

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2023

課題番号：18K09554

研究課題名（和文）温熱療法とIL-1R阻害薬の臨床応用に向けた併用療法の開発

研究課題名（英文）Development of a combination of hyperthermia and IL-1R inhibitors for clinical application.

研究代表者

小栗 千里（OGURI, Senri）

横浜市立大学・医学部・講師

研究者番号：30400394

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：我々は、口腔癌に対する温熱療法とIL-1R阻害薬の併用療法の臨床応用に向けた開発を目指した。IL-1阻害薬としてIL-1ra（Anakinra）を用いる予定であったが、入手が困難なこともあり、IL-1ra（Anakinra）獲得までの間にpreliminaryな実験を行った。IL-1raの加温後の最適な投与のタイミングを検討するために、in vitroにおいてIL-1R1の発現を検討し、タイムコースでのIL-1R1の発現上昇を確認した。またin vivoにおいては、加温による腫瘍の抑制と、腫瘍のregrowthの状態を確認でき、今後のIL-1raの投与実験に向けた足掛かりになると考えた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

進行口腔癌に対する治療の主体は外科的療法だが、術後の機能・審美障害など抱える問題は多く、新たな治療法の開発が必要とされている。我々はこれまでに、温熱療法とIL-1阻害薬の併用療法についてin vitroにおいて、その抗腫瘍効果を報告してきた。安全かつ侵襲の少ない治療法として、今後は温熱療法とIL-1阻害薬の併用療法を臨床応用するため、in vivo マウス腫瘍移植モデルを中心に標的分子の発現誘導と腫瘍抑制に対する相乗効果を検討する。安全性が高く、より高い抗腫瘍効果が得られる工夫を目的に、トランスレーショナルリサーチを推進する。

研究成果の概要（英文）：To develop the effective hyperthermia treatment combined with IL-1R inhibitors, we performed some examination using oral cancer tumors. We tried to get the material of IL-1R inhibitors, but for some reasons, we could not. Therefore, We examined preliminary experiments without IL-1R inhibitors (IL-1ra: Anakinra). We investigated the optimal effect of IL-1ra after hyperthermia, we performed some analysis in vitro to evaluate IL-1R1 expression level with time course. Also, in subcutaneous tumor mouse model, we confirmed the tumor suppression and regrowth after hyperthermia. In this study, it should be foothold to evaluate combination therapy with hyperthermia and IL-1R inhibitors.

研究分野：口腔がん

キーワード：IL-1阻害薬 口腔がん 温熱療法

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

口腔癌治療における問題点は、(1)再発、後発転移、遠隔転移患者に対する根治的治療が困難であること、(2)手術不適応患者の予後が極めて不良であることがあり、これらを解決するためには化学療法、放射線療法、手術を主体とした従来の方法に加え、新たな治療法の開発が必要である。そこで我々は、分子標的薬に着目した。分子標的治療は癌細胞のみに特異的に発現する分子をターゲットとするため、有害事象を最小限に抑えることが可能となる。そこで着目したのはインターロイキン1(IL-1)である。IL-1の中で癌においてはIL-1が腫瘍の増殖、浸潤、転移を進行させるとの報告がある。また他にホモロジーを持つ分子としてIL-1レセプターアンタゴニスト(Ra)が存在し、同じレセプターに結合しIL-1と拮抗する。海外ではIL-1の阻害薬であるIL-1Ra(antagonist:Anakinra)がリウマチに対して臨床応用されており、研究分野においては腫瘍に対してのIL-1Ra therapyが進行中である。併用療法の一つである温熱療法とは血管系の温度調節機構の違いを利用して、癌の局所を42-43℃に加熱することによって、正常組織に影響を与えずに癌細胞のみを死滅させる局所療法の一つで、一般的に放射線や化学療法の補助療法として用いられている。我々は加熱により癌細胞のIL-1R1の発現レベルが上昇するという興味深い事実を見出した。つまり、温熱療法にIL-1阻害薬を用いた分子標的療法を組み合わせることにより、標的分子の発現上昇を図ることでIL-1阻害薬に対する癌細胞の感受性を高める効果も期待できる。これまでに温熱療法によりIL-1の発現上昇を認めた報告はなく、早期の臨床応用が期待できる。我々はこれまでに、*in vitro*においてIL-1阻害薬(IL-1Ra)と温熱療法を併用して、腫瘍細胞への影響を観察した。口腔癌細胞株OSC-19, HSC-3を用いたScratch assayにおいては、併用群において遊走能の低下を認めた。このことは温熱療法およびIL-1阻害薬の併用療法が局所の腫瘍細胞の増大のみならず、転移の抑制にも寄与できる可能性が示唆され、今後の*in vivo*における研究は口腔癌治療の問題点解決のために大いに期待できる。

### 2. 研究の目的

温熱療法とIL-1R阻害薬の臨床応用に向けた併用療法の開発を本研究の目的とする。

### 3. 研究の方法

これまで得られてきた抗腫瘍効果のメカニズムについて詳細な解析を行う。

用いる細胞としてヒト扁平上皮癌細胞株SCC25, OSC-19, HSC-3ならびにマウス由来のSCC-を用いて温熱療法を43℃、30分併用としIL-1阻害薬IL-1Ra(IL-1 antagonist)を用いる。グループはi)コントロール、ii)温熱療法のみ、iii)IL-1阻害薬のみ、iv)温熱療法+IL-1阻害薬とする。また、検討項目はa)Protein synthesis assay、b)Cell apoptosis assay (FACS)とする。

#### 【動物実験】

ヒト扁平上皮癌細胞移植ヌードマウスにおける温熱療法とIL-1R阻害薬の併用療法による腫瘍抑制効果を検討する。腫瘍の大きさ、マウスの生存率をtime courseで計測する。またIL-1の発現程度、アポトーシスの誘導を免疫染色、RT-PCRなどで検討する。

(1) ヒト扁平上皮癌細胞のヌードマウスへの移植、腫瘍形成：SCC25, OSC-19, HSC-3をヌードマウス(nu/nu Balb/c)へ移植し皮下腫瘍を形成させる。

*In vitro*で得られた基礎的データを参考に最適な温熱療法の条件、IL-1阻害薬の投与量、投与間隔の条件を*in vivo*において検討する。IL-1阻害薬は腫瘍内に直接注入し、5日ごとに腫瘍サイズの計測をノギス及び*in vivo*イメージにて行う。また同時にマウス

の生存日数を記録し、治療によるマウスの生存率の変化を計測する。マウスを用いた腫瘍加温法の検討。ヒト扁平上皮癌細胞移植ヌードマウスにおけるIL-1R阻害薬と磁場による温熱療法（以下、HT と略す）との併用療法による腫瘍抑制効果を検討する。In vivo におけるHTはサーモトロンRF（山本ビニター社）を用いて腫瘍のみを42～43℃に特異的に加温できるように調整を行う。または40～41℃のwater bathにて腫瘍加温を行う。ヒト扁平上皮癌細胞株（SCC25, OSC-19, HSC-3）をヌードマウス（nu/nu Balb/c）の大腿部皮下に腫瘍を移植する。皮下腫瘍が直径5mmに達したところで治療を開始する。

- (2) 併用療法終了後、2日、10日後にマウスを屠殺、正常組織を含めて腫瘍を摘出し温熱+ IL-1阻害薬の併用療法によるIL-1、IL-1R、種々の増殖因子の発現、アポトーシス関連タンパクの発現をRT-PCR、免疫染色、活性測定など各種手法を用いて検討する。
- (3) 同系マウスにおける扁平上皮癌細胞株皮下腫瘍に対する併用療法を用いた腫瘍抑制効果を検討：マウス由来扁平上皮癌細胞株であるSCC-25を同系のC57BL/6マウスに移植し温熱療法+ IL-1阻害薬の併用療法を施行する。この実験系においては、ヌードマウスと異なり、腫瘍免疫の影響を検討することが可能となる。併用療法によるT cell (CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>)の腫瘍組織内への誘導、浸潤の有無は免疫染色にて、腫瘍特異的な免疫応答の獲得は脾臓細胞を用いたELISA assay, FACS analysisにより検討する。また腫瘍免疫誘導効果を見るために、一度腫瘍を移植し併用療法を行ったマウスに、再度腫瘍を再移植して腫瘍が拒絶されるか否かを検討する。

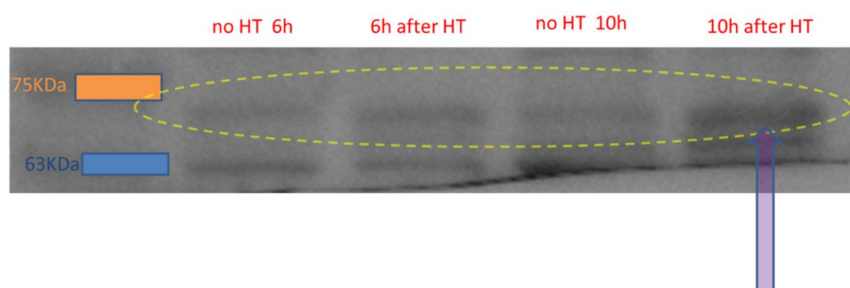
#### 4. 研究成果

IL-1阻害薬として、IL-1ra (Anakinra)を米国Amgen社より購入を試みていたが、コロナ禍や物流問題などにより試薬の獲得が困難であった。そこで我々は、IL-1ra (Anakinra)獲得までの間にpreliminary examinationを行った。In vitroおよびIn vivoでの腫瘍の加温、アポトーシスの有無、腫瘍サイズについて検討を行った。

- (1) In vitroにおける腫瘍の加温と細胞内の変化を観察：

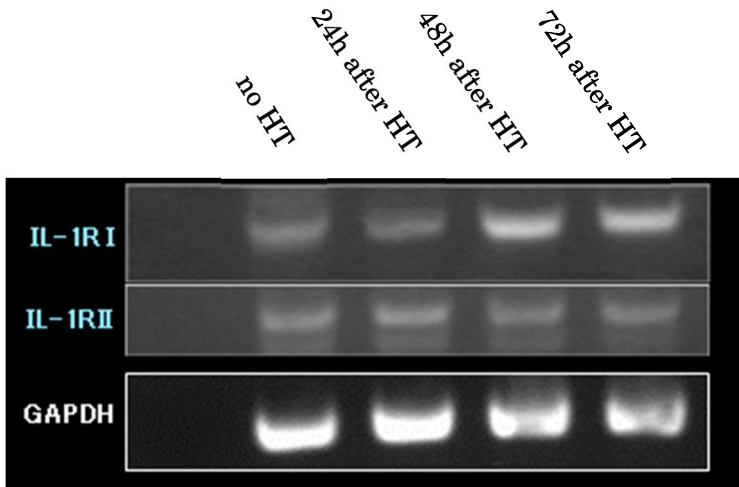
ヒト扁平上皮癌細胞株SCC25を43℃、30分で加温し、加温後のIL-1R1の発現レベルをウェスタンブロッティングおよびRT-PCRで計測した。腫瘍細胞加温後、6時間、10時間後にcell lysateを行い、ウェスタンブロッティングを行った結果、10h後に非加温群と比較してIL-1R1の発現を認めた【図1】。またRT-PCRでは、腫瘍加温後24h, 48h, 72hで腫瘍を回収し観察を行ったところ、IL-1R1の発現は24時間後より増大傾向を認めた【図2】。また加温後24hの細胞に対してapoptosis assay (TUNEL法)を行ったところ、有意差はなかったがHT群においてアポトーシスの増加傾向を認めた【図3】。

【図1】ウェスタンブロッティングでのIL-1R1の発現

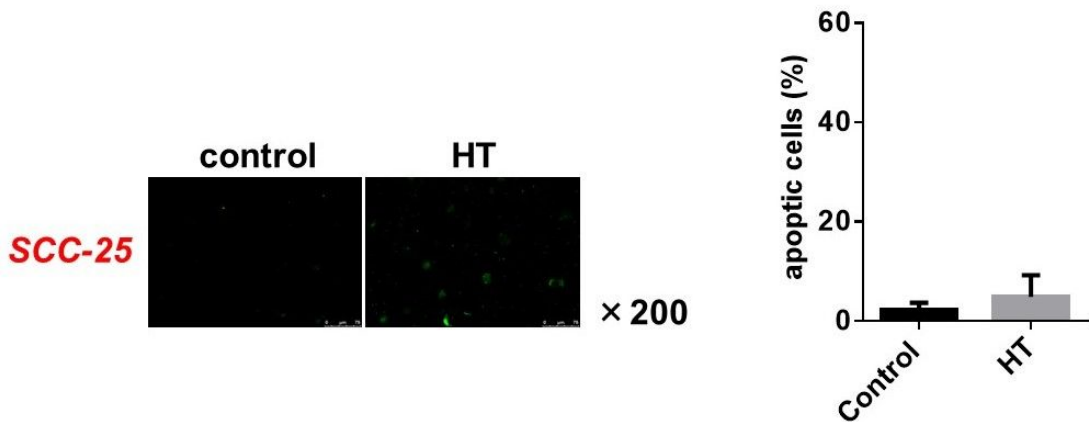


The expression of IL-1R1 is emphasized after HT.

【図2】 RT-PCRでのIL-1R1, IL-1R2の発現



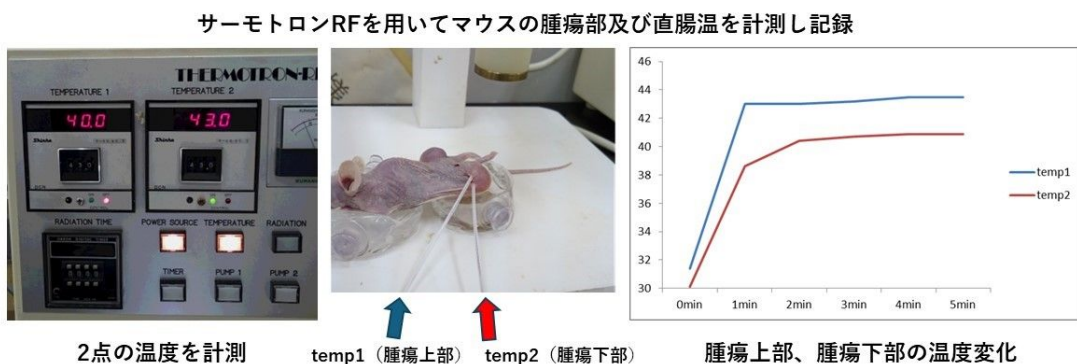
【図3】 腫瘍細胞加温後のapoptosis assay



(2) In vivoでの実験結果

マウスを用いた実験を行うにあたり、腫瘍移植マウスに対して安定した腫瘍のみ加温できる機器の使用法と温熱条件を検討した。装置はサーモトロンRFを用いて、2つのプローブを腫瘍および直腸温、または腫瘍部2か所（腫瘍上部と下部）で測定した。温熱発生装置に近い腫瘍上部は30秒で43 に達する条件を確立することができた【図4】。また直腸温は平常の体温（27～30度）を維持できた。

【図4】 加温装置の使用法と腫瘍部の温度変化

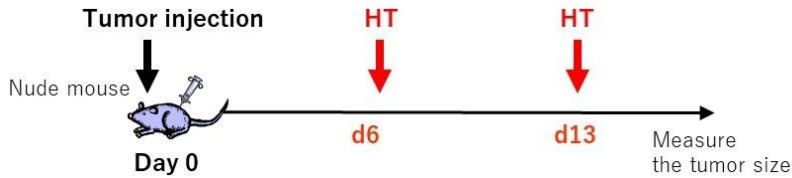


次に、ヒト扁平上皮癌細胞OSC-19をヌードマウス (nu/nu Balb/c) へ移植し皮下腫瘍を形成させ、最適な温熱療法の条件、IL-1阻害薬の投与のタイミングを図るための実験を行った。ま

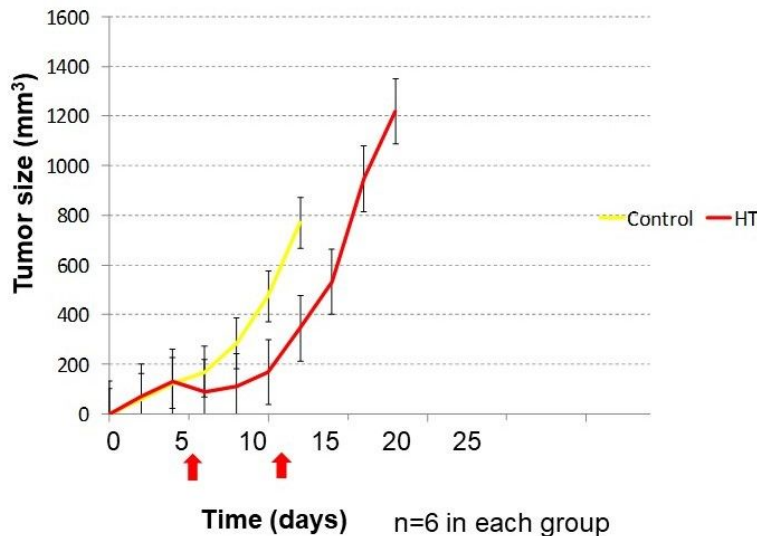
ずは腫瘍単独群（無治療）と温熱療法群での抗腫瘍効果を観察した。

【図4】の装置を用いて、腫瘍コントロールと温熱療法（HT）単独での腫瘍増殖の評価を行った。3×10<sup>6</sup>のOSC-19腫瘍を右大腿部の皮下に移植し、腫瘍移植後day6, day13に43℃・30分のHTを行った【図5】。HT単独では無治療群と比較すると腫瘍の増殖は抑制されたが、2回の治療後速やかに腫瘍の増大を認めた【図6】。

【図5】マウス実験スケジュール（コントロール群、HT単独群）

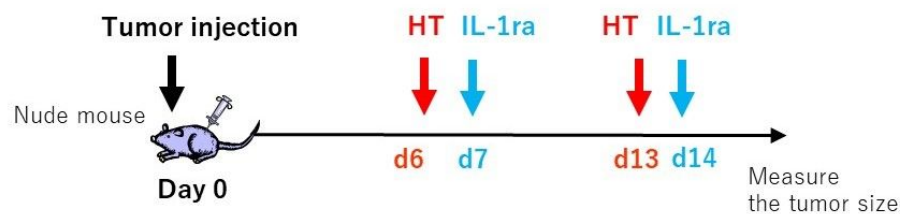


【図6】腫瘍単独群とHT単独群での腫瘍増殖曲線



今回の実験においてはIL-1ra (Anakinra)の投与までには至らなかったが、コントロール群とHT単独群での結果を得ることが出来た。それに伴い、今後の実験課題として下記のようなIL-1ra投与群、とHT + IL-1ra併用群でのマウス腫瘍実験モデルを考え得るきっかけとなった【図7】。

【図7】IL-1raを用いた今後の実験計画



**Tumor** : OSC-19, 3.0 × 10<sup>6</sup> cells by subcutaneous injection (s.c.) on the right side of thigh.

**Hyperthermia (HT)** : Day 6, 13 (43°C, 30 min)

**IL-1ra (Anakinra)** : injection, Day 7, 14

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小栗千里
2. 発表標題 下顎歯肉扁平上皮癌T4症例に対する逆行性超選択的動注化学放射線療法の検討
3. 学会等名 第43回日本頭頸部癌学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	中島 英行  (Nakashima Hideyuki)  (30437032)	横浜市立大学・医学研究科・客員研究員   (22701)	
研究分担者	來生 知  (Kioi Mitomu)  (30545059)	横浜市立大学・附属病院・准教授   (22701)	
研究分担者	光藤 健司  (Kenji Mitsudo)  (70303641)	横浜市立大学・医学研究科・教授   (22701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------