

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24593026

研究課題名(和文) 口腔癌に対する磁場誘導組織内温熱免疫療法の最適化

研究課題名(英文) Optimization of hyperthermia and immunotherapy for squamous cell carcinoma.

## 研究代表者

山本 憲幸 (YAMAMOTO, NORIYUKI)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：60378156

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、口腔扁平上皮癌肺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。

抗原性が極めて低い腫瘍の肺転移に対して、腫瘍に対する加温(43℃)、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℃)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口腔癌の治療法になりうると思われる。

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) occult pulmonary metastasis model, and to optimize the conditions of this therapy. Our data suggest that the combination of 43℃ preheated simple HT SCCVII tumors and additional 41℃ heat mHT promotes DC maturation, resulting in suppression of tumor growth systemically and lifetime prolongation in occult pulmonary metastasis model 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.

研究分野：医歯薬学

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

1. 研究開始当初の背景

近年、再建外科をはじめとする手術方法の進歩や、集学的治療の開発により進行口腔癌の治療成績は向上してきている。しかし、局所制御率、QOL は改善してきているものの、再発、転移により予後不良となることは少なくない。再発、転移においては局所療法中の微小残存病変、微小転移が生じる可能性があり、治療を難しくしている。がん治療において生存率を上げるために、副作用が少なく再発・転移を制御できる治療法として、温熱療法や免疫療法が注目されるようになった。

われわれはこれまでに、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。ウサギ舌扁平上皮癌モデルに対して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層のみを加温することに成功している。

また、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) が抗腫瘍効果を高めることが報告された。それらは、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、近年、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。さらにわれわれは、抗原提示能をより高めるために、抗原提示細胞として未熟樹状細胞 (immature dendritic cell, iDC) に着目した。加温部位に直接投与すると 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する。成熟した DC は所属リンパ節へ移行し CTL を活性化左折。われわれはメラノーマ細胞株を用いてその抗腫瘍効果を確認した。しかし、免疫原性の低い腫瘍細胞では iDC の成熟化は低く抗腫瘍効果は認めなかった。樹状細胞と同じ抗原提示細胞のマクロファージは 40 の温熱処理にて貪食能が 40% 程度増加する。また、40 の温熱ストレスは樹状細胞の所属リンパ節の移行を促進することが知られている。そこでわれわれは、免疫原性の低いマウス扁平上皮癌腫瘍株 (SCC) を用いてマイルド加温 (41) を組み合わせる基礎研究を行った。腫瘍細胞を直接磁場誘導組織内加温にて治療し樹状細胞を注入した後にマイルド加温を加える 3 ステップの方法にて抗原性の低い腫瘍であっても樹状細胞を活性化できた。また、活性化した樹状細胞は所属リンパ節へ遊走して CTL を強く誘導することを確認した。

2. 研究の目的

本研究では、マウス扁平上皮癌細胞株 (SCC) 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し、iDC を局所注入後にマイルド加温を加えることによる原発巣、微小肺転移巣の抗腫瘍効果および免疫系の賦活化に着目し温熱免疫療法の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

動物実験は名古屋大学における動物実験等に関する取扱規程に従って行った。腫瘍細胞はマウス可移植性であり抗原性の低いマウス扁平上皮癌細胞株 SCC を使用し、マウスは C3H/HeJ マウスを使用した。6 週齢の C3H/HeJ マウスの尾静脈より SCCsVII 細胞株を  $5 \times 10^5$  の細胞を注入した。同時に背部皮下に SCCsVII 細胞株を  $5 \times 10^5$  の細胞を移植した。移植後 5 日目に背部皮下腫瘍径が約 6mm になったのを確認し group : コントロール, group : 温熱療法 (43) + 未熟樹状細胞注入 (HT+iDC), group : 温熱療法 (43) + マイルド加温 (41) (HT+mHT), group : 温熱療法 (43) + 未熟樹状細胞注入 + マイルド加温 (41) (HT+iDC+mHT) として背部皮下腫瘍を治療した。抗腫瘍効果判定は腫瘍径を連日測定し評価した。

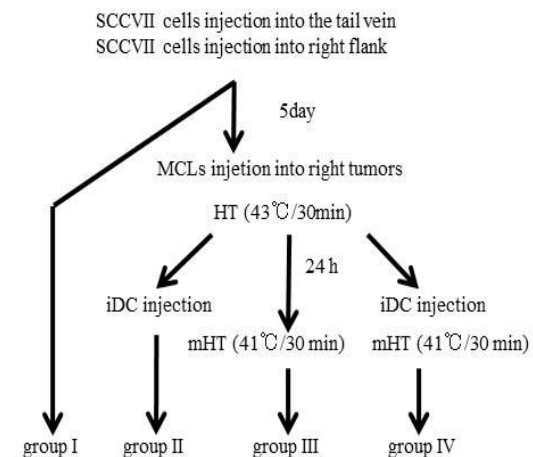


図 1 : *in vivo* における治療方法

(3) 組織学的評価 (HE)

治療後 7 日目に全身麻酔下に腫瘍を摘出し 10%ホルマリン液にて固定した。標本はパラフィンに包埋し、4 μm の切片を作成し HE 染

色し組織学的に検討を行なった。

(4) 微小肺転移の抗腫瘍効果  
それぞれのグループにおいて、尾静脈より腫瘍細胞を注入3週後にマウスを屠殺し肺転移の小結節の数をカウントした。

(5) 生存率  
それぞれのグループにおいて、治療後60日間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。(図2)

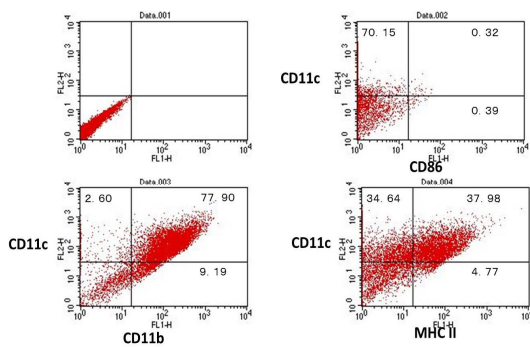


図2：樹上細胞の表面抗原の発現

(2) *in vivo* における抗腫瘍効果の検討  
背部腫瘍治療群においてはHT:43 30分の加温に加え、iDC注入群(group )あるいはmHT:41 30分の加温(group )ではコントロールと比較して腫瘍増殖に優位差を認めなかった。iDC注入後にmHT:41 30分の加温(group )を行なった群ではコントロール、その他の治療群と比較し優位に腫瘍増殖抑制を認めた。(図3)

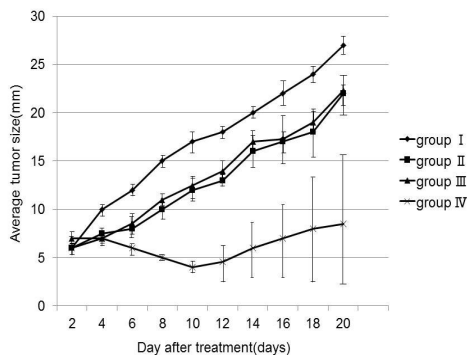


図3：腫瘍サイズの変化

(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。コントロール群と比較し温熱療法群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。(図4)

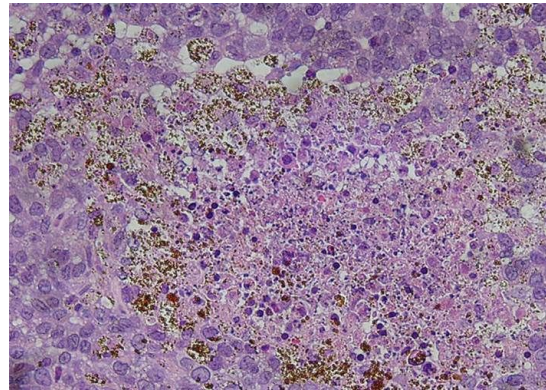


図4：治療部位の組織像

(4) 肺転移巣においては、背部皮下腫瘍と同様にgroup、group ではコントロールと比較して小結節の数に優位差を認めなかった。group ではコントロール、その他の治療群と比較し優位に小結節の数が少なく抗腫瘍効果を認めた。(図5)

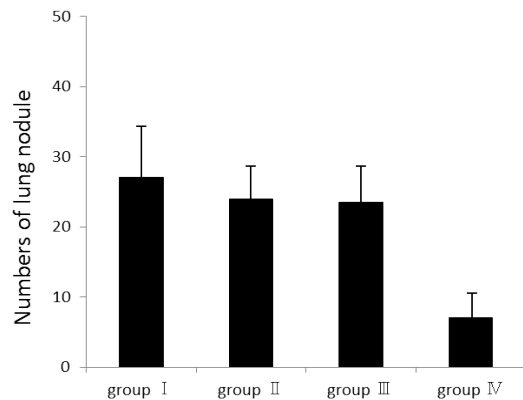


図5：肺転移巣の抗腫瘍効果

(5) 生存率  
コントロールと比較してgroup、group では若干の生存率の延長を認めた。group においてはさらに生存率の延長を認めた。(図6)

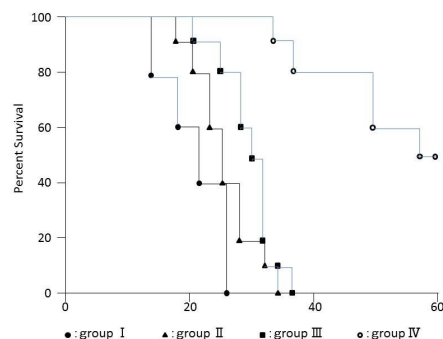


図6：生存率

これまでにわれわれは、抗原提示能が低い腫瘍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。また、成熟した樹状細胞は所属リンパ節へ遊走してCTLを強く誘導した。

今回の研究により、微小肺転移モデルにおいて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た。また、微小肺転移巣にも増殖抑制を示した。

低侵襲で肺転移に対する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)

[学会発表](計1件)

Noriyuki Yamamoto. Optimization of hyperthermia and immunotherapy for squamous cell carcinoma. 21<sup>st</sup> International Conference on Oral and Maxillofacial Surgery. 2013.10.21-24. BARCELONA SPAIN

## 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