

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：22304

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08182

研究課題名(和文) PD-L1抗体を用いた免疫放射線療法確立のための基礎検討

研究課題名(英文) Basic study of immunoradiation therapy using anti-PD-L1 antibody

研究代表者

原 孝光 (Hara, Takamitsu)

群馬県立県民健康科学大学・診療放射線学部・教授

研究者番号：70464542

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)：実験にはB16、B16F10、colon26、3LL、4T1、MM102D細胞を使用した。抗PD-L1抗体単独の殺細胞効果はalamer blue法、放射線と薬剤との併用効果はコロニー形成法で調べた。薬剤単独の細胞毒性は容量依存性に増大した。この結果より放射線と併用する薬剤濃度は70-80%細胞生残率濃度とし、すべての細胞株で0.015mg/mlであった。放射線と抗PD-L1抗体を併用したときpost treatでは放射線増感効果は見られなかった。しかし、pre treatにおいては、多くの細胞株で放射線増感効果を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、in vitroにおいても抗PD-L1抗体と放射線を併用することで増感効果を示す場合があることが示唆された。我々の発見では放射線照射前に抗PD-L1抗体で処理した場合のみに増感効果が認められた。これは、PD-L1が免疫逃避機構以外の機能を有しているという先行研究の結果とも一致することを意味し、PD-L1の免疫逃避機構以外の機能として放射線増感のターゲット分子としての役割があることが示唆された。これは臨床において免疫療法と放射線療法を併用する際、免疫チェックポイント阻害剤は全身への抗腫瘍免疫に加えて放射線による局所制御の増強にも働くことを示す有用な結果であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We used B16, B16F10, colon26, 3LL, 4T1 and MM102D cell lines in our experiment. cytotoxic effect of the anti-PD-L1 antibody alone was investigated by the alamer blue assay, and the combined effect of radiation and the drug was investigated by the clonogenic assay. The cytotoxicity of the drug alone increased in a dose-dependent manner. Based on this result, we determined that the drug concentration to be used in combination with radiation was 70-80% cell survival concentration. The drug concentration was 0.015 mg/ml in all cell lines. When radiation and anti-PD-L1 antibody were used in combination, no radiosensitizing effect was observed even when the drug was added after irradiation. However, when the drug was added before irradiation, many cell lines showed a radiosensitizing effect.

研究分野：放射線生物学

キーワード：免疫放射線療法 抗PD-L1抗体薬 放射線増感効果 免疫チェックポイント阻害剤 PD-L1 免疫逃避機構

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

これまでがん治療は、外科手術、化学療法、放射線治療が主な3つで、これらを総称して3大がん治療と言われてきた。近年、この3大がん治療に加えて、第4のがん治療として免疫療法が大きく発展し、がん治療の中心的な役割を担ってきている。

免疫療法における研究の進歩は目覚ましく、次々に新しい治療法が開発され治療効果が向上している。その結果、アメリカ科学誌「サイエンス」では、がん免疫療法が非常に魅力的な治療法であるとして、2013年の“科学ブレークスルー・オブ・ザ・イヤー”に選出されるまでに至っている¹⁾。

これまでの3大がん治療では外的作用により治療を行うのに対し、免疫療法は生体が本来持っている免疫作用を利用して治療を行う。その為、免疫療法は、他の治療ほど即効性がない場合もあるが、効果の長期間持続や全身への波及、及び副作用を最小限に抑えられる可能性を有する事の特徴とする。免疫療法は大きく2つに分類することができる。1つは、がん細胞を攻撃し、免疫応答を亢進する免疫細胞を活性化する方法であり、樹状細胞ワクチン療法などがある。もう1つは、免疫抑制分子の働きを阻害する方法であり、現在最も注目されている免疫チェックポイント阻害剤を用いた治療である。後者の治療法の一つに抗PD-L1抗体療法があり、我が国でも数年内に保険適応となることが予想されている。治療原理としては、がん細胞が発達過程において免疫細胞の攻撃から逃れて自身を守るために獲得した免疫逃避機構の解除に基づいている。免疫逃避機構においてがん細胞はPD-L1を発現し、これが細胞障害性T細胞(CTL)の発現しているPD-1と結合する事で、CTLの活性を抑制している。そこで抗PD-L1抗体を使用することで、がん細胞が発現したPD-L1に抗PD-L1抗体を結合させ、CTLのPD-1との結合を阻害することで、がん細胞が獲得した免疫逃避機構を抑制し、がん免疫の機能を回復させる治療法である。多くのがん種で、このPD-L1が発現しており、PD-L1発現量と予後に相関があるという報告も多くされている²⁻⁵⁾。したがってPD-L1を標的とした免疫チェックポイント阻害剤はがん治療において非常に有効と考える。この抗PD-L1抗体療法による治療効果は優れているが、現状の単剤での奏効率率は20-30%であり⁶⁾、効果がまだ十分とは言えない状況である。

一方、放射線療法は放射線による直接的、およびフリーラジカル生成を介した間接的なDNA障害により殺細胞効果を発揮することによる局所療法と考えられてきた。しかし、放射線療法にも稀ではあるが照射範囲外の病巣を縮小させる“アブスコパル効果”が存在することが古くから知られていたが、科学的な証明がされなかった。このアブスコパル効果に関しても近年の腫瘍免疫学研究的な発展によりメカニズムの解明が進んでいる。そして、放射線療法による殺細胞効果の少なくとも一部は、治療により活性化される腫瘍特異的な抗腫瘍免疫であることが報告されている⁷⁻⁹⁾。これらの事より、放射線によって誘導される抗腫瘍免疫を増強すること、または免疫抑制メカニズムを解除するような免疫療法と放射線療法を組み合わせることは非常に有効であると考えられる。具体的には、放射線療法で治療後、腫瘍のPD-L1の発現が上昇することが報告されているので^{10,11)}、抗PD-L1抗体と放射線療法の併用療法の有効性は非常に高いと考える。

またPD-L1の発現は腫瘍細胞の免疫逃避機構以外にも、腫瘍細胞の生存能や増殖能に関連していることが示唆されている¹²⁾。よって、PD-L1経路の抑制が腫瘍局所の放射線照射の増感効果の標的となる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では抗PD-L1抗体を用いて免疫放射線療法を行う上で重要な放射線による腫瘍のPD-L1発現上昇が腫瘍細胞の内因性なのか、腫瘍を取り巻く微小環境によるものなのかを明確に解明することを第一の目的とした。その後、上昇したPD-L1を抗PD-L1抗体で抑制することで放射線の殺細胞効果が増強されることを証明し、抗PD-L1抗体を用いた免疫放射線療法の有効性を実証していく事とする。さらには、放射線によるPD-L1の発現上昇のメカニズムを明らかにしていきたい。

そこで、本研究ではin vitroにおいて先ず抗PD-L1抗体薬と放射線療法を併用することで、腫瘍細胞におけるPD-L1経路を標的とした放射線増感効果の有無を中心に探索し、PD-L1に関する放射線増感に腫瘍細胞の内因要素の有無を確認した。

3. 研究の方法

使用細胞

細胞はマウス肺がん細胞3LL、マウス乳がん細胞MM102D,4T1、マウス大腸がん細胞colon26、マウス悪性黒色腫細胞B16,B16F10を使用した。

細胞培養条件

培養液はRPMI-1640(500ml)に10%のFBS(50ml)、1%のPenicillin-Streptomycin(1ml)を添加したものをを用いた。細胞の継代および実験中の細胞においてはCO₂インキュベータで

37 の条件下にて培養を行った。

実験プロトコルとして、各種細胞を播種後、48 時間培養を行い対数増殖期にある状態で、薬剤処理、放射線照射、およびその併用を行い、再び 24 時間培養を行い、Alamer Blue assay および Clonogenic survival assay を行った(Fig.1)。

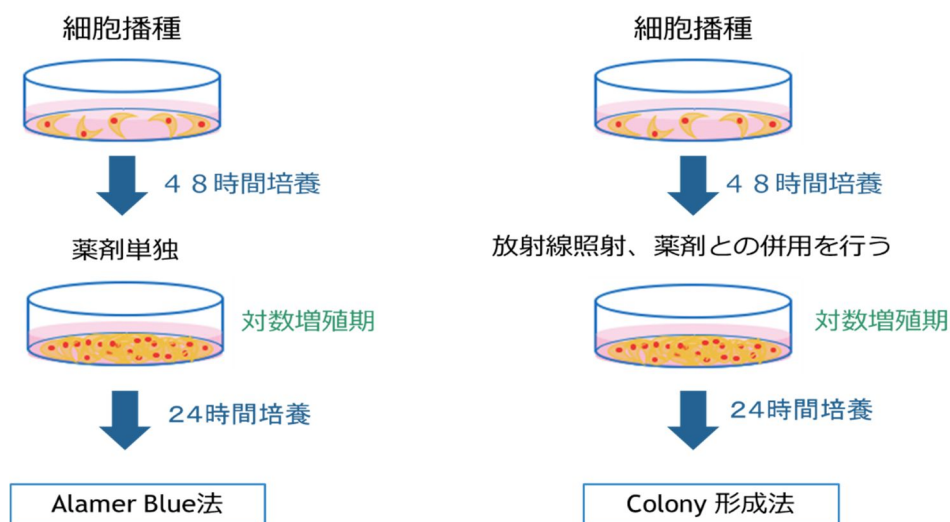


Fig.1 実験プロトコル

アラマブルー法 (Alamer Blue assay)

Al-Nasiri らの方法¹³⁾に準じて実験を行った。各種細胞を 3 万個/3.5 cm dish に播種し、2 日間培養後、anti PD-L1 を 24 時間処理した。anti PD-L1 による薬剤刺激後 PBS にて細胞をよく洗浄した後、トリプシン処理を行い single cell にした後、96 well plate に 3,000 個/well ずつ細胞を再播種し、3 日間培養を行った。その後、細胞生存率を細胞の viability で評価した。簡単に説明すると生細胞は Alamer Blue の細胞内代謝により溶液の色変化が起こり、その為に溶液の吸光度が変化するので、その変化をマイクロプレートリーダーで計測した。測定プロトコルは PBS で希釈した 10 % Alamer Blue 液を加えてから 37 °C で 4 時間インキュベートした。その後、マイクロプレートリーダーで吸光度変化を測定した。測定データの処理は実験ウェルの 570 nm 吸光度の値から、リファレンス波長 620 nm の吸光度を減じた。そして、各測定値からはバックグラウンドの値を差し引いた。以下の式に従って、吸光度と細胞数から生存率 (S.F: survival fraction) を決定した。

$$S.F = \frac{\text{細胞刺激後の細胞数} \times \text{Alamer Blue による吸光度}}{\text{コントロールの細胞数} \times \text{コントロールの Alamer Blue による吸光度}}$$

コロニー形成法 (Clonogenic survival assay)

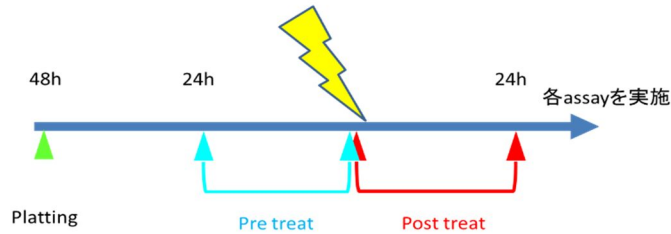
Hara¹⁴⁾らの方法に準じて各種マウス細胞株を用いてコロニー形成法で評価を行った。細胞を 3×10^4 cell/3.5 cm dish に播種し 2 日後に対数増殖期にある状態の細胞を室温でガンマ線を 1-8 Gy (線量率 4Gy/h - 32Gy/h) と線量を振って照射し、24 時間後に PBS で細胞を洗浄し、0.05 % トリプシンを含む PBS で細胞分散を行い、single cell suspension とした。トリプシン処理後、コロニー形成用に 6 cm-dish に細胞を播種し、2 週間培養してからクリスタルバイオレット 0.05 % で染色した。形成したコロニー (細胞数が 50 個以上の集団) を目視により計数し、そのコロニー数をもとに細胞生存率 (S.F) を以下の式より求めた。

$$S.F = \frac{\text{プレート効率} \times \text{コントロール(未照射群)の播種した細胞数}}{\text{ガンマ照射後 24 時間後の細胞数} \times \text{計測したコロニー数}} \div \frac{\text{未照射群 24 時間後の細胞数}}{\text{播種した細胞数} \times \text{プレート効率}}$$

また、細胞播種数は 1dish あたり、およそ 100 個のコロニーを作る数とし、本実験で用いた B16 では、コントロール (0 Gy) で 150 個、1 Gy で 200 個、2 Gy で 800 個、4 Gy で 2000 個、6 Gy で 5000 個、8 Gy で 30000 個とした。本研究ではこの過程を 3 回繰り返し、その平均値を用いて細胞生存率を求めた。

ガンマ線照射のプロトコルは Fig.2 に示すようにして行った。anti PD-L1 の処理は 24 時間とし、ガンマ線照射の前に 24 時間薬剤処理をしたコースを Pre treat、ガンマ線照射後の 24 時間薬剤刺激したコースを Post treat とした。

抗PD-L1抗体とγ線との併用protocol



Pre treat : γ線照射の24時間前からγ線照射の直前まで抗PD-L1抗体で処理

Post treat : γ線照射直前から照射後24時間後まで抗PD-L1抗体で処理

Fig.2 ガンマ線照射プロトコール

統計処理

有意差評価を行う為にデータは等分散と仮定した2標本による t 検定が行われ、解析された。データは平均値 ± S.D (標準偏差) で表してある。有意差があるものを $p < 0.05$ とした。すべての実験は3回以上行っている。

4. 研究成果

4-1 cetuximab 単独での各大腸癌細胞株に対する殺細胞効果

本研究で使用した各種細胞株の抗 PD-L1 抗体に対する薬剤単独での感受性を AlamerBlue 法で調べた。グラフは縦軸に細胞生残率、横軸に cetuximab 濃度を取っている。Fig.3 が示すように抗 PD-L1 抗体の濃度は 0.001 mg/ml から 1.5 mg/ml まで変化させた。薬剤感受性は各細胞株において似たような傾向を示し、0.015 mg/ml 前後から細胞生残率が減少し始めた。今回は抗 PD-L1 抗体薬を放射線増感と関係するか調べ、臨床応用において正常組織に与える影響を考えたとき、薬剤単独での作用がなるべく少ない濃度が理想的と考えた。従って、肩に近い部分である、80%以上の細胞生残率を与える薬剤濃度を用いることにした。以上より、Fig.3 から、放射線照射と併用する薬剤濃度は全ての細胞株で 0.015 mg/ml とした。

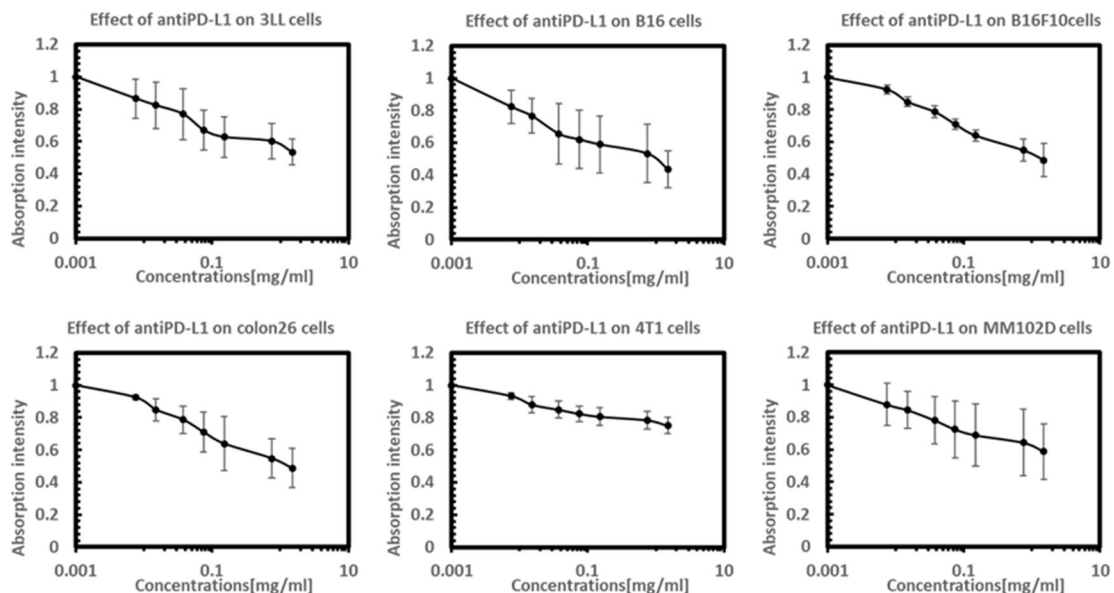


Fig.3 抗 PD-L1 抗体単独での殺細胞効果 (Alamer Blue 法)

4-2 抗 PD-L1 抗体による放射線感受性への影響

次に抗 PD-L1 抗体が放射線感受性に与える影響をコロニー形成法で調べた結果を Fig.4 に示す。は線照射単独、は抗 PD-L1 抗体を線照射の前に 24 時間処理した pre treat、は線照射後に抗 PD-L1 抗体を 24 時間処理した post treat を表している。

Fig.4中の程度の違いはあったが、使用したすべての細胞株において、抗PD-L1抗体をpost treatした場合に細胞生存率が線照射単独に比べて減少しており、放射線増感効果が認められることが示唆された。線照射単独と線照射と抗PD-L1抗体のpost treatの併用療法の8Gyにおける細胞生存率をt検定で評価すると3LL:p=0.0429、B16:p=0.0026、B16F10:p=0.00025、colon26:p=0.22、4T1:p=0.0009、MM102D:p=0.037となり、6種の細胞株中、3LL,B16,B16F10,4T1,MM102Dの5種類の細胞株でp値がp<0.05となり有意に放射線増感効果があることが分かった。また、8Gyにおいて放射線照射単独に比べpre treatで有意に増感効果が認められた細胞株の10%細胞生存率におけるD.M.F(Dose modifying factor)値は3LL=1.33、B16=1.54、B16F10=1.25、4T1=1.29、MM102D=1.32となった。post treatに関しては照射単独と比べて有意差が見られなかった。上記のcolon26については線照射単独、抗PD-L1抗体のpre treatおよびpost treatといった3群において細胞生存率に差が見られないことが分かった。

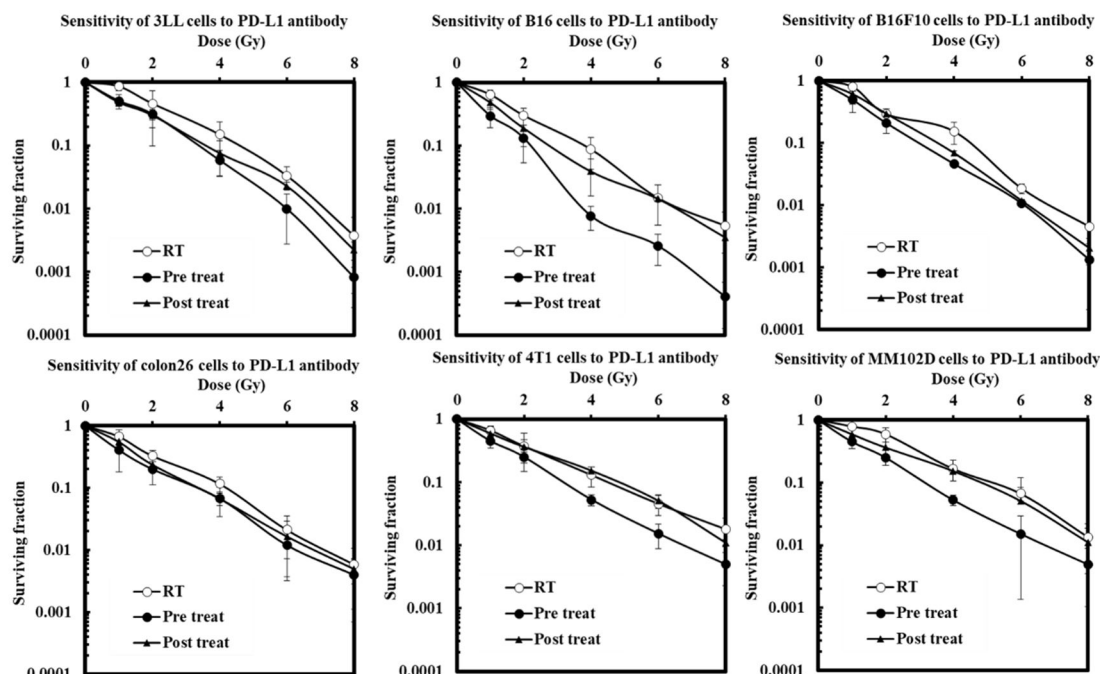


Fig.4 抗PD-L1抗体と放射線併用時の殺細胞効果 (colony 形成)

本研究において in vitroでも放射線と抗PD-L1抗体を併用したとき、多くの細胞株でPre treatにおいて、有意な放射線増感効果を認めた。これは今回使用した各種細胞株が発現しているPD-L1が抗PD-L1抗体で抑制されることで、何らかの作用が働いたためだと考えられる。したがって、腫瘍細胞が発現しているPD-L1は腫瘍細胞の内因性の放射線増感ターゲットになりうることを示唆された。実際に先行研究においてPD-L1の発現は腫瘍細胞の免疫逃避機構以外にも、腫瘍細胞の生存能や増殖能にも関連していることが示唆されている。したがって今回の放射線増感効果はPD-L1の亢進が薬剤によって抑制されたことで、腫瘍の増殖能、生存能が抑制され、放射線の殺細胞効果の増強につながったと考えられる。しかし今回の研究においては、元々細胞が発現しているPD-L1の発現量や、抗PD-L1抗体薬によってどの程度PD-L1が抑制されたのかは調べられていない。よって今後はもともとの腫瘍細胞のPD-L1の発現状況や抗PD-L1抗体薬によるPD-L1活性化などの測定を行うことで、今回確認できた抗PD-L1抗体薬と放射線増感効果のメカニズムの解明を進めていきたい。

<引用文献>

- 1) Jennifer Couzin-Frankel. Science, 2013, vol 342(6165), 1432-1433
- 2) Thompson et al. PNAS, 2004, vol 101(49), 17174-17179
- 3) Ohigashi et al. Clin Cancer Res, 2005, vol 11(8), 2947-53
- 4) Nomi et al. Clin Cancer Res, 2007, vol 13(7), 2151-7
- 5) Hino et al. Cancer, 2010, vol 116(7), 1757-66
- 6) Topalian SL et al. N Engl J Med, 2012, vol 366(26), 2443-54
- 7) Suzuki Y et al. Cancer Res, 2012, vol 72(16) 3967-76
- 8) Yoshimoto Y et al. PLOS ONE, 2014, vol 9(3)
- 9) Takeshima T et al. Cancer Res, 2010, vol 70(7) 2697-706
- 10) Gong et al. Journal of Thoracic Oncology, 2017, vol 12(7) 1085-1097
- 11) Bernstein et al. Cancer Biother Radiopharm, 2014, vol 29(4), 156-161
- 12) J Li et al. Cell Physiol Biochem, 2017,41(3), 907-920
- 13) S.Al-Nasiry et al. Hum,Reprod,2007,vol22(5), 1304-1309
- 14) Hara.T et al. Biol,Phys,2008,vol71(5), 1485-1495

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 原孝光、舟山知夫、青木 武生、佐藤浩央、中神佳宏、鈴木義行、大野達也、岡崎篤
2. 発表標題 EGFR を標的とした化学放射線療法の開発
3. 学会等名 QST高崎サイエンスフェスタ2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 原孝光、舟山知夫、青木 武生、佐藤浩央、中神佳宏、鈴木義行、大野達也、岡崎篤
2. 発表標題 PD-L1抗体を用いた免疫放射線療法確立のための基礎検討
3. 学会等名 QST高崎サイエンスフェスタ2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takamitsu Hara, Takeo Aoki, Tomoo Funayama, Hiro Sato, Yoshiyuki Suzuki, Yoshihiro Nakagami, Tatsuya Ohno, Atsushi Okazaki
2. 発表標題 Enhancement of Radiation effect targeting EGFR on colon cancer cell lines.
3. 学会等名 日本放射線影響学会第63回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takamitsu Hara, Takeo Aoki, Tomoo Funayama, Hiro Sato, Yoshiyuki Suzuki, Yoshihiro Nakagami, Tatsuya Ohno, Atsushi Okazaki
2. 発表標題 Development of chemoradiation therapy targeting EGFR for triple negative breast cancer.
3. 学会等名 日本放射線影響学会第63回大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

特になし。

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	鈴木 義行 (Suzuki Yoshiyuki) (60334116)	福島県立医科大学・医学部・教授 (21601)	データ評価、研究助言
研究分担者	中神 佳宏 (Nakagami Yoshihiro) (80347301)	獨協医科大学・医学部・准教授 (32203)	データ評価、研究助言、実験指導
研究分担者	吉本 由哉 (Yoshimoto Yuuya) (80594390)	福島県立医科大学・医学部・講師 (21601)	データ評価、研究助言
研究分担者	佐藤 浩央 (Sato Hiroo) (90750571)	群馬大学・重粒子線医学推進機構・助教 (12301)	データ評価、研究助言
研究分担者	川村 拓 (Kawamura Hiraku) (80424050)	群馬県立県民健康科学大学・診療放射線学部・助教 (22304)	実験補助、研究助言

6. 研究組織（つづき）

	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	舟山 知夫 (Funayama Tomoo) (40354956)	国立研究開発法人日本原子力研究開発機構・高崎研究所 (82110)	研究助言、実験補助

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