

2025 年度臨床研究推進研究費報告書

提出年月日: 2025 年 4 月 22 日

| | | | | |
|----------------------|--|---------|--------|------------------------------|
| 代表者 | 氏名 | 前川直也 | 所属 | 感染症学教室 |
| | 内線 | 5274 | e-mail | maekawa@vetmed.hokudai.ac.jp |
| 研究課題 | イヌ腫瘍における放射線による免疫原性細胞死の検出 | | | |
| 研究チーム参加者 | 氏名 | 所属 | | 役割 |
| | 前川直也 | 感染症学教室 | | 実験全般、データ解析 |
| | 房 知輝 | 放射線学教室 | | 実験全般、データ解析 |
| | 大脇 稜 | 獣医外科学教室 | | 実験全般、採材、データ解析 |
| 研究期間 | 2025 年 6 月 ~ 2026 年 3 月 | | | |
| 研究目的と成果の概要 (400 字以内) | 放射線照射を受けた腫瘍細胞は免疫原性細胞死 (immunogenic cell death, ICD) を起こすとされ、抗 PD-L1 治療などの免疫療法と組み合わせることで相乗効果が期待される。しかしイヌにおいては ICD の検出法は確立されておらず、実際の放射線治療例でこのような現象が起きているかは未だ明らかではない。そこで本研究では、ICD に付随して発現動態が変動するマーカーの定量法を確立することを目的とした。イヌ腫瘍細胞株において、細胞表面上の CALR の発現量をフローサイトメトリーにより、また培養上清中の HMGB1 濃度を ELISA により定量したところ、放射線照射によってこれらの発現上昇が認められた。さらに放射線治療を受けた移行上皮癌のイヌの尿では、正常犬と比較していくつかのサイトカイン濃度が高値であった。これらの測定系はイヌの ICD およびその後の免疫応答の評価系として利用可能であると考えられた。 | | | |

研究方法、結果、考察、成果の公表（上記書式、図表を含めて 3 ページ以内に纏めて下さい）

【方法】

1. イヌ腫瘍細胞株を用いた *in vitro* での ICD マーカーの検出

イヌ骨肉腫 (HMPOS)、悪性黒色腫 (CMeC)、移行上皮癌 (MegTCC) の腫瘍細胞株に対して、それぞれの放射線感受性に合わせて 5–20 Gy の X 線照射を行い、24 時間培養を継続した。回収した細胞に表出する calreticulin (CALR) をイヌ CALR への交差反応性が報告されているウサギポリクローナル抗体を用いたフローサイトメトリー法により検出した。死細胞を解析から除外するため、7-AAD による死細胞染色を併用した。培養上清も同時に回収し、ヒトサンプル用キットを使用して ELISA 法により High Mobility Group Box 1 (HMGB1) の検出を行った。なお、ヒト HMGB1 とイヌ HMGB1 のアミノ酸配列は 100%一致することが報告されている。

2. 放射線治療を行った腫瘍症例におけるサイトカインおよび ICD マーカーの検出

動物医療センターにおいて放射線治療を行った移行上皮癌のイヌ 1 頭から、照射後の尿検体を採材し、マルチプレックスイムノアッセイによって interferon-gamma (IFN- γ)、tumor necrosis factor-alpha (TNF- α)、interleukin (IL)-2, 6, 8, 10, 12 などの 11 種のサイトカイン/ケモカイン/成長因子の定量を行った。対照として、非がん症例 1 頭の尿を用いた。並行して、悪性黒色腫のイヌ 1 頭から、放射線治療前後の腫瘍組織から針生検 (FNA) による採材を行って RNA 抽出を行い、網羅的 mRNA 発現解析 (RNA-seq) に利用可能か検討した。

【結果】

フローサイトメトリー解析において、前方散乱光および側方散乱光により腫瘍細胞株集団をゲーティングして、死細胞染色に染まらない生細胞集団を CALR 発現の解析対象とした。陰性対照抗体 (非免疫ウサギ血清) と比較して、抗 CALR 抗体 (免疫ウサギ抗血清) による染色では蛍光強度の上昇が認められ、CALR を特異的に検出していることが示された。HMPOS および CMeC では、照射線量に応じて CALR の発現上昇が認められた一方で、MegTCC では高照射線量 (20 Gy) でもほとんど蛍光強度の上昇が認められなかった (図 1)。

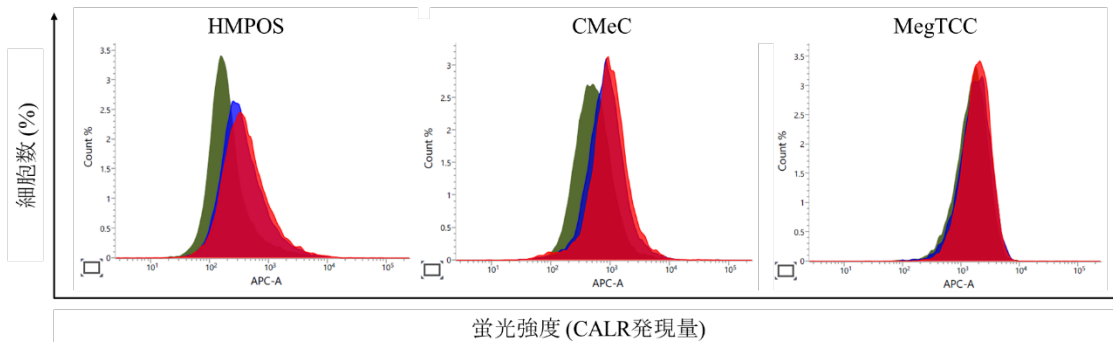


図 1. フローサイトメトリーによる細胞表面上の CALR 発現の検出

各細胞株に対し、線量を変えて放射線照射を行い (HMPOS: 0, 5, 10 Gy; CMeC: 0, 10, 20 Gy; MegTCC: 0, 10, 20 Gy)、生細胞集団における CALR 発現を蛍光強度により比較した。緑のヒストグラムは対照処置 (0 Gy)、青のヒストグラムは低線量 (5 または 10 Gy)、赤のヒストグラムは高線量 (10 または 20 Gy) の結果を示す。

次に、培養上清中の HMGB1 濃度の定量を行った。陰性対照 (生育培地のみ) および HMPOS、CMeC では、培養上清中の HMGB1 濃度は放射線照射の有無にかかわらず定量下限未満であった。MegTCC では、非照射条件では定量下限未満であったのに対して、20 Gy 照射では定量可能なレベルの HMGB1 が培養上清中に存在した (図 2)。

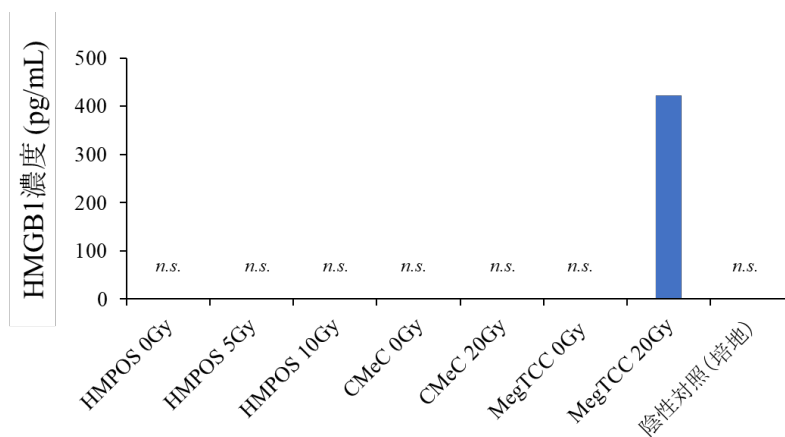


図 2. ELISA による培養上清中の HMGB1 の検出

各細胞株に対し、放射線照射を行い (HMPOS: 0, 5, 10 Gy; CMeC: 0, 20 Gy; MegTCC: 0, 20 Gy)、培養上清中の HMGB1 濃度を ELISA により測定した。陰性対照には生育培地 (10%ウシ胎仔血清添加 RPMI1640) を使用した。

動物医療センターにて採材した尿検体を用いて、尿中のサイトカイン濃度の定量を試みたところ、いくつかのサイトカイン (IFN- γ , TNF- α , IL-10 等) では定量下限未満となり評価ができなかった。一方で、IL-8、MCP-1、SCF、VEGF-A では定量範囲内において測定が可能であった。放射線治療を受けた移行上皮癌のイヌの尿では、非がん症例の尿と比較して IL-8 濃度や VEGF-A 濃度が高い一方で、MCP-1 および SCF 濃度は低かった (図 3)。

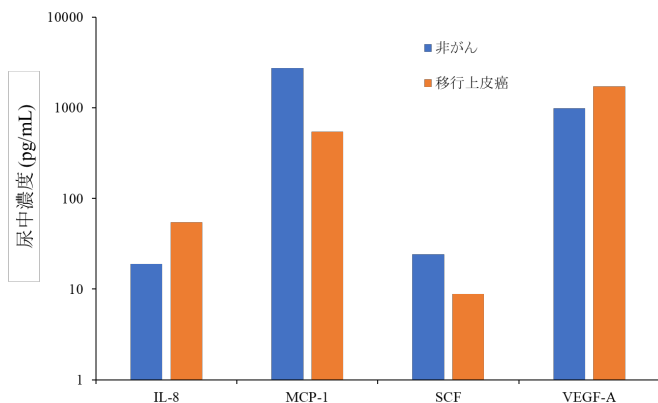


図 3. マルチプレックスシムノアッセイによる尿中サイトカインの検出

放射線治療を行った移行上皮癌症例 ($n = 1$) および非がん症例 ($n = 1$) の尿検体について各種サイトカイン濃度を定量した。

放射線照射の前後でFNAにより採材した細胞サンプルについて、RNA-seq解析に供する目的でRNA抽出を行った。FNA サンプルでは得られる細胞数が少なかったことから、得られた RNA 量は受託解析に一般的に必要なとされる量 (1 μ g) に満たなかった。

【考察】

本研究では、ICDに付随して発現動態が変動すると予想された CALR、HMGB1、および各種サイトカインの検出を行った。細胞株を用いた検討では、CALRの細胞表面での発現上昇ならびに HMGB1の培養上清への放出が認められ、放射線照射により ICD が誘導されていることが強く示唆された。CALRは小胞体に局在する分子シャペロンタンパク質であり、通常細胞膜上への表出はないが、ICDにおいて特徴的に表出すると考えられている。マクロファージ上の CD91 と結合することで貪食を促進する eat-me シグナルとして働き、その後の抗原提示へとつながっていくと期待される。HMGB1はクロマチン構造の安定化や転写反応を調節する核内タンパク質であり、細胞死に伴って放出される。細胞外に放出された HMGB1は細胞死を知らせるアラミンとして、toll-like receptor 4などのパターン認識受容体を介して自然免疫応答を活性化する。ICDでは、細胞死に伴う受動的な放出に加えて、ストレスを受けた細胞からの分泌によっても放出されると考えられており、ICDのマーカーの一つとして利用されている。本研究では、HMPOS および CMeC では CALRの表出が認められた一方で、HMGB1の放出は定量下限未満であった。対照的に、MegTCCでは、CALRの表出はほとんど認められなかった一方で顕著な HMGB1の放出が認められた。これらの現象は ICDの異なるプロセスを反映していることから、各細胞株における放射線感受性や各プロセスの起きやすさなどによりそれぞれ検出に適した照射条件やタイミングがあることが示唆された。

臨床検体を用いた解析では、尿中のいくつかのサイトカインが炎症状態を示すバイオマーカーとして使用可能であることが示唆された一方で、個体間でのバラつきや疾病における診断的意義などについては今後頭数を増やして検討していく必要がある。さらに同一個体内でも採材タイミングや尿の濃縮状態などの要素が定量結果に影響を与える可能性があり、慎重な検討が求められる。また FNAによる採材では網羅的遺伝子発現解析に必要な RNA 量に満たないことが明らかとなったため、今後は組織生検を考慮するほか、微量 RNA からの増幅後に解析に供するなど実験手法の工夫が必要になると考えられた。

以上より、本研究ではイヌの ICD 検出に必要な各因子の定量系を検討し、その有用性を一部明らかとした。今後はそれぞれの手法の最適化を行って放射線治療症例における ICD 誘導の有無やその程度を明らかとしていきたい。ICDを反映するバイオマーカーが同定されれば、ICDをより強く誘導する照射プロトコルの検討などが可能となり、より良い獣医療の提供に繋がっていくと期待される。

【成果の公表（代表的なもの）】

- ・論文発表
なし
- ・学会発表
なし