

平成21年 4月30日現在

研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18591435
 研究課題名（和文） 熱ショックタンパクをターゲットとした悪性腫瘍に対する温熱治療の研究
 研究課題名（英文） Investigation of hyperthermia treatment targeting heat shock protein for malignant tumor
 研究代表者
 菊森 豊根 (Kikumori Toyone)
 名古屋大学・医学部附属病院・病院助手
 研究者番号：90402635

研究成果の概要：

代表的な熱ショックタンパクである Hsp90 の阻害剤である 17AAG により、乳癌細胞に対する温熱治療効果の増強を認めた。この効果は Hsp90 の標的タンパクである HER2 の発現減少およびその信号伝達経路の下流に位置し、細胞増殖および抗アポトーシス作用を有する Akt タンパクの不活化が関与することが示唆された。この研究により、標準的治療が無効になった悪性腫瘍に対する治療法としての温熱治療を熱ショックタンパクを阻害することにより増強できる可能性が示された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,200,000	0	1,200,000
2007年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,400,000	660,000	4,060,000

研究分野：医歯薬学

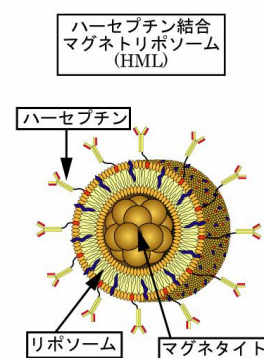
科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：HER2、乳癌、温熱治療、ヒートショック蛋白

1. 研究開始当初の背景

癌温熱治療は腫瘍細胞を直接加熱することにより死滅させる局所治療のひとつである。現在までに多数の加熱方法が試みられてきたが、腫瘍特異的に加熱することは困難と考えられてきた。我々が開発したがん細胞特異的な抗体を表面に固定した磁性体を含むリポソーム（挿入図）は腫瘍に磁性体を特異的に導入することができ、理想的な温熱治療を行うことができることを示してきた。すでに2-3の腫瘍に対してこのアプローチにより動物実験もしくは培養細胞において抗腫瘍効果が認められている。この研究では乳癌に

対するヒト化マウスモノクローナル抗体ですでに臨床応用されているハーセプチンをリポソームに結合させた物質を用いる。一方、温熱により種々の熱ショックタンパク（HSP）が誘導されることが知ら



れている。HSP は細胞内タンパクの約 1-2% を占める普遍的なタンパクであり、熱、放射線、化学物質などのストレスによりその発現が増強され、細胞の対ストレス反応の基幹を支えている。HSP は温熱ストレスのみでなく、酸化剤、金属、虚血、飢餓、感染などさまざまなストレスで誘導されることから、ストレス蛋白とも呼ばれている。また、HSP はストレス時のみでなく、正常時においてもシャペロン蛋白として蛋白質の生合成、細胞内移送、蛋白分解と生物の最も基本となる機能の担い手であるとともに、さまざまな細胞の環境ストレスに対して蛋白質の機能を維持する分子でもある。

我々は HSP のうち、HSP70 が特に温熱により誘導され、腫瘍免疫賦活化を通して抗腫瘍効果増強に大きな役割を果たしていることを報告した。一方、HSP90 は数多くの重要な情報伝達タンパク質や増殖因子の機能と安定性を調節する分子シャペロンで、腫瘍細胞の増殖、存続に関係することが報告されている。現在の温熱治療の問題点として、HSP の誘導による殺細胞効果の減弱が指摘されている。これは加熱により誘導される HSP が種々の細胞保護因子、増殖因子の細胞内における輸送、成熟などに深くかかわっていることによる。癌細胞で HSP の機能を阻害できれば、温熱療法の効果を増大でき、魅力的な癌治療法になりうる。

2. 研究の目的

17-allylaminogeldanamycin (17-AAG) は HSP90 特異的な阻害剤であり、現在悪性腫瘍に対する臨床試験が進行中の薬剤である。17-AAG は正常組織より悪性腫瘍における HSP90 の作用をより強く抑制することや、HSP70 などの他の HSP の機能は阻害しないことが報告されている。17-AAG は HSP90 により安定性が調節されているタンパクの機能を阻害し、温熱治療の効果を高める可能性がある。

以上のことから、われわれが開発した HML と 17-AAG を併用することにより特異的な抗腫瘍効果の増強が期待できる。

この研究課題においては HSP90 阻害剤を用いることにより細胞の生存に必要な増殖因子の発現を抑制しつつ、腫瘍免疫能を増強することにより温熱治療効果の増大が得られるかどうかを検討したい。

3. 研究の方法

【培養細胞実験】

ヒト乳癌培養細胞における HML と HSP 阻害剤である 17-AAG の相互作用を検討する。HSP の発現、および増殖因子、細胞保護因子などの発現を免疫染色、半定量 RT-PCR などで検討する。また、HSP の発現の程度と細胞増殖と

の関連を検討する。

1. ヒト乳癌細胞の培養: Her2 強発現株である MDA-MB-361、SKBr3、BT-474、Her2 弱発現株である MBA-MB-231、MCF-7 を培養する。
2. 培養乳癌細胞に対して HSP 阻害剤を加え、45 度程度の温熱を加える。HSP 阻害剤の温熱による細胞増殖抑制増強効果を検討する。
3. 培養乳癌細胞に対して HSP 阻害剤および HML を加え、HML を細胞表面に吸着させる。その後交番磁場を印加し、細胞の温度を上昇させる。HSP 阻害剤の HML を介する温熱による細胞増殖抑制増強効果を検討する。
4. HSP 阻害剤の温熱による腫瘍縮小に対する効果: 温熱を加えた培養乳癌細胞における HSP の発現、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半定量 RT-PCR、特殊染色、活性測定など各種手法を用いて検討する。

【動物実験】

ヒト乳癌細胞移植ヌードマウスにおける HML と HSP 阻害剤である 17-AAG の相互作用を検討する。HSP の発現、および増殖因子、細胞保護因子などの発現を免疫染色、半定量 RT-PCR などで検討する。また、HSP の発現の程度と腫瘍増殖との関連を検討する。

1. ヒト乳癌培養細胞のヌードマウスへの移植、腫瘍形成: Her2 強発現株である MDA-MB-361、SKBr3、BT-474、Her2 弱発現株である MBA-MB-231、MCF-7 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。
2. 担癌マウスに対して HSP 阻害剤を前投与し、HML を局所、もしくは経静脈投与し交番磁場を印加する。HSP 阻害剤の温熱による腫瘍縮小に対する効果を検討する。
3. HSP 阻害剤の温熱による腫瘍縮小に対する効果: 温熱を加えた乳癌細胞における HSP の発現、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半定量 RT-PCR、特殊染色、活性測定など各種手法を用いて検討する。

担癌動物における HSP 阻害剤の HML を用いた温熱治療効果増強の検討。

1. ニードマウスに移植したヒト乳癌細胞皮下腫瘍モデルを用いて最適な HSP 阻害剤の投与量、投与間隔、温熱療法の条件を検討する。
2. HSP 阻害剤の温熱治療の効果を増強させる最適な条件 (温度、時間、間隔など)

を検討する。

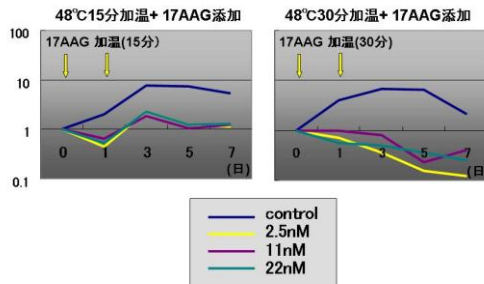
- 同系マウスにおける乳癌細胞皮下腫瘍に対するHSP阻害剤のHMLを用いた温熱治療効果増強および、腫瘍免疫増強を検討する。ヒト Her2 を強制発現しているマウス細胞株を同系マウスに移植し、これにHMLを投与し交番磁界をかけ腫瘍の温熱療法の実験モデルとする。この実験系においては、ヌードマウスと異なり、腫瘍免疫の影響を検討することが可能となる。この実験系を用いて、同じ動物に複数の腫瘍を移植し交番磁界をかけた腫瘍とかけない腫瘍のあいだで、腫瘍の温度上昇の比較をする。さらにHSP阻害剤を投与し、腫瘍免疫能誘導が変化するかどうかを検討する。すなわち、腫瘍免疫誘導効果のみるために、一度腫瘍を移植しHMLによる温熱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

【培養細胞実験】ヒト乳癌培養細胞における温熱効果と熱ショックタンパク (HSP) 阻害剤である 17-AAG の相互作用を検討した。

- 培養乳癌細胞に対してHSP阻害剤である17-AAGを添加すると、HER2陽性細胞(SKBr3細胞)では非常に低濃度においても温熱効果増感作用があることが認められた。(下図参照)

SKBr3細胞における17AAGの温熱治療に対する増強効果



- 17-AAGの添加により細胞増殖を促進する蛋白であるAktのリン酸化(ウェスタン解析による)が抑制されることが示され、これが17-AAGが温熱効果を増感させるメカニズムの一つであることが示唆された。(下図参照)

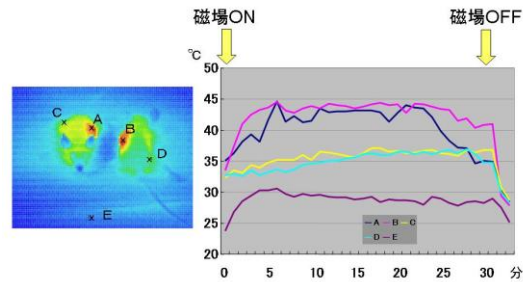
17AAGのAktのリン酸化に対する影響

SKBr3 (HER2 +)	Western Blot Bands								
加温 (48度, 15分)	-	+	-	-	-	+	+	-	-
加温 (48度, 30分)	-	-	+	-	-	-	-	+	+
17-AAG (2.5 nM, SKBr3)	-	-	-	+	-	+	-	+	-
17-AAG (5 nM, SKBr3)	-	-	-	-	+	-	+	-	+

【動物実験】ヒト乳癌細胞移植ヌードマウスモデルにおける温熱効果を検討した。

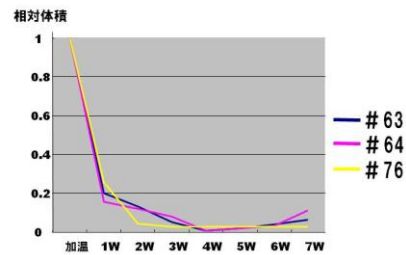
- ヒト乳癌培養細胞のヌードマウスへの移植、腫瘍形成: Her2 強発現株であるBT-474、Her2 弱発現株であるSKOV3をヌードマウス (nu/nu Balb/c) へ移植し皮下腫瘍を形成させた。
- 上記の皮下腫瘍にHER2を認識する抗体を表面に結合させたマグネタイトを内包するリポソーム(HML)を局所投与し、交番磁場を印加することにより、有効な腫瘍温上昇効果を認めた。(下図参照)

温度変化



- HMLを局所投与され、交番磁場により加温された腫瘍は経時的に縮小し、その縮小効果は加温後7週以上にわたり維持された。(下図参照)

加温後 腫瘍体積の変化



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1件)

- Toyone Kikumori, Takeshi Kobayashi, Masataka Sawaki, Tsuneo Imai、
Anti-Cancer Effect of Hyperthermia on Breast Cancer by Magnetite Nanoparticle-Loaded Anti-HER2 immunoliposomes、Breast Cancer

Research and Treatment、113 卷、435-441、
2009 年、435-441、査読有

〔学会発表〕(計 4 件)

1. 菊森 豊根、ヒト乳癌細胞株における Heat shock protein (Hsp) 90 阻害剤による温熱効果増強- HER2, Akt, Hsp の関与、第 16 回日本乳癌学会学術総会、平成 20 年 9 月 27 日、大阪
2. 菊森 豊根、ヒートショックタンパク阻害剤による温熱効果増強における HER2 タンパクの関与、第 108 回日本外科学会定期学術集会、平成 20 年 5 月 15 日、長崎
3. 菊森 豊根、乳癌における磁性酸化鉄を用いた温熱療法の基本実験およびヒートショック蛋白阻害による温熱効果増強の検討、第 15 回日本乳癌学会学術総会、平成 19 年 6 月 29 日、横浜
4. 菊森 豊根、磁性酸化鉄(マグネタイト)を用いた温熱免疫療法 of 乳癌に対する基本実験、第 108 回日本外科学会定期学術集会、平成 19 年 4 月 13 日、大阪

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菊森 豊根 (Kikumori Toyone)
名古屋大学・医学部附属病院・病院助手
研究者番号：90402635

(2) 研究分担者

今井 常夫 (Imai Tsuneo)
名古屋大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：80252245

中尾 昭公 (Nakao Akimasa)
名古屋大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：70167542

小林 猛 (Kobayashi Takeshi)
中部大学・応用生物学部・教授
研究者番号：10043324