

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591832

研究課題名(和文) 抗腫瘍免疫を増強する放射線治療法確立のための基礎的研究

研究課題名(英文) Research for enhancing immunological antitumor effects in radiation therapy

研究代表者

石川 仁 (Ishikawa, Hitoshi)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：70344918

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：マウス悪性黒色腫細胞株を移植し、40Gyを照射した結果、10匹中、5匹で局所制御が得られた。脾細胞48時間培養液を検討した結果、腫瘍非制御群のIFN- γ は 0.6 ± 0.6 pg/mlに対し、腫瘍制御群で 5.4 ± 6.9 pg/mlと有意差がみられた。同様に血清IFN- γ 値も差を認めた。また、TCD50照射後の局所制御した群では反対側の移植率が低下していた。

転移性乳癌26症例の放射線治療前後の血清と乳癌細胞からの抽出蛋白に対する抗原抗体反応を検索した結果、16例にIgGバンドが照射後に出現し、この反応が認められた群で3年生存率が高かった。照射による抗腫瘍免疫反応が成績に影響する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Five of 10 tested mice malignant melanoama after 40 Gy irradiation were controlled (C-group) and the remaining 5 developed progression (R-group). The level of IFN- γ in the supernatants of 48 hr-cultivated spleen cells obtained 28 days after irradiation in the C-group was 5.4 ± 6.9 pg/ml, but that in the R-group was 0.6 ± 0.6 pg/ml ($p < 0.05$). Similarly, plasma IFN- γ level in the C-group was also higher than that in the R-group.

To assess whether autoimmunity induced by radiotherapy (RT) has beneficial impacts on outcomes for metastatic breast cancer patients, plasma serially corrected before, during, and after RT from 28 patients with metastatic breast cancer were analyzed. Western blot experiments were performed to detect antibody formation to tumor antigens extracted from human breast cancer cell lines. Tumor-specific antibodies were detected in 57% of the patients. The 3-year OS rates of IgG positive (n=16) and negative (n=12) groups were 65.6 % and 22.2 %, respectively.

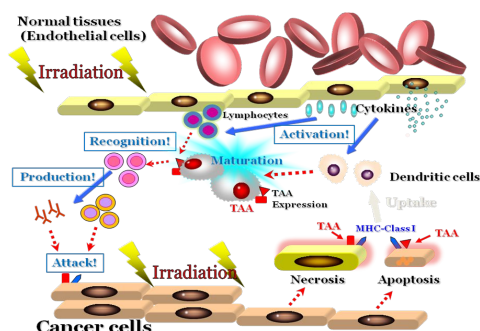
研究分野：腫瘍免疫学

キーワード：腫瘍免疫 放射線治療 サイトカイン 抗腫瘍抗体 陽子線治療

1. 研究開始当初の背景

(1) がんに対する放射線療法は治療関連機器の開発および画像診断学の発展により、革新的な治療技術の向上による高精度治療が可能になった。これは局所制御の向上ならびに周辺臓器の有害事象の軽減として治療成績の向上に結び付いている。これを後押しするかのよう、我が国における人口の高齢化とがん罹患率の上昇によって、放射線治療の適応となるがん患者数は増加しており、治療後の生活の質を維持した質の高い放射線治療法の確立は急務である。

放射線治療は歴史的に外科治療や化学療法と同様、宿主に対して免疫抑制的に作用すると理解されてきた。一方で、放射線治療による宿主の免疫応答があることも古くから知られてきた。なかでも、免疫賦活作用の臨床的な現象の1つとして、照射部位とは異なる遠隔部位で腫瘍が縮小する場合がある。残念ながら頻度も少なかったことや当時の研究手法が未熟であったことから、この現象のメカニズムを解明するまでには至らなかった。しかし、近年の分子生物学の発展により、腫瘍免疫学が著しい進歩を遂げた結果、局所治療による全身的な抗腫瘍作用についての多くの研究がなされ、放射線照射によるこのような宿主の免疫応答が少しずつ明らかとなってきた。



がん細胞に対する放射線照射による細胞死はMHC-クラスI分子や共起刺激分子とともに、腫瘍関連抗原をその表面上に強く発現し、樹状細胞やマクロファージなどにより認識され、貪食される。同時に、照射によって腫瘍細胞や周囲の微小環境から放出される前炎症性サイトカインは貪食細胞の成熟化、抗原提示を促進することが報告された(Nat. Med. 13:54-61, 2007)。このように、放射線照射で誘導される免疫応答のメカニズムは徐々に解明されつつあるが、その臨床的な効果についてはいまだ明確ではない。このため、宿主の免疫能を支持する治療法、すなわち免疫療法を併用した放射線治療の臨床試験が試行されてきており、本学でも進行肝臓がんに対して免疫療法併用陽子線治療の臨床試験を開始するに至った。

(2) 照射による有害事象の改善のためには標的に集中した治療が望まれる。陽子線治療はX線による放射線治療と比較すると線量集中度が高いため、多くの腫瘍に対して十分な線量を投与できるとともに、腫瘍の周囲に存在する正常組織の照射線量や照射体積を少なくできる。

肝臓癌に対する陽子線による高線量照射の有効性に関する報告がだされてきたものの、どのような症例に安全に治療ができるかについての検討は少ない。そこでラットを用いた放射線障害モデルを作成し、肝臓の病理学的変化を長期観察することとした。とくに照射後の臓器の線維化に影響する分子としてトランスフォーミング増殖因子が注目されてきていたために、この分子と肝障害への寄与を検討するとともに細胞死や増殖機能についても検討する

その結果、食道癌に対しても有害事象の軽減と安全な線量増加による治療成績の向上を図る方法として陽子線治療が注目されている。

進行食道癌の症例に対する放射線単独でのこれまでの治療成績は不良であり、化学療法を同時併用することで生存率の改善が図られてきた。しかしながら、治療後の晩期障害として、日常生活に支障をきたす心臓や肺の機能低下が長期生存者に予想以上に高く生じることが報告され、これらの障害を軽減することが求められている。一方で、心肺毒性の発生にはこれらの臓器に対する照射線量と照射された体積が関係する(線量体積効果)ことも知られるようになった。

2. 研究の目的

(1) マウス悪性黒色腫細胞株を用いて、大腿皮下に移植後に対する放射線照射後の免疫応答およびその後の移植腫瘍に対する抗腫瘍反応がどの程度生ずるかについて検討する。

(2) 照射前後の血清中サイトカインの動向や抗腫瘍抗体産生が治療成績に影響を与えるかについて検討する。最終目標は放射線照射による抗腫瘍免疫を損なわずに有効に利用する放射線治療法、有効な免疫療法併用について探索する。

(3) 有害事象に与える免疫の影響についてラット肝照射後障害モデルを作成し、照射後の変化と障害度を与える因子を病理学的に検討する。

(4) 食道癌に対する陽子線治療後の有害事象について主に物理学的な観点から、臨床成績への寄与を検討する。

3. 研究の方法

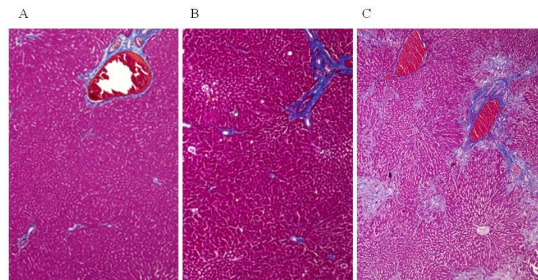
- (1)移植可マウス悪性黒色腫細胞 (B16/F10) を用いて、初めに 50%腫瘍制御線量を決定する。次いで、マウス右大腿皮下に移植した腫瘍に 50%腫瘍制御線量の放射線照射を施行し、局所効果および 2 週後に健側 (左) 大腿皮下に移植した際の 50%腫瘍制御線量との違いについて比較し、初期腫瘍の局所制御別に健側 50%腫瘍制御線量と血清サイトカイン値の動向を検討する。
- (2)照射前後の患者血清のサイトカイン測定と抗腫瘍抗体を検出し、治療成績の比較を行う。
- (3)照射による肝障害を検討するためのラット肝障害モデルを作成する。術中照射の手法を用いて、コントロール群に対して線量別に 40 週までの生存割合、血液生化学的検査結果の推移、および病理学的な検討を行う。
- (4)陽子線治療の食道癌治療後の有害事象について、その発生に影響する因子について線量体積ヒストグラムを用いて、統計学的に解析し、陽子線治療の有効性を X 線治療と比較する。

4. 研究成果

- (1) TCD50 は 40Gy であった。この線量を 10 匹のマウスに照射した結果、5 匹で局所制御が得られた。脾細胞 48 時間培養液中の GM-CSF、IFN- γ および TNF- α 濃度は腫瘍非制御群では 23.7 \pm 13.0 pg/ml, 0.6 \pm 0.6 pg/ml, and 13.1 \pm 5.6 pg/ml あったのに対し、腫瘍制御群で 37.8 \pm 10.1 pg/ml, 5.4 \pm 6.9 pg/ml, and 21.2 \pm 6.6 pg/ml と高値であった。IFN- γ の 2 群間の差は有意であった。同様に 28 日後の血清 IFN- γ 値も非制御群 0.9 \pm 0.7 pg/ml に対し、制御群で 12.0 \pm 18.7 pg/ml と高値であった。TCD50 照射後の局所制御した群では反対側の移植率が低下し抑制されていたことから、照射後の免疫応答が治療効果に正の影響を与える可能性が示唆された。
- (2) 治療前および治療開始 1-2 週後に血清が採取・保存された転移性乳癌 26 症例について検討した。年齢の中央値は 55 歳、初期治療から本プロトコル登録までの期間中央値は 67 か月 (15-118 か月) であった。放射線治療は多くの症例で 50Gy/10fr で施行した。全症例の生存期間中央値は 29 か月 (4-93 か月) であった。治療前の GM-CSF および IFN- γ の中央値はそれぞれ 65.3 pg/ml、5.03 pg/ml であり、治療後は 109.0 pg/ml および 6.6 pg/ml であった。これらの値をカットオフ値として GM-CSF および IFN- γ を高レベル群と低レベル群に分けた場合、治療前・後の 2 つのサイトカイン値には正に相関する傾向が認められた (治療前 p=0.060、治療後 p=0.058)。次に、治療前の GM-CSF および IFN- γ レベルで治療成績を検討したが、いずれも明らかな差は認められず、治療中のサイトカインレベルで検討しても同様であった。そこで、治療前・後のサイトカイン値の変動で 2 群に分けた場合、GM-CSF 上昇群 (n=11) は 3 年全生存率:68%、無遠隔再発生存率 DMFS:45%であったのに対し、GM-CSF 下降群 (n=15) ではそれぞれ 25%、

27%であり、GM-CSF 上昇群で良好な結果であった。GM-CSF 上昇群と下降群の間に年齢、転移数、総線量などの背景因子には明らかな差はみられなかった。次に乳癌細胞株から抽出した蛋白に対する抗原抗体反応をウェスタンブロットを用いて検索した。その結果、16 例に腫瘍前に認められなかった IgG バンドが照射後に出現し、この反応が認められた症例群で 3 年生存率が高い傾向であった。放射線治療に誘発された抗腫瘍免疫反応が治療成績に影響する可能性が示唆された。

- (3) 開腹下で照射を行い、肝のみに 30Gy の大線量照射後に長期間観察可能なラットモデルを確立した。コントロール群と 15Gy 群で死亡したラットはいなかったが、30Gy 群では 60%のラットが死亡した。血液学的にはアルブミン値が 15Gy 群では照射 2 週間までは低下傾向にあり、その後はコントロール群と同程度まで回復したが、30Gy 群では照射 40 週間でも低値であった。肝細胞数については照射した群で照射 4 週間には有意に減少したが、15Gy 群では 40 週間には肝細胞数はコントロール群と同程度まで回復した。同様にアポトーシス陽性細胞の割合は照射した 2 群とも照射 4 週間までコントロール群と比較し上昇したが、15Gy 群では 40 週間にはコントロール群と同程度まで減少した。一方、40 週後の Ki-67 (MIB1) 陽性率は 15Gy 群、30Gy 群はともにコントロールと比較し高値を示した。照射した肝臓は 30Gy 群では線量に関わらず、40 週間も照射による影響が続いているが、線量の少ない 15Gy 群では肝のダメージが一部回復していることが、生存率の差に起因するものと考えられた。アザン染色では 30Gy 照射群でのみ肝小葉構築の乱れや線維性隔壁などの線維化の所見が認められたが、免疫組織化学染色による α -SMA および TGF- β の発現は 15Gy、30Gy 照射群はとも



に 40 週間までコントロール群と比較し有意な上昇が認められた。以上から、長期的に照射肝の線維化への誘導が持続している可能性があると思われる。

- (4) 治療後の Grade 2 以上の心肺毒性は X 線治療では 19 例中 13 例 (68%) に生じたが陽子線治療 25 例では 1 例 (4%) のみであった。また、心肺毒性を発症した群は心臓および肺の線量が発症しなかった群と比較して有意に高かった (p<0.01)。陽子線実治療群では心臓の V30-50、肺の V5-20 および平均肺線量の平均の全てで X 線実治療群より有意に低かった。Grade 2 以上の心肺毒性がみられた X 線症例 13 例の陽子線計画では心臓および肺の線量が低下し、Grade 1 以下の心配毒性しか見られな

かった陽子線症例 24 例の X 線計画では心臓および肺の線量が有意に増加した。NTCP の解析では、実際に確認された有害事象発生確率よりも算出された予想確率は低かったものの、陽子線計画で有害事象発生確率が低下することが示唆された。

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5件)

石川 仁、福光延吉、大西かよ子、水本齊志、室伏景子、沼尻晴子、粟飯原輝人、奥村敏之、櫻井英幸、局所進行癌に対する化学療法を併用した陽子線治療成績と展、癌と化学療法、42 巻、2015、148-153、査読なし PMID:25743133

Ishikawa H, Hashimoto T, Moriwaki T, Hyodo I, Hisakura K, Terashima H, Ohkohchi N, Ohno T, Makishima H, Mizumoto M, Ohnishi K, Okumura T, Sakurai H. Proton beam therapy combined with concurrent chemotherapy for esophageal cancer. *Anticancer Res.* 35: 1757-62, 2015. PMID:25750339 査読あり

Makishima H, Ishikawa H, Terunuma T, Hashimoto T, Yamanashi K, Sekiguchi T, Mizumoto M, Okumura T, Sakae T, Sakurai H. Comparison of adverse effects of proton and X-ray chemoradiotherapy for esophageal cancer using an adaptive dose-volume histogram analysis. *J Radiat Res.* 56: 568-576, 2015. 査読あり
DOI: 10.1093/jrr/rrv001.

石川 仁、大西かよ子、水本齊志、大城佳子、奥村敏之、櫻井英幸、粒子線治療(陽子線治療、重粒子線治療)肺癌、54 巻、2014、917-925、査読あり

DOI: <http://doi.org/10.2482/haigan.54.917>

Imaeda M, Ishikawa H, Yoshida Y, Takahashi T, Ohkubo Y, Musha A, Komachi M, Nakazato Y, Nakano T. Long-term pathological and immunohistochemical features in the liver after intraoperative whole-liver irradiation in rats. *Imaeda M, J Radiat Res.* 55: 665-673, 2014.

doi: 10.1093/jrr/tru005. 査読あり

[学会発表](計6件)

Ishikawa H, Okumura T, Ohno T, Makishima H, Ohnishi K, Mizumoto M, Aihara T, Numajiri H, Hashimoto T, Sakurai H. Proton Beam Therapy combined with Concurrent Chemotherapy for Esophageal Cancer. The 56th Annual Meeting of the American Society for Radiation Oncology (ASTRO 2014), San Francisco, California, USA, 2014.9.14-17.

石川 仁、奥村敏之、水本齊志、大西かよ子、菅原香織、牧島弘和、大野豊然貴、森脇俊和、兵頭一之介、久倉勝治、田村孝史、寺島秀人、大河内信弘、橋本孝之、櫻井英幸：食道癌の化学放射線療法と陽子線治療の役割(臓器別シンポジウム)、第 52 回日本癌治療学会学術

集会、横浜、2014.8.28-30.

Ishikawa H, Hashimoto T, Mizumoto M, Makishima H, Takizawa D, Sugawara K, Okumura T, Sakurai H: Preliminary results of concurrent chemoradiation therapy using proton beam therapy for esophageal cancer. The 55th Annual Meeting of the American Society for Radiation Oncology (ASTRO 2013), Atlanta, Georgia, USA, 2013.9.22-24.

Makishima H, Ishikawa H, Terunuma T, Hashimoto T, Yamanashi K, Sekiguchi T, Mizumoto M, Okumura T, Tsuboi K, Sakurai H: Comparison of adverse effects of proton and X-ray chemoradiotherapy for oesophageal cancer using an adaptive dose-volume histogram. The European Cancer Congress 2013. Amsterdam, Netherlands, 2013.9.27-10.

Ishikawa H, Yoshida Y, Mutoh Y, Metcalfe SK, Zhang M, Zhang L, Okunieff P, Sakurai H, Nakano T: The impact of radiation-induced up-regulations of ifn- γ on local tumor control of malignant melanoma in vivo. The 54th American Society for Therapeutic Radiology and Oncology Annual Meeting, Boston, 2012.10.28-31.

石川 仁、吉田由香里、武藤泰子、櫻井英幸、中野隆史：マウス悪性黒色腫移植腫瘍に対する放射線照射後のサイトカイン上昇による局所効果予測、東京、日本放射線腫瘍学会第 25 回学術大会、2012.11.23-25

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

石川 仁 (Ishikawa Hitoshi)
筑波大学・医学医療系・准教授
研究者番号：70344918