様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成　２７　年　　５　月　２８　日現在

機関番号：　１２１０２
研究種目：　基盤研究(B)
研究期間：　2012～2014
課題番号：　２４３９０４４９

研究課題名（和文）口腔癌の腫瘍表面分子を標的とするキメラ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 new bio-therapy with chimeric peptide target tumor cell surface molecules of oral cancer

研究代表者

武川　寛樹（BUKAWA, HIROKI）

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：８０１７３５５８

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　14,000,000円

研究成果の概要（和文）：腫瘍表面分子IL-4Rに着目し、口腔がん細胞株と口腔がん切除標本におけるIL-4Rの発現レベルをqRT-PCR法ならびにウェスタンブロット法、免疫組織染色法にて解析したところ、細胞株および切除検体ではIL-4受容体が高発現していることが明らかとなった。次にIL-4Rに関する受容体結合配列の候補選定を行いキメラペプチドを作製し、口腔がん細胞への抗腫瘍効果をin vitro, in vivoの系にて検討した。0～20μMの各培地濃度で24時間培養し、腫瘍細胞における抗腫瘍効果を判定し、正常細胞よりがん細胞に抗腫瘍効果を認めた。マウスの皮下腫瘍モデルにおいても、濃度依存性に抗腫瘍効果を確認した。

研究成果の概要（英文）：Interleukin-4 receptor α (IL-4Rα) is highly expressed on the surface of oral squamous cell carcinoma (OSCC). We designed a novel IL-4Rα-lytic hybrid peptide composed of a binding peptide to IL-4Rα and a cell-lytic peptide. We evaluated the antitumor activity of the IL-4Rα-lytic hybrid peptide as a novel molecular-targeted therapy in OSCC. Immunoblot analysis revealed that IL-4Rα was expressed in all tested OSCC cell lines, but not in a human normal keratinocyte (HaCaT) cell line. Immunohistochemical expression levels of IL-4Rα in OSCC tissues were higher compared to those in normal epithelial tissue. The IL-4Rα-lytic hybrid peptide showed cytotoxic activity in cancer cell lines with a concentration that killed 50% of all cells (IC50) as low as 10uM. HaCaT cells were less sensitive to this peptide with an IC50 of >30uM. In addition, intratumoral administration of IL-4Rα-lytic hybrid peptide significantly inhibited tumor growth in a xenograft model of human OSCC in vivo.

研究分野：　口腔がん分野における分子生物学的研究

キーワード：　キメラペプチド　IL-4R　口腔がん

１．研究開始当初の背景

（１）頭頚部がんは、悪性腫瘍の中で世界 6 番目に多いがんであり、その中で、口腔がんが約 60%を占めている。過去 30 年間で生存率に明らかな向上が見られていないこと、また口腔がんの特徴として、摂食、嚥下、構音、審美など日常生活の根本に関わる口腔機能障害があることから、新たな治療法の開発が極めて重要と考えられる。

（２）そこで開発されたのが、hybrid peptide である。がん細胞に多く発現している受容体に特異的に結合する binding peptide と細胞殺傷効果を有する膜溶解ペプチドである lytic peptide の２つの異なる性質を持ったペプチドを結合させたものである。正常細胞と比較して、がん細胞により多く発現している腫瘍表面分子を標的とした、次世代イムノトキシン療法とも呼ばれている。

（３）膜溶解ペプチドは、陽イオンの抗菌ペプチドであり、細菌と癌細胞膜との類似点に着目され、天然に存在する抗菌ペプチドを利用して人工的な膜溶解ペプチドが設計されている。これらのペプチドは正電荷のアミノ酸を多く含んでいる事から、がん特異的に結合し、さらに抗がん活性もあることが見いだされている。

（４）これまで、様々な固形がんにおいて IL-4R が高発現していることが報告されてきた。従って、今後新しい分子標的治療薬の Target になりえると考え、今回 IL-4R に結合する hybrid peptide を IL-4R hybrid peptide として、研究を計画した。

２．研究の目的

（１）口腔がんにおける IL-4R の発現の有無を確認する。

（２）細胞レベルでの IL-4R-lytic hybrid peptide の殺細胞効果を解析する。

（３）動物レベルでの IL-4R-lytic hybrid peptide の抗腫瘍効果・副作用を評価する。

３．研究の方法

（１）IL-4R の発現解析

口腔がん症例の切除標本を用いて、免疫組織染色、ウェスタンブロット法でタンパク室の発現を評価する。real-time PCR 法を行いて mRNA の発現を評価する。

（２）ペプチドの腫瘍特異性に関する解析

蛍光ペプチドを用いて、fluorescence activated cell sorting (FACS)と共焦点顕微鏡にて解析する。

（３）IL-4R-lytic peptide の抗腫瘍効果の検討 In vitro では、MTT assay にて生存細胞数を測定し、In vivo では、xenograft model を用いて腫瘍内投与を行い評価する。

４．研究成果

（１）口腔がん症例の切除標本 5 例における IL-4R の発現状態の評価

①正常組織・がん組織を採取し、タンパクを抽出しウェスタンブロット法によるタンパク質の発現を確認したところ、正常組織では発現が認められないのに対して、がん組織では、IL-4R の発現を認めた。次いで、免疫組織染色を行ったところ、全ての症例で、腫瘍部分に IL-4R が発現していることが確認された（図１-１、２）。

No.	Age (years)	Gender	Primary site	TNM classification	Differentiation of SCC
1	57	Male	Tongue	T1N0M0	Well
2	40	Male	Tongue	T2N0M0	Moderate
3	47	Female	Tongue	T2N0M0	Well
4	78	Male	Gingiva	T3N2bM0	Well
5	61	Male	Gingiva	T4aN2bM0	Moderate

SCC, squamous cell carcinoma.

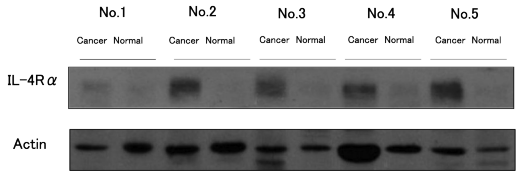


図１-１：口腔がん症例の切除標本 5 例における IL-4R の発現状態

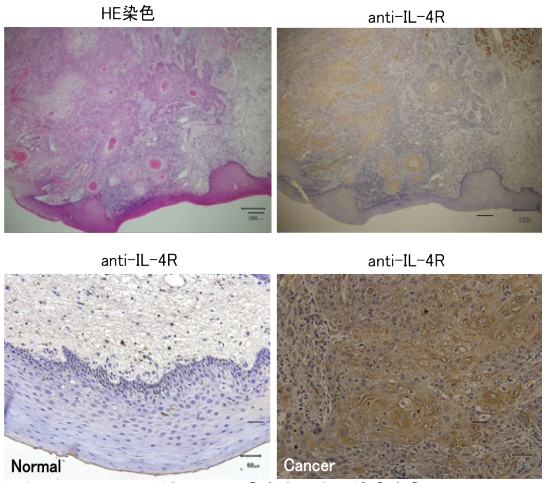


図１-２：口腔がん症例の切除標本における IL-4R の発現状態（免疫組織染色）

（２）口腔がん症例の切除標本 64 例における IL-4R の発現状態の評価

症例数を増やし、当科における腔がん症例の切除標本 64 例についての検討を行ったところ、がん部で染色陽性と判断したものは 64 例中 42 例（65.6%）あり、正常上皮と比較しがん組織でより多く IL-4R 陽性と判定された。

（３）口腔がん細胞株 5 種類とヒト表皮角化細胞株（HaCaT）における IL-4R の発現解析

real-time RT-PCR 法およびウェスタンブロット法にて、5 種類の細胞株で IL-4R の発現が認められたのに対して、HaCaT では、IL-4R の発現を認めなかった。FACS にて定量化したグラフを示す（図２）。

（４）口腔がん細胞株と HaCaT における、IL-4R-hybrid peptide の抗腫瘍効果の検討

MTT assay にて施行した。口腔がん細胞株 5 種類では IL-4R-hybrid peptide においては、抗腫瘍効果を認めた。また正常細胞の HaCaT に対しては、Hybrid peptide の効果は少ない

ことが分かり、腫瘍選択性が確認された。抗腫瘍効果を IC_{50} 値で示すと、がん細胞株では IC_{50} 値が 10μM 以下であったのに対して、HaCaT では、40μM に近い値であった（図３）。

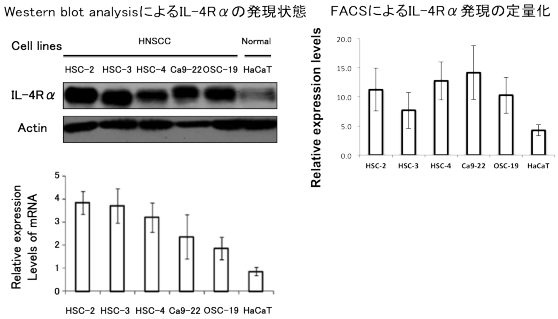


図２：口腔がん細胞株と HaCaT における IL-4R の発現状態

Cell line	IC_{50}(μM) §		IC_{50} ratio Lytic/Hybrid
	IL-4Rα-hybrid peptide Mean±SD	Lytic peptide Mean±SD	
Cancer cells			
HSC-2	1.9 ± 0.1	8.2 ± 0.2	4.4
HSC-3	2.3 ± 0.6	17.4 ± 1.2	7.4
HSC-4	2.8 ± 0.8	33.2 ± 6.1	11.9
Ca9-22	2.2 ± 0.7	29.6 ± 5.8	13.2
OSC-19	8.2 ± 5.4	33.3 ± 13.1	4.0
Normal cell			
HaCaT	37.6 ± 15.3	43.4 ± 13.6	1.2

§ The peptide concentration inducing 50% inhibition of control cell growth.

図３：口腔がん細胞株と HaCaT における、IL-4R-hybrid peptide の抗腫瘍効果

（５）IL-4R の発現と IC_{50} 値との相関の評価および IC_{50}ratio との相関を確認しました。FACS を用いて、IL-4R の発現レベルを評価し、IC_{50}、IC_{50}ratio との相関を検討したところ、強い相関を認め、IL-4R の発現が多いと、IL-4R-hybrid peptide はより効果を示すことが明らかとなった（図４）。

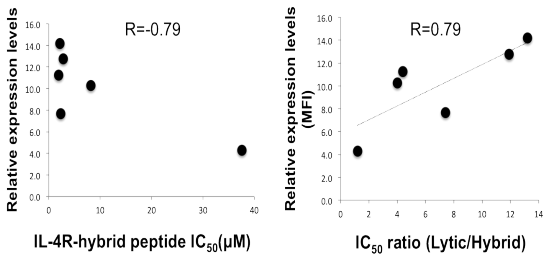


図４：IL-4R の発現と IC_{50} 値との相関

（６）IL-4R-Hybrid peptide の経時的な抗腫瘍効果の検討

がん細胞株 HSC-2 と HaCaT を比較すると、Hybrid peptide はがん細胞に接触後数分以内に効果を示すことが明らかとなった（図５）。

（７）IL-4R-Hybrid peptide の腫瘍特異性の検討

IL-4R-binding peptide に FITC をラベルし、FACS にて binding assay を行った。濃度依存的に、HaCaT と比較して HSC-2 において強い蛍光強度を示す傾向にあったため、binding peptide の腫瘍特異性が示唆された（図６）。

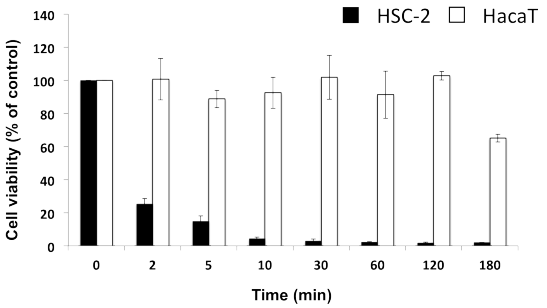


図５：IL-4R-Hybrid peptide の経時的な抗腫瘍効果

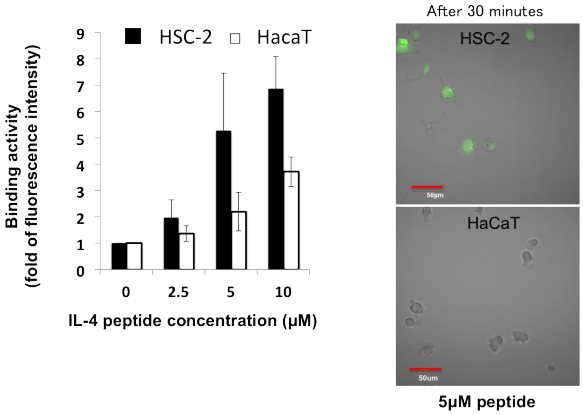


図６：IL-4R-Hybrid peptide の腫瘍特異性

（８）HSC-2 xenograft model に対する IL-4R-hybrid peptide の効果に関する検討

IL-4R-hybrid peptide を腫瘍内投与した際、濃度依存的に抗腫瘍効果を認めた（図７）。IL-4R-hybrid peptide の腫瘍内投与による肝・腎障害や体重減少などは認めなかった。

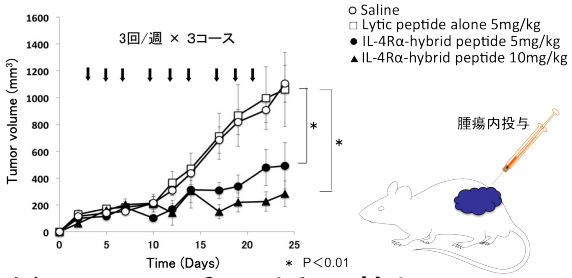


図７：xenograft model に対する IL-4R-hybrid peptide の効果

＜引用文献＞

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、29、2013、2147～2153

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２件）

Seto K, Shoda J, Horibe T, Warabi E, Kohno M, Yanagawa T, Bukawa H, Nakanuma Y, Kawakami K. Targeting interleukin-4 receptor alpha by hybrid Peptide for novel biliary tract cancer therapy、Int J Hepatol、2014、査読有
DOI:10.1155/2014/584650

Seto K, Shoda J, Horibe T, Warabi E, Ishige K, Yamagata K, Kohno M, Yanagawa T, Bukawa H, Kawakami K. Interleukin-4 receptorα-based hybrid peptide effectively induces antitumor activity in head and neck squamous cell carcinoma、Oncology report、29、2013、2147～2153、査読有
DOI:10.3892/or.2013.2387

〔学会発表〕（計１件）
瀬戸佳穂里、他、口腔がんに対するインターロイキン４受容体を標的とした新しい分子標的治療の開発、第 57 回　日本口腔外科学会総会、2012 年 10 月 19 日、パシフィコ横浜、横浜

〔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：
出願年月日：
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
武川　寛樹　（BUKAWA, Hiroki）
筑波大学・医学医療系・教授
研究者番号：80173558

(2)研究分担者
正田　純一　（SHODA, Junichi）
筑波大学・医学医療系・教授
研究者番号：90241827

(3) 研究分担者
川上　浩司　（KAWAKAMI, Koji）
京都大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：70422318