

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：82502

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08110

研究課題名(和文)放射線が誘導する免疫賦活化および全身性の抗腫瘍効果の定量的評価と制御機構解明

研究課題名(英文)Quantitative evaluation of radiation-induced immunostimulating effect

研究代表者

下川 卓志(Shimokawa, Takashi)

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・量子医科学研究所 物理工学部・研究統括

研究者番号：20608137

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：放射線治療では生体内でがん細胞に細胞死を誘導するため、がんワクチンのような効果の誘導が期待できる。本課題では放射線、特に炭素イオン線と免疫療法の併用によるがん根治療法の確立を目指して、放射線照射により活性化される腫瘍に対する免疫応答の詳細なメカニズムの解析を行った。その結果、炭素イオン線と免疫チェックポイント阻害剤の併用により、照射されていない遠隔腫瘍にも治療効果を及ぼせることを実証した。さらに、それに伴う生体内の変化を照射腫瘍、遠隔腫瘍それぞれについて解析し、放射線による抗腫瘍免疫の誘導とその治療効果の全身への波及との関連を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

炭素イオン線治療は局所に対して非常に有効であるが、その治療成績の向上には診断が困難な微小転移への対応が必要である。今回の結果は、免疫療法との併用により転移などにより全身に広がったがんへの治療が可能であることを示し、その全身性の治療効果誘導に関わるメカニズムを照射された腫瘍および遠隔に存在する照射されていない腫瘍それぞれで詳細に解析を行った。今回見出した発現変化のあった遺伝子や免疫細胞の局在変化は治療効果予測マーカーとしての利用や治療効果誘導効率の改善を目的とした今後の研究に大いに貢献するものである。

研究成果の概要(英文)：Since radiotherapy can induce cell death in cancer cells in the patient's body, it is expected to lead to cancer vaccine-like effects. To establish a systemic cancer therapy using a combination of radiation, especially carbon-ion beams, and immunotherapy, we analyzed mechanisms of anti-tumor immune responses activated by irradiation. We demonstrated that the combination of carbon-ion irradiation and immune checkpoint inhibitors can induce therapeutic effects even in distant non-irradiated tumors. Furthermore, we analyzed the associated biological changes in irradiated and distant tumors, and clarified the relationship between the induction of anti-tumor immunity by radiation and its induction of systemic therapeutic effects.

研究分野：放射線治療生物学, 分子生物学

キーワード：重粒子線がん治療 Abscopal効果 抗腫瘍免疫 併用療法

1. 研究開始当初の背景

放射線には光子線や粒子線など多様な種類があり、それぞれ異なった物理的特性や生物学的特性を有している。放射線の物理量は、量を示す照射線量(Dose: Gy)と質を示す線エネルギー付与(LET: keV/μm)で示すことができる。高LET放射線である炭素イオン線などの重粒子線と低LET放射線である光子線(X線、ガンマ線)は、同じ物理的な指標(Gy)で、その照射線量を評価できるが、照射により誘導される生物効果はLETによって大きく異なっている。LETに依存して、DNA損傷の種類や割合、間接効果と直接効果の影響比も変動し、その影響を受けて、RBE(生物効果比)として示される細胞への致死・増殖抑制などの生物効果の誘導能や、OER(酸素効果比)として示される酸素の生物効果への影響も、LET依存的に変化する。一方で、がん細胞の転移能への影響や、血管新生誘導など、単純に強弱で評価できない線質の影響を受けて誘導される生物効果の違いも報告されており、未だその全容は明らかになっていない。特に、生体への照射では、生体レベルでの応答に影響する非標的部位の被ばく量・体積が線質毎で違いも大きく、線質の影響はより複雑となり、正確な比較・評価は非常に困難である。

放射線によるがん療は、

- i) 外科的手術とは異なり、生体内でがん細胞に細胞死を誘導するため、がん抗原として利用できること、
- ii) 化学療法とは異なり、ダメージを局所だけに制御できるため、患者の免疫系に与えるダメージが少ないこと、

などから、免疫を介して波及的に全身のがんに対する治療効果を誘導できることが期待されている(図1)。実際に、放射線を照射した腫瘍だけでなく、遠隔に存在し照射されていない腫瘍に対しても、治療効果が誘導され治癒した例も報告されている。さらにその特性から、免疫療法との併用も有効であると考えられている。さらに免疫チェックポイント阻害剤の効果のなかった患者への放射線の追加治療により、照射野外の腫瘍も含め完治したという報告もある。

このような照射されていない遠隔腫瘍に対する治療効果の誘導は、Abscopal効果として知られ、高い関心を集めており、世界中で研究が進められている。放射線照射により、腫瘍そのものをがんワクチンとして作用させ、生物が本来持つ防御機構を活性化することで、抗腫瘍効果を全身に波及させることができれば、検出困難な微小転移にも対応できる理想的な治療法の一つになると考えられる。しかし、実際には非常に稀にしか誘導されない現象であり、現在多くの基礎研究が進められているが、マウスモデル間や個体間での誘導効果の違いも大きく、未だそのメカニズムについて不明な点が多い。

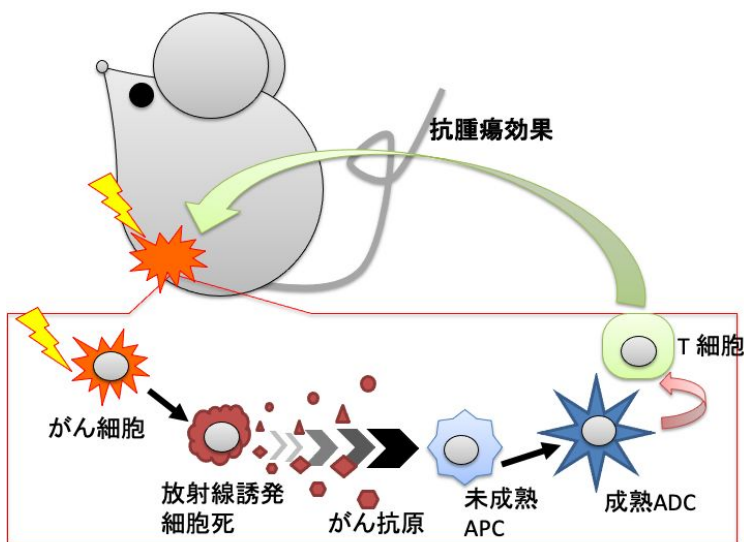


図1 放射線により誘導される腫瘍免疫応答

放射線照射により誘導されたがん細胞の細胞死(特に免疫細胞死)により腫瘍免疫応答が効果的に誘導されると考えられる。

2. 研究の目的

放射線治療を主体とする非侵襲治療によるがん根治療法の確立には、放射線照射により引き起こされる免疫を介した全身性応答の詳細なメカニズムを明らかにする事が必要である。そのために、本申請では、その生体応答を的確に評価するための指標候補を検証・確定し、それを利用して放射線照射後に生体内で起こる連続した生物応答である次の二つ現象、

1. 放射線による抗腫瘍免疫賦活効果
2. 賦活化された免疫による Abscopal 効果

をそれぞれ独立に評価し、遠隔への抗腫瘍効果に影響する分子メカニズムを解析することを目的としている。さらに、今後のさらなる検討に必須である治療効果の評価マーカー/予測マーカーにもなり得る、免疫を介した一連の生体応答を制御している因子の探索を進める。

3. 研究の方法

3-1: 細胞培養

本実験で使用したマウス由来がん細胞のうち B16F10 は 10% FBS, 1x 抗生物質含有の RPMI1640 で、LM8, SCCVII, Colon26 とヒト由来がん細胞株 MIAPaCa2, U2OS は 10% FBS, 1x 抗生物質含有の DMEM high glucose 培地にて培養を行った。

3-2: 担がんマウスモデル

マウス由来のがん細胞は、B16F10 株は C57BL/6J マウスに、LM8 株と SCCVII 株は C3H/He マウスに、Colon26 株は BALB/c マウスにそれぞれ移植して担がんマウスモデルとした。In vitro で継代したそれぞれの細胞株は、 2×10^5 cells/10 μ L または 10×10^5 cells/10 μ L となるように HBSS で懸濁し、マウスの右下肢、または両下肢の皮下に移植した。移植一週間後に照射を行い、その後、継続的に腫瘍径を測定した。免疫チェックポイント阻害剤である抗 CTLA4 抗体、抗 PD-1 抗体はそれぞれ 0.2, 0.6 mg/mouse/回を腹腔内に投与した。

3-3: 放射線照射

培養細胞並びに移植腫瘍への X 線照射は TITAN (Shimadzu) を用いて、200kV, 20mA, 0.5mmAl+0.5mm Cu filter の条件下で線量率 0.25~1.0Gy/min で行った。炭素イオン線の照射は医療用加速器 HIMAC にて行った。290MeV/n の炭素イオン線を、培養細胞に対しては mono-energetic beam を用いて LET 13~90keV/ μ m で、移植腫瘍に対しては下肢以外を被ばくしないように遮蔽し拡大 Bragg peak beam を用いて LET 約 50keV/ μ m で照射を行った。

3-4: 遺伝子発現解析

培養細胞並びに腫瘍などから RNAzol などを用いて単離した total RNA は PrimeScript (Takara bio) を用いて cDNA とし、Thunderbird SYBR (Toyobo) と CFX connect (Bio-rad) を使用して real time PCR 法により遺伝子発現を解析した。

3-5: 免疫細胞の解析

担がんマウスモデルの腫瘍、リンパ節等から回収した T 細胞などの免疫細胞は、蛍光標識された抗体 (Biolegend) や OVA 特異的な MHC テトラマー (MBL) で染色し、Gallios (Beckman-Coulter) にて解析を行った。

4. 研究成果

4-1: 全身性のがん治療効果の誘導

本課題申請時には、マウス担がんモデルでの X 線などの光子線と免疫療法との併用による Abscopal 効果誘導については報告が数報発表されていたが、炭素イオン線との併用についての報告はまだなかった。そこで、炭素イオン線による abscopal 効果の誘導を、複数のモデルにて改めて検証を行った。

本実験で用いたモデルはすべて免疫チェックポイント阻害剤単独による治療では移植腫瘍に対して効果が認められず、また、放射線単独では abscopal 効果の誘導が認められなかった。一方で、両下肢に移植した担がんマウスモデルの片側の下肢のみに照射を行い、免疫チェックポイント阻害剤との併用を行ったところ、abscopal 効果を誘導できることを確認できた (図 2)。特に高転移株である LM8 細胞株を用いた解析では、肺転移の抑制と非照射遠隔腫瘍の増殖抑制を併用療法により誘導できることを示した。さらにこの併用療法時に、照射されていない遠隔腫瘍内への免疫細胞浸潤が亢進していることを明らかにできた。

4-2: 照射による局所腫瘍内の変化

がん細胞における抗腫瘍免疫に関する遺伝子の放射線照射に伴う発現量変化を検証した。申請時にはすでに、X 線による IRF1 を介した PD-L1 の発現増加が報告されていた。そこで、ヒト及びマウス由来のがん細胞株を用いて、約 70 keV/ μ m の炭素イオン線を 3, 10 Gy 照射した後の遺伝子発現量の変化を測定した。先に報告された X 線と同様に、測定した全ての細胞で IRF1 および PD-L1 は線量依存的に発現が亢進し、照射 7 日後までその発現亢進は維持されていた (図 3)。同様に LAG-3, PD-L2 など複数の免疫関連遺伝子の発現亢進も認められたが、細胞によっては変化の認められない遺伝子や、発現亢進が一過性であったなど、IRF1 や PD-L1 とはその発現誘導が異なっていた。なお、これらの遺伝子発現誘導は正常細胞では認められなかった。同様の結果は、移植腫瘍に対して炭素イオン線を照射した解析においても確認された。

さらに、線質依存性を確認するために、LET を 13~90 keV/μm と変えて同一線量を照射し、遺伝子発現変化を測定した。その結果、緩やかながら線質依存的が認められた。上記の結果より、特に PD-L1 は多くの細胞株で変化が共通しており、その発現量の変化が大きく、線量、線質依存的に変化することから、照射腫瘍の生物応答の指標として有望であることが示された。

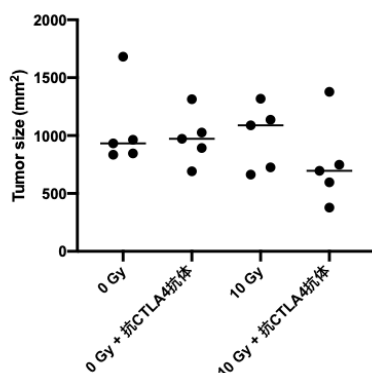


図2 併用療法による遠隔に存在する非照射腫瘍の増殖抑制

炭素イオン線照射、免疫チェックポイント阻害剤単独では影響がないが、併用によりAbscopal効果が誘導されている。

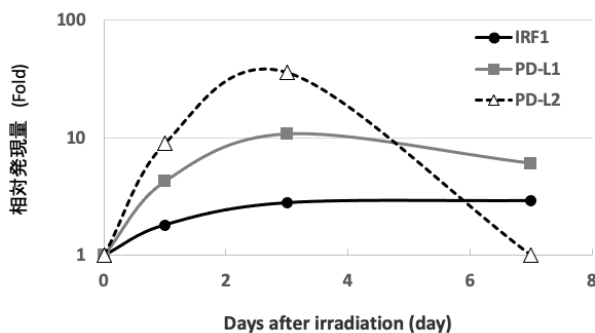


図3 炭素イオン線により誘導される遺伝子発現変化

炭素イオン線照射後の遺伝子発現の経時的変化。IRF1とPD-L1は照射後長期に発現亢進が維持されている。

4-3 照射による誘導される免疫応答

照射腫瘍における免疫の変化を、プローブとして ⁶⁴Cu 標識抗 PD-1 抗体、⁶⁴Cu 標識抗 PD-L1 抗体などを用いて PET により解析を行った。⁶⁴Cu 標識抗 PD-1 抗体の分布は、免疫チェックポイント阻害剤単独の治療効果が認められた SCCVII では腫瘍への集積が認められた。一方で、免疫チェックポイント阻害剤単独では治療効果がほとんど認められないモデルでは、腫瘍内には集積せず、腫瘍周辺への分布が確認された。この腫瘍周辺にその集積が認められるモデルでは、腫瘍局所への炭素イオン線の照射により、腫瘍内へのプローブの集積が誘導された。加えて、この条件下では、免疫チェックポイント阻害剤との併用により、照射腫瘍に対する治療効果の増強も認められた。本結果は、放射線治療の免疫チェックポイント阻害剤との併用における作用機序として、免疫細胞の腫瘍局在への誘導が重要であることを示している。

炭素イオン線照射による抗腫瘍免疫の誘導は、OVA 発現がん細胞を用いて、OVA に対する T 細胞の誘導を指標に評価を行った。先行する光子線での結果と同様に、腫瘍内 OVA 特異的 T 細胞が照射により増加することが認められた。この腫瘍特異的 T 細胞の誘導は、照射線量に比例する傾向が認められ、また、そのような誘導は免疫チェックポイント阻害剤単独では認められなかった。この結果は、腫瘍に由来する抗腫瘍免疫の誘導において、放射線の照射が効果的であることを示している。一方で、炭素イオン線照射単独の条件下では abscopal 効果の誘導が認められなかったことから、腫瘍特異的 T 細胞の誘導に加えて、それとは異なる免疫機能への作用が abscopal 効果の誘導には必要であることが強く示唆された。

4-4: 遠隔腫瘍内変化

マウス両下肢移植モデルの片側に照射した際の非照射腫瘍内の変化に着目し、解析を行った。照射腫瘍で認められた IRF1 や PD-L1 の発現誘導は遠隔腫瘍では誘導されなかった。これらの遺伝子発現は DNA 損傷による誘導されるため、想定どおりの結果である。一方で、4-1 でも記載したように、T 細胞などの免疫細胞の浸潤が照射腫瘍に比べ非常に弱いながらも誘導されていた。遺伝子発現解析の結果、多くの遺伝子で変動は認められなかったが、照射腫瘍と同様に変動する遺伝子や遠隔腫瘍でのみ変動している遺伝子を複数同定することができた。今後、これら遺伝子変動の影響と、abscopal 効果の誘導の関係について継続して解析していく必要がある。

4-5：照射線量の影響

本課題の実施期間中に、いくつか新しい報告があり、照射線量や照射方法（分割など）と abscopal 効果の誘導の関係についての関心が世界的に高まった。腫瘍特異的 T 細胞の誘導は線量依存的であったことから、この課題の研究においては高線量照射を行ってきたが、abscopal 効果の誘導には至適な線量があるとの報告もあり、線量を変えて abscopal 効果の誘導効率を比較した。照射された局所腫瘍の制御は照射した線量に依存したにもかかわらず、abscopal 効果の誘導効率は線量の増加にはよって特に増加は認められず、むしろ低い線量の方が抗腫瘍効果が高い傾向が認められた。現時点では、まだ限られたモデルでの結果であるため、今後より慎重な検証が必要であるが、abscopal 効果の誘導には局所制御とは異なる照射条件が必要となることを示唆するものである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Helm Alexander, Tinganelli Walter, Simoniello Palma, Kurosawa Fuki, Fournier Claudia, Shimokawa Takashi, Durante Marco	4. 巻 109
2. 論文標題 Reduction of Lung Metastases in a Mouse Osteosarcoma Model Treated With Carbon Ions and Immune Checkpoint Inhibitors	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics	6. 最初と最後の頁 594 ~ 602
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ijrobp.2020.09.041	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 黒澤ふき、謝琳、破入正行、張明栄、藤崎真吾、下川卓志
2. 発表標題 炭素イオン線照射による免疫チェックポイント関連分子発現誘導の解析
3. 学会等名 第56回アイソトープ・放射線研究発表会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 黒澤ふき、謝琳、破入正行、張明栄、藤崎真吾、下川卓志
2. 発表標題 Expression change of immune checkpoint related molecules in cancer cells after C-ion irradiation
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 足助一真、黒澤ふき、藤崎真吾、白井敏之、下川卓志
2. 発表標題 重粒子線照射による免疫チェックポイント関連遺伝子の発現変動解析
3. 学会等名 第1回 日本量子医科学会
4. 発表年 2021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
研究 分担者	武島 嗣英 (Takeshima Tsuguhide) (10360950)	国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・量子医科学研究所 重粒子線治療研究部・主幹研究員 (82502)	
研究 分担者	中島 菜花子 (Nakajima Nakako) (50402863)	国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・量子医科学研究所 重粒子線治療研究部・研究員 (82502)	

	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
研究 協力者	黒澤 ふき (Kurosawa Fuki)	国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・放射線医学総合研究所 重粒子線治療研究部・連携大学院生 (82502)	
研究 協力者	足助 一真 (Ashisuke Kazuma)	国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・量子医科学研究所 物理学部・実習生 (82502)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
ドイツ	GSI	Technische Universität Darmstadt	
イタリア	Istituto Nazionale di Fisica Nucleare		