

氏名	津久井 秀 則
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	甲第 595 号
学位授与年月日	令和 2 年 3 月 16 日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第 4 条第 2 項該当
学位論文名	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
論文審査委員	(委員長) 教授 杉本 英治 (委員) 教授 古川 雄祐 准教授 鈴木 浩一

論文内容の要旨

1 研究目的

細胞外アデノシンは免疫細胞膜上の特異的受容体を介して強い免疫抑制能を有し、膜抗原 CD73 はアデノシン産生系における律速酵素である。放射線照射 (RT) により腫瘍細胞が障害されると、細胞外に多量のアデノシンが放出されることで、局所の免疫寛容が誘導されている可能性が推察される。今回、RT に抗 CD73 抗体を上乗せすることにより、効果的な免疫応答を誘導し、照射腫瘍の縮小率を高めるとともに、遠達効果 (Abscopal effect) を介して遠隔病変にも抗腫瘍効果を発揮するのではないか? という作業仮説を設定し、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。また、ヒト術前 CRT (chemoradiotherapy) 症例の CD73 発現と予後を検討し、実臨床における CD73/アデノシン経路の意義についても検討を加えた。

2 研究方法

大腸癌細胞 Colon26 の亜株で自然肺転移をきたす細胞株 LuM-1 (小栗博士 愛知県立がんセンターより提供) を使用した。LuM-1 皮下腫瘍を形成した BALB/c 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。

1. LuM-1 における CD73 の発現と腫瘍内アデノシン濃度の RT による変化

培養 LuM-1 に RT を行い CD73 抗体 (TY/11.8) で染色、その発現の変化を FACS にて定量した。また、LuM-1 皮下腫瘍に対して RT を行い同様の検討を行うとともに、アデノシンの濃度変化を LC/MS 法を用いて測定した。

2. 自然肺転移放射線照射モデルでの検討

LuM-1 を皮下接種したマウスに対して、接種後 12、14、16 日目に 4Gy×3 回、腫瘍局所に限局した RT を行った。免疫療法として接種後 12、14、16、19、22、25 日目に抗 CD73 抗体 (TY/23: RT+Anti-CD73 群) および Rat IgG2a isotype control (clone 2A3; RT+Isotype control 群) 200µg の腹腔内投与を付加し、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、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、免疫細胞のフェノタイプを FACS にて解析した。

3. ヒト直腸癌臨床検体における CD73 発現と生存解析

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 を施行

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を行った。腫瘍細胞または間質の染色強度を高発現及び低発現に分類し、CD73 発現と無再発生存期間 (RFS)、全生存期間 (OS)との関連性を解析した。

3 研究成果

1. LuM-1 は CD73 を発現しており、その発現強度は RT によって増強し ($p = 0.016$)、同様の傾向が *in vivo* でも認められた ($p < 0.0001$)。また、RT 後 24 時間時の LuM1 皮下腫瘍内アデノシン濃度は有意に上昇し($p = 0.0069$)、48 時間後には代謝産物イノシンが有意に上昇していた ($p = 0.048$)。
2. RT+Anti-CD73 群では、RT+Isotype control 群と比べ、接種後 19 日目より腫瘍容積の増大抑制を認め、28 日目の重量は有意に低下していた ($p < 0.05$)。また、肉眼的転移結節個数も有意に減少しており ($p < 0.05$)、半数 (4/8) で肺転移は認めなかった。脾臓内 CD4 陽性、CD8a 陽性細胞における IFN γ 陽性細胞の割合は、RT+Anti-CD73 群で有意に高かった (CD4; Mean = $11 \pm 1.2\%$ vs $4.7 \pm 1.6\%$, $p = 0.041$; CD8a; $16 \pm 1.7\%$ vs $6.9 \pm 2.3\%$, $p = 0.041$)。腫瘍浸潤 T 細胞においても同様の傾向が認められた。
3. 術前 CRT を受けた直腸癌組織では腫瘍細胞と間質に CD73 の発現を認めたが、その染色形態は症例間で著しく異なっていた。CD73 の発現強度で RFS を比較すると、間質高発現群は低発現群と比較して有意に再発しやすく ($p = 0.049$)、特に、腫瘍細胞と間質で共に高発現していた群はその他と比較して非常に再発率が高く ($p = 0.0059$)、OS も悪かった (生存期間中央値= 59.9 か月, $p = 0.0077$)。

4 考察

LuM-1 は CD73 を強く発現しており、RT にて CD73 の発現強度が増強することが、*in vitro* と *in vivo* で確認された。実際に、LC/MS 法を使用してアデノシン濃度を測定したところ、照射後の LuM-1 腫瘍組織では照射後にアデノシンとアデノシンの安定代謝産物であるイノシンのレベルが有意に上昇していた。この結果から、放射線照射された腫瘍の微小環境内のアデノシンレベルは、少なくとも数時間、かなり高値に維持されており、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た。

アデノシンは強力な免疫抑制効果を有しており、CD73/アデノシン経路阻害薬は新たな免疫治療薬として注目を集めているが、担癌個体におけるアデノシンレベルの変化が RT の治療効果に及ぼす影響に関してはこれまでに検討されていなかった。今回、LuM-1 を用いたマウス自然肺転移モデルにおいて、RT と抗 CD73 抗体を併用した場合、isotype control と比較して腫瘍の成長が有意に抑制されていた。また、鉛遮蔽により RT の直接影響がない肺の転移個数も有意に減少していた。これは、局所照射に CD73 抗体を付加することで、全身性免疫反応を引き起こされた結果と考えられる。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- γ を産生する能力が有意に増加しており、腫瘍組織細胞においても同様の傾向が認められた。過去の RT と抗 CTLA-4 抗体を併用した免疫放射線療法の実験でも、Abscopal effect が誘発された免疫療法併用群で脾臓細胞 CD8a 陽性細胞における IFN- γ 陽性細胞の割合が有意に増加する事実が報告されており、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。

術前 CRT 症例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、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。マウス実験の結果と合わせると、RT により腫瘍組織内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 を応用する試みがなされてきている。RT に適切な免疫制御を付加した免疫放射線療法は、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。本研究結果は、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ている。

5 結論

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。

論文審査の結果の要旨

論文は、放射線照射(RT) された腫瘍から放出されたアデノシンにより抗腫瘍作用が低下する状況を CD73 の機能的阻害により回復できる可能性を示した。マウスの In vitro/In vivo の実験では、RT により腫瘍細胞の CD73 発現が増強すること、腫瘍細胞 (LuM-1) の CD73 はアデノシン産生能を有し、RT により LuM-1 の酵素活性が増加すること、RT 単独では転移抑制効果がなく、また CD73 抗体単独でも抗腫瘍効果がないこと、RT に CD73 抗体を組み合わせることにより非照射部の転移抑制効果があること、RT と CD73 抗体の併用により癌に対する T 細胞応答が活性化されること、以上を示した。ヒトの直腸癌症例では、腫瘍細胞と腫瘍間質で CD73 が高発現した群では予後が悪いこと、癌の病期と CD73 発現が生存期間に関する予後因子となることを示した。

遠達効果 Abscopal effect 増幅に関してはこれまでに PD1 経路、CTLA4 経路、樹状細胞経路での先行研究があるが、A2aR 経路での報告はない。本研究は A2aR 経路を阻害している点が独創的である。また、CD73 抗体が現在の局所進行大腸癌の標準的治療法である術前化学放射線療法に代わる新規治療法になりうることも示した。

一次審査において指摘された抗 CD73 抗体併用による肺転移抑制、A2aR 経路阻害剤による肺転移抑制と転移巣でのアデノシンの低下について、実験を繰り返して証明された。転移巣でのアデノシン低下を直接証明はできなかったものの、組織のリン酸濃度測定、腫瘍組織内でのアデノシン代謝産物であるイノシンの測定を行い、RT により腫瘍内のアデノシンが上昇していることを間接的にはあるが証明した。また、抗 CD73 抗体併用による肺転移抑制実験では、RT の照射法を改善調整して、転移抑制効果を明確に証明した。

本研究は放射線照射とアデノシン阻害により、腫瘍細胞から放出されたアデノシンによる免疫寛容を阻害できることを周到な実験とヒトにおける観察で明らかにしている。実験はよくデザインされ、論文は独自性が高く、合格と判定された。

最終試験の結果の要旨

最終試験ではまず癌治療における免疫応答の重要性から研究に至った動機についての説明のあと、癌（マウス大腸癌）で、放射線照射(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、免疫応答を誘導して、照射部の腫瘍縮小と非照射部の遠達効果 Abscopal effect を誘導できるという作業仮説を提示し、それに元づくマウスの *in vivo* ならびに *in vitro* の複数の実験、ヒトの大腸癌における CD73 発現と予後についての解析結果を示した。

マウスの *In vitro/In vivo* の実験では、RT により腫瘍細胞の CD73 発現が増強すること、腫瘍細胞 (LuM-1) の CD73 はアデノシン産生能を有し、RT により LuM-1 の酵素活性が増加すること、RT 単独では転移抑制効果がなく、また CD73 抗体単独でも抗腫瘍効果がないこと、RT に CD73 抗体を組み合わせることにより非照射部の転移抑制効果があること、RT に CD73 抗体併用により癌に対する T 細胞応答が活性化されること、以上を証明した。また、転移巣でのアデノシン低下を直接証明はできなかったものの、組織のリン酸濃度測定、腫瘍組織内でのアデノシン代謝産物 イノシンの測定を行い、RT により腫瘍内のアデノシンが上昇していることを証明した。

抗 CD73 抗体併用による肺転移抑制実験では、RT の照射法を改善調整して、転移抑制効果を明確に証明した。ヒトの直腸癌症例では、腫瘍と間質で CD73 が高発現した群では予後が悪いこと、また、癌の病期と CD73 発現が生存期間に関する予後因子となることを示した。

Abscopal effect 増幅に関しては PD1 経路、CTLA4 経路、樹状細胞経路での先行研究があるが、A2aR 経路での報告がない。本研究は A2aR 経路を阻害している点が独創的である。また、CD73 抗体が現在の局所進行大腸癌の標準的治療法である術前化学放射線療法に代わる新規治療法になりうることを示した。

抗 CD73 抗体併用療法が大腸癌以外の癌腫にも使える可能性について、T 細胞を抑制する経路が複数あることからヒトでも単一の経路の阻害により同様の効果が得られるかどうか、について質疑された。また、使用したマウス大腸癌細胞株のマイクロサテライト不安定性 (Microsatellite instability: MSI) について言及していない点が指摘された。この点については、マウス大腸癌細胞株 Colon26 では RT による CD73 の発現がないことを追加で示した。さらに、今回の腫瘍で PD1 および PDL1 についての検討の有無について、氏は検討してあると回答した。

臨床例の解析では、間質の CD73 の意義はなにかとの質問に対して、CD73 は fibroblast に発現し腫瘍制御に重要ではないかという見解を示した。氏はそれぞれの質問に対して、実験の限界等をよく理解して回答した。また、どの質問に対しても真摯に回答し、腫瘍免疫学全般において、十分な知識があると考えられた。

提出論文と最終試験の結果、全員一致で合格と判定された。