九州大学学術情報リポジトリ
Kyushu University Institutional Repository

機能性磁性ナノ粒子を利用した温熱誘導型遺伝子発現システムの開発

山口，雅紀

https://doi.org/10.15017/1500701

出版情報：九州大学，2014，博士（工学），課程博士
バージョン：
権利関係：全文ファイル公表済

機能性磁性ナノ粒子を利用した
温熱誘導型遺伝子発現システムの開発

平成 27 年 1 月

山口　雅紀

目次

第 1 章　序論 1

1.1 本研究の目的 **1**

1.2 本研究の方針 **4**

1.3 本論文の構成 **6**

第 2 章　既往の研究 7

2.1 温熱療法と三大療法の併用 **7**

2.1.1 放射線療法との併用 7

2.1.2 化学療法との併用 8

2.1.3 外科手術との併用 11

2.2 温熱療法と遺伝子療法および免疫療法の併用 **12**

2.2.1 遺伝子療法との併用 12

2.2.2 免疫療法との併用 16

2.3 機能性磁性ナノ粒子の医学的応用 **20**

2.3.1 機能性磁性ナノ粒子を用いた温熱療法 21

2.3.2 腫瘍標的性をもった機能性磁性ナノ粒子 22

2.4 本章のまとめ **25**

第 3 章　フィードバック増幅ループを含む温熱誘導型遺伝子発現システムの開発 26

3.1 緒言 **26**

3.2 レポーター遺伝子 *LacZ* を用いた温熱誘導型遺伝子発現システムの機能解析 **29**

3.2.1 本節の目的 29

3.2.2 実験方法 29

3.2.3 実験結果と考察 36

3.2.4 本節のまとめ 45

3.3 治療遺伝子 *HSV-tk* および *TNF-α* を用いた温熱誘導型遺伝子発現システムの機能解析 45
3.3.1 本節の目的 45
3.3.2 実験方法 46
3.3.3 実験結果と考察 51
3.3.4 本節のまとめ 55
3.4 本章のまとめ 56
第 4 章　磁場誘導型遺伝子発現システムの開発 57
4.1 緒言 57
4.2 *in vitro* における磁場誘導型遺伝子発現システムの機能解析 58
4.2.1 本節の目的 58
4.2.2 実験方法 59
4.2.3 実験結果と考察 65
4.2.4 本節のまとめ 73
4.3 *in vivo* における磁場誘導型遺伝子発現システムの機能解析 73
4.3.1 本節の目的 73
4.3.2 実験方法 74
4.3.3 実験結果と考察 76
4.3.4 本節のまとめ 79
4.4 本章のまとめ 80
第 5 章　T 細胞受容体遺伝子導入によるがん温熱免疫療法の開発 82
5.1 緒言 82
5.2 NPrCAP/M を利用した CTI 療法の治療効果及び免疫誘導効果 84
5.2.1 本節の目的 84
5.2.2 実験方法 84
5.2.3 実験結果と考察 87
5.2.4 本節のまとめ 92

5.3 NPrCAP/M を利用した CTI 療法後の腫瘍浸潤リンパ球の TCR レパトワ解析 92
5.3.1 本節の目的 92
5.3.2 実験方法 93
5.3.3 実験結果と考察 96
5.3.4 本節のまとめ 101
5.4 本章のまとめ 101
第 6 章　総括 103
6.1 本論文のまとめ 103
6.2 今後の展望 105
参考文献 107
謝辞 129

第 1 章　序論

1.1 本研究の目的

がんは、がん関連遺伝子の変異により細胞増殖に歯止めが効かなくなり、周囲の臓器へ浸潤、転移する組織塊であり、国内における死亡原因の第 1 位である。がん治療法としては放射線療法・化学療法（抗がん剤）・外科手術の三大療法が主流であり、現在は腫瘍組織を直接取り除くため治療効果が最も高い外科手術が第一選択療法として施されている。しかしながら、目視不能ながん細胞まで摘出することはできないため、術後の再発・転移を防ぐために抗がん剤等で治療を継続する必要があるが、患者への重篤な副作用が問題となっている。そこで、患者への負担が少なく、長期的に治療効果を発揮するがん治療法の開発が求められており、温熱療法、遺伝子療法、免疫療法が注目を集めている。

腫瘍組織の特徴として、腫瘍形成における急速な細胞増殖に血管新生が追い付かず、腫瘍血管は組織全体を覆っていないことが挙げられる。正常組織を加温した際は、血流により熱を拡散させる生体防御作用が正常に機能するが、腫瘍組織の場合は血管網が未熟であるために熱の拡散が満足に行えない。そのため、腫瘍組織は熱が篭り易く、一般的に正常組織と比較して熱に弱い。温熱療法は、腫瘍組織の高い蓄熱性に注目した治療法であり、悪性度の高い神経膠芽腫、メラノーマなど様々ながんに対して有効な治療法である[1-5]。温熱療法は目的に応じて全身温熱療法[6]と局所温熱療法[7]を使い分けるが、これら治療法を臨床応用する際の問題点として、正常組織を損傷させることなく、腫瘍部位特異的に加温することが困難であることが挙げられる。腫瘍組織を 42.5°C 以上に加温することで多くのがん細胞を破壊することが可能であるが、従来の温熱療法では正常組織も同様に加温される。また、生体外から体表面を加温する従来方法では熱が届き難い腫瘍組織内部まで 42.5°C 以上に加温することは困難である。したがって、腫瘍組織特異的に組織内部から加温可能な温熱療法の開発

が求められている。この目的を達成するために、交番磁場と磁性ナノ粒子を利用した温熱療法が開発されている（Fig. 1）[8]。この治療法は、磁性粒子表面を修飾することにより腫瘍組織への標的性をもたせることが可能であり、投与後に体外から交番磁場を照射することによりヒステリシス損失によって発熱するという磁性ナノ粒子の性質を利用したものである [9, 10]。腫瘍特異的抗体などを磁性粒子表面に修飾することにより高い腫瘍標的性を示す機能性磁性ナノ粒子が多くの研究者によって開発されている[11-13]。さらに、臨床応用を目指して交番磁場装置の改良も進んでおり[14, 15]、機能性磁性ナノ粒子を利用した温熱療法は臨床試験の段階に到達している[16]。

遺伝子療法は、遺伝子変異により機能不全に陥った細胞に対して治療遺伝子を組込んだウイルスベクターなどを導入し、異常な遺伝子の働きを是正、または変異が生じた細胞を破壊することにより遺伝子疾患を治療する手法である。1990 年にアデノシン・デアミナーゼ欠損症の重篤な免疫不全患者に対して初めての遺伝子療法が行われて以来[17]、後天性免疫不全症候群、筋ジストロフィー、がんといった治療が困難な遺伝子疾患においても治療効果が報告されている[18-21]。がん治療においては、細胞死を誘導するサイトカインなどの治療遺伝子を利用することが一般的であるが、抗がん剤による化学療法と同様に、遺伝子発現量と治療遺伝子を発現させるタイミングが治療効果を左右するため、治療遺伝子の発現を制御する技術の開発が必要不可欠である。そこで、時間的、空間的に治療遺伝子の発現を制御するために、化学物質や物理刺激によって目的遺伝子を発現するベクターの開発が盛んに行われてきた[22-24]。これらのベクターは腫瘍組織特異的に治療遺伝子を発現するように設計されており、放射線療法、化学療法、温熱療法と併用することによりがん治療の効果がさらに向上することが多数報告されている[25-27]。

さらに、磁性ナノ粒子と交番磁場を利用した温熱療法後に強力な抗腫瘍免疫が誘導されることが報告されており、この免疫誘導にはがん細胞内からの抗原ペプチドの放出とそれに起因する T 細胞の腫瘍組織への浸潤が重要であると考

えられている [28-30]。温熱療法により誘導される抗腫瘍免疫を賦活することができれば、温熱療法により原発がんを治療した後に、身体に備わる免疫系により再発・転移がんをも治療可能な理想的ながん治療法の開発が可能になる。温熱療法と併用することにより高い治療効果が得られたとの報告がある T 細胞の増殖・分化を促進するインターロイキン 2（IL-2）、IL-12 及びインターフェロン γ（IFN-γ）[31-33]などの治療遺伝子を利用することにより抗腫瘍免疫を賦活することが可能になると考えられるが、これら治療遺伝子を体内で発現させる際の副作用を考慮する必要がある[34]。したがって、温熱療法の課題である局所性を克服し、腫瘍組織内特異的に治療遺伝子を発現させるシステムを開発することが重要である。また、がん細胞からどの様な抗原ペプチドが放出しているか、どの様な T 細胞が抗原ペプチドを認識し、腫瘍組織へ浸潤しているかを解析することが抗腫瘍免疫をさらに賦活する上で不可欠の要素である。そこで本研究では、温熱療法による加温をスイッチとして目的遺伝子を大量発現させる「温熱誘導型遺伝子発現システムの開発」、および「腫瘍浸潤リンパ球の解析」、「抗原ペプチドの解析」を並行して行い、磁性ナノ粒子と交番磁場を利用した温熱療法により誘導される抗腫瘍免疫を賦活する治療法の開発を目指した。

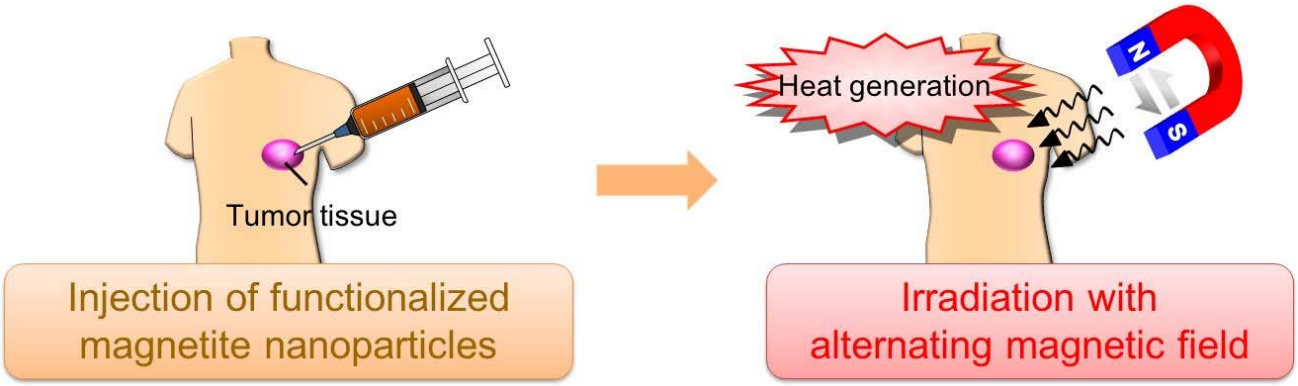

Fig. 1 Intracellular hyperthermia using functionalized magnetite nanoparticles.

1.2 本研究の方針

本研究では、温熱療法の問題点である局所性を克服するために、機能性磁性ナノ粒子マグネタイトカチオニックリポソーム（magnetite cationic liposome; MCL、Fig. 2A）を利用した。MCL は負電荷を帯びたがん細胞膜に静電的に結合して高効率で取り込まれる性質と、交番磁場を照射することでヒステリシス損失によって発熱する性質を持っている[10]。MCL を用いることで腫瘍組織内部の温度を交番磁場の出力により自在に制御でき、腫瘍組織特異的に加温することが可能である。さらに、治療遺伝子の発現を温熱療法による発熱により制御するために、熱ショックタンパク質（heat shock protein; HSP）プロモーターを利用した。HSP プロモーターは熱ストレスを感知し下流の遺伝子発現を厳密に誘導する性質を有している[35]。しかしながら、サイトメガロウイルス（cytomegalovirus; CMV）などの構成的に下流の遺伝子発現を誘導するウイルスプロモーターと比較して、HSP プロモーターによる遺伝子発現量が低いという問題点があるため[36]、遺伝子療法の治療効果を高めるためには、発現強度の増強が必要であると考えた。そこで、人工的な遺伝子高発現システムである Tet-Off システム[37]を融合することにより、加温をスイッチとして目的遺伝子を大量に発現する温熱誘導型遺伝子発現システムの開発を試みた。HSP プロモーター下に Tet-Off システムを配置することで、温熱療法による発熱をスイッチとして、Tet-Off システムがポジティブフィードバック的に働き、目的遺伝子の大量発現が起こるように設計した。レポーター遺伝子 *LacZ* を用いたレポーターアッセイ、さらに単純ヘルペスウイルス由来のチミジンキナーゼ（herpes simplex virus thymidine kinase; HSV-tk）および腫瘍壊死因子（tumor necrosis factor-α; TNF-α）による遺伝子療法をモデルとした細胞傷害性アッセイを行うことにより開発したシステムの機能解析を行った。

並行して、悪性度が高いが表在性腫瘍であるので薬剤の投与と効果のモニターが容易な悪性黒色腫メラノーマを標的腫瘍として、温熱療法後の抗腫瘍免疫誘導のメカニズム解析を行った。チロシン類似体である

N-Propionyl-4-*S*-Cysteaminylphenol（NPrCAP）を修飾した磁性ナノ粒子 NPrCAP/M（Fig. 2B）[38]を担がんマウスに投与し、交番磁場照射により温熱療法を行った。NPrCAP は、メラニン色素合成の際に基質として利用されるチロシンの類似体であるため、NPrCAP を結合させることにより磁性ナノ粒子をメラノーマに効率よく取り込ませることが可能になる。また、腫瘍浸潤リンパ球は T 細胞受容体（T-cell receptor; TCR）を介して抗原ペプチドを認識し、がん細胞を攻撃することから[39]、温熱療法を施した担がんマウスの腫瘍浸潤リンパ球の *TCR* 遺伝子を解析した。さらに、T 細胞はどの様な抗原ペプチドを認識し、腫瘍組織へ浸潤しているかを確認するために、腫瘍浸潤リンパ球のメラノーマ関連抗原ペプチドへの反応性を調べた。

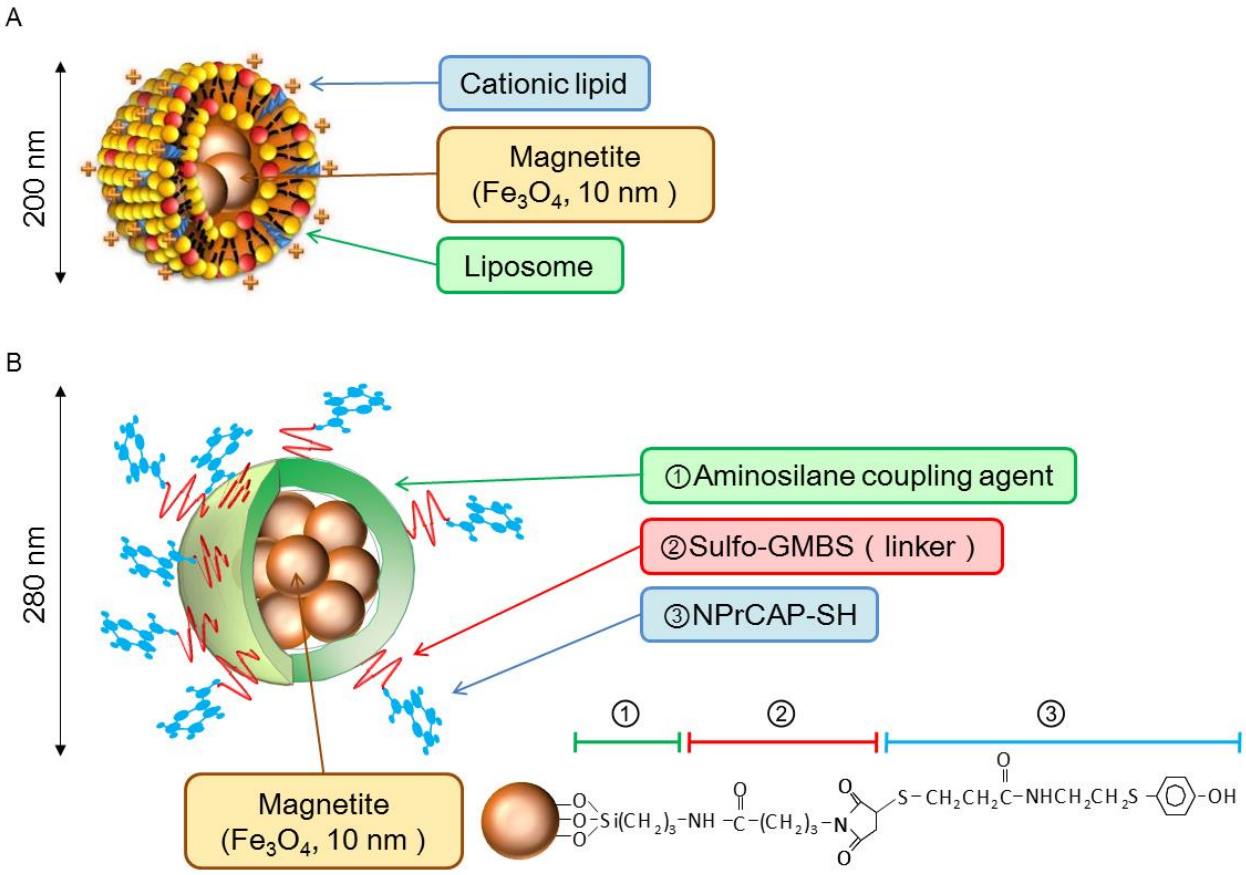

Fig. 2 Functionalized magnetite nanoparticles used in this study. (A) Magnetite cationic liposome, MCL [10]. (B) *N*-Propionyl-4-*S*-Cysteaminylphenol/Magnetite, NPrCAP/M [38].

1.3 本論文の構成

第 1 章では、本研究の背景、目的を示し、本研究の方針について説明した。

第 2 章では、本研究の関連分野の既往の研究を紹介し、本研究の意義について説明した。

第 3 章では、HSP プロモーターと Tet-Off システムを融合した温熱誘導型遺伝子発現システムの開発に取り組んだ。加温をスイッチとして HSP プロモーターが駆動し目的遺伝子の発現を誘導するか、さらに Tet-Off システムにより目的遺伝子の発現が増強されるかを観察することで、開発したシステムの機能解析を行った。

第 4 章では、機能性磁性ナノ粒子 MCL と交番磁場を利用した温熱療法により第 3 章で開発したシステムが駆動し、目的遺伝子の大量発現が誘導されるかを担がんマウスモデルを用いた動物実験により評価した。

第 5 章では、機能性磁性ナノ粒子 NPrCAP/M と交番磁場を利用した温熱療法後に誘導される抗腫瘍免疫をさらに賦活することを目的として、温熱療法後の腫瘍浸潤リンパ球の解析、抗原ペプチドの解析を行った。

第 6 章では、本論文の総括を行い、本研究の成果を踏まえた今後の展望について述べた。

第 2 章　既往の研究

2.1 温熱療法と三大療法の併用

医学の父ヒポクラテスの言葉に「薬で治らなければ、ナイフ（手術）で治すことができる。ナイフ（手術）で治らなければ、火（温熱）で治すことができる。もし、火（温熱）で治すことができなければ、それは不治の病だろう。」とあり、温熱療法はヒポクラテスの時代から疾患治療に利用されてきた。熱に弱いというがんの性質を利用したがん温熱療法は、放射線療法・化学療法・外科手術の三大療法と比較して繰り返し治療が可能であり、副作用が少ないことから患者への負担が少ない魅力的ながん治療法として注目されてきた。しかしながら、温熱療法単独の治療効果が低い、さらに腫瘍組織特異的に加温することが困難であることがボトルネックとなり、三大療法に匹敵する治療効果を達成することは一朝一夕にはいかない。現在では、温熱療法を単独で用いるのではなく、温熱療法の治療効果を増強し、三大療法の短所を補うことを目標として、温熱療法は三大療法と併用した集学的治療に活用されている。この節では、温熱療法の三大療法との集学的治療についてこれまでに報告されている例について紹介する[40]。2.1.1 では放射線療法との併用、2.1.2 では化学療法との併用、2.1.3 では外科手術との併用について述べる。

2.1.1 放射線療法との併用

放射線療法は、生体外から放射線を腫瘍組織へ照射することによりがん細胞の DNA 損傷を引き起こし、がん細胞を破壊、または細胞増殖を抑制する治療法である。化学療法や外科手術と同様に多くのがん患者に適用されているが、放射線による正常組織への副作用は無視できないため、腫瘍組織へ耐容線量を超えた線量を照射することはできず、DNA を損傷したがん細胞が回復し、再発す

ることが問題となっている[41]。これは、時間経過に伴い DNA 損傷が修補されるためと想定されるが、温熱療法によりこの DNA 損傷の修復過程が阻害され、放射線療法の治療効果が高められることが報告されている[40, 42, 43]。また、放射線療法は低酸素、低栄養状態の細胞に対しては効果が低い。これは、放射線照射により生成したペルオキシルラジカルによってがん細胞が破壊されるため、腫瘍組織内の酸素分圧が放射線療法の治療効果を大きく左右するためである。腫瘍組織は急速な増大により血管網が未熟なため低酸素状態であり、放射線療法が効き難い環境下である。この様な環境下では腫瘍組織は放熱作用が小さいために熱が篭り易く、さらに、温熱療法により腫瘍組織内の酸素分圧が上昇するという報告[44]からも、温熱療法を併用することにより相乗効果が得られると考えられる。放射線療法は細胞分裂が盛んな M、G1 期の細胞に対して効果が大きいため、がん細胞にはより効果的であるが、DNA を複製する S 期の細胞は放射線の感受性が低く、治療効果が低いことも放射線療法の欠点である。このような S 期のがん細胞に対して温熱療法が強く作用することが報告されており[45]、細胞周期の観点からも温熱療法は放射線療法との相性が良いことがわかる。

van der Zee, J.らは、直腸がん、子宮頸がん、膀胱がんを対象に臨床第Ⅲ相試験を行い、温熱併用放射線療法の有効性を示した[46]。放射線療法後に温熱療法（温度条件 42°C、加温時間 1 時間）を施した結果、放射線療法単独の場合は完全寛解率 39%であったのに対して、温熱療法と併用することで完全寛解率は 55%まで増加した（$p<0.001$）。特に子宮頸がんにおいては、温熱併用放射線療法を施すことにより、放射線療法単独と比較して約 2 倍の 3 年累積生存率が得られ（$p<0.01$）、著しい生存率の上昇も達成された。

2.1.2 化学療法との併用

化学療法は、抗がん剤を利用して DNA の生合成や細胞分裂を阻害することによりがん細胞の増殖を抑制する治療法である。放射線療法や外科手術とともに

がんの根治を狙う肝要な治療法であるが、抗がん剤の強い細胞毒性から正常組織の損傷は避けられず重篤な副作用をもたらす、さらに連続投与によりがん細胞が抗がん剤に対する薬剤耐性を獲得し効果が弱くなることが問題となっている。副作用の少ない低濃度の抗がん剤によりがん細胞を破壊することができれば、正常組織への影響を低減することが可能になると考えられる。しかしながら、腫瘍形成における急速な細胞増殖のために、腫瘍血管は組織全体を覆っておらず、生体内に投与した抗がん剤は満足に腫瘍組織内部へ侵入できない。このため、十分な治療効果を得るためには抗がん剤の濃度を高くする必要があり、それに起因して副作用を引き起こすという悪循環に陥る。この問題点に対して、温熱療法により腫瘍血管が拡張して腫瘍組織内の血流が増加し、抗がん剤の腫瘍内濃度が高まり、温熱療法との相乗効果が得られたとの報告が多数されている（Table 1）[40, 47-50]。これらの結果から、温熱療法と化学療法を併用することにより、副作用を抑えるために低濃度で抗がん剤を投与しても、良好な治療効果が得られることがわかる。

化学療法による副作用をさらに低減するためには、腫瘍組織に抗がん剤を運び、腫瘍組織特異的に抗がん剤を作用させる必要がある。近年、抗がん剤の欠点を改善するためにドラッグデリバリーシステムが幅広く用いられている。温熱療法との併用では、熱感受性リポソームを用いて抗がん剤を腫瘍組織へ効率よく送達できたと 1978 年に Yatvin, M. B.らによって初めて報告されている[51]。それ以降、様々な熱感受性リポソームが報告されており[50, 52, 53]、抗がん剤ドキソルビシンを包埋した熱感受性リポソーム（Thermodox®）は既に臨床試験に用いられている[54, 55]。Thermodox®は、40°C-42°C の熱ショックが加わると分解し、包埋した抗がん剤が放出するように設計されている。Thermodox®と局所温熱療法を併用することにより、乳がん、膵臓がんなどで相乗効果が得られ、特に肝細胞がんにおいては臨床第Ⅲ相試験まで進んでおり、著しい相乗効果（ハザード比= 0.639）が得られたと報告されている[55]。

Table 1 Overview of the interactions between some chemotherapeutic agents and heat [50].

Class of agents		Interaction	Remarks
Platinum drug	Cisplatin	More than additive	Gradual increase with increase temperature; highest when simultaneous
	Carboplatin		
Alkylating agents	Cyclophosphamide	More than additive	Gradual increase with increase temperature; highest when simultaneous
	Ifosfamide		
	Melphalan		
	Mitomycin		
Nitrosources	Carmustine (BCNU)	More than additive	Highest when simultaneous
	Lomustine (CCNU)		
Antibotics	Bleomycin	More than additive	Only >42°C; largest when simultaneous
	Doxorubicin	Complex	Less than additive when heat precedes drug
	Actinomycin D		
Pyrimidine antagonists	5-Fluorouracil (5-FU)	Independent	No interaction
	Cytarabine (Ara C)		
Vinca alkaloids	Vincristin	Independent	
	Vinblastin		
Taxanes	Paclitaxel	Complex	Cell type dependent; temperature 41.5-43.0°C
Nucleosidanalog	Gemcitabine	Additive	Only if applied 24 h before or after heat

2.1.3 外科手術との併用

外科手術は、腫瘍組織を直接摘出することから最も治療効果が高く、血液を除く多くのがん患者に対して第一選択療法として施行されている。術後の再発・転移を防ぐために、腫瘍組織と共に、目視不能ながん細胞が残存している恐れのある周辺臓器を摘出することが一般的である。しかしながら、肝臓などの重要な臓器に大きな腫瘍組織が形成された場合は、外科手術により患者の生活の質（Quality of life; QOL）が損なわれる恐れがあるため、外科手術の適用外になることが少なくない。そのため、術前に放射線療法、化学療法、温熱療法を併用し、外科手術可能な大きさまで腫瘍組織を退縮させた後に切除を行う集学的治療が行われている[40, 56, 57]。Asao, T.らは、ステージ T2-T4 の直腸腺がんの患者を対象として集学的治療法を行い、入院期間を延長する程度の副作用は 6.9 %の患者においてしか観察されず、41.4 %の患者に対して顕著な腫瘍退縮を観察し、外科手術が可能になったと報告している[56]。

また、外科手術が困難ながんとして腹膜転移を起こしたがんが知られている。腹膜転移とは、腫瘍組織が増大を続けることで消化管を突き破り、がん細胞が直接腹腔内に拡散され、腹膜の隅々に転移しまうことであり、極めて難治性である。近年、この難治性の腹膜転移に対する有効的な治療法として、腹腔内温熱化学療法（hyperthermic intraperitoneal chemotherapy; HIPEC）が開発されている[58, 59]。HIPEC は、腹腔内の腫瘍組織を外科手術により摘出した後に、高濃度の抗がん剤と温熱療法により腹腔内に残っている目視不能ながん細胞を破壊する治療法である[59]。温熱療法の効果によりがん細胞内に抗がん剤が取り込まれ易くなることで腹膜に潜んだがん細胞も破壊することが可能となり、再発、転移を予防することができる。ステージ T3-T4 の進行胃がんの患者を対象として外科手術後に HIPEC を行ったところ、HIPEC を受けていない患者と比較して、有意に 5 年生存率が改善していたと報告されている[58]。

さらに、外科手術による手術傷を残さず、臓器温存を望む乳がん患者に対し

て、腫瘍組織に挿入した電極針にラジオ波電流を流すことによりがん細胞を破壊するラジオ波療法が施されている[60]。ラジオ波療法は、治療時間が 10-30 分程度と短いため患者への負担が少ないが、適用可能な腫瘍組織の大きさは直径 3cm 以下程度であり、大きな腫瘍組織に対しては満足な治療効果は得られない。しかしながら、外科手術により大きな腫瘍組織を摘出した後に、残存している小規模の腫瘍組織についてはラジオ波療法で治療するなど外科手術との併用も行われている[40, 61]。

2.2 温熱療法と遺伝子療法および免疫療法の併用

この節では、三大療法に代わる新しい治療法として注目されている遺伝子療法および免疫療法との温熱療法の併用治療の例について紹介する。2.2.1 では遺伝子療法との併用、2.2.2 では免疫療法との併用について述べる。

2.2.1 遺伝子療法との併用

温熱療法による発熱をスイッチとして治療遺伝子の発現を制御することができれば、温熱療法と遺伝子療法の課題である局所性を克服し、これら治療法の相乗効果が得られる斬新ながん治療法の開発につながる。この目的を達成するために、多くの研究者によって温熱誘導性を有したウイルスベクターやプラスミドベクターが構築されている[62-64]。まず、温熱誘導型遺伝子発現ベクターを用いた遺伝子療法と温熱療法を融合した温熱誘導型遺伝子療法を開発する上で重要となる、熱ストレスに対する細胞内メカニズムについて述べる。

2.2.1.1 細胞の熱ストレス応答機構

加温された細胞は、生存するために熱ストレスに対処するが、この熱ストレス応答の一端を担っているタンパク質として HSP が知られている[65]。HSP は、様々なストレス（熱、低酸素、低 pH、活性酸素、重金属など）を受けた細胞内で発現し、タンパク質の変性やミスフォールディングを防ぐ分子シャペロンの一群である[66]。熱ストレスによる HSP の発現誘導は、HSP プロモーター配列中の熱ショック転写要素（heat-shock element; HSE）に活性化した熱ショック転写因子（heat shock transcription factor-1; HSF-1）が結合することによって開始される（Fig. 3）[67, 68]。HSF-1 が HSE を認識して結合するためには、プロモーター配列中に五塩基共通配列 5'-N**GAA**N-3'を有していることが必要不可欠である（Table 2）[68]。通常の細胞内では、HSF-1 は HSP とのヘテロ複合体を形成し、細胞質内に留まっている。これは、分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼやグリコーゲン合成酵素キナーゼ 3 によって、HSF-1 のセリン残基 Ser307、Ser303 のリン酸化が阻害されており、核内への移行が抑制されているためである[67, 69]。この際の核内では、転写開始前複合体（preinitiation complex; PIC）により RNA ポリメラーゼ II（Pol-II）の機能が制限されているため、*HSP* 遺伝子の転写は抑制されている[70, 71]。細胞が熱ストレスを受けると、HSP がヘテロ複合体から外れ、HSF-1 は核内へ移行する。核内へ移行した HSF-1 は、ホモ三量体化し、cAMP 依存性タンパク質キナーゼやカルシウム/カルモジュリン依存性タンパク質キナーゼの作用によりセリン残基 Ser230、Ser326 がリン酸化され、HSE への結合能を獲得する[67, 72, 73]。その後、活性化した HSF-1 が HSP プロモーター配列中の HSE に結合することにより、PIC と Pol-II の結合が解かれ、*HSP* 遺伝子の転写が誘導される[71]。以上の熱ストレス応答機構により、細胞は熱ストレスに対処することが可能となる。

HSP の転写機構を利用した温熱誘導型遺伝子発現ベクターを治療に用いる際には、副作用を考慮して加温された際のみ治療遺伝子を発現する、さらに、強

力な治療効果を得るために加温をスイッチとした遺伝子発現量が多いことが求められる。様々な温熱誘導型プロモーターが開発され、その性能が評価されているが、その中でもヒト HSP70B'プロモーターが加温をスイッチとして遺伝子発現を厳密に制御可能であることから *in vitro* および *in vivo* において幅広く用いられている[68]。次節において、HSP70B'プロモーターを利用した温熱誘導型遺伝子療法の例について紹介する。

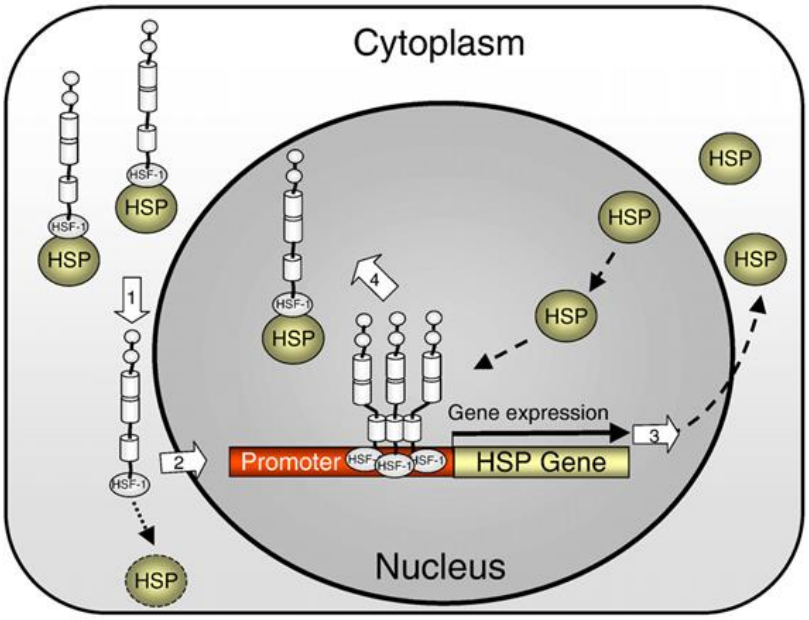

Fig. 3 Cellular mechanism of HSF-1 mediated heat-shock response [68].

Table 2 Heat-shock elements (HSE) of the heat-responsive human HSP70B promoter and the human MDR1 promoter [68].

Promoter	Position in the promoter	Sequence (5'→3')
HSP70B'		
HSE 1	-73 to -54	G**GAA**GG**T**G**C**GG**GAA**GG**TTC**G
HSE 2	-163 to -149	CCGCCC**GAA**CC**TTC**T
HSE 3	-262 to -247	GAGCTA**GAA**CC**TTC**CC
MDR1	-315 to -285	GCCA**GAA**CA**TTC**CTCCTG**GAA**A**TTC**AACCTG

2.2.1.2 HSP70B'プロモーターを利用した温熱誘導型遺伝子療法

ヒト HSP70B'プロモーターは 3 つの HSE（Table 2）、非定型 TATA ボックスを有しており、2 つの HSE に HSF-1 が結合し、下流の遺伝子発現を誘導する [68, 74]。Huang, Q.らは、HSP70B'プロモーターを搭載したアデノウイルスベクターを作製し、レポーター遺伝子 *GFP* 、治療遺伝子 *IL-12* および *TNF-α* を用いて HSP70B'プロモーターの熱応答性を *in vitro* において評価した[63]。アデノウイルスベクターを導入したマウス乳がん細胞株 4T1 を 42°C で加温することにより、加温を行わなかった場合と比較してレポーター遺伝子 *GFP* の発現量が約 1000 倍、さらに治療遺伝子 *IL-12* および *TNF-α* の発現量がそれぞれ 13,600 倍、6.8×10^5 倍増加したことを報告している。次に、治療遺伝子 *IL-12* による遺伝子療法をモデルとして温熱療法と遺伝子療法の併用効果を調べたところ、加温をスイッチとした *IL-12* 遺伝子の発現によりメラノーマの増殖を抑制することに成功している [63]。また、Isomoto, H.らは、HSP70B'プロモーターを搭載したプラスミドスベクターを作製し、レポーター遺伝子 *Luciferase* および治療遺伝子 *HSV-tk* を用いて温熱誘導型遺伝子発現システムの機能解析を行った[75]。プラスミドベクターを導入したヒト胃がん細胞株 MKN45 を加温することにより遺伝子発現を誘導したところ、42°C の温度から HSP70B'プロモーターが駆動し始めた。さらに、45°C で加温したところ、加温を行わなかった場合と比較してレポーター遺伝子 *Luciferase* の発現量が約 400 倍増加した。次に、治療遺伝子 *HSV-tk* による遺伝子療法をモデルとして温熱療法と遺伝子療法の併用効果を調べたところ、42°C で 30 分間の加温を 3 度行うことにより、温熱療法単独の場合と比較して腫瘍体積の増殖を 28 日間著しく抑制することに成功している[75]。

以上のように、HSP70B'プロモーターの熱誘導性能の高さが実証されており、HSP70B'プロモーターを利用した温熱誘導型遺伝子発現システムはがん遺伝子療法において非常に有用なツールであると考えられる。さらに、HSE 配列を新たに加えて活性を高めた変異型 HSP70B'プロモーター[76]、組織特異的プロモーターを融合さ

せることにより腫瘍標的性をもたせたハイブリッドプロモーター[77]など HSP70B'プロモーターの機能をさらに高めることを狙った研究が報告されている。一方で、HSP70B'プロモーターは熱ストレス以外にも低酸素、飢餓、サイトカインといったストレスで駆動することが報告されているため[68, 78, 79]、臨床応用を想定した場合、熱ストレス以外で治療遺伝子が発現し、正常組織への意図せぬ副作用を引き起こす可能性がある。そこで、がん温熱遺伝子療法の発展のために、HSP70B'プロモーター領域を熱ストレス特異的に駆動するように最適化するなど、HSP70B'プロモーターを含む温熱誘導型プロモーターのより一層の機能化が期待されている。

2.2.2 免疫療法との併用

生体外から侵入したウイルスや病原菌などの外的異物、および生体内で発生したがん細胞や老朽化細胞などの内的異物に対する防御作用を担うのは、T 細胞、B 細胞、マクロファージおよび樹状細胞（dendritic cell; DC）などの免疫細胞による免疫系である[80]。元来は自己の正常細胞であったがん細胞に対しては、マクロファージや DC ががん細胞表面に発現しているがん抗原や主要組織適合性遺伝子複合体（major histocompatibility complex; MHC）クラス I を認識することにより正常細胞との識別を行い、がん細胞を貪食する。その後、がん細胞を分解し、がん抗原を細胞傷害性 T 細胞（cytotoxic T-lymphocyte; CTL）やヘルパーT 細胞に提示することでがん細胞の情報を伝える。がん細胞の情報を得た CTL やヘルパーT 細胞はがん抗原を認識し、生体内に潜むがん細胞に対して攻撃を開始する。この免疫の仕組みを細胞性免疫といい、細胞性免疫を活性化し、抗腫瘍免疫を賦活することで治療効果を狙うがん免疫療法の研究が進んでいる[81-83]。がん免疫療法の利点として、生体内に本来備わっている免疫系を賦活する治療法であるため、抗がん剤や放射線療法と比較して副作用が少ないことや外科手術の様に患者の QOL を損なう恐れがないことが挙げられる。しかしながら、がん細胞はがん抗原や MHC クラス I の発現量を低下させることにより免

疫系を回避しようとするため[84]、がん免疫療法単独での治療効果は三大療法と比較して低いことが問題である。近年、温熱療法と併用することによりがん免疫療法の治療効果が著しく高まり、温熱療法により抗腫瘍免疫が活性化されることが報告されている[85]。この温熱療法による免疫誘導には、がん抗原と HSP が必須であることが報告されており、次節にそのメカニズムについて述べる。

2.2.2.1 温熱療法の免疫誘導効果

HSP を介した免疫誘導の概略について述べる（Fig. 4）。まず、温熱療法を施すことにより腫瘍組織内で HSP が高発現し、シャペロン作用によりがん細胞内のがん抗原ペプチドと結合する[86, 87]。そして、熱ストレスによりネクローシスを起こしたがん細胞内から HSP-抗原ペプチド複合体が放出される。放出された HSP-抗原ペプチド複合体は、CD91 などの HSP レセプターを発現しているマクロファージや DC などの抗原提示細胞（antigen presenting cell; APC）に貪食される[88]。APC は貪食した抗原ペプチドを MHC クラス I およびクラス II に提示し、MHC クラス II とヘルパーT 細胞の TCR を介した相互作用により成熟し、CTL の機能分化を誘導する能力を獲得する[89]。その後、成熟した APC は CTL にがん抗原の情報を伝えるために流入領域リンパ節へ移動し、MHC クラス I と CTL の TCR を介した相互作用により抗原提示を行う[90]。抗原提示を受けた CTL はリンパ節内で増殖・分化し、腫瘍組織へ浸潤し、提示されたがん抗原を発現するがん細胞を認識し、攻撃を開始する。また、温熱療法により大量に発現した HSP がん細胞膜に結合し、その結合した HSP を目印としてナチュラルキラー（NK）細胞が集まり、がん細胞を攻撃することも報告されている[91]。

さらに、温熱療法を施すことによって、APC の貪食作用の活性化による抗原ペプチドの取込み量の増加[92]、CD40 や MHC クラス II の発現誘導による APC 成熟の促進[93]、APC の流入領域リンパ節への遊走の活性化[94]、および抗原特異的な CTL の増殖の活性化[95]などが観察されている。これらの知見を基に、

温熱療法により誘導される抗腫瘍免疫をさらに賦活する治療法を開発することができれば、賦活された免疫によって再発・転移がんをも治療可能な理想的ながん治療法になり得る。次節において、温熱療法と免疫療法を融合したがん温熱免疫療法の治療効果について紹介する。

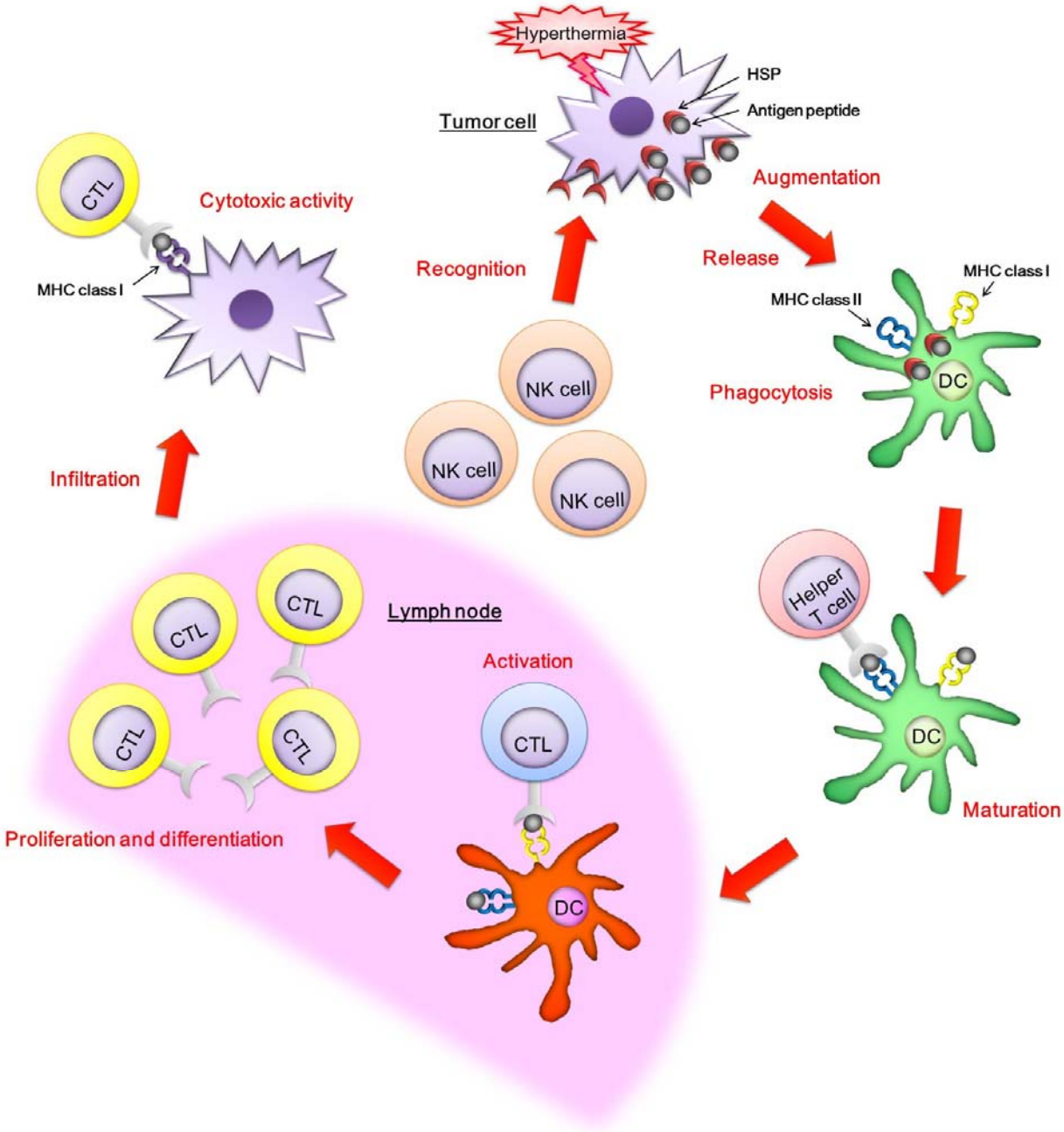

Fig. 4 Hypothesis for antitumor immune response induced by hyperthermia.

2.2.2.2 がん温熱免疫療法

Ito. A.らは、温熱療法で発現誘導される HSP をさらに増強することを目的として、温熱療法と HSP 投与による温熱免疫療法を開発した[40, 96, 97]。組換えマウス HSP70 タンパク質をマウスメラノーマに投与し、43°C、30 分間の温熱療法を施したところ、20%のマウスで腫瘍組織の完全退縮が観察された[96]。さらに、*HSP70* 遺伝子を構成的に発現するプラスミドベクターを用いた遺伝子療法と温熱療法を併用した結果、30%のマウスで腫瘍組織の完全退縮が観察され、温熱療法と HSP による温熱免疫療法の有効性を示した[97]。

さらに、患者由来の DC を体外でがん抗原を添加することにより活性化し、患者の体内に戻す研究が活発に行われている[98]。また、DC は温熱療法後のがん細胞から放出された HSP-抗原ペプチド複合体を貪食し、CTL に抗原提示を行うことにより抗腫瘍免疫を活性化させるという重要な役割を担っている。この抗原提示による抗腫瘍免疫の活性化は、DC の細胞数に比例して増強されると考えられるため、温熱療法後に DC を生体内に投与することでさらなる治療効果を得られることが期待される。Matsumoto, K.らは、両体側の C3H マウス扁平上皮がんの右側の腫瘍部位のみに 43°C、30 分間の温熱療法を施し、腫瘍組織に DC を注入し、腫瘍体積の経過観察を行った[99]。興味深いことに、DC を注入直後に再度 41°C、30 分間のマイルド温熱療法を施すことで、有意に腫瘍体積の増殖が抑制された。また、温熱療法を施していない左側の腫瘍組織の増殖も抑制され、温熱療法と DC を併用した治療法の抗腫瘍免疫の効力を示した。がん細胞のネクローシスを引き起こす 43°C-46°C といった温度より低い 39°C-41°C の温熱療法により DC の成熟が促進されることが報告されており[40, 100]、抗腫瘍免疫を賦活するためにはマイルド温熱療法を利用することも重要であることが示唆された。

T 細胞の増殖や分化を促進する IL-2 や IL-12 などのサイトカインを使用して抗腫瘍免疫を賦活する研究も行われている[31, 32]。しかしながら、これらサイ

トカイン遺伝子の過剰発現は体重減少や肝臓のネクローシスを引き起こすことが報告されており[34]、臨床応用する際には効力を調節する方法が求められる。また、がんの抗原特異的免疫療法として、がん抗原を認識して腫瘍組織に浸潤している腫瘍浸潤リンパ球（tumor infiltrating lymphocyte; TIL）を利用した TIL 療法が開発されている[101]。TIL 療法は、患者から採取した TIL を生体外で大量培養し、再び生体内へ戻す治療法であるが、T 細胞の抗原特異性を維持したまま培養を行うことが困難である。その欠点を克服する治療法として、遺伝子工学的に *TCR* 遺伝子を再編成した人工 CTL を用いた養子免疫治療法が注目されている[102, 103]。この治療法は、患者から採取した $CD8^{+}$T 細胞をがん抗原特異的に認識するように *TCR* 遺伝子を再編成するために、抗原特異性を維持したまま大量培養を行うことが可能である。そこで、温熱療法後の抗腫瘍免疫におけるエフェクター細胞である CTL を賦活することを目的として、温熱療法後に患者由来の TIL を用いて人工 CTL を作製した後に、患者に投与する新規温熱免疫療法の開発が有益であると考えられる。

2.3 機能性磁性ナノ粒子の医学的応用

磁性ナノ粒子は、その磁性特性と粒子表面を修飾することで新たに機能を付加することが容易であることから、磁気分離による不純物の除去[104]、プラスミドベクターなどを利用した細胞への遺伝子導入[105]、MRI の造影剤[106]、抗がん剤を腫瘍組織へ届けるドラッグデリバリーシステム[107]など医学分野への応用が盛んに行われている。磁性ナノ粒子のその他の応用例として、本研究では、機能性磁性ナノ粒子と交番磁場を利用した温熱療法により目的遺伝子を発現させるシステムの開発を行った。そこで本節では、これまでに報告されている機能性磁性ナノ粒子を利用した温熱療法、さらに温熱療法への応用が今後期待される機能性磁性ナノ粒子について紹介する。

2.3.1 機能性磁性ナノ粒子を用いた温熱療法

温熱療法を臨床応用する際には、如何にして腫瘍組織特異的に加温するかという課題を克服しなければならない。さらに、より高い治療効果を得るためには腫瘍組織内部から加温することが望ましい。これら温熱療法の臨床応用への障害を突破するために、機能性磁性ナノ粒子と交番磁場を利用した温熱療法が開発されている[8]。がん細胞内へ磁性ナノ粒子を送達できれば、交番磁場照射による磁性ナノ粒子のヒステリシス損失により細胞内から加温することが可能となる。1979 年に Gordon, R.らは、乳がんマウスを対象としてデキストランマグネタイトを用いた細胞内温熱療法を行い、磁性ナノ粒子と交番磁場を利用した温熱療法の有用性を初めて実証した [108]。その後、様々な機能性磁性ナノ粒子を利用した温熱療法の開発が試みられてきた。磁性ナノ粒子を正電荷脂質に包埋することにより負電荷を帯びた細胞への取り込み能を増強した MCL を用いた温熱療法では、45°C、30 分間の加温を行うことによりマウス乳がん皮下移植モデルの完全退縮に成功したことが報告されている [109]。さらに、細胞内温熱療法の課題である磁性ナノ粒子の腫瘍組織特異性を達成するために、磁性ナノ粒子表面に腫瘍特異的抗体などを結合した機能性磁性ナノ粒子が開発されている[12, 110, 111]。ヒト腎臓がん細胞の表面抗原を認識する抗体を結合させた機能性磁性ナノ粒子では、全投与量の 50%が腫瘍組織に集積し、43°C、30 分間の温熱療法により腫瘍組織の増大が 2 週間抑制されたとの報告もある[110]。また、多くのヒト乳がん細胞で過剰発現しているヒト上皮成長因子受容体（human epidermal growth factor receptor-2; HER2）を認識する抗体を結合させた機能性磁性ナノ粒子においても、全投与量の 60%が腫瘍組織に取り込まれ、高い腫瘍標的性を示した[12]。そして、抗 HER2 抗体結合型磁性ナノ粒子を投与後に、24 時間毎に計 2 回、45°C、30 分間の温熱療法を施すことにより、腫瘍組織の完全退縮に成功している[111]。

さらに、悪性黒色腫メラノーマを標的とした機能性磁性ナノ粒子も開発され

ている。メラノーマはメラニンを形成するメラノサイト由来の悪性腫瘍であり、非常に進行が速いがんとして知られている。早期に発見することができれば外科手術により良好な治療効果を得られるが、リンパ節や肺、肝臓などに一度転移してしまうと治療が難しく死亡率が非常に高くなる。切除不能なメラノーマ患者の予後は悪く、従来の治療法では 3 年生存率は 15%以下である[112]。一方で、メラノーマは表在性腫瘍であるので薬剤の投与と効果のモニターが容易であるために、メラノーマを標的とした局所温熱療法を目的として機能性磁性ナノ粒子 NPrCAP/M が開発されている[113]。メラノサイトはメラニン形成の際に基質としてチロシンを利用するため、チロシン類似体を利用することによりメラノーマ標的性をもたせることが可能である。Thomas, P. D.らは、DNA 合成を阻害するチロシン類似体 NPrCAP を用いた化学療法によりメラノーマ特異的に治療効果が得られることを実証している[114]。このチロシン類似体 NPrCAP を結合させた NPrCAP/M はメラノーマに対する標的性を獲得し、それ自体が化学薬剤として働き、メラノーマ細胞のアポトーシスを誘発する[38]。さらに、Sato, M.らは、NPrCAP/M を用いてマウスメラノーマに対して 43°C、30 分間の温熱療法を施すことにより、NPrCAP を結合していない磁性ナノ粒子を用いた場合と比較して、約 5.4 倍の抗腫瘍効果が得られたことを報告している [113]。以上のことから、腫瘍標的性をもたせた機能性磁性ナノ粒子を温熱療法に応用することにより、局所性と細胞内からの加温という温熱療法の課題を解決することが可能であることが示唆された。

2.3.2 腫瘍標的性をもった機能性磁性ナノ粒子

腫瘍標的性をもった機能性磁性ナノ粒子を開発する際には、細網内皮系（reticuloendothelial system; RES）を如何にして突破するかが重要な要因である。RES とは、生体内の異物に対する防御作用を担うマクロファージなどの細胞の総称である。生体内に投与した磁性ナノ粒子が RES に捕えられ、肝臓や脾臓に

取り込まれることにより予期せぬ副作用を引き起こすことが問題となっていた。Fan, C.らは、*o*-carboxymethyl chitosans （OCMCS）を磁性ナノ粒子に修飾することにより RES を回避可能であることを示し、さらに、OCMCS に葉酸（folic acid; FA）を結合させることにより腫瘍標的性磁性ナノ粒子へ発展させた[115]。葉酸受容体（folate receptor; FR）は、FA をリガンドとする腫瘍関連膜タンパク質であり、正常細胞とがん細胞を区別して薬剤を届ける上で格好の標的となる[116]。また、FR を介したエンドサイトーシスにより FA-薬剤複合体を細胞内へ輸送する機能[117]を活かして、FA 結合型磁性ナノ粒子をがん細胞内へ取り込ませることが可能になる。さらに、FA を用いる利点として、免疫原性および細胞毒性が低く、安価で安定であることが挙げられる[115]。Fan, C.らが開発した FA 結合型磁性ナノ粒子は、FR を発現しているヒト口腔上皮内がん、ヒト子宮頸がんに高効率で取り込まれ、正常細胞への反応性が低いことが報告されている[115]。したがって、FA 結合型磁性ナノ粒子を温熱療法に用いることで、予期せぬ副作用がなく、細胞内から加温可能な新規温熱療法の開発が可能であると考えられる。

さらに、膵臓がんを標的とした機能性磁性ナノ粒子も開発されている。膵臓がんは難治がんの代表であり、5 年生存率は 5 %以下である。膵臓がんによる死亡率の高さの原因は、膵臓がんと診断された際には既に他臓器へ浸潤・転移しており、劇症型の臨床経過を辿る、そして適切な全身療法が不足していることが挙げられる。現在、膵臓がんの根治療法は外科手術のみであるが、5 %-25 %の患者しか外科手術の適応にならなず、外科手術を施せない膵臓がん患者の予後は悪く、生存期間中央値は 3 か月から 6 ヶ月である[118]。以上の理由から、膵臓がんは国内におけるがんによる死亡原因の第 5 位であり、外科手術に代わる根治療法の開発が望まれている。そこで、膵臓がんの早期発見、治療を目的として、ウロキナーゼ型プラスミノーゲン活性化因子受容体（urokinase plasminogen activator receptor, uPAR）を標的とした機能性磁性ナノ粒子が開発された[119]。ウロキナーゼ型プラスミノーゲン活性化因子（urokinase plasminogen activator, uPA）は、がん細胞の浸潤や転移に関与しており、受容体である uPAR は正常な膵臓では発現せず、多くの膵臓がんで過剰発現していることが報告

されている[119-121]。さらに、uPAR を介したエンドサイトーシスにより高効率で抗がん剤をがん細胞内へ送達可能であることも示されており、uPAR 標的性磁性ナノ粒子は膵臓がんの早期診断および膵臓がんに対する化学療法において有用なナノ材料である[119, 122]。Lee, G. Y.らは、抗がん剤ゲムシタビンを結合させた uPAR 標的性磁性ナノ粒子を開発し、uPAR を結合していない磁性ナノ粒子を用いた場合と比較して、効率よく膵臓がんの MRI 診断および治療が可能であることを示した[119]。この uPAR 標的性磁性ナノ粒子を温熱療法へ応用することにより、外科手術が困難な膵臓がんに対する新たな治療法の確立が可能であると考えられる。

酸化鉄を利用した磁性ナノ粒子に代わる新しい磁性体として、鉄貯蔵タンパク質であるフェリチンタンパク質[123]が注目されている。細胞内に取り込んだ鉄イオンを利用し、磁性粒子を形成するフェリチンの特性を活かして、目的細胞の磁気分離技術への応用が盛んに研究されている[124]。さらに、近年、フェリチンタンパク質の腫瘍標的性を活かした診断および抗がん剤送達が行われている[125, 126]。腫瘍特異性を獲得するためには、磁性ナノ粒子の表面に抗体や低分子を結合させることが一般的であるが、その過程が煩雑である、さらに用いる試薬が高価であるといった問題が常に付きまとう。そして、粒子表面を修飾しているために、目的細胞ではない予期せぬ細胞への結合、またナノ粒子同士の凝集を引き起こし、磁性ナノ粒子の機能性が損なわれるという問題が度々発生する[125, 127]。これらの問題を解決するために、フェリチンタンパク質がトランスフェリン受容体 1（transferrin receptor 1, TfR1）を介して細胞へ結合する、さらにがん細胞が TfR1 を過剰発現していることを利用した腫瘍標的性ナノ粒子が開発されている[125, 128, 129]。Fan, K.らは、鉄原子を包埋したフェリチンタンパク質をがん診断に利用し、肝細胞がん、肺扁平上皮がん、大腸がん、乳がん、前立腺がんなど幅広いがん細胞と正常細胞を高感度で識別可能であることを示した[125]。さらに、Liang, M.らは、抗がん剤ドキソルビシンを包埋したフェリチンタンパク質を薬物送達のキャリアーとして利用し、正常組織を傷害することなく、腫瘍組織の増大を 3 週間抑制することに成功している[126]。

フェリチンタンパク質をキャリアーとして用いる利点として、高価な抗体やペプチドを修飾する必要がない、生体内で元来発現しているため免疫原性が低い、さらに大腸菌によって大量に精製できるため安価であることが挙げられる[125, 126, 130]。このフェリチンタンパク質を磁性体として利用することで、高い腫瘍標的性をもち、副作用が少ない新たな温熱療法の開発が可能であると考えられる。

2.4 本章のまとめ

2.1 節では、がんの三大療法である放射線療法、化学療法、外科療法と温熱療法を併用した治療法について説明した。2.2 節では、遺伝子療法と温熱療法を融合した温熱遺伝子療法を説明する上で重要な熱ストレスに対する細胞内メカニズムを示し、その性質を利用した温熱誘導型遺伝子療法について紹介した。さらに、温熱療法で誘導される抗腫瘍免疫のメカニズムを説明し、温熱療法と免疫療法を併用した治療法の有用性を示した。2.3 節では、機能性磁性ナノ粒子を利用した温熱療法の有用性、さらに、今後温熱療法に応用可能な機能性磁性ナノ粒子について説明した。

これらの背景を踏まえて、次章からは、磁性ナノ粒子と交番磁場を利用した温熱療法後の抗腫瘍免疫を賦活する治療法の開発を目的として、温熱誘導型遺伝子発現システムの開発、および温熱免疫機構の解析について得られた成果を示す。

第 3 章　フィードバック増幅ループを含む温熱誘導型遺伝子発現システムの開発

3.1 緒言

遺伝子療法は、がん治療を含む様々な医療分野への応用が期待されている[18-21]。抗がん剤を用いた化学療法と同様に、遺伝子療法を臨床応用するためには正常組織への副作用の低減が第一義であり、治療遺伝子の発現を意図的に制御する技術の開発が急務である。この目的を達成するために、多くの研究者が合成生物学の概念を取り入れ、人工的な遺伝子回路を設計している[131, 132]。その中でもテトラサイクリン（Tet）発現システム[133]と HSP プロモーターシステム[63]は効率的に遺伝子発現を制御可能なため幅広く用いられている。本研究で利用した Tet-Off システム（Fig. 5）は、転写活性化タンパク質 tTA と TRE 配列によって構成される人工的な遺伝子高発現システムである。tTA は大腸菌由来のテトラサイクリンレセプター（tetR）とヘルペスウイルス由来の転写活性化ドメイン（vp16）の融合タンパク質であり、vp16 ドメインが転写を活性化、tetR ドメインが TRE 配列に特異的に結合する性質を持つ。TRE 配列と最小 CMV プロモーター（P_{CMVmin}）によって構成される合成プロモーター配列に tTA が結合することで、TRE 配列下流の目的遺伝子の発現が誘導される。さらに、ドキシサイクリン（Dox）などの Tet 誘導体を添加することにより tTA と TRE 配列の相互作用が阻害されるため、目的遺伝子の発現を抑制することも可能である。また、HSP プロモーターシステムには、通常の細胞内では発現量が非常に低いが、熱ストレスを含む細胞内ストレスが加わった際に迅速に発現する HSP70B’ [35]のプロモーターが用いられることが多い。HSP70B’プロモーターは加温された際だけ下流の遺伝子発現を誘導する厳密なプロモーターとして働くが、構成的に遺伝子発現を誘導する CMV プロモーターなどのウイルスプロモーターと比較して活性が低いことが問題として挙げられる[36]。

そこで本研究では、HSP70B’プロモーターによる目的遺伝子の発現量をさらに増強

することを目的として、Tet-Off システムと HSP プロモーターシステムを融合したハイブリッドプロモーターを作製し、加温をスイッチとした 2 段階発現増幅システムを構築した（Fig. 6A）[134]。2 段階発現増幅システムでは、まず、加温をスイッチとして HSP70B'プロモーターが駆動し、下流の遺伝子配列が mRNA に転写される。その後、スプライシングドナー（SD）とスプライシングアクセプター（SA）間のイントロンがスプライスアウトされ、転写活性化タンパク質 tTA が翻訳される。発現した tTA が上流の TRE 配列に結合することで、ポジティブフィードバック的に tTA が大量発現する。その後、目的遺伝子上流の TRE 配列に大量発現した tTA が結合することで、目的遺伝子の大量発現が誘導される。一方で、この 2 段階発現増幅システムが機能するためには、tTA 発現プラスミドベクターと目的遺伝子発現プラスミドベクターが同一核内に導入されることが必須であるため、臨床応用する際には遺伝子導入効率がボトルネックとなる恐れがある。そのため本研究ではさらに、これらの発現ユニットをひとつのプラスミドベクターに含有する One-pack システムを構築し、さらなる発現効率の向上を狙った（Fig. 6B）[134]。

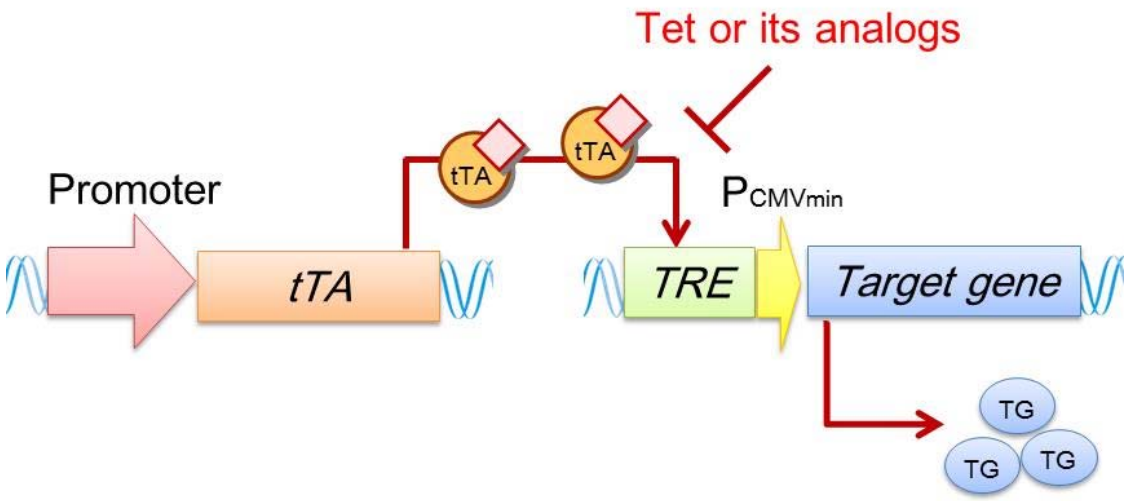

Fig. 5 Tetracycline-controlled expression system used in this study. Tetracycline-responsive transcriptional activator (tTA) binds to the tetracycline-responsive element (TRE) and induces the transcription of the downstream gene. After the addition of tetracycline or its analogs, such as doxycycline (Dox), the interaction between tTA and TRE is inhibited and gene expression is switched off (Tet-Off system).

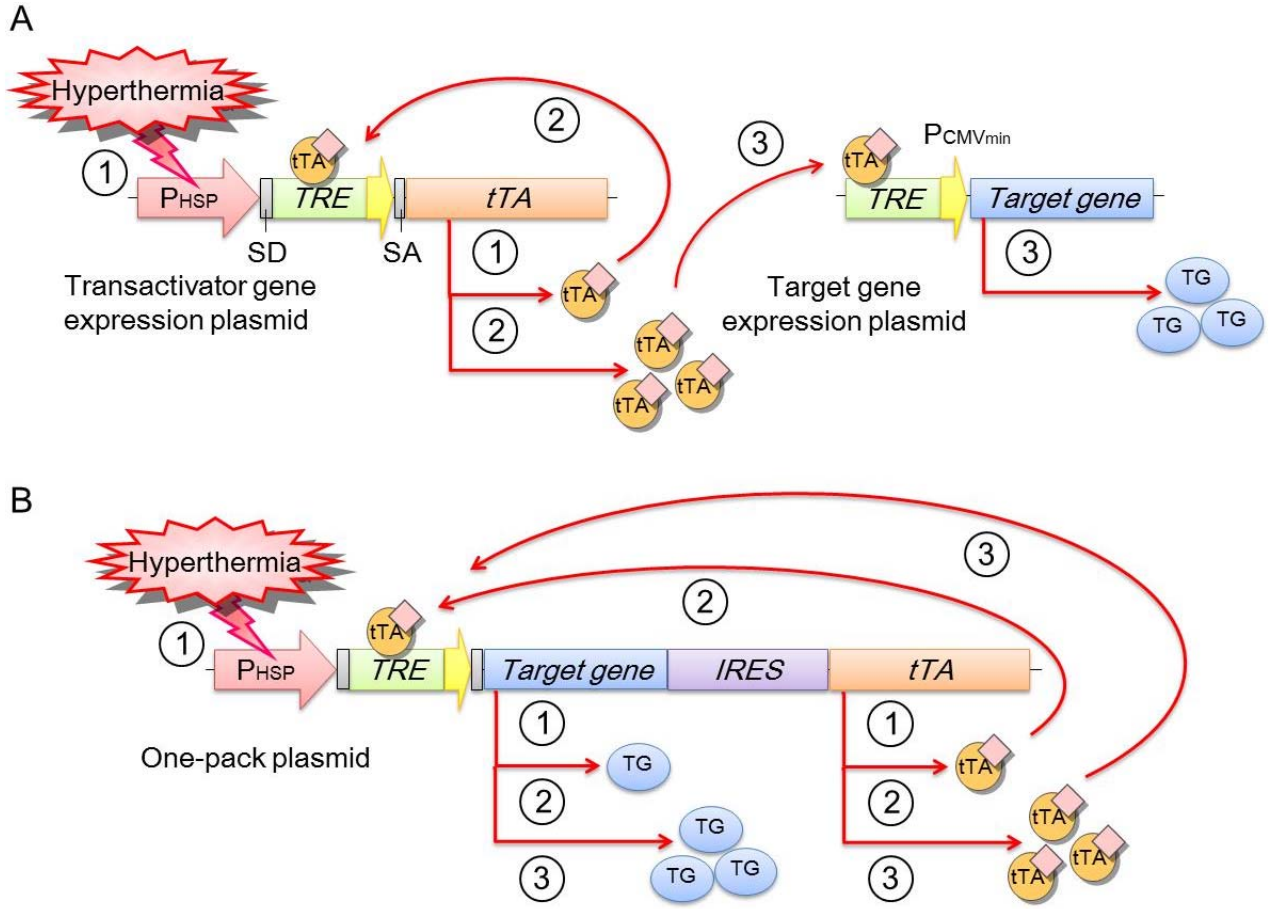

Fig. 6 Schematic diagrams of the strategy for heat-inducible gene expression. (A) Mechanism of action in heated cells co-transfected with the transactivator plasmid and the target gene expression plasmid. (1) Hyperthermia induces tTA expression mediated by the HSP70B' promoter; (2) tTA activates the TRE/P_{CMVmin} promoter to induce additional tTA expression, providing a transcriptional positive feedback loop; (3) highly expressed tTA also induces target gene expression under the control of the TRE/ P_{CMVmin} promoter. (B) Mechanism of heat-induced gene expression in cells transfected with the one-pack plasmid. (1) Hyperthermia induces the expressions of both target gene and tTA mediated by the HSP70B' promoter and the bicistronic IRES; (2), (3) tTA activates TRE/P_{CMVmin} promoter to induce further expressions of target gene and tTA providing a transcriptional positive feedback loop [134].

3.2 レポーター遺伝子 *LacZ* を用いた温熱誘導型遺伝子発現システムの機能解析

3.2.1 本節の目的

本節では、HSP70B'プロモーターと Tet-Off システムを融合することにより、加温をスイッチとして目的遺伝子の大量発現を誘導する温熱誘導型遺伝子発現システムの構築を目的とした。まず、tTA 発現プラスミドベクターと目的遺伝子発現プラスミドベクターを作製し、レポーター遺伝子 *LacZ* の発現を継続的に測定することにより、2 段階発現増幅システムの機能解析を行った。また、HSP70B'プロモーターと TRE 配列を組み合わせたハイブリッドプロモーターと CMV プロモーターの活性値を比較することにより、HSP70B'プロモーターの問題点である活性値の低さが改善されたかを確認した。最後に、tTA 発現プラスミドベクターと目的遺伝子発現プラスミドベクターを利用した 2 段階発現増幅システムをひとつのプラスミドベクターに含有する One-pack システムを構築し、さらなる発現効率の向上が達成されるかを検討した。

3.2.2 実験方法

3.2.2.1 HSP70B'プロモーター配列のクローニング方法

本研究で使用した HSP70B'プロモーター配列領域は、HEK293 細胞（Riken BioResourse Centar, Tsukuba, Japan）由来のゲノム DNA を鋳型として PCR 法により取得した遺伝子配列である[134, 135]。使用した遺伝子領域は 6 つの HSE 配列を含んでおり、HSP70B'遺伝子の 5'-UTR の開始位置（転写開始位置）を+1 とした際の-342 から+114 にかけての 456 bp の断片である。以下に簡潔に HSP70B'プロモーター配列のクローニング方法を記載する。クローニングするためのプライマー（Table 3）の各端には、制限酵素 *Kpn*I と *Eco*RI の認識サイトがそれぞれ付加されており、PCR

用マイクロチューブ内の反応溶液の組成は、鋳型 DNA 溶液 1.2 μL、10 × PCR buffer 5 μL、2mM dNTP 5 μL、25 mM $MgSO_4$ 2 μL、プライマー Fw 1 μL（10 pmol）、プライマー Rv 1 μL（10 pmol）、DNA ポリメラーゼ（KOD -Plus-; Toyobo, Osaka, Japan）1 μL である。94°C で 2 分間処理した後（初期熱変性）、94°C で 15 秒間（熱変性）、62°C で 30 秒間（アニール）、68°C で 15 秒間（伸長）を 1 サイクルとし、これを 30 サイクル繰り返した。アガロースゲル電気泳動を行うことにより、増幅した PCR 産物が目的の DNA 断片であるかを確認した。

Table 3 PCR primers used in cloning of the human HSP70B' promoter. (Restriction sites were underlined.)

Gene		Sequence	Site
HSP	FW	5'-GGGGTACCGCCTCTAAAGTTGCTGCTTTTG-3'	*Kpn*I
	RV	5'-GGAATTCAAGCTTCTTGTCGGATGCTG-3'	*E*coRI

3.2.2.2 プラスミドベクターの作製方法

使用したプラスミドベクターの作製方法を以下に記載する。

〈pCMV/tTA の作製〉

pCMV/tTA のコンストラクトとその作製手順を Fig. 7 に示す。pTet-Off（Clontech, Palo Alto, CA, USA）を制限酵素 *Xho*I で切断し、リガーゼ処理により自己閉環化させることで pCMV/tTA を作製した[136]。

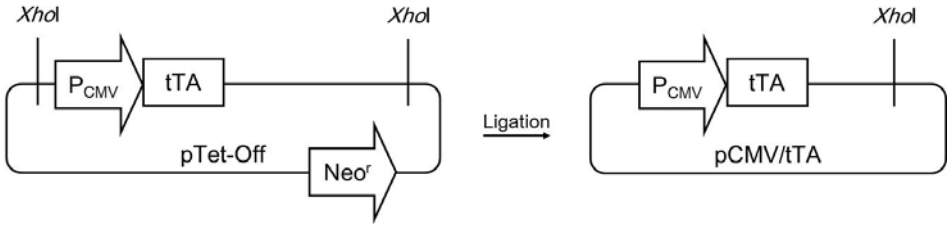

Fig. 7 Flowchart for the construction of pCMV/tTA plasmid.

〈pTRE-CMVmin/Z の作製〉

pTRE-CMVmin/Z のコンストラクトとその作製手順を Fig. 8 に示す。pMSCV/NΔAβ [137]由来の *LacZ* 配列の DNA フラグメントを制限酵素 *Not*I で切断した pTRE2hyg (Clontech)とリガーゼ処理により連結させることで pTRE-CMVmin/Z を作製した[138]。

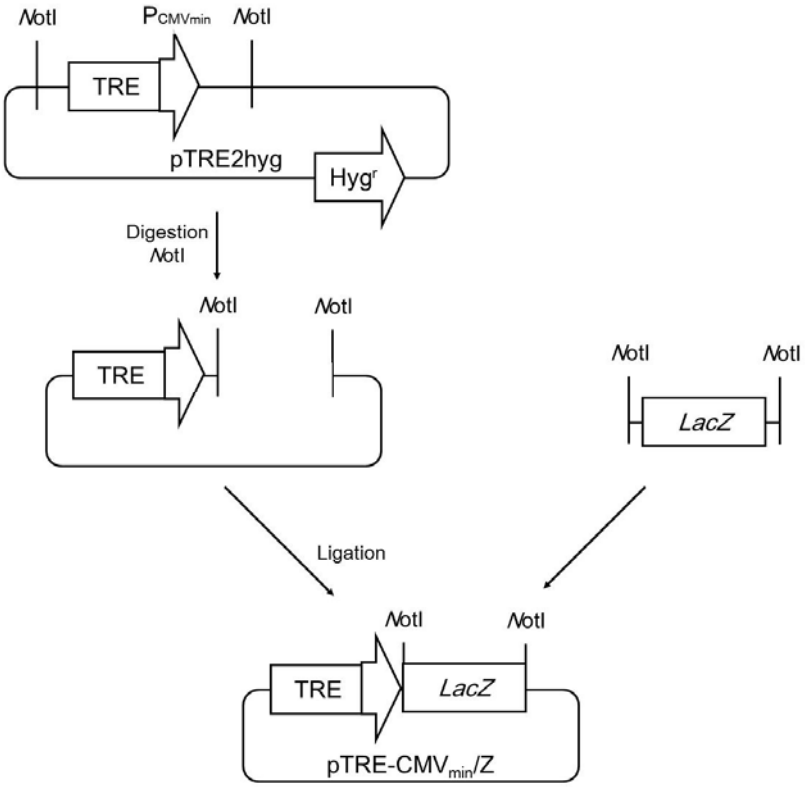

Fig. 8 Flowchart for the construction of pTRE-CMVmin/Z plasmid.

〈pHSP-TRE/tTA の作製〉

pHSP-TRE/tTA のコンストラクトとその作製手順を Fig. 9 に示す。3.2.2.1 に記載した方法で取得した PCR 産物を制限酵素 *Kpn*I と *E*coRI で切断し、制限酵素 *Kpn*I と *E*coRI で切断した pTRE-CMVmin/Z とリガーゼ処理により連結させることで pTRE-HSP456/Z を作製した[135]。そして、pTRE-HSP/Z から制限酵素 *Kpn*I および *Hind*III で切断した HSP プロモーター配列の DNA フラグメントを制限酵素 *Kpn*I および *Hind*III で切断した pETBlue II (Novagen, Madison, WI, USA)とリガーゼ処理により連結させることで pET/pHSP を作製した。

次に、制限酵素 *Cla*I と *E*coRI が付着した SA 配列（Table 4）を全合成により取得した。また、SD 配列を含む TRE 配列は pTRE-tight（Clontech）を鋳型にして Table 5 に示すプライマーを用いて PCR 法により増幅した。PCR 産物を制限酵素 *Hind*III と *Cla*I で切断し、全合成した SA 配列と共に、制限酵素 *Hind*III と *E*coRI で切断した pETBlue II とリガーゼ処理により連結させることで pET/TRE を作製した。

最後に、pET/pHSP から制限酵素 *Sal*I と *Hind*III で切断した HSP プロモーター配列の DNA フラグメント、pET/TRE から制限酵素 *Hind*III と *E*coRI で切断した SD-TRE-SA 配列の DNA フラグメントを制限酵素 *Xho*I と *E*coRI 切断した pTet-Off-Advanced（Clontech）とリガーゼ処理により連結させることで pHSP-TRE/tTA を作製した。そして、PCR 法により増幅した HSP プロモーターの配列確認を行うため、このサンプルのシーケンス解析を北海道システムサイエンス社（Hokkaido, Japan）に依頼した。

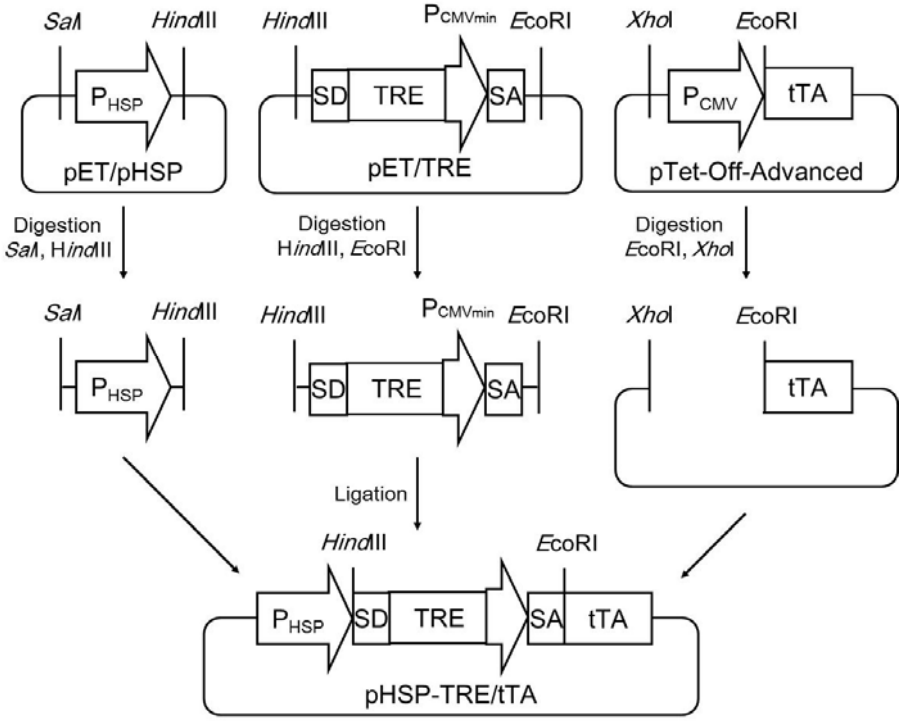

Fig. 9 Flowchart for the construction of pHSP-TRE/tTA plasmid.

Table 4 Oligonucleotide sequences corresponding to SA fragment. (Restriction sites were underlined.)

Gene	Sequence	Site
SA	5'-CGATACTGACATCCACTTTGCCTTTCTCTCCACAGGG-3'	*Cla*I
	5'-AATTCCCTGTGGAGAGAAAGGCAAAGTGGATGTCAG TAT-3'	*E*coRI

Table 5 PCR primers used in cloning of TRE gene tagged with SD sequence. (Restriction sites were underlined and the SD sequence was dark underline.)

Gene		Sequence	Site
TRE	FW	5'-CGCAAGCTTCAGGTAAGTAGGCCCTTTCGTCTT CACTC-3'	*H*indIII
	RV	5'-AAATCGATGCGATCTGACGGTTCACTAAAC-3'	*Cla*I

< pHSP-TRE/Z/IRES/tTA の作製>

pHSP-TRE/Z/IRES/tTA のコンストラクトとその作製手順を Fig. 10 に示す。まず、上述の pHSP-TRE/tTA を制限酵素 *Eco*RI で切断し、DNA Blunting Kit（Takara, Siga, Japan）を使用して DNA フラグメントの平滑化を行った後で、CIP 処理を行った。次に、本研究室で構築された pQMSCV/eG/TRE/OVA/LacZ/IRES/tTA[138]を制限酵素 *Nhe*I と *Xho*I により切断し、DNA フラグメントの平滑化を行った。そして、これら 2 断片をリガーゼ処理により連結させることで pHSP-TRE/Z/IRES/tTA を作製した。

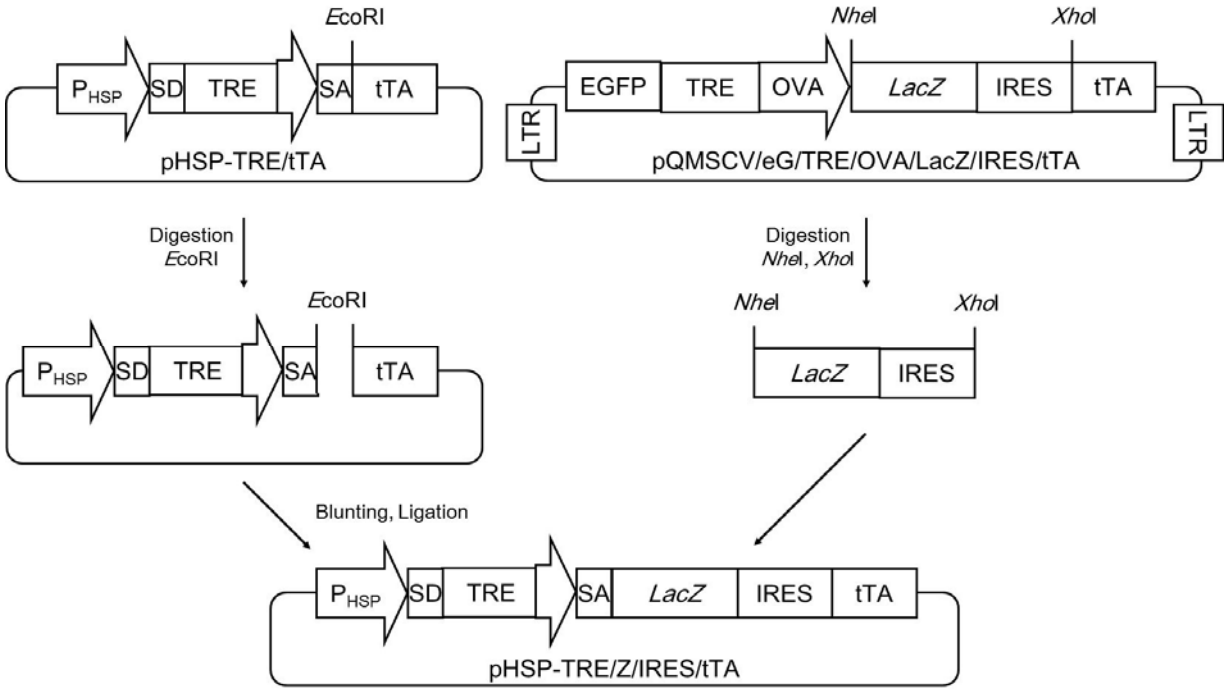

Fig. 10 Flowchart for the construction of pHSP-TRE/Z/IRES/tTA plasmid.

< pHSP-TRE/Z の作製>

pHSP-TRE/Z のコンストラクトとその作製手順を Fig. 11 に示す。上述の pHSP-TRE/Z/IRES/tTA を制限酵素 *Bam*HI で切断し、リガーゼ処理により自己閉環化させることで pHSP-TRE/Z を作製した。

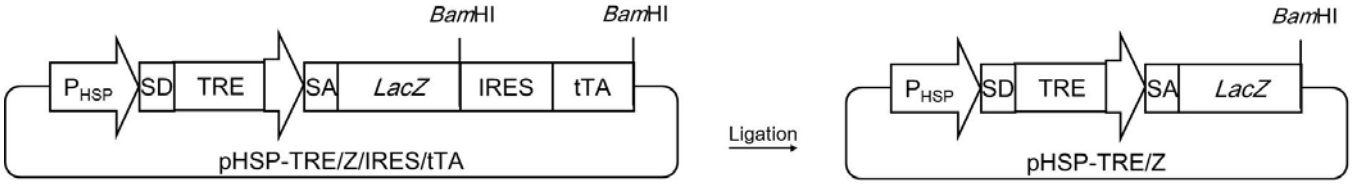

Fig. 11 Flowchart for the construction of pHSP-TRE/Z plasmid.

3.2.2.3 細胞培養

ヒト子宮頸がん細胞株 HeLa（Riken BioResource Center）は、ウシ胎児血清（fetal bovine serum; FBS）を 10%、ベンジルペニシリンカリウム（Wako, Osaka, Japan）を 100 unit/mL、ストレプトマイシン硫酸塩（Wako）を 100 μg/mL および炭酸水素ナトリウム（Wako）を 1.5 g/L 添加した高グルコース DMEM（Dulbecco's modified Eagle's medium; Gibco BRL, MD, USA）を用いて培養した。細胞培養は、37°C、5% CO_2 インキュベータ内で行った。

3.2.2.4 *LacZ* 遺伝子を用いたレポーターアッセイ

レポーターアッセイの実験スキームを Fig. 12 に示す。まず、遺伝子導入を行う 24 時間前に、1.0×10^6 cells/dish の細胞密度で HeLa 細胞を 60 mm ディッシュに前播種した。翌日、Lipofectamine 2000（Invitrogen, Carlsbad, CA, USA）を用いたリポフェクション法により、レポーター遺伝子発現プラスミド（pTRE-CMVmin/Z; 4 μg/dish）と tTA 遺伝子発現プラスミド（pCMV/tTA または pHSP-TRE/tTA; 4 μg/dish）、または One-pack 型レポーター遺伝子発現プラスミド（pHSP-TRE/Z/IRES/tTA; 8 μg/dish）を HeLa 細胞に遺伝子導入した。tTA によるポジティブフィードバック効果が得られないコントロール実験では、空ベクター（pETBlue II; 4 μg/dish）とレポーター遺伝子発現プラスミド（pTRE-CMVmin/Z; 4 μg/dish）、または空ベクター（pETBlue II; 4 μg/dish）とレポーター遺伝子発現プラスミド（pHSP-TRE/Z; 4 μg/dish）を HeLa 細胞へ遺伝子導入した。さらに、ポジティブフィードバックループによる遺伝子大量発現の効果を調べるために、加温する 24 時間前からレポーター遺伝子発現プラスミドを導入した HeLa 細胞を Dox（1 μg/mL）入り培地で培養した。

遺伝子導入から 24 時間後、細胞培養ディッシュの側面をパラフィルムにより厳重に覆うことで水の侵入を防ぎ、恒温槽に 1 時間保持することにより細胞を 41°C、43°C、45°C で加温し、*LacZ* 遺伝子がコードする β-ガラクトシダーゼの発現誘導を行った。加

温終了後、即座に細胞を回収し、24 穴プレートに 1.0 × 10^5 cells/well の細胞密度で再播種した。加温終了から 0、6、12、24、48 時間後に 24 穴プレートから細胞をそれぞれマイクロチューブに回収し、リン酸緩衝生理食塩水（phosphate-buffered saline; PBS）1 mL で洗浄した後、6,000 rpm、5 分間、4°C で遠心分離し、上清を廃棄した。この PBS による洗浄を 3 回行った後に、凍結融解により採取した細胞内タンパク質を用いて、β-ガラクトシダーゼ活性測定[137]および細胞内総タンパク質量測定[139]を行った。

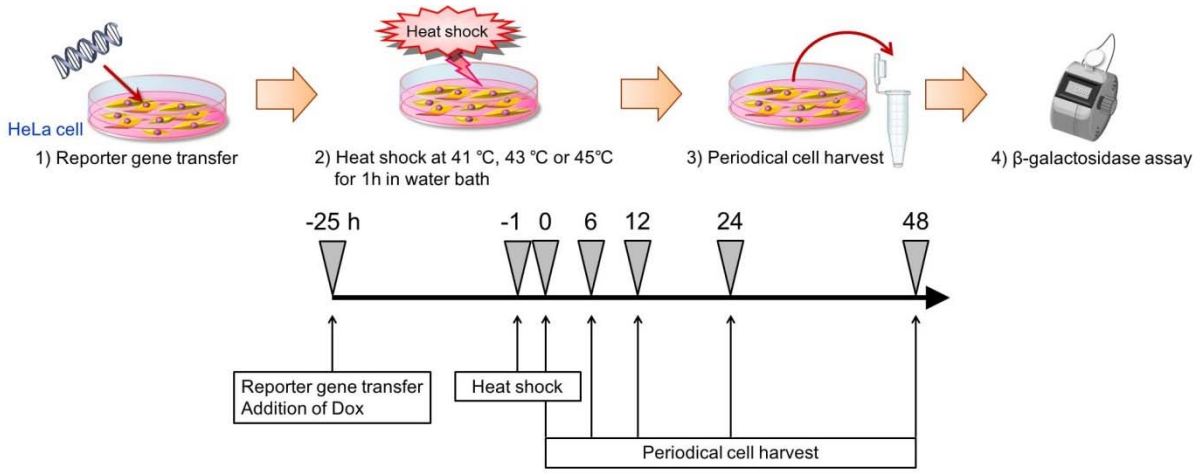

Fig. 12 Scheme of reporter gene assays using reporter gene expression plasmids.

3.2.3 実験結果と考察

3.2.3.1 2 段階発現増幅システムにおけるハイブリッドプロモーターの機能解析

プラスミド pHSP-TRE/tTA および pTRE-CMVmin/Z を HeLa 細胞へ一過性で共導入し、その 24 時間後に加温を行い、*LacZ* 遺伝子の発現を経時的に調べることにより、ハイブリッドプロモーターの機能解析を行った（Fig. 13）。Fig. 13 の横軸は加温を終了してから経過した時間、縦軸は細胞内総タンパク質量あたりのβ-ガラクトシダーゼ活性を示している。細胞への加温は、43°C、1 時間の条件で行った。Fig. 13 より、加温を行わなかった場合では、*LacZ* 遺伝子の発現はほとんど確認されなかった。これと比較して、プ

ラスミド pHSP-TRE/tTA および pTRE-CMVmin/Z を遺伝子導入し、加温を行った場合では、加温をスイッチとしてハイブリッドプロモーターが駆動し、即座に *LacZ* 遺伝子の発現誘導が観察された。加温終了から 24 時間後にプロモーター活性は最大値を示し、この際の *LacZ* 遺伝子の発現量はプラスミド pTRE-CMVmin/Z を単独導入し、加温を行わなかった場合と比較して 1000 倍であった。以上の結果より、作製したハイブリッドプロモーターのリークの低さが示され、加温をスイッチとして駆動するハイブリッドプロモーターの活性により目的遺伝子の発現が誘導されることが分かった。

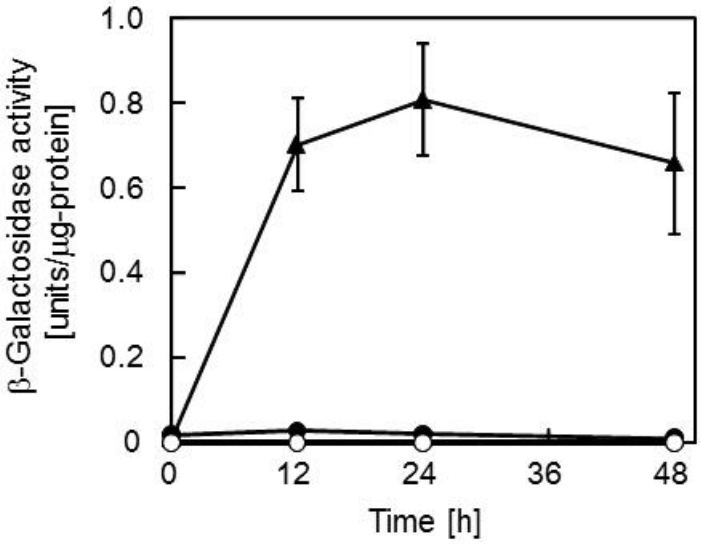

Fig. 13 Reporter gene expression mediated by a heat-induced positive feedback system. HeLa cells were transfected with pTRE-CMVmin/Z alone (open symbols) or co-transfected with pHSP-TRE/tTA and pTRE-CMVmin/Z (closed symbols), and incubated at 37 °C (circles) or heated at 43°C for 1 h (triangles). The data are expressed as mean ± SD (n=3) [134].

3.2.3.2 2 段階発現増幅システムにおけるポジティブフィードバック効果の解析

作製したハイブリッドプロモーターが加温をスイッチとして目的遺伝子の発現を誘導することが示されたため、次に、プラスミド pHSP-TRE/tTA および pTRE-CMVmin/Z を HeLa 細胞へ一過性で導入し、その 24 時間後に加温を行い、*LacZ* 遺伝子の発現を経時的に調べることにより、開発したシステムのポジティブフィードバック機能を評価した（Fig. 14A）。Fig. 14A の横軸は加温を終了してから経過した時間、縦軸は細胞内総タンパク質量あたりのβ-ガラクトシダーゼ活性を示している。細胞への加温は、43°C、1 時間の条件で行った。先程と同様に、プラスミド pHSP-TRE/tTA および pTRE-CMVmin/Z を遺伝子導入し、加温を行わなかった場合では、培養期間中 *LacZ* 遺伝子の発現はほとんど誘導されず、作製したハイブリッドプロモーターのリークの低さが改めて実証された。プラスミド pHSP-TRE/Z を単独導入し、加温を行った場合では、加温直後からβ-ガラクトシダーゼ活性の増加を確認し、ハイブリッドプロモーターの活性は加温から 12-24 時間後に最大を迎えた。しかしながら、加温終了から 48 時間後には、ハイブリッドプロモーターの活性低下に起因して *LacZ* 遺伝子の発現量は加温を行わなかった場合と同レベルまで急激に低下した。これと比較して、プラスミド pHSP-TRE/tTA および pTRE-CMVmin/Z を遺伝子導入し、加温を行った場合では、加温をスイッチとして *LacZ* 遺伝子の発現が誘導され、加温終了から 48 時間後に、恐らく細胞増殖による細胞あたりのプラスミドの減少に起因してやや活性が減少したものの、持続的な *LacZ* 遺伝子の高発現が観察された。以上の結果から、開発した 2 段階発現増幅システムは、HSP70B'プロモーターの熱誘導性と Tet-Off システムの転写増強を兼ね揃えていることが示唆された。

また、開発した 2 段階発現増幅システムは Tet-Off システムを組込んでいるため、Dox を利用することにより tTA と TRE 配列の結合が阻害されるので、tTA のポジフィードバックをキャンセルした効果を調べることが可能である。そこで、プラスミド pHSP-TRE/tTA と pTRE-CMVmin/Z を HeLa 細胞へ一過性で導入し、その 24 時間後に 43°C、1 時間の加温を行い、*LacZ* 遺伝子の発現を調べることにより、Fig.14A で観察

された目的遺伝子の高発現は tTA の転写増強に起因しているかを評価した（Fig. 14B）。Fig. 14B は加温を終了してから 24 時間後の細胞内総タンパク質量あたりのβ-ガラクトシダーゼ活性を示している。Dox を添加するサンプル群については、遺伝子導入の 6 時間後に 1.0 μg/mL Dox 入り培地で培地交換を行った。プラスミド pHSP-TRE/tTA とpTRE-CMVmin/Z を遺伝子導入し、加温を行った後に Dox を添加した場合では、Dox により tTA と TRE 配列の結合が阻害され、加温を行わなかったコントロールと同程度のβ-ガラクトシダーゼ活性値を示した。Dox を添加しなかった場合では、加温をスイッチとして *LacZ* 遺伝子の大量発現が誘導され、Dox を添加した場合と比較して 1850 倍のβ-ガラクトシダーゼ活性を示した。以上の結果より、Fig. 14A で得られた *LacZ* 遺伝子の高発現は、加温をスイッチとした tTA のポジティブフィードバックに起因していると考えられる。

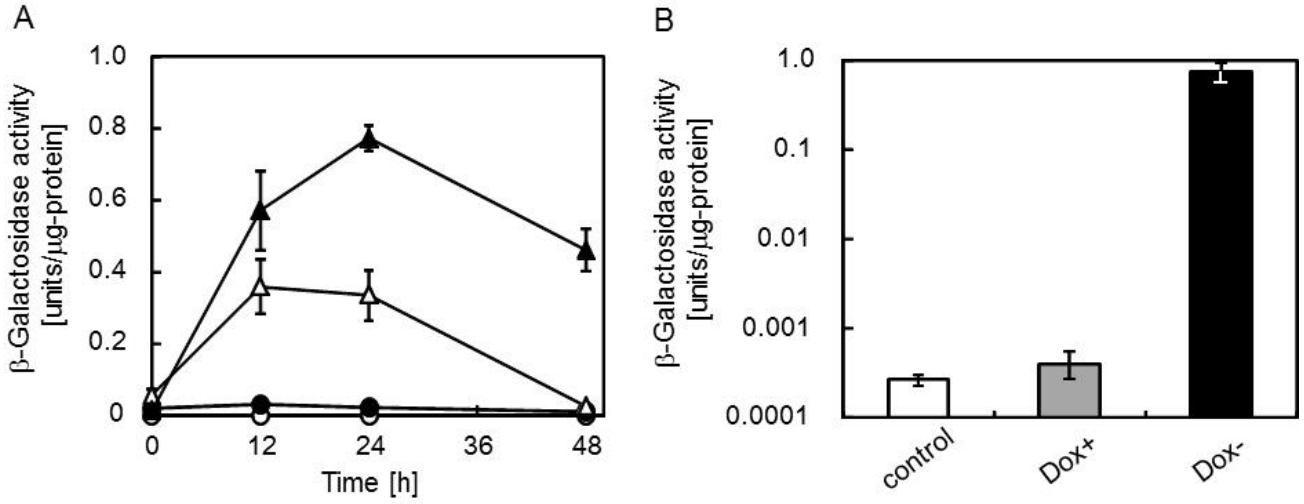

Fig. 14 (A) Reporter gene expression mediated by a heat-induced positive feedback system. HeLa cells were transfected with pHSP-TRE/Z alone (open symbols) or co-transfected with pHSP-TRE/tTA and pTRE-CMVmin/Z (closed symbols), and incubated at 37 °C (circles) or heated at 43°C for 1 h (triangles). The data are expressed as mean ± SD (n=3). (B) β-galactosidase activity at 24 h after heat treatment. HeLa cells were transfected with pHSP-TRE/Z alone (open column) or co-transfected with pHSP-TRE/tTA and pTRE-CMVmin/Z in the presence (shaded column) or absence (closed column) of Dox (1 μg/mL). Cells were then incubated at 37 °C (open column) or heated at 43 °C for 1 h (shaded and closed columns). The data are expressed as mean ± SD (n=3) [134].

3.2.3.3 ハイブリッドプロモーター活性の温度依存性評価

温熱療法における温度設定は、加温領域のがん細胞のネクローシスを引き起こす 43°C-46°C、または抗腫瘍免疫を活性化させる 39°C-41°C という様に目的により使い分けられる。本研究で構築した温熱誘導型遺伝子発現システムと温熱療法を併用する上で、上記の温度領域におけるハイブリッドプロモーター活性を把握することが非常に重要である。そこで、43°C の加温に加え、41°C、45°C を温度条件として新たに設定し、*LacZ* 遺伝子の発現量を比較することにより、作製したハイブリッドプロモーター活性の温度依存性を評価した。

プラスミド pHSP-TRE/tTA および pTRE-CMVmin/Z を HeLa 細胞へ一過性で共導入し、その 24 時間後に 41°C、43°C、45°C で 1 時間の加温を行い、*LacZ* 遺伝子の発現量を 24 時間後に比較した（Fig. 15）。Fig. 15 の横軸は温度条件、縦軸はプラスミド pHSP-TRE/Z を導入し、加温を行わなかった場合（37°C）の活性を 1 とした際の相対的な活性を示している。加温を行わなかった場合（37°C）では、tTA によるポジティブフィードバック効果が得られない場合（プラスミド pHSP-TRE/Z 単独導入）と比較して、プラスミド pHSP-TRE/tTA および pTRE-CMVmin/Z を共導入した際に約 3 倍の活性を示したが、ハイブリッドプロモーター活性の絶対量は低かった。一方で、加温を行った場合のβ-ガラクトシダーゼ活性は、tTA によるポジティブフィードバック効果が得られない場合（プラスミド pHSP-TRE/Z 単独導入）と比較して、プラスミド pHSP-TRE/tTA および pTRE-CMVmin/Z を共導入した際に、43°C の加温と tTA の併用効果により約 3000 倍、45°C の加温と tTA の併用効果により約 6500 倍に増強された。また、HSP70B'プロモーターにより誘導された遺伝子発現量は、加温から 24 時間後では温度条件 43°C、45°C 間で差異はほとんど無かったが（Fig. 15; open symbols）、加温から 48 時間後では温度条件 45°C においてより高い *LacZ* 遺伝子発現量を得た（data not shown）。したがって、HSP70B'プロモーターの活性は温度条件 45°C においてより高いことが分かったが、温度条件 43°C と比較して *LacZ* 遺伝子発現の遅れが観察された。この原因として、温度条件 43°C と比較して、

温度条件 45°C では細胞ダメージがより大きく、目的タンパク質の合成に影響を及ぼしたことが考えられる。この結果から、HSP70B'プロモーターによる遺伝子発現量は細胞ストレスに比例して増強されることが示唆された。

本実験により、37°C、41°C といった温度では HSP70B'プロモーターが駆動しないため、ハイブリッドプロモーターの活性は低く、目的遺伝子の発現を制御することが示された。また、43°C、45°C といった温度では HSP70B'プロモーターが駆動し、ハイブリッドプロモーターにより目的遺伝子の発現増強が誘導されることが分かった。以上の結果より、構築した温熱誘導型遺伝子発現システムを利用することにより、副作用が少なく（加温された際のみ遺伝子発現を誘導する）、長期的に（tTA の転写増強による持続的な遺伝子発現）治療効果が得られる新規がん治療法を開発することが可能であることが示唆された。

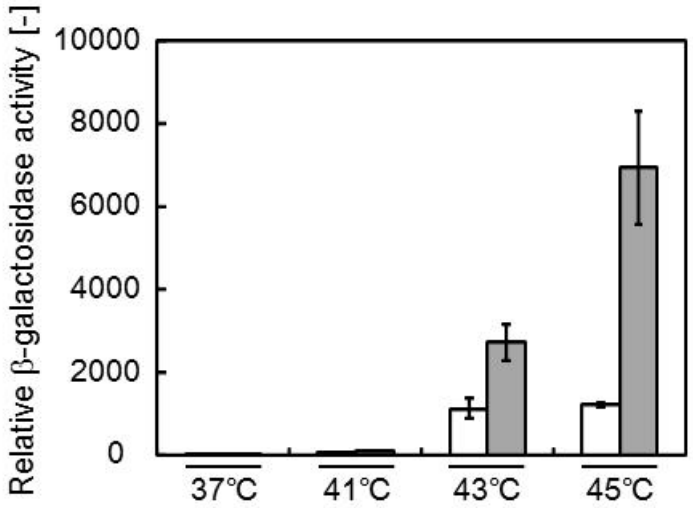

Fig. 15 Reporter gene expression mediated by a heat-induced positive feedback system. HeLa cells were transfected with pHSP-TRE/Z alone (open symbols) or co-transfected with pHSP-TRE/tTA and pTRE-CMVmin/Z (closed symbols), and heated at respective temperatures. Relative β-galactosidase activity is defined as the relative value to the β-galactosidase activity of the cells transfected with pHSP-TRE/Z alone without heating (37 °C) at 0 h. The data are expressed as mean ± SD (n=3) [134].

3.2.3.4 One-pack システムの機能解析

臨床応用を想定した場合、2 種類の遺伝子発現ベクターを用いることは遺伝子導入効率の観点から望ましくないため、要素を一つのプラスミドベクターに含有した One-pack 型のプラスミドベクターpHSP-TRE/Z/IRES/tTA を作製した。One-pack 型プラスミド pHSP-TRE/Z/IRES/tTA を HeLa 細胞へ一過性で導入し、その 24 時間後に 43°C、1 時間の加温を行い、*LacZ* 遺伝子の発現を経時的に調べることにより、One-pack システムの機能解析を行った（Fig. 16A, B）。Fig. 16A の横軸は加温を終了してから経過した時間、縦軸はプラスミド pHSP-TRE/Z を導入し、加温を行わなかった場合（37°C）のβ-ガラクトシダーゼ活性を 1 とした際の相対的なβ-ガラクトシダーゼ活性を表示している。加温を行わなかった場合では、プラスミド pHSP-TRE/Z/IRES/tTA を含むすべての遺伝子導入条件において、β-ガラクトシダーゼ活性はほとんど観察されなかった。ハイブリッドプロモーターのリークによりtTA が発現し、それにより*LacZ*遺伝子の転写増幅が少なからず誘導されることが懸念されたが、One-pack システムにおいてもハイブリッドプロモーターのリークの低さが示された。これと比較して、加温を行った場合では、tTA によるポジティブフィードバック効果が得られない場合（プラスミド pHSP-TRE/Z 単独導入）と比較して、プラスミド pHSP-TRE/Z/IRES/tTA を遺伝子導入した場合で *LacZ* 遺伝子の発現量の増強が観察された。また、2 段階発現増幅システムと同様に、One-pack システムにおいても Dox 添加により tTA の転写増強をキャンセルした効果を調べた（Fig. 16B）。Fig. 16B の横軸は加温を終了してから経過した時間、縦軸はプラスミド pHSP-TRE/Z を導入し、加温を行わなかった場合（37°C）のβ-ガラクトシダーゼ活性を 1 とした際の相対的なβ-ガラクトシダーゼ活性を表示している。Dox を添加するサンプル群については、遺伝子導入の 6 時間後に 1.0 μg/mL Dox 入り培地で培地交換を行った。Fig. 16B に示すように、β-ガラクトシダーゼ活性は Dox 添加により抑制され、プラスミド pHSP-TRE/Z を導入し、加温を行った場合（Fig. 16A）と同程度の活性を示した。Dox を添加しなかった場合では、加温終了から 48 時間後に Dox を添加した場合と比較して 6 倍高いβ-ガラクトシダーゼ活性を示した。以上の結果より、Fig.

16A で観察された目的遺伝子の発現量の増強は、tTA のポジティブフィードバックに起因していると考えられる。

次に、ハイブリッドプロモーターと CMV プロモーターの活性値を比較することにより、HSP70B'プロモーターの問題点である活性の低さが改善されたかを確認した（Fig. 16C）。Fig. 16C は、24 時間後の活性値を 2 段階発現増幅システム、One-pack システムおよび pCMV システム（プラスミド pCMV/tTA および pTRE-CMVmin/Z）と比較したものである。pCMV システムは、CMV プロモーターにより構成生産された tTA で *LacZ* 遺伝子を高発現する Tet-Off システムである。Fig. 16C の横軸は導入したシステム、縦軸は pCMV システムの活性を 100%とした際のハイブリッドプロモーターの活性を相対値で示している。Fig. 16C より、tTA によるポジティブフィードバック効果が得られないコントロール（プラスミド pHSP-TRE/Z 単独導入）では、pCMV システムの 22 %の活性を示した。また、2 段階発現増幅システムは、加温をスイッチとした tTA の発現増強により *LacZ* 遺伝子の高発現が誘導され、pCMV システムの 51 %の活性を示した。これに対し、One-pack システムの方が 2 段階発現増幅システムより高い *LacZ* 遺伝子発現を示し、One-pack システムは pCMV システムの 95%に匹敵する活性を示した。これは、2 段階発現増幅システムが機能するためには、tTA 発現プラスミドベクターと目的遺伝子発現プラスミドベクターが同一核内に導入されることが必須であるが、これらの機能をひとつのプラスミドベクターに集約した One-pack システムの方が効率良く目的遺伝子の高発現を誘導できるためであると考えられる。これを実証するために、構成的にレポーター遺伝子を発現するプラスミド pcDNA6.2/emGFP、pcDNA4/P1DsRed を用いて 2 段階発現増幅システムおよび One-pack システムの遺伝子導入効率の比較を行った（Fig. 16D-F）。Fig. 16D、E より、プラスミド pcDNA6.2/emGFP または pcDNA4/P1DsRed を HeLa 細胞へ一過性で単独導入した場合では、陽性細胞率はそれぞれ 73 %、71 %であったのに対して、プラスミド pcDNA6.2/emGFP および pcDNA4/P1DsRed を HeLa 細胞へ一過性で共導入した場合では、二重陽性細胞率は 43 %であった（Fig. 16F）。以上の結果より、One-pack システムは 2 段階発現増幅システムと比較して、効率良く目的遺伝子の高発現を誘導できることが示唆された。

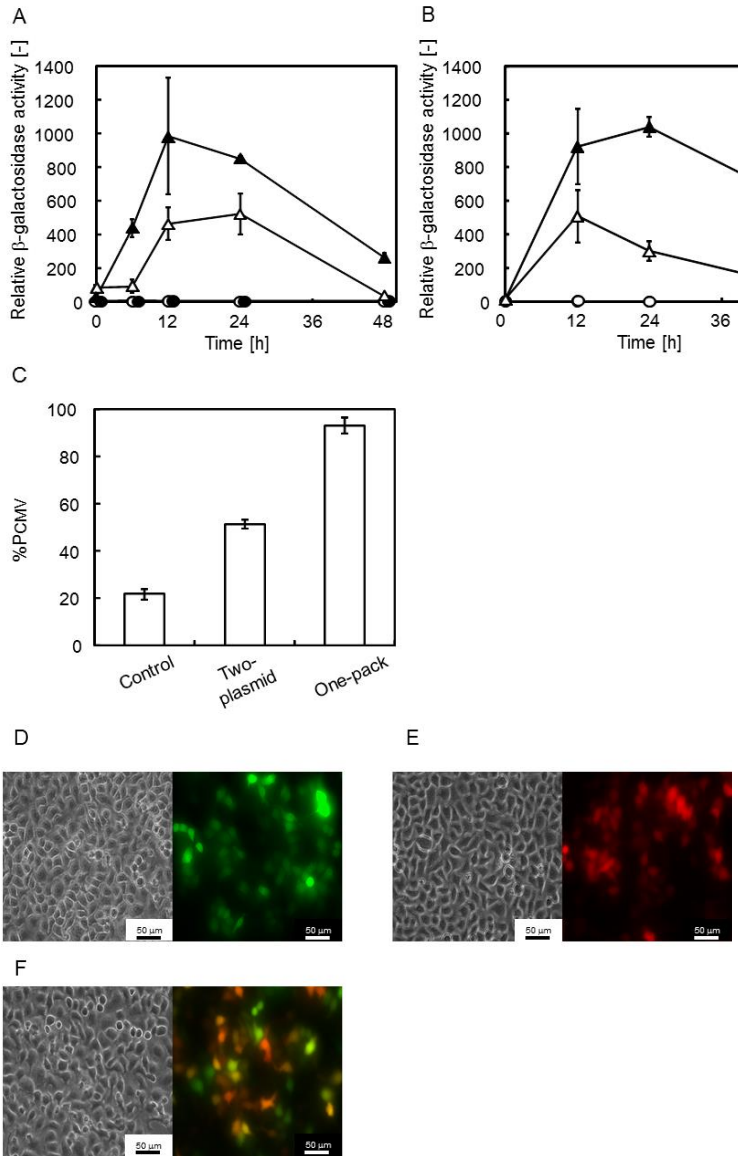

Fig. 16 Functional analysis of the one-pack plasmid. (A) HeLa cells were transfected with pHSP-TRE/Z (open symbols) or pHSP-TRE/Z/IRES/tTA (closed symbols), and incubated at 37 °C (circles) or heated at 43 °C for 1 h (triangles). Relative β-galactosidase activity is defined as the relative value to the β-galactosidase activity of the cells transfected with pHSP-TRE/Z alone without heating (37 °C) at 0 h. The data are expressed as mean ± SD (n=3). (B) HeLa cells were transfected with pHSP-TRE/Z/IRES/tTA and cultured in the presence (open symbols) or absence (closed symbols) of Dox (1 μg/mL). Cells were then incubated at 37 °C (circles) or heated at 43 °C for 1 h (triangles). Relative β-galactosidase activity is defined as the relative value to the β-galactosidase activity of the cells transfected with pHSP-TRE/Z alone without heating (37 °C) at 0 h. The data are expressed as mean ± SD (n=3). (C) HeLa cells were transfected with pHSP-TRE/Z (control), pHSP-TRE/tTA and pTRE-CMVmin/Z (two plasmids) or pHSP-TRE/Z/IRES/tTA (one-pack plasmid), and heated at 43 °C for 1 h. Relative β-galactosidase activity at 24 h after heat treatment is defined as the relative value to the β-galactosidase activity of the cells co-transfected with pCMV/tTA and pTRE-CMVmin/Z. The data are expressed as mean ± SD (n=3). (D-F) Microscopic observation of HeLa cells after reporter gene expression plasmids transfer for the transfection efficiencies assay. Cells were transfected with pcDNA6.2/emGFP (D), pcDNA4/P1DsRed (E) or pcDNA6.2/emGFP and pcDNA4/P1DsRed (F), and incubated at 37 °C. (*left*) Bright-field microscopy images. (*right*) Fluorescence microscopy images [134].

3.2.4 本節のまとめ

本節では、HSP70B'プロモーターと Tet-Off システムを融合することにより温熱誘導型の遺伝子大量発現システムを開発した。tTA 発現プラスミドベクターと目的遺伝子発現プラスミドベクターを利用した 2 段階発現増幅システムでは、43°C、45°C の加温により HSP70B'プロモーターが駆動し、*LacZ* 遺伝子の発現が誘導された。そして、加温せず、tTA のポジティブフィードバック効果が得られない場合と比較して、加温と tTA のポジティブフィードバック効果が得られる場合では、43°C の加温により約 3000 倍のβ-ガラクトシダーゼ活性を、45°C の加温により約 6500 倍のβ-ガラクトシダーゼ活性を得た。観察された *LacZ* 遺伝子の発現増強は tTA のポジティブフィードバックに起因していることが Dox を用いた実験により判明した。そして、目的遺伝子と tTA の発現をひとつのユニットで制御する One-pack システムでは、pCMV システムの 95 %に匹敵する活性を示し、遺伝子導入効率の面からも効率良く目的遺伝子の高発現を誘導できることが示唆された。以上の結果より、構築した温熱誘導型遺伝子発現システムをがん治療へ応用することにより、温熱療法による加温をスイッチとして長期的に高い治療効果を発揮できる新規がん治療法の開発が可能であることが示唆された。

3.3 治療遺伝子 *HSV-tk* および *TNF-α* を用いた温熱誘導型遺伝子発現システムの機能解析

3.3.1 本節の目的

本節では、前節で構築した One-pack システムにより治療遺伝子を発現させ、がん治療への応用を目指した。自殺遺伝子 *HSV-tk*、腫瘍壊死因子 *TNF-α* による遺伝子療法をモデルとして検討を行った。ウイルス由来の代謝酵素遺伝子であ

る *HSV-tk* はプロドラッグとして投与したガンシクロビル（ganciclovir; GCV）をリン酸化し、リン酸化された GCV は DNA 合成を阻害し、細胞増殖を抑制する[75]。GCV 投与により *HSV-tk* 遺伝子を発現する細胞を特異的にあたかも自殺したかのように破壊することが可能となることから、*HSV-tk* 遺伝子は自殺遺伝子とも呼ばれている。また、腫瘍壊死因子 *TNF-α* は、主にマクロファージから産生され、がん細胞膜上の腫瘍壊死因子受容体に結合し、カスパーゼ経路を活性化させることによりアポトーシスを誘導するサイトカインである[140]。これら治療遺伝子をがん細胞へ遺伝子導入し、43°C、1 時間の温熱療法後にアポトーシス細胞数、生細胞数を測定することにより、温熱療法と遺伝子療法の併用効果が得られるかを確認した。

3.3.2 実験方法

3.3.2.1 プラスミドベクターの作製方法

使用したプラスミドベクターの作製方法を以下に記載する。

〈pHSP-TRE/TK/IRES/tTA の作製〉

pHSP-TRE/TK/IRES/tTA のコンストラクトとその作製手順を Fig. 17 に示す。まず、上述の pHSP-TRE/Z/IRES/tTA を制限酵素 *Not*I で切断し、DNA Blunting Kit（Takara）を使用して DNA フラグメントの平滑化を行った後で、CIP 処理を行った。次に、本研究室で構築された pQMSCV/PTNIG[141]を制限酵素 *Sac*II により切断し、DNA フラグメントの平滑化を行った。そして、これら 2 断片をリガーゼ処理により連結させることで pHSP-TRE/TK/IRES/tTA を作製した。

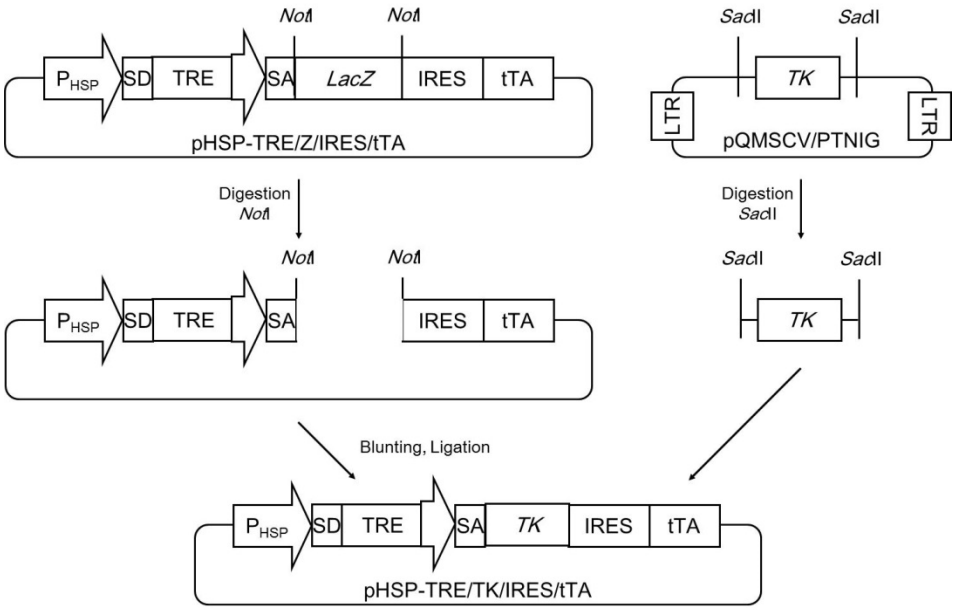

Fig. 17 Flowchart for the construction of pHSP-TRE/TK/IRES/tTA plasmid.

〈pHSP-TRE/TNF-α/IRES/tTA の作製〉

pHSP-TRE/TNF-α/IRES/tTA のコンストラクトとその作製手順を Fig. 18 に示す。本研究室で構築された pTRE-HSP456/α[135]を制限酵素 *Not*I で切断し、制限酵素 *Not*I で切断した pHSP-TRE/Z/IRES/tTA とリガーゼ処理により連結させることで pHSP-TRE/TNF-α/IRES/tTA を作製した。

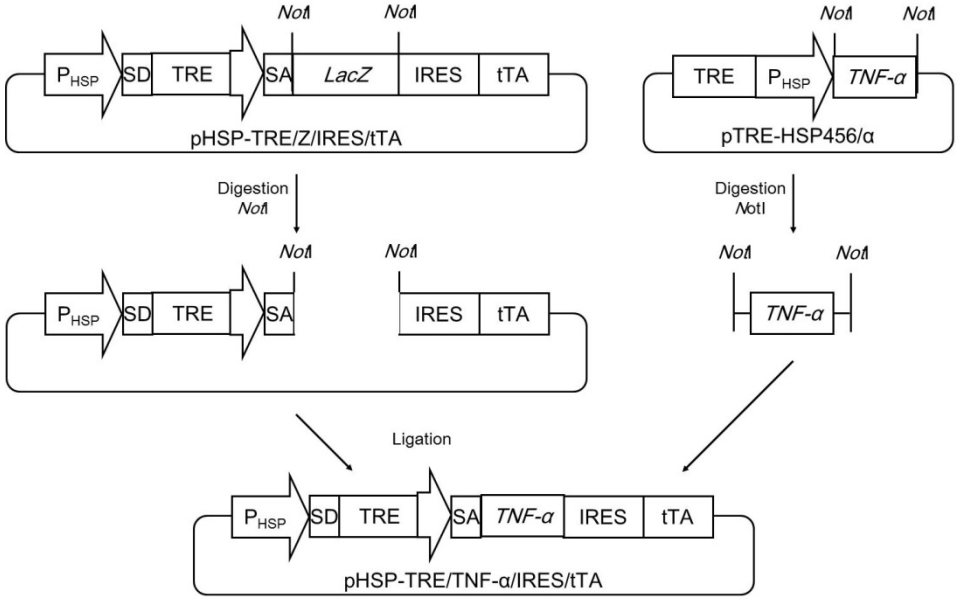

Fig. 18 Flowchart for the construction of pHSP-TRE/TNF-α/IRES/tTA plasmid.

3.3.2.2 細胞培養

ヒト子宮頸がん細胞株 HeLa（Riken BioResource Center）およびヒト肺胞上皮がん細胞株 A549（Riken BioResource Center）は、FBS を 10%、ベンジルペニシリンカリウム（Wako）を 100 unit/mL、ストレプトマイシン硫酸塩（Wako）を 100 μg/mL および炭酸水素ナトリウム（Wako）を 1.5 g/L 添加した高グルコース DMEM（Gibco BRL）を用いて培養した。細胞培養は、37°C、5% CO_2 インキュベータ内で行った。

3.3.2.3 治療遺伝子 *HSV-tk* を用いた細胞傷害アッセイ

治療遺伝子 *HSV-tk* を用いた細胞傷害アッセイの実験スキームを Fig. 19 に示す。まず、遺伝子導入を行う 24 時間前に、1.6×10^5 cells/well の細胞密度で HeLa 細胞を 6 穴プレートに前播種した。翌日、Lipofectamine 2000（Invitrogen）を用いたリポフェクション法により、治療遺伝子発現プラスミド（pHSP-TRE/TK/IRES/tTA; 1.6 μg/well）を HeLa 細胞に遺伝子導入した。tTA によるポジティブフィードバック効果が得られないコントロール実験では、空ベクター（pETBlue II; 1.6 μg/well）を遺伝子導入した。また、Dox によるポジティブフィードバックをキャンセルした効果を調べる条件では、加温する 24 時間前に治療遺伝子発現プラスミドを遺伝子導入した HeLa 細胞を Dox（1 μg/mL）入り培地で培養した。

遺伝子導入から 24 時間後、細胞培養プレートの側面をパラフィルムにより厳重に覆うことで水の侵入を防ぎ、恒温槽に 1 時間保持することにより細胞を 43°C で加温し、*HSV-tk* 遺伝子の発現誘導を行った。加温終了後、即座に細胞を回収し、5.0×10^3 cells/well の細胞密度で 96 穴プレートに再播種した。この際、細胞のアポトーシスを誘導するために、培地中に GCV（0.01-1000μg/mL）を添加した。加温終了から 4 日後に、WST-8 法に基づく Cell Counting Kit-8（Dojindo, Kumamoto, Japan）により生細胞数を測定した。生細胞率は次式を用いて算出した。

Cell viability [%] = (the number of viable cells in the tested dish) /
(the number of viable cells in the pETBlue
control dish at 37°C) × 100

また、terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick labeling（TUNEL）法に基づく *In situ* cell Death Detection Kit（Roche, Mannheim, Germany）によりアポトーシス細胞を染色し、BZ-9000 蛍光顕微鏡（Keyence, Tokyo, Japan）によりアポトーシス細胞を観察した。以上の操作はキットのプロトコールに従って行った。

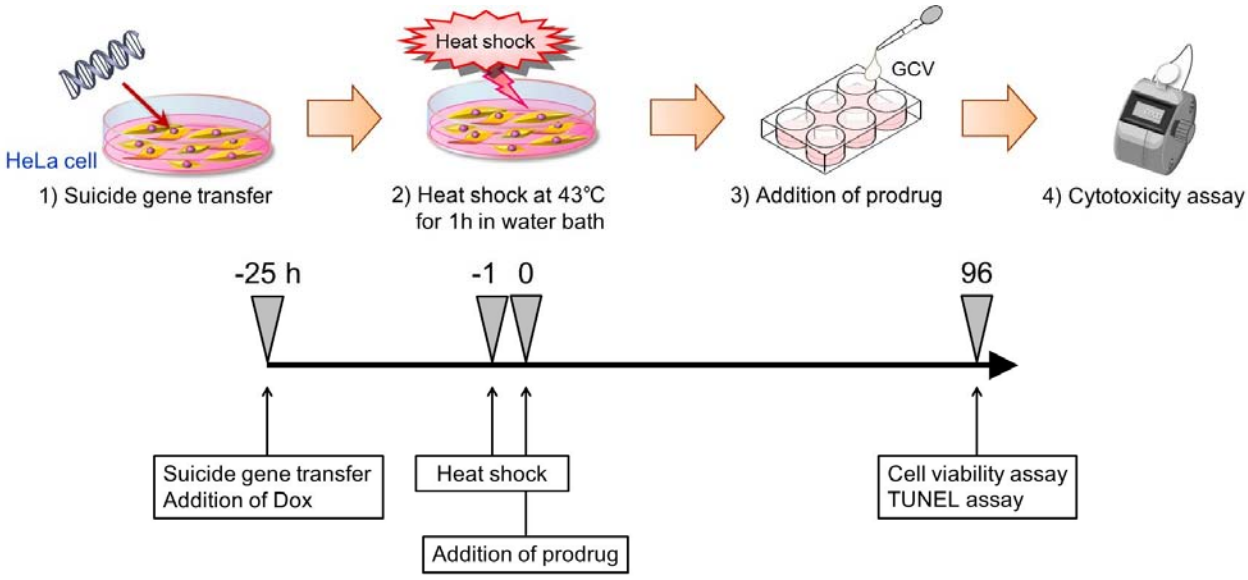

Fig. 19 Scheme of cytotoxicity assay using *HSV-tk* gene expression plasmid.

3.3.2.4 治療遺伝子 *TNF-α* を用いた細胞傷害アッセイ

治療遺伝子 *TNF-α* を用いた細胞傷害アッセイの実験スキームを Fig. 20 に示す。まず、遺伝子導入を行う 24 時間前に、1.0 × 10^6 cells/dish の細胞密度で A549 細胞を 100 mm ディッシュに前播種した。翌日、Lipofectamine 2000（Invitrogen）を用いたリポフェクション法により、治療遺伝子発現プラスミド（pHSP-TRE/TNF-α/IRES/tTA; 2.0 μg/dish）を A549 細胞に遺伝子導入した。tTA によるポジティブフィードバック効果が得

られないコントロール実験では、空ベクター（pETBlue II; 2.0 μg/dish）を遺伝子導入した。また、Dox によるポジティブフィードバックをキャンセルした効果を調べる条件では、加温する24時間前に治療遺伝子発現プラスミドを遺伝子導入したA549細胞をDox（1 μg/mL）入り培地で培養した。

遺伝子導入から 24 時間後、細胞培養プレートの側面をパラフィルムにより厳重に覆うことで水の侵入を防ぎ、恒温槽に 1 時間保持することにより細胞を 43°C で加温し、*TNF-α* 遺伝子の発現誘導を行った。加温終了後、即座に細胞を回収し、1.0×10^5 cells/well の細胞密度で 6 穴プレートに再播種した。加温終了から 1、2、3、4 日後の細胞を回収し、トリパンブルー染色法により生細胞数を測定した。

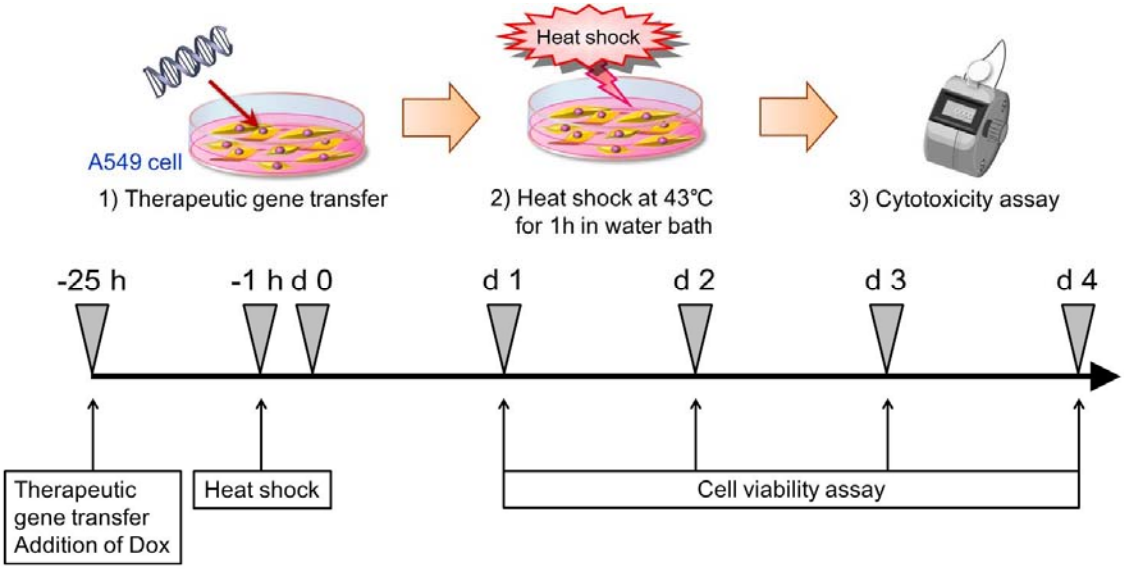

Fig. 20 Scheme of cytotoxicity assay using *TNF-α* gene expression plasmid.

3.3.3 実験結果と考察

3.3.3.1 *in vitro* における温熱遺伝子治療プラスミド pHSP-TRE/TK/IRES/tTA の殺細胞効果

レポーター遺伝子 *LacZ* を治療遺伝子 *HSV-tk* に置換した温熱遺伝子治療プラスミドベクターpHSP-TRE/TK/IRES/tTA を作製し、HeLa 細胞へ一過性で導入し、その 24 時間後に加温を行い、96 時間後の生細胞数を測定することにより、本研究で構築した温熱誘導型遺伝子発現システムをがん治療へ応用可能か評価した（Fig. 21A）。Fig. 21A の横軸は GCV 濃度条件、縦軸は空ベクターpETBlue II を遺伝子導入した HeLa 細胞（37°C、0 μg/mL GCV）の生細胞数を 100 %とした生細胞率を示している。レポーターアッセイ同様、細胞への加温は 43°C で 1 時間行った。Fig. 21A より、加温を行わなかった 37°C の各遺伝子導入条件では、高濃度の GCV（10 - 1000 μg/mL）により細胞死が観察されたが、1 μg/mL 以下の濃度では、治療プラスミド pHSP-TRE/TK/IRES/tTA を遺伝子導入した HeLa 細胞においても殺細胞効果はほとんど観察されなかった。また、治療遺伝子を導入せず、加温を行った場合（温熱療法単独）では、熱ストレスにより HeLa 細胞の細胞死が若干誘導されたが、HSP のシャペロン作用により時間経過に伴い HeLa 細胞は正常の機能を取り戻し、本来の細胞増殖能を取り戻した。一方、治療プラスミド pHSP-TRE/TK/IRES/tTA を遺伝子導入し、加温を行った場合では、温熱療法と遺伝子療法の併用効果が得られ、臨床で採用されている GCV 濃度（~5 μg/mL）で顕著な細胞死が観察された。また、この条件下における GCV の 50 %抑制濃度（IC_{50}）を測定したところ、IC_{50} = 0.006 μg/mL であったのに対して、Dox を添加することにより IC_{50} は増加した（IC_{50} = 0.011 μg/mL）。以上の結果より、*LacZ* 遺伝子を用いた検討と同様に、加温をスイッチとして誘導された *HSV-tk* 遺伝子の発現量は、tTA のポジティブフィードバック効果により強く増強されることが示唆された。

次に、治療プラスミド pHSP-TRE/TK/IRES/tTA を HeLa 細胞に一過性で導入し、その 24 時間後に加温を行い、96 時間後に TUNEL 法によりアポトーシス細胞を検知する

ことにより、Fig. 21A で観察された殺細胞効果の機構を調べた（Fig. 21B-F）。細胞への加温は先程と同様に 43°C で 1 時間行った。Fig. 21B は各条件で 3 視野ずつ、1 mm^2 あたりのアポトーシス細胞数を示しており、Fig. 21C は 37°C、空ベクターpETBlue II、Fig. 21D は 43°C、空ベクターpETBlue II、Fig. 21E は 43°C、治療プラスミド pHSP-TRE/TK/IRES/tTA + Dox、Fig. 21F は 43°C、治療プラスミド pHSP-TRE/TK/IRES/tTA の各条件において蛍光顕微鏡により観察した HeLa 細胞の位相差および蛍光写真である。Fig. 21B、C より、空ベクターpETBlue II を導入し、加温を行わなかった場合では、2.5 ± 0.8 cells/mm^2 のアポトーシス細胞が観察されたのに対して、加温を行うことによりアポトーシス細胞数は 25.5 ± 2.7 cells/ mm^2 に増加した（Fig. 21B、D）。Fig. 21B、F より、治療プラスミド pHSP-TRE/TK/IRES/tTA による温熱誘導型遺伝子治療の効果が得られ（143 ± 4.0 cells/ mm^2）、Dox 添加によりアポトーシス細胞数は 53.9 ± 3.9 cells/ mm^2 に減少した（Fig. 21B、D）。これらの観察結果から、Fig. 21A で観察された殺細胞効果は、加温と tTA のポジティブフィードバック効果により発現増強された *HSV-tk* 遺伝子と GCV の作用により誘発されたアポトーシスに起因していると考えられる。以上のように、治療遺伝子として自殺遺伝子 *HSV-tk* を用いた遺伝子療法モデルにおけるがん治療応用の検討において、本研究で構築した温熱誘導型フィードバック増幅ループを含む遺伝子発現システムは、HSP プロモーター活性のみに依存した自殺遺伝子療法システムと比較して有意にがん細胞のアポトーシスを誘導可能であることが示唆された。

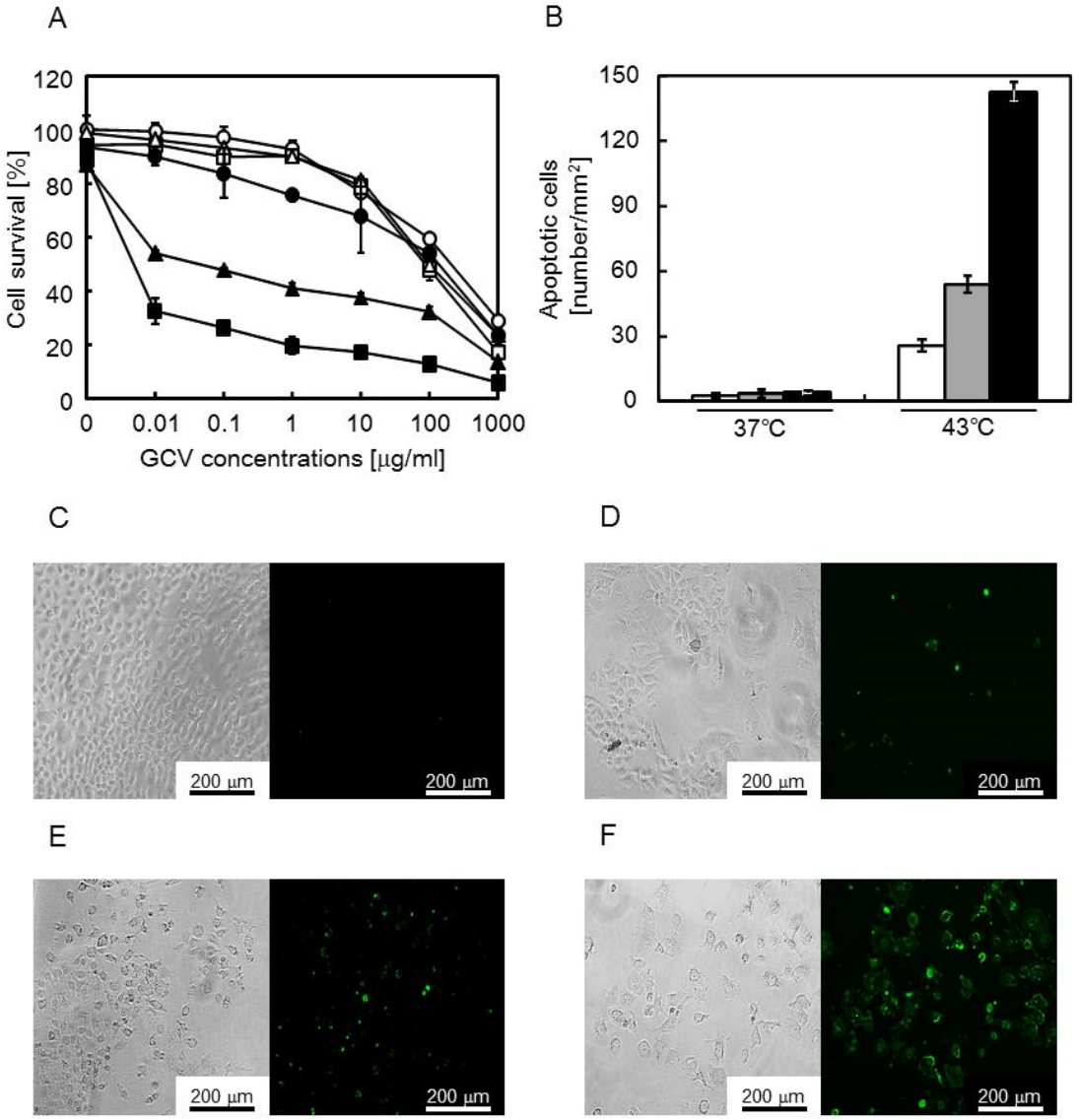

Fig. 21 Effects of suicide gene therapy on cancer cells *in vitro*. (A) HeLa cells were transfected with mock plasmid (circles), pHSP-TRE/TK/IRES/tTA with (triangles) or without (squares) Dox addition, and incubated at 37 °C (open symbols) or heated at 43 °C for 1 h (closed symbols). Following heat treatment, cells were treated with GCV at the concentrations of 0.1–1000 μg/mL, and incubated at 37 °C for 96 h, and cell viability was evaluated by the WST-8 method. The data are expressed as mean ± SD (n=3). (B) HeLa cells were transfected with mock plasmid (open columns), pHSP-TRE/TK/IRES/tTA plus Dox addition (1 μg/mL) (shaded columns) or pHSP-TRE/TK/IRES/tTA (black columns). Cells were incubated at 37 °C or underwent heat treatment at 43 °C for 1 h. At 96 h after heat treatment, apoptotic cells were evaluated by fluorescence microscopy using the TUNEL assay. The data are expressed as mean ± SD (n=3). (C-F) Microscopic observation of HeLa cells after gene delivery and heat treatment. Cells were transfected with mock plasmid (C and D), pHSP-TRE/TK/IRES/tTA plus Dox addition (1 μg/mL) (E) or pHSP-TRE/TK/IRES/tTA (F), and incubated at 37 °C (C) or heated at 43 °C for 1 h (D-F). Apoptotic cells were detected by fluorescence microscopy based on the TUNEL assay. (*left*) Bright-field microscopy images. (*right*) Fluorescence microscopy images [134].

3.3.3.2 *in vitro* における温熱遺伝子治療プラスミド pHSP-TRE/TNF-α/IRES/tTA の殺細胞効果

次に、レポーター遺伝子 *LacZ* を治療遺伝子 *TNF-α* に置換した温熱遺伝子治療プラスミドベクターpHSP-TRE/TNF-α/IRES/tTA を作製し、A549 細胞へ一過性で導入し、その 24 時間後に加温を行い、加温終了から経時的に生細胞数を計測することにより、*HSV-tk* 遺伝子と同様な殺細胞効果が得られるか検討した（Fig. 22）。Fig. 22 の横軸は加温終了から経過した時間、縦軸は空ベクターpETBlue II を遺伝子導入し、加温を行わなかった A549 細胞の生細胞数を 100 %とした生細胞率を示している。*HSV-tk* 遺伝子による検討と同様、細胞への加温は 43°C で 1 時間行った。加温を行わなかった場合では、治療プラスミド pHSP-TRE/TNF-α/IRES/tTA を遺伝子導入した条件においても培養期間中に A549 細胞の細胞死はほとんど観察されず、ハイブリッドプロモーターのリークの低さが示された。治療プラスミドを導入せず、加温を行った場合では、加温終了翌日には生細胞率は 68 %になり、その後徐々に減少していき、4 日後には 51 %まで減少した。これと比較して、治療プラスミド pHSP-TRE/TNF-α/IRES/tTA を導入し、加温を行った場合では、加温終了翌日には生細胞率は 20 %まで急激に減少し、4 日後には 2 %まで減少した。さらに、Dox 添加により殺細胞効果が緩和されたことから、tTA のポジティブフィードバック効果により、*TNF-α* 遺伝子の大量発現が誘導され、殺細胞効果が増強されたことが示唆された。以上のように治療遺伝子として *TNF-α* 遺伝子を用いた検討においても、構築した温熱誘導型遺伝子発現システムを利用することによりがん細胞に対して高い殺細胞効果を発揮できることが示された。

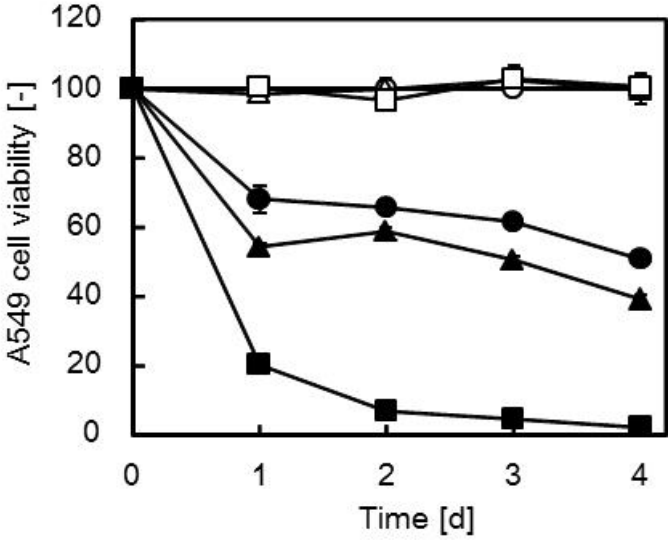

Fig. 22 *In vitro* cytotoxicity of heat-inducible TNF-α gene expression. A549 cells were transfected with the mock plasmid (circles), pHSP-TRE/TNF-α/IRES/tTA plus Dox addition (triangles) or pHSP-TRE/TNF-α/IRES/tTA (squares). The cells were incubated at 37°C (open symbols) or underwent heat treatment at 43°C for 1 h (closed symbols). At 24 h after heat treatment, cells were collected for the cell viability assay. The data are expressed as mean±SD (n=3).

3.3.4 本節のまとめ

本節では、自殺遺伝子 *HSV-tk*、腫瘍壊死因子 *TNF-α* による遺伝子療法をモデルとして温熱療法と遺伝子療法の併用効果が得られるかの検討を行った。自殺遺伝子 *HSV-tk* を用いた検討では、加温せず、tTA のポジティブフィードバック効果が得られない条件と比較して、加温と tTA のポジティブフィードバック効果により 55.6 倍のアポトーシスが誘導された。腫瘍壊死因子 *TNF-α* を用いた検討においても、加温と tTA のポジティブフィードバック効果により加温終了から 4 日後まで有意にがん細胞の増殖を抑制できた。*LacZ* 遺伝子を用いたレポーターアッセイと同様に、観察された殺細胞効果の増強は tTA のポジティブフィードバック効果に起因していることが Dox を用いた実験により判明した。以上の結果より、構築したフィードバック増幅ループを含む温熱誘導型遺伝子発現システムはがん治療に有効であることが示された。

3.4 本章のまとめ

本章では、HSP70B'プロモーター配列と Tet-Off システムを融合することにより、フィードバック増幅ループを含む温熱誘導型遺伝子発現システムの開発に取り組んだ。まず、本システムを搭載したプラスミドベクターを作製し、*LacZ* 遺伝子を用いたレポーターアッセイを行うことにより、tTA のポジティブフィードバック効果が得られるか検討した。レポーターアッセイの結果、加温を行わない 37°C やマイルドハイパーサーミアで用いられる 41°C といった温度条件では HSP70B'プロモーターは駆動せず、tTA による *LacZ* 遺伝子の発現増強は観察されなかった。これと比較して、がん細胞のネクローシスを引き起こす 43°C や 45°C といった温度条件では、HSP70B'プロモーターが駆動し、tTA のポジティブフィードバック効果により *LacZ* 遺伝子の大量発現が観察された。さらに、治療遺伝子 *HSV-tk*, *TNF*-α を用いた細胞傷害性アッセイにおいて、加温を行わなかった場合では治療遺伝子の発現はほとんど観察されず、予期せぬ副作用が発生する恐れが低いことが示唆された。加温を行った場合では、温熱療法と遺伝子療法の併用効果が得られ、tTA のポジティブフィードバック効果により抗腫瘍効果はさらに増強された。以上の結果より、本章で構築した温熱誘導型フィードバック増幅ループを含む遺伝子発現システムは、効果的で強力な新規がん治療法を開発する上で重要なツールとなると考えられる。しかしながら、本章では、温熱誘導型遺伝子発現システムは細胞へ一過性で導入しているため、短期間の解析しか行えていない。そこで、今後は薬剤耐性遺伝子を有するプラスミドベクターを細胞に遺伝子導入後、薬剤を用いたスクリーニングによりトランスフェクタントを取得し、加温条件（時間・温度）と遺伝子発現挙動を長期的に解析することが必要不可欠である。

第 4 章　磁場誘導型遺伝子発現システムの開発

4.1 緒言

細胞内に導入した遺伝子の発現を外部刺激により制御することが可能になれば、遺伝子療法などの医療技術のさらなる発展が期待できる。しかしながら、生体内に発現させた治療遺伝子による副作用を考慮した場合、外部刺激により治療遺伝子の発現を時間的・空間的に制御するシステムの開発が必要不可欠である。現在まで、電気刺激や光刺激などの物理刺激により目的遺伝子の発現を制御するシステムが報告されているが、電気刺激の場合、生体内に永久埋め込み型の特殊な装置を導入しなければならない上に、操作が複雑なことから生体組織の損傷が懸念されている[142]。また、光刺激の場合、生体外から光を照射しても身体の奥深くの組織まで透過することは困難であるために特殊な装置を埋め込む必要があり、電気刺激と同様に操作が煩雑なことが問題となっている[143]。これらと比較して、生体組織を損傷しないエネルギーで身体の奥深くの組織まで透過する高周波磁場を利用した遺伝子発現システムが注目されている[144, 145]。Stanley, S. A.らは、磁性ナノ粒子と交番磁場を利用することにより、細胞へ影響を及ぼさないエネルギーで細胞内に導入した治療遺伝子の発現を制御可能であることを実証している[145]。これらの背景から本章では、第 3 章で開発した温熱誘導型遺伝子発現システムを、機能性磁性ナノ粒子と交番磁場照射による加温をスイッチとして目的遺伝子を大量発現させる磁場誘導型遺伝子発現システム（Fig. 23）へ発展させることを目的とし、担がんマウスモデルを用いた動物実験により磁場誘導型遺伝子発現システムの機能解析を行った[146]。

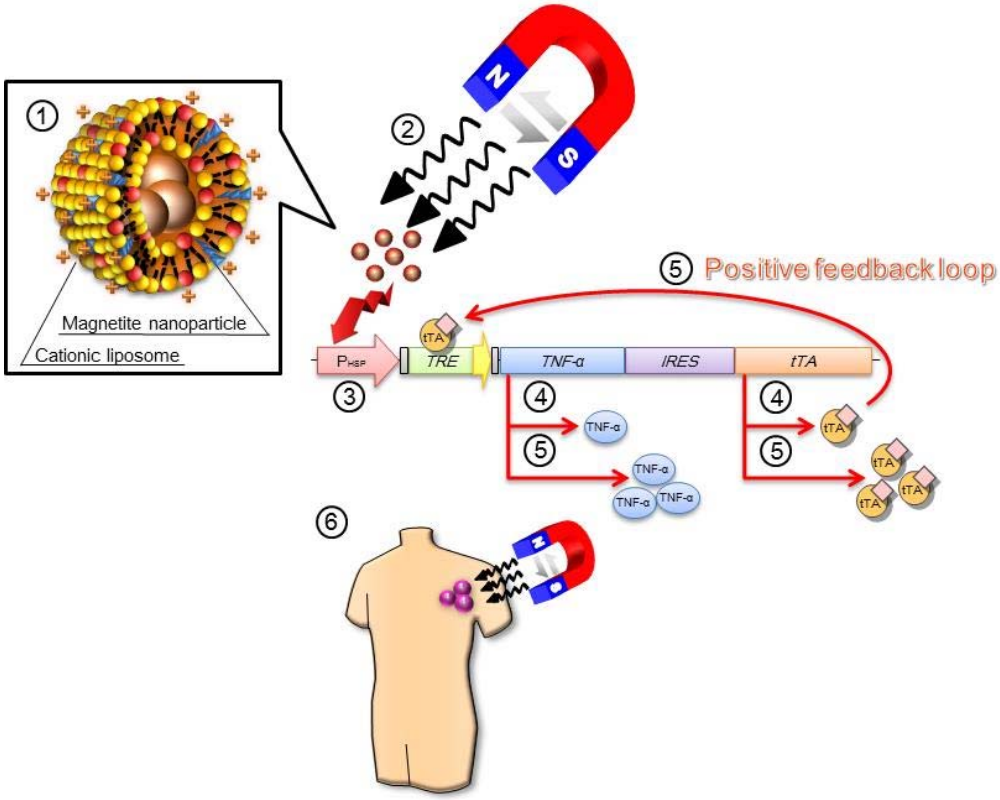

Fig. 23 Overview of the magnetically triggered gene expression system. (1) Magnetite cationic liposomes (MCLs) bind to the membrane of target cells via electrostatic interaction. (2) Exposure to an alternating magnetic field (AMF) induces local magnetite nanoparticle heating (3) that activates the HSP70B' promoter. (4) Expression of both TNF-α and tTA genes are driven by the HSP70B' promoter and bicistronic IRES. (5) tTA activates the TRE/P_{CMVmin} promoter to induce further expression of TNF-α and tTA genes, providing a transcriptional positive feedback loop. (6) Therapeutic gene expression can be controlled by AMF exposure from outside the body [146].

4.2 *in vitro* における磁場誘導型遺伝子発現システムの機能解析

4.2.1 本節の目的

前章では、細胞への熱ストレスは培養ディッシュを恒温槽に保持することで行っていた。本章では、機能性磁性ナノ粒子 MCL と交番磁場照射を利用することにより、MCL が発熱するか、その発熱により治療遺伝子の発現誘導が起こるか、そして治療遺伝子と tTA の併用効果により有意にがん細胞の増殖を抑制できるかを *in vitro* において評価した。

4.2.2. 実験方法

4.2.2.1 プラスミドベクターの作製方法

使用したプラスミドベクターの作製方法を以下に記載する。

〈pHSP/TNF-α の作製〉

pHSP/TNF-α のコンストラクトとその作製手順を Fig. 24 に示す。本研究室で構築された pTRE-HSP456/α[135]を制限酵素 *Not*I で切断し、制限酵素 *Not*I により切断した本研究室で構築された pHSP/LacZ[135]とリガーゼ処理により連結させることで pHSP/TNF-α を作製した。

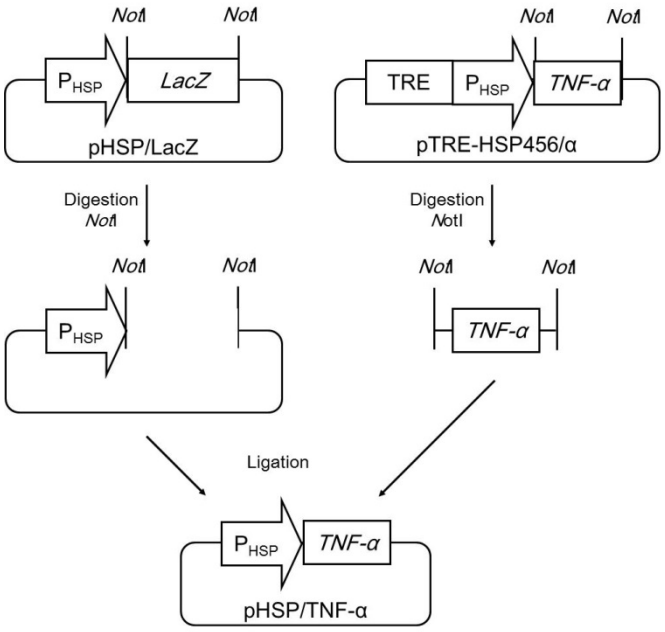

Fig. 24 Flowchart for the construction of pHSP/TNF-α plasmid.

4.2.2.2 細胞培養

ヒト肺胞上皮がん細胞株 A549（Riken BioResource Center）は、FBS を 10%、ペンジルペニシリンカリウム（Wako）を 100 unit/mL、ストレプトマイシン硫酸塩（Wako）を 100 μg/mL および炭酸水素ナトリウム（Wako）を 1.5 g/L 添加した高グルコース DMEM（Gibco BRL）を用いて培養した。細胞培養は、37°C、5% CO_2 インキュベータ内で行った。

4.2.2.3 Magnetite Cationic Liposome (MCL)の作製方法

戸田工業（Hiroshima, Japan）より購入した磁性ナノ粒子（Fe_3O_4; 平均粒子径, 10 nm）を超純粋で洗浄した後に、1 時間超音波処理を施すことにより磁性ナノ粒子を分散させた。796 kA/m（室温）における磁気特性（飽和保磁力、飽和磁束密度、残留磁束密度）は、2.0 kA/m、63.9 Am^2/kg、2.6 Am^2/kg であり、30.6 kA/m、118 kHz（384 Oe）における比吸収率は、42.6 W/g である[147]。次に、正電荷脂質である *N*-(α-trimethylammonioacetyl)-didodecyl-D-glutamate chloride（TMAG; Sogo Pharmaceutical, Tokyo, Japan）、リン脂質である dilauroylphosphatidyl-choline（DLPC; Sigma Chemical, St. Louis, MO）と dioleoylphosphatidyl-ethanol-amine（DOPE; Sigma Chemical）をモル比 1:2:2 でクロロホルムに溶解させた。クロロホルム溶液をナス型フラスコに入れ、フラスコ内壁に均等に脂質膜が形成されるように 40°C で湯浴しながら攪拌し、ロータリーエバポレータにより吸気した。脂質膜形成後、分散させた磁性ナノ粒子溶液（10 mg/mL）をナス型フラスコに投入し、ボルテックス攪拌を 10 分程度行うことにより MCL の形成を促した[148]。そして、1 時間超音波処理を施した分散 MCL 溶液を実験に用いた。動的光散乱法による測定から、MCL の平均粒子径は約 200 nm である[149]。

4.2.2.4 A549 細胞の MCL 取込み評価と MCL の生細胞率への影響

A549 細胞の MCL 取込み能と生細胞率測定の実験スキームを Fig. 25 に示す。まず、MCL を添加する 24 時間前に、5.0 × 10^5 cells/dish の細胞密度で A549 細胞を 100 mm ディッシュに前播種した。翌日、培地中に MCL（25、50、100、200 pg/cell）を添加した。MCL 添加から 0、4、8、12、24、48 時間後に 100 mm ディッシュから細胞をそれぞれマイクロチューブに回収した。この際、生細胞と死細胞をトリパンブルー染色法により計測した。回収した細胞を PBS 1 mL で洗浄した後、6,000 rpm、5 分間、4°C で遠心分離し、上清を廃棄した。この PBS による洗浄を 3 回行った後に、細胞ペレット内の鉄濃度をチオシアン酸カリウム法[150]により測定した。

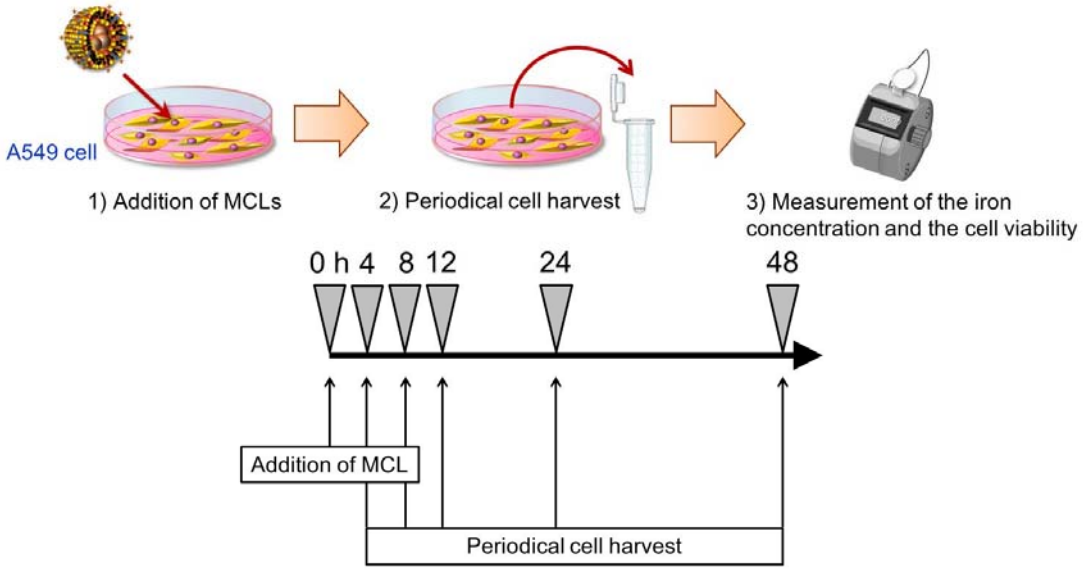

Fig. 25 Scheme of cellular uptake of MCLs and the effect on cell viability.

4.2.2.5 A549 細胞への遺伝子導入効率測定

まず、遺伝子導入を行う 24 時間前に、1.0 × 10^6 cells/dish の細胞密度で A549 細胞を 100 mm ディッシュに前播種した。翌日、正電荷脂質膜（TMAG:DLPC:DOPE = 1:2:2）を用いたリポフェクション法により、レポーター遺伝子発現プラスミド（pcDNA6.2/emGFP; 0.1、0.2、0.4 μg/mL）を A549 細胞に遺伝子導入した[151]。その

24 時間後、BZ-9000 蛍光顕微鏡（Keyence）を用いて細胞を観察することにより、遺伝子導入効率を測定した。遺伝子導入効率は次式を用いて算出した。

Transfection efficiency [%] = (the number of GFP positive cells in the tested dish) / (the number of total cells in the tested dish) × 100

4.2.2.6 *LacZ* 遺伝子を用いたレポーターアッセイ

レポーターアッセイの実験スキームを Fig. 26 に示す。まず、遺伝子導入を行う 24 時間前に、1.0×10^6 cells/dish の細胞密度で A549 細胞を 100 mm ディッシュに播種した。翌日、正電荷脂質膜（TMAG:DLPC:DOPE = 1:2:2）を用いたリポフェクション法により、One-pack 型レポーター遺伝子発現プラスミド（pHSP-TRE/Z/IRES/tTA; 0.2 μg/mL）を A549 細胞に遺伝子導入した[151]。また、ポジティブフィードバックループによる遺伝子大量発現の効果を調べるために、磁場照射を行う 24 時間前からレポーター遺伝子発現プラスミド導入した A549 細胞を Dox（1 μg/mL）入り培地で培養した。遺伝子導入から 18 時間後、MCL（100 pg/cell）を培地中に添加し、6 時間培養することで MCL を細胞内に取り込ませた。その後、遺伝子導入細胞内で β-ガラクトシダーゼの発現誘導を行うために、細胞を 1.5 mL マイクロチューブに回収し、磁場照射を行った。細胞への加温はマイクロチューブを交番磁場照射装置（LTG-100-05; Dai-ichi-High Frequency, Tokyo, Japan, Fig. 27）[148]のコイル（直径 7 cm）の中心になるように設置し、コイル内に水を潅流させることでマイクロチューブ内を 37°C に保ち、交番磁場を 30 分間照射することで行った。このときの磁場強度、周波数は 30.6 kA/m、118 kHz（384 Oe）に設定した。温度条件は 43°C に設定し、光ファイバー温度計のプローブ（Anritsu Meter, Tokyo, Japan）をマイクロチューブ内の細胞ペレットに当てることで温度を測定した。磁場照射開始から経時的に温度を観察し、出力を調節することにより細胞ペレットの温度を 43°C に保った。磁場照射後、24 穴プレートに 1.0×10^5 cells/well の細胞密度で再播種した。磁場照射から 0、12、24、48 時間後に 24 穴プレートから細胞をそれぞれマイクロチューブに回収し、PBS 1 mL で洗浄した後、再度 6,000 rpm、5 分間、4°C で遠

心分離し、上清を廃棄した。この PBS による洗浄を 3 回行った後に、凍結融解により採取した細胞内タンパク質を用いて、β-ガラクトシダーゼ活性測定[137]および細胞内総タンパク質量測定[139]を行った。

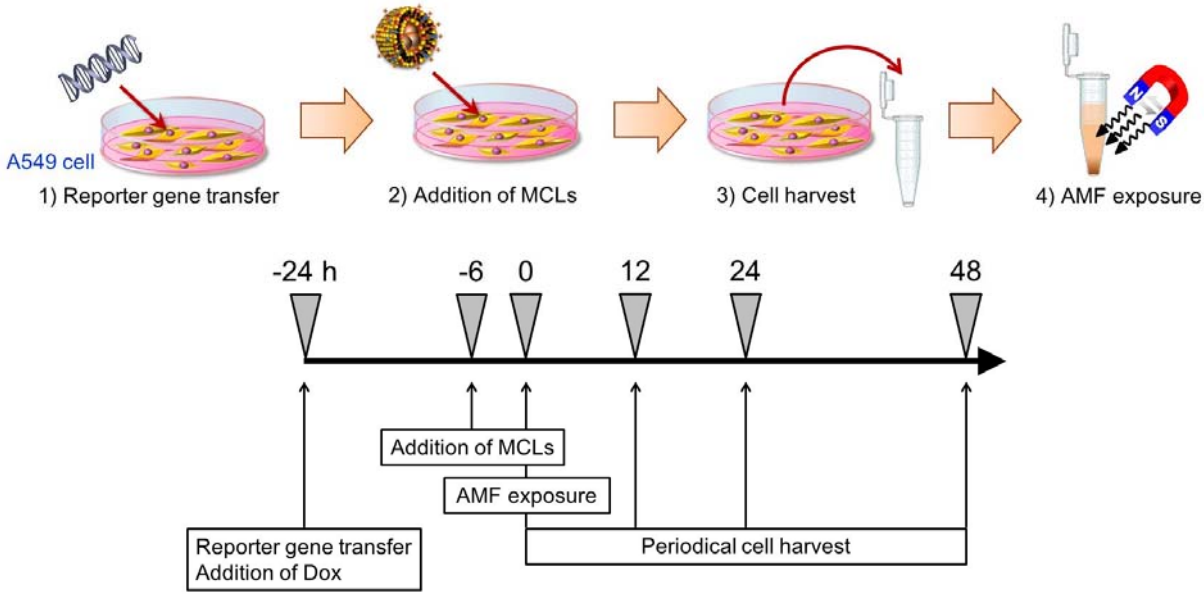

Fig. 26 Scheme of β-galactosidase activity after AMF exposure.

Fig. 27 Appearance of a transistor inverter.

4.2.2.7 *in vitro* における治療遺伝子 *TNF-α* を用いた細胞傷害アッセイ

in vitro における治療遺伝子 *TNF-α* を用いた細胞傷害アッセイの実験スキームを Fig. 28 に示す。まず、遺伝子導入を行う 24 時間前に、1.0 × 10^6 cells/dish の細胞密度で A549 細胞を 100 mm ディッシュに前播種した。翌日、正電荷脂質膜（TMAG:DLPC:DOPE = 1:2:2）を用いたリポフェクション法により、治療遺伝子発現プラスミド（pHSP-TRE/ TNF-α/IRES/tTA または pHSP/ TNF-α; 0.2 μg/mL）を A549 細胞に遺伝子導入した[151]。tTA によるポジティブフィードバック効果が得られないコントロール実験では、空ベクター（pETBlue II; 0.2 μg/mL）を遺伝子導入した。また、Dox によるポジティブフィードバックをキャンセルした効果を調べる条件では、磁場照射を行う 24 時間前から治療遺伝子発現プラスミドを遺伝子導入した A549 細胞を Dox（1 μg/mL）入り培地で培養した。遺伝子導入から 18 時間後、MCL（100 pg/cell）を培地中に添加し、6 時間培養することで MCL を細胞内に取り込ませた。その後、*TNF-α* 遺伝子の発現誘導を行うために、細胞を 1.5 mL マイクロチューブに回収し、磁場照射を行った。細胞への加温はマイクロチューブを交番磁場照射装置（LTG-100-05; Dai-ichi-High Frequency）[148]のコイル（直径 7 cm）の中心になるように設置し、コイル内に水を潅流させることでマイクロチューブ内を 37°C に保ち、交番磁場を 30 分間照射することで行った。このときの磁場強度、周波数は 30.6 kA/m、118 kHz（384 Oe）に設定した。温度条件は 43°C、45°C に設定し、光ファイバー温度計のプローブ（Anritsu Meter）をマイクロチューブ内の細胞ペレットに当てることで温度を測定した。磁場照射開始から経時的に温度を観察し、出力を調節することにより細胞ペレットの温度を 43°C、45°C に保った。磁場照射後、6 穴プレートに 1.0 × 10^5 cells/well の細胞密度で再播種した。磁場照射から 1、2、3、4 日後に細胞を回収し、トリパンブルー染色法により生細胞数を測定した。この際、細胞培養上清をマイクロチューブに回収し、Quantikine human TNF-α ELISA kit（R&D systems, Minneapolis, MN）により TNF-α 産生量を定量した。操作はキットのプロトコールに従って行った。

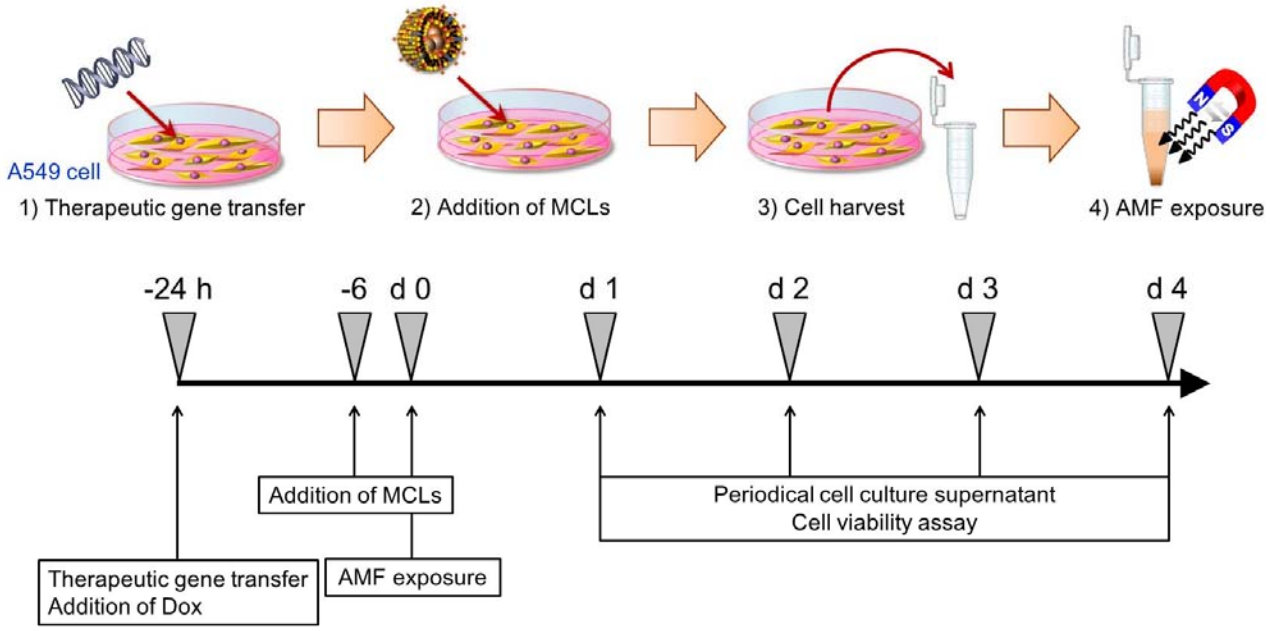

Fig. 28 Scheme of *in vitro* transfection and AMF exposure.

4.2.2.8 統計解析

統計解析はマンホイットニー順位和検定を用いて行った。全ての統計解析において $P < 0.05$ の時、有意差がある判断とした。

4.2.3. 実験結果と考察

4.2.3.1 A549 細胞の MCL 取込み評価と MCL の生細胞率への影響

磁場照射と MCL を利用した遺伝子発現システムを開発するために、まず、細胞内に MCL を取り込ませた際の細胞毒性について評価した（Fig. 29）。25-200 pg/cell の濃度で MCL を培地中に添加し、磁気標識した A549 細胞のマグネタイト濃度を測定したところ、MCL 濃度に比例してマグネタイト取込み量は増加していた（Fig. 29A）。また、Fig. 29B より、100 pg/cell の濃度までは生細胞率へ影響を及ぼさなかったが、200 pg/cell の濃度で僅かに細胞毒性が観察された。こ

れらの結果より、今後の *in vitro* 実験では培地中に添加する MCL 濃度を 100 pg/cell に設定した。次に、MCL を取り込ませるための最適な取込み時間の検討を行った（Fig. 29C）。100 pg/cell の濃度で MCL を培地中に添加し、磁気標識した A549 細胞のマグネタイト濃度を経時的に測定したところ、添加後に A549 細胞は MCL を迅速に取込み、MCL 添加から 24 時間後の取込み量（13.5 pg/cell）が最大であった。MCL 添加から 6 時間後には取込み量はほぼプラトーに達し、24 時間後と比較して有意な差がなかったことから、今後の *in vitro* 実験では A549 細胞に MCL を取り込ませる時間を 6 時間に設定した。

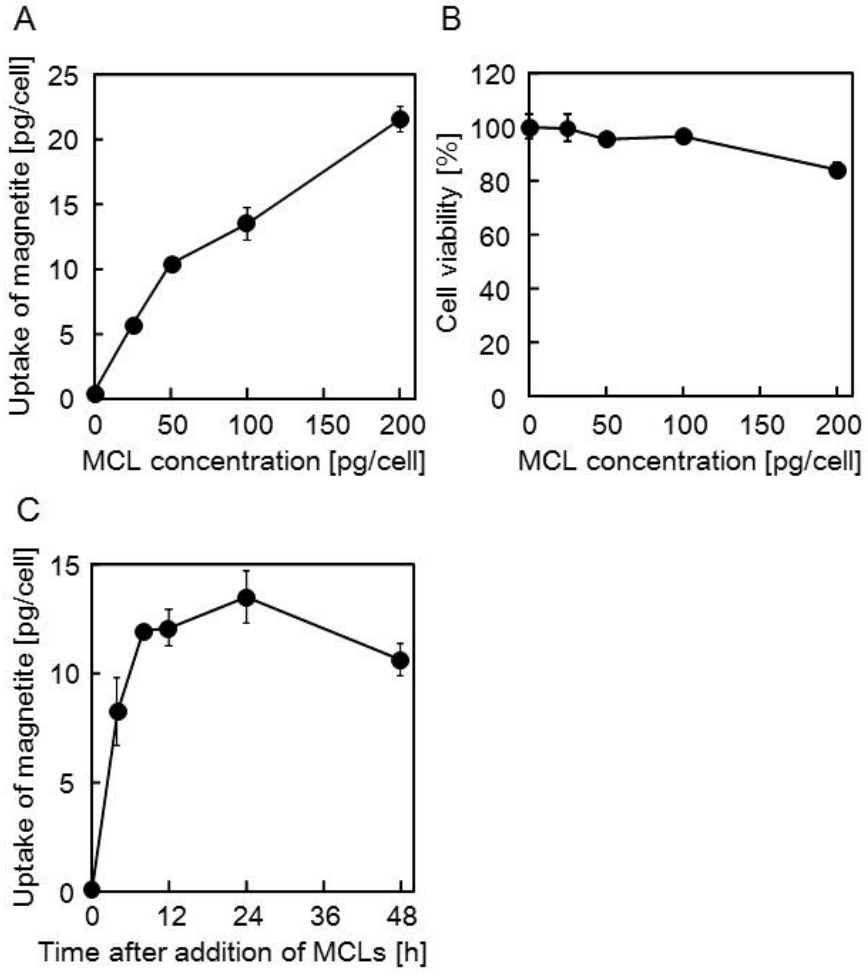

Fig. 29 Cellular uptake of magnetite nanoparticles. (A) Amounts of magnetite taken up by A549 cells at 24 h after the addition of MCLs at various concentrations (0, 25, 50, 100 and 200 pg/cell). (B) Cell viability at 24 h after the addition of MCLs at various concentrations (0, 25, 50, 100 and 200 pg/cell). (C) Time course of the amount of magnetite taken up by cells after the addition of 100 pg MCLs/cell. Data are expressed as the mean ± SD of triplicates [146].

4.2.3.2 *in vitro* における MCL を利用した発熱実験

磁場誘導型遺伝子発現システムの機能解析を行うために、磁場照射によって MCL が目的温度（43°C、45°C）まで発熱するかを *in vitro* で観察した（Fig. 30）。まず、MCL（100 pg/cell）を添加した 6 時間後に A549 細胞を 1.5 mL マイクロチューブに回収し、遠心分離により細胞ペレットを得た。細胞ペレットの体積は約 50 μL であり、この際のマグネタイト濃度は 6.5 mg/cm^3 である。Fig. 30 より、磁場照射開始から 3 分後には細胞ペレット温度が目的温度（43°C、45°C）に到達し、出力を調節することで目的温度を維持することができた。これらの結果から、用いた MCL 添加濃度、MCL 取込み時間は目的温度まで発熱させる条件として妥当であり、磁場照射をスイッチとして遺伝子を大量発現させるシステムの開発が可能であることが示された。

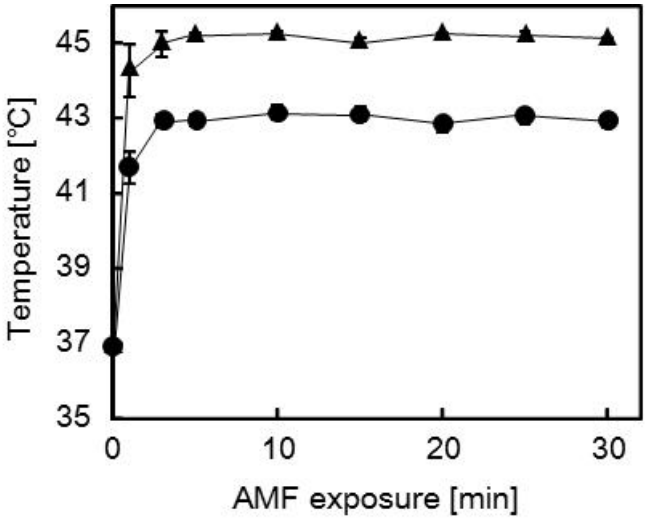

Fig. 30 MCL-induced heat generation *in vitro*. A549 cells magnetically labeled with MCLs (100 pg/cell) were harvested as cell pellets, and then exposed to an AMF for 30 min. The temperature of the cell pellets was measured using an optical fiber probe, and maintained at 43°C (circles) or 45°C (triangles) by adjustment of the electrical power of the AMF [146].

4.2.3.3 *in vitro* における磁場誘導型遺伝子発現システムの機能解析

次に、加温をスイッチとして治療遺伝子 *TNF-α* を発現するプラスミドベクター（pHSP-TRE/TNF-α/IRES/tTA または pHSP/TNF-α）を A549 細胞へ一過性で導入し、磁場照射から 24 時間後に培養上清中の TNF-α 産生量を測定することで、磁場照射によって HSP70B'プロモーターが駆動するかを確認した（Fig. 31A）。Fig. 31A の横軸は温度条件、縦軸は ELISA 法により定量した単位細胞あたりの TNF-α 生産量を示している。まず、磁場照射を行わなかった場合では、治療遺伝子発現プラスミドを導入した A549 細胞において TNF-α の発現は観察されなかった。治療プラスミド pHSP/TNF-α を遺伝子導入し、43°C、45°C の加温を行った場合では、相当な TNF-α が生産されたことから、MCL の発熱によって HSP70B'プロモーターが駆動することが示唆された。プラスミド pHSP/TNF-α と比較して、治療プラスミド pHSP-TRE/TNF-α/IRES/tTA を遺伝子導入し、43°C、45°C の加温を行った場合では、TNF-α 生産量が著しく増加した。また、Fig. 33B より、本実験で用いた遺伝子導入方法の導入効率は 14 %であったことから、得られた TNF-α 生産量は A549 細胞の致死量ではない可能性がある。しかし、タンパク質合成の限界や細胞毒性の観点から、ポジティブフィードバックループによる *TNF-α* 遺伝子発現はプラトーに到達する可能性があるが、遺伝子導入効率を改善することによりさらなる *TNF-α* 遺伝子発現量を得られると考えられる。さらに、Dox 添加により、治療プラスミド pHSP-TRE/TNF-α/IRES/tTA を遺伝子導入した A549 細胞の TNF-α 生産量は、治療プラスミド pHSP/TNF-α を遺伝子導入した A549 細胞の TNF-α 生産量と同等量まで減少した。また、Fig. 31C より、レポーター遺伝子 *LacZ* を用いた検討においても同様の結果が得られたことから、治療プラスミド pHSP-TRE/TNF-α/IRES/tTA を遺伝子導入した際の TNF-α 生産量の増加は Tet-Off システムによるポジティブフィードバックループに起因することが示唆された。

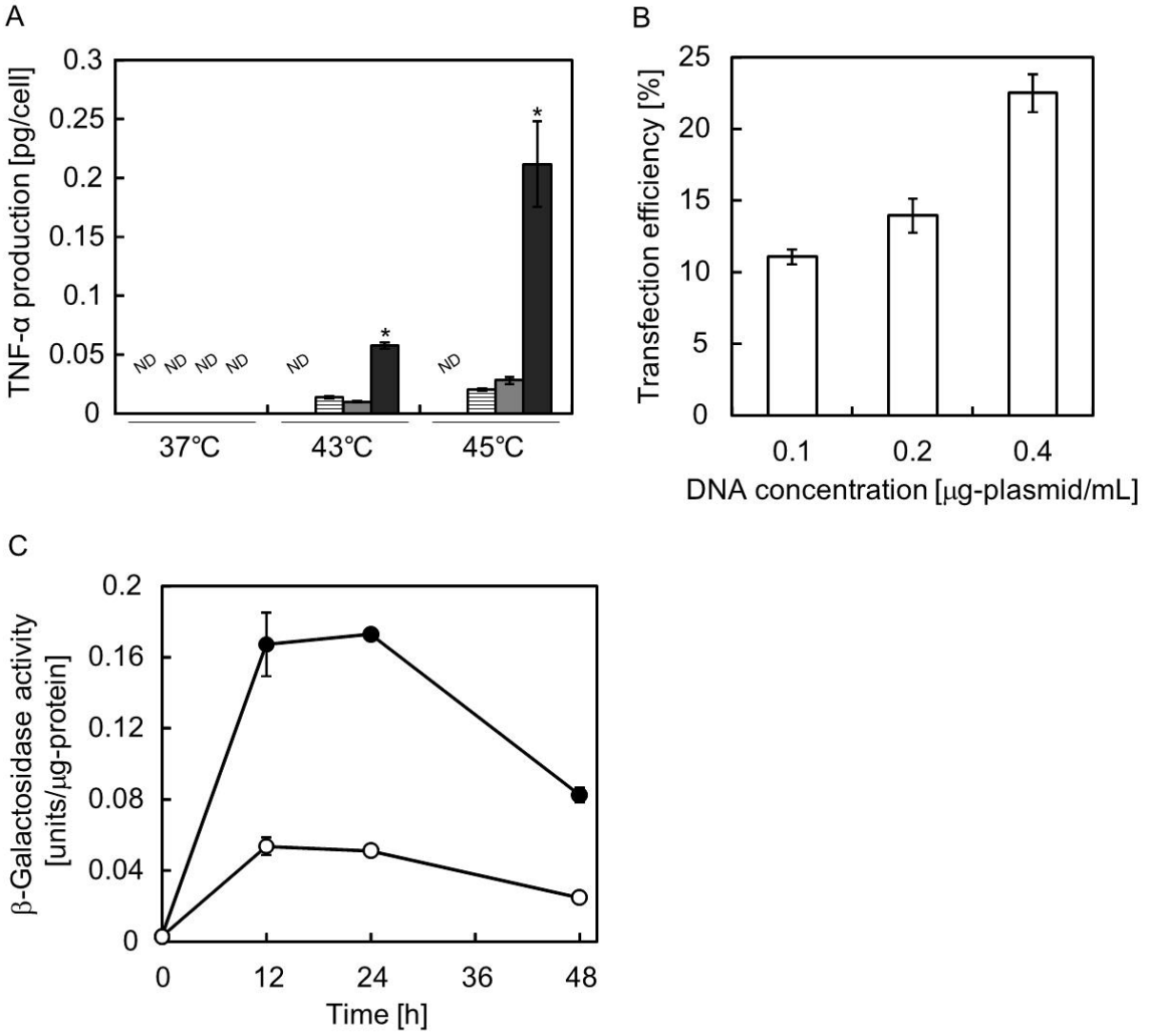

Fig. 31 AMF-inducible gene expression *in vitro*. (A) TNF-α production after AMF exposure. A549 cells were transfected with a mock plasmid (white columns), pHSP/TNF-α (stripe columns), pHSP-TRE/TNF-α/IRES/tTA plus Dox addition (gray columns) or pHSP-TRE/TNF-α/IRES/tTA (black columns), and then incubated at 37°C or heated at 43°C or 45°C. At 24 h after AMF exposure, culture medium was collected to measure the TNF-α level by ELISA. *P<0.05 versus pHSP/TNF-α at each temperature. ND indicates "no detection", where the minimum detectable range of TNF-α using the ELISA kit is <1.6 pg/mL, according to the manufacturer's instructions. (B) Transfection efficiencies. A549 cells were transfected with the reporter gene expression plasmid (pcDNA6.2/emGFP) at the concentration of 0.1, 0.2 or 0.4 μg-plasmid/mL. (C) Time-course profile of β-galactosidase activity after AMF exposure. A549 cells were transfected with pHSP-TRE/Z/IRES/tTA and treated with (open symbols) or without (closed symbols) Dox addition. The cells were exposed to the AMF for 30 min. The temperature was maintained at 43°C by adjusting the electrical power of the transistor inverter during AMF exposure. Following AMF exposure, the cells were reseeded in a 24-well culture plate, and then were harvested periodically to quantify β-galactosidase activity. Data are expressed as the mean ± SD of triplicates [146].

4.2.3.4 *in vitro* における磁場誘導型遺伝子発現システムの治療効果

治療遺伝子発現プラスミドを A549 細胞へ一過性で導入し、43°C あるいは 45°C で 30 分間の加温を行い、加温終了から経時的に A549 細胞数を測定することで、*in vitro* における磁場誘導型遺伝子発現システムの治療効果を評価した（Fig. 32A, B）。Fig. 32A, B の横軸は磁場照射から経過した時間、縦軸は空ベクターpETBlue II を導入し、磁場照射を行わなかった場合（37°C）の生細胞数を 100 %とした生細胞率を示している。磁場照射を行わなかった場合では、治療遺伝子発現プラスミド pHSP-TRE/TNF-α/IRES/tTA を遺伝子導入した場合においても殺細胞効果は観察されなかったことから、作製したハイブリッドプロモーターのリークが低いことが示唆された。磁場照射を行い、43°C あるいは 45°C で 30 分間加温した場合では、著しい殺細胞効果が観察された。空ベクターpETBlue II を導入し、43°C で加温した場合では、磁場照射翌日に生細胞率は 49 %まで減少し、4 日後まで 40 %を維持していた。これに対し、空ベクターpETBlue II を導入し、45°C で加温した場合では、磁場照射翌日に生細胞率は 33 %まで減少し、4 日後までには 12 %まで減少した。治療遺伝子発現プラスミド pHSP /TNF-α を導入し、43°C で加温した場合では、治療遺伝子を導入しなかった場合と比較して著しい生細胞率の減少が観察されたことから、*TNF-α* 遺伝子による治療効果が得られたことがわかった。しかしながら、治療遺伝子発現プラスミド pHSP/TNF-α を導入し、45°C で加温した場合では、治療遺伝子を導入しなかった条件と比較してさらなる治療効果は得られなかった。一方、治療遺伝子発現プラスミド pHSP-TRE/TNF-α/IRES/tTA を導入し、43°C で加温した場合では、磁場照射翌日に生細胞率は 9 %まで急激に減少し、4 日後までには 2 %まで減少した。さらに、治療遺伝子発現プラスミド pHSP-TRE/TNF-α/IRES/tTA を導入し、45°C で加温した場合では、治療遺伝子発現プラスミド pHSP/TNF-α を導入し、43°C あるいは 45°C で加温した場合と比較して、生細胞率の有意な減少を確認した。また、Dox を添加することによって殺細胞効果が緩和されたことから、治療遺伝子発現プラスミド

pHSP-TRE/TNF-α/IRES/tTA を用いた際の殺細胞効果の増強は、tTA のポジティブフィードバックにより誘導された *TNF*-α 遺伝子の大量発現に因るものであることが示唆された。

次に、治療遺伝子発現プラスミド pHSP-TRE/TNF-α/IRES/tTA を A549 細胞へ一過性で導入し、様々な時間で磁場照射による 43°C の加温を行い、加温終了から 24 時間後の A549 細胞数を測定し、充分な細胞死を得るために必要な磁場照射時間を測定することで、本研究で開発した遺伝子発現システムのさらなる有効性を評価した（Fig. 32C）。Fig. 32C の横軸は磁場照射時間、縦軸は磁場照射を行わなかった場合（37°C）の生細胞数を 100%とした生細胞率を示している。Dox を添加し、tTA のポジティブフィードバックをキャンセルした条件では、50%または 90%の細胞死を得るために必要な磁場照射時間はそれぞれ 29.3 分、40.0 分であった。これと比較して、Dox を添加しなかった場合では、50%または 90%の細胞死を得るために必要な磁場照射時間はそれぞれ 12.0 分、20.3 分であり、短い磁場照射時間でより強い殺細胞効果を得ることができることが分かった。したがって、本研究で開発した転写のポジティブフィードバックを可能にする遺伝子発現システムを利用することにより、温熱療法による治療効果を増強できることが示唆された。

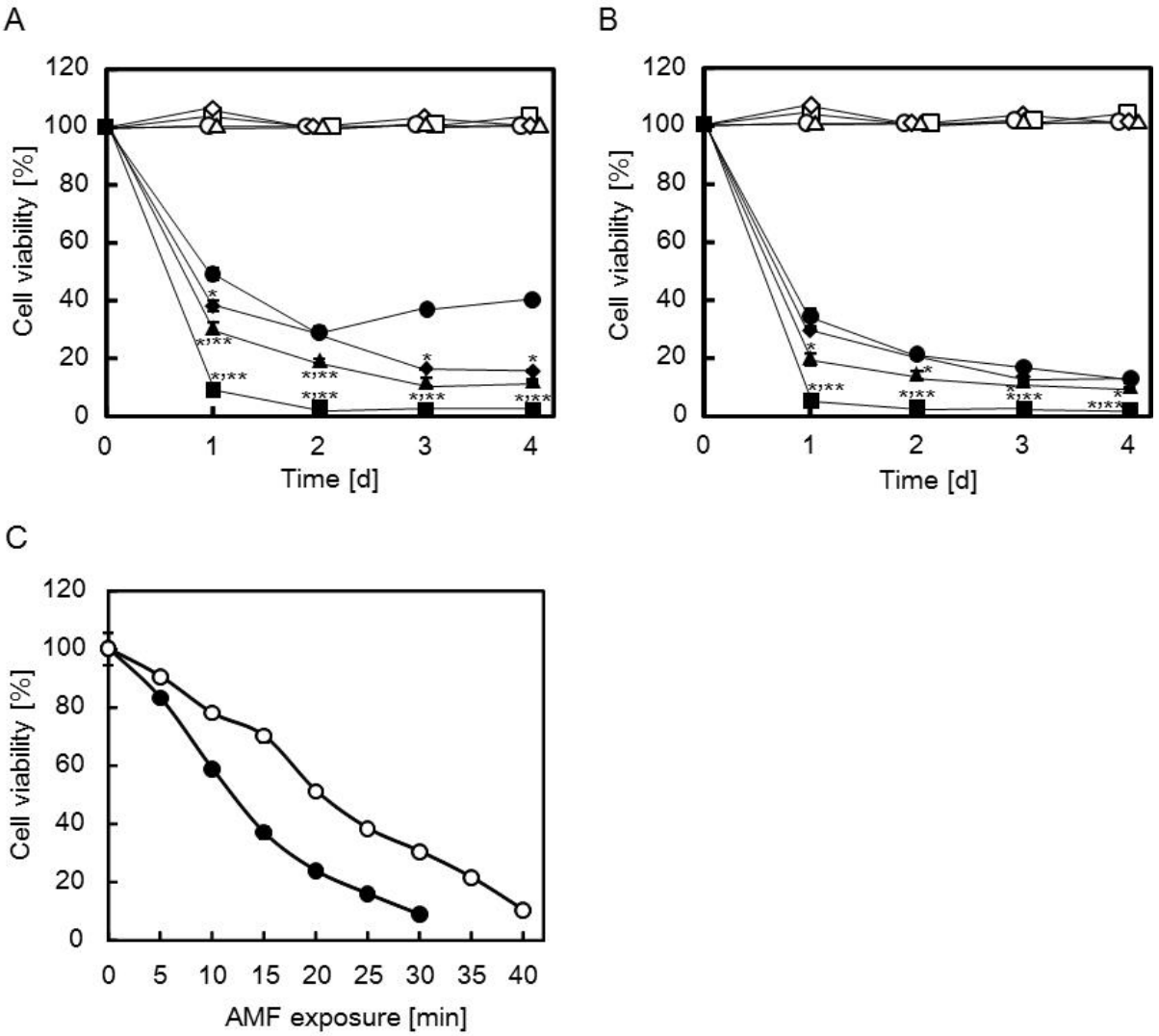

Fig. 32 Cell viability after AMF exposure. (A, B) A549 cells were transfected with the mock plasmid (circles), pHSP/TNF-α (diamonds), pHSP-TRE/TNF-α/IRES/tTA plus Dox addition (triangles) or pHSP-TRE/TNF-α/IRES/tTA (squares). The cells were incubated at 37°C (open symbols) or exposed to the AMF for 30 min (closed symbols). The temperature was maintained at 43°C (A) or 45°C (B) by adjusting the electrical power of the transistor inverter during AMF exposure. *P<0.05 versus the mock plasmid with AMF exposure (closed circles) and **P<0.05 versus pHSP/TNF-α with AMF exposure (closed triangles) at each temperature, respectively. Data are expressed as the mean ± SD of triplicates. (C) A549 cells were transfected with pHSP-TRE/TNF-α/IRES/tTA and treated with (open symbols) or without (closed symbols) Dox addition. The cells were exposed to the AMF for 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 or 40 min. The temperature was maintained at 43°C by adjusting the electrical power of the transistor inverter during AMF exposure. Data are expressed as the mean ± SD of triplicates [146].

4.2.4 本節のまとめ

本節では、機能性磁性ナノ粒子と交番磁場照射を利用した磁場誘導型遺伝子発現システムを開発した。*in vitro* において、磁場照射による加温をスイッチとして治療遺伝子の発現が誘導され、tTA によって発現量は増強された。そして、加温と tTA による治療遺伝子の大量発現により、磁場照射翌日に A549 細胞の生細胞率は 9 %まで急激に減少し、4 日後までには 2 %まで減少した。さらに、本研究で開発した磁場誘導型遺伝子発現システムを利用することにより、磁場照射時間を短縮したとしても高い治療効果が得られることが示され、患者への負担が少ない温熱療法の開発に有用であることが示唆された。

4.3 *in vivo* における磁場誘導型遺伝子発現システムの機能解析

4.3.1 本節の目的

本節では、担がんマウスモデルを用いた動物実験で、磁場照射によって MCL が目的治療温度（43°C）まで発熱し、腫瘍組織特異的に加温可能であるか調べた。そして、磁場照射による加温により治療遺伝子が発現し、さらに、Tet-Off システムの効果により遺伝子発現が増強されるかを確認した。また、磁場照射後の腫瘍組織体積を経時的に測定することで磁場誘導型遺伝子発現システムの殺細胞効果を評価した。

4.3.2 実験方法

4.3.2.1 腹部担がんマウスの作製

26G（Terumo, Tokyo, Japan）の注射針を付けたシリンジを用いて、4 週齢雌の胸腺欠損マウス BALB/cSlc-*nu*（Japan SLC, Hamamatsu, Japan）の腹腔内にペントバルビタール（50 mg/kg body weight）を注射することにより麻酔を施した。麻酔後は、マウスをウッドチップで包み、ライトで照射することにより体温が下がらないように配慮した。1×10^7 cells/mL に PBS で調製した A549 細胞懸濁液をマウスの左側腹部の皮下に 29G（Terumo）の注射針で 50 μL 注射することで腹部担がんマウスを作製した。腫瘍直径が 7 mm に達した担がんマウスを動物実験に用いた。腫瘍直径は 3 日毎に計測し、腫瘍体積は次式を用いて算出した。

$$\text{Tumor volume} = 0.5 \times \text{length [mm]} \times (\text{width [mm]})^2 \text{ [152]}$$

動物実験は所属機関の所定手続きを行い、承認を得た後に九州大学動物実験実施マニュアルに従い関連法令を遵守するように適切に取り扱った（A22-180-0、A24-176-1）。

4.3.2.2 *in vivo* における治療遺伝子 *TNF-α* を用いた細胞傷害アッセイ

in vivo における治療遺伝子 *TNF-α* を用いた細胞傷害アッセイの実験スキームを Fig. 33 に示す。まず、正電荷脂質膜（TMAG:DLPC:DOPE = 1:2:2）を用いたリポフェクション法により、治療遺伝子発現プラスミド（pHSP-TRE/TNF-α/IRES/tTA または pHSP/TNF-α; 20 μg）を担がんマウスに遺伝子導入した[153]。tTA によるポジティブフィードバック効果が得られないコントロール実験では、空ベクター（pETBlue II; 20 μg）を遺伝子導入した。遺伝子導入から 24 時間後、MCL 溶液（net magnetite weight: 3 mg）を担がんマウスの腫瘍中心部に 29G（Terumo）の注射針で 150 μL 注射した。MCL 注入から 24 時間後、アクリル製の筒の中に麻酔後のマウスを入れ、腫瘍が交番磁場照射

装置のコイルの中心になるように設置し、交番磁場を照射することにより *TNF-α* 遺伝子の発現誘導を行った。このときの磁場強度、周波数は 30.6 kA/m、118 kHz（384 Oe）に設定した。温度条件は 43°C に設定し、光ファイバー温度計のプローブ（Anritsu Meter）を腫瘍表面と直腸内に置くことで、腫瘍表面温度と体温を測定した。磁場照射開始から経時的に温度を観察し、出力を調節することにより腫瘍表面の温度を 43°C に保った。磁場照射終了後すぐに、マウス全身の温度を赤外線サーモグラフィー（FLIR i3; FLIR Systems Japan, Tokyo, Japan）により観察した。そして、治療遺伝子を導入した日を day 0 とし 3 日毎に腫瘍体積を測定した。この際、day 3 の腫瘍を回収し、Quantikine human TNF-α ELISA kit（R&D systems）により腫瘍内に含まれる TNF-α の定量を行った。

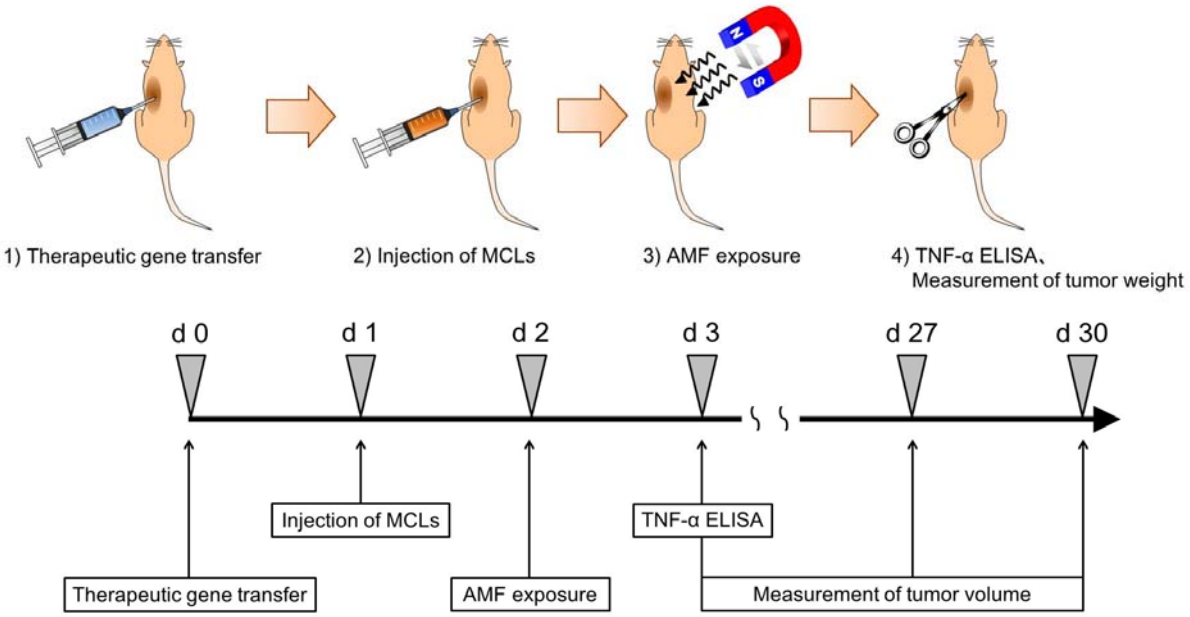

Fig. 33 Scheme of *in vivo* transfection and AMF exposure.

4.3.2.3 腫瘍内、血清中の TNF-α の定量

まず、腫瘍内の TNF-α を定量するために、磁場照射から24時間後の腫瘍組織（n=5）を切除し、gentle MACS^{TM} Dissociator（Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany）を用いてホモジナイズすることで単細胞懸濁液を用意した。その後、フェニルメチルスル

ホニルフッ化物（0.5 mM）を含むトリス塩酸緩衝液（pH 7.5）に浸し、1 時間超音波処理を施し、ホモジネートを 18,000 rpm、10 分間、4°C で遠心分離し、上清を回収した。また、マウス血清内の TNF-α を定量するために、心臓から血液を採取し、10,000 rpm、5 分間、4°C で遠心分離し、上清を回収した。回収した 200 μL の上清を用いて ELISA を行った。腫瘍ホモジネート、血清中の TNF-α の定量はキットのプロトコールに従って行い、総タンパク質量は Bicinchoninic acid solution（BCA）法により測定した[139]。

4.3.2.4 統計解析

統計解析はマンホイットニー順位和検定を用いて行った。全ての統計解析において $P < 0.05$ の時、有意差がある判断とした。

4.3.3. 実験結果と考察

4.3.3.1 *in vivo* における MCL を利用した発熱実験

担がんマウスモデルを用いた動物実験で、磁場照射によって MCL が目的治療温度（43°C）まで発熱し、腫瘍組織特異的に加温可能であるか調べた（Fig. 34）。担がんマウスの腫瘍組織に MCL を注入し、その 24 時間後に全身に交番磁場を照射した。Fig. 34A は磁場照射間の腫瘍表面、直腸内の温度を示している。Fig. 34A より、磁場照射開始から 3 分後には腫瘍温度が 43°C に到達し、出力を調節することで 43°C を維持することができた。そして、磁場照射を終えると急速に通常の体温に戻った。この間、直腸の温度は 36°C を超えることはほとんどなく、通常の体温を保っていた。さらに、磁場照射直後のマウスの全身を赤外線サーモグラフィーにより観察したところ、MCL を注射した腫瘍組織特異的に加温されていることが分かった（Fig. 34B）。以上の結果より、MCL と磁場照射を用いることで、正常組織を傷つけることなく、MCL を注射した腫瘍組織特異的に

加温できることが示され、*in vivo* においても磁場照射をスイッチとして遺伝子を大量発現させるシステムの利用が可能であることが示唆された。

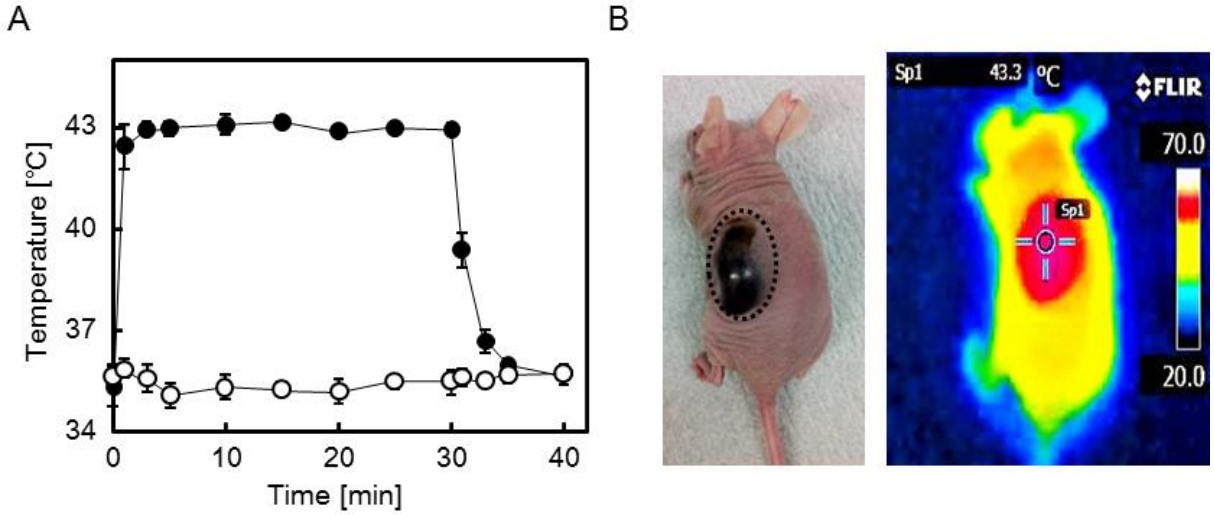

Fig. 34 MCL-induced heat generation *in vivo*. (A) Tumor temperature during AMF exposure. MCLs were injected into tumors, and then the mice were exposed to an AMF. Temperatures at the tumor surface (closed circles) and in the rectum (open circles) were measured by optical fiber probes. Data are expressed as the mean ± SD of five mice. (B) Infrared thermography of a mouse exposed to the AMF. (left) Bright field image. The tumor is encircled by a dotted line. (right) Infrared thermography [146].

4.3.3.2 *in vivo* における磁場誘導型遺伝子発現システムの機能解析

加温をスイッチとして治療遺伝子 *TNF-α* を発現するプラスミドベクター（pHSP-TRE/TNF-α/IRES/tTA または pHSP/TNF-α）を担がんマウスへ一過性で導入し、磁場照射から 24 時間後の腫瘍組織内の TNF-α 産生量を測定することで、磁場照射によって HSP70B'プロモーターが駆動するかを *in vivo* においても確認した（Fig. 35A）。Fig.35A の横軸は磁場照射の有無、縦軸は ELISA 法により定量した単位細胞あたりの TNF-α 生産量を示している。まず、磁場照射を行わなかった場合では、空ベクター pETBlue II または治療遺伝子発現プラスミド（pHSP-TRE/TNF-α/IRES/tTA または pHSP/TNF-α）を導入した腫瘍組織において TNF-α の発現は観察されなかったことから、作製したハイブリッドプロモーターによるリークは少ないことが示唆された。同様に、空ベクターpETBlue II を導入し、磁場照射を行った場合においても TNF-α の発現は観

察されなかった。これと比較して、治療遺伝子発現プラスミドを遺伝子導入し、磁場照射を行った場合では、腫瘍組織内に TNF-α が発現していることが分かり、MCL の発熱によって HSP70B'プロモーターが駆動することが示された。また、*in vitro* の場合と同様に、治療遺伝子発現プラスミド pHSP/TNF-α と比較して、治療遺伝子発現プラスミド pHSP-TRE/TNF-α/IRES/tTA を遺伝子導入し、43°C の加温を行った場合では、TNF-α 生産量が著しく増加した。さらに、全ての条件でマウスの血清から外因性の TNF-α の発現が観察されなかったことから、TNF-α による副作用の影響は少ないことが示唆された。

次に、磁場照射後の腫瘍組織体積を経時的に測定することで磁場誘導型遺伝子発現システムの抗腫瘍効果を評価した（Fig. 35B）。Fig. 35B の横軸は治療遺伝子発現プラスミドを遺伝子導入してから経過した時間、縦軸は腫瘍体積を示している。MCL のみを導入し、遺伝子を導入せず、磁場照射を行わない条件をコントロールとして設定した。コントロール群では、腫瘍体積は徐々に増大していき、遺伝子導入から 30 日後の平均腫瘍体積は 3.6 ± 0.3 cm^3 であった。遺伝子、MCL を導入し、磁場照射を行わなかった群の腫瘍組織は、コントロール群と同等まで成長を続けた。空ベクターpETBlue II を遺伝子導入し、磁場照射による加温を施した群では、コントロール群と比較して有意に腫瘍組織の増大が抑制され、遺伝子導入から 30 日後の平均腫瘍体積は 1.8 ± 0.2 cm^3 であり、温熱療法の効果が得られた。治療遺伝子発現プラスミド pHSP/TNF-α を遺伝子導入し、磁場照射による加温を施した群では、温熱治療単独の効果が得られる空ベクターpETBlue II を遺伝子導入した群と比較して著しく腫瘍体積の増大を抑制でき、遺伝子導入から 30 日後の平均腫瘍体積は 1.0 ± 0.1 cm^3 であり、温熱療法と遺伝子療法の併用効果が得られた。治療遺伝子発現プラスミド pHSP-TRE/TNF-α/IRES/tTA を遺伝子導入し、磁場照射による加温を施した群では、腫瘍組織の成長は 30 日間強く抑制され、遺伝子導入から 30 日後の平均腫瘍体積は 0.3 ± 0.1 cm^3 であった。以上の結果より、MCL と磁場照射を利用した磁場誘導型遺伝子発現システムは *in vivo* においても外部刺激により遺伝子発現を制御可能であり、がん治療へ応用することで高い治療効果を得られることが示唆された。

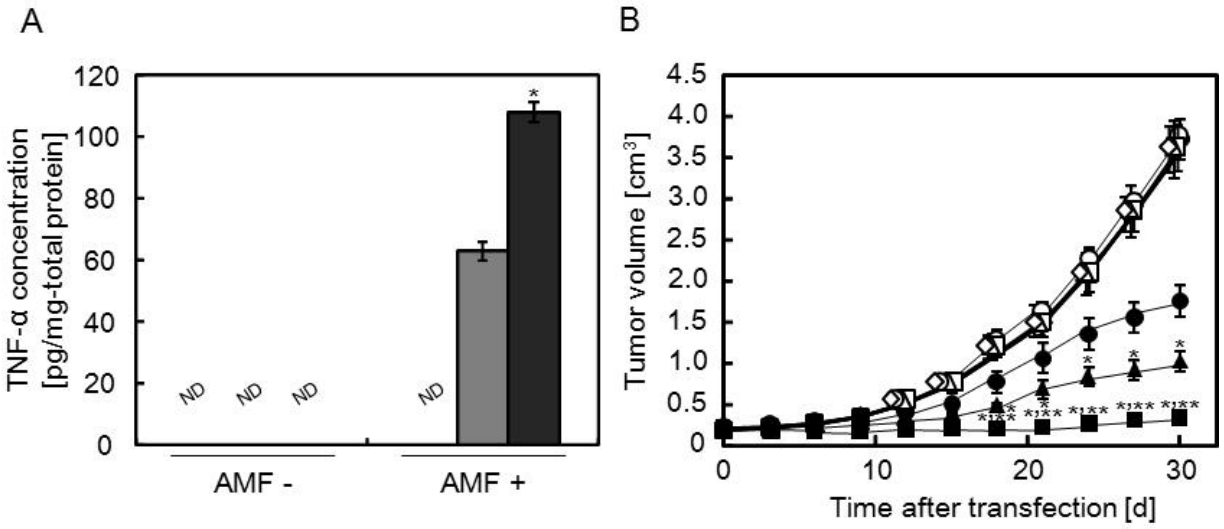

Fig. 35 AMF-inducible gene expression *in vivo* and therapeutic effects of heat-induced TNF-α gene therapy. (A) TNF-α production in tumor tissues after AMF exposure. Tumors were transfected with the mock plasmid (white columns), pHSP/TNF-α (gray columns) or pHSP-TRE/TNF-α/IRES/tTA (black columns). The mice were then exposed to the AMF for 30 min. TNF-α concentration in tumor homogenates was determined by ELISA at 1 day after AMF exposure. The human TNF-α ELISA does not detect mouse TNF-α. TNF-α concentration (pg/mg total protein) represents pg of TNF-α per mg of total protein in tumor homogenates. Data are expressed as the mean ± SD of triplicates. Each group contained five mice. *P<0.05 versus pHSP/TNF-α. ND means "no detection", where the minimum detectable range of TNF-α using the ELISA kit is <1.6 pg/mL, according to the manufacturer's instructions. (B) Therapeutic effects of heat-induced TNF-α gene therapy on tumor growth. Tumor tissues were transfected with the mock plasmid (circles), pHSP/TNF-α (triangles) or pHSP-TRE/TNF-α/IRES/tTA (squares). The mice were then treated with (closed symbols) or without (open symbols) AMF exposure for 30 min. As a control group, tumors were not transfected or exposed to the AMF (diamonds). Each group contained five mice. *P<0.05 versus the mock plasmid with AMF exposure (closed circles) and **P<0.05 versus pHSP/TNF-α with AMF exposure (closed triangle). Data are expressed as the mean ± SD of five mice [146].

4.3.4 本節のまとめ

担がんマウスモデルを用いた動物実験で、正常組織を傷つけず、MCL を注射した腫瘍組織特異的に加温できることが示され、*in vivo* においても磁場照射をスイッチとして遺伝子を大量発現させるシステムの利用が可能であることが示唆された。また、*in vitro* の場合と同様に、43°C の加温と tTA によって TNF-α 生産量が著しく増加した。さらに、温熱療法を施してから経時的に腫瘍体積を計測したところ、遺伝子導入から 30 日間著しく腫瘍体積の増大を抑制することができ、温熱療法と遺伝子療法の併用効果が得られた。以上の結果より、MCL と磁場照射を利用した磁

場誘導型遺伝子発現システムを利用したがん治療法は、温熱療法および遺伝子療法の課題である局所性を克服でき、相乗効果によって高い治療効果を得られることが示唆された。

4.4 本章のまとめ

本章では、交番磁場を照射することで発熱する磁性ナノ粒子の性質を利用して、磁場照射による発熱をスイッチとして目的遺伝子の発現を誘導する磁場誘導型遺伝子発現システムを開発した。本研究で用いた機能性磁性ナノ粒子 MCL は負電荷を帯びた細胞膜に静電的に結合して高効率で取り込まれる性質を有しており、腫瘍組織に直接注入することにより *in vivo* において高い治療効果が得られたと報告されている[153, 154]。細胞の種類によって MCL の取込み量は異なるが、正常細胞と比較してがん細胞株により多く取り込まれることが分かっている。これは、一般的にがん細胞株は高いエンドサイトーシス作用を有しており、MCL の標的細胞への取込みはこの作用を利用しているからである。しかしながら、これまでに報告されているがん細胞株への取込み量（ヒト U251-SP グリオーマ; 58.9 pg/cell[155]、ヒト肝細胞がん HepG2; 48.9 pg/cell[156]）と比較して、本研究で用いた A549 細胞への MCL の取込み量は 13.5 pg/cell と予想と反して低かった。MCL が細胞内へ取り込まれるメカニズムは完全には明らかにされておらず、今後詳しく解析する必要がある。このことにもかかわらず、*in vitro* において磁場照射を利用することで A549 細胞を目的温度 43°C および 45°C まで発熱させることに成功したことから、MCL は様々な細胞を磁気標識可能な優れたツールであることが示された。しかし、本研究では、MCL、治療遺伝子発現プラスミドベクターをそれぞれ別々に腫瘍組織へ直接注入しており、腫瘍標的性は達成できていない。*in vivo* において、抗体を磁性ナノ粒子の表面に修飾させることで組織標的性を達成している報告が数多くされており[12, 157]、今後はこの概念を本研究に取り入れ、より高度ながん治療法を開発していく必要がある。

また、本研究では遺伝子発現を誘導するためのスイッチとして交番磁場照射を行った。*in vitro* および *in vivo* において、磁場照射による MCL の発熱により HSP70B’プロモーターが駆動し、治療遺伝子 *TNF-α* の発現が誘導され、一方で、磁場照射を行わなかった場合では HSP70B’プロモーターのスイッチが入らず、治療遺伝子 *TNF-α* の発現はほとんど観察されなかった。これらの結果から、HSP70B’プロモーターと磁場照射を利用することにより目的遺伝子の発現を厳密に制御可能であることが示唆された。本研究で構築した遺伝子発現システムは、tTA のフィードバック増幅ループを含有しているため、磁場照射を行わなかった場合でも HSP70B’プロモーターのリークにより発現する tTA によって治療遺伝子の発現が増幅され、予期せぬ副作用を引き起こす危険性を孕んでいた。しかしながら、HSP70B’プロモーターのリークの低さが実証されたことから、本研究で構築した温熱誘導型フィードバック増幅ループを含む遺伝子発現システムは、副作用が少なく、長期的に治療効果が期待できる新規がん治療法の開発において有益なツールであると考えられる。

第５章　Ｔ細胞受容体遺伝子導入によるがん温熱免疫療法の開発

5.1 緒言

がんの種類によっては早期に発見できれば外科手術により根治可能であるが、未だ数多くのがんが「不知の病」であることは避けられない事実である。大半のがんを「不知の病」たらしめている理由は、再発がん、転移がんに対する有効な治療法が無いためである。この問題を解決するために、腫瘍への抗原特異的な免疫応答において重要な役割を担う CTL を利用した腫瘍特異的 T 細胞治療法の研究開発が盛んに行われている[102, 103]。腫瘍に対する CTL の免疫応答は、α 鎖と β 鎖により構成される TCR によって媒介される。β 鎖は VDJ（variable, diversity, ioining）領域および定常領域によって構成されており、TCR の多様性は VDJ 領域の遺伝子再編成を経ることにより獲得される。そして、VDJ 領域の中でも超可変領域と呼ばれる CDR3 領域（third complementarity-determining region）をコードする遺伝子配列が TCR の多様性形成において最も重要であると考えられている[39]。患者から採取した TIL の CDR3 領域の遺伝子配列を解析し、がん抗原を特異的に認識するように *TCR* 遺伝子を再編成した後に患者に戻すことにより、より有効ながん免疫療法を行うことが可能である [158-160]。TIL を治療に用いる場合の問題点として、培養時に T 細胞の抗原特異性が変化することが挙げられるが、*TCR* 遺伝子を再編成した人工 CTL を治療に用いる際の利点は、抗原特異性を維持したまま大量に人工 CTL を培養可能である点である。

本章で用いたメラノーマ標的性磁性ナノ粒子 NPrCAP/M は、メラニン生合成時に細胞傷害性のフリーラジカルを生成する NPrCAP を結合させており、メラノーマ細胞に対してアポトーシスを誘導する化学薬剤として作用する[38]。さらに、MCL と同様に、NPrCAP/M を用いた温熱療法後に強い抗腫瘍免疫が誘導されることが報告されており、化学療法・温熱療法・免疫療法の 3 種類の治療効

果を有した CTI（chemo-thermo-immuno）療法がメラノーマに対する新規治療法として開発されている[161]。本研究では、NPrCAP/M を利用した CTI 療法に人工 CTL を利用した *TCR* 遺伝子療法、およびメラノーマ抗原ペプチドを利用したワクチン療法を組み合わせることで、CTI 療法により誘導された抗腫瘍免疫をさらに賦活する治療法の開発を目的とした（Fig. 36）[147]。具体的には、NPrCAP/M を利用した CTI 療法後に患者の腫瘍から TIL を単離して CDR3 領域の遺伝子配列を解析、さらに腫瘍特異的な抗原ペプチドを同定する。それら解析結果を基に、人工 CTL を作製し生体内に戻す、さらに同定した抗原ペプチドを投与することにより、抗腫瘍免疫の賦活を狙う。この治療法は、「CTI 療法後に免疫誘導された TIL」の CDR3 領域の解析結果を基に人工 CTL の作製を行うため、CTI 療法と併用することによる相乗効果が期待できる。さらに、個々の患者に対して人工 CTL を作製、および抗原ペプチドを同定するため、個別化医療として多くの患者に対して適用可能である。本研究が完成すれば、原発がんを治療した後に、誘導された強力な抗腫瘍免疫により再発・転移がんをも治療可能であり、がんを「不知の病」から脱却させる治療法の開発につながる。本章では、標的腫瘍を B16F1 マウスメラノーマとし、NPrCAP/M と交番磁場を利用した CTI 療法後に誘導される抗腫瘍免疫のメカニズムを探索するために、CTI 療法後の TIL の *TCR* 遺伝子配列解析、および抗原ペプチドの解析を行った。

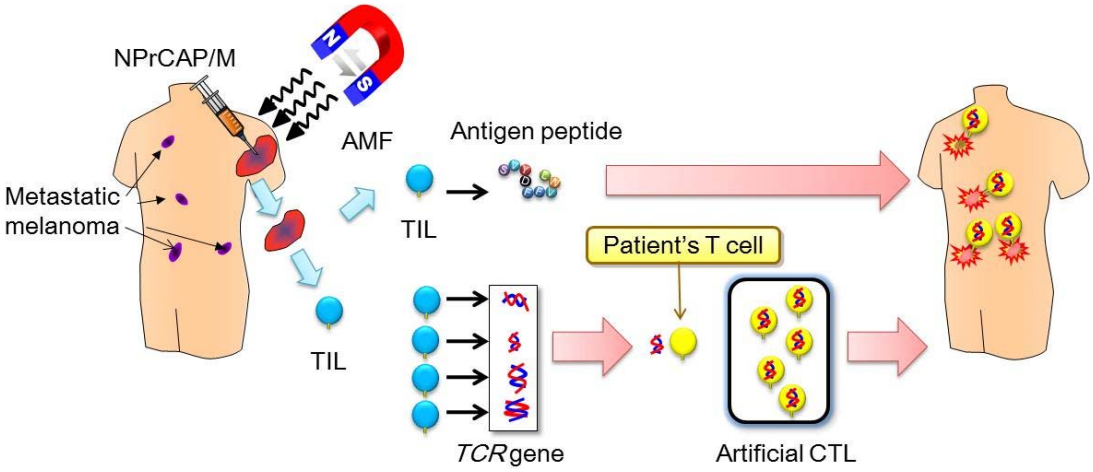

Fig. 36 Strategy of NPrCAP/M-mediated hyperthermia for melanoma-targeted chemo-thermo-immunotheraoy. This strategy is based on combination of hyperthermia using NPrCAP/M with antimelanoma peptide vaccine and *TCR* gene-engineered CTL therapy [147].

5.2 NPrCAP/M を利用した CTI 療法の治療効果及び免疫誘導効果

5.2.1 本節の目的

本節では、担がんマウスモデルを用いた動物実験で、磁場照射によって NPrCAP/M が目的治療温度（43°C）まで発熱し、腫瘍組織特異的に加温可能であるか調べた。そして、CTI 療法後の腫瘍組織の重さを測定することで治療効果を評価した。さらに、CTI 療法後の腫瘍組織およびリンパ節内に $CD8^+$T 細胞が浸潤しているかを観察することで、CTI 療法により抗腫瘍免疫が誘導されたかを確認した。

5.2.2 実験方法

5.2.2.1 細胞培養

マウスメラノーマ細胞株 B16F1（American Type Culture Collection, VA, USA）は札幌医科大学医学部皮膚科学講座から供与して頂き、FBS を 5%、ベンジルペニシリンカリウム（Wako）を 100 unit/mL、ストレプトマイシン硫酸塩（Wako）を 100 μg/mL および炭酸水素ナトリウム（Wako）を 1.5 g/L 添加した低グルコース DMEM（Gibco BRL）を用いて培養した。細胞培養は、37°C、5% CO_2 インキュベータ内で行った。

5.2.2.2 フットパッド担がんマウスの作製

26G（Terumo）の注射針を付けたシリンジを用いて、4 週齢雌の C57/BL6Ncr マウス（Japan SLC）の腹腔内にペントバルビタール（50 mg/kg body weight）を

注射することにより麻酔を施した。麻酔後は、マウスをウッドチップで包み、ライトで照射することにより体温が下がらないように配慮した。1×10^7 cells/mL に PBS で調製した B16F1 細胞懸濁液を麻酔後のマウスの右足の皮下（フットパッド）に 29G（Terumo）の注射針で 50 μL 注射することでフットパッド担がんマウスを作製した。動物実験は所属機関の所定手続きを行い、承認を得た後に九州大学動物実験実施マニュアルに従い関連法令を遵守するように適切に取り扱った（A22-180-0）。

5.2.2.3 *N*-propionyl-4-*S*-cysteaminylphenol/magnetite（NPrCAP/M）の作製方法

本研究で使用した NPrCAP/M は札幌医科大学医学部皮膚科学講座から供与して頂いた。以下に簡潔に NPrCAP/M の作製方法を記載する。磁性ナノ粒子（Fe_3O_4; 平均粒子径, 10 nm）は戸田工業（Hiroshima, Japan）より購入したものを使用し、796 kA/m（室温）における磁気特性（飽和保磁力、飽和磁束密度、残留磁束密度）は、2.0 kA/m、63.9 Am^2/kg、2.6 Am^2/kg であり、30.6 kA/m、118 kHz（384 Oe）における比吸収率は、42.6 W/g である[147]。磁性ナノ粒子表面はアミノシラン・カップリング剤で修飾し、マレイミド架橋剤を介して NPrCAP を結合させており[114]、高速液体クロマトグラフィー解析から、磁性ナノ粒子に結合している NPrCAP 量は 60 nmol/mg である。また、平均粒子径は約 280 nm である。

5.2.2.4 NPrCAP/M を利用した CTI 療法実験

CTI 療法の実験スキームを Fig. 37 に示す。B16F1 細胞移植から 3 日後、腫瘍が形成されていることを確認し、NPrCAP/M 溶液（net magnetite weight: 2 mg）を担がんマウスの腫瘍中心部に 29G（Terumo）の注射針で 50 μL 注射した。NPrCAP/M 注入後、アクリル製の筒の中に麻酔後のマウスを入れ、腫瘍が交番磁場照射装置のコイルの中心になるように設置し、交番磁場を照射することにより CTI 療法を

開始した。このときの磁場強度、周波数は 30.6 kA/m、118 kHz（384 Oe）に設定した。温度条件は 43°C に設定し、光ファイバー温度計のプローブ（Anritsu Meter）を腫瘍表面と直腸内に置くことで、腫瘍表面温度と体温を測定した。磁場照射開始から経時的に温度を観察し、出力を調節することにより腫瘍表面の温度を 43°C に保った。この一連の操作を一日置きに計 3 回行い、治療開始から 14 日後に腫瘍組織を切除して、腫瘍組織の重量測定を行った。さらに、Optimal Cutting Temperature Compound（Sakura Finetechnical, Tokyo, Japan）を用いて腫瘍組織を凍結固定し、薄切切片を作製して抗 CD8 抗体（clone: 53-6.7, BD Pharmingen, CA, USA）を用いて染色することにより免疫組織学的解析を行った。

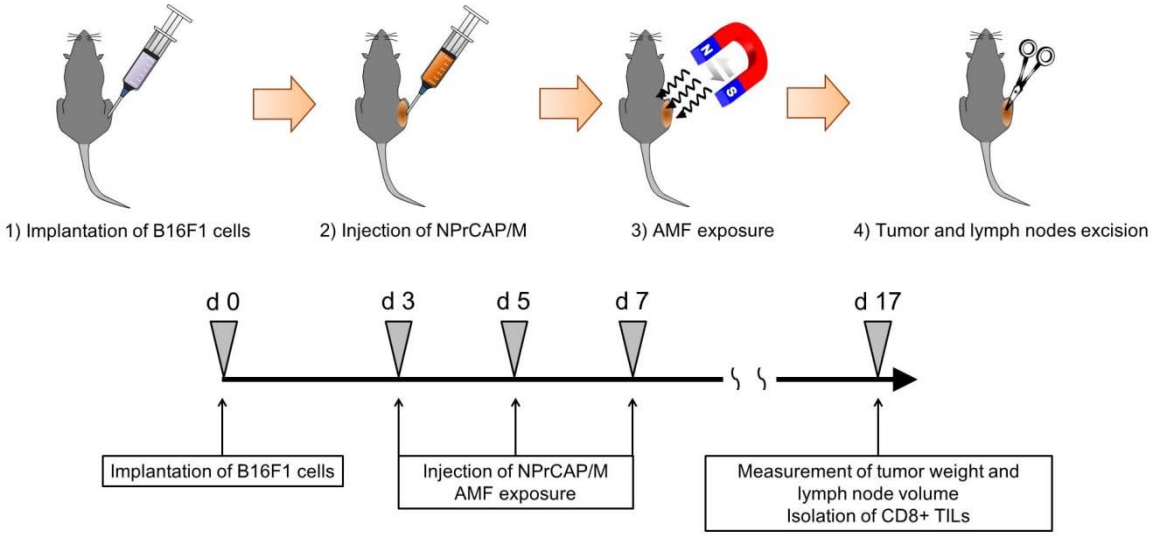

Fig. 37 Scheme of hyperthermia using NPrCAP/M.

5.2.2.5 所属リンパ節からの CD8^{+}T 細胞の単離及びフローサイトメトリー解析

リンパ節と脂肪を識別し、外科手術を行い易くするために、CTI 療法開始から 14 日後のマウスに麻酔を施した後、切除したいリンパ節側の足の裏に 1% Evans blue（Sigma Chemical） を 25 μL 皮下注射し、リンパ節を青色に染色した[162]。青色に染色された腫瘍を移植した右足側の鼠蹊部リンパ節が腫瘍流入領域リンパ節である[163]。リンパ節の直径はノギスを用いて測定し、リンパ節の体積は次式を用いて算出した。

$$\text{Lymph node volume} = 0.5 \times \text{length [mm]} \times (\text{width [mm]})^2$$

青色に染色された鼠径部リンパ節を脂肪が付着しないように丁寧に切除し、PBS により血液を洗い流した。切除した鼠径部リンパ節を gentleMACS C Tube（Miltenyi Biotec）に回収し、gentleMACS™ Dissociator（Miltenyi Biotec）を用いてホモジナイズすることで単細胞懸濁液を用意した。単細胞懸濁液を 15 mL 遠心チューブに移した後、MACS buffer（Miltenyi Biotec）で 10 mL にメスアップし、300×*g*、10 分間、4°C で遠心分離することでリンパ球を採取した。採取したリンパ球を抗 CD8 抗体により染色した後、フローサイトメーター（BD FACSCalibur™; BD Bioscience, CA, USA）により解析することでリンパ節中の $CD8^+$T 細胞数を計測した。リンパ節中の全細胞当たりの $CD8^+$T 細胞の割合はトリパンブルー染色法により算出した。

5.2.2.6 統計解析

統計解析はマンホイットニー順位和検定を用いて行い、$P < 0.05$ の時、有意差がある判断とした。

5.2.3 実験結果と考察

5.2.3.1 NPrCAP/M を利用した CTI 療法の治療効果

現在までに、マウス側腹部に皮下移植された B16F1 メラノーマに対して NPrCAP/M を利用した CTI 療法が有効であることが報告されている[164]。本研究では、流入領域リンパ節を鼠径部および膝窩リンパ節[162]に限定して解析することを目的として、マウスのフットパッドに皮下移植したメラノーマに対して NPrCAP/M を利用した CTI 療法を施した。

まず、フットパッド担がんマウスモデルを用いた動物実験で、磁場照射によって NPrCAP/M が目的治療温度（43°C）まで発熱し、腫瘍組織特異的に加温可

能であるか調べた（Fig. 38A）。フットパッドに B16F1 細胞を移植して 3 日後、担がんマウスの腫瘍組織に NPrCAP/M を注入し、交番磁場を照射することで温熱療法を行った。Fig. 38A は磁場照射間の腫瘍表面、直腸内の温度を示している。Fig. 38A より、磁場照射開始から 3 分後には腫瘍温度が 43°C に到達し、出力を調節することで 43°C を維持することができた。この間、直腸の温度は 36°C を超えることはほとんどなく、通常の体温を保っていた。以上の結果から、NPrCAP/M と交番磁場を利用することにより正常組織を傷つけることなく、NPrCAP/M を注入した腫瘍組織特異的に加温することができ、出力を調節することで正確、簡便に温度を調節可能であることが示唆された。

次に、CTI 療法開始から 14 日後の腫瘍組織の重さを測り、NPrCAP/M を利用した CTI 療法の治療効果を評価した（Fig. 38B）。治療温度を 43°C に設定し、一日おきに 3 回行うことにより、無治療担がんマウスと比較して CTI 療法を行ったマウスの腫瘍体積が有意に退縮した。治療温度を 46°C に設定し、一日毎に 2 回行うことでメラノーマを完全に退縮可能であることが報告されており[165]、本研究においても治療温度を 43°C 以上に設定することで腫瘍の完全退縮が可能であると思われる。しかし、ネクローシスを起こす 46°C より低い 43°C で加温することでより強力な抗腫瘍免疫が誘導されたとの報告から[164]、本研究では温熱免疫機構の解明を目的としているため治療温度を 43°C に設定した。

さらに、腫瘍に浸潤している $CD8^+$T 細胞を定量するため、抗 CD8 抗体を用いて治療開始から 14 日後の腫瘍組織の免疫染色を行った（Fig. 38C, D）。無治療担がんマウスの腫瘍内、腫瘍組織周囲においては $CD8^+$T 細胞は観察されなかったが、CTI 療法を施したマウスの腫瘍組織周囲では $CD8^+$T 細胞の浸潤を多数観察することができた（Fig. 38C）。そして、僅かながら腫瘍内においても $CD8^+$T 細胞の浸潤を確認した（Fig. 38D）。この結果は、Sato, A.ら、Takada, T.らが行った側腹部担がんマウスモデルを用いた CTI 療法における結果と一致した[161, 164]。以上の結果から、NPrCAP/M を利用した CTI 療法を行うことにより、リンパ球が活性化されて腫瘍に浸潤し、腫瘍の退縮に貢献することが示唆された。

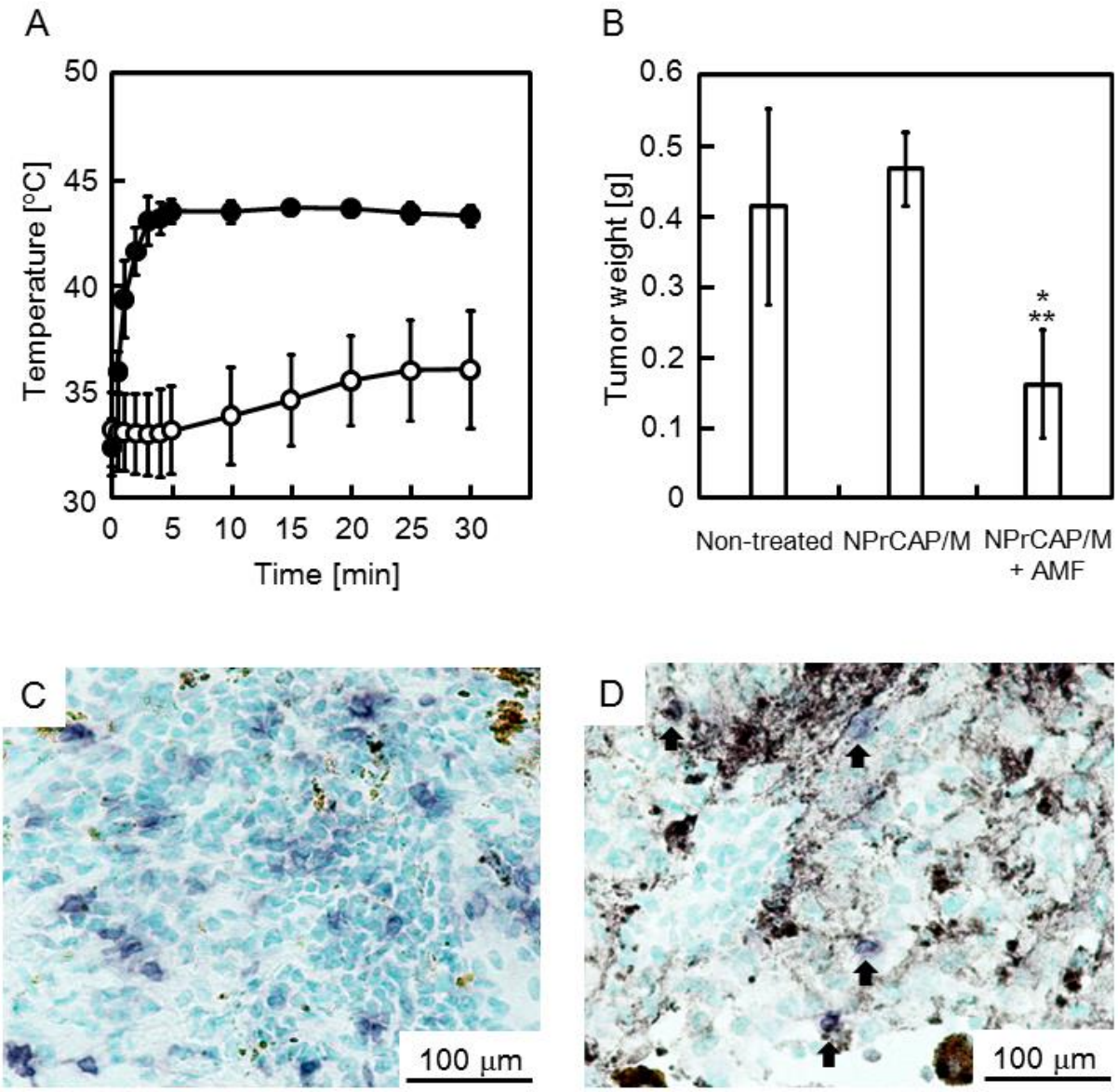

Fig. 38 Hyperthermia using NPrCAP/M. (A) Temperatures at the tumor surface (closed circles) and in the rectum (open circles) during AMF exposure. NPrCAP/M were injected directly into subcutaneous B16F1 tumors. Data points and bars are expressed as the mean ± SD of five mice. (B) Tumor weight on day 17. Tumors that had been non-treated or injected with NPrCAP/M with or without AMF irradiation were resected, and tumor weight was measured on day 17. Data are expressed as the mean ± SD of five mice. (C, D) Immunohistochemical staining for $CD8^+$ T cells around (C) and within (D) the tumor on day 17. Tumors were resected after NPrCAP/M-mediated hyperthermia. Violet-blue cells are anti-CD8 antibody-stained cells visualized by diaminobenzidine tetrahydrochloride-nickel solution containing hydrogen peroxide. Slides were counterstained with methyl green, and nuclei are light green. Arrows in (D) show a few representative $CD8^+$ T cells within the tumor. *$P < 0.01$ against non-treated mice. **$P < 0.01$ against the mice treated with NPrCAP/M alone [147].

5.2.3.2 NPrCAP/M を利用した CTI 療法の免疫誘導効果

次に、CTI 療法開始から 14 日後の鼠径部流入領域リンパ節を観察することにより、NPrCAP/M を利用した CTI 療法の免疫誘導効果を評価した（Fig. 39）。Fig. 39A, B より、左半身の鼠径部リンパ節と比較して、右足に移植した腫瘍組織の所属リンパ節である右半身の鼠径部流入領域リンパ節が肥大していることを確認した。このリンパ節のサイズを計測したところ、無治療担がんマウスや NPrCAP/M を注入したのみのマウスを含む、全ての担がんマウスモデルにおいて、著しい鼠径部流入領域リンパ節の肥大を確認した（Fig. 39C）。特に NPrCAP/M を利用した CTI 療法を施したマウスにおいて、ナイーブマウスと比較して著しく鼠径部流入領域リンパ節が肥大していた（Fig. 39C）。

観察されたリンパ節の肥大は、がん抗原を認識して腫瘍組織へ浸潤した T 細胞がリンパ節へ帰還している、また流入領域リンパ節において APC による抗原提示により活性化し、増殖・分化した特異的な T 細胞が関与していると考えられる。そこで、ナイーブマウスの鼠径部リンパ節と CTI 療法を施した担がんマウスの鼠径部流入領域リンパ節を回収し、$CD8^+$T 細胞の数を比較した（Fig. 39D）。Fig. 39D より、CTI 療法を施した担がんマウスにおいて $CD8^+$T 細胞数が著しく増加していた。これらの結果から、CTI 療法により抗腫瘍免疫が誘導され、$CD8^+$T 細胞が増幅したことにより流入領域リンパ節が肥大したと考えられる。

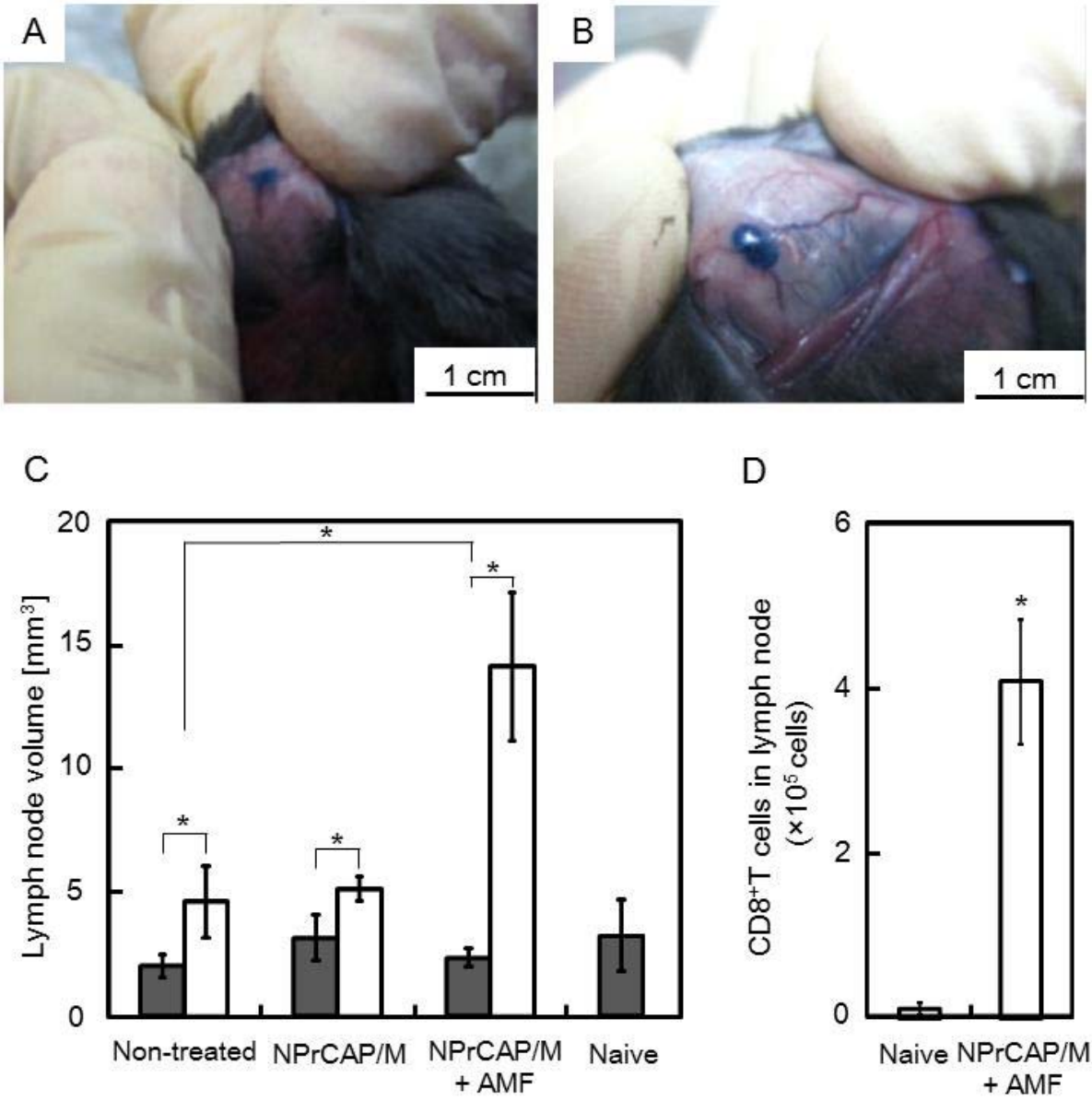

Fig. 39 Analysis of lymph node after NPrCAP/M-mediated hyperthermia. (A, B) Evans blue dye labeling of a representative inguinal NDLN (A) and DLN (B). On day 17, 1% Evans blue dye solution was subcutaneously injected into the hind foot pad. (C) Lymph node volume on day 17. Closed columns, NDLN; open columns, DLN. Data are expressed as the mean ± SD of five mice. (D) The number of $CD8^+$ T cells in a lymph node on day 17. $CD8^+$ T cells were negatively selected by magnetic cell sorting. The cells were mixed and stained phycoerythrin-conjugated anti-CD8 antibody, and flow cytometric analyses were performed to analyze the percentage of $CD8^+$ T cells. The number of $CD8^+$ T cells in lymph node was calculated from the percentage of $CD8^+$ T cells among the total number of lymphocytes that were counted by the trypan blue dye exclusion method using a hemocytometer. Data are expressed as the mean ± SD of five mice. $*P < 0.01$ [147].

5.2.4 本節のまとめ

NPrCAP/M を利用した CTI 療法から 14 日後の腫瘍組織の重さを測定したところ、CTI 療法を施したマウスにおいて有意に腫瘍を退縮させることができた。さらに、CTI 療法開始から 14 日後の腫瘍組織の抗 CD8 抗体を用いた免疫組織学的解析を行ったところ、CTI 療法を施したマウスの腫瘍組織周囲において $CD8^+$T 細胞の浸潤を多数確認し、僅かながら腫瘍組織内においても $CD8^+$T 細胞を確認した。

また、CTI 療法開始から 14 日後の鼠径部流入領域リンパ節を観察したところ、がんを移植した右半身の鼠径部流入領域リンパ節が著しく肥大していることを確認した。そして、鼠径部流入領域リンパ節内の $CD8^+$T 細胞の数を比較したところ、CTI 療法を施した担がんマウスにおいて $CD8^+$T 細胞数が著しく増加していることが分かり、CTI 療法により抗腫瘍免疫が誘導され、$CD8^+$T 細胞が増殖したと考えられる。以上の結果から、NPrCAP/M を利用した CTI 療法を行うことにより、がん細胞を認識して攻撃する $CD8^+$T 細胞数が増加し、腫瘍組織の退縮に貢献することが示唆された。

5.3 NPrCAP/M を利用した CTI 療法後の腫瘍浸潤リンパ球の TCR レパトワ解析

5.3.1 本節の目的

前節において、NPrCAP/M を利用した CTI 療法により誘導された抗腫瘍免疫により、鼠径部流入領域リンパ節において $CD8^+$T 細胞数の増加を確認した。そこで、本節では、腫瘍組織、鼠蹊部リンパ節内の T 細胞の TCR Vβ ファミリーのレパトワ解析を行うことにより、免疫誘導された $CD8^+$T 細胞の特性を調べた。さらに、抗腫瘍免疫を賦活するために、免疫誘導された $CD8^+$T 細胞を活性化する抗原ペプチドの同定を目標とした。

5.3.2 実験方法

5.3.2.1 TCRVβ レパトワ解析

TCRVβ レパトワ解析は、SuperTCRExpress™ Mouse T Cell Receptor Vβ Repertoire Clonality Detecting Kit（BioMed Immunotech, FL, USA）を用いて行った。このキットを利用した解析方法は、VDJβ 領域を PCR 法により遺伝子増幅した後に、アガロースゲル電気泳動解析を行うという流れである。まず、CTI 療法から 14 日後の腫瘍組織もしくはリンパ節から単離した $CD8^+$T 細胞から RNA 抽出キット（RNAiso Plus、Takara）を用いて RNA を抽出した。抽出した RNA を用いて逆転写反応を行うことにより cDNA を採取し、94°C で 3 分間処理した後、94°C で 30 秒間、55°C で 30 秒間、72°C で 45 秒間を 1 サイクルとし、これを 35 サイクル繰り返すことにより *TCR* 遺伝子を増幅した。そして、Taq DNA polymerase を用いた 2 段階目の PCR（95°C で 3 分間処理した後、95°C で 30 秒間、58°C で 30 秒間、72°C で 30 秒間を 1 サイクルとし、これを 30 サイクル繰り返す）を行い、特異的な *TCR Vβ* 遺伝子を増幅した。その後、4 %の高解像度アガロースゲルを用いた電気泳動を行うことにより、PCR 産物から得られた *TCR Vβ* 遺伝子にどのようなレパトワがあるかを調べた。また、DNA 塩基配列解析のために、電気泳動後のゲルから切り出した TCR Vβ バンドを MagExtractor™-PCR（Toyobo）と Gel Clean Up Kit（Toyobo）により精製した後に、pGEM®-T vector（Promega, WI, USA）に載せクローニングを行った。そして、陽性コロニーから抽出したプラスミド DNA の塩基配列を DNA sequencer（Prism® 3130 Genetic Analyzer; Applied Biosystems, CA, USA）により解析し、得られた塩基配列を BLAST search engine を使用して GenBank database と比較した。以上の操作はキットのプロトコールに従って行った。

5.3.2.2 所属リンパ節からの CD8$^+$Vβ11$^+$T 細胞の単離

CD8$^+$Vβ11$^+$細胞のフローサイトメトリー解析のために、5.2.2.5 に記載した操作により回収したリンパ球から抗 CD8 抗体および抗 TCR Vβ11 抗体（clone RR3-15; BD Pharmingen）を用いて CD8$^+$Vβ11$^+$T 細胞を単離した。回収した細胞はフローサイトメーター（BD FACSCalibur^{TM}; BD Bioscience）で解析することで、リンパ節中の CD8$^+$Vβ11$^+$T 細胞のポピュレーションを解析した。リンパ節中の全細胞当たりの CD8$^+$Vβ11$^+$T 細胞の割合はトリパンブルー染色法により算出した。

5.3.2.3 培養上清中における IFN-γ の定量

培養上清中における IFN-γ 量測定の実験スキームを Fig. 40 に示す。CTI 療法開始から 14 日後のマウスから採取したリンパ球細胞をマイトマイシン C 処理した B16F1 細胞（1.0 × 10^7 cells）または抗原ペプチド（10 μg/mL）と共培養することにより再刺激を行い、IFN-γ の分泌を促した。共培養する際の培地は、FBS を 10 %、ベンジルペニシリンカリウム（Wako）を 100 unit/mL、ストレプトマイシン硫酸塩（Wako）を 100 μg/mL、2-メルカプトエタノール（EMD Millipore, Darmstadt, Germany）を 50 μM、HEPES（Dojindo）を 25 mM および炭酸水素ナトリウム（Wako）を 3.7 g/L 添加した RPMI-1640（日水製薬）を使用した。使用した FBS は 56°C で 30 分間加温することにより非働化を行った。そして、再刺激を行う際に用いた B16F1 細胞は、B16F1 細胞が元来発現している MHC クラス I 量が低いため、IFN-γ（100 unit/mL）による発現誘導を行った[166]。また、抗原ペプチドとして、tyrosinase-related protein（TRP）-$1_{222\text{-}229}$（amino acid sequence: TWHRYHLL; Greiner Bio-one, Frickenhausen, Germany）[167]、TRP-$2_{180\text{-}188}$（amino acid sequence: SVYDFFVWL; Abgent, CA, USA）[168]、glycoprotein $100_{25\text{-}33}$（amino acid sequence: EGSRNQDWL; Anaspec, CA, USA）[169]を用い、ネガティブコントロールとして、ovalbumin peptide（OVA257-263; amino acid sequence: SIINFEKL;

Abbiotec, CA, USA）[170]を用いた。これらペプチドの精製度は>90 %である。

B16F1 細胞、抗原ペプチドを抗原とする再刺激は 5 日間行い、培養中は 2 日おきに半分量の培地交換を行った。共培養により 5 日間再刺激を行った後に、培養上清を回収し、Mouse IFN-γ ELISA kit（Thermo Fisher Scientific, IL, USA）により培養上清中に含まれる IFN-γ の定量を行った。操作はキットのプロトコールに従って行った。

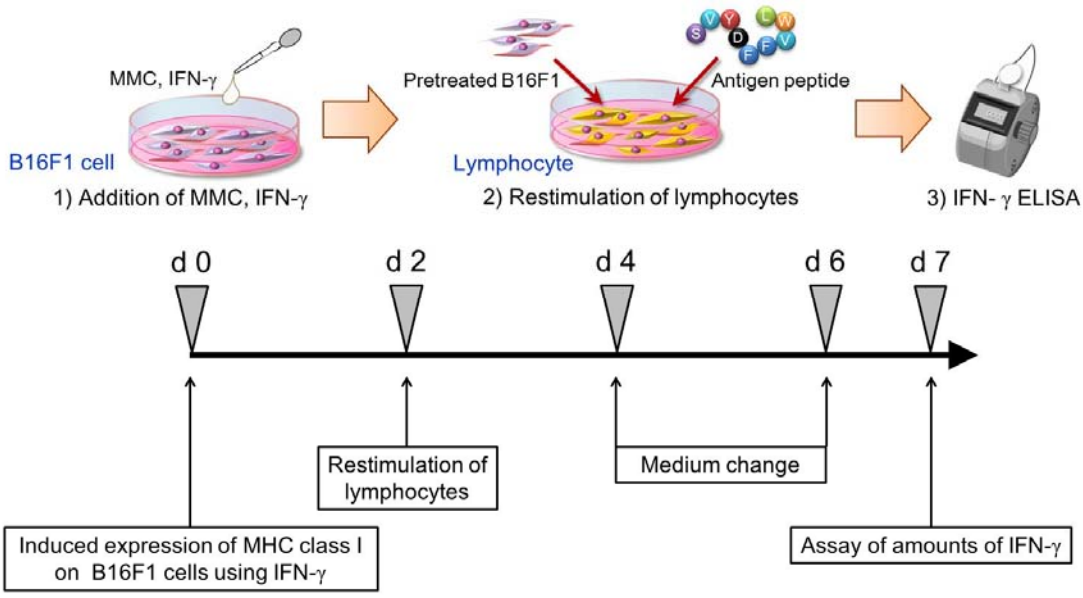

Fig. 40 Scheme of assay of amounts of IFN-γ in culture supernatants.

5.3.3 実験結果と考察

5.3.3.1 腫瘍浸潤リンパ球の TCR Vβ レパトワ解析

NPrCAP/M を利用した CTI 療法により、鼠径部流入領域リンパ節において $CD8^+$T 細胞数の増加を確認することができたため、免疫誘導された $CD8^+$T 細胞の特性を調べるために、腫瘍組織、鼠径部リンパ節内の T 細胞の TCR Vβ ファミリーのレパトワ解析を行った（Fig. 41）。ナイーブマウスの鼠径部リンパ節では、*Vβ20* 遺伝子を除くすべての TCR Vβ ファミリーの遺伝子発現を確認した（20/21 Vβ ファミリー; Fig. 41A）。無治療担がんマウスの鼠径部リンパ節においても、ほぼ全ての TCR Vβ ファミリーの遺伝子発現を確認した（19/21 Vβ ファミリー; Fig. 41B）。しかしながら、無治療担がんマウスの腫瘍組織内には、*TCR* 遺伝子の発現は観察されなかったことから（data not shown）、温熱療法を施さなければ腫瘍組織内にリンパ球はほとんど浸潤してこないと考えられる。一方で、NPrCAP/M を利用した CTI 療法を施したマウスの流入領域リンパ節において、$CD8^+$T 細胞の TCR Vβ ファミリーの遺伝子発現は若干限定された（15/21 Vβ ファミリー; Fig. 41C）。さらに、CTI 療法を施したマウスの腫瘍組織では、TCR Vβ ファミリーの遺伝子発現はさらに限定され、TCR Vβ5、Vβ8.3、Vβ11 をもつ $CD8^+$T 細胞が存在していることが分かった（Fig. 41D）。以上の結果より、CTI 療法により活性化された $CD8^+$T 細胞は、マウスメラノーマを特異的に攻撃するためにオリゴクローナルに増殖していることが示唆された。

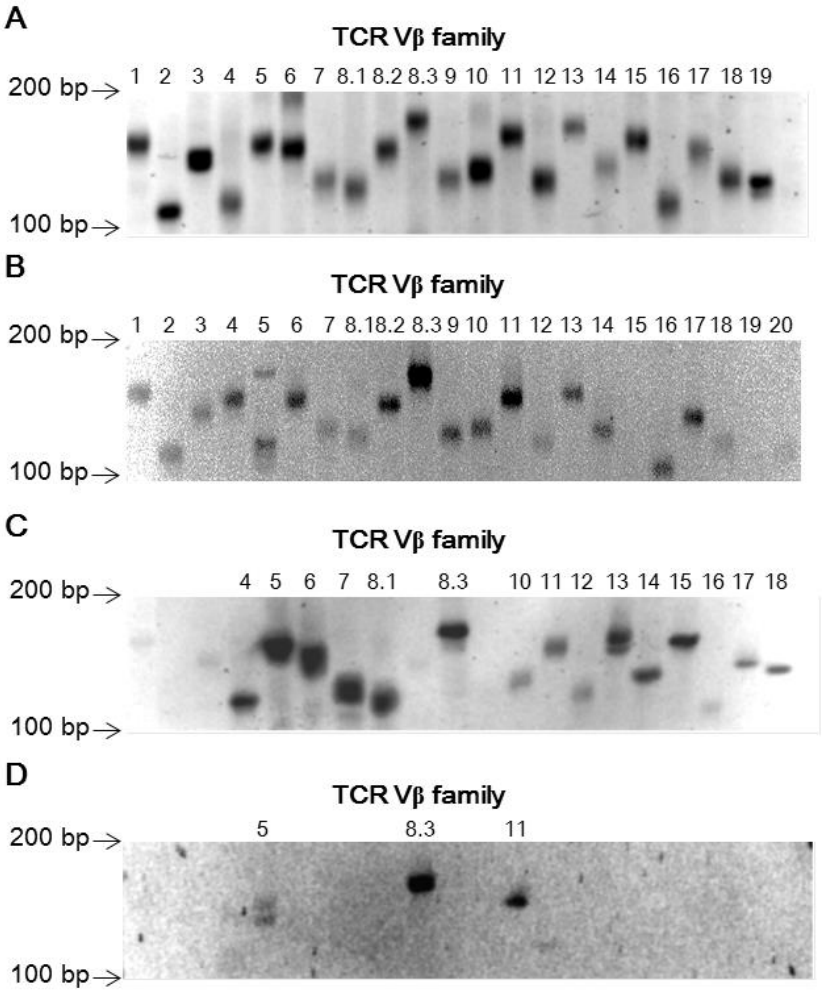

Fig. 41 TCR β-chain gene expression in TILs after NPrCAP/M-mediated hyperthermia. Analysis of each specimen included 22 separate electrophoreses of DNA amplified with different primer sets of each TCR Vβ family gene-specific oligonucleotides. Representative results from Vβ amplifications of T cells in single mice are shown. (A) Inguinal lymph node from naive mouse. (B) Inguinal DLN from non-treated tumor-bearing mice. (C) Inguinal DLN from the mice treated with hyperthermia. (D) Tumor from the mice treated with hyperthermia. The TCR Vβ family number is shown above each lane where bands were observed [147].

5.3.3.2 腫瘍浸潤リンパ球の TCR Vβ 遺伝子配列解析

TCR を介した T 細胞の抗原認識の多様性形成において、VDJ 領域の遺伝子配列が最も重要であると考えられているため、NPrCAP/M を利用した CTI 療法を施した担がんマウスの TIL の VDJ 領域の遺伝子配列を解析した（Fig. 42）。遺伝子配列を解析するために、CTI 療法開始から 14 日後の担がんマウスから腫瘍

を回収し、解析したところ、PCR 産物から Vβ6 のクローンを 1 つ、Vβ8.2 のクローンを 5 つ、Vβ11 のクローンを 6 つ採取した。採取したクローンの遺伝子配列解析の結果、5 つ全ての TCR Vβ8.2 のクローンは同一の遺伝子配列を有していた（Fig. 42B）。一方、TCR Vβ11 の遺伝子配列解析の結果、採取した TCR Vβ11 は、Jβ2-3、Jβ2-7 の異なる二つの *Jβ* 遺伝子、さらに、異なる三つの N-Dβ-N 領域で構成されていた（Fig. 42C）。これらの結果より、TCR Vβ11^{+}T 細胞は流入領域リンパ節でオリゴクローナルに増幅し、腫瘍組織に浸潤していることが示唆され、マウスメラノーマを治療するためには TCR Vβ11^{+}T 細胞を利用することが重要であると考えられる。

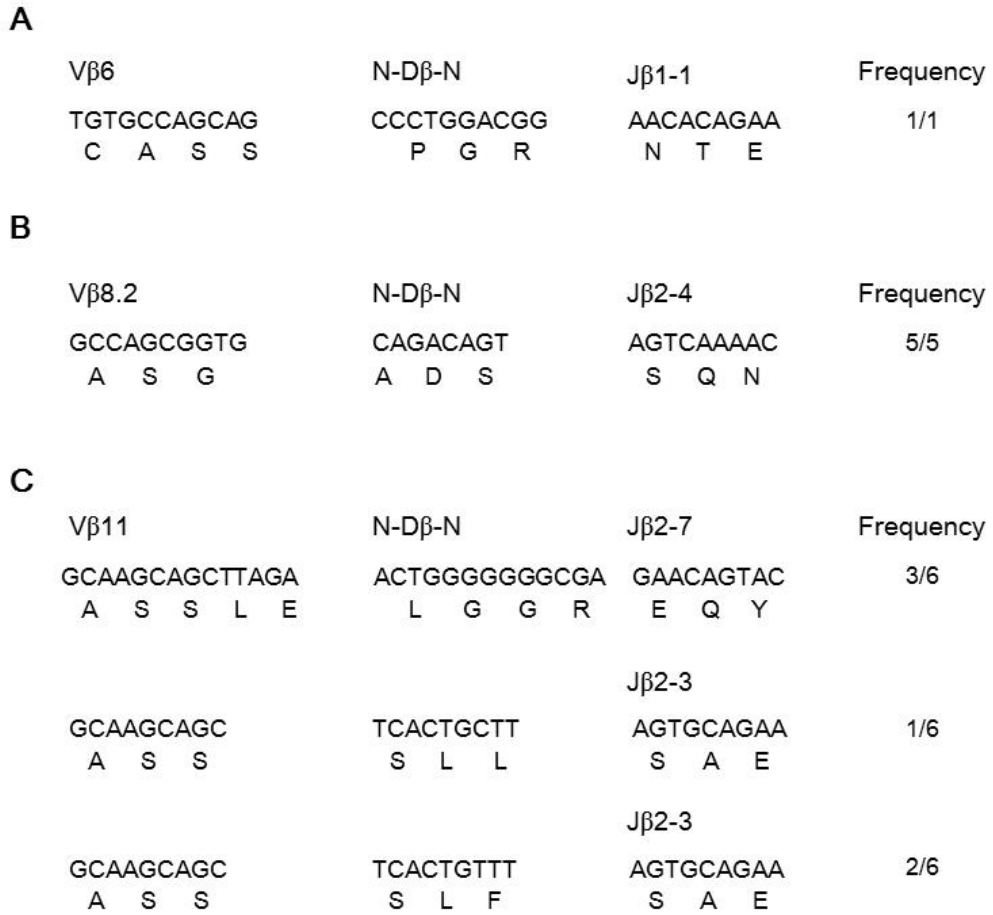

Fig. 42 TCR β junctional sequences from TILs in the mice treated with NPrCAP/M-mediated hyperthermia. (A-C) Nucleotide and predicted amino acid sequence from V(D)J regions of *TCR Vβ6* (A), *Vβ8.2* (B) and *Vβ11* (C). Tumor samples from five mice were mixed and analyzed. The amplified PCR products of TCR Vβ gene were cloned into the plasmid vector. Six or as many as possible randomly picked colonies were analyzed, and the plasmid DNA from the positive colonies was sequenced [147].

5.3.3.3 メラノーマ関連抗原に対する腫瘍浸潤リンパ球の反応性評価

RT-PCR による *TCR Vβ11* 遺伝子の定性分析から、マウスメラノーマを認識し、攻撃するために TCR Vβ11^{+}T 細胞がオリゴクローナルに増幅し、腫瘍組織へ浸潤していることが示唆されたため、ナイーブマウスと CTI 療法を施したマウスの鼠蹊部リンパ節から採取した TCR Vβ11^{+}T 細胞の数を定量し、比較した（Fig. 43A-C）。その結果、ナイーブマウスと比較して CTI 療法を施したマウスにおいて CD8^{+}/TCR Vβ11^{+}T 細胞の有意な増加を確認した。Harada, M.らが樹立した B16 メラノーマを特異的に認識する CD8^{+}T 細胞株 AB1 細胞においても *TCR Vβ11* 遺伝子が発現していることが報告されており[171]、マウスメラノーマを認識して腫瘍組織に浸潤しているリンパ球の多くが *TCR Vβ11* 遺伝子を発現していると考えられる。これらの結果より、所属リンパ節に存在する CD8+T 細胞の多くが *TCR Vβ11* 遺伝子を発現しているかを観察することにより、観察されるオリゴクローナルな増幅は CD8+T 細胞がマウスメラノーマを認識していることに起因しているか評価可能であることが示された。

次に、TCR Vβ11^{+}T 細胞がメラノーマ関連抗原ペプチドにより活性化されるかを調べるために、腫瘍抗原特異的な IFN-γ 産生量を測定した（Fig. 43D）。治療開始から 14 日後の鼠径部流入領域リンパ節から採取したリンパ球を、マイトマイシン C 処理を施した B16F1 細胞またはマウスメラノーマ関連抗原である免疫優性ペプチド TRP-1、TRP-2、gp100 と共培養することにより再刺激を与えた。共培養後の培地上清を用いた ELISA の結果、TRP-2 ペプチドによる再刺激を与えた場合のみリンパ球が著しく IFN-γ を分泌していることが分かり、CTI 療法により誘導され腫瘍に浸潤しているリンパ球が TRP-2 抗原を特異的に認識していることが示唆された。Harada, M.らが樹立した AB1 細胞は B16 メラノーマ細胞と同様に TRP-2 ペプチドを抗原として認識していることが報告されている[171]。さらに、Singh, V.らが樹立した TRP-2 ペプチドを特異的に認識する CD8^{+}T 細胞

株は、*TCR Vβ11* 遺伝子を発現していることが報告されている[172]。これらの知見と得られた結果から、TCR Vβ11^{+}T 細胞を用いた養子免疫治療法や、TRP-2 ペプチドワクチン治療法を併用することにより、NPrCAP/M を利用した CTI 療法により誘導される抗腫瘍免疫をさらに賦活することが可能になると考えられる。

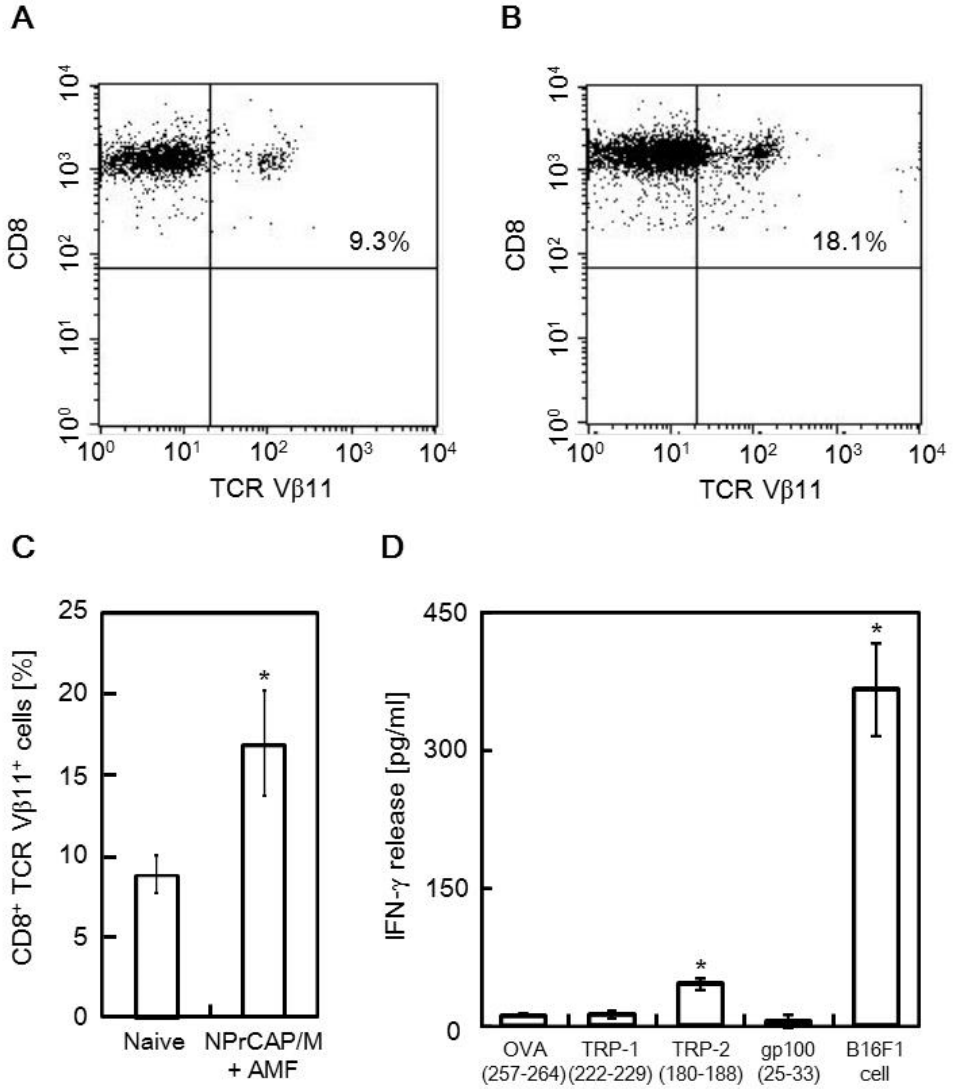

Fig. 43 T-cell response in the mice treated with NPrCAP/M-mediated hyperthermia. (A-C) Flow cytometric analysis of CD8^{+}/TCR Vβ11^{+} T cells in an inguinal lymph node of a naive mouse (A) and in an inguinal DLN of a mouse treated with NPrCAP/M-mediated hyperthermia (B). CD8^{+} T cells in the lymph node were purified by the magnetic cell sorting, and the representative data from single mice (A and B) and five mice for statistical analysis (C) are shown. Data are the means and SDs. (D) T-cell response to melanoma-associated antigen peptides. After the hyperthermia treatment, DLNs from five mice were harvested on day 17, and lymphocytes were then restimulated *in vitro* with antigen peptides or mitomycin-treated B16F1 cells for 5 days. $OVA_{257\text{-}264}$ peptide was used as a negative control. After the restimulation, culture supernatants were collected and amounts of IFN-γ were measured by ELISA. Data are the means and SDs of triplicate experiments. $^{*}P < 0.01$ [147].

5.4.4 本節のまとめ

本節において、腫瘍組織、鼠径部リンパ節内の T 細胞の TCR Vβ ファミリーのレパトワ解析を行ったところ、TCR Vβ11^{+}T 細胞がマウスメラノーマを治療する上で重要なツールとなることがわかった。さらに、採取した TCR Vβ11 のクローンの遺伝子配列解析を行い、3 種類の遺伝子配列を得た。そして、B16 メラノーマ特異的な抗原ペプチドとして TRP-2 ペプチドが有用であることが示唆された。今後は取得した遺伝子配列を利用して人工 CTL の作製に着手したいと考えている。

5.5 本章のまとめ

本章ではまず、NPrCAP/M を利用した CTI 療法をメラノーマ担がんマウスモデルに施すことにより、有意に腫瘍体積を退縮可能であることを示した。さらに、CTI 療法後の鼠径部流入領域リンパ節において、CD8^{+}T 細胞の増加によるリンパ節の肥大化が観察され、CTI 療法により抗腫瘍免疫が誘導されることがわかった。そして、鼠径部流入領域リンパ節内、および腫瘍組織に浸潤している T 細胞の TCR Vβ ファミリーのレパトワ解析結果により、マウスメラノーマを攻撃するために TCR Vβ11^{+}T 細胞がオリゴクローナルに増幅し、腫瘍組織に浸潤していることが示唆された。また、免疫誘導された CD8^{+}T 細胞は TRP-2 ペプチドにより活性化されることも分かった。以上の結果より、CTI 療法により誘導された抗腫瘍免疫を賦活することを目的として、CTI 療法に人工 CTL を利用した *TCR* 遺伝子療法、メラノーマ抗原ペプチドを利用したワクチン療法を組み合わせた治療法を開発することの有用性が示された。この治療法は抗腫瘍免疫を誘導できることが最大の利点であり、原発がんを治療した後に再発・転移がんの根絶も可能になると考えられる。また、本研究の手法では、「CTI 療法後に免疫誘導された TIL」の CDR3 領域の解析結果を基に人工 CTL を作製、および抗原ペプチドを同定するため、患者一人ひとりに高い抗腫瘍効果を提供で

きる個別化医療を開発することが可能となる。これまでの研究で、腹腔注射により NPrCAP/M をメラノーマへ送達することに成功しているが、細網内皮系により肝臓や脾臓へも取り込まれてしまうことが分かっている[113, 147]。本章で標的としたマウスメラノーマは表在性腫瘍であるので NPrCAP/M の投与が容易であったが、今後、直接注入が困難ながんへ応用するためにはより高度な腫瘍標的性を獲得する必要がある。

第 6 章　総括

6.1 本論文のまとめ

磁性ナノ粒子と交番磁場を利用した温熱療法後に誘導される抗腫瘍免疫を賦活する治療法を開発することができれば、がんを「不知の病」たらしめている再発・転移がんを身体に備わる免疫系により治療可能な画期的ながん治療と成り得る。抗腫瘍免疫を賦活する手段として、T 細胞の増殖・分化を誘導するサイトカインなどの治療遺伝子を用いることが最適であると考えられるが、これら遺伝子の生体内発現における副作用の低減を達成しなければならない。したがって、温熱療法と遺伝子療法の課題である局所性を克服するシステムを開発することが重要である。そこで、本研究ではまず、機能性磁性ナノ粒子と交番磁場を利用した温熱療法による加温を起因として目的遺伝子を大量発現させる温熱誘導型遺伝子発現システムの開発を行った。そして、温熱療法後の抗腫瘍免疫を温熱誘導型遺伝子発現システムによりさらに賦活するために、誘導された抗腫瘍免疫のエフェクター細胞である CTL の特性を調べた。

第 1 章では、本研究の背景、目的を示し、本研究の方針について説明した。

第 2 章では、本研究の関連分野の既往の研究を紹介し、本研究の意義について説明した。

第 3 章では、加温をスイッチとして目的遺伝子を大量発現する温熱誘導型遺伝子発現システムの開発を試みた。まず、目的遺伝子発現プラスミドベクターと tTA 発現プラスミドベクターを作製後、*LacZ* 遺伝子を用いたレポーターアッセイを行った結果、加温をスイッチとして目的遺伝子が発現し、tTA による発現量の増強が観察できた。さらに、機能性の向上を目的として One-pack システ

ムを開発した。この One-pack システムは、ウイルスプロモーターを利用した構成的遺伝子発現システムに匹敵する活性を示した。次に、One-pack システムを利用したがん治療応用への検討では、加温と tTA による治療遺伝子 *HSV-tk* および *TNF-α* の発現増強により強くがん細胞の増殖が抑制され、温熱療法と遺伝子療法の併用効果が示された。

第 4 章では、機能性磁性ナノ粒子 MCL と交番磁場を利用して、第 3 章で開発した遺伝子発現システムを磁場誘導型遺伝子発現システムへ発展させた。まず *in vitro* において、磁場照射の加温により HSP70B'プロモーターが駆動し、tTA により目的遺伝子の発現が増強されることを示した。担がんマウスを用いた動物実験においても、腫瘍組織特異的に加温可能であり、磁場照射により目的遺伝子の発現を制御可能であることを示した。また、磁場照射による温熱療法後の腫瘍体積を経時的に観察したところ、30 日間強く腫瘍組織の増大を抑制できた。さらに、磁場照射を行わなかった条件では、目的遺伝子の発現は誘導されなかったことから、開発した磁場誘導型遺伝子発現システムは磁場照射により目的遺伝子の発現を厳密に制御可能であることが示された。以上の結果より、磁場誘導型遺伝子発現システムは、温熱療法により誘導された抗腫瘍免疫を賦活する治療法を開発する上で有用なツールとなると考えられる。

第 5 章では、機能性磁性ナノ粒子 NPrCAP/M と交番磁場を利用して、温熱療法後に誘導される抗腫瘍免疫のメカニズム解析を行った。まず、治療から 14 日後のマウスを観察したところ、腫瘍組織の退縮、腫瘍流入領域リンパ節内における $CD8^+$T 細胞の増加がみられ、温熱療法により抗腫瘍免疫が誘導されたことが示唆された。そして、腫瘍組織、腫瘍流入領域リンパ節に浸潤してきた $CD8^+$T 細胞の TCR のレパトワ解析を行うことで、腫瘍を特異的に認識して攻撃している CTL の質的解析を行った。その結果、CTI 療法により誘導され腫瘍組織に浸潤している CTL の多くが *TCR Vβ11* 遺伝子を発現していることが示された。そ

して、抗腫瘍免疫をさらに賦活することを目的として、腫瘍流入領域リンパ節に浸潤してきた $CD8^+$T 細胞を活性化させる抗原ペプチドの探索を行ったところ、TRP-2 ペプチドが有用であることが分かった。以上の結果より、CTI 療法に人工 CTL を利用した *TCR* 遺伝子療法、メラノーマ抗原ペプチドを利用したワクチン療法を組み合わせることにより、CTI 療法により誘導された抗腫瘍免疫をさらに賦活することが可能となり、再発・転移がんをも治療可能な理想的ながん治療法の開発が可能となると考えられる。

6.2 今後の展望

本研究では、磁性ナノ粒子と交番磁場を利用した温熱療法後に誘導される抗腫瘍免疫を賦活する新規がん治療法の開発を目指し、第 3 章および第 4 章において「温熱誘導型遺伝子発現システムの開発」、第 5 章において「腫瘍浸潤リンパ球の解析」および「抗原ペプチドの解析」を並行して研究を行った。今後は、これらの研究成果を工学的発想により一体化した効率的な新規がん治療法の開発を試みる。

上記の目的を達成するために、「腫瘍標的性」「磁性ナノ粒子」「温熱誘導型遺伝子発現ベクター」の特性をすべて含有したバイオナノマテリアルを開発することが有益であると考えられる。具体的には、カチオニックリポソームで包埋した磁性ナノ粒子とプラスミドベクターを静電的に結合させ、ベクター結合型 MCL を作製する。温熱誘導型遺伝子発現ベクターにより発現させる治療遺伝子は、T 細胞の増殖・分化を促す IL-2、IL-12、IFN-γ をまず使用し、治療効果を確認する。そして、ベクター結合型 MCL のリポソーム表面にリンカーを用いて腫瘍特異的抗体を結合させることにより、抗腫瘍免疫を賦活するためのバイオナノマテリアルへと発展させる。生体内に投与されたバイオナノマテリアルは、結合させた腫瘍特異的抗体によって腫瘍組織特異的に接着し、静電相互作用により磁性ナノ粒子と共にプラスミドベクターをがん細胞に取り込ませる

ことが可能である。その後、交番磁場照射による磁性ナノ粒子の発熱をスイッチとして治療遺伝子を発現させ、温熱療法と遺伝子療法の相乗効果を狙う。磁性ナノ粒子に結合させるプラスミドベクター搭載量や抗体量、および遺伝子導入効率を評価することにより最適条件を調べる。

次に、温熱療法により誘導された抗腫瘍免疫をさらに賦活するために、治療後の患者の腫瘍組織から TIL を単離して、*TCR Vβ* 遺伝子配列の解析、抗原ペプチドの同定を行う。*TCR Vβ* 遺伝子配列の解析結果を基に、*TCR* 遺伝子をクローニングし、レトロウイルスベクターを用いて TIL に *TCR* 遺伝子を導入し、人工 CTL の作製を試みる。その後、IL-2 および IFN-γ を培地中に添加することによって抗原特異性を維持したまま大量培養する。同定した抗原ペプチドを生体内に投与することにより、腫瘍組織に浸潤してきた $CD8^{+}$T 細胞を活性化し、腫瘍特異的な強力な抗腫瘍免疫が誘導される。この抗腫瘍免疫のエフェクター細胞は CTL であるが､内在性 CTL と生体内に投与した人工 CTL の併用効果により、さらなる抗腫瘍効果の増強が期待される。

以上のように、温熱療法により誘導される抗腫瘍免疫をさらに効率的に賦活することで、がんを「不知の病」たらしめている再発・転移がんの根治も視野に入れることができ、さらに外部刺激により治療遺伝子の発現を厳密に制御可能であるため副作用の低減と強力な抗腫瘍免疫を達成可能な未だかつてないがん治療法を確立できると考えられる。

参考文献

1. Dewhirst, M.W., Prosnitz, L., Thrall, D., Prescott, D., Clegg, S., Charles, C., MacFall, J., Rosner, G., Samulski, T., Gillette, E., LaRue, S. Hyperthermic treatment of malignant diseases: current status and a view toward the future. *Semin Oncol.* 24(6), 616-625, 1997
2. van der Zee J. Heating the patient: a promising approach? *Ann Oncol.* 13(8), 1173-1184, 2002
3. Sherar, M., Liu, F. F., Pintilie, M., Levin, W., Hunt, J., Hill, R., Hand, J., Vernon, C., van Rhoon, G., van der Zee, J., Gonzalez, D. G., van Dijk, J., Whaley, J., Machin, D. Relationship between thermal dose and outcome in thermoradiotherapy treatments for superficial recurrences of breast cancer: data from a phase III trial. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 39(2), 371-380, 1997
4. Hildebrandt, B., Wust, P., Rau, B., Schlag, P., Riess, H. Regional hyperthermia for rectal cancer. *Lancet.* 356(9231), 771-772, 2000
5. Wust, P., Hildebrandt, B., Sreenivasa, G., Rau, B., Gellermann, J., Riess, H., Felix, R., Schlag, PM. Hyperthermia in combined treatment of cancer. *Lancet Oncol.* 3(8), 487-497, 2002
6. Shecterle, L. M., St Cyr, J. A. Whole body hyperthermia as a potential therapeutic option. *Cancer Biother.* 10(4), 253-256, 1995
7. Storm, F. K., Morton, D.L., Kaiser, L. R., Harrison, W. H., Elliott, R. S., Weisenburger, T. H., Parker, R. G., Haskell, C. M. Clinical radiofrequency hyperthermia: a review. *Natl Cancer Inst Monogr.* 61, 343-350, 1982
8. Kobayashi, T. Cancer hyperthermia using magnetic nanoparticles. *Biotechnol J.* 6(11), 1342-1347, 2011
9. Jordan, A., Wust, P., Fähling, H., John, W., Hinz, A., Felix, R. Inductive heating of ferrimagnetic particles and magnetic fluids: physical evaluation of their

potential for hyperthermia. *Int J Hyperthermia.* 9(1), 51-68, 1993

10. Ito, A., Shinkai, M., Honda, H., Kobayashi, T. Medical application of functionalized magnetic nanoparticles. *J Biosci Bioeng.* 100(1), 1-11, 2005.
11. Pala, K., Serwotka, A., Jeleń, F., Jakimowicz, P., Otlewski, J. Tumor-specific hyperthermia with aptamer-tagged superparamagnetic nanoparticles. *Int J Nanomedicine.* 9, 67-76, 2014
12. Ito, A., Kuga, Y., Honda, H., Kikkawa, H., Horiuchi, A., Watanabe, Y., Kobayashi, T. Magnetite nanoparticle-loaded anti-HER2 immunoliposomes for combination of antibody therapy with hyperthermia. *Cancer Lett.* 212(2), 167-175, 2004
13. Cole, A. J., Yang, V. C., David, A. E. Cancer theranostics: the rise of targeted magnetic nanoparticles. *Trends Biotechnol.* 29(7), 323-332, 2011
14. Kawai, N., Ito, A., Nakahara, Y., Honda, H., Kobayashi, T., Futakuchi, M., Shirai, T., Tozawa, K., Kohri, K. Complete regression of experimental prostate cancer in nude mice by repeated hyperthermia using magnetite cationic liposomes and a newly developed solenoid containing a ferrite core. *Prostate.* 66(7), 718-727, 2006
15. Gneveckow, U., Jordan, A., Scholz, R., Brüss, V., Waldöfner, N., Ricke, J., Feussner, A., Hildebrandt, B., Rau, B., Wust, P. Description and characterization of the novel hyperthermia- and thermoablation-system MFH 300F for clinical magnetic fluid hyperthermia. *Med Phys.* 31(6), 1444-1451, 2004
16. Ito, A., Kobayashi, T. Intracellular hyperthermia using magnetic nanoparticles: A novel method for hyperthermia clinical applications. *Thermal Medicine. 24*, 113−129, 2008
17. Blaese, R. M., Culver, K. W., Miller, A. D., Carter, C. S., Fleisher, T., Clerici, M., Shearer, G., Chang, L., Chiang, Y., Tolstoshev, P., Greenblatt, J. J., Rosenberg, S. A., Klein, H., Berger, M., Mullen, C. A., Ramsey, W. J., Muul, L., Morgan, R. A., Anderson, W. F. T lymphocyte-directed gene therapy for ADA- SCID: initial trial results after 4 years. *Science.* 270(5235), 475-480, 1995

18. Edelstein, M. L., Abedi, M. R., Wixon, J., Edelstein, R. M. Gene therapy clinical trials worldwide 1989-2004-an overview. *J Gene Med.* 6(6), 597-602, 2004
19. Edelstein, M. L., Abedi, M. R., Wixon, J. Gene therapy clinical trials worldwide to 2007--an update. *J Gene Med.* 9(10), 833-842, 2007
20. Ginn, S. L., Alexander, I. E., Edelstein, M. L., Abedi, M. R., Wixon, J. Gene therapy clinical trials worldwide to 2012 - an update. *J Gene Med.* 15(2), 65-77, 2013
21. Kazuki, Y., Hiratsuka, M., Takiguchi, M., Osaki, M., Kajitani, N., Hoshiya, H., Hiramatsu, K., Yoshino, T., Kazuki, K., Ishihara, C., Takehara, S., Higaki, K., Nakagawa, M., Takahashi, K., Yamanaka, S., Oshimura, M. Complete genetic correction of ips cells from Duchenne muscular dystrophy. *Mol Ther.* 18(2), 386-393, 2010
22. Walther, W., Stein, U. Cell type specific and inducible promoters for vectors in gene therapy as an approach for cell targeting. *J Mol Med.* 74(7), 379-392, 1996
23. Miller, N., Whelan, J. Progress in transcriptionally targeted and regulatable vectors for genetic therapy. *Hum Gene Ther.* 8(7), 803-815, 1997
24. Varley, A. W., Munford, R. S. Physiologically responsive gene therapy. *Mol Med Today.* 4(10), 445-451, 1998
25. Hallahan, D. E., Mauceri, H. J., Seung, L. P., Dunphy, E. J., Wayne, J. D., Hanna, N. N., Toledano, A., Hellman, S., Kufe, D. W., Weichselbaum, R. R. Spatial and temporal control of gene therapy using ionizing radiation. *Nat Med.* 1(8), 786-791, 1995
26. Walther, W., Wendt, J., Stein, U. Employment of the mdr1 promoter for the chemotherapy-inducible expression of therapeutic genes in cancer gene therapy. *Gene Ther.* 4(6), 544-552, 1997
27. Siddiqui, F., Li, C. Y., Larue, S. M., Poulson, J. M., Avery, P. R., Pruitt, A. F., Zhang, X., Ullrich, R. L., Thrall, D. E., Dewhirst, M. W., Hauck, M. L. A phase I

trial of hyperthermia-induced interleukin-12 gene therapy in spontaneously arising feline soft tissue sarcomas. *Mol Cancer Ther.* 6(1), 380-389, 2007

28. Ito, A., Honda, H., Kobayashi, T. Cancer immunotherapy based on intracellular hyperthermia using magnetite nanoparticles: a novel concept of "heat-controlled necrosis" with heat shock protein expression. *Cancer Immunol Immunother.* 55(3), 320-328, 2006
29. Ito, A., Shinkai, M., Honda, H., Wakabayashi, T., Yoshida, J., Kobayashi, T. Augmentation of MHC class I antigen presentation via heat shock protein expression by hyperthermia. *Cancer Immunol Immunother.* 50(10), 515-522, 2001
30. Ito, A., Shinkai, M., Honda, H., Yoshikawa, K., Saga, S., Wakabayashi, T., Yoshida, J., Kobayashi, T. Heat shock protein 70 expression induces antitumor immunity during intracellular hyperthermia using magnetite nanoparticles. *Cancer Immunol Immunother.* 52(2), 80-88, 2003
31. Ito, A., Tanaka, K., Kondo, K., Shinkai, M., Honda, H., Matsumoto, K., Saida, T., Kobayashi, T. Tumor regression by combined immunotherapy and hyperthermia using magnetic nanoparticles in an experimental subcutaneous murine melanoma. *Cancer Sci.* 94(3), 308-313, 2003
32. Ito, A., Fujioka, M., Tanaka, K., Kobayashi, T., Honda, H. Screening of cytokines to enhance vaccine effects of heat shock protein 70-rich tumor cell lysate. *J Biosci Bioeng.* 100(1), 36-42, 2005
33. Kushida, S., Ohmae, H., Kamma, H., Totsuka, R., Matsumura, M., Takeuchi, A., Saiki, I., Yanagawa, T., Onizawa, K., Ishii, T., Ohn, T. Artificial cytokine storm combined with hyperthermia induces significant anti-tumor effect in mice inoculated with lewis lung carcinoma and B16 melanoma cells. *Int J Hyperthermia.* 22(8), 699-712, 2006
34. Noguchi, Y., Richards, E. C., Chen, Y. T., Old, L. J. Influence of interleukin 12 on p53 peptide vaccination against established Meth A sarcoma. *Proc Natl Acad Sci U*

S A. 92(6), 2219-2223, 1995

35. Leung, T. K., Rajendran, M. Y., Monfries, C., Hall, C., Lim, L. The human heat-shock protein family. Expression of a novel heat-inducible HSP70 (HSP70B') and isolation of its cDNA and genomic DNA. *Biochem J.* 267(1), 125-132, 1990
36. Wada, K., Taniguchi, A., Okano, T. Highly sensitive detection of cytotoxicity using a modified HSP70B' promoter. *Biotechnol Bioeng.* 97(4), 871-876, 2007
37. Gossen, M., Bujard, H. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89(12), 5547-5551, 1992
38. Jimbow, K., Takada, T., Osai, Y., Thomas, P. D., Sato, M., Sato, A., Kamiya, T., Ono, I., Tamura, Y., Sato, N., Miyamoto, A., Ito, A., Honda, H., Wakamatsu, K., Ito, S., Yamashita, T., Nakayama, E., Kobayashi, T. Melanogenesis exploitation and melanoma nanomedicine: utilization of melanogenesis substrate, NPrCAP for exploiting melanoma-targeting drug and its conjugation with magnetite nanoparticles for developing melanoma chemo-thermo-immunotherapy. *The Open Conference Proceedings Journal*. 2, 5-16, 2011
39. Davis, M. M., Bjorkman, P. J. T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature.* 334(6181), 395-402, 1988
40. 日本ハイパーサーミア学会. ハイパーサーミア　がん温熱療法ガイドブック. 毎日健康サロン, 2008
41. Bedwinek, J. M., Fineberg, B., Lee, J., Ocwieza, M. Analysis of failures following local treatment of isolated local-regional recurrence of breast cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 7(5), 581-585, 1981
42. Ben-Hur, E., Elkind, M. M., Bronk, B. V. Thermally enhanced radioresponse of cultured Chinese hamster cells: inhibition of repair of sublethal damage and enhancement of lethal damage. *Radiat Res.* 58(1), 38-51, 1974
43. Sakurai, H., Kitamoto, Y., Saitoh, J., Nonaka, T., Ishikawa, H., Kiyohara, H.,

Shioya, M., Fukushima, M., Akimoto, T., Hasegawa, M., Nakano, T. Attenuation of chronic thermotolerance by KNK437, a benzylidene lactam compound, enhances thermal radiosensitization in mild temperature hyperthermia combined with low dose-rate irradiation. *Int J Radiat Biol.* 81(9), 711-718, 2005

44. Song, C. W., Shakil, A., Osborn, J. L., Iwata, K. Tumour oxygenation is increased by hyperthermia at mild temperatures. *Int J Hyperthermia.* 12(3), 367-373, 1996
45. Westra, A., Dewey, W. C. Variation in sensitivity to heat shock during the cell-cycle of Chinese hamster cells in vitro. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med.* 19(5), 467-477, 1971
46. van der Zee, J., González González, D., van Rhoon, G. C., van Dijk, J. D., van Putten, W. L., Hart, A. A. Comparison of radiotherapy alone with radiotherapy plus hyperthermia in locally advanced pelvic tumours: a prospective, randomised, multicentre trial. Dutch Deep Hyperthermia Group. *Lancet.* 355(9210), 1119-1125, 2000
47. Song, C. W., Park, H. J., Lee, C. K., Griffin, R. Implications of increased tumor blood flow and oxygenation caused by mild temperature hyperthermia in tumor treatment. *Int J Hyperthermia.* 21(8), 761-767, 2005
48. Dahl, O. Interaction of hyperthermia and chemotherapy. *Recent Results Cancer Res.* 107, 157-169, 1988
49. Urano, M., Kuroda, M., Nishimura, Y. For the clinical application of thermochemotherapy given at mild temperatures. *Int J Hyperthermia.* 15(2), 79-107, 1999
50. Issels, R. D. Hyperthermia adds to chemotherapy. *Eur J Cancer.* 44(17), 2546-2554, 2008
51. Yatvin, M. B., Weinstein, J. N., Dennis, W. H., Blumenthal, R. Design of liposomes for enhanced local release of drugs by hyperthermia. *Science.* 202(4374), 1290-1293, 1978

52. Needham, D., Anyarambhatla, G., Kong, G., Dewhirst, M. W. A new temperature-sensitive liposome for use with mild hyperthermia: characterization and testing in a human tumor xenograft model. *Cancer Res.* 60(5), 1197-1201, 2000
53. Lindner, L. H., Eichhorn, M. E., Eibl, H., Teichert, N., Schmitt-Sody, M., Issels, R. D., Dellian, M. Novel temperature-sensitive liposomes with prolonged circulation time. *Clin Cancer Res.* 10(6), 2168-2178, 2004
54. Jones, E., Vujaskovic, Z., Dewhirst, M., et al. An update of the duke experience for thermally sensitive liposomes containing doxorubicin in combination with hyperthermia in breast cancer patients with chest wall recurrence (Abstract). In: 10th international congress of hyperthermic oncology, Munich, Germany; April 2008.
55. ClinicalTrials.gov [homepage on the Internet] Study of ThermoDox With Standardized Radiofrequency Ablation (RFA) for Treatment of Hepatocellular Carcinoma (HCC) (OPTIMA) Available from: http:// http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00617981
56. Asao, T., Sakurai, H., Harashima, K., Yamaguchi, S., Tsutsumi, S., Nonaka, T., Shioya, M., Nakano, T., Kuwano, H. The synchronization of chemotherapy to circadian rhythms and irradiation in pre-operative chemoradiation therapy with hyperthermia for local advanced rectal cancer. *Int J Hyperthermia.* 22(5), 399-406, 2006
57. Hulshof, M. C., Van Haaren, P. M., Van Lanschot, J. J., Richel, D. J., Fockens, P., Oldenborg, S., Geijsen, E. D., Van Berge Henegouwen, M. I., Crezee, J. Preoperative chemoradiation combined with regional hyperthermia for patients with resectable esophageal cancer. *Int J Hyperthermia.* 25(1), 79-85, 2009
58. Murata, S., Naito, H., Yamamoto, H., Yamaguchi, T., Miyake, T., Mekata, E., Shimizu, T., Shiomi, H., Naka, S., Sonoda, H., Mori, T., Akabori, H., Kawai, Y.,

Cho, H., Kubota, Y., Umeda, T., Endo, Y., Abe, H., Kurumi, Y., Tani, T. Hyperthermic intraperitoneal chemotherapy following gastrectomy for the prevention of carcinomatosis in advanced gastric cancer: Nonrandomized phase II prospective trial. *J Clin Oncol.* 30, suppl 4, abstr 116, 2012

59. Seretis, C., Youssef, H. Quality of life after cytoreductive surgery and intraoperative hyperthermic intraperitoneal chemotherapy for peritoneal surface malignancies: A systematic review. *Eur J Surg Oncol.* 40(12), 1605-1613, 2014
60. Jeffrey, S. S., Birdwell, R. L., Ikeda, D. M., Daniel, B. L., Nowels, K. W., Dirbas, F. M., Griffey, S. M. Radiofrequency ablation of breast cancer: first report of an emerging technology. *Arch Surg.* 134(10), 1064-1068, 1999
61. Navarra, G., Ayav, A., Weber, J. C., Jensen, S. L., Smadga, C., Nicholls, J. P., Habib, N. A., Jiao, L. R. Short- and-long term results of intraoperative radiofrequency ablation of liver metastases. *Int J Colorectal Dis.* 20(6), 521-528, 2005
62. Schweinfest, C. W., Jorcyk, C. L., Fujiwara, S., Papas, T. S. A heat-shock-inducible eukaryotic expression vector. *Gene.* 71(1), 207-210, 1988
63. Huang, Q., Hu, J. K., Lohr, F., Zhang, L., Braun, R., Lanzen, J., Little, J. B., Dewhirst, M. W., Li, C. Y. Heat-induced gene expression as a novel targeted cancer gene therapy strategy. *Cancer Res.* 60(13), 3435-3439, 2000
64. Walther, W., Arlt, F., Fichtner, I., Aumann, J., Stein, U., Schlag, P. M. Heat-inducible in vivo gene therapy of colon carcinoma by human mdr1 promoter-regulated tumor necrosis factor-alpha expression. *Mol Cancer Ther.* 6(1), 236-243, 2007
65. Lindquist, S. The heat-shock response. *Annu Rev Biochem.* 55, 1151-1191, 1986
66. Parsell, D. A., Lindquist, S. The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Annu Rev Genet.* 27, 437-496, 1993

67. Silver, J. T., Noble, E. G. Regulation of survival gene hsp70. *Cell Stress Chaperones.* 17(1), 1-9, 2012
68. Walther, W., Stein, U. Heat-responsive gene expression for gene therapy. 61(7-8), 641-649, 2009
69. Chu, B., Soncin, F., Price, B. D., Stevenson, M. A., Calderwood, S. K. Sequential phosphorylation by mitogen-activated protein kinase and glycogen synthase kinase 3 represses transcriptional activation by heat shock factor-1. *J Biol Chem.* 271(48), 30847-30857, 1996
70. Fuda, N. J., Ardehali, M. B., Lis, J. T. Defining mechanisms that regulate RNA polymerase II transcription in vivo. *Nature.* 461(7261), 186-192, 2009
71. Mason, P. B. Jr., Lis, J. T. Cooperative and competitive protein interactions at the hsp70 promoter. *J Biol Chem.* 272(52), 33227-33233, 1997
72. Ohnishi, K., Wang, X., Takahashi, A., Matsumoto, H., Aoki, H., Ohnishi, T. Effects of protein kinase inhibitors on heat-induced hsp72 gene expression in a human glioblastoma cell line. *Cell Signal.* 10(4), 259-264, 1998
73. Holmberg, C. I., Hietakangas, V., Mikhailov, A., Rantanen, J. O., Kallio, M., Meinander, A., Hellman, J., Morrice, N., MacKintosh, C., Morimoto, R. I., Eriksson, J. E., Sistonen, L. Phosphorylation of serine 230 promotes inducible transcriptional activity of heat shock factor 1. *EMBO J.* 20(14), 3800-3810, 2001
74. Morgan, W. D., Williams, G. T., Morimoto, R. I., Greene, J., Kingston, R. E., Tjian, R. Two transcriptional activators, CCAAT-box-binding transcription factor and heat shock transcription factor, interact with a human hsp70 gene promoter. *Mol Cell Biol.* 7(3), 1129-1138, 1987
75. Isomoto, H., Ohtsuru, A., Braiden, V., Iwamatsu, M., Miki, F., Kawashita, Y., Mizuta, Y., Kaneda, Y., Kohno, S., Yamashita, S. Heat-directed suicide gene therapy mediated by heat shock protein promoter for gastric cancer. *Oncol Rep.* 15(3), 629-635, 2006

76. Brade, A. M., Ngo, D., Szmitko, P., Li, P. X., Liu, F. F., Klamut, H. J. Heat-directed gene targeting of adenoviral vectors to tumor cells. *Cancer Gene Ther.* 7(12), 1566-1574, 2000
77. Emiliusen, L., Gough, M., Bateman, A., Ahmed, A., Voellmy, R., Chester, J., Diaz, R. M., Harrington, K., Vile, R. A transcriptional feedback loop for tissue-specific expression of highly cytotoxic genes which incorporates an immunostimulatory component. *Gene Ther.* 8(13), 987-998, 2001
78. Pirkkala, L., Nykänen, P., Sistonen, L. Roles of the heat shock transcription factors in regulation of the heat shock response and beyond. *FASEB J.* 15(7), 1118-1131, 2001
79. Siddiqui, F., Avery, P. R., Li, C. Y., Zhang, X., LaRue, S. M., Dewhirst, M. W., Ullrich, R. L. Induction of the human heat shock promoter HSP70B by nutritional stress: implications for cancer gene therapy. *Cancer Invest.* 26(6), 553-561, 2008
80. 藤原　大美. 腫瘍免疫学　第 2 版. 中外医学社. 2003
81. Ugel, S., Zoso, A., De Santo, C., Li, Y., Marigo, I., Zanovello, P., Scarselli, E., Cipriani, B., Oelke, M., Schneck, J. P., Bronte, V. In vivo administration of artificial antigen-presenting cells activates low-avidity T cells for treatment of cancer. *Cancer Res.* 69(24), 9376-9384, 2009
82. Kottke, T., Errington, F., Pulido, J., Galivo, F., Thompson, J., Wongthida, P., Diaz, R. M., Chong, H., Ilett, E., Chester, J., Pandha, H., Harrington, K., Selby, P., Melcher, A., Vile, R. Broad antigenic coverage induced by vaccination with virus-based cDNA libraries cures established tumors. *Nat Med.* 17(7), 854-859, 2011
83. Montagna, D., Turin, I., Schiavo, R., Montini, E., Zaffaroni, N., Villa, R., Secondino, S., Schiavetto, I., Caliogna, L., Locatelli, F., Libri, V., Pession, A., Tonelli, R., Maccario, R., Siena, S., Pedrazzoli, P. Feasibility and safety of adoptive immunotherapy with ex vivo-generated autologous, cytotoxic T

lymphocytes in patients with solid tumor. *Cytotherapy.* 14(1), 80-90. 2012

84. Garrido, F., Algarra, I., García-Lora, A. M. The escape of cancer from T lymphocytes: immunoselection of MHC class I loss variants harboring structural-irreversible "hard" lesions. *Cancer Immunol Immunother.* 59(10), 1601-1606, 2010
85. Yanase, M., Shinkai, M., Honda, H., Wakabayashi, T., Yoshida, J., Kobayashi, T. Antitumor immunity induction by intracellular hyperthermia using magnetite cationic liposomes. *Jpn J Cancer Res.* 89(7), 775-782, 1998
86. Shi, H., Cao, T., Connolly, J. E., Monnet, L., Bennett, L., Chapel, S., Bagnis, C., Mannoni, P., Davoust, J., Palucka, A. K., Banchereau, J. Hyperthermia enhances CTL cross-priming. *J Immunol.* 176(4), 2134-2141, 2006
87. Takahashi, T., Mitsuhashi, N., Sakurai, H., Niibe, H. Modifications of tumor-associated antigen expression on human lung cancer cells by hyperthermia and cytokine. *Anticancer Res.* 15(6B), 2601-2606, 1995
88. Basu, S., Binder, R. J., Ramalingam, T., Srivastava, P. K. CD91 is a common receptor for heat shock proteins gp96, hsp90, hsp70, and calreticulin. *Immunity.* 14(3), 303-313, 2001
89. Ridge, J. P., Di Rosa, F., Matzinger, P. A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T-helper and a T-killer cell. *Nature.* 393(6684), 474-478, 1998
90. Banchereau, J., Steinman, R. M. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature.* 392(6673), 245-252, 1998
91. Multhoff, G. Heat shock protein 70 (Hsp70): membrane location, export and immunological relevance. *Methods.* 43(3), 229-237, 2007
92. van Bruggen, I., Robertson, T. A., Papadimitriou, J. M. The effect of mild hyperthermia on the morphology and function of murine resident peritoneal macrophages. *Exp Mol Pathol.* 55(2), 119-134, 1991

93. Basu, S., Srivastava, P. K. Fever-like temperature induces maturation of dendritic cells through induction of hsp90. *Int Immunol.* 15(9), 1053-1061, 2003
94. Ostberg, J. R., Patel, R., Repasky, E. A. Regulation of immune activity by mild (fever-range) whole body hyperthermia: effects on epidermal Langerhans cells. *Cell Stress Chaperones.* 5(5), 458-461, 2000
95. Zheng, H., Benjamin, I. J., Basu, S., Li, Z. Heat shock factor 1-independent activation of dendritic cells by heat shock: implication for the uncoupling of heat-mediated immunoregulation from the heat shock response. *Eur J Immunol.* 33(6), 1754-1762, 2003
96. Ito, A., Matsuoka, F., Honda, H., Kobayashi, T. 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(1), 26-32, 2004
97. Ito, A., Matsuoka, F., Honda, H., Kobayashi, T. Heat shock protein 70 gene therapy combined with hyperthermia using magnetic nanoparticles. *Cancer Gene Ther.* 10(12), 918-925, 2003
98. Hunyadi, J., András, C., Szabó, I., Szántó, J., Szluha, K., Sipka, S., Kovács, P., Kiss, A., Szegedi, G., Altorjay, I., Sápy, P., Antal-Szalmás, P., Tóth, L., Fazekas, G., Rajnavölgyi, E. Autologous Dendritic Cell Based Adoptive Immunotherapy of Patients with Colorectal Cancer-A Phase I-II Study. *Pathol Oncol Res*. 20, 357-365, 2014
99. Matsumoto, K., Yamamoto, N., Hagiwara, S., Saito, M., Furue, H., Shigetomi, T., Narita, Y., Mitsudo, K., Tohnai, I., Kobayashi, T., Ueda, M. Optimization of hyperthermia and dendritic cell immunotherapy for squamous cell carcinoma. *Oncol Rep.* 25(6), 1525-1532, 2011
100. Ostberg, J. R., Repasky, E. A. Emerging evidence indicates that physiologically relevant thermal stress regulates dendritic cell function. *Cancer Immunol*

Immunother. 55(3), 292-298, 2006

101.Rosenberg, S. A., Spiess, P., Lafreniere, R. A new approach to the adoptive immunotherapy of cancer with tumor-infiltrating lymphocytes. *Science.* 233(4770), 1318-1321, 1986

102.Okamoto, S., Mineno, J., Ikeda, H., Fujiwara, H., Yasukawa, M., Shiku, H., Kato, I. Improved expression and reactivity of transduced tumor-specific TCRs in human lymphocytes by specific silencing of endogenous TCR. *Cancer Res.* 69(23), 9003-9011, 2009

103.Ochi, T., Fujiwara, H., Okamoto, S., An, J., Nagai, K., Shirakata, T., Mineno, J., Kuzushima, K., Shiku, H., Yasukawa, M. Novel adoptive T-cell immunotherapy using a WT1-specific TCR vector encoding silencers for endogenous TCRs shows marked antileukemia reactivity and safety. *Blood.* 118(6), 1495-1503, 2011

104.Herrmann, I. K., Urner, M., Koehler, F. M., Hasler, M., Roth-Z'graggen, B., Grass, R. N., Ziegler, U., Beck-Schimmer, B., Stark, W. J. Blood purification using functionalized core/shell nanomagnets. *Small.* 6(13), 1388-1392, 2010

105.Scherer, F., Anton, M., Schillinger, U., Henke, J., Bergemann, C., Krüger, A., Gänsbacher, B., Plank, C. Magnetofection: enhancing and targeting gene delivery by magnetic force in vitro and in vivo. *Gene Ther.* 9(2), 102-109, 2002

106.Winter, P. M., Caruthers, S. D., Kassner, A., Harris, T. D., Chinen, L. K., Allen, J. S., Lacy, E. K., Zhang, H., Robertson, J. D., Wickline, S. A., Lanza, G. M. Molecular imaging of angiogenesis in nascent Vx-2 rabbit tumors using a novel alpha(nu)beta3-targeted nanoparticle and 1.5 tesla magnetic resonance imaging. *Cancer Res.* 63(18), 5838-5843, 2003

107.Guo, M., Que, C., Wang, C., Liu, X., Yan, H., Liu, K. Multifunctional superparamagnetic nanocarriers with folate-mediated and pH-responsive targeting properties for anticancer drug delivery. *Biomaterials.* 32(1), 185-194, 2011

108.Gordon, R. T., Hines, J. R., Gordon, D. Intracellular hyperthermia. A biophysical

approach to cancer treatment via intracellular temperature and biophysical alterations. *Med Hypotheses.* 5(1), 83-102, 1979

109.Ito, A., Tanaka, K., Honda, H., Abe, S., Yamaguchi, H., Kobayashi, T. Complete regression of mouse mammary carcinoma with a size greater than 15 mm by frequent repeated hyperthermia using magnetite nanoparticles. *J Biosci Bioeng.* 96(4), 364-369, 2003

110.Shinkai, M., Le, B., Honda, H., Yoshikawa, K., Shimizu, K., Saga, S., Wakabayashi, T., Yoshida, J., Kobayashi, T. Targeting hyperthermia for renal cell carcinoma using human MN antigen-specific magnetoliposomes. *Jpn J Cancer Res.* 92(10), 1138-1145, 2001

111.Kikumori, T., Kobayashi, T., Sawaki, M., Imai, T. Anti-cancer effect of hyperthermia on breast cancer by magnetite nanoparticle-loaded anti-HER2 immunoliposomes. *Breast Cancer Res Treat.* 113(3), 435-441, 2009

112.Balch, C. M., Gershenwald, J. E., Soong, S. J., Thompson, J. F., Atkins, M. B., Byrd, D. R., Buzaid, A. C., Cochran, A. J., Coit, D. G., Ding, S., Eggermont, A. M., Flaherty, K. T., Gimotty, P. A., Kirkwood, J. M., McMasters, K. M., Mihm, M. C. Jr., Morton, D. L., Ross, M. I., Sober, A. J., Sondak, V. K. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J Clin Oncol.* 27(36), 6199-6206, 2009

113.Sato, M., Yamashita, T., Ohkura, M., Osai, Y., Sato, A., Takada, T., Matsusaka, H., Ono, I., Tamura, Y., Sato, N., Sasaki, Y., Ito, A., Honda, H., Wakamatsu, K., Ito, S., Jimbow, K. N-propionyl-cysteaminylphenol-magnetite conjugate (NPrCAP/M) is a nanoparticle for the targeted growth suppression of melanoma cells. *J Invest Dermatol.* 129(9), 2233-2241, 2009

114.Thomas, P. D., Kishi, H., Cao, H., Ota, M., Yamashita, T., Singh, S., Jimbow, K. Selective incorporation and specific cytocidal effect as the cellular basis for the antimelanoma action of sulphur containing tyrosine analogs. *J Invest Dermatol.* 113(6), 928-934, 1999

115.Fan, C., Gao, W., Chen, Z., Fan, H., Li, M., Deng, F., Chen, Z. Tumor selectivity of stealth multi-functionalized superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Int J Pharm.* 404(1-2), 180-190, 2011

116.Reddy, J. A., Low, P. S. Folate-mediated targeting of therapeutic and imaging agents to cancers. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* 15(6), 587-627, 1988

117.Low, P. S., Antony, A. C. Folate receptor-targeted drugs for cancer and inflammatory diseases. *Adv Drug Deliv Rev.* 56(8), 1055-1058, 2004

118.Willett, C. G., Czito, B. G., Bendell, J. C., Ryan, D. P. Locally advanced pancreatic cancer. *J Clin Oncol.* 23(20), 4538-4544, 2005

119.Lee, G. Y., Qian, W. P., Wang, L., Wang, Y. A., Staley, C. A., Satpathy, M., Nie, S., Mao, H., Yang, L. Theranostic nanoparticles with controlled release of gemcitabine for targeted therapy and MRI of pancreatic cancer. *ACS Nano.* 7(3), 2078-2089, 2013

120.Tan, X., Egami, H., Nozawa, F., Abe, M., Baba, H. Analysis of the invasion-metastasis mechanism in pancreatic cancer: involvement of plasmin(ogen) cascade proteins in the invasion of pancreatic cancer cells. *Int J Oncol.* 28(2), 369-374, 2006

121.Chen, Y., Zheng, B., Robbins, D. H., Lewin, D. N., Mikhitarian, K., Graham, A., Rumpp, L., Glenn, T., Gillanders, W. E., Cole, D. J., Lu, X., Hoffman, B. J., Mitas, M. Accurate discrimination of pancreatic ductal adenocarcinoma and chronic pancreatitis using multimarker expression data and samples obtained by minimally invasive fine needle aspiration. *Int J Cancer.* 120(7), 1511-1517, 2007

122.Høyer-Hansen, G., Ploug, M., Behrendt, N., Rønne, E., Danø, K. Cell-surface acceleration of urokinase-catalyzed receptor cleavage. *Eur J Biochem.* 243(1-2), 21-26, 1997

123.Theil, E. C. Ferritin: structure, gene regulation, and cellular function in animals, plants, and microorganisms. *Annu Rev Biochem.* 56, 289-315, 1987

124.Kim, T., Moore, D., Fussenegger, M. Genetically programmed superparamagnetic behavior of mammalian cells. *J Biotechnol.* 162(2-3), 237-245, 2012

125.Fan, K., Cao, C., Pan, Y., Lu, D., Yang, D., Feng, J., Song, L., Liang, M., Yan, X. Magnetoferritin nanoparticles for targeting and visualizing tumour tissues. *Nat Nanotechnol.* 7(7), 459-464, 2012

126.Liang, M., Fan, K., Zhou, M., Duan, D., Zheng, J., Yang, D., Feng, J., Yan, X. H-ferritin-nanocaged doxorubicin nanoparticles specifically target and kill tumors with a single-dose injection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 111(41), 14900-14905, 2014

127.Bagwe, R. P., Hilliard, L. R., Tan, W. Surface modification of silica nanoparticles to reduce aggregation and nonspecific binding. 22(9), 4357-4362, 2006

128.Li, L., Fang, C. J., Ryan, J. C., Niemi, E. C., Lebrón, J. A., Björkman, P. J., Arase, H., Torti, F. M., Torti, S. V., Nakamura, M. C., Seaman, W. E. Binding and uptake of H-ferritin are mediated by human transferrin receptor-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107(8), 3505-3510, 2010

129.Daniels, T. R., Delgado, T., Rodriguez, J. A., Helguera, G., Penichet, M. L. The transferrin receptor part I: Biology and targeting with cytotoxic antibodies for the treatment of cancer. *Clin Immunol.* 121(2), 144-158, 2006

130.Uchida, M., Flenniken, M. L., Allen, M., Willits, D. A., Crowley, B. E., Brumfield, S., Willis, A. F., Jackiw, L., Jutila, M., Young, M. J., Douglas, T. Targeting of cancer cells with ferrimagnetic ferritin cage nanoparticles. *J Am Chem Soc.* 128(51), 16626-16633, 2006

131.Lu, T. K., Khalil, A. S., Collins, J. J. Next-generation synthetic gene networks. *Nat Biotechnol.* 27(12), 1139-1150, 2009

132.Brophy, J. A., Voigt, C. A. Principles of genetic circuit design. *Nat Methods.* 11(5), 508-520, 2014

133.Stieger, K., Belbellaa, B., Le Guiner, C., Moullier, P., Rolling, F. In vivo gene

regulation using tetracycline-regulatable systems. *Adv Drug Deliv Rev.* 61(7-8), 527-541, 2009

134.Yamaguchi, M., Ito, A., Okamoto, N., Kawabe, Y., Kamihira, M. Heat-inducible transgene expression system incorporating a positive feedback loop of transcriptional amplification for hyperthermia-induced gene therapy. *J Biosci Bioeng.* 114(4), 460-465, 2012

135.Ito, A., Okamoto, N., Yamaguchi, M., Kawabe, Y., Kamihira, M. Heat-inducible transgene expression with transcriptional amplification mediated by a transactivator. *Int J Hyperthermia.* 28(8), 788-798, 2012

136.寺森　正志. 合成プロモーターシステムを用いた組織特異的遺伝子大量発現法に関する研究. 九州大学大学院修士論文, 2008

137.Kamihira, M., Ono, K., Esaka, K., Nishijima, K., Kigaku, R., Komatsu, H., Yamashita, T., Kyogoku, K., Iijima, S. High-level expression of single-chain Fv-Fc fusion protein in serum and egg white of genetically manipulated chickens by using a retroviral vector. *J Virol.* 79(17), 10864-10874, 2005

138.沼田　健作. スギ花粉症治療用エピトープペプチドを生産する遺伝子導入ニワトリの作製. 九州大学大学院修士論文, 2010

139.Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., Klenk, D. C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* 150(1), 76-85, 1985

140.菅村　和夫, 宮園　浩平, 宮澤　恵二, 田中　伸幸. サイトカイン・増殖因子用語ライブラリー. 羊土社. 117-119, 2005

141.Huang, S., Kawabe, Y., Ito, A., Kamihira, M. Adeno-associated virus Rep-mediated targeting of integrase-defective retroviral vector DNA circles into human chromosome 19. *Biochem Biophys Res Commun.* 417(1), 78-83, 2012

142.McIntyre, C. C., Grill, W. M. Extracellular stimulation of central neurons:

influence of stimulus waveform and frequency on neuronal output. *J Neurophysiol.* 88(4), 1592-1604, 2002

143.Boyden, E. S., Zhang, F., Bamberg, E., Nagel, G., Deisseroth, K. Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nat Neurosci.* 8(9), 1263-1268, 2005

144.Stauffer, P. R., Cetas, T. C., Jones, R. C. Magnetic induction heating of ferromagnetic implants for inducing localized hyperthermia in deep-seated tumors. *IEEE Trans Biomed Eng.* 31(2), 235-251, 1984

145.Stanley, S. A., Gagner, J. E., Damanpour, S., Yoshida, M., Dordick, J. S., Friedman, J. M. Radio-wave heating of iron oxide nanoparticles can regulate plasma glucose in mice. *Science*. 336(6081), 604-608, 2012

146.Yamaguchi, M., Ito, A., Ono, A., Kawabe, Y., Kamihira, M. Heat-inducible gene expression system by applying alternating magnetic field to magnetic nanoparticles. *ACS Synth Biol.* 3(5), 273-279, 2014

147.Ito, A., Yamaguchi, M., Okamoto, N., Sanematsu, Y., Kawabe, Y., Wakamatsu, K., Ito, S., Honda, H., Kobayashi, T., Nakayama, E., Tamura, Y., Okura, M., Yamashita, T., Jimbow, K., Kamihira, M. T-cell receptor repertoires of tumor-infiltrating lymphocytes after hyperthermia using functionalized magnetite nanoparticles. *Nanomedicine (Lond).* 8(6), 891-902, 2013

148.Shinkai, M., Yanase, M., Honda, H., Wakabayashi, T., Yoshida, J., Kobayashi, T. Intracellular hyperthermia for cancer using magnetite cationic liposomes: in vitro study. *Jpn J Cancer Res.* 87(11), 1179-1183, 1996

149.Ito, A., Ino, K., Kobayashi, T., Honda, H. The effect of RGD peptide-conjugated magnetite cationic liposomes on cell growth and cell sheet harvesting. *Biomaterials.* 26(31), 6185-6193, 2005

150.Owen, C. S., Sykes, N. L. Magnetic labeling and cell sorting. *J Immunol Methods.* 73(1), 41-48, 1984

151.Bouhon, I. A., Ito, A., Shinkai, M., Honda, H., Kobayashi, T. Heat induction of reporter gene expression via the gadd153 promoter and its possible application to hyperthermia treatment of cancer. *Cytotechnology.* 33(1-3), 131-137, 2000

152.Yoshida, J., Mizuno, M., and Yagi, K. Secretion of human β-interferon into the cystic fluid of glioma transfected with the interferon Gene. *J. Clin. Biochem. Nutr. 11*, 123−128, 1991

153.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(9), 649-654, 2001

154.Ito, A., Kamihira, M. Tissue engineering using magnetite nanoparticles. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 104, 355-395, 2011

155.Le, B., Shinkai, M., Kitade, T., Honda, H., Yoshida, J., Wakabayashi, T., Kobayashi, T. Preparation of tumor-specific magnetoliposomes and their application for hyperthermia. *J Chem Eng Jpn.* 34, 66-72, 2001

156.Ito, A., Jitsunobu, H., Kawabe, Y., Kamihira, M. Construction of heterotypic cell sheets by magnetic force-based 3-D coculture of HepG2 and NIH3T3 cells. *J Biosci Bioeng.* 104(5), 371-378, 2007

157.Cho, M. H., Lee, E. J., Son, M., Lee, J. H., Yoo, D., Kim, J. W., Park, S. W., Shin, J. S., Cheon, J. A magnetic switch for the control of cell death signalling in in vitro and in vivo systems. *Nat Mater.* 11(12), 1038-1043, 2012

158.Tahara, H., Fujio, K., Araki, Y., Setoguchi, K., Misaki, Y., Kitamura, T., Yamamoto, K. Reconstitution of $CD8^+$ T cells by retroviral transfer of the TCR alpha beta-chain genes isolated from a clonally expanded P815-infiltrating lymphocyte. *J Immunol.* 171(4), 2154-2160, 2003

159.Bobisse, S., Rondina, M., Merlo, A., Tisato, V., Mandruzzato, S., Amendola, M., Naldini, L., Willemsen, R. A., Debets, R., Zanovello, P., Rosato, A. Reprogramming T lymphocytes for melanoma adoptive immunotherapy by T-cell

receptor gene transfer with lentiviral vectors. *Cancer Res.* 69(24), 9385-9394, 2009

160.Wu, F., Zhang, W., Shao, H., Bo, H., Shen, H., Li, J., Liu, Y., Wang, T., Ma, W., Huang, S. Human effector T cells derived from central memory cells rather than CD8(+)T cells modified by tumor-specific TCR gene transfer possess superior traits for adoptive immunotherapy. *Cancer Lett.* 339(2), 195-207, 2013

161.Sato, A., Tamura, Y., Sato, N., Yamashita, T., Takada, T., Sato, M., Osai, Y., Okura, M., Ono, I., Ito, A., Honda, H., Wakamatsu, K., Ito, S., Jimbow, K. Melanoma-targeted chemo-thermo-immuno (CTI)-therapy using N-propionyl-4-S-cysteaminylphenol-magnetite nanoparticles elicits CTL response via heat shock protein-peptide complex release. *Cancer Sci.* 101(9), 1939-1946, 2010

162.Harrell, M. I., Iritani, B. M., Ruddell, A. Lymph node mapping in the mouse. *J Immunol Methods.* 332(1-2), 170-174, 2008

163.Hindley, J. P., Ferreira, C., Jones, E., Lauder, S. N., Ladell, K., Wynn, K. K., Betts, G. J., Singh, Y., Price, D. A., Godkin, A. J., Dyson, J., Gallimore, A. Analysis of the T-cell receptor repertoires of tumor-infiltrating conventional and regulatory T cells reveals no evidence for conversion in carcinogen-induced tumors. *Cancer Res.* 71(3), 736-746, 2011

164.Takada, T., Yamashita, T., Sato, M., Sato, A., Ono, I., Tamura, Y., Sato, N., Miyamoto, A., Ito, A., Honda, H., Wakamatsu, K., Ito, S., Jimbow, K. Growth inhibition of re-challenge B16 melanoma transplant by conjugates of melanogenesis substrate and magnetite nanoparticles as the basis for developing melanoma-targeted chemo-thermo-immunotherapy. *J Biomed Biotechnol.* 457936, 2009

165.Suzuki, M., Shinkai, M., Honda, H., Kobayashi, T. Anticancer effect and immune induction by hyperthermia of malignant melanoma using magnetite cationic

liposomes. *Melanoma Res.* 13(2), 129-135, 2003

166.Böhm, W., Thoma, S., Leithäuser, F., Möller, P., Schirmbeck, R., Reimann, J. T cell-mediated, IFN-gamma-facilitated rejection of murine B16 melanomas. *J Immunol.* 161(2), 897-908, 1998

167.Dyall, R., Bowne, W. B., Weber, L. W., LeMaoult, J., Szabo, P., Moroi, Y., Piskun, G., Lewis, J. J., Houghton, A. N., Nikolić-Zugić, J. Heteroclitic immunization induces tumor immunity. *J Exp Med.* 188(9), 1553-1561, 1998

168.Bloom, M. B., Perry-Lalley, D., Robbins, P. F., Li, Y., el-Gamil, M., Rosenberg, S. A., Yang, J. C. Identification of tyrosinase-related protein 2 as a tumor rejection antigen for the B16 melanoma. *J Exp Med.* 185(3), 453-459, 1997

169.Zhai, Y., Yang, J. C., Spiess, P., Nishimura, M. I., Overwijk, W. W., Roberts, B., Restifo, N. P., Rosenberg, S. A. Cloning and characterization of the genes encoding the murine homologues of the human melanoma antigens MART1 and gp100. *J Immunother.* 20(1), 15-25, 1997

170.Rötzschke, O., Falk, K., Stevanović, S., Jung, G., Walden, P., Rammensee, H. G. Exact prediction of a natural T cell epitope. *Eur J Immunol.* 21(11), 2891-2894, 1991

171.Harada, M., Tamada, K., Abe, K., Li, T., Onoe, Y., Tada, H., Tatsugami, K., Ando, T., Kimura, G., Nomoto, K. Characterization of B16 melanoma-specific cytotoxic T lymphocytes. *Cancer Immunol Immunother.* 47(4), 198-204, 1998

172.Singh, V., Ji, Q., Feigenbaum, L., Leighty, R. M., Hurwitz, A.A. Melanoma progression despite infiltration by in vivo-primed TRP-2-specific T cells. *J Immunother.* 32(2), 129-139, 2009

略語一覧

APC	antigen presenting cell
CDR3	third complementarity-determining region
CMV	cytomegalovirus
CTI	chemo-thermo-immuno
CTL	cytotoxic T-lymphocyte
DC	dendritic cell
DLPC	dilauroylphosphatidyl-choline
DOPE	dioleoylphosphatidyl-ethanol-amine
Dox	doxycycline
GCV	ganciclovir
HSE	heat-shock element
HSF-1	heat shock transcription factor-1
HSP	heat shock protein
HSV-tk	herpes simplex virus thymidine kinase
IFN-γ	interferon-γ
MCL	magnetite cationic liposome
MHC	major histocompatibility complex
NPrCAP/M	*N*-Propionyl-4-*S*-Cysteaminylphenol/magnetite
SA	splicing donor sequence
SD	splicing donor sequence
TCR	T-cell receptor
TIL	tumor infiltrating lymphocyte
TMAG	*N*-(α-trimethylammonioacetyl)-didodecyl-D-glutamate chloride
TNF-α	tumor necrosis factor-α
TRE	tetracycline-responsive element
TRP-2	tyrosinase-related protein-2
tTA	tetracycline-responsive transcriptional activator
TUNEL	terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick labeling
VDJ	variable, diversity, ioining

謝辞

本論文は、九州大学大学院工学府化学システム工学専攻において行われた研究の成果についてまとめたものであります。

本研究を遂行するにあたり、5 年間の研究生活の中で終始適切なご指導ご鞭撻を賜りました九州大学大学院工学研究院化学工学部門 上平 正道 教授に心より感謝するとともに厚くお礼を申し上げます。「常に上を見て研究を行う」という研究者としての姿勢を学び、実験上の知見にとどまらず、学生生活などあらゆる面について常に心温かくご指導して頂き、誠に有難うございました。先生と肩を並べる研究者を目指して、さらに邁進してまいります。

本論文の審査にあたり、有意義な議論をさせて頂きました九州大学大学院工学研究院化学工学部門 三浦 佳子 教授 並びに 井嶋 博之 教授に深く感謝致します。本研究の今後の方針を立てる上で大変参考になるご教授も下さり、感謝の意が絶えません。

本研究を遂行するにあたり、様々な実験手法や知識を事細かに教えて頂いただけでなく、何気ない会話を通じて研究室の雰囲気を明るくして頂いた九州大学大学院工学研究院化学工学部門 井藤 彰 准教授に心より感謝申し上げます。先生のご指導の下に研究を行えたことは私の誇りであり、今後、先生に少しでも追いつけるように精進してまいります。

本研究を遂行するにあたり、難局に直面した際に何度も手を差し伸べて頂いた上に、研究方針についても幾度となく相談に乗って下さった九州大学大学院工学研究院化学工学部門 河邉 佳典 助教には感謝の気持ちでいっぱいです。特に、私の遺伝子工学技術の向上は先生のご指導の賜物と、感謝しております。

本研究を遂行するにあたり、多大なご協力を賜りました札幌医科大学 神保 孝一 名誉教授、名古屋大学 小林 猛 名誉教授、岡山大学 中山 睿一 名誉教授、藤田保健衛生大学 伊藤 祥輔 名誉教授、藤田保健衛生大学医療科学部化学教室 若松 一雅 教授、札幌医科大学医学部皮膚科学講座 山下 利春 教授 並びに 黄倉 真恵 先生、名古屋大学大学院工学研究科 本多 裕之 教授、札幌医科大学医学部病理学第一講座 田村 保明 特任教授に心より感謝致します。先生方との共同研究を通して、研究者としての視野を広げる貴重な経験を数多くさせて頂き、深く感謝しております。

研究生活から就職活動に至るまで常に配慮して支えて頂いた上平研究室秘書 崎本 真紀子氏を始め、九州大学大学院工学研究院化学工学部門事務室 並びに九州大学工学部等教務課学生支援係の皆様には厚くお礼を申し上げます。

研究生活において温かくご指導下さった研究室の先輩方、また、至らない私を常に支え、励まして頂いた後輩方に心よりお礼申し上げます。特に、研究生活当初から同じ研究チームの一員として常に配慮し、手厚く指導して頂いた實松 裕次氏、岡本 憲明氏を始め、積極的にサポートして下さり、終始和やかな雰囲気で接して頂いた鈴木 大雅氏、佐藤 智詠氏、小野 章彦氏、寺西 亮士氏に深く感謝致します。皆様と過ごした研究生活は私のかけがえのない財産です。

最後に、私の意志を尊重し、8 年間という学生生活を温かく見守り、支えて下さった両親、兄弟、祖母を始め、友人たちには何とお礼を申し上げてよいのか、感謝の言葉もございません。私がここまでやってこられたのは、皆様のお陰です。ここに心から敬意と感謝の意を表します。

平成 27 年 1 月

山口　雅紀