Hojo, S Kageyama	4. 巻 23
2. 論文標題 Enhanced tumor response to radiotherapy after PD-1 blockade in metastatic gastric cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Gastric Cancer.	6. 最初と最後の頁 893-903
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10120-020-01058-4.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 S Kageyama, D Junyan, H Hojo, A Motegi, M Nakamura, K Tsuchihara	4. 巻 61
2. 論文標題 PARP inhibitor olaparib sensitizes esophageal carcinoma cells to fractionated proton irradiation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of radiation research	6. 最初と最後の頁 177-186
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jrr/rrz088.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 M Nakamura, S Kageyama, S Niho, M Okumura, H Hojo, A Motegi	4. 巻 20
2. 論文標題 Impact of EGFR mutation and ALK translocation on recurrence pattern after definitive chemoradiotherapy for inoperable stage III non-squamous non small-cell lung cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clinical lung cancer	6. 最初と最後の頁 256-264
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cl lc.2019.02.021.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 H Hojo, T Dohmae, K Hotta, SI Kageyama, H Baba, R Kohno, A Motegi	4. 巻 58
2. 論文標題 Effect of 5-fluorouracil on cellular response to proton beam in esophageal cancer cell lines according to the position of spread-out Bragg peak	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Acta Oncologica	6. 最初と最後の頁 475-482
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/0284186X.2018.1555373.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------