メラノーマに対する Heat Immunotherapy の開発

井藤 彰 小林 猛 本多 裕之

名古屋大学大学院工学研究科化学・生物工学専攻生物機能工学分野

要旨 温熱療法は有望な癌治療法であるが、正常組織を傷害せず、腫瘍組織だけを加温する技術は開発されていない。機能性磁性ナノ粒子は、交番磁場中で発熱することから、腫瘍組織だけを加温する発熱体として応用できる。我々は抗体結合型と正電荷脂質包埋型の二種類のマグネタイトを開発した。今までに、我々の温熱治療システムにおいて、腫瘍免疫が賦活されることを報告してきた。本稿では、温熱療法における熱ショックタンパク質 (HSP) 70 の発現によって、腫瘍免疫が活性化されることを示す。このメカニズムに基づくと、我々の温熱療法システムは腫瘍局所でのワクチン化としてみなすことができる。この温熱療法とサイトカイン、HSP70、樹状細胞等の免疫療法との組み合わせ療法で、マウスにおいて高い治療効果を示した。これらの結果は、温熱療法と免疫療法を組み合わせることで、新しい治療法へ応用できることを示唆している。

Heat immunotherapy for melanoma

Akira ITO, Takeshi KOBAYASHI, Hiroyuki HONDA

Department of Biotechnology, School of Engineering, Nagoya University

Hyperthermia is a promising approach for cancer therapy. The inevitable technical problem with hyperthermia is the difficulty in heating only the tumor region and avoiding damage to healthy tissue. Magnetite nanoparticles have been applied in an attempt to overcome these disadvantages. Magnetite nanoparticles generate heat in an alternating magnetic field. We have developed antibody-conjugated magnetoliposomes and magnetite cationic liposomes. We previously reported that our hyperthermia system induces antitumor immunity. In the present study, we show that HSP70 expression following hyperthermia induces antitumor immunity. Based on this mechanism, our hyperthermia system is regarded as an in situ vaccination. The combined therapy of hyperthermia with immunotherapy, such as cytokines (IL-2 or GM-CSF), recombinant HSP70, hsp70 genes, and dendritic cells, resulted in strong antitumor activity in mice. These results suggest that hyperthermia-induced antitumor immunity has important implications in the development of novel therapies, and the combination with immunotherapy is a promising approach. [*Skin Cancer (Japan)* 2004 ; 19 : 298-305]

Key words : Magnetite, Hyperthermia, Liposome, Immunotherapy, Heat shock protein

1. はじめに

医学の父であるヒポクラテスは、もし体温を自在に操ることができれば、如何なる病気も治すことができると考え、熱によって様々な病気を治療していた。このように、温熱療法は、古代ギリシャから行われてきた古い治療法である。特に、癌組織は正常組織に比べて熱に弱いといった性質があることから、癌に対する温熱療法は注目されてきた。しかし、このような期待に反して、温熱療法は癌治療の第一選択肢にはなっていない。その一因としては、癌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。現在行われている温熱療法では、正常組織への加温の影響を考慮して、42.5℃付近に腫瘍組織の温度が調節されているが、加温する温度が高いほど癌細胞が死にやすいことは自明である。したがって、もし、正常組織が加温されずに、癌組織だけを特異的に加温することができれば、どのような種類あるいは大きさの癌細胞であっても死滅させることが理論上可能である。

我々は、機能性磁性ナノ微粒子を用いた高周波磁場誘導型の温熱療法によって、古代ギリシャ時代以来、初めて腫瘍部位の温度を自在に操ることができるようになったと自負している。腫瘍局所の発熱は生体にとって初めての経験である。このことによって、これまでの「熱で直接的に癌を殺す治療法」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、腫瘍免疫の増強である。このことは、原発癌のみを治療すれば転移癌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^{1) 2)}。

2. 機能性磁性ナノ粒子を用いた磁場誘導加温型温熱療法

我々は、癌組織を選択的に加温するために、酸化鉄の10nmサイズの磁性ナノ粒子であるマグネタイト(Fe_3O_4)を発熱体とする誘導加温型の温熱療法を開発した³⁾。図1 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ヒステリシス損によって発熱する。したがって、マグネタイト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、癌特異的な加温ができる。我々は、マグネタイトナノ粒子をリポソームで包埋して、さらに癌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⁴⁾。また、カチオニックリポソームでマグネタイトナノ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)を開発した³⁾。二つの機能性磁性ナノ粒子を図1 Bに示す。

興味深いことに、我々は機能性磁性ナノ粒子を用いて温熱療法を施すことによって、腫瘍免疫が賦活されることを見出した。この温熱療法における癌免疫の賦活について、図2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調べた⁵⁾。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、図2 Aに示すように、MCLを注入した左側の腫瘍は交番磁場照射で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は温度がほとんど上昇しなかった。しかし、温熱療法を施行した28日後、温度上昇があった左側の腫瘍だけでなく、直接的な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(図2 B-II)。これらの結果から、本治療法は、腫瘍局所における温熱療法であるにもかか

図1. 機能性磁性ナノ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粒子は発熱して癌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. AML (左) 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. MCL (右) 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

図2. 機能性磁性ナノ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)

わらず、直接加温されない全身の癌（転移癌を含む）に対しても免疫賦活によって治療効果を示すといった、癌治療の理想を実現可能にする治療法であると考えられる。

3. ヒートショックプロテインの役割

HSPは、熱をはじめとするストレスで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、温熱で誘導される癌細胞のアポトーシス死を抑制する（温熱耐性）ことから⁶⁾、温熱療法においては、治療効果に対してデメリットと考えられてきた。

一方、HSP70をはじめとするHSPが、癌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⁷⁾。癌細胞内における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る（図3）。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あるいはHSP90にシャペロンされる。これらのHSPは抗原ペプチドをTAPと呼ばれるタンパク質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 / β_2m 複合体へ輸送する。

これらの経路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。Wellsら⁸⁾はマウスB16メラノーマ細胞にヒトHSP70遺伝子を導入することで、B16メラノーマ細胞表面のMHC class I分子が有意に増強することを示した。また、このことによって免疫原性の低いB16メラノーマ細胞における免疫原性が増強することを見出した。そして、もう一つの重要な知見は、HSPが癌細胞内で腫瘍抗原ペプチドを保持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、それを癌ワクチンとして利用す

図3. 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、癌細胞の抗原提示に寄与する

る試みを行っている⁹⁾。

このように、癌細胞によるHSP発現は、温熱療法において欠点、腫瘍免疫においては利点として考えられてきた。ここで、HSPが温熱療法で発現するのは当然であることから、温熱療法におけるHSP発現が癌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癌治療法と言える。我々は以下に述べる研究仮説を組み立て、温熱療法における癌免疫賦活のメカニズムを調べた。

4. 温熱療法による癌細胞の免疫原性の亢進

上述したように、HSPが癌抗原ペプチドをMHC class I に送達していることが報告され、HSP70の遺伝子導入は癌細胞表面のMHC class I 密度を増強させることが示された。こういった背景から、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²⁾。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時間後に誘導型のHSP70発現のピークがみられた。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。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。温熱なしの細胞と比較して、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り、48時間後にはMHC class I 密度の増強が最大になった。このMHC class I の発現パターンは、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。

次に、この温熱処理によるMHC class I 発現の増強が、癌細胞の免疫原性を高めているかを調べた。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。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。

以上のことから、温熱療法においてもHSP70発現とMHC class I 発現に相関があり、温熱療法によって癌細胞自身がMHC class I 発現を増強して、免疫原性が増強することが示された。

5. 温熱療法による癌細胞の壊死に伴うHSPワクチン放出

上述したように、癌細胞からHSP-抗原ペプチド複合体が精製されてワクチンとして利用されている。患者に投与されたHSP-抗原ペプチド複合体は、専門的抗原提示細胞 (Antigen presenting cell, APC) の特異的レセプターと結合する。レセプターと結合したHSP-抗原ペプチド複合体はAPCに取り込まれ、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。この現象はクロスプライミングと呼ばれる。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¹⁰⁾。この場合、抗原ペプチドの有無に関わらず、HSP70はCD14と結合して樹状細胞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、特に癌においては自己-非自己の概念が当てはまりにくい。このことから、特に癌免疫では「自己-非自己」ではなく、如何に生体にとって「危険 (Danger)」であるかが重要であると

考えられている¹¹⁾。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。我々は、温熱療法においてHSP発現が増強し、さらに癌細胞が熱で壊死を起こすことによって、細胞内からHSP-抗原ペプチド複合体が放出され、癌ワクチン化が起こっているのではないかと考えた。

我々の温熱療法では、マグネタイト粒子自身が発熱する。したがって、マグネタイト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を磁場照射によって発熱させると、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粒子の分布領域が広がっていき、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、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、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、癌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、厳密にはマグネタイト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の施行が可能になる。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。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2mgといった非常に大量の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。ここで、コントロール実験として、肝臓から精製したHSP70-抗原ペプチド複合体を接種したラットでは抗腫瘍効果は示さなかったもので、HSP70にシャペロンされている腫瘍抗原ペプチドが強い抗腫瘍効果を生み出すと考えられる。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²⁾。

このように、機能性磁性ナノ粒子を用いた温熱療法は、HSP70-抗原ペプチドの放出を伴うネクローシスを誘導し、免疫担当細胞を腫瘍局所に集積させ、抗腫瘍免疫を誘導することがわかった。このことにより、Heat Immunotherapy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言える。

6. まとめ

最後に、本稿の主題である「温熱療法に伴う免疫賦活のメカニズム」についてまとめた概略図を図4に示す。現在我々は、HSPを介した免疫賦活メカニズムを基にして、特にメラノーマをターゲットにして、Heat Immunotherapyの免疫賦活能をさらに高めるための新しい治療方法の開発を行っている。具体的には、機能性磁性ナノ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

図 4. 温熱療法による癌免疫誘導のメカニズム — まとめ —

1) 癌細胞は一般的に免疫原性が低い。細胞内ではHSP発現が低く、抗原のプロセッシング機能が低下しており、細胞表面のMHC class I分子も減少している。2) マグネタイト粒子による温熱療法によって、壊死に至らない癌細胞においては、細胞内のHSP発現誘導が起こり、細胞表面のMHC class I密度が増強する。これらの癌細胞はCTLによって攻撃される。3) CTLあるいは温熱療法によって殺された癌細胞の細胞内からHSP-抗原ペプチド複合体が放出される。4) 放出されたHSPは単球細胞の炎症性サイトカイン産生を刺激し、APCを腫瘍内へ集積させる。5) HSP-抗原ペプチド複合体がAPCに取り込まれ、MHC class Iを介して腫瘍特異的なT細胞に提示される

ンとの併用療法¹²⁾、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¹³⁾、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¹⁴⁾、HSP70遺伝子治療との併用療法¹⁵⁾の開発を行った。今後も、新しい治療法を開発を行いつつ、一日でも早く、Heat Immunotherapyが臨床使用され、患者さんの助けになるように努力している。

文 献

- 1) Ito A, Shinkai M, Honda H, et al : Augmentation of MHC class I antigen presentation via heat shock protein expression by hyperthermia. *Cancer Immunol Immunother*, 50 : 515-522, 2001
- 2) Ito A, Shinkai M, Honda H, et al : Heat shock protein 70 expression induces antitumor immunity during intracellular hyperthermia using magnetite nanoparticles. *Cancer Immunol Immunother*, 52 : 80-88, 2003
- 3) Yanase M, Shinkai M, Honda H, et al : Intracellular hyperthermia for cancer using magnetite cationic liposomes : an *in vivo* study. *Jpn J Cancer Res*, 89 : 463-469, 1998
- 4) Shinkai M, Le B, Honda H, et al : Targeting hyperthermia for renal cell carcinoma using human MN antigen-specific magnetoliposomes. *Jpn J Cancer Res*, 92 : 1138-1145, 2001
- 5) Yanase M, Shinkai M, Honda H, et al : Antitumor immunity induction by intracellular hyperthermia using magnetite cationic liposomes. *Jpn J Cancer Res*, 89 : 775-782, 1998
- 6) Mosser DD, Caron AW, Bourget L, et al : The chaperone function of hsp70 is required for protection against stress-induced apoptosis. *Mol Cell Biol*, 20 : 7146-7159, 2000
- 7) Srivastava PK, Menoret A, Basu S, et al : Heat shock proteins come of age : primitive functions acquire new roles in an adaptive world. *Immunity*, 8 : 657-665, 1998
- 8) Wells AD, Rai SK, Salvato MS, et al : M Hsp72-

- mediated augmentation of MHC class I surface expression and endogenous antigen presentation. *Int Immunol*, 10 : 609-617, 1998
- 9) Udono H and Srivastava PK : Heat shock protein 70-associated peptides elicit specific cancer immunity. *J Exp Med*, 178 : 1391-1396, 1993
 - 10) Asea A, Kraeft SK, Kurt-Jones EA, et al : HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine. *Nat Med*, 6 : 435-442, 2000
 - 11) Matzinger P : The danger model : a renewed sense of self. *Science*, 296 : 301-305, 2002
 - 12) Ito A, Tanaka K, Kondo K, et al : Tumor regression by combined immunotherapy and hyperthermia using magnetic nanoparticles in an experimental subcutaneous murine melanoma. *Cancer Sci*, 94 : 308-313, 2003
 - 13) Ito A, Shinkai M, Honda H, Kobayashi T : Heat-inducible TNF-alpha gene therapy combined with hyperthermia using magnetic nanoparticles as a novel tumor-targeted therapy. *Cancer Gene Ther*, 8 : 649-654, 2001
 - 14) Ito A, Matsuoka M, Honda H : 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, 2004
 - 15) Ito A, Matsuoka M, Honda H : Heat shock protein 70 gene therapy combined with hyperthermia using magnetic nanoparticles. *Cancer Gene Ther*, 10 : 9, 18-25, 2003