

令和元年9月6日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05387

研究課題名(和文) DNA損傷と細胞死応答に基づく「がん陽子線・複合免疫療法」の開発

研究課題名(英文) Development of a fusion cancer treatment of local proton beam radiotherapy and systemic immunotherapy based on DNA damage and cell death response

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) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤SAHAの正常細胞と腫瘍細胞に対する陽子線増感効果を *in vitro* で検討した。SAHAは照射後に生じるDNAの相同組換え修復を阻害し、DNA 2本鎖切断を増加させた。増感効果は正常細胞よりもがん細胞で有意に大きく、がん選択的に放射線増感効果を示すことが示された。新規免疫アジュバントであるメソポーラスシリカナノ粒子(MS)の放射線照射後の腫瘍在soでの腫瘍免疫賦活効果を *in vivo* で検討した。大腿皮下腫瘍へのエックス線照射後にMSナノ粒子を局所投与した結果、腫瘍特異的免疫反応が賦活されて腫瘍の治癒率が向上し、脳にアブスコパル効果を誘導することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤SAHAは腫瘍細胞と正常細胞のDNA修復メカニズムの違いに基づく腫瘍選択的な増感効果が期待でき用法の拡大により固形悪性腫瘍に対する新たな放射線増感剤として期待できる。また、メソポーラスシリカナノ粒子は放射線照射後に放出される腫瘍溶解成分を吸着し全身的な腫瘍免疫賦活効果を賦活することから放射線治療後の再発や遠隔転移を防ぐことが可能であり、毒性も低く取り扱いが容易であることからその臨床応用が期待される。局所的放射線療法と全身的な免疫療法をお互いに補完しつつそれぞれの特徴を生かすことにより、原理的には腫瘍の種類を問わず適用可能な「放射線・複合免疫療法」が実現できる。

研究成果の概要(英文)：We examined how a HDAC inhibitor “suberoylanilide hydroxyamic acid (SAHA)” sensitizes the radiation effect on normal and tumor cells. As a result, SAHA inhibited the DNA homologous recombination repair, and increased the yield of DNA double strand breaks. These radio-sensitizing effects were significantly greater in tumor cells than in normal cells, indicating that SAHA may be able to sensitize cancer cells selectively after irradiation. We also examined whether a novel immune-adjuvant “mesoporous silica (MS)” nanoparticles could promote local tumor control and induce the abscopal effect using a mouse subcutaneous tumor model. As a result, intratumoral administration of MS after X-ray irradiation activated the systemic tumor-specific immune response, improving the local tumor control rate and enhancing the abscopal effect in the brain. In addition, it was confirmed that MS was not toxic in subcutaneous administration.

研究分野：放射線生物学

キーワード：放射線治療 ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 メソポーラスシリカ がん免疫療法 アブスコパル効果 放射線増感効果

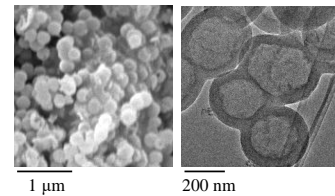
様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

我々はこれまでに様々な粒子線の生物効果を検討し、特に陽子線の生物学的特徴について報告してきた (Tsuboi K 2001, 2005, 2007, Gerelchuluun A 2011, 2014, Hong Z 2013)。一方、「ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤」は、Epigenetic に作用してクロマチン構造において主要な構成因子であるヒストンのアセチル化を促進し、クロマチン構造を弛緩させることで遺伝子の転写活性を上げる作用を持つことが報告されている (Minucci S 2006)。また、非相同末端結合 (NHEJ) を抑制し (Minucci S 2006) 腫瘍細胞にアポトーシスを誘導するが (Subramanian C 2011) この効果は正常組織では低くなることが示唆されていることから (Barazzuol L 2014) 陽子線との併用により相乗的な殺腫瘍細胞効果が期待できる。

一方でがん陽子線治療における大きな課題は、その局所性に基づく照射野外での再発や遠隔転移を防ぐ事である。近年、局所的放射線治療自体に、がん免疫反応を賦活するアジュバントとしての効果があることが明らかにされ (Krysko D 2012) 放射線治療の効果も腫瘍特異的な CTL を介して発揮されるという報告もある (Takashima T, 2010)。そのような背景から最近では、局所的放射線治療とがん免疫療法の併用効果には大きな期待が寄せられており (Formenti SC 2013, Frey B 2013, Abei M 2013) 我々も陽子線照射後の肝細胞がん組織内へ免疫アジュバントを直接投与する第 I 相臨床試験を行い、その安全性とともに一定の再発予防効果を示した (Abei M 2013)。そこで本課題では、さらに汎用性が高く無機系のバイオマテリアルとして注目されている「メソポーラスシリカ」ナノ粒子を免疫アジュバントとして用いてその効果を評価した。メソポーラスシリカナノ粒子は 2~50nm の均一で規則的な細孔 (メソ孔) を持つ二酸化ケイ素で (Fig. 1)、そのメソ気孔が高い吸着能を持ち、抗原のような巨大分子をも吸着把持することができる。フロイント不完全アジュバントと同程度の免疫刺激能を持つことが報告されている (Mercuri LP 2006)。

Fig. 1: Mesoporous Silica



## 2. 研究の目的

- 1) HDAC 阻害剤 Suberoylanilide Hydroxamic Acid (SAHA) の陽子線増感効果 : 腫瘍細胞の DNA 損傷修復を阻害し、増殖抑制とアポトーシスを誘導する作用を持つ HDAC 阻害剤 "SAHA" の正常細胞と腫瘍細胞に対する陽子線増感効果を明らかにする。
- 2) メソポーラスシリカの免疫アジュバント作用 : マウス皮下腫瘍モデルにおいて、陽子線照射部位へ「メソポーラスシリカ」ナノ粒子を局所的に投与することにより、局所制御とともに照射野外にチャレンジした腫瘍に対する「アブスコパル効果」が得られるかどうかを明らかにする。

## 3. 研究の方法

### 1) 研究対象

1. エックス線と陽子線の照射 : 細胞およびマウスを対象とした。マウスは専用の固定装置を用いてエックス線及び陽子線照射を実施した。
2. 細胞株 : マウス脳腫瘍細胞株 GL261、マウス悪性黒色腫細胞株 B16/BL6、ヒト肺がん細胞株 A549、正常線維芽細胞 AG1522 を研究対象として用いた。
3. マウス皮下蛍光蛋白発現腫瘍モデルと in vivo imaging system : GL261 細胞に kusabira-orange 蛍光蛋白質を安定的に高発現するマウス脳腫瘍細胞株「GL261-mKO」を

作製した。GL261-mKOを同系マウス(アルビノ C57BL/6)の大腿皮下へ移植して in vivo 蛍光イメージング装置 (IVIS) で腫瘍のサイズをモニターするシステムを用い、同じ細胞を脳内に移植し拒絶されるかどうかを検討した。

4. 「メソポーラスシリカ」ナノ粒子の作製：メソポーラスシリカナノ粒子を Wang らの方法で作製し(Wang X, 2013,2 報)、粒径を 2-3 段階に変化させて調製して用いた (Fig. 1)。

## 2) 研究方法

### 1. エックス線および陽子線照射により誘導される腫瘍免疫反応の検討

- 1) マウス悪性脳腫瘍細胞株 GL261、ヒト肺がん細胞株 A549 と正常線維芽細胞 AG1522 を対象として細胞の対数増殖期に、線量を変化させてエックス線、陽子線を照射し、生存解析を行った。
- 2) 照射後の細胞を経時的に固定し、照射後の各細胞における細胞死の出現を FACS にて検出し、同様に、細胞の MHC-1、PD - L1 の発現を FACS にて検出した。

### 2. SAHA の陽子線増感効果の検討

A549、AG1522 を対象として、HDAC 阻害剤である Suberoylanilide Hydroxamic Acid (SAHA)を、濃度を変化させて添加し、エックス線、陽子線を照射し増感効果を検討した。

### 3. メソポーラスシリカのアジュバント効果の検討

脳腫瘍蛍光蛋白発現細胞株 GL261-mKO をアルビノ C57BL/6 マウスの皮下に移植したモデルを対象として、コントロール群、照射単独群、照射 + メソポーラスシリカ群に群別し、群と群に対して 30Gy のエックス線または陽子線照射を行い、照射 + メソポーラスシリカ群に対しては、照射後に腫瘍内へメソポーラスシリカの安全量を 3 ~ 6 回局所投与した。IVIS で腫瘍サイズをモニターし、群における局所制御率と生存率を明らかにした。次に、皮下腫瘍への照射から一定期間後に同じ細胞を同所性となる脳内に移植し生着するか拒絶されるかを検討した。

## 4 . 研究成果

### 1 ) SAHA ( Suberoylanilide Hydroxamic

### Acid ) の放射線増感効果

ヒストン脱アセチル化酵素 SAHA の正常ヒト線維芽細胞 AG1522 および肺癌細胞株 A549 に対する放射線増感効果を検討した。放射線は、ガンマ線、陽子線および炭素イオン線を用いた。その結果、高い濃度の SAHA は A549 (肺がん細胞) に対するガンマ線、陽子線、および炭素イオンの放射線増感効果を示したが、AG1522 (正常線維芽細胞) に対しては増感効果を示さなかった。またこの増感効果はガンマ線 > 陽子線 > 炭素線の順で大きくなった (Fig.-2A,B)。

さらに SAHA の増感効果は低 LET の線と陽子線で顕著であり、特に G1 期

Fig. 2A: A549 (Cancer Cells)

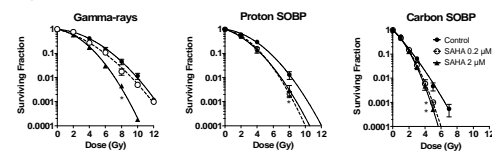


Fig. 2B: AG1522 (Normal Cells)

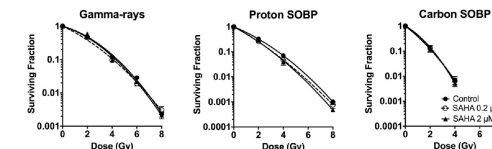


Fig. 3A: Rad51

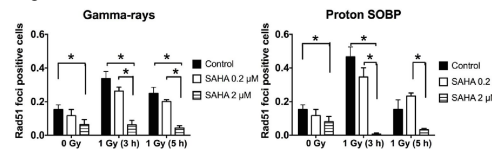
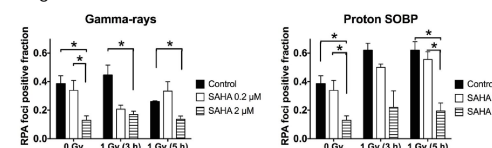


Fig. 3B: PARP



の細胞に対して放射線増感効果を示した。また、SAHAは照射後に生じるDNA 2本差切断マーカである $\gamma$ -H2AXを増加し、修復酵素であるRAD51およびRPAの発現を抑制したが、潜在的致死損傷修復は影響を受けなかった。がん細胞と正常細胞におけるSAHAの放射線増感作用の違いはこれらの修復機構の抑制の違いとともに、他のメカニズムの関与が示唆された。

このようにSAHAは正常細胞への影響を最小限に抑えつつがん選択的に放射線増感効果を示すことが示され、SAHAは陽子線との併用で最もその効果が見込めることが示された。

## 2) メソポーラスシリカのアジュバント効果

新規免疫アジュバントであるメソポーラスシリカナノ粒子が放射線照射による大腿皮下腫瘍の治癒を促進し、より効率的にアブスコパル効果を起こすかどうか検討した。GL261(マウス神経腫)細胞を同系C57BL/6マウス的大腿皮下に移植し、エックス線(16Gy)照射した後、メソポーラスシリカを局所投与して治癒効果を検討した(Fig. 4)。その結果、エックス線照射の後メソポーラスシリカを1週間おきに3回投与すると、腫瘍の増殖はエックス線照射単独より遅延する傾向が認められた(Protocol A)。さらにメソポーラスシリカを6回投与することにより(Protocol B,C)、有意な腫瘍増殖抑制効果と頭蓋内腫瘍の拒絶が認められた。メソポーラスシリカをエックス線照射と併用することにより、腫瘍の治癒率が向上し、脳におけるアブスコパル効果を増強させることが明らかとなった。

メソポーラスシリカナノ粒子の製造規格を設定し、非臨床試験に相当するマウスによる安全性試験を行った。その結果、HMSの皮下投与では、10-100mgでは有害事象は認められなかったが、200mgでは一過性の体重減少を認めた。一方、腹腔内投与では1mg以下では体重減少のみであったが、2mg以上ではHMSの沈着による腸管の機能不全によりマウスは死亡した。また、尾静脈内投与では、0.3mg以下では有害事象は認められなかったが、0.6-1.0mgではマウスの動作が緩慢となり、2mgではマウスは肺又は脳塞栓により死亡した。以上から皮下投与での安全性は確認できたが全身的な投与では投与量の増加に伴い重篤な有害事象が認められ、腫瘍内への局所投与のみが可能であるが、血管内へのHMSの迷入を避ける必要があることが示唆された。

Fig. 4: Treatment protocol

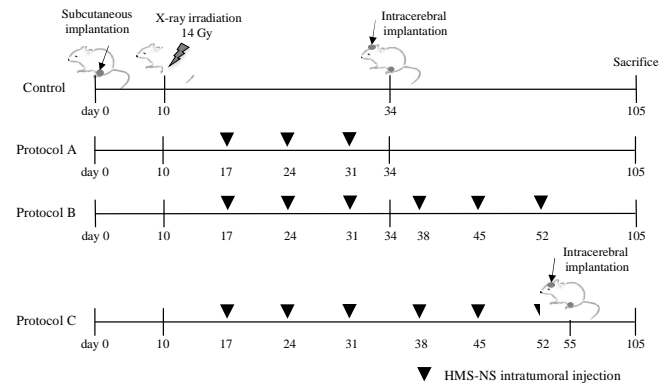


Fig. 5A: Local Control

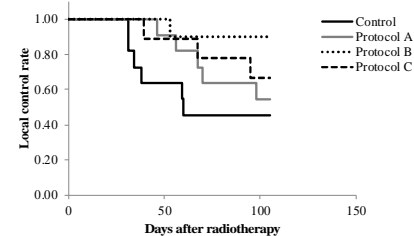
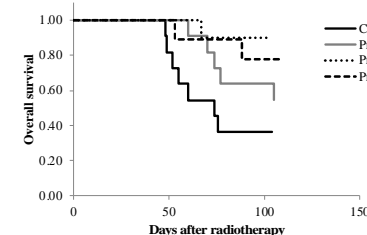


Fig. 5B: Overall Survival



1. Tsuboi K. Advantages and limitations in the use of combination therapies with charged particle radiation therapy. Int J Particle Ther. 122-132, 2018 査読あり
2. Wang Y, Zenkoh J, Gerelchuluun A, Sun L, Cai S, Li X, Tsuboi K. Administration of dendritic cells and anti-pd-1 antibody converts x-ray irradiated tumors into effective in situ vaccines. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 958-969, 2018 査読あり
3. Gerelchuluun A, Maeda J, ManabeE, Brents C, Sakae T, Fujimori A, Chen D, Tsuboi K, Kato T. Histone Deacetylase Inhibitor Induced Radiation Sensitization Effects on Human Cancer Cells after Photon and Hadron Radiation Exposure. Int J Mol Sci. 496, 2018 査読あり
4. Miyazaki T, Ishikawa E, Matsuda M, Akutsu H, Osuka S, Sakamoto N, Takano S, Yamamoto T, Tsuboi K, Matsumura A. Assessment of PD-1 positive cells on initial and secondary resected tumor specimens of newly diagnosed glioblastoma and its implications on patient outcome. J Neurooncol. 277-285, 2017 査読あり
5. Zenkoh J, Gerelchuluun A, Wang Y, Miwa Y, Ohno T, Tsuboi K. The abscopal effect induced by in situ-irradiated peripheral tumor cells in a murine GL261 brain tumor model. Transl Cancer Res. 136-148, 2017 査読あり

〔学会発表〕(計8件)

1. 坪井康次. 定位放射線治療に役立つ放射線生物学. 第27回定位放射線治療学会 2018
2. Yuzi Wang, Lue Sun, Songjie Cai, Xiaokang Li, Koji Tsuboi Effect of a combined treatment with iPS cells derived dendritic cells and proton beam irradiation in a murine subcutaneous melanoma model European Society for Medical Oncology (ESMO) 2018 (国際学会)
3. 坪井康次. 陽子線治療における基礎研究の必要性、特に併用療法について. 放射線影響学会キャッチアップセミナー2018
4. Yuzi Wang, Koji Tsuboi. A combined local treatment with anti-PD-1 antibody and bone-marrow derived DCs after X-ray irradiation to subcutaneous melanoma in a murine model. 第18回癌治療増感研究シンポジウム 2017
5. Yuzi Wang<sup>1</sup>, Lue Sun, Xiaokang Li, Koji Tsuboi. A combined local treatment with anti-PD-1 antibody and bone-marrow derived DCs after X-ray irradiation to subcutaneous melanoma in a murine model. American Society of Clinical Oncology (ASCO) Annual Meeting 2017 (国際学会)
6. 善光 純子、ゲレルチュルン・アリウンゲレル、王 禹滋、大野 忠夫、坪井 康次. 局所放射線照射と新規免疫アジュバント“メソポーラスシリカ”を融合したがん放射線免疫療法 第75回日本癌学会学術総会 2016
7. Wang Yuzi、Ariungerel Gerelchuluun、Junko Zenkoh、Xiaokang Li、Koji Tsuboi. Combination Treatment of Bone Marrow DCs and X-ray Irradiation in a Melanoma Mouse Model. 第75回日本癌学会学術総会 2016
8. 坪井 康次. がんに対する局所的物理療法と全身的免疫療法はお互いを補完するか? 日本ハイパーサーミア学会第33回大会 2016

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 1 件）

名称：メソポーラスシリカ粒子

発明者：王秀鵬、辻典子、吉行和子、十河友、伊藤敦夫、小菅勝典、大野忠夫、坪井康次、善光純子、ゲレルチュルン アリウンゲレル、山崎淳司

権利者：産業技術総合研究所、セルメディシン株式会社

種類：特許

番号：特願 2016-168752（出願番号）、特開 2017-048180（公開番号）

出願年：2016 年 8 月 31 日

国内外の別： 国内

取得状況（計 1 件）

名称：免疫刺激因子担持微粒子

発明者：王秀鵬、李霞、伊藤敦夫、十河友、大野 忠夫、坪井 康次、Gerelchuluun Ariungerel

権利者：産業技術総合研究所、セルメディシン株式会社

種類：特許

番号：特許第 5999639 号（特許登録番号）

取得年：2016/09/09

国内外の別： 国内

6. 研究組織

(1)研究分担者

1. 研究分担者氏名：榮 武二

ローマ字氏名：Sakae Takeji

所属研究機関名：筑波大学

部局名：医学医療系

職名：教授

研究者番号（8 桁）：60162278

2. 研究分担者氏名：伊藤 敦夫

ローマ字氏名：Itoh Atsuo

所属研究機関名：国立研究開発法人産業技術総合研究所

部局名：生命工学領域

職名：研究グループ長

研究者番号（8 桁）：30356480