

機関番号：22701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24792006

研究課題名(和文) 温熱療法と分子標的薬の併用療法の開発

研究課題名(英文) Development of combination therapy with hyperthermia and targeted therapy

研究代表者

中島 英行 (NAKASHIMA, Hideyuki)

横浜市立大学・附属病院・助教

研究者番号：30437032

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：今回我々は、IL-13R<sub>2</sub>をターゲットにした分子標的薬であるIL13-PEと温熱療法との併用による相乗効果を期待し研究を行った。

ヒト扁平上皮癌細胞株において、加温ありと加温なしの群とでIL-13R<sub>2</sub>の発現レベルの比較検討をRT-PCRを用いて行ったところ加温群において、IL-13R<sub>2</sub>の発現レベルの上昇を認めた。Cell viability assayにおいて、加温群で、非加温群と比較して細胞の抗増殖抑制効果が観察された。細胞を加温した後、IL13-PEを投与し、Protein synthesis assayにて抗腫瘍効果を観察したところ、加温群において濃度依存的に抗腫瘍効果の増加を認めた。

研究成果の概要(英文)：Interleukin-13 receptor alpha 2 chain (IL-13Ra2), a unique tumor-associated antigen, is a promising target for cancer immunotherapy. IL13-PE, a targeted cytotoxin composed of IL-13 and mutated Pseudomonas exotoxin, induces specific killing of IL-13Ra2 positive tumor cells. Our objective is whether hyperthermia treatment of oral squamous cell carcinoma (OSCC) can modulate the expression of IL-13Ra2 and increase their sensitivity to IL13-PE.

OSCC cell lines, HSC-3 and SCC-25 cells were heated with 43 degree for 1 hour. The proliferation of heat-stressed OSCC cells showed more than 50% growth inhibition compared to control cells. IL-13Ra2 was up-regulated after heating of OSCC cells. Protein synthesis inhibition assay with IL13-PE showed that heat-stressed OSCC cells decreased the number of IC50 compared to that of without heated OSCC cells. The percentages of apoptotic cells increased in OSCC cells treated with IL13-PE after hyperthermia compared with controls.

研究分野：医歯薬学

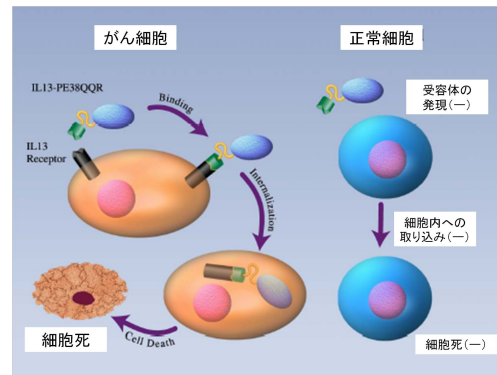
科研費の分科・細目：歯学・病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード：温熱療法 分子標的薬 併用療法 口腔癌

## 1. 研究開始当初の背景

現在の口腔癌の治療における大きな問題点としては、腫瘍の進展度や患者の全身状態、手術拒否など様々な理由により、手術不適応患者の予後が極めて不良であること、領域再発や後発転移をきたした患者に対する根治的治療が困難であること、治療後の著しい審美的および機能的障害などがあげられる。これらの問題点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。現在多くの領域で注目され、研究・開発が進められているものの一つに分子標的治療がある。これまでの抗癌剤による化学療法や放射線療法は、癌細胞のみならず正常細胞までもダメージを与えてしまう副作用が存在していたが、この分子標的治療は癌細胞に特異的に発現する分子をターゲットとするため、副作用を最小限に抑えることが可能となる。我々はインターロイキン13(IL-13)と緑膿菌外毒素(PE)の2つのたんぱく質を遺伝子組み換え技術により融合させた分子標的薬であるIL13-PE38(以下IL13-PE)を開発し、その標的効果について研究を行ってきた。IL-13の受容体の一つであるIL-13R $\alpha$ 2は悪性脳腫瘍、特に神経膠芽腫に高発現することが報告されているが、ほとんどの正常組織には認められない。最近我々は口腔扁平上皮癌においても、このIL-13R $\alpha$ 2が高発現していることを見出し、報告している(Kioi M et al, Int J Cancer, 2009)。IL13-PEは、IL-13R $\alpha$ 2を高発現する癌細胞に高い親和性で結合し、細胞内に取り込まれた後、たんぱく合成を阻害することで細胞死を引き起こす。正常細胞はIL-13R $\alpha$ 2受容体を発現していないためIL13-PEは結合せず細胞毒性は見られない(図1)。米国では現在、脳腫瘍患者を対象にPhase III臨床試験が行われている。

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に加温することによって、正常組織に影響を与えずに癌細胞のみを死滅させようとす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。その歴史は古く、現在は保険治療として臨床応用されているが、深部の温度調節など手技に熟練を要することや煩雑さなどからあまり普及していないのが現状である。また生物学的効果に関してはいまだ解明されていない部分も多い。我々は現在までに、口腔癌に対する温熱療法について研究および臨床応用を行ってきたが、ごく最近の知見で、加温により癌細胞のIL-13R $\alpha$ 2の発現レベルが上昇するという興味深い事実を見している。つまり、温熱療法にIL13-PEを用いた分子標的療法を組み合わせることに



(図1)IL-13 サイトキシンの作用機序

より、従来から知られている温熱療法の効果(血流上昇に起因する癌細胞へのドラッグデリバリーを高める作用)だけでなく、標的分子の発現上昇を図ることでIL13-PE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標的治療薬の標的分子の発現上昇を認めた報告はなく、非常に画期的な方法であると同時に、それぞれ副作用が少ないことから早期の臨床応用が期待できる。これは口腔癌に対する従来の治療法のデメリットを極力回避し、低侵襲かつより安全で、患者のQOL向上が期待される新たな治療法の確立となり得る。

## 2. 研究の目的

進行口腔癌に対する治療は外科的療法が主体となるが、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。分子標的薬は近年臨床応用され、高い期待を集めているが、現時点で頭頸部癌に対して承認されているものは一つのみである。その理由の一つとして有効な標的分子の欠如が挙げられる。本研究では、安全性が高くかつより高い抗腫瘍効果が得られる治療法の開発を目的に、分子標的薬に温熱療法を加えることにより標的分子の発現誘導と腫瘍抑制に対する相乗効果、さらに早期の臨床応用を目指し、トランスレーショナル研究を行う。

## 3. 研究の方法

(1) ヒト扁平上皮癌細胞株において、加温ありと加温なしの群とでIL-13Rの発現レベルを比較検討する。また加温後何時間で発現レベルがピークに達するのか条件検討を行う。ヒト扁平上皮癌細胞株はSCC25, HSC-3を用い、IL-13R(IL-13R $\alpha$ 1、IL-13R $\alpha$ 2)の発現レベルは、RT-PCRおよびWestern Blottingで行う。

(2) In vitroにおける温熱とIL13-PEとの併用効果の検討。(1)で得られた条件をもとに上記細胞を培養し、下記のグループに分け

て検討を行う。

《グループ》

- i) コントロール
- ii) 温熱療法のみ
- iii) IL13-PEのみ
- iv) 温熱療法+IL13-PE

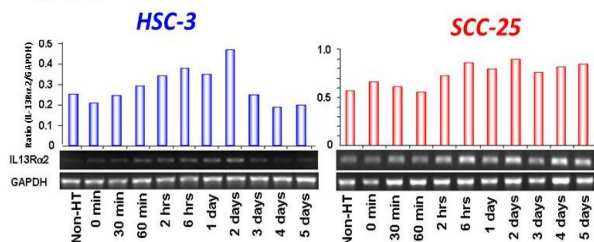
《検討項目》

Cell viability assay  
Protein synthesis assay  
温熱療法と IL13-PE の併用療法による腫瘍抑制効果のメカニズムについての検討を Cell apoptosis (TUNEL) assay を用いて検討を行う。

4. 研究成果

(1) ヒト扁平上皮癌細胞株 (SCC-25, HSC-3) において、加温ありと加温なしの群とで IL-13R $\alpha$ 2 の発現レベルの比較検討を RT-PCR を用いて行った。加温群において、加温後 6 時間より IL-13R の発現レベルの上昇を認め、加温後 24 時間で発現のピークを観察した。一方、非加温群においては発現の変化は認められなかった。

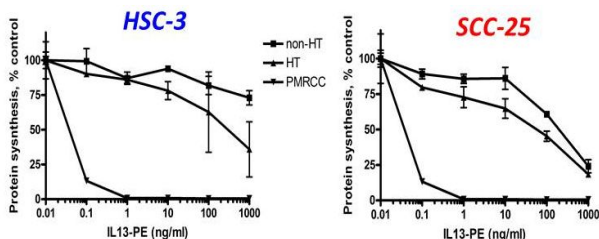
【図2】



(2)

Cell viability assay において、SCC-25、HSC-3 の細胞株は加温群で、非加温群と比較して細胞の抗増殖抑制効果が観察された。

細胞を加温(43℃、1時間)し 24 時間後に IL13-PE を投与し、Protein synthesis assay にて抗腫瘍効果を観察したところ、加温群において濃度依存的に抗腫瘍効果の増加を認めた(図3)。



【図3】

TUNEL Apoptosis Detection Kit (Millipore) を用いて、先の4つのグループについて検討を行った。温熱療法+IL13-PE の併用療法群において、アポトーシスを誘導された細胞数が他の治療群と比較して有意に多く認められた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計4件)

1. 中島 英行, 來生 知, 大久保牧子, 杉浦 圭, 佐藤 格, 飯田 昌樹, 佐藤 有紀, 光藤 健司, 藤内 祝. 口腔扁平上皮癌における分子標的薬と温熱療法との併用療法の開発. シンポジウム: 第30回日本ハイパーサーミア学会・学術大会, 2013, Aug 31, 横浜

2. Sugiura K, Nakashima H, Okubo M, Sato I, Iida M, Sato Y, Kioi M, Mitsudo K, Husain SR, Tohnai, Puri RK. Interleukin-13 Receptor  $\alpha$ 2 chain Regulation in Human Head and Neck by Hyperthermia in vitro. International Conference on Diabetes Mellitus and Cancer (Dia-Can' 12), 2012, Dec. 15, Tamil Nadu, India

3. Nakashima H, Husain SR, Sato Y, Kioi M, Tohnai I, Puri RK. A Novel Combination Immunotherapy for Targeting Murine Breast Cancer with IL-13 Receptor alpha 2 DNA Vaccine and an Immunotoxin. International Conference on Diabetes Mellitus and Cancer (Dia-Can' 12), 2012 Dec.15, Tamil Nadu, India

4. Nakashima H, Kioi M, Okubo M, Sugiura K, Sato I, Iida M, Mitsudo K, Husain SR, Puri RK, Tohnai I. Hyperthermia sensitizes resistant human oral cancer cells to IL-13 cytotoxin. ICHO & JCTM 2012 meeting, 2012 Aug. 29, Kyoto, Japan

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:

種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

中島 英行 (NAKASHIMA, Hideyuki)  
横浜市立大学・附属病院・助教  
研究者番号：30437032

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：