

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 24 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860976

研究課題名(和文)放射線照射とNSAIDsの併用による新規腫瘍免疫賦活療法の基礎的研究

研究課題名(英文)Basic study of the new tumor immunity activation therapy by combination of irradiation and NSAIDs

研究代表者

鈴木 健之(Suzuki, Kenshi)

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号：20726442

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、放射線と celecoxib (CXB) の併用療法の効果の根拠を見出すため、マウス扁平上皮癌細胞SCC7のマウス大腿部皮下移植モデルを用いて治療効果を検討し、そのメカニズムを検証する事を目的とした。

結果、CXBとX線の併用は、それぞれの単独治療群と比較し、強い腫瘍増殖抑制作用を示した。そして、そのメカニズムに、強いERストレスの惹起に伴う免疫賦活関連タンパク calreticulin の発現上昇が関与する事を確認した。本研究ではマウスへの重篤な副作用も無く、有効な治療効果を確認した。この事は、X線とCXB投与の併用が癌治療における新しい免疫賦活療法として提示出来る可能性を示唆している。

研究成果の概要(英文)：We examined effect of treatment by using a mouse femoral region hypodermic implantation model of mouse squamous cell carcinoma cells (SCC7) to find the evidence of the effect of the therapy with radiation and celecoxib (CXB), and tested the mechanism. As a result, CXB and the X-ray combined treatment showed strong tumor growth inhibitory effect in comparison with each monotherapy. And we confirmed that expression increase of immunostimulation-related protein calreticulin with the initiation of strong ER stress was associated with the mechanism. We confirmed effective effect of treatment without Serious ADR to a mouse in this study. These results suggest the possibility that X-rays and the combination of the CXB administration can show as new immunity activation therapy in the cancer therapy.

研究分野：放射線生物学

キーワード：ERストレス DAMPs 免疫 celecoxib 放射線

## 1. 研究開始当初の背景

がん治療においては、有効性が高く侵襲性が低い治療法の開発が望まれている。その候補の一つに局所放射線治療と全身の腫瘍免疫反応を併用する治療法がある。小胞体(ER)ストレスは、damage-associated molecular patterns(DAMPs)を誘導し、腫瘍免疫反応を高めることが示唆されている。放射線照射と非ステロイド性消炎・鎮痛薬(NSAIDs)のcelecoxib(CXB)はPGE2を阻害する作用に加え、単独でERストレスを惹起する作用を持つ事が明らかにされており、放射線と併用することでより強いERストレスを負荷し、局所制御とともに効果的に腫瘍免疫反応を誘導できることが期待されていた。

## 2. 研究の目的

本研究では、局所放射線治療とcelecoxibの併用療法の治療効果の根拠を見出すため、マウス扁平上皮癌細胞SCC7のマウス大腿部皮下移植モデルを用いて治療効果を検討し、ならびにそのメカニズムについて検証することを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) (併用効果の *in vitro* 検証実験)  
対象にマウス扁平上皮癌細胞株SCCVIIを用いた。検討したX線の線量(6Gy)やCXB(Pfizer,USA)の濃度(50 $\mu$ M)は先行研究で強いERストレスが確認された組み合わせに基づき選択した。その他CXBは10 $\mu$ Mの濃度も比較対象として検証を行った(マウス実験での投与量に換算した場合、等量となるため)。CXBやX線による細胞増殖抑制作用の検証は、コロニーサバイバル法で行った。また、培養細胞への各々の処理後に誘導される細胞死、ERストレス、ならびにDAMPsの発現については、フローサイトメトリー、ウェスタンブロッティング、そして免疫染色法により解析した。

## (2) (併用効果の *in vivo* 検証実験)

SCCVII細胞をC3Hマウスの左脚皮下に移植し、X線(20Gy)とCXB(100mg/kg)の併用治療を行った。治療から1ヶ月後、今度は反対脚皮下にSCCVII細胞を再移植し、その細胞の拒絶の有無もしくは増殖の遅延を検討した。

また、腫瘍を両脚大腿部皮下に同時に腫瘍細胞を移植し、片足だけに放射線照射を行うという実験を行った。ここにcelecoxib投与の有無の条件を加えて、併用による治療効果を比較検証した。(アブスコパル効果の検証)

いずれの実験系でもマウス腫瘍組織を摘出する群を設け、それぞれ照射日から換算して5日目、12日目の腫瘍を摘出し、ウェスタンブロットや免疫染色を行い、腫瘍内微小環境における細胞死や免疫誘導反応の検証を行った。

## 4. 研究成果

### (1) (併用効果の *in vitro* での検証実験)

#### コロニーサバイバル法

CXB 0 $\mu$ M 処理(control)の生存曲線と比較したとき、10 $\mu$ MのCXB処理によるX線の増感作用は確認出来なかった。しかし、50 $\mu$ MのCXB処理では、6Gyと8Gyの生存率において有意な放射線増感作用を認める事が出来た。(図1)

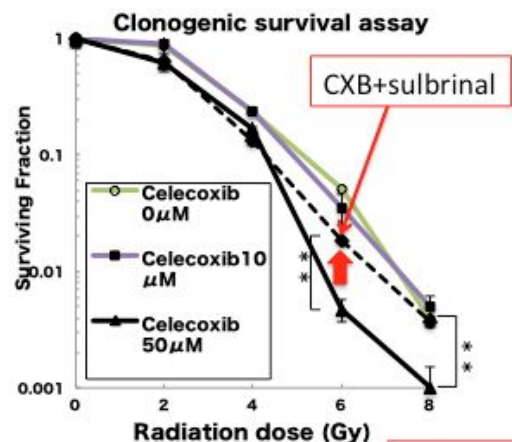


図1 放射線増感作用の検証

また、この増感効果は、ER ストレス抑制薬として知られている sulbrinal を 1  $\mu\text{M}$  加えることによって抑制される事がわかった。言い換えると増感作用には ER ストレスが関与しているということを示している。

### 各種細胞死の検証

放射線によって誘導される代表的な細胞死形態であるアポトーシス（検証マーカー；cleaved-caspase 3）、オートファジー（検証マーカー；LC3）、senescence（検証マーカー；p16、SA- $\beta$ -gal)について、フローサイトメトリー（図2；オートファジーとsenescenceのフローサイトメトリーの結果を代表して示す。）ならびにウェスタンブロットで解析を行った所（図3）CXB50  $\mu\text{M}$  と X 線 6Gy の組み合わせはコントロールと比較し、発現上昇傾向にある事が示唆された。

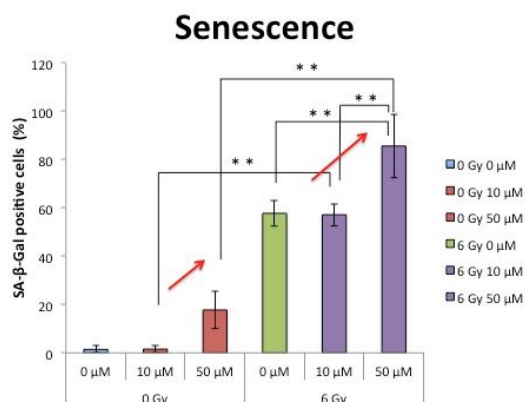
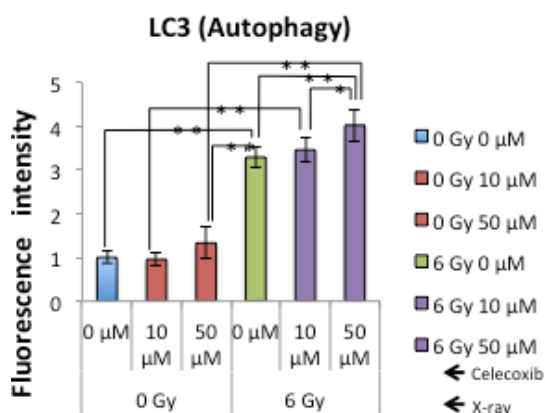


図2 フローサイトメトリーによる細胞死の検証。

### ER ストレスの検証

ウェスタンブロットによって ER ストレスの経路のひとつである PERK-elf2 経路の発現変化を検証した。Phospho-elf2 の発現はセレコキシブの濃度依存的に増加することがわかった。CXB 処理に X 線照射を加えると Phospho-elf2 の発現はさらに上昇した。コントロールの細胞と比較したとき、特に顕著な発現増加が確認されたのは X 線 6Gy と CXB 50  $\mu\text{M}$  を組合せた時であった。（図3）

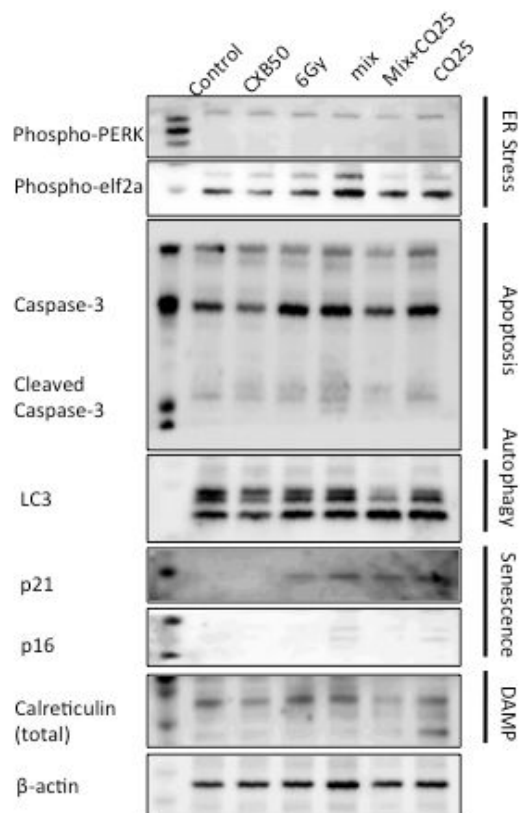


図3 ER ストレス、細胞死、DAMP 関連タンパクの発現

### DAMPs 発現の検証

DAMPs の発現を Flowcytometry、免疫染色（図4）、ならびにウェスタンブロットによって検出した（図3）。今回は DAMPs の1つであるカルレティキュリンに着目し、その発現変化について検証を行った。カルレティキュリンは、細胞に与えられたストレスの程度に応じ、小胞体内から細胞膜表面に出現してくるタンパク質である。それは、免疫蛍光染

色においては(図4)の中の赤いフォーカスとして示される。カルレティキュリンのフォーカスがコントロールの細胞ではほとんど確認出来なかったが、対照的にセレコキシブ 50  $\mu$ M と 6Gy の X 線照射との組合せで、フォーカスの顕著な増加が確認された。

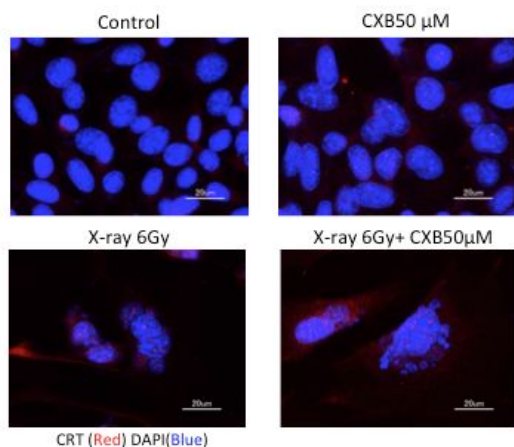


図4 calreticulin の免疫染色 (CRT; 赤色)

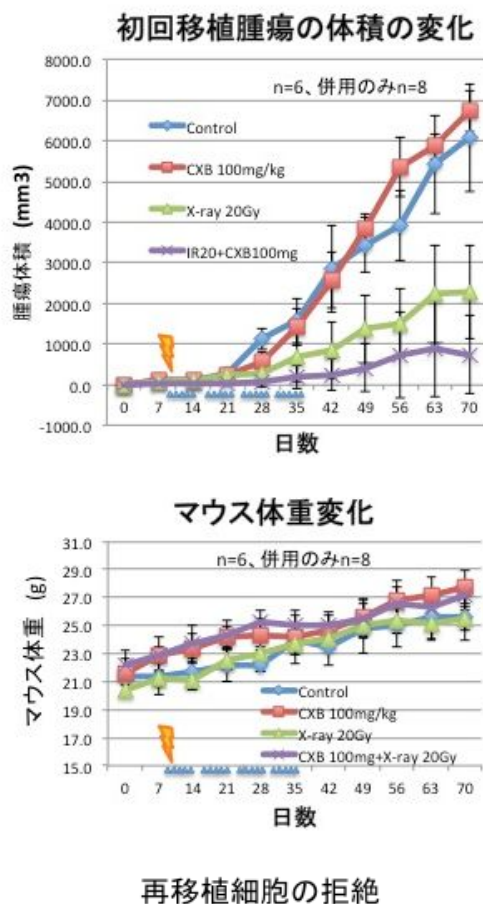
同様に、カルレティキュリン抗体により蛍光標識された細胞をフローサイトメトリーによって検出したとき、蛍光強度が薬<放射線<の組合せの順に増加することが確認された。また、タンパク抽出バッファーを用いて、細胞膜タンパクのみを抽出し、ウエスタンブロットによってカルレティキュリンの発現を調べた。コントロールの細胞と比較すると、カルレティキュリンの発現は、50  $\mu$ M CXB と 6Gy の X 線照射の組合せの時に特に顕著に増加する事が確認された。

(2) (併用効果の *in vivo* での検証実験)

各種治療後のマウス皮下移植腫瘍体積の推移

(図5)は皮下移植腫瘍担癌マウスに対する (i) 無処理、(ii) CXB100mg/kg、(iii) X-ray 20Gy、(iv) CXB100mg/kg + X-ray 20Gy 治療後の腫瘍体積の推移を示すものである。併用群は、他の群と比較して腫瘍の増殖が抑えられている事が分かる。併用群では半数のマウス(8匹中4匹)で腫瘍が完全に消失し、それらのマ

ウスに対する腫瘍細胞の再移植は、腫瘍細胞に対する免疫反応の構築のためにすべて拒絶され、検証期間中(治療から 100 日間)には再度定着する事は無かった。



	検討したマウスの数	再移植した細胞を拒絶したマウスの数
Control	6	0
CXB 100mg/kg	6	0
X-ray 20Gy	6	1
CXB + X-ray	8	4

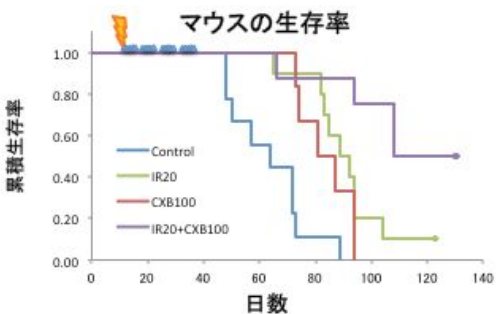


図5 検証期間におけるマウスの腫瘍体積、体重の推移、生存率。ならびに再移植細胞に対するの拒絶の有無の検証

## アブスコパル効果の検証

(図 6)は図 4 で確認されたような免疫反応の構築をより明らかにするために腫瘍の両脚同時移植、片足のみ治療という実験系によりアブスコパル効果の出現を検証したものである。CXB100mg/kg + X-ray 20Gy の併用を行った群では、X 線治療を行った左脚のみならず未照射の右脚の腫瘍も退縮傾向にある事がわかった。総じて併用群では半数のマウス(12 匹中 6 匹)で腫瘍の退縮、かつアブスコパル効果の出現を確認する事が出来た。

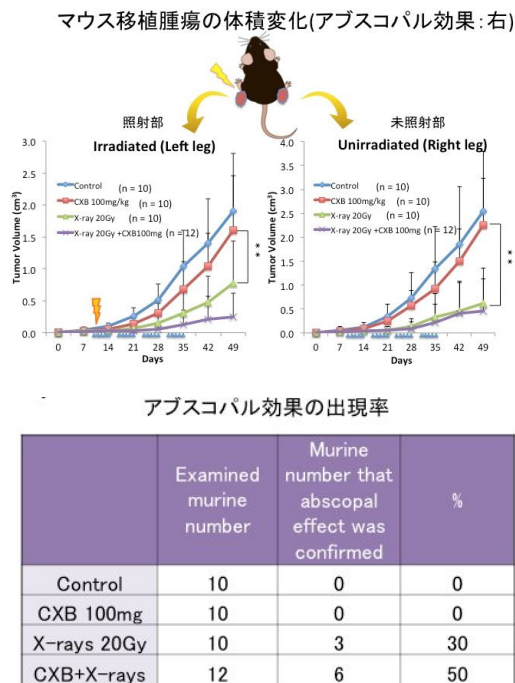


図 6 アブスコパル効果の検証

## 腫瘍増殖抑制メカニズムの検証

治療から 5 日後、ならびに 12 日後の腫瘍を摘出し、免疫染色を行った。5 日後の組織には際立った発現の変化は確認出来なかったが、12 日後の組織においては以下のような反応を確認する事が出来た。無処理群と比較したところ、併用群の組織では細胞死 (アポトーシス) の誘導を示す cleaved caspase-3 の発現が確認された。cleaved caspase-3 が陽性を示す腫瘍組織の近傍では、DAMPs (calreticulin) の発現が上昇している様子が確認され、さらに免疫担当細胞と考えられる CD

8 陽性細胞の浸潤とみられる所見が観察された。さらに、腫瘍から抽出したタンパクサンプルを用いてウェスタンブロット法で発現解析を行ったところ、強い ER ストレスの惹起を示す、(PERK-elf2 経路) の発現上昇、アポトーシスを初め様々な細胞死の誘導 (cleaved-caspase 3; アポトーシス、LC3; オートファジー、p16 ; senescence) 、そして calreticulin 等の DAMPs の誘導が確認された。(図 7)

## アブスコパル効果に関わる分子の検証

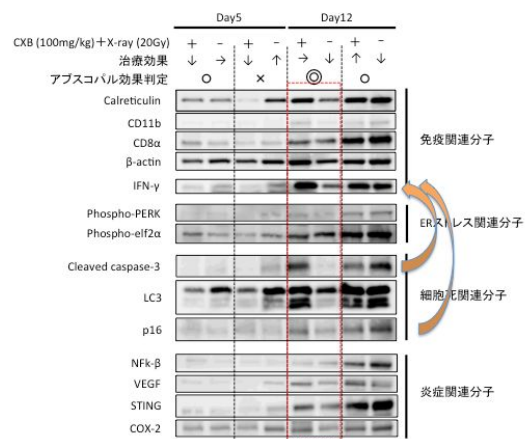


図 7 アブスコパル効果に関わる分子の検証

## (3) 研究成果の総括

X 線とセレコキシブの併用群で、半数のマウスで再移植細胞の拒絶が生じ、残りの半数で増殖の遅延が確認された。

腫瘍増殖抑制には腫瘍内微小環境での calreticulin の発現上昇に伴い、腫瘍免疫惹起反応が起こった為であると推定される。

この腫瘍免疫惹起反応は、アブスコパル効果としても働き、未照射部の腫瘍も縮小させる作用が確認された。

## (4) 研究成果から導きだされる結論

X 線とセレコキシブの併用は、腫瘍内微小環境において calreticulin を強発現させ、腫瘍免疫を惹起させることが明らかとなった。よって、この併用法は新規免疫賦活療法として提示出来る可能性があると考えられる。

## 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 1 件 )

鈴木 健之、セレコキシブによる膠芽腫の放射線増感性とその分子機構、医学のあゆみ、

2015; 252(13)1297- 8 (査読無し)

[ 学会発表 ] ( 計 5 件 )

鈴木 健之、ゲレルチュルン・アリウンゲレル、善光純子、坪井康次、X 線とセレコキシブの併用は癌細胞に強い小胞体ストレスを負荷して calreticulin の発現を上昇させる。

第 17 回癌治療増感研究シンポジウム、2015 年 02 月 06 日~2015 年 02 月 07 日、奈良県文化会館小ホール ( 奈良 )

鈴木健之、ゲレルチュルン・アリウンゲレル、善光純子、坪井康次、放射線とNSAIDs の併用による新規腫瘍免疫賦活療法の基礎的研究、第8回 QuantumMedicine 研究会(招待講演)、2015年03月01日、茨城大学理学部 K棟インタビュースタジオ ( 茨城 )

Kenshi Suzuki, Ariungerel Gerelchuluun, Lue Sun, Takaaki Ishikawa, Kazuya Ito, Eri Manabe, Junko Zenkoh, and Koji Tsuboi, The combination of X- rays and celecoxib causes the strong ER stress to tumor cells and raises expression of calreticulin., 15th International Congress of Radiation Research(国際学会)、2015 年 05 月 25 日~ 2015 年 05 月 29 日、Kyoto International Conference Center ( Kyoto )

Kenshi Suzuki, Ariungerel Gerelchuluun, Eri Manabe, Junko Zenkoh, and Koji Tsuboi, The combination of X- rays and celecoxib causes strong ER stress to tumor cells and raises expression of calreticulin. 第 74 回日本癌学会学術総会、2015 年 10 月 08 日~ 2015 年 10 月 10 日、名古屋国際会議場 ( 名古屋 )

## 6 . 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 健之 ( Suzuki , Kenshi )

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号 : 20726442