

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16811

研究課題名(和文)放射線治療とメソポーラスシリカ粒子の併用による抗腫瘍免疫活性化メカニズムの解明

研究課題名(英文) Analysis of the Mechanism of Tumor Immunomodulation through the Combination of Radiotherapy and Mesoporous Silica Particles

研究代表者

孫 略 (Sun, Lue)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究員

研究者番号：40757704

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：「多孔シリカとX線の併用はX線単独より腫瘍増殖を抑制する」ことを確認したが、バラツキが大きく、有意な差は得られなかった。また、マウスの脾臓のサイトカイン量を解析したところ、腫瘍の増殖遅延が著しくみられたマウスでは、抗腫瘍免疫に関わるようなサイトカイン(INF- γ)の量が増加していた。シリカ投与直後の血漿中サイトカイン量を測定してみると、炎症系サイトカインであるIL-6の量が増加していた。IL-6は腫瘍の増殖促進方向に働くことが知られている。我々が用いたシリカでは、腫瘍免疫のアクセルとブレーキの両方に作用し、そのバランスの制御が難しい可能性が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

患者負担が少ない放射線治療の治療効果を上げることは、臨床上の意義が高いと考えられる。メソポーラスシリカは工業分野だけでなく、医学利用に関しても多く研究が行われており、ドラッグデリバリーの担体やがんワクチンアジュバントとしての利用が検討されている。本研究は、メソポーラスシリカと放射線治療の併用についての基礎研究であり、メソポーラスシリカの持つ免疫調節機能の一部を明らかにした。本研究に引き続き、工夫されたメソポーラスシリカの利用やその他微粒子の利用による放射線治療効果向上に関する研究が行われることを期待する。

研究成果の概要(英文)：We found that the combination of mesoporous silica and X-irradiation suppress tumor growth more effectively than X-irradiation alone, although there was significant variability and no statistically significant difference was observed. Further, we analyzed cytokine levels in the mouse spleen and we found an increase in interferon-gamma (INF- γ), a cytokine associated with anti-tumor immunity, particularly in mice showing significant tumor growth delay. We observed that administration of mesoporous silica resulted in an increased level of interleukin-6 (IL-6) following X-ray irradiation. The mesoporous silica used in our study appears to exert both accelerating and inhibitory effects on tumor immunity, making it challenging to control the balance between the two.

研究分野：放射線生物学

キーワード：放射線治療 無機材料 抗腫瘍免疫

1. 研究開始当初の背景

放射線治療はがんの三大治療の一つであり、本邦の患者数は28万人/年、全がんに対する放射線治療適応率は23.7%と推定されている。しかしながら、放射線治療を行ってもなお局所再発が起きる事例や副作用が強く出てしまうケースがあり、放射線治療の高度化(効果を高く、副作用を小さく)に関する臨床ニーズは高い。一方で、近年、放射線治療ががん細胞を殺す治療から免疫を活性化させる治療へと認識が改められつつある。例えば、放射線治療によってがん細胞に複雑なDNA損傷が蓄積することで、変性したDNAやたんぱく質が増加し、より免疫細胞に認識されやすくなることが報告されている(Uchihara et al., Mol Cell, 2022)。事実、放射線治療では複数のがん病巣がある患者さんで照射していない病巣も退縮する「アブスコパル効果」と呼ばれる現象が報告されており、これは免疫系の活性化が関与していることが報告されている。しかしながら、アブスコパル効果は極めて稀な現象であるし、放射線治療では同時に免疫抑制環境を促進することが報告されている(Weichselbaum et al., Nat Rev Clin Oncol, 2017)。そのため、“放射線治療後の免疫環境を如何に制御するか”ということが放射線治療の高度化の重要なポイントを握っているのではないかと我々は考えている。

一方で、放射線治療の効果を増強する「放射線治療増感剤」の研究が古くから行われてきた。しかしながら、多くが基礎研究レベルにとどまり、承認されて臨床で使用できる製品はほとんど無い。例えば、TH-302 (evofosafamide)は低酸素がん細胞の放射線増感剤として非臨床試験では好成績を収めたが(Peeters et al., Clin Cancer Res, 2015)、臨床試験では効果が認められずに取り下げられた(Mistry et al., IJROBP, 2017)。mTORの阻害薬のEverolimusは、非臨床試験では放射線増感作用を示したが、臨床試験では再現できなかった(Mauceri et al., Oncol Rep, 2001; Ma et al., Neuro Oncol, 2014)。このように動物実験と臨床試験の結果が乖離する原因として、動物実験でヒトがん細胞+免疫不全マウスを使用したために腫瘍免疫に与える影響を十分に調査できなかったのではないかと我々は考えている。

近年、金ナノ粒子を始めとした無機成分を薬効成分とした放射線増感剤の研究が数多く進められている。特にNanobiotix社が開発した酸化ハフニウムを薬効成分とする放射線増感剤NBTXR3を様々ながんで適応すべく臨床研究を進めている。メソポーラスシリカとは、1~数十nmの大きさの孔(メソポア)を多数持つ多孔性シリカ(二酸化ケイ素(SiO₂))であり、吸着材、触媒担体、ナノ空間反応場などとして利用されている。医療では、薬物輸送の担体やがんワクチンのアジュバントとしての利用可能性を示唆する論文が発表されている。我々は放射線治療によって生じた変性DNA、たんぱく質、またはその他サイトカインなどを吸着することで、放射線治療後のがん免疫を活性化できるのではないかと考えて本研究を計画した。

2. 研究の目的

本研究ではメソポーラスシリカが放射線治療効果を増強するか否か、増強するとしたらどのようなメカニズムか、検討した。メソポーラスシリカの生体に対する安全性について検討した。

3. 研究の方法

メソポーラスシリカは、市販品(シグマアルドリッチ、805890、粒径500nm、ポアサイズ~2nm)または自家合成品を使用した。メソポーラスシリカ粒子は、生理食塩水または培地中で超音波(40分)により分散させた。市販品の物性についてはXRD解析と走査型電子顕微鏡観察を行った。

H1048細胞をRPMI1640(10%FBS+1%PS)培地で培養した。粒子投与24時間後にX線照射し、その直後にトリプシンで剥がして、コロニー形成アッセイを行った。

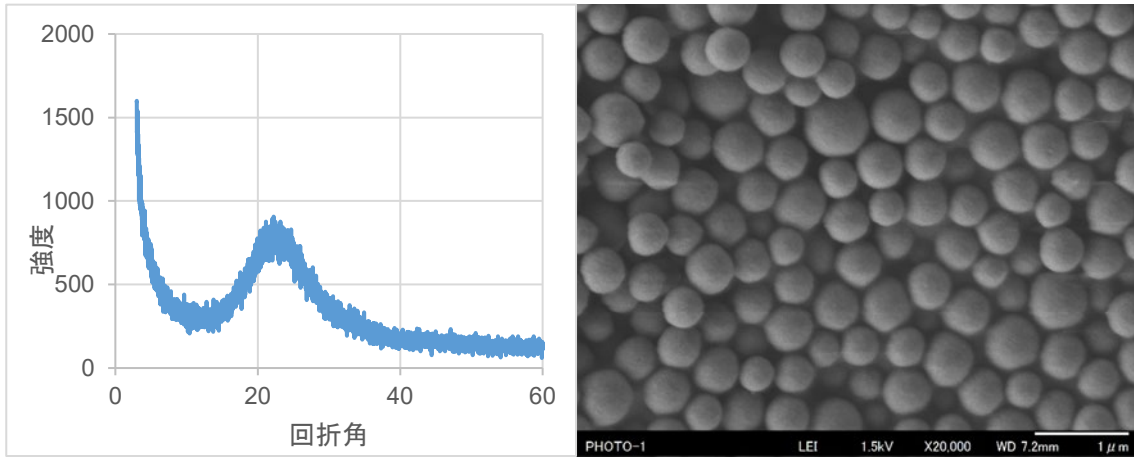
マウスから採血した全血(ヘパリン)と生理食塩水中に分散させたメソポーラスシリカを混合し、37℃で4時間静置後、遠心処理によって血漿を分離、血漿を570nmの吸光後で測定して溶血状況の評価した。

CT26細胞を同系マウスに移植10日後(腫瘍サイズ約50mm³)に、腫瘍局所に6Gy照射し、経時的に腫瘍サイズを測定した。メソポーラスシリカは照射翌日、3日後、5日後の3回投与した。安楽死時に、脾臓を摘出し、脾臓内のIFN- γ 量を測定した。

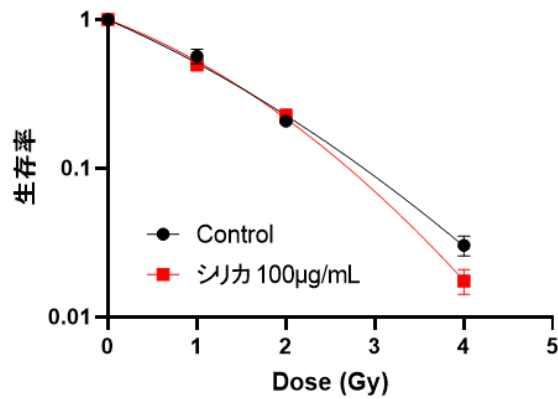
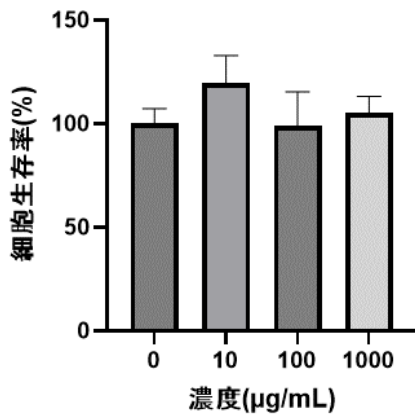
CT26細胞を同系マウスに移植10日後に、腫瘍局所に6Gy照射し、翌日にメソポーラスシリカを投与し、その3時間後に採血し、血漿中の炎症性サイトカイン量をBD Cytometric Bead Arrayにより解析した。

4. 研究成果

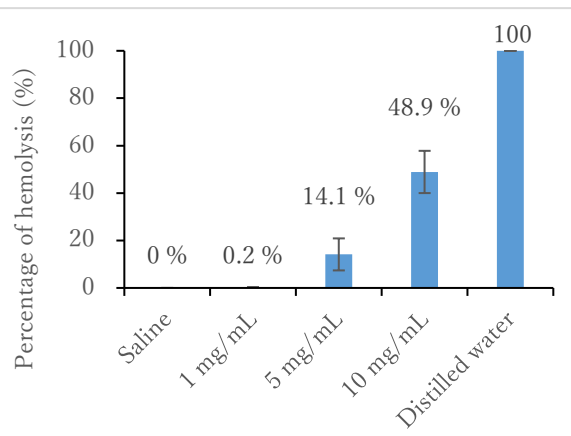
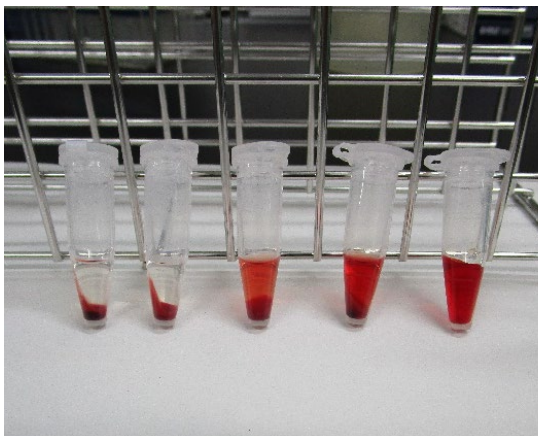
市販メソポーラスシリカのXRD結果と電顕写真を下に示す。XRDからアモルファスであることが分かる。電顕写真から綺麗な球形でサイズもある程度そろっているが、粒径が規定の500nmより小さいことが分かった。



メソポーラスシリカの濃度を振って、コロニー形成アッセイにより評価した毒性を示す(放射線は照射なし)。1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (の24時間接触)でも細胞生存率に影響を及ぼさないことが分かった(下)。医学応用上1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ より高い濃度の試験は不要であると考えた。次にメソポーラスシリカの濃度を100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に設定し、放射線量を振って、コロニー形成アッセイにより放射線増感能を解析した。4Gyでは、投与群で生存率が低く($p=0.021$)、程度は小さいが放射線増感能を示した(下)。

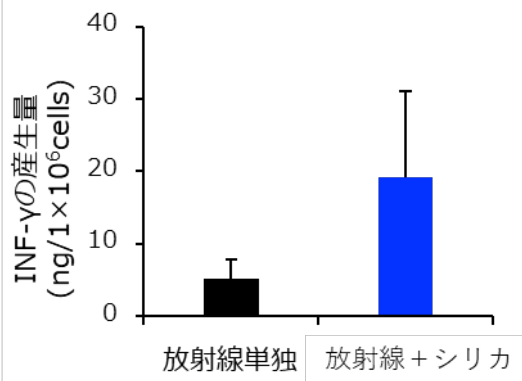
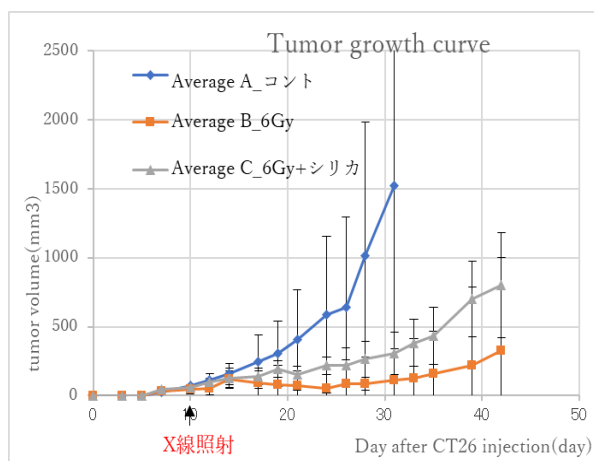


溶血試験の結果(下)、1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下では溶血が発生せず、*in vitro* 毒性試験と一致した。

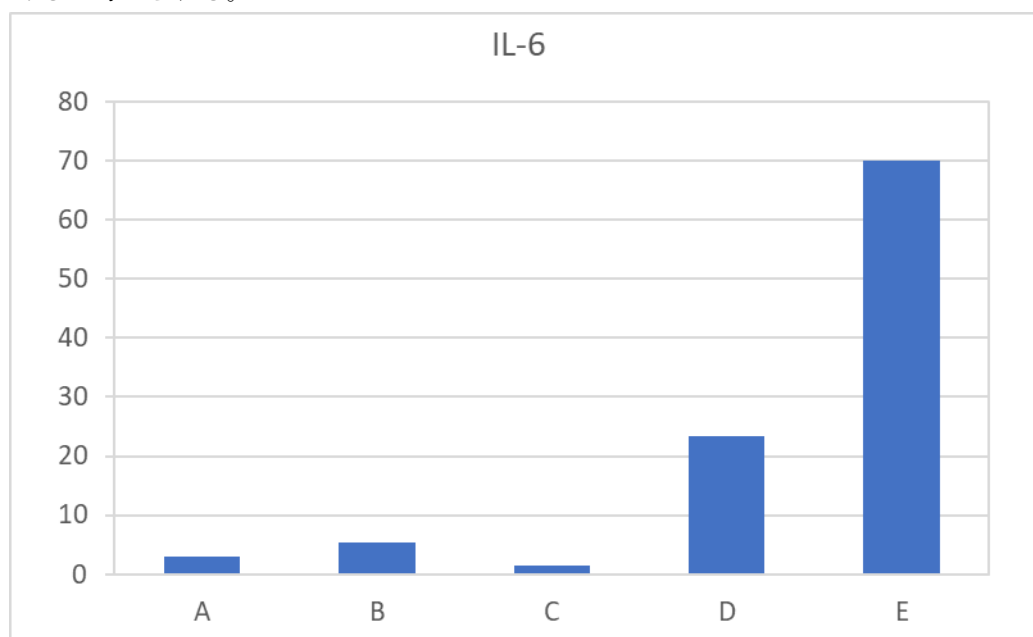


腫瘍増殖曲線を下に示す。コントロールは処置(照射、粒子投与共に)なし群となる。併用群は単独群より腫瘍増殖が抑制される傾向にあった。使用したCT26細胞は免疫原性が強く、放射線治療に対する反応(腫瘍増殖の変化)にマウスの個体差等によるバラツキが大きく出た。実験終了時にマウスから脾臓を摘出し、がん免疫促進サイトカインの代表格であるIFN- γ 量を測定したところ、併用群で増加していた(下)。特に、腫瘍サイズが小さいマウスほどIFN- γ 量が高くなる傾向があり、同一群内でバラツキが大きかった。なお、粒子の濃度や投与スケジュール、線量を振って検討したが、おおよその結果は変わらなかった。さらに、免疫を賦活化するため、アンサーやAH1(CT26の抗原ペプチド)を加えた3者併用も試験したが、大きく治療効果をも高める結

果は得られなかった。



ナノ粒子等の異物が体内に入ると炎症を起こすことが知られており、炎症は免疫促進にも抑制にも働く。そこで、メソポーラスシリカが炎症を修飾するか否か調べるため、炎症関連サイトカイン量を解析した。IL-4、IL-6、MCP-1、IL-10、IL-1 β 量を解析したところ、特にIL-6量が放射線とシリカの併用で増加していた(下図 A: 処置なし、B: シリカのみ、C: 照射のみ、D: 照射+シリカ、E: 照射+シリカ 10倍)。IL-6は抗腫瘍免疫を抑制することが報告されており、放射線治療にメソポーラスシリカを併用した場合、IFN- γ 増加という抗腫瘍免疫を亢進する面とIL-6増加という抗腫瘍免疫抑制面の両方が発生するいわば、アクセルとブレーキの同時踏みであると考えられる。



なお、メソポーラスシリカの今後の医薬品応用のために非臨床の生体安全性についてまとめた。
<https://link.springer.com/article/10.1007/s10856-021-06582-y>

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------