

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 16 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22791971

研究課題名（和文）口腔癌転移モデルに対する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 for oral cancer metastasis model.

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）：

本研究の目的は、口腔扁平上皮癌転移モデルに対する温熱療法（HT）と樹状細胞（DC）を用いた新規な併用療法の可能性を探求し、この療法の条件を最適化することである。

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°C 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°C 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°C 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、また細胞障害性 T 細胞（CTL）は優位に腫瘍に浸潤していた。さらに、マウス転移モデルにおいて局所治療を行うことで腫瘍特異的な免疫が誘導され転移巣の抗腫瘍効果を認めた。このことから、腫瘍に対する加温（43°C）、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（41°C）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）：

The aims of this study were to explore the feasibility of a novel combination therapy comprising hyperthermia (HT) and dendritic cell (DC) application for oral squamous cell carcinoma (OSCC) metastasis model, and to optimize the conditions of this therapy. A more suppressive effect of tumor growth was observed, and cytotoxic T cell infiltration was significantly increased by adding mHT compared to conventional only simple HT with DCs. These phenomena also occurred in non-treated contralateral tumors as well as treated ones. Our data suggest that the combination of 43 °C preheated simple HT SCCVII tumors and additional 41 °C heat mHT promotes DC maturation, resulting in suppression of tumor growth systemically and lifetime prolongation in mice. A three-step process of additional mHT after local HT and intratumoral immature DC (iDC) injection could be a more effective and novel method for the treatment of OSCC.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

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、免疫療法、口腔癌、扁平上皮癌、磁性微粒子、樹状細胞、マイルド加温

1. 研究開始当初の背景

現在までに、温熱療法の基礎的研究において磁性ナノ微粒子を用いた磁場誘導組織内温熱療法は、確実な温度上昇による優れた抗腫瘍効果を示してきた。われわれはこれまでに、ウサギ舌扁平上皮癌モデルに対しての磁性微粒子の舌組織内投与により、原発巣およびリンパ行性に磁性微粒子を移行させ選択的に頸部リンパ節転移巣のみを加温することに成功している。

また、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得ることが報告されている。最近、免疫賦活に関しては、癌細胞が壊死して発生する熱ショックタンパク質 (Heat shock protein, HSP) が抗腫瘍効果をもたることが近年報告されている。HSPは、元来生体が持っているストレスに対する防御機構であるが HSP70,90 といった HSP が癌細胞内で腫瘍抗原をシャペロンしていることが報告され、米国では Srivastava らにより HSP-抗原ペプチド複合体を精製して腫瘍ワクチン療法が行なわれている。この磁性ナノ微粒子を用いた温熱療法は 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 class I 抗原の増強があり腫瘍細胞の免疫原性を高めていることを確認している。さらに抗原提示能をより高めるために、抗原提示細胞として樹状細胞(Dendritic cell, DC)に着目した。従来の DC による免疫療法と異なる点は、患者の体外で培養、増幅した未熟 DC(imature dendritic cell,iDC)を、未熟の状態のまま加温部位に投与する点である。iDC は、壊死した癌細胞から放出された HSP-癌抗原ペプチドを貪食することで成熟し、所属リンパ節へ遊走して naïve T 細胞に抗原提示を行い、結果、全身性の腫瘍免疫能の賦活が得られる。

2. 研究の目的

今回の研究では、口腔癌の大多数を占める扁平上皮癌を用い、また、MCLs を使用した磁場誘導組織内加温を用いて腫瘍部位のみを

特異的に加温することによる原発巣及び転移巣の抗腫瘍効果および免疫系の賦活化に着目し抗腫瘍免疫についての研究を行う。

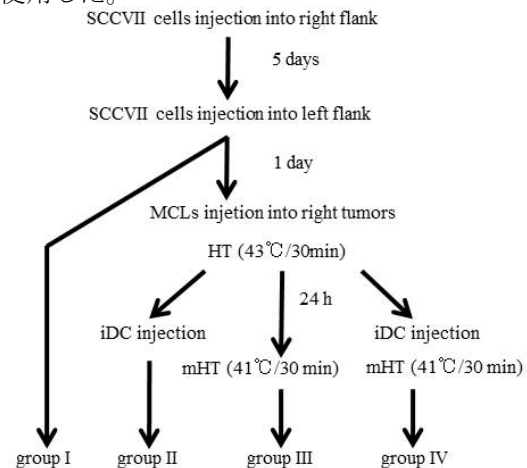
3. 研究の方法

(1) 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 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。

(2) *in vivo*における抗腫瘍効果の検討

C3H/HeJ マウスの右背部皮下に SCCsVII 細胞株を 5×10^5 の細胞を移植した。移植後 5 日目に腫瘍径が約 6mm になったのを確認し、左側皮下に SCCsVII 細胞株を 5×10^5 の細胞を移植した。右側腫瘍移植後 6 日目 group I : コントロール、group II : HT+iDC、group III : HT+mHT、group IV : HT+iDC+mHT として右側の腫瘍のみを治療した。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。左側は転移モデルとして使用した。



(3) 組織学的評価 (HE)

治療後 7 日目に腫瘍を切除し HE 染色し組織学的に検討を行なった。

(4) 免疫組織化学的検討

治療後 7 日目に腫瘍を切除し、パラホルムアルデヒドで固定後 CD8 にて免疫染色を行なった。

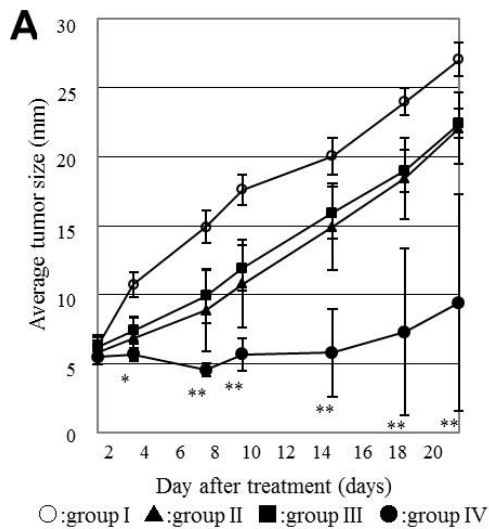
(5) 生存率

治療後80日間それぞれの生存率を確認した。

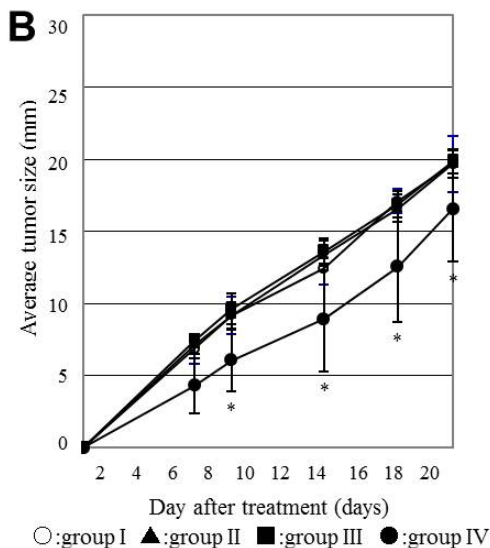
4. 研究成果

(1) マウス骨髄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た。

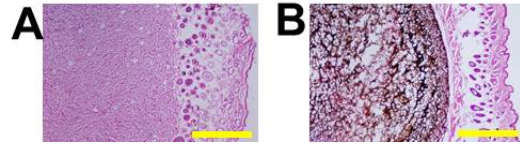
(2) *in vivo* における抗腫瘍効果の検討
右側の治療群においてはHT:43°C30分の加温に加え、iDC注入群 (group II) あるいはmHT:41°C30分の加温 (group III) ではコントロールと比較して腫瘍増殖に優位さを認めなかった。iDC注入後にmHT:41°C30分の加温 (group IV) を行なった群ではコントロール、その他の治療群に比較し優位に腫瘍増殖抑制を認めた。



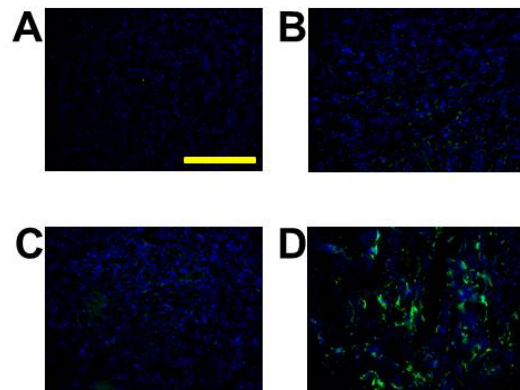
左側の無治療腫瘍においては右側と同様に group II, group IIIではコントロールと比較して腫瘍増殖に優位さを認めなかった。group IVではコントロール、その他の治療群に比較し優位に腫瘍増殖抑制を認めた。



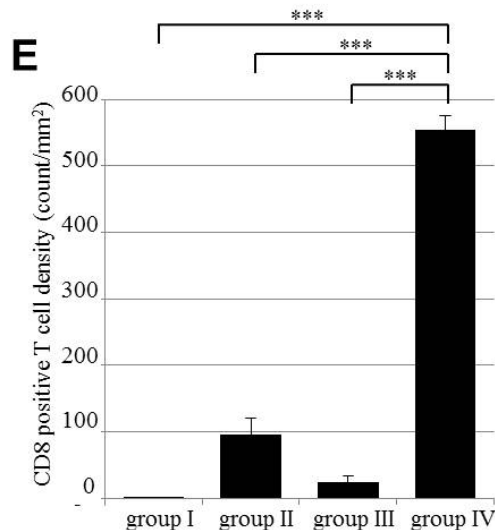
(3) 治療7日後に腫瘍を切除しHE染色にて組織学的評価を行なった。コントロール軍に比較し温熱療法軍では腫瘍の中にびまん性にMCLが広がっており、腫瘍細胞はネクローシスを起こしていることを確認した



(4) 治療7日後に腫瘍を切除しCD8(+)の細胞を蛍光免疫染色にて評価を行なった。右側治療側において、group IにおいてはCD8+の細胞は認めなかった。group IIにおいて若干のCD8+の細胞を認めた。group IVではその他の群に比較し優位にCD8+T細胞の浸潤を認めた。

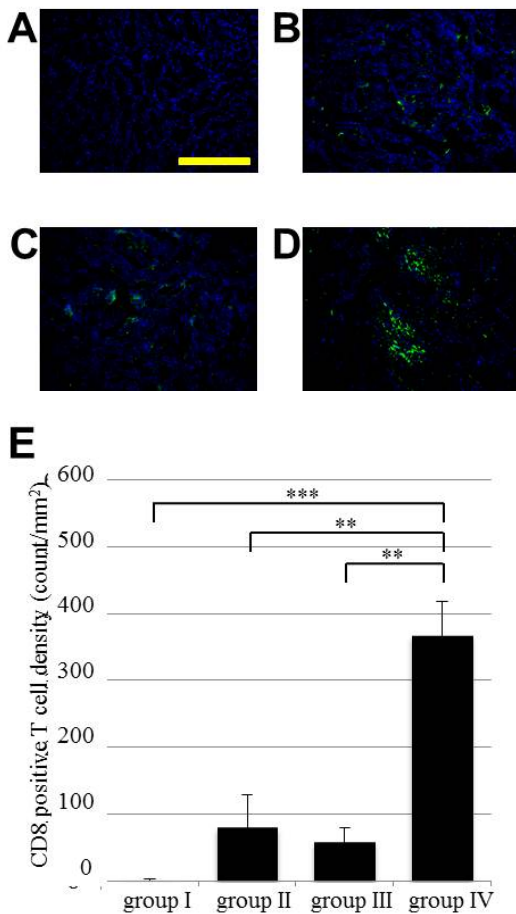


A: group I, B: group II, C: group III, D: group IV



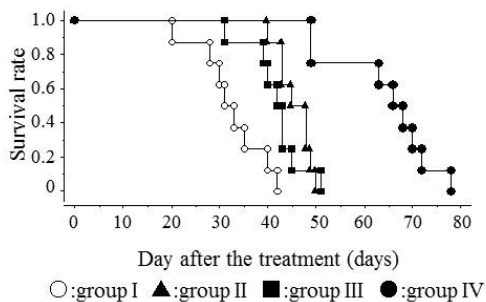
左側も同様に治療7日後に腫瘍を切除しCD8(+)の細胞を蛍光免疫染色にて評価を行なった。group IにおいてはCD8+の細胞は認めなかった。group IIにおいて若干のCD8+の細胞を認めた。group IVではその他の群に比較

し優位に CD8+T 細胞の浸潤を認めた。



(5) 生存率

コントロールに比較して group II, IIIでは若干の生存率の延長を認めた ($P<0.05$)。group IVにおいてはさらに生存率の延長を認めた ($P<0.01$)。



これまでわれわれは、抗原提示能が低い細胞において腫瘍細胞を加温するのみでは樹上細胞を成熟化することができないことを確認し、マイルド加温を加えることにより抗原提示細胞である樹上細胞を活性化することを報告してきた。

今回の研究により、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、CTL を強く誘導すること

を確認した。また、転移層においても CTL の浸潤を認め腫瘍増殖抑制を認めた。

温熱療法、樹状細胞療法、マイルド加温療法を加えた治療は抗原提示能の低い腫瘍にも効果があり、転移巣にも増殖抑制を示した。低侵襲で新たながん治療の方法として期待される。

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)

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Matsumoto Koshi, Yamamoto Noriyuki. Optimization of hyperthermia and dendritic cell immunotherapy for squamous cell carcinoma. *Oncol Rep.* 査読有り. 25(6): 2011; 1525-32.

[学会発表] (計 2 件)

- ① 山本憲幸、第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、56 回(社)日本口腔外科学会総会・学術大会、2011 年 10 月 22 日、大阪 大阪国際会議場
- ② 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温熱免疫療法と追加マイルド加温の効果、第 34 回日本頭頸部癌学会、2010 年 6 月 11 日、東京・新宿 京王プラザホテル

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

(2) 研究分担者なし