Veränderung der Tumormikroumgebung (TME) im Rahmen einer Hyperthermie

Dr. med. Matthias Kraft

Einleitung

Im Jahre 2018 gab es den Nobelpreis für Medizin und Physiologie für die Entdeckung immunologisch orientierter Methoden in der Tumortherapie. Immuncheckpoint-Inhibitoren (ICIs) haben pharmakologisch eine neue Ära in der Tumortherapie eingeleitet. Leider ist es so, dass nicht alle Tumorpatienten von der Therapie mit Immuncheckpoint-Inhibitoren (ICIs) profitieren, welches auch für andere Ziel gerichtete Therapieformen gilt. Ein wesentlicher Grund hierfür ist bei vielen Tumoren die für das Immunsystem feindliche Tumormikroumgebung (tumor microenvironment = TME]. Bereits Rudolf Virchow erkannte, dass „Entzündungszellen in Tumorgeweben reichlich vorhanden sind". Die Tumormikroumgebung besteht aus Immun- und Entzündungszellen, Stromazellen mit desmoplastischen Reaktionen, alterierten Blut- und Lymphgefäßen, Zytokinen, sezernierten Proteinen, RNAs und kleinen Organellen und machen ca. 50 % des Tumorgewebes aus *[1]*. Heute wissen wir, dass durch Signaltransduktionskaskaden und interzelluläre Interaktionen die TME durch den Tumor selbst moduliert und die Interaktion zwischen Tumor und Immunzellen aktiv beeinflusst wird *[2]*. Zudem schafft es der Tumor durch Aktivierung bestimmter Stoffwechselwege peritumoral ein saures Milieu durch eine vermehrte Produktion von Laktat und eine hypoxische Umgebung zu generieren, welche das Immunsystem lähmt. Mit Blick auf den Immunstatus können Tumore als „kalt" und „heiß" klassifiziert werden. „Kalte" Tumoren weisen eine geringere T-Zell-Infiltration, PD-L1-Expression und Anreicherung immunsuppressiver Zellen auf. Dies geht einher mit einer geringen Ansprechrate auf verschiedene Therapieformen, so auch auf eine Immuntherapie durch z. B. Immuncheckpoint-Inhibitoren (ICIs) *[3]*. Eine Anti-Angiogenese-Behandlung, Strahlentherapie oder Chemotherapie erhöht die Behandlungswirksamkeit von ICIs, indem sie den Immunstatus des TME durch Exposition von tumorspezifischen Antigenen, Normalisierung des Endothels, Rektrutierung von Immunzellen usw. transformiert *[4–6]*. Dies gilt gleichwohl für die Hyperthermiebehandlung, welche bekannter Weise ebenfalls den Immunstatus des TME modulieren und das Immunsystem beeinflussen kann *[7]*. Die immunmodulatorischen Effekte machen die Hyperthermie nicht nur zu einer Behandlung, die in der Lage ist, das körpereigene Immunsystem in die Lage zu versetzen, sich gegen Krebs verteidigen zu können. Hyperthermie ist darüber hinaus auch eine zuverlässige Behandlungsmethode, die eine Typ-I-ähnliche Tumormikroumgebung (Überexpression von PD-L1 und Anreicherung von tumorinfiltrierenden Lymphozyten) genieren kann. Im Folgenden soll eine Gruppe von immunbezogenen Faktoren zusammengefasst werden, die durch Hyperthermie induzierbar sind und die komplementäre Wirkung der Hyperthermie auf die Immunogenität und Immunreaktivität in der Tumormikroumgebung dargestellt werden. Dies ohne Anspruch auf Vollständigkeit, da viele Mechanismen noch nicht gänzlich verstanden sind und wir wahrscheinlich diese in Zukunft auch nicht in Gänze verstehen werden können. Aber der Weg ist das Ziel.

Hyperthermie ist nicht gleich Hyperthermie

Hyperthermie ist eine Methode, um Krebszellen abzutöten oder ihr Wachstum zu behindern, indem die Gewebetemperatur mit einer externen oder intern platzierten Wärmequelle für einen bestimmten Zeitraum erhöht wird. Dies kann auch durch die intravenöse Gabe von Bakterienkonjugaten alleine, oder in Kombination mit einer Misteltherapie. Frühe Studien fanden heraus, dass Fieber mit einer spontanen Tumorregression korrelierte. Bereits Hippokrates, der Vater der modernen Medizin, sagte: „Diejenigen, die nicht durch eine Operation geheilt werden können, können durch Hitze geheilt werden. Diejenigen, die nicht durch Hitze geheilt werden können, sind in der Tat unheilbar." Dies beruhte auf Erfahrungswerten. Bahnbrechende Studien von WB Coley zeigten, dass Fieber zu einer spontanen Tumorregression führen kann, woraufhin er ein Serum aus Bakterien zur Fieberinduktion entwickelte. Seit dem letzten Jahrhundert wird Hyperthermie häufig bei Patienten mit lokoregionären und fortgeschrittenen Krebserkrankungen eingesetzt. Auch die Kombination von Hyperthermie und Radio-/Chemotherapie hat sich in zahlreichen klinischen Studien als wirksam für die Tumorkontrolle erwiesen. Hyperthermie kann je nach Zielorgan als lokale (Mikrowelle, Radiowelle oder Ultraschall), regionale (hypertherme intraperitoneale Chemotherapie) und Ganzkörperhyperthermie (extern, intern) klassifiziert werden. Basierend auf Temperaturberei-

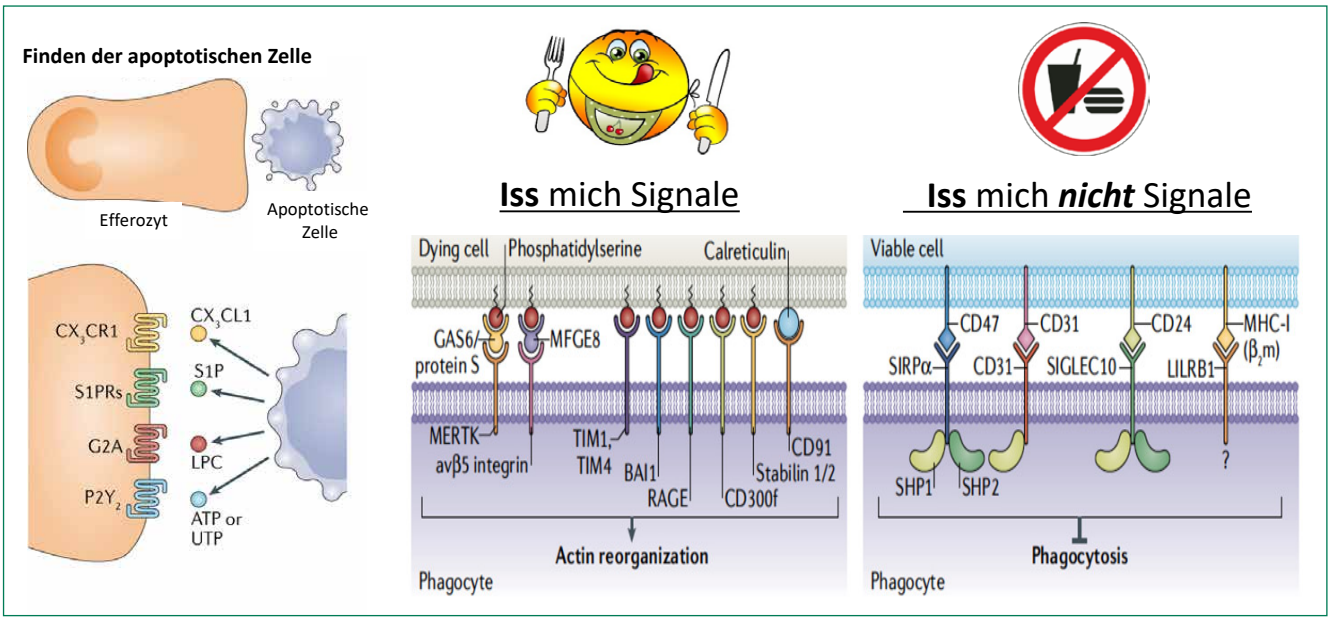


Abb. 1 *„Iss mich Signale" sind wesentliche Charakteristika für eine effektive Tumorkontrolle durch das zelluläre Immunstem. Viele Tumore sind in der Lage „Friss mich nicht" Signale zu generieren und entziehen sich so der Phagozytose oder der Efferozytose nach Apoptose. Hierdurch kann eine regelrechte Aktivierung des zellulären Immunsystems durch dendritische Zellen oder Makrophagen nicht mehr erfolgen [modfiziert nach: (21) und Doran AC, Yurdagul A Jr, Tabas I. Efferocytosis in health and disease. Nat Rev Immunol. 2020 Apr;20(4):254–267].*

chen kann die Hyperthermie als Temperaturhyperthermie im moderaten Fieberbereich (39–40°C), leichte Temperaturhyperthermie (Hitzeschocktemperatur, 41–43 °C) und Thermoablation (zytotoxische Temperatur, >43 °C) eingestuft werden. Die Hyperthermie mit magnetischen Nanopartikeln, die Kryo-Thermotherapie und die Photothermie sind neu entwickelte Behandlungsmethoden, die ebenfalls zur Kategorie der Hyperthermie gehören, aber noch nicht generell verfügbar sind und das Therapiespektrum in Zukunft erweitern könnten.

Hyperthermie und allgemeine Auswirkungen auf das Immunsystem

Das T-Zell-basierte Immunsystem reagiert häufig auf sogenannte Neoantigene, die als Folge einer akkumulierten DNA-Schädigung entstehen. Diese Schädigung wird auch als Tumormutationslast bezeichnet *[9, 10]*. Hyperthermie induziert direkt und indirekt DNA-Schäden und beeinflusst verschiedene DNA-Reparaturkaskaden dahingehend, dass Mutationen im Tumorgenom zur Produktion von Neoantigenen beitragen *[11]*. Hyperthermie schafft so eine Blockade von Reparaturmechanismen, die es der Tumorzelle erschweren, sich weiter zu teilen. Darüber hinaus kann Hyperthermie die DNA-Schädigung in Tumorstammzellen, die gegen die meisten klassischen Behandlungsschemata resistent sind und die Rezidivhäufigkeit signifikant erhöhen, fördern *[12]*. Die verstärkte Akkumulation irreversibler zellulärer DNA-Schäden unterstützt den Einsatz von Hyperthermie insbesondere als Ergänzung zur Behandlung mit Chemotherapie oder Bestrahlung *[13]*. Für die potentielle Initiierung einer Immunität löst jedoch nur ein immunogenes Merkmal, das durch den immunogenen Zelltod (ICD) definiert ist, eine Immunantwort aus. Der immunogene Zelltod ist gebunden an die gleichzeitige Erzeugung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS, Typ I) und der Aktivierung von endoplasmatischem Retikulum Stress (ER-Stress, Typ II) *[14, 15]*. Hier spielen sogenannte „Eat me"-Signale eine wesentliche Rolle *[16–18]*. Leider exprimieren Tumore häufig „do not eat me" Signale an Ihrer Oberfläche, welche eine effektive Phagozytose und somit den immunogenen Zelltod hemmen (Abb. 1). Hier scheint vor allem die Interaktion zwischen CD47 und SIRPα eine wesentliche Rolle zu spielen. Der immunogene Zelltod hat sich als wichtiger Trigger für die Generierung einer tumorfeindlichen TME herausgestellt, da er die verschiedenen funktionellen, immunologisch aktiven Zellinfiltrate und Zytokine bereitstellt, die die Tumorzelldestruktion unterstützen *[15, 19]*. Obwohl häufig kontrovers diskutiert, scheint die Hyperthermie eine Art ICD-Induktor zu sein. Je nach Temperatur induziert Hyperthermie einen apoptotischen (41–43 °C) oder einen nekrotischen Zelltod (> 43°C, Bereich der Thermoablation) *[20]*. Über den Einfluss der Hyperthermie auf weitere, Zell destruierende komplexe Mechanismen wie Ferroptose, Pyroptose, Efferocytose oder Mikro-/Makropinozytose ist aktuell das Wissen noch nicht gereift, könnten aber in Zukunft für wesentliche Impulse in der Forschung und Therapie sorgen *[21]*. Die durch thermische Ablation induzierte Nekrose ist ein pathologischer Zelltod, der eine immu-

nogene Entzündungsreaktion hervorrufen kann *[22]*. Im Gegensatz zur Thermoablation kann die Hyperthermie im Fieberbereich nur die Fluidität und Stabilität der Zellmembran beeinflussen, die Zellmorphologie verändern und den intrazellulären Natrium-Kalzium-Spiegel beeinflussen *[23]*. Bei dieser Temperatur können jedoch die für eine immunogene Zellantwort benötigten Grundlagen geschaffen werden, da Hitzeschockreaktion und die ER-Belastung gleichzeitig auftreten. Es wurde postuliert, dass HSPs, die durch Hitzeschockreaktionen induziert werden, entweder die Aktivierung verringern oder den ER-Stress lindern, indem sie ein negatives Rückkopplungssystem der ungefalteten Proteinantwort (UPR) aktivieren, um eine übermäßige Aktivierung zu vermeiden und Tumorzellen sowohl vor Caspase-abhängiger als auch vor Caspase-unabhängiger Apoptose zu schützen, die durch oxidativen Stress ausgelöst wird *[24]*. Während die Temperatur zwischen dem „Fieberbereich" und dem „Thermoablationsbereich" bei 41–43 °C ansteigt, starben Tumorzellen überwiegend durch Apoptose. Neuere Studien deuten darauf hin, dass bestimmte Arten von Behandlungen, die die Apoptose von Tumorzellen induzieren, auch DAMPs freisetzen und ICD induzieren können. Schadensassoziierte molekulare Muster (Damage-associated molecular patterns, DAMPs) sind Moleküle in Zellen, die Bestandteil der angeborenen Immunantwort sind und von geschädigten oder absterbenden Zellen freigesetzt werden. Krebszellen, die dem immunogenen Zelltod (ICD) erliegen, exprimieren in der Regel Calreticulin (CRT) auf ihrer Oberfläche, was die Aufnahme von Zelldebris durch professionelle Phagozyten fördert und letztlich die Initiierung der Krebsimmunität unterstützt. CRT-Mutationen mit Funktionsverlust fördern also die Onkogenese nicht nur, weil sie die zelluläre Homöostase in gesunden Zellen beeinträchtigen, sondern auch, weil sie die natürliche und therapiebedingte Immunüberwachung gefährden. Weitere wesentliche Faktoren für den immunogenen Zelltod ist die Freisetzung von High Mobility Group Box 1 (HMGB1) und die Sekretion von Adenosintriphosphat (ATP), auf die in diesem Beitrag nicht näher eingegangen werden soll *[26]*. HMGB1, oder Amphoterin, ist ein Protein, das unter Stress und von abgestorbenen Zellen freigesetzt wird und als körpereigener Alarmstoff, also als DAMP, dient. Es ist normalerweise im Zellkern gelegen, kann aber unter oben genannten Bedingungen in das Zytoplasma wandern und über Vesikel auch nach extrazellulär sezerniert werden. Tatsächlich erhöhte die Hitzeschockkonditionierung von Krebszellen ihre CRT-Plasmamembrantranslokation und induzierte die Freisetzung des HMGB1-Proteins. Darüber hinaus waren sowohl die CRT, als auch die HMGB1-Mobilisierung, mit einer verstärkten Antigen-Kreuzpräsentation und einer Antigen-Antigen-Zellreifung nach Hyperthermie im milden Temperaturbereich von 41–43°C assoziiert *[27, 28]*. Unter Berücksichtigung der ICD-assoziierten biologischen Ereignisse von ER-Stress, ROS und Apoptose und der damit einhergehenden erzeugten DAMPs kann die Hyperthermie als ICD-Induktor angesehen werden und somit eine vom Tumor induzierte, seinem Wachstum förderliche, in eine tumorfeindliche Mikroumgebung umwandeln *[26, 29]*.

Hyperthermie und Hitzeschockproteine

Hitzeschock-Proteine (HSPs) sind eine Gruppe von hochkonservierten Chaperonproteinen, die in einer Vielzahl von Tumorzellen synthetisiert werden. Chaperone sind somit Proteine, die in Zellen für die korrekte Faltung anderer komplexer Proteine sorgen. Zu diesen zählen unter anderem HSP70, HSP60, HSP90. Erhöhte HSPs sind bei den meisten Krebsarten in der Regel mit einer schlechten Prognose verbunden. Die überexprimierten HSPs nach Hyperthermie sind jedoch auch mit einer verstärkten Immunantwort verbunden. In Übereinstimmung mit dem Zusammenhang zwischen biologischen Ereignissen und Temperatur werden HSPs bei ca. 41 °C freigesetzt und erreichen bei 43 °C ein Maximum *[30]*. Lin et al. fanden heraus, dass die maximale extrazelluläre HSP-Synthese bei 43 °C lag, ebenso wie der maximale modulatorische Effekt für die Tumorregression und die verringerte Metastasierungsrate. Wenn die Temperatur weiter erhöht wurde, nahm die HSP-Synthese ab, und die immunmodulatorische Wirkung der Hyperthermie wurde herunterreguliert *[31]*.

Hyperthermie und Antigen-Präsentation/ Priming

Es ist seit Jahren bekannt, dass milder thermischer Stress die Aktivitäten dendritischer Zellen (DCs) zur Kontrolle von Infektionen und Tumorwachstum reguliert *[32, 33]*. Die Aktivierung von APCs beeinflusst direkt die tumorspezifischen T-Zell-Antworten. Hyperthermie reguliert hauptsächlich „Phagozytose-Checkpoints", indem sie die immunogenen „Eat me"-Signale verstärkt und „Iss mich nicht"-Signale unterdrückt *[34]*. Darüber hinaus kann die Hyperthermie auch tolerogene (immunsuppresive) „Eat me"-Signale hemmen, indem sie unreife APCs und/oder APCs mit immunsuppressiven Phänotypen (M2-Makrophagen, N2-Neutrophile, myeloische Suppressorzellen) in einen relativ reifen Typ umwandelt *[35, 36]*. Diese Transformationen umfassen die Infiltration aktivierter Monozyten in die Tumormikroumgebung *[37]*, die Induktion unreifer DCs zur Differenzierung in reife DCs *[38]*, die Förderung der Makrophagenpolarisation zum M1-Typ, der proinflammatorische Wirkungen ausübt, und die Förderung der Freisetzung von Entzündungsmediatoren *[39, 40]*. Studien deuten darauf hin, dass das bloße Erhitzen von Tumorzellen unreife DCs

nicht ausreichend aktivieren kann. Nur wenn sowohl Tumorzellen als auch unreife DCs sequentiell mit Hyperthermie behandelt werden, können die unreifen DCs effektiv aktiviert werden. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die Reifung von DCs nicht nur von Gefahrensignalen durch HSPs abhängt, sondern auch von der Hyperthermie selbst und hat zur dendritischen Zelltherapie geführt *[41]*. In zwei weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass die Hyperthermie im Fieberbereich DCs von einem Ruhezustand in einen aktivierten Status überführt, indem sie die metabolische Reprogrammierung in ihnen fördert *[42, 43]*. Die Autoren postulierten, dass Hyperthermie die Expression des insulinähnlichen Wachstumsfaktor-bindenden Proteins 6 (IGFBP-6) und HSP70 erhöht. Konsekutiv wird hierdurch die Glykolyse gesteigert, die Aktivität der mitochondrialen Atmungskette und die daraus resultierende oxidative Phosphorylierung (OxPhos) verringert und des Weiteren die Produktion von NO und ROS stimuliert.

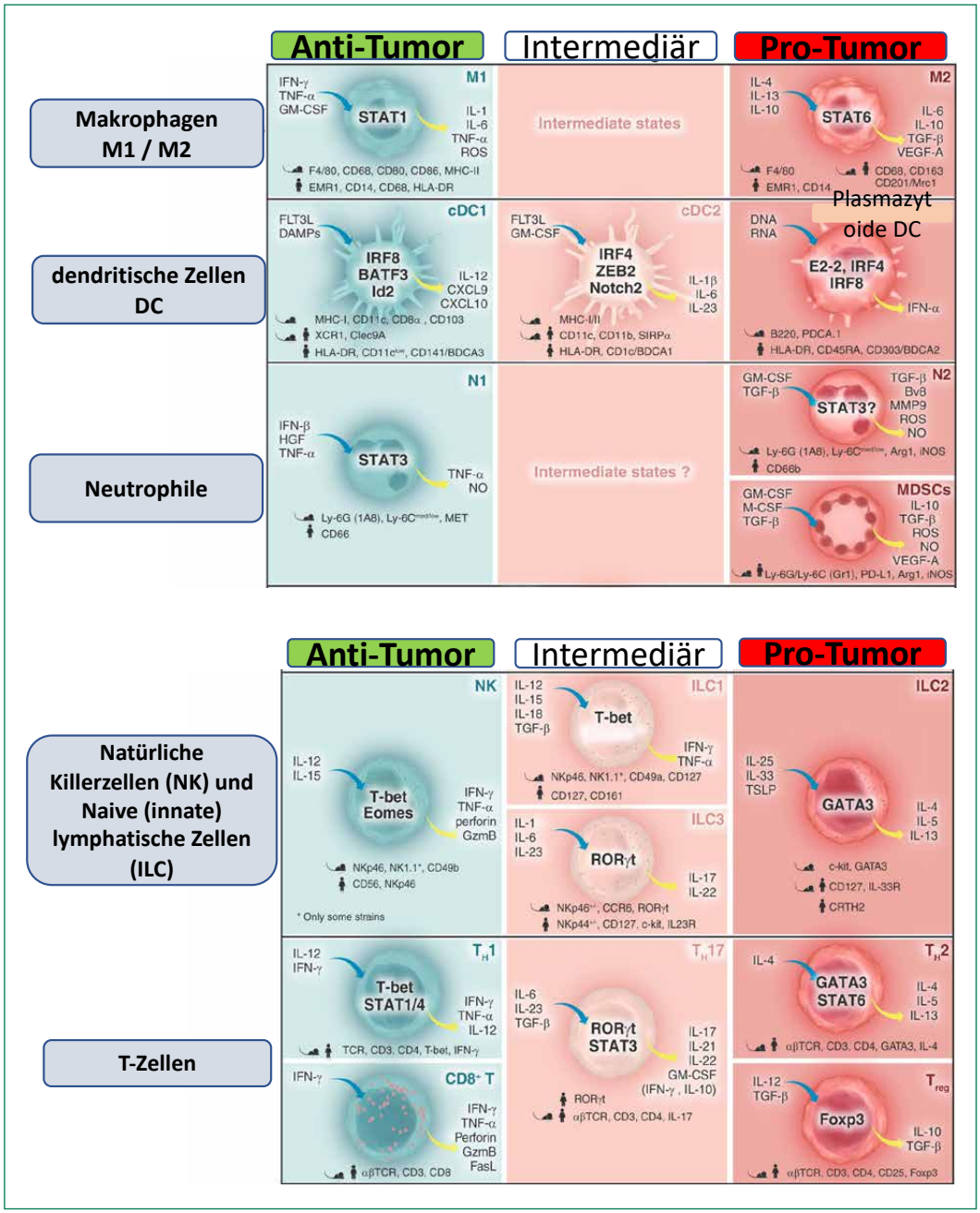


Abb. 2 *Tumormikroumgebung und Immunabwehr: Im Tumorstroma koexistieren Entzündungszellen welche je nach Umgebungsbedingungen entweder eine tumorzellhemmende Funktion haben, oder Promoter des Tumorwachstums sein können. Hier spielen Zytokine, Chemokine aber auch der Tumor selbst eine wesentliche Rolle. Viele Tumore generieren eine Tumormikroumgebung welche feindlich für das Immunsystem ist [modifiizert nach: Cell Research (2020) 30:562–563 https://doi.org/10.1038/s41422–020–0326–5].*

Hyperthermie korrigiert eine dysfunktionale CD4-T-Zell-Immunantwort

CD4-T-Zellen weisen einen hohen Grad an Plastizität auf, um sich als Reaktion auf unterschiedliche Tumorumgebungen in Th1-, Th2-, Th17- und regulatorische T-Zellen (Tregs) zu differenzieren *[44, 54]*. Th1-Zellen üben zusammen mit ihren erzeugten Chemokinen eine ausgeprägte Anti-Tumor-Aktivität aus, indem sie die Bildung neuer Blutgefäße blockieren und die Rekrutierung tumortötender Immunzellen fördern. Intratumorale FoxP3 positive Tregs behindern eine wirksame Immunantwort gegen Krebs. Im Gegensatz zur Funktion von Tregs können Th17-Zellen prominente Kandidaten für die adoptive T-Zelltherapie sein *[46–48]*. Die funktionelle systemische CD4-T-Zell-Immunität ist essentiell für das Priming von zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) sowie die Entwicklung von Gedächtnis-CTL *[49, 50]* (Abb. 2). Die Hyperthermie zeigte das Potenzial, eine dysfunktionale CD4-T-Zell-Immunantwort zu korrigieren, indem CD4-T-Zellen zu Th1 driften und Treg-Zellen in Th17-Zellen umgewandelt werden, um eine günstige TME zu rekonstituieren. Die durch die Hyperthermie induzierte Reifung von dendritischen Zellen ist eine Voraussetzung für die weitere Differenzierung von CD4-T-Zellen *[39, 51]*. Neben der Hyperthermie im Fieberbereich (39–40 °C) hemmt sie das Th2- und Treg-Wachstum, induziert die Th1- und Tc1-Proliferation der Milz und fördert die Th1-Zell-assoziierte Sekretion von IL-2, IFN-γ und TNF-α *[52]*. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die kombinierte Strahlentherapie mit Hyperthermie im Vergleich zur alleinigen Strahlentherapie die Tumormikroumgebung und das Th1/Th2-Verhältnis reguliert *[53]*. Hyperthermie bei 41°C für 30 min. induziert intra-tumoral die Bildung inflammatorischer Zytokine und Chemokine, welche zu einer vermehrten Extravasation von Immmunzellen in das Tumorgewebe führt *[54]*. Insbesondere erhöht eine leichte Hyperthermie die Expression von L-Selektin, P-Selektin und interzellulärem Zelladhäsionsmolekül-1 (ICAM-1) in der Gefäßwand und treibt die Produktion einer Reihe von pro-inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen (d.h. Interleukin-1β, IL-6, IL-8, IL-10 und CCL22) voran *[55–58]*. Diese inflammatorischen Zytokine und Chemokine wirken in mehreren diskreten Schritten, unter anderem auch über eine Hyperperfusion des Gewebes. In letzter Konsequenz kommt es zu einer vermehrten Extravasation von Lymphozyten in die Mikroumgebung des Tumors und nach Ausbildung eines chemotaktischen Gardienten zu einer Effektivit.

Schlussfolgerung

Die Hyperthermie verändert nachhaltig die immunologische Reaktivität des Tumorzellstromas. Durch die Bereitstellung von Gefahrensignalen, die Reduktion einer hypoxischen Tumorumgebung, die Rekrutierung und Umprogrammierung von Immunzellen in die TME, Veränderung der Gefäßstrukturen *[59]* und der wärme induzierten Hyperperfusion des Tumorstromas ist die Hyperthermie an mehreren Schritten bei der Regulierung von Signalwegen im Krebs-Immunitätszyklus beteiligt (Abb. 3). Die immunmodulatorische Wirkung macht die Hyperthermie nicht nur zu einer Behandlung, die

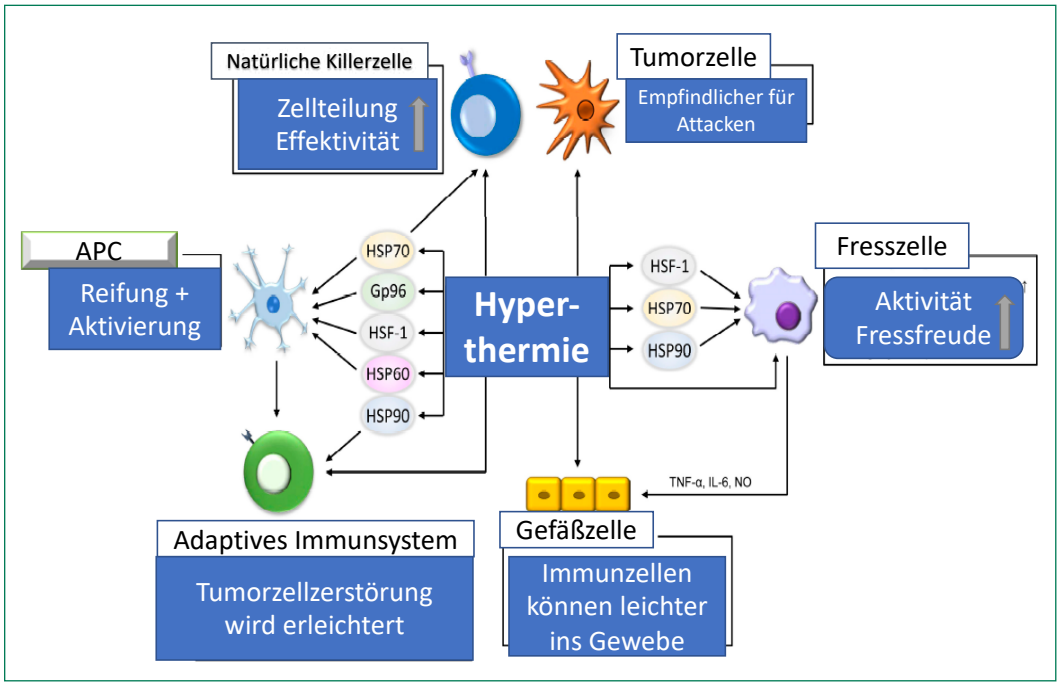


Abb. 3 *Auswirkungen der Hyperthermie auf das Immunsystem, Zusammenfassung*

in der Lage ist, in einem multimodalen Ansatz therapeutisch positive Effekte in der Krebstherapie zu generieren. Eine Kombination mit Chemotherapie und/oder Strahlentherapie erhöht nachweislich die Effektivität der Behandlung. Zudem ist aus Tumor-immunbiologischer Sicht die Kombination mit Immuncheckpoint-Inhibitoren, Multikinase-Rezeptor-Antagonisten/small molecules und die Kombination mit Anti-Angiogenese Inhibitoren im Rahmen einer Ziel-gerichteten individuellen Therapie, insbesondere auch unter Einsatz komplementär-onkologischer Verfahren, ein vielsprechender Ansatz, um die Effektivität einer Tumortherapie zu erhöhen. Sollte es gelingen, über die Schulmedizin den Zugang zu größeren prospektiven Studien Level A zu schaffen, hätte man auch hinsichtlich sogenannter Leitlinien die Möglichkeit, sich in diesen zu etablieren.

Dr. med. Matthias Kraft
Tischbergerstraße 5+8
6887 Bad Bergzabern | Deutschland
www.biomed-klinik.de

Literatur

[1] *Wu T, Dai Y. Tumor microenvironment and therapeutic response. Cancer Lett. 2017 Feb 28;387:61-68*
[2] *Chen DS, Mellman I. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. Immunity. 2013 Jul 25;39(1):1-10*
[3] *Teng MW, Ngiow SF, Ribas A, et al. Classifying Cancers Based on T-cell Infiltration and PD-L1. Cancer Res. 2015 Jun 1;75(11):2139-45*
[4] *Osipov A, Saung MT, Zheng L et al.. Small molecule immunomodulation: the tumor microenvironment and overcoming immune escape. J Immunother Cancer. 2019 Aug 22;7(1):224*
[5] *Wang Y, Deng W, Li N, Neri S. et al. Combining Immunotherapy and Radiotherapy for Cancer Treatment: Current Challenges and Future Directions. Front Pharmacol. 2018 Mar 5;9:185*
[6] *Fukumura D, Kloepper J, Amoozgar Zet al. Enhancing cancer immunotherapy using antiangiogenics: opportunities and challenges. Nat Rev Clin Oncol. 2018 May;15(5):325-340*
[7] *Repasky EA, Evans SS, Dewhirst MW. Temperature matters! And why it should matter to tumor immunologists. Cancer Immunol Res. 2013 Oct;1(4):210-6*
[8] *Coley WB. The Treatment of Malignant Tumors by Repeated Inoculations of Erysipelas American Journal of the Medical Sciences. (1893). 10: 487–511*
[9] *Germano G, Lamba S, Rospo G et al. Inactivation of DNA repair triggers neoantigen generation and impairs tumour growth. Nature. 2017 Dec 7;552(7683):116-120*
[10] *Schumacher TN, Scheper W, Kvistborg P. Cancer Neoantigens. Annu Rev Immunol. 2019 Apr 26;37:173-200*
[11] *Mantso T, Goussetis G, Franco R et al. Effects of hyperthermia as a mitigation strategy in DNA damage-based cancer therapies. Semin Cancer Biol. 2016 Jun;37-38:96-105*
[12] *Oei AL, Vriend LEM, Krawczyk PM et al. Targeting therapy-resistant cancer stem cells by hyperthermia. Int J Hyperthermia. 2017 Jun;33(4):419-427*
[13] *Hurwitz M, Stauffer P. Hyperthermia, radiation and chemotherapy: the role of heat in multidisciplinary cancer care. Semin Oncol. 2014 Dec;41(6):714-29*
[14] *Radogna F, Diederich M. Stress-induced cellular responses in immunogenic cell death: Implications for cancer immunotherapy. Biochem Pharmacol. 2018 Jul;153:12-23*
[15] *Krysko DV, Garg AD, Kaczmarek A et al. Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy. Nat Rev Cancer. 2012 Dec;12(12):860-75*
[16] *Garg AD, Krysko DV, Verfaillie T et al. A novel pathway combining calreticulin exposure and ATP secretion in immunogenic cancer cell death. EMBO J. 2012 Mar 7;31(5):1062-79*
[17] *Panaretakis T, Kepp O, Brockmeier U et al. Mechanisms of pre-apoptotic calreticulin exposure in immunogenic cell death. EMBO J. 2009 Mar 4;28(5):578-90*
[18] *Nagata S, Tanaka M. Programmed cell death and the immune system. Nat Rev Immunol. 2017 May;17(5):333-340*
[19] *Inoue H, Tani K. Multimodal immunogenic cancer cell death as a consequence of anticancer cytotoxic treatments. Cell Death Differ. 2014 Jan;21(1):39-49*
[20] *Diederich CJ. Thermal ablation and high-temperature thermal therapy: overview of technology and clinical implementation. Int J Hyperthermia. 2005 Dec;21(8):745-53*
[21] *Boada-Romero E, Martinez J, Heckmann BL et al. The clearance of dead cells by efferocytosis. Nat Rev Mol Cell Biol. 2020 Jul;21(7):398-414*
[22] *Kono H, Rock KL. How dying cells alert the immune system to danger. Nat Rev Immunol. 2008 Apr;8(4):279-89*
[23] *de Andrade Mello P, Bian S et al.. Hyperthermia and associated changes in membrane fluidity potentiate P2X7 activation to promote tumor cell death. Oncotarget. 2017 Jun 21;8(40):67254-67268*
[24] *Homma T, Fujii J. Heat stress promotes the down-regulation of IRE1 in cells: An atypical modulation of the UPR pathway. Exp Cell Res. 2016 Nov 15;349(1):128-138*
[25] *Pallepati P, Averill-Bates D. Mild thermotolerance induced at 40 degrees C increases antioxidants and protects HeLa cells against mitochondrial apoptosis induced by hydrogen peroxide: Role of p53. Arch Biochem Biophys. 2010 Mar 15;495(2):97-111*
[26] *Wang Q, Ju X, Wang J, Fan Y et al.. Immunogenic cell death in anticancer chemotherapy and its impact on clinical studies. Cancer Lett. 2018 Dec 1;438:17-23*
[27] *Aguilera R, Saffie C, Tittarelli A et al. Heat-shock induction of tumor-derived danger signals mediates rapid monocyte differentiation into clinically effective dendritic cells. Clin Cancer Res. 2011 Apr 15;17(8):2474-83*

[28] *Shi H, Cao T, Connolly JE, Monnet L et al. Hyperthermia enhances CTL cross-priming. J Immunol. 2006 Feb 15;176(4):2134-41*

[29] *Adkins I, Fucikova J, Garg AD et al. Physical modalities inducing immunogenic tumor cell death for cancer immunotherapy. Oncoimmunology. 2015 Jan 7;3(12):e968434*

[30] *Ito A, Fujioka M, Tanaka K et al. Screening of cytokines to enhance vaccine effects of heat shock protein 70-rich tumor cell lysate. J Biosci Bioeng. 2005 Jul;100(1):36-42*

[31] *Lin FC, Hsu CH, Lin YY. Nano-therapeutic cancer immunotherapy using hyperthermia-induced heat shock proteins: insights from mathematical modeling. Int J Nanomedicine. 2018 Jun 19;13:3529-3539*

[32] *Ostberg JR, Repasky EA. Emerging evidence indicates that physiologically relevant thermal stress regulates dendritic cell function. Cancer Immunol Immunother. 2006 Mar;55(3):292-8*

[33] *Knippertz I, Stein MF, Dörrie J et al.. Mild hyperthermia enhances human monocyte-derived dendritic cell functions and offers potential for applications in vaccination strategies. Int J Hyperthermia. 2011;27(6):591-603*

[34] *Feng M, Jiang W, Kim BYS et al. Phagocytosis checkpoints as new targets for cancer immunotherapy. Nat Rev Cancer. 2019 Oct;19(10):568-586*

[35] *Garg AD, Romano E, Rufo N et al. Immunogenic versus tolerogenic phagocytosis during anticancer therapy: mechanisms and clinical translation. Cell Death Differ. 2016 Jun;23(6):938-51*

[36] *Dudek AM, Martin S, Garg AD et al. Immature, Semi-Mature, and Fully Mature Dendritic Cells: Toward a DC-Cancer Cells Interface That Augments Anticancer Immunity. Front Immunol. 2013 Dec 11;4:438*

[37] *Kubes J, Svoboda J, Rosina J et al. Immunological response in the mouse melanoma model after local hyperthermia. Physiol Res. 2008;57(3):459-465*

[38] *Zhu J, Zhang Y, Zhang A, He K et al. Cryo-thermal therapy elicits potent anti-tumor immunity by inducing extracellular Hsp70-dependent MDSC differentiation. Sci Rep. 2016 Jun 3;6:27136*

[39] *Liu P, Jia S, Lou Y et al. Cryo-thermal therapy inducing MI macrophage polarization created CXCL10 and IL-6-rich pro-inflammatory environment for CD4+ T cell-mediated anti-tumor immunity. Int J Hyperthermia. 2019;36(1):408-420*

[40] *He K, Jia S, Lou Y et al. Cryo-thermal therapy induces macrophage polarization for durable anti-tumor immunity. Cell Death Dis. 2019 Mar 4;10(3):216*

[41] *Matsumoto K, Yamamoto N, Hagiwara S et al. Optimization of hyperthermia and dendritic cell immunotherapy for squamous cell carcinoma. Oncol Rep. 2011 Jun;25(6):1525-32*

[42] *Menga M, Trotta R, Scrima R et al. Febrile temperature reprograms by redox-mediated signaling the mitochondrial metabolic phenotype in monocyte-derived dendritic cells. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis. 2018 Mar;1864(3):685-699*

[43] *Liso A, Capitanio N, Gerli R et al. From fever to immunity: A new role for IGFBP-6? J Cell Mol Med. 2018 Oct;22(10):4588-4596*

[44] *Zhou L, Chong MM, Littman DR. Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation. Immunity. 2009 May;30(5):646-55*

[45] *Wan YY. Multi-tasking of helper T cells. Immunology. 2010 Jun;130(2):166-71*

[46] *Kim HJ, Cantor H. CD4 T-cell subsets and tumor immunity: the helpful and the not-so-helpful. Cancer Immunol Res. 2014 Feb;2(2):91-8*

[47] *Fridman WH, Pagès F, Sautès-Fridman C et al. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. Nat Rev Cancer. 2012 Mar 15;12(4):298-306*

[48] *Najafi S, Mirshafiey A. The role of T helper 17 and regulatory T cells in tumor microenvironment. Immunopharmacol Immunotoxicol. 2019 Feb;41(1):16-24*

[49] *Zuazo M, Arasanz H, Bocanegra A et al. Systemic CD4 immunity: A powerful clinical biomarker for PD-L1/PD-1 immunotherapy. EMBO Mol Med. 2020 Sep 7;12(9):e12706*

[50] *Zuazo M, Arasanz H, Fernández-Hinojal G et al. Functional systemic CD4 immunity is required for clinical responses to PD-L1/PD-1 blockade therapy. EMBO Mol Med. 2019 Jul;11(7):e10293*

[51] *Liu K, He K, Xue T, et al. The cryo-thermal therapy-induced IL-6-rich acute pro-inflammatory response promoted DCs phenotypic maturation as the prerequisite to CD4+ T cell differentiation. Int J Hyperthermia. 2018 May;34(3):261-272*

[52] *Du G, Liu Y, Li J et al. Hypothermic microenvironment plays a key role in tumor immune subversion. Int Immunopharmacol. 2013 Oct;17(2):245-53*

[53] *Hong M, Jiang Z, Zhou YF. Effects of thermotherapy on Th1/Th2 cells in esophageal cancer patients treated with radiotherapy. Asian Pac J Cancer Prev. 2014;15(5):2359-62*

[54] *Newton JM, Flores-Arredondo JH, Suki S et al.. Non-Invasive Radiofrequency Field Treatment of 4T1 Breast Tumors Induces T-cell Dependent Inflammatory Response. Sci Rep. 2018 Feb 22;8(1):3474*

[55] *Chen Q, Fisher DT, Kucinska SA et al. Dynamic control of lymphocyte trafficking by fever-range thermal stress. Cancer Immunol Immunother. 2006 Mar;55(3):299-311*

[56] *Chen Q, Appenheimer MM, Muhitch JB et al. Thermal facilitation of lymphocyte trafficking involves temporal induction of intravascular ICAM-1. Microcirculation. 2009 Feb;16(2):143-158*

[57] *Evans SS, Wang WC, Bain MD et al. Fever-range hyperthermia dynamically regulates lymphocyte delivery to high endothelial venules. Blood. 2001 May 1;97(9):2727-33*

[58] *Chen Q, Fisher DT, Clancy KA et al. Fever-range thermal stress promotes lymphocyte trafficking across high endothelial venules via an interleukin 6 trans-signaling mechanism. Nat Immunol. 2006 Dec;7(12):1299-308*

[59] *Cheng Y, Weng S, Yu L et al. The Role of Hyperthermia in the Multidisciplinary Treatment of Malignant Tumors. Integr Cancer Ther. 2019 Jan-Dec;18:1534735419876345*