

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年3月31日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23791393

研究課題名（和文） 放射線治療による腫瘍特異的免疫の活性化に関する研究

研究課題名（英文） Study for radiotherapy-induced tumor specific immunity.

研究代表者

吉本 由哉（YOSHIMOTO YUYA）

群馬大学・医学部・助教

研究者番号：80594390

研究成果の概要（和文）：

本研究はヒトがんにおいて、放射線治療開始後に抗腫瘍免疫が誘導されることの立証を目的として行った。食道がんの放射線治療患者からリンパ球を分離して腫瘍特異的CTLが誘導されているかを確認した。特異的CTLの確認にはELISPOT assayを用いた。放射線治療により特異的なCTLが誘導されることを見出した。次に、誘導されるCTLの意義を検討するために動物実験を行った。実験的放射線治療モデルにおいてCTLを抗体の投与によって除去したところ、放射線治療の効果が減弱した。これらのことから、放射線治療により腫瘍特異的な免疫が誘導されること、誘導された免疫は放射線治療効果に重要な役割を果たしていることが考えられた。

研究成果の概要（英文）：

The aim of this study is to examine whether a radiation therapy can induce specific anti-tumor immunity in human cancer patients. ELISPOT assay revealed that tumor specific CTLs were induced in the patients after radiation therapy. The CTLs recognized cancer testis antigen derived peptides that were expressed on esophageal cancer cells. Furthermore, a role of the CTLs was also investigated. In mouse tumor models, a radiation therapy also induced tumor specific CTLs. The radiation therapy failed when CTLs were removed by using specific antibody, suggesting that anti-tumor immunity, such as the CTLs, was required for success of the therapy.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|-------|-----------|---------|-----------|
| 交付決定額 | 3,200,000 | 960,000 | 4,160,000 |

研究分野：抗腫瘍免疫、放射線治療

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・放射線科学

キーワード：抗腫瘍免疫、放射線治療、癌精巢抗原、

1. 研究開始当初の背景

近年、放射線や抗がん剤が、直接的殺細胞効果のみならず、宿主の免疫活性化を介して抗腫瘍効果を発揮する可能性が指摘されている(1)。実際に、稀ではあるが、放射線治

療により（放射線が照射されていない）遠隔転移した腫瘍も同時に縮小した事例が報告されており、放射線により抗腫瘍免疫が活性化することが推測されている。しかしながらそのメカニズムについては、臨床の現場では未だ十分には立証されていない。本研究の研

究代表者（吉本）はこれまでに、放射線治療による抗腫瘍免疫の誘導に注目し、i) リンパ腫移植マウスは放射線治療後に免疫を獲得し再移植に抵抗すること、ii) 免疫不全マウスでは放射線治療による局所制御には成功するが全身転移により死亡することを見出している。これらの結果は、放射線治療の直接的殺細胞効果のみならず、それにより誘導される抗腫瘍免疫が腫瘍の制御に重要な役割をはたしていることを示している。

また、実際に放射線治療が行われる患者体内における抗腫瘍免疫を検討するために、放射線治療開始後の腫瘍特異的 CTL 誘導の検討をしており（施設内 IRB 承認済み）、既に数例で CTL の活性化を検出している。抗腫瘍免疫の誘導が放射線治療の効果に影響している可能性は以前より想像されていたが、ここ数年の細胞生物学的検討、マウスモデルでの検討によりこの仮説に科学的根拠が与えられつつある(1-3)。このことがヒトがんの臨床でも予後へ寄与することを検討し、新しい治療に応用するためには、ヒトがんにおいて抗腫瘍免疫が誘導されることを早急に立証する必要がある。

1) Apetoh, L, et al, Cancer Res 2008; 68: 4026-4030.

2) Yoshimoto, Y, et al, Int Immunopharmacol 2005; 5: 281-288.

3) Takeshima, T, et al, Cancer Res 2010; 70: 2697-2706.

2. 研究の目的

本研究は、放射線治療による抗腫瘍免疫の誘導に着目し、実際に放射線治療が行われる患者体内において、治療開始後に抗腫瘍免疫、特に腫瘍特異的な細胞障害性 T 細胞 (CTL) が誘導されることの立証を目的とした。具体的には、本施設で放射線治療されている食道がん、子宮頸がん患者の血液から分離したリンパ球を治療前後で比較することにより腫瘍特異的 CTL が誘導されていることを確かめた。また、子宮頸がんにおいては、生検により得られた腫瘍組織を免疫染色することにより、放射線治療前後でその所見が変化するかどうかを検討した。検討項目は、細胞死による Hsp70、HMGB1 などの“danger signal”発現、それによる DC の活性化、引き続く CTL の浸潤とした。以上のように臨床検体を用いてヒトがんでの抗腫瘍免疫の誘導について検討した。

また同時に、マウスモデルを用いて、放射線治療と免疫誘導のタイミング、免疫誘導の有無、がん種の違いによる発現タンパクの違い、放射線が誘導された免疫細胞に与える影

響を検討した。これらマウスモデルで得られた結果を臨床検体にフィードバックすることによりさらなる検討を行った。

3. 研究の方法

本研究は平成 23 年、24 年の 2 カ年にわたって行った。

平成 23 年度

1) 臨床検体（血液）における HLA 拘束性腫瘍特異的 CTL の検出

腫瘍特異的な HLA 拘束性抗原が複数知られており、そのような抗原に特異的な CTL について検討した。患者の頬粘膜を少量採取し、HLA を決定した (HLA 研究所に外注した)。続いて採血を行い、Ficol 採血管を用いた遠心分離によりリンパ球を分離した。分離したリンパ球から、既知の HLA 拘束性抗原に反応する CTL を検出するために IFN γ 、IL-2 産生を指標とした ELISpot assay を行い、腫瘍特異的な CTL 活性を評価した。リンパ球の採取は治療開始前、治療中、治療後、と数回に分けて行い、経時的な活性の評価を行った。

2) 臨床検体（生検組織）における抗腫瘍免疫関連タンパク発現、免疫細胞浸潤の検出

抗腫瘍免疫の誘導のためには、放射線照射による腫瘍細胞の細胞死、Hsp70 や HMGB1 などの“danger signal”の発現、DC による Toll-like receptor (TLR) 4 を介した認識、DC の活性化、cross-presentation による腫瘍特異的 CTL の活性化という段階が必要と考えられている。主に特異抗体を用いた免疫染色によりこれらの現象の確認を試みた。

3) 同系担がんマウスを用いた実験的放射線治療による検出

抗腫瘍免疫には細胞性免疫が主に関与していると考えられており、マウスのリンパ腫モデルで放射線治療後の細胞性免疫活性化を検出する。一方でヒトの抗腫瘍免疫については扁平上皮がんにおいて多くの報告がある。そこで Th1 優位な免疫応答を示す C57BL/6 マウスを用い、同マウス由来扁平上皮がん Lewis lung carcinoma (LL/C) を移植して検討を行った。マウスの大腿に LL/C を移植し、腫瘍形成が認められた後、高線量率 X 線照射装置 (Siemens) を用いて実験的放射線治療を行った。適宜マウスをサクリファイスし、腫瘍標本を免疫染色することにより腫瘍細胞の状態、免疫細胞の浸潤について評価した。必要に応じて蛍光免疫染色、RT-PCR を用いた。マウス splenocyte について、ELISA、Flow-cytometer を用いて免疫状態の解析を行った。

CTLの細胞障害活性はCr-51放出 assay で評価した。

平成 24 年度

4)臨床検体(血液)における HLA 拘束性腫瘍特異的 CTL の検出
前年度に引き続き行った。

5)臨床検体(生検組織)における抗腫瘍免疫関連タンパク発現、免疫細胞浸潤の検出
前年度に引き続き腫瘍特異的な CTL 誘導、生検組織におけるタンパク発現、免疫細胞について検討した。適応症例についてはフォローアップを行った。また、サイトカインや新しい標的分子の関与がについて、それらのヒト臨床における関与を検討した。

6)同系担がんマウスを用いた実験的放射線治療による検討
放射線治療による腫瘍組織の変化、抗腫瘍免疫の誘導に関しては不明であることが多い。マウスモデルを用いた基礎的な検討を併せて行うことにより、抗腫瘍免疫にかかわる様々な因子(腫瘍側因子・宿主側因子)が明らかとなる可能性がある。具体的には、腫瘍側因子として MHC、Fas/FasL など免疫関連分子、EGFR や FGFR など各種増殖因子レセプター、Akt、PTEN など抗アポトーシス分子、宿主側因子としてサイトカイン発現、DC の活性化、T 細胞の機能分化などがある。これら分子の関与について基礎的検討を行った。

4. 研究成果

食道がん特異的な HLA 拘束性抗原が複数知られており、そのような抗原に特異的な CTL について検討した。抗原として、食道がんを高頻度で発現している LY6K、TTK、IMP3、CDCA1、TOMM34、HIG2 の 6 種類の癌精巢抗原を選択した。まず患者の頬粘膜を少量採取し、HLA を決定した。放射線治療中の患者より、治療開始前、治療中、治療後、と数回に分けて腫瘍細胞の採取を行い、14 日間の培養後、上述の HLA 拘束性抗原に反応する CTL を検出するために IFN γ 、IL-2 産生を指標とした ELISpot assay を行った。化学放射線療法後には 16 例中 6 例の患者において、放射線治療により抗原特異的な CTL が誘導されることを見出した。ELISA による血清 HMGB1 レベルの測定では、治療後に有意な上昇が認められた。さらに、抗原特異的な CTL が認められた患者の HMGB1 レベルは、認められていない患者のそれと比較して有意に高かった。

放射線治療により誘導される CTL が、治療効果に影響しているかについて、動物モデル

を用いて検討した。C57BL/6 マウスに EL-4 リンパ腫を移植し、手術摘出群と放射線治療群(30 Gy)を比較したところ、手術摘出群では早期に局所再発及び遠隔転移を来し、生存期間は無治療群と差がなかった。一方の放射線治療群では局所は制御され、長期生存が認められた。また、これらのマウスは EL-4 の再移植に抵抗したが、他の可移植腫瘍(B16-jg)の放射線治療後に EL-4 を移植した場合には生着した。さらに、マウスより脾細胞を分離して EL-4 と共培養すると、IFN γ や TNF α などの Th1 サイトカインの産生が認められ、放射線治療後に経時的に増加した。これらより、マウスは放射線治療により EL-4 に対する特異的な免疫を獲得したと考えられた。一方、ヌードマウスに EL-4 を移植して放射線治療を行ったところ、早期に全身転移を来して死亡した。さらに、C57BL/6 マウスに Lewis 肺癌を移植して放射線治療を行ったところ、その増殖遅延効果及び生存期間延長効果は anti-CD8 抗体投与による CTL 除去により抑制された。

これらの結果より、動物モデルにおいても放射線治療により腫瘍特異的な抗腫瘍免疫が誘導されること、抗腫瘍免疫が放射線治療効果に重要であること、その一部には CTL が関与していることが考えられた。

まとめると、ヒトがんの放射線治療において抗腫瘍免疫が活性化することを世界に先駆けて見出した。さらに、誘導された抗腫瘍免疫は放射線治療効果に重要な役割を果たしていると考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Suzuki Y, Mimura K, Yoshimoto Y, Watanabe M, Ohkubo Y, Izawa S, Murata K, Fujii H, Nakano T, Kono K. Immunogenic tumor cell death induced by chemoradiotherapy in patients with esophageal squamous cell carcinoma. Cancer Res. 査読有り、2012; 72(16): 3967-3976.

[学会発表] (計 3 件)

- ① 吉本由哉、鈴木義行、三村耕作、河野浩二、中野隆史、放射線による抗腫瘍免疫の活性化、第 50 回日本放射線腫瘍学会生物部会学術大会、2012. 6. 30、カルチャーリゾートフェストーネ(沖縄)
- ② 吉本由哉、鈴木義行、三村耕作、河野浩二、中野隆史、放射線による抗腫瘍免疫誘導に関する検討、第 21 回日本癌病態治

- 療研究会、2012.7.7、前橋テルサ（前橋）
- ③ Yoshimoto Y, Suzuki Y, Mimura K, Kono K and Nakano T, Requirement of Anti-tumor Immunity and Enhancement by CTL-associated Antigen-4 Blockade on Therapeutic Efficacy of Radiation Therapy in a Mouse Tumor Model. 54th Annual meeting for American Society for Radiation Oncology, 2012.10.25-31, Boston Convention Center, Boston

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉本 由哉 (YOSHIMOTO YUYA)
群馬大学・医学部・助教
研究者番号：80594390

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし