

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：12102
 研究種目：基盤研究(B)
 研究期間：2012～2014
 課題番号：24390287
 研究課題名(和文)陽子線のDNA損傷メカニズムと腫瘍免疫賦活効果を応用した新たながん治療法の研究

 研究課題名(英文)Novel approaches to cancer treatment based on DNA damage and tumor immunity activation induced by proton beam irradiation

 研究代表者
 坪井 康次(Tsuboi, Koji)

 筑波大学・医学医療系・教授

 研究者番号：90188615

 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,000,000円

研究成果の概要(和文)：1)炭素線は、照射後初期に陽子線やエックス線より有意に多くの「複雑なDNA損傷」を生成するが、時間経過とともに差はなくなり、SLGAが誘導される。
 2)選択的Cox2阻害剤であるcelecoxibは小胞体ストレス負荷により膠芽腫細胞の線感受性を有意に上昇させて、腫瘍細胞にオートファジーを誘導する。
 3)マウスモデルにおいて、局所的X線照射により始めに大腿皮下腫瘍が治癒すれば「アブスコパル効果」により、後から脳内へ腫瘍を移植しても拒絶されるが、再発した場合には逆に腫瘍免疫応答は大きく負に傾き、脳の腫瘍も増大する。

研究成果の概要(英文)：1) The “complex DNA damages” induced by irradiation make a significant impact on cell inactivation or transformation. Although complex DNA damage formation was dependent on radiation quality in the early phase after irradiation, senescence-like growth arrest was suggested to be the major cellular response in the later phase, regardless of radiation quality.
 2) A selective Cox-2 inhibitor “celecoxib” sensitized malignant brain tumor cells to gamma-rays by loading ER stress. The major modality of cell death induced was autophagy, suggesting that celecoxib is a promising candidate for radiosensitizing refractory malignant brain tumors.
 3) Local cancer radiotherapy may have an effect as an immune adjuvant. We found that a tumor-specific immune system was activated when the primary tumor was cured by irradiation. This “abscopal effect” was effective even in the brain. In contrast, primary tumor recurrence after irradiation resulted in suppression of tumor immunity.

研究分野：放射線生物学

キーワード：がん 陽子線治療 DNA損傷 化学療法 腫瘍免疫

1. 研究開始当初の背景と概要

(1) がん陽子線治療における生物学的研究課題

陽子線治療は、その極めて秀逸した線量集中性と生物学的特性から局所的がん治療の有力な手段として注目され、国内外で治療施設や治療患者数は増加しつつある。我々はがん陽子線治療の本格的臨床試験を 1983 年に開始し、以来、様々な臓器のがんや腫瘍に対する治療成績を報告してきたが、今後は難治性腫瘍に対する陽子線の治療効果をさらに向上させるために以下の二つの課題が重要である。

局所制御率を高めるために、分子・化学療法との併用効果を明らかにする。

「腫瘍微小環境」における陽子線照射の影響を明らかにし、腫瘍の再発や播種・遠隔転移を制御するための治療法を開発する。

(2) 粒子線照射によるクラスターDNA 損傷の解析、分子標的剤との併用効果

我々はこれまでにエックス線や粒子線の正常及び腫瘍細胞に対する生物学的効果を明らかにし、最近、高エネルギー陽子線はエックス線よりも腫瘍細胞に多くの DNA 二本鎖切断とアポトーシスを生じることが明らかにした。そこで本研究では、様々な種類の放射線(エックス線、陽子線、炭素線)により生じる「複雑な DNA 損傷」を分子イメージングで捉え、それを生物学的評価指標として、腫瘍細胞に対する各線源の効果を解析した。さらに、選択的 COX2 阻害剤である Celecoxib の線増感効果とそのメカニズムを検討した。

(3) 腫瘍微小環境における放射線照射の免疫学的効果

放射線治療による腫瘍治療過程には「腫瘍微小環境」における「腫瘍免疫応答」が深く関与しており、腫瘍の局所再発や遠隔転移に関わる重要なメカニズムと考えられている。我々は、放射線照射後には腫瘍細胞における腫瘍抗原提示分子とアポトーシス誘導分子の発現が亢進し、腫瘍免疫反応が促進されることを報告した。そこで本研究では、腫瘍に対する局所的な放射線照射により全身的ながん免疫賦活効果が得られるかどうかをマウスモデルにて検討した。

2. 研究の目的

本課題では、難治性の悪性腫瘍を克服するために、陽子線照射により局所の腫瘍細胞を根絶するとともに遠隔転移を防ぐ新たな治療を開発するための基礎的研究を行なう。

(1) 「複雑な DNA 損傷」を指標として炭素線

と陽子線の腫瘍細胞に対する DNA 損傷効果を評価し、エックス線との違いを明らかにする。

(2) Celecoxib の放射線増感効果とそのメカニズムを in vitro において明らかにする。

(3) 腫瘍に対する放射線治療後にその場に残留する腫瘍関連抗原をそのまま利用する「放射線+在所ワクチン療法」を実現するために、腫瘍に対する局所的放射線照射による全身的ながん免疫賦活効果をマウス腫瘍モデルにおいて明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 粒子線による DNA クラスター損傷の解析

培養腫瘍細胞を対象として炭素線、陽子線、エックス線を照射し、二重鎖切断(53BP1)、一重鎖切断(XRCC1)及び塩基損傷(OGG1)を可視化して定量化する。これらの損傷が重なった、「複雑な DNA 損傷」の生成とその回復過程について検討し、クロマチン構造との関連を明らかにする。

(2) 腫瘍細胞に対する Celecoxib の放射線増感作用

培養悪性脳腫瘍細胞を対象として、エックス線照射と選択的 COX2 阻害剤である Celecoxib の濃度を変えて併用し、その増感効果をコロニー形成法、増殖抑制効果から検討する。またそのメカニズムを免疫細胞化学染色、ウェスタンブロットにて検討する。

(3) 腫瘍微小環境における放射線照射の免疫学的効果

アルビノ C57BL/6 マウスに、蛍光蛋白発現する同系の悪性脳腫瘍細胞 GL261 を移植したモデルを対象とする。まず、大腿皮下腫瘍に対してエックス線照射し、その効果を見る。次に大腿皮下腫瘍エックス線を照射後、時間を置いて頭蓋内に同じ腫瘍細胞を移植し、それが拒絶されるかどうかを検討する。また、脾臓細胞からの IFN- γ の産生を ELISPOT assay により解析する。

4. 研究成果

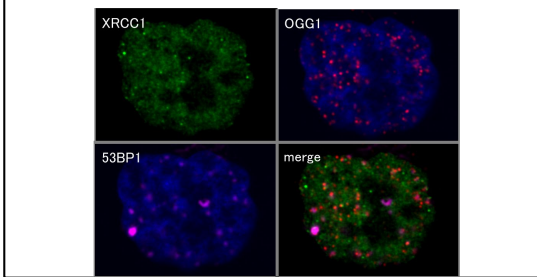
(1) 粒子線による DNA クラスター損傷の解析

様々な DNA 損傷のなかで、複雑な DNA 損傷は修復困難であり細胞死や発がんに要因となると考えられている。治療に用いられている陽子線や炭素線はこれら複雑な DNA 損傷を X 線よりも多く生じさせると考えられているが、その生成と細胞応答に関する詳細は不明である。

そこで、我々はヒト肉腫細胞株 HT1080 に対して X 線と陽子線照射後に hOGG1、

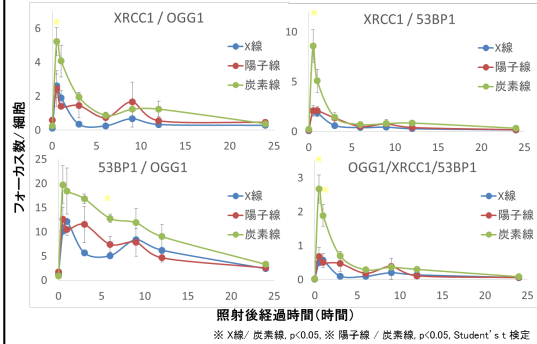
XRCC1, 53BP1 のフォーカスを可視化して、形成されるフォーカスの数と時間経過を検討するとともに、それらが重複する部位(クラスター損傷)を観察できるかどうかを検討した。その際、DNA一本鎖損傷を検出するXRCC1のフォーカスを観察することが困難であることから、EGFP-XRCC1を組み込んだプラスミッドをHT1080へ導入した細胞(HT1080 EGFP-XRCC1)を作製した。DNA塩基損傷を検出するhOGG1と二本鎖切断を検出する53BP1は免疫組織化学的にフォーカスを観察した(図-1)。共焦点顕微鏡の条件設定を行った後に、HT1080 EGFP-XRCC1に対して200MeV陽子線と130kVのX線を2Gy照射した。その結果、hOGG1、XRCC1のフォーカスの数はほぼ同様であったが、53BP1フォーカスはX線に比べて陽子線が多く観察された。また、照射後24時間で観察したクラスター損傷の数は現時点ではほぼ同程度であった。

図-1: DNA損傷の分子イメージングと「複雑なDNA損傷 (merge)」



さらに、同様にEGFPでtag付けしたXRCC1を安定発現する髄芽腫細胞株ONS76を樹立し(ONS76 EGFP-XRCC1)、この細胞に130keV X線、200MeV陽子線、290MeV炭素線を2Gy照射した。各DNA損傷を、XRCC1(単鎖切断)、53BP1(二重鎖切断)、OGG1(塩基損傷)の免疫細胞化学染色により可視化し、それらの数、重なりから「複雑なDNA損傷」を検出した。その結果、照射後30分では、炭素線照射は陽子線より有意に多くの複雑なDNA損傷を形成されたが、時間経過とともに減少し、24時間後には線源によるDNA損傷に差は見られなくなった(図-2)。何れの線源においても、時間経過とともに

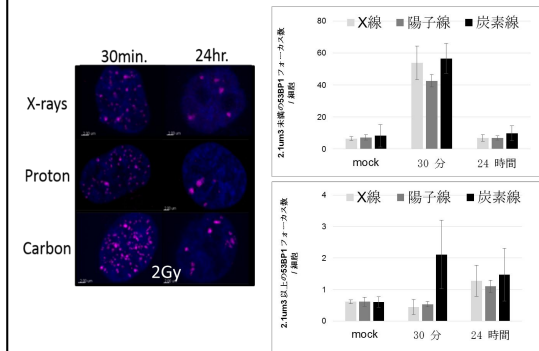
図-2: 複雑なDNA損傷(各フォーカス)の経時変化



に核内に巨大な53BP1 foci ($V > 2.1 \mu m^3$) が形成され増加した(図-3)。この巨

大な53BP1 fociは、heterochromatinのマーカであるH3K9me3のfociとは共存していないことから、おそらくeuchromatin領域に存在しており、senescent-like growth arrest (SLGA)を示唆する現象ではないかと考えられる。

図-3: 53BP1フォーカスのサイズと経時変化



(2) 悪性脳腫瘍細胞に対するCelecoxibのガンマ線増感作用

ヒト及びマウス髄芽腫細胞株(U87MG, U251MG, GL261)を常酸素あるいは低酸素状態で培養し、線照射と選択的COX2阻害剤であるCelecoxibの併用効果を検討した。その結果、コロニー生存解析では常酸素のみならず低酸素状態でもこれら髄芽腫細胞の線感受性を有意に上昇させ、増殖を遅延させた(図-4)。また、これらの併用により特に低酸素下では、腫瘍細胞にはオートファジーが誘導されることが明らかとなった(図-5)。また、そのメカニズムは髄芽腫細胞に対する強い小胞体ストレスの負荷であることが明らかとなった。

図-4: Celecoxibのγ線増感作用

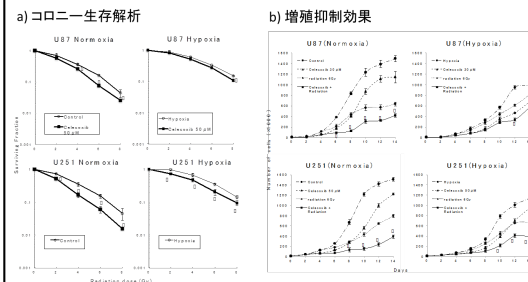
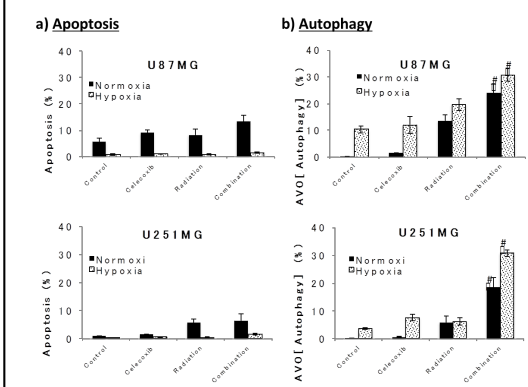


図-5: 放射線とCelecoxibの併用によるAutophagyの誘導



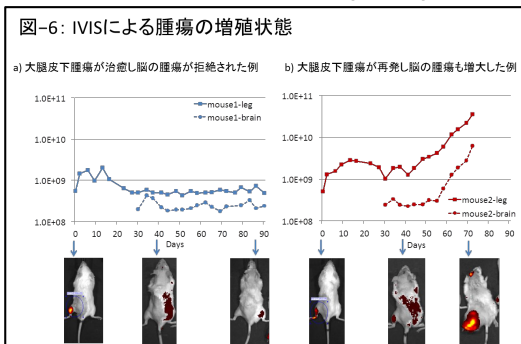
低酸素状態ではガンマ線等の低LET放

射線の効果は低くなり、腫瘍の放射線感受性は低下する。また、腫瘍幹様細胞も低酸素状態をいわゆるニッチとしていることが最近示唆されている。放射線とセレコキシブの併用によりこれら低酸素状態にある抵抗性腫瘍細胞にオートファジーを誘導できれば、臨床応用への可能性が示され、膠芽腫患者の予後の改善に貢献できる可能性が望める。

(3) 放射線照射による腫瘍免疫賦活効果の検討：

マウス悪性グリオーマ細胞 GL261 へ kusabira-orange 蛍光発現プラスミッドを導入し、長期間継代後も安定して蛍光を発するクローン (GL261-mKO) を樹立した。次にこの GL261-mKO を同系 C57BL/6 マウスの大腿皮下と頭蓋内に移植して、移植腫瘍の蛍光量を、蛍光検出装置 (IVIS) を用いて体外から測定し、蛍光量と実際の腫瘍の体積が相関することを確認した。

GL261-mKO を同系アルビノ C57BL/6 マウスの大腿皮下へ移植し、10 日目に X 線 20Gy を照射した。さらに 24 日後に GL261-mKO を脳内へ移植し IVIS にて腫瘍の増殖状態を観察した (図-6)。大腿



皮下腫瘍への照射により 16 匹中 8 匹では腫瘍は消失し、8 匹では再増大を示した。腫瘍が消失した 8 匹では全例で脳内へ移植された腫瘍は拒絶され長期間生存したが、増大を示した 8 例では全例で脳内でも腫瘍が増大して生存期間は有意に短くなり、この生存期間は脳に腫瘍を移植しただけのマウスよりも短くなった (図-7)。また、脳内の腫瘍を拒絶した個体では、ELISPOT アッセイで INF- γ が産生されていることが確認され、さらに腫瘍を移植した部位に CD8 陽性の CTL が浸潤していた (図-8)。

図-7: 生存解析

- 1) 大腿皮下腫瘍が治癒し脳内の腫瘍が拒絶された例
- 2) 大腿皮下腫瘍が再発し脳内の腫瘍も増殖した例
- 3) 脳への腫瘍移植例の比較

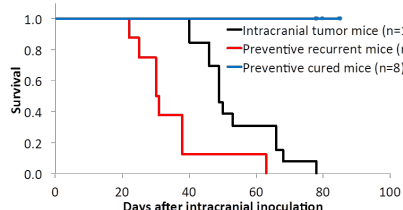
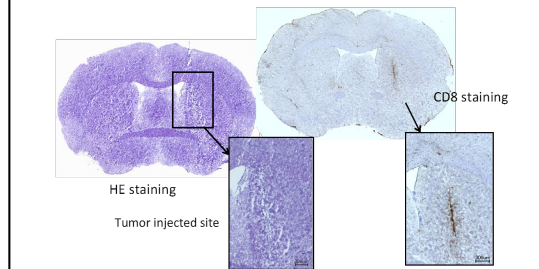


図-8: 腫瘍を移植した部位での CD8 陽性キラーリンパ球の浸潤



以上から X 線照射により大腿皮下腫瘍が治癒すると、脳内の腫瘍に対しても免疫応答細胞死が誘導されるが、一旦再発した場合にはむしろ腫瘍免疫応答は大きく負に傾くことが示唆された。脳内の腫瘍の拒絶は、腫瘍特異的細胞性免疫の賦活による「アブスコパル効果」によるものと考えられた。

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 11 件)

Gerelchuluun A, Manabe E, Ishikawa T, Sun L, Itoh K, Sakae T, Suzuki K, Hirayama R, Asaithamby A, Chen DJ, Tsuboi K. The Major DNA Repair Pathway after Both Proton and Carbon-Ion Radiation is NHEJ, but the HR Pathway is More Relevant in Carbon Ions. *Radiat Res.* 2015 Mar;183(3):345-356. doi: 10.1667/RR13904.1. 査読有

Mizumoto M, Yamamoto T, Takano S, Ishikawa E, Matsumura A, Ishikawa H, Okumura T, Sakurai H, Miyatake S, Tsuboi K. Long-term survival after treatment of glioblastoma multiforme with hyperfractionated concomitant boost proton beam therapy. *Pract Radiat Oncol.* 2015 Jan-Feb;5(1):e9-e16. doi: 10.1016/j.prro.2014.03.012. 査読有

Kanemoto A, Hirayama R, Moritake T, Furusawa Y, Sun L, Sakae T, Kuno A, Terunuma T, Yasuoka K, Mori Y, Tsuboi K, Sakurai H. RBE and OER within the spread-out Bragg peak for proton beam therapy: in vitro study at the Proton Medical Research Center at the University of Tsukuba. *J Radiat Res.* 2014 Sep;55(5):1028-32. doi: 10.1093/jrr/rru043. 査読有

Gerelchuluun A, Zhu J, Su F, Asaithamby A, Chen DJ, Tsuboi K. Homologous recombination pathway may play a major role in high-LET radiation-induced DNA double-strand

break repair. J Radiat Res. 2014 Mar 1;55 Suppl 1:i83-i84. doi: 10.1093/jrr/rrt181. 査読有

Abei M, Okumura T, Fukuda K, Hashimoto T, Araki M, Ishige K, Hyodo I, Kanemoto A, Numajiri H, Mizumoto M, Sakae T, Sakurai H, Zenkoh J, Ariungerel G, Sogo Y, Ito A, Ohno T, Tsuboi K. A phase I study on combined therapy with proton-beam radiotherapy and in situ tumor vaccination for locally advanced recurrent hepatocellular carcinoma. Radiat Oncol. 2013 Oct 16;8(1):239. doi: 10.1186/1748-717X-8-239. 査読有

Mizumoto M, Okumura T, Ishikawa E, Yamamoto T, Takano S, Matsumura A, Oshiro Y, Ishikawa H, Sakurai H, Tsuboi K. Reirradiation for recurrent malignant brain tumor with radiotherapy or proton beam therapy: Technical considerations based on experience at a single institution. Strahlenther Onkol. 2013 Aug;189(8):656-663. doi: 10.1007/s00066-013-0390-6. 査読有

Suzuki K, Gerelchuluun A, Hong Z, Sun L, Zenkoh J, Moritake T, Tsuboi K. Celecoxib enhances radiosensitivity of hypoxic glioblastoma cells through endoplasmic reticulum stress. Neuro Oncol. 2013 Sep;15(9):1186-99. doi: 10.1093/neuonc/not062. 査読有

Mizumoto M, Oshiro Y, Tsuboi K. Proton beam therapy for intracranial and skull base tumors. Transl Cancer Res 2013;2(2):87-96. <http://www.thetcr.org/article/view/1120>. 査読有

Sun L, Moritake T, Zheng YW, Suzuki K, Gerelchuluun A, Hong Z, Zenkoh J, Taniguchi H, Tsuboi K. In vitro stemness characterization of radio-resistant clones isolated from a medulloblastoma cell line ONS-76. J Radiat Res. 2013 Jan;54(1):61-9. doi: 10.1093/jrr/rrs078. 査読有

Hong Z, Kase Y, Moritake T, Gerelchuluun A, Sun L, Suzuki K, Terunuma T, Yasuoka K, Kumada H, Anzai K, Sakurai H, Sakae T, Tsuboi K. Lineal energy-based evaluation of oxidative DNA damage induced by proton beams and X-rays. Int J Radiat Biol. 2013 Jan;89(1):36-43. doi: 10.3109/09553002.2012.715791. 査読有

Tsuboi K. DNA-PK targeting virotherapy, a promising approach. Transl Cancer Res 2012;1(1): 2-3. doi: 10.3978/j.issn.2218-676X.2012.05.03. 査読有

〔学会発表〕(計 10 件)

坪井康次、鈴木健之、Gerelchuluun Ariungerel. シンポジウム 放射線による細胞死研究の新展開 ～細胞死につながる初期過程を考察する～ 日本放射線影響学会 第 57 回大会 2014.10.1-3 (2014.10.2) かがしま県民交流センター 鹿児島

真鍋絵梨, Ariungerel Gerelchuluun, 石川隆昭, 鈴木健之, Aroumougame Asaithamby, David J Chen, 坪井康次. 粒子線による DNA 二本鎖切断と修復機構. 日本放射線影響学会 第 57 回大会 2014.10.1-3 (2014.10.2) かがしま県民交流センター 鹿児島

Ariungerel Gerelchuluun、石川隆昭、真鍋絵梨、孫略、伊東和也、鈴木健之、善光純子、Aroumougame Asaithambi, David J Chen、坪井康次. Biological effectiveness of clinically used proton beam (治療用陽子線の生物学的効果). 日本放射線影響学会 第 57 回大会, 2014.10.1-3 かがしま県民交流センター 鹿児島

石川隆昭、Ariungerel Gerelchuluun、伊東一也、孫略、鈴木健之、真鍋絵梨、Asaithamby Aroumougame, David J Chen、坪井康次. 治療用陽子線と炭素線による複雑な DNA 損傷の形成と細胞応答 第 73 回日本癌学会学術総会、2014.9.25-27、パシフィコ横浜 神奈川

鈴木健之、ゲレルチュルンアリウンゲレル、洪正善、孫略、盛武敬、坪井康次. セレコキシブは、小胞体ストレスを負荷して低酸素下の膠芽腫細胞の放射線感受性を上げる. 第 19 回癌治療増感研究会、2013.6.8. 東京医科歯科大学 東京

石川隆昭、ゲレルチュルン アリウンゲレル、洪正善、孫略、鈴木健之、善光純子、盛武敬、Asaithamby Aroumougame, David J Chen、坪井康次. 治療用陽子線とエックス線による clustered DNA damage の形成. 第 72 回日本癌学会学術総会、2013.10.3-5、パシフィコ横浜 神奈川

孫略、伊東一也、鈴木健之、ゲレルチュルンアリウンゲレル、洪正善、盛武敬、坪井康次. 脳腫瘍幹細胞様クローンのミトコンドリア活性が放射線抵抗性に

及ぼす影響の解明. 日本放射線影響学会第56回大会. 2013.10.18-20. ホテルクラウンパレス青森 青森

Gerelchuluun A, Manabe E, Ishikawa T, Suzuki K, Hong Z, Sun L, Ito K, Manabe E, Zenkoh J, Sakae T, Moritake T, Asaithamby A, David JC, Tsuboi K. Clinical Proton beam induced DNA damage and its repair mechanism. 29th RBC-NIRS International Symposium、2013.11.28-29、コープ・イン・京都 京都

Gerelchuluun A, Zhu J, Su F, Asaithamby A, Chen DJ, Tsuboi K. Homologous Recombination Pathway play a Major role in High-LET Radiation Induced DNA Double-Strand Break Repair. Heavy Ion in Therapy and Space Radiation Symposium 2013, 2013.5.15-18、The Keiyo Bank Culture Plaza, Chiba

Zenkoh J, Gerelchuluun A, Hong Z, Suzuki K, Sun L, Ito K, Miwa Y, Tsuboi K. エックス線照射による腫瘍免疫応答的細胞死が脳内へ及ぼす影響. 第4回国際放射線神経生物学会大会 2014.1.17、高崎シティーギャラリー 群馬

6. 研究組織

(1)研究代表者

坪井 康次 (TSUBOI, KOJI)
筑波大学・医学医療系・教授
研究者番号：90188615

(2)研究分担者

榮 武二 (SAKAE, TAKEJI)
筑波大学・医学医療系・教授
研究者番号：60162278

熊田 博明 (KUMADA, HIROAKI)
筑波大学・医学医療系・准教授
研究者番号：30354913

盛武 敬 (MORITAKE, TAKASHI)
筑波大学・医学医療系・講師
研究者番号：50450432

橋本 孝之 (HASHIMOTO, TAKAYUKI)
筑波大学・医学医療系・講師
研究者番号：60400678

鈴木 健之 (SUZUKI, KENSHI)
筑波大学・医学医療系・助教
研究者番号：20726442

(3)連携研究者

伊藤 敦夫 (ITO, ATSUO)
産業技術総合研究所・ヒューマンライフテクノロジー研究部門・グループリーダー
研究者番号：30356480

大野 忠夫 (OHNO, TADAO)
日本歯科大学・生命歯学部・客員教授
研究者番号：90160580