

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K22587

研究課題名（和文）線治療はなぜ効くのか？—がん免疫から迫る—

研究課題名（英文）Why does alpha-ray therapy work? Approaching the question from the viewpoint of cancer immunity

研究代表者

小川 美香子 (Ogawa, Mikako)

北海道大学・薬学研究院・教授

研究者番号：20344351

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：まずX線による外照射によるがん免疫の検討を行った結果、X線外照射は腫瘍内の免疫の活性化一時的に低下させるものの、その後がん免疫の活性化を誘導することが示唆された。標識RGDペプチドでの検討では、¹¹³I-131標識体に比較し²¹¹At-211標識体では免疫賦活時に放出されるCalreticulinがより多く放出されるという結果を得ている。一方、細胞への²¹¹At-211標識体の取り込み量とCalreticulinの放出量には相関を認めていない。これは、細胞の中へ取り込まれた²¹¹At-211標識薬剤は、細胞膜を破壊する効果が高くないことを示唆しているものと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

線核医学治療への期待が世界的に高まっている。これは、臨床で見られた治療効果の高さによるが、その理由がわかっていない。本研究では、がん免疫に着目し、線の治療効果について検証し、免疫賦活の可能性を示した。さらに、²¹¹At-211による標識薬剤の合成に成功し、今後の線核医学治療の展開へ向けて一助になるものと考ええる。

研究成果の概要（英文）：First, we examined cancer immunity induced by external irradiation with X-rays. The results suggest that external irradiation with X-rays temporarily reduces the activation of immunity in tumors, but subsequently induces the activation of cancer immunity. We synthesized ²¹¹At-211-labeled RGD peptides and examined cell death. We have previously shown that the ²¹¹At-211-labeled peptide releases more calreticulin upon immune activation than the ¹¹³I-131-labeled peptide. On the other hand, no correlation was observed between the amount of ²¹¹At-211 labeled material taken into cells and the amount of Calreticulin released. This may suggest that the ²¹¹At-211-labeled drug taken into the cell is not highly effective in disrupting the cell membrane.

研究分野：分子イメージング

キーワード：線 核医学治療 がん免疫

1. 研究開始当初の背景

古くから ^{223}Ra を用いたがん骨転移の線治療が行われていたが、広く臨床で使われているとは言いがたい。従来、放射性同位元素を用いた標的化内用療法は線放出核種により行われてきたが、最近、がん細胞を標的化した線治療が再注目されている。例えば、前立腺がんに対する治療において、線放出核種である ^{177}Lu により標識された PSMA による標的化治療では効果が無かった患者さんにおいて、線放出核種である ^{225}Ac 標識 PSMA では治療効果が認められたことが報告されているなど[Clemens et al. J Nucl Med 2016;57:1941-1944.] (図 1) 線放出核種の治療効果がこれまで基礎実験で予想されていたより高いことが臨床で示されつつある。

高 LET 放射線である線は、一回の崩壊で与えるエネルギーは大きいが飛程が短く障害を与える範囲が小さい。そこで、線による治療のほうが周囲のがん細胞を同時に治療できるため固形がんでの効果が高いと考えられていた。しかし最近の結果はこれに反する。

また、放射線治療において、古くから abscopal effect が知られている。これは、放射線が当たっていない部位の腫瘍が小さくなるというものであり、主に外照射において見られる現象である。サイトカインの放出などによる炎症反応惹起が起因とされている bystander effect と異なり、最近、abscopal effect にはがん免疫が関与すると考えられ始めている。免疫チェックポイント阻害薬と放射線の外照射の組み合わせが abscopal effect を効果的に生み出すことが報告されていることから、がん免疫の関与が予測される。

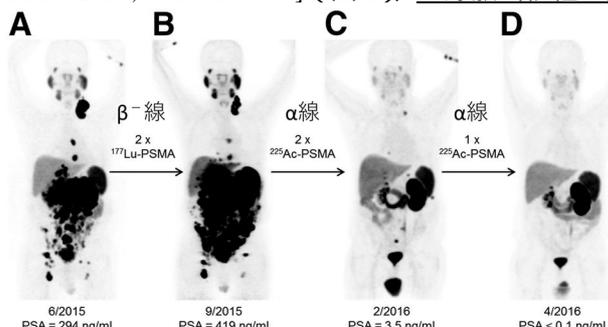


図 1 前立腺がんに対する線治療後に線治療が行われた例 ([^{68}Ga]PSMA-11 による PET イメージング) ^{177}Lu -PSMA (線) では効果が認められなかったが (A, B) ^{225}Ac -PSMA (線) では効果が認められた (B, C, D)。 Clemens et al. J Nucl Med 2016;57:1941-1944.

2. 研究の目的

線は線に比較し飛程が短い。つまり、線治療ではがん細胞の周囲にある T 細胞・樹状細胞などの免疫細胞を巻きこみ死滅させる可能性があるが、線治療では放射線標識薬剤が結合したがん細胞のみに影響を与えるのではないかと発想した。すなわち、標的化治療ではがん免疫が活性化していることにより、大きな治療効果が現れているのではないかと考え、線治療とがん免疫の関連について検討することを本研究の目的とする。

3. 研究の方法

3-1. X線外照射によるがん免疫の検討

研究方法として重要な点は、ヌードマウスなどの免疫不全マウスではなく、免疫が保たれているマウスを用いることにある。本検討では、BALB/c マウス (8 週齢、オス) に、マウス結腸由来細胞である CT26 (5×10^5 cells) を皮下移植して作製した担癌マウスを用いた。腫瘍体積が約 50 mm^3 または約 200 mm^3 に達した時点を目 0 とし、以下の検討を行った。

(1) 腫瘍体積約 50 mm^3 の群では、Day 0, 1, 2, 3, 4 にそれぞれ 2 Gy/回 (合計 10 Gy) の X 線を、医療用リニアック (Varian) を用いて腫瘍に照射した。また、X 線の単独照射だけでは、がん免疫が十分に活性化されないこともあるため、免疫チェックポイント阻害療法である抗 PD-1 療法と X 線治療を併用した検討も行った。抗 PD-1 抗体は、Day 0, 2, 4 にそれぞれ 250 μg 腹腔内投与した。Day 11 にマウスを安楽死させて腫瘍および脾臓を摘出し、フローサイトメトリーによって、CD4 陽性細胞 (CD45 $^+$ CD4 $^+$)、CD8 陽性細胞 (CD45 $^+$ CD8a $^+$)、樹状細胞 (CD11c $^+$ IA/IE $^+$) の数を解析した。

(2) 腫瘍体積約 200 mm^3 の群では、Day 0, 1, 2, 3 にそれぞれ 2 Gy/回 (合計 8 Gy) の X 線を照射した。抗 PD-1 抗体は、Day 0, 3 にそれぞれ 250 μg 腹腔内投与した。Day 4 および 10 にマウスを安楽死させて腫瘍を摘出し、フローサイトメトリーによって、腫瘍に浸潤する CD4 陽性細胞 (CD45 $^+$ CD4 $^+$)、CD8 陽性細胞 (CD45 $^+$ CD8a $^+$)、樹状細胞 (CD11c $^+$ IA/IE $^+$)、マクロファージ (CD11b $^+$ F4/80 $^+$) の数を解析した。

3-2. 線標識薬剤によるがん免疫の検討 (線標識薬剤との比較)

本検討では、脳腫瘍など一部のがん細胞において高い発現が認められるインテグリンを標的とし、インテグリンに高い親和性があることが知られている RGD ペプチドを用いた。線と線

の比較のため、RGD ペプチドの At-211 標識体および I-131 標識体を合成した。

合成した At-211 標識 RGD ペプチドを用いて、培養がん細胞においてがん免疫の検討を行った。ヒトグリオーマ由来細胞である U87MG、マウス大腸がん由来細胞である MC38 および CT26 細胞を用いた。まず、標識ペプチドの細胞への取り込み量を検討するため、細胞に^[211At]At-c(RGDfK) または^[131I]I-c(RGDfK) を 10 kBq/mL の濃度で添加し、1 h または 8 h インキュベートした。その後、細胞を回収し、カウンターを用いて放射能を測定した。細胞溶解液をタンパク定量することで、取り込み量を%ID/mg protein として算出した。なお、10 倍および 100 倍濃度の未標識 RGD ペプチドを培地に添加することで阻害実験を行った。

続いて、細胞死に関する検討を行った。各細胞に^[211At]At-c(RGDfK) または^[131I]I-c(RGDfK) を 80 kBq/mL の濃度で添加し、1 h インキュベートした。細胞を回収し、Immunogenic cell death のマーカーである Calreticulin を、フローサイトメトリーを用いて解析した。同時に、死細胞マーカーとして知られるヨウ化プロピジウム (Propidium iodide; PI) を用いた染色も行った。また、細胞の Immunogenic cell death が誘導された場合、培地中に ATP が放出されることが知られている。そこで、ルシフェリン ルシフェラーゼ反応による発光が ATP 依存性であることを利用したアッセイによって、培地中の ATP の濃度を測定した。

3-3. 線標識薬剤合成に関する検討

我々は最近、アリアルヨードニウムイリドと揮発性の低い At-211 アニオンを用いた標識合成を開発した[Matsuoka K, Obata H, Nagatsu K, Kojima M, Yoshino T, Ogawa M, Matsunaga S. Transition-metal-free nucleophilic 211At-astatination of spirocyclic arylidonium ylides. Org Biomol Chem. 2021 Jun 30;19(25):5525-5528]。線によるがん免疫の活性化を明らかにするためには、複数のがん細胞への集積量や細胞内局在が異なる At-211 標識薬剤を用い、細胞傷害性を比較して検討することが有効であると考えられる。我々が開発した、At-211 アニオンを用いた標識合成法が様々な標識化合物の合成に適用できるか検討するため、アリアルヨードニウムイリド構造を持つ種々の標識前駆体を合成した。塩基 Et₄NHCO₃、還元剤 PPh₃ 存在下、DMF 溶媒中 100 °C で At-211 アニオンと反応させ、標識合成の検討を行った。

また、固相法での At-211 標識を目指し、モデル化合物としてキノリン構造をもつヨードニウムイリドをポリスチレン樹脂に担持した前駆体を用いた At-211 標識反応の検討を行った。さらに、本邦にて最近治験が開始された meta-^[211At]astato-benzylguanidine (²¹¹At-MABG) について、固相法での標識合成を検討した。溶媒として CH₃CN および DMF を用い、塩基 Et₄NHCO₃、還元剤 PPh₃、ラジカル補足剤 TEMPO、樹脂の量、反応温度・時間の検討を行った。各反応は TLC または HPLC で分析した。

4. 研究成果

4-1. X 線外照射によるがん免疫の検討

線源の入手を模索する間、X 線による外照射によるがん免疫の検討を行った。まず初年度は、腫瘍体積 50 mm³ の担癌マウスを用いて、腫瘍内の免疫細胞の変動を検討した。その結果、X 線単独照射群ならびに X 線と抗 PD-1 療法の併用群において、CD8 陽性細胞の顕著な増加を認めた。さらに、脾臓内の CD8 陽性細胞も増加していた。CD4 陽性細胞については有意な差が認められなかったが、X 線照射によって浸潤量が増加する傾向にあった。一方、免疫チェックポイント阻害薬である抗 PD-1 抗体の治療単独では、本実験条件においては、腫瘍内のこれらの細胞の浸潤量に変化は認められなかった。

しかし、以上の条件では、治療開始時の腫瘍が小さすぎたこと (50 mm³)、また、X 線の線量が高すぎたことで腫瘍が治療によってほぼ消失してしまい、フローサイトメータなどによるがん

免疫のアッセイがほとんど行えなかった。そこで次に、腫瘍体積が 200 mm³ に達してから X 線を照射することとし、また、照射量も 10 Gy から 8 Gy (2 Gy × 4 回) に下げて検討を行った。4 回の X 線治療が終了した翌日である Day 4 において、腫瘍内の免疫細胞の数を解析した結果、非治療群と比較して抗 PD-1 療法単独群では、CD8 陽性 T 細胞、CD4 陽性 T 細胞、樹状細胞の数が有意に増加した (図 2)。しかし、X 線を照射した群である、X 線照射単独群、X 線治療と抗 PD-1 療法の併用群では、これ

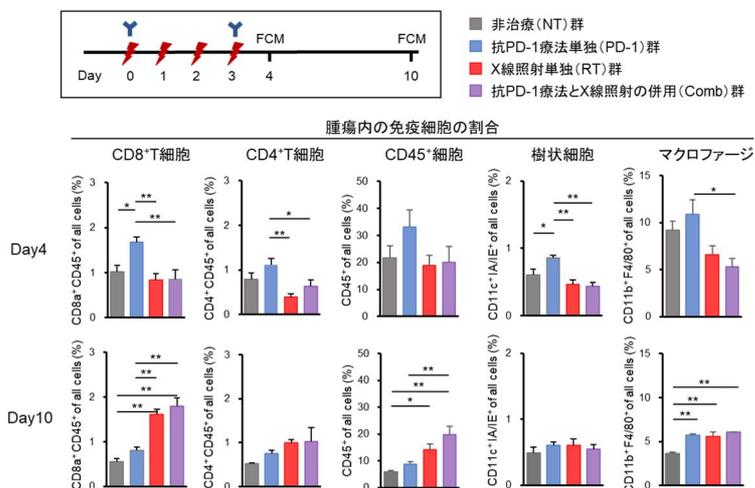


図 2 X 線外照射によるがん免疫の検討
Day 4 では、X 線を照射した群で免疫細胞の増加が認められなかったが、Day 10 では併用群で免疫細胞の増加が顕著に認められた。

らの免疫細胞の浸潤量の増加は認められなかった。すなわち、X線外照射により、腫瘍組織内の免疫活性が一時的に低下することが示唆された。続いて、治療終了後1週間後のDay 10にも同様の解析を行った。その結果、CD8陽性T細胞の数が、非治療群や抗PD-1療法単独群と比較して、X線治療を行った群で有意に高かった。なお、汎免疫細胞マーカーであるCD45陽性細胞についても、CD8陽性T細胞と同様の傾向が認められた。また、マクロファージは、Day 4では併用群で減少していたが、Day 10では非治療群と比較して他3群で増加していた。放射線照射により免疫原性が高まった際に腫瘍のPD-L1の発現が増加するとの報告があることを踏まえ、免疫組織染色によりPD-L1の発現を評価したが、顕著な変化は認められなかった。

以上の結果から、X線外照射は腫瘍内のがん免疫の活性化一時的に低下させるものの、その後がん免疫の活性化を誘導することが示唆された。これは、X線治療が腫瘍内の免疫細胞に一時的に障害を与えるものの、がん細胞のImmunogenic cell deathを誘導したためと考えている。

4-2. 線標識薬剤によるがん免疫の検討（線標識薬剤との比較）

当初、線源としてAc-225を、線源としてY-90を用いた、放射性標識抗体による治療を利用し線種の違いによる免疫へ与える影響の違いを検討する予定であったが、Ac-225の入手がまだしばらく困難であることが分かったため、線源としてAt-211を線源としてI-131を用いる計画に変更した。さらに、半減期の問題から体内動態が遅い抗体ではなく、ペプチドを用いることとし、RGDペプチドを選択した。

初年度は、RGDペプチドの標識条件についての検討を開始した。まず、I-131標識体の合成のため、I-125での事前検討を行った。1-stepでの標識に失敗したため、2-stepでの標識に変更したところ、合成に成功した。続いて、At-211標識RGDペプチドの合成を検討し、高効率で標識を行えることを確認した。

合成した $[^{211}\text{At}]\text{At-c(RGDfK)}$ および $[^{131}\text{I}]\text{I-c(RGDfK)}$ を用いて、培養細胞における検討を行った。まず、U87MG、MC38、CT26細胞に $[^{211}\text{At}]\text{At-c(RGDfK)}$ を添加し、取り込み量を測定した。各細胞へのAt-211の取込量は、2.41%Dose/mg protein(U87MG)、0.66%Dose/mg protein(MC38)、0.64%Dose/mg protein(CT26)となった。100倍量の阻害剤添加時には取込量が0.25%Dose/mg protein(U87MG)、0.23%Dose/mg protein(MC38)、0.22%Dose/mg protein(CT26)と抑制されたことから、各細胞へのAt-211の取込は、RGD配列を認識するインテグリンに依存し、U87MGでインテグリンの発現量が高いことが示された(図3)。

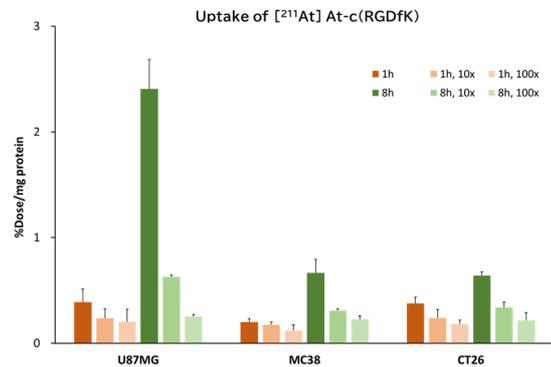


図3 U87MG, MC38, CT26細胞への $[^{211}\text{At}]\text{At-c(RGDfK)}$ の取り込み。

将来的に、マウス同種移植モデルを用いてインビボで評価することを考慮し、MC38細胞を用いて細胞傷害性に関する検討を行った。その結果、 $[^{211}\text{At}]\text{At-c(RGDfK)}$ を80 kBq/mLを添加した場合にPI陽性の死細胞が有意に増加した($p < 0.001$)。また、Calreticulinの増加も認められ(約1.4倍 vs. 0 kBq/mL添加群)、Immunogenic cell deathを介して免疫の活性化が起こり得ることが示唆された。比較のためI-131標識体での検討も行ったが、1.6 MBq/mLであっても細胞死は認められなかった($p = 0.79$ vs. 0 MBq/mL添加群)。なお、Calreticulinの増加はわずかに認められた(図4)。一方で、培地中へのATPの放出は、 ^{211}At 標識体、 ^{131}I 標識体いずれの場合でも認められなかった。

以上、At-211標識RGDペプチドを合成し、細胞死について検討を行ってきた。これまでに、I-131標識体と比較しAt-211標識体では免疫賦活時に放出されるCalreticulinがより多く放出されるという結果を得ている。一方、細胞へのAt-211標識体の取り込み量とCalreticulinの放出量には相関を認めていない。これは、細胞の中へ取り込まれたAt-211標識薬剤は、細胞膜を破壊する効果が低いことを示唆しているものと考えられる。

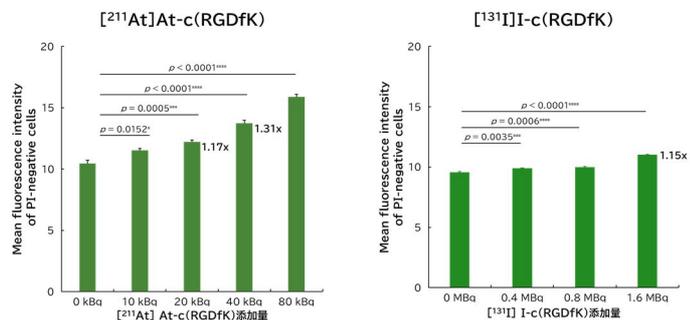


図4 $[^{211}\text{At}]\text{At-c(RGDfK)}$ または $[^{131}\text{I}]\text{I-c(RGDfK)}$ を細胞に添加した際のCalreticulinの変化。

4-3. 線標識薬剤合成に関する検討

また、安全なAt-211標識を目指し、揮発性の低いAt-211アニオンを用いた標識合成について検討

討を行った。初年度は、アリアルヨードニウムイリドを前駆体として還元型 At-211 を利用し、還元型 At-211 を利用した新規標識法を開発した。

この結果、90%以上の標識率にて標識可能な前駆体の開発に成功した。??
本年度はさらに多くの化合物へ展開し、9種類の化合物の標識合成に成功した。

また、樹脂を使った固相での標識合成も検討した。At-211 は非常に揮発性が高く、また、線放出核種であるため取り扱いに大きな注意が必要であるが、固相を使った合成が可能となれば、カートリッジなど閉鎖系での標識が達成される。まず、モデル化合物としてキノリン構造をもつヨードニウムイリドをポリスチレン樹脂に担持させ、前駆体を合成した。塩基 $\text{Et}_4\text{NHC}_3\text{O}_3$ 、還元剤 PPh_3 存在下、DMF 溶媒中 100 °C で At-211 アニオンと反応させたところ、放射化学的収率 53% で目的化合物が得られた。

さらに、ヨードニウムイリドを用いた固相法によって、 ^{211}At -MABG の標識合成を行った。まず、樹脂量を 10 mg、温度 100 °C、反応時間 60 min に固定し、 CH_3CN または DMF 溶媒中で、塩基 $\text{Et}_4\text{NHC}_3\text{O}_3$ および還元剤 PPh_3 が反応性に与える影響を検討した。その結果、どちらの溶媒でも、塩基のみを加えた条件で最も高い放射化学的収率が得られ、特に CH_3CN 中で高い反応性が認められた。さらに、ラジカル補足剤である TEMPO を加えることで前駆体の分解が抑えられ、収率が向上した。同反応条件で樹脂を 20 mg 用いて反応を行ったところ、放射化学的収率 53.6% で ^{211}At -MABG-Boc が得られた。なお、反応時間を短くしたり、反応温度を下げたりすることで、放射化学的収率は低下した。Boc 基の脱保護は TFA を用いることで収率 99.5% 以上で進行した。脱保護反応後、陽イオン交換樹脂を用いて精製し、溶液を HPLC で分析した結果、 ^{211}At -MABG の放射化学的純度は 98.5% であった。すなわち、At-211 アニオンとヨードニウムイリドを用いた固相法によって、 ^{211}At -MABG の標識合成を達成できたと言える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Matsuoka Keitaro, Obata Honoka, Nagatsu Kotaro, Kojima Masahiro, Yoshino Tatsuhiko, Ogawa Mikako, Matsunaga Shigeki	4. 巻 -
2. 論文標題 Transition-metal-free nucleophilic ²¹¹ At-astatination of spirocyclic arylidonium ylides	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Organic and Biomolecular Chemistry	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） 10.1039/d1ob00789k	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小川 美香子
2. 発表標題 がん免疫を考慮した放射線治療の可能性
3. 学会等名 アイソトープ協会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小川 美香子
2. 発表標題 線内用療法と免疫に関する最新の知見
3. 学会等名 第61回核医学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小川美香子
2. 発表標題 光免疫療法の特徴と放射免疫療法との違い
3. 学会等名 日本核医学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 芳香族アスタチン化合物の製造方法	発明者 松永茂樹、吉野達彦、松岡慶太郎、小川美香子	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2021/006133	出願年 2021年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 芳香族アスタチン化合物の製造方法	発明者 松永茂樹、吉野達彦、松岡慶太郎、小川美香子	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2020-208367	出願年 2020年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔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	東川 桂 (Higashikawa Kei) (10756878)	北海道大学・アイソトープ総合センター・助教 (10101)	

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
---------	---------