

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：12301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670736

研究課題名(和文) 頭頸部癌への重粒子線治療による immunogenic cell deathの検討

研究課題名(英文) Radiation induced immunomodulatory effects in head and neck cancers

研究代表者

近松 一朗 (Chikamatsu, Kazuaki)

群馬大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：30301378

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：放射線治療は癌細胞に作用して細胞死を誘導するが、それだけにとどまらず、一部の癌細胞では細胞死によって、免疫刺激分子の発現や免疫シグナル分子の放出をきたすことが明らかになってきた。今回、放射線照射(X線と重粒子線)による免疫学的作用について検討した。重粒子はX線と比較して高い殺細胞効果(アポトーシス誘導能)を認めた。更に放射線照射によってcalreticulinの発現増強とともにCD47の発現低下を認めた。放射線照射による抗腫瘍免疫応答の誘導のメカニズムの一つとして放射線照射された癌細胞はマクロファージによって貪食されやすくなり、癌抗原提示を促進している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Radiotherapy is generally used as one of treatment modalities for head and neck cancer, and it has been known to not only kill cancer cells but also induce anti-tumor immune responses through the expression of immunostimulatory molecules and release various signaling molecules. In this study, immunomodulatory effect by radiotherapy (X-ray and heavy ion radiation) was investigated using head and neck squamous cell carcinoma cell lines. Heavy ion radiation more efficiently killed tumor cells compared to X-ray. Moreover, radiotherapy could enhance calreticulin expression and decrease CD47 expression on tumor cells. These results suggest that radiotherapy might promote successful induction of anti-tumor immune responses via acceleration of phagocytosis by decrease of CD47 molecule.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：癌 放射線治療 免疫学

1. 研究開始当初の背景

新しい放射線治療法として粒子線が国内でも徐々に広まりつつある。粒子線治療の一つである重粒子線治療は平成 22 年 3 月より当院で治療が開始され、頭頸部癌に対しても炭素イオン線による重粒子線治療を開始している。重粒子線の特徴として、1) 線量集中度が高い、2) 生物効果が高い(X線の2~3倍)、3) 低酸素状態でも殺細胞効果がある、4) 癌の細胞周期に関係なく殺細胞効果を示すことが挙げられる。これらは、重粒子線の特徴として既に確立されており、これらの特徴から頭頸部癌のなかではリンパ節転移のない非扁平上皮癌を対象として治療を行っている(耳鼻臨床 2013:106;184-185)。現在までに 100 症例以上の頭頸部癌患者の治療を経験して、これまで放射線治療抵抗性と言われていた頭頸部領域の腺様嚢胞癌や悪性黒色腫に対して局所奏効率は 90%弱であり、十分な効果を挙げている。一方、本治療は局所治療であることより頸部転移は手術的に制御可能な症例もあるが、遠隔転移については従来の治療と変わらない。また対象となる組織型では有効な化学療法がなく、遠隔転移が出現すると制御するのは困難である。近年、放射線や一部の抗がん剤には免疫機能を向上させる、あるいは癌細胞が殺傷される際に免疫原性を上げる効果(immunogenic cell death)を有することが明らかになってきた(Frey B. et al. Curr Med Chem 2012;19:1751-1764)。それゆえ、我々が治療対象としている頭頸部扁平上皮癌に対して X 線や重粒子線が癌細胞に免疫原性の変化を生じるかどうか調べることは、他の治療との併用などの可能性を検討する上で、非常に重要である。

2. 研究の目的

本研究では、X 線と重粒子線照射によって頭頸部扁平上皮癌細胞の免疫関連分子の発現の変化やそのような分子の臨床的な意義を

解析・検討をすることを目的とする。

また、X 線や重粒子線照射を施行する患者を対象に、患者生体内でどのような免疫学的変化が生じているのかを検討し、in vitro との研究結果との整合性を確認する。これらの検討により、X 線や重粒子線などの局所治療が全身的に及ぼす影響の解明から全身的な治療として放射線治療を組み込む可能性について検討する。

3. 研究の方法

in vitro の実験系として、頭頸部扁平上皮癌の細胞株を用いて実験を行う。

培養癌細胞株に対して、X 線あるいは重粒子線を照射し、癌細胞そのものへの照射効果として、増殖能、アポトーシス誘導能を MTS assay, flow cytometry にて検討する。immunogenic cell death 誘導として calreticulin の誘導について検討する。immunomodulator としての作用として、HLA class I, II, B7 family, APM components の発現変化を flow cytometry にて解析する。照射によって発現変化をきたす分子について、癌細胞上の分子発現と免疫学的なパラメーターや臨床因子との相互関係を免疫染色によって解析する。

4. 研究成果

2 種類の頭頸部扁平上皮癌の細胞株(下咽頭癌由来 Gun-1 と舌癌由来 HSC-3)を用いて実験を施行した。まず、X 線照射を 10Gy 施行し 48 - 72 時間後にアポトーシス誘導と calreticulin 発現を調べたところ、calreticulin の発現上昇を認めた。重粒子は同じ線量を照射すると、アポトーシス誘導が有意に増加していた。X 線照射によって、HLA class I, B7H1, CD47 分子の発現の低下(低下傾向)を認めたが、発現変動は、細胞株間での差もあった。

CD47 分子について、マクロファージの貪食に対する影響とその臨床意義について検討し

たところ、癌細胞上の CD47 分子を抗体あるいは siRNA でブロックしたところマクロファージ、特に M1 マクロファージによる貪食が促進された。また、CD47 分子は頭頸部扁平上皮癌組織においても発現を認め、CD47 の発現は、臨床病理学的因子との相関は認めなかったが、予後不良因子であった。

放射線照射 (X 線及び重粒子線) によって immunogenic cell death が誘導されるが、それ以外に CD47 発現の低下を引き起こし、がん微小環境において、貪食細胞による貪食及びその後の抗原提示を促進することによって腫瘍局所の抗腫瘍免疫応答不活化に関与している可能性が示唆された。

更に、アデノシン代謝に関与する CD39 と CD73 について放射線照射による影響を検討した。今回検討した細胞株には CD39 の発現は認めなかったが、CD73 は両細胞株とも高発現していた。放射線照射による CD39/CD73 発現の変化を調べたが、特に変動は認めなかった。癌細胞は CD39/CD73 を介してアデノシン代謝に関与し免疫を抑制すると言われ、低酸素状態は CD73 を誘導することなどが知られているが、放射線の直接作用による発現の制御はなかった。

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 17 件)

1. Saitoh J, Shirai K, Imaeda M, Musha A, Abe T, Shino M, Takayasu Y, Takahashi K, Chikamatsu K, Nakano T. Concurrent chemoradiotherapy with conventional fractionated radiotherapy and low-dose daily cisplatin plus weekly docetaxel for T2N0 glottic cancer. *Radiat Oncol* 2017;12:39. 査読有
2. Takahashi H, Sakakura K, Kudo T, Toyoda M, Kaira K, Oyama T, Chikamatsu K. Cancer-associated fibroblasts promote an immunosuppressive microenvironment

through the induction and accumulation of protumoral macrophages. *Oncotarget* 2017;8:8633-8647. 査読有

3. Sakakura K, Tazawa M, Otani N, Takagi M, Morita M, Kurosaki M, Chiyoda T, Kanai Y, Endo A, Murata T, Shino M, Yokobori Y, Shirakura K, Wada N, Chikamatsu K. Impact of a multidisciplinary round visit for the management of dysphagia utilizing a Wi-Fi-based wireless flexible endoscopic evaluation of swallowing. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2017;126:47-53. 査読有
4. Shirai K, Saitoh JI, Musha A, Abe T, Kobayashi D, Takakusagi Y, Takaysu Y, Shino M, Toyoda M, Takahashi K, Chikamatsu K, Ohno T, Nakano T. Clinical Outcomes of Definitive and Postoperative Radiotherapy for Stage I-IVB Hypopharyngeal Cancer. *Anticancer Res* 2016;36:6571-6578. 査読有
5. Sakakura K, Takahashi H, Kaira K, Toyoda M, Murata T, Ohnishi H, Oyama T, Chikamatsu K. Relationship between tumor-associated macrophage subsets and CD47 expression in squamous cell carcinoma of the head and neck in the tumor microenvironment. *Lab Invest* 2016;96:994-1003. 査読有
6. Takahashi H, Sakakura K, Mito I, Ida S, Chikamatsu K. Dynamic changes in immune cell profile in head and neck squamous cell carcinoma: Immunomodulatory effects of chemotherapy. *Cancer Sci* 2016;107:1065-1071. 査読有
7. Kaira K, Toyoda M, Shimizu A, Imai H, Sakakura K, Nikkuni O, Suzuki M, Iijima

- M, Asao T, Chikamatsu K. Decreasing expression of glucose-regulated protein GRP78/BiP as a significant prognostic predictor in patients with advanced laryngeal squamous cell carcinoma. *Head Neck* 2016;38:1539-1544. 査読有
8. Kaira K, Toyoda M, Shimizu A, Mori K, Shino M, Sakakura K, Takayasu Y, Takahashi K, Oyama T, Asao T, Chikamatsu K. Expression of ER stress markers (GRP78/BiP and PERK) in patients with tongue cancer. *Neoplasma*. 2016;63:588-594. 査読有
 9. Kaira K, Toyoda M, Shimizu A, Imai H, Sakakura K, Suzuki ON, Iijima M, Asao T, Chikamatsu K. Prognostic significance of GRP78/BiP expression in patients with Stage III/IV hypopharyngeal squamous cell carcinoma. *Neoplasma* 2016;63:477-483. 査読有
 10. Kaira K, Toyoda M, Shimizu A, Shino M, Sakakura K, Takayasu Y, Takahashi K, Asao T, Chikamatsu K. Expression of ER stress markers (GRP78/BiP and PERK) in adenoid cystic carcinoma. *Acta Otolaryngol* 2016;136:1-7. 査読有
 11. Musha A, Shimada H, Shirai K, Saitoh J, Yokoo S, Chikamatsu K, Ohno T, Nakano T. Prediction of acute radiation mucositis using an oral mucosal dose surface model in carbon ion radiotherapy for head and neck tumors. *PLoS ONE* 2015;10: e0141734. 査読有
 12. Takahashi H, Sakakura K, Kawabata-Iwakawa R, Rokudai S, Toyoda M, Nishiyama M, Chikamatsu K. Immunosuppressive activity of cancer-associated fibroblasts in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Immunol Immunother* 2015;64:1407-1417. 査読有
 13. Nikkuni O, Kaira K, Toyoda M, Shino M, Sakakura K, Takahashi K, Tominaga H, Oriuchi N, Suzuki M, Iijima M, Asao T, Nishiyama M, Nagamori S, Kanai Y, Oyama T, Chikamatsu K. Expression of Amino Acid Transporters (LAT1 and ASCT2) in Patients with Stage III/IV Laryngeal Squamous Cell Carcinoma. *Pathol Oncol Res* 2015;21:1175-1181. 査読有
 14. Sakakura K, Takahashi H, Kaira K, Toyoda M, Oyama T, Chikamatsu K. Immunological significance of the accumulation of autophagy components in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Sci* 2015;106:1-8. 査読有
 15. Yokobori Y, Toyoda M, Sakakura K, Kaira K, Tsushima Y, Chikamatsu K. ¹⁸F-FDG uptake on PET correlates with biological potential in early oral squamous cell carcinoma. *Acta Otolaryngol* 2015;135:494-449. 査読有
 16. Toyoda M, Kaira K, Shino M, Sakakura K, Takahashi K, Takayasu Y, Tominaga H, Oriuchi N, Nikkuni O, Suzuki M, Iijima M, Tsukamoto N, Nagamori S, Kanai Y, Oyama T, Chikamatsu K. CD98 is a novel prognostic indicator for patients with stage III/IV hypopharyngeal squamous cell carcinoma. *Head Neck* 2015;37:1569-1574. 査読有
 17. Shino M, Yasuoka Y, Nakajima K, Chikamatsu K. A case of pyriform sinus fistula infection with double tracts. *Case Rep Otolaryngol* 2014;2014:126840. 査読有
- [学会発表](計19件)
1. Chikamatsu K, Takahashi H, Sakakura K,

- Shino M, Ida S, Mito I, Toyoda M. Identification of circulating tumor cells and its clinical relevance in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. AHNS 9th International Conference on Head and Neck Cancer. July 16-20, 2016 (Seattle, USA)
2. Sakakura K, Takahashi H, Motegi S, Kaira K, Toyoda M, Chikamatsu K. Immunological and clinicopathological significance of MFG-E8 expression on oral squamous carcinoma. AHNS 9th International Conference on Head and Neck Cancer. July 16-20, 2016 (Seattle, USA)
 3. Tada H, Takahashi H, Shino M, Takahashi K, Sakakura K, Chikamatsu K. Prognostic value of inflammatory biomarkers in nasopharyngeal carcinoma. AHNS 9th International Conference on Head and Neck Cancer. July 16-20, 2016 (Seattle, USA)
 4. Shino M, Toyoda M, Nikkuni O, Takayasu Y, Chikamatsu K. Superselective intra-arterial cisplatin infusion with concomitant intensity modulated radiation therapy for maxillary sinus cancer. AHNS 9th International Conference on Head and Neck Cancer. July 16-20, 2016 (Seattle, USA)
 5. 坂倉浩一、高橋秀行、近松一朗. 腫瘍微小環境における tumor-associated macrophage (TAM) と CD47 発現との関係 第 33 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会 2015 年 2 月 26-28 日 (東京都)
 6. Takahashi H, Sakakura K, Chikamatsu K. Immunosuppressive activity of cancer-associated fibroblasts in head and neck squamous cell carcinoma. AACR Annual Meeting, April 18-22, 2015 (Philadelphia, USA)
 7. Sakakura K, Takahashi H, Chikamatsu K. Relation between tumor-associated macrophage(TAM) subsets and CD47 expression on squamous cell carcinoma of the head and neck (SCCHN) in tumor microenvironment. AACR Annual Meeting, April 18-22, 2015 (Philadelphia, USA)
 8. 高安幸弘、紫野正人、豊田実、新国撰、高橋克昌、近松一朗、斎藤淳一、白井克幸、大野達也、中野隆史 群馬大学における頭頸部悪性腫瘍に対する重粒子線治療の短期成績 第 116 回日本耳鼻咽喉科学会 2015 年 5 月 20-23 日 (東京都)
 9. Chikamatsu K., Takayasu U, Shino M, Toyoda M, Nikkuni O. Carbon ion radiotherapy with concurrent chemotherapy for head and neck mucosal melanoma 第 39 回日本頭頸部癌学会ならびに第 4 回アジア頭頸部癌学会学術講演会 2015 年 6 月 3-6 日 (神戸)
 10. Sakakura K, Takahashi H, Toyoda M, Chikamatsu K. Relation between Tumor-associated Macrophage Subsets and CD47 Expression on Oral SCC. 第 39 回日本頭頸部癌学会ならびに第 4 回アジア頭頸部癌学会学術講演会 2015 年 6 月 3-6 日 (神戸)
 11. Takahashi H, Sakakura K, Nikkuni O, Chikamatsu K. The Alteration of Immune Effector and Suppressor Cells in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. 第 39 回日本頭頸部癌学会ならびに第 4 回アジア頭頸部癌学会学術講演会 2015 年 6 月 3-6 日 (神戸)
 12. Sakakura K, Takahashi H, Kaira K, Toyoda M, Chikamatsu K. Relation between tumor-associated macrophage (TAM) subsets and CD47 expression on

- squamous cell carcinoma of the head and neck (SCCHN) in tumor microenvironment International Conference of Cancer Immunotherapy and Macrophages July 9-11, 2015 (Tokyo)
13. 高橋克昌、西岡由樹、近松一朗、白井克幸、齋藤淳一、大野達也、中野隆史 重粒子線による嗅神経芽細胞腫の治療経験 第54回日本鼻科学会 2015年10月1-3日(広島市)
 14. 高安幸弘、紫野正人、豊田実、高橋克昌、近松一朗、齋藤淳一、白井克幸、大野達也、中野隆史 群馬大学における頭頸部悪性黒色腫に対する重粒子線治療成績 第115回日本耳鼻咽喉科学会 2014年5月14-17日(福岡市)
 15. 高安幸弘、紫野正人、豊田実、近松一朗、齋藤淳一、白井克幸、大野達也、中野隆史 群馬大学における頭頸部領域腺様嚢胞癌に対する重粒子線治療の短期治療成績 第38回日本頭頸部癌学会 2014年6月12-13日(東京都)
 16. Takayasu Y, Shino M, Toyoda M, Takahashi K, Chikamatsu K, Saitoh J-I, Shirai K, Ohno T, Nakano T. Results Of Carbon Ion Radiotherapy For Mucosal Malignant Melanoma Of The Head And Neck IFHNOS 5th World Congress And AHNS Annual Mtg. July 26-30, 2014 (NY, USA)
 17. Sakakura K, Toyoda M, Oyama T, Chikamatsu K. Immunological significance of autophagy components accumulated in oral squamous cell carcinoma IFHNOS 5th World Congress And AHNS Annual Mtg. July 26-30, 2014 (NY, USA)
 18. Takahashi H, Sakakura K, Chikamatsu K. Immunological significance of cancer-associated fibroblasts in head

- and neck squamous cell carcinoma IFHNOS 5th World Congress And AHNS Annual Mtg. July 26-30, 2014 (NY, USA)
19. Takahashi H, Sakakura H, Chikamatsu K. Immunosuppressive role of cancer-associated fibroblasts in head and neck squamous cell carcinoma The 73rd Annual Meeting of the Japanese Cancer Association Sep.25-27, 2014 (Yokohama)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：
 国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 取得年月日：
 国内外の別：

〔その他〕
 ホームページ等

6. 研究組織
 (1)研究代表者
 近松 一朗 (CHIKAMATSU Kazuaki)
 群馬大学・大学院医学系研究科・教授
 研究者番号：30301378