

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19771

研究課題名(和文)炭素イオン線による抗腫瘍免疫活性化の検討

研究課題名(英文)Anti cancer specific immune response after carbon ion irradiation

研究代表者

佐藤 浩央(Sato, Hiro)

群馬大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：90750571

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：リンパ腫移植マウスへの炭素イオン線照射が、HMGB1の放出を誘導すること、また腫瘍特異的Tリンパ球を増加させることを明らかにした。

HMGB1は、放射線照射によって死亡した細胞から放出されるdamage-associated molecular pattern (DAMPs)の一種であり、抗原提示細胞を活性化させる。HMGB1の刺激により活性化した抗原提示細胞は、腫瘍特異的細胞障害性T細胞の増殖と活性化を誘導する。そのため、本研究の結果から、炭素イオン線照射による腫瘍細胞死が、その腫瘍細胞特異的T細胞の活性化を促す可能性が明らかになった。

研究成果の概要(英文)：I found that carbon ion radiotherapy induced high-mobility group box 1 (HMGB1) release, and T cell activation and proliferation in mice with lymphoma.

HMGB1 is a member of damage-associated molecular pattern, which is released by irradiated tumor cells and trigger the activation of antigen presentation cells (APCs). APCs present the tumor-derived antigens to cytotoxic T lymphocytes, which then kill the target cells. Therefore, the present data suggested that tumor cell death by carbon ion radiotherapy elicited activation of tumor antigen specific immune response.

研究分野：放射線生物学

キーワード：放射線腫瘍学 腫瘍免疫学

### 1. 研究開始当初の背景

近年の抗腫瘍免疫研究の発展にともない、抗腫瘍免疫が、X線を用いた放射線治療の抗腫瘍効果において重要な役割を担っていることが明らかにされた[1]。臨床研究により、様々ながん種における腫瘍細胞表面上の HLA class I 高発現や、腫瘍組織への CD8 陽性 T 細胞の浸潤と、良好な予後との関連が報告されていた[2, 3]。また研究開始当時、Programmed death 1: PD-1、Programmed death ligand-1: PD-L1 などの免疫チェックポイント阻害剤が優れた治療効果を発揮し、放射線治療についての研究も行われ始めた[4]。本邦では 2014 年に抗 PD-1 抗体が保険適応となり、次世代の免疫治療の発展が期待されるようになった。

以上から、放射線治療と免疫治療を併用することによって、照射により誘導される抗腫瘍免疫のさらなる活性化により、照射を受けた部位のみならず全身の転移巣の制御までも対象にした、効率的ながん治療が確立されると考えた。実際にそれまで、放射線治療による抗腫瘍免疫の活性化についてのトランスレーショナル研究をおこなってきた。具体的には、2012 年に食道癌患者の血清をもちいて、化学療法同時併用の X 線治療が末梢血中の CTL を増加させること[5]、マウス同種腫瘍移植モデルにおいて、X 線による腫瘍縮小効果に CD8 陽性 T 細胞が関わること、ならびに CTLA-4 阻害による CTL の活性化が、X 線照射による腫瘍縮小効果を増強すること[6]、直腸癌組織検体を用いて、温熱療法・化学療法・X 線治療の同時併用が腫瘍細胞表面上の HLA class I 発現を誘導することを報告していた[7]。このように、自身の研究を含めて X 線治療による抗腫瘍免疫活性化効果が明らかにされつつあったが、一方で炭素イオン線治療における抗腫瘍免疫の活性化効果については全く未解明であった。

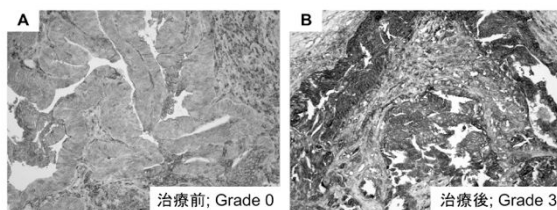


Figure 1: 同一患者での、温熱療法・化学療法・X線照射による腫瘍細胞表面の HLA class I 発現誘導[7]

### 2. 研究の目的

近年の腫瘍免疫学の発展に伴い、X線を用いた放射線治療の抗腫瘍効果において、抗腫瘍免疫の活性化が重要な役割を担っていることが注目を集めている。放射線治療のうち、炭素イオン線は、X線と比較して高い線量集中性と殺細胞効果を有し、様々な X 線抵抗性

がん種に対して優れた局所制御効果を示す。しかし、炭素イオン線治療が抗腫瘍免疫に与える影響については未解明である。

そのため、マウス同種腫瘍移植片モデルにおいて、炭素イオン線照射により誘導される抗腫瘍免疫反応の特性を明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

C57BL/6 マウスに、1 匹あたり  $2 \times 10^5$  個のマウスリンパ腫細胞株(EG7)を移植し、10日後に10Gy炭素イオン線照射をおこなった(A群)。照射前、および照射の3時間後、12時間後、24時間後、72時間後の血液中の high mobility group box 1:HMGB1 を、ELIZA 法にて測定した。さらに、照射前、および照射の3日後、14日後、28日後に脾臓を摘出し、EG7 と共培養することで、EG7 に特異的に反応する T 細胞の活性を、IFN $\gamma$  の ELISPOT assay にて測定した。比較群として、「腫瘍なし / 照射あり」群(B群)、「腫瘍あり / 照射なし」群(C群)を設定した。

### 4. 研究成果

#### (1) 炭素イオン線照射後の HMGB1 変化

A 群での HMGB1 中央値は、照射前、照射後 3 時間、12 時間、24 時間、72 時間でそれぞれ  $9.6 \pm 6.8$  ng/ml,  $115.9 \pm 50.1$  ng/ml,  $136.4 \pm 81.4$  ng/ml,  $10.2 \pm 1.7$  ng/ml,  $24.9 \pm 27.5$  ng/ml であった (Figure 1)。照射前と比較し、照射から 3 時間後および 12 時間後の値は有意に高値であった。各群での比較では、照射後 12 時間の HMGB1 中央値は A 群、B 群、C 群でそれぞれ  $136.4 \pm 81.4$  ng/ml,  $11.5 \pm 6.5$  ng/ml,  $13.6 \pm 6.0$  ng/ml であった。A 群と比較し、B 群と C 群では各時系列にて HMGB1 値の有意な上昇を認めなかった。

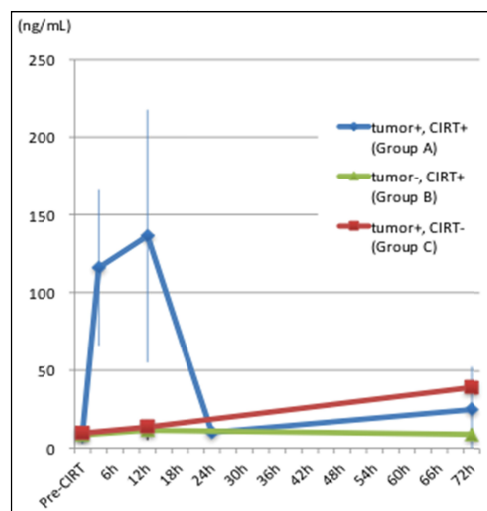
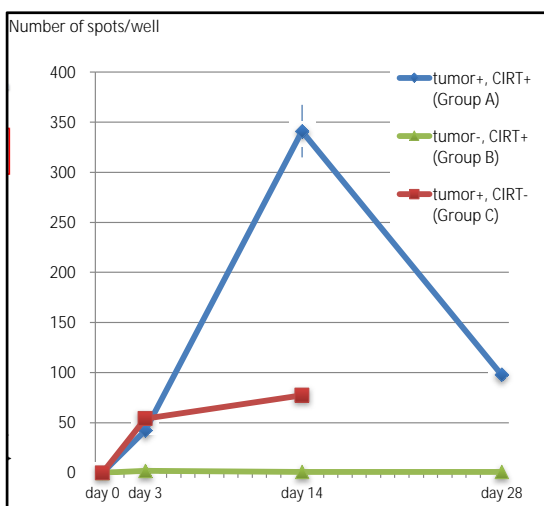


Figure 2: 炭素イオン線照射後の HMGB1 値の経時的変化

#### (2) 炭素イオン線照射後の T 細胞活性

Elispot assay の結果、A 群と C 群で、照射後 14 日目にスポット数が最大となった。A 群では、照射後 28 日目には照射前と同程度まで低下した。C 群では、全個体が 28 日目までに死亡したため、14 日目以降のデータを得られなかった。B 群では、どの時点でもスポット数の変化を認めなかった。照射後 14 日目のスポット数の中央値は、それぞれ  $341 \pm 26$ 、 $1 \pm 1$ 、 $77 \pm 4$  であり、A 群のスポット数が、B 群および C 群のスポット数よりも有意に高かった (Figure 2)。



**Figure 3: 炭素イオン線照射後の IFN $\gamma$  スポット数の経時的変化**

以上の結果から、リンパ腫移植マウスへの炭素イオン線照射が、HMGB1 の放出を誘導すること、また腫瘍特異的 T リンパ球を増加させることが明らかになった。

HMGB1 は、放射線照射によって死亡した細胞から放出される damage-associated molecular pattern (DAMPs) の一種であり、toll like receptor (TLRs) との反応を介して抗原提示細胞を活性化させる。HMGB1 の刺激により活性化した抗原提示細胞は、腫瘍特異的細胞障害性 T 細胞の増殖と活性化を誘導する。そのため、本研究の結果から、炭素イオン線照射による腫瘍細胞死が、その腫瘍細胞特異的 T 細胞の活性化を促す可能性が明らかになった。

本研究の結果を受け、今後の課題としては炭素イオン線照射による HMGB1 放出と T 細胞の活性化について、X 線照射による反応と比較し優位性を持つかどうか、また腫瘍組織を摘出し腫瘍細胞あるいは腫瘍周囲環境における組織的解析を検討していく。

< 引用文献 >

[1] Takeshima T, et al. Cancer Res 70: 2697-2706. (2010)  
 [2] Ogino T, et al. Clin Cancer Res 9: 4043-4051. (2003)  
 [3] Ogino T, et al. Cancer Res 66:

9281-9289. (2006)  
 [4] Formenti SC, et al. J Natl Cancer Inst 105: 256-265. (2013)  
 [5] Suzuki Y, et al. Cancer Res 72: 3967-3976. (2012)  
 [6] Yoshimoto Y, et al. PLoS One 9: e92572. (2014)  
 [7] Sato H, et al. PLoS One 9: e108122. (2014)

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 0 件)

[学会発表](計 1 件)

学会名 :  
 ASTRO's 58th Annual Meeting  
 開催場所 :  
 Boston, Massachusetts, United States of America.  
 会期 :  
 2016 年 9 月 25 日 ~ 9 月 28 日  
 演題名 :  
 Changes in high mobility group box 1 (HMGB1) levels and T cell activity after carbon-ion radiotherapy in vivo.  
 発表者 :  
 Yoshiyuki Suzuki, Hiro Sato, Noriyuki Okonogi, Yuya Yoshimoto, Ken Ando, Masahiro Ohnishi, Hiroto Murata, Takashi Nakano

出願状況 (計 0 件)

名称 :  
 発明者 :  
 権利者 :  
 種類 :  
 番号 :  
 出願年月日 :  
 国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :  
 発明者 :  
 権利者 :  
 種類 :  
 番号 :  
 取得年月日 :  
 国内外の別 :

[その他]  
 ホームページ等  
 該当なし

6. 研究組織

(1)研究代表者  
佐藤 浩央 (Sato Hiro)  
群馬大学医学部附属病院 放射線科 医  
員  
研究者番号：90750571

(2)研究分担者  
( )

研究者番号：

(3)連携研究者  
( )

研究者番号：

(4)研究協力者  
( )