

表 題 CD73/アデノシン経路を標的にした免疫放射線療法の基礎的検討

論文の区分 博士課程

著 者 名 津久井 秀則

担当指導教員氏名 佐田 尚宏教授

所 属 自治医科大学大学院医学研究科  
地域医療学系専攻  
消化器疾患学分野  
消化器外科学

2020年1月10日申請の学位論文

## 目次

略語一覧	1
1. はじめに	1
2. 実験材料と方法	8
2-1. 細胞培養	
2-2. 自然肺転移放射線照射モデルの作成	
2-3. フローサイトメトリー法	
2-4. フローサイトメトリー法 (細胞内染色)	
2-5. CD73 活性アッセイ	
2-6. 腫瘍組織内アデノシン代謝物質の測定	
2-7. 細胞障害アッセイ	
2-8. 臨床研究による免疫組織学的検討	
2-9. 統計学的解析	

3. 結果	20
3-1. LuM-1 における CD73 の発現と放射線照射による変化	
3-2. マウス LuM-1 皮下腫瘍における CD73 発現の放射線照射による変化	
3-3. LuM-1 における CD73 活性アッセイ	
3-4. 放射線照射された腫瘍組織内アデノシン代謝物質の変化	
3-5. 自然肺転移モデルに対する放射線治療、抗 CD73 抗体の治療効果の検討	
3-6. 自然肺転移放射線照射モデルに対する抗 CD73 抗体併用の治療効果の検討	
3-7. 自然肺転移放射線照射モデルに対して抗 CD73 抗体が免疫系に与える影響の検討	
3-8. ヒト直腸癌臨床検体における CD73 発現と検討・生存解析	
4. 考察	41
5. おわりに	46
6. 謝辞	47
7. 参考文献	48

### 略語一覧

ADP: adenosine diphosphate

AMP: adenosine monophosphate

APC: allophycocyanin

APCP: adenosine 5'-( $\alpha,\beta$ -methylene) diphosphate

ATP: adenosine triphosphate

BSA: bovine serum albumin

BV: Brilliant Violet

CD: cluster of differentiation

CRT: chemoradiotherapy

CTLA-4: cytotoxic T-lymphocyte (associated) antigen 4

DAMPs: damage-associated molecular patterns

DMEM: Dulbecco's modified eagle medium

DNA: deoxyribonucleic acid

DPBS: Dulbecco's phosphate-buffered saline

EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid

FCS: fetal calf serum

FITC: fluorescein isothiocyanate

FVS780: Fixable Viability Stain 780

Gr-1: granulocyte-differentiation antigen-1

HE: Hematoxyline-Eosin

HES: 2-Morpholinoethanesulfonic Acid

IFN- $\gamma$ : interferon- $\gamma$

IHC: immunohistochemistry

LC/MS: liquid chromatography-mass spectrometry

MST: median survival time

OS: overall survival

PBS: phosphate-buffered saline

PE: phycoerythrin

PD-L1: programmed death-ligand 1

PD-1: programmed death 1

PFS: progression free survival

RBC: red blood cell

RFS: recurrence free survival

rIL-2: recombinant interleukin-2

RPMI1640: Roswell Park Memorial Institute medium 1640

RT: radiation therapy

SPF: specific pathogen free

TME: total mesorectal resection

TV: tumor volume

WT: wild type

7-AAD: 7-Aminoactinomycin D

## 第1章 はじめに

局所進行直腸癌は、他部位の大腸癌と比較して術後に局所再発する症例が非常に多く、優れた局所制御法の確立が患者の予後や QOL を考える上で極めて重要である。今世紀初頭に欧州で行われたランダム化比較試験にて、術前放射線療法 (radiation therapy: RT) が手術単独群と比較して、有意に局所再発率を低下させることが証明された (1)。更に fluorouracil と leucovorin を用いた術前化学放射線療法 (chemoradiotherapy: CRT) と術前 RT を比較したランダム化比較試験では、CRT 群が有意に高い局所制御率が得られることが分かった (2)。これらの結果から、欧米のガイドラインでは術前 CRT が局所進行直腸癌に対する標準治療として推奨されている。一方、本邦では局所進行直腸癌に対しては直腸間膜全切除 (TME)+側方郭清が標準的に行われており、局所再発率、全生存期間 (OS) 共に良好な成績が報告されていることから、欧米で標準である術前 CRT はあまり積極的には行われていないのが現状である (3)。

上記の試験に続き、術前 CRT 治療の有用性を検証する複数の臨床試験が施行され、同様の成果が証明されてきたが、その長期成績を総合すると、遠隔再発の発生頻度には有意な変化は認められず、結果として OS の改善にはつながっていない (4, 5)。現在も、capecitabine や oxaliplatin を併用した新たな化学療法レジメンや術前 RT の分割回数と手術までの期間に関する至適治療プロトコルを見出す目的で多くの臨床試験が行われているが、OS の向上に寄与する明確な結果は得られておらず、これが現時点での局所進行直腸癌に対する術前治療の最大の課題であると言えよう (6, 7)。

RT は主に二本鎖 DNA の破壊やアポトーシスの誘導など、癌細胞に対する直接障害作用を介して抗腫瘍効果を発揮するとされている。しかし、近

年の研究で、RTによる腫瘍縮小には、宿主の免疫応答を介した間接的な腫瘍細胞障害作用が強く関与していることが示唆されている(8,9)。一般に、RTは一過性の免疫抑制を誘発することが良く知られている。しかし、RTにより障害を受けた癌細胞由来の腫瘍関連抗原が宿主の免疫応答を惹起しうることを示唆する報告が見られる(10,11)。更に腫瘍に対する免疫能の活性化が全身に及ぶと、非照射部に存在する病変をも抑制するという遠達効果(Abscopal effect)が起こることも報告されている(12,13)。

近年の臨床研究の結果から、免疫チェックポイント分子を標的とした免疫療法が、癌に対する集学的治療法において重要な役割を果たすと考えられるようになってきた。特に、近年、RTに免疫チェックポイント阻害療法を付加する免疫放射線療法の有用性を示唆する結果が報告されてきている(14)。Dewanらは、乳癌細胞株を用いたマウスモデルにおいて、照射に免疫チェックポイント分子CTLA-4に対する阻害抗体を併用することで、照射部原発巣の腫瘍増大抑制効果だけでなく、非照射部に接種した腫瘍に対する抑制効果を認めたことでAbscopal effectが誘発されたと報告している(15)。さらに、異なる癌腫を使った動物実験にて、局所照射に抗PD-1抗体(16)や抗PD-L1抗体(17)を併用することで、同様のAbscopal effectが誘発される事実が既に報告されており、その発現にはCD8陽性の細胞障害性T細胞が必須であることが証明されている。

ヒトを対象にした臨床試験でも同様の事象が既に報告されている。Antoniaらは、切除不能非小細胞肺癌に対して、CRT後のDurvalumab(抗PD-L1抗体)投与群とプラセボ群とを比較したランダム化比較試験において、Durvalumab投与群でより良好なPFSとOSが得られたことを報告している(18,19)。またShaverdianらは、非小細胞肺癌におけるPembrolizumab(抗PD-1抗体)の効果・安全性を検討した臨床試験KEYNOTE-001のサブ

解析において、RT 歴のある群の予後がない群に比較してより良好であったことを報告している (20)。更に Golden らは、非小細胞肺癌転移巣に対しての RT と Ipilimumab (抗 CTLA-4 抗体) を併用した際に、一部の患者で Abscopal effect が誘発されたことを報告している (21)。一方で、Kwon は、Docetaxel 投与後に増悪した転移性去勢抵抗性前立腺癌における RT 後の Ipilimumab (抗 CTLA-4 抗体) 投与群とプラセボ投与群とを比較したランダム化比較試験においては、有意な OS 改善効果を認めなかったと報告している (22)。この違いは、それぞれの試験での癌腫や治療プロトコールの違いに起因すると考えられ、今後は、至適放射線量や照射回数を検討することに加えて異なる分子をターゲットとした薬剤を応用することで、より効果的な免疫放射線療法のプロトコールを見出す必要があると考えられる。

そこで、著者は、自然免疫及び獲得免疫系において重要な内因性調節因子とされているアデノシンに着目した (図 1)。細胞外アデノシンは、主に A2a 受容体を介して T 細胞などの免疫細胞を強力に抑制し、様々な組織における恒常性の維持に重要な役割を果たしていることが解っており、近年、新たな免疫チェックポイント分子として注目を浴びてきている (23, 24)。



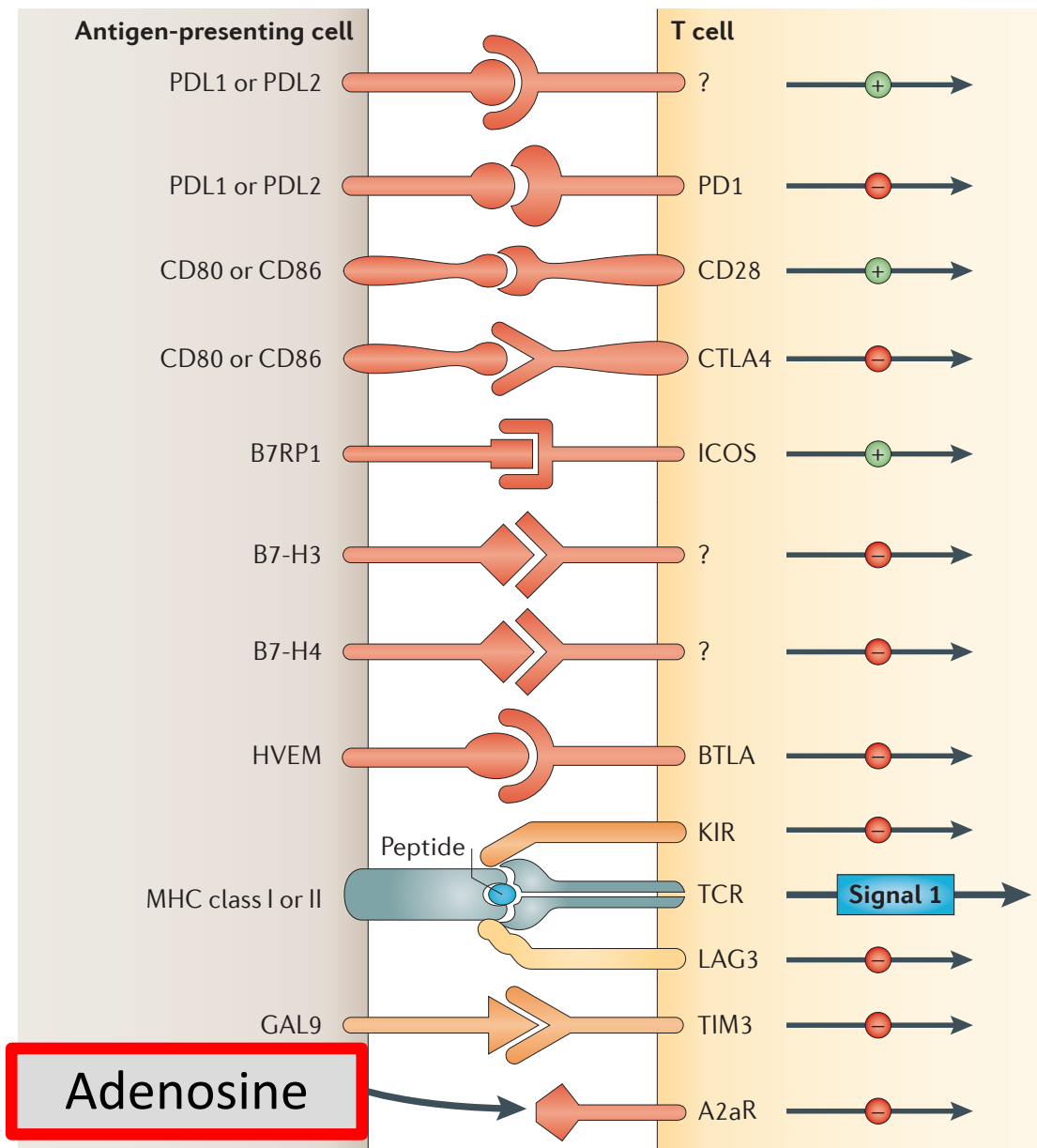


図1 代表的な免疫チェックポイント分子 (25)

一般に、細胞が障害を受けると細胞内のアデノシンリン酸化合物 (ATP、ADP、AMP) が細胞外に放出される。アデノシンは、これらの細胞外アデニンヌクレオチドから細胞表面に局在するアデノシン脱リン酸化酵素エクトアピラーゼ (CD39)、及び5'エクトヌクレオチダーゼ (CD73)

の相互作用により生成される。CD39はATPからAMPへ、CD73はAMPからアデノシンへの変換を司り、CD73はアデノシン産生における律速酵素と考えられている(図2)(26, 27)。ATPはDAMPsとして免疫を刺激するのに対し、アデノシンは強力な免疫抑制機能を発揮するため、ATPとアデノシンの量的バランスは局所の免疫応答を制御する重要な要素であると考えられる(24, 28, 29)。

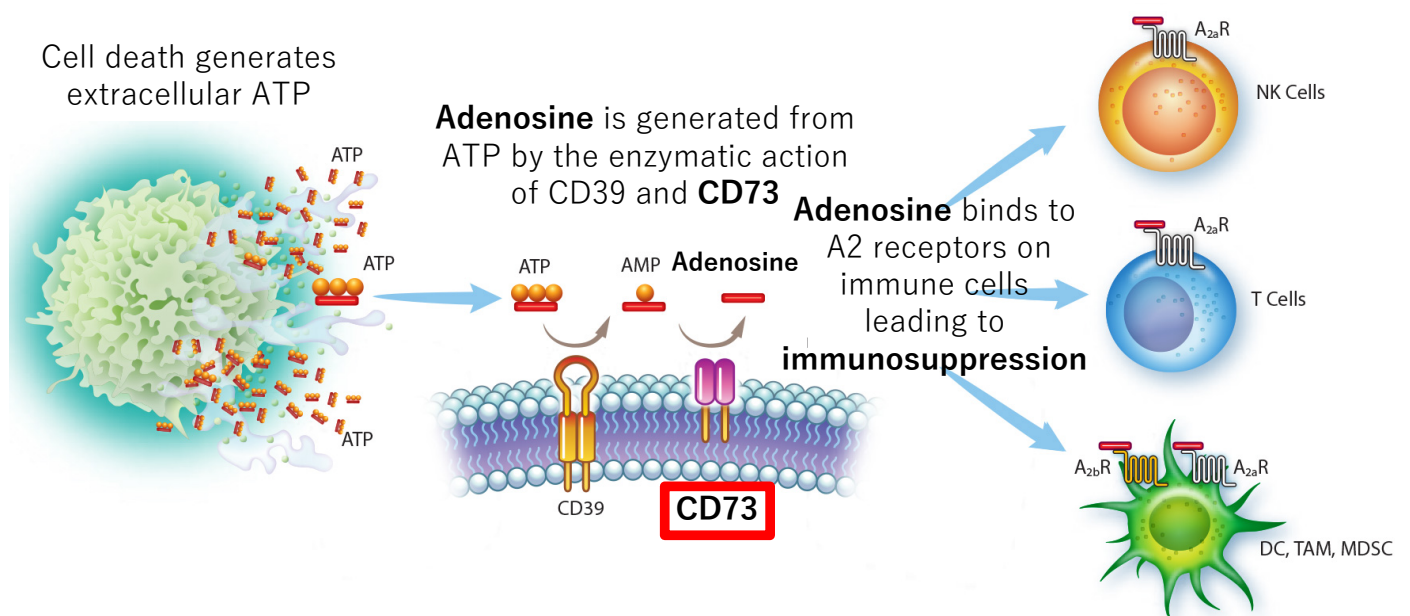


図2 アデノシン産生経路 ([http://q4live.s22.clientfiles.s3-website-us-east-1.amazonaws.com/243592055/files/doc\\_presentations/2019/04/2019.04.26-Arcus-Corporate-Non-Confidential-FINAL-website.pdf](http://q4live.s22.clientfiles.s3-website-us-east-1.amazonaws.com/243592055/files/doc_presentations/2019/04/2019.04.26-Arcus-Corporate-Non-Confidential-FINAL-website.pdf))

さて、腫瘍細胞はしばしばCD73を発現し、腫瘍組織内にCD73が高発現している症例は、予後不良因子であることが示されている(30-32)。また、マウスを用いた複数の動物実験にて、CD73/アデノシン経路の阻害が腫瘍の進行を抑制することが報告されている(33-36)。Beavisらは、CD73陽性

腫瘍細胞において抗 CD73 抗体、A2a 受容体阻害薬投与により肺転移が抑制されることを報告している (33)。また Young らは、抗 CD73 抗体と A2a 受容体阻害薬併用することで腫瘍縮小の上乗せ効果を認めたと報告している (34)。更に Loi らは、doxorubicin により腫瘍細胞の CD73 発現が増強し、抗 CD73 抗体を併用することでより強い腫瘍縮小効果を認めたと、Allard らは、抗 PD-1 抗体や抗 CTLA-4 抗体に抗 CD73 抗体を併用することで腫瘍縮小の上乗せ効果を認めたと報告している (35, 36)。これらの事実は、CD73 の酵素活性により産生されたアデノシンが、免疫抑制を介して腫瘍細胞の生存や転移を促進している可能性があることを示唆しており、腫瘍微小環境におけるアデノシンレベルを低下させることが、癌治療につながる可能性があると考えられる (37, 38)。

一方で、CD73/アデノシン経路に着目した免疫放射線療法の報告はない。しかし、腫瘍組織には多量のアデノシンが存在することが既に報告されている (39)。RT により多量の腫瘍細胞が障害されると、多量のリン酸化アデノシンが組織内に放出されることが推測されるため、アデノシン産生酵素 (CD39, CD73) の発現下では、照射組織中には更に多量のアデノシンが蓄積することが予想される。したがって、このアデノシンが局所における免疫応答を抑制する事により RT の腫瘍縮小効果を減弱させるとともに、腫瘍に対する全身の免疫寛容を誘導している可能性があることが推測される。

そこで、著者は、RT にアデノシンシグナルを阻害する治療法を上乗せすることにより、効果的な免疫応答を誘導し、照射した腫瘍の縮小率を高めるとともに、非照射部に対する Abscopal effect を誘導することで遠隔臓器に存在する微小転移を消滅、遠隔再発を抑制し、生存率の向上に繋がるのではないかと、いう作業仮説を設定し、自然肺転移をきたす大腸癌マウス

モデルを用いてその正当性を検証することを試みた(図3)。また、術前 CRT の後に手術加療を行ったヒト直腸癌臨床検体を用いて CD73 発現と臨床・病理学的因子、患者予後を検討し、ヒトの放射線治療における CD73/アデノシン経路の意義についても検討を加えた。

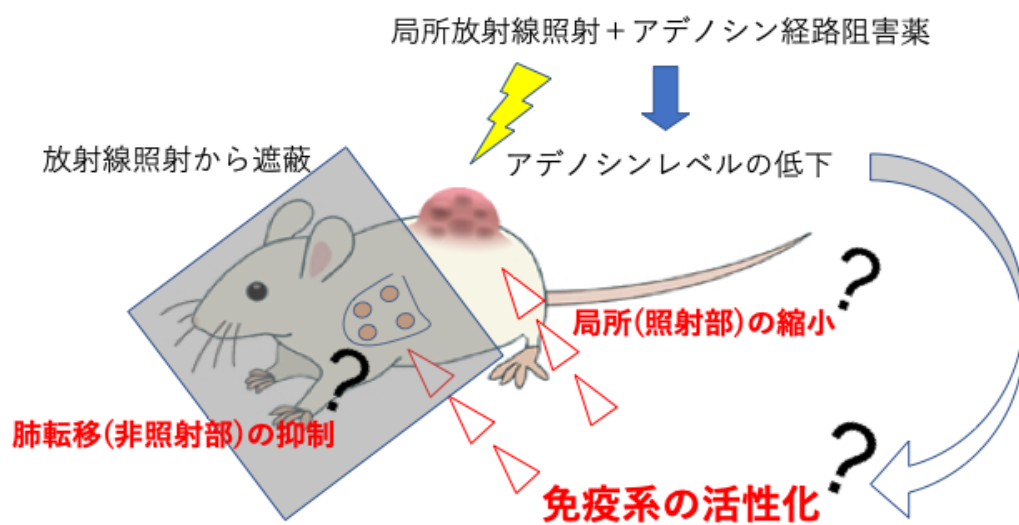


図3 本研究における仮説

## 第2章 実験材料と方法

### 2-1. 細胞培養

BALB/c マウス大腸癌細胞株 Colon26、そして Colon26 亜型で自然肺転移をきたす細胞株 LuM-1 を使用した (40)。LuM-1 は小栗博士 (愛知県立がんセンター) より提供を受けた。細胞は 10% ウシ胎仔血清 (FCS)、100 U/mL ペニシリン及び 100 $\mu$ g/mL ストレプトマイシン (Sigma, St. Louis, MO, USA) 含有 DMEM (Sigma) で培養した。培養時は温度 37°C の 5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で維持した。培養細胞は、マイコプラズマ検出キット (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) によって 3 か月ごとに検査し、3~5 継代の細胞を実験に使用した。

### 2-2. 自然肺転移放射線照射モデルの作成

培養した LuM-1 が 80% を超えるコンフルエントに達した後、0.04% (w/v) EDTA を含む 0.25% (w/v) トリプシン溶液で処理後に回収した細胞を使用した。実験には 8~12 週齢の雌性 BALB/c 野生型 (WT) マウスを使用した。マウスは日本クレア (富士宮、日本) より購入し、特定の病原体フリー (SPF) 条件で飼育した。

LuM-1  $1 \times 10^6$  個を 8~9 週齢 BALB/c マウスの右側腹部皮下に接種し、皮下腫瘍を作成させた。このマウスは、接種後 8~10 日後には肺に微小転移巣を形成し、4 週を過ぎると呼吸不全にて死亡する。

放射線装置は MX-160 Labo (メディエックステック、松戸、日本) を使用した。マウスをイソフルランによる吸入全身麻酔下に仰臥位とし、肺を含むマウスの体の残りの部分が鉛板で覆われた状態で、放射線を皮下腫瘍のみ照射した (図 4) (41)。

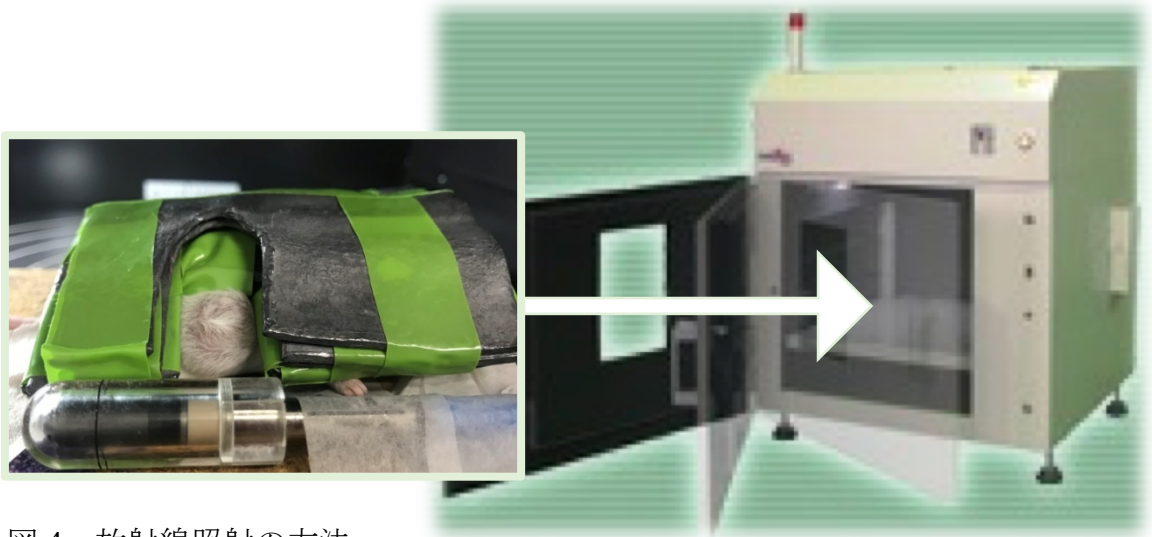


図 4 放射線照射の方法

LuM-1 を接種したマウスに対して、接種後 12、14、16 日目に  $4\text{Gy} \times 3$  回の放射線照射を行った。加えて免疫療法として接種後 12、14、16、19、22、25 日目に抗 CD73 抗体 (clone:TY/23, BioX-Cell, West Lebanon, NH, USA)  $200\mu\text{g}$  の腹腔内投与を行った。また、コントロール群は Rat IgG2a isotype control (clone 2A3, BioX-Cell)  $200\mu\text{g}$  の腹腔内投与を行った。放射線照射に抗 CD73 抗体投与した群を RT+Anti-CD73 群、放射線照射に isotype control を投与した群を RT+Isotype control 群とした。腫瘍体積 (TV) は、 $TV = 1/2 \times \text{長径} \times \text{短径}^2$  を用いて計算し、週 3 回測定した。接種後 28 日目に安楽死させ、皮下腫瘍の重量と肺の肉眼的転移結節個数を測定した。また、抗 CD73 抗体が免疫系に与える影響を調べるため、接種後 18 日目に安楽死させ、腫瘍組織と脾臓細胞を摘出した (図 5)。

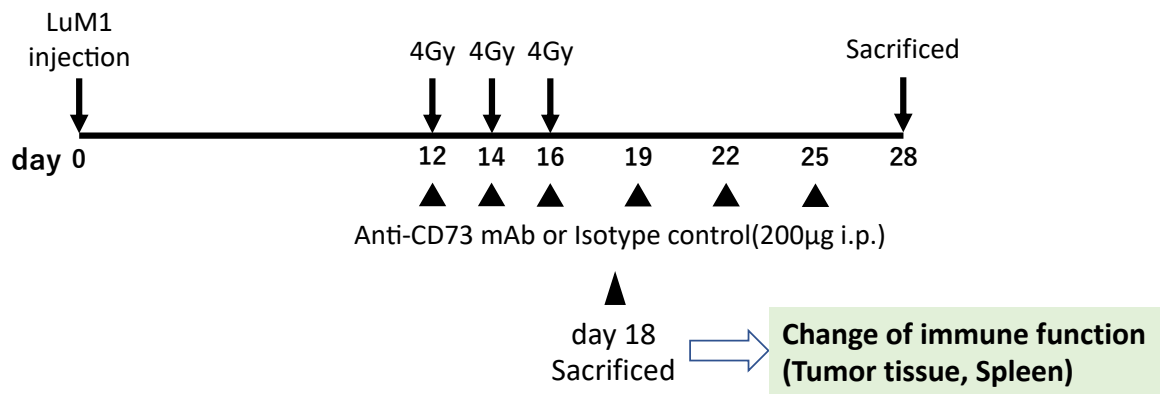


図 5 治療プロトコール

腫瘍組織に対する放射線照射、抗 CD73 抗体単独での治療効果を検討するため、LuM-1 を接種したマウスに対して、接種後 12、14、16 日目に 4Gy×3 回の放射線照射を行った RT 群、接種後 12、14、16、19、22、25 日目に isotype control 200µg の腹腔内投与を行った Rat IgG 群、接種後 12、14、16、19、22、25 日目に抗 CD73 抗体 200µg の腹腔内投与を行った Anti-CD73mAb 群と接種後無治療の No treatment 群として、接種後 28 日目に安楽死させ、皮下腫瘍の重量と肺の肉眼的転移結節個数を測定した。

本研究における全ての動物実験は自治医科大学動物実験規定 (平成 22 年規定第 51 号) に従って施行し、本実験系は自治医科大学動物実験委員会承認 (承認番号:17005-02) の上、施行した。

### 2-3. フローサイトメトリー法

LuM-1 における CD39、CD73 の発現をフローサイトメトリーで解析した。細胞は  $1 \times 10^6/10\text{cm dish}$  の濃度で播種し、MX-160 Labo を使用して 10Gy

照射を行った後に 24 時間温度 37°C の 5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で維持した。0.04% (w/v) EDTA を含む 0.25% (w/v) トリプシン溶液を用いて回収した。Fc- $\gamma$ レセプターをブロックするため、Fc blocking reagent (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) と 10 分氷上で反応させた後、下記の抗体を使用して細胞の二重染色を行った (表 1)。氷上で 30 分反応させた後、5% BSA 含有 DPBS (Sigma) で洗浄した。7-AAD (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) で 15 分氷上に静置し BD FACSCalibur™ (BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA) システムでフローサイトメトリー解析を行い、7-AAD 陰性細胞を生細胞としてカウントした。解析には FlowJo software version10 (Tree Star, Ashland, OR, USA) を用いた。非特異的な染色を除外するため、陰性コントロールとして isotype control 抗体を使用した。また、Colon26 における CD39、CD73 の発現についても上記と同様に染色し、フローサイトメトリー解析を行った。

表 1 使用抗体

APC	PE
anti-CD73 (clone: Duha59, BioLegend)	anti-CD39 (clone: TY/11.8, BioLegend)

マウス実験として上記と同様に LuM-1  $1 \times 10^6$  を BALB/c マウスに皮下注射し、接種後 14、16 日目に 4Gy $\times$ 2 回の放射線照射を行った。2 日後 (接種後 18 日目) に、腫瘍を切除し、gentleMACs Dissociators (Miltenyi Biotec) と Tumor Dissociation Kit, mouse (Miltenyi Biotec) を使用して単細胞処理を行った。RBC Lysis Buffer (BioLegend) を用いて溶血処理を行った後に、単細胞を 40 $\mu$ m フィルターに通し、Fc blocking reagent と 10 分氷上で反応させた後、下記の抗体を使用して細胞の二重染色を行った (表 2)。氷上で



30分反応させた後、5% BSA 含有 DPBS で洗浄した。7-AAD で 15 分氷上に静置し BD FACSCalibur™ システムでフローサイトメトリー解析を行い、7-AAD 陰性細胞 CD45 陰性細胞を腫瘍細胞としてカウントした。解析には Flow Jo software version10 を用いた。非特異的な染色を除外するため、陰性コントロールとして isotype control 抗体を使用した。

表 2 使用抗体

APC	PE
anti-CD73 (clone: Duha59, BioLegend)	anti-CD45 (clone: 30-F11, BioLegend)

RT+Anti-CD73 群、RT+Isotype control 群においてマウス脾臓細胞と腫瘍組織の免疫細胞の解析を行った。

脾臓は破碎し単細胞処理を行った。腫瘍組織は gentleMACs Dissociators と Tumor Dissociation Kit, mouse を使用して単細胞処理を行った。RBC Lysis Buffer を用いて溶血処理を行った後に、単細胞を 40µm フィルターに通した。死細胞除去のため FVS780 (BD Biosciences) で 15 分に暗所に静置、5% BSA 含有 DPBS で洗浄した。細胞表面染色として Fc blocking reagent と 10 分氷上で反応させた後、下記の抗体を使用して細胞の染色を行った (表 3)。氷上で 30 分反応させた後、5% BSA 含有 DPBS で洗浄した。Fixation Buffer (BD Biosciences) を用いて 20 分暗所で静置、細胞固定を行った後に BD LSRForterssa™ X-20 (BD Bioscience) システムでフローサイトメトリー解析を行った。解析には FlowJo software version10 を用いた。非特異的な染色を除外するため、陰性コントロールとして isotype control 抗体を使用した。

表 3 使用抗体

脾臓細胞

APC	FITC	PE
anti-CD3 (clone: 17A2, BioLegend)	anti-CD8a (clone: 53-6.7, BioLegend)	anti-CD4 (clone: GK1.5, Beckman Coulter)
	anti-CD11b (clone: M1/70, BioLegend)	anti-Ly-6G/Gr-1 (clone: RB6-8C5, Beckman Coulter)

腫瘍組織

APC	FITC	Pacific Blue	PE
anti-CD3	anti-CD8a	anti-CD45 (clone: 30-F11, BioLegend)	anti-CD4
	anti-CD11b	anti-CD45	anti-Ly-6G/Gr-1

2-4. フローサイトメトリー法 (細胞内染色)

RT+Anti-CD73 群、RT+Isotype control 群においてマウス脾臓と腫瘍組織 T 細胞における IFN- $\gamma$  産生の解析に細胞内染色を用いた。上記の如く単細胞処理した脾臓細胞、腫瘍組織細胞  $5 \times 10^6$  を 10% FCS 含有 RPMI1640 (Sigma)、 $1 \mu\text{l}/\text{mL}$  Brefeldin A (BioLegend) 存在下で 2 時間培養した。細胞を回収し、死細胞除去のため FVS780 で 15 分に暗所に静置、5% BSA 含有 DPBS で洗浄した。細胞表面染色として Fc blocking reagent と 10 分、氷上で反応させた後、細胞表面抗原に対して下記の抗体を使用して細胞の染色を行った (表 4)。氷上で 30 分反応させた後、5% BSA 含有 DPBS で洗浄した。Fixation and Permeabilization Solution (BD Biosciences) を用いて 20

分暗所で静置、細胞固定・透過処理を行った後に 5% BSA 含有 DPBS で洗  
 浄した。Perm/Wash Buffer (BD Biosciences) に置換した後に PE 結合 IFN- $\gamma$   
 抗体 (clone: XMG1.2; BioLegend) を用いて、30 分室温暗所で静置し、細  
 胞内染色を行った。5% BSA 含有 DPBS で洗浄した後に FACS BD  
 LSRForterssa™ X-20 システムでフローサイトメトリー解析を行った。解析  
 には FlowJo software version10 を用いた。非特異的な染色を除外するた  
 め、陰性コントロールとして isotype control 抗体を使用した。

表 4 使用抗体

APC	BV 421	FITC	PE
anti-CD3	anti-CD4 (clone: GK1.5, Beckman Coulter)	anti-CD8a	anti-IFN- $\gamma$ (clone: XMG1.2; BioLegend)

#### 2-5. CD73 活性アッセイ

LuM-1 におけるアデノシン産生能を評価するため、CD73 活性アッセイ  
 を行った。CD73 活性アッセイは、遊離リン酸の検出で評価した。簡潔に  
 説明すると、癌細胞と AMP とをリン酸フリーの培地 (phosphate-free  
 buffer) で反応させた後に上清を回収し、上清中の遊離リン酸をマラカイ  
 ドグリーン試薬で反応させ、吸光度を測定する方法である (図 6) (42)。

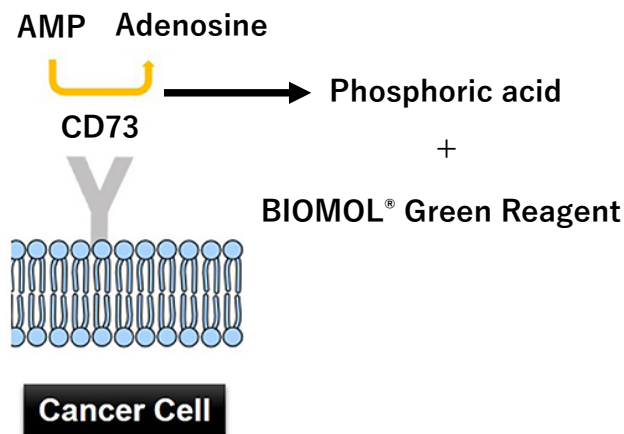


図6 CD73 活性アッセイのシエーマ

LuM-1 細胞は  $1 \times 10^5$ /24 well dish の濃度で播種し、24 時間温度  $37^\circ\text{C}$  の  $5\% \text{CO}_2$  インキュベーター内で維持した。phosphate-free buffer で 2 回洗浄し phosphate-free buffer で融解した AMP (Sigma)  $50\mu\text{M}$  を加え 1 時間温度  $37^\circ\text{C}$  の  $5\% \text{CO}_2$  インキュベーター内で維持した。一部には CD73 阻害物質 APCP (Sigma)  $50\mu\text{M}$  を添加した。

放射線照射による CD73 活性への影響を調べるために、 $1 \times 10^5$ /24 well dish の濃度で播種した LuM-1 に対して MX-160 Labo を使用して  $10\text{Gy}$  の放射線照射を行った後に 24 時間温度  $37^\circ\text{C}$  の  $5\% \text{CO}_2$  インキュベーター内で維持した。phosphate-free buffer で 2 回洗浄し phosphate-free buffer で融解した AMP  $50\mu\text{M}$  を加え 1 時間温度  $37^\circ\text{C}$  の  $5\% \text{CO}_2$  インキュベーター内で維持した。

上清中の遊離リン酸を BIOMOL® Green Reagent (コスモバイオ、東京、日本) で反応させ、 $620\text{nm}$  の吸光度を測定、標準溶液を基準として濃度を算出した。

< 試薬の組成 >

phosphate-free buffer:

MgCl<sub>2</sub> 2mM, NaCl 25mM, KCl 1mM, glucose 10mM, HEPES pH 7.2 10mM

#### 2-6. 腫瘍組織内アデノシン代謝物質の測定

アデノシン代謝物質 (AMP、アデノシン、イノシン) の定量分析は、Nexera X2, LCMS-8060 (SHIMADZU、京都、日本) と LC/MS メソッドパッケージ一次代謝物質 Ver.2 (SHIMADZU) とを用いて行った (43)。上記の如く LuM-1 を皮下接種したマウス皮下腫瘍に対して接種後 12 日目に 4Gy の放射線照射を行った。照射後 12、24、48 時間後に安楽死させ腫瘍組織を摘出した。非照射群を 0hr とした。摘出した腫瘍をホモジナイザーで粉砕し、超純水 (WAKO、大阪、日本)、メタノール (WAKO)、クロロホルム (WAKO) の混合液を用いて除タンパクを行った。遠心後に上清を回収し、超純水を添加、再度遠心し親水性代謝物の抽出を行った。減圧濃縮装置で乾燥を行い -80°C で凍結保存、測定時に超純水で再溶解を行った。内部標準物質には L-メチオニンスルホン (Dojindo、熊本、日本) と HES (Thermo Fisher Scientific) を用いた。測定したアデノシン代謝物質のピーク値を内部標準物質で補正した。

#### 2-7. 細胞障害アッセイ

RT+Anti-CD73 群、RT+Isotype control 群において、上記の如く単細胞処理した脾臓細胞  $5 \times 10^6$  と、MX-160 Labo を使用して 50Gy の放射線照射を行った LuM-1  $1 \times 10^6$  とを、10% FCS 含有 RPMI-1640 培地に 20 ng/ml マウス rIL-2 (BioLegend) を添加して 12 日間温度 37°C の 5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で維持した。活性化した脾臓細胞を LuM-1 と E/T 比が 20:1 になる

よう 4 時間温度 37°C の 5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で維持し、5% BSA 含有 DPBS で洗浄した。回収した細胞を Fc blocking reagent と 10 分氷上で反応させた後、APC 結合 anti-CD45 抗体を使用して細胞の染色を行った。氷上で 30 分反応させた後、5% BSA 含有 DPBS で洗浄した。FITC 結合 Annexin-V (BioLegend) 及び 7-AAD で 15 分氷上に静置し BD FACSCalibur™ システムでフローサイトメトリー解析を行い、CD45 陰性細胞を腫瘍細胞として、腫瘍細胞における 7-AAD 陽性細胞を死細胞としてカウントした。解析には FlowJo software version10 を用いた。

## 2-8. 臨床研究による免疫組織学的検討

自治医科大学附属病院で2008年から2015年の間に、局所進行直腸癌に対して術前CRTの後に手術加療を行った64名の患者を対象に、CD73の免疫組織学的染色 (IHC) を行った。術前CRTの適応と判断され希望した患者は、25分割で50.4Gyの線量で放射線治療を受け、一部の患者は経口UFTまたはS1を併用した化学療法を同時に受けた。CRT終了後8～10週間に根治切除が行われた。切除した腫瘍を直ちに10% 緩衝ホルマリンで固定し、パラフィン包埋されたブロックから切片を4μm 厚で作成し、HE染色及びIHCを行った。比較として、同時期に局所進行直腸癌に対して術前加療を行わずに手術加療を行った48名の患者を対象に、HE染色及びIHCを行った。

IHCはキシレンとエタノールで脱パラフィン後、PBSで洗浄し、クエン酸緩衝液 (武藤化学株式会社、東京、日本) 中でオートクレーブを用いて熱処理による抗原賦活化を行った。内因性ペルオキシダーゼブロッキングは、ペルオキシダーゼブロッキング溶液 (DAKO, SantaClara, CA, USA) で行った。その後、抗CD73抗体 (D7F9A, Rabbit IgG, Cell Signaling Technology) を1:200で添加し、温度4°C overnightで維持した。PBSで3回洗

浄後、切片を抗ウサギ二次抗体入りのPolymerを用いて室温30分間反応させた。いずれも、Dako REAL™ EnVision™ Detection System (DAKO) を用いて検出を行った。対比染色には、Meyerのヘマトキシリンを用い、脱水・透徹後封入した。

腫瘍細胞または間質の染色強度は、臨床所見を知らない2人の異なる評価者によって0から3まで独立して評価され (図7)、2人の評価者の平均scoreにより高発現 (score=2または >2) 及び低発現 (score < 2) に分類した。この研究プロトコールは自治医科大学の研究倫理審査委員会 (臨A17-164) によって承認され、ヘルシンキ宣言の指針に基づいて実施した。

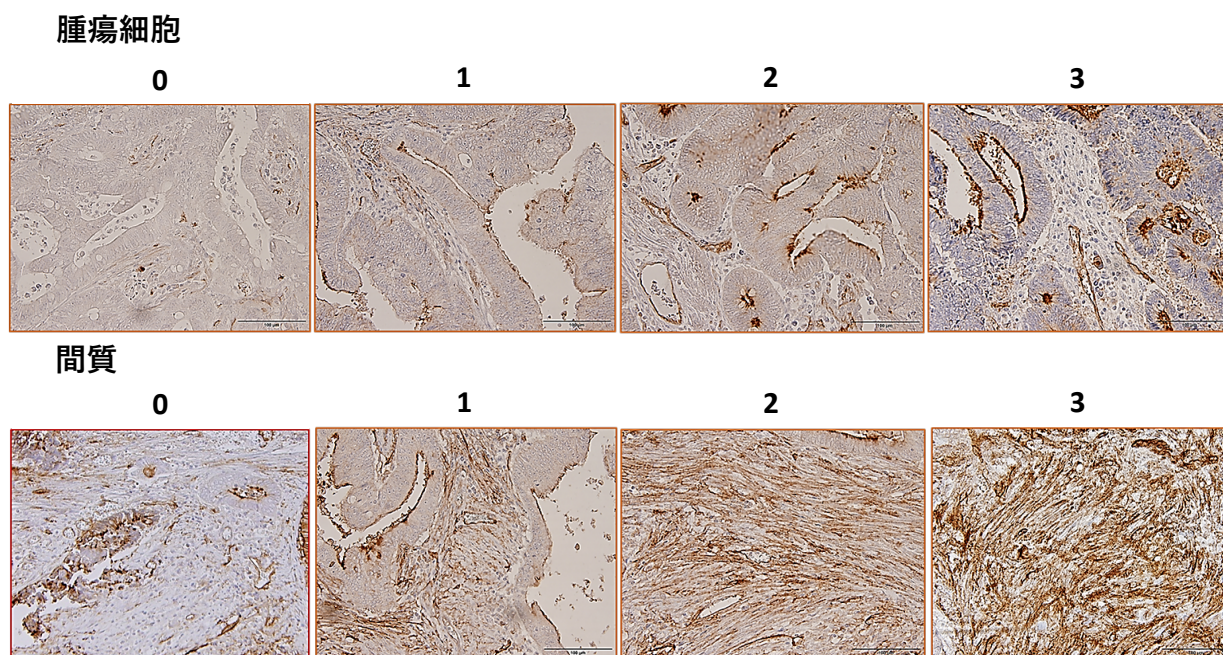


図7 CD73染色強度の評価方法

## 2-9. 統計学的解析

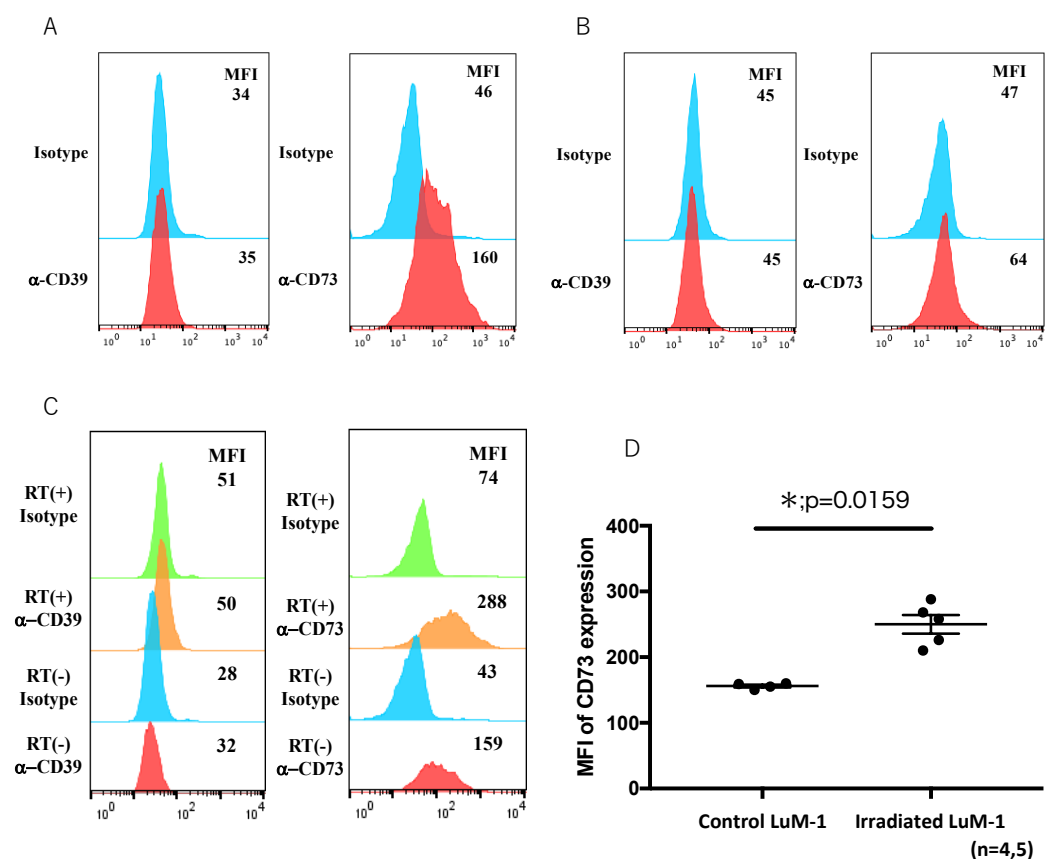
数値データは、平均値±標準誤差と中央値で表示した。独立2群間の比較には Mann-Whitney の U 検定を、多群間比較には一元配置分散分析法と post hoc test (多重比較検定；事後比較) を用いた。患者背景の解析において、名義尺度に関しては  $\chi^2$  検定と Fisher's exact test、比率尺度に関しては Mann-Whitney の U 検定を用いた。生存曲線は Kaplan-Meier 法と Log-rank 検定を用いて行い、単変量解析・多変量解析は Cox 比例ハザードモデルを用いて行った。統計解析ソフトは Graphpad prism Prism 7 (Graphpad Software, San Diego, CA, USA) と IBM SPSS Statistics 21 (IBM, Chicago, IL, USA) を用いて行い、 $p < 0.05$  を統計学的に有意差ありと判断した。



### 第3章 結果

#### 3-1. LuM-1 における CD73 の発現と放射線照射による変化

LuM-1 における CD39 と CD73 の発現を測定したところ、LuM-1 は CD39 を発現していなかったが、CD73 を強く発現していた (図 8A)。一方で、Colon26 は CD39、CD73 のいずれも発現を認めなかった (図 8B)。そして、LuM-1 における CD73 の発現を放射線照射の有無で比較したところ、放射線照射後には平均蛍光強度 (MFI) で評価した CD73 の発現強度は更に増加していた (図 8C、図 8D)。



## 図 8 LuM-1、Colon26 における CD39 と CD73 の発現と放射線照射による変化

(A) 培養した LuM-1 と (B) Colon26 とを CD39 (左) または CD73 (右) に対する抗体で染色し、7-AAD 陰性生細胞集団の平均蛍光強度 (MFI) を BD FACSCalibur™ システムでフローサイトメトリー解析を行った。(C) MX-160 Labo を使用して培養した LuM-1 を 10Gy 放射線照射で処理し、更に 24 時間 37°C の 5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で維持した。細胞を CD39 (左) または CD73 (右) に対する抗体で染色し、7-AAD 陰性生細胞集団の平均蛍光強度 (MFI) を BD FACSCalibur™ システムでフローサイトメトリー解析を行った。(D) LuM-1 における CD73 の MFI を放射線照射の有無で比較した (n = 4,5)。\* $p < 0.05$ 。

### 3-2. マウス LuM-1 皮下腫瘍における CD73 発現の放射線照射による変化

続いて、同様の実験を *in vivo* で行った。LuM-1 接種により皮下腫瘍を形成したマウスの腫瘍組織から得られた細胞中の、CD45 陰性細胞腫瘍細胞における CD73 の発現を放射線照射前後で比較したところ、その MFI は放射線照射後に有意に増加していた (図 9A)。一方、CD45 陽性の白血球では放射線前後で CD73 の MFI に有意な変化は認めなかった (図 9B)。

以上の結果から、放射線照射により腫瘍細胞の CD73 発現が増強することが、*in vitro* と *vivo* で示された。

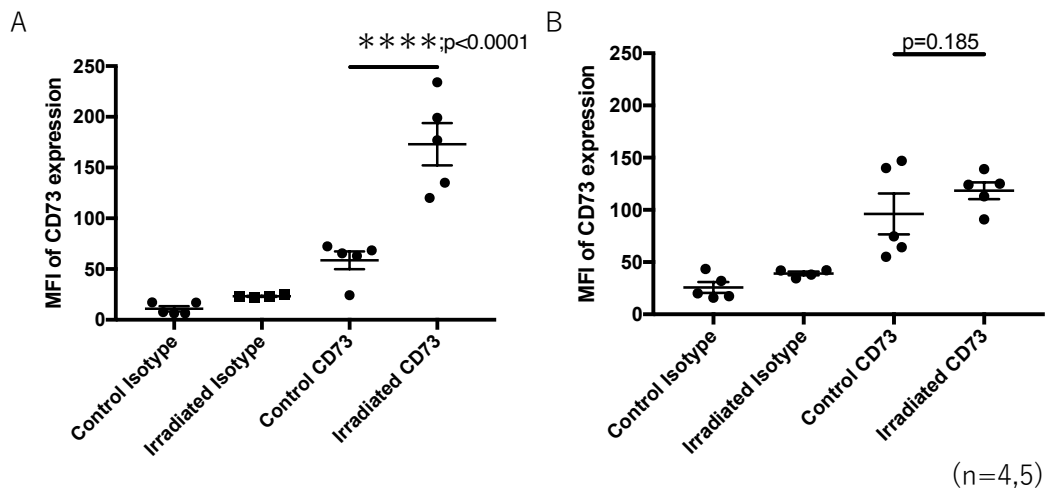


図9 マウス LuM-1 皮下腫瘍における CD73 発現の放射線照射による変化  
LuM-1  $1 \times 10^6$  を BALB/c マウスに皮下注射し、接種後 14、16 日目に MX-160 Labo を使用して  $4\text{Gy} \times 2$  回の放射線照射を行った。2 日後(接種後 18 日目)に、腫瘍を切除し、単細胞処理を行った。表面抗原染色後に BD FACSCalibur<sup>TM</sup> システムでフローサイトメトリ一解析を行った。(A) 7-AAD 陰性 CD45 陰性細胞を腫瘍細胞として腫瘍細胞集団における CD73 の平均蛍光強度 (MFI) を放射線照射の有無で比較した (n = 4,5)。(B) 7-AAD 陰性 CD45 陽性細胞を白血球細胞として白血球細胞集団における CD73 の MFI を放射線照射の有無で比較した (n = 4,5)。\*\*\*\* $p < 0.0001$ 。

### 3-3. LuM-1 における CD73 活性アッセイ

LuM-1 は CD73 を発現し、放射線照射により CD73 の発現が増強していたことから、LuM-1 における CD73 の酵素活性を評価した。CD73 活性アッセイは、遊離リン酸検出で行った。LuM-1 に AMP  $50\mu\text{M}$  を添加した群では control 群と比較して上清中の遊離リン酸濃度が有意に高く、更に AMP に CD73 阻害物質 APCP  $50\mu\text{M}$  を添加することで、上清中の遊離リン酸量が有意に減少していた (図 10A)。

続いて、LuM-1 に対する放射線照射の有無で上清中の遊離リン酸量を比較すると、放射線照射した LuM-1 では、control 群と AMP 添加群ともに有意に上清中の遊離リン酸量が増加していた (図 10B)。

以上から、LuM-1 の CD73 はアデノシン産生能を有し、放射線照射された LuM-1 ではその酵素活性が増加することが判明した。

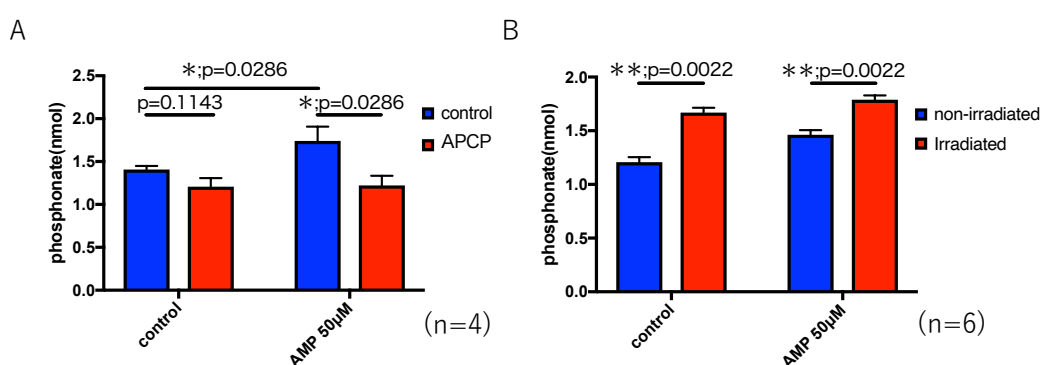


図 10 LuM-1 における CD73 活性アッセイ

CD73 活性アッセイを遊離リン酸の検出で評価した。(A) 24 時間温度 37°C の 5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で維持した LuM-1 1×10<sup>5</sup>/24 well dish に AMP 50µM と APCP 50µM を添加し 1 時間後に培養上清中の遊離リン酸を BIOMOL® Green Reagent で反応させ、620nm の吸光度を測定した (n=4)。\**p* < 0.05。(B) LuM-1 1×10<sup>5</sup>/24 well dish に MX-160 Labo を使用して 10Gy の放射線照射し 24 時間温度 37°C の 5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で維持した。AMP 50µM を添加し 1 時間後に培養上清中の遊離リン酸を BIOMOL® Green Reagent で反応させ、620nm の吸光度を測定した (n=6)。\*\**p* < 0.01。

### 3-4. 放射線照射された腫瘍組織内アデノシン代謝物質の変化

放射線照射による腫瘍組織内アデノシン代謝物質 (AMP、アデノシン、イノシン) の変化を LC/MS を用いた定量分析にて検討した。LuM1 皮下腫瘍に放射線 4Gy を 1 回照射すると、照射後 24 時間後にアデノシンが、照

射後 48 時間後にアデノシンから代謝されるイノシンが非照射群 (0hr 群) と比較して有意に上昇していた (図 11)。

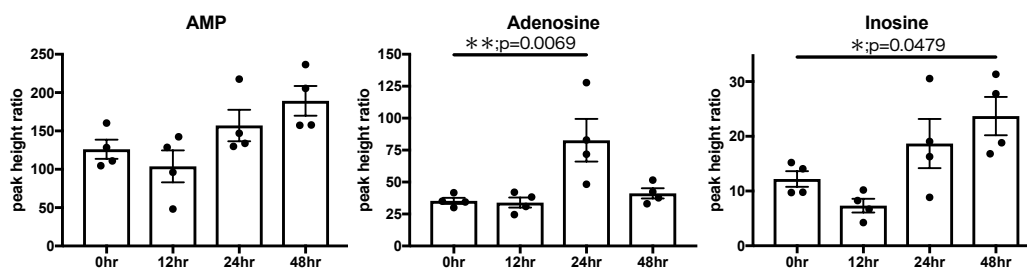


図 11 放射線照射された腫瘍組織内アデノシン代謝物質の変化

LuM-1 を皮下接種したマウスに対して接種後 12 日目に 4Gy の放射線照射を行った。照射後 12、24、48 時間後に安楽死させ腫瘍組織を摘出した。AMP、アデノシン、イノシンの定量分析は Nexera X2, LCMS-8060 と LC/MS メソッドパッケージ一次代謝物質 Ver.2 を用いて行った。アデノシン代謝物質 (AMP、アデノシン、イノシン) のピーク値を内部標準物質で補正した (n=4)。\* $p < 0.05$ 、\*\* $p < 0.01$ 。

### 3-5. 自然肺転移モデルに対する放射線治療、抗 CD73 抗体の治療効果の検討

LuM-1 を用いた自然肺転移放射線照射モデルに対して、RT 単独、抗 CD73 抗体単独の治療効果を腫瘍重量と肺の肉眼的転移結節個数で比較した。RT 群では非治療群と比較して有意に腫瘍重量が低下していた (図 12A)。一方で、肺転移個数については両群間で有意な変化は認めなかった (図 12B)。また、抗 CD73 抗体単独投与では、Rat IgG 群と比較して、腫瘍重量と肺転移個数いずれも有意差を認めなかった (図 12A-B)。

以上から、本モデルにおいては、RT 単独では皮下腫瘍に対する抑制効果を示すが、放射線非照射部である肺における転移抑制効果は示さず、CD73 抗体単独では明らかな抗腫瘍効果は示さないことが解った。

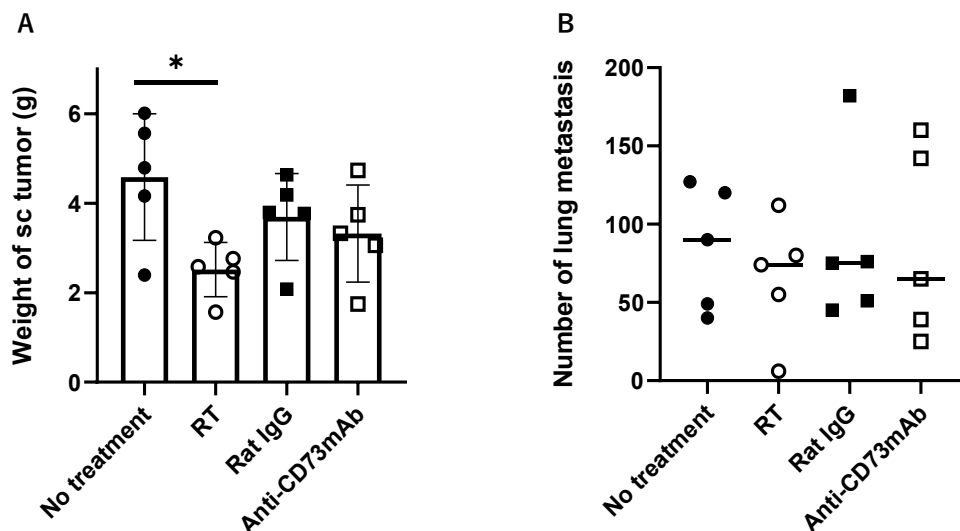


図 12 腫瘍組織に対する放射線、抗 CD73 抗体単独の治療効果の検討

LuM-1  $1 \times 10^6$  を BALB/c マウスに皮下注射し、接種後 12、14、16 日目に  $4\text{Gy} \times 3$  回の放射線照射を行った RT 群、接種後 12、14、16、19、22、25 日目に isotype control  $200\mu\text{g}$  の腹腔内投与を行った Rat IgG 群、接種後 12、14、16、19、22、25 日目に抗 CD73 抗体  $200\mu\text{g}$  の腹腔内投与を行った Anti-CD73mAb 群と接種後無治療の No treatment 群について、接種後 28 日目に安楽死させ、腫瘍重量 (A) と肺の肉眼的転移結節個数 (B) を比較した ( $n = 5$ )。\* $p < 0.05$ 。

### 3-6. 自然肺転移放射線照射モデルに対する抗 CD73 抗体併用の治療効果の検討

続いて、放射線照射モデルにおける CD73 抗体の上乗せ効果を、RT+Anti-CD73 群と RT+Isotype control 群における皮下腫瘍の腫瘍重量と肺の肉眼的

転移結節個数で検討した。皮下腫瘍の容積の経過をグラフ化すると、RT+Isotype control 群と比べて RT+Anti-CD73 群で接種後 19 日目より有意に腫瘍容積の増大抑制効果を認めた (図 13B)。また、接種後 28 日目に安楽死させ皮下腫瘍の重量を測定すると、RT+Anti-CD73 群で有意に低下していた (図 13A-B)。更に接種後 28 日目での肉眼的転移結節個数を測定すると、RT+Anti-CD73 群で有意に肺転移個数が減少していた (図 13D-E)。事実、RT+Isotype control 群では全例 (8/8 匹) で肺転移を認めたが、RT+Anti-CD73 群では半数 (4/8) で肺転移は認めなかった (図 13D-E)。

以上から、RT に抗 CD73 抗体を組み合わせることにより、照射部の皮下腫瘍だけでなく、放射線非照射部である肺転移巣に対する抑制効果が得られることが判明した。





CD73 群、RT+Isotype control 群で比較した。(D) 接種後 28 日目に摘出した肺写真。(E) 肺の肉眼的転移結節個数を RT+Anti-CD73 群、RT+Isotype control 群で比較した。(n = 8)。\* $p < 0.05$ 。

### 3-7. 自然肺転移放射線照射モデルにおいて抗 CD73 抗体が免疫系に与える影響の検討

自然肺転移放射線照射モデルに対して抗 CD73 抗体が免疫系に与える影響を調べるため、RT+Anti-CD73 群、RT+Isotype control 群においてマウス脾臓と腫瘍組織の免疫細胞の解析を行った。

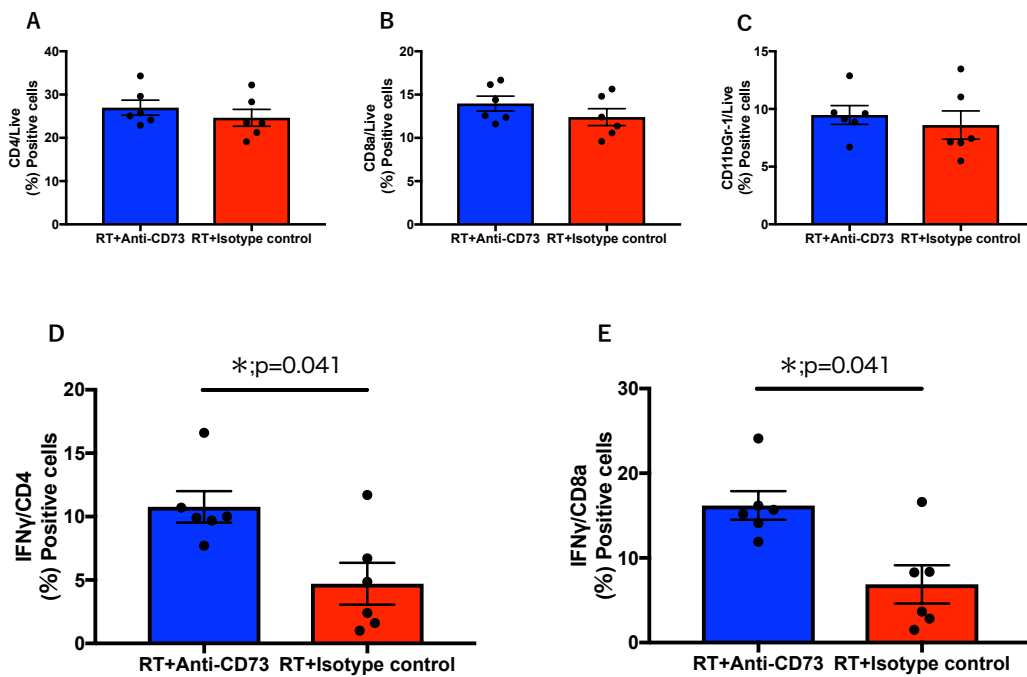
脾臓細胞で FVS780 陰性の生細胞における CD4 陽性、CD8a 陽性 T 細胞及び CD11b 陽性 Gr-1 陽性 MDSC 細胞の割合は、RT+Anti-CD73 群、RT+Isotype control 群の両群間で有意差は認めなかった (図 14A-C)。一方、CD4 陽性、CD8a 陽性細胞における IFN- $\gamma$  陽性細胞の割合は、RT+Anti-CD73 群で有意に高かった (IFN- $\gamma$ /CD4; Mean =  $11 \pm 1.2\%$  vs  $4.7 \pm 1.6\%$ ,  $p = 0.041$ ,  $n = 6$ ; IFN- $\gamma$ /CD8a;  $16 \pm 1.7\%$  vs  $6.9 \pm 2.3\%$ ,  $p = 0.041$ ,  $n = 6$ ) (図 14D-E)。

また、腫瘍組織由来の CD45 陽性浸潤細胞を検討すると、CD4 陽性、CD8a 陽性の T 細胞、CD11b 陽性 Gr-1 陽性細胞の割合は、脾臓細胞と同様に両群間で有意差は認めなかった (図 14F-H)。しかし、CD4 陽性細胞における IFN- $\gamma$  陽性細胞の割合は、RT+Anti-CD73 群で有意に高く (IFN- $\gamma$ /CD4;  $13 \pm 1.5\%$  vs  $6.7 \pm 1.2\%$ ,  $p = 0.0022$ ,  $n = 6$ )、CD8a 陽性細胞でも同様の傾向が認められた (IFN- $\gamma$ /CD8a;  $29 \pm 1.9\%$  vs  $20 \pm 4.5\%$ ,  $p = 0.13$ ,  $n = 6$ ) (図 14I-J)。

続いて、マウス脾臓細胞と LuM-1 細胞を In vitro で培養後、標的細胞に対する細胞障害アッセイを行うと、統計学的有意差には至らなかったが、

RT+Anti-CD73 群で細胞障害活性が高い傾向を認めた ( $12.8 \pm 1.5\%$  vs  $7.8 \pm 2.8\%$  at E/T ratio = 20,  $p = 0.053$ ,  $n = 3$ ) (図 15)。

以上の事実から、RT に抗 CD73 抗体を併用することにより、腫瘍局所のみでなく、癌に対する全身の T 細胞応答が活性化されていることが判明した。



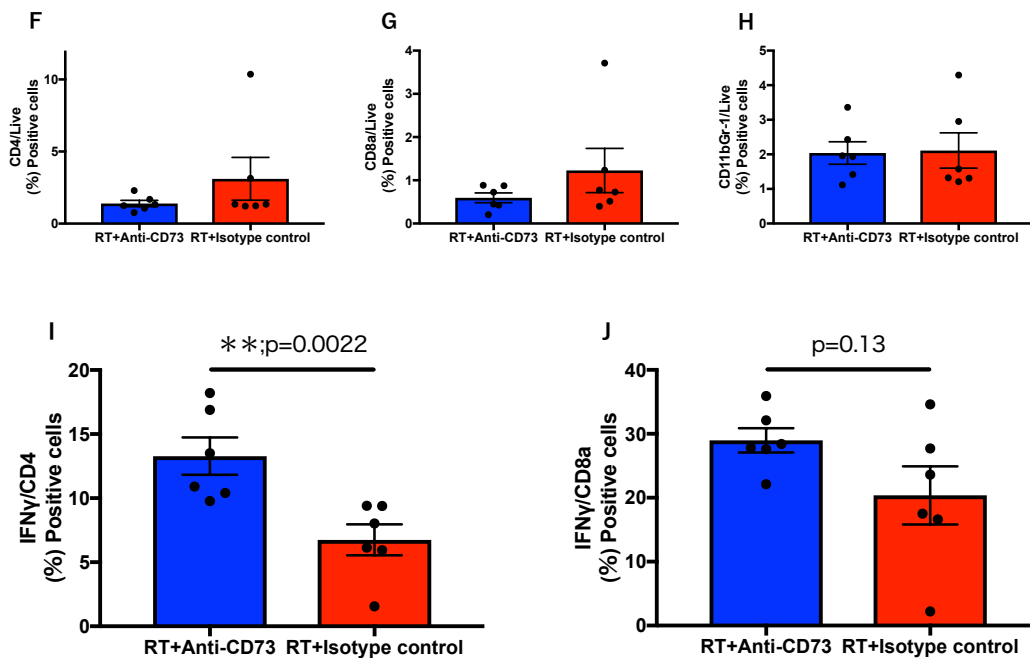


図 14 マウス脾臓細胞と腫瘍組織の免疫細胞の解析

LuM-1  $1 \times 10^6$  を BALB/c マウスに皮下注射し、接種後 12、14、16 日目に 4Gy $\times$ 3 回の放射線照射を行った。加えて接種後 12、14、16 日目に抗 CD73 抗体 200 $\mu$ g もしくは isotype control 200 $\mu$ g の腹腔内投与を行った。放射線照射に抗 CD73 抗体投与した群を RT+Anti-CD73 群、放射線照射に isotype control を投与した群を RT+Isotype control 群とした。接種後 18 日目にマウスを安楽死させ、脾臓細胞と腫瘍組織を摘出した。単細胞処理し、抗原染色後に FACS BD LSRFortressa™ X-20 システムでフローサイトメトリー解析を行った。マウス脾臓細胞の細胞表面染色を行い、(A) 生細胞 (=FVS780 陰性細胞) における CD3 陽性 CD4 陽性細胞の割合、(B) 生細胞における CD3 陽性 CD8a 陽性細胞の割合、(C) 生細胞における CD11b 陽性 Gr-1 陽性細胞の割合、を RT+Anti-CD73 群と RT+Isotype control 群とで比較した。マウス脾臓細胞の細胞内染色を行い、(D) 生細胞における CD3 陽性 CD4 陽性細胞における IFN- $\gamma$ 陽性細胞の割合、(E) 生細胞における CD3 陽性 CD8a 陽性細胞における IFN- $\gamma$ 陽性細胞の割合、を RT+Anti-CD73 群と RT+Isotype control 群とで比較した。マウス腫瘍組織細胞の細胞表面染色を行い、(F) 生細胞における CD45 陽

性 CD3 陽性 CD4 陽性細胞の割合、(G) 生細胞における CD45 陽性 CD3 陽性 CD8a 陽性細胞の割合、(H) 生細胞における CD45 陽性 CD11b 陽性 Gr-1 陽性細胞の割合、を RT+Anti-CD73 群と RT+Isotype control 群とで比較した。マウス腫瘍組織細胞の細胞内染色を行い、(I) 生細胞における CD3 陽性 CD4 陽性細胞における IFN- $\gamma$ 陽性細胞の割合、(J) 生細胞における CD3 陽性 CD8a 陽性細胞における IFN- $\gamma$ 陽性細胞の割合、を RT+Anti-CD73 群と RT+Isotype control 群とで比較した。(n = 6)。\* $p$  < 0.05、\*\* $p$  < 0.01。

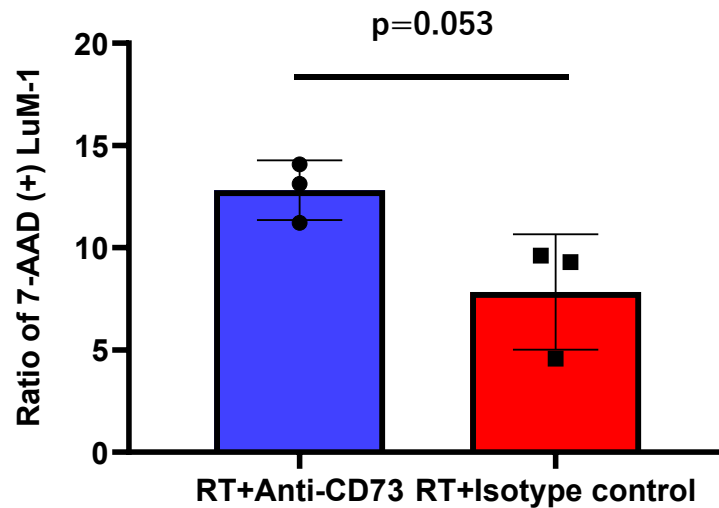
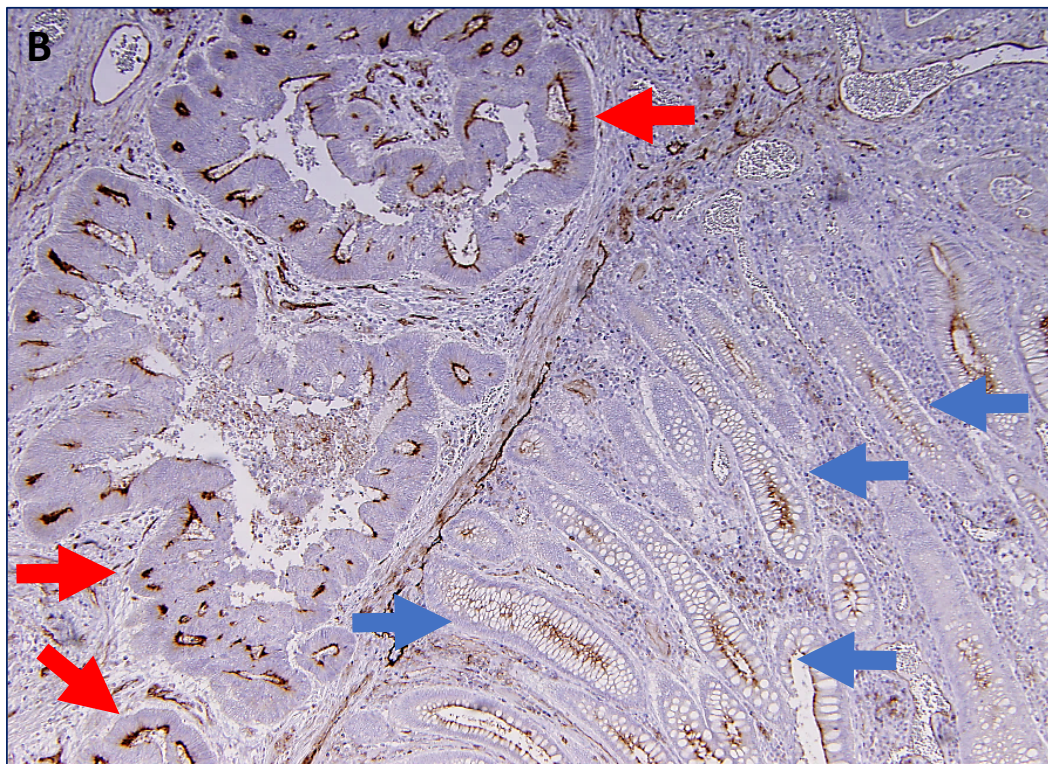
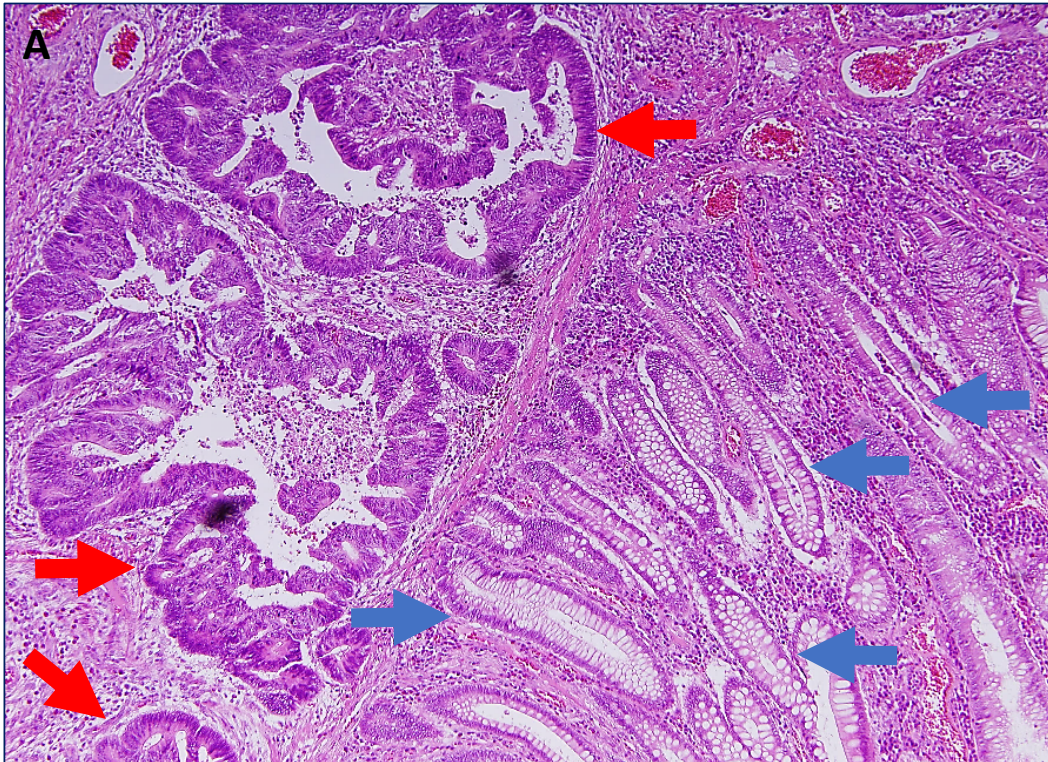


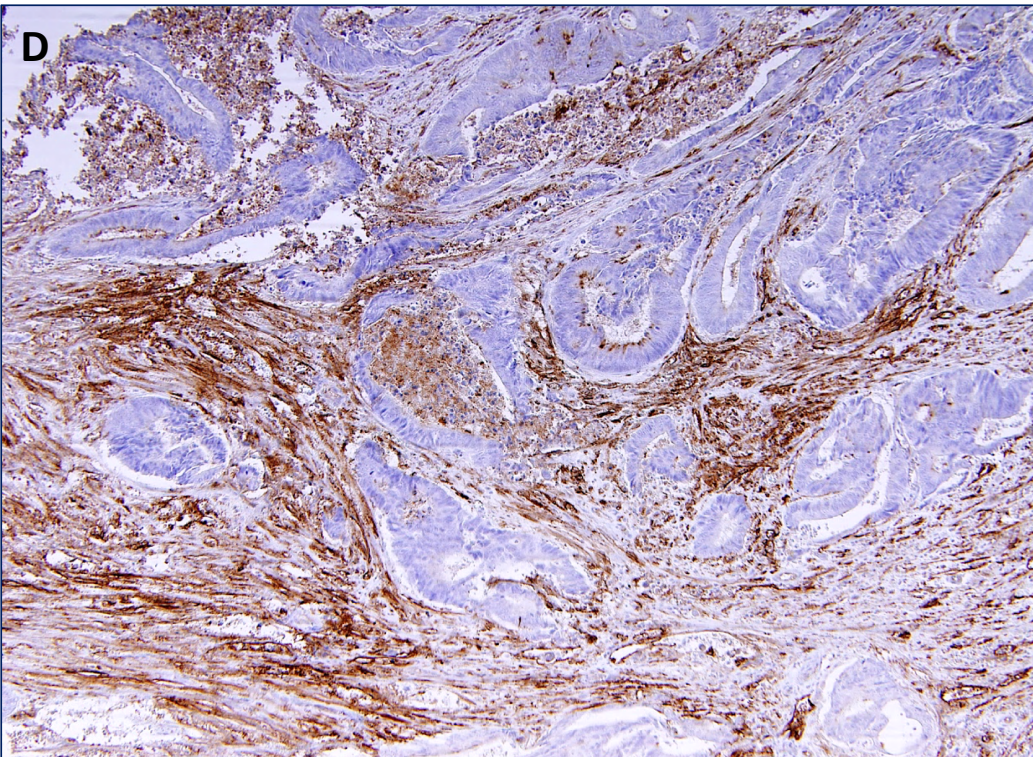
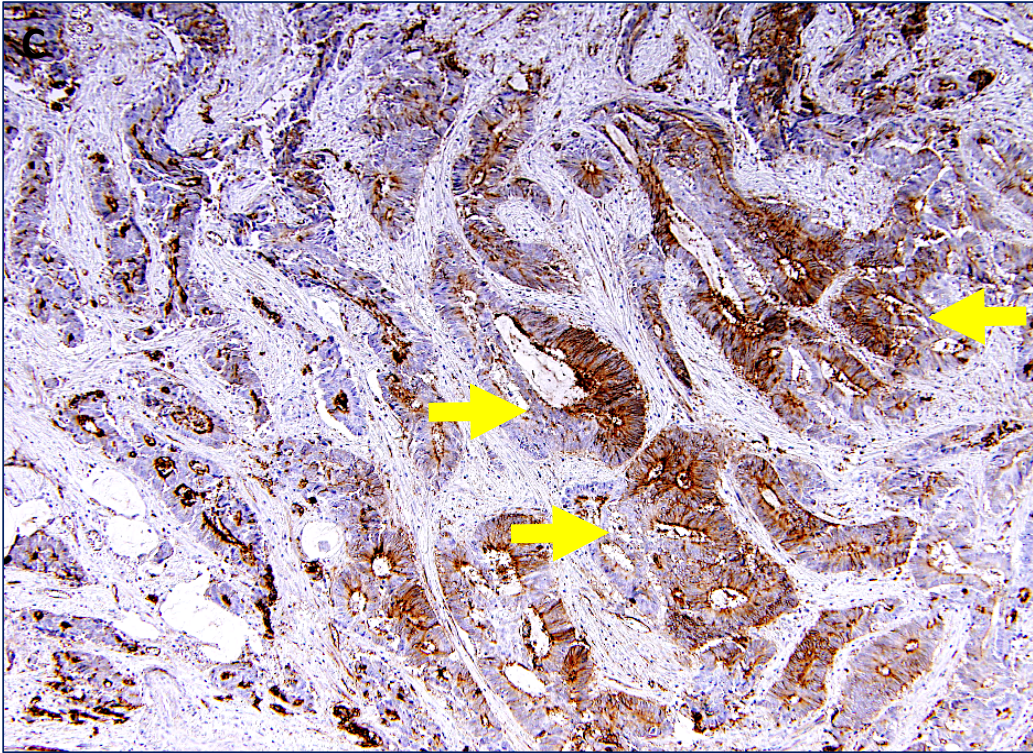
図 15 脾臓細胞を用いた細胞障害アッセイ

RT+Anti-CD73 群、RT+Isotype control 群において、単細胞処理した脾臓細胞  $5 \times 10^6$  と、MX-160 Labo を使用して 50Gy の放射線照射を行った LuM-1  $1 \times 10^6$  とを、20 ng/ml マウス rIL-2 を添加して 12 日間温度 37°C の 5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で維持した。活性化した脾臓細胞と LuM-1 とが 20:1 になるよう 4 時間インキュベーター内で維持し、FITC 結合 Annexin-V、APC 結合 anti-CD45 抗体及び 7-AAD で染色し BD FACSCalibur™ システムでフローサイトメトリー解析を行った。CD45 陰性細胞を腫瘍細胞として、腫瘍細胞における 7-AAD 陽性細胞を死細胞としてカウントした。解析には FlowJo software version10 を用いた。(n = 3)。

### 3-8. ヒト直腸癌臨床検体における CD73 発現と検討・生存解析

直腸癌における CD73 の発現を検討するために、まず術前加療を行わずに外科的切除を施行した 48 名のヒト直腸癌臨床検体を対象に免疫染色を行った。同一症例の HE 染色から正常粘膜上皮 (図 16A、B 青矢印) と腫瘍細胞 (図 16A、B 赤矢印) とを同定し、CD73 の染色形態を観察したところ、多くの症例で、正常粘膜上皮と比較して腫瘍細胞膜上の CD73 発現が増強していた。同じ組織内でも CD73 の発現様式には強弱があり、一部の腫瘍細胞の細胞質内に発現している部分も認めた (図 16C 矢印)。また一部の症例では、腫瘍細胞に発現しておらず、間質、特に線維化部位に一致して強い発現が認められた (図 16D)。以上のことから、腫瘍細胞と間質とで CD73 発現強度で分け、臨床・病理学的因子について検討したが、臨床・病理学的因子とは明らかな相関関係は認めなかった (表 5)。





## 図 16 術前加療を行わずに手術加療を行った症例の CD73 発現と臨床検体の検討

局所直腸進行癌に対して術前加療を行わずに手術加療を行った48名のヒト直腸癌臨床検体ホルマリン固定パラフィン包埋4 $\mu$ m切片を対象にDako REAL EnVision Detection System (DAKO) を使用して、HE染色及び抗CD73抗体 (D7F9A, Rabbit IgG) の免疫組織学的染色 (IHC) を行った。(A) HE染色 (B) IHCから正常粘膜上皮 (青矢印) と腫瘍細胞 (赤矢印) とを同定し、CD73の染色形態を評価した。(C) 他症例では同じ組織内で、一部腫瘍細胞内にCD73を発現している部分 (矢印) を認めた。(D) 一部の症例では、間質にCD73を強く発現していた。

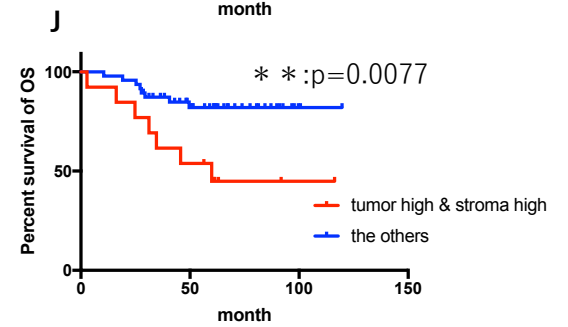
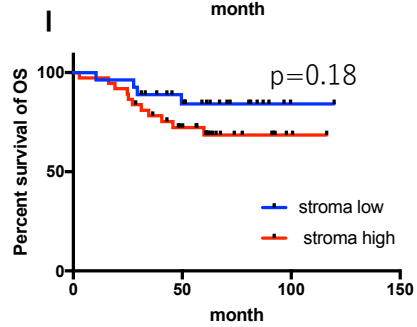
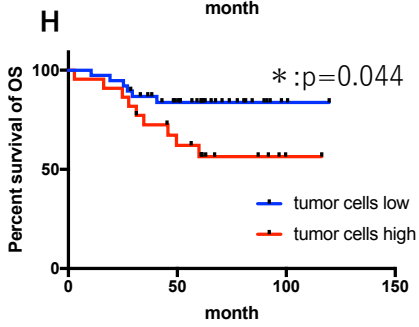
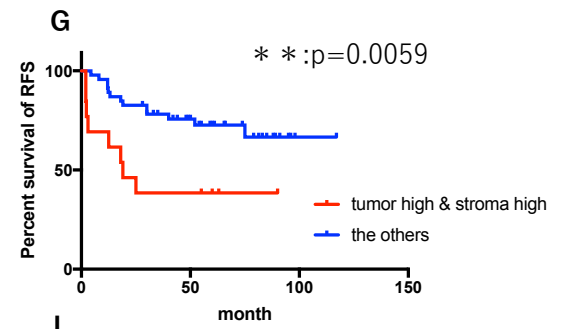
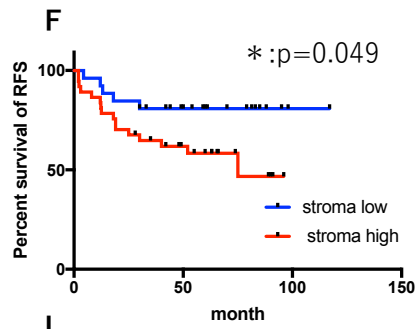
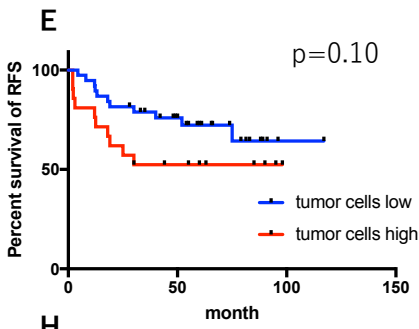
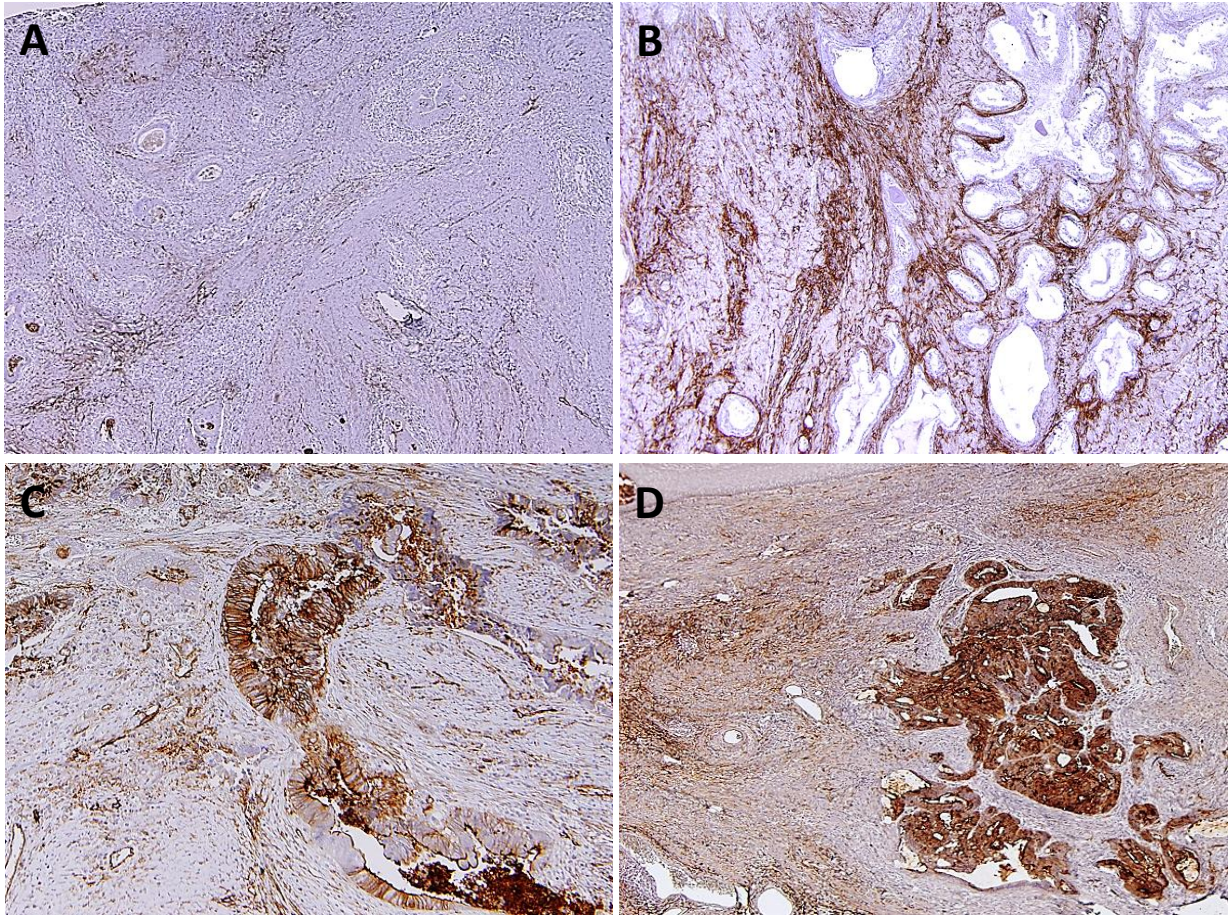


表5 CD73発現別の術前加療を行わずに手術加療を行った直腸癌48症例の臨床・病理学的因子

Variable	Tumor cells (48)			Stroma (48)		
	Low (21)	High (27)	p-value	Low (20)	High (28)	p-value
Age	68 (33-81)	67 (32-79)	0.77	64 (32-81)	68 (32-79)	0.64
Gender			0.55			0.76
M	13	19		14	18	
F	8	8		6	10	
Location			0.58			0.38
Ra	14	14		10	18	
Rab	2	4		2	4	
Rb	5	9		8	6	
Histology			1.00			0.26
Differentiated	20	25		20	25	
Undifferentiated	1	2		0	3	
Lymphatic invasion			1.00			1.00
Absent	9	12		9	12	
Present	12	15		11	16	
Venous invasion			1.00			1.00
Absent	1	2		1	2	
Present	20	27		19	26	
Tumor stage			0.28			0.28
t2	6	9		7	8	
t3	10	16		12	14	
t4	5	2		1	6	
N stage			1.00			0.77
n0	10	12		10	12	
n1 <	11	15		10	16	
Adjuvant chemotherapy			0.76			0.36
Given	6	10		5	11	
Not given	15	17		15	17	

次に、局所進行直腸癌に対して術前 CRT の後に手術加療を行った 64 名のヒト直腸癌臨床検体対象に同様の検討を行った。CD73 の発現強度は症例によって大きく異なっており、かつ腫瘍細胞と間質とで著しく異なる染色形態を示していた (図 17A-D)。そこで、腫瘍細胞と間質とで CD73 発現強度で分け、臨床・病理学的検討を行ったところ、やはり両群間で顕著な差は認めなかった (表 6)。しかし、予後因子として、CD73 の発現強度で無再発生存期間 (RFS) を比較すると、間質高発現グループは間質低発現グループと比較して有意に再発しやすく、特に、腫瘍細胞高発現かつ間質細胞高発現グループはその他と比較して有意に再発率が高かった (図 17E-G)。また、CD73 の発現強度で OS を比較すると、腫瘍細胞高発現グループは腫瘍細胞低発現グループと比較して有意に生存期間が短く、特に、腫瘍細胞と間質で共に CD73 が高発現していた患者の生存期間中央値 (MST) は 59.9 か月と、その他の群と比較して著しく予後が悪かった (図 17H-J)。

最後に、この 64 例において、予後に影響を与える因子を単変量解析で検討したところ、Tumor stage と CD73 expression levels (腫瘍細胞高発現かつ間質高発現) が OS に関する予後因子として挙げられ、RFS においては CD73 expression levels だけが有意な予後因子であった。単変量における  $p < 0.20$  の因子について多変量解析したところ RFS と OS どちらにおいても、CD73 expression levels が独立した予後因子であった (表 7)。



## 図 17 術前 CRT 症例の CD73 発現と臨床検体の検討・生存解析

局所進行直腸癌に対して術前 CRT の後に手術加療を行った 64 名のヒト直腸癌臨床検体ホルマリン固定パラフィン包埋 4  $\mu$  m 切片を対象に Dako REAL EnVision Detection System (DAKO) を使用して、抗 CD73 抗体 (D7F9A, Rabbit IgG) の免疫組織学的染色 (IHC) を行った。染色強度を腫瘍細胞または間質で個別に評価し、高発現グループと低発現グループに分けた。4 つの代表例 (A) 腫瘍細胞低発現/間質低発現、(B) 腫瘍細胞低発現/間質高発現、(C) 腫瘍細胞高発現/間質低発現、(D) 腫瘍細胞高発現/間質高発現。(E) 腫瘍細胞高発現グループと腫瘍細胞低発現グループ、(F) 間質高発現グループと間質低発現グループ、(G) 腫瘍細胞高発現かつ間質細胞高発現グループとその他、で無再発生存期間 (RFS) を比較した。(H) 腫瘍細胞高発現グループと腫瘍細胞低発現グループ、(I) 間質高発現グループと間質低発現グループ、(J) 腫瘍細胞高発現かつ間質細胞高発現グループとその他、で全生存期間 (OS) を比較した。 $*p < 0.05$ 、 $**p < 0.01$ 。

表6 CD73発現別の術前CRT後に手術を加療を行った直腸癌64症例の臨床・病理学的因子

Variable	Tumor cells (64)			p-value	Stroma (64)		p-value
	Low (38)	High (22)	Unknown (4) <sup>※</sup>		Low (27)	High (37)	
Age	63 (36-78)	59 (42-79)	66 (63-68)	0.13	61 (36-74)	62 (44-79)	0.80
Gender				0.77			0.56
M	29	16	3		19	29	
F	9	6	1		8	8	
Location				0.69			0.48
Rab	2	1			2	1	
Rb	36	21			25	36	
Histology				0.70			0.46
Differentiated	32	20			22	31	
Undifferentiated	6	2			2	6	
Lymphatic invasion				0.42			0.80
Absent	24	11			17	22	
Present	14	11			10	15	
Venous invasion				0.78			0.80
Absent	13	9			10	16	
Present	25	13			17	21	
Tumor stage				0.48			0.35
t0/t1	4	0	4		5	3	
t2	9	5			7	7	
t3	23	14			12	25	
t4	2	3			3	2	
N stage				0.59			0.79
n0	23	15			17	25	
n1 <	15	7			10	12	
Pathological response				0.29			0.63
grade 0/1	25	17			18	24	
grade 2	13	5	1		7	12	
grade 3	0	0	3		2	1	
Combined chemotherapy				0.31			0.20
Given	35	18	4		23	34	
Not given	3	4			4	3	
Adjuvant chemotherapy				0.13			0.99
Given	16	5			9	12	
Not given	22	17	4		18	25	

※腫瘍細胞におけるCD73の発現において、病理学的治療効果grade2の内1症例は遺残腫瘍細胞がほとんど残っていませんでしたため評価できず、grade3と同様に扱った。

表7 無再発生存期間 (RFS) と全生存期間 (OS) に関連する因子の単変量解析・多変量解析

Variable	RFS				OS			
	Univariate analysis		Multivariate analysis		Univariate analysis		Multivariate analysis	
	HR (95% CI)	p-value	HR (95% CI)	p-value	HR (95% CI)	p-value	HR (95% CI)	p-value
Age (62y vs $\geq 62$ y)	1.0(0.45-2.4)	0.94			1.0(0.38-2.9)	0.94		
Gender (M vs F)	0.88(0.32-2.4)	0.81			1.1(0.35-3.5)	0.88		
Location (Rab vs Rb)	22(0.005- $1.0 \times 10^5$ )	0.47			22(0- $1.0 \times 10^6$ )	0.58		
Histology (Differentiated vs Undifferentiated)	1.3(0.40-4.5)	0.66			1.3(0.30-5.8)	0.72		
Lymphatic invasion (Absent vs Present)	1.5(0.62-3.3)	0.39			1.3(0.46-3.5)	0.66		
Venous invasion (Absent vs Present)	1.2(0.49-3.0)	0.68			0.87(0.31-2.5)	0.79		
Tumor Stage (Others vs t3/4)	3.2(0.94-11)	0.063	3.0(0.90-10)	0.074	2.8(0.64-13)	0.17	2.5(0.56-11)	0.23
N stage (No vs Yes)	0.91(0.37-2.3)	0.84			1.2(0.44-3.5)	0.68		
Pathological response (Grade0/1 vs 2/3)	0.75(0.29-1.9)	0.54			0.80(0.25-2.5)	0.70		
Combined chemotherapy (Given vs Not Given)	1.2(0.27-5.0)	0.83			0.89(0.2-3.9)	0.87		
Adjuvant chemotherapy (Given vs Not given)	0.93(0.38-2.3)	0.87			1.0(0.36-3.1)	0.94		
CD73 expression levels (Tumor cells high and Stroma high vs Others)	3.2(1.3-7.6)	0.01	2.8(1.2-6.8)	0.022	3.9(1.4-11)	0.008	3.3(1.2-9.2)	0.021

HR: hazard ratio, CI: confidence interval

## 第4章 考察

RT は、固形癌に対する治療目的や緩和目的に広く臨床応用されている。最近の臨床研究において、免疫チェックポイント阻害薬と併用により、RT による抗腫瘍効果が増強されることを示唆する報告が見られるが、その効果は限定的で、更なる治療法の改良が望まれる (16-18, 20, 44)。アデノシンは、強力な免疫抑制効果を有しており、重要な『代謝性免疫チェックポイント分子』と考えられ、CD73/アデノシン経路阻害薬は、RT と併用しうる新たな免疫療法のマテリアルとして注目を集めている (29, 45, 46)。しかし、担癌個体における照射後のアデノシンレベルの変化が RT の治療効果に及ぼす影響、特に非照射部に対する影響 (Abscopal effect) に関しては、まだ検討されていない。

過去の動物実験で、RT と免疫チェックポイント阻害抗体の併用が効率良く Abscopal effect を誘導することが報告されている (15-17)。しかし、これらの報告では、同一のマウス個体に対して 2 カ所に腫瘍細胞を接種し、照射部と非照射部とに分けて、非照射部に対する抗腫瘍効果を Abscopal effect としている。しかし、実際の癌の進展は原発巣から他臓器に転移することから、本研究では、自然肺転移をきたすマウスモデルを用いて、原発巣に局所照射することで肺の微小転移に対する Abscopal effect を検討することを試みた。

まず、マウス大腸癌細胞株 Colon26 の亜型で自然肺転移をきたす細胞株 LuM-1 は CD73 を強く発現しており、RT にて CD73 の発現強度は更に増強し、その酵素活性も増加することが確認した。過去の報告では、CD73 の遺伝子発現が RT に関与する低酸素下や炎症性サイトカインにより増強することが解っており (47, 48)、RT により免疫細胞や食道癌や膀胱癌の

CD73 発現が増強することも報告されている (49-51)。本研究結果は、これらの報告と合致し、RT 後には、障害された細胞から大量のリン酸化アデノシンが細胞外に放出されることに加えて CD73 の発現亢進が認められることから、放射線照射された腫瘍組織内には大量のアデノシンが存在する可能性があることが予想された。

逆相高圧液体クロマトグラフィーを用いた過去の研究では、固形癌の細胞外アデノシンレベルは 50-100  $\mu\text{M}$  と正常な組織より高く、局所的な抗腫瘍免疫応答を抑えるのに十分な量だという報告がある (39, 52)。しかし、アデノシンは、低分子量、高極性に加え、極めて短時間で酵素分解されるため、組織中のアデノシンレベルの正確な定量は困難とされている (53)。そこで、本研究では、従来の液体クロマトグラフィーよりも感度と選択性に優れた LC/MS 法を使用してアデノシンレベルを測定したところ、放射線照射されたマウス LuM-1 腫瘍組織では照射後 24 時間後にアデノシンレベルが有意に上昇しているというデータが得られた (54)。検索した限り、本研究は放射線照射された腫瘍におけるアデノシンレベルの変化を直接評価した最初の報告である。また、アデノシンの安定代謝産物であるイノシンのレベルは、照射後 48 時間後で有意に増加していた。これらの結果から、放射線照射された腫瘍の微小環境におけるアデノシンレベルが、少なくとも数時間、かなり高いレベルに維持されており、結果として RT によって誘発される抗腫瘍免疫応答を減弱させている可能性があることが推測される。

さて、LuM-1 を用いたマウス自然肺転移モデルにおいて、RT 単独は皮下腫瘍の成長を遅延させたが、抗 CD73 抗体を単独で使用した場合には明らかな抗腫瘍効果を示さなかった。しかし、RT と抗 CD73 抗体を併用した場合、RT と isotype control を併用した皮下腫瘍と比較して、腫瘍の成長を更に抑制していた。また興味深いことに、RT と抗 CD73 抗体を併用し



た群では、鉛遮蔽により放射線が照射されていない肺の転移個数も有意に減少しており、4/8 匹 (50%) の肺では肉眼的転移は観察されなかった。

LuM-1 は接種後 8~10 日後には肺に微小転移巣を形成するため、治療時には既に肺顕微鏡的微小転移が存在していたと考えられる。したがって、肺転移を認めなかった個体においては、RT と抗 CD73 抗体を併用することにより、肺に存在する微小転移を除去する全身性免疫反応を引き起こされたと考えられる。事実、RT と抗 CD73 抗体を併用したマウスの脾臓内 T 細胞において IFN- $\gamma$  を産生する能力が有意に増加しており、照射腫瘍組織細胞においても同様の傾向が認められた。更に、細胞障害アッセイにおいて、自己 LuM-1 に対する細胞毒性が増強していた。過去のマウスを用いた RT と抗 CTLA-4 抗体を併用した免疫放射線療法の実験では、RT 単独群と比較して併用群では脾臓細胞 CD8a 陽性細胞における IFN- $\gamma$  陽性細胞の割合が有意に増えていたと報告しており、本研究の結果と合致し

(15)、RT による Abscopal effect を誘発する機序には細胞障害性 T 細胞の活性化が重要な役割を果たしていることを示唆している。

CD73 は様々な細胞で発現する多機能分子である。以前の研究によると、CD73 はアデノシン産生酵素活性とは別に、癌細胞の増殖と遊走を直接媒介する事実が報告されている (55, 56)。本研究において、Colon26 の亜型で自然肺転移をきたす細胞株 LuM-1 が、親株の Colon26 と比較して、CD73 を強く発現していたことは、これらの報告を支持している。また、CD73 は酵素機能と非酵素機能の両方を介して血管新生の過程に寄与することも報告されている (57, 58)。以上の報告は、CD73 の阻害が免疫とは関係のない全く別のメカニズムを通じて、肺転移の成長を抑制していた可能性があることを示唆している。しかし、本研究では、抗 CD73 抗体を単独で使用した場合には肺転移の有意な抑制を示さなかったため、その可能性は少ない

と考えられる。実際、*in vitro* 実験において LuM-1 の増殖と遊走は抗体処理の影響を受けないことは確認している。

ヒト直腸癌臨床検体の免疫染色実験では、腫瘍細胞及び間質の両方に、様々なレベルで CD73 が発現することが確認された。特に CRT 後に手術加療を行ったヒト直腸癌臨床検体の免疫染色実験では、発現様式は症例によって大きく異なっていたが、CD73 が高発現した症例では、再発率が高く、生存期間が短い傾向が確認された。放射線照射を受けていない腫瘍における CD73 発現と OS との関連性については既に検討されている。Wu らは、大腸癌において腫瘍細胞上の CD73 発現が増強しており、CD73 発現が独立した予後不良因子であることを報告している。また、Ren らは口腔扁平上皮癌において、Inoue らは非小細胞肺癌において、同様の報告をしている (30-32)。一方、直腸癌を対象として著者らの検討では、CD73 は腫瘍細胞だけでなく間質にも強い染色を認めた。過去の報告では、腫瘍の間質における CD73 については詳しく言及されていないが、CD73 は腫瘍細胞だけでなく、多くの間質細胞にも発現していることは既に知られており (59)、本研究結果は、その結果を反映していると思われる。今回、間質のどの細胞まで同定することは出来なかったが、線維性変化が強い間質は CD73 が強い傾向が認められた。

また、放射線を受けた腫瘍組織での CD73 の発現を検討した報告はないが、照射後の CD73 発現の強い直腸癌症例では、再発が多く、予後が悪い傾向を示した。これは、非照射腫瘍におけるこれまでの報告とおおむね一致している。マウス実験の結果と合わせると、放射線照射された腫瘍組織の CD73 の増強によりアデノシンレベルが上昇すると、癌の免疫逃避機構が増強され、癌の成長や遠隔転移に好都合な環境になることを示唆する結果であると思われる。

近年のがん免疫療法において、腫瘍特異的抗原を宿主の獲得免疫系に提示させる目的で、RTを腫瘍ワクチンとして応用しようとする試みがなされてきている。しかし、RTは一過性の免疫抑制を誘発するという側面があるため、RTに適切な免疫制御を付加した免疫放射線療法は、今後、進行癌に対する有望な治療法に発展する可能性があると思われる。本研究は、放射線照射された腫瘍から放出されたアデノシンにより抗腫瘍効果が低下する状況をCD73の機能的阻害により回復できる可能性があることを示唆した最初の報告である。抗CD73抗体は、Phase1の臨床試験で既に使用されているため(NCT02503774)(60)、RTと抗CD73抗体との併用療法が、進行直腸癌患者に対する局所及び遠隔転移巣を制御する上で、有望な術前治療になりうると考えられた。

## 第5章 おわりに

自然肺転移をきたすマウス大腸癌細胞 LuM-1 における CD73 の発現が、放射線照射により増強され、照射後には皮下腫瘍組織内におけるアデノシン代謝物質が増加することが示された。また、自然肺転移モデルにおいて局所 RT に抗 CD73 抗体を併用することで、放射線照射部の皮下腫瘍の抑制のみならず、全身の免疫応答を介した **Abscopal effect** による非照射部の肺転移の抑制が得られることが確認できた。また、CRT 後に手術加療を行ったヒト直腸癌臨床検体を用いた免疫染色実験においても照射後の腫瘍組織内での CD73 高発現が予後不良因子であったことから、CD73/アデノシン経路の活性化がヒトにおいても放射線の治療効果を減弱させている可能性があることが示唆された。RT と抗 CD73 抗体との併用療法が、進行直腸癌患者に対する有望な術前治療になりうることを示すことができた。

## 謝辞

本研究を進めるにあたり、ご指導を頂いた自治医科大学外科学講座消化器一般移植外科部門教授 佐田尚宏主任教授、北山丈二教授、堀江久永教授に深く感謝致します。

また、放射線実験を行うにあたり、ご指導を頂いた自治医科大学外科学講座形成外科部門 吉村浩太郎教授、フローサイトメトリー法を行うにあたり、ご指導を頂いた自治医科大学学生化学講座病態生化学部門 早川裕子さんに深く感謝致します。

最後に、研究の計画・遂行にあたり様々なお助言を頂き、日々の研究生活を支えて下さった自治医科大学消化器外科学教室の皆様、研究補助員の篠原淳子さん、畠山浩美さんに心より御礼申し上げます。

## 引用文献

1. Kapiteijn, E., C. A. Marijnen, I. D. Nagtegaal, H. Putter, W. H. Steup, T. Wiggers, H. J. Rutten, L. Pahlman, B. Glimelius, J. H. van Krieken, J. W. Leer, C. J. van de Velde, and Dutch Colorectal Cancer Group. Preoperative radiotherapy combined with total mesorectal excision for resectable rectal cancer. *N Engl J Med* **345**, 638-646 (2001).
2. Bosset, J. F., L. Collette, G. Calais, L. Mineur, P. Maingon, L. Radosevic-Jelic, A. Daban, E. Bardet, A. Beny, J. C. Ollier, and EORTC Radiotherapy Group Trial 22921. Chemotherapy with preoperative radiotherapy in rectal cancer. *N Engl J Med* **355**, 1114-1123 (2006).
3. Sugihara, K., H. Kobayashi, T. Kato, T. Mori, H. Mochizuki, S. Kameoka, K. Shirouzu, and T. Muto. Indication and benefit of pelvic sidewall dissection for rectal cancer. *Dis Colon Rectum* **49**, 1663-1672 (2006).
4. van Gijn, W., C. A. Marijnen, I. D. Nagtegaal, E. M. Kranenbarg, H. Putter, T. Wiggers, H. J. Rutten, L. Pahlman, B. Glimelius, C. J. van de Velde, and Dutch Colorectal Cancer Group. Preoperative radiotherapy combined with total mesorectal excision for resectable rectal cancer: 12-year follow-up of the multicentre, randomised controlled TME trial. *Lancet Oncol* **12**, 575-582 (2011).
5. Sauer, R., T. Liersch, S. Merkel, R. Fietkau, W. Hohenberger, C. Hess, H. Becker, H. R. Raab, M. T. Villanueva, H. Witzigmann, C. Wittekind, T. Beissbarth, and C. Rödel. Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for locally advanced rectal cancer: results of the German

- CAO/ARO/AIO-94 randomized phase III trial after a median follow-up of 11 years. *J Clin Oncol* **30**, 1926-1933 (2012).
6. O'Connell, M. J., L. H. Colangelo, R. W. Beart, N. J. Petrelli, C. J. Allegra, S. Sharif, H. C. Pitot, A. F. Shields, J. C. Landry, D. P. Ryan, D. S. Parda, M. Mohiuddin, A. Arora, L. S. Evans, N. Bahary, G. S. Soori, J. Eakle, J. M. Robertson, D. F. Moore, M. R. Mullane, B. T. Marchello, P. J. Ward, T. F. Wozniak, M. S. Roh, G. Yothers, and N. Wolmark. Capecitabine and oxaliplatin in the preoperative multimodality treatment of rectal cancer: surgical end points from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project trial R-04. *J Clin Oncol* **32**, 1927-1934 (2014).
  7. Erlandsson, J., T. Holm, D. Pettersson, Å Berglund, B. Cedermark, C. Radu, H. Johansson, M. Machado, F. Hjern, O. Hallböök, I. Syk, B. Glimelius, and A. Martling. Optimal fractionation of preoperative radiotherapy and timing to surgery for rectal cancer (Stockholm III): a multicentre, randomised, non-blinded, phase 3, non-inferiority trial. *Lancet Oncol* **18**, 336-346 (2017).
  8. Lee, Y., S. L. Auh, Y. Wang, B. Burnette, Y. Meng, M. Beckett, R. Sharma, R. Chin, T. Tu, R. R. Weichselbaum, and Y. X. Fu. Therapeutic effects of ablative radiation on local tumor require CD8<sup>+</sup> T cells: changing strategies for cancer treatment. *Blood* **114**, 589-595 (2009).
  9. Clifford, R., N. Govindarajah, J. L. Parsons, S. Gollins, N. P. West, and D. Vimalachandran. Systematic review of treatment intensification using novel agents for chemoradiotherapy in rectal cancer. *Br J Surg* **105**, 1553-1572 (2018).
  10. Gulley, J. L., P. M. Arlen, A. Bastian, S. Morin, J. Marte, P. Beetham, K. Y. Tsang, J. Yokokawa, J. W. Hodge, C. Ménard, K. Camphausen, C. N.

- Coleman, F. Sullivan, S. M. Steinberg, J. Schlom, and W. Dahut. Combining a recombinant cancer vaccine with standard definitive radiotherapy in patients with localized prostate cancer. *Clin Cancer Res* **11**, 3353-3362 (2005).
11. Golden, E. B., D. Frances, I. Pellicciotta, S. Demaria, M. Helen Barcellos-Hoff, and S. C. Formenti. Radiation fosters dose-dependent and chemotherapy-induced immunogenic cell death. *Oncoimmunology* **3**, e28518 (2014).
  12. Formenti, S. C., and S. Demaria. Systemic effects of local radiotherapy. *Lancet Oncol* **10**, 718-726 (2009).
  13. Grass, G. D., N. Krishna, and S. Kim. The immune mechanisms of abscopal effect in radiation therapy. *Curr Probl Cancer* **40**, 10-24 (2016).
  14. Derer, A., L. Deloch, Y. Rubner, R. Fietkau, B. Frey, and U. S. Gaipl. Radio-Immunotherapy-Induced Immunogenic Cancer Cells as Basis for Induction of Systemic Anti-Tumor Immune Responses - Pre-Clinical Evidence and Ongoing Clinical Applications. *Front Immunol* **6**, 505 (2015).
  15. Dewan, M. Z., A. E. Galloway, N. Kawashima, J. K. Dewyngaert, J. S. Babb, S. C. Formenti, and S. Demaria. Fractionated but not single-dose radiotherapy induces an immune-mediated abscopal effect when combined with anti-CTLA-4 antibody. *Clin Cancer Res* **15**, 5379-5388 (2009).
  16. Park, S. S., H. Dong, X. Liu, S. M. Harrington, C. J. Krco, M. P. Grams, A. S. Mansfield, K. M. Furutani, K. R. Olivier, and E. D. Kwon. PD-1 Restrains Radiotherapy-Induced Abscopal Effect. *Cancer Immunol Res* **3**, 610-619 (2015).



17. Dovedi, S. J., A. L. Adlard, G. Lipowska-Bhalla, C. McKenna, S. Jones, E. J. Cheadle, I. J. Stratford, E. Poon, M. Morrow, R. Stewart, H. Jones, R. W. Wilkinson, J. Honeychurch, and T. M. Illidge. Acquired resistance to fractionated radiotherapy can be overcome by concurrent PD-L1 blockade. *Cancer Res* **74**, 5458-5468 (2014).
18. Antonia, S. J., A. Villegas, D. Daniel, D. Vicente, S. Murakami, R. Hui, T. Yokoi, A. Chiappori, K. H. Lee, M. de Wit, B. C. Cho, M. Bourhaba, X. Quantin, T. Tokito, T. Mekhail, D. Planchard, Y. C. Kim, C. S. Karapetis, S. Hiret, G. Ostoros, K. Kubota, J. E. Gray, L. Paz-Ares, J. de Castro Carpeño, C. Wadsworth, G. Melillo, H. Jiang, Y. Huang, P. A. Dennis, M. Özgüroğlu, and PACIFIC Investigators. Durvalumab after Chemoradiotherapy in Stage III Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* **377**, 1919-1929 (2017).
19. Antonia, S. J., A. Villegas, D. Daniel, D. Vicente, S. Murakami, R. Hui, T. Kurata, A. Chiappori, K. H. Lee, M. de Wit, B. C. Cho, M. Bourhaba, X. Quantin, T. Tokito, T. Mekhail, D. Planchard, Y. C. Kim, C. S. Karapetis, S. Hiret, G. Ostoros, K. Kubota, J. E. Gray, L. Paz-Ares, J. de Castro Carpeño, C. Faivre-Finn, M. Reck, J. Vansteenkiste, D. R. Spigel, C. Wadsworth, G. Melillo, M. Taboada, P. A. Dennis, M. Özgüroğlu, and PACIFIC Investigators. Overall Survival with Durvalumab after Chemoradiotherapy in Stage III NSCLC. *N Engl J Med* **379**, 2342-2350 (2018).
20. Shaverdian, N., A. E. Lisberg, K. Bornazyan, D. Veruttipong, J. W. Goldman, S. C. Formenti, E. B. Garon, and P. Lee. Previous radiotherapy and the clinical activity and toxicity of pembrolizumab in the treatment of

- non-small-cell lung cancer: a secondary analysis of the KEYNOTE-001 phase 1 trial. *Lancet Oncol* **18**, 895-903 (2017).
21. Golden, E. B., S. Demaria, P. B. Schiff, A. Chachoua, and S. C. Formenti. An abscopal response to radiation and ipilimumab in a patient with metastatic non-small cell lung cancer. *Cancer Immunol Res* **1**, 365-372 (2013).
  22. Kwon, E. D., C. G. Drake, H. I. Scher, K. Fizazi, A. Bossi, A. J. van den Eertwegh, M. Krainer, N. Houede, R. Santos, H. Mahammedi, S. Ng, M. Maio, F. A. Franke, S. Sundar, N. Agarwal, A. M. Bergman, T. E. Ciuleanu, E. Korbenfeld, L. Sengeløv, S. Hansen, C. Logothetis, T. M. Beer, M. B. McHenry, P. Gagnier, D. Liu, W. R. Gerritsen, and CA184-043 Investigators. Ipilimumab versus placebo after radiotherapy in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer that had progressed after docetaxel chemotherapy (CA184-043): a multicentre, randomised, double-blind, phase 3 trial. *Lancet Oncol* **15**, 700-712 (2014).
  23. Haskó, G., and B. N. Cronstein. Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. *Trends Immunol* **25**, 33-39 (2004).
  24. Antonioli, L., C. Blandizzi, P. Pacher, and G. Haskó. Immunity, inflammation and cancer: a leading role for adenosine. *Nat Rev Cancer* **13**, 842-857 (2013).
  25. Pardoll, D. M. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* **12**, 252-264 (2012).
  26. Sorrentino, R., A. Pinto, and S. Morello. The adenosinergic system in cancer: Key therapeutic target. *Oncoimmunology* **2**, e22448 (2013).

27. Di Virgilio, F., and E. Adinolfi. Extracellular purines, purinergic receptors and tumor growth. *Oncogene* **36**, 293-303 (2017).
28. Kaufmann, A., B. Musset, S. H. Limberg, V. Renigunta, R. Sus, A. H. Dalpke, K. M. Heeg, B. Robaye, and P. J. Hanley. "Host tissue damage" signal ATP promotes non-directional migration and negatively regulates toll-like receptor signaling in human monocytes. *J Biol Chem* **280**, 32459-32467 (2005).
29. Ohta, A. A Metabolic Immune Checkpoint: Adenosine in Tumor Microenvironment. *Front Immunol* **7**, 109 (2016).
30. Wu, X. R., X. S. He, Y. F. Chen, R. X. Yuan, Y. Zeng, L. Lian, Y. F. Zou, N. Lan, X. J. Wu, and P. Lan. High expression of CD73 as a poor prognostic biomarker in human colorectal cancer. *J Surg Oncol* **106**, 130-137 (2012).
31. Ren, Z. H., Y. X. Yuan, T. Ji, and C. P. Zhang. CD73 as a novel marker for poor prognosis of oral squamous cell carcinoma. *Oncol Lett* **12**, 556-562 (2016).
32. Inoue, Y., K. Yoshimura, N. Kurabe, T. Kahyo, A. Kawase, M. Tanahashi, H. Ogawa, N. Inui, K. Funai, K. Shinmura, H. Niwa, T. Suda, and H. Sugimura. Prognostic impact of CD73 and A2A adenosine receptor expression in non-small-cell lung cancer. *Oncotarget* **8**, 8738-8751 (2017).
33. Beavis, P. A., U. Divisekera, C. Paget, M. T. Chow, L. B. John, C. Devaud, K. Dwyer, J. Stagg, M. J. Smyth, and P. K. Darcy. Blockade of A2A receptors potently suppresses the metastasis of CD73+ tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 14711-14716 (2013).
34. Young, A., S. F. Ngiow, D. S. Barkauskas, E. Sult, C. Hay, S. J. Blake, Q. Huang, J. Liu, K. Takeda, M. W. L. Teng, K. Sachsenmeier, and M. J.

- Smyth. Co-inhibition of CD73 and A2AR Adenosine Signaling Improves Anti-tumor Immune Responses. *Cancer Cell* **30**, 391-403 (2016).
35. Loi, S., S. Pommey, B. Haibe-Kains, P. A. Beavis, P. K. Darcy, M. J. Smyth, and J. Stagg. CD73 promotes anthracycline resistance and poor prognosis in triple negative breast cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* **110**, 11091-11096 (2013).
  36. Allard, B., S. Pommey, M. J. Smyth, and J. Stagg. Targeting CD73 enhances the antitumor activity of anti-PD-1 and anti-CTLA-4 mAbs. *Clin Cancer Res* **19**, 5626-5635 (2013).
  37. Antonioli, L., G. G. Yegutkin, P. Pacher, C. Blandizzi, and G. Haskó. Anti-CD73 in cancer immunotherapy: awakening new opportunities. *Trends Cancer* **2**, 95-109 (2016).
  38. Leone, R. D., and L. A. Emens. Targeting adenosine for cancer immunotherapy. *J Immunother Cancer* **6**, 57 (2018).
  39. Blay, J., T. D. White, and D. W. Hoskin. The extracellular fluid of solid carcinomas contains immunosuppressive concentrations of adenosine. *Cancer Res* **57**, 2602-2605 (1997).
  40. Sakata, K., K. Kozaki, K. Iida, R. Tanaka, S. Yamagata, K. R. Utsumi, S. Saga, S. Shimizu, and M. Matsuyama. Establishment and characterization of high- and low-lung-metastatic cell lines derived from murine colon adenocarcinoma 26 tumor line. *Jpn J Cancer Res* **87**, 78-85 (1996).
  41. Yasuda, K., T. Nirei, N. H. Tsuno, H. Nagawa, and J. Kitayama. Intratumoral injection of interleukin-2 augments the local and abscopal effects of radiotherapy in murine rectal cancer. *Cancer Sci* **102**, 1257-1263 (2011).

42. Turcotte, M., D. Allard, D. Mittal, Y. Bareche, L. Buisseret, V. José, S. Pommey, V. Delisle, S. Loi, H. Joensuu, P. L. Kellokumpu-Lehtinen, C. Sotiriou, M. J. Smyth, and J. Stagg. CD73 Promotes Resistance to HER2/ErbB2 Antibody Therapy. *Cancer Res* **77**, 5652-5663 (2017).
43. Jimmerson, L. C., L. R. Bushman, M. L. Ray, P. L. Anderson, and J. J. Kiser. A LC-MS/MS Method for Quantifying Adenosine, Guanosine and Inosine Nucleotides in Human Cells. *Pharm Res* **34**, 73-83 (2017).
44. Demaria, S., E. B. Golden, and S. C. Formenti. Role of Local Radiation Therapy in Cancer Immunotherapy. *JAMA Oncol* **1**, 1325-1332 (2015).
45. Vaupel, P., and G. Multhoff. Adenosine can thwart antitumor immune responses elicited by radiotherapy : Therapeutic strategies alleviating protumor ADO activities. *Strahlenther Onkol* **192**, 279-287 (2016).
46. de Leve, S., F. Wirsdörfer, and V. Jendrossek. Targeting the Immunomodulatory CD73/Adenosine System to Improve the Therapeutic Gain of Radiotherapy. *Front Immunol* **10**, 698 (2019).
47. Synnestvedt, K., G. T. Furuta, K. M. Comerford, N. Louis, J. Karhausen, H. K. Eltzschig, K. R. Hansen, L. F. Thompson, and S. P. Colgan. Ecto-5'-nucleotidase (CD73) regulation by hypoxia-inducible factor-1 mediates permeability changes in intestinal epithelia. *J Clin Invest* **110**, 993-1002 (2002).
48. Gao, Z. W., K. Dong, and H. Z. Zhang. The roles of CD73 in cancer. *Biomed Res Int* **2014**, 460654 (2014).
49. Fukuda, K., C. Sakakura, K. Miyagawa, Y. Kuriu, S. Kin, Y. Nakase, A. Hagiwara, S. Mitsufuji, Y. Okazaki, Y. Hayashizaki, and H. Yamagishi. Differential gene expression profiles of radioresistant oesophageal cancer

- cell lines established by continuous fractionated irradiation. *Br J Cancer* **91**, 1543-1550 (2004).
50. Dietrich, F., F. Figueiró, E. C. Filippi-Chiela, A. R. Cappellari, L. Rockenbach, A. Tremblay, P. B. de Paula, R. Roesler, A. B. Filho, J. Sévigny, F. B. Morrone, and A. M. O. Battastini. Ecto-5'-nucleotidase/CD73 contributes to the radiosensitivity of T24 human bladder cancer cell line. *J Cancer Res Clin Oncol* **144**, 469-482 (2018).
51. Mandapathil, M., M. J. Szczepanski, M. Szajnik, J. Ren, D. E. Lenzner, E. K. Jackson, E. Gorelik, S. Lang, J. T. Johnson, and T. L. Whiteside. Increased ectonucleotidase expression and activity in regulatory T cells of patients with head and neck cancer. *Clin Cancer Res* **15**, 6348-6357 (2009).
52. Vaupel, P., and A. Mayer. Hypoxia-Driven Adenosine Accumulation: A Crucial Microenvironmental Factor Promoting Tumor Progression. *Adv Exp Med Biol* **876**, 177-183 (2016).
53. Goodwin, K. J., E. Gangl, U. Sarkar, P. Pop-Damkov, N. Jones, A. Borodovsky, R. Woessner, and A. J. Fretland. Development of a quantification method for adenosine in tumors by LC-MS/MS with dansyl chloride derivatization. *Anal Biochem* **568**, 78-88 (2019).
54. Sharma, K., R. Singh, S. Giri, S. Rajagopal, and R. Mullangi. Highly sensitive method for the determination of adenosine by LC-MS/MS-ESI: method validation and scope of application to a pharmacokinetic/pharmacodynamic study. *Biomed Chromatogr* **26**, 81-88 (2012).

55. Sadej, R., and A. C. Skladanowski. Dual, enzymatic and non-enzymatic, function of ecto-5'-nucleotidase (eN, CD73) in migration and invasion of A375 melanoma cells. *Acta Biochim Pol* **59**, 647-652 (2012).
56. Gao, Z. W., H. P. Wang, F. Lin, X. Wang, M. Long, H. Z. Zhang, and K. Dong. CD73 promotes proliferation and migration of human cervical cancer cells independent of its enzyme activity. *BMC Cancer* **17**, 135 (2017).
57. Allard, B., M. Turcotte, K. Spring, S. Pommey, I. Royal, and J. Stagg. Anti-CD73 therapy impairs tumor angiogenesis. *Int J Cancer* **134**, 1466-1473 (2014).
58. Ghalamfarsa, G., A. Rastegari, F. Atyabi, H. Hassannia, M. Hojjat-Farsangi, A. Ghanbari, E. Anvari, J. Mohammadi, G. Azizi, A. Masjedi, M. Yousefi, B. Yousefi, J. Hadjati, and F. Jadidi-Niaragh. Anti-angiogenic effects of CD73-specific siRNA-loaded nanoparticles in breast cancer-bearing mice. *J Cell Physiol* **233**, 7165-7177 (2018).
59. Allard, D., P. Chrobak, B. Allard, N. Messaoudi, and J. Stagg. Targeting the CD73-adenosine axis in immuno-oncology. *Immunol Lett* **205**, 31-39 (2019).
60. Hay, C. M., E. Sult, Q. Huang, K. Mulgrew, S. R. Fuhrmann, K. A. McGlinchey, S. A. Hammond, R. Rothstein, J. Rios-Doria, E. Poon, N. Holoweckyj, N. M. Durham, C. C. Leow, G. Diedrich, M. Damschroder, R. Herbst, R. E. Hollingsworth, and K. F. Sachsenmeier. Targeting CD73 in the tumor microenvironment with MEDI9447. *Oncoimmunology* **5**, e1208875 (2016).