

令和元年6月5日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07173

研究課題名(和文)放射線を利用した腫瘍免疫療法の効果予測法の開発

研究課題名(英文) Development of prediction of responder in cancer immunotherapy by using radiation

研究代表者

高橋 豊 (Takahashi, Yutaka)

大阪大学・医学系研究科・特任講師(常勤)

研究者番号：40353461

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では腫瘍免疫療法における、放射線の効果的な利用法を明らかにするとともに、放射線を用いて簡便な腫瘍免疫療法効果予測法を開発し、予測マーカーを同定することを目的として研究を行ってきた。その結果、両足に骨肉腫を接種する系を用い、免疫チェックポイント阻害剤とX線照射を同時併用することで高率に原発巣と転移巣の制御、アブスコパル効果が惹起されること明らかにした。さらに、X線だけでなく、重粒子線でも同様にT細胞の活性化が介在した免疫療法増強効果があることを解明した。以上のことから、放射線は免疫療法に適した併用療法であり、腫瘍の免疫環境の変化を起こしていることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

免疫チェックポイント阻害剤は遠隔転移を有する症例に対しても効果が得られているが、奏効率は依然と低く、高奏効率化と予測法の開発が求められている。私たちは、まず、X線、または重粒子線と免疫チェックポイント阻害剤を併用することで、奏効率の向上が得られるかどうかを骨肉腫マウスモデルを用い、骨肉腫細胞を両脚に移植し、片方のみに照射する系で研究した。その結果、放射線と抗PD-L1抗体と抗CTLA-4抗体を併用することで、照射腫瘍のみならず、照射野外の腫瘍に対しても高率に抗腫瘍効果が得られ、有意に生存が延長し、腫瘍免疫環境も変化していた。本研究は放射線と免疫療法の併用の臨床利用の合理性を与えるものである。

研究成果の概要(英文)：Immune checkpoint inhibitor has been playing an important role in controlling metastatic tumors. However, only limited patients experience durable response. Therefore development of strategy to increase the responder and exploring biomarker to predict the responder is an urgent issue. The purpose of this study was to investigate whether use of various radiation including X-ray and particle beam combined with dual immune checkpoint blockade (Anti-PD-L1 and anti-CTLA-4 antibodies: P1C4) contribute to the control of tumors out-side radiation field, and addition of radiation to immune checkpoint blockade alters immune micro environment. We found that both X-ray and carbon ion irradiation enhanced the efficacy of P1C4 both for irradiated tumors and tumors out-of-radiation field with the increase of CD8 to Treg ratio. Although further study is necessary, tumor microenvironment analysis after radiation therapy might be useful to predict responder for immune checkpoint blockade therapy.

研究分野：Radiation biology

キーワード：放射線 重粒子線 腫瘍免疫 アブスコパル効果

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

1. 研究開始当初の背景

抗腫瘍免疫に中心的役割を果たす T 細胞上に発現する PD-1 や CTLA-4 は腫瘍免疫にブレーキをかける役割を果たしている。これらをブロックする免疫チェックポイント阻害剤の出現により、腫瘍免疫療法は画期的なブレークスルーをあげているが、奏効の高確率化は重要な課題である。近年、放射線治療はがんの局所治療に重要な役割を果たすだけでなく、非照射領域に対しても抗腫瘍効果を引き起こすアブスコパル効果を惹起することが明らかになり、腫瘍免疫療法との併用が有効である可能性が示唆されている (Victor, et al. *Nature* 520, 2015)。しかし、放射線がどのような症例で腫瘍免疫療法における奏効率向上に寄与するかは十分に解明されていなかった。

2. 研究の目的

本研究では腫瘍免疫療法における放射線の効果的な利用法を明らかにするとともに、放射線を用いた簡便な腫瘍免疫放射線療法効果予測法を開発し、効果予測マーカーを同定することを目的として研究を行ってきた。

3. 研究の方法

(1) 骨肉腫に対する X 線と 2 種類の免疫チェックポイント阻害剤 (抗 PD-L1 抗体と抗 CTLA-4 抗体: P1C4) の併用効果

マウス骨肉腫細胞 LM8 を C3H マウスの両脚に移植し、P1C4 を腫瘍移植後 9、12、15 日目に、片脚の腫瘍のみに、X 線を 12 日目に照射した。照射腫瘍、非照射腫瘍の腫瘍増殖、遠隔転移、生存、非照射腫瘍の免疫環境を解析した。

(2) 骨肉腫に対する重粒子線 (炭素線) と 2 種類の免疫チェックポイント阻害剤 (抗 PD-L1 抗体と抗 CTLA-4 抗体: P1C4) の併用効果

X 線実験と同様にマウス骨肉腫細胞 LM8 を C3H マウスの両脚に移植し、P1C4 を腫瘍移植後 9、12、15 日目に、片脚の腫瘍のみに、290MeV 炭素線で 6 cm Spread-out Bragg Peak 中心に腫瘍が設置されるように設定を行い、12 日目に照射した。この時の炭素線の線エネルギー付与は約 50keV/ μm であった。照射腫瘍、非照射腫瘍の腫瘍増殖、遠隔転移、生存、非照射腫瘍の免疫環境を解析した。

4. 研究成果

(1) 骨肉腫に対する X 線と 2 種類の免疫チェックポイント阻害剤 (抗 PD-L1 抗体と抗 CTLA-4 抗体: P1C4) の併用効果

高転移性の骨肉腫マウスモデルを用い、X 線 10 Gy の単回照射と P1C4 の同時併用により、以下のことを明らかにしてきた (Takahashi Y et al. *PLoS One* 12 (12), 2017)。

P1C4 と X 線の併用により、高率に照射野外の腫瘍に対しても増殖遅延効果 (アブスコパル効果) が得られ、転移の抑制、生存率の延長が見出された。

併用療法によりアブスコパル効果の誘導された腫瘍内では CD8 と制御性 T 細胞の比 (CD8/Treg) が有意に増加していた。

腫瘍内の PD-L1 発現が抗 PD-L1 療法に対して奏効率と相関していることが報告されているが、X 線照射により、PD-L1 の発現が有意に増加していた。

以上のことから、X 線照射によって、腫瘍内の免疫環境が変化し、免疫療法の増強につながることを示唆された。

(2) 骨肉腫に対する炭素線と 2 種類の免疫チェックポイント阻害剤 (抗 PD-L1 抗体と抗 CTLA-4 抗体: P1C4) の併用効果

これまでに私たちは X 線 10 Gy 単回照射と P1C4 併用による抗腫瘍効果の研究を行ってきた経緯があるため、はじめに、*in vitro* 実験により、移植に用いる LM8 細胞のコロニーアッセイにより、等価な線量を算出した。その結果、290 MeV 炭素線の 6 cm SOBP 中心では、5.3 Gy であった。従って、*in vivo* 実験ではマウスの両脚に LM8 細胞を移植し、片側腫瘍のみに SOBP 中心で 5.3 Gy を照射して実験をおこなった。その結果、以下のことを明らかにした (Takahashi et al. *Oncotarget* 2019)。

In vitro 実験では照射 72 時間後に LM8 細胞上に抗 PD-L1 抗体の標的となる PD-L1 の発現が著明に増加していた。

炭素線に P1C4 を加えることにより、局所の著明な抗腫瘍効果が得られた。それに伴い、照射腫瘍で有意に殺細胞性 T 細胞 (CD8⁺ GzMB⁺) の集積が増加した。また、CD8/Treg 比も増加した。さらに、局所効果は CD8 抗体を加えることにより減弱したことから、免疫反応介在性の局所効果増強であることが示唆された。

非照射腫瘍に対しても炭素線と P1C4 の併用で相乗的な抗腫瘍効果が得られた。P1C4 では腫瘍の完全消失は 20% のマウスに得られたのに対し、併用群では 64% で得られた。

併用群では無治療群に比べ、殺細胞性 T 細胞およびヘルパー T 細胞が有意に増加していた。

また、アブスコパル効果は CD8 抗体の投与により減弱したことから、免疫反応介在性であることが示唆された。

併用群では強力な肺転移、肝転移抑制効果があり、生存も有意に増加した。

以上の結果はいずれも X 線と PIC4 の併用効果と同等であり、骨肉腫に対し、炭素線でも 2 種類免疫チェックポイント阻害剤との併用で優れた局所および遠隔効果が得られることを示したものである。

腫瘍への炭素線照射により、T 細胞の抗原提示を行う樹状細胞を活性化させる HMGB-1 の放出が増加していた。

本研究課題では X 線抵抗性である骨肉腫に対して、X 線、および炭素線で PIC4 との併用効果が得られることを明らかにしたが、免疫療法が効きにくいことが明らかにされている癌種等での検討までは進めることができなかった。また、末梢血を用いた効果の予測因子の解明までは至らず、今後さらなる研究を進めていきたいと考えている。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

1. Takahashi Y, Yasui T, Minami K, Tamari K, Hayashi K, Otani K, Seo Y, Isohashi F, Koizumi M, Ogawa K. Carbon ion irradiation enhances the antitumor efficacy of dual immune checkpoint blockade therapy both for local and distant sites in murine osteosarcoma, *Oncotarget* 10 (6), 633-646, 2019.

査読あり

2. Takahashi Y, Yasui T, Tamari K, Minami K, Otani K, Isohashi F, Seo Y, Kambe R, Koizumi M, Ogawa K. Radiation enhanced the local and distant antitumor efficacy in dual immune checkpoint blockade therapy in osteosarcoma. *PLoS One* 2017, 12(12):e0189697. 査読あり

3. Takahashi Y, Yasui T, Minami K, Tamari K, Otani K, Seo Y, Isohashi F, Koizumi M, Ogawa K. Radiation enhances the efficacy of antitumor immunotherapy with an immunocomplex of Interleukin-2 and its monoclonal antibody. *Anticancer Res* 2017, 37;6799-6806. 査読あり

〔学会発表〕(計 7 件)

1 . 武中涉、高橋豊、小川和彦、小泉雅彦. 骨肉腫に対する放射線治療と免疫チェックポイント阻害剤の最適な併用法の探索. 第 21 回菅原・大西記念癌治療増感シンポジウム in 奈良 (2019 年 2 月 3 日、奈良)

2 . Yutaka Takahashi. Translational Research and Radiation Biology. Hokkaido Summer Institute 2018 -Radiation Biology School-, August 3, 2018 (Sapporo)

3 . 安井智洋、高橋豊、皆巳和賢、玉利慶介、林和彦、大谷啓祐、瀬尾雄二、磯橋文明、小泉雅彦、小川和彦. 炭素イオン照射と二重免疫チェックポイント阻害剤による局所及び遠隔の抗腫瘍効果の向上. 第 20 回菅原・大西記念癌治療増感シンポジウム in 奈良 (2018 年 2 月 4 日、奈良)

4 . Tomohiro Yasui, Yutaka Takahashi, Keisuke Tamari, Kazumasa Minami, Keisuke Otani, Fumiaki Isohashi, Kazuhiko Ogawa, Masahiko Koizumi. Combination of carbon ion irradiation with dual immune checkpoint blockade therapy enhances local and distant antitumor efficacy. 1st International Cancer Research Symposium of Training Plan for Oncology Professionals, 2018 (Osaka)

5. Yutaka Takahashi, Tomohiro Yasui, Keisuke Tamari, Kazumasa Minami, Masahiko Koizumi, Yuji Seo, Fumiaki Isohashi, Keisuke Ohtani, Ryosuke Kambe, Kazuhiko Ogawa. Radiation combined with checkpoint blockades enhanced antitumor efficacy for osteosarcoma. AACR 2017 (Washington DC, USA)

6 . 高橋豊、安井智洋、玉利慶介、皆巳和賢、林和彦、大谷啓祐、瀬尾雄二、磯橋文明、小泉雅彦、小川和彦. 骨肉腫に対する放射線と 2 種類の免疫チェックポイント阻害剤の併用効果. 第 30 回日本放射線腫瘍学会 (2017 年 11 月、大阪)

7. Yutaka Takahashi, Tomohiro Yasui, Keisuke Tamari, Kazumasa Minami, Masahiko Koizumi, Yuji Seo, Fumiaki Isohashi, Keisuke Ohtani, Ryosuke Kambe, Kazuhiko Ogawa. Radiation effect on antitumor immunotherapy with an immunocomplex of Interleukin-2 and its monoclonal antibody. .第 46 回放射線による制癌シンポジウム (2017 年 6 月、名古屋)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
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：
国内外の別：

〔その他〕
なし

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：小川 和彦
ローマ字氏名：(Kazuhiko Ogawa)
所属機関系：大阪大学
部局名：大学院医学系研究科
職名：教授
研究者番号：40253984

研究分担者氏名：玉利 慶介
ローマ字氏名：(Keisuke Tamari)
所属機関系：大阪大学
部局名：大学院医学系研究科
職名：特任助教
研究者番号：30718995

(2)研究協力者

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。