

機関番号：10101

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791164

研究課題名 (和文) 光イメージングを利用した癌特異的免疫賦活を狙う新規放射線癌治療法の開発

研究課題名 (英文) Development of a new radiation therapy to improve tumor immunity using tumor-bearing mouse with in vivo imaging technique

研究代表者

武島 嗣英 (TAKESHIMA TSUGUHIDE)

北海道大学・大学院医学研究科・特任助教

研究者番号：10360950

研究成果の概要 (和文)：担癌マウスを使用し、腫瘍へ放射線照射後の免疫細胞の動向を調べた結果、腫瘍内と腫瘍の所属リンパ節内に特異的キラーT 細胞が多数誘導され、これが放射線治療の効能に大きく関わるということがわかった。X 線治療と免疫治療の併用治療を行ったところ癌特異的キラーT 細胞が相乗的に増加し、優れた治療効果が得られた。さらに自然転移モデルでこの治療法を試験するために、ルシフェラーゼ遺伝子導入・リンパ行性転移株を用いた担癌動物を作製した。

研究成果の概要 (英文)：In the present study, I found that tumor-specific cytotoxic T lymphocytes (CTL) in tumor-bearing mice was elevated in tumor draining lymph node and tumor tissue after local tumor irradiation. I also found that these radiation-induced tumor-specific CTL play a crucial role in the inhibition of tumor growth by radiation therapy. A combined therapy of local radiation with immunotherapy (Th1 cell therapy) augmented the generation of tumor-specific CTL at the tumor site and induced a complete regression of the tumor, although radiation therapy alone did not exhibit such a pronounced therapeutic effect. The metastasis model, in which tumor cells were inoculated into both legs, was used and the combination therapy was done only on the right leg. The tumor growth of the left leg (metastasis) was greatly inhibited along with that of the right leg (primary tumor) in the group receiving the combination therapy. The metastatic potential of tumor cell was transduced with luciferase gene to investigate the effectiveness of this combined therapy in a spontaneous metastasis model.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・放射線科学

キーワード：放射線治療生物学、癌免疫治療

1. 研究開始当初の背景

放射線の癌局所照射による腫瘍縮小のメカニズムは、DNA への傷害付与による癌細

胞のアポトーシスが直接の原因と考えられてきた。しかし、そればかりでなく腫瘍局所へ放射線照射することで癌に対する特異的

免疫反応が惹起され、この免疫反応も腫瘍溶解に一役買っていることが近年になりわかりつつある。もしこれが事実であれば、放射線治療で誘導される腫瘍免疫を高める工夫を行うことにより原発巣のみならず転移巣をも消失できるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

担癌動物を用いてX線治療が腫瘍免疫を高めるか、具体的にはX線治療を行うことにより癌特異的キラーT細胞が体内に誘導されるかを確認する。確認後、X線誘導・癌特異的キラーT細胞のさらなる増加を目指して最適な免疫治療との併用治療モデルを開発する。最終的に光イメージング・リンパ節転移・担癌動物モデルを使用した、「放射線・免疫併用治療法」の治療モデルを開発する研究を提案する。

3. 研究の方法

- (1) C57BL/6 マウスに EG7 (Thymoma, EL4 Ovalbumin (OVA, 卵白アルブミン) 遺伝子導入株、この系では OVA が免疫系の標的 (癌抗原) になる) を脚部皮内に 2×10^6 /匹接種し、腫瘍塊が 6-8mm になったところで腫瘍塊に X 線を 2 Gy 照射した。2 Gy は腫瘍の増殖を抑制できる線量である。
- (2) 抗 CD8 抗体を投与してキラーT細胞を体内から消去した状態で X 線照射後の腫瘍サイズを計測した。腫瘍に対する X 線治療のキラーT細胞の関与を調べるためである。
- (3) 照射 5 日後に所属リンパ節内と腫瘍内リンパ球の癌特異的キラーT細胞 (CD8⁺OVA-tetramer⁺細胞) の出現割合をフローサイトメトリーにて測定した。
- (4) 併用する免疫治療として、Th1 細胞治療法を行った。2 Gy 照射を行うとともに OVA 特異的 Th1 細胞を他のマウスから誘導、増殖させ、 5×10^6 /匹を OVA タンパク質 200ug/匹と一緒に所属リンパ節近傍に皮内投与した。Th1 と OVA の投与は X 線照射した日とその 3 日後、6 日後の計 3 回行った。
- (5) X 線・Th1 併用治療における OVA 特異的キラーT細胞の誘導能相乗効果を見るために、癌所属リンパ節細胞と腫瘍内リンパ球の中の癌特異的キラーT細胞 (CD8⁺OVA-tetramer⁺細胞) の割合をフローサイトメトリーにて測定した。
- (6) 併用治療の効果を見るため、腫瘍体積の計時変化と 100 日後の生存率を測定した。
- (7) 放射線・免疫併用治療の転移巣に対する治療効果を見るため、EG7 をマウスの両脚に移植した転移モデルを用いて治療を行った。EG7 を右脚に移植 (原発巣)

した 3 日後に左脚にも移植 (転移巣) し、7 日後に右脚のみに X 線と OVA 特異的 Th1 細胞での治療を行い、左右の腫瘍サイズを計測した。

- (8) 転移巣の光イメージングモデル構築のために、自然にリンパ節転移をおこした EG7 をマウスより採取し、その株を新たなマウスに移植、これを計 5 回行って確実にリンパ節転移を起こす株を作成した。さらにこの株にルシフェラーゼ遺伝子を導入し、動物に移植した際に原発巣・転移巣の位置を光イメージング検出機器で捉えられる細胞株を作製した。

4. 研究成果

- (1) 抗 CD8 抗体を投与したマウスでは X 線治療の効果が減弱することがわかった (図 1)。つまり、X 線による腫瘍縮小にはキラーT細胞が大きく関与しているといえる。

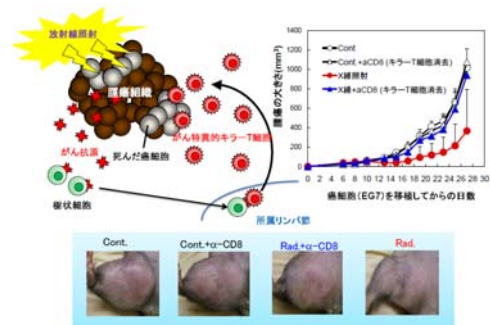


図 1 X 線照射による腫瘍の縮小はキラーT細胞が大きく関わっていた

- (2) EG7 腫瘍への X 線照射を行った際に所属リンパ節内と腫瘍内に癌特異的キラーT細胞 (CD8⁺OVA-tetramer⁺細胞) が誘導されていることを確認した (図 2)。

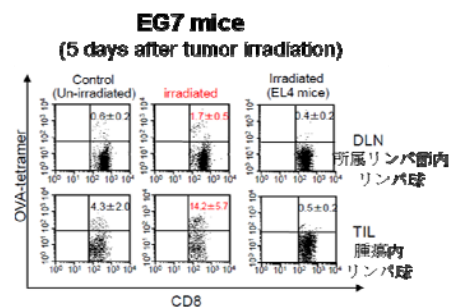


図 2 腫瘍に X 線照射を行うことで癌特異的キラーT細胞 (CD8⁺OVA-tetramer⁺細胞) が増加した

- (3) X 線・免疫 (Th1 細胞治療) 併用治療群ではそれぞれの単独治療に比べて所属リンパ節内・腫瘍内に癌特異的キラーT細胞を多く誘導することがわかった。すなわち、Th1 免疫治療は放射線治療で誘

導される癌特異的キラーT細胞の増殖を促すことがわかった(図3)。

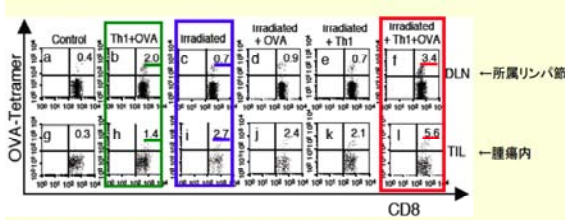


図3 放射線免疫併用療法(X線+Th1+癌抗原)は癌特異的キラーT細胞をより多く誘導した

(4) X線・免疫(Th1細胞治療)併用治療により顕著な抗腫瘍効果と延命効果が見られた(図4)。放射線と免疫治療は癌特異的キラーT細胞の増殖・活性化を促す点でがん治療に有効であると考えられる。

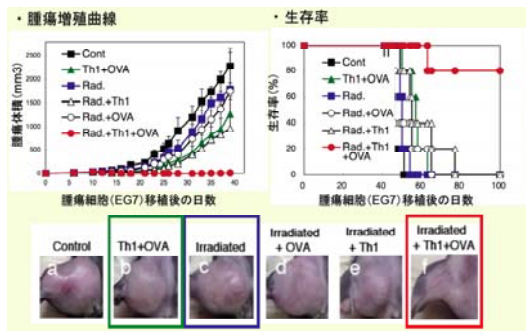


図4 X線・免疫(Th1+OVA)併用による治療効果。併用治療は腫瘍の成長を抑え、生存率を大幅に向上させる。

(5) X線・Th1細胞併用療法を腫瘍をマウスの両脚に移植する転移担癌マウスに行くと、原発巣(右脚)だけでなく、転移巣(左脚)も完治した。それぞれの単独療法では完治しなかった(図5)。

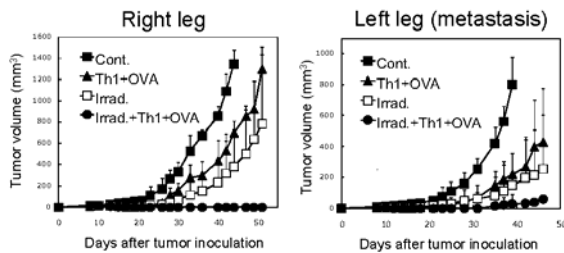


図5 放射線免疫併用療法(X線+Th1+癌抗原)は原発巣のみならず転移巣の腫瘍も縮小させた

(6) EG7にルシフェラーゼ遺伝子(EG7-Eluc)を導入し、動物に移植した際に原発巣・転移巣の位置を光イメージング検出機器で捉えられる細胞株の作製が成功し

た(図6)。

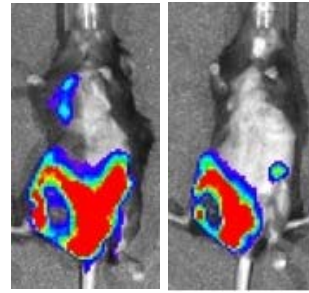


図6 リンパ節指向性EG7-Elucを右脚皮内に移植した際の転移の様子

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計2件)すべて査読有り

- ① Nishioka T, Yasuda M, Takeshima T, Haga H, Miyai Y, Shibata KI, Yamazaki R, Shirato H, Teduka M, Date H. Radiation-induced Cancer Cell Repopulation: A possible mechanism implied by experiments using transplantable mouse-derived sarcoma cell line. Cell Struct Funct. 2011, 31(1):13-20.
- ② Takeshima T, Chamoto K, Wakita D, Ohkuri T, Togashi Y, Shirato H, Kitamura H, Nishimura T. Local radiation therapy inhibits tumor growth through the generation of tumor-specific CTL: its potentiation by combination with Th1 cell therapy. Cancer Res. 2010, 70(7):2697-706

[学会発表](計8件)

- ① 武島嗣英, 脇田大功, 大栗敬則, 白土博樹, 北村秀光, 西村孝司, Application of radiation-induced tumor-specific CTL for tumor therapy, 第53回日本放射線影響学会, 京都, 2010.10.21.
- ② Takeshima T, Chamoto K, Wakita D, Ohkuri T, Togashi Y, Shirato H, Kitamura H, Nishimura T. Local radiation therapy inhibits tumor growth through the generation of tumor-specific CTL: its potentiation by combination with Th1 cell therapy. RRS2010 (Radiation Research Society 2010), Hawaii, 2010.9.29.
- ③ 武島嗣英, 脇田大功, 大栗敬則, 白土博樹, 北村秀光, 西村孝司, Application of radiation-induced tumor-specific CTL to adoptive tumor immunotherapy, 第69回日本癌学会学術総会, 大阪,

2010.9.24.

- ④ Takeshima T, Chamoto K, Wakita D, Ohkuri T, Togashi Y, Shirato H, Kitamura H, Nishimura T.、Local radiation therapy inhibits tumor growth through the generation of tumor-specific CTL: its potentiation by combination with Th1 cell therapy.、14th International Congress of Immunology、神戸、2010.8.23.
- ⑤ 武島嗣英、茶本健司、脇田大功、大栗敬則、白土博樹、北村秀光、西村孝司、放射線治療による腫瘍縮小には癌特異的免疫が関与する、第49回日本医学放射線学会生物部会学術大会、札幌、2010.7.9.
- ⑥ 武島嗣英、茶本健司、北村秀光、西村孝司、白土博樹、放射線癌治療におけるTh1細胞治療との併用効果、日本医学放射線学会北日本地方会、仙台、2009.11.6.
- ⑦ Takeshima T., Chamoto K., Kitamura H., Nishimura T., Shirato H, Synergistic efficacy of radiation therapy and Th1 cell adjuvant therapy in mice-transplanted tumor、The 7th Symposium for Future Drug Discovery and Medical Care、札幌、2009.10.7.
- ⑧ 武島嗣英、茶本健司、脇田大功、大栗敬幸、白土博樹、北村秀光、西村孝司、Augmentation of the therapeutic efficacy of Th1 cell-adjuvant therapy enhanced the therapeutic efficacy of combination with radiation therapy 第68回日本癌学会、横浜、2009.10.1.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武島 嗣英 (TAKESHIMA TSUGUHIDE)
北海道大学・大学院医学研究科・特任助教
研究者番号：10360950

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし