

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 8 月 9 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861575

研究課題名(和文) 臨床応用に向けた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 for clinical application.

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：今回我々は、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った。

具体的な研究成果は、Tunnel assayを用いたアポトーシスの検討で、温熱療法とIL13-PEの併用群において、HSC-3、SCC-25の両細胞株でアポトーシスを誘導している細胞がコントロール群と比較して有意に多いことが観察された。またマウスを用いたin vivoでの実験においては、併用療法による抗腫瘍効果が観察された。

研究成果の概要(英文)： Our objective is whether combination therapy with hyperthermia and IL13-PE, targeted therapy could be useful for clinical application of oral cancer, in safety and more efficient for antitumor activity. We expected that combination therapy could modulate the expression of IL-13Ra2 and increase their sensitivity to IL13-PE, and then synergistic effects were observed in vivo study as translational research.

In our results, Tunnel assay showed that combination therapy with hyperthermia and IL13-PE induced apoptotic cells in both HSC-3 and SCC-25 cell lines compared to control groups, significantly.

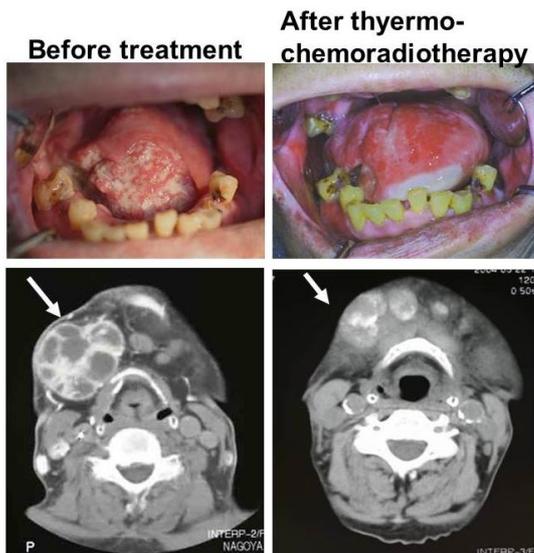
In vivo study showed that combination therapy with hyperthermia and IL13-PE reduced the tumor growth compared to the control mice.

研究分野：口腔癌

キーワード：温熱療法 分子標的薬 口腔癌 併用療法

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、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、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、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。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 (Thermochemoradiotherapy) を併用し、その治療効果を報告してきた (Mitsudo K et al, Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2012)【図 1】。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を治めているが、しかし依然として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。**

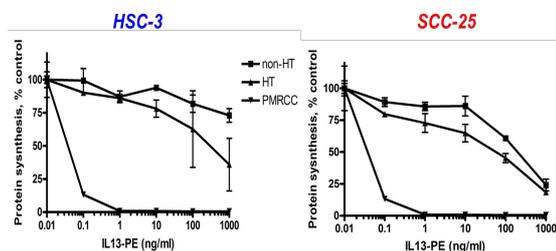


【図 1】

近年、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<sub>2</sub> 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<sub>2</sub> 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<sub>2</sub> 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<sub>2</sub> 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。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<sub>2</sub> の発現レベルが上昇し、IL13-PE の抗腫瘍効果の増強が観察された【図 2】**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。

【図 2】



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未だない。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

これまでの研究において *in vitro* において温熱療法と IL13-PE の併用療法による、HSC-3, SCC-25 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観察した。残る *in vitro* の実験としては、Tunnel assay を用いたアポトーシスの誘導による抗腫瘍効果のメカニズムについて研究を行う。(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。H24-25 の間に、マウスに移植した腫瘍への温熱の治療法についてリゾピストを用いて条件検討を行い、手技などを確立させた。この方法を元に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。

#### 【培養細胞実験】

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。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-7 を用いる。細胞をチャンバースライドにて培養後、下記グループに分けてトリートする。その後、TUNEL Apoptosis Detection Kit (Millipore) を用いてアポトーシスの誘導について検討する。

#### 【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 IL13-PE の併用療法による腫瘍抑制効果を検討する。 *In vivo* における温熱療法は、41 度に調整した water bath にマウスの大腿を浸す方法を用いた。この手法をもとに温熱療法と IL13-PE の併用療法を施行する。治療後の腫瘍の大きさ、マウスの生存率を Time course で計測する。また IL-13R 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。

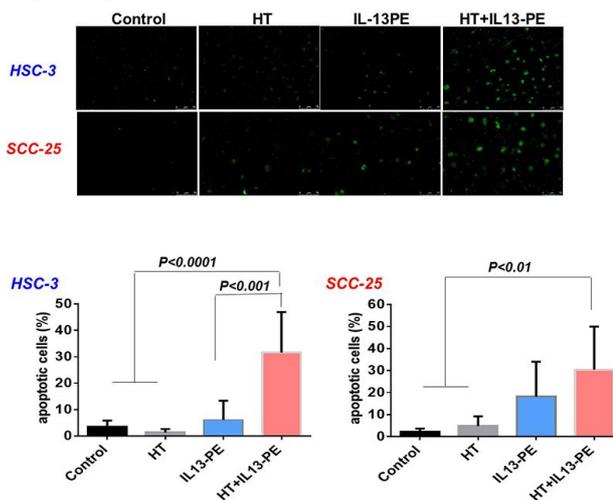
### 4. 研究成果

これまでの研究で、加温により、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 IL13-PE に対する癌細胞の感受性を高める効果が観察された。Tunel assay を用いたアポトーシスの検討において、温熱療法と IL13-PE の併用

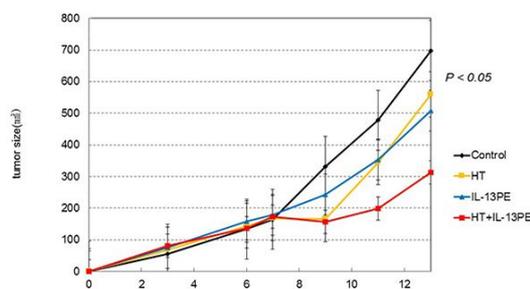
群において、HSC-3, SCC-25 の両細胞株でアポトーシスを誘導している細胞がコントロール群と比較して有意に多いことが観察された【図3】。

またマウスを用いた *in vivo* での実験において、併用療法による抗腫瘍効果が観察された【図4】。

【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)

1. Okubo M, Nakashima H, Kioi M, Sakaguchi T, Uemura, Sugiura K, Sato I, Iida M, Mitsudo K, Tohnoi I. A Combination therapy with hyperthermia and IL-13 cytotoxin for human oral cancer cells. 6<sup>th</sup> Asian Congress of Hyperthermia Oncology & The 31<sup>st</sup> Japanese Congress of Thermal Medicine meeting, AOSSA (福井県福井市) 2014, 年9月5日.
2. 中島英行、大久保牧子、來生 知、杉浦圭、佐藤 格、飯田昌樹、小泉俊之、光藤健司、藤内 祝：口腔扁平上皮癌にお

ける温熱療法と分子標的薬の併用療法の開発.第19回関東ハイパーサーミア研究会, 国立がん研究センター中央病院(東京都中央区), 2015年1月17日

3. Nakashima H, Iisaka T, Kioi M, Miyajima A, Okubo M, Sugiura K, Sato I, Murata S, Mitsudo K, Tohnai I. Combination therapy with hyperthermia and cetuximab in oral squamous cell carcinoma. The 5<sup>th</sup> World Congress of the International Academy of Oral Oncology (IAOO) meeting, Sao Paulo, Brazil, 2015年7月8~11日
4. 中島英行、大久保牧子、宮島章嘉、飯坂友宏、杉浦 圭、飯田昌樹、佐藤 格、小泉俊之、來生 知、光藤健司、藤内祝: 口腔癌における温熱療法と分子標的薬の併用療法の開発. 日本ハイパーサーミア学会第32回大会 シンポジウム1 「ハイパーサーミアにおける基礎研究: 現状と将来への展望」KKR ホテル大阪(大阪府大阪市), 2015年9月4~5日
5. 中島英行・來生 知・宮島彰嘉・飯坂友宏・杉浦 圭・大久保牧子・佐藤 格・廣田 誠・光藤健司・藤内 祝. 口腔癌における IL-13R 2 の発現と新たな分子標的薬の可能性について. 第60回日本口腔外科学会総会・学術大会, 公募ワークショップ4 「口腔がんリサーチの最前線」名古屋国際会議場(愛知県名古屋市), 2015年10月16~17日
6. Nakashima H, Okubo M, Kioi M, Miyajima A, Iisaka T, Sugiura K, Itaru S, Koizumi T, Mitsudo K and Tohnai I. Hyperthermia enhances the therapeutic efficacy of IL-13 cytotoxin in human oral squamous cell carcinoma. The 12<sup>th</sup> International congress of hyperthermic oncology, New Orleans, USA, 2016年4月11~15日

〔学会発表〕(計 6 件)

〔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・医学研究科・客員研究員  
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:

##### (4) 研究協力者

( )

〔雑誌論文〕(計 0 件)