HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	抗癌剤投与が癌微小環境を改善する免疫学的機構に関する研究
Author(s)	山村, 喜之
Description	配架番号：2345
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第12841号
Issue Date	2017-09-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k12841
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/67445
Type	doctoral thesis
File Information	Yoshiyuki_Yamamura.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学　位　論　文

抗癌剤投与が癌微小環境を改善する免疫学的機構に関する研究

(Studies on the immunological improvement of cancer microenvironment under administration of chemotherapeutic agents)

２０１７年９月

北　海　道　大　学

山村　喜之

目　　次

発表論文目録および学会発表目録 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 1 頁

緒言・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・3 頁

略語表 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・5 頁

実験方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・6 頁

実験結果・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・14 頁

考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・26 頁

総括および結論・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・30 頁

謝辞・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・31 頁

引用文献・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・32 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

1. Yoshiyuki Yamamura, Takahiro Tsuchikawa, Kengo Miyauchi, Shintaro Takeuchi, Masataka Wada, Toshihiko Kuwatani, Noriaki Kyogoku, Aki Kuroda, Tahehiro Maki, Toshiaki Shichinohe, Satoshi Hirano

   The key role of calreticulin in immunomodulation induced by chemotherapeutic agents

   International Journal of Clinical Oncology, 20·386-394, (2015)

2. 山村喜之、土川貴裕、京極典憲、藤原　晶、真木健裕、七戸俊明、平野　聡

   抗癌剤投与は細胞膜表面での calreticulin の発現を増強させ免疫応答を増強する

   北海道医学雑誌, 91·47, (2016)

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. Yoshiyuki Yamamura, Tsuchikawa Takahiro, Masaki Miyamoto, Noriaki Kyogoku, Aki Kuroda, Takehiro Maki, Satoshi Hirano, Satoshi Kondo

   Anticancer agents induce translocation of calreticulin and enhance the anticancer immunity in mice

   第 70 回日本癌学会学術集会，2011 年 10 月 5 日・名古屋

2. 山村喜之、土川貴裕、宮本正樹、京極典憲、黒田　晶、真木健裕、七戸俊明、田中栄一、平野　聡、近藤　哲

抗癌剤はcalreticulinの細胞膜表面への移行を誘導しマウスにおける抗腫瘍効果を増強させる

第111回日本外科学会，2011年（震災により紙上開催）

緒　言

免疫療法は悪性腫瘍の集学的治療戦略の一つであり、これまで特異的な抗腫瘍免疫を誘導する癌ワクチン療法のほか、抗腫瘍効果を増強するよう遺伝子改変した腫瘍特異的リンパ球輸注療法、癌細胞の免疫逃避機構を阻害し免疫細胞の活性を維持する免疫チェックポイント阻害剤治療など、さまざまな臨床研究が報告されてきた[1-6]。

歴史的に、集学的治療の中心を占める抗癌剤治療はその有害事象の一つに免疫抑制効果があるため、免疫療法との併用が避けられてきた。しかし、近年、特定の抗癌剤は、むしろ腫瘍局所の微小環境や宿主免疫応答を改善することが報告されている[7-9]。微小環境は腫瘍細胞の形成や疾患の進行、転移、予後に強い影響を与えている[10]。腫瘍周囲における微小環境は、腫瘍細胞の過剰な増殖により低酸素状態に陥っているため、低酸素誘導転写因子が活性化され、細胞障害性 T 細胞の機能低下と制御性 T 細胞(regulatory T cell：Treg)の増加が起こり、腫瘍細胞に対する免疫反応が抑制されると報告されている[11-12]。微小環境を改善するメカニズムとして、Brode ら[13]はシクロフォスファミドが制御性 T 細胞 を抑制することにより免疫応答を改善すると報告しているほか、Kawano ら[14]はドキソルビシンが細胞膜表面での heat shock protein 70 (HSP70)の発現を介して免疫原性の亢進とともに癌細胞死を誘導し、骨肉腫に対する抗腫瘍効果を発揮したと報告している。また、HSP70 同様に細胞膜表面に発現することにより抗腫瘍効果を発揮すると言われているのが calreticulin（CRT）である。CRT は、小胞体の内腔に位置している 60-kDa の Ca^{2+}-binding protein で、HLA class I の発現などに重要な役割を果たしている。Obeid ら[15]は、CRT が抗癌剤治療における抗原認識に関与する重要な分子であると報告しており、低容量のアントラサイクリンに暴露された CT26 細胞（マウス大腸癌細胞株）では CRT が小胞体から細胞膜表面に移動し、それによって樹状細胞に対して”eat me”シグナルを提示し抗原性を増強させると報告している。さらに、Hodge ら[16]は高濃度の抗癌剤を投与した際は CRT が全く発現しなかったと報告しており、CRT の発現に関しては低用量の抗癌剤投与が必要である。低用量の抗癌剤投与は CRT の発現増強を介して宿主の免疫応答を改善するだけ

ではなく、抗癌剤による免疫抑制以外の有害事象も軽減できる可能性がある。

これまでの CRT の発現に関する報告は、CT26 細胞株もしくは B16（マウス melanoma）細胞株といった特定の癌細胞株を用いた検討に限られ、複数の癌細胞株を用いた検討はされていない。また、使用される抗癌剤も単剤で、CRT の発現の増強や抗腫瘍効果の有無に関する比較・検討がなされていない現状がある。本研究では、複数の抗癌剤と癌細胞株を用いて低用量の抗癌剤暴露により Immunogenic cell death (ICD)細胞を作成し、CRT の発現の増強の有無を比較・検討するとともに、CRT が腫瘍特異的免疫応答を増強させるメカニズムを検証することを目的とした。

今回の検討では、低用量の抗癌剤を暴露されたマウス癌細胞株は抗癌剤に暴露されていないマウス癌細胞株と比較して、細胞膜表面での CRT 発現が増加していた。また、この発現量は使用する細胞株、抗癌剤の種類により異なっていた。動物実験において、抗癌剤暴露後の ICD 細胞を移植したマウスの腫瘍の大きさと ICD 細胞の細胞膜表面での CRT の発現量には正の相関関係が認められた。また、生着した腫瘍周囲の腫瘍浸潤 CD3 陽性 T 細胞の数は ICD 細胞の細胞膜表面での CRT の発現量、腫瘍の大きさと相関関係が認められた。以上の結果より、ICD 細胞は細胞膜表面での CRT 発現量の増加により、腫瘍浸潤 CD3 陽性 T 細胞を誘導し、微小環境を改善させることにより宿主免疫応答を増強させることが示唆された。さらに、ヒト癌細胞株において細胞膜表面での CRT の発現と HLA class I の発現量には相関関係が認められた。

以上の結果から、抗癌剤治療は CRT の発現を増強することにより、微小環境を改善し、免疫原性の亢進による抗腫瘍効果も期待できることが確認された。また、高齢者や合併症の多い癌患者に対しては、通常の投与量よりも低用量の抗癌剤を投与されることが多いが、その場合でも抗癌剤により誘導される免疫原性の亢進を介した抗腫瘍効果が期待できると考えられた。

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下の通りである。

5FU	5-fluorouracil
ACK	ammonium chloride potassium
ATCC	American Type Culture Collection
BSA	bovine serum albumin
CDDP	cisplatin
CPT-11	camptothecin
CRT	calreticulin
DTC	dying tumor cell
FBS	fetal bovine serum
FITC	fluorescein isothiocyanate
GEM	gemcitabine
HLA	human leukocyte antigen
HPF	high power field
HSP70	heat shock protein 70
IC50	50% inhibitory concentration
ICD	immunogenic cell death
IgG	immunoglobulin G
LLC	Lewis lung carcinoma
MIT	mitoxantrone
MMC	mitomycin C
MTT	3-(4,5-di-methylthiazol-2-yl)-2,5- diphenyltetrazolium bromide
PBS	phosphate-buggered saline
PI	propidium iodide
RPMI-1640	Roswell Park Memorial Institute-1640
Treg	regulatory T cell

実験方法

1) 細胞株

使用した細胞株と供給元を以下の表に示す（表１）

表１．細胞株とその供給元

	細胞株	供給元
マウス細胞株	CT26　（大腸癌細胞株）	American Type Culture Collection
	B16　（メラノーマ細胞株）	American Type Culture Collection
	LLC　（肺癌細胞株）	American Type Culture Collection
ヒト細胞株	TE 8　（食道扁平上皮癌細胞株）	東北大学加齢医学研究所医用細胞資源センター細胞バンク
	HEC 46（食道扁平上皮癌細胞株）	広島大学総合科学研究科
	PK-9　（膵癌細胞株）	東北大学加齢医学研究所医用細胞資源センター細胞バンク
	AsPC-1　（膵癌細胞株）	American Type Culture Collection
	SUIT-2　（膵癌細胞株）	ヒューマンサイエンス研究資源バンク

細胞培地は RPMI-1640（Sigma Aldrich）を使用し、ウシ血清（fetal bovine serum：FBS）（Sigma Aldrich）とペニシリン・ストレプトマイシン（Life technologies）を添加し、それぞれの終濃度を 10%、1%として 37℃、5%CO_2 下で培養した。

2) 抗癌剤

使用した抗癌剤と供給元を以下の表に示す（表 2）

表 2. 抗癌剤とその供給元

抗癌剤（略語）	供給元
ミトキサントロン　（MIT）	ファイザー製薬
マイトマイシン C　（MMC）	協和発酵キリン株式会社
フルオロウラシル　（5FU）	協和発酵キリン株式会社
カンプトテシン　（CPT-11）	ヤクルト本社
シスプラチン　（CDDP）	ブリストルマイヤーズスクイブ株式会社
ジェムザール　（GEM）	イーライーリリー株式会社

3) 抗癌剤の細胞毒性

本研究では、ICD 細胞を作成するための抗癌剤投与量として培養細胞の 100%阻害濃度ではなく、50%阻害濃度（50% inhibitory concentration: 以下 IC50）を MTT 溶液（Cell Counting Kit-8）を用いて以下の方法で求めた。

まず、96 ウェルマイクロプレートに 1×10^5 個/well の細胞株を加え、RPMI-1640 を添加し 24 時間培養した（5%CO_2、37℃）。24 時間後、各ウェルに様々な濃度に希釈した抗癌剤 100μL を加え、コントロール群としては PBS のみ 100μL を投与し、さらに 24 時間培養した（5%CO_2、37℃）。その後、MTT 溶液 10μL を加え、4 時間培養し（5%CO_2、37℃）（図１）、マイクロプレートリーダーで 450-550nm の吸光度（A）を測定した。細胞生存率は $A_{drug}/ A_{control}\times100\%$で計算した。

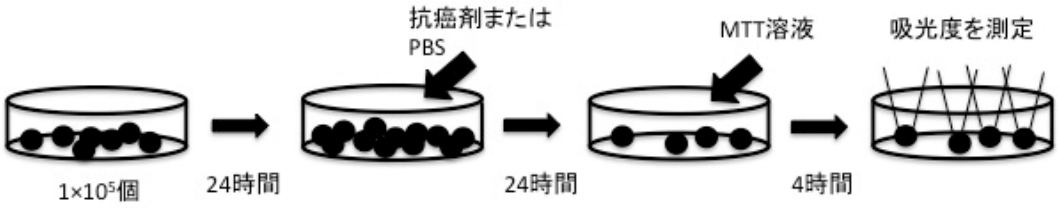

図１．MTT 溶液を用いた IC50 の決定方法

癌細胞株に抗癌剤投与したのち、MTT assay を用いて吸光度を測定し ICD50 を求めた。

4）フローサイトメトリー

フローサイトメトリーの機器は FACS canto II（BD Biosciences）を用い、解析ソフトは FlowJo software V7.6.5（Tomy Digital Biology）を用いて行った。

① Annexin V-FITC ならびに Propidium iodide を用いたフローサイトメトリー

これまで細胞膜表面での HSP70 や CRT の発現による抗腫瘍効果に関する報告では、ICD 細胞がネクローシス状態ではなくアポトーシス状態で抗腫瘍効果を発揮すると報告されている[10-12]。そのため、抗癌剤を暴露して作成した ICD 細胞がアポトーシス状態であることを確認するために、フローサイトメトリーを用いて以下に記載する方法で解析した。

6 ウェル培養プレートの 1 ウェルにつき 2.0mL の RPMI-1640 培養液に 1×10^6 個/well の癌細胞株を播き、24 時間培養した（5%CO_2、37℃）。MTT assay で調べた IC50 となる抗癌剤を 2.0mL/well 投与し、24 時間培養を行った（5%CO_2、37℃）。抗癌剤暴露 24 時間後の癌細胞株を ICD 細胞として回収し、Annexin binding buffer（Miltenyi Biotec）添加 PBS 50μL 用いて 2 回洗浄した。洗浄後に Annexin V-FITC を 1μL 加え 15 分間反応させた（暗所、4℃）。その後、癌細胞株を Annexin binding buffer 添加 PBS 50μL 用

いて 2 回洗浄した。最後に propidium iodide（PI）（Miltenyi Biotec）で反応させたのち、フローサートメトリーを行った。

② CRT-FITC を用いたフローサイトメトリー

抗癌剤を暴露し作成した ICD 細胞の細胞膜表面での CRT の発現量を、フローサイトメトリーを用いて以下に記載する方法で解析した。

ICD 細胞を①同様に作成したのち、ウシ血清アルブミン（Bovine serum albumin：BSA）（Sigma Aldrich）を含んだ 150μL の PBS（以下、BSA 添加 PBS）で 2 回洗浄した。次に、BSA 添加 PBS50μL で癌細胞を攪拌し、抗 CRT polyclonal 抗体（Thermo Scientific）を 1μL 加えた後、iso-type ウサギイムノグロブリン分画（Dako）を加えて 15 分間反応させた（暗所、4℃）。その後、BSA 添加 PBS で 2 回洗浄したのち、BSA 添加 PBS50μL で攪拌させ、FITC 抗ウサギ IgG(H+L)（Jackson Immunoresearch）を 1μL 加え、反応させた（暗所、15 分間、4℃）。最後に、BSA を添加 PBS で癌細胞を洗浄し、フローサイトメトリーを行った。CT26 細胞株にミトキサントロン （MIT）を暴露して作成した ICD 細胞の CRT 発現を確認したフローサイトメトリーの 1 例を図 2 に示す。CRT の発現量は陰性対照である isotype と比較し、calreticulin-FITC を標識している細胞を細胞膜表面で CRT を発現している細胞と定義し、その細胞数を比較・検討した。

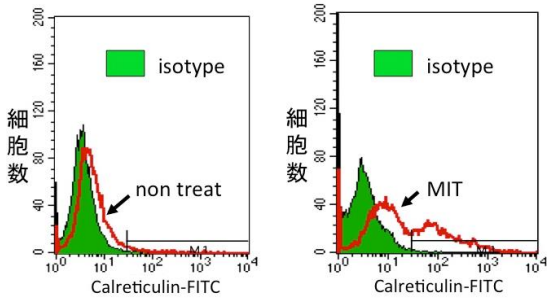

図 2. ICD 細胞の細胞膜表面での CRT の発現量の確認

CT26 細胞株にミトキサントロン（MIT）を暴露して作成した ICD 細胞は、抗癌剤を暴露していない細胞（non treat）と比べて細胞膜表面での CRT の発現量が増加していることが確認できた。

③ HLA class I-FITC を用いたフローサイトメトリー

HLA class I の発現をフローサイトメトリーを用いて解析した。ICD 細胞を①と同様に作成したのち、BSA 添加 PBS150μL で 2 回洗浄した。次に BSA 添加 PBS50μL で癌細胞を攪拌し、抗ヒト HLA-ABC PE（eBioScience）または FITC 抗マウス H-2 Kb（Biolegend）をマウス IgG2a K Isotype Control PE（eBioScience）と 15 分間反応させた（暗所、4℃）後、BSA 添加 PBS 150 μL で 2 回洗浄し、フローサイトメトリーを行った。

5）動物実験

「北海道大学動物実験に関する規定」に従って以下の実験を実施した。

マウスは 5 週令の BALB/cAJcl と C57BL/6JJcl のメスを日本クレア株式会社より購入した。マウスはそれぞれ PBS のみ注射した PBS 群、抗癌剤に暴露されていない癌細胞株を移植した non-treat（NT）群のほか、抗癌剤暴露後の ICD 細胞を移植した MIT 添加培養群、MMC 添加培養群、CPT-11 添加群、5FU 添加培養群、CDDP 添加培養群、GEM 添加培養群の 8 群に分けた。この 8 群間において、ICD 細胞をワクチンとして接種した際の抗腫瘍効果を抗癌剤毎に比較した。

PBS 群はマウスの左尾側に 100μL の PBS を注射し、その他の群は 100μL の PBS に 1×10^6 個の ICD 細胞を攪拌し左尾側に移植した。移植後 7 日目に抗癌剤を暴露していない同種の癌細胞株を 100μL の PBS に 1×10^6 個攪拌し、右尾側に移植した。その後、2 日毎に腫瘍の観察を行い、右側に移植した腫瘍の長径が 2cm を超えるか、潰瘍を形成したマウスは脱落とした。2 週間後に右側に移植した腫瘍をすべて摘出したのち、腫瘍の大きさを比較し ICD 細胞の抗腫瘍効果を検討した。また、大きさを計測後、腫瘍は免疫組織学的検討の検体として用いた（図 3）。脾臓はリンパ球抽出のために摘出した。

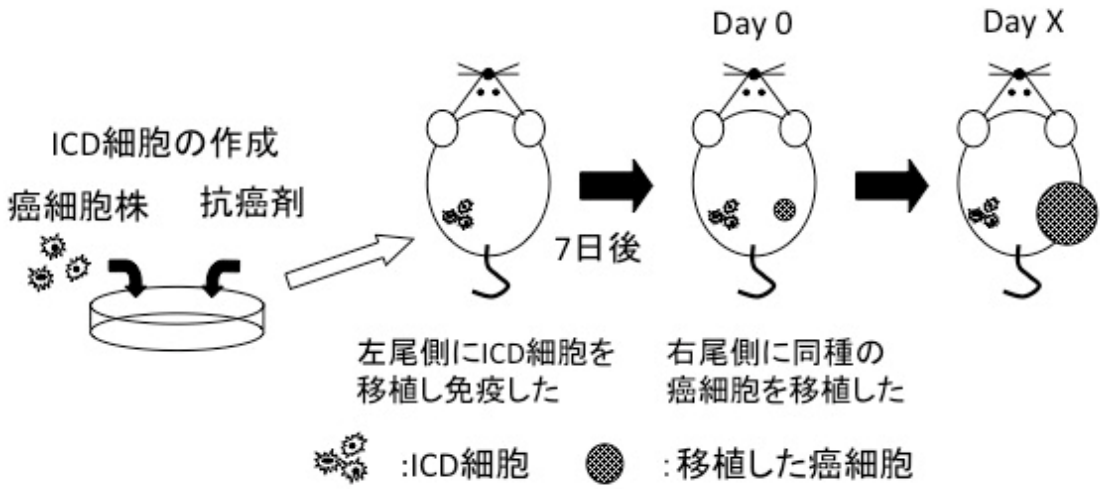

図 3. 動物実験シェーマ

ICD 細胞をマウスの左尾側に注射し、マウスを免疫した。さらに、7 日後に抗癌剤を暴露していない同種の癌細胞を右尾側に移植した。右尾側に生着した腫瘍の大きさを比較・検討し、抗腫瘍効果を検証した。

6) リンパ球の抽出と細胞傷害性測定試験

ICD 細胞で免疫したマウスの脾臓を摘出しリンパ球を抽出した。摘出した脾臓の皮膜下に mRPMI（RPMI 500mL+1%ペニシリン・ストレプトマイシン＋0.5M メルカプトエタノール 50μL）を注射したのち、スライドグラスを用いてすり潰し懸濁させた。この懸濁液をフィルターに通したのち、遠心分離を行い（1200rpm、5 分間、4℃）、上清を除去した。次に、溶血剤である ACK（10×NH_4Cl lysis β、Thermo Fisher Scientific）を 1mL と mRPMI を 10mL 投与し、再び遠心分離した後、上清を除去し回収したペレットをリンパ球として培養した。

本研究では、CT26 細胞株に CDDP を暴露し作成した ICD 細胞で免疫したマウスから抽出したリンパ球を使用し、細胞傷害性測定試験（LDH assay）を施行した 。96 ウェルマイクロプレートの各ウェルに CT26 細胞株を 1×10^4 個

/well 加え、RPMI-1640 を添加し 24 時間培養した（5%CO_2、37℃の条件下）。その後、各ウェルにリンパ球をそれぞれ 1×10^4 個、1×10^5 個加え、24 時間共培養した（5%CO_2、37℃）（図 4）。最後に LDH assay 反応混合液（LDH Cytotoxicity Detection Kit、タカラバイオ）を添加し、4 時間後にマイクロプレートリーダーを用いて 490-492nm の吸光度を測定した。

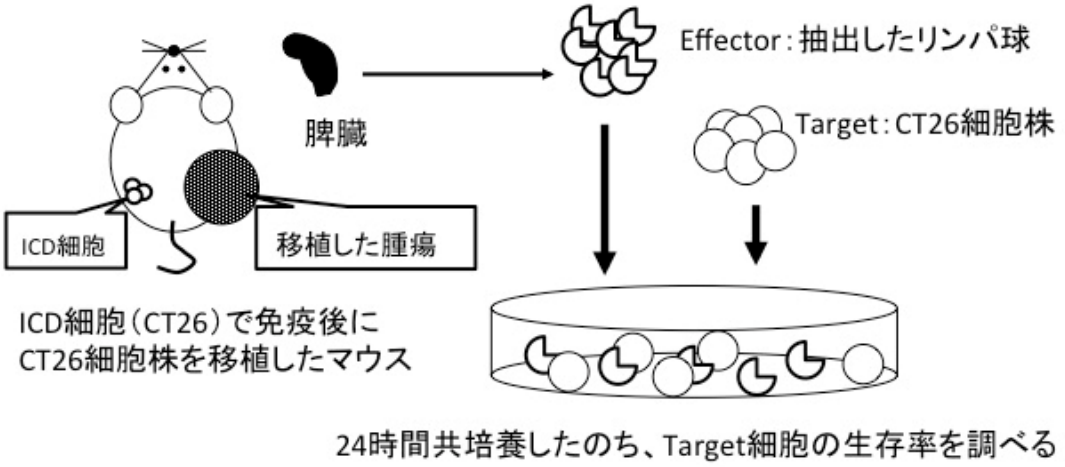

図 4.　細胞傷害性試験のシェーマ

脾臓から抽出したリンパ球を Effector 細胞、癌細胞株を Target 細胞として共培養したのち、LDH assay を施行して Target 細胞の生存率を求めた。

7）免疫組織化学染色

免疫組織化学染色は通常のポリマー法を用いて行った。動物実験で採取した検体のパラフィン包埋標本を 5μm に薄切し、スライドガラスに張り付けて切片を作成した。キシレンで脱パラフィンを行い、再水和後、圧力鍋で 10 分間処理した。過酸化水素水で 15 分間内因性ペルオキシターゼ活性を賦活化した。1% Tween-20 を含有した PBS で 3 回洗浄後に、10%正常ヤギ血清（ニチレイ）に浸した（30 分間）。その後、一次抗体である CD3 抗体（400 倍希釈）（Bioss）

と陰性対照ラットポリクローナル抗体（400 倍希釈）（Gene Tex）に一晩、4℃で反応させた。反応後に 3 回洗浄し、二次抗体としてペルオキシダーゼ標識抗マウス/ウサギ IgG ポリクローナル抗体（Histofine Simple Stain MAX PO、ニチレイ）で反応させた（30 分）。洗浄後にヘマトキシリンで核染色を行った（15 分）。

8）腫瘍浸潤 CD3 陽性 T 細胞のスコアリング

動物実験で採取した検体の抗腫瘍効果を検討するため、HPM（×200）で 10 視野以上を確認し、そのうち腫瘍周囲に浸潤している CD3 陽性 T 細胞が最も多い 5 視野を選択したのち、CD3 陽性 T 細胞数の中央値を求めた。

9）統計学的分析

マウスに生着した腫瘍の大きさの比較、腫瘍浸潤 CD3 陽性 T 細胞数の比較、細胞障害性試験における細胞生存率の比較は Mann-Whitney U test を用いて検討した。回帰分析は回帰直線と回帰係数を用いて分析した。相関係数 R は $0<R\leqq0.2$ を相関なし、$0.2<R\leqq0.4$ を弱い相関あり、$0.4<R\leqq0.7$ を中程度の相関あり、$0.7<R<1.0$ を強い相関ありとし、p 値は 0.05 未満を有意差ありとした。これらの統計分析は Statview J version 5.0（SAS Institute）を用いて行った。

実験結果

1）抗癌剤暴露量の決定と CRT 発現量の検討

免疫原性を有する理想的な ICD の状態を設定するために、MTT assay を施行して IC50 を求めることで、抗癌剤暴露後の癌細胞株が 50%以上 100%未満で死滅する濃度を抗癌剤投与量とした。その後、 ICD 細胞に対して Annexin V-FITC と PI の二重染色を行い、フローサイトメトリーで Annexin V-FITC と PI 共に蛍光染色した細胞をネクローシス細胞、Annexin V-FITC のみ蛍光染色した細胞をアポトーシス細胞として比較した。その結果、細胞株の種類、暴露する抗癌剤の種類によりアポトーシス細胞数の割合は異なるが、アポトーシス細胞が存在していることが確認できた（図 5）。また、細胞膜表面での CRT の発現は、抗癌剤を暴露し作成した ICD 細胞において、抗癌剤を暴露していない癌細胞株である NT 群と比べ、すべての群で CRT の発現量が増加しているだけではなく、抗癌剤の種類によって CRT の発現量は異なっていた（図 6）。

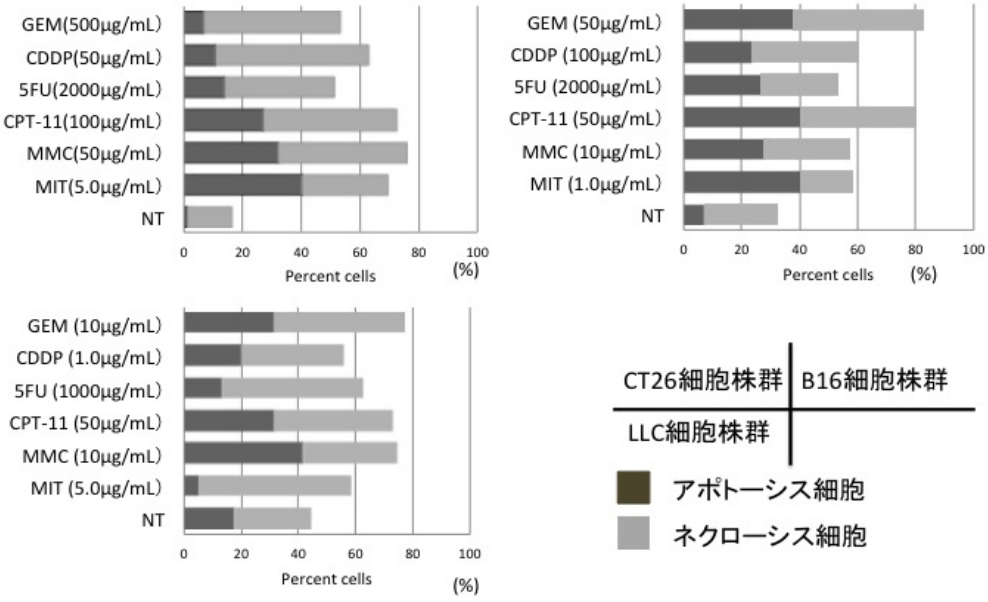

図 5. 癌細胞株に対する抗癌剤投与後のアポトーシスとネクローシスの割合

ICD 細胞におけるアポトーシス細胞数は、癌細胞株の種類、抗癌剤の種類により異なっていた。

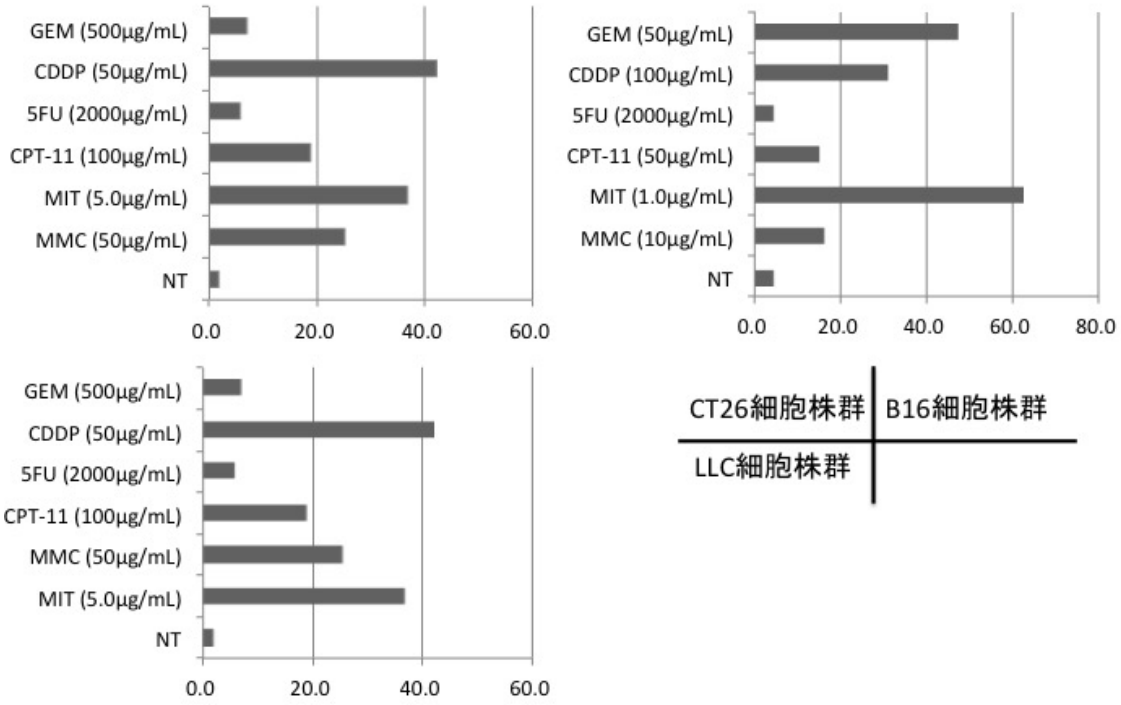

図 6.　ICD 細胞における細胞膜表面での CRT 発現量の比較

ICD 細胞表面での CRT 発現量は、細胞株の種類と暴露した抗癌剤の種類により異なっていた。また、ICD 細胞では抗癌剤を暴露していない癌細胞（NT 群）よりも CRT の発現量が多かった。

2）動物実験における抗腫瘍効果の検証

CT26 細胞株を用いた実験において、抗癌剤を暴露していない CT26 細胞株を注射し免疫した NT 群は、右尾側に癌細胞株を移植後に生着した腫瘍サイズの中央値は 1303mm^3 であったが、MIT を暴露後の ICD 細胞で免疫した MIT 添加培養群は、腫瘍サイズの中央値は 50mm^3 であり、有意に小さかった（p=0.009）。一方、CPT-11 や MMC に暴露後の ICD 細胞で免疫したマウスは、腫瘍サイズの中央値が、それぞれ 1346 mm^3、1127mm^3 であり、NT 群と比べて統計学的に有意差はなく抗腫瘍効果の増強は認められなかった（p=0.4647、p＝0.9168）。

また、MIT や CDDP を暴露した ICD 細胞は、CT26 細胞株、B16 細胞株、LLC 細胞株全ての細胞株に対して抗腫瘍効果が確認できた。しかし、GEM を暴露して作成した ICD 細胞は、CT26 細胞株、B16 細胞株に対しては抗腫瘍効果が確認できたが、LLC 細胞株では確認できず、ある種の癌細胞株に対して抗腫瘍効果が発揮される ICD 細胞が、すべての癌細胞株に対して抗腫瘍効果を増強させるわけではないことが確認できた（表 3）。今回、B16 細胞株においては、CPT-11 群のマウスは全て潰瘍を形成したため、検討対象外とした。

表 3．生着した腫瘍の大きさの比較

動物実験で得られた腫瘍の大きさは、暴露した抗癌剤の種類、細胞株の種類によって異なっていた。

抗癌剤	腫瘍体積		*p* value
CT26 細胞株			
MIT	50	(0-156.8)	0.009
MMC	1127	(221-2157)	0.9168
CPT-11	1346	(259.6-4766)	0.4647
CDDP	203	(0-795)	0.0283
5FU	705	(0-2464)	0.2506
GEM	113	(0-399.4)	0.0163
NT	1303	(205.1-1950)	
B16 細胞株			
MIT	436	(0-716.9)	0.0163
MMC	940	(189.4-1277)	0.3472
CDDP	76	(0-253.2)	0.009
5FU	645	(193.4-1531.2)	0.1416
GEM	23	(0-69.9)	0.0253
NT	1381	(580.2-2691.5)	
LLC 細胞株			
MIT	55	(0-160.2)	0.0062
MMC	314	(194.4-411.3)	0.1003
CPT-11	389	(136-753.2)	0.4652
CDDP	89	(0-259.7)	0.0062
5FU	331	(95.9-539.2)	0.1441
GEM	443	(67.5-696.2)	0.8312
NT	1668	(809.3-3906.6)	

3）CRT 発現量と抗腫瘍効果の検討

ICD 細胞の細胞膜表面での CRT の発現量と、移植腫瘍の大きさとの間には、CT26 細胞株を使用した群では相関係数が R=0.266（p=0.056）と弱い相関関係であったが、B16 細胞株を使用した群では R=0.547（p＝0.062）と中程度の相関関係、LLC 細胞株を使用した群では R=0.756（p=0.0025）と強い相関関係が認められた（図 7）。

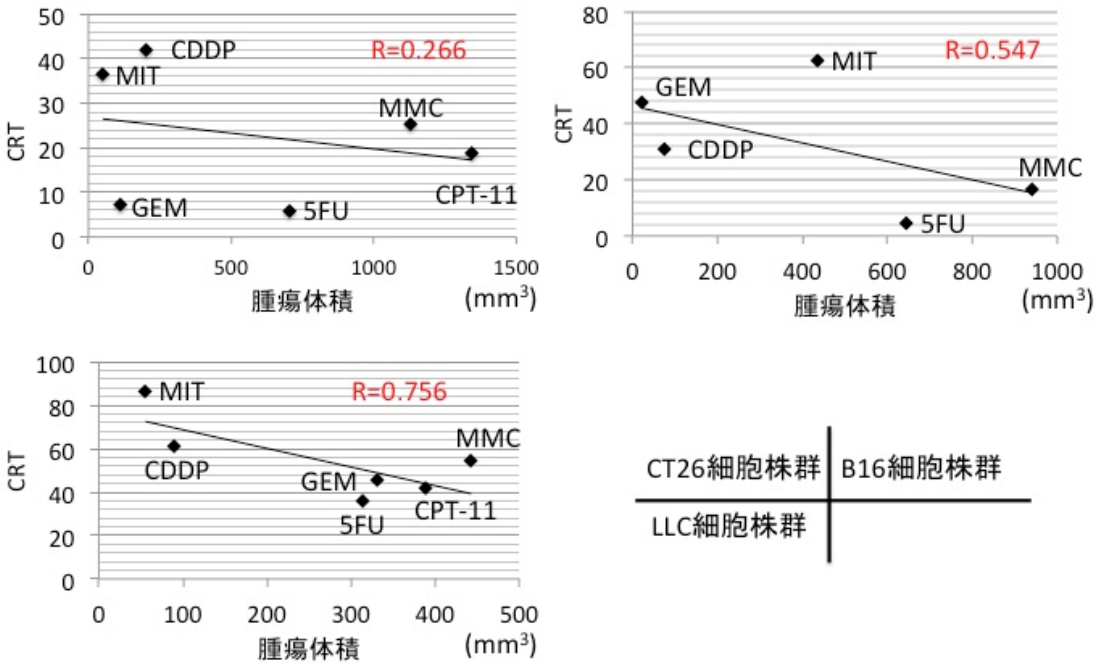

図 7. ICD 細胞の CRT の発現量と腫瘍の大きさの関係

ICD 細胞の CRT の発現量は抗癌剤の種類によって異なっていた。また、CRT の発現量が高いほど、マウスに移植した腫瘍の大きさは小さく、ICD 細胞の抗腫瘍効果が確認された。また、CRT の発現量と腫瘍の大きさには相関関係が認められた。

4）CRT 発現量と腫瘍浸潤 CD3 陽性 T 細胞数の検討

ICD 細胞で免疫後に癌細胞株を移植し、生着した腫瘍の周囲に浸潤した CD3 陽性 T 細胞数を検討した（図 8）。抗癌剤の種類や癌細胞株の種類によって、NT 群と比較し腫瘍浸潤 CD3 陽性 T 細胞数が有意に多いもの、差がないものなど様々であった（図 9）。また、B16 細胞株に MMC を暴露した群や、LLC 細胞株に GEM を暴露した群のように NT 群よりも CD3 陽性 T 細胞数が少ない群も認められた。

ICD 細胞で免疫したマウスに生着した腫瘍の周囲に浸潤した腫瘍浸潤 CD3 陽性 T 細胞の数と、フローサイトメトリーで調べた ICD 細胞の細胞膜表面での CRT の発現量には、CT26 細胞株を使用した群では相関係数 R=0.421、（p=0.055）、B16 細胞株を使用した群では R=0.597（p=0.084）、LLC 細胞株を使用した群では R=0.66（p＝0.089）と中等度の相関関係が認められ、CRT の発現が CD3 陽性 T 細胞を誘導し、抗腫瘍効果を発揮する可能性が示唆された（図 10）。

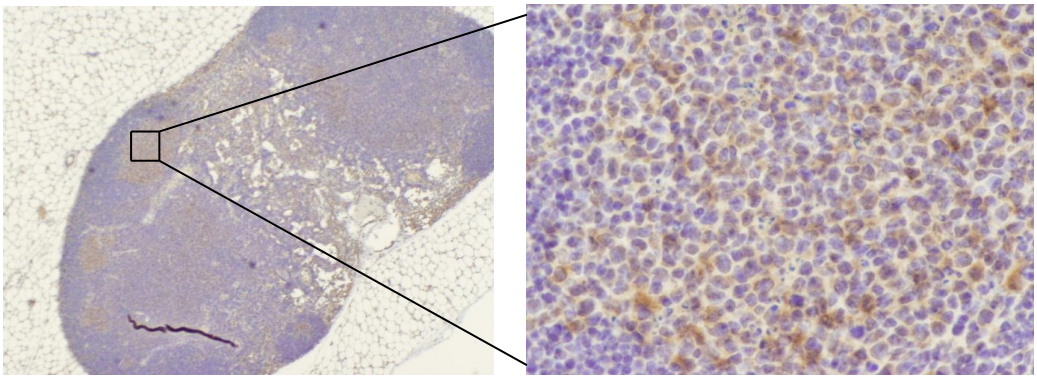

図 8. 免疫染色による腫瘍浸潤 CD3 陽性 T 細胞の検討

腫瘍周囲に浸潤している CD3 陽性 T 細胞が最も多い 5 視野を選び、CD3 陽性 T 細胞数の中央値を求めた。

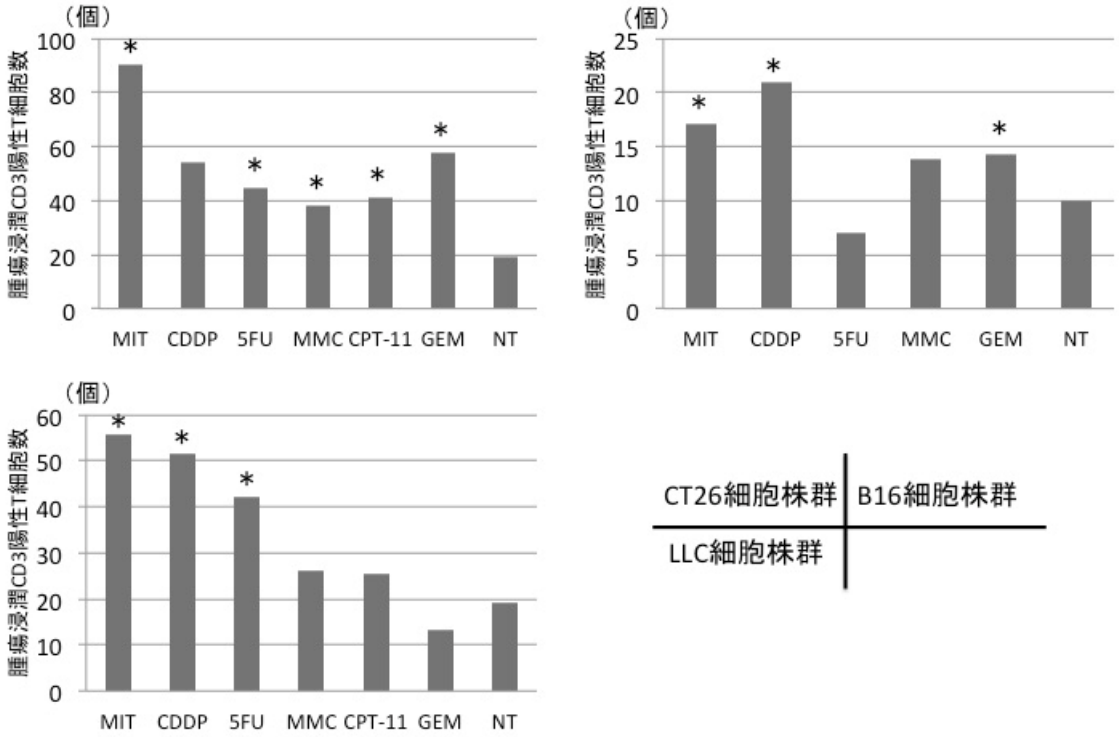

図 9. 腫瘍浸潤 CD3 陽性 T 細胞数の比較

MIT を暴露し作成した ICD 細胞で免疫したマウスは、CT26 細胞株を用いた群で $p<0.0001$、B16 細胞株を用いた群では $p=0.001$、LLC 細胞株を用いた群で $p=0.0007$ と、すべての細胞株において NT 群よりも腫瘍浸潤 CD3 陽性 T 細胞数が有意に多かった。しかし、他の抗癌剤は癌細胞株の種類によって、NT 群と比較し腫瘍浸潤 CD3 陽性 T 細胞数が有意に多いもの、差がないものなど様々であった（＊: $p<0.05$）。

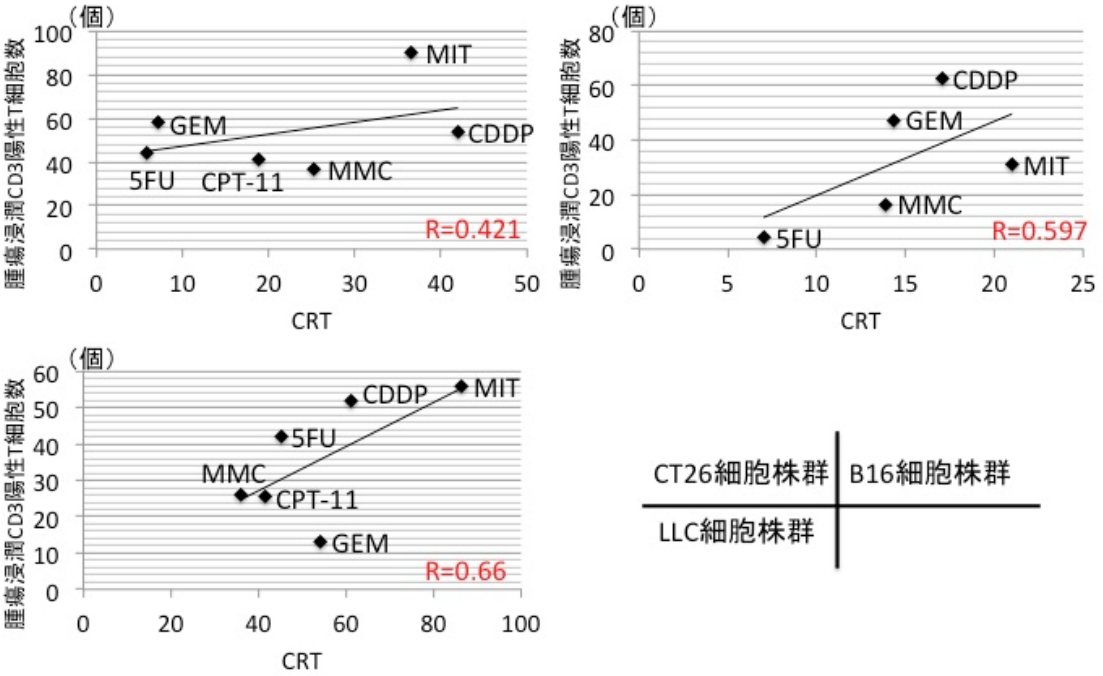

図 10.　CRT の発現量と腫瘍浸潤 CD3 陽性 T 細胞の数の比較・検討

フローサイトメトリーで確認した ICD 細胞膜表面の CRT 発現量は、腫瘍浸潤 CD3 陽性 T 細胞の数との間には正の相関関係が認められ、CRT の発現量の増加に伴い CD3 陽性 T 細胞が増加していた。

5）ICD 細胞による細胞傷害活性試験

CT26 細胞株に CDDP を暴露して作成した ICD 細胞をマウスに注射し免疫したのち、そのマウスの脾臓からリンパ球を抽出した。そのリンパ球を Effector 細胞とし、CT26 細胞株を Target 細胞として Effector: Target 比（以下、E: T 比）1：1、10：1 で共培養したのち、LDH assay を施行して、リンパ球の細胞傷害活性を確認した。その結果、CT26 細胞株の生存率が有意に低下していた（図 11）。脾臓から抽出したリンパ球で細胞傷害活性が確認できたことより、抗腫瘍効果は局所の反応ではなく、全身性の反応であることが確認できた。

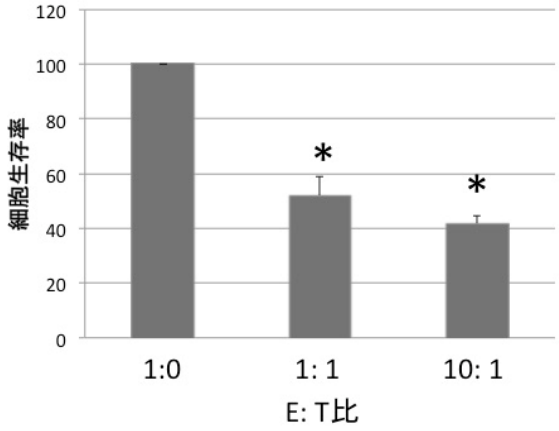

図 11.LDH assay による細胞傷害性測定試験

CT26 細胞株で作成した ICD 細胞で免疫したマウスの脾臓からリンパ球を抽出し、そのリンパ球を用いて細胞傷害性測定試験を施行したところ、CT26 細胞株の生存率が有意に低下しており（E: T 比　1:1、10:1 ともに p=0.0495）、CT26 細胞株に対して抗腫瘍効果を発揮していた（＊: p<0.05）。

6）CRT 発現量と HLA class I 発現量の検討

ヒト食道扁平上皮癌細胞株（TE8、HEC46）とヒト膵癌細胞株（PK-9、AsPC-1、SUIT-2）を用いて ICD 細胞を作成し、フローサイトメトリーで細胞膜表面での CRT の発現量と HLA class I の発現量を比較・検討した。抗癌剤の暴露量はマウス癌細胞株と同様に MTT assay を用いて決定した。細胞膜表面での CRT の発現量は、癌細胞株の種類、抗癌剤の種類によって異なっていた（図 12）。また、抗癌剤を暴露して作成した ICD 細胞は、抗癌剤を暴露していない NT 群よりも CRT の発現量が増加していた。それに加え、ICD 細胞の HLA class I の発現量は、癌細胞株の種類、抗癌剤の種類によって異なっており、NT 群よりも HLA class I の発現量は増加していた（図 13）。細胞膜表面での CRT の発現量と HLA class I の発現量は、相関係数 R=0.394（p<0.0001）とやや弱いが相関関係が認められた（図 14）。以上より、ヒト癌細胞株において CRT の細胞膜表面での発現量の増加は HLA class I pathway を介して、宿主の免疫応答を増強する可能性が示唆された。

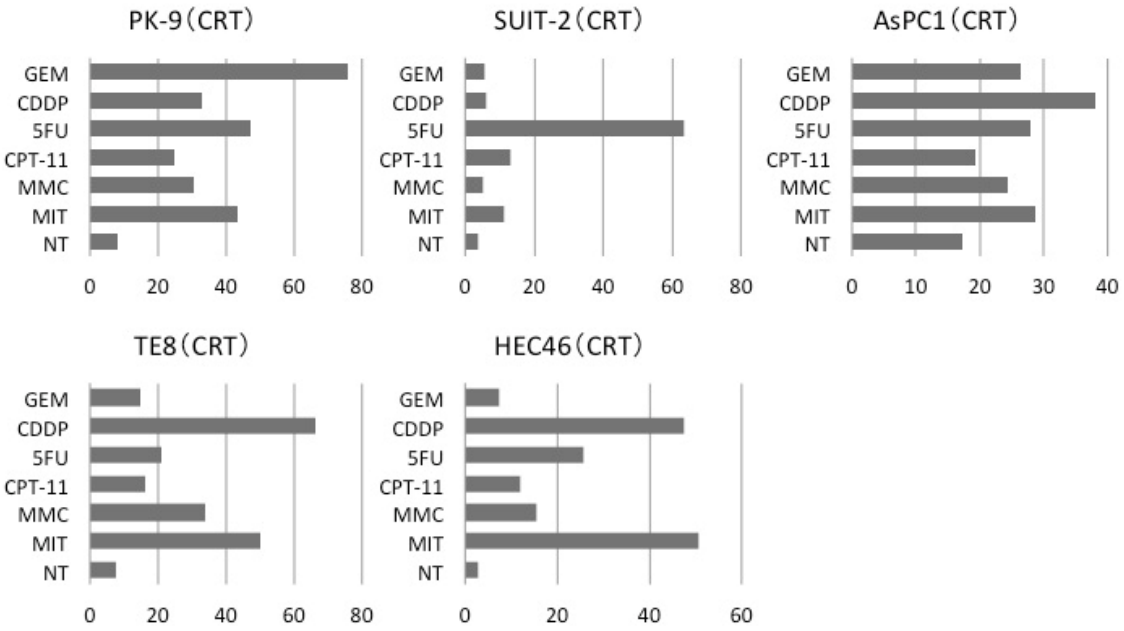

図 12. ヒト癌細胞株に抗癌剤を暴露した ICD 細胞における CRT の発現量

マウス癌細胞株と同様に、ヒト癌細胞株に抗癌剤を暴露して作成した ICD 細胞の CRT 発現量は、抗癌剤を暴露していない NT 群よりも増強していた。また、使用する癌細胞株、抗癌剤によりその発現量は異なっていた。

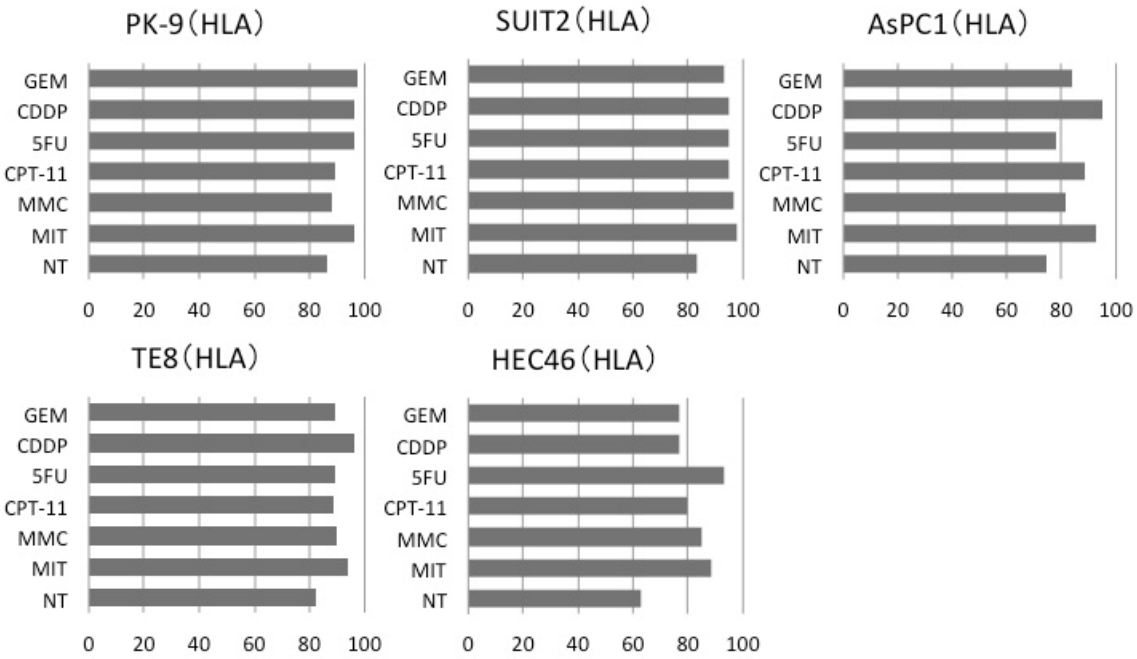

図 13. ヒト癌細胞株に抗癌剤を投与した ICD 細胞の HLA class I の発現量

ICD 細胞の HLA class I の発現量は、抗癌剤を暴露していない NT 群よりも増強していた。また、使用する癌細胞株、抗癌剤によりその発現量は異なっていた。

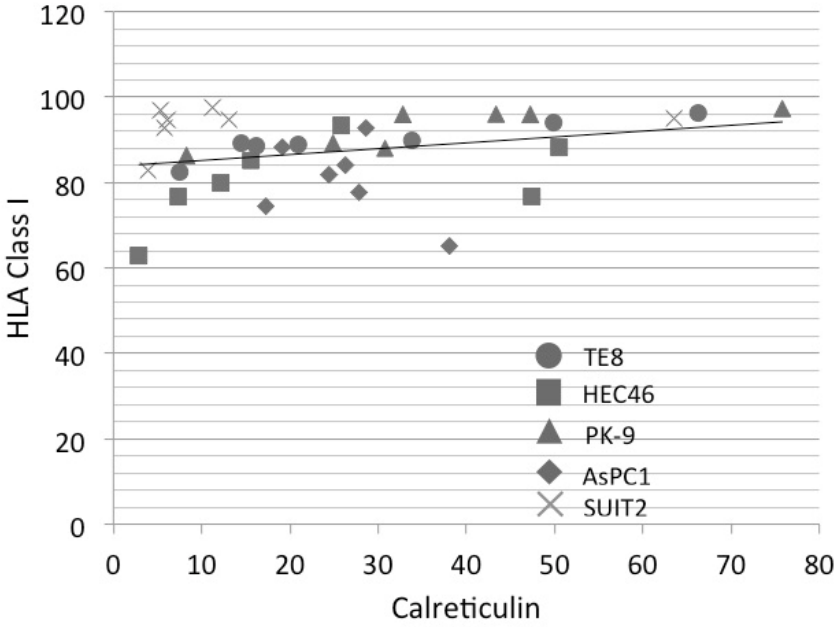

図 14. ヒト癌細胞株における細胞膜表面での CRT の発現量と HLA Class I の発現量の検討

ヒト癌細胞株に抗癌剤を暴露し作成した ICD 細胞において、CRT の発現量が増加すると、HLA Class I の発現量も増加しており、正の相関関係が認められた（R=0.394）。

考察

一般的に、抗癌剤は DNA 合成阻害やチューブリン合成阻害などのメカニズムにより腫瘍細胞に対して殺細胞効果を発揮するが[17]、近年これらの効果以外に腫瘍局所の微小環境や宿主の免疫原性を改善させる効果も有することが報告がされている[9、13-14、18-19]。教室では、これまでに腫瘍浸潤 T 細胞が腫瘍の微小環境や予後に影響を与えることを食道癌、肺非小細胞癌、膵癌において報告し[20-22]、さらに、術前化学療法施行後に切除した食道癌や膵臓癌標本において腫瘍の微小環境が改善していたことを報告してきた[23-24]。すなわち、術前に化学療法を施行した食道癌患者の切除検体では、化学療法を施行していない患者の切除検体と比較して、CD4 陽性 T 細胞数と CD8 陽性 T 細胞数が有意に多く認められた。また、術前に放射線化学療法を施行した膵臓癌患者の切除検体では、放射線化学療法を施行していない患者の切除検体と比較して、制御性 T 細胞である Foxp3 陽性 T 細胞の数が有意に少なかった。以上のように抗癌剤が癌局所環境を修飾することは明らかとなったが、そのメカニズムに関しては、これまで詳細が不明であった。

Immunogenic cell death（ICD）は癌細胞に対する免疫応答を賦活し、抗腫瘍効果を発揮する細胞死形態である。2005 年、Casares ら[25]は癌細胞株に抗癌剤を暴露することにより ICD 細胞を作成し、それを用いて宿主を免疫することにより ICD を誘導し、免疫誘導を惹起することができたと報告した。次いで Obeid ら[15]は、ICD 細胞が抗腫瘍効果を発揮するには、細胞膜表面での CRT の発現が重要であることを発見し、CT26 細胞株に対してアントラサイクリン系の MIT を暴露し作成した ICD 細胞において、細胞膜表面での CRT の発現量増加を証明しただけではなく、in vivo の実験系において ICD 細胞の抗腫瘍効果が確認できたと報告した。これらの報告に加え、Gameiro ら[26-27]は抗癌剤暴露だけではなく、放射線を照射し作成した ICD 細胞も、細胞膜表面での CRT の発現が増強すると報告したが、その発現を増強させるメカニズムは不明であった。

このような状況の中、本研究では ICD 細胞を作成するための抗癌剤暴露量の決定、CRT の発現量を増加させるためのメカニズムの解明、CRT 発現の強弱

による抗腫瘍効果の有無をマウス癌細胞株、ヒト癌細胞株を用いて包括的に比較・検討することを目的とした。

まず、ICD 細胞を作成するための抗癌剤暴露量に関し、これまでの報告では CRT 発現量やアポトーシス状態に関して一定の明確な基準がなかった[7,14,16]。Hodge ら[16]は高濃度の抗癌剤を投与した際は、CRT が全く発現していなかったと報告しており、CRT を発現させるためには暴露する抗癌剤は低容量である必要があり、本研究では MTT assay を用いて求めた IC50 を、ICD 細胞作成の際の暴露量と決定した。元来、アポトーシスの作用は恒常性維持のため不要になった細胞や害となる細胞を取り除くための細胞死機構であるが、通常の細胞ではアポトーシスが起こると細胞内のリン脂質ホスファチジルセリンが細胞膜表面に発現し、いわゆる”eat me “シグナルを提示し、マクロファージや好中球などに貪食されることが知られている[28]。同様のメカニズムで、癌細胞はアポトーシスを起こすと細胞膜表面に CRT を発現し、”eat me”シグナルを提示することにより抗腫瘍効果を発揮すると考えられ、ICD 細胞はアポトーシス状態であることが重要であると考えた。そこで、本研究ではフローサイトメトリーを用いて、アポトーシス細胞が存在することを確認することにした。その結果、細胞株の種類や抗癌剤の種類により、アポトーシス細胞数の割合は異なるが、アポトーシス細胞が存在していることを確認することができた。

次に、抗癌剤が CRT の発現量を増強させるためのメカニズムの解明に関し、これまでアポトーシスが CRT の発現に重要な役割を果たすと考えられてきたが、CRT の発現を増強させる詳細なメカニズムは不明であった[14-15, 29]。本研究においても、アポトーシス細胞が存在していることや、ICD 細胞の細胞膜表面での CRT の発現が確認できたが、そのメカニズムの解明には至らなかった。

動物実験におけるCRTの発現と抗腫瘍効果の関係に関しては、本研究ではICD細胞で免疫したマウスに対して同種の癌細胞を移植し、生着した腫瘍のサイズを比較・検討することにより抗腫瘍効果を確認する実験系を作成した。これまではCRTの発現が増強しているICD細胞を動物実験で用いることが多かったが[14, 30]、本研究ではCRTの発現量の少ないICD細胞も含めて動物実験を行い、その腫瘍サイズを比較・検討した。その結果、ICD細胞の抗腫瘍効果が確認で

きただけではなく、CRTの発現量と腫瘍サイズには相関関係があることが確認できた。

さらに、このメカニズムを解明するために免疫組織学的染色を用いて、腫瘍周囲に浸潤するCD3陽性T細胞数を比較・検討した。腫瘍周囲に浸潤するCD4陽性T細胞数やCD8陽性T細胞数が多い癌患者は予後が良好であると報告されているが、CD3陽性T細胞数が多い患者も同様に予後が良好であると報告されている[31]。本研究では、抗腫瘍効果が確認された宿主に生着した腫瘍は、腫瘍周囲に浸潤しているCD3陽性T細胞が増加しているだけではなく、その細胞数とCRTの発現量との間には相関関係が認められた。以上より、ICD細胞はCRTを発現することにより、腫瘍周囲へのCD3陽性T細胞の浸潤を介して、腫瘍局所の微小環境を改善し、抗腫瘍効果を発揮する可能性が示唆された。

最後に、ヒト癌細胞株において、抗癌剤暴露後のICD細胞ではHLA class I発現とCRTの発現との間に関係性がないとの報告もあるが、Delら[32]は細胞膜表面でのHLA class Iと細胞質内でのCRTの糖鎖修飾が関係していると報告しており、一定の見解は得られていないのが現状である[33-34]。本研究では、ヒト癌細胞株において抗癌剤投与により細胞膜表面でのCRTの発現量が増強するだけではなく、HLA class Iの発現も増強しており、それらの間には相関関係も認められた。以上より、ヒト癌細胞株においてCRTの発現の増強は、HLA class Iの発現上昇を介して腫瘍の微小環境を改善する可能性が示唆された。今後、臨床検体を用いて、術前化学療法の有無によるCRTの発現やHLA class Iの発現と予後に関する比較・検討が必要である。

臨床の場において、癌種により抗癌剤治療の key drug は異なってくる。また同じ癌種であっても抗癌剤の至適投与量や組み合わせる抗癌剤の種類が異なってくる。本研究においても癌種によって抗癌剤の至適投与量や抗腫瘍効果は異なっていたが、同じ癌種においても個々の細胞株によって ICD 細胞の CRT の発現量が異なっており、抗癌剤治療は癌種による抗癌剤の選択だけではなく、患者ごとに個別の治療選択が必要であると考えられる。また、CRT の発現には腫瘍細胞がアポトーシス状態であることが必要といわれているが、低容量の抗癌剤投与であっても癌細胞がアポトーシスを起こすことにより CRT を細胞膜表面に発現し、直接的な殺細胞効果に依らない効腫瘍効果を発揮することが可

能となる。このメカニズムにより、抗癌剤治療は抗癌剤本来の作用である細胞毒性だけではなく、抗癌剤により誘導される免疫原性の亢進を介した抗腫瘍効果の増強も期待できる。それに加え、高齢者や合併症の多い癌患者に対しては、低用量の抗癌剤投与であっても腫瘍局所の微小環境と宿主の免疫応答を改善による抗腫瘍効果を期待できるだけでなく、副作用も軽減できる可能性がある。

今後、より効果的に CRT の発現を増強するメカニズムに関する研究や、臨床検体を用いて術前化学療法の有無による CRT の発現と予後の比較検討が必要であると考えられた。

総括及び結論

① 本研究から得られた新知見

・低用量の抗癌剤を暴露して作成した ICD 細胞は、動物実験において抗腫瘍効果が確認できた。

・動物実験において、ICD 細胞における細胞膜表面での CRT の発現量と抗腫瘍効果には相関関係が認められた。

・動物実験で採取した腫瘍の周囲に浸潤していた CD3 陽性 T 細胞数と、細胞膜表面での CRT の発現量との間には相関関係が認められた。

・ヒト癌細胞株において、ICD 細胞における CRT の発現量と HLA class I の発現量に相関関係が認められた。

② 新知見の意義

細胞膜表面での CRT の発現は、HLA class I 発現を介して腫瘍周囲の微小環境を変化させ、抗腫瘍効果を発揮することが示唆された。これまで、抗癌剤治療は免疫抑制効果があると考えられてきたが、癌種や使用する抗癌剤の種類によっては、免疫原性の亢進による抗腫瘍効果を発揮する。これにより、抗癌剤治療は抗癌剤本来の作用である細胞毒性だけではなく、抗癌剤により誘導される免疫原性の亢進を介した抗腫瘍効果の両者が期待できる。

③ 新知見に基づき今後展開されうる研究と課題

・CRT の発現量が抗腫瘍効果と相関関係にあったが、今後、発現量を増加させるメカニズムの解明が必要である。

・ヒト癌細胞株を用いて CRT の発現と HLA class I の発現には相関関係が認められたが、今後臨床検体を用いた免疫染色で、術前化学療法の有無により CRT の発現と予後の比較検討が必要である。

謝　辞

稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えていただきました北海道大学大学院消化器外科学教室Ⅱ　平野 聡 教授に深く感謝致します。また、研究全般にわたり、有意義な御指導御鞭撻いただきました北海道大学大学院消化器外科学教室Ⅱ　土川貴裕 講師に深く感謝致します。また、初期の実験指導や科学的考察の方法について御指導いただいた、北海道大学大学院医学研究科消化器外科学分野Ⅱ　故 宮本正樹 助教に深く感謝致します。また、本研究を遂行するにあたり、御協力いただいた北海道大学大学院消化器外科学教室Ⅱの皆様に心より感謝致します。

最後に、免疫組織染色法の技術的な助言をいただいた志田 啓 氏および実験試薬の準備に協力していただいた斉藤 直美 氏に感謝の意を表します.

引用文献

1. Rosenberg, S. A., Yang, J. C. & Restifo, N. P. Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat. Med.* 10, 909-915 (2004).

2. Tsuboi, A., Oka, Y., Katayama, Y., Elisseeva, O. A., Kawakami, M., Nishida, S., Morimoto, S., Murao, A., Nakajima, H., Hosen, N., Oji, Y. & Sugiyama, H. A Long-term WT1 peptide vaccination for patients with acute myeloid leukemia with minimal residual disease. *Leukemia* 26, 1410-1413 (2012)

3. Zhang, L., Morgan, R. A., Beane, J. D., Zheng, Z., Dudley, M. E., Kassim, S. H., Nahvi, A. V., Ngo, L. T., Sherry, R. M., Phan, G. Q., Hughes, M. S., Kammula, U. S., Feidman, S. A., Toomey, M. A., Kerkar, S. P., Restifo, N. P., Yang, J. C. & Rosenberg, S. A. Tumor-infiltrating lymphocytes generally engineered with an inducible gene encoding interleukin-12 for the immunotherapy of metastatic melanoma. *Clin. Cancer. Res.* 21, 2278-2288 (2015)

4. Tran, E., Robbins, P. F., Lu, Y. C., Prickett, T. D., Gartner, J. J., Jia, L., Pasetto, A., Zheng, Z., Ray, S., Groh, E. M., Kriley, I. R. & Rosenberg, S. A. T-cell transfer therapy targeting mutant KRAS in cancer. *N. Engl. J. Med.* 375, 2255-2262 (2016)

5. Nishino, M., Ramaiya, N. H., Chambers, E. S., Adeni, A. E., Hatabi, H., Janne, P. A., Hodi, F. S. & Awad, M. M. Immune-related response assessment during PD-1 Inhibitor therapy in advanced non-small-cell lung cancer patients. *J. Immunother. Cancer* Http://dx.doi.org/10.1186/s40425-016-0193-2 (2016)

6. Eggermont, A. M., Chiarion-Sileni, V., Grob, J. J., Dummer, R., Wolchok, J. D., Schmidt, H., Hamid, O., Robert, C., Ascierto, P. A., Richards, J. M.,

Lebbe, C., Ferraresi, V., Smylie, M., Weber, J.S., Maio, M., Bastholt, L., Mortier, L., Thomas, L., Tahir, S., Hauschild, A., Hassel, J. C., Hodi, F. S., Taitt, C., de Pril, V., de Schaetzen, G., Suciu, S. & Testori, A. Prolonged survival in Stage III melanoma with Ipilimumab adjuvant therapy. *N. Engl. J. Med.* 375, 1845-1855 (2016)

7. Martins, I., Kepp, O., Schlemmer, F., Adjemian, S., Tailler, M., Shen, S., Michaud, M., Menger, L., Gdoura, A., Tajeddine, N., Tesniere, A., Zitvogel, L. & Kroemer, G. Restoration of the immunogenicity of cisplatin-induced cancer cell death by endoplasmic reticulum stress. *Oncogene* 30, 1147-1158 (2011)

8. Zitvogel, L., Kepp, O. & Kroemer, G. Immune parameters affecting the efficacy of chemotherapeutic regimens. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 8, 151-160 (2011)

9. Homma, Y., Taniguchi, K., Murakami, T., Nakagawa, K., Nakazawa, M., Matsuyama, R., Mori, R., Takeda, K., Ueda, M., Ichikawa, Y., Tanaka, K. & Endo, I. Immunological impact of neoadjuvant chemoradiotherapy in patients with borderline resectable pancreatic ductal adenocarcinoma. *Ann. Surg. Oncol.* 21, 670-676 (2014)

10. Quail, D. F. & Joyce, J.A. Microenvironmental regulation of tumor progress and metastasis. *Nat. Med.* 19, 1423-1437 (2013)

11. Ben-Shoshan, J., Maysel-Auslender, S., Mor, A., Keren, G. & George, J. Hypoxia controls CD4+CD25+ regulatory T-cell homeostasis via hypoxia-inducible factor-1alfa. *Eur. J. Immunol.* 38, 2412-2418 (2008)

12. Dang, E. V., Barbi, J., Yang, H. Y., Jinasena, D., Yu, H., Zheng, Y., Bordman, Z., Fu, J., Kim, Y., Yen, H. R., Luo, W., Zeller, K., Shimoda, L., Topalian, S. L., Semenza, G. L., Dnag, C. V., Pardoll, D. M. & Pan, F. Control of T (H) 17/ T (reg) balance by hypoxia-inducible factor 1. *Cell* 146,

772-784 (2011)

13. Brode, S. & Cooke, A. Immune-potentiating effects of the chemotherapeutic drug cyclophosphamide. *Crit. Rev. Immunol.* 28,109-126 (2008)

14. Kawano, M., Tanaka, K., Itonaga, I., Iwasaki, T., Miyazaki, M., Ikeda, S. & Tsumura, H. Dendritic cells combined with doxorubicin induces immunogenic cell death and exhibits antitumor effects for osteosarcoma. *Oncol. Let.* 11, 2169-2175 (2016)

15. Obeid, M., Tesniere, A., Ghiringhelli, F., Fimia, G. M., Apetoh, L., Perfettini, J. L., Castedo, M., Mignot, G., Panaretakis, T., Casares, N., Metivier, D., Larochette, N., van Endert, P., Ciccosanti, F., Piacentini, M., Zitvogel, L. & Kromer, G. Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat. Med.* 13, 54-61 (2007)

16. Hodge, J. W., Garnett, C. T., Farsaci, B., Palena, C., Tsang, K. Y., Ferrone, S. & Gameiro, S. R. Chemotherapy-induced immune modulation of tumor cells enhances killing by cytotoxic T lymphocytes and is distinct from immune cell death. *Int. J. Cancer* 133, 624-636 (2013)

17. Curtin, N. J. DNA repair dysregulation from cancer driver to therapeutic target. *Nat. Rev. Cancer* 12, 801-817 (2012)

18. Galluzzi, L., Senovilla, L., Zitvogel, L. & Kroemer, G. The secret ally: immunostimulation by anticancer drugs. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 11, 215-233 (2012)

19. Berraondo, P., Umansky, V. & Melero, I. Changing the tumor microenvironment: new strategies for immunotherapy. *Cancer. Res.* 72, 5159-5164 (2012)

20. Cho, Y., Miyamoto, M., Kato, K., Fukunaga, A., Shichinohe, T., Kawarada,

Y., Hida, Y., Oshikiri, T., Kurokawa, T., Suzuoki, M., Nakakubo, Y., Hiraoka, K., Murakami, S., Shinohara, T., Itoh, T., Okushiba, S., Kondo, S. & Katoh, H. $CD4^+$and $CD8^+$ T cells cooperate to improve prognosis of patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer. Res.* 63, 1555-1559 (2003)

21. Fukunaga, A., Miyamoto, M., Cho, Y., Murakami, S., Kawarada, Y., Oshikiri, T., Kato, K., Kurokawa, T., Suzuoki, M., Nakakubo, Y., Hiraoka, K., Itoh, T., Morikawa, T., Okushiba, S., Kondo, S. & Katoh, H. $CD8^+$tumor- infiltrating lymphocytes together with $CD4^+$ tumor-infiltrating lymphocytes and dendritic cells improve the prognosis of patients with pancreatic adenocarcinoma. *Pancreas* 28, 26-31 (2004)

22. Hiraoka, K., Miyamoto, M., Cho, Y., Suzuoki, M., Oshikiri, T., Nakakubo, Y., Itoh, T., Ohbuchi, T., Kondo, S. & Katoh, H. Concurrent infiltration by $CD8^+$ T cells and $CD4^+$ T cells is a favourable prognostic factor in non-small-cell lung carcinoma. *Br. J. Cancer* 94, 275-280 (2006)

23. Tsuchikawa, T., Md, M. M., Yamamura, Y., Shichinohe, T., Hirano, S. & Kondo, S. The immunological impact of neoadjuvant chemotherapy on the tumor microenvironment of esophageal squamous cell carcinoma. *Ann. Surg. Oncol.* 19, 1713-1719 (2012)

24. Tsuchikawa, T., Hirano, S., Tanaka, E., Matsumoto, J., Kato, K., Nakamura, T., Ebihara, Y. & Shichinohe, T. Novel aspects of preoperative chemoradiation therapy improving anti-tumor immunity in pancreatic cancer. *Cancer. Sci.* 104, 531-535 (2013)

25. Casares, N., Pequignot, M. O., Tesniere, A., Ghiringhelli, F., Roux, S., Chaput, N., Schmitt, E., Hamai, A., Hervas-Stubbs, S., Obeid, M., Coutant, F., Metivier, D., Pichard, E., Aucouturier, P., Pierron, G., Garrido, C., Zitvogel, L. & Kroemer, G. Caspase-dependent

immunogenicity of doxorubicin-induced tumor cell death. *J. Exp. Med.* 202, 1691-1701 (2005)

26. Obeid, M., Panaretakis, T., Joza, N., Tufi, R., Tesniere, A., van Endert, P., Zitvogel, L. & Kroemer, G. Calreticulin exposure is required for the immunity of gamma-irradiation and UVC light-induced apoptosis. *Cell. Death. Differ.* 14, 1848-1850 (2007)

27. Gemeiro, S. R., Jammeh, M. L., Wattenberg, M. M., Tsang, K. Y., Ferrone, S. & Hodge, J. W. Radiation-induced immune modulation of tumor enhances antigen processing and calreticulin exposure, resulting in enhanced T-cell killing. *Oncotarget* 30, 403-416 (2014)

28. Hanayama, R., Tanaka, M., Miwa, K., Shinohara, A., Iwamatsu, A. & Nagata, S. Identification of a factor that links apoptotics cells to phagocytes. *Nature* 417, 182-187 (2002)

29. Panaretakis, T., Kepp, O., Brockmeier, U., Tesniere, A., Bjorklund, A. C., Chapman, D. C., Durchschlag, M., Joza, N., Pierron, G., van Endert, P., Yuan, J., Zitvogel, L., Madeo, F., Williams, D. B. & Kroemer, G. Mechanisms of pre-apoptotic carleticulin exposure in immune cell death. *EMBO. J.* 28, 578-590 (2009)

30. Tesniere, A., Schlemmer, F., Boige, V., Kepp, O., Martins, I., Ghiringhelli, F., Aymeric, L., Michaud, M., Apetoh, L., Barault, L., Mendiboure, J., Pignon, J. P., Jooste, V., van Endert, P., Ducreux, M., Zitvogel, L., Piard, F. & Kroemer, G. Immunogenic death of colon cancer cells treated with oxaliplatin. *Oncogene* 29, 482-491 (2010)

31. Rathore, A. S., Kumar, S., Konwar, R., Srivastava, A. N., Makker, A. & Goel, M. M. Presence of CD3+ tumor infiltrating lymphocytes is significantly associated with good prognosis in infiltrating ductal carcinoma of breast. Indian. *J. Cancer* 50, 239-244 (2013)

32. Del Cid, N., Jeffery, E., Rizvi, S. M., Stamper, E., Peters, L. R., Brown, W. C., Provoda, C. & Raghavan, M. Modes of calreticulin recruitment to the major histocompatibility complex class I assembly pathway. *J. Biol. Chem.* 12, 4520-4535 (2010)

33. Raghavan, M., Del Cid, N., Rizvi, S. M. & Peters, L. R. MHC class I assembly: out and about. *Trends. Immunol.* 29, 436-443 (2008)

34. Rizvi, S. M., Del Cid, N., Lybarger, L. & Raghavan, M. Distinct functions for the glycans of tapasin and heavy chains in the assembly of MHC class I molecules. *J. Immunol.* 186, 2309-2320 (2011)