

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H03011

研究課題名（和文）重粒子線照射の膵癌細胞死・免疫応答分子機構解明と外科治療への応用展望

研究課題名（英文）Analysis of molecular mechanism of pancreatic cancer cell death and immune response after carbon ion radiation and its application to surgery

研究代表者

藤元 治朗（FUJIMOTO, JIRO）

兵庫医科大学・医学部・特別招聘教授

研究者番号：90199373

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,200,000円

研究成果の概要（和文）：膵癌細胞に重粒子線（以下CIRT）を実施、照射された膵癌細胞における細胞死機構を検討した。細胞死形態はapoptosis, necrosisの双方が存在、apoptosisが優位であった。低線量照射では細胞死を免れ生存する膵癌細胞が認められ、一つの生存機構としてautophagy(以下AP)につき検証した。CIRT下で生存した膵癌細胞ではAPが常に認められた。AP阻害剤であるハイドロキシクロロキン（以下HCQ）をCIRT前に膵癌細胞に投与するとCIRTにより著明にapoptosisの増加が認められた。同系列マウスに移植、in vivoにて同等の結果が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵癌に対する重粒子線治療（CIRT）は2022年に保険適用となり臨床例が増加している現状である。非侵襲的治療であり、特に高齢者、有合併症患者にとり有益な治療選択肢となりえるが一方でCIRTにて完治に至る症例は進行度にもよるがまだ少ないのが現状である。分析するとCIRTのあと膵癌細胞内でオートファジー（自己組織利用による生存機構）が存在、細胞死を妨げていることが判明した。AP阻害薬により著明に効果が増加することが示された。

研究成果の概要（英文）：Pancreatic cancer cell (PCC) was treated by carbon ion radiotherapy (CIRT), cell survival and molecular mechanisms of cell death were investigated. After CIRT, most PCC showed apoptosis/ necrosis, but some cells were survived in which autophagy (AP) was identified. Hydroxychloroquine (HCQ), an inhibitor of AP, was introduced to the PCC before CIRT which resulted completely cell death after the CIRT. PCC treated with HCQ and CIRT, treated with CIRT were inoculated into syngeneic mouse which showed compatible result with the in vitro experiment. Published articles:(1)

研究分野：消化器外科

キーワード：重粒子線治療 膵癌 オートファジー アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

膵癌に対する最善の治療は治癒切除を軸とした集学的治療であることは明確である。しかし手術不能例・術後再発を多く経験するのが実情である。重粒子線治療（以下 CIRT: carbon ion radiotherapy）は炭素イオンをシンクロトロンで光速の 70%まで加速、癌部に超選択的に高エネルギーを集中させる先端技術であり、膵癌に対する優れた治療成績により 2022 年に保険収載となった。大阪重粒子線センター（以下 HIMAK）ではこれまでに##例の膵癌 CIRT を経験、優れた効果と共に局所再発も経験している。CIRT は癌細胞の 2 重螺旋 DNA を全領域で切断、細胞死に至るが（Nature, 508: 2014）、細胞死の詳細な分子機構は未だ不明な点が多い。また CIRT による癌細胞死は免疫応答を伴う可能性が高いことが予測される。オートファジー（以下 AP: autophagy）は細胞が自己物質を分解再利用する細胞生存機構であり、膵癌における AP による免疫抑制が報告された（Nature, 581: 2020）。申請者らは膵癌に対して CIRT 実施、AP が照射後に確認されるが AP 阻害剤により CIRT の効果増強を最近報告（Cell Physiol Biochem, 57: 2023）免疫応答への可能性を示した。本研究では CIRT による膵癌細胞死・免疫応答の分子機構の研究をすすめ、より効果的な膵癌集学的治療の可能性を探索する。さらに現在最先端技術である FLASH（超高線量瞬時照射）の CIRT における膵癌に対する実験を展開、また臨床で CIRT 後の局所再発の原因因子を探索、また NAC+CIRT+CS の手術病理標本より病理・分子生物学的研究を実施、膵癌 CIRT の臨床における事実を検証する。また CS 時に障害となる癒着・線維化の分子機構解明と対策を模索する。

2. 研究の目的

申請者らは膵癌に対する CIRT は癌細胞を細胞死に陥らせる反面、生存した癌細胞では AP 機構が働き生存シグナルとなるが、AP 阻害剤+CIRT にて癌を制御可能であることを報告した。一方、癌細胞膜表面に提示される MHC-I 抗原が AP により細胞内で分解され、免疫回避される機構が報告（Nature 581: 2020）されている。膵癌に対する CIRT は癌に対して殺傷能力を有する一方で免疫回避にも働くのであろうか？CIRT による老化癌細胞は免疫系の標的となる可能性が高く、細胞死の分子機構解析および免疫応答機構解析が必要である。

アブスコパル効果（照射部以外の病変に対する遠隔効果）は 1953 年に報告されたが臨床では極めてまれな現象である。申請者らはマウス肉腫モデルに CIRT 実施、免疫チェックポイント阻害剤（ICI）併用によるアブスコパル効果を報告した（Oncotarget, 10:2019）。また最近 線照射によるミトコンドリア障害機構を介した同効果も報告され、臨床の乳癌患者でも効果が報告された（Nature Immunol, 21: 2020）。これらのことより上記(1)の課題と合わせて、アブスコパル効果有無、ICI 効果などの検証が必要と考える。また CIRT は核 DNA 以外にも細胞小器官（ミトコンドリア・小胞体・リボゾームなど）にも障害を与え、多機能不全細胞死の可能性も有し、細胞老化への効果も検証が必要である。

膵癌 CIRT の現実: HIMAK で昨年は 130 例/年と急速に増加、ほぼ全例が UR-LA であるが BR、術後再発例も含む。CIRT の線量は一定であるが紹介までの化学療法の種類、総投与量は多岐である。局所制御率は CIRT 後 2 年時点で約 80%、約 20%の局所再発は重要な事実であり、局所再発因子探索が必要である。UR-LA 症例に対し NAC+CIRT+CS 実施は Evans Grade IV・5 年無再発例を含め 15 例経過観察中であるがまだ CS 例は少なく、CS, NAC+S 群, up-front S 群の病理検証が必要である。また、CIRT による腸管障害への対策、CS の際に癒着による手術困難症例もあり、原因の検索と対策が必須である。

上記の課題に対する具体的な「問い」は以下である（ ~ ）

AP 制御および CIRT による免疫応答の機序の解析：腫瘍周囲における制御性 T 細胞（Treg）・細胞障害性 T 細胞（CTL: 以下 CD8）の集積は変動するか？ Treg の制御機構は何か？ また誘導される CD8 は抗原特異的な CD8 か、またその CD8 は遠隔病変に効果を示すか？（アブスコパル効果） 腫瘍における MHC-I の発現、および PD-L1 発現に変化はあるか？ CIRT による細胞小器官（ミトコンドリア、小胞体）の障害による多機能細胞死は存在するか？

再発は腫瘍中心部か辺縁部か、また胃十二指腸近傍部か？CIRT 線量分布との関連、化学療法種類、総投与量と再発との関連はあるか？ また CS, NAC+S, upfront S の病理で相違はあるか（癌細胞死、AP 有無、Treg/CD8）？また CIRT による腸管障害への対策、CIRT 後の強固な線維化・癒着は CS の際に認められるか？またその予防策は開発できるか？

：膵癌細胞を対象に FLASH 実施、細胞死機構は従来の CIRT に比べ変化があるか？非癌細胞に対して本当に影響が少ないか？

申請者らは膵癌に対して CIRT 実施、AP が照射後に誘導されるが AP 阻害剤により CIRT の効果増強を最近報告（Cell Physiol Biochem, 57: 2023）免疫応答への可能性を示した。本研究では CIRT による膵癌細胞死・免疫応答の分子機構の研究をすすめ、より効果的な膵癌集学的治療の可能性を探索する。

3. 研究の方法

C57BL/6 マウス由来の Pan02 膵癌細胞株を用い、同マウスに腫瘍移植実験を実施する。プレリミナリーではあるが Pan-02 を用い、0 Gy/ HCQ (AP 阻害群) / 2 Gy/ HCQ+2Gy の 4 群の isograft 移植モデル作成した。細胞移植後 4 週で腫瘍採取、浸潤リンパ球(TIL)の解析を実施した。Treg は CD4, CD25 (細胞表面)、FoxP3(細胞質)で同定、FACS 解析した。0 Gy 群では TIL 内には多くの Treg が認められたが HCQ+2Gy 群では有意に減少し(図 A)、また免疫染色でも細胞表面が CD4(green)と CD25(red)がマージした朱色となり、細胞質は FoxP3(blue)に染まった Treg が確認され(図 B)、HCQ+2Gy にて Treg 減少が確認された(図 C)。一方、HE 染色では HCQ+2Gy 群にてヘマトキシリン陽性細胞の集積が認められ(図 C 右側図)この集団は CD8+細胞、好中球、マクロファージなどの可能性があり、興味深い事実であり、細胞集団の解析をすすめる予定である。データを確証するために N 数を増やし検証を予定する。

CD8 を FACS および免疫染色にて検索、Treg とは相反的に HCQ+2 Gy で増加していた(左図)。これらのことより AP 阻害+CIRT 実施した腫瘍は免疫応答を受け、腫瘍制御に関与する可能性が考慮される。しかしまだ N 数が少なく確証を得るための追試が必要である。またこれは isograft モデル(*in vitro* で CIRT 実施した膵癌細胞のマウスへの移植実験であり、次のステップとしては N 数を増加して結果の検証、さらに Pan 02 細胞をまずマウスに移植、マウスに HCQ 投与、マウスで形成された腫瘍に対して CIRT 照射実験が必要と考える。

Treg の制御機構は何か? また誘導される CD8 は抗原特異的な CD8 か、またその CD8 は遠隔病変に効果を示すか?(アブスコパル効果)

(1)TGF- β は Treg 分化誘導に関与(Nature Reviews Immunology, 2023), (2)Pan-02 は Smad4 mutation を有し TGF- β を高発現する(Curr Mol Med, 2012)、の報告がある。「膵癌において膵癌細胞が TGF- β を産生、腫瘍周囲に Treg が分化誘導される」ことは仮説として設定可能と思われる。Pan 02 を用いて培養細胞液の TGF- β を ELISA にて測定すると、0 Gy (2,500 pg/mL)に比して HCQ+2Gy (1,050 pg/mL)と半減していた。しかしまだ少数検体であり、追試予定である。上記

の実験で HCQ+2Gy 群で Treg の減少、CD8 の集積が認められている。この CD8 が腫瘍(Pan 02) 特異的な CD8 か否かを検証するために CD8 抗体および非特異的 IgG 抗体の投与実験を行った。未熟なデータではあるが IgG 抗体に比し CD8 抗体投与により腫瘍総重量の増加(左図)を認めるが N 数も少なく追試を予定、確証が得られれば Pan 02 特異的 CD8 が産生されている根拠となる。腫瘍における MHC-I の発現、および PD-L1 発現に変化はあるか? (1-2 年)

Pan 02 に各処置を実施、48 時間後に FACS 解析、照射後短時間でまだ健全な healthy 細胞群、既に細胞死が始まる damaged 細胞群が観察、これらをソーティング、MHC-I を解析した(下図)。縦軸は細胞数、横軸は MHC-I の発現を示す。Damaged 細胞群では HCQ+2Gy では MHC-I 発現細胞(緑)が 0 Gy (赤)の約 10 倍、また MHC-I 発現量も healthy 細胞に比して大きく増加していることが観察された。解釈として AP 抑制だけでは MHC-I は発現せず、CIRT のような細胞死ストレスが必須と思われた。しかしこのデータの再現性はまだ未確認で、さらなる追試が必要である。PD-L1 のアッセイは未着手であり、各処置後に FACS, RT-PCR, 免疫染色にて検証する

CIRT によるミトコンドリア・小胞体の障害による多機能細胞死が誘導されるか。
ミトコンドリア(以下 MT)は固有の DNA(MT-DNA)を有し、細胞核 DNA 同様に CIRT による MT-DNA 切断が想定される。障害 MT-DNA はマイトファジーにより除去され、この現象は Mitophagy Dye による蛍光顕微鏡で観察可能である。小胞体については小胞体ストレス因子である XBP1 タンパクに着目、XBP1 遺伝子にルシフェラーゼを挿入したレポーターにより検証予定とする。

再発と CIRT 線量分布との関連、また化学療法種類・総投与量との関連はあるか。
CIRT 後 2 年時点で約 20%の局所再発があるがまだ再発部位(腫瘍中心部/ 辺縁部)、消化管近傍部などの解析は未実施であり、線量分布図を重ねて検証を実施する。化学療法は GnP, FFX, GS など種類も回数も組み合わせも多岐にわたり解析は困難であるが、一方策として各薬剤成分の総投与量を算出、上記と合わせデータファイルを構築する

申請者らは膵癌に対する CIRT は癌細胞を細胞死に陥らせる反面、生存した癌細胞では AP 機構が働き生存シグナルとなるが、AP 阻害剤+CIRT にて癌を制御可能であることを報告した。一方、癌細胞膜表面に提示される MHC-I 抗原が AP により細胞内で分解され、免疫回避される機構が報告(Nature 581: 2020)されている。膵癌に対する CIRT は癌に対して殺傷能力を有する一方で免疫回避にも働くのであろうか? CIRT による老化癌細胞は免疫系の標的となる可能性が高く、細胞死の分子機構解析および免疫応答機構解析が必要である。

また、アブスコパル効果(照射部以外の病変に対する遠隔効果)は 1953 年に報告されたが臨床では極めてまれな現象である。申請者らはマウス肉腫モデルに CIRT 実施、免疫チェックポイント阻害剤 (ICI)併用によるアブスコパル効果を報告した(Oncotarget, 10:2019)。また最近 線照射によるミトコンドリア障害機構を介した同効果も報告され、臨床の乳癌患者でも効果が報告された(Nature Immunol, 21: 2020)。これらのことより上記(1)の課題と合わせて、アブスコパル効果有無、ICI 効果などの検証が必要と考える。また CIRT は核 DNA 以外にも細胞小器官(ミトコンドリア・小胞体・リボゾームなど)にも障害を与え、多機能不全細胞死の可能性も有し、細胞老化への効果も検証が必要である。また臨床で CIRT 後の局所再発の原因因子を探索する。NAC+CIRT+CS の手術病理標本より病理・分子生物学的研究を実施、膵癌 CIRT の臨床における事実を検証する。また CS 時に障害となる癒着・線維化の分子機構解明と対策を実施した。

4. 研究成果

現時点での膵癌 CIRT の現実：HIMAK で年間約 130 例を実施、ほぼ全例が UR-LA であるが BR、術後再発例も含む。CIRT の線量は一定であるが紹介までの化学療法の種類、総投与量は多岐である。局所制御率は CIRT 後 2 年時点で約 80%、約 20%の局所再発は重要な事実であり、局所再発因子探索が必要である。UR-LA 症例に対し NAC+CIRT+CS 実施は Evans Grade IV・5 年無再発例を含め 15 例経過観察中であるがまだ CS 例は少なく、CS, NAC+S 群, up-front S 群の病理検証が必要である。また、CIRT による腸管障害への対策、CS の際に癒着による手術困難症例もあり、今後原因の検索と対策が必須であり、現在データ収集論文作成中である。申請者らは膵癌に対して CIRT 実施、AP が照射後に確認されるが AP 阻害剤により CIRT の効果増強を最近報告 (Cell Physiol Biochem, 57: 2023) 免疫応答への可能性を示した。本研究では CIRT による膵癌細胞死・免疫応答の分子機構の研究をすすめ、より効果的な膵癌集学的治療の可能性を探索する。また、review article にて Carbon Ion Irradiation Activates Anti-Cancer immunity. M.Sudo, H.Tustsui, j. Fujimoto. Int. j. Mol. Sci. 2024, 25: 1-17 を publish した。現在はマウスにおける in vivo model において APinhibitor + CIRT 群において Anti-cancer immunity の分子機構の一部を解明、論文投稿準備中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 Makoto Sudo, Hiroko Tsutsui, Shuhei Hayashi, Koubun Yasuda, Keiko Mitani, Nana Iwami, Makoto Anzai, Toshiro Tsubouchi, Mitsuaki Ishida, Sohei Sato, Tatsuaki Kanai, Seiko Hirono, Etsuro Hatano, Jiro Fujimoto	4. 巻 57
2. 論文標題 Autophagy Inhibition Increased Sensitivity of Pancreatic Cancer Cells to Carbon Ion Radiotherapy	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cellular Physiology and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 212 ~ 225
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.33594/000000639	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 -

1. 著者名 Sudo Makoto, Tsutsui Hiroko, Fujimoto Jiro	4. 巻 25
2. 論文標題 Carbon Ion Irradiation Activates Anti-Cancer Immunity	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2830 ~ 2830
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms25052830	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1件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Jiro Fujimoto
2. 発表標題 Autophagy inhibition sensitizes pancreatic cancer cells to carbon ion radiotherapy
3. 学会等名 The 26th meeting of International Association of Pancreatology（国際学会）
4. 発表年 2022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
研究分担者	山上 裕機 (Yamaue Hiroki) (20191190)	和歌山県立医科大学・医学部・学長特命教員(特別顧問) (24701)	
研究分担者	鈴木 修 (Suzuki Osamu) (30644778)	大阪大学・大学院医学系研究科・招へい教員 (14401)	
研究分担者	筒井 ひろ子 (Tsutsui Hiroko) (40236914)	兵庫医科大学・医学部・教授 (34519)	
研究分担者	小川 和彦 (Ogawa Kazuhiko) (40253984)	大阪大学・大学院医学系研究科・教授 (14401)	
研究分担者	林 和彦 (Hayashi Kazuhiko) (70718981)	大阪大学・大学院医学系研究科・特任助教(常勤) (14401)	
研究分担者	波多野 悦朗 (Hatano Etsurou) (80359801)	兵庫医科大学・医学部・非常勤講師 (34519)	
研究分担者	里井 壯平 (Satoi Souhei) (90340695)	関西医科大学・医学部・教授 (34417)	
研究分担者	江口 英利 (Eguchi Toshiaki) (90542118)	大阪大学・大学院医学系研究科・教授 (14401)	

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 分 担 者	皆巳 和賢 (Minami Kazumasa) (90634593)	大阪大学・大学院医学系研究科・助教 (14401)	

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