

令和 2 年 5 月 28 日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15555

研究課題名(和文) リキッドバイオプシーを用いた腫瘍免疫能と放射線治療の解析

研究課題名(英文) Analysis of tumor immunity and radiotherapy using liquid biopsy

研究代表者

土屋 高旭 (Tsuchiya, Takaaki)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：90631169

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では子宮頸癌患者において、放射線治療によって引き起こされる腫瘍免疫関連タンパク発現の変化を評価し、またそれらのタンパクと予後の関連を検討した。方法として、子宮頸癌に対して術前放射線治療が行われた104例を対象に放射線治療前の生検検体と放射線治療後の手術検体を用いて、腫瘍免疫関連タンパクを免疫組織染色にて評価をおこなった。結果として、放射線治療により腫瘍における免疫学的な変化が引き起こされていること、またこれらの変化が放射線治療の結果に影響を与えていることが解明された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、腫瘍免疫機構が解明されつつあり、臨床においても免疫チェックポイント阻害薬が承認され効果が認められている。しかし、放射線治療と腫瘍免疫機構の関連については未解明の部分が多い。そこで、本研究では腫瘍免疫関連タンパクの発現と放射線治療成績の相関を解明し、臨床応用に結びつけることを目的とする。そのための方法として、本研究では治療開始前の生検検体および術後摘出標本を用いた、腫瘍免疫関連タンパクの免疫組織染色による放射線治療効果予測を行い、癌細胞の腫瘍免疫関連タンパクを用いた放射線感受性予測法の臨床応用と個別化放射線治療の実用化を目指す。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we evaluated the changes in tumor immune-related protein expression caused by radiotherapy in patients with cervical cancer and examined the association between these proteins and prognosis. In 104 patients with uterine cervical cancer treated with preoperative radiotherapy, we evaluated tumor immune-related proteins by immunohistochemistry using biopsy specimens before radiotherapy and surgical specimens after radiotherapy. The results show that radiotherapy causes immunological changes in tumors, and that these changes affect the outcome of radiotherapy.

研究分野：放射線治療

キーワード：腫瘍免疫 放射線治療 リキッドバイオプシー

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

放射線治療による抗腫瘍効果の本質は、X線が腫瘍細胞内のDNA損傷を起こし、それによりアポトーシスが誘導され間期死を起こす、またはDNA損傷の蓄積によって増殖期に細胞分裂がうまく行かず増殖死を起こす、のいずれか2つの経路がメインと考えられていた。ところが臨床ですべての腫瘍細胞を死滅させるだけの十分な線量を照射できなかった場合においても長期間の局所制御が得られるものや、照射野外にある腫瘍が縮小する現象(アブスコパル効果)がまれに観察される。よって従来考えられていたDNA損傷だけでなく、抗腫瘍効果には腫瘍免疫機構などが関連している可能性がある。

近年、腫瘍免疫機構のメカニズムが詳しく調べられ、腫瘍細胞がいかにして宿主の免疫細胞からの攻撃を避けて増殖、進行していくのか解明されつつある。腫瘍免疫に関わる主な経路としてはPD-L1(Programmed death ligand-1)タンパクが知られ、腫瘍細胞表面のPD-L1発現量が多いと免疫逃避機構が強く働き、なおかつ放射線治療抵抗性の原因となる事が知られている。また、免疫細胞であるCD8陽性のTリンパ細胞が腫瘍内に多く浸潤している場合には放射線治療効果が良好である事も報告されており、この両面から放射線治療の効果予測に関連する研究が行われている。

つまり放射線治療に対する抗腫瘍効果は、従来の放射線治療によるDNA損傷修復の観点に加えて、放射線治療による腫瘍免疫機構の応答についても積極的に研究が進められている。これまで我々のグループでは、DNA修復に関わるタンパク発現(DNA-PKcs, Ku70, XRCC4など)を免疫染色し、解析する事で、複数のがん種に対して放射線治療効果予測が可能である事を報告してきたが、今回は腫瘍免疫にテーマを当てて治療効果予測の研究を進める事とした。

### 2. 研究の目的

本研究では腫瘍免疫関連タンパクの発現と放射線治療成績の相関を解明し、臨床応用に結びつけることを目的とする。具体的には、(1) 治療開始前の生検検体および術後摘出標本を用いた、腫瘍免疫関連タンパクの免疫組織染色による放射線治療効果予測、(2) 血中のPDL1(Programmed death ligand-1)測定による腫瘍免疫応答の解析、(3) 腫瘍免疫の制御に関わる血中マイクロRNAの同定を行い、癌細胞の腫瘍免疫関連タンパクを用いた放射線感受性予測法の臨床応用と個別化放射線治療の実用化を目指す。

### 3. 研究の方法

(1) 治療開始前の生検検体および術後摘出標本を用いた、腫瘍免疫関連タンパクの免疫組織染色による放射線治療効果予測

子宮頸がんの治療開始前の生検標本および術後摘出標本を用いて、腫瘍免疫に関わるタンパクであるPD-L1、PD-1、HLA-1、CD8、FoxP3などの発現を免疫組織染色で検討し、放射線治療成績との相関関係を解析することを目的とする。

これまでの我々の施設において、2005~2016年にかけて放射線治療を行った中咽頭がん患者の約90例において、生検検体を抗PD-L1抗体および抗CD8抗体を用いて染色した。その結果、腫瘍内に浸潤するPD-L1およびCD8陽性細胞の割合が高いほど、有意に無再発生存率が高いとする結果が得られている(Radiother Oncol. 2018 Nov;129(2):409-414.)。今回の研究ではPD-L1に限らず腫瘍免疫を担う複数のタンパクを実臨床の検体で染色を行うことで、腫瘍免疫機構を腫瘍細胞と免疫細胞の両面から評価が可能である。

この研究では対象は当院で2000年から2011年にかけて子宮頸癌に対して術前放射線治療が行われた104例とした。本研究では放射線治療または化学放射線治療による腫瘍免疫に関連する各種タンパク質の発現変化と腫瘍浸潤性CD8+T細胞(細胞傷害性T細胞)の変化を、放射線前の生検標本と放射線後の切除標本を対にした免疫組織化学的解析により評価した。CD8+T細胞に加えて、腫瘍組織におけるprogrammed death ligand 1(PD-L1)、programmed death 1(PD-1)、ヒト白血球抗原クラスI(HLA-1)、Forkhead box P3(FoxP3)の発現を調べた。また、放射線照射前の生検標本や放射線照射後の切除標本における免疫組織化学的所見が子宮頸がんの治療成績と関連しているかどうかを調べた。

(2) 血中のPD-L1(Programmed death ligand-1)測定による腫瘍免疫応答の解析

放射線治療効果を予測する場合、照射する部位の腫瘍細胞を直接生検し、腫瘍免疫関連タンパク発現を評価するのが理想であるが、部位によっては生検が困難であり、また生検できても量が少ないことが多い。その他、腫瘍内のクローン不均一性のために生検部位の腫瘍が全体の性質を反映していない可能性もある。また、臨床現場で施行可能な検査法を確立するのが本研究の目標でもあるので、採取が容易な血中に遊離する腫瘍免疫関連タンパクを測定し、腫瘍細胞を用いた免疫染色の結果と相関する事を確認する。

対象は2014~2018年にかけて当施設で子宮頸がんに対して根治的放射線治療を行った50例とし、放射線治療開始前と放射線治療最終日に採取した血液から血中の可溶性PD-L1濃度をELISA法により測定した。

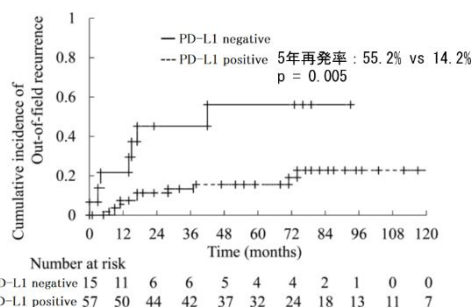
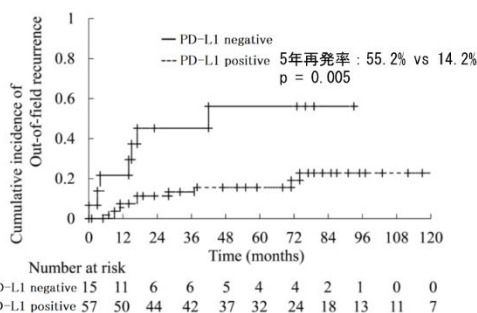
### (3) 腫瘍免疫の制御に関わる血中マイクロ RNA の同定

これまでに非小細胞肺癌や口腔がんなどで、腫瘍免疫の調整に、血中に存在するマイクロ RNA が関わっていると報告がある (Fujita, 2015; Ahn, 2017)。これを応用し、当施設で 2014 ~ 2018 年にかけて子宮頸癌に対して根治的放射線治療を行った 50 例を対象とし、放射線治療前に採取した血漿中のエクソソーム由来マイクロ RNA を QIAGEN 社 exoRNeasy kit を用いて抽出した。

## 4. 研究成果

### (1) 治療開始前の生検検体および術後摘出標本を用いた、腫瘍免疫関連タンパクの免疫組織染色による放射線治療効果予測

PD-L1 発現腫瘍細胞は化学放射線療法後に有意に増加した。CD8+T 細胞浸潤および FoxP3+T 細胞浸潤は化学放射線療法後に有意に減少した。PD-1、PD-L1 発現免疫細胞、または HLA-1 の発現は化学放射線療法後に変化しなかった。化学放射線療法または放射線療法前に得られた生検標本では、CD8+ T 細胞および FoxP3+ T 細胞の浸潤が多いことは、全生存期間 (OS) の改善の有意な予測因子であった。化学放射線療法または放射線療法後に得られた手術標本では、PD-L1 陽性腫瘍細胞が多いことが唯一の OS 改善の有意な予測因子であり、照射野外再発の確率が有意に低いことと関連していた。



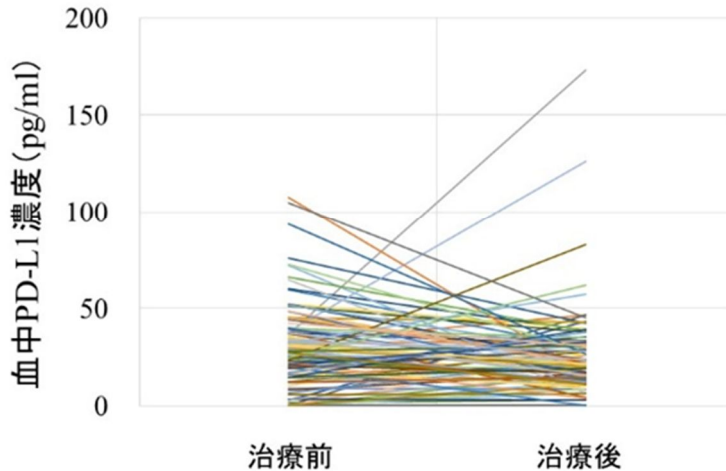
- 放射線治療後のPD-L1発現腫瘍細胞陽性群は陰性群と比較して有意に照射野外再発が少なかった。
- 放射線治療後のPD-L1発現腫瘍細胞陽性群は陰性群と比較して有意に照射野外再発が少なかった。

結論として、化学放射線療法は PD-L1 発現腫瘍細胞を増加させる免疫学的変化を誘導したと、化学放射線療法は子宮頸がんの治療成績に影響を与える免疫学的効果を有することが明らかとなった。この結果は *Strahlentherapie und Onkologie* 誌に投稿し受理・掲載された (Strahlenther Onkol. 2020 Jan 17. doi: 10.1007/s00066-019-01571-1. [Epub ahead of print])

### (2) 血中の PD-L1(Programmed death ligand-1)測定による腫瘍免疫応答の解析

血中の可溶性 PD-L1 濃度を ELISA 法により測定した。結果としては患者によって、治療前に比べて血中濃度が上昇したものが 5 例、低下したものが 10 例、ほぼ不変であったものが 35 例であった。

放射線治療前後の血中PD-L1濃度変化



次に治療効果との関連を調べた。放射線治療によって局所制御が得られた36例と、腫瘍残存・再発が見られた14例に分けて解析を行ったが、治療前後の血中濃度や、血中濃度の変化といったパラメーターと治療成績が相関する結果は得られなかった。また、治療前の腫瘍検体のPD-L1発現強度と血中濃度との相関も見られず、血中濃度を測定する事によって治療効果や、腫瘍免疫の変化を予測する事は困難であると考えられた。

### (3) 腫瘍免疫の制御に関わる血中マイクロRNAの同定

2014～2018年にかけて子宮頸癌に対して根治的放射線治療を行った50例を対象とし、放射線治療前に採取した血漿中のエクソソーム由来マイクロRNAをQIAGEN社exoRNeasy kitを用いて抽出した。局所制御が得られた9例と遠隔再発が見られた9例の合計18例を代表サンプルとして、次世代シーケンサーを用いてRNAseqを行い、遠隔再発に関わると予想される複数のマイクロRNA発現パターンの抽出に成功している(未発表データ)。全例サンプルを用い、RT-PCR法でのvalidationを行う事と、腫瘍免疫タンパク発現に関わるマイクロRNA発現の同定をするため、引き続き解析を今後も継続していく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4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 Tsuchiya Takaaki, Someya Masanori, Takada Yu, Hasegawa Tomokazu, Kitagawa Mio, Fukushima Yuki, Gocho Toshio, Hori Masakazu, Nakata Kensei, Hirohashi Yoshihiko, Torigoe Toshihiko, Saito Tsuyoshi, Sakata Koh-ichi	4. 巻 -
2. 論文標題 Association between radiotherapy-induced alteration of programmed death ligand?1 and survival in patients with uterine cervical cancer undergoing preoperative radiotherapy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Strahlentherapie und Onkologie	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） 10.1007/s00066-019-01571-1	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 Gocho Toshio, Hori Masakazu, Fukushima Yuuki, Someya Masanori, Kitagawa Mio, Hasegawa Tomokazu, Tsuchiya Takaaki, Hareyama Masato, Takagi Masaru, Hashimoto Kohei, Masumori Naoya, Sakata Koh-ichi	4. 巻 19
2. 論文標題 Evaluation of the urethral / ratio and tissue repair half-time for iodine-125 prostate brachytherapy with or without supplemental external beam radiotherapy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Brachytherapy	6. 最初と最後の頁 290 ~ 297
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.brachy.2020.02.007	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 Someya Masanori, Hasegawa Tomokazu, Tsuchiya Takaaki, Kitagawa Mio, Gocho Toshio, Fukushima Yuuki, Hori Masakazu, Miura Katsutoshi, Takada Yu, Nakata Kensei, Sakata Koh-ichi	4. 巻 61
2. 論文標題 Retrospective DVH analysis of point A based intracavitary brachytherapy for uterine cervical cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Radiation Research	6. 最初と最後の頁 265 ~ 274
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jrr/rrz099	査読の有無 無
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 Fukushima Yuki, Someya Masanori, Nakata Kensei, Hori Masakazu, Kitagawa Mio, Hasegawa Tomokazu, Tsuchiya Takaaki, Gocho Toshio, Ikeda Hikaru, Hirohashi Yoshihiko, Torigoe Toshihiko, Sugita Shintaro, Hasegawa Tadashi, Himi Tetsuo, Sakata Koh-ichi	4. 巻 129
2. 論文標題 Influence of PD-L1 expression in immune cells on the response to radiation therapy in patients with oropharyngeal squamous cell carcinoma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Radiotherapy and Oncology	6. 最初と最後の頁 409 ~ 414
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.radonc.2018.08.023	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 Kato Junji, Hida Tokimasa, Someya Masanori, Sato Sayuri, Sawada Masahide, Horimoto Kohei, Fujioka Mao, Minowa Tomoyuki, Matsui Yoshiyuki, Tsuchiya Takaaki, Kitagawa Mio, Nakata Kensei, Sakata Koh ichi, Torigoe Toshihiko, Uhara Hisashi	4. 巻 46
2. 論文標題 Efficacy of combined radiotherapy and anti programmed death 1 therapy in acral and mucosal melanoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Dermatology	6. 最初と最後の頁 328 ~ 333
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1346-8138.14805	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4件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 土屋高旭、染谷正則、長谷川智一、北川未央、福島悠希、堀正和、高田優、中田健生、後町俊夫、廣橋良彦、鳥越俊彦、坂田耕一
2. 発表標題 子宮頸癌術前照射症例を用いた放射線治療による腫瘍免疫の変化と予後の関連の検討
3. 学会等名 日本放射線腫瘍学会第32回学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 染谷 正則、土屋 高旭、福島 悠希、長谷川 智一、北川 未央、後町 敏夫、堀 正和、坂田 耕一
2. 発表標題 根治的放射線治療を行った進行子宮頸癌症例における腫瘍免疫と予後との関連
3. 学会等名 日本放射線腫瘍学会第32回学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 染谷 正則、土屋 高旭、坂田 耕一
2. 発表標題 子宮頸癌に対する根治的放射線治療の治療効果予測の試み
3. 学会等名 第13回Quantum Medicine研究会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 染谷 正則、長谷川 智一、土屋 高旭、福島 悠希、北川 未央、堀 正和、坂田 耕一
2. 発表標題 根治放射線治療を行った進行期子宮頸癌症例における腫瘍免疫と予後との関連
3. 学会等名 第79回日本医学放射線学会総会
4. 発表年 2020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
--	---------------------------	-----------------------	----