

論文の内容の要旨

論文題目 放射線照射の抗腫瘍作用における MIP-1 α 変異体、eMIP の併用効果

指導教員 中川恵一助教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 14 年 4 月進学

医学博士課程

生体物理医学専攻

氏名 白石 憲史郎

【研究の背景】

現代の悪性腫瘍に対する治療の基本は手術、放射線、化学療法であり、特に手術と放射線が中心的役割を担っている。定位放射線治療あるいは強度変調放射線治療 (IMRT) に代表されるように、近年の放射線治療の進歩は著しく、癌種によっては単独で手術に匹敵する治療成績も報告されている。手術は、術者による治療成績の差が大きいと言われているが、放射線治療は、施設や治療医による差が小さいという利点がある。さらに放射線には、機能温存ができるというメリットがあり、この点で手術よりも優れている。

放射線の腫瘍制御効果を増強するための工夫として、空間的線量分布を高めるため多分割絞り (MLC) を用いた三次元照射や、腫瘍組織の放射線感受性を考慮した様々な線量分割の試みといった照射法の工夫のみならず、生物学的観点からのアプローチとして放射線増感剤や化学療法の併用なども積極的に行われている。食道癌や一部の婦人科癌、泌尿器癌

では放射線化学療法により手術と同等な成績が期待できることもコンセンサスになりつつあり、集学的治療、すなわち腫瘍制御を目的とする多領域に渡る知識の結集が更なる癌治療の成績の向上には不可欠と思われる。

【研究の目的】

放射線治療は手術と同様局所治療である。抗腫瘍効果を増強するために、抗癌剤を始めより毒性の少ない有効な薬剤の開発が望まれているが、近年急速に進歩している腫瘍免疫学的観点からも、宿主の腫瘍細胞への特異的免疫反応を賦活化することは有効な手段と考えられ、T細胞や樹状細胞（DC）を遊走させるため腫瘍部位に放射線を照射して適切な炎症が誘発されれば、免疫学的機序による抗腫瘍効果が期待できる。もし腫瘍免疫の活性化による腫瘍の消退を認めるのに要する照射線量が、通常腫瘍制御に必要な高線量以下であれば、放射線治療の弱点である正常組織の障害を抑制できる臨床上的有用性も見込まれる。

Macrophage inflammatory protein 1 α (MIP-1 α , CCL3) はリンパ球やDC、単球、NK細胞などに対する遊走活性を有するケモカインであり、炎症の進展や免疫応答に重要な役割を担っている。

MIP-1 α の変異体、eMIP（旧名 BB10010）はMIP-1 α の26番目のAspをAlaに置換し、アミノ基末端のアミノ酸が1残基少ないSerより始まるペプチドで、天然型と同等の生物活性を保持するが、天然型の持つ凝集塊形成を改善する利点を有する。

我々はマウス皮下の癌組織に電子線を照射し、続いてeMIPを投与することによる放射線の抗腫瘍作用の併用効果に関する研究を行った。

【材料と方法】

雌性 7 週齢の SPF 飼育 C57BL/6 系マウスの右側部皮下に Lewis lung carcinoma 細胞 (3LL) を 4×10^6 個移植した。移植 19 日後、腫瘍径が約 1cm になった時点で群分けし、著しく異なる腫瘍径群は除外してまず放射線の至適線量を 6Gy に決定した。照射至適線量設定後、腫瘍組織に 6Gy の電子線単回照射を施行して 24 時間後に eMIP を静脈内に投与し、以降 7 日毎に 4 週間連続で eMIP を静注した。他治療法のベンチマーク・ドラッグとして 5-Fu 群を設定し、週に 2 回腹腔内投与した。腫瘍体積は以下に示す Janik らの式に従って算出した。

$$(\text{腫瘍体積}) = (\text{腫瘍の長径}) \times (\text{腫瘍の短径})^2 \times 0.5236$$

また、eMIP/radiation による腫瘍組織への浸潤白血球判定には、照射 3 日後に凍結切片を作成して免疫組織染色し、光学顕微鏡の強拡大で測定した。eMIP 投与 2 日後 (同日) には末梢血単核球 (PBMC) を回収し Flow cytometry により解析した。腫瘍特異的な免疫賦活の判定のため、照射 4 日後 (腫瘍移植 22 日後) に脾臓細胞を 1 次抗体として培養し、IFN- γ を 2 次抗体として標識する ELISpot assay を施行した。

さらにここまでの実験結果を踏まえ、同系統マウスの右側部皮下には 3LL を 4×10^6 個移植 (primary tumor) するが左側腹部皮下にも 3LL を 2×10^6 個移植 (secondary tumor) し、右側腹部の腫瘍径が約 1cm になった時点で腫瘍径で再群分けして右側腹部の腫瘍に電子線 6Gy 照射した。片側のみ移植した実験系と同様に 24 時間後に eMIP を静脈内に投与し、以降 7 日毎に 3 週間連続で eMIP を静注した。両実験系とも control 群として担癌のみ、および eMIP 単独投与群も実験を行った。

統計解析手法として、データを平均値±標準偏差で表示し、Dunnett の多重比較検定を用いた分散分析または Student の t 検定を用い、危険率 $p < 0.05$ で有意差を評価した。

【結果】

放射線（電子線）単独での腫瘍増大抑制作用は 2、6、10Gy で線量依存的に効果が認められたが、6Gy と 10Gy とで有意差はなかった。eMIP 単独では抑制する傾向はあったが有意差は認められなかった。いずれも腫瘍縮小効果は見られなかった。電子線 6Gy 単独では無治療に比し約 50%の腫瘍抑制効果が見られたが、eMIP (50 μ g/mouse) 投与により、約 80%まで有意に抗腫瘍効果が増強された。次に eMIP の至適用量を決定するため放射線 6Gy の条件下で eMIP 50、12.5、3.13、0.78 μ g/mouse の 4 群で同様の実験を行ったところ、eMIP 3 μ g/mouse 程度が最も抗腫瘍効果が認められた。eMIP 投与 2 日後に腫瘍組織への細胞浸潤を免疫組織染色で調べた結果、control 群および radiation 単独群にはほとんど白血球浸潤が認められなかったが、eMIP/radiation 投与群には多くの CD4、CD8 陽性細胞およびマクロファージ (F4/80) の浸潤が認められた。DC、NK 細胞の腫瘍組織への浸潤は見られなかった。eMIP 20 μ g/mouse 以上の静脈内投与で DC precursor が動員されると報告されているが、eMIP 投与 2 日後に回収された PBMC には著明な増加は見られなかった。

また、eMIP 単独の転移抑制効果を調べるために、同条件のマウスに 3LL 10⁶個静脈内投与直後から eMIP 50、12.5、3.13、0.78 μ g/mouse の群でそれぞれ 7 日毎に 4 週連続静脈内投与し、22 日後に肺を摘出し転移巣のカウントを行った。この系では 0.78~12.5 μ g/mouse の群で転移が有意に抑制された。50 μ g/mouse では無効であった。

腫瘍特異的な全身の免疫が賦活されていることを確かめるためには、腫瘍に感作された特異的 IFN- γ の存在が明らかになれば確定的である。この目的で eMIP 投与 2 日後のマウスの脾臓細胞を用いて ELISpot assay により調べたところ、3LL とは関連性のない MethA 細胞を倍地上に加えた場合や何も腫瘍を加えない条件では見られない IFN- γ 産生細胞が eMIP/radiation 投与群でのみ有意に認められ、上述の腫瘍特異的な免疫の賦活が証明された。

反対側の腹部にも腫瘍を同時移植した実験では、照射された右側 (primary tumor) は片側移植の実験系同様 eMIP/radiation 投与の併用効果が確認されたが、照射されていない左側

(secondary tumor) でも radiation と併用された eMIP 10、2、0.4、0.08 μ g/mouse の 4 群の内、2 μ g/mouse 投与群で明らかな腫瘍増大抑制効果が認められ、いわゆる「遠達効果」(abscopal effect) によるものと考えられた。また片側の場合と同様照射 3 日後に両側の腫瘍組織への細胞浸潤を免疫組織染色で調べた結果、やはり eMIP/radiation 併用群で著明な CD4、CD8 陽性細胞およびマクロファージの浸潤が認められた。実験期間中、eMIP による明らかな副作用は認められなかった。

【考察】

片側に腫瘍を移植した実験では eMIP 単独では腫瘍抑制効果は認められないが、放射線と併用することで放射線の抗腫瘍作用を増強することが確かめられた。そしてこの作用は腫瘍組織への免疫細胞浸潤の増強効果を伴っていることが明らかになった。ただしこの免疫賦活効果は PBMC の実験から DC の動員を介さない機序である可能性が考えられ、ELISpot assay では IFN- γ 産生細胞の誘導が確認された。MIP-1 α が投与されると腫瘍細胞は CD8 陽性 T 細胞を介して転移抑制効果を示すことが報告されているが、我々の実験でも CD4 あるいは CD8 陽性細胞を介する抗腫瘍効果の増強が惹起されたものと思われる。ELISpot assay による IFN- γ 産生は eMIP 単独でもわずかながら認められることから、この実験結果は T 細胞の機能を eMIP が発展・増強させ、より強力にする手段を提供することを示唆している。注目すべき点は、両側の腹部に腫瘍が存在しても、eMIP 投与により片側の原発巣のみに放射線を照射しても全身の腫瘍特異的な免疫が賦活されるため照射野外の腫瘍に対しても治療効果があることである。これは再発、進行癌患者の担癌部位に少量の放射線を照射すれば、続く eMIP の投与により、重篤な治療関連合併症もなく癌の進行が抑制される可能性を予見しているとさえ言える。

eMIP との併用療法は放射線治療の新たなアプローチとなり得る可能性が期待でき、知見の更なる集積と臨床応用への発展が待たれる。