

令和 3 年 5 月 26 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K10473

研究課題名(和文) Abscopal 効果の効果的な照射/ワクチン最適照射臓器の探索

研究課題名(英文) Exploratory Optimization of Organs for Radiotherapy or Cancer Vaccination by Abscopal Effect

研究代表者

渡辺 隆 (Watanabe, Takashi)

三重大学・医学系研究科・産学官連携講座教授

研究者番号：70415529

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：転移巣局所に放射線療法を行うことで照射野から離れた部位のがん病変が縮小することを abscopal effect と呼ぶが、特に免疫チェックポイント阻害剤併用で期待できる。小動物を用いた基礎研究が行われておらず、原理は未説明。多臓器好転移がん細胞株を用いて、胎生期に各組織に入った組織常在マクロファージが抗原提示すると仮説し、血中から流入する異なる種類の単球を遮断することで、証明を計画した。肝臓のみを照射する装置を作製したが、マウスが全て死亡したため、まず後脚のみを外に出して他を遮蔽した8匹同時照射装置を作製した。黒色腫の実験に留まり、大腸・乳がんでの肝・肺・脳照射効果の違いを示すに至らなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん末期に症状緩和目的に放射線治療を行うことがあるが、多臓器に亘り転移巣がある場合に、より他の転移巣も縮小させる照射臓器を特定することが期待されたが、明らかにできていない。放射線照射を受けた腫瘍組織においてPD-L1が発現するため、免疫チェックポイント阻害剤抗PD-1抗体を併用すると照射単独よりも abscopal effect が期待でき、至適条件として、照射前から投与することでより効果が得られる。

研究成果の概要(英文)：Abscopal effect is tumor reduction effect outside the radiation field. Immune checkpoint inhibitors enhance the effect because PD-L1 is overexpressed in irradiated tumors. The exact mechanism of the effect has not been yet elucidated. The biggest obstacle to disclosure is no local irradiation devices for small animals developed. We first made irradiation devices using lead shield having windows for liver or one lobe of liver. However, all the mice that received a single dose of radiation with various doses were dead. Therefore, we next made a device using a 50 mL-conical tubes covered with lead tunnels, where holes were drilled for stretching one lower limb so that 8 mice could be simultaneously irradiated in the same condition. The device worked well but the "second" melanoma on the upper flank opposite to the lower limb did not show any obvious abscopal effects despite of the optimized schedule of an anti-PD-1 antibody administration starting in advance of radiation initiation.

研究分野：血液腫瘍科、腫瘍免疫学

キーワード：abscopal effect 遠隔効果 抗PD-1抗体 放射線治療 定位照射 小動物照射装置

## 1. 研究開始当初の背景

がん局所放射線治療 (RT) 後、遠隔巣も消失する **abscopal effect (AE)** は、これまで逸話的に観察されてきたが、免疫チェックポイント阻害剤 (ICI) の治験で効果が認められず、その後に RT を行った例で AE が観察されたり、両者の併用で AE が報告されるようになっていた。ICI と様々な薬剤の併用療法の早期臨床試験が群雄割拠する時代を迎え、より廉価で確実な併用療法も検討される必要性があった。一方、ICI の臨床現場への登場により、今後がんワクチンが見直される可能性が出てきた。これら複合免疫療法における至適併用法の検討が将来的には重要になると考えられた。また、AE に関しては免疫学的反応として捉えられてきたが、その正確な機序は未だ解明されないうえに、解決できない主たる理由は、高価な特殊な装置を除き、適切な小動物臓器限局照射装置が存在しないことが、その基盤研究を妨げてきたことに起因する。したがって、まず複数のマウスを同条件で限局照射可能な装置を開発する必要性があった。2015 年、抗 CTLA-4 抗体を投与中、後に RT 施行例に全身転移巣消失例が報告されたのに続き、肝・肺別の定位照射を用いて行われた第 I 相試験で、肝臓への RT 群で、より末梢血 T リンパ球に活性化マーカーの出現が認められ、照射臓器によって AE の程度が異なる可能性が示唆された。抗 CTLA-4・PD-1・PD-L1 抗体のうち、どの ICI が放射線治療に併用するのに最適なのか不明で、抗 CTLA-4 抗体を用いた研究が先行していた。また RT と同時或いは両者を連続的に行ううち、いずれでより AE が得られるのか、また、ICI を RT 後からか、RT の前から投与するのがより効果的なのか、至適投与方法についても全く不明であった。

## 2. 研究の目的

照射臓器の違いによって得られる AE の程度が異なるとしたら、樹状細胞ががん抗原を提示していることから説明し難いと考えられた。そこでマクロファージが抗原提示に関与している可能性が考えられた。実際、リンパ節内で髄質に存在するマクロファージが抗原提示に関与している研究成果が当研究室で得られていた。胎生期には異なった時点で異なった造血巣より、マクロファージが各臓器に迷入し、組織常在マクロファージとして生後も存在する。例えば、脳のマクログリア、肝のクッパー細胞、肺胞マクロファージ、脾の赤色髄マクロファージがこれに相当する。そして組織常在マクロファージは自立増殖能があり、また組織に炎症が生じた場合には単球がこれを補充するが、単球の流入割合は組織によって異なる。単球には古典的単球 (CCR2 陽性) と非古典的単球 (CX3CR1 陽性) の 2 種が存在し、後者が組織常在マクロファージを補填するとされている。CCR2 又は CX3CR1 ノックアウトマウスを用いることで、後者のマウスで AE が減弱すれば、組織常在マクロファージが抗原提示に関与していることが証明できると考えた。このようにして、照射臓器によって得られる AE の相違を組織常在マクロファージの違いで証明することを本研究の目的とした。また、同様のがんワクチンの効果的な

抗腫瘍効果を得るには、ワクチン接種を従来の接種部位である皮下ではなく、特定の臓器に接種することで、より高い腫瘍縮小効果が得られる可能性を仮説として立てた。

### 3. 研究の方法

1) マウス肝あるいは肝右葉を除いて全身を遮蔽し、マウス 12 匹を円盤状板上に頭を外に向けて放射状に固定し、回転させながら同時照射する装置を作製した。そして、0.65 Gy/m で Balb/c マウスで既報告では耐容可能とされた 15 Gy, 20 Gy, 25 Gy, 30 Gy で単回照射した。

2) 次に、鉛遮蔽板をトンネル状に曲げて 50mL 円錐形チューブを覆い、マウスを放射状に木製円盤上に固定し、マウスの頭をチューブ開口部に向け固定し、麻酔下に C57BL/6 マウス 8 匹同時照射できる装置を開発した。

3) 将来、流入単球の影響をみる C57BL/6 由来ノックアウトマウスと比較するため、C57BL/6 マウスにメラノーマ細胞 B16F10 を右後脚に  $1.5 \times 10^5$  個移植（これを一次腫瘍と呼ぶ）した。まず、抗 PD-1 抗体投与なしで 4 日後に左背部に  $1.2 \times 10^5$  個同腫瘍を移植（以下、二次腫瘍）し、鉛遮蔽板・円錐形チューブに開窓してマウス右後脚のみを外に出し、一次腫瘍移植 12 日後に 5 Gy, 10 Gy, 15 Gy, 20 Gy で単回照射し、二次腫瘍が縮小する至適条件設定を行った。

4) 免疫学的機序を明らかにするため、右後脚に  $1 \times 10^5$  個の B16F10 を移植したのと同じ日に、それぞれ、左背部に B16F10（二次腫瘍）を  $1 \times 10^5$  個、右背部に組織型の異なる大腸がん細胞 MC-38 を  $1 \times 10^6$  個移植し、対照とした。

5) 移植 7 日後に各 5 Gy または 15 Gy で単回照射をし、その 3 日後から抗 PD-1 抗体 250  $\mu$ g を腹腔内に 3 日毎に 3 回投与して週 2 回腫瘍計測を行った。1 群 4 匹で(1) 未治療 (2) 抗 PD-1 抗体のみ (3) 放射線療法のみ (4) 放射線療法 + 抗 PD-1 抗体群で比較した。

6) 次に、右後脚に B16F10  $1.5 \times 10^5$  個を移植し、同じ日に二次腫瘍として左背部に B16F10  $1.2 \times 10^5$  個を移植し、7 日後に 15 Gy で単回照射し、照射 3 日前から 3 日毎に（あるいは週 2 回）抗 PD-1 抗体を計 5 回腹腔内に投与し、腫瘍計測を行った。1 群 4 匹で(1) 未治療 (2) 抗 PD-1 抗体のみ (3) 放射線療法のみ (4) 放射線療法 + 抗 PD-1 抗体群で比較した。

7) 更に、右後脚に B16F10  $1 \times 10^5$  個を移植したのと同じ日にそれぞれ、左背部に B16F10  $1 \times 10^5$  個を、右背部に MC-38  $1 \times 10^6$  個を移植（対照群と）し、再度 1 群 4 匹で(1) 未治療 (2) 抗 PD-1 抗体のみ (3) 放射線療法のみ (4) 放射線療法 + 抗 PD-1 抗体群で比較した。

### 4. 研究成果

1) Balb/c マウスに 15 ~ 30 Gy で肝更には肝右葉のみ単回照射したが、いずれも全マウスが死亡した。

- 2) C57BL/6 マウス右後脚に移植した一次腫瘍（照射野内）では、明らかに抗体併用群で照射群に、更に 5 Gy よりも 15 Gy 照射群により腫瘍の縮小が認められた。
- 3) 二次腫瘍では、未治療群に比べ、抗体併用放射線治療群で二次腫瘍の縮小傾向を認めるも、明らかな優位差が認められなかった。
- 4) 抗体併用群では 15 Gy 照射群に比べ、むしろ 5 Gy 照射群でより腫瘍縮小効果が得られた傾向が示されたようにも見えた（MC-38 では抗 PD-1 体単独でも 2 匹で顕著な腫瘍縮小効果が認められてしまった）。
- 5) 一次腫瘍と同一日に二次腫瘍を移植し、7 日後に 15 Gy で単回照射し、照射 3 日前から抗 PD-1 抗体を併用した実験で、抗体併用の有無にかかわらず、腫瘍移植日を day0 とし、day17 まで顕著な一次腫瘍の縮小が確認された。しかし、二次腫瘍で抗 PD-1 抗体単独でも腫瘍縮小傾向が認められ、放射線単独では 1 匹のみが、また放射線 + 抗 PD-1 抗体で 3 匹に腫瘍増殖を抑えられる傾向が認められたが、著名な AE は得られなかった。
- 6) 一次腫瘍と同一日に二次腫瘍を移植した実験では、抗 PD-1 抗体単独群でしか二次腫瘍の増殖抑制は認められず、むしろ対照腫瘍で抗 PD-1 抗体単独でも二次腫瘍増殖の抑制効果が得られるマウスが認められ、放射線療法単独では 1 匹に、放射線療法と抗 PD-1 抗体併用群において、2 匹で腫瘍の顕著な増殖抑制が認められた。

結局、用いた細胞株で明確な AE が出せず、米国の研究室から譲渡してもらった多臓器好転移乳がん及び大腸がん細胞株を用いての、肝・肺・脳照射の実験迄行着かず、組織常在抗原マクロファージによる抗原提示を証明するには至らなかった。したがって、ワクチン接種至適臓器選定実験へも進めなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------