

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10548

研究課題名(和文) 低侵襲な温熱療法の抗腫瘍効果増強の工夫

研究課題名(英文) Augmentation of anti-tumor effect by less invasive hyperthermia

研究代表者

武田 力 (Takeda, Tsutomu)

大阪大学・医学系研究科・招へい教授

研究者番号：80236471

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)：我々の施設では一度は免疫チェックポイント阻害薬不応状態になった膵癌患者でも温熱療法との併用で再び著効した例を経験した。本研究データから、温熱療法により浸潤誘導されるCD8+T細胞がIFN- γ を介してPD-L1の発現増強を誘導し腫瘍細胞の温熱抵抗性に関与する可能性が考えられ、免疫チェックポイント抗体は抑制された細胞性免疫を活性化することで、両者の併用療法が有効となるのではないかと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

温熱療法は主として症状緩和に利用され、単独では癌の治療効果は乏しいが、抗癌剤や放射線の増強効果が知られている。近年、免疫チェックポイント阻害剤が新たな癌治療として脚光を浴びているが、本研究では温熱療法と免疫治療との併用効果をもたらすメカニズムが示唆された。動物実験の数を増やした検証が必要であるが基幹となるセオリーを示せたことは大きな意義があり、今後の温熱免疫療法の基盤となる研究であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Under the hyperthermia therapy, the immune checkpoint system is largely unknown. Immunohistochemical studies using clinical samples of colon and breast cancer indicated that hyperthermia treatment induced PD-L1 expression and MHC class I, and that the number of CD8+ T cell increased around the tumor cells. Because CD8+ T cell can release IFN- γ , we examined by western blot analysis and found that exposure of IFN- γ on the MC38 mouse colon cancer cells led to increase in p-STAT1 and IRF1 expression as well as PD-L1 induction. Hyperthermal therapy using MC38 tumor-bearing mouse model led to necrosis in the tumors, facilitated CD8+ T cell invasion, but simultaneously enhanced expression of PD-L1 and its related molecules. Finally, we could observe that the combination therapy of hyperthermia and the anti PD-L1 antibody led to the more effective effect. In conclusion, combination therapy of hyperthermia and the immune checkpoint inhibitor may be an efficient anti-tumor treatment.

研究分野：化学療法、温熱療法、癌治療

キーワード：温熱療法 免疫チェックポイント阻害剤 PD-L1

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

温熱療法 (ハイパーサーミア)は体内の癌を 40 度から 42 度に加温する治療法であり、抗癌剤や放射線の効果増強作用が知られている。高リスク軟部組織肉腫に対する術前化学温熱療法 (Phase3)や胚細胞腫瘍のサルベージ治療 (phase2)で良好な治療成績が報告され、膵癌術後化学療法に対する温熱療法の上乗せ効果を検討する Phase3 試験 (HEAT)が進行中である。近年、保険適応となり話題になった免疫チェックポイント阻害薬 (nivolumab)の治療標的である PD-L1 に対して温熱療法がどのような影響を及ぼすかについては未だ定まった見解は得られていない。我々の施設でも一度は免疫チェックポイント阻害薬不応状態になった膵癌患者でも温熱療法との併用で再び著効した例を経験したことから、奏効率が 20-30%と決して高くはない免疫チェックポイント阻害薬の効果を温熱療法が高めるのではないかという仮説を立てた。一方、癌局所の温度を効率よく上昇させる磁性ナノ粒子と温熱との併用も魅力的な治療法である。磁性ナノ粒子を腫瘍に効率よく集積させることができれば、正常組織の温度上昇のために治療が難しかった深部癌への温熱療法の応用も可能となるかもしれない。

2. 研究の目的

本研究では細胞性免疫を促進するとの報告もある温熱療法が CD8⁺T 細胞の誘導や免疫チェックポイント経路に対してどのように影響を与えるのかを明らかとすることを主たる目的とした。

3. 研究の方法

(1) 臨床サンプルの解析

CD8⁺T 細胞は樹状細胞の MHC Class I とそれが提示する癌抗原を T 細胞受容体 (TCR) で認識され活性化される。この T 細胞が癌組織へ遊走されると癌細胞の提示する MHC Class I を認識して結合するが、癌細胞と CD8⁺T 細胞との間に免疫チェックポイント分子である PD-1/PD-L1 経路が働くと、CD8⁺T 細胞の免疫応答が抑制される。癌免疫療法は、この状態のがん患者に免疫チェックポイント阻害剤を投与することでブレーキのかかっていた CD8⁺T 細胞の免疫機構が活性化され、癌細胞を攻撃するようになるという原理に基づき実施されている。以上の免疫制御機構に関する知見に基づき、温熱と免疫チェックポイント阻害剤による治療を受けた大腸癌、乳癌、膀胱癌患者の治療前後の生検サンプルから MHC Class I, PD-L1, CD8⁺T 細胞の発現を検討した。免疫染色には、マウス PD-L1 ポリクローナル抗体 (Proteintech, Rosemont, IL, USA)、抗ヒト HLA Class I モノクローナル抗体 (clone: EMR8-5, Abcam, Cambridge, United Kingdom)、抗ヒト CD8 ポリクローナル抗体 (Abcam)を用いた。

(2) In vitro 実験

がん組織に浸潤し、MHC Class I と TCR を介してがん細胞に結合した CD8⁺T 細胞は、がん細胞に対して IFN- γ を放出する。IFN- γ を受容したがん細胞内では、JAK/STAT 経路により核内にリン酸化 STAT1 (p-STAT1) が移行する。p-STAT1 は IRF1 (Interferon regulatory factor 1) プロモーターに結合し IRF1 を誘導する。この IRF1 が核内でさらに PD-L1 プロモーターに結合することで PD-L1 が誘導され、細胞膜に発現することが報告されている。PD-L1 が誘導されること分かっている MC38 マウス大腸癌細胞株を用いて、以下の実験を行った。

温熱刺激: マウス大腸癌 MC-38 細胞株において温熱刺激による免疫チェックポイント分子への影響を明らかとするため、43°C、90 分の温熱処理を行なった。その後 37°C に戻し、24 時間、48 時間、72 時間培養したのちサンプル回収を行った。

IFN- γ 刺激: Recombinant Mouse IFN- γ (BioLegend, San Diego, CA, USA) を 10 ng/mL とするようにならせたメEDIUMに変え、24 時間、48 時間、72 時間培養したのちサンプル回収を行った。

回収したサンプルを用いて、western blot 法にて、リン酸化 Stat3, IFR, PD-L1 の発現を検討した。抗体は、抗マウス p-STAT1 モノクローナル抗体 (clone: D3B7, Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA)、抗マウス IRF-1 モノクローナル抗体 (clone: D5E4, Cell Signaling Technology)、抗マウス MHC Class I モノクローナル抗体 (clone: ER-HR52, Novus Biologicals, Littleton, CO, USA) を使用した。

(3) In vivo 実験

(I) 温熱の抗腫瘍効果と免疫チェックポイント関連蛋白の発現: 7 週齢・メスの C57BL/6J マウスをインフルランで吸入麻酔し抑制状態とした後、除毛した右下肢に調整した細胞懸濁液を 50 μ L、27G 針を使用して皮下注射した。細胞懸濁液には PBS と Matrigel 基底膜マトリックス (Corning, New York, NY, USA) を等量ずつ用いた。移植後 10 から 13 日間経過を観察し、腫瘍径が 8-10 mm に達したのちに恒温槽を使用して温めた 42°C の温水に、腫瘍全体が浸るよう右下肢のみを浸け、20 分間の温熱を実施した。温熱後は温水から離し、通常通り飼育した。温熱刺激を 3 日連続で加え、4 日目に腫瘍サンプルの回収を行った。腫瘍は半割してホルマリンに浸し、4°C で一晚浸透させ固定後、パラフィンブロックを作製した。全ての動物実験は大阪大学規定のガイドラインやプロトコールに則って行った。温熱後のサンプルに関して、HE 染色で壊死の程度を評価し、各蛋白発現 (リン酸化 Stat3, IFR, PD-L1) と CD8⁺T 細胞浸潤の程度を免疫染色で評価した。

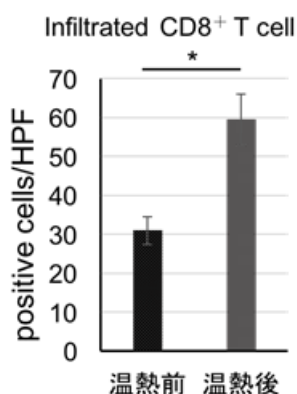
(II) 温熱と免疫チェックポイント阻害剤の併用効果: 温熱実施 2 日前と当日、2 日後に In vivo 抗マウス PD-L1 モノクローナル抗体 (clone: 10F.9G2, Bio X Cell, West Lebanon, NH, USA) を 1 回あたり 150 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ となるように 30G 針を使用して腹腔投与した。温熱終了 72 時間後に腫瘍サンプルを回収し腫瘍壊死率(壊死範囲面積/腫瘍面積 $\times 100$)% を算出した。

4. 研究成果

(1-I) 臨床サンプルにおける免疫チェックポイント経路関連分子の検討

臨床例 2 例において、PD-L1 及び MHC Class I の免疫組織化学染色を行ったところ、2 例とも治療前のがん細胞での発現が確認できた。また、どちらの分子も細胞膜と細胞質に発現していることがわかった。大腸がん症例は温熱療法後に PD-L1 及び MHC Class I 共にがん細胞での発現が増強し、乳がん症例は治療前後での発現量に明らかな差は認められなかったが少なくとも維持はされていた。

(1-II) 臨床サンプルにおける免疫細胞浸潤の検討 臨床例 2 例において、細胞性免疫因子である CD8⁺T 細胞について免疫組織化学染色を行った。大腸がん生検サンプルにおいて、治療前にも癌組織内に CD8⁺T 細胞が浸潤しているが、温熱により免疫細胞浸潤が有意に増加した (図1)。乳癌サンプルにおいて、治療前の癌組織内 CD8⁺T 細胞浸潤は僅かであったが、温熱後の組織では、癌部周囲に CD8⁺T 細胞が集まっていた。中には癌の辺縁を突き破り、内部に浸潤し始めている像も確認できた。



(図1)大腸癌生検サンプルの CD8⁺T 細胞浸潤。*: $P < 0.05$ 。

(2) In vitro 実験

温熱刺激のみでは各分子の発現増加は認められなかったが、IFN- γ 刺激によって、p-STAT1 及び STAT1 は刺激後 24 時間をピークに、48 時間、72 時間と IFN- γ 刺激のない状態と比べて増加した。IRF1 は刺激後 24 時間をピークに発現が増加した。PD-L1 は、これら分子発現の増加にやや遅れて、刺激後 48、72 時間での発現が増加した (図 2)。

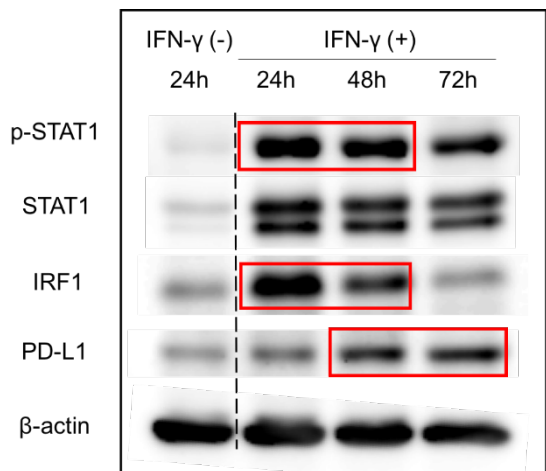


図 2. IFN- γ 刺激が PD-L1 関連因子に与える影響

Cell line: MC-38

(3) In vivo 実験

(3-I) 温熱の抗腫瘍効果と免疫チェックポイント関連蛋白の発現検討

3回の温熱刺激により腫瘍内部に壊死部分と腫瘍辺縁部に癌細胞の生存部分を認めた。温熱群では生存癌細胞で p-STAT1、IRF1、PD-L1 の強い発現誘導がみられた。MHC Class I の発現も軽度ながら生存部で増強した。温熱群では CD8⁺T 細胞の腫瘍内浸潤が亢進していることがわかった。また、CD8⁺T 細胞の局在は癌の生存部分に沿って集積していた。

(3-II) 温熱と免疫チェックポイント抗体医薬の併用治療による抗腫瘍効果検討

図3A のように温熱単独治療マウスと、温熱療法と免疫チェックポイント抗体との併用治療マウスにおいて腫瘍壊死の程度を評価したところ、単独治療マウスは 35%、併用治療マウスでは 65%であった (図3B)。更に興味深いことに CD8 陽性 T 細胞は、併用治療ではまだらに腫瘍生存部に入り組むような浸潤像がみられ、細胞性免疫の活性化が示唆された。

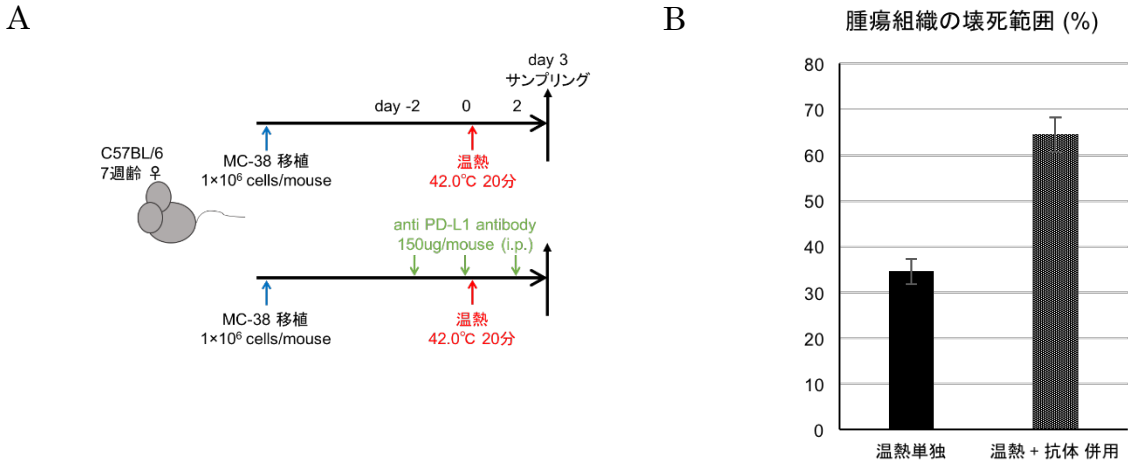


図 3. 温熱と抗体医薬の併用が腫瘍に与える影響

(A) 動物実験のスキーム。上: 温熱単独治療、下: 併用治療。 (B) 腫瘍壊死範囲

以上の結果から、温熱療法により浸潤誘導される CD8⁺T 細胞が IFN- γ を介して PD-L1 の発現増強を誘導し腫瘍細胞の温熱抵抗性に寄与する可能性が考えられ、免疫チェックポイント抗体は抑制された細胞性免疫を活性化することで、両者の併用療法が有効となるのではないかと考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takeda T, Kubota Y, Takeda T, Tanaka C, Morita S, Hattori N, Takeda H, Yokoyama Y, Yamamoto H.	4. 巻 45
2. 論文標題 Effects of Immune Checkpoint Inhibitor Combined with Dendritic Cell Therapy and Hyperthermia	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Gan To Kagaku Ryoho	6. 最初と最後の頁 1472-1474
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takeda T, Kubota Y, Takeda T, Nakano Y, Nogami Y, Honjoh I, Takeda H, Yokoyama Y, Yamamoto H.	4. 巻 45
2. 論文標題 Enhancing Antitumor Effects Using Hyperthermia (Including Immune Checkpoint Inhibitor)	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Gan To Kagaku Ryoho	6. 最初と最後の頁 1479-1481
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kubota Y, Takeda T, Takeda T, Noda T, Hattori N, Nakamura K, Yasuda T, Hasegawa T, Yokoyama Y, Yamamoto H, Takeda H.	4. 巻 46
2. 論文標題 Combination of Immunotherapy and Hyperthermia	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Gan To Kagaku Ryoho	6. 最初と最後の頁 1605-1607
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計18件（うち招待講演 4件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 武田 力
2. 発表標題 当院における11年間の温熱免疫療法（免疫チェックポイント抗体の使用）
3. 学会等名 第19回 関西ハイパーサーミア研究会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 武田 力
2. 発表標題 免疫チェックポイント抗体による治療
3. 学会等名 日本放射線腫瘍学会主催 第46回放射線による制癌シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 武田 力
2. 発表標題 温熱療法の免疫療法増強 免疫チェックポイント抗体の登場
3. 学会等名 第34回 日本ハイパーサーミア学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 武田 力
2. 発表標題 癌の免疫療法、免疫チェックポイント抗体
3. 学会等名 第10回 日本放射線ホルミシス協会講演会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 武田 力、武田 和、田中 千栄里、久保田 結衣、大木 明子、武田 寛子、服部 宣明、横山 雄起、山本 浩文
2. 発表標題 免疫チェックポイント抗体治療の経験と今後の展望
3. 学会等名 第30回 日本バイオセラピー学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 武田 力
2. 発表標題 免疫チェックポイント抗体を用いた最新の樹状細胞療法 Precision medicine に向かって
3. 学会等名 第14回樹状細胞免疫療法懇話会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 武田力、久保田結衣、武田和、安田知世、武田寛子、横山雄起、山本浩文
2. 発表標題 免疫チェックポイント抗体と樹状細胞を併用した複合免疫療法の効果
3. 学会等名 第7回日本免疫・細胞治療学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 久保田結衣、武田力、安田知世、武田和、服部宣明、中村華奈、田中千栄里、武田寛子、長谷川武夫、横山雄起、山本浩文
2. 発表標題 免疫チェックポイント抗体治療における温熱療法の意義
3. 学会等名 第31回 日本バイオセラピー学会学術集会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 武田力、久保田結衣、武田和、安田知世、武田寛子、横山雄起、山本浩文
2. 発表標題 免疫チェックポイント抗体と樹状細胞を併用した複合免疫療法の効果
3. 学会等名 第31回 日本バイオセラピー学会学術集会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 久保田結衣、吉岡靖雄、横山雄起、呉しん、武田力、山本浩文
2. 発表標題 PD-L1 siRNAによる核酸治療の可能性
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 武田力、久保田結衣、武田和、田中千栄里、武田寛子、服部宣明、長谷川武夫、横山雄起、山本浩文
2. 発表標題 免疫チェックポイント抗体と樹状細胞を併用した複合免疫療法における温熱療法の意義
3. 学会等名 第35回 日本ハイパーサーミア研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 久保田結衣、武田力、武田和、服部宣明、中野義人、佐藤光幸、田中千栄里、武田寛子、長谷川武夫、横山雄起、山本浩文
2. 発表標題 免疫チェックポイント抗体治療における温熱療法の意義
3. 学会等名 第20回 関西ハイパーサーミア研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 武田力、武田和、久保田結衣、本庄郁恵、森田祐子、野上祐子、東佐和子、吉岡ありさ、武田寛子、横山雄起、山本浩文
2. 発表標題 免疫チェックポイント抗体と樹状細胞療法との複合免疫療法において温熱療法は役に立つか？
3. 学会等名 第20回 関西ハイパーサーミア研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 久保田結衣, 武田力, 武田和, 野田剛広, 服部宣明, 中村華奈, 安田知世, 長谷川武夫, 横山雄起, 山本浩文, 武田寛子
2. 発表標題 複合免疫療法と温熱療法
3. 学会等名 第40回日本癌免疫外科研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安田知世, 久保田結衣, 横山雄起, 廣瀬遥香, 柴田理志, 長谷川武夫, 武田力, 山本浩文
2. 発表標題 分子温熱療法の可能性
3. 学会等名 第21回関西ハイパーサーミア研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 武田力, 久保田結衣, 武田和, 安田知世, 佐藤光幸, 中野義人, 中村華奈, 武田寛子, 長谷川武夫, 横山雄起, 山本浩文
2. 発表標題 令和新時代の温熱療法の発展は (免疫チェックポイント阻害薬とネオアンチゲンの新時代において)
3. 学会等名 第21回関西ハイパーサーミア研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 武田力, 久保田結衣, 武田和, 安田知世, 窪田瑛佳, 服部宣明, 中村華奈, 武田寛子, 長谷川武夫, 中村祐輔, 横山雄起, 山本浩文
2. 発表標題 ネオアンチゲン・免疫チェックポイント阻害薬そして温熱療法
3. 学会等名 第32回日本バイオセラピー学会学術集会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 久保田結衣, 武田力, 長谷川武夫, 武田寛子, 安田知世, 横山雄起, 山本浩文
2. 発表標題 温熱による細胞性免疫誘導と免疫チェックポイント阻害剤併用の意義
3. 学会等名 第30回日本消化器癌発生学会総会
4. 発表年 2019年

〔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
研究分担者	山本 浩文 (Yamamoto Hirofumi) (30322184)	大阪大学・医学系研究科・教授 (14401)	
研究分担者	長谷川 武夫 (Hasegawa Takeo) (80077784)	大阪大学・医学系研究科・招へい教授 (14401)	