

氏名（本籍）	瀬戸 佳穂里（山梨県）		
学位の種類	博士（医学）		
学位記番号	博甲第 7044 号		
学位授与年月	平成26年 3月25日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	人間総合科学研究科		
学位論文題目	Interleukin-4 receptor $\alpha$ -based hybrid peptide effectively induces antitumor activity in head and neck squamous cell carcinoma. (頭頸部扁平上皮がんに対する Interleukin-4 受容体を標的とした新しい分子標的療法の開発)		
主査	筑波大学教授	博士（医学）	佐藤 幸夫
副査	筑波大学准教授	博士（医学）	和田 哲郎
副査	筑波大学講師	博士（医学）	松田 学
副査	筑波大学講師	博士（医学）	前野 貴美

## 論文の内容の要旨

### （目的）

ハイブリッドペプチドは、癌細胞の細胞表面に特異的に結合するリガンドペプチド（binding peptide）と細胞殺傷効果を有する膜溶解ペプチド（lytic peptide）を結合させた新しい分子標的薬である。正常細胞と比較して癌細胞により多く発現する腫瘍表面分子に結合し、膜を破壊し癌細胞を死滅させる。

これまで、様々な固形がんにおいて、インターロイキン4受容体（IL-4R）が高発現していることが報告されてきた。今回、IL-4R に注目して、口腔がんへの新しい分子標的治療として、IL-4R $\alpha$  に結合する、IL-4R $\alpha$  ハイブリッドペプチドの有用性を示すべく研究を進めた。

### （対象と方法）

IL-4R $\alpha$  の発現の解析として、患者検体、口腔癌細胞株、正常細胞ヒトケラチノサイト（HaCaT）を使用して、免疫組織染色、ウェスタンブロット法、real-time PCR 法、Flow cytometry（FACS）を用いて IL-4R $\alpha$  の発現の有無を確認した。ペプチドの腫瘍特異性に関しては、蛍光ペプチドを用いて、FACS と共焦点顕微鏡を用いて評価した。IL-4R $\alpha$ -hybrid peptide の殺細胞効果を、細胞レベルにおいては

## 審査様式 2 - 1

MTT assay、動物レベルでは、xenograft model を作製し腫瘍内投与を行った。

### (結果)

患者の腫瘍組織と正常組織をそれぞれ同じ手術検体内からとり、組織からタンパクを抽出しウェスタンブロット法を行ったところ、5例中5例とも、腫瘍組織でのみ IL-4R $\alpha$  の発現を認め、免疫組織染色をでも、同様な結果が示された。当科における患者検体の免疫染色46例を行い46例中42例認め、正常上皮と比較し、癌細胞でより多く IL-4R 陽性と判定された。

口腔がん細胞株5種類と正常細胞 (HaCaT) における IL-4R $\alpha$  の発現に関して評価した。ウェスタンブロット法を用いて、5種類の細胞株で、IL-4R $\alpha$  の発現が認められたのに対して、HaCaT においては、IL-4R $\alpha$  の発現を認めなかった。mRNA の発現についても、ウェスタンと同様の結果が得られた。FACS において IL-4R の発現を定量化し、IC50 値との相関、および IC50ratio との相関を確認し、IL-4R $\alpha$  の発現が多いと、hybrid peptide はより効果を示すことが明らかとなった。

ハイブリッドペプチドは癌細胞に接触後数分以内に効果を示すが、フローサイトメトリーにて binding assay を行い、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り、同様に共焦点顕微鏡で確認した。

細胞株における、IL-4R $\alpha$ -hybrid peptide の殺細胞効果を、MTT assay にて解析し、5種類の口腔がん細胞株での殺細胞効果を認めた。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、腫瘍選択性を示した。

さらに、マウスに口腔がんを皮下腫瘍移植し Xenograft model を作製し、食塩水をコントロールとして、Lytic peptide、IL-4R $\alpha$ -hybrid peptide を5、10mg/kg 腫瘍内投与した。食塩水、Lytic peptide では腫瘍が増大しているのに対して、IL-4R $\alpha$ -hybrid peptide では、濃度依存的に腫瘍の縮小を認め肝・腎障害や体重減少などは認めなかった。

### (考察)

IL-4R $\alpha$  は、口腔がんの特異的に発現しており、新しい分子標的療法の target として有用な受容体であることが示唆された。口腔がん細胞株において、*in vitro*、*in vivo* の試験で Hybrid peptide の有用性を示すことができ、腫瘍内投与では副作用は認めなかった。IL-4R $\alpha$ -hybrid peptide は、今後口腔がんの治療の一助になると考え、新たなオーダーメイド治療が期待される。

## 審査の結果の要旨

### (批評)

瀬戸氏の研究により、頭頸部扁平上皮がんに対する Interleukin-4 受容体を標的とした新しい分子標的療法の開発を目指したものである。まず患者の腫瘍組織検体を用い、IL-4R $\alpha$  の高発現を認めることを確認、次に口腔がん細胞株5種類と正常細胞 (HaCaT) を用い IL-4R $\alpha$ -hybrid peptide の癌細胞株に対する殺細胞効果を示し、マウスに口腔がんを皮下腫瘍移植し Xenograft model を作製し、IL-4R $\alpha$ -hybrid peptide が濃度依存的に腫瘍の縮小を認めることを証明したものである。In

## 審査様式 2 - 1

vivo・in vitro とともに臨床応用に発展する可能性を示唆する結果が示されており、研究の計画・遂行・結果の評価が、科学的・論理的に適確に行われている。臨床応用を目指し、適切な投与経路・容量設定・副反応の評価等、今後の研究において引き続き解明を続けて頂きたい。

平成 25 年 12 月 27 日、博士（医学）学位論文審査委員会において審査委員全員出席のもとに最終試験を行い、論文について説明をもとめ、関連事項について質疑応答を行った結果、審査委員全員によって合格とされた。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。