

平成 22年 5月 1日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20791506

研究課題名 (和文) 口腔癌に対する樹状細胞を用いた磁場誘導組織内温熱免疫療法

研究課題名 (英文) Hyperthermia using magnetic nanoparticles combined with intratumoral dendritic cells enhance antitumor effect

研究代表者

山本 憲幸 (YAMAMOTO NORIYUKI)

名古屋大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：60378156

研究成果の概要 (和文)：SCCVII というマウスの扁平上皮癌細胞は抗原性が極めて低い。そのため、この腫瘍を 43℃で加温するだけでは樹状細胞という強力な抗原提示細胞をあまり活性化できない。しかし、43℃で加温した SCCVII と、その後補充した樹状細胞にマイルドな 41℃程度の加温を追加することで、樹状細胞は強く活性化された。このことから、腫瘍に対する加温、樹状細胞の注入、腫瘍と樹状細胞に対するマイルドな加温という 3つのステップが腫瘍特異的な免疫を誘導でき、副作用のほとんどない新しい癌の治療法になりうると考えられる。

研究成果の概要 (英文)：Additional mild hyperthermia at 41℃ after classic local hyperthermia and intratumoral immature dendritic cells injection could be a more effective and novel method of hyperthermia in cancer therapy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：温熱療法、樹状細胞、免疫療法、扁平上皮癌、磁性微粒子、マイルド加温

1. 研究開始当初の背景

(1) 腫瘍細胞に温熱ストレスを与えることで産生される heat shock protein (HSP) 70 が、腫瘍ペプチドと複合体を形成し、抗原提示を促進させ、免疫活性化に寄与する。

(2) 樹状細胞には HSP レセプターの存在するため、複合体を形成した腫瘍ペプチドを取り込み易く、T細胞へ強力に抗原提示を行う。

(3) これらのことから温熱療法と樹状細胞の併用療法は有効性が高い。

(4) 発熱程度のマイルドな加温も免疫系を活性化させることができる。

2. 研究の目的

(1) 扁平上皮癌において、温熱療法と樹状細胞を用いた免疫療法の併用療法による抗腫瘍効果を確認すること。

(2) 最適な併用療法のプロトコールを検討すること。

3. 研究の方法

(1) HSP70 を高発現させる条件の検討
腫瘍細胞としてマウス扁平上皮癌である SCCVII を用いた。培養腫瘍細胞に 41~45°C、30 分、1~2 回の温熱ストレスを加え、その後、経時的にタンパクを抽出した。Western blotting により HSP70 の発現量の比較を行った。

(2) 樹状細胞の培養
C3H/HeJ マウスの大腿骨、脛骨より骨髓細胞を採取。赤血球を除去し、単核球成分を Granulocyte Macrophage colony-stimulating Factor (GM-CSF) 存在下に RPMI 培地にて 8 日間誘導培養した。フローサイトメトリーにて培養細胞が樹状細胞に分化しているか確認した。

(3) 樹状細胞の成熟度の検討
温熱ストレスを加えた、もしくは加えていない腫瘍細胞と未熟樹状細胞を共培養、または、共培養下にマイルドな加温を行った。さらに、リポポリサッカライド (LPS) を加え、樹状細胞を成熟化させ、ポジティブコントロールとした。

①HT(-)SCCVII + iDC (control)

②HT(+)SCCVII + iDC

③HT(+)SCCVII + iDC + mHT

④LPS + iDC (positive control)

の 4 群を設定し、各群の樹状細胞の成熟度を成熟マーカーである抗 CD80、抗 MHC class II 抗体を用い、フローサイトメトリーにより解析した。

(4) in vivo における抗腫瘍効果の検討
担癌マウスを用いて in vitro で得られた結果を検証した。

①未治療群

②HT + iDC

③HT + mHT

④HT + iDC + mHT

HT : 43°C30 分の加温

mHT : 41°C30 分の加温

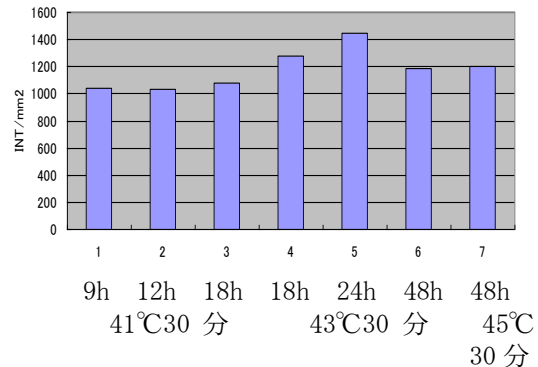
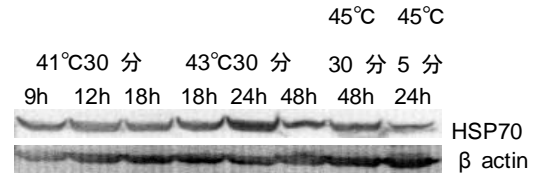
iDC : 未熟樹状細胞

という 4 群を設定し、移植した腫瘍径が 5mm となったところで治療を開始した。腫瘍局所の加温は、腫瘍に磁性微粒子 (MCL) を注入し磁場を与えることで行った。また、マウス骨髓細胞より培養誘導した未熟樹状細胞も

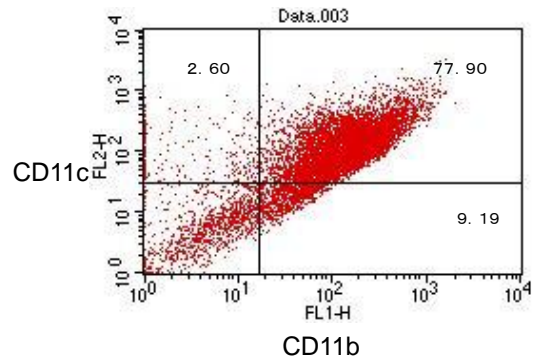
腫瘍に直接注入して用いた。

4. 研究成果

(1) SCCVII 細胞からの HSP70 の発現量は、43°C30 分加温後 24 時間で最大となった。加温時間、加温回数を変えても有意差をもって HSP70 の発現が亢進することはない。



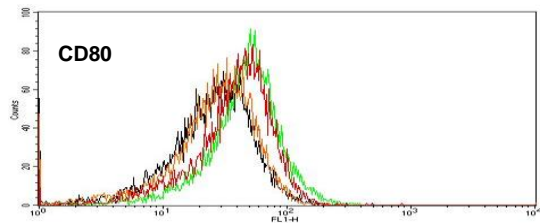
(2) マウス骨髓より誘導培養した樹状細胞は、CD11c (+)、CD11b (+) とされており、およそ 8 割の細胞が樹状細胞に分化していると考えられる。



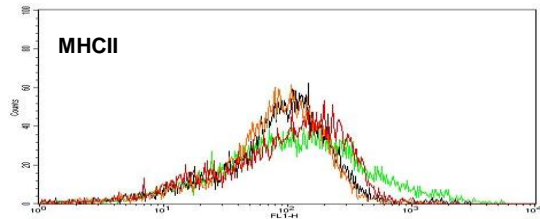
この細胞を未熟樹状細胞として用いた。

(3) 43°C30 分の温熱ストレスにより HSP70 を高発現させた SCCVII との共培養では樹状細胞の成熟化はわずかに認めるのみであった。SCCVII の免疫原性が極めて低いことが理由として考えられた。腫瘍への 43°C30 分の温熱ストレスに加え、共培養下に 41°C30 分のマイルド加温を行うことで、樹状細胞は CD80、MHC class II の発現が有意に上昇し、成熟化した。一方、腫瘍を 43°C に加温しない場合、共培養下にマイルド加温を行っても樹

樹状細胞は成熟化しなかった。また、樹状細胞単独でマイルド加温を行っても成熟化は認めなかった。

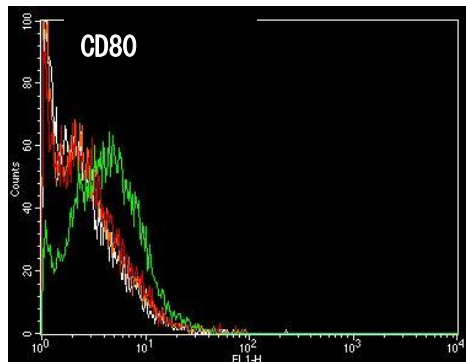


マイルド加温を追加することで、CD80、MHC class II の発現が亢進しており、樹状細胞が成熟化している。

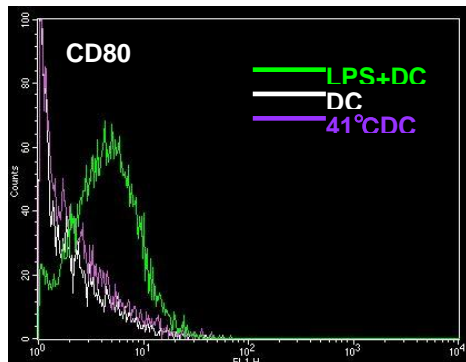


- ①黒：HT(-)SCCVII + iDC (control)
- ②橙：HT(+)SCCVII + iDC
- ③赤：HT(+)SCCVII + iDC + mHT
- ④緑：LPS + iDC (positive control)

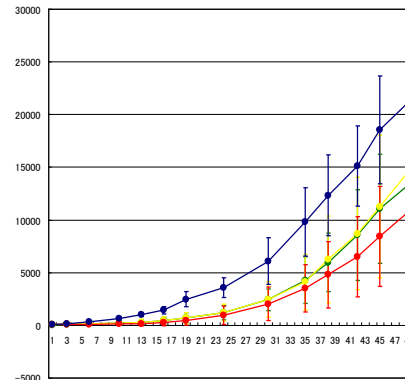
加温していない腫瘍との共培養下でのマイルド加温→樹状細胞の成熟化なし



樹状細胞単独でマイルドに加温→樹状細胞の成熟化なし



(4) 担癌マウスを用いた実験では、コントロール群と治療群の間で有意差を認めた。また、治療群間では有意差は認めないものの、腫瘍の加温、樹状細胞、マイルド加温の3ステップの治療で腫瘍の増殖抑制傾向があった。



- 青：未治療群
- 緑：HT+iDC
- 黄：HT+mHT
- 赤：HT+iDC+mHT

in vitro において SCCVII を加温するのみでは樹状細胞を成熟化させることはできなかったが、腫瘍細胞への温熱ストレスに加えて樹状細胞自身をマイルドに加温することで活性化させることができた。これはマイルドな温熱刺激により樹状細胞の抗原の取り込み能が亢進したためと考えられる。本研究から、①腫瘍局所を43℃に加温、②腫瘍局所に未熟樹状細胞を注入、③腫瘍・樹状細胞をマイルド(41℃)に加温するという3ステップを繰り返すことが、この併用療法の有効なプロトコールになりうる事が予想される。

近年、マイルドな加温が免疫系を活性化させるという報告がされてきている。しかし、マイルドな追加加温によって、抗原性の低い腫瘍であっても樹状細胞を活性化できることを示した報告はこれまでにない。また、温熱療法、樹状細胞療法、マイルド加温療法を効果的に併用する方法もこれまでに報告がない。

今後、さらに治療スケジュールや腫瘍転移抑制効果、免疫組織化学的な検討も必要と考える。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に

は下線)

〔学会発表〕(計4件)

①松本行史、山本憲幸、扁平上皮癌に対する樹状細胞を用いた磁場誘導組織内温熱免疫療法の研究、日本口腔外科学会総会、2009年10月9日、札幌コンベンションセンター

②山本憲幸、頭頸部癌に対するマグネタイトカチオニックリポソームを用いた磁場誘導組織内加温療法－樹状細胞を用いた温熱療法－、日本ハイパーサーミア学会、2009年9月11日、千葉大学西千葉キャンパス内けやき会館

③松本行史、山本憲幸、Hyperthermia using magnetic nanoparticles combined with intratumoral dendritic cells enhance antitumor effect、International Academy of Oral Oncology、2009年7月9日、Sheraton Centre Toronto Hotel

④山本憲幸、頭頸部癌に対するマグネタイトカチオニックリポソームを用いた磁場誘導組織内加温療法－樹状細胞を用いた温熱免疫療法 関東ハイパーサーミア研究会、全身ハイパーサーミア研究会合同学術研究会、2009年2月21日、横浜市立大学エクステーションセンター

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 憲幸 (YAMAMOTO NORIYUKI)
名古屋大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：60378156