

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 28 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21500450

研究課題名（和文） 超音波による分子標的治療増強効果の臨床応用に関する研究

研究課題名（英文） A preliminary study for clinical application of the anti-tumor enhancement effects using low-intensity ultrasound under the treatment with molecular target drugs.

研究代表者

神野 正敏（KANNO MASATOSHI）

奈良県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：30195185

研究成果の概要（和文）：

【目的】分子標的治療薬は、腫瘍細胞に関連する標的分子に特異的に作用し、従来の殺細胞性抗腫瘍剤に比べ血液・消化器毒性などの臓器毒性は低いが、単独投与での抗腫瘍効果は必ずしも十分とはいえない。研究者らは、*in vitro*でCD20陽性B細胞性リンパ腫培養株に対して抗ヒトCD20抗体リツキシマブと低強度の超音波照射を併用することにより抗腫瘍効果が増強されることを示し、今回の予備実験でも確認している。新たな試みとして、EGF受容体(EGFR)発現頭頸部扁平上皮癌由来細胞株(HSC-3およびHSC-4)を用いて、*in vitro*で抗EGFR抗体製剤セツキシマブ(C-mab)による抗腫瘍効果が超音波照射により増強されるか、検討を行った。

【方法】まず 1×10^6 個のHSC-3またはHSC-4培養細胞株を12時間培養後、C-mabを100nMになるよう調整し、投与した。超音波照射は、C-mab投与30分後にpulse repetition frequency (PRF) 1 Hz、強度 0.5 W/cm^2 (= output intensity of 0.38 W/cm^2)、照射時間1分の条件で施行した。

【結果および考察】頭頸部扁平上皮癌由来細胞株における、増殖抑制効果、アポトーシス誘導効果の上昇は、C-mab投与単独および超音波照射単独と比較して、C-mab添加後に超音波照射を行うことにより有意な増強を認めた。この結果、既に検証されたリンパ腫細胞におけるリツキシマブと超音波照射併用による抗腫瘍効果の増強と同様に、EGFR発現頭頸部癌細胞においても、分子標的治療剤であるC-mabと低強度の超音波照射を併用することで、より効果的な抗腫瘍効果が得られる可能性が示唆された。以上の実験結果に基づき、今後は*in vivo*において、超音波照射がC-mabの抗腫瘍効果を増感できるか、さらに検討を重ねる予定である。

研究成果の概要（英文）：

Purpose: Molecular target drugs are recognized as having anti-tumor effects against specific target molecules. Although these drugs are less toxic for major organs, representing hematological and gastrointestinal toxicities, when compared with conventional cytotoxic anti-tumor drugs, the anti-tumor intensities still have been in unsatisfactory levels with a single use of these drugs. *The investigators* already showed the enhancement of anti-tumor effects by the combination of anti-human CD20 antibody, rituximab and low-intensity ultrasound in a B-cell lymphoma cell line, and the same results were also confirmed by the preliminary experiments in the present study. As a new study design, we tried whether anti-Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) antibody, cetuximab (C-mab) have a potential power to enhance anti-tumor effects followed by ultrasound exposure using EGFR expressing head and neck squamous cell carcinoma cell lines (HSC-3, HSC-4) *in vitro*.

Methods: After 12 hours duration for 1×10^6 number of HSC-3 or HSC-4 cell culture, C-mab was concentrated and administered under the condition of 100nM into cell medium. Thirty minutes after administration of C-mab, ultrasound was exposed to the dish under the condition of pulse repetition frequency (PRF) 1 Hz, intensity 0.5 W/cm^2 (= output intensity of 0.38 W/cm^2), duration 1 minute.

Results and Discussion: Both of growth suppression and apoptosis induction effect in head

and neck squamous cell carcinoma cell lines were significantly enhanced by C-mab administration followed by ultrasound exposure compared with either C-mab administration or ultrasound exposure alone. These results suggest that the anti-tumor effect may possibly be enhanced by the combination of molecular target drug and low-intensity ultrasound in EGFR expressing head and neck squamous cell carcinoma cell lines, as well as that has been already observed in a B-cell lymphoma cell line. Based on the present study, the further investigation would be planned toward the possibility if the ultrasound exposure be able to enhance the anti-tumor effect by C-mab *in vivo*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	100,000	30,000	130,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用システム

キーワード：超音波医科学

1. 研究開始当初の背景

分子標的治療薬は腫瘍細胞あるいは関連細胞の抗原あるいは標的分子に特異的に作用して抗腫瘍効果を発揮する。近年急速にその開発・臨床応用が進み、すでに多くの薬剤が実地臨床に供されており、さらに今後も多く有望な薬剤が実用化されていくと考えられる。標的分子に特有な副作用が認められるとはいえ、従来の殺細胞性抗腫瘍剤と比較して一般に血液・消化器毒性をはじめとする臓器毒性は低い。しかし、抗体製剤の場合、分子標的治療剤の単独投与のみでは必ずしも十分な殺細胞作用が発揮できないのが現状である。

一方、超音波の生体に対する作用は、熱作用と非熱作用に分けることができる。熱作用についてはこれまで温熱療法として臨床応用されている。非熱作用、とくにキャビテーション作用は細胞膜に可逆的な穿孔(sonoporation)を起こすことが知られており、これを利用して遺伝子導入の効率を高める方法が検討され、遺伝子治療に実用化されつつある。超音波単独の抗腫瘍効果については、培養白血病細胞を用いて検討がなされており(Lancet1997、Exp Hematol 2002)、また、薬剤送達システムとしての超音波の有用性については、少量の抗腫瘍剤を効率よく培養腫瘍細胞内に送達することが可能であることが報告されている(Cancer Letters 2001、Ultrasonics 2006)。

研究代表者らは、これまで超音波の細胞膜

に対する生物学的modulationによって細胞表面抗原を変化させることにより、これと特異的に結合し抗腫瘍効果を発揮する分子標的治療薬の効果増強を図る目的で、CD20を細胞表面に強発現している培養細胞とヒト-マウスキメラ抗ヒトCD20抗体であるリツキシマブ(Rituximab)を用いて基礎的検討を行っている(Danno D、Kanno M、et al、Ultrason Sonochem 15:463-471、2008、4th International Symposium on Therapeutic Ultrasound 2004、第9回がん分子標的治療研究会総会 2005、第46回日本臨床血液学会総会 2006)。その結果、超音波によりリツキシマブの殺細胞効果が相乗的に増強されることを示した。この基礎的研究で超音波と分子標的治療薬の併用により抗腫瘍効果の増強が期待できることが明らかになった。

近年、頭頸部がん領域においても手術治療、化学療法、放射線治療に加えて分子標的薬治療が導入されつつある。現時点では欧米において承認されている分子標的薬はEGF受容体(EGFR)を標的としたキメラ抗体セツキシマブ(Cetuximab)のみで、放射線治療との併用で一定の効果は認められるものの、現在の標準治療であるシスプラチン(Cisplatin: CDDP)を中心とした化学放射線治療を越える効果は見出されていないのが現状であり、これを打開する方策が求められているところである。

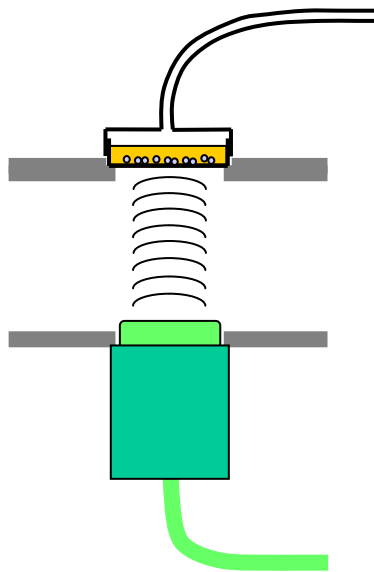
2. 研究の目的

前項で述べた基礎的研究を踏まえ、この成果を更に応用するために研究を計画した。

(1)分子標的治療薬併用による抗腫瘍効果増強のための *in vitro* での超音波の至適条件を検索する。

(2)頭頸部腫瘍は体表近くに腫瘤を形成し、超音波照射が比較的容易な部位である。リツキシマブ以外の分子標的治療剤として同じヒトマウスキメラ抗 EGFR 抗体であり、頭頸部腫瘍に対し抗腫瘍効果を有するセツキシマブを用いて、*in vitro* での超音波による増強効果を認めるか検証する。

【超音波照射イメージ図】



3. 研究の方法

(1)BCL-2 を発現している CD20 陽性 B 細胞性リンパ腫細胞株 SU-DHL-4 細胞を用いて、抗ヒト CD20 モノクローナル抗体リツキシマブ暴露後に低強度超音波照射を行い、両者によるアポトーシス誘導が相乗効果を発現する至適条件を検討した。超音波照射には 1.0 MHz ultrasonic generator (KUS-2S, ITO ULTRASONIC Co., Ltd., Tokyo, Japan) を用いた。

(2)EGFR 発現頭頸部扁平上皮癌由来細胞株として HSC-3 および HSC-4 を用いた。超音波照射には 1.0 MHz ultrasonic generator (KUS-2S, ITO ULTRASONIC Co., Ltd., Tokyo, Japan) を用い、pulse repetition frequency (PRF)、強度、および照射時間はそれぞれ 1 Hz、 0.5 W/cm^2 (= output intensity of 0.38 W/cm^2)、1分とした。

(図 1)

まず 3.5-cm dish に 1×10^6 個の HSC-3、HSC-4 をそれぞれ 12 時間培養し、(A) コントロール (CNTRL)、(B) セツキシマブ単独

(CETU)、(C) 超音波照射単独(UST)、(D) 併用(COMB) の 4 グループを作成後、CETU および COMB 群にはセツキシマブを 100 nM になるよう調整し、投与した。その 30 分後に UST および COMB 群に対し超音波照射を施行した。(図 2)

上記対象に対し、セツキシマブおよび超音波照射に対する細胞増殖抑制効果および抗腫瘍効果 (アポトーシス)、また両者の併用による増強効果などを WST-1 assay およびヘキスト染色などで検討した。

図 1

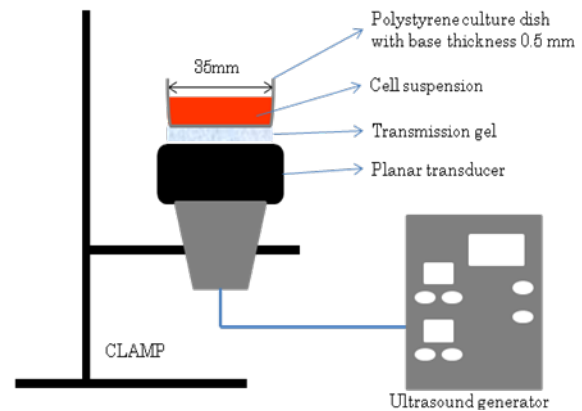
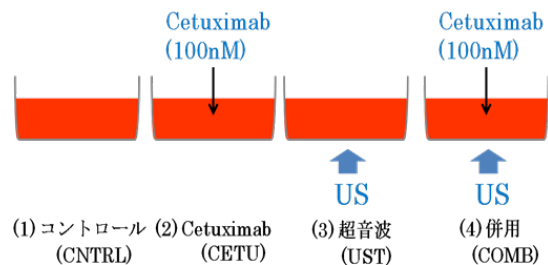


図 2

Experimental protocol



4. 研究成果

(1)BCL-2 発現 CD20 陽性 B 細胞性リンパ腫細胞株 SU-DHL-4 細胞に対して、超音波照射、抗ヒト CD20 モノクローナル抗体リツキシマブ、および両者によるアポトーシス誘導が相乗効果を発現する至適条件を検討した結果、超音波強度は $2.5 \text{ W/cm}^2 \cdot 1 \text{ MHz}$ で、リツキシマブの添加濃度は $10^{-2} \mu\text{g/ml}$ で 24 時間培養することにより、両者によるアポトーシス誘導に相乗効果を認めた。この条件設定が最適であるかは、なお検討が必要ではあるものの、今後更なる研究を推進する上での、重要な基礎的設定条件になると考えられる。

(2)頭頸部扁平上皮癌由来細胞株 HSC-3 および HSC-4 に対して、ヒトマウスキメラ型抗 EGFR 抗体セツキシマブ単独暴露では増殖抑制効果を認めるものの、アポトーシスの有

意な上昇を認めなかった。超音波照射単独においても増殖抑制効果、アポトーシスの上昇を認めたが、両者を併用することにより増殖抑制効果、アポトーシスの上昇ともに他群と比較し有意な差を認め、セツキシマブの超音波照射併用による抗腫瘍効果の増強が示唆された。(図3、4)

今回の検討で、B細胞性リンパ腫細胞に認められたリツキシマブと超音波照射併用による抗腫瘍効果の増強が、頭頸部癌細胞に対しても同様に分子標的治療剤であるセツキシマブと超音波照射を併用することで、より効果的に抗腫瘍効果が得られる可能性が示唆された。今後は、これらの研究結果に基づき、*in vivo*においても超音波照射がセツキシマブの抗腫瘍効果を増感できるかについて検討していく予定である。

図3

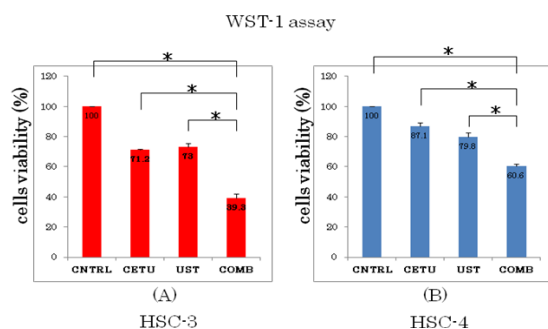
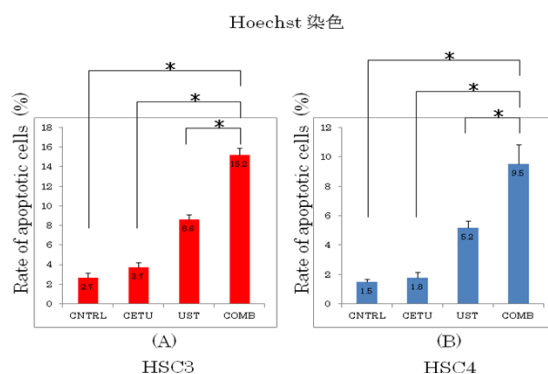


図4



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)

- ① Ota I, Okamoto N, Yane K, Takahashi A, Masui T, Hosoi H, Ohnishi T, Therapeutic strategies for head and neck cancer based on *p53* status, *Experimental and Therapeutic Medicine*, 査読あり, 3, 2012, 585-591. DOI:10.3892/etm.2012.474

[学会発表] (計6件)

- ① 神野正敏、再発・難治性低悪性度非ホジキンリンパ腫に対するゼヴァリン®に関する多施設アンケート調査の報告と当院での使用経験、第25回悪性リンパ腫治療研究会、2010年。
- ② 太田一郎、岡本倫朋、榊井貴史、家根旦有、細井裕司、頭頸部癌細胞におけるEGFRおよびmTORシグナル経路をターゲットにした分子標的治療、第35回日本頭頸部癌学会、2010年。
- ③ Masatoshi Kanno, Takanori Kitauchi, Makoto Kawahara, Satoshi Ueno, Yasunori Enomoto, Noboru Yamagata, Hotoshi Sawada, Progressive multifocal leukoencephalopathy after treatment with rituximab for macroglobulinemia, 第72回日本血液学会学術集会、2010年。
- ④ 神野正敏、木村道子、樋野光生、古川直人、中村卓、再発または難治性濾胞性およびマンツル細胞リンパ腫に対する Ibritumomab tiuxetanの臨床的有用性に関する後方的検討、第9回日本臨床腫瘍学会学術集会、2011年。
- ⑤ 太田一郎、頭頸部癌における分子標的治療、第13回癌治療増感研究シンポジウム、2011年。
- ⑥ Takashi Masui, Ichiro Ota, Masatoshi Kanno, Hiroshi Hosoi, Combination of cetuximab and low-intensity ultrasound causes a synergistic enhancement in cell killing and an additive enhancement in apoptosis induction in human head and neck cancer cells, The 11th Japan-Taiwan Conference on Otolaryngology-Head and Neck Surgery, 2011.

[図書] (計1件)

- ① 真貝隆之、長谷川正俊、神野正敏、バイエル薬品株式会社／富士フィルムRIファーマ株式会社、¹¹¹In-ゼヴァリン画像アトラス (監修：遠藤啓吾)、2010、68 (全80ページ)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

神野 正敏 (KANNO MASATOSHI)
 奈良県立医科大学・医学部・准教授
 研究者番号：30195185

(2)研究分担者

藤本 眞一 (FUJIMOTO SHINICHI)
奈良県立医科大学・医学部・教授
研究者番号：70209097

水野 麗子 (MIZUNO REIKO)
奈良県立医科大学・医学部・講師
研究者番号：80398437

太田 一郎 (OTA ICHIRO)
奈良県立医科大学・医学部・助教
研究者番号：00326323

(3)連携研究者

なし