

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 1 月 14 日現在

機関番号：82502

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591624

研究課題名（和文）難治性癌に対する重粒子線治療の転移抑制作用の解明

研究課題名（英文）To elucidate the immune activity of heavy ion irradiation in inhibiting lung metastasis in treatment-resistant cancer

研究代表者

山田 滋（YAMADA SHIGERU）

独立行政法人放射線医学総合研究所・重粒子医科学センター病院・室長

研究者番号：80311380

研究成果の概要（和文）：重粒子線照射により免疫監視細胞である TLR(Toll like receptor)を有するマクロファージ、樹状細胞、マスト細胞が癌細胞を認識されやすなり、それらの細胞から分泌されるサイトカインである TNF α あるいは IL-12 の産生を増加させることで NK 細胞が活性化され、さらに NK 細胞から分泌される IFN- γ の産生を増加し、さまざまな細胞性免疫機構が活性化され転移巣に対する抗腫瘍作用がおこることが示された。

研究成果の概要（英文）：The cell mediated immunity mainly on the NK-cell was activated by heavy-ion particle radiation, and the suppression of metastases was induced by the activation. Heavy-ion particle radiation induced monitoring cells such as a macrophage, dendritic cells or the mast cells which had TLR(Toll like receptor) to recognize cancer cells easily, and an NK-cell was activated by increasing a production of TNF- α and IL-12 which were cytokines secreted by those cells more or IL-12 and increased a production of IFN - γ secreted more by an NK-cell, and it was shown that various cell mediated immunity mechanisms were activated, and the antitumor action for metastases was demonstrated.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科学臨床医学・放射線治療学

キーワード：①重粒子②転移③難治性がん

1. 研究開始当初の背景

放射線治療と転移の関係については長期にわたり議論されてきた。悪性リンパ腫・甲状腺癌などでは原発巣が縮小するに連れて転移巣も縮小する現象が認められ、ABSCOPAL効果として広く認識されている。これに対し、培養細胞を用いた基礎実験では膀胱癌・神経膠腫のような悪性度の高い癌細胞に亜致死線量のX線を照射すると転移能が高くなることが示されている(Qian LW: Int J Cancer 2003, Wild-Bode C: Cancer Res 2001)。これらはX線照射された癌細胞がマトリックス分解酵素(MMP)やインテグリンの活性を促進することが原因と考えられている。一方、Ogataらはマウス骨肉腫を用い、重粒子線照射された細胞のMMP活性が減少し浸潤能や遊走能が低下することを示している(Can. Res. 2005)。我々は2007年の重粒子線共同利用研究から、移植腫瘍を重粒子線で治療したマウスにおいては再移植の腫瘍生着率さらには肺転移形成率も著明に減少することを見いだした(共同利用報告書2007)。現在までの重粒子線治療の臨床試験からは、膀胱癌などの難治性癌に対しても高い局所制御率が示されている。今後の重粒子線治療の課題は遠隔転移の制御とされている。これら転移抑制の機序を解明し、腫瘍免疫の活性化を促進することで、副作用が軽微で有効な治療法の開発が可能となり、転移率の高い難治性癌の治療戦略に極めて有用であると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、重粒子線による腫瘍の転移抑制作用について、マウス扁平上皮癌に対し定量的解析を行い、線量およびLETとの相関関係を明らかにし、さらに重粒子線治療による転移抑制作用機序を明らかにし新しい治療法の開発の基礎作りを行うことを目的とする。これらの効果を解明することは、今後の難治性癌に対する重粒子線治療の臨床試験の作成に極めて有用であると期待された。

3. 研究の方法

(1) 重粒子線の線質と転移抑制作用との関係の検討

扁平上皮癌SCCVII・NR-S1(高転移株)2種のC3Hマウス移植腫瘍に重粒子線(炭素イオン線)をLET等の線質を変えて照射し線量と線質と転移抑制作用との関係を検討した。重粒子線としては、既存の重粒子線加速器で作ら

れ現在治療に用いている炭素イオン線を使用した(図1)。

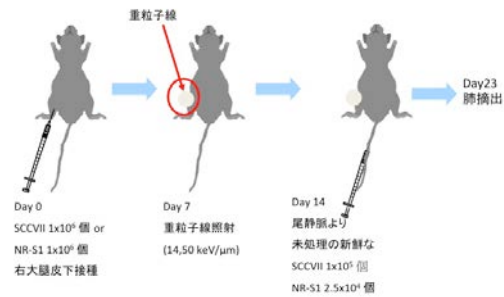


図1. 実験方法

(2) 転移抑制作用を発現する免疫エフェクター検討

上記の実験をBALB/c nudeマウスについて行う、LETの投与、転移巣の免疫組織染色等で免疫エフェクターとしての、T細胞・B細胞・NK細胞等の役割を確認した。

(3) 転移抑制作用を担う免疫系を明らかにするため、上記重粒子線照射したマウスの血液を採取しIL-2, 6, 12, INF- γ , TNF- α などのサイトカインの濃度変化をELISA法を用いて測定した。

4. 研究成果

(1) 2種類のマウス扁平上皮癌SCCVIIおよびNR-S1において下腿に移植した腫瘍に対し重粒子線照射を施行することにより、照射していない未治療の肺転移巣の増殖が抑制された(図2)。



図2. 重粒子線照射線量と肺転移個数との関係

(2) この肺転移抑制作用は重粒子線のLET(Linear Energy Transfer)および線量に

依存した。低 LET では転移抑制作用がわずかで、高 LET で抑制作用が著明に認められ高いほど大きくなった(図 3)。高 LET 線である重粒子線特有の作用であることが示された。さらに線量が高いほど抑制効果が高くなり、また腫瘍を移植していない下腿に照射しても抗腫瘍効果は認められなかったことから、重粒子線照射が腫瘍細胞に作用し抗腫瘍効果を誘導していると考えられた。

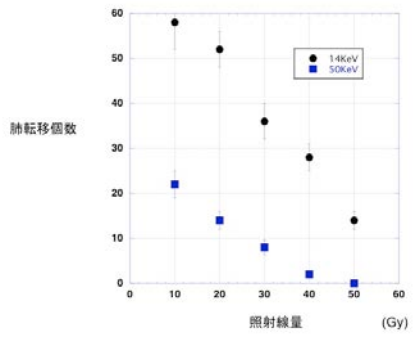


図 3. LET の差による SCCVII の肺転移個数と重粒子線照射との関係

(3) 転移巣に対する抗腫瘍効果の腫瘍特異性の有無を検討した。下腿に移植した SCCVII に重粒子線照射することにより未治療の異なる腫瘍である NR-S1 の肺転移巣の増殖が抑制された。また反対に下腿に移植した NR-S1 に重粒子線照射することにより SCCVII の肺転移巣の増殖が抑制された(図 4)。これより転移巣の増殖抑制作用は腫瘍特異性がないことが示された。

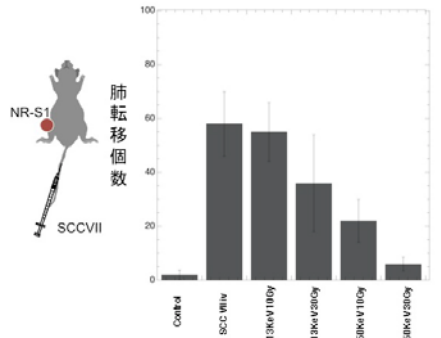


図 4. NR-S1 下腿移植後に SCCVII 静注した際の肺転移個数と重粒子線との関係

(4) 次に腫瘍の転移のどの過程において転移抑制が認められるのかを検討した。すなわちがん細胞の転移巣の血管外遊走、転移臓器への着床および転移巣の形成・増殖であるが、あらかじめ尾静脈から腫瘍細胞を静注し転移が形成されてから下腿に照射しても転移

巣にたいする抗腫瘍効果が認められたことから、直接腫瘍に対する抗腫瘍効果が誘導されていることが示された。

(5) 以上のことから免疫賦活化による抗腫瘍効果の誘導が示唆されたことから、免疫動態を解析した。ヌードマウスにおいても下腿に移植した SCCVII 腫瘍に対し重粒子線照射を施行することにより、未治療の肺転移巣の増殖が抑制された(図 5)。これらのことから T 細胞系ではない免疫系の関与が示唆された。

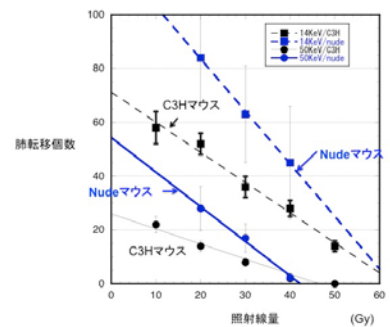


図 5. C3H と Nude マウスにおける SCCVII の肺転移個数と重粒子線照射との関係

(6) 肺転移巣の組織切片における免疫染色では CD19 抗体では control と発現に差がなく、CD11b 抗体では control よりやや発現が高く、B 細胞系統が関与している可能性は低く、マクロファージ、マスト細胞、NK 細胞の関与が示唆された。

(7) また、NK 細胞の作用を抑制する抗アシアロ GM1 抗体を照射したマウスに投与することで、この転移抑制作用が減少した。これらのことから NK 細胞が強く関与していることが示唆された(図 6)。

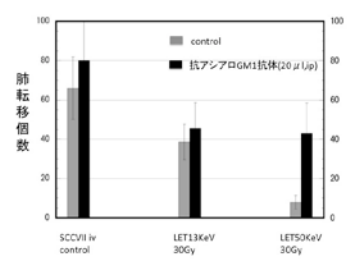


図 6. 重粒子線による SCCVII の肺転移抑制効果に対する抗アシアロ GM1 抗体の作用

(8) 重粒子線照射したマウスの血清中のサイトカインを測定した。TNF- α 、IFN- γ 、IL-12 はすべて重粒子線照射後に上昇していた。これらの結果から重粒子線照射により監視細

胞が分泌する TNF- α 、IFN- γ で NK 細胞が活性化し細胞傷害性を高めるのみならず、さらに IFN- γ を分泌しマクロファージ等を活性化することで免疫賦活化を引き起こしていると示唆された(図 7)。

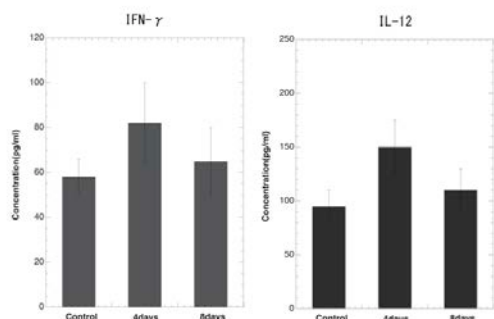


図 7. 重粒子線照射によるマウス血中サイトカイン濃度変化

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 13 件)

- Makoto Shinoto, **Shigeru Yamada**, Shigeo Yasuda et. al: Phase I trial of preoperative, short-course carbon-ion radiotherapy for patients with resectable pancreatic cancer, *Cancer*, 111(1), 45-51, 2013(査読有)
- Mayumi Fujita, Yoshimi Otsuka, Kaori Imadome, Satoshi Endo, **Shigeru Yamada**, Takashi Imai: Carbon-ion radiation enhances migration ability and invasiveness of the pancreatic cancer cell, PANC-1, in vitro, *Cancer Science*, 103(4), 677-683, 2012(査読有)
- Kazuhiko Oonishi, Xing Cui, Hirokazu Hirakawa, Akira Fujimori, Takehiko Kamijo, **Shigeru Yamada** : Different effects of carbon ion beams and X-rays on clonogenic survival and DNA Repair in human pancreatic cancer stem-like cells, *Radiotherapy and Oncology*, 105(2), 258-265, 2012(査読有)
- Mayumi Fujita, Yoshimi Otsuka, **Shigeru Yamada**, Mayumi Iwakawa, Takashi Imai: X-ray irradiation and Rho-kinase inhibitor additively induce invasiveness of the cells of the pancreatic cancer line, MIAPaCa-2, which exhibit mesenchymal and amoeboid motility, *Cancer Science*, 102(4), 792-798, 2011(査読有)
- Shigeru Yamada**, Makoto Shinoto, Satoshi Endo: Carbon Ion Radiotherapy for Patients with Locally Recurrent Rectal Cancer, *NIRS-ETOILE Joint Symposium on Carbon Ion Radiotherapy*, 2(NIRS-M-243), 54-59, 2011(査読無)
- Shinichiro Mori, Takeshi Yanagi, Ryusuke Hara, Sharp Gregory*, Hiroshi Asakura, Motoki Kumagai, Riwa Kishimoto, **Shigeru Yamada** et al: Comparison of Respiratory-gated and -ungated Planning in Scattered Carbon Ion Beam Treatment of the Pancreas Using Four-dimensional CT, *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 76(1), 303-312, 2010(査読有)
- Akinao Matsunaga, Yasuji Ueda, **Shigeru Yamada** et al: Carbon- Ion Beam Treatment Induces Systemic Antitumor Immunity Against Murine Squamous Cell Carcinoma, *Cancer*, 116(15), 3740-3748, 2010(査読有)
- MOBARAKI Abdulelah Hussain, Tatsuya Ohno, **Shigeru Yamada**, Hideyuki Sakurai*, Takashi Nakano: Cost-effectiveness of carbon ion radiation therapy for locally recurrent rectal cancer, *Cancer Science*, 101(8), 1834-1839, 2010(査読有)
- Tohru Okada, Tadashi Kamada, Hiroshi Tsuji, Junetsu Mizoe, Masayuki Baba, Shingo Kato, **Shigeru Yamada** et al: Carbon Ion Radiotherapy: Clinical Experiences at National Institute of Radiological Sciences (NIRS), *Journal of Radiation Research*, 51(4), 355-364, 2010(査読有)
- Hiroshi Imada, Hirotoshi Katou, Shigeo Yasuda, **Shigeru Yamada** etc al: Comparison of efficacy and toxicity of short-course carbon ion radiotherapy for hepatocellular carcinoma depending on their proximity to the porta hepatis, *Radiotherapy and Oncology*, 96(2), 231-235, 2010(査読有)
- Hiroshi Imada, Hirotoshi Katou, Shigeo Yasuda, **Shigeru Yamada** et al: Compensatory enlargement of the liver after treatment of hepatocellular carcinoma with carbon ion

radiotherapy-Relation to prognosis and liver function, Radiotherapy and Oncology, 96(2), 236-242, 2010(査読有)

12. Masayuki Kano, **Shigeru Yamada**, Isamu Hoshino et al: Effects of Carbon-ion Radiotherapy combined with a Novel Histone Deacetylase Inhibitor, Cyclic Hydroxamic-acid -containing Peptide 31 in Human Esophageal Squamous Cell Carcinoma, Anticancer Research, 29(11), 4433-4438, 2009(査読有)
13. Shinichiro Mori, Ryusuke Hara, Takeshi Yanagi, Sharp Gregory*, Motoki Kumagai, Hiroshi Asakura, Riwa Kishimoto, **Shigeru Yamada** : Four-dimensional Measurement of Intrafractional Respiratory Motion of Pancreatic Tumors Using a 256 multi-slice CT Scanner, Radiotherapy and Oncology, 92(2), 231-237, 2009(査読有)

[学会発表] (計 24 件)

1. **Shigeru Yamada**, Shigeo Yasuda, Koutaro Terashima: Clinical results on liver, rectum, and pancreas, Seminar on Carbon Ion Therapy, Penang, 2012. 12. 23
2. **山田 滋**, 寺嶋 広太郎, 篠藤 誠, 安田 茂雄: 局所進行膵癌に対する集学的治療の進歩-重粒子線治療の現状、第50回日本癌治療学会学術集会、横浜市、2012. 10. 26
3. 崔 星、上條 岳彦、**山田 滋**: 重粒子線による癌幹細胞を標的とした癌治療の基礎的研究、第55回日本放射線影響学会総会、仙台市、2012. 9. 6~8
4. Mayumi Fujita, **Shigeru Yamada**, Takashi Imai: Irradiation alters the invasive potential of human pancreatic cancer cell lines thorough Rac1 and RhoA activities, The 71st Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (JCA), Sapporo-shi, 2012. 9. 19~21
5. 遠藤 悟史、**山田 滋**、松原 久裕: 再発大腸癌に対して重粒子線治療を行い、abscopal effect を認めた2例、第67回日本消化器外科学会総会、富山市、2012. 7. 18~20
6. **山田 滋**、篠藤 誠、遠藤 悟史、安田 茂雄、今田 浩史、鎌田 正: 局所進行膵癌に対する重粒子線治療、第67回日本消化器外科学会総会、富山市、2012. 7. 18~20
7. 藤田 真由美、今留 香織、遠藤 悟史、荘司 好美、**山田 滋**、今井 高志: 炭素線照射後のヒト膵癌由来細胞株 MIAPaCa-2及びPANC-1の浸潤能変化とその機序、第21回日本がん転移学会学術集会・総会、広島市、2012. 7. 12~13
8. **Shigeru Yamada**, Makoto Shinoto, Koutaro Terashima, Shigeo Yasuda, Hiroshi Imada, Tadashi Kamada, Hirohiko Tsujii, Shinichiro Mori: Pancreas / Rectum, 51st Annual Meeting of Particle Therapy Co-Operative Group, ソウル, 2012. 5. 14~16
9. **Shigeru Yamada**, Makoto Shinoto, Satoshi Endo: Carbon Ion Radiotherapy for Patients with Locally Recurrent Rectal Cancer and Pancreatic Cancer, New Frontiers in Cancer Treatment: A Focus on Photon and Carbon Ion Radiation Therapy, コロラド, 2012. 4. 26~27
10. **山田 滋**、小池 幸子、篠藤 誠、安藤 興一: 扁平上皮癌における重粒子線の転移抑制作用に関する研究、平成23年度 HIMAC共同利用研究成果発表会、千葉市、2012. 4. 23
11. **Shigeru Yamada**, Makoto Shinoto, Shigeo Yasuda: Carbon Ion Radiotherapy for Patients with Locally Recurrent Rectal Cancer and Pancreatic Cancer, NIRS-KFSHRC Joint Symposium on Carbon Ion Radiotherapy and Radiation Emergency Medicine, リヤド, 2012. 2. 27~29
12. **山田 滋**、篠藤 誠、小藤 昌志: 放射線治療後の直腸癌術後骨盤内局所再発に対する重粒子線治療の有効性の検討、日本放射線腫瘍学会第24回学術大会、神戸市、2011. 11. 17~19
13. 崔 星、大西 和彦、**山田 滋**、鎌田 正: ヒト肝細胞癌における癌幹細胞の同定及びX線や重粒子線照射による影響、日本放射線影響学会第54回大会、神戸市、2011. 11. 17~19
14. **山田 滋**、篠藤 誠、遠藤 悟史、鎌田 正、松原 久裕*: 直腸癌術後再発に対する重粒子線治療、第73回日本臨床外科学会総会、東京都新宿区、2011. 11. 17
15. **山田 滋**、篠藤 誠、遠藤 悟史: 直腸癌術後再発に対する重粒子線治療、第66

- 回日本大腸肛門病学会学術集会、東京都千代田区、2011. 11. 25
16. 遠藤 悟史、山田 滋、篠藤 誠：直腸癌の骨盤内局所再発に対する再照射としての重粒子線治療の有効性の検討、第66回日本大腸肛門病学会学術集会、東京都千代田区、2011. 11. 25
 17. Shigeru Yamada, Makoto Shinoto, Shigeo Yasuda: Carbon Ion Radiotherapy for Patients with Locally Recurrent Rectal Cancer, 2nd NIRS-ETOILE Joint Symposium on Carbon Ion Therapy, リヨン, 2011. 11. 25~27
 18. 大西 和彦、崔 星、山田 滋：膵臓癌幹細胞様細胞における炭素線の影響、第70回日本癌学会学術総会、名古屋市、2011. 10. 3~4
 19. 崔 星、大西 和彦、平川 博一、藤森亮、古川 高子、山田 滋：ヒト膵臓癌細胞における癌幹細胞の同定及びX線や重粒子線照射による影響、第42回日本膵臓学会、弘前市、2011. 7. 29~30
 20. 藤田 真由美、山田 滋、今井 高志：放射線照射後の膵癌由来細胞MIAPaCa-2の浸潤能変化とその機序、第20回日本がん転移学会学術集会、浜松市、2011. 6. 30~7. 1
 21. Shigeru Yamada, Makoto Shinoto, Kazuhiko Oonishi: Carbon Ion Radiotherapy for Pancreatic Cancer, The KI-NIRS Joint Symposium on Ion-Radiation Sciences, ストックホルム, 2010. 9. 9~11
 22. Shigeru Yamada, Makoto Shinoto, Hiroshi Imada: Pancreas Cancer, II NIRS-CNAO Joint Symposium on Hadrontherapy, ミラノ, 2010. 3. 20~21
 23. Shigeru Yamada, Makoto Shinoto, Hiroshi Imada : Carbon-ion therapy for patients with pancreas cancer, 48th Particle Therapy Co-Operative Group Meeting, Heidelberg, 2009. 9. 28~10. 3
 24. Shigeru Yamada, Makoto Shinoto, Shigeo Yasuda : Carbon Ion Therapy for Patients with Locally Recurrent Rectal Cancer, NIRS-IMP Joint Symposium on Carbon Ion Therapy, 蘭州, 2009. 8. 14~15

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 滋 (YAMADA SHIGERU)

独立行政法人放射線医学総合研究所・重粒子医学センター病院・室長

研究者番号：80311380

(2) 研究協力者

篠藤 誠 (SHINOTO MAKOTO)

独立行政法人放射線医学総合研究所・重粒子医学センター病院・治療室医員

研究者番号：50551503