

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5 月 7 日現在

機関番号：12102
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23659827
 研究課題名（和文） 悪性黒色腫を標的とするハイブリッドペプチドによる新しいバイオ療法の研究開発
 研究課題名（英文） Development of novel biotherapy using hybrid peptide targeting molecules on malignant melanoma
 研究代表者
 関堂 充 (SEKIDO MITSURU)
 筑波大学・医学医療系・教授
 研究者番号：40372255

研究成果の概要（和文）：最近では、癌細胞膜融解による細胞殺傷効果を有する「爆薬ペプチド」と癌細胞表面分子と結合する特異的な「弾頭ペプチド」を組み合わせた抗癌活性を有する「hybrid peptide」の有用性が、分担研究者らにより確認されている。悪性黒色腫は悪性度が高く完全治癒の期待出来ない難治性の癌腫である。また、口腔癌も進行例では難治性の癌腫である。そこで、悪性黒色腫および口腔癌に対する IL-4R-hybrid peptide の抗腫瘍効果について検討を行った。口腔癌では、臨床病理標本において正常上皮に比較して IL-4R の発現レベルが高いことが確認され、その癌細胞株においても IL-4R の発現レベルは正常口腔上皮細胞に比較して高いことが確認された。IL4-lytic hybrid peptide は、in vitro において IL4 受容体が高発現している癌細胞株に対して、効果的な殺細胞効果を示し、また、口腔癌細胞株を用いた in vivo におけるマウス異種モデルにおいても用量依存性に抗腫瘍効果を発揮することが確認された。しかし、悪性黒色腫に対する IL4-lytic の効果は検証出来ていない。

研究成果の概要（英文）：Interleukin-4 receptor (IL-4R) is highly expressed on the surface of various human solid tumors including head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). Recently, we designed a novel IL-4R-lytic hybrid peptide composed of a binding peptide to IL-4R and a cell-lytic peptide. We confirmed the antitumor activity of the IL-4R-lytic hybrid peptide as a novel molecular-targeted therapy in several kinds of cancers. Malignant melanoma is a challenging cancer with poorer survival outcome. In addition, oral cavity cancer is also a challenging cancer in its advanced cases. In this study, we evaluated the antitumor activity of the IL-4R-lytic hybrid peptide as a novel molecular-targeted therapy in malignant melanoma and oral cavity cancers. IL-4R was expressed in oral cavity cancer cell lines, but not in a human normal keratinocyte. IL-4R in oral cavity cancer tissue was higher compared to that in normal epithelial tissue. The results revealed the antitumor activity of the IL-4R-lytic hybrid peptide against oral cavity cancers in a dose-dependent manner using the in vitro and in vivo experiments. However, we did not confirm the antitumor activity against malignant melanoma.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：形成外科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・形成外科学

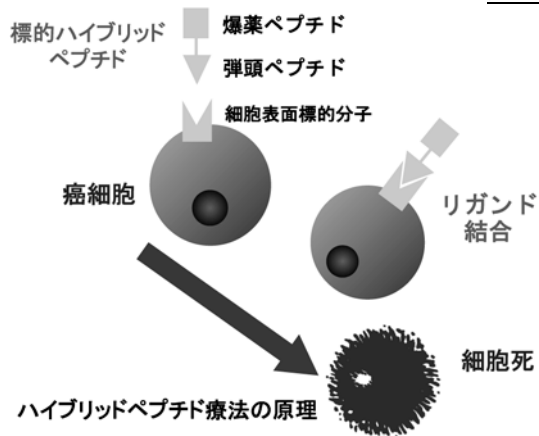
キーワード：悪性黒色腫，サイトカイン，受容体，標的治療，バイオ療法

1. 研究開始当初の背景

悪性黒色腫 (malignant melanoma) は皮膚、眼窩内組織、口腔粘膜上皮などに発生するメラノサイト由来の悪性腫瘍である。悪性度が非常に高い癌腫であり、転移能が高い。悪性黒色腫の治療成績の向上には、癌の悪性挙動にかかわる腫瘍生物分子を同定すること、腫瘍生物分子に関連した転移診断のための鋭敏な分子マーカーの探索を行うこと、それらの分子を標的とした新しい有効な治療手段を講じることが急務である。

近年、細胞殺傷能力を有するペプチドが複数報告されており、これらペプチドには強力な抗腫瘍効果を有するものも存在する。陽イオン抗菌ペプチドについて、哺乳類細胞と癌細胞に対する細胞障害性、結合性を評価したところ、正常細胞に比して、癌細胞で感受性が顕著に高く、ペプチドの癌細胞膜への結合亢進による癌細胞への優れた選択性が得られることが判明した。代表者らは癌細胞表面特異的な「弾頭ペプチド」と癌細胞膜融解性ペプチドの「爆薬ペプチド」を組み合わせ、抗癌活性を有する新規キメラペプチドを見出すことに成功し、この一群を「ハイブリッドペプチド」と命名した (図1)。ハイブリッドペプチドは担癌動物系に対して強力な抗腫瘍効果と安全性が確認されている。

図1



2. 研究の目的

本研究では、悪性黒色腫に対する新しいバイオ療法を確立する目的で、悪性黒色腫の表面分子を探索し、抗癌ペプチドとの組み合わせにより新規ハイブリッドペプチドを作製し、本ハイブリッドペプチドの抗癌効果について *in vitro* および *in vivo* の実験系において検証していく。

3. 研究の方法

(1) 悪性黒色腫より樹立された培養細胞株を用いて「ハイブリッドペプチド」療法の標的となり得る腫瘍表面分子の網羅的解析を行う。各細胞株について、腫瘍生物学的分子プ

ロファイリングを完成し、「ハイブリッドペプチド」の設計可能となる分子を抽出する。

(2) サイトカイン受容体として IL-4R を標的とするハイブリッドペプチドを作製する。培養細胞系の *in vitro* における抗腫瘍効果を解析する。また、同所性移植腫瘍モデルを作製し、原発巣および転移巣の形成状況を時系列にて腫瘍の大きさと腫瘍の進展範囲を追跡する。

(3) 代表者らの予備的実験解析にて、サイトカイン受容体である IL-4R が口腔癌には高発現することが判明している。そこで、口腔癌について、IL-4R を標的とするハイブリッドペプチド (IL-4-lytic) の抗腫瘍効果に関する検討を加える。

4. 研究成果

今回の研究では、悪性黒色腫および口腔癌に対する IL-4R-hybrid peptide の抗腫瘍効果について検討を行った。臨床病理標本を用いた IL-4R の発現について、悪性黒色腫では**検出が困難であった**。一方、口腔癌では、臨床病理標本において正常上皮に比較して IL-4R の発現レベルが高いことが確認された (図2)。また、その癌細胞株 (HSC-2, HSC-3, HSC-4, Ca9-22, OSC-19) においても IL-4R の発現レベルは正常口腔上皮細胞 (HaCaT) に比較して高いことが確認された (図3)。IL-4-lytic hybrid peptide は、*in vitro* において IL-4 受容体が高発現している癌細胞株に対して、効果的な殺細胞効果を示し (図4)、また、口腔癌細胞株を用いた *in vivo* におけるマウス異種モデルにおいても用量依存性に抗腫瘍効果を発揮することが確認された (図5)。悪性黒色腫に対する IL-4-lytic の効果は検証出来ていないものの、**口腔癌における IL-4 受容体を標的とした IL-4-lytic hybrid peptide は、新たな口腔癌の治療に有効である可能性が示唆された**。

図2

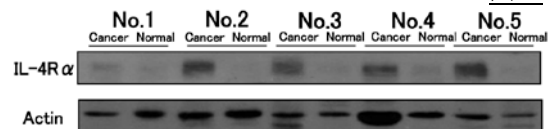


図3

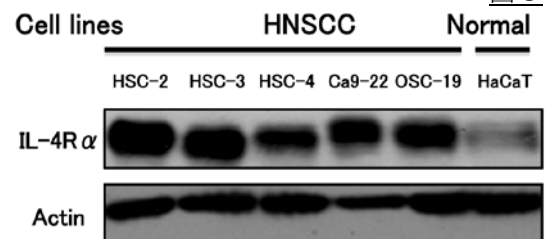


図 4

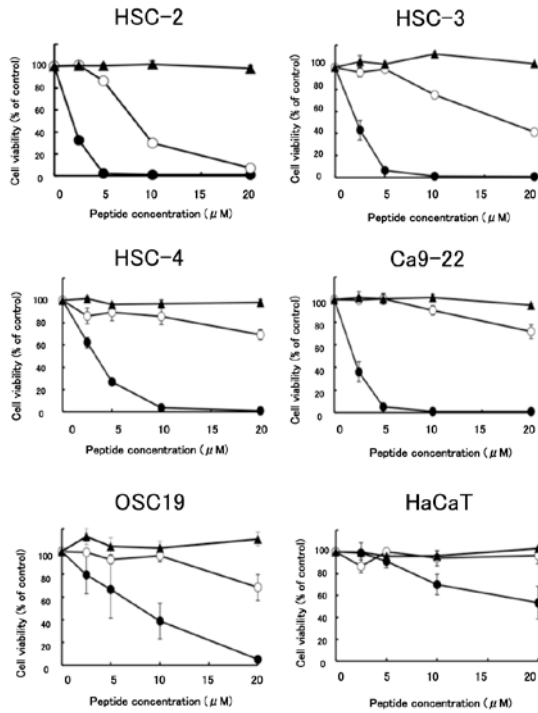
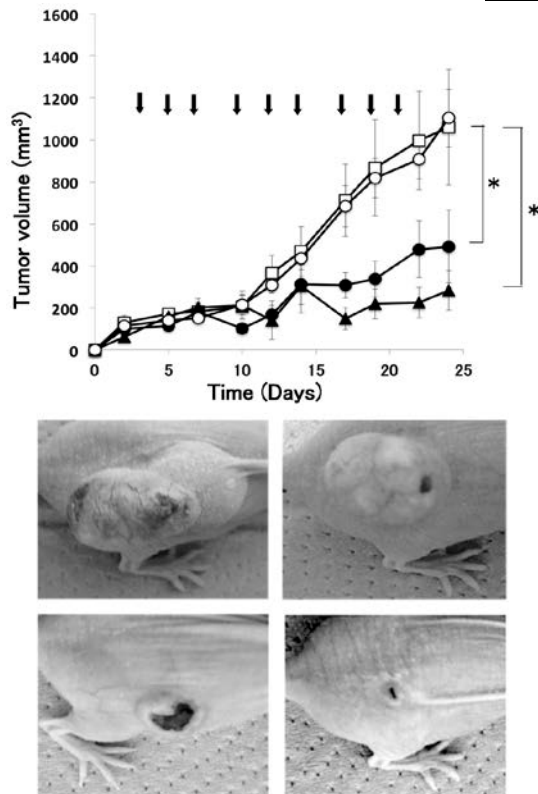


図 5



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 19 件) 全て査読有

- ① Adachi K, Togashi S, Yanagawa T, Ishibashi N, Goto T, Yamagata K, Onizawa K, Sasaki H, Sasaki K, Bukawa H, Sekido M.: Presurgical Orthopedic Treatment Ameliorates Postoperative Nasal Deformity after Cheiloplasty. *Annals of Plastic Surgery*, 2013, In press.
- ② Oh S, Tanaka K, Warabi E, Shoda J.: Exercise training decreases elevated serum ferritin and lipid peroxidation marker levels in middle-aged obese men with non-alcoholic fatty liver disease. *Medicine & Science in Sports & Exercise* 2013, In press.
- ③ Seto K, Shoda J, Horibe T, Warabi E, Ishige K, Yamagata K, Kohno M, Yanagawa T, Bukawa H, Kawakami K: Interleukin-4 receptor α -based hybrid peptide effectively induces antitumor activity in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncology Report* 2013, In press.
- ④ Onuki K, Sugiyama H, Ishige K, Kawamoto T, Ota T, Ariizumi S, Yamato M, Kadota S, Takeuchi K, Ishikawa A, Onodera M, Onizawa K, Yamamoto M, Miyoshi E, Shoda J.: Expression of *N*-acetylglucosaminyltransferase V in the subserosal layer correlates with postsurgical survival of pathological tumor stage 2 carcinoma of the gallbladder. *J Gastroenterol* 2013, In press.
- ⑤ Sasaki K, Adachi K, Sakido M.: Transverse fascial suspension with muscle bow traction: Advantages for full-thickness lip reconstruction involving the oral commissure using free flap. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery* 65:e193-e196, 2012.
- ⑥ Todgashi S, Sekido M.: A Technique to Improve the Geometric and Unnatural Appearance of the Inferior Triangular Flap in Primary Unilateral Cleft Lip Repair Plastic and Reconstructive Surgery 129:746e-748e, 2012.
- ⑦ Sasaki K, Yamamoto N, Kiyosawa T, Sekido M.: The role of collagen

- arrangement change during tendon healing demonstrated by scanning electron microscopy. *Journal of Electron Microscopy* 61:327-334, 2012.
- ⑧ Shoda J, Ishige K, Sugiyama H, Kawamoto T: Biliary tract carcinoma: clinical perspective on molecular targeting strategies for therapeutic options. *JHBPS* 19:342-353, 2012.
- ⑨ 福田麻衣子, 新谷佳子, 柳川 徹, 山城拓也, 櫻井陽子, 佐々木薫, 足立孝二, 鬼澤浩司郎, 関堂 充, 武川寛樹: CAD/CAMによる3D造形モデルを用いた下顎骨再建の3例. *茨城県歯科医学会誌*, 20:40-41, 2012.
- ⑩ 関堂 充, 足立孝二, 佐々木薫, 富樫真二, 齊藤 亮, 古川洋志, 山本有平. : 舌垂全摘以上の欠損に対する機能的再建法. *形成外科* 55:23-29, 2012.
- ⑪ 會沢哲士, 芳賀康史, 富樫真二, 中山凱夫, 関堂 充. われわれが経験した合趾症手術例の検討. *日形会誌* 32:450-457, 2012.
- ⑫ 小林友哉, 玉田崇和, 足立孝二, 関堂 充. 保存的治療で軽快した *Vibrio vulnificus* 感染症の1例. *日形会誌* 32:486-488, 2012.
- ⑬ 佐々木 薫, 足立 孝二, 棚倉 健太, 富樫 真二, 関堂 充. 手術点数から算定したチームサージャリーにおける形成外科科の貢献-2010 年度保険診療点数改正の影響-. *日形会誌* 32:542-547, 2012.
- ⑭ 江藤 綾乃, 佐々木 薫, 富樫 真二, 會沢 哲士, 関堂 充. 小耳症助軟骨移植後の軟骨露出に対する陰圧閉鎖療法の有用性. *日形会誌* 32:686-689, 2012.
- ⑮ 関堂 充, 富樫真二. 死腔, 血腫の防止 1) ドレーンの目的と選択 2) 陰圧吸引ドレーンの適応と抜去時期. *形成外科* 55:34-40, 2012.
- ⑯ 佐々木薫, 久保 諭, 関堂 充, 清澤智晴, 武石 明精. 血管吻合が有効であった手掌デグロビング損傷の1例. *日形会誌* 32:841-845, 2012.
- ⑰ 赤澤俊文, 関堂 充, 佐々木薫, 足立孝二, 坂東 裕子. 筑波大学における乳房再建外来新設の効果. *日形会誌* 33:887-891, 2012.
- ⑱ 川井啓太, 関堂 充, 佐々木薫, 足立孝二, 富樫真二. 乳房再建における移植床血管としての胸背動静脈前鋸筋枝の有用性. *日本マイクロサージャリー学会会誌* 25:201-206, 2012.
- ⑲ Sugiyama H, Onuki K, Ishige K, Baba N, Ueda T, Matsuda S, Takeuchi K, Onodera M, Nakanuma Y, Yamato M, Yamamoto M, Hyodo I, Shoda J. : Potent *in vitro* and *in vivo* antitumor activity of sorafenib against human intrahepatic cholangiocarcinoma cells. *J Gastroenterol* 46:779-789, 2011.
- [学会発表] (計4件)
- ① 岡田浩介, 蕨 栄治, 正田純一. 疾病モデルより解明された肝病態に対する転写因子 Nrf2 の演じる生体防御機構. 第98回日本消化器病学会総会 (東京), 2012. 4. 19-21
- ② 岡田浩介, 蕨 栄治, 徳重克年, 石井哲郎, 橋本悦子, 正田純一. *Nrf2/p62* 遺伝子二重欠損マウスは脂肪性肝炎を自然発症し, 肝腫瘍を発生する. 第48回日本肝臓学会総会 (金沢), 2012. 6. 7-8
- ③ 正田純一. 胆石の種類と成因. 日本胆道学会認定指導医養成講座3. 第48回日本胆道学会学術集会 (東京), 2012. 9. 20-21
- ④ 正田純一: 胆管がんに対するハイブリッドペプチドの新しいバイオ療法 厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業「難治性の肝・胆道疾患に関する調査研究」(東京), 2012. 2. 16-17
- [図書] (計4件)
- ① 正田純一: 漢方薬の有効性と医療科学 インチンコウ湯 漢方薬の薬効と薬理 日本伝統医学テキスト 漢方編 平成22・23年度厚生労働科学研究費補助金 地域医療基盤開発推進研究事業「統合医療を推進するための日本伝統医学の標準化」研究班 pp. 295-297, 2012.
- ② Shoda J: *Inchinkoto*, Clinical efficacy and pharmacology, Textbook of Traditional Japanese Medicine, Health and Labour Sciences Research Grant, Research on the standardization of traditional Japanese Medicine promoting integrated medicine. pp.

230-232, 2012.

- ③ Shoda J & Yamamoto M: Gallbladder Cancer Pathogenesis and Molecular Targeting Strategies for Therapeutic Options. Horizons in Cancer Research. Volume 48. pp.1-24. NOVA Science, 2012.
- ④ 正田純一:胆石症・胆道炎・胆道がん 胆石症 概念・定義と疫学 最新医学社(大阪), pp.13-25 2011.

6. 研究組織

(1)研究代表者

関堂 充 (SEKIDO MITSURU)
筑波大学・医学医療系・教授
研究者番号：40372255

(2)研究分担者

石毛 和紀 (ISHIGE KAZUNORI)
筑波大学・医学医療系・講師
研究者番号：20597918

正田 純一 (SHODA JUNICHI)
筑波大学・医学医療系・教授
研究者番号：90241827

竹内 薫 (TAKEUCHI KAORU)
筑波大学・医学医療系・准教授
研究者番号：00192162

川上 浩司 (KAWAKAMI KOJI)
京都大学・医学系研究科・教授
研究者番号：70422318