

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08195

研究課題名(和文)放射線照射後のDNA修復応答による免疫関連リガンド発現機構の解析

研究課題名(英文) Mechanism of immune-related ligands expression by DNA damage repair response after irradiation

研究代表者

佐藤 浩央 (Hiro, Sato)

群馬大学・重粒子線医学推進機構・助教

研究者番号：90750571

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：(1)放射線治療による免疫反応を臨床レベルで解析するため、放射線治療前および治療期間中に採取した子宮頸癌検体を用いて、腫瘍組織中のがん細胞のPD-L1とKu80の発現変化を調べた。免疫化学染色にて治療前と治療中の検体を比較したところ、PD-L1は放射線治療により発現誘導されること、さらにその発現レベルはKu80と相関することがわかった。

(2)培養細胞にて、炭素イオン線照射後のPD-L1発現変化を調べた。その結果、未照射細胞と比較し、炭素イオン線照射後にPD-L1発現誘導を認めた。さらに炭素イオン線とX線を比較した場合、炭素イオン線照射においてより高度にPD-L1発現が誘導されることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

(1)放射線治療により誘導される免疫反応の一部が明らかとなった。PD-L1発現誘導が放射線治療期間中に認められたことから、放射線治療中の腫瘍組織は免疫チェックポイント阻害剤が機能しやすい環境になっていることが示唆された。

(2)炭素イオン線照射はX線よりも高度にPD-L1発現を誘導することから、PD-L1を介した免疫抑制が、炭素イオン線治療後の局所再発の理由の一つである可能性が示唆された。さらに、PD-L1を高発現したがんは抗PD-1/PD-L1抗体治療の効果が高い可能性が示されており、炭素イオン線と抗PD-1/PD-L1抗体併用という新たな治療戦略の有効性を支持する結果であった。

研究成果の概要(英文)：(1) To analyze the induction of immune response to radiotherapy at the clinical setting, we examined the expression of PD-L1 and Ku80 on cancer cells in cervical cancer tissues obtained before and during radiotherapy. Comparing the immunohistochemical staining of samples before and during treatment revealed that PD-L1 was induced by radiotherapy and that its expression level correlated with Ku80.

(2) We examined whether PD-L1 expression on cancer cells is induced after carbon-ion irradiation. The results showed that PD-L1 expression was induced after carbon-ion irradiation compared to unirradiated cells. Furthermore, PD-L1 induction level by carbon-ion was higher than by X-rays.

研究分野：放射線腫瘍学

キーワード：放射線治療 腫瘍免疫学 免疫チェックポイント DNA損傷

## 1. 研究開始当初の背景

抗 PD-1/PD-L1 抗体および抗 CTLA-4 抗体に代表される免疫チェックポイント阻害剤 (ICIs) の臨床的成功により、がん治療における抗腫瘍免疫反応の重要性が明らかとなった。しかし ICIs 単独で高い治療効果を得られる症例は限定的であることから、治療効果のさらなる向上を目指した治療法の探索が行われていた。その中で、ICIs と放射線治療の併用が行われるようになった。その背景としては、放射線治療はすでに臨床で幅広く利用されているがん治療法であるという実践的な理由に加え、放射線治療により生じる免疫反応のエビデンスの蓄積も影響していると考えられた。実際、本研究開始時まで、放射線治療により誘導される免疫反応が基礎・臨床問わず数多く報告されてきた。我々の先行研究でも、培養細胞モデルにて、X 線照射および DNA 損傷誘導性化学療法剤処理による DNA 損傷・修復シグナルが腫瘍細胞での PD-L1 発現誘導を制御することを報告していた (Sato et al., Nature Communications, 2017)。

しかし、両者併用の臨床試験の結果からは、治療効果が患者ごとに大きく異なることが明らかになってきた。さらにその結果に影響する因子も未解明であり、この解明が喫緊の課題であった。そこで申請者は、併用治療の効果をより多くの症例で再現するためには、放射線治療により誘導される免疫反応のより詳細な解明が必要であると考えた。本研究では、放射線照射後に誘導される免疫環境変化、特に細胞膜表面の免疫関連リガンド発現に注目し、放射線照射による DNA 損傷・修復メカニズムの影響を明らかにすることを目的とした。

## 2. 研究の目的

- (1) これまでの放射線照射による免疫反応誘導の *in vitro* 研究は、ほとんどが X 線照射を用いたものであった。一方で、本邦で適応が拡大しつつある次世代の放射線治療である炭素イオン線照射については、治療により誘導される免疫反応について未解明な点が多い。炭素イオン線治療は X 線治療よりも高い局所効果が期待できるため、ICIs と炭素イオン線の併用は、X 線との併用と比較し同等かそれ以上の効果が期待できると考えられる。そこで我々は、抗 PD-1/PD-L1 抗体の効果予測マーカーの一つと考えられている PD-L1 に着目した。炭素イオン線照射によりがん細胞の PD-L1 発現が誘導されるか、さらに DNA 損傷・修復シグナルに着目し PD-L1 発現制御経路の解明をめざした。
- (2) 現在、放射線治療と ICIs 併用の臨床試験が数多く進行中である。この併用治療の基礎的裏付けとして、放射線照射により誘導される免疫反応を介した腫瘍局所および全身での免疫反応誘導が考えられている。そのため、両者併用による治療効果を最大限に引き出すためには、放射線治療により誘導される免疫反応、特に臨床における腫瘍微小環境中での免疫反応の解明が重要である。これまでの臨床腫瘍検体を用いた研究では、術前放射線治療を受けた症例から採取した手術検体についての解析が中心であり、放射線治療期間中の検体を用いた解析はほとんど行なわれていなかった。そこで本研究では、放射線治療期間中に腫瘍組織で誘導される免疫反応の解明を目指した。

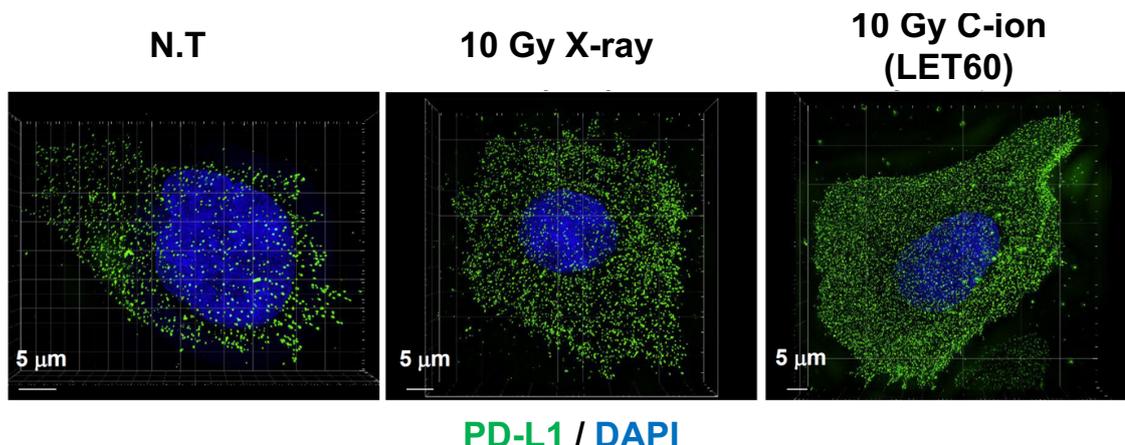
## 3. 研究の方法

- (1) ヒト腫瘍細胞株 (U2OS) を用いて、炭素イオン線または X 線照射後の腫瘍細胞の PD-L1 発現を、Flow cytometry、Western blot、Real-time PCR および蛍光免疫染色法にて解析した。照射線量は、同一物理線量および生物学的効果比 (relative biological effectiveness: RBE) を揃えた線量を用いた。PD-L1 発現誘導における DNA 損傷・修復シグナルの影響の解明のため、照射前に ATM/ATR/Chk1 の阻害剤を用いた。加えて、既知の PD-L1 発現誘導経路である STAT-IRF1 経路の関与を Western blot にて評価した。さらに炭素イオン線照射後の PD-L1 発現レベルを空間的に評価するため、超高解像度顕微鏡で取得した画像を用いて定量評価を行った。
- (2) 臨床検体における放射線治療期間中の免疫反応を解明するため、根治的放射線治療 (化学放射線治療含む) を受けた子宮頸部扁平上皮癌症例を対象に、放射線治療開始前と 10Gy/5 分割照射時点での生検検体を持ちいて免疫組織化学染色を行った。免疫反応の解析対象として、腫瘍細胞の PD-L1、Ku80、および CD8 陽性 T 細胞の染色を行った。さらに、これらの免疫反応が予後に影響するかを調べるため、各因子の発現変化と予後の相関を調べた。

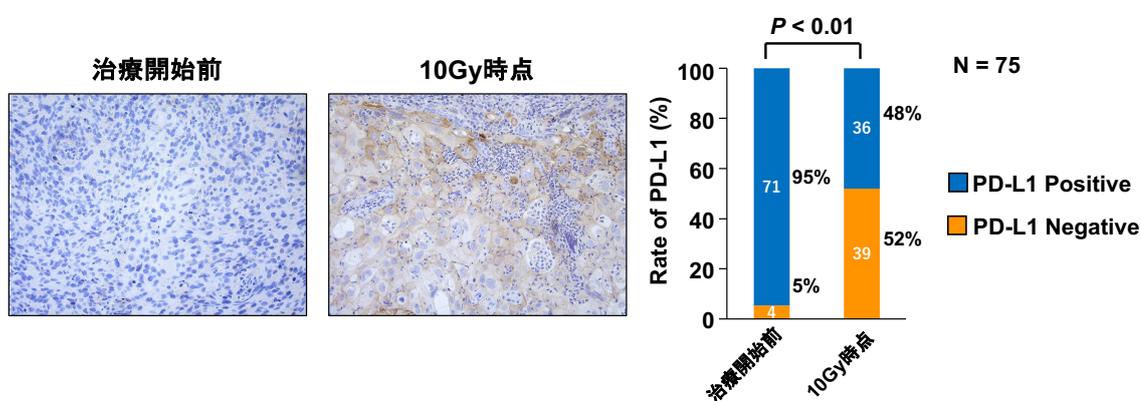
## 4. 研究成果

- (1) 同一物理線量の炭素イオン線と X 線照射後の PD-L1 発現レベルを比較したところ、細胞膜表面レベル、タンパクレベル、mRNA レベル全てにおいて、炭素イオン線照射後の方がより高度に PD-L1 発現を誘導した。RBE を揃えた線量でも同様に、炭素イオン線照射にて有意に高度な PD-L1 発現誘導を認めた。さらに炭素イオン線照射後の Chk1 リン酸化レベルは、同一物理線量での X 線照射後と比較し有意に高かった。これらの PD-L1 発現および Chk1 リン酸化は ATM または ATR 阻害剤投与下では有意に抑制された。また、炭素イオ

ン線照射後に ATR/Chk1 依存性の STAT1 リン酸化と IRF1 発現の亢進を認めた。超高解像度顕微鏡の画像では、炭素イオン線、X 線照射後のいずれにおいても PD-L1 spot 数の有意な増加を認めた（下図）。これらの結果から、炭素イオン線照射後の PD-L1 発現レベルは、X 線照射後と同様に DNA 損傷シグナル（ATM/ATR/Chk1）依存的事であること、さらにその下流で STAT1-IRF1 経路を介していることが明らかになった。



- (2) 放射線治療開始前検体と 10 Gy 照射時点の検体を比較すると、PD-L1 陽性症例の割合は 10 Gy 照射後に有意に増加していた（治療前 5% vs 10 Gy 照射後 52% ;  $P < 0.01$ ）（下図）。さらに、10 Gy 照射後の PD-L1 誘導レベル（10 Gy 照射後の PD-L1 発現レベルと治療開始前の PD-L1 発現レベルの差）は、治療前 Ku80 発現陽性率と有意な負の相関を示した（ $SRCC = -0.379$ ;  $P < 0.01$ ）。また、間質浸潤 CD8 陽性 T 細胞密度は 10 Gy 照射後に有意に低下した（中央値：治療前 23.1% vs 10 Gy 照射後 16.9% ;  $P = 0.038$ ）。予後との相関については、放射線治療前、10 Gy 照射後いずれにおいても間質浸潤 CD8 陽性 T 細胞密度が高い群にて、全生存率、局所制御率、無増悪生存率が有意に良好であった。一方で PD-L1 発現レベルおよび 10Gy 時点での発現誘導レベルは、予後と有意な相関を認めなかった。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 6件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Hiro Sato, Sandra Demaria, Tatsuya Ohno.	4. 巻 Apr 1;51(4)
2. 論文標題 The role of radiotherapy in the age of immunotherapy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 513-522
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jjco/hyaa268.	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
1. 著者名 Sangeeta Kakoti, Hiro Sato, Siddhartha Laskar, Takaaki Yasuhara, Atsushi Shibata	4. 巻 -
2. 論文標題 DNA Repair and Signaling in Immune-Related Cancer Therapy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Molecular Biosciences	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmolb.2020.00205.	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
1. 著者名 Hiro Sato, Penny A Jeggo, Atsushi Shibata	4. 巻 110(11)
2. 論文標題 Regulation of programmed death ligand 1 expression in response to DNA damage in cancer cells: Implications for precision medicine	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 3415-3423
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14197	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
1. 著者名 Hiro Sato, Noriyuki Okonogi, Takashi Nakano	4. 巻 25(5)
2. 論文標題 Rationale of Combination of anti-PD-1/PD-L1 Antibody Therapy and Radiotherapy for Cancer Treatment	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 801-809
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10147-020-01666-1	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 -

1. 著者名 Permata Tiara Bunga Mayang, Sato Hiro, Gu Wenchao, Kakoti Sangeeta, Uchihara Yuki, Yoshimatsu Yukihiko, Sato Itaru, Kato Reona, Yamauchi Motohiro, Suzuki Keiji, Oike Takahiro, Tsushima Yoshito, Gondhowiardjo Soehartati, Ohno Tatsuya, Yasuhara Takaaki, Shibata Atsushi	4. 巻 62
2. 論文標題 High linear energy transfer carbon-ion irradiation upregulates PD-L1 expression more significantly than X-rays in human osteosarcoma U2OS cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Radiation Research	6. 最初と最後の頁 773 ~ 781
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jrr/rrab050	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

1. 著者名 Mori Yasumasa, Sato Hiro, Kumazawa Takuya, Permata Tiara, Yoshimoto Yuya, Murata Kazutoshi, Noda Shin-Ei, Kaminuma Takuya, Ando Ken, Oike Takahiro, Okonogi Noriyuki, Okada Kohei, Kakoti Sangeeta, Suzuki Keiji, Ikota Hayato, Yokoo Hideaki, Nakano Takashi, Ohno Tatsuya, Shibata Atsushi	4. 巻 21
2. 論文標題 Analysis of radiotherapy-induced alteration of CD8+ T cells and PD-L1 expression in patients with uterine cervical squamous cell carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ol.2021.12707	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

1. 著者名 Kumazawa Takuya, Mori Yasumasa, Sato Hiro, Permata Tiara, Uchihara Yuki, Noda Shin-Ei, Okada Kohei, Kakoti Sangeeta, Suzuki Keiji, Ikota Hayato, Yokoo Hideaki, Gondhowiardjo Soehartati, Nakano Takashi, Ohno Tatsuya, Shibata Atsushi	4. 巻 23
2. 論文標題 Expression of non-homologous end joining factor, Ku80, is negatively correlated with PD-L1 expression in cancer cells after X-ray irradiation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ol.2021.13147	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11件 (うち招待講演 10件 / うち国際学会 6件)

1. 発表者名 佐藤浩央
2. 発表標題 Present status and issues for clinical application of radiotherapy combined with immune checkpoint inhibitor
3. 学会等名 第58回 日本癌治療学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤浩央
2. 発表標題 Clinical trials of combination of radiotherapy and immune checkpoint inhibitor
3. 学会等名 日本放射線腫瘍学会 第33回学術大会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤浩央
2. 発表標題 Current status and issues of radiotherapy combined with immune checkpoint inhibitor
3. 学会等名 第56回 日本医学放射線学会 秋季臨床大会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤浩央
2. 発表標題 Combination of radiotherapy and immune checkpoint inhibitor as a novel cancer treatment strategy
3. 学会等名 日本放射線影響学会 第63回大会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤浩央
2. 発表標題 Immune Radiotherapy
3. 学会等名 International Training Course on Carbon-ion Radiotherapy 2020 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤浩央
2. 発表標題 免疫治療時代における 放射線治療の役割
3. 学会等名 若手放射線生物学研究会 専門研究会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤浩央
2. 発表標題 Rationale of combination of radiotherapy and immune therapy
3. 学会等名 The 3rd international cancer research symposium of training plan for oncology professionals (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hiro Sato, Tiara Bunga Mayang Permata, Wenchao Gu, Kakoti Sangeeta, Takahiro Oike, Takashi Nakano, Tatsuya Ohno, Takaaki Yasuhara, and Atsushi Shibata
2. 発表標題 Mechanisms of PD-L1 expression in response to DNA damage in cancer cells
3. 学会等名 The 8th International Symposium of Gunma University Initiative for Advanced Research (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hiro Sato, Tiara Bunga Mayang Permata, Wenchao Gu, Kakoti Sangeeta, Takahiro Oike, Takashi Nakano, Tatsuya Ohno, Takaaki Yasuhara, and Atsushi Shibata
2. 発表標題 PD-L1 upregulation in response to DNA damage signaling in cancer cells
3. 学会等名 The 8th International Symposium of Gunma University Initiative for Advanced Research satellite workshop (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hiro Sato
2. 発表標題 Current status of radiotherapy combined with immune checkpoint inhibitors
3. 学会等名 18th Asian Oceanian Congress of Radiology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hiro Sato, Tiara Bunga Mayang Permata, Wenchao Gu, Kakoti Sangeeta, Takahiro Oike, Takaaki Yasuhara, Takashi Nakano, Tatsuya Ohno, Atsushi Shibata
2. 発表標題 Regulation of DNA damage signal-dependent PD-L1 upregulation in cancer cells after ionizing irradiation
3. 学会等名 The ASTRO 2020 Annual Meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020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

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