

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 7 月 28 日現在

機関番号：74329

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25350612

研究課題名(和文)ハイパーサーミアによる免疫監視機構の再構築

研究課題名(英文)Re-establishment of immune system in cancer tissue by Hyperthermia

研究代表者

古倉 聡 (Kokura, Satoshi)

公益財団法人ルイ・パストゥール医学研究センター・免疫学研究室・研究員

研究者番号：80347442

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)：ハイパーサーミアは、癌組織の免疫逃避機構をほぼ完全にブロックする(免疫抑制性サイトカインの分泌抑制、癌細胞上の癌抗原の発現増強、Tregの抑制など)。また、がん患者の免疫系に関しては、ハイパーサーミアを受けた患者のリンパ球のTh1サイトカインの産生能が亢進することも見いだした。また、NK細胞活性は、ハイパーサーミアにより増強し、未熟樹状細胞もハイパーサーミアによって成熟し、抗原の取り込みも亢進することも明らかとなった。以上のことから、ハイパーサーミアは、癌の免疫逃避機構を破壊し、正常な免疫機構を再構築するものと考えられる。今後は、ハイパーサーミアと免疫療法の臨床での検討を考えたい。

研究成果の概要(英文)：Hyperthermia activates the host immune system against cancer whereas the overall mechanisms are yet to be fully elucidated. So far, several mechanisms of anti-cancer activity by hyperthermia have been postulated: increasing cytotoxicity of effector cells such as NK cells against cancer; enhancing maturation of immature DCs via the production of the HSP-tumor antigen complex in tumors; decreasing the numbers of Tregs in tumor tissues and blood; increasing the expression levels of adhesion molecules in cancer cells. Better uses of hyperthermia will be achieved by further understanding of its effects on the immune system. Additionally, clinical data on cancer treatments using hyperthermia in combination with immunotherapy need to be accumulated and evaluated for their respective clinical efficacies. These efforts will lead to the development of efficient combinatory therapies using immune therapy.

研究分野：癌免疫、ハイパーサーミア、化学療法

キーワード：ハイパーサーミア 癌免疫 制御性Tリンパ球 免疫逃避機構 NK細胞 樹状細胞 MHC-classI 免疫機構

## 1. 研究開始当初の背景

免疫細胞療法については、近年著しく細胞培養技術が進歩し、日本全国いたるところで、ある程度の水準が保たれた免疫細胞療法（細胞の質、安全性）が施行されているようになってきたと感じられる。ところで、現在の免疫細胞療法は、その培養技術の進歩のゆえに今日理解されている生体内の抗がん作用を有する免疫細胞の培養は、ほぼ出尽くした感がある。今後、実臨床に於いて免疫細胞療法をより有効な治療法として確立するためには、移入した免疫細胞が生体内でより活躍できる環境を整えることが重要となってくる。その一つが今話題の免疫チェックポイント阻害剤である。我々は、そのような方法とは別にがん局所を加温する（ハイパーサーミア）ことにより、癌組織内の免疫抑制機構が解除されることをみだし、現在ハイパーサーミアと免疫細胞療法を併用している。

## 2. 研究の目的

### (1) 癌による免疫抑制機構に打ち勝つ免疫細胞療法の確立

我々は、まず免疫細胞療法に用いる活性化Tリンパ球について、海外ですでに報告のある、「癌免疫療法においては、移入するTリンパ球は、成熟したeffector Tリンパ球よりも、まだ未熟で分化していないNaïve Tリンパ球を用いることが、より抗がん効果が見いだせる」との基礎実験の報告をもとに、Naïve T細胞の開発・臨床使用を検討した。その結果、臨床試験[1]を終え、5年ほど前から、Naïve Tリンパ球を拡大培養し、癌患者に細胞移入をするという免疫細胞療法を行っている。また、このNaïve Tリンパ球移入療法にハイパーサーミアを併用した治療も多数行っている。次に、我々は、NK細胞の拡大培養の開発に取り組んだ。NK細胞は、Tリンパ球より遥かに拡大培養が難しい。しかし、我々が開発したNK細胞療法では、癌患者のNK細胞の純度が平均80%の高純度の拡大培養に成功し、臨床試験を経て現在臨床応用している[2]。また、健康人でのデータであるが、培養NK細胞のNK活性はK562を用いた場合、その元の披検者のNK細胞（マグネットセレクションで回収）のNK活性の最大で2.6倍に、またA549（肺癌細胞株）を用いた場合、最大6.26倍に増強していた。

### (2) 加温することによる癌組織の様々な影響を明らかにする。

次にハイパーサーミアで加温された腫瘍組織での免疫に関与する環境はどのように変化したのだろうか。

この点については、細胞実験、動物実験レベルで検討している。また、癌細胞内では、転移・浸潤の関与しているEMTについても検討を加えた。

## 3. 研究方法

### (1) ハイパーサーミアとnaïve Tリンパ球移入療法の併用療法の有効性について動物実験

【方法】6週齢C57BL/6雄メラノーマ皮下腫瘍モデルマウスに、①無治療、②温熱単独、③温熱+CD62L+細胞、④温熱+CD62L-細胞、の治療を行った。治療のタイミングは、腫瘍モデル作成後day3、day4に温熱処理し、細胞移入はday6、day10に尾静脈より行った。Day17に解剖し、腫瘍容積、体重、脾重量を比較検討した。

### (2) 新規免疫療法「Naïve T細胞リッチT細胞移入療法」の進行消化器癌・肺癌に対する第1相臨床試験結果

【対象】標準治療後の残存あるいは再発症例で手術・放射線治療による根治性のある治療の対象とならない消化器癌・肺癌で文書同意の得られた20歳以上、80歳未満でPSが0-2の症例9例を対象とした。[1]

### (3) ハイパーサーミアによる癌免疫監視機構についての動物実験

【方法】Balb/cマウスの背部に大腸がん細胞colon26を皮下移植し、形成した腫瘍に、43℃・1時間温熱処理を行い、24時間後に腫瘍を摘出し、腫瘍内のIL-10, TGF-beta, VEGFをRT-PCRおよびウェスタンブロット法で、また、腫瘍内のTregをIHCおよびFoxp3のウェスタンブロット法で評価した。さらに、in vitroにおいて、colon26細胞のMHC class I発現に対する温熱処理の影響をフローサイトメーターにて評価した。

### (4) ハイパーサーミアのEMTへの影響

ヒト肺癌細胞株と大腸癌細胞株を用いて、TGF- $\beta$ 刺激で誘導されるEMTに対する温熱処理の影響を検討温熱処理はTGF- $\beta$ 刺激に先行して行い、形態変化およびEMT関連分子の発現変化を比較検討した。[3]

### (5) Naïve Tリンパ球移入療法にハイパーサーミアを併用した場合の患者の末血リンパ球のサイトカイン産生能等の免疫モニターの結果への影響

当院でハイパーサーミアと免疫治療を併用した94例と免疫治療のみを行った141例を対象とした。免疫治療に必要な最初の培養用の採血時と最終の培養用採血時に白血球数、抑制性Tリンパ球数、末梢血リンパ球からの各種サイトカイン産生能（IL-4, 10, 12(p40), IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ,

TNF- $\alpha$ ) を測定し、比較検討した。

#### 4. 研究成果

(1) Day17 の腫瘍体積は、温熱+CD62L+細胞群で他の3群に比し有意に低値であった。

(2) 対象症例の年齢は、43-75 歳、中央値 60 歳、性別は男：女、7:2、原発巣は、胃癌1例、大腸癌3例、膵臓癌1例、胆管癌2例、肝細胞癌1例、肺癌1例であった。すべての症例において、個々の PBMC より予定どおりリンパ球の拡大培養が可能であった。全9症例に重篤な有害事象は認めなかった。治療効果はCR:1例 PR:1例 SD:4例PD:3例であり、奏効率 22%、病勢コントロール率は 66.6%であった。

(3) 温熱処理により、腫瘍内の IL-10, TGF- $\beta$ , VEGF の発現量は、mRNA、タンパク量ともに温熱処理により有意に低下した。腫瘍内の Treg (Foxp3 陽性リンパ球) 数は、腫瘍の増大により増加したが、温熱処理によりその数は有意に低下し、ウェスタンブロット法にても Foxp3 のタンパク量は減少した。Colon26 細胞を in vitro において温熱処理すると、MHC class I 発現は有意に亢進した。

(4) 温熱処理は TGF- $\beta$  刺激により誘導される細胞の形態変化(紡錘形変化)を抑制しなかった。さらに、温熱処理は TGF- $\beta$  刺激により誘導される EMT 上皮系マーカー(E-cadherin) 発現低下を抑制しなかった。間葉系マーカー(vimentin 等) 発現亢進を認めなかった。

(5) ハイパーサーミアと免疫治療を併用した群で、TNF- $\alpha$  が有意に上昇し、IL12(p40), IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  でも上昇傾向がみとめられた。

#### <引用文献>

[1] Phase I clinical trial of fibronectin CH296-stimulated T cell therapy in patients with advanced cancer. Ishikawa T, Kokura S, Enoki T, Sakamoto N, Okayama T, Ideno M, Mineno J, Uno K, Yoshida N, Kamada K, Katada K, Uchiyama K, Handa O, Takagi T, Konishi H, Yagi N, Naito Y, Itoh Y, Yoshikawa T PLoS One. 2014 Jan 31;9(1):e83786. doi: 10.1371/journal.pone.0083786. eCollection 2014.

[2] Phase I clinical trial of autologous NK cell therapy using novel expansion method in patients with advanced digestive cancer.

Sakamoto N, Ishikawa T, Kokura S, Okayama T, Oka K, Ideno M, Sakai F, Kato A, Tanabe M, Enoki T, Mineno J, Naito Y, Itoh Y, Yoshikawa T.

J Transl Med. 2015 Aug 25;13:277. doi: 10.1186/s12967-015-0632-8.

[3] The inhibitory effect of heat treatment against epithelial-mesenchymal transition (EMT) in human pancreatic adenocarcinoma cell lines.

Kimura-Tsuchiya R, Ishikawa T, Kokura S, Mizushima K, Adachi S, Okajima M, Matsuyama T, Okayama T, Sakamoto N, Katada K, Kamada K, Uchiyama K, Handa O, Takagi T, Yagi N, Naito Y, Itoh Y.

J Clin Biochem Nutr. 2014 Jul;55(1):56-61. doi: 10.3164/jcbn.14-8. Epub 2014 May 13.

#### 5. 主な発表論文等

##### 「雑誌論文」

① 編者 Kokura Satoshi, Yoshikawa Toshikazu, Ohnishi Takeo "Hyperthermic Oncology from Bench to Bedside" Springer 2016/6/1 査読あり

② Satoshi KOKURA, The Present State of the Hyperthermia in Japan, and by What Kind of Way Should We Progress from Now on? 京都学園大学健康医療学部紀要 13-20, 2016 査読あり

③ Sakamoto N, Ishikawa T, Kokura S, Okayama T, Oka K, Ideno M, Sakai F, Kato A, Tanabe M, Enoki T, Mineno J, Naito Y, Itoh Y, Yoshikawa T. Phase I clinical trial of autologous NK cell therapy using novel expansion method in patients with advanced digestive cancer. J Transl Med. 2015 Aug 25;13(1):277. doi: 10.1186/s12967-015-0632-8 査読あり

④ Matsuyama T, Ishikawa T, Okayama T, Oka K, Adachi S, Mizushima K, Kimura R, Okajima M, Sakai H, Sakamoto N, Katada K, Kamada K, Uchiyama K, Handa O, Takagi T, Kokura S, Naito Y, Itoh Y, Tumor inoculation site affects the development of cancer cachexia and muscle wasting. Int J Cancer. 2015 May 27. doi: 10.1002/ijc.29620. 査読あり

⑤ Okayama T, Ishikawa T, Sugatani K, Yoshida N, Kokura S, Matsuda K, Tsukamoto S, Ihara N, Kuriu Y, Nakanishi M, Nakamura T, Kamada K, Katada K, Uchiyama K, Takagi T, Handa O, Konishi H, Yagi N, Naito Y, Otsuji E, Hosoi H, Miki T, Itoh Y. Hypersensitivity Reactions to Oxaliplatin: Identifying the Risk Factors and Judging the Efficacy of a Desensitization

Protocol. Clin Ther. 2015 Jun 1;37(6):1259-69. doi: 10.1016/j.clinthera.2015.03.012. Epub 2015 Apr 査読あり

⑥ Kageyama S, Ikeda H, Miyahara Y, Imai N, Ishihara M, Saito K, Sugino S, Ueda S, Ishikawa T, Kokura S, Naota H, Ohishi K, Shiraiishi T, Inoue N, Tanabe M, Kidokoro T, Yoshioka H, Tomura D, Nukaya I, Mineno J, Takesako K, Katayama N, Shiku H Adoptive Transfer of MAGE-A4 T-cell Receptor Gene-Transduced Lymphocytes in Patients with Recurrent Esophageal Cancer. Clin Cancer Res. 2015 May 15;21(10):2268-77. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-1559. Epub 2015 Apr 8 査読あり

⑦ Ishikawa T, Adachi S, Okayama T, Kokura S, Mizushima K, Doi T, Matsuyama T, Sakamoto N, Katada K, Kamada K, Uchiyama K, Handa O, Takagi T, Naito Y, Itoh Y, Yoshikawa T. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 inhibition increases the antitumor activity of adoptive T-cell therapy when carried out with naïve rather than differentiated T cells. Oncol Rep. 2015 May;33(5):2545-52. doi: 10.3892/or.2015.3815. Epub 2015 Feb 24 査読あり

⑧ Kimura-Tsuchiya R, Ishikawa T, Kokura S, Mizushima K, Adachi S, Okajima M, Matsuyama T, Okayama T, Sakamoto N, Katada K, Kamada K, Uchiyama K, Handa O, Takagi T, Yagi N, Naito Y, Itoh Y. The inhibitory effect of heat treatment against epithelial-mesenchymal transition (EMT) in human pancreatic adenocarcinoma cell lines. J Clin Biochem Nutr. 2014 Jul;55(1):56-61. doi: 10.3164/jcfn.14-8. Epub 2014 May 13

[学会発表]

- ① 13-15th March 2015 The Empress Hotel, Chiang Mai, THAILAND, **招待講演** Annual Scientific Meeting Thai Society of Therapeutic Radiology and Oncology
- ② Hangzhou 2014 11 月 7-9 日 **招待講演** The 12th Chinese Congress of Hyperthermic Oncology and The 2nd Chinese Union Conference of Thermal medicine
- ③ 19th June 2015 **招待講演** The Second Regional Summit Forum of the International Progress of Radiotherapy and Hyperthermia Zhengzhou
- ④ 古倉 聡、第 32 回日本ハイパーサーミア学会学術大会教育講演 2015 年 9 月 2・3・4 日 KKR ホテル大阪
- ⑤ Satoshi Kokura 招待講演、The present state of the hyperthermia in Japan, and By what kind of way should we progress from now on? 6<sup>th</sup> ACHO and 31<sup>st</sup> JCTM Fukui

5-6, Sep

⑥ ハイパーサーミア および 分子標的治療薬で免疫細胞療法 of 抗がんポテンシャルを増強する。  
ハイパーサーミア および 分子標的治療薬で免疫細胞療法 of 抗がんポテンシャルを増強する。  
第 28 回バイオセラピー学会 2015 年 12 月 3 日・4 日 川越東武ホテル

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古倉 聡 (KOKURA Satoshi)

公益財団法人ルイ・パスツール医学研究センター・研究員

研究者番号 : 80347442

(2) 研究分担者

石川 剛

京都府立医大・消化器内科・講師

研究者番号 : 90372846