

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26462847

研究課題名(和文) 温熱療法とIL-1阻害薬の併用療法の開発

研究課題名(英文) Development of combination therapy with hyperthermia and Interleukin-1 inhibitor.

研究代表者

小栗 千里 (SENRI, Oguri)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：30400394

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：進行口腔癌に対する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、サイトカインInterleukin-1(IL-1)阻害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を期待して研究を開始した。研究成果としてはin vitroにおいて口腔癌細胞株とOSC-19を用いてIL-1R1の発現レベルを観察したところ、細胞を加温した後、細胞のIL-1R1の発現レベルが上昇していること、また細胞の移動能については温熱療法とIL-1Ra(IL-1阻害薬)を併用した群で、有意に細胞の移動能の抑制が観察された。

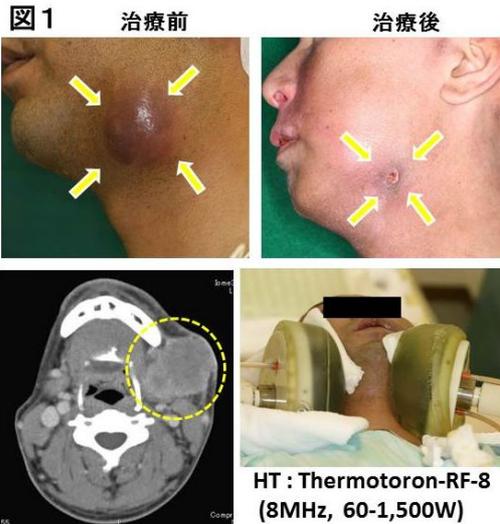
研究成果の概要(英文)：To develop new therapies that are highly efficient and safe for advanced oral cancer, we have started studying of hyperthermia treatment combined with targeted therapy using Interleukin-1(IL-1) inhibitor. We have expected to the synergistic efficacy for modulating the expression of targeting molecule by hyperthermia. In our results, the expression level of IL-1R was increased after hyperthermia in OSC-19 cells, which is one of the oral squamous cell carcinoma cell line, by western blotting. Moreover, cell motility assay showed that the group of which treated with combination therapy with both IL-1Ra(IL-1 inhibitor) and hyperthermia in OSC-19 cells, significantly reduced the cell motility compared to other groups.

研究分野：口腔外科

キーワード：進行口腔癌 IL-1R 温熱療法 併用療法

1. 研究開始当初の背景

進行口腔癌に対して手術・放射線・化学療法を3つを組み合わせた治療を行っても、予後は依然満足いくものとなっていない。第4の治療法の開発が期待されている。我々は、口腔癌 N3 頸部リンパ節転移を有する患者に対し、動注化学放射線治療と温熱療法を併用し、その治療効果を報告してきた (Mitsudo K, Oguri S et al, Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2012)。この併用療法により、患者の5年生存率ならびに局所制御率が向上し良好な成績(図1)を収めている。しかしそれでもやはり、同時化学放射線治療による粘膜障害、骨髄毒性、口腔乾燥症などの合併症が存在している。そこで我々は、現在多くの領域で注目され、研究・開発が進められている分子標的薬に着目した。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。**



我々はこれまでインターロイキン 1 (IL-1) に着目し、糖尿病、癌、骨性病変との関連について研究を行ってきた (Oguri S et al. Clin Diagn Lab Immunol. 2002, Oguri S et al. Biochim Biophys Acta. 2003)。IL-1にはこの2種類の分子種が存在し、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、実験では癌に対して腫瘍の転移を抑制するとの報告が

なされている。また近年、国内においては初のIL-1モノクローナル抗体であるカナキマズ(イラリス)が関連性周期性症候群(CAPS)に対して認可された。癌への臨床応用はこれからであるが、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。

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。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、加熱により癌細胞のIL-1の発現レベルが上昇するという興味深い事実を見出している(未発表データ)**

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、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。これまでに頭頸部領域において温熱療法によりIL-1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。平成24年12月には頭頸部癌においても抗EGFR抗体薬(セツキシマブ)が臨床に導入され、その有効性が認められている。今後も口腔癌に対して新たな分子標的薬の誕生が期待される。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、サイトカインInterleukin-1(IL-1)阻害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

(A) In vitroにおいて温熱療法とIL-1阻害薬の併用療法による、種々の口腔扁平上皮癌細胞株を用いた細胞レベルでの抗腫瘍効果を検討する。アポトーシスの誘導な

どの抗腫瘍効果のメカニズムについても追求する。

(B) In vitro で抗腫瘍効果が確認できた場合には、マウスの皮下腫瘍モデルを用いて併用療法を実施する。計時的に腫瘍のサイズを計測し、治療による腫瘍抑制効果を観察すると同時に、腫瘍を摘出して免疫組織学的に治療効果のメカニズムについても検討する。

(C) In vitro, in vivo ともに最も効果的な治療の条件（投与量、投与時間、温熱後の IL-1 阻害薬の投与するタイミングなど）を検討する。

#### 【培養細胞実験】

I. 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-1、IL-1Ra、IL-1R 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, OSC-19, HSC-3 ならびにマウス由来の SCC- を用い、IL-1 の発現レベルは、RT-PCR、ELISA および Western Blotting で行う。

II. In vitro における温熱と IL-1 阻害薬との併用効果の検討。I. で得られた条件をもと 6cm dish 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。

#### 《IL-1 阻害薬》

IL-1Ra (IL-1 antagonist)

#### 《グループ》

- 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

#### 《検討項目》

- a) Cell viability assay
- b) Protein synthesis assay
- c) Cell apoptosis assay

#### 【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-1 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などを免疫染色、RT-PCR などで検討する。

I. 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。

II. 皮下腫瘍が直径 5mm に達したところで治療を開始する。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

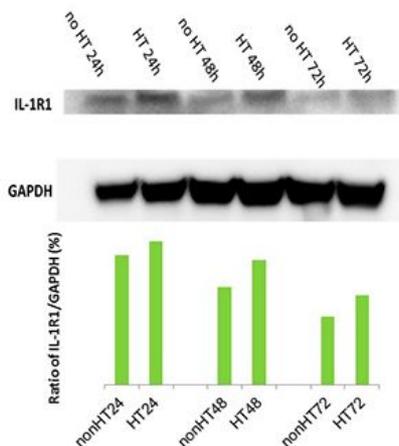
において検討する。温熱療法は保温マットを用いる。IL-1 阻害薬は腫瘍内に直接注入し、5 日ごとに腫瘍サイズの計測をノギス及び in vivo イメージにて行う。また同時にマウスの生存日数を記録し、治療によるマウスの生存率の変化を計測する。

III. 併用療法終了後、2 日、10 日後にマウスを屠殺し、正常組織を含めて腫瘍を摘出する。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。

#### 4. 研究成果

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-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ている【図 2】**。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、従来から知られている温熱療法の効果だけでなく、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。これまでに頭頸部領域において温熱療法により IL-1 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。

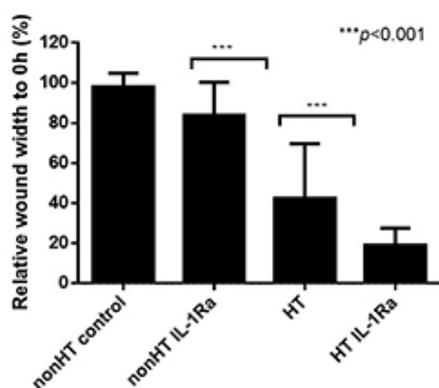
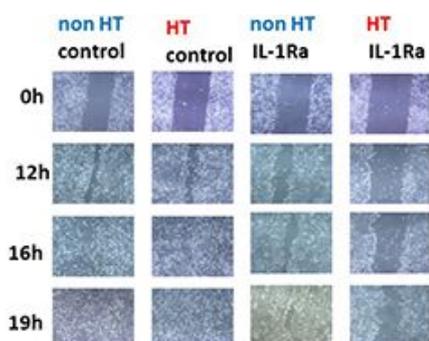
【図 2】



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【図 3】。本研究において温熱療法お

よび分子標的治療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 における発展にも期待ができる。

【図 3】



## 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 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔図 4〕 温熱療法と IL-1R 阻害薬の併用による細胞移動能の抑制効果

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小栗 千里 (OGURI, Senri)  
横浜市立大学・医学部・助教  
研究者番号: 30400394

### (2) 研究分担者

中島 英行 (NAKASHIMA, Hideyuki)  
横浜市立大学・医学研究科・客員研究員  
研究者番号: 30437032

來生 知 (KIOI, Mitomu)  
横浜市立大学・医学部・准教授  
研究者番号: 30545059

光藤 健司 (MITSUDO, Kenji)  
横浜市立大学・医学部・准教授  
研究者番号: 70303641

### (3) 連携研究者

なし

### (4) 研究協力者

なし