様　式　C－１９、F－１９－１、Z－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　　４ 年　　７ 月 ２１ 日現在

機関番号：１３９０１
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2019～2021
課題番号：１９Ｋ１０３３０

研究課題名（和文）口腔癌に対する免疫チェックポイント阻害薬を用いた免疫温熱療法

研究課題名（英文）Hyperthermia with immune checkpoint inhibitors for oral cancer

研究代表者
山本　憲幸（Yamamoto, Noriyuki）

名古屋大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：６０３７８１５６

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では，半導体レーザーを用いた温熱療法と免疫チェックポイント阻害薬との併用療法の抗腫瘍効果と腫瘍微小免疫環境にあたえる影響を検討した．マウスモデルにおいて①半導体レーザー照射により腫瘍の温度が上昇し43℃で維持され腫瘍の増大は抑制された．②温熱療法により腫瘍細胞と骨髄系細胞のPD-L1発現が上昇した.③温熱療法により腫瘍微小免疫環境で,細胞障害性T細胞の増加とPD-L1発現強度上昇がみられた.④抗PD-L1＋温熱療法併用群ではアブスコパル効果が得られた．⑤肺転移の抑制効果は抗PD-L1群と抗PD-L1＋温熱療法併用群で同等であった．

研究成果の学術的意義や社会的意義
超高齢社会において口腔癌の発生率は増加し、全身疾患や合併症などによりこれまでの標準治療が適用できない患者も増加している。口腔癌に対する半導体レーザーによる温熱療法と免疫チェックポイント阻害剤との併用療法の効果及びその作用機序の解明することで低侵襲で新たな治療法の開発となる。本研究では半導体レーザーで温熱治療が可能であり、温熱療法後の腫瘍内の免役環境では、すでに報告されている細胞傷害性T細胞の増加の他に、PD-L1発現上昇というネガティブな変化も生じており、これを標的とする併用治療が有効であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the antitumor effect and the effect of the combination therapy of hyperthermia using a semiconductor laser and an immune checkpoint inhibitor on the tumor microimmune environment. In the mouse model, (1) Temperature of the tumor increased by irradiation with a semiconductor laser and was maintained at 43 °C, and the growth of the tumor was suppressed. (2) Hyperthermia increased PD-L1 expression in tumor cells and myeloid cells. (3) Hyperthermia increased cytotoxic T cells and increased PD-L1 expression intensity in the tumor microimmune environment. (4) Anti The Abscopal effect was obtained in the PD-L1 + hyperthermia combination group. (5) The inhibitory effect on lung metastasis was similar between the anti-PD-L1 group and the anti-PD-L1 + hyperthermia combination group.

研究分野：口腔腫瘍

キーワード：温熱療法　口腔癌　免疫療法　免疫チェックポイント阻害剤　半導体レーザー　アブスコパル効果

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９（共通）

１．研究開始当初の背景

口腔癌の治療成績は集学的治療（手術、放射線治療、抗がん剤）の進歩により向上しているが、高度進展例や再発・転移例においては満足のいく結果は得られていない。また、免疫チェックポイント阻害剤（ICI）の出現により免疫療法が注目されているが、その奏功率はまだ限定的であり[1)]、改善すべく研究が進められている。口腔癌の発生率は増加し、超高齢社会において全身疾患や合併症などによりこれまでの標準治療が適用できない患者も増加している。

がんの温熱療法は 1980 年代より、日本ではラジオ波あるいはマイクロ波を使った局所領域の難治がんに対する治療法として、放射線治療または化学療法との併用による治療が多部位・多種のがん腫に行われていた。しかし、大型の装置が必要であることや導入された施設が少ないこと等から広く用いられているとは言えず、その後次第に衰退した。しかし、温熱のがんに対する生物学的作用は明らかであり、有効な加温方法が新たに開発されれば広く臨床応用される治療法と考えられる。近赤外光である半導体レーザーは水、ヘモグロビンによる吸収が少なく、組織蒸散を生じにくいため生体組織深部までエネルギーが到達する。放射線治療とは異なり副作用や正常組織への侵襲が少なく繰り返し治療を行うことができる。Nd-YAG レーザーやその消耗品は非常に高価であったが、近年レーザー装置も小型で比較的低価格な半導体レーザーが開発されており、本学放射線科において開発（「レーザー治療器」として特許出願（特願 2014-152771））された。

PD-1/PD-L1 リガンド経路は自己への免疫反応や炎症反応を沈静化することから免疫の恒常性の維持に深く関わっており、主に末梢組織で働き標的（がん細胞や異物）への免疫制御に関わっている。また、抗 PD-1 抗体などの ICI を用いてメラノーマや非小細胞肺がんなど多くのがんに対して良好な成績が報告されている。放射線治療、化学療法との併用において増強効果が報告されているが、温熱療法との関連した基礎的な報告はほとんどない。近年、ICI（抗 CTLA-4、抗 PD-１、抗 PD-L1 など）の出現により固形癌に対する治療も変わりつつある。これらと放射線治療の併用により遠隔病変にも治療効果が期待できることがわかってきた[2)]。しかし、温熱療法とこれらの併用による基礎的な研究報告はほとんどない。研究代表者らは、温熱治療の結果、免役機構が賦活化し治療をしていない腫瘍まで効果がある「アブスコパル効果（バイスタンダー効果)」と呼ばれる現象がありその効果を確認してきた。

これまでに、我々は温熱療法により壊死した癌細胞が、ワクチンとして全身性に抗腫瘍免疫を活性化させることを報告してきた。局所温熱療法は HSP を強く発現誘導させながら腫瘍局所で細胞を壊死させることによって HSP-抗原ペプチドを大量に放出させるといった腫瘍ワクチン療法というべき治療法である。われわれの HSP に関する基礎的研究は、HSP70 の発現とそれによる腫瘍細胞表面 MHC classⅠ抗原の増強があり腫瘍細胞の免疫原性を高める。マイルドハイパーサーミアを追加することにより抗腫瘍免疫を高めることを確認している[3)]。

これらのことより、低侵襲で新たな治療法の開発が求められている。

２．研究の目的

口腔癌に対する半導体レーザーによる温熱療法と ICI との併用療法の効果及びその作用機序の解明することである。

３．研究の方法

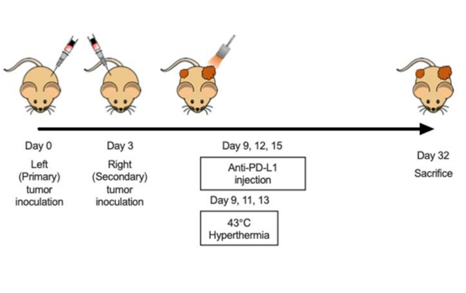
(1) *in vitro* における温熱処理による腫瘍細胞への影響。

細胞はマウス扁平上皮癌細胞株である SCCVII を使用し、温熱処理は 37°Cで前培養した細胞を加温したインキュベータ内に静置することで行った。解析は WST-8 アッセイによる増殖能の検討、アポトーシスアッセイによる細胞死の検討、RT-qPCR とフローサイトメトリーによる PD-L1 発現を検討した。

(2) *in vivo* の実験

C3H/HeJ 雄 7 週齢を用い、片側もしくは両側の背側皮下に 5×10^{5} 個の SCCVII を移植することで腫瘍モデルを作製した。レーザー温熱療法は、飛鳥メディカル社製半導体レーザーADL-20 を使用し、プローブを腫瘍より 10㎜ 離してレーザーを照射した。腫瘍直上の体表温度を温度センサーで測定し、43°Cに維持するようコントローラーを介して照射を制御した。0 日目にマウスの左側背側皮下に SCCVII を移植し、コントロール群と HT 群の 2 群とし、HT 群には 9 日目、11 日目、13 日目に各 10 分間の HT を行なった。腫瘍体積の測定と、治療終了から 3 日後に腫瘍と脾臓を採取し、フローサイトメトリーをした。

次に抗 PD-L1 抗体併用による抗腫瘍効果の検討を行なった。0 日目に左側背側皮下に、3 日目に右側背側皮下に遠隔腫瘍を想定した SCCVII を移植し、9 日目にコントロール群・AntiPD-L1 抗体群、HT 群、併用群の 4 群に分けました。HT 群、併用群には 9 日目、11 日目、13 日目に左側の腫瘍にのみ各 10 分間 43°Cの HT を行なった。Anti-PD-L1 群と併用群には 9、12、15 日目に抗 PD-L1 抗

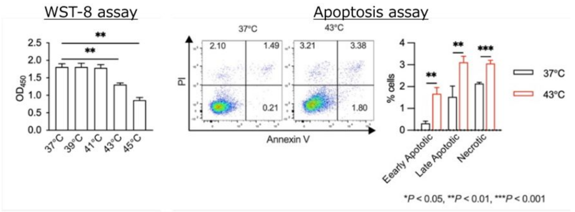


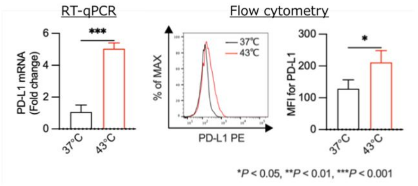
体（200μg）を腹腔内投与し、コントロール群と HT 群にはアイソタイプ・コントロール抗体を同量投与した。その後 32 日目まで腫瘍体積を測定し、32 日目に屠殺し肺を採取、HE 染色標本を作製し肺転移数をカウントした。

４．研究成果

(1) *in vitro* における温熱処理による腫瘍細胞への影響。

温熱処理から 24 時間後、WST-8 アッセイでは、43°Cで増殖能が低下した。細胞生存率（アポトーシスアッセイ）では、43°Cの温熱処理により細胞死が増加していた。PD-L1 発現について、リアルタイム PCR とフローサイトメトリーを行った、温熱処理により PD-L1 遺伝子発現が上昇し、細胞膜上での PD-L1 発減量が増加した。

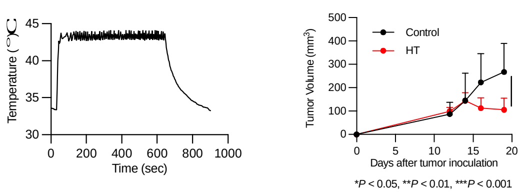




(2) *in vivo* における半導体レーザー照射による抗腫瘍効果

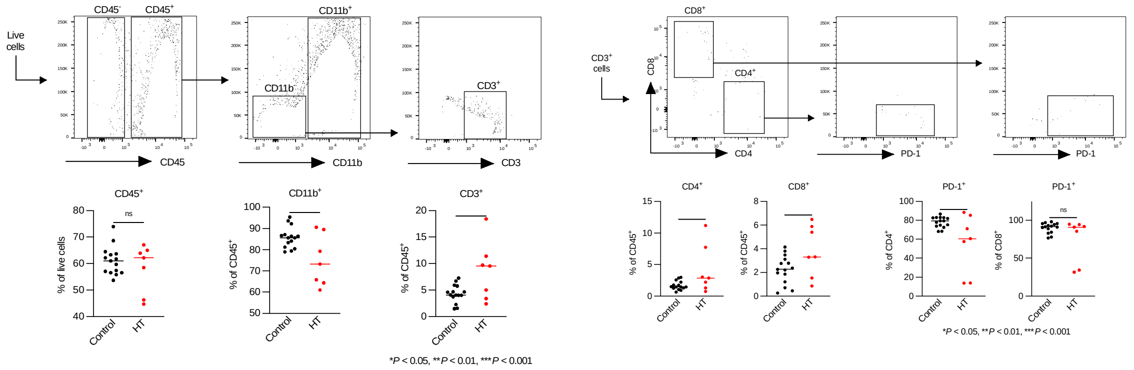
レーザー照射による腫瘍直上皮膚の温度は速やかに温度が上昇し、43°Cで維持されることを確認した。3 回の HT により腫瘍増大が抑制されることが示されました。

腫瘍直上皮 膚の温度　腫瘍体積



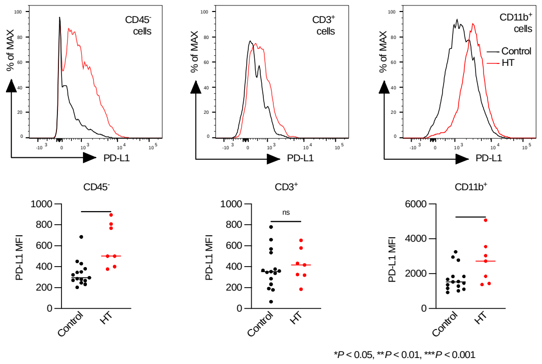
(3) 腫瘍内の免疫環境への影響

腫瘍内の免疫環境への影響をフローサイトメトリーで検討した。腫瘍組織中の CD45 細胞についてはコントロール群と HT 群で有意な差はなかった。マクロファージが含まれる CD11b 陽性である骨髄系細胞の割合は低下、CD3 陽性である T 細胞の割合は上昇した。HT により CD4 陽性細胞、CD8 陽性細胞ともに CD45 陽性細胞中での割合が上昇した。また、CD4 陽性細胞中の PD-1 陽性率が減少した。一方、CD8 陽性細胞では優位な差はなかった。



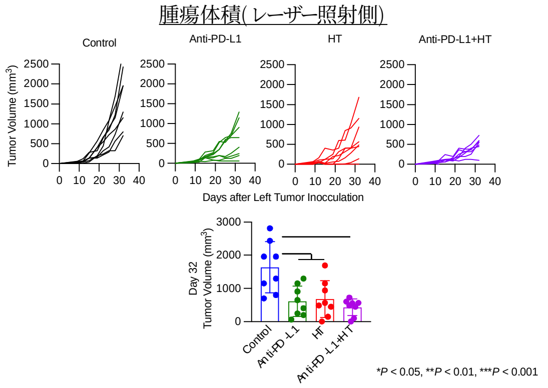
(4) *in vivo* における HT による PD-L1 発現

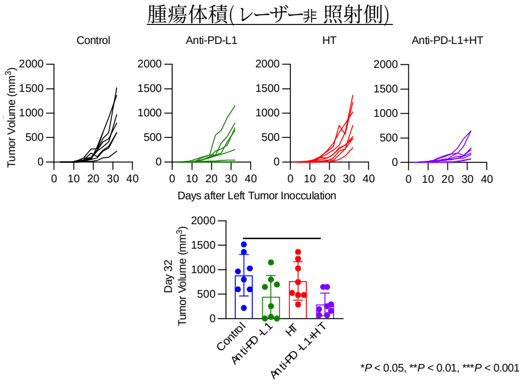
各細胞群における PD-L1 発現を右に示す。上段には代表的なヒストグラムを示す。腫瘍細胞が含まれる CD45 陰性細胞、CD11b 陽性細胞で HT により PD-L1 発現が上昇した。CD3 陽性細胞では優位な差はなかった。脾臓ではコントロール群と HT 群で各細胞群の割合に差はなかった。CD4 陽性細胞、CD8 陽性細胞中の PD-1 陽性率や、CD3 陽性細胞と CD11b 陽性細胞での PD-L1 発現にも差がなかった。



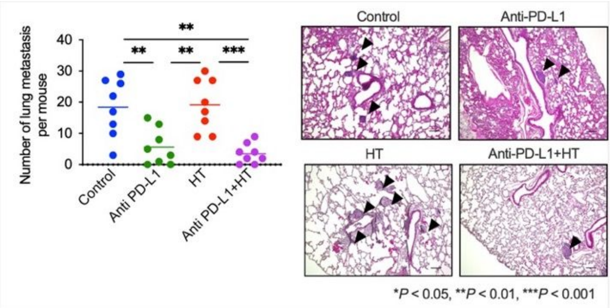
(5) ICI、半導体レーザー照射併用によるアブスコパル効果

半導体レーザー照射側である左側と半導体レーザー非照射側である右側の各群ごとの腫瘍体積推移と、32 日目の平均腫瘍体積のグラフを示す。半導体レーザー照射側では Control 群以外の 3 群で腫瘍増大が抑制されましたが、これら 3 群の間では有意な差はなかった。併用群のみで有意な腫瘍増大の抑制がみられた。また、HT 単独治療では非照射側に抗腫瘍効果はみられなかった。





32 日目時点での肺転移数と、代表的な肺の HE 染色像を右に示す。(転移巣を矢頭で示す。) AntiPD-L1 群と併用群で肺転移数が減少しましたが、この 2 群間では有意な差がありませんでした。



以上より、半導体レーザーによる HT は抗腫瘍効果を示した。HT 後の免疫環境では CD8 陽性 T 細胞の割合が上昇した。*in vitro* での温熱処理、マウスモデルでの HT により腫瘍細胞での PD-L1 発現が上昇した。また、マウスモデルの腫瘍では CD11b 陽性の骨髄系細胞でも PD-L1 発現が上昇していた。HT の抗腫瘍効果は単独治療では照射側にのみにみられ、併用群では非照射側にも抗腫瘍効果がみられた。肺転移の抑制効果は anti-PD-L1 群と併用群で同等であった。HT は抗腫瘍効果を有するものの、免疫環境における PD-L1 発現が上昇することでその効果が相殺されている可能性が考えられた。温熱療法後の免疫環境では、すでに報告されている細胞傷害性 T 細胞の増加の他に、PD-L1 発現上昇というネガティブな変化も生じており、これを標的とする併用治療が有効であることが示唆された。

＜引用文献＞

1) Sharma P, Hu-Lieskovan S, Wargo JA, Ribas A. Primary, Adaptive, and Acquired Resistance to Cancer Immunotherapy. Cell. 2017 Feb 9;168(4):707-723. doi: 10.1016/j.cell.2017.01.017.
2) Ngwa W, Irabor OC, Schoenfeld JD, Hesser J, Demaria S, Formenti SC. Using immunotherapy to boost the abscopal effect. Nat Rev Cancer. 2018 May;18(5):313-322. doi: 10.1038/nrc.2018.6.
3) Matsumoto K, Yamamoto N, Hagiwara S, Saito M, Furue H, Shigetomi T, Narita Y, Mitsudo K, Tohnai I, Kobayashi T, Ueda M. Oncol Rep. 2011 Jun;25(6):1525-32. doi: 10.3892/or.2011.1232.

5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計0件

〔学会発表〕　計0件

〔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

7．科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕　計0件

8．本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関