

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09225

研究課題名(和文) 腫瘍局所の代謝に注目した新たな直腸癌術前免疫放射線療法の開発

研究課題名(英文) Novel radioimmunotherapy for rectal cancer based on the tumor metabolism

研究代表者

鯉沼 広治 (Koinuma, Koji)

自治医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20382905

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)：マウス大腸癌高肺転移株LuM1を用いて、遠隔転移を持つ大腸癌モデルを作成し、このモデルを使用して、メトホルミンを併用した免疫放射線療法の研究を行った。原発巣は放射線照射により有意に縮小していたが、肺転移巣には効果が認められなかった。しかし、放射線療法にメトホルミンを併用することで、遠隔巣の肺転移にも縮小効果が認められた。この機序の一因として、脾臓細胞のフローサイトメトリーと肺転移巣の免疫組織化学染色を行ったところ、脾臓細胞中のT細胞のIFN-g産生能とNK細胞、G-MDSCが関与していた。また肺転移では、NK細胞、G-MDSCが肺転移の抑制に関与していることを示す事ができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大腸癌は罹患数、死亡率ともに上位を占めている疾患の一つである。遠隔転移がある場合、きわめて予後が不良である。術前の放射線療法が局所再発率の低下につながるようになったが、遠隔転移に対する効果は認められていない。糖尿病治療薬メトホルミンの抗腫瘍効果が注目されており、宿主の免疫応答に関与することが報告されている。本研究ではメトホルミン併用による免疫放射線療法の効果とその機序の一因を示す事が出来た重要な研究結果である。

研究成果の概要(英文)：We used a hyperlung metastasis strain LuM1 and examined the efficacy of radiotherapy in combination with metformin. The primary lesion was significantly reduced by irradiation, but no effect was observed on lung metastases. However, the combined use of metformin with radiation therapy also showed a reduction effect on lung metastases in distant lesions. Flow cytometry of spleen cells and immunohistochemical staining of lung metastases revealed that IFN-g-producing ability of T cells in spleen cells, NK cells, and G-MDSC were involved in this mechanism. Was there. In lung metastasis, it was possible to show that NK cells and G-MDSC are effective in suppressing lung metastasis. Metformin effectively enhances local and abscopal effects of radiation therapy through the activation of cell-mediated immunity and might be clinically useful as neoadjuvant treatment for patients with locally advanced colorectal cancer.

研究分野：腫瘍外科学

キーワード：直腸癌 免疫放射線療法 Abscopal Effect 肺転移 メトホルミン

1. 研究開始当初の背景

日本における大腸癌の罹患数は、全癌腫の中で男性で3位、女性で2位と高い位置を占めている。また、進行直腸癌は、他の結腸癌と比較して、局所再発率が高いことが知られている。近年、術後の再発を予防することを目的に、局所進行直腸癌に対して術前放射線化学療法を施行することがガイドラインにも記載され、腫瘍の縮小後に根治術を行う施設が増えてきている。治療前後の放射線照射は局所再発に寄与することが示唆されているが、全生存率を改善する効果までは確認されていない。このために癌の局所制御のみならず、生存率を改善させる治療法の開発が必要と考えられている。放射線治療を行うことで、一時的な免疫抑制が誘導されるが、その一方で細胞死に至った癌細胞から腫瘍関連抗原が放出され、腫瘍特異的な免疫応答の誘導により放射線照射外の腫瘍を退縮させる abscopal effects という現象がある。この現象が、放射線照射単独で実臨床で認められることはまれであるが、近年免疫チェックポイント阻害剤との併用療法により、この現象が増強されることが報告されており、免疫放射線療法という治療戦略が着目を集めている。しかし、免疫チェックポイント阻害剤は高額であり、遠隔転移をみとめる癌患者のすべてに応用することは医療費を大幅に増大させる可能性がある。そこで、免疫チェックポイント阻害剤以外の薬剤を使用した免疫放射線療法の開発が望まれている。メトホルミンは、2型糖尿病治療薬として広く使われているが、抗腫瘍効果にも寄与することが報告されている。その作用機序として、AMPKの活性化により癌幹細胞のアポトーシス誘導や分化の誘導が促進され、腫瘍の増殖が抑制されたり、担癌状態で増殖するMDSC(myeloid derived suppressor cells)やM2マクロファージなどの免疫抑制性の細胞を減少させたり、疲弊状態にあるT細胞のIFN- γ やTNF- α などのサイトカイン産生能を回復する事が報告され、メトホルミンは、担癌患者における免疫療法としても有用である可能性が示されている。

2. 研究の目的

免疫チェックポイント阻害剤との併用療法により着目されている免疫放射線療法に対して、他の薬剤により腫瘍縮小効果が認められることを目的とした。また腫瘍縮小効果が認められる際には、どの免疫分子がその抑制に関与しているかフローサイトメトリーを用いて探索することを目的とした。またフローサイトメトリーで得られた結果が実際の肺転移にどのように作用しているかを免疫組織化学染色を用いて評価した。

3. 研究の方法

BALB/cの自然高肺転移性大腸癌細胞株LuM1を培養後、 1×10^6 個/100 μ lとして7週のBALB/cマウスの右側腹部に皮下注射した。13日目に皮下腫瘍の大きさを測定し、非治療群、メトホルミン投与群、放射線照射群、放射線照射/メトホルミン投与併用群の4群に均等に割り付けた。メトホルミンは飲料水に1mg/mlの濃度で融解し、マウスに自由飲水させることで投与した。3日ごとに飲水量をチェックし、交換を行い新鮮な水を接種させた。放射線照射は、2%イソフルランを吸入させて全身麻酔をかけ、腹臥位とした。マウスの体を鉛板で遮蔽することで皮下腫瘍のみに放射線照射ができるようにした。X線照射装置は、MX-160Laboを使用した。放射線照射は、13日目と15日目に4Gy/回を2回のX線照射を行った。腫瘍径を13日目から3日ごとに測定し、腫瘍体積を測定した(腫瘍体積(tumor volume)=長径 \times 短径 \times 短径 \times 1/2(mm²))。28日目に犠牲死させ、皮下腫瘍の重さと肉眼的に観察できる肺転移結節数の個数を測定した。また、脾臓と血液を採取し、フローサイトメトリーを用いて脾臓細胞と血液細胞のフェノタイプを解析した。また犠牲死させた後に摘出した肺は、肉眼的肺転移結節数を測定後4%ホルマリンにて一晩固定し、パラフィン包埋を行った。パラフィンブロックから4 μ mの厚さで組織切片を作成し、免疫組織化学染色を行った。得られた標本は、ランダムに5か所の肺転移を選択し、ImageJを用いて腫瘍面積を計測し、その中に浸潤している免疫細胞数をカウントし、腫瘍内浸潤免疫細胞密度を算出した。

4. 研究成果

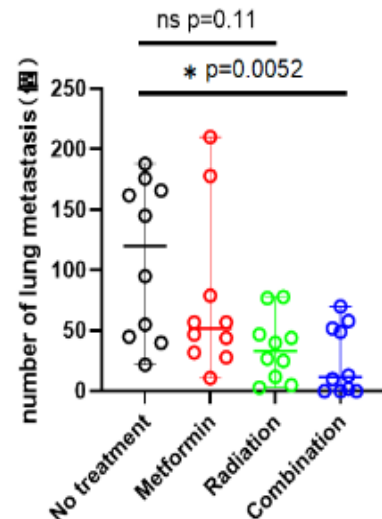
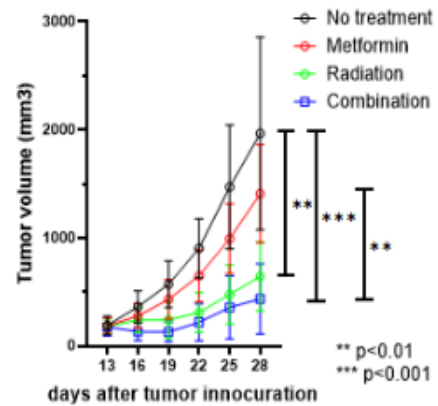
(1)皮下腫瘍の体積の推移および28日目の腫瘍の重さと肉眼的肺転移個数

マウスにLuM1を皮下注射してから7日目頃から皮下腫瘍が確認できるようになり13日目に腫瘍体積が100~300mm³にまで増大した。腫瘍体積に偏りが出ないように、非治療群、メトホルミン投与群、放射線照射群、放射線照射メトホルミン投与併用群の4群に振り分けた。1群を5匹として1回の実験に20匹を使用し、同様の実験を2回行った。28日目になると腫瘍の体積は非治療群と比較して放射線照射で有意に抑制されていた(非治療群 vs 放射線照射群 1966.2 \pm 891.0mm³ vs 643.3 \pm 318.0mm³, p=0.0011)。メトホルミンを併用することで腫瘍体積はさらに抑制されていた(非治療群 vs 放射線照射メ

トホルミン投与併用群 $1966.2 \pm 891.0 \text{mm}^3$ vs $437.7 \pm 323.8 \text{mm}^3$, $p < 0.0001$ 。

トホルミン投与群は、非治療群と比較して腫瘍の重さに有意差を認めなかったが、放射線照射群では非治療群と比較して皮下腫瘍の重さは減少していたが(非治療群 vs 放射線照射群 $2151.1 \pm 765.4 \text{mg}$ vs $990.5 \pm 625.7 \text{mg}$; $p = 0.0182$)、放射線照射にトホルミンを併用することにより皮下腫瘍の重さはさらに減少していた。(非治療群 vs 放射線照射/トホルミン投与併用群 $2151.1 \pm 765.4 \text{mg}$ vs $643.6 \pm 517.7 \text{mg}$; $p = 0.0009$)一方、放射線照射単独群は、非治療群と比較して肺転移結節数はやや減少しているものの、有意差は認めなかった(非治療群 vs 放射線照射群 109.4 ± 64.7 (個) vs 35.8 ± 26.8 (個); $p = 0.11$)。これに対し、放射線照射/トホルミン投与併用群では、放射線照射単独群よりも肺転移結節数が減少し、非治療群との間に有意差を認めた(非治療群 vs 放射線照射/トホルミン投与併用群 109.4 ± 64.7 (個) vs 25.4 ± 28.3 (個); $p = 0.018$)

腫瘍径の推移



(2)各治療群間での脾臓中の免疫細胞の割合の違いについて

i) T細胞

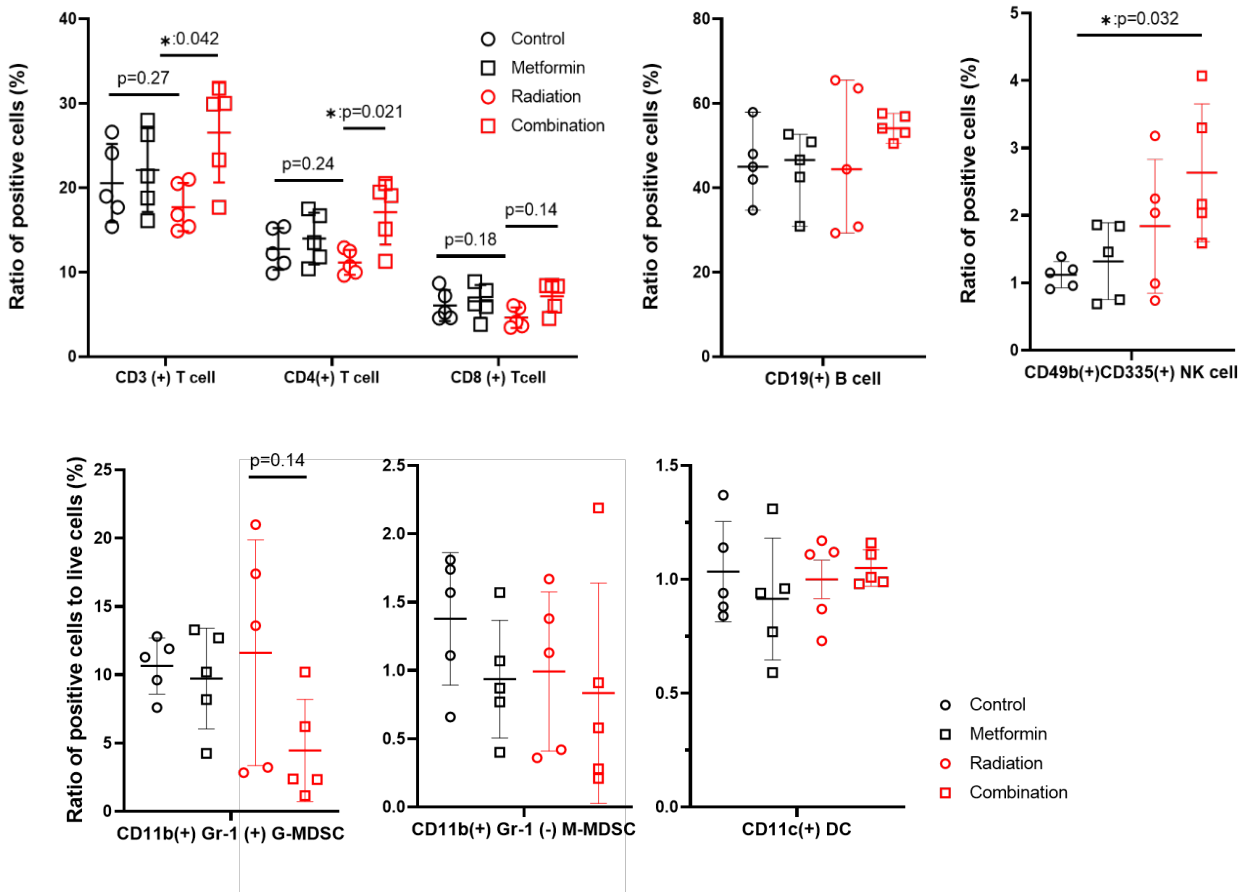
放射線照射群は非治療群に比べて CD3 陽性 T 細胞、CD4 陽性 T 細胞、および CD8 陽性 T 細胞の割合はわずかながら低下する傾向を認めた。これに対し、トホルミンを併用すると、CD3 陽性 T 細胞と CD4 陽性 T 細胞の割合は放射線照射単独群と比較して、有意に増加していた(CD3 陽性 T 細胞; $17.7 \pm 2.9\%$ vs $26.5 \pm 5.9\%$; $p = 0.031$, CD4 陽性 T 細胞 $11.5 \pm 1.5\%$ vs $17.1 \pm 3.8\%$; $p = 0.032$)。CD8 陽性 T 細胞においても有意差は認めなかったものの同様の傾向を認めた ($4.6 \pm 1.2\%$ vs $7.1 \pm 1.8\%$; $p = 0.056$)。次に、IFN- γ 産生細胞の割合は、CD8 陽性 T 細胞において非治療群と比較して、トホルミン投与群で有意に増加していた($24.1 \pm 3.6\%$ vs $34.3 \pm 3.5\%$; $p = 0.008$)。また、放射線照射/トホルミン投与併用群では非治療群と比較して CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞の両方において有意に増加していた (CD4 陽性 T 細胞; $6.8 \pm 2.4\%$ vs $9.6 \pm 1.8\%$; $p = 0.033$, CD8 陽性 T 細胞; $24.1 \pm 3.6\%$ vs $37.6 \pm 10.0\%$; $p = 0.0096$)

ii) NK細胞

CD49b(+)/CD335(+)の表現型を示す活性化型 NK 細胞の割合は、放射線照射/トホルミン投与併用群が非治療群と比較して有意に増加していた(非治療群 vs 併用群 $1.1 \pm 0.2\%$ vs $2.8 \pm 1.0\%$; $p = 0.032$)

iii) 骨髄球系細胞

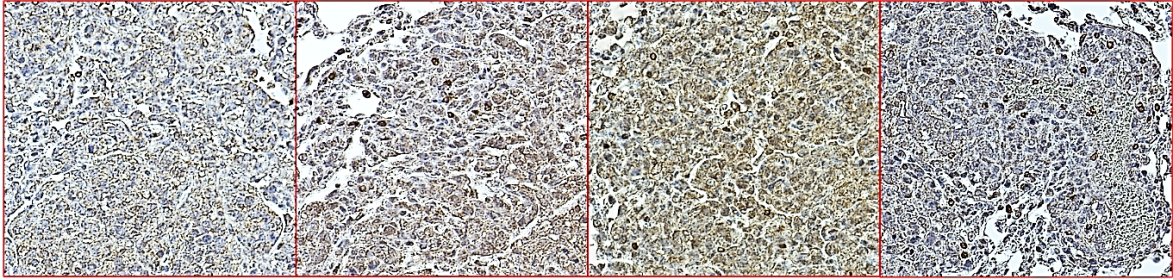
CD11b(+)/Gr-1(+)の表現型を示す G-MDSC の割合については、4 群間で有意差を認めなかったが、併用群は、非治療群、放射線照射群と比較して減少する傾向を示した(非治療群 vs 併用群 $9.3 \pm 1.8(\%)$ vs $4.2 \pm 3.6(\%)$; $p=0.056$, 放射線照射群 vs 併用群 $10.0 \pm 7.2(\%)$ vs $4.2 \pm 3.6(\%)$; $p=0.10$)



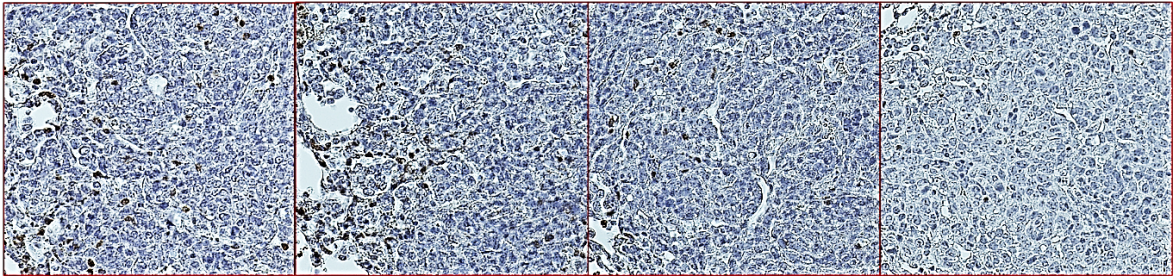
(3)免疫組織化学染色を用いた肺転移巣内への免疫細胞の浸潤について

肺転移巣内への免疫細胞の浸潤の程度を免疫組織化学染色を用いて検討し、4 群間の比較を行った。抗 CD8a 抗体で染色された細胞の数を腫瘍面積で割って得られた CD8a 陽性 T 細胞の密度は、4 群間で有意な差は認めなかった。(非治療群 vs 併用群 $88.0 \pm 30.0(\text{個}/\text{mm}^2)$ vs $139.1 \pm 97.1(\text{個}/\text{mm}^2)$; $p=0.78$)。抗 NCR1(CD335)抗体で染色される NK 細胞の密度は、放射線治療/メトホルミン投与併用群が非治療群と比較して有意に増加しており、脾臓中の NK 細胞の割合に関する結果と一致した。(非治療群 vs 併用群 $45.5 \pm 47.9(\text{個}/\text{mm}^2)$ vs $316.9 \pm 175.0(\text{個}/\text{mm}^2)$; $p=0.014$)。メトホルミン投与群、および放射線照射/メトホルミン投与併用群は非治療群と比較して、肺転移巣における Gr-1 陽性細胞の密度が有意に低下しており(非治療群 vs トホルミン投与群; $246.9 \pm 56.8(\text{個}/\text{mm}^2)$ vs $159.7 \pm 29.4(\text{個}/\text{mm}^2)$; $p=0.032$ 、非治療群 vs 併用群; $246.9 \pm 56.8(\text{個}/\text{mm}^2)$ vs $70.8 \pm 54.0(\text{個}/\text{mm}^2)$; $p=0.0046$)、併用群は放射線治療群と比較しても有意に減少していた(放射線治療群 vs 併用群; $197.2 \pm 102.0(\text{個}/\text{mm}^2)$ vs $70.8 \pm 54.0(\text{個}/\text{mm}^2)$; $p=0.016$)。

(A) NKp46/CD335



(B) Gr-1



(4)まとめ

メホルミン併用による免疫放射線の効果により、原発巣のみならず遠隔転移の肺転移巣まで縮小されることが示された。その機序として脾臓裁縫の T 細胞の IFN- γ の産生能が上昇していること、NK 細胞の割合が上昇していること、G-MDSC の細胞の割合が減少していることを示した。また、肺転移巣内においては、NK 細胞の割合が非治療群と比較して上昇しており、G-MDSC の細胞の割合が減少していた。この結果よりメホルミンを併用した免疫放射線療法は放射線照射により宿主の免疫が賦活化し、遠隔転移の肺転移を縮小させた可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 H. Tsukui, H. Horie, K. Koinuma, H. Ohzawa, Y. Sakuma, Y. Hosoya, H. Yamaguchi, K. Yoshimura, A. K. Lefor, N. Sata, J. Kitayama.	4. 巻 20(1)
2. 論文標題 CD73 blockade enhances the local and abscopal effects of radiotherapy in a murine rectal cancer model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC Cancer	6. 最初と最後の頁 411
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12885-020-06893-3	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 Tojo Mineyuki, Horie Hisanaga, Koinuma Koji, Miyato Hideyo, Tsukui Hidenori, Kaneko Yuki, Futoh Yurie, Kimura Yuki, Takahashi Kazuya, Saito Akira, Ohzawa Hideyuki, Yamaguchi Hironori, Lefor Alan Kawarai, Sata Naohiro, Kitayama Joji	4. 巻 Online ahead of print.
2. 論文標題 Programmed cell death ligand 1 expression on monocytes is inversely correlated with tumour response to preoperative chemoradiotherapy for locally advanced rectal cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Colorectal Disease	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/codi.16167	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 Tojo Mineyuki, Miyato Hideyo, Koinuma Koji, Horie Hisanaga, Tsukui Hidenori, Kimura Yuki, Kaneko Yuki, Ohzawa Hideyuki, Yamaguchi Hironori, Yoshimura Kotaro, Lefor Alan Kawarai, Sata Naohiro, Kitayama Joji	4. 巻 12
2. 論文標題 Metformin combined with local irradiation provokes abscopal effects in a murine rectal cancer model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 7290
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-11236-2	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6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 東條 峰之, 津久井 秀則, 金子 勇貴, 風當 ゆりえ, 木村 有希, 高橋 和也, 齋藤 晶, 大澤 英之, 宮戸 秀世, 鯉沼 広治, 堀江 久永, 佐田 尚宏, 北山 丈二
2. 発表標題 直腸癌術前放射線化学療法の奏効率と末梢血単核球上PDL1との関連
3. 学会等名 第59回日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 津久井 秀則, 堀江 久永, 大澤 英之, 山口 博紀, 佐久間 康成, 川平 洋, 細谷 好則, 味村 俊樹, 鯉沼 広治, 吉村 浩太郎, Alan Lefor, 佐田 尚宏, 北山 丈二
2. 発表標題 CD73 targeting therapy enhances the antitumor effect of radiotherapy in rectal cancer
3. 学会等名 第120回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 東條 峰之, 津久井 秀則, 齋藤 晶, 高橋 和也, 木村 有希, 熊谷 祐子, 宮戸 秀世, 大澤 英之, 鯉沼 広治, 堀江 久永, 佐田 尚宏, 北山 丈二
2. 発表標題 Combination therapy of local radiation and metformin can suppress the spontaneous lung metastases of murine tumor
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 東條 峰之, 津久井 秀則, 齋藤 晶, 木村 有希, 高橋 和也, 熊谷 祐子, 金丸 理人, 宮戸 秀世, 大澤 英之, 鯉沼 広治, 佐田 尚宏, 北山 丈二
2. 発表標題 大腸癌細胞株LuM1肺転移モデルにおけるMetformin併用放射線治療
3. 学会等名 第41回癌免疫外科研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 堀江 久永, 鯉沼 広治, 巷野 佳彦, 佐田友 藍, 直井 大志, 佐久間 康成, 細谷 好則, 味村 俊樹, 北山 丈二, 佐田 尚宏
2. 発表標題 直腸癌に対する術前CRTと選択的側方郭清併用による治療成績
3. 学会等名 第75回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 堀江 久永, 鯉沼 広治, 井上 賢之, 田原 真紀子, 巷野 佳彦, 佐久間 康成, 細谷 好則, 味村 俊樹, 北山 丈二, 佐田 尚宏.
2. 発表標題 術前CRTと側方郭清による側方リンパ節転移の制御.
3. 学会等名 第74回日本消化器外科学会
4. 発表年 2019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	北山 丈二 (Kitayama Joji) (20251308)	自治医科大学・医学部・教授 (32202)	
研究分担者	堀江 久永 (Horie Hisanaga) (20316532)	自治医科大学・医学部・教授 (32202)	
研究分担者	田原 真紀子 (Tahara Makiko) (30406102)	自治医科大学・医学部・助教 (32202)	
研究分担者	井上 賢之 (Inoue Yoshiyuki) (80375279)	自治医科大学・医学部・講師 (32202)	

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