

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670548

研究課題名(和文)放射線と免疫療法を融合したロコ・システミックがん治療法の開発

研究課題名(英文) Development of the loco-systemic cancer therapy combining localized radiation and novel immune adjuvant mesoporous silica

研究代表者

坪井 康次 (Tsuboi, Koji)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：90188615

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍に対するエックス線照射により誘導される「免疫原性細胞死」に伴い放出されたがん抗原をナノ粒子アジュバントで安定化して抗原性を高めることで、全身的ながん免疫反応を賦活する「ロコ・システミックがん治療法」を考案した。本研究では、マウス腫瘍モデルを対象としてこの治療を行い、局所及び遠隔部位の腫瘍に対する治療効果が得られるか否かを検証した。その結果、照射後の腫瘍内へナノ粒子免疫アジュバント「メソポーラスシリカ」を投与することにより、局所の再発を抑制するとともに、全身的な腫瘍特異的免疫反応を賦活できることが明らかになった。さらにインドメタシンの併用投与によりその効果が増強されることが示された。

研究成果の概要(英文)：Localized radiotherapy for cancers has an effect of immune adjuvant by inducing immunogenic cell death. The signals from dying or newly dead cells evoke anti-tumor immunity that is mediated by activated CTLs.

In this study, murine glioma cells GL261 were inoculated to syngeneic albino C57BL/6 mice. Mesoporous silica nanoparticles (MSNs) were used as an immune adjuvant. Intra-tumoral injection of MSNs was combined with localized X-ray irradiation, and the tumor growth rates and survival were analyzed. In addition, the immune-enhancing effect of indomethacin was examined.

Consequently, MSNs administration (0.1 mg/mouse) once a week for 3 weeks delayed tumor growth significantly. Moreover, 6 times administrations induced complete cure in 90% of the treated mice inducing abscopal effect in the brain. Furthermore, sequential oral administration of indomethacin enhanced anti-tumor effect and prolonged survivals of the mice. MSNs may be a promising candidate for a novel immune adjuvant.

研究分野：放射線生物学・放射線腫瘍学

キーワード：放射線治療生物学 免疫応答細胞死

1. 研究開始当初の背景

我々は、悪性脳腫瘍細胞にエックス線を照射すると腫瘍関連抗原提示装置 (MHC-I) と、アポトーシスのスイッチ (Fas) の発現が亢進することを報告した。その後、照射により腫瘍細胞からいわゆる Damage Associated Molecular pattern (DAMPs) が放出され “danger signal” となって免疫応答を誘導することが明らかになりつつある (Nat Rev Cancer, 2012)。しかし、通常の放射線治療のみでは、臨床的に腫瘍免疫賦活効果が得られているとは言い難い。一方、我々は自己がん組織を抗原とした「自家がんワクチン」の有効性を示して来たが、初期療法後の再発や転移の予防効果はあるものの、現時点では単独での治療効果には限界があると言わざるを得ない。

最近、我々は、抗原提示細胞への取り込みを高めるために BCG をナノ粒子 Hydroxyapatite (HA) に担持させた免疫アジュバントを考案して、放射線照射後の進行肝がん症例に対する第 I 相臨床試験を行った。その結果、その安全性とともに、がん再発予防効果があることを報告した。

そこで、エックス線照射による「免疫応答細胞死」の誘導と「免疫抑制の是正」効果を最大限に活かすために、照射後直にこのアジュバントを投与する「ロコ・システミックがん治療法」を考案した。本研究では、マウス腫瘍モデルを対象としてこの治療を行い、局所及び遠隔部位の腫瘍に対する治療効果が得られるか否かを検証する。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、まずマウス脳腫瘍細胞 (GL261mKO) を移植した同系アルビノ C57BL/6 マウス腫瘍モデルを作製し、局所へのエックス線照射の効果と一定時間後に脳内へ再チャレンジした腫瘍の増殖抑制・治療効果 (アブスコパル効果) を明らかにする。

(2) 次に同じ皮下腫瘍モデルを対象とし、エックス線照射後に同部位に新規ナノ粒子免疫アジュバントである Mesoporous Silica (MS) を局所投与し、局所の制御効果とともにエックス線照射野外 (対側大腿皮下) にチャレンジした腫瘍の増殖抑制・治療効果 (アブスコパル効果) を明らかにする。

(3) さらにエックス線照射に加え、免疫抑制物質である PGE2 の産生をインドメタシン投与により抑制したときの腫瘍増殖抑制効果を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) マウス腫瘍モデルの作製

GL261mKO を 1×10^7 個を同系マウス「アルビノ C57BL/6」の大腿皮下へ移植して、in vivo imaging system (IVIS) にて腫瘍のサイズを

モニターした (図 1)。

(2) エックス線照射の抗腫瘍効果とアブスコパル効果の検討

このマウス腫瘍モデルにおいて、大腿皮下へ腫瘍を移植後、10 日目に腫瘍局所に 20Gy のエックス線照射を行い、その効果を IVIS にて評価する。さらに、照射後一定の時間において、脳内へ同じ腫瘍を移植 (再チャレンジ) し、腫瘍が生着・増殖するかどうかを検討した (図 2-①)。

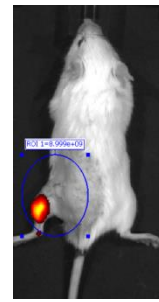


図 1

(3) エックス線とインドメタシンの併用効果の検討

腫瘍免疫応答に対し、抑制作用を示す PGE2 の産生を抑制するためにインドメタシンを用い、エックス線照射との併用効果を検討した (図 2-②)。インドメタシンは腫瘍細胞を大腿皮下へ移植後 7 日目から、脳内へ腫瘍を移植する前日 (33 日目) まで 1mg/kg の投与量を経口投与した。

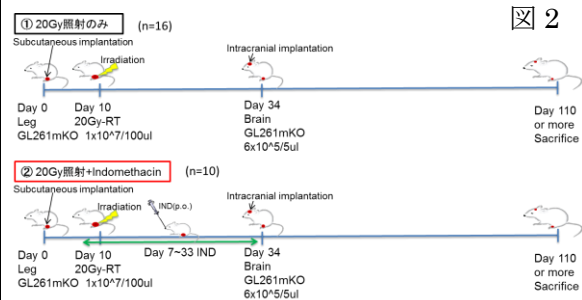


図 2

(4) 皮下腫瘍に対するエックス線照射とナノ粒子免疫アジュバント「メソポーラスシリカ」のアジュバント効果

メソポーラスシリカ (MS) とは、平均粒径 110nm で 2~3nm の pore 構造を持つ球状シリカゲル粒子である (図 3)。MS を濃度 1mg/ml になるように生理食塩液に懸濁し、超音波洗浄機にて 1 時間以上懸濁させた後に、1 回 100 μl (0.1mg/mouse) をマウスの腫瘍内に投与した。

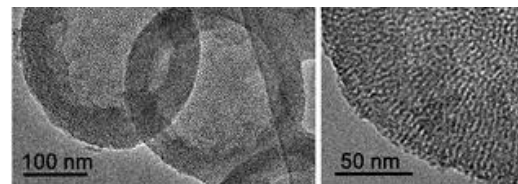


図 3

同マウスモデルにおいて、移植後 10 日目に、エックス線を 20Gy 照射し、③ 群 (図 4-③) では照射後 7, 14, 21 日目に 3 回メソポーラスシリカ (0.1mg/100 μl /mouse) を腫瘍内へ投与した。さらに、3 回投与から 3 日後に頭蓋内へ同じ腫瘍細胞を移植して腫瘍が拒絶されるかどうかを検討した。また④ 群

(図 4-④) として、③ 群で頭蓋内への移植後さらに大腿腫瘍へ3回メソポーラスシリカを追加投与する群を設定し、予後に違いが出るかどうかを検討した。

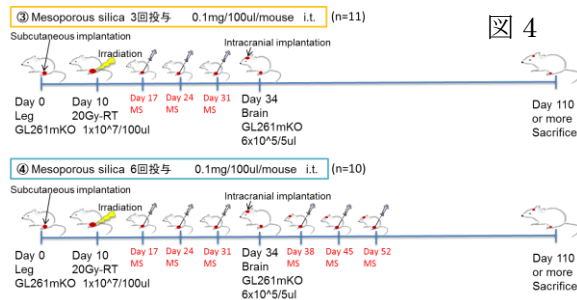


図 4

(5) エックス線とメソポーラスシリカ、インドメタシンの複合療法の効果の検討

さらに、メソポーラスシリカ3回の大腿皮下腫瘍内投与と、それに続く脳内への腫瘍移植の後にインドメタシンを投与した時の効果について検討した。メソポーラスシリカは③と同様、20Gyの照射後7, 14, 21日目に腫瘍内へ投与し、インドメタシンは脳内へ腫瘍を移植した1日後から観察終了時まで②と同じ投与量を経口投与した(図 5-⑤)。

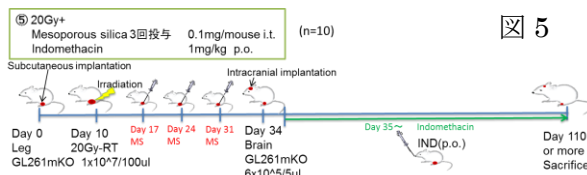


図 5

4. 研究成果

(1) マウス腫瘍モデルにおいて皮下腫瘍への局所照射後に脳に同じ腫瘍を移植したところ、皮下腫瘍が照射後に治癒せず増大したマウスでは生存期間の中央値は38日で、脳腫瘍モデルマウス(生存期間の中央値:49日)より生存期間が短縮された。一方、皮下腫瘍が照射により治癒したマウスでは、その後に脳内へ腫瘍を移植しても拒絶され、生着せずアブスコパル効果が確認された。

(2) 同腫瘍モデルにおいて、免疫抑制の是正のためにPGE2の産生を抑制するNSAIDsのひとつであるインドメタシンをエックス線照射の前後に投与したところ、エックス線照射のみの結果と比べ生存解析において有意差は認められなかったが(p=0.95)、腫瘍の増殖が抑制され、生存期間が延長する傾向が認められた(図 6 赤)。

(3) また照射後にMSを3回投与すると照射単独群と比較して腫瘍の増殖は抑制され(図 6、図 7 黄)、頭蓋内の腫瘍は6例で拒絶され、生存期間は延長したが生存解析における有意差は認められなかった(p=0.52)。

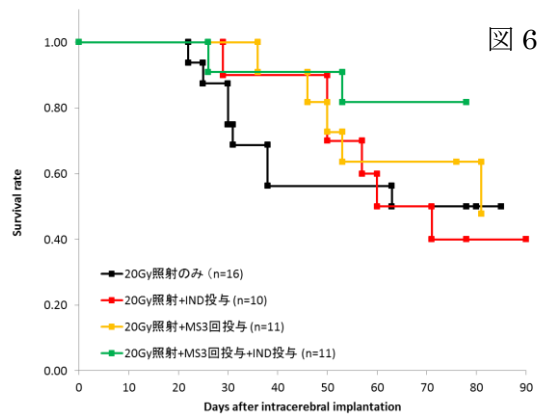


図 6

一方、頭蓋内への移植後さらに大腿腫瘍へ3回メソポーラスシリカを投与した群では、有意に予後が改善された(p=0.038)(図 7 水色)。照射のみの群では局所制御は50%であったが、メソポーラスシリカ6回投与群では90%で局所が制御され、頭蓋内の腫瘍が拒絶された。

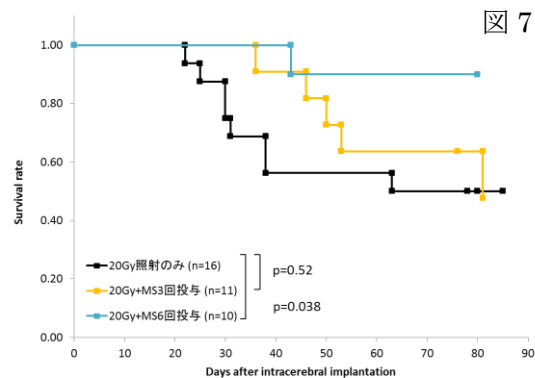


図 7

(4) さらにエックス線とMS、インドメタシンの複合療法では、エックス線照射とMS3回投与およびインドメタシン投与群に比較して腫瘍増殖は抑制され、生存期間には有意な差はないものの延長された(下表)

生存期間の中央値

系列	中央値
照射のみ (n=16)	63.000
照射+インドメタシン (n=10)	60.000
照射+MS 3回 (n=11)	81.000
照射+MS3回+インドメタシン (n=11)	-

以上から、照射後の腫瘍内へナノ粒子免疫アジュバント「メソポーラスシリカ」を投与することにより、局所の再発を抑制し、さらに腫瘍死細胞から放出された抗原を利用して全身的な腫瘍特異的免疫反応を賦活できることが明らかになった。

またインドメタシン投与により照射後の腫瘍の再増殖が抑制され、メソポーラスシリカと組み合わせることで、より効果的に腫瘍の増殖を抑制できることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Hong Z, Zenkoh J, Le B, Gerelchuluun A, Suzuki K, Moritake T, Washio M, Urakawa J, Tsuboi K. Generation of low-flux X-ray micro-planar beams and their biological effect on a murine subcutaneous tumor model. *J Radiat Res.* 2015 Sep;56(5):768-76. doi: 10.1093/jrr/rrv037. 査読有
- ② Gerelchuluun A, Manabe E, Ishikawa T, Sun L, Itoh K, Sakae T, Suzuki K, Hirayama R, Asaithambi A, Chen DJ, Tsuboi K. The Major DNA Repair Pathway after Both Proton and Carbon-Ion Radiation is NHEJ, but the HR Pathway is More Relevant in Carbon Ions. *Radiat Res.* 2015 Mar;183(3):345-356. doi: 10.1667/RR13904.1. 査読有
- ③ Mizumoto M, Yamamoto T, Takano S, Ishikawa E, Matsumura A, Ishikawa H, Okumura T, Sakurai H, Miyatake S, Tsuboi K. Long-term survival after treatment of glioblastoma multiforme with hyperfractionated concomitant boost proton beam therapy. *Pract Radiat Oncol.* 2015 Jan-Feb;5(1):e9-e16. doi: 10.1016/j.prro.2014.03.012. 査読有

[学会発表] (計 11 件)

- ① 鈴木健之、ゲレルチュルン・アリウンゲレル、真鍋絵梨、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 74 回日本癌学会学術総会 2015 年 10 月 8 日～10 日、名古屋国際会議場 (愛知県・名古屋市)
- ② 善光純子、鈴木健之、ゲレルチュルン・アリウンゲレル、大野忠夫、坪井康次、放射線照射により誘導される免疫細胞死は脳内へもアブスコパル効果をもたらす、第 74 回日本癌学会学術総会 2015 年 10 月 8 日～10 日、名古屋国際会議場 (愛知県・名古屋市)
- ③ 真鍋絵梨、ゲレルチュルン・アリウンゲレル、鈴木健之、善光純子、加藤宝光、David Chen J、榮武二、坪井康次、HDAC 阻害剤である SAHA の陽子線増感効果についての研究、第 74 回日本癌学会学術総会 2015 年 10 月 8 日～10 日、名古屋国際会議場 (愛知県・名古屋市)

- ④ ゲレルチュルン・アリウンゲレル、真鍋絵梨、志村友梨、鈴木健之、善光純子、坪井康次、陽子線と HDAC 阻害剤の併用治療法に関する基礎的研究、第 74 回日本癌学会学術総会 2015 年 10 月 8 日～10 日、名古屋国際会議場 (愛知県・名古屋市)
- ⑤ Kenshi Suzuki, Ariungerel Gerelchuluun, Lue Sun, Takaaki Ishikawa, Kazuya Ito, Eri Manabe, Junko Zenkoh, 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, 2015 年 6 月 25 日-29 日 京都国際会館 (京都府・京都市)
- ⑥ Junko Zenkoh, Ariungerel Gerelchuluun, Kenshi Suzuki, Xiupeng Wang, Atsuo Ito, Tadao Ohno, Koji Tsuboi. Radiation Induced Tumor Cell Death Bring about the "Abscopal Effect" in the Brain. 15th International Congress of Radiation Research, 2015 年 6 月 25 日-29 日 京都国際会館 (京都府・京都市)
- ⑦ Ariungerel Gerelchuluun, Eri Manabe, Takaaki Ishikawa, Takeji Sakae, Kenshi Suzuki, Ryoichi Hirayama, Aroumougame Asaithambi, David J Chen, Koji Tsuboi. DNA Repair Pathways for DNA Damages Induced By Proton and Carbon-ion Beams. 15th International Congress of Radiation Research, 2015 年 6 月 25 日-29 日 京都国際会館 (京都府・京都市)
- ⑧ Eri Manabe, Ariungerel Gerelchuluun, Kenshi Suzuki, Takeji Sakae, Takamitsu Kato, David J Chen, Koji Tsuboi. A HDAC Inhibitor, Suberoylanilide Hydroxamic Acid Enhances Biological Effect of Proton Beams. 15th International Congress of Radiation Research, 2015 年 6 月 25 日-29 日 京都国際会館 (京都府・京都市)
- ⑨ 坪井康次、鈴木健之、Gerelchuluun Ariungerel、放射線による細胞死研究の新展開～細胞死につながる初期過程を考察する～、日本放射線影響学会 第 57 回大会、2014 年 10 月 1 日-3 日、かごしま県民交流センター (鹿児島県・鹿児島市)
- ⑩ Ariungerel Gerelchuluun、石川隆昭、真鍋絵梨、孫略、伊東和也、鈴木健之、善光純子、Aroumougame Asaithambi, David J Chen、坪井康次、Biological

effectiveness of clinically used proton beam (治療用陽子線の生物学的効果)、日本放射線影響学会 第 57 回大会、2014 年 10 月 1 日-3 日、かごしま県民交流センター (鹿児島県・鹿児島市)

- ⑩ 坪井康次、放射線神経生物学の夜明け多形性膠芽腫に対する陽子線治療、第 57 回日本神経化学会大会、2014 年 9 月 29 日-10 月 1 日、奈良県文化会館 (奈良県・奈良市)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：メソポーラスシリカ粒子
発明者：王秀鵬、辻典子、吉行和子、十河友、伊藤敦夫、大野忠夫、坪井康次、善光純子、ゲレルチュルン・アリウンゲレル、山崎淳司
権利者：産業技術総合研究所、セルメディン(株)
種類：特許
番号：特願 2015-171512
出願年月日：2015 年 8 月 31 日
国内外の別： 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坪井 康次 (TSUBOI, Koji)
筑波大学・医学医療系・教授
研究者番号：90188615

(2) 研究分担者

善光 純子 (ZENKOH, Junko)
筑波大学・医学医療系・研究員
研究者番号：20710148

伊藤 敦夫 (ITO, Atsuo)
国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域 健康工学研究部門 生体材料研究グループ・研究グループ長
研究者番号：30356480