

《解 説》

温熱療法に伴う免疫賦活のメカニズム

小林 猛*

中部大学応用生物学部

はじめに

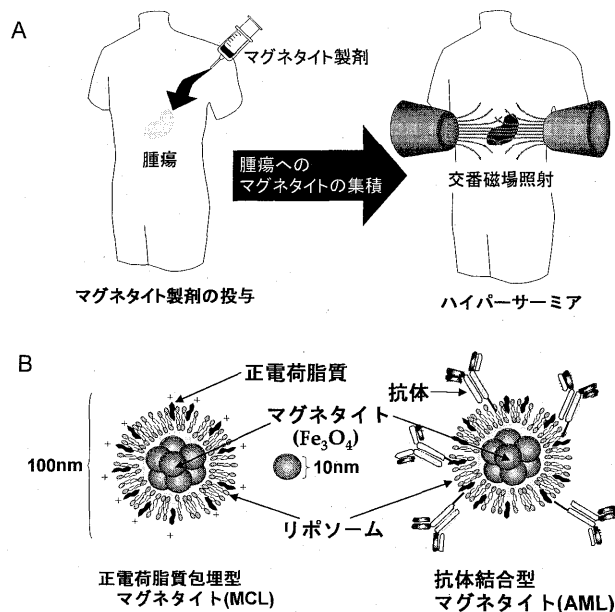
温熱療法（ハイパーサーミア）は古くから行われてきたガン治療法であり，ガン組織は正常組織に比べて熱に弱いという性質にもとづいている．しかし，いまだ温熱療法は外科手術，化学療法，放射線療法に代わるほどの強力なガン治療法にはなっていない．その一因としては，ガン組織だけを自在に加温する技術が開発されていないことがある．ガン細胞は42.5℃以上に加温すると殺傷される．現行の温熱療法では，正常組織も同時に加温されるので，正常組織への加温の影響を考えて，42.5℃程度まで加温するのが限界であり，実際にはガン組織も余り殺傷されない．もし，正常組織が加温されずに，ガン組織だけを43℃以上に加温することができれば，固形ガンであればどのような種類のガン細胞であっても死滅させることができるはずである．

我々は，後述するマグネタイト微粒子を用いた磁場誘導型の温熱療法によって，腫瘍部位の温度を何度にも上げることができるようにした．このことによって，これまでの「熱で直接的にガンを殺す治療法」とみなされてきた温熱療法からは全く予想できなかった生体反応が観察された．すなわち，瞬時に43℃以上に加温することによるガン細胞における温熱耐性の打破であり，もっと重要なことにはガン免疫の賦活効果である．このことは，原発ガンのみを温熱治療すれば転移ガンをも免疫によって殺傷できる可能性を秘めている．我々はこの腫瘍免疫を誘導する温熱療法を“Heat Immunotherapy”と名付け，そのメカニズムについて熱ショックタンパク質（Heat shock protein, HSP）に着目して調べた（Ito. et., 2003. 2001）本稿では温熱療法によって誘導される免疫賦活のメ

カニズムについて，これまでの我々の研究結果を中心に解説する．

マグネタイト微粒子を用いた磁場誘導加温型温熱療法

ガン組織を選択的に加温するために，酸化鉄の10nmサイズの磁性ナノ微粒子であるマグネタイト（Fe₃O₄）を発熱体とする誘導加温型の温熱療法



第1図. マグネタイト微粒子を用いた温熱療法.

A) 治療スキーム．マグネタイト製剤を投与して腫瘍に集積させた後，交番磁場を体外から照射する．磁場によってマグネタイト微粒子は発熱してガン組織を特異的に殺す．加温温度は磁場発生装置の出力によって調節できる．

B) 二種類のマグネタイト製剤．MCL（左）は腫瘍に直接投与すると，静電的相互作用によって腫瘍内に留まる．AML（右）は血中投与すると，抗体が腫瘍と結合することで腫瘍組織に集積する．

キーワード：マグネタイト，熱ショックタンパク質，温熱療法，リポソーム，腫瘍免疫

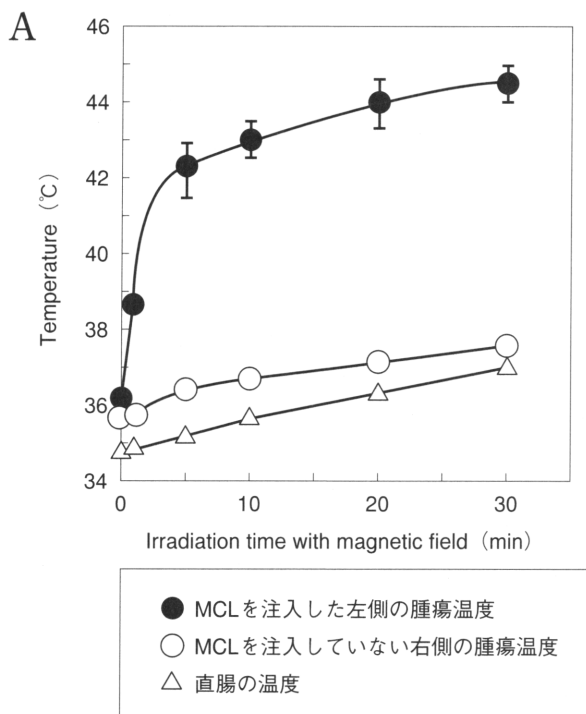
受 理 日：2004年2月6日受理

* 名古屋大学大学院工学研究科教授，2002年から中部大学応用生物学部で応用微生物学概論担当（非常勤講師），2004年4月，中部大学教授．

を開発した (Yanase, et al., 1998) 第1図 [A] に我々が開発したマグネタイトを用いた磁場誘導加温型の温熱療法のスキームを示す。マグネタイトは交番磁場中で主としてヒステリシス損失によって発熱する。したがって、マグネタイト微粒子を腫瘍部位に選択的に集めることができれば、患者の外部から交番磁場を照射することによって、ガン特異的な加温ができる。我々はすでに、マグネタイト微粒子を腫瘍に選択的に送達するために、リポソームで包埋して、さらにガン特異的な抗体を結合させたマグネタイト製剤 (Antibody-conjugated magnetoliposome, AML) を開発した (Skinkai et al., 2001)。この場合には、血中投与によって約6割が腫瘍に選択的に集積する。また、遺伝子治療で用いられる遺伝子導入用のベクターであるカチオニックリポソームでマグネタイト微粒子を包埋することで、正電荷脂質包埋型マグネタイトリポソーム (Magnetite cationic liposome, MCL) も開発した (Yanase et al., 1998a)。この場

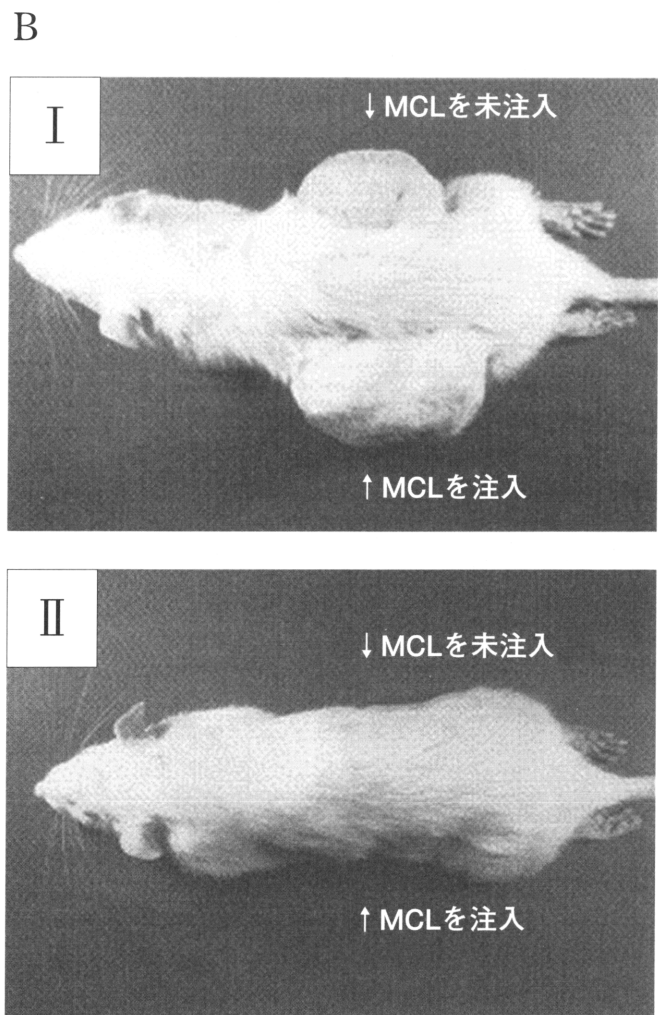
合には、腫瘍組織に注射することによって静電的な相互作用によって約6割が腫瘍に留まる。AMLとMCLの模式図を第1図 [B] に示す。このマグネタイト微粒子を用いた温熱療法によって、様々な動物種 (マウス、ラット、ハムスター、ウサギ) に対して、脳腫瘍、皮膚ガン、舌ガン、乳ガン、腎細胞ガン、骨肉腫で腫瘍の退縮に成功している (発表論文リストはページ数の関係で省略した)。

興味深いことに、我々はマグネタイト微粒子を用いた温熱療法によって、抗腫瘍免疫が賦活されることを、第2図に示すような、腫瘍をラットの両体側に移植する動物実験で見出した (Yanase et al., 1998b)。両体側のT-9ラットグリオーマの皮下腫瘍のうち、左側の腫瘍にだけMCLを注入して交番磁場を照射したところ、第2図 [A] に示すように、MCLを注入した左側の腫瘍は44℃まで温度が上昇した。一方、MCLが注入されていない右側の腫瘍や直腸は温度がほとんど上昇しなかった。温熱療法を施行した28日後、温度上昇があ



第2図. マグネタイト微粒子を用いた温熱療法における腫瘍免疫の賦活。

A) 交番磁場照射による腫瘍特異的な発熱。
B) 免疫賦活による治療効果。交番磁場照射を行わないラットでは両体側の腫瘍は増大した (I) が、左側の腫瘍にMCLを注入して交番磁場照射したラットでは、A) のように左側の腫瘍のみ温度が上昇するが、右側の腫瘍も免疫によって退縮した (II)。



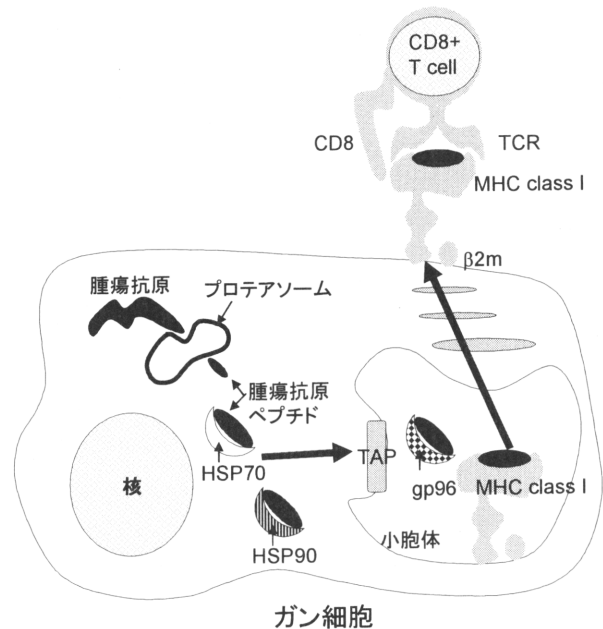
った左側の腫瘍だけでなく、温度上昇が観察されなかった右側の腫瘍まで完全に退縮した（第2図[B-II]）。また、温熱療法後の腫瘍組織内にCD8陽性T細胞、CD4陽性T細胞、およびナチュラルキラー（NK）細胞が集積していることが観察された。さらに、脾細胞を用いた免疫細胞による細胞障害活性測定を行ったところ、T-9細胞に特異的な全身性の抗腫瘍免疫が活性化していることがわかった。本治療法は、腫瘍局所における選択的な温熱療法であるにもかかわらず、直接加温されない全身のガン（転移ガンを含む）に対しても免疫賦活によって治療効果を示すといった、ガン治療の理想を実現可能にする治療法であると考えられた。

この免疫賦活メカニズムを解明することは、我々の温熱療法のシステムにおける従来のガン治療法に対する優位性を示すことができるだけでなく、そのメカニズムを応用した新しい観点のガン治療法の開発につながる。そこで、温熱療法における免疫賦活のメカニズムについて、いかにしてガンが抗原として免疫細胞に認識されるかをHSPに着目して研究を行った。

温熱療法とガン免疫におけるヒートショックプロテインの役割

HSPは熱ショックタンパク質という名が示す通り、熱をはじめとするストレスで細胞内発現が誘導されるタンパク質である。ここで、細胞内のHSP発現は分子シャペロンとしてストレスによって変性したタンパク質を保護する働きがあることが知られており、温熱で誘導されるガン細胞のアポトーシスを抑制することから、温熱療法においては温熱耐性を引き起こす因子として、治療効果に対してデメリットと考えられてきた。温熱療法の利点として、腫瘍を温める物理的な治療法であることから何度でも施行することが可能であるが、温熱耐性が引き起こされるといった理由から、従来の温熱療法ではHSP発現、特にHSP70発現が消失するまで次の温熱療法を施行しないといった治療プロトコルで行われてきた。

一方、HSP70やHSP90、gp (glucose-regulated protein) 96といったHSPが、ガン免疫において重要な役割を果たしていることが明らかになった（Srivastava et al.,1998）。ガン細胞内におけるHSPの腫瘍免疫における役割については、腫瘍抗原ペ



第3図. HSPによる腫瘍抗原ペプチドのリレーモデル. HSPファミリーは、腫瘍抗原ペプチドをMHC class I分子へ運搬することで、ガン細胞の抗原提示に寄与する。

プチドのプロセッシングおよび抗原提示における抗原ペプチドの輸送があり、Srivastavaらによって“relay line model”として提唱されている（Srivastava et al.,1998）。このモデルの概略図を第3図に示す。まず、(1) 免疫プロテアソーム複合体によって切り出されたペプチドは、細胞質内でHSP70などにシャペロンされる。これらのHSPは抗原ペプチドをTAP (transporters associated with antigen processing)を介して小胞体内に運搬する。(2) 小胞体内で抗原ペプチドはgp96にシャペロンされる。そして、(3) gp96は抗原ペプチドをMHC class I / $\beta 2$ ミクログロブリン複合体へ輸送する。この“relay line model”からは腫瘍免疫におけるHSPの二つの重要な意義を見出すことができる。一つ目は、HSPが腫瘍細胞表面におけるMHC class I分子の抗原提示を促進させる役割を果たすという点である。HSP70を高発現させることで、ガン細胞自身がMHC class Iを介した抗原提示を活発に行い、ガン細胞が免疫担当細胞（特にガン細胞特異的なCD8陽性T細胞）に攻撃されやすくなる。もう一つの重要な知見は、HSPがガン細胞内で腫瘍抗原ペプチドをシャペロンしているという点である。Srivastavaのグループは、患者の腫瘍からHSP70-抗原ペプチド複合体を精製して、それをガンワクチンとして利用する試みを行っている（Srivastava et al.,1998）。ここで重要なのは、

実際にガン特異的抗原として機能するのはHSP自身ではなく、それにシャペロンされたペプチドということである。近年、多くのガン抗原ペプチドが同定されてきたが、一種類のペプチド抗原によるワクチン投与は、治療効果が乏しいことが問題になっている。一方、患者の腫瘍から精製されたHSP-抗原ペプチド複合体は、HSPが多様な抗原ペプチドをシャペロンしていることが期待でき、また、それらの抗原は患者自身の腫瘍から摘出されることから、HSP-抗原ペプチド複合体ワクチンは患者に対するテーラーメイド (tailor-made) ガンワクチンといえる。

このように、ガン細胞によるHSP発現は、温熱療法においてデメリット、腫瘍免疫においてはメリットとして考えられてきた。前述したように、HSPが温熱療法で発現するのは当然である。したがって、もし、温熱療法におけるHSP発現がガン免疫を強く誘導するのであれば、温熱療法は非常に効率のよいガン治療法といえる。このようなことから、我々は以下に述べる研究仮説を組み立て、温熱療法におけるガン免疫賦活のメカニズムを調べた。

温熱療法によるガン細胞の免疫原性の亢進

我々は、温熱によるHSP70発現誘導によって、MHC class I の細胞表面密度が増強されるかを調べた (Ito et al., 2001)。研究仮説の概略図を第4図に示す。

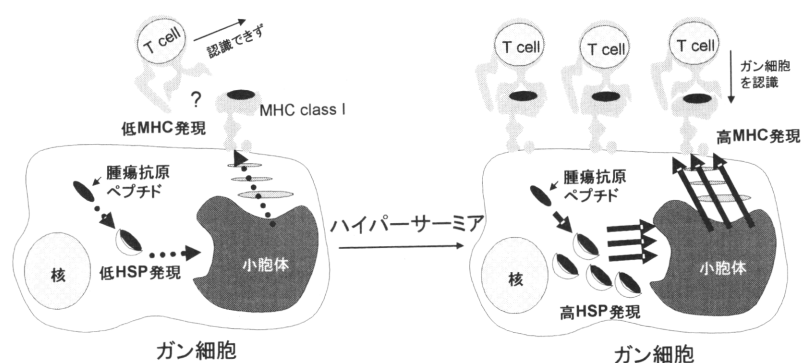
T-9細胞に対して43℃で1時間の加温を施したところ、温熱24時間後にHSP70発現のピークが見られた (Ito et al., 2001)。このHSP70の温熱による発現誘導は、加温48時間後には消失した。つま

り、一過性のHSP70発現誘導がおこった。この温度条件において、加温後の経時的な細胞表面のMHC class I 発現をフローサイトメーターで調べた。温熱しなかった細胞と比較して、温熱した細胞のMHC class I は、温熱24時間後から発現増強が起こり、48時間後には最大2倍程度のMHC class I 密度の増強が見られた。この発現増強は72時間後には消失したことから、一過性の発現増強であった。このMHC class I の発現増強パターンは、HSP70の発現誘導パターンと類似しており、また、HSP70発現誘導に遅れてMHC class I 発現の増強が始まることから、HSP70発現とMHC class I 増強はタンデムであることが示唆された。また、このMHC class I 増強は、細胞内でHSP70と結合してペプチド輸送を阻害する薬剤であるDSG (deoxyspergualin) を投与することによって減少したことから、HSP70の運搬能が関与していることが示された。

次に、この温熱処理によるMHC class I 発現の増強が、ガン細胞の免疫原性を高めているかを調べた (Ito et al., 2001)。上記実験と同じ条件 (43℃, 30分; この温度条件ではT-9細胞は細胞死を起こさない) で加温したT-9細胞をF344ラットに接種したところ、温熱しなかった細胞と比較して有意に腫瘍増殖が抑制された。この効果が、温熱による細胞へのダメージではなく、免疫の影響であることを確かめるために、F344の無胸腺ラット (ヌードラット) に接種したところ、温熱した細胞と温熱しなかった細胞で腫瘍の増殖に差がなかった。無胸腺ラットでは、ガン細胞が提示するMHC class I 分子を認識して攻撃するT細胞が欠損している。このことから、温熱によって増強

された細胞表面MHC class I は、T細胞によって認識されることがわかった。また、脾臓を用いた免疫担当細胞の殺細胞活性測定を行ったところ、温熱した細胞を接種すると腫瘍特異的な細胞性免疫が賦活されることを確かめた。

以上のことから、温熱療法においてもHSP70発現とMHC class I による抗原提示に相関があり、温熱療法によってガン細胞自身がMHC class I 発現を増強して、免疫系に認識されやすくなることが示され



第4図. 温熱療法によるガン免疫誘導のメカニズム-その1
温熱療法によるガン細胞内HSP発現誘導でMHC class I 増強が誘導される。

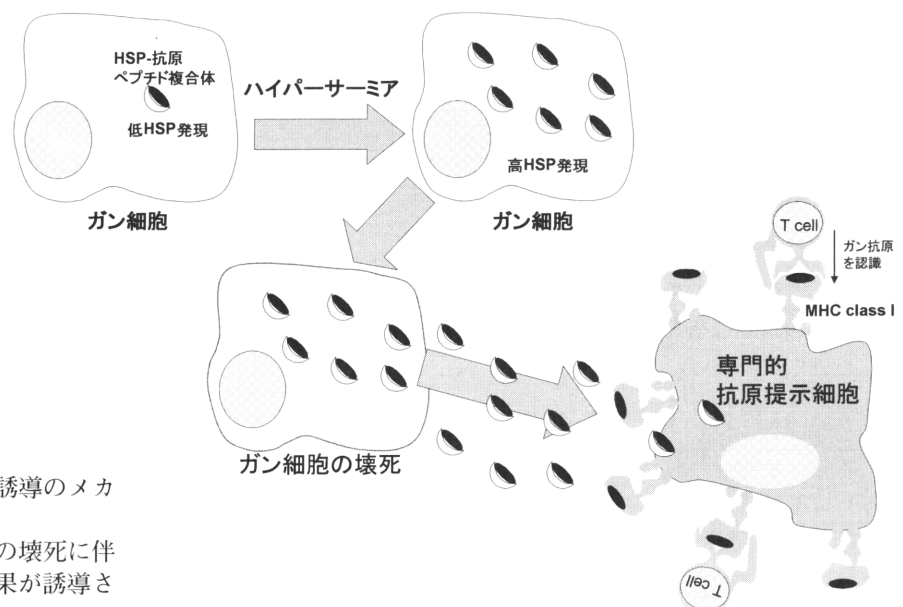
た．このことが，我々が解明した一つ目のメカニズムである．

温熱療法によるガン細胞の壊死に伴うHSPワクチン放出

HSP70等のHSPはガン細胞内で抗原ペプチドをシャペロンしている．上述したように，ガン細胞からHSP-抗原ペプチド複合体を精製して，ワクチンとして利用されている．患者にガンワクチンとして投与されたHSP-抗原ペプチド複合体は，樹状細胞（Dendritic cell, DC）等の専門的抗原提示細胞（Antigen presenting cell, APC）のCD91レセプター等の特異的レセプターと結合する（Basu et al., 2001）．レセプターと結合したHSP-抗原ペプチド複合体はエンドサイトーシスによって取り込まれ，APC内のMHC class I 提示経路のプロセッシングを受けて，抗原ペプチドはMHC class I によって細胞表面に提示される．この現象は，本来ガン細胞自身のMHC class I によって提示されるべき抗原ペプチドが，APCによって代わりに提示されることから，クロスプライミング（cross-priming）と呼ばれる．ここで，専門的抗原提示細胞であるDCは，ガン細胞とは比較にならないほどの強力な抗原提示能を有する．一方，HSP70自身がAPCを刺激するサイトカインであるといった報告もある（Basu et al., 2001）．この場合，抗原ペプチドの有無に関わらず，HSP70はCD14と結合してDCの成熟や単球からのサイトカイン放出を誘導する．この生体反応は自然免疫

（Innate immunity）の活性化を意味し，HSPは生体が本来備えている自然のアジュバントであることを示唆する．古典的には，免疫とは「非自己に対する反応」として認知されてきたが，特にガンにおいては自己—非自己の概念が当てはまりにくい．このことから，特にガン免疫では「自己—非自己」ではなく，いかに生体にとって「危険（Danger）」であるかが重要であると考えられている（Nagamine et al., 1993）．この理論において，HSPは細胞がストレスに曝されると発現するタンパク質であることから，重要な“Danger signal”になると考えられる．特に，HSP-抗原ペプチド複合体のワクチン投与では，本来細胞内に存在するHSPが血中で感知されるといった状況になり，生体にとって危険であると認識されるシステムが備わっていることが容易に想像できる．一方，ガン細胞から精製しなくても，何らかの原因でガン細胞が死んだ場合に，HSP-抗原ペプチド複合体が細胞外へ放出されて免疫系に認識される可能性がある．我々は，温熱療法においてHSP発現が増強し，さらにガン細胞が熱で壊死することによって，細胞内からHSP-抗原ペプチド複合体が放出され，ガンワクチン化が起こっているのではないかと考えた．研究仮説の概略図を第5図に示す．

マグネタイト微粒子を用いた温熱療法のシステムでは，マグネタイト微粒子自身が発熱する．したがって，マグネタイト微粒子の腫瘍内における分布が重要になってくるが，T-9皮下腫瘍内のマグネタイト微粒子を磁場照射によって発熱させる



第5図．温熱療法によるガン免疫誘導のメカニズム - その2
温熱療法によるガン細胞の壊死に伴うHSP放出でワクチン効果が誘導されるか．

と、その周りの腫瘍組織が熱によって壊死して、その壊死領域にマグネタイト微粒子が流入していくことで腫瘍内部を拡散していった。このことによって、複数回の磁場照射を行うと、腫瘍組織の壊死とともにマグネタイト微粒子の分布領域が広がっていき、1日1回の磁場照射による温熱療法を24時間毎に3日間連続で行うことによって、腫瘍全体を均一に壊死させることができた。ここで、24時間毎といった温熱のタイミングは、上述したように、T-9細胞が最もHSP70を発現するタイミングであり、腫瘍内では大量のHSP70が発現していた。つまり、1日1回の磁場照射による温熱療法を24時間毎に3日間連続で行うことによって、HSP70を大量に発現させながら腫瘍全体を壊死させることができた。このことは二つの大きな意義をもつ。一つは温熱耐性を打破したということである。従来の温熱療法ではHSP発現の消失を待ってから次の加温を行う。これは、従来の加温法が腫瘍特異的ではないため、ガン細胞の温熱耐性を打破することができないからである。一方、我々の方法では腫瘍局所的、さらに厳密に言えばマグネタイト微粒子が存在する微小領域のみを発熱させることができる。この加温によって腫瘍組織温度を従来法よりも高く設定することができるため、24時間毎に3回の加温を行うといった、今までの温熱療法の常識では考えられない治療プロトコルが可能になる。そして、もう一つの重要な意義は大量のHSPが腫瘍組織から放出されることである。Srivastavaらは、精製したHSP70-抗原ペプチド複合体のワクチン効果は、投与した量に依存して促進されることを報告している (Srivastava et al.,1998)。我々の温熱療法では腫瘍全体が壊死するので、T-9腫瘍を用いた実験では1gの腫瘍細胞が壊死したと考えられる。我々の検討で、1gの腫瘍細胞中には約2 mgという非常に大量のHSP70-抗原ペプチド複合体が含まれる計算となる。

次に、実際に温熱後のHSP70-ペプチド複合体に抗腫瘍効果があるのかを調べるために、温熱療法を施したラットの腫瘍を摘出して、HSP70-抗原ペプチド複合体を精製してワクチン効果を調べたところ、有意な抗腫瘍効果を示した (Ito et al.,2003)。さらに我々は、精製したHSP70-抗原ペプチド複合体ではなく、温熱によって壊死させたT-9細胞の上清にHSP70が放出されているのを確

認して、この細胞死で放出されたHSP70が抗腫瘍効果を持つことを確認した (Ito et al.,2003)。

我々のマグネタイト微粒子を用いたハイパーサーミアは、HSP70-抗原ペプチドの放出を伴う壊死を誘導し、免疫担当細胞を腫瘍局所に集積させ、抗腫瘍免疫を強く誘導することがわかった。このことにより、マグネタイト微粒子を用いた温熱療法は、腫瘍局所における*in situ*ワクチン療法というべき治療法であるといえよう。

我々はさらに、HSPを介した免疫賦活メカニズムを基にして、さらに温熱療法の免疫賦活能を高めるための新しい治療方法の開発を行った。具体的には、マグネタイト微粒子を用いた温熱療法との組み合わせとして、IL-2やGM-CSFといったサイトカインとの併用療法、温熱誘導型プロモーターを用いたTNF- α 遺伝子治療との併用、HSP70のリコンビナントタンパク質の腫瘍局所投与との併用療法 (Ito et al., 2004)、HSP70遺伝子治療との併用療法 (Ito et al.,2001) の開発を行った。

現在、我々はHeat Immunotherapyの臨床応用に向けて取り組んでおり、株式会社ナノセラピー研究所を設立し、厚生労働省への申請業務を集中的に行っている。

引用文献

- Nagamine T., K.Maruyama and S.Miyazima 1993. Fractals 1: 998-1000 (World Scientific Publishing, Singapole)
- Basu, S., Binder, R. J., Ramalingam, T., and Srivastava, P. K. 2001. CD91 is a common receptor for heat shock proteins gp96, hsp90, hsp70, and calreticulin. *Immunity*. 14: 303-313.
- Ito, A., Shinkai, M., Honda, H., Wakabayashi, T., Yoshida, J., and Kobayashi, T. 2001. Augmentation of MHC class I antigen presentation via heat shock protein expression by hyperthermia. *Cancer Immunol. Immunother.* 50: 515-522.
- Ito, A., Shinkai, M., Honda, H., Yoshikawa, K., Saga, S., Wakabayashi, T., Yoshida, J., and Kobayashi, T. 2003. Heat shock protein 70 expression induces antitumor immunity during intracellular hyperthermia using magnetite nanoparticles. *Cancer Immunol. Immunother.* 52: 80-88.
- Ito, A., Matsuoka, M., Honda, H and Kobayashi, T.

2003. Heat shock protein 70 gene therapy combined with hyperthermia using magnetic nanoparticles. *Cancer Gene Ther.* 10: 918-925.
- Ito, A., Matsuoka, M., Honda, H and Kobayashi, T. 2004. Antitumor effects of combined therapy of recombinant heat shock protein 70 and hyperthermia using magnetic nanoparticles in an experimental subcutaneous murine melanoma. *Cancer Immunol. Immunother.* 53: 26-32.
- Matzinger, P. 2002. The danger model: a renewed sense of self. *Science.* 296: 301-305.
- Shinkai, M., Le, B., Honda, H., Yoshikawa, K., Shimizu, K., Saga, S., Wakabayashi, T., Yoshida, J., and Kobayashi, T. 2001. Targeting hyperthermia for renal cell carcinoma using human MN antigen-specific magnetoliposomes. *Jpn. J. Cancer Res.* 92: 1138-1145.
- Srivastava, P. K., Menoret, A., Basu, S., Binder, R. J., and McQuade, K. L. 1998. Heat shock proteins come of age: primitive functions acquire new roles in an adaptive world. *Immunity.* 8: 657-665.
- Yanase, M., Shinkai, M., Honda, H., Wakabayashi, T., Yoshida, J., and Kobayashi, T. 1998. Intracellular hyperthermia for cancer using magnetite cationic liposomes: an *in vivo* study. *Jpn. J. Cancer Res.* 89: 463-469.
- Yanase, M., Shinkai, M., Honda, H., Wakabayashi, T., Yoshida, J., and Kobayashi, T. 1998. Antitumor immunity induction by intracellular hyperthermia using magnetite cationic liposomes. *Jpn. J. Cancer Res.* 89: 775-782.
- Title :** Mechanisms of Induction of Cancer Immunity due to Hyperthermia
- Author :** Takeshi Kobayashi
- Key words :** Cancer immunity, Heat shock protein, Hyperthermia, Liposome, Magnetite