

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 19 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390309

研究課題名(和文) 直腸癌に対する免疫放射線療法 予後改善に繋がる遠達効果の効率的誘導法の確立

研究課題名(英文) Establishment of radioimmunotherapy for advanced rectal cancer; Induction of efficient abscopal effect

研究代表者

北山 丈二 (Kitayama, Joji)

東京大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：20251308

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：(1)マウス大腸癌細胞LuM-1の皮下腫瘍は放射線治療で約50%程度の成長抑制が認められ、レンチナンの付加は抑制率に有意な増強を認めず、肺転移にも有意な変化は認めなかったが、脾臓細胞中のCD11b(+)Gr-1(+)MDSCに低下傾向を認めた。(2)LuM-1へのPSPLA-1遺伝子導入により、Annexin V結合能で判定した照射後細胞表面のPSの発現量は有意に低下しており、放射線感受性に変化をもたらす可能性があることが推測された。(3)直腸癌の放射線化学療法施行患者において、奏功は血中のCD4(+)細胞数、血小板数、CD40-ligand濃度と有意な相関を認めた。

研究成果の概要(英文)：The addition of lentinan, anti-tumor polysaccharide isolated from the fruit body of shiitake, on radiation to subcutaneous tumor of LuM-1 increased the number of Gr-1(+)CD11b(+) MDSC in splenocytes, although it could not induce the augment of antitumor effects of irradiated tumor as well as non-irradiated lung metastasis. Transfection of PS-PLA1 to LuM-1 can induce PS expression of irradiated cells. The effect of PS-PLA1 on radiosensitivity is under investigation. On the other hand, in patients with rectal cancer who received neoadjuvant chemoradiotherapy (CRT), the response is significantly associated with preoperative number of CD4(+) helper T lymphocytes, as well as platelet number, soluble CD40-ligand (sCD40L). Altogether, our data suggest that the tumor response of rectal cancer against RT is at least partly dependent on host immune response. Combination of immunotherapy to conventional (chemo)radiotherapy is a new approach for the improvement of the treatment of rectal cancer.

研究分野：腫瘍外科学

キーワード：abscopal effect 免疫放射線療法

1. 研究開始当初の背景

進行直腸癌に対する術前放射線治療は、局所再発率の低下、側方リンパ節郭清の省略による術後 QOL の向上などの利点を有し、我国でも普及しつつある。近年、放射線に化学療法を組み合わせた術前放射線化学療法が取り入れられ、様々な抗瘍剤を用いた治療プロトコールによる臨床試験が世界中で行われている。しかし、これらの成績を見ると、RT 単独と比較して優れた局所効果は得られているものの、患者全体の生存率の向上にはつながっていないのが現状である。この理由は、ひとえに術前 CRT が、遠隔再発の頻度の低下をもたらしていない事に起因すると考えられ、これが直腸癌治療における CRT の最大の課題である。近年、放射線の腫瘍縮小効果は、その直接的癌細胞障害作用だけではなく、宿主の免疫細胞による間接的癌細胞障害が深く関わっている事、その免疫作用は照射野の外に存在する病変に対しても効果を発揮する事 (Abscopal Effect; 遠達効果) などが報告されてきている。この事実を裏返すと、放射線がもたらす免疫能の低下が、遠隔再発の発生に関与しており、これが患者予後の向上につながる真の理由である事が推測される。しかし、Abscopal Effect の起こる機序については十分な情報はない。一方、放射線の腫瘍縮小効果のメカニズムとして、宿主の免疫応答を介した間接的な癌細胞障害作用が大きく寄与している事を示唆する知見が報告されてきている。

2. 研究の目的

著者らは、これまでに、消化器癌に対する CRT の臨床効果が個々の患者の免疫能に強く左右される事を実感し、直腸癌 CRT 症例の retrospective な解析から、血液中のリンパ球の総数や白血球中の割合が CRT によって著しく低下する事、CRT 経過中のリンパ球が高く保たれていれば CRT が著効を示す事、CRT 前の直腸生検標本中の T 細胞の浸潤度と CRT 効果が強い正の相関を示す事 などを見出した。また、CRT 後の手術標本の免疫染色にて、多数の CD8(+)T 細胞が残存癌細胞巢の周囲に集積し、がん細胞を攻撃している組織像を確認しており、照射による腫瘍に対する免疫応答がヒトで確かに存在することを確認した。これが、局所のみならず宿主全身に起こることが、放射線腫瘍学で古くから提唱されている Abscopal Effect (遠達効果) を起こすメカニズムとなる事が推測した。

そこで、皮下腫瘍と肝転移を作成し、マウ

スの全身を鉛のシールドで覆い、皮下腫瘍のみ照射する実験系を用いて、照射局所における T 細胞応答の強化することにより、有効な遠達効果を誘導することを証明し、実際の臨床治療に応用できる合理的かつ実践的な治療プロトコールを樹立する事を目的とした。

3. 研究の方法

(1) レンチナンの影響

Balb/c マウスに皮下腫瘍を作成、2 週後に尾静脈注入による肺転移を作成し、その翌日から皮下腫瘍部分に限局した放射線照射 (2Gy x5 日連続) を 1, 3 週目に施行し、免疫増強剤としてレンチナン 0.1mg/body x4 回/週で投与、肺転移作成後 4 週目で皮下腫瘍、肺転移の成長を検討した。また、同マウスより脾臓を摘出し、脾臓細胞を分離、各種モノクローナル抗体を用いて表面抗原を染色、そのフェノタイプを FACS を用いて解析した。

(2) Phosphatidyl serine specific phospholipase-1 (PS - PLA1) の影響

Balb/c マウスの皮下に腫瘍を摂取することにより自然肺転移をおこす colon26 亜株 LuM1 に Phosphatidyl serine specific phospholipase-1 (PSPLA-1) 遺伝子を導入した細胞株 LuM-1-PSPLA-1 を作成し、その生物学的性質を In vitro で解析した。この LuM-1-PSPLA-1、LuM-1-mock の皮下腫瘍を作成し、その 1 週間後から皮下腫瘍部分に限局した放射線照射 (2Gy x3 日連続) を 1, 3 週目に施行し、4 週目で皮下腫瘍、肺転移の成長を検討した。

(3) 臨床データの解析

直腸癌の放射線化学療法を施行した患者の血液データおよび血清中のサイトカインを治療前後で測定し、腫瘍縮小率、病理学的奏功と比較検討した。また、ヒト大腸がん組織における PS - PLA1 の発現とその臨床病理学的因子との相関を 85 例の大腸がん切除標本の免疫組織にて検討した。

4. 研究成果

(1) 皮下腫瘍は放射線治療群 (RT) で約 50% 程度の成長抑制が認められ、皮下腫瘍抑制率は放射線 + レンチナンの投与群 (RT+LN) でやや増強したが、有意差は認めなかった。一方、肺転移を肺重量で評価すると、肺転移 RT 群で 15% 低下したが、レンチナン付加による影響は認めなかった。脾臓細胞の解析では、CD45(+)白血球中で CD3(+)CD4(+)T 細胞の比率が RT 群、RT+LN 群で有意に低下、逆に CD19(+)B 細胞の比率は増加していたが、RT

群と RT+LN 群との間に有意差は認めなかった。また、CD11b(+)/Gr-1(+)/MDSC は RT+LN 群で低下傾向を認めたが有意差には至らなかった。全体のマウスでの比較検討してみると、脾臓細胞中の CD3(+)/および CD4(+)/細胞の比率は肺転移と逆相関する結果が得られた。以上の結果から、放射線照射は生体内で腫瘍抗原に対する免疫応答を惹起することにより、CD3(+)/CD4(+)/T 細胞数を増加させ全身の抗腫瘍効果に寄与していることが確認された。免疫賦活剤レンチナンは、この投与方法では Abscopal effect を増強させる効果は認めなかったが、CD11b(+)/Gr-1(+)/MDSC を抑制する効果を有する可能性があり、投与方法を工夫することによって臨床応用できる可能性が示唆された。しかしながら、免疫賦活剤としてのレンチナンの in vivo における免疫誘導効果について確認することができた。ただ、放射線の遠達効果を惹起する能力は低く、臨床応用には適さないため、別な薬剤ないしはアプローチが必要であると考えられた。

(2) In vitro の MTS アッセイにて LuM-1-PSPLA-1 は LuM-1-mock と比べて放射線による細胞障害感受性に変化はなかったが、AnnexinV 結合能で判定した照射後細胞表面における PS の発現量は有意に低下していた。また、皮下腫瘍は LuM-1-PSPLA-1、LuM-1-mock とともに放射線治療群 (RT) で約 50% 程度の成長抑制が認められ、その制御率には有意差は認めなかった。一方、肺転移を肺重量で評価すると、LuM-1-PSPLA-1 では照射による影響はほとんど認めなかったが、LuM-1-mock では約 15% 低下した。この差は統計学的有意差には至らなかったが、照射によって障害された大腸癌細胞上の PS の存在は局所における免疫学的変化を誘導する可能性が示唆された。PSPLA-1 は PS に作用して、LysoPS を産生する。この LysoPS は強い免疫抑制作用があることが過去の報告されていることから、遺伝子導入した PSPLA-1 により、アポトーシスをきたしたがん細胞上の PS が LysoPS に変化することにより、貪食をのがれるとともに局所の免疫応答が抑制された結果、肺転移の抑制が観察されなかった可能性が推測された。

(3) 直腸癌の放射線化学療法を施行した患者 14 例の治療前末梢血リンパ球数は病理学的奏功と正の相関を示した。フェノタイプ別に検討すると、CD3(+)/T 細胞が多い症例で奏功例が多く、Grade2 以上の奏功例 5 例では Grade1 以下の 9 例と比較して、CD4(+)/helper T 細胞数が有意に高値であった (1195 ± 235 vs 597 ± 102 , $p=0.0002$)。ま

た、照射の奏功性は、血清中の CD40-ligand (sCD40L) の高値と正の、血小板数と負の相関があることが判明した。これらの事実から、照射による直腸局所の奏功性には宿主の T 細胞を主体とした免疫応答が積極的に関与していることが推測された。

また、大腸がん切除標本の免疫染色では、大腸がん細胞の一部に発現が認められ、その発現程度はがんの壁進達度および血行性転移と正の相関を示していた。

まとめ

以上の結果から、今回の検討では、臨床応用に足るだけの有用な遠達効果の誘導方法は見いだせなかったが、放射線に抗腫瘍効果は、少なくともその一部は、宿主側の免疫機能に依存していることの傍証が得られた。今後は、PS-PLA1 の効果を追加検討すると共に、immune check point 抗体などを用いた検討が望まれる。

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 5 件)

2014 年度

1. Tada N, Tsuno NH, Kawai K, Muro K, Nirei T, Ishihara S, Sunami E, Kitayama J, Watanabe T. Changes in the plasma levels of cytokines/chemokines for predicting the response to chemoradiation therapy in rectal cancer patients. *Oncol Rep.* 査読有,31(1),2014, 463-71
doi: 10.3892/or.2013.2857
2. Muro K, Kawai K, Tsuno NH, Ishihara S, Yamaguchi H, Sunami E, Kitayama J, Watanabe T. Barium enema and CT volumetry for predicting pathologic response to preoperative chemoradiotherapy in rectal cancer patients. *Dis Colon Rectum.* 査読有,57(6),2014,715-24
3. Iida Y, H Tsuno N, Kishikawa J, Kaneko K, Muro K, Kawai K, Ikeda T, Ishihara S, Yamaguchi H, Sunami E, Kitayama J, Yatomi Y, Watanabe T. Phosphatidylserine-specific Phospholipase A1 (PS-PLA1) Expression in Colorectal Cancer Correlates with Tumor Invasion and Hematogenous Metastasis. *Anticancer Res.* 2015 Mar;35(3):1459-64.

2014 年度

4. Kawai K, Kitayama J, Tsuno NH, Sunami E, Watanabe T. Thrombocytosis before pre-operative chemoradiotherapy

predicts poor response and shorter local recurrence-free survival in rectal cancer. Int J Colorectal Dis 査読有 28(4):527,2013 527-35 DOI 10.1007/s00384-012-1594-4

2012年度

5. Yasuda K, Sunami E, Kawai K, Nagawa H, Kitayama J. Laboratory blood data have a significant impact on tumor response and outcome in preoperative chemoradiotherapy for advanced rectal cancer. J Gastrointest Cancer. 査読有, 43(2),2012,236-43 doi: 10.1007/s12029-011-9268-y.

[学会発表](計6件)

2014年度

1. 須並 英二,川合 一茂,清松 知充,風間 伸介,野澤 宏彰,金沢 孝満,田中 潤一郎,田中 敏明,米山 さとみ,室野 浩司,山口 博紀,石原 聡一郎,北山 丈二,渡邊 聡明,局所進行直腸癌に対する術前化学放射線療法に関する検討,第114回日本外科学会定期学術集会,2014/4/4,国立京都国際会館(京都府・京都市)
2. 川合 一茂,石原 聡一郎,山口 博紀,北山 丈二,渡邊 聡明,術前化学放射線療法による直腸癌側方リンパ節転移の制御,第76回日本臨床外科学会総会,2014/11/22,郡山市民文化センター(福島県・郡山市)

2012年度

3. 須並 英二,斎藤 晋祐,風間 伸介,金沢 孝満,川合 一茂,谷澤 健太郎,森 健,清松 知充,北山 丈二,下部直腸癌に対する術前放射線化学療法の治療成績と問題点,第112回日本外科学会定期学術集会,2012/4/14,幕張メッセ(千葉県・千葉市)
4. 多田 訓子,川合 一茂,須並 英二,斎藤 晋祐,風間 伸介,金沢 孝満,谷澤 健太郎,清松 知充,森 健,北山 丈二,下部直腸癌に対する術前放射線化学療法施行後の組織学的効果と末梢血リンパ球サブセットの相関性についての検討,第112回日本外科学会定期学術集会,2012/4/14,幕張メッセ(千葉県・千葉市)
5. 北山 丈二,須並 英二,仁禮 貴子,多田 訓子,金子 建介,渡邊 聡明,Host immunity has a critical role in local and abscopal effects of radiotherapy for rectal cancer,第71回日本癌学会学術総会,2012/9/21,ロイトン札幌(北海道・札幌市)
6. Noriko Tada,Nelson H Tsuno,Kazushige Kawai,Koji Murono,Takako Nirei,Manabu Kaneko,Masaya Hiyoshi,Kazuhito Sasaki,Kumiko Hongo,Eiji Sunami,Joji

Kitayama,Peripheral blood lymphocyte subsets can predict the pathological response of rectal cancer patients to chemoradiation. 103th AACR Annual Meeting 2012,2012/4/3,Chicago(USA)

6. 研究組織

(1)研究代表者

北山 丈二 (KITAYAMA,Joji)
東京大学医学部附属病院・准教授
研究者番号:20251308

(2)研究分担者

須並 英二 (SUNAMI,Eiji)
東京大学医学部附属病院・講師
研究者番号:70345205