

令和 2 年 6 月 17 日現在

機関番号：34303

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2016～2019

課題番号：16K01482

研究課題名（和文）ハイパーサーミア（温熱療法）による免疫チェックポイントの制御

研究課題名（英文）Regulation of immuno-check point by hyperthermia

研究代表者

古倉 聡（KOKURA, SATOSHI）

京都先端科学大学・健康医療学部・教授

研究者番号：80347442

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：複数のがん細胞株にIFN $\gamma$ で刺激してPD-L1の発現を亢進させたうえで、ハイパーサーミア（温熱処理）の影響を検討した。その結果、がん細胞株によって発現が増強する細胞株と発現が減少する細胞株もあり、全体としては発現抑制の傾向は認められるものの断定するには至らなかった。そこで、IFN $\gamma$ の前刺激なしでPD-L1の発現に対する温熱処理の影響を検討した。その結果、がん細胞のPD-L1の発現は増強した。そのメカニズムについては、我々の検討では、温熱処理によりがん細胞からのIFN $\gamma$ の産生が亢進することを明らかとし、この温熱刺激によるIFN $\gamma$ がautocrine的にPD-L1の発現を増強していると推察した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在注目されている免疫チェックポイントの阻害方法は、それぞれのリガンド（キラーTリンパ球上のPD-1、癌細胞上のPD-L1）を抗体でブロックする方法である。本研究では、抗体ではなく、腫瘍を加温することで腫瘍組織内の癌細胞上のPD-L1の発現の変動を検討することにより、免疫チェックポイント阻害剤の適応や使用容量を適切にすることが可能である。場合によっては、高額な免疫チェックポイント阻害剤（抗体）の使用量を減じることが可能で、医療経済へ及ぼす影響も見逃すことはできない。

研究成果の概要（英文）：After stimulating by IFN $\gamma$  in two or more cancer cell stocks and accelerating the onset of PD-L1, I considered the impact of hyperthermia. As a result, with a cancer cell stock, the cell strain which an onset reinforces greatly also has a dispersion, and an observe thing did not come to conclude the tropesis of the onset suppression as a whole. Then, I considered the impact of a thermal treatment on an onset of PD-L1 without the pre-stimulus of IFN $\gamma$ . As a result, the onset of PD-L1 was reinforcing on some cancer cell stocks. About the mechanism, by our investigation, it became clear that a yield of IFN $\gamma$  from a cancer cell rises by thermal treatment, and I guessed that I was reinforcing the onset of PD-L1 in autocrine.

研究分野：がん免疫、ハイパーサーミア、がん治療

キーワード：ハイパーサーミア 温熱処理 免疫チェックポイント PD-L1 IFN

## 1. 研究開始当初の背景

我々は、前回の科研費での研究を中心に、ハイパーサーミアが免疫監視機構の再構築を引き起こしていることを明らかとした。もちろん、癌組織側からみると、腫瘍組織を加温することで様々な反応が起こる。1) 癌細胞、繊維芽細胞など癌組織を構成する様々な細胞から、免疫抑制性のサイトカインの産生が低下する。2) 癌細胞を加温するとその加温温度によっては、癌細胞は死滅するが、そうならない場合は、癌細胞上に MHC-class I や癌抗原を発現する。3) 癌組織中の制御性 T 細胞が減少する。などを明らかとした。また、4) 癌の転移や浸潤に重要な現象と言われる EMT は、癌細胞を加温することで抑制される (Reiko K, Satoshi K, et al.)。すなわちハイパーサーミアには転移抑制効果も期待できる。これは、臨床的に証明するのは難しいと思われるが、現在臨床試験を企画中である。

癌組織を加温すると、当然癌組織に浸潤している、NK 細胞、樹状細胞、T-リンパ球なども加温される。これらの細胞群は、in vitro の検討で、それぞれ最適な温度で最も活性が高まる。ハイパーサーミア中、腫瘍組織は必ずしも均一に加温されているわけではないので、腫瘍組織内では、浸潤細胞は、それぞれが適した温度の領域に分布しているのだろうか？

ハイパーサーミアと免疫細胞療法 (Ishikawa T, Kokura S, et al., Sakamoto N, Kokura S, et al.) のみを行っている患者も多い。子宮体癌 Stage IIb、進行胃癌 Stage IIb、進行膵臓癌 Stage IVa の患者で、術後 5 年ハイパーサーミアと免疫細胞療法を行って生存されている患者は多数おられる (いずれも 5 年生存率は 50% 以下である)。また、発症時、スキルス胃癌およびその癌性腹膜炎の患者 (診断時、予後は 12 ヶ月と考えられた) は、発症後 5 年を経過しているが、現在も仕事をされている。さらに最近では、平成 25 年 4 月に診断がついた、進行胃癌およびその肝臓転移、癌性腹膜炎の患者で全身化学療法を拒否され、8 ヶ月間のハイパーサーミアと免疫細胞療法のみで、平成 26 年 4 月の精査では、原発巣、転移巣ともに消失し、発症後 2 年以上経過するが、再発していない進行胃癌の患者もおられる。

ハイパーサーミアと免疫細胞療法のみ (場合によっては、化学療法を併用) で、奏功する症例を多数経験してきたことから、この併用療法には、まだ未知の抗がんメカニズムがあるのではないかと考えた。もちろん、数百例に及ぶ症例に対して免疫モニタリングを行っているが、決定的な治療効果予測因子は見つからない。そこで、近年注目されている免疫チェックポイントの発現に対するハイパーサーミアの影響を検討することとした。

## 2. 研究の目的

ハイパーサーミア (温熱療法) による免疫チェックポイントの制御が行うことができれば、癌免疫療法は著しく進歩する。近年注目されている免疫チェックポイント阻害剤の優れた抗癌効果は、ハイパーサーミアを併用すること (あるいは単独) により、その効果を増強し、また、薬品としての免疫チェックポイント阻害剤の投与量を減量することが可能になると考えている。あるいは、逆

にハイパーサーミアにより免疫チェックポイントの発現が亢進するなら、ハイパーサーミアによるがん治療時は免疫チェックポイント阻害剤を併用することが望ましいということになる。今後、多種類の免疫チェックポイント阻害剤が保険収載されることが予定されており、温熱刺激によるがん細胞上の免疫チェックポイントの発現動向の確認は必須の検討項目と考える。

### 3. 研究の方法

本研究の目的は、ハイパーサーミア（温熱療法）により、免疫チェックポイントの制御を行うことである。

近年、癌免疫療法においては、癌ワクチン、免疫細胞療法（Ishikawa T, Kokura S, et al, Sakamoto N, Kokura S, et al.）に加えて、免疫チェックポイントの阻害剤が保険収載され、今後もその阻害剤の種類、適応癌腫も増えてくると思われる。我々は、培養癌細胞を温熱処理することで、免疫チェックポイントの代表的因子である、PD-L1 の発現が低下するという予備実験の結果を得ている。まず、培養癌細胞を用いて、より PD-L1 の発現を抑える条件を見だし、その場合の細胞内遺伝子発現変化を調べることにより、細胞内でどのようなイベントが起こって、PD-L1 の発現低下を引き起こしたかを明らかとする。

2016 年度～2018 年度

- 1) まず、これまでの基礎的検討で把握している、温熱処理による IFN 刺激培養癌細胞株の PD-L1 の発現の変動について、培養癌細胞株を増やして、癌細胞に普遍的な現象であるかどうかを検討する。PD-L1 の発現については、FACS もしくは ELISA で検討した。
- 2) 上記の検討は、無刺激の癌細胞株の場合は PD-L1 の発現が弱い細胞株もあるために、IFN 刺激により PD-L1 の発現を増強させた上で、温熱処理を行い、PD-L1 の発現変動を調べることとした。
- 3) 温熱処理の方法としては、すなわち、温熱する加温温度（臨床的実用性からは、39 度から 43 度くらいの範囲）、加温時間（臨床的実用性からは、30 分から 60 分）で検討した。
- 4) 加温処理後の PD-L1 の発現の変動について、加温処理直後から 48 時間までを検討する（これまでの様々な研究結果から、加温処理の細胞への影響は、48 時間までに認められ、それ以後に加温処理の影響が出ることは認められなかったから）。PD-L1 の発現に最も強く影響する時期、及びその持続時間を明らかにした。

2019 年度

IFN の刺激をしていない状態における癌細胞上の PD-L1 への温熱処理の影響

を検討した。

#### 4. 研究成果

まず、7種類の癌細胞株を用いて *in vitro* で PD-L1 を発現しているか否かを FACS にて検討したところ、PD-L1 を発現している癌細胞とほとんど発現していない癌細胞を認めた(図1のブルーバー)。しかし、IFN で刺激をすると、7種類中4種類の癌細胞で明らかに PD-L1 の発現が増強することを認めた(図1のレッドバー)。IFN 刺激で PD-L1 の発現量がもっとも増加した癌細胞株 NCI-N87 を用いて、IFN 刺激下の 37 のコントロール、41 の温熱処理、43 の温熱処理を 30 分、60 分行ったのちに PD-L1 の発現を見ると(図2) 41 ,1 時間の加温直後で PD-L1 の発現が有意に低下した。43 の加温でも PD-L1 は低下傾向をしめした。

図 1

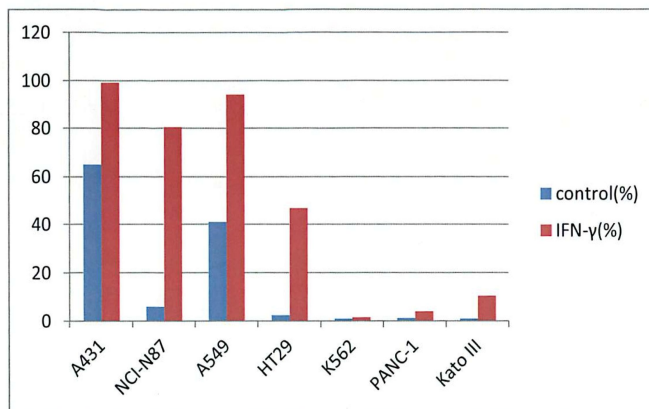
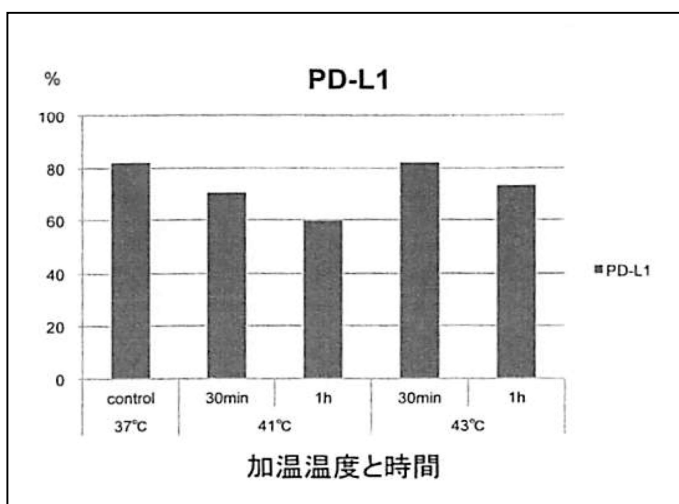


図 2

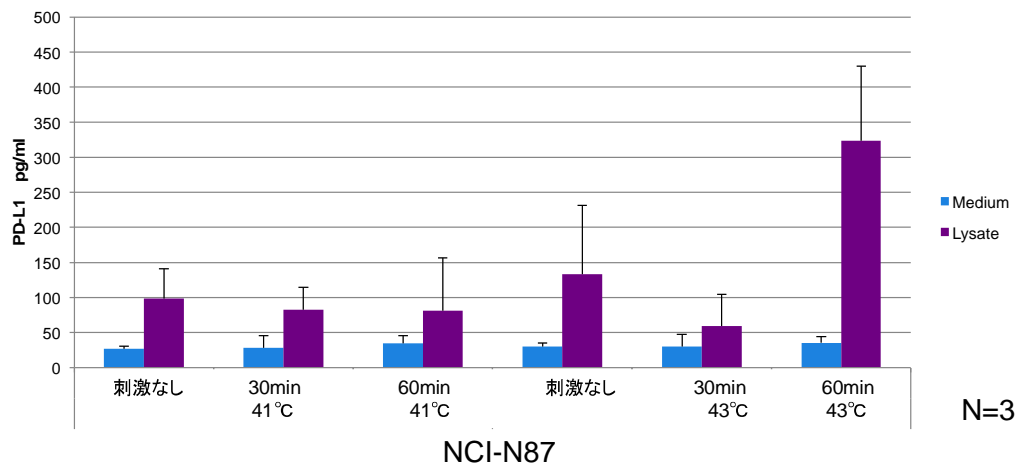


この結果は、温熱処理により癌細胞上の PD-L1 の発現が抑制される可能性を示唆している。

ところが、我々のこれまでの検討で温熱処理を行うと、*in vitro* でも *in vivo* でも、さらには担癌患者でも、温熱処理(患者の場合は、ハイパーサーミア)により、癌細胞は IFN を産生することをあきらかとしている。この事実を考慮すると *in vitro* において、IFN の刺激をしていない状態の癌細胞上の PD-L1

への温熱処理の影響を検討すべきと考えた。この検討を 2019 年度に行った。用いた癌細胞株は、前述した細胞と同じ NCI-N87 で検討を行った。この癌細胞株は、無刺激では PD-L1 の発現は 10%以下であるが、IFN で刺激をすると PD-L1 の発現が 80%まで増加することがわかっている。すなわち、IFN に対する感受性が高いことがわかっている（前述）。この癌細胞株に温熱処理を 30 分、及び 60 分行ったところ、41 ではわずかに PD-L1 の発現が増強し、43 、60 分の温熱処理では有意に PD-L1 の発現増強を認めた。

図 3



以上の結果より、温熱処理（ハイパーサーミア）は、加温された癌細胞から IFN を産生することにより、オートクライン的に PD-L1 の発現を増強する可能性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Nishida S, Ishikawa T, Egawa S, Koido S, Yanagimoto H, Ishii J, Kanno Y, Kokura S, Yasuda H, Oba MS, Sato M, Morimoto S, Fujiki F, Eguchi H, Nagano H, Kumanogoh A, Unno M, KonM, Shimada H, Ito K, Homma S, Oka Y, Morita S, Sugiyama H.	4. 巻 6(3)
2. 論文標題 Combination Gemcitabine and WT1 Peptide Vaccination Improves Progression-Free Survival in Advanced Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: A Phase II Randomized Study.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Immunol Res.	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/2326-6066.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ishikawa T, Okayama T, Sakamoto N, Ideno M, Oka K, Enoki T, Mineno J, Yoshida N, Katada K, Kamada K, Uchiyama K, Handa O, Takagi T, Konishi H, Kokura S, Uno K, Naito Y, Itoh Y.	4. 巻 142(12)
2. 論文標題 Phase I clinical trial of adoptive transfer of expanded natural killer cells in combination with IgG1 antibody in patients with gastric or colorectal cancer	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Int J Cancer	6. 最初と最後の頁 2599-2609
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ijc.31285.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ishikawa T, Okayama T, Sakamoto N, Ideno M, Oka K, Enoki T, Mineno J, Yoshida N, Katada K, Kamada K, Uchiyama K, Handa O, Takagi T, Konishi H, Kokura S, Uno K, Naito Y, Itoh Y.	4. 巻 142
2. 論文標題 Phase I clinical trial of adoptive transfer of expanded natural killer cells in combination with IgG1 antibody in patients with gastric or colorectal cancer.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Int J Cancer	6. 最初と最後の頁 2599-2609
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ijc.31285. Epub 2018 Feb 14.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ishikawa T, Yasuda T, Doi T, Okayama T, Sakamoto N, Gen Y, Dohi O, Yoshida N, Kamada K, Uchiyama K, Handa O, Takagi T, Konishi H, Yagi N, Kokura S, Naito Y, Itoh Y.	4. 巻 36
2. 論文標題 The amino acid-rich elemental diet Elental; preserves lean body mass during chemo- or chemoradiotherapy for esophageal cancer.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Oncol Rep	6. 最初と最後の頁 1093-100
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/or.2017.4877. Epub 2016 Jun 15.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Satoshi Kokura.	4. 巻 1
2. 論文標題 The Present State of the Hyperthermia in Japan, and by What Kind of Way Should We Progress from Now on?.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Bulletin of the Faculty of Health and Medical Sciences, Kyoto Gakuen University	6. 最初と最後の頁 13-19
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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計17件 (うち招待講演 12件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Satoshi Kokura
2. 発表標題 Healthcare innovation and technology for Anti-Aging
3. 学会等名 Green ASIA and Sustainability Forum (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 古倉 聡
2. 発表標題 ハイパーサーミアと放射線治療法・化学療法・免疫療法との併用のメカニズムと治療効果.
3. 学会等名 ハイパーサーミアについて理解を深める講演会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 古倉 聡
2. 発表標題 進行癌を慢性疾患に
3. 学会等名 よみうり市民公開講座 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 古倉 聡
2. 発表標題 癌と向き合う治療のあり方
3. 学会等名 ハイパーサーミア市民講座 in 鶴岡 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 古倉 聡
2. 発表標題 がんの集学的治療の一つとしての免疫療法を考える
3. 学会等名 よみつり市民公開講座 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 古倉 聡
2. 発表標題 集学的治療の一つとしてのハイパーサーミア.
3. 学会等名 ハイパーサーミア市民公開講座 in山形 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 古倉 聡
2. 発表標題 「私とハイパーサーミアとの30年」
3. 学会等名 九州中国四国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 古倉 聡、
2. 発表標題 ハイパーサーミア と 放射線療法・化学療法・免疫療法 との併用のメカニズムと治療効果
3. 学会等名 庄内クリエート勉強会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 古倉 聡、
2. 発表標題 ハイパーサーミアと放射線療法・化学療法・免疫療法との併用効果のメカニズムと治療の実際
3. 学会等名 東海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 古倉 聡、
2. 発表標題 「私とハイパーサーミアとの30年間のお付き合い」
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 古倉 聡
2. 発表標題 日本ハイパーサーミア学会 学会賞受賞講演
3. 学会等名 日本ハイパーサーミア学会第34回大会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 古倉 聡、松山竜三、舟木 準、水野麻利、柏木隆宏、出野美津子.
2. 発表標題 癌免疫療法にハイパーサーミアを併用する意義.
3. 学会等名 第45回放射線による制癌シンポジウム.
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 古倉 聡、松山竜三、柏木隆宏.
2. 発表標題 癌免疫細胞療法にハイパーサーミアを併用する意義.
3. 学会等名 日本ハイパーサーミア学会第33回大会.
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 石川 剛、西田純幸、江川新一、小井戸薫雄、石井 淳、菅野良秀、柳本泰明、古倉 聡、森本創世子、大庭真梨、岡 芳弘、杉山 治夫
2. 発表標題 進行肺癌に対するゲムシタピン併用WT1ペプチドワクチン療法のランダム化第2相試験.
3. 学会等名 第75回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 小井戸薫雄、西田純幸、石川 剛、江川新一、石井 淳、菅野良秀、柳本泰明、古倉 聡、森本創世子、大庭真梨、江口英利、島田英昭、本間 定、森田智視、杉山治夫.
2. 発表標題 進行肺癌に対するゲムシタピン併用WT1ペプチドワクチン療法ランダム化第II相臨床試験.
3. 学会等名 第54回日本癌治療会ミニシンポジウム
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 古倉 聡、松山竜三、柏木隆宏
2. 発表標題 ハイパーサーミアの癌細胞上のPD-L1の発現に対する影響
3. 学会等名 第13回がんワクチン療法研究会学術集会.
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 古倉 聡
2. 発表標題 Hyperthermia, the Adjunct Modality to Enhance Effects of Standard Treatment and New Trends of Treatment Modality
3. 学会等名 天壇普華RF8温熱治療機器発表会.(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Kokura S, Yoshikawa T, Ohnishi T,	4. 発行年 2016年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 444
3. 書名 Hyperthermic Oncology from Bench to Bedside	

〔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
---------	---------------------------	-----------------------	----