

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462500

研究課題名(和文)高精度放射線照射によるEndogenousワクチン効果に関する研究

研究課題名(英文)The study of Endogenous vaccine effect by high-precision radiation therapy

研究代表者

久保 誠 (KUBO, Makoto)

北里大学・医療衛生学部・講師

研究者番号：40464804

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)：放射線治療は前立腺癌に対する最も重要な治療法の一つである。放射線治療では、放射線照射のない転移巣が縮小する現象がまれに観察されるが、これは局所から全身への抗腫瘍免疫応答の誘導なしには説明できない。そこで、放射線治療を実施した前立腺癌患者を対象に、定期的に末梢血を採取し、リンパ球サブセットの動態解析を実施した。その結果、治療開始後から活性化T細胞の割合が徐々に上昇することを確認した。その他いくつかのサブセットでも変化が観察され、放射線治療によって免疫応答が惹起され得ることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Radiation therapy (RT) is one of the most important treatments for prostate cancer. Patients treated by RT were occasionally observed that metastatic cancer without directly radiation disappeared after RT treatment. RT might be able to induce effectively anti-tumor immunity. However, the details of immune responses were not clear in RT. Then, the lymphocyte subsets were analyzed by flow cytometry. The proportion of activated T cells in peripheral blood gradually increased after one of the RT treatment (low-dose-rate brachytherapy). RT treatment indicates to be inducible immune responses.

研究分野：免疫学

キーワード：前立腺癌 放射線治療 Endogenousワクチン

1. 研究開始当初の背景

(1) 腫瘍に対する放射線治療の効果は、これまで直接的な殺細胞効果のみと考えられてきた。しかし原発巣への放射線照射によって「放射線照射されていない転移巣が縮小する現象 (abscopal effect)」が臨床的に確認されており、これは局所から全身への抗腫瘍免疫応答の誘導なしには説明できない。

(2) 放射線治療における抗腫瘍免疫応答については、*in vivo* にて高線量の放射線を照射した腫瘍細胞を体内に戻すとワクチン効果を持つことが既に確認されている。また前立腺癌の臨床においても、高頻度にリンパ節転移や遠隔転移をきたしている可能性が高いハイリスク症例において原発巣のみの照射によって転移が生ずることなく外科手術を上回る成績が得られている。

(3) 現在、癌に対する放射線治療は世界的にも高線量を照射する傾向にあり、(2) で述べた *in vivo* での照射に近い状況が推測され、より強い抗腫瘍免疫応答が誘導されている可能性がある。

2. 研究の目的

(1) 癌治療の成績向上には、原発巣のみならず転移巣の制御がポイントである。しかしながら、転移性癌の標準治療とされる全身化学療法は、殺細胞効果を主とするため、正常細胞への毒性が常に問題であり、新たな癌治療ストラテジーの確立が急務とされている。

(2) 近年、癌特異的な殺細胞効果をもたらす免疫療法は、その効果と正常細胞への毒性が極めて低いことから、新たな癌治療法としての基盤が確立されつつある。また、腫瘍免疫学的な解析から、放射線治療による抗腫瘍免疫応答の誘導も新たに確認されてきている。

(3) そこで本研究では、放射線治療によって誘導される抗腫瘍免疫応答の機序を、実臨床における患者末梢血で詳細に解析し、放射線誘導型の新たな癌ワクチン (Endogenous ワクチン) 開発の可能性を探る。

3. 研究の方法

(1) 対象患者の選定と放射線治療の実施

前立腺癌患者における対象症例の選定と治療の実施については、研究分担者の佐藤威文と石山博條が実施した。また本研究は、北里大学医学部・病院倫理委員会にて審議され承認を得た (承認番号 B13-62)。前立腺癌患者に対する放射線治療としては、ヨウ素 125 永久密封小線源療法 (LDR)、イリジウム 192 高線量率組織内照射法 (HDR) 強度変調放射線療法 (IMRT)、定位的放射線治療 (SRT)

のいずれかが実施された。治療法の選択については、インフォームドコンセントを実施し、本研究参加の同意を得た上で、患者自身の選択によるものでランダム化は実施していない。

(2) 放射線治療施行患者における末梢血単核球の動態解析

放射線治療前、治療開始日から起算して凡そ3ヵ月毎に患者から約5~8ml採血した。末梢血のリンパ球動態は、CD3, CD4, CD8, CD14, CD16, CD19, CD56、メモリーT細胞はCD45RA, CD45RO, CD62L, CCR7、細胞傷害性T細胞を含む活性化リンパ球はCD38, HLA-DRに対する蛍光標識モノクローナル抗体を用いたフローサイトメトリー解析を行った。また近年、腫瘍免疫抑制に関与すると注目されている骨髄由来抑制性細胞 (MDSC) についても解析した。

(3) 血漿中サイトカインの定量解析

末梢血の動態解析 (2) を実施する際に、血漿は分離し-80°Cに保存した。この保存していた血漿を用いて放射線治療前後の血漿中サイトカインの測定をELISA法により実施した。測定したサイトカインは、Interleukin (IL)-1 β , IL-2, IL-4, IL-8, IL-10, IL-12, Interferon- γ , Tumor necrosis factor- α である。

(4) 腫瘍抗原特異的自己抗体の検出

癌患者血漿中には腫瘍に対する自己抗体が産生されることが報告されている。末梢血より分離した血漿を用いて、前立腺癌細胞株 (PC-3) の細胞溶解液を抗原としてWestern blottingを行い、放射線治療前後に変化する抗原の検出を実施した。

4. 研究成果

(1) 放射線治療 (LDR) 施行患者における末梢血単核球の動態解析

解析した白血球分画については、リンパ球と単球に大きな変化は観察されなかった。リンパ球分画については、B細胞、T細胞、ヘルパーT細胞、キラーT細胞、ナチュラルキラー細胞に大きな変化は認められなかった。治療前後で、細胞分画の活性化の程度に変化が生じている可能性を考慮し、活性化T細胞に関して解析した。その結果、活性化T細胞の割合は治療開始後から徐々に増加していた (図1)。活性化CD4陽性T細胞、活性化CD8陽性T細胞の割合も同様に増加した。全T細胞の割合に変化は認められていないことから、活性化T細胞が治療によって誘導されていることを示唆している。また、活性化T細胞の上昇とは逆に骨髄由来抑制性細胞 (MDSC) 治療から200日前後を境に減少した。このことはT細胞の活性化と関連があるかもしれない。

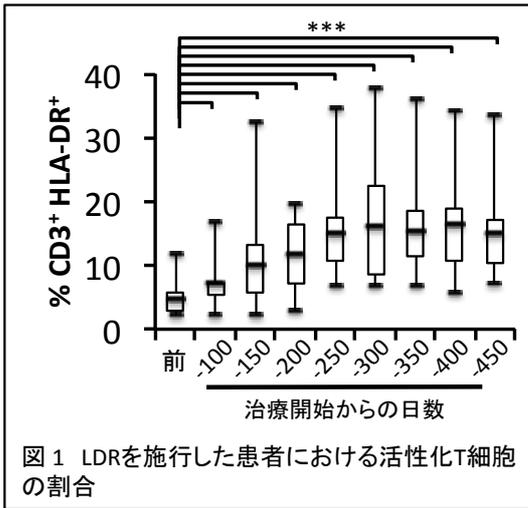


図1 LDRを施行した患者における活性化T細胞の割合

(2) 血漿中サイトカインの定量解析

測定したサイトカインの中で、IL-2はLDRを実施した前立腺癌患者35例中17例で検出した(図2)。検出された症例の中には、治療前からIL-2産生がかなり高値で亢進しているものもあり、これは前立腺癌に伴う抗腫瘍免疫応答が既に惹起されており、そのことが結果に反映されていると推察された。治療後にIL-2が増加する症例も複数で認められ、これらの患者では、放射線により徐々に傷害された癌細胞からの抗原や免疫応答賦活物質の放出により惹起された抗腫瘍免疫応答が影響している可能性が示唆された。IL-2を検出しなかった症例ではTh2側にサイトカイン産生が傾いている可能性を考慮し、IL-4やIL-10についても検討したが、IL-4はLDRを実施した35例中4例で、IL-10は35例中6例で検出した。IL-4やIL-10を検出した症例はIL-2が高値であった症例と重なっており、サイトカイン産生が全般に亢進している印象を受けた。その他のサイトカインについては、検出しないもの多かった。現在、最も多く検出したIL-2とPSAの関連も調べており、IL-2と腫瘍マーカーなどの異なる因子との関連を調べることで、放射線治療による抗腫瘍免疫応答の解明に繋がるかもしれない。

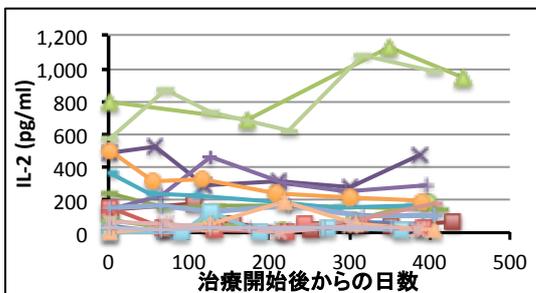


図2 LDRを施行した前立腺癌患者血漿中IL-2の経時的变化

(3) 腫瘍細胞に対する抗体の検出

放射線治療により腫瘍抗原に対する自己抗体が誘導され得るか検討した。放射線治療

では外科的療法と異なり癌部を切除しないため、自身の癌部を抗原に用いることは難しい。そこで、前立腺癌細胞株であるPC-3細胞溶解液を抗原にしたWestern blotting法を実施した。その結果、LDRを施行した35例のうち12例で、放射線治療によって増加あるいは減少するバンドを認めた(図3)。現時点で、検出したバンドの共通性やどのような抗原に対して反応しているか不明ではあるが、放射線治療は液性免疫にも影響しうることを示唆している。今後、検出した抗原の質量分析を実施し、抗原性なども明らかにしていきたい。

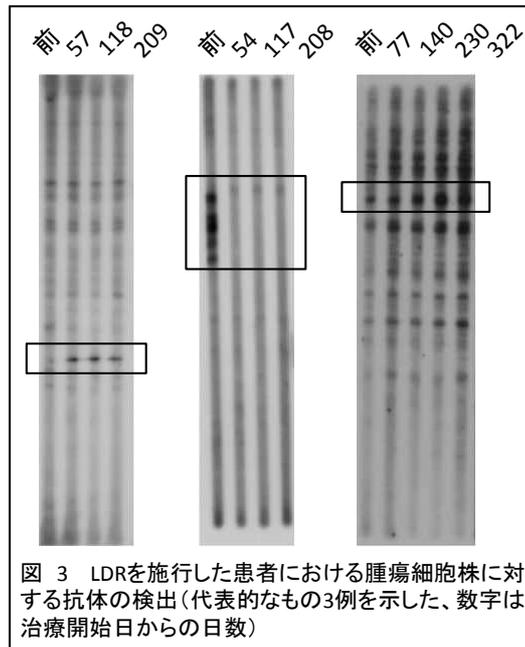


図3 LDRを施行した患者における腫瘍細胞株に対する抗体の検出(代表的なもの3例を示した、数字は治療開始日からの日数)

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)

[学会発表] (計 1 件)

① Analysis of immune responses in prostate cancer patients received low-dose-rate brachytherapy. Kubo Makoto, Satoh Takefumi, Ishiyama Hiromichi, Tabata Ken-ichi, Tsumura Hideyasu, Igarashi Yasuyuki, Iwamura Masatsugu, Baba Shiro, Hayakawa Kazushige, Obata Fumiya. The 44th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology Sapporo Convention Center 2015. 11. 18-20 北海道札幌市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久保 誠 (KUBO, Makoto)

北里大学・医療衛生学部・講師
研究者番号：40464804

(2) 研究分担者

佐藤 威文 (SATO, Takefumi)
北里大学・医学部・准教授
研究者番号：50286332

石山 博條 (ISHIYAMA, Hiromichi)
北里大学・医学部・講師
研究者番号：60343076