

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：34417

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16813

研究課題名（和文）PETイメージングによる放射線免疫併用療法の最適化

研究課題名（英文）Development of PET imaging for radioimmunotherapy

研究代表者

鈴木 基史（SUZUKI, Motofumi）

関西医科大学・附属光免疫医学研究所・助教

研究者番号：90807801

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：放射線治療と免疫チェックポイント阻害剤を併用する際、腫瘍組織内の免疫細胞の状態を把握する手法があればより最適な治療条件を選択できる。本研究では、腫瘍組織内の代謝変化から免疫細胞の状態を間接的に予測することが可能かを評価した。その結果、（1）放射線治療はがん細胞の細胞周期および糖代謝に関わるGlut1の発現量を変化させること、（2）免疫チェックポイント阻害剤は腫瘍組織の細胞周期を変化させ、それには活性化T細胞が放出するIFNやTNFが関与することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、放射線治療または免疫療法によりがん組織の細胞周期が変動すること、また代謝に関わるタンパク質の発現量が変わることが示された。本研究により得られた知見から、既存のPETイメージング剤を用いて免疫細胞の活性度合いを把握できる可能性がある。それにより、放射線免疫併用療法の適切な治療プロトコルの作成の新たな指標となり得ることが期待される。

研究成果の概要（英文）：When combining radiotherapy and immune checkpoint inhibitors, a method to determine the state of immune cells in tumor tissue would allow more optimal treatment conditions to be selected. In this study, we evaluated whether it is possible to predict the state of immune cells from metabolic changes in tumor tissue. The results showed that (1) radiotherapy alters cell cycle and the expression level of Glut1, which is involved in glucose metabolism of cancer cells, and (2) immune checkpoint inhibitors also alter the cell cycle of tumor tissue, and these phenomenon is induced by IFN and TNF released by activated T cells.

研究分野：放射線生物学

キーワード：放射線治療 免疫チェックポイント阻害剤 細胞周期

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がん組織では、がん細胞の解糖系に依存した無秩序な増殖に血管新生が追いつかず低グルコース・低酸素状態を維持している。抗腫瘍免疫を担う T 細胞は、がん細胞とグルコースを代謝競合していることから、癌組織の劣悪な環境では T 細胞は疲弊してしまう。また、がん組織内部の栄養環境は T 細胞の分化や機能、寿命にも影響をあたえる。このことから、がん組織の代謝機構は抗腫瘍免疫の活性と密接に関係があるといえる。

放射線治療は、がん細胞に過剰な DNA 損傷を与えることで細胞死を生じさせる。この時に、がん細胞内の代謝能が変化することが知られており、我々は過去にその要因のひとつとして、ミトコンドリア密度と酸素消費量が増加することを明らかにしている。これらのことから、放射線によるがん組織の質的变化は腫瘍組織内の免疫に対しても影響を与える可能性がある。事実、放射線治療後に抗腫瘍免疫が活性化することが報告されており、放射線治療と免疫チェックポイント阻害剤を用いた放射線免疫併用療法についての臨床研究も既に行われている。しかし、放射線照射後の組織内の免疫を評価する手段がないことが課題のひとつである。これまでの放射線治療が放射線によって生じた障害によりがん細胞を死滅させるのに対し、併用療法ではがん組織中の免疫細胞を利用してさらなる治療効果の向上を狙う。そのため従来の照射線量・範囲では適さない可能性があり、患者の免疫状態を把握して照射法の最適化や併用すべき患者の見極めを行う必要がある。

2. 研究の目的

上記の背景を元に、放射線によって生じるがん組織の代謝の変化と抗腫瘍免疫には密接な相互作用があると仮説をたてた。この仮説を立証するため本課題では、がん組織中の代謝に関する各種タンパク質に対する放射線および免疫細胞が放出するサイトカインが及ぼす影響について検討を行った。

3. 研究の方法

(1) 放射線およびサイトカイン処理または抗 PD1 抗体治療による細胞周期の変化の解析

本研究では、免疫正常マウスに腫瘍を移植し実験を行うことから、マウス由来の結腸がん細胞 CT26 を使用した。BALB/c マウス (8 週齢、オス) に CT26 を移植し、腫瘍が触知可能になった時点を Day0 とした。Day0 と Day5 に抗マウス PD-1 抗体 (250 µg) を腹腔内投与し、Day7 に腫瘍を摘出した。腫瘍を分散させた後に 70%メタノールにて固定と RNase 処理を行い、ヨウ化プロピジウム染色後にフローサイトメトリーを用いて細胞周期の解析を行なった。

細胞を用いた解析では、細胞をプラスチックシャーレに播種し、2-8 Gy のエックス線またはガンマ線を照射、または細胞障害性 T 細胞が放出すると考えられるサイトカイン群 (IL-2、IFN-γ、TNF-α) を処理し、24 時間後に細胞をトリプシンで回収し、細胞周期の解析を行なった。

(2) 放射線およびサイトカイン処理した細胞における各種トランスポーター発現量の比較

上記と同様に放射線またはサイトカインに暴露された CT26 細胞を RIPA buffer により回収し、作成した細胞抽出液をウエスタンブロットに供した。

(3) 放射線治療後の代謝変化の評価

CT26 細胞を 96-well plate に播種し、ガンマ線を照射後にグルコース取り込み能を Glucose uptake kit (Dojindo) を用いて評価した。同条件にて、培地内のグルコースおよび乳酸濃度をそれぞれ Glucose-Glo および Lactate-Glo (Promega) を用いて測定した。またこの際、乳酸の細胞外への放出を担う MCT1 の阻害剤として AZD3965 を使用した。

(4) 放射線治療後の腫瘍内免疫細胞の変化の評価

CT26 移植マウスに 2 Gy を連続 5 日間照射し、10 日後に腫瘍および脾臓を摘出し、パラフィン包埋を行った後に免疫組織化学に供した。その際、細胞障害性 T 細胞のマーカーとして CD8、ヘルパー T 細胞のマーカーとして CD4 を使用した。

4. 研究成果

(1) 放射線およびサイトカイン処理または抗 PD1 抗体治療による細胞周期の変化の解析

過去の報告から、細胞内糖代謝に関与するトランスポーターなどの発現は、細胞周期に依存し G2/M 期に増加することが知られている。そのため、 ^{18}F FDG を始めとする代謝イメージング剤の取り込みも細胞周期に依存する可能性が考えられる。そこで CT26 細胞に放射線を照射した後の細胞周期について解析したところ、線量依存的に G2/M 期の有意な増加が観察された。

免疫チェックポイント阻害剤による治療効果は、細胞障害性 T 細胞の活性化に起因する。その際、T 細胞は様々なサイトカインを放出することでがん細胞に影響を与える。そこで代表的なサ

イトカイン 3 種類 (IL-2、IFN- γ 、TNF- α) の細胞周期に対する影響を評価した。その結果、IFN- γ 、TNF- α を処理した細胞では G2/M 期が有意に増加することが示された。また CT26 担がんマウスに抗 PD1 抗体による治療を行ったところ、G2/M 期の増加が観察された。これらの結果から、放射線および免疫チェックポイント阻害剤による治療は G2/M 期を増加させることが示された。

(2) 放射線およびサイトカイン処理した細胞における各種トランスポーター発現量の比較

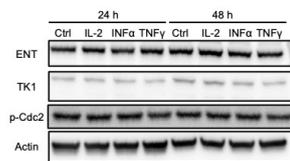
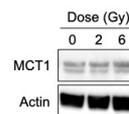
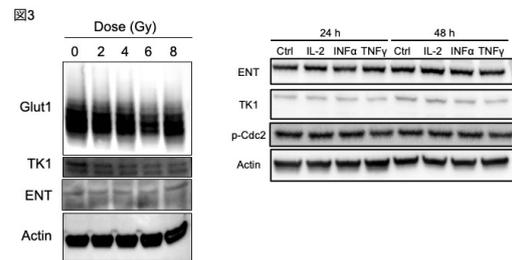
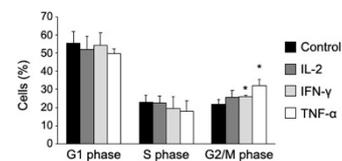
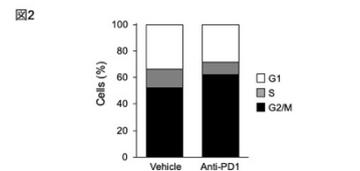
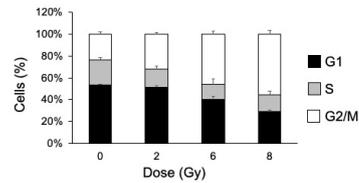
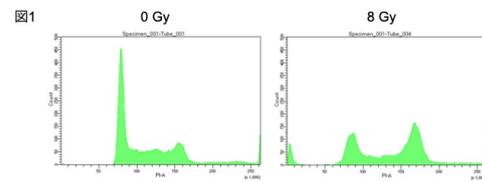
放射線照射後およびサイトカイン処理を行った際に、細胞内の代謝環境がどのような影響を受けるか評価するため、各種トランスポーターの発現量を評価した。放射線照射では、照射線量依存的に Glut1 の発現量が減少したのに対し、乳酸の取り込みと排出に関わる MCT1 の発現量については変化がなかった。また DNA 合成に必要なチミジンの細胞内取り込みに関わる ENT についても評価したが変化は認められなかったものの、DNA 合成に関わるリン酸化酵素 TK1 について評価したところ、放射線の照射によりその発現量は低下した。サイトカイン処理した細胞では、Glut1、ENT、MCT1 の全てにおいて有意な変化は観察されなかった。両条件において G2/M 期が増加していることから、Glut1 の発現が増加するという予測とは異なる結果であった。

(3) 放射線治療後の代謝変化の評価

放射線照射後の培地内に残存するグルコースおよび乳酸濃度を測定することで、代謝能の変化が生じているかを評価した。その結果、放射線照射により培地中に放出された乳酸の量が約 2 枚程度まで上昇した。乳酸の細胞内への取り込みおよび細胞外への放出の両方を MCT1 阻害剤で抑制しても細胞外への乳酸の放出は変化しなかった。過去の報告によると、がん細胞では MCT1 の他に MCT4 も同様の働きを担っていることがあるため、CT26 細胞では MCT4 依存的に乳酸の放出が行われている可能性が示唆された。次に、がん細胞の糖代謝が活発化し、細胞外への乳酸放出が加速したと考え、グルコース取り込み量について評価したものの、変化はなかった。

(4) 放射線治療後の腫瘍内免疫細胞の変化の評価

放射線が腫瘍組織および脾臓内の免疫細胞に及ぼす影響を評価するため、免疫組織化学により免疫細胞の同定を行なった。その結果、抗 PD1 抗体を単独処理したマウス群では腫瘍組織および脾臓における CD8 の増加傾向を示したのに対し、放射線との併用群ではそれらの増加傾向が消失し、コントロール群と同程度であった。一般的にリンパ球は放射線感受性が高いことが知られている。そのため免疫チェックポイント阻害剤により増加した免疫細胞を放射線で死滅させてしまうことからより最適な照射条件を探索する必要性がある。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nakajima Kohei, Homma Mitsunori, Suzuki Motofumi, Yokouchi Yuta, Matsuda Takuma, Takakura Hideo, Hirata Kenji, Kuge Yuji, Ogawa Mikako	4. 巻 108-109
2. 論文標題 Reduction of tumor hypoxia by anti-PD-1 therapy assessed using pimonidazole and [18F]FMISO	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nuclear Medicine and Biology	6. 最初と最後の頁 85 ~ 92
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.nucmedbio.2022.03.005	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 Suzuki Motofumi, Matsuda Takuma, Nakajima Kohei, Yokouchi Yuta, Kuge Yuji, Ogawa Mikako	4. 巻 36
2. 論文標題 PD1 blockade alters cell-cycle distribution and affects 3'-deoxy-3'-[18F]fluorothymidine uptake in a mouse CT26 tumor model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Annals of Nuclear Medicine	6. 最初と最後の頁 931 ~ 940
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12149-022-01782-0	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 -

〔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
---------	---------