

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08146

研究課題名(和文) がん放射線治療後に起きるがん免疫応答経路の選択に関わるスイッチ分子の探索

研究課題名(英文) Research for switch molecules involved in the cancer immune response pathways with cancer radiotherapy.

研究代表者

善光 純子 (Zenkoh, Junko)

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・特任研究員

研究者番号：20710148

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)：担癌マウスに放射線または、放射線と抗PD-1抗体のコンビネーション治療を施し、経時的に採取した血液を用いて、シングルセルトランスクリプトーム解析とmiRNA解析を行った。いずれの治療でも治癒したマウスでは、細胞障害活性の高いCTLやNK細胞の増加が認められ、赤芽球クラスターが顕著に増加していた。一方、放射線治療のみで増悪したマウスではMDSCの増加が認められた。また、増悪したマウスでは、治療後にNK細胞クラスターが増加したものの、細胞障害活性の低い自然リンパ球の比率が高いことが明らかとなった。miRNA解析からは、いくつかのバイオマーカーとなりそうなmiRNAが確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マウス実験により、放射線治療後に惹起される全身的な免疫応答は、照射野外にも影響を与え、腫瘍を縮小させるばかりでなく、逆に通常よりも急激に増悪させることがあることが明らかとなり、治療による免疫細胞の変化が推測された。実験的に腫瘍移植前から治療後までの免疫細胞の変化を同一マウスで解析することは困難であったが、今回、少量の血液からPBMCのscRNA-seqとmiRNAの解析を行った。放射線治療による腫瘍縮小群・増悪群の免疫細胞の経時変化が解析され、腫瘍縮小に寄与する免疫細胞の種類と影響を与える候補分子が明らかになってきた。今後は、さらに詳細な解析と候補分子の機能解析につなげていく予定である。

研究成果の概要(英文)：Tumor-bearing mice were treated with radiation or a combination of radiation and anti-PD-1 antibody, and blood samples were used for single-cell transcriptome and miRNA analysis. Mice cured by either treatment showed an increase in CTL and NK cells with high cytotoxic activity and a marked increase in erythroblast clusters. On the other hand, mice that were exacerbated by radiotherapy alone showed an increase in MDSCs. In addition, the exacerbated mice had a higher proportion of innate lymphoid cells with low cytotoxic activity, although NK cell clusters were increased after treatment. miRNA analysis identified several potential biomarker miRNAs.

研究分野：放射線生物学 分子腫瘍学

キーワード：アブスコパル効果 放射線治療 オミクス解析 免疫応答スイッチ分子 シングルセル解析

### 1. 研究開始当初の背景

末梢の腫瘍に対する局所放射線照射によって引き起こされる「腫瘍抗原特異的免疫活性化」が脳内の免疫環境へも影響を与え、末梢の照射局所の腫瘍が治癒した場合は、後から脳内へ移植した同種腫瘍細胞は完全に拒絶され、この効果は長期に渡って維持されること、また、末梢からのCTLが関与していることを明らかにした (Zenkoh et al. 2017)。一方、同マウスモデルにおいて皮下腫瘍が治癒しなかった個体では全例で照射局所および後から脳内へ移植した腫瘍は通常よりも速い増殖を見せた。特に局所腫瘍増悪群では脳内へ移植した腫瘍増殖が顕著に早くなり、全身的な腫瘍免疫反応が損なわれていることが示唆されたが、そのメカニズムは明らかにできなかった。また、予備実験として行った同マウスモデルでの放射線治療と抗 PD-1 抗体投与の併用群では、効果の見られる個体は観察されたものの生存期間の有意な延長は認められなかったことから、この急速な腫瘍増悪には他の分子の関与が示唆された。

上記における局所腫瘍増悪群と縮小群のように、放射線照射に対する局所の反応性によって、後に移植した腫瘍の増殖速度が顕著に異なり、大きく予後に違いが生じることは、両群間で腫瘍免疫応答に大きな差が生じていることを意味している。全身の免疫状態を理解し、各群間の免疫状態の違いにつながる機能的分子を見出すためには、これら両群及び抗 PD-1 抗体投与群も合わせたマウスの網羅的トランスクリプトーム解析が必要であると考えた。

### 2. 研究の目的

放射線照射後の腫瘍抗原特異的免疫活性化を制御する分子メカニズムを明らかにし、それを放射線治療後の予後予測のバイオマーカーとすること、また、予後不良と予測される患者においては、それをターゲットとした新たな治療の開発に繋げ、腫瘍免疫のバランスをコントロールして、患者の予後の改善に寄与することを目的とする。

### 3. 研究の方法

C57BL/6 マウスの大腿部皮下に GL261 (同マウス由来の Glioma 細胞: MHC-I、PD-L1 の発現が確認されており、腫瘍免疫研究に多く使われている) 腫瘍細胞を移植し、10 日後大腿皮下に腫瘍が定着したことを確認してから 10Gy の X 線を照射した。X 線照射を施したマウスを 2 群に分け (9 匹ずつ)、一方の群に抗 PD-1 抗体を 3mg/kg の投与量で、1 日おきに 3 回腹腔内へ投与した。さらに 24 日後、抗 PD-1 抗体投与群、未投与群の両群に、同じ腫瘍細胞を頭蓋内に再移植した。大腿部腫瘍については、腫瘍確認後、その増殖を週に 1 回計測し、腫瘍大を観察した。

マウスからの試料の採取については、腫瘍移植前、腫瘍移植後、X 線照射後、腫瘍細胞再移植後、および腫瘍が治癒し長期生存したマウスについては治癒後に、経時的に血液 200  $\mu$ L 程度をランセットを用いて顎静脈から採取した。採取した血液から直ちに密度勾配法 (キット) を用いて、血漿と末梢血単核球 (PBMC) を調製し、凍結保存した。全てのポイントでの採血が終了した後、抗 PD-1 抗体投与・未投与の両群について、治癒したマウスと増悪したマウス各 1 匹ずつ、合わせて 4 匹を選び、各々採血 4 ポイント分 (合計 16 サンプル) について PBMC を 10 x Chromium システムを用いて、scRNA-Seq 用のライブラリを調製し、シークエンス解析を行い、Cell Ranger を用いてデータ解析を行った。

血漿からは Small RNA を調製し、さらに miRNA ライブラリを作製してシークエンス解析を行った。

### 4. 研究成果

放射線治療、放射線と抗 PD-1 抗体のコンビネーション治療を施したマウス、各 9 匹ずつについて、大腿皮下腫瘍の増殖を計測した。(図 1) その結果、放射線治療のみでは、9 匹中 3 匹で腫瘍が治癒し、コンビネーション治療では、6 匹が治癒した。このことより、放射線照射に抗 PD-1 抗体投与を組み合わせることで、一部の個体では、抗腫瘍免疫応答がより効果的に起こり、治癒したマウスの割合が増えたことが示唆された。しかし、抗 PD-1 抗体の効果が見られない個体もあった。

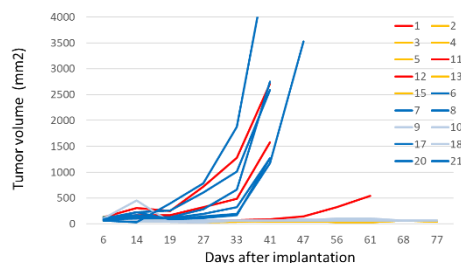


図 1 皮下腫瘍の増殖

両群から治癒したマウス、増悪したマウスを 1 匹ずつ選択し、腫瘍移植前、腫瘍移植後、治療後、治癒もしくは増悪後に採血をし PBMC を調製して、10 x Chromium を用いてシングルセル化し、トランスクリプトーム解析を行った。

各マウスの結果を専用のパイプラインで処理し、遺伝子発現から 8 種の細胞種に分類した (図 2)。

その結果、放射線治療のみで、腫瘍が増殖したマウス 7 では、腫瘍増殖後に骨髄由来抑制細胞

(MDSCs) の顕著な増加が見られた (図 2)。

またいずれの治療でも治癒したマウスでは、治癒後に赤芽球 (Erythroblast) の増加が見られ、これは骨髓過形成・骨髓異形成症候群様の変化かと思われるが、治癒したマウスで顕著であるため、今後さらに解析を行う予定である。

### Identification of cell populations

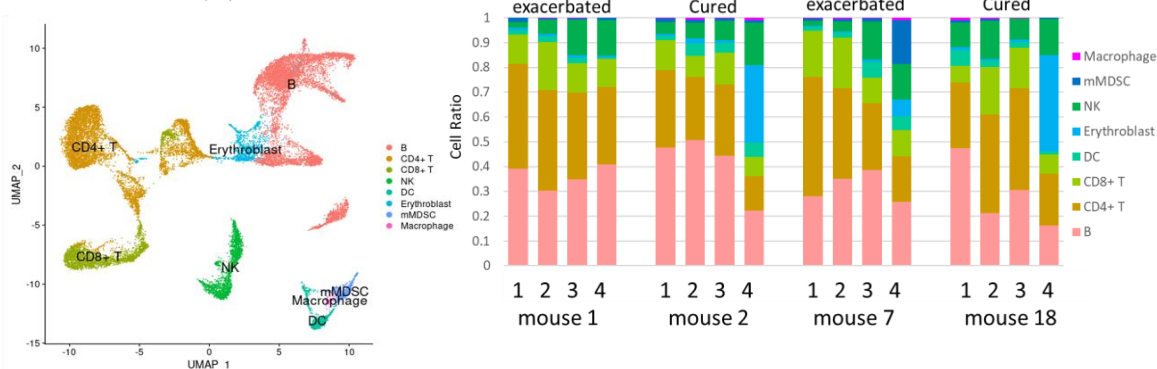


図 2 マウス PBMC のシングルセルトランスクリプトーム解析

Gene Ontology 解析を行った結果、放射線照射のみで腫瘍が治癒したマウス 18 では、他のマウスに比べて、腫瘍の移植後に免疫応答に関わる遺伝子が顕著に変化していることが確認された。

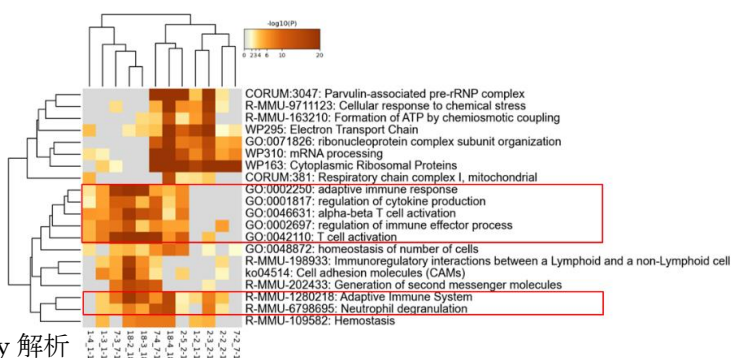


図 3 Gene Ontology 解析

Cd8 陽性細胞のクラスターは 5 つのサブクラスターに分けられた。そのうち、クラスター 3 では、Ccr7 の発現が高く、Naïve T cell であると考えられた。また、クラスター 1, 2 も Ccr7 の発現が比較的高く、未分化であることが確認された。クラスター 4 は Cd8 陽性細胞に分類されたものの、Cd8 の発現は低く、Trdc の発現が見られたことから、 $\gamma\delta$  T cell と考えられた。またクラスター 5 は、Ccr7-Ptpcr+ であることから、活性化メモリー T 細胞であると考えられた。いずれも、細胞障害活性が強く、抗腫瘍に働くことが明らかとなっている。

活性化 CTL は、いずれの治療法の腫瘍縮小群・増悪群でも、治療後に増加しており、腫瘍縮小群と増悪群を比較しても、その差は大きいものではなかった。

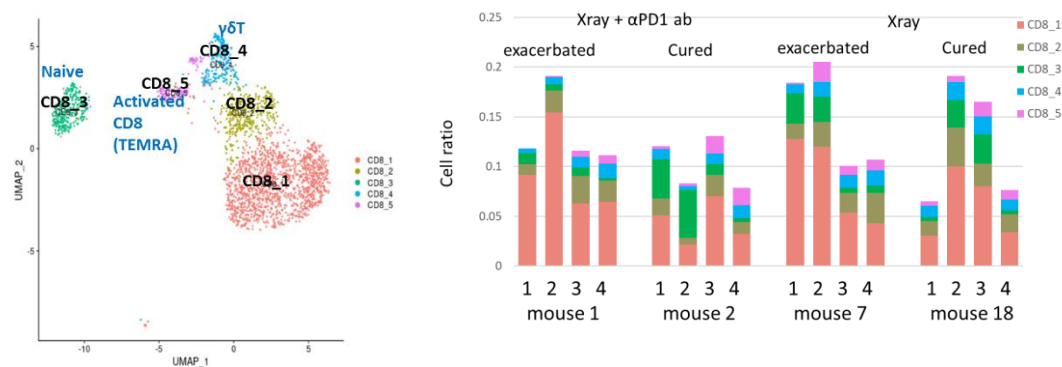


図 4 Cd8 陽性 T 細胞のサブクラスター解析

Cd4 陽性細胞のクラスターは、6 つのサブクラスターに分類された (図 5)。放射線治療のみで治癒したマウス (マウス 18) では、いずれのタイムポイントでも制御性 T 細胞 (Treg) はほとんど観察されなかったが、そのほかのマウスでは治療後に Treg の増加が認められた。コンビネーション治療で治癒したマウス (マウス 2) では、治療後に Treg が減少しており、抗 PD-1 抗体の効果であると考えられる。一方、コンビネーション治療でも腫瘍が増悪したマウス (マウス 1) では、治療後も Treg の減少は見られなかった。疲弊マーカーの発現の詳細を確認すると、Pcdcl の発現よりも Icos の発現の上昇が見られているため、このマウスに対しては Icos に対する抗体がより効果的である可能性が示唆された。

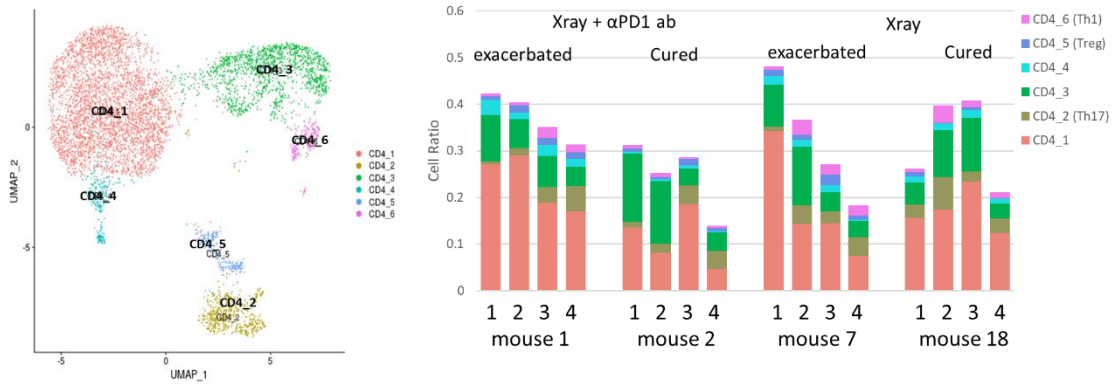


図5 Cd4 陽性 T 細胞のサブクラスター解析

NK 細胞については、3つのサブクラスターに分類された。そのうち、クラスター1と3では、Eomes や Tbx21 (T-bet) の発現が見られ、Granzyme や Perforin が高発現であることから、活性型のNK細胞であることが示唆された。一方、クラスター2では、Eomes や Tbx21、また Slamf7 の発現が低く、細胞障害活性の低い自然リンパ球(ILCs)であることが示唆された。

いずれの治療においても、治癒したマウスでは細胞障害活性の高いNK細胞の比率が高く、増悪したマウスでは、ILCsの比率が高くなっていることが確認された。

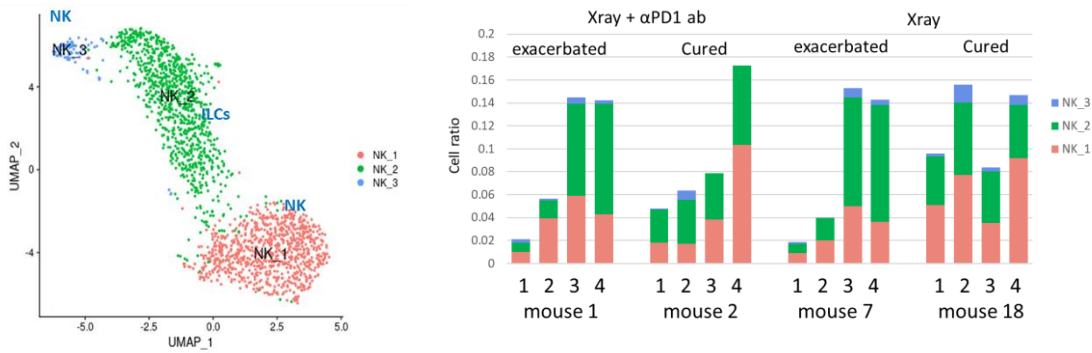


図6 NK 細胞のサブクラスター解析

miRNA の解析からは、抗腫瘍のターゲットまたは、バイオマーカーになる可能性がある分子が確認された。例えば、今回の結果から miR-223-3p が高発現であったマウスの方が、より抗腫瘍免疫環境が整っていたことが推察された(図7)。現在は解析が不十分であるが、今後、さらに詳細な解析を行うことにより、ターゲットまたはバイオマーカーを見出したいと考えている。

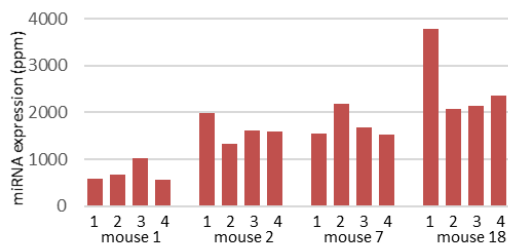


図7 miR-223-3p の発現

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 善光 純子、鈴木 絢子、松本 孔貴、菅原 裕、鈴木 穰
2. 発表標題 放射線治療と免疫チェックポイント阻害剤を併用した担癌マウスにおける末梢血単核細胞のシングルセルトランスクリプトーム解析
3. 学会等名 放射線影響学会第64回大会
4. 発表年 2021年

〔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
研究分担者	鈴木 絢子 (Suzuki Ayako) (00770348)	東京大学・大学院新領域創成科学研究科・特任准教授  (12601)	
研究分担者	鈴木 穰 (Suzuki Yutaka) (40323646)	東京大学・大学院新領域創成科学研究科・教授  (12601)	
研究分担者	坪井 康次 (Tsuboi Koji) (90188615)	筑波大学・医学医療系・名誉教授  (12102)	

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
---------	---------