

Hyperthermia improves anticancer effect of Cetuximab in pancreatic cancer mouse model

(膵癌マウス皮下腫瘍モデルにおける温熱付加での
Cetuximab の抗腫瘍効果増強の検討)

2 0 1 4

筑波大学大学院博士課程人間総合科学研究科

宮 本 良 一

目次

1. Abbreviations	1
2. 緒言	3
3. 目的	12
4. 実験材料と方法	13
4-1. 試薬	
4-2. 細胞株の選択、細胞株移植モデルの作成	
4-3. 臨床膀胱癌腫瘍片移植モデル、Ope-xenograft の作成	
4-4. 加温モデル	
4-5. 免疫染色法	
4-6. Cetuximab 定量方法	
4-7. 実験デザイン	
4-7-1. 治療実験：腫瘍体積の経時的計測	
4-7-2. 薬剤の腫瘍集積量の評価	
4-7-3. 温熱刺激での Hsp70、EGFR の発現の評価	
4-7-4. 腫瘍血管内皮細胞数の検討	
4-8. 統計	
5. 結果	21

5-1. 治療実験：腫瘍体積の経時的計測	
5-2. 薬剤の腫瘍集積量の評価	
5-3. 温熱刺激での Hsp70、EGFR の発現の評価	
5-4. 腫瘍血管内皮細胞数の検討	
6. 考察	24
6-1. 組織像での温熱付加効果の違い	
6-2. 温熱刺激での腫瘍集積量の増大と癌微小環境への影響	
6-3. 温熱刺激での抗原抗体反応親和性の向上	
6-4. Hsp70 の発現亢進と癌細胞の関係	
6-5. 肺癌と EGFR シグナルの関係	
6-6. 腫瘍血管内皮細胞への Cetuximab の温熱付加効果	
6-7. 臨床応用への可能性	
7. 結論	32
8. 図表	33
9. 参考文献	45
10.謝辞	54

1 . Abbreviations

Cmab, Cetuximab

CR, Complete response

DAB, Diamino benzidine

DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole

DMEM, Dulbecco's modified Eagle medium

EGF, Epidermal growth factor

EGFR, Epidermal growth factor receptor

EPR, Enhanced permeability and retention

FBS, Fetal bovine serum

HE, Hematoxylin-eosin

HER2, Human epidermal growth factor receptor 2

HIF, Hypoxia inducible factor

HRP, Horseradish peroxidase

Hsp70, Heat shock protein 70

K_D, Dissociation constant

MHC class I, Major histocompatibility complex class I

MST, Median survival time

MT, Masson trichrome

NF- κ B, Nuclear factor-kappa B

NK cell, Natural killer cell

Ns, Normal saline

TGF α , tumor growth factor α

VEGF, Vascular endothelial growth factor

2. 緒言

膵癌は初期段階での自覚症状に乏しく、診断時には半数以上が進行期であり、手術や放射線などの局所治療で根治困難である。また、切除可能と判断されても早期に肝臓および腹膜への遠隔臓器転移により再発を来すために予後が不良で、5年生存率はおおよそ5%である [1, 2]。膵癌での抗癌治療薬は1990年代より、塩酸 Gemcitabine が標準治療薬として投与されているが、生存期間中央値 (median survival time; MST) は5.7か月に過ぎず、その効果は不十分である [3]。そこで近年、既存の低分子薬剤から、新規薬剤として、乳癌や胃癌に発現している HER2 受容体や血管新生の主要シグナルである血管内皮細胞増殖因子 (Vascular endothelial growth factor; VEGF) 受容体を標的とした Trastuzumab、Bevacizumab といった分子標的抗体薬 [4, 5] が広く用いられ、その抗腫瘍効果の上乗せが示されている。そこで、膵癌に対しても分子標的抗体薬が応用されたが、その抗腫瘍効果は不十分であった [6, 7]。その中で、癌細胞の増殖・生存に関与し、膵癌細胞において、60-90%で高発現である上皮成長因子受容体 (Epidermal Growth Factor Receptor; EGFR) は、その発現が膵癌患者の予後因子であるといわれ [8]、その EGFR を標的とした分子標的抗体薬である Cetuximab の臨床研究が行われたが、その治療効果は MST 5.9 か月から 6.3 か月と予後の改善効果を認めなかった [9-14]。

Cetuximab の薬理動態は、EGFR 陽性であるヒト大腸癌細胞株 (GEO) で作製したマウス皮下腫瘍モデルでの基礎実験で一定の見解がしめされている。

Cetuximab の投与濃度依存性に、腫瘍内薬剤濃度、更には癌細胞の EGFR に結合している Cetuximab の割合が異なり、更に、その事が抗腫瘍効果と相関する事が知られている [15]。実際に 0.04 mg/body (自験例は 0.02 mg/body) と 0.25 mg/body の濃度での全身投与で、Cetuximab の腫瘍集積量はそれぞれ腫瘍 1mg あたり、それぞれ 2 ng、5 ng で、癌細胞の EGFR との結合率は 84%、100%と濃度依存性を認めていた。更に、腫瘍組織重量での抗腫瘍効果の比較においても、皮下腫瘍移植後 30 日目で、それぞれの腫瘍重量は 700 mg、400 mg と 0.25 mg/body 投与群でより明らかな抗腫瘍効果を認めた。以上より、Cetuximab と癌細胞の EGFR との結合率、更に抗腫瘍効果は、Cetuximab の投与濃度に依存すると言える。

膵癌における抗体治療薬の効果が限定的な理由として、膵癌の組織学的特徴が大きく影響していると考えられる。一つは腫瘍血流が相対的に乏しい hypovascularity という特徴と、もう一つは癌細胞が豊富な腫瘍内間質にとり囲まれている desmoplastic reaction である。つまり、もともと腫瘍内の血流量が少ない為に腫瘍そのものに到達する薬剤量が少ない上に、腫瘍血管に到達した薬剤が、血管壁を透過し、厚い間質組織を乗り越え癌細胞まで到達する薬剤の割合が極めて少ない事が、膵癌における薬剤治療抵抗性の大きな要因と考えられる

[16-21]。更に、膀胱癌が薬剤抵抗性である三つ目の理由は、癌間質の構成要素の一つである腫瘍血管内皮細胞が挙げられる。腫瘍血管内皮細胞は正常血管内皮細胞と比較し、VEGF や basic fibroblast growth factor といった血管新生因子に対する感受性が高い事や、正常血管内皮細胞には発現していない EGFR が、癌細胞だけでなく腫瘍血管内皮細胞においても発現している事が知られ、血管新生促進作用を助長する事で、癌細胞の浸潤・転移能の獲得に寄与している [22, 23]。そのため、癌細胞だけでなく、癌微小環境を標的とする治療戦略において、腫瘍血管内皮細胞自身、もしくは腫瘍血管内皮細胞の EGFR を標的とした治療戦略が報告されている [24-26]。

薬剤送達が困難な膀胱癌に対して、癌細胞への薬剤送達を改善させる方法として、1. 薬剤の腫瘍集積を上昇する物質の併用投与、2. 薬剤のナノ粒子化、3. 薬剤の選択的動脈投与、4. マイルド温熱療法が挙げられる。1 に関しては、全身の血管内皮細胞の拡張作用を持つ bradykinin や serotonin が挙げられ [27]、更には、腫瘍特異的に、薬剤の腫瘍血管透過性および腫瘍浸透性を亢進するペプチドが報告されている [28]。前者は腫瘍選択性に欠け、後者のペプチドに関しては、当研究室で膀胱癌に対しての効果を検証したが、その腫瘍集積量の上乗せ効果は最大 2.1 倍で、まだまだ不十分であった [29]。2 に関しては、薬剤の粒径を 10-200 nm にナノ粒子化する事で、構造的に未熟な腫瘍血管をすり抜け、薬

剤をより多く癌細胞に集積させる、Enhanced Permeability and Retention effect; EPR effectと言われる効果を期待する治療戦略である [30]。しかしながら、EPR effect が期待できる粒子の設計が極めて困難である点と、EPR effect 単独では全身投与された薬剤が肝臓や脾臓のマクロファージに捕捉される事で、癌細胞まで到達する割合が依然として少ないといった問題が挙げられる。この問題を解決するために、当研究室では、マクロファージを一時的に除去可能な clodronate liposomes を先行投与する方法や、粒子をポリマーコーティングする事で、マクロファージの捕捉から回避可能なステルス効果によって、腫瘍の薬剤集積量の上昇を確認している [31, 32]。しかしながら、まだまだその集積量は不十分で、臨床応用には至っていない。3 に関しては、肝細胞癌に代表される動脈血流支配の腫瘍に対して、カテーテルインターベンションによって、支配動脈選択的に薬剤を投与する方法である。そのため、肝癌と比較して乏血性腫瘍である膵癌に対しての応用は困難である [33]。以上の事から、我々は4番目のマイルド温熱療法に注目した。この治療法は、腫瘍を 41℃から 43℃の比較的低温の温熱刺激を腫瘍に加える事で、腫瘍への薬剤送達が改善し、抗腫瘍効果の上乗せが期待できる治療戦略である [34]。

温熱療法の歴史は古く、紀元前 3 世紀に Hippocrates によって癌は熱で焼灼可能であると提唱された。その後 1860 年代に入り、温熱付加での殺細胞効果、

生理学、加温装置の開発研究が盛んに行われるようになり、50℃の温熱刺激を5分加える事で確実な殺細胞効果が得られる数値目標が提唱された [35]。当初はマイクロ波や交流磁場を使用し、加温しやすい皮膚癌や乳癌といった体表の臓器を焼灼対象としていたが [36, 37]、穿刺針とラジオ波の組合せで、肝腫瘍をはじめとして体表から穿刺可能な腹腔内腫瘍に対しても、焼灼治療効果を上げる事に成功し、現在では臨床で広く用いられている [38]。

一方、41-42℃という比較的低温の加熱を薬剤投与と併用する mild hyperthermia の報告が 1970 年代より散見される様になった。腫瘍を 41℃まで加温する事で、腫瘍血管の血流が増加する事と、血管透過性が亢進する事で、投与した薬剤の腫瘍への分布が上昇し、抗腫瘍効果が増強されるというものである [34]。実際、Nah らの報告した担癌ラットでの加温実験では、腫瘍組織を 42.5℃に 90 分加温する事で、腫瘍組織の血流が 1.5 倍になり、更に 24 時間後に 42.5℃を 60 分加温する事で、腫瘍組織の血流が最大 3 倍となる事を報告している [39]。更に、温熱付加で薬剤の抗腫瘍効果が増強する 3 つ目の理由として、温熱付加で腫瘍内血流が上がった結果、腫瘍内の低血流量によって生じている腫瘍組織内の低酸素、低 pH の状態が改善し、薬剤感受性および放射線感受性が向上する事が挙げられる [40, 41]。実際、1999 年に、Urano らが、10 種類の薬剤の抗腫瘍効果と温熱刺激との関係について報告し、41.5℃での 30 分の加温で薬剤の抗腫

瘍効果は最大 3.6 倍にまで上昇したと報告している [42]。つまり、我々が注目している膵癌で薬剤送達を上昇させ、抗腫瘍効果を増強するには、その組織学的特徴 (hypovascularity、desmoplastic reaction) から、温熱療法は非常に効果的な方法であると言える。

更に、マイルド温熱療法の直接的な抗腫瘍効果として、熱誘導タンパクである Heat shock protein; Hsp 70 の発現の増大が報告されている [43]。Hsp70 の癌細胞に対する作用としては、温熱刺激での NK cell の活性化や MHC class I 発現の増強といった癌細胞に対する免疫応答の活性化作用や、癌細胞増殖に關与する NF- κ B の抑制および、血管新生を調節する VEGF の抑制といった作用を有し、間接的に細胞増殖および血管新生の抑制作用を有している [43-45]。以上の事から、Hsp70 は癌細胞に抑制的に働く作用が報告されてきたが、2007 年、Dai らが Hsp70 と発癌の關連について報告し [46]、その後も、Hsp70 が癌の増殖に促進的に働くという報告を認め、Hsp70 を標的とした新規治療戦略も報告されている [45, 47-49]。以上より、Hsp70 は癌細胞に抑制的に働く作用と、促進的に働く促進的に働く作用といった、相反する作用が報告されている。今回注目している EGFR に関しても、Hsp70 を介しての、EGFR の発現増強や活性化の報告を認めている [47, 50]。

温熱療法の臨床研究に関しては、初めはその加温のし易さから体表の腫

瘍に対して行われた [51-57]。メラノーマでは、138 例の局所進行期および再発腫瘍に対して、放射線治療単独群 (n = 65) と温熱療法併用群 (n = 63) との比較では、Complete response; CR の割合が、それぞれ 23 例 (35%)、39 例 (62%) であり、局所制御の点で温熱療法併用の有用性を示した [51]。乳癌でも同様に、306 例の局所進行乳癌に対しての放射線治療単独 (n = 135) と温熱療法併用群 (n = 171) で、CR の割合がそれぞれ 55 例 (41%)、101 例 (59%) で、局所制御の点で温熱療法併用群が優れている事を報告した [52]。その後、加温装置の開発や薬物動態の解析の進歩により、現在では、食道癌、胃癌、直腸癌といった腹腔内臓器に対しても広く臨床研究が行われるようになった [51-57]。食道癌では、手術可能な 66 例で、術前放射線化学療法単独群 (n = 34) と温熱療法併用群 (n = 32) で比較し、病理学的 CR であった割合が、それぞれ 2 例 (5.9%) と 8 例 (25%) であった [58]。胃癌では、293 例の局所進行癌の検討で、手術単独群 (n = 100)、術前放射線治療と手術の併用群 (n = 98)、術前放射線治療と温熱療法併用および手術群 (n = 95) で、5 年生存率の点で、それぞれ 30 例 (30%)、43 例 (44%)、48 例 (51%) と温熱療法併用群で優位に予後に寄与する事が示唆された [59]。直腸癌では、115 例の局所進行直腸癌に対して、放射線治療単独群 (n = 59) と温熱療法併用群 (n = 56) の検討では、それぞれの 5 年生存率は、7 例 (6.6%)、12 例 (35.6%) と温熱療法併用群で予後改善効果を認めた [60]。以上より、温熱療法は

体表のみならず腹腔内腫瘍に対して、抗腫瘍増強効果を示したエビデンスが報告されている。

膵癌に対しての温熱療法に関しても、塩酸 Gemcitabine と組み合わせた結果が報告されている [61, 62]。 *In vitro* では、ヒト膵癌細胞株 (AsPC-1、MIAPaCa-2) に対して、塩酸 Gemcitabine 単独群と温熱療法併用群を比較し、温熱療法併用群で優位に細胞数の減少を認め、温熱療法の抗腫瘍効果の上乗せが示された [43]。更に、臨床研究では 29 例の局所進行膵癌に対して、化学放射線治療単独群 (n = 9) と温熱療法併用群 (n = 20) で比較し、MST がそれぞれ 9.6 か月、18.6 か月で [61]、同様に、60 例の局所進行膵癌に対して、放射線化学療法群 (n = 26) と温熱療法併用群 (n = 34) での比較で、MST がそれぞれ 11 か月、15 か月であり、いずれの臨床研究も温熱付加での抗腫瘍効果の増強を認めた [62]。

更に、別の臨床研究では、局所進行膵癌 12 例と他臓器転移を認める膵癌 6 例に対して、塩酸 Gemcitabine に温熱療法を併用したところ、MST はそれぞれ 17.7 か月と 5.2 か月で、局所進行膵癌で優位に予後の改善を認めた。この事は、温熱膵癌においても局所制御という点で、温熱療法付加のメリットが期待できると言える。

Cetuximab を初めとした分子標的抗体薬と温熱療法の併用療法は今まで

報告がないものの、仮に、温熱付加で間質内、更に癌細胞まで十分量の Cetuximab を送達可能となれば、より多くの Cetuximab が癌細胞表面の EGFR と結合可能となり、薬剤単剤では治療困難であった癌細胞に対して、十分な抗癌作用が期待可能である。更に、癌細胞の増殖・転移を助長する間質内の腫瘍血管内皮細胞も標的治療とする事が可能である。その事は、癌細胞に対する直接的な抗腫瘍作用だけでなく、腫瘍血管内皮細胞の血管新生を阻害し、間接的な抗腫瘍効果が期待できると言える。

本研究は、癌マウス皮下腫瘍モデルで、Cetuximab と温熱療法を組み合わせ、抗腫瘍効果の増強程度を検討する。更に、癌細胞あたりに集積する Cetuximab を定量化することで、温熱付加での Cetuximab の癌細胞への集積増強程度を証明し、さらにその作用機序について検討する。

3. 目的

本研究は、臨床応用に向けた腭癌に対しての温熱療法による抗腫瘍効果の上乗せ効果に関しての基礎実験データとしての報告を目的とし、腭癌マウス皮下腫瘍モデルで、分子標的抗体薬である **Cetuximab** と温熱療法を組み合わせ、抗腫瘍効果の増強効果を検討する。更に、癌細胞あたりに集積する **Cetuximab** を定量化することで、温熱付加での **Cetuximab** の癌細胞への集積増強程度を証明し、さらにその作用機序について検討する。

4. 実験材料と方法

4-1. 試薬

Cetuximab は Merck KGaA (Germany)より購入した。実験に使用した Cetuximab は生理食塩水 (0.9%NaCl) で希釈し、最終濃度 1.0 mg/kg で使用した。投与量の決定に関しては、温熱付加での抗腫瘍効果の上乗せに期待し、Cetuximab の動物実験の報告例 [15, 63-65] で用いられている 5.0 mg/kg の濃度より低濃度とした。

4-2. 細胞株の選択、細胞株移植モデルの作成

ヒト膵癌細胞株の選択にあたって、組織像での間質の量に注目し、間質量の豊富な細胞株として、Capan-1、BxPC-3、間質量が少ない細胞株として MIAPaCa-2 を選択した [66]。また、EGFR の発現に関しては、Capan-1、BxPC-3 が中等度陽性で、MIAPaCa-2 が強陽性であった [10, 63, 67] (Figure 1)。

3 種類のヒト膵癌細胞株 (Capan-1 [HTB-79], BxPC-3 [CRL-1687]) は ATCC 細胞バンク (VA, USA) より、MIAPaCa-2 (JCRB0070) は JCRB 細胞バンク (大阪) より購入した。

Capan-1、BxPC-3 は RPMI1640 (Sigma-Aldrich, MO, USA) に 10% fetal bovine serum (FBS) を添加した培地で、MIAPaCa-2 は Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Sigma-Aldrich, MO, USA) に 10% FBS を添加した培地にてそれぞれ培養を行った。

3 種類のヒト膵癌細胞株は 8 週齢、雌性ヌードマウス (BALB/cA, CLEA Japan, 東京) の右後ろ脚、大腿部に 5×10^6 個の細胞を皮下に注入して作成した。腫瘍径を計測し、腫瘍体積 (V) を、 $V = \pi ab^2/6$ (a : 最大径, b : 最小径) で算出し、腫瘍体積が 70 mm^3 となった時点で下記の実験に使用する事とした。

4-3. 臨床膵癌腫瘍片移植モデル、Ope-xenograft の作成

今までのヒト膵癌細胞株由来のマウス皮下腫瘍移植モデルは、臨床膵癌の組織像を十分に反映せず、基礎実験データと臨床データとの乖離が問題であった。そこで我々は、前述の 3 種類のヒト膵癌細胞株よりも、病理組織学的に、癌細胞の腺管形成や増生した間質像、薬剤送達に関わる血管の分布、EGFR の発現強度といった点で、臨床膵癌の組織像により近い組織像を持ち、薬物動態の面でも、より臨床膵癌像に近い評価が可能と言われている腫瘍片移植モデル (以下、Ope-xenograft) を我々の研究室で、開発している [66, 68, 69] (Figure 2)。

筑波大学附属病院消化器外科で浸潤性膵管癌の診断で手術が施行された症例を対象とし、得られた膵癌組織の一部を使用した。対象患者からは術前に同意を取得し、更に、筑波大学附属病院臨床研究倫理審査の承認を得て実験を行った (承認番号 H25-123)。動物実験に関しては、国立大学法人筑波大学動物実験取扱い規定に準拠して実験を行った。

採取した膵癌組織は氷上で、正常膵組織、壊死部分をトリミングし、1-2 mm 角の組織片とし、8 週齢、雌性 C.B-17/Icr scid/scid マウスに対して、30%イソフルラン、70%プロピレングリコール混合液で吸入麻酔導入した後に、右後ろ

脚大腿部を剃毛し、5 mm 長の皮膚切開後、皮下を剥離し、組織片を 3 片移植した。創部閉鎖後に 100 μ l の BD マトリゲル (BD, NJ, USA) を注入した。細胞株移植モデルと同様に、継時的に腫瘍径を計測し、腫瘍体積が 70 mm³ に達した時点で実験に使用した。なお、生着した腫瘍はその後、同様の手順で別のマウス個体へと腫瘍組織片の継代移植を行い、組織片の一部はセルバンカー1 (十慈フィールド株式会社、東京) に浸透させ凍結保存とした。

4-4. 加温モデル

加温モデルとしては、マウスの局所加温方法で報告の多い温浴槽での加温方法を選択した [70-73]。温浴槽で水面上に広げた断熱材の上にマウスを載せ、後ろ足両足を断熱剤に開けた穴より、水中に皮下腫瘍を含めて足全体が浸かるようにした。加温中はマスクを使用し、イソフルランの吸入麻酔で維持麻酔を行った。なお、予備実験にて直腸温を同時に計測し、上記の方法で直腸温が上昇しない事を確認した。

4-5. 免疫染色法

マウスから採取した腫瘍組織は速やかに 10%ホルマリン液に浸透させ、2 μ m の厚さでパラフィン切片を作成した。組織形態はヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色、組織中の間質像の評価はマッソントリクロム (Masson trichrome ; MT) 染色で評価した。

EGFR 発現の免疫染色法は、パラフィン切片を Tris-EDTA Buffer (pH9.0) に浸透後、オートクレーブ (121℃、10 分) で抗原の賦活化を行い、0.03% hydrogen-peroxidase で 15 分間内因性ペルオキシダーゼブロックを行った。1 次抗体は、rabbit anti-human EGFR Ab (D38B1, Cell Signaling Technology, Japan) を使用し、反応条件は濃度 100 倍、室温 1 時間で反応させた。Envision+HRP (DAKO, Glostrup, Denmark) で発色させた後にヘマトキシリン染色を行った。発現の評価方法に関しては過去の報告に従い、評価した [74, 75]。

Hsp70 発現確認の免疫染色および腫瘍血管内皮細胞数の確認目的の CD31 の免疫染色に関しても、EGFR の同様の手順で行った。使用した 1 次抗体は、rabbit anti-human Hsp70 Ab (4872, Cell Signaling Technology, Japan)、rabbit anti-mouse CD31 Ab (LS-B1932, LifeSpan BioSciences, WA, USA) で 1 次抗体の反応条件は両者ともに 200 倍希釈、室温 1 時間で染色を行った。それぞれの免疫染色における positive control は、Hsp70 が 41℃の温熱刺激を加えたマウス表皮、CD31 がマウス正常肝臓とした [66, 76]。

Cetuximab の免疫染色法に関しては、腫瘍に集積した Cetuximab を 1 次抗体と見なし、免疫染色を行った。当初は腫瘍に集積した Cetuximab を器質剤 (DAB) にて染色を行っていたが、この方法では Cetuximab の腫瘍集積量を定量する事が困難であると判断し、蛍光標識物質 (Alexa488) での染色法を検討した。パラフィン切片を tris-EDTA Buffer (pH9.0) に浸透後、オートクレーブ (121℃、10 分) で抗原の賦活化を行い、0.03% hydrogen-peroxidase で 30 分間内因性ペルオキシダーゼブロックを行い、更に、biotin-blocking system (X0590, Dako Japan,

Tokyo, Japan) にて内因性ビオチンブロックを行った。1 次抗体は、horseradish peroxidase (HRP) conjugated polyclonal rabbit anti-human IgG Ab (P0214, DAKO, Glostrup, Denmark) で、反応条件は 4℃、24 時間とした。更に増感剤として TSA amplification system (1723749, PerkinElmer, Inc. USA) を 50 倍希釈、室温 10 分で反応させ、2 次抗体として streptavidin conjugated Alexa488 (S11223, Life Technologies, Grand Island, NY, USA) を 500 倍希釈、室温 30 分で反応させ、最後に Slow Fade Gold antifade reagent with DAPI (S36938, Life Technologies, Grand Island, NY, USA) で核の染色を行った。

4-6. Cetuximab 定量方法

顕微鏡 (KEYENCE BZ-9000[®]、大阪) の解析ツールを使用し、200 倍視野の組織学的所見で、島状もしくは腺管状の癌細胞のみを手動で抽出し、間質の領域は除外した。1 切片あたり 10 カ所を抽出し、同様の操作を $n = 4$ に対して、各群それぞれ行った。癌細胞の数は同様の操作で、DAPI の数を計測する事で算出した。蛍光標識抗体 (Alexa488) の蛍光輝度の総数と癌細胞個数を顕微鏡 (KEYENCE BZ-9000[®]、大阪) で算出し、癌細胞 1 細胞あたりに集積した Cetuximab を近似的に定量した (Figure 3)。

4-7. 実験デザイン

4-7-1. 治療実験：腫瘍体積の経時的計測

皮下腫瘍モデルに対して温熱化学療法での抗腫瘍効果の上乗せ効果を経時的に腫瘍径を測定し、腫瘍体積を測定した。腫瘍体積は前述の方法で算出した。皮下腫瘍体積が 70 mm^3 に到達した時点を実験開始とした。Cetuximab (1 mg/kg) を尾静脈より静注し、投与直後より温浴槽にて皮下腫瘍を含めた両下肢の 30 分加温を 1 コースとした。治療プロトコールは、Cetuximab の動物実験のプロトコールに従い [15, 64]、3 日毎に計 10 回尾静脈より投与し、静注直後に 30 分の加温を行った。温度設定は室温である 25°C と、腓癌を初め、腹腔内臓器の温度帯である 37°C 、そして一般的に温熱療法で使用されている温度の 41°C の 3 群を設定した (Cetuximab [Cmab] + 25, Cmab + 37, Cmab + 41) [40, 77]。Cetuximab のコントロールは生理食塩水 (Normal saline; Ns, 0.9%NaCl) とした (Ns + 25, Ns + 37, Ns + 41)。各群の数の設定は $n = 4$ とした。

4-7-2. 薬剤の腫瘍集積量の評価

皮下腫瘍体積が 70 mm^3 に到達した時点を実験開始とした。Cetuximab (1 mg/kg) を尾静脈より静注し、投与直後より温浴槽にて皮下腫瘍を含めた両下肢を 30 分加温した。24 時間後に、頸椎脱臼によりマウスを安楽死させて腫瘍を採取し、病理組織学的評価を行った。温度設定は実験 4-7-1. と同様に設定した (Cetuximab [Cmab] + 25, Cmab + 37, Cmab + 41)。各群の数の設定は $n = 4$ とした。

4-7-3. 温熱刺激での Hsp70、EGFR の発現の評価

温熱刺激自体での、Hsp70、更に EGFR の発現解析の為、実験 3-7-1. において抗腫瘍効果が最大であった Capan-1 群を選択し、マウス皮下腫瘍に対して、温熱刺激のみを行い、それぞれの発現増大の有無を免疫染色法で確認した。皮下腫瘍モデル (n = 4)、加温方法は実験 4-7-1. と同様の手順とした。加温後 24 時間後に腫瘍を摘出し、抗 Hsp70 抗体、抗 EGFR 抗体で、それぞれ免疫染色を行った。免疫染色の評価方法は 1 切片あたり、200 倍視野で 5 か所を観察した。

4-7-4. Cetuximab と温熱付加での腫瘍血管内皮細胞数の検討

温熱付加による Cetuximab の抗腫瘍効果が最大であった Capan-1 群に注目し、実験 4-7-1. における Capan-1 群 (Ns+25, Ns+37, Ns+41, Cmab+25, Cmab+37, Cmab+41) の検体を使用した (各 n = 4)。腫瘍血管内皮細胞数の計測は、Microvessel density 法に準拠し、免疫染色法で、CD31 陽性細胞で囲まれた血管数を計測した [78]。更に、計測方法は腫瘍の壊死領域を除外し、腫瘍中心部と辺縁部で 1 腫瘍あたり各 4 視野、合計 8 視野の血管数を計測し、合計して比較した [66]。

4-8. 統計

統計解析は SPSS-II for Windows ソフトウェア (SPSS Inc, IL, USA)を用いて行い、数値は平均で示した。F 検定で母分散を検定した後に、2 群間の比較は Student の t 検定、多群間の比較は Turkey-Kramer 検定を施行した。 p 値 < 0.05 で有意差ありとした。データのエラーバーは標準誤差 (SEM) で示した。

5. 結果

5-1. 治療実験：腫瘍体積の経時的計測

腫瘍体積の経時的変化に関しては、BxPC-3 群で、皮下移植後 40 日目（治療開始後 30 日目）の時点で、Cmab + 25 群 ($470 \pm 122 \text{ mm}^3$) と比較して、Cmab + 37 群 ($189 \pm 114 \text{ mm}^3$)、Cmab + 41 群 ($121 \pm 155 \text{ mm}^3$) で、腫瘍体積の抑制効果を認めた ($p < 0.05$)。同様に、Capan-1 群で皮下移植後 40 日目（治療開始後 30 日目）の時点で、Cmab + 25 群 ($1070 \pm 10 \text{ mm}^3$) と比較して、Cmab + 37 群 ($789 \pm 18 \text{ mm}^3$)、Cmab + 41 群 ($421 \pm 7 \text{ mm}^3$) で、更に Cmab + 37 群 ($789 \pm 18 \text{ mm}^3$) と Cmab + 41 群 ($421 \pm 7 \text{ mm}^3$) の間に、それぞれ腫瘍体積の抑制効果を認めた ($p < 0.05$)。更に同様に、Ope-xenograft 群においても、皮下移植後 71 日目（治療開始後 43 日目）の時点で、Cmab + 25 群 ($778 \pm 19 \text{ mm}^3$) と比較して、Cmab + 41 群 ($565 \pm 60 \text{ mm}^3$) で、更に Cmab + 37 群 ($823 \pm 19 \text{ mm}^3$) と Cmab + 41 ($565 \pm 60 \text{ mm}^3$) の群の間で、腫瘍体積の抑制効果を認めた ($p < 0.05$)。MIAPaCa-2 群に関しては、皮下移植後 50 日目（治療開始後 27 日目）の時点で、Cmab + 25 群 ($123 \pm 15 \text{ mm}^3$) と比較して、Cmab + 37 群 ($109 \pm 18 \text{ mm}^3$)、Cmab + 41 ($151 \pm 5 \text{ mm}^3$) の群で、温熱付加での腫瘍体積の抑制効果を認めなかった。Ns 群は、いずれの細胞株群においても、温熱付加で腫瘍体積の増減を認めなかった (Figure 4AB)。

5-2. 薬剤の腫瘍集積量の評価

BxPC-3、Capan-1、Ope-xenograft では、25℃と比較して、37℃、41℃で蛍光強度の増強を認めた (Figure 5AB)。BxPC-3、Capan-1、Ope-xenograft 群で、25℃、37℃、41℃でのそれぞれの Alexa488 輝度値は、BxPC-3 群が 1063 ± 630 、 2980 ± 719 、 3015 ± 408 で、Capan-1 群は 760 ± 378 、 1881 ± 435 、 3615 ± 317 で、更に、Ope-xenograft 群では 461 ± 268 、 1469 ± 236 、 1922 ± 870 で、BxPC-3 群および Ope-xenograft 群では、25℃に対して 37℃、41℃で、Capan-1 群では、25℃に対して 37℃と 41℃、および 37℃と 41℃の間で、温熱付加による Cetuximab の腫瘍集積量の増加を認めた ($p < 0.05$)。MIAPaCa-2 群においては、25℃、37℃、41℃での、それぞれの Alexa488 輝度値は、 1632 ± 480 、 1921 ± 424 、 1949 ± 345 で、薬剤単独で既に腫瘍集積量は高値であり、温熱付加での Cetuximab の腫瘍集積量の増大は認めなかった (Figure 6)。

5-3. 温熱刺激での Hsp70、EGFR の発現の評価

Capan-1 群での Hsp70 の発現は、41℃の加温群において明らかな Hsp70 の発現の増大を認めた (Figure 7)。25℃、37℃では発現の増大を認めなかった。同様に、EGFR の発現においても、41℃の群で明らかな発現の増大を認めた (Figure 8)。

5-4. Cetuximab と温熱付加での腫瘍血管内皮細胞数の検討

Capan-1 群での血管数は、Ns+25 群 (137 ± 17 個) と比較して、Cmab + 41 (102 ± 20 個) であり、腫瘍血管数の減少を認めた ($p < 0.05$)。Ns+37 群 (152 ± 11 個)、Ns+41 群 (153 ± 5 個)、Cmab + 25 群 (124 ± 27 個)、Cmab + 37 群 (132 ± 24 個) に関しては差を認めなかった (Figure 9)。

6. 考察

6-1. 組織像での温熱付加効果の違い

膵癌マウス皮下腫瘍モデルで、Cetuximab と温熱療法を併用する事で、抗腫瘍効果の増強を確認できた。その理由としては、温熱付加での Cetuximab の腫瘍集積量の増大が挙げられる。

加温温度での Cetuximab の腫瘍集積量の上乗せ量に注目すると、治療効果の最も高かった Capan-1 群では、25℃と比較して、41℃で 4.7 倍、更に、37℃と比較して、1.9 倍の Cetuximab 集積量を達成していた。同様に、温熱付加で抗腫瘍効果が増強された BxPC-3 と Ope-xenograft に関しても、温熱付加での Cetuximab の腫瘍集積の増大を確認した。この事は、温熱付加での Cetuximab の腫瘍集積量の増強が、抗腫瘍効果に寄与したと言える。更に、Capan-1、Ope-xenograft の群では、それぞれ、25℃だけでなく 37℃に対しても、41℃での抗腫瘍効果の増強を認めた。この事は、もともと 37℃の状態である膵癌をはじめとした腹腔内臓器に対して、41℃に加温する事で温熱療法の効果が得られることを示唆している。

Capan-1 で、温熱付加での抗腫瘍効果が最大であった理由は、間質量が多く、Cetuximab 単剤では腫瘍への集積量が低い Capan-1 に対して、温熱付加の

上乘せ効果で、最大 4.7 倍の腫瘍集積量を達成し、その事が抗腫瘍効果の増強に寄与したと言える。

温熱付加効果が限定的であった MIAPaCa-2 は、髄様の組織像を有し、Cetuximab の腫瘍血管内濃度と腫瘍に到達する濃度の乖離が小さく、薬剤単剤で十分量の Cetuximab が腫瘍に集積し、更に標的である EGFR を飽和させる量の Cetuximab が反応したと言える。なぜなら、当初は通常量の Cetuximab 濃度 (5.0 mg/kg) で薬剤の集積量を予備検討したところ、MIAPaCa-2 では Cetuximab の腫瘍集積量が温熱付加の有無に関わらず、他の細胞株と比較しても高値であったために、既に Cetuximab 単剤で、EGFR と Cetuximab との反応は平衡状態に達していると考えた。よって、MIAPaCa-2 では、温熱付加での抗腫瘍効果の増強を認めなかったと言える。以上の事より、温熱付加での抗腫瘍効果の増強程度は Cetuximab の腫瘍集積量に依存し、それは腫瘍組織像に強く影響を受けると言える。

更に、Ope-xenograft においても、温熱付加での抗腫瘍効果の増強を認めた。Ope-xenograft は、Capan-1 および BxPC-3 と比較して、間質量、腫瘍血管の分布の点で、薬剤単剤での腫瘍集積量に乏しく、細胞株由来の皮下腫瘍と比較して、更に治療効果が乏しいと言える。今回、より臨床膵癌像に近い組織形態、

薬剤送達能を有する Ope-xenograft に対しても、温熱付加で、Cetuximab の腫瘍集積量を最大 4.1 倍と高める事で、抗腫瘍効果を増強する事が出来たと言える。

6-2. 温熱刺激での腫瘍集積量の増大と癌微小環境への影響

抗癌治療薬に温熱療法を組み合わせた治療戦略のメカニズムは以下の用に考えられている [40, 77]。腫瘍を 41℃に加温する事で、はじめに腫瘍血管の血流が増加し、次に、血管内薬剤濃度が上昇し、更に、腫瘍血管から癌細胞までの到達する薬剤の割合を増加させ、最終的に薬剤の腫瘍内濃度を亢進し、薬剤単剤と比較して腫瘍集積量の増大が期待できる。

更に、温熱療法は、癌細胞への薬剤送達の改善効果以外にも、癌組織内の低酸素、低 pH の改善が挙げられる。癌の特徴的な組織学的所見として、腫瘍内を構成する腫瘍血管の構造的未熟さ、腫瘍内血管密度の低さが挙げられる [16-20]。その結果として、腫瘍内は供給される血流量に乏しく、腫瘍組織内は低酸素、低 pH の環境下となり、Hypoxia Inducible Factor (HIF) の刺激による VEGF の高発現で、更なる腫瘍血管の分化が誘導され、その事が腫瘍の増殖、転移に寄与していると言われている [79]。温熱療法で、腫瘍を加温し腫瘍組織内の血流が増加する事で、腫瘍組織内の低酸素および低 pH が改善し [80]、HIF の刺激が抑制され、最終的には、腫瘍の増殖、転移を抑制できる事が期待される

[81]。温熱付加での腫瘍組織内の血流増加および低酸素、低 pH の改善については、実際、乏血性腫瘍である膵癌において検討した報告は認めない。しかしながら、ヒト膵癌細胞株皮下移植マウスモデルにおいても、温熱付加で薬剤の抗腫瘍効果が増強した報告を認めていること [80]、そして膵癌をはじめとした固形腫瘍は、正常組織と比較して、静脈、リンパ管といった排熱機構が未熟・無秩序な構造で運搬効率も低い為、排熱機構が働き難く、熱が貯留しやすいと言われ、温熱付加の影響を受けやすいと言われている [82]。腫瘍内の低酸素、低 pH の環境を改善する事は、細胞の放射線感受性を改善し、放射線による細胞内の DNA 損傷の自己修復を阻害する事も報告されている [83, 84]。

6-3. 温熱刺激での抗原抗体反応親和性の向上

一般に、同一濃度条件下において、抗原抗体反応の親和性は、抗原、抗体反応が平衡状態となる時の、未反応である抗原濃度と抗体濃度の積を抗原抗体複合体の濃度で除して算出される解離定数 (K_D) の値によって規定され、反応する温度や pH 値によって変動する事が知られている [85, 86]。実際、1956 年に報告された、Berson と Yalow による免疫学的測定法における抗原抗体反応と反応温度についての検証では、インスリンとその標的抗体との結合時間は、4℃の場合と比較して、37℃では 21 倍の反応速度であったと報告している [87, 88]。

自験例においても、25℃と比較して、37℃、および41℃の温熱付加で Cetuximab と EGFR の反応速度が促進されたと推測できる。

癌細胞膜に発現している EGFR と分子標的抗体薬である Cetuximab の反応においても同様に、Cetuximab の K_D 値は、2.3 nM といわれ、EGFR に結合可能な EGF、TGF α といった内因性リガンドと比較し、EGFR に対して 5 から 10 倍の親和性を持っている [89]。今回、Cetuximab と EGFR の抗原抗体反応が、温熱刺激によって賦活化され、解離定数が減少する方向に反応が進み、Cetuximab と EGFR との抗原抗体反応の親和性が向上し、その結果として抗腫瘍効果が増強したと言える。

6-4. Hsp70 の発現亢進と癌細胞の関係

Hsp70 は細胞が加温された時に誘導される熱ショックタンパクの一員であり、1980 年代に、Sribastava らによって、腫瘍抗原ペプチドのプロセッシングおよび抗原提示における抗原ペプチドの輸送の役割をし、腫瘍免疫賦活作用に関与していると報告された [90]。更に、NF- κ B や VEGF を介した細胞増殖および血管新生の抑制に寄与しているともいわれている [91, 92]。しかしながら、2007 年、Dai らが Hsp70 と発癌の関係を報告し [46]、現在では、Hsp70 と癌の促進作用に関しても注目されている [45, 47-49]。自験例においても、41℃の温熱刺激

による Hsp70、EGFR の発現増強がそれぞれ認められた。この事は、温熱刺激で増強した Hsp70 が、EGFR の発現増強に寄与した可能性が示唆されたと言える。

自験例では、温熱付加と腫瘍増殖に正の相関を認めなかったが、Hsp70、更には EGFR の発現増強の結果から、温熱刺激と癌の増殖に関しては、今後も注意深い検討が必要であると言える [47, 50]。

6-5. 膵癌と EGFR シグナルの関係

Cetuximab をはじめとした抗 EGFR 抗体薬への薬剤耐性遺伝子として、K-RAS 変異が注目され、既到大腸癌および非小細胞肺癌で、薬剤耐性との関係が言われている [93]。進行膵癌においても、90%の割合で、K-RAS 変異陽性と言われている [94]。しかしながら、K-RAS 変異のある膵癌細胞株に対して、EGFR knockdown で、細胞増殖を抑制した基礎実験結果の報告例や、抗 EGFR 抗体薬を使用した膵癌患者の臨床研究では、K-RAS 変異の発現の有無で予後に差を認めなかった報告も認める [93, 95]。そのため、膵癌に関しては、K-RAS 変異による薬剤耐性の機序は不明のままである。自験例では、MIAPaCa-2、Capan-1、Ope-xenograft が K-RAS 変異陽性であったが、温熱付加で Cetuximab の腫瘍集積を増強することで、抗腫瘍効果を増大する事が可能であった。

6-6. 腫瘍血管内皮細胞への Cetuximab の温熱付加効果

腫瘍血管内皮細胞には、正常血管内皮細胞には発現していない EGFR が発現し、血管新生促進作用を助長する事で、癌細胞の浸潤・転移能の獲得に寄与している事が知られ、そのため、腫瘍血管内皮細胞の EGFR を標的とした治療戦略が報告されている [22, 23]。実際、ヒト膵癌移植マウスモデルで塩酸 Gemcitabine と抗 EGFR 製剤を併用する事で、塩酸 Gemcitabine 単剤と比較して、有意に腫瘍血管の増殖を抑制し、抗腫瘍効果を増強した報告を認める [24-26]。

今回、自験例の結果で、腫瘍血管内皮細胞の血管新生抑制効果については、Cetuximab 単剤では不十分であったが、41℃の温熱付加をすることで血管新生を有意に抑制する事ができた。この事は、温熱付加によって、治療標的である癌細胞だけでなく腫瘍血管内皮細胞に対しても、Cetuximab の送達を改善し、腫瘍血管内皮細胞の増殖を抑制する事が可能であったと言える。その結果として、間接的に抗腫瘍効果の一役を担ったと言える。

6-7. 臨床応用への可能性

現在は装置の開発によって、腹腔内臓器においても局所加温する事が可能となってきた。膵癌に対しても、局所進行膵癌に対して、塩酸 Gemcitabine と放射線療法に温熱療法を加えた臨床研究が報告され、一定の成果を上げている

[61, 62]。本研究は腭癌に対して、抗癌治療に温熱療法の上乗せ効果の有用性を示した、今後の臨床研究を推し進める上での基礎研究データと言える。更に、今回使用した Cetuximab についても、温熱療法での上乗せ効果が明らかだったことから、塩酸 Gemcitabine と併用する事で、更なる抗腫瘍効果が期待できると言える。

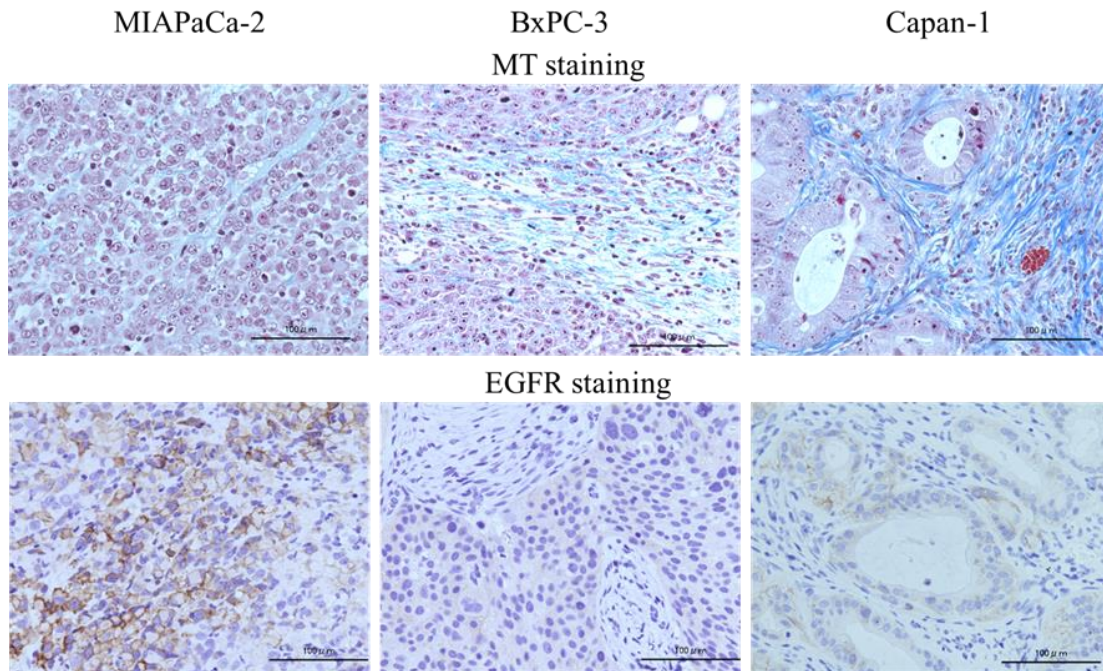
今後は腭癌の治療戦略を構築する上で、手術単独では根治不能な局所進行腭癌に対して、更なる局所制御を可能とし、R0 切除を目指す新しいモダリティとして、化学放射線療法と温熱療法の併用を強く提唱していきたい。

7. 結論

本研究は、分子標的抗体薬である **Cetuximab** と温熱療法を組み合わせる事で、腭癌に対しての抗腫瘍効果を増強することが可能であった。更に、温熱付加による薬剤の腫瘍集積量の増強程度を定量化することに成功し、その抗腫瘍効果は間質量に依存している事を報告した。本研究は腭癌に対して、**Cetuximab** に温熱療法の上乗せ効果の有用性を示した、臨床応用の礎となる基礎研究データであると言える。

8. 図表

Figure 1. 使用するヒト膵癌細胞株の病理組織形態と EGFR の発現

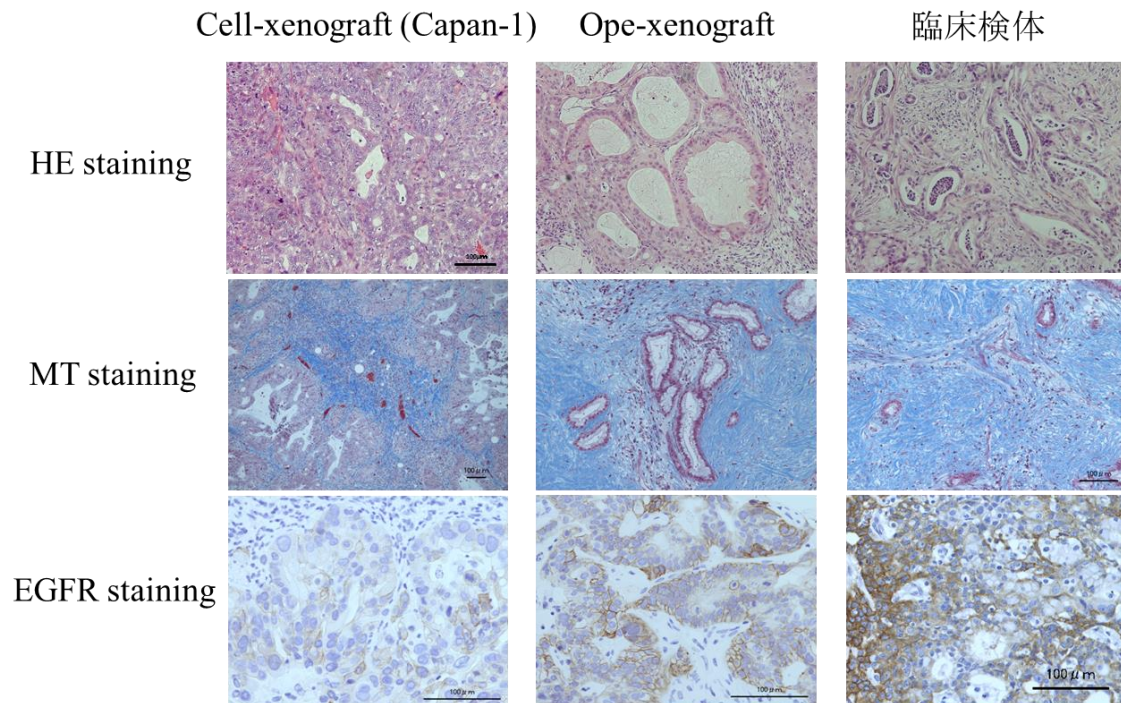


MIAPaCa-2、BxPC-3、Capan-1 でのマッソントリクローム染色 (Masson trichrome staining; MT staining) (上段) および EGFR 染色 (下段)

間質量に注目して、使用する細胞株を選択。MIAPaCa-2 の病理組織像は髄様で、間質像は少ない。BxPC-3、Capan-1 は癌細胞がそれぞれ島状、腺環状の形態をとり、間質量は多い。

EGFR の発現は MIAPaCa-2 が強陽性で、BxPC-3、Capan-1 は中等度陽性である。

Figure 2. Ope-xenograft の病理組織形態

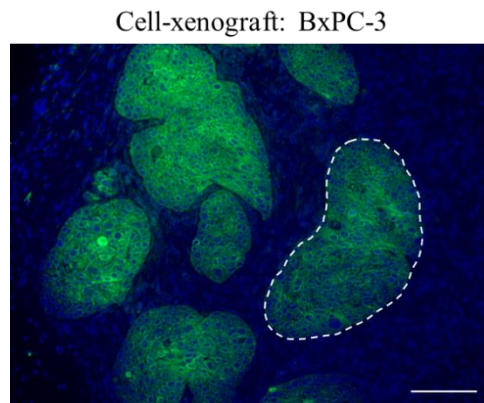


ヒト膵癌細胞株である **Capan-1** 由来のマウス皮下腫瘍と **Ope-xenograft**、および膵癌臨床検体での、**HE 染色 (HE staining)** (上段)、**MT staining** (中段)、**EGFR staining** (下段)

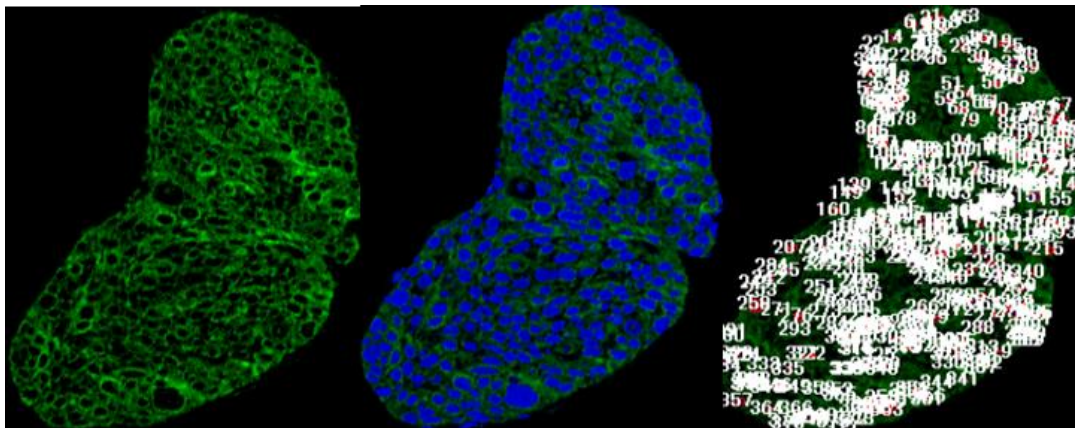
Ope-xenograft は、腫瘍の組織形態で、ヒト膵癌細胞株由来のよりも、癌細胞の腺管形成や増生した間質像、薬剤送達に関わる血流の分布、更には **EGFR** の発現強度といった点で、臨床膵癌の組織像により近い組織像を再現可能である。

Figure 3. 腫瘍集積した Cetuximab の定量方法

A



B



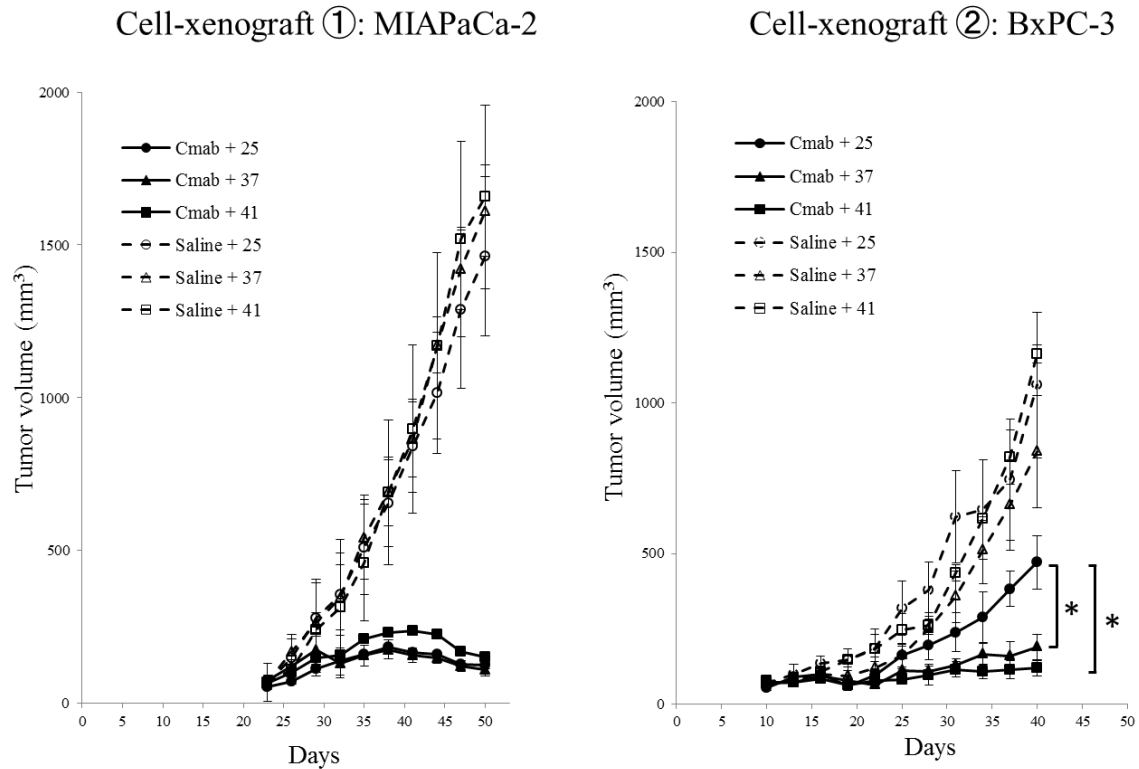
A: BxPC-3 での Alexa488 蛍光免疫染色

顕微鏡 (KEYENCE BZ-9000@、大阪) の解析ツールを使用し、200 倍視野の組織学的所見で、間質の領域は除外するように、島状もしくは腺管状の癌細胞のみを手動で抽出し (点線部)。1 切片あたり 10 カ所を抽出し、同様の操作を $n = 4$ に対して、各群それぞれ行った。

B: A でトリミングした島状の癌細胞所見 (左)、DAPI での核染色 (中央)、顕微鏡で測定した細胞数

癌細胞に集積した Alexa488 の輝度の総和を DAPI で標識した癌細胞数で割る事で、1 癌細胞あたりの Cetuximab を間接的に定量。

Figure 4A. 腫瘍増殖曲線



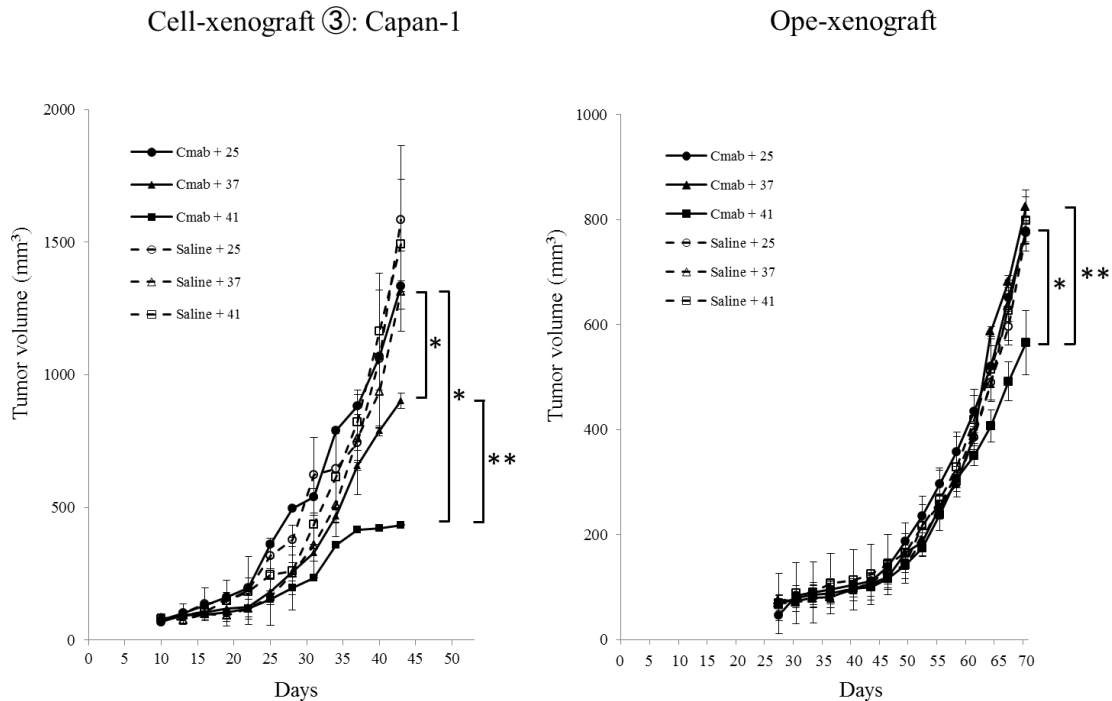
MIAPaCa-2、BxPC-3 群での皮下腫瘍の経時的変化

MIAPaCa-2 群では、皮下移植後 50 日目（治療開始後 27 日目）の時点で、C-mab + 25 群 ($123 \pm 15 \text{ mm}^3$) と比較して、C-mab + 37 群 ($109 \pm 18 \text{ mm}^3$)、C-mab + 41 ($151 \pm 5 \text{ mm}^3$) の群で、温熱付加での腫瘍体積の抑制効果を認めなかった。Ns 群は、いずれの細胞株群においても、温熱付加で腫瘍体積の増減を認めなかった。一方、BxPC-3 群では、皮下移植後 40 日目（治療開始後 30 日目）の時点で、C-mab + 25 群 ($470 \pm 122 \text{ mm}^3$) と比較して、C-mab + 37 群 ($189 \pm 114 \text{ mm}^3$)、C-mab + 41 ($121 \pm 155 \text{ mm}^3$) の群で、腫瘍体積の抑制効果を認めた ($p < 0.05$)。

Abbreviations: C-mab, Cetuximab; Ns, Normal saline

* ; $p < 0.05$ versus C-mab + 25 group

Figure 4B. 腫瘍増殖曲線



Capan-1、Ope-xenograft 群での皮下腫瘍の経時的変化

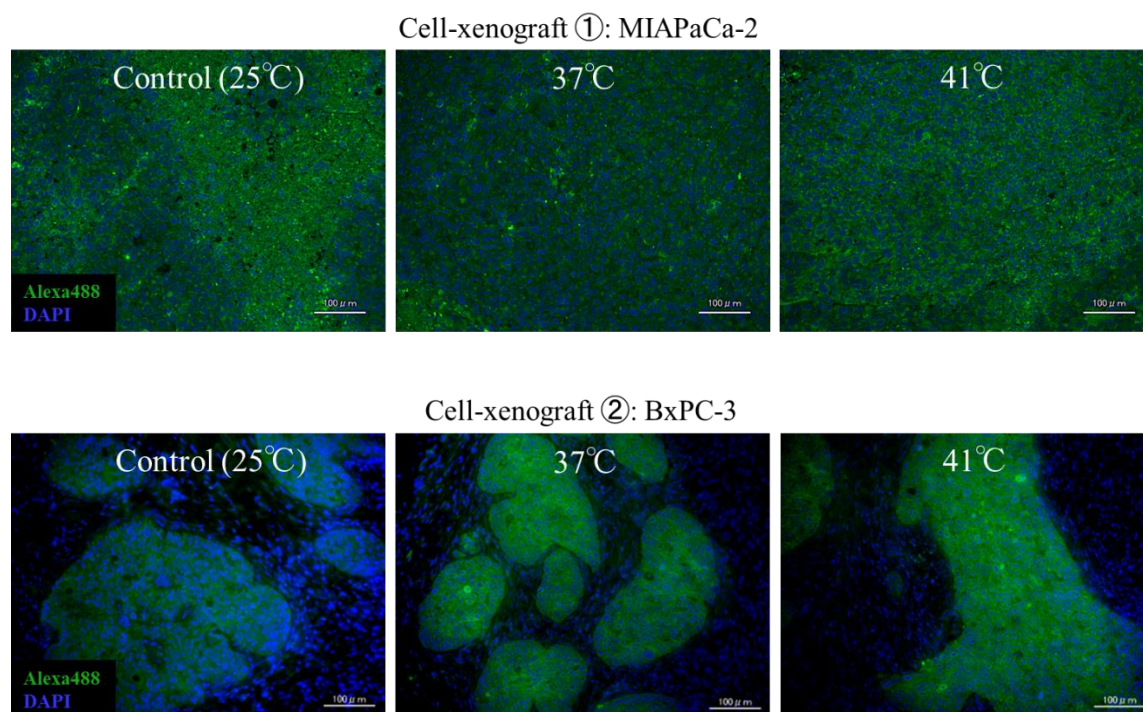
Capan-1 群で皮下移植後 40 日目 (治療開始後 30 日目) の時点で、C-mab + 25 群 ($1070 \pm 10 \text{ mm}^3$) と比較して、C-mab + 37 群 ($789 \pm 18 \text{ mm}^3$)、C-mab + 41 ($421 \pm 7 \text{ mm}^3$) の群で、それぞれ腫瘍体積の抑制効果を認めた ($p < 0.05$)。更に、C-mab + 37 群 ($789 \pm 18 \text{ mm}^3$) と C-mab + 41 ($421 \pm 7 \text{ mm}^3$) の群の間にも、腫瘍体積の抑制効果を認めた ($p < 0.05$)。同様に、Ope-xenograft 群においても、皮下移植後 71 日目 (治療開始後 43 日目) の時点で、C-mab + 25 群 ($778 \pm 19 \text{ mm}^3$) と C-mab + 41 ($565 \pm 60 \text{ mm}^3$) の群の間で、更に、C-mab + 37 群 ($823 \pm 19 \text{ mm}^3$) と C-mab + 41 ($565 \pm 60 \text{ mm}^3$) の群との間で、それぞれ腫瘍体積の抑制効果を認めた ($p < 0.05$)。

Abbreviations: C-mab, Cetuximab; Ns, Normal saline

* ; $p < 0.05$ versus C-mab + 25 group

** ; $p < 0.05$ versus C-mab + 37 group

Figure 5A. Cetuximab の蛍光免疫染色

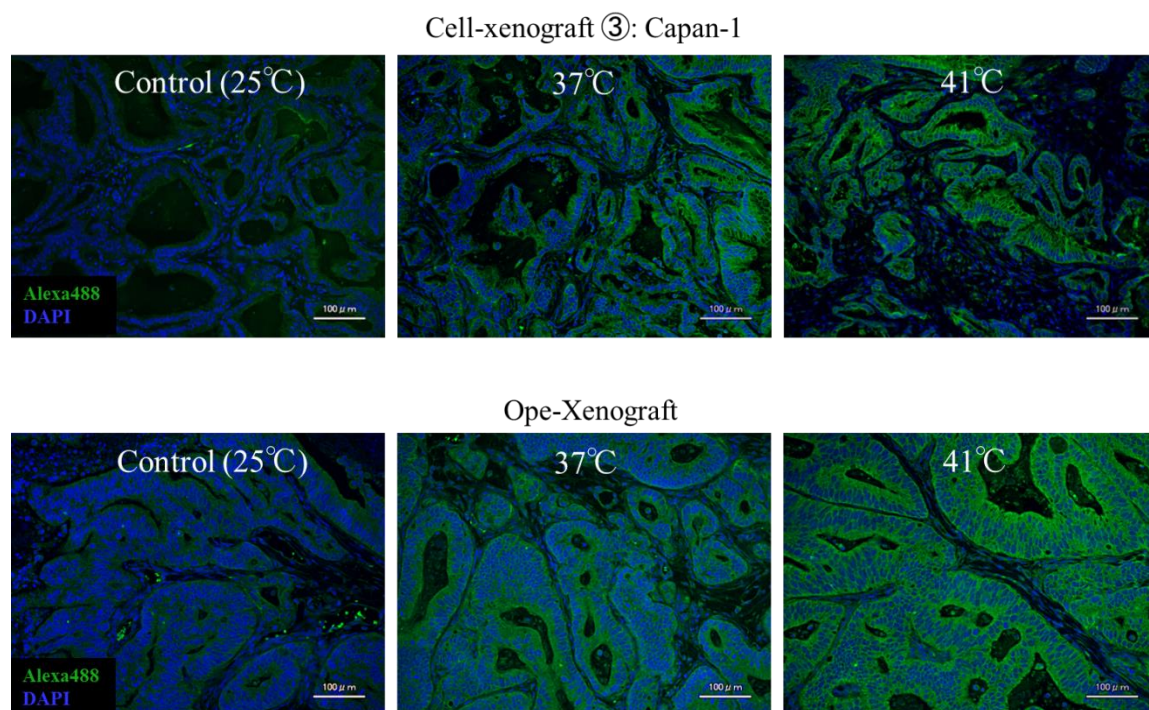


MIAPaCa-2 (上段)、BxPC-3 (下段) 群での Alexa488 と DAPI の蛍光免疫染色

MIAPaCa-2 群は、25°Cで既に、Alexa488 の発現が強度であり、37°C、41°Cでの発現の増強を認めなかった。

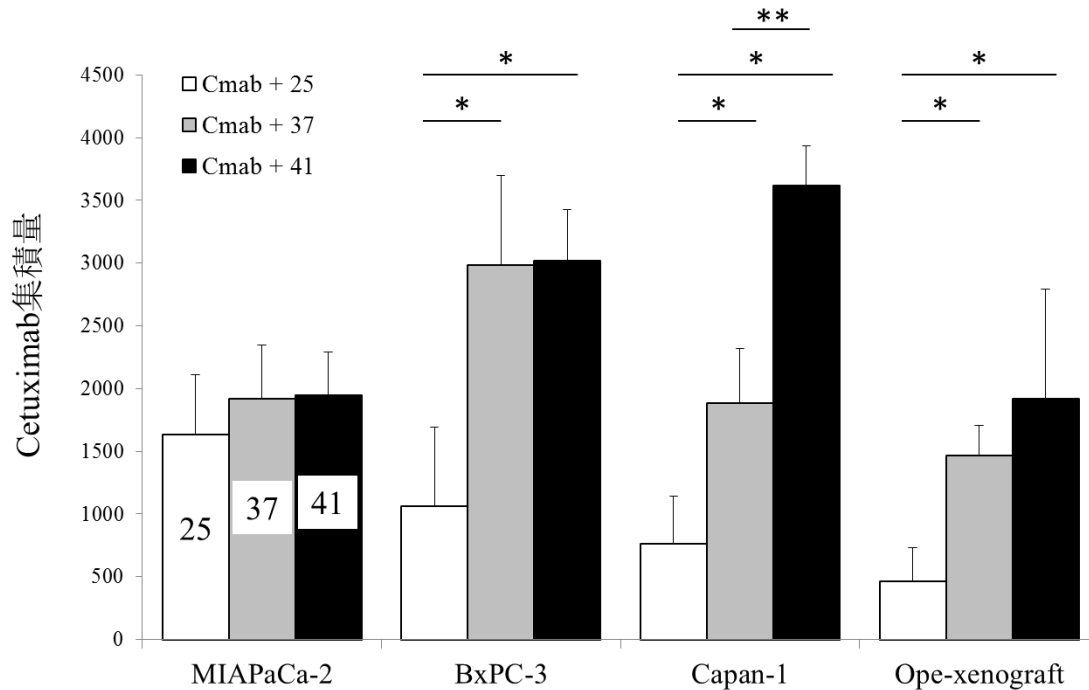
BxPC-3 の群では、癌細胞が島状構造を有し、25°Cと比較して、37°C、41°Cで、Alexa488 の発現増強を認めた。

Figure 5B. Cetuximab の蛍光免疫染色



Capan-1 (上段)、Ope-xenograft (下段) 群での Alexa488 と DAPI の蛍光免疫染色
Capan-1, Ope-xenograft の群では、ともに癌細胞は腺管状の構造を有していた。
それぞれ、25°Cと比較して、37°C、41°Cで Alexa488 の発現の増強を認めた。

Figure 6. Cetuximab の腫瘍集積量



各グループでの、温度変化による Cetuximab の腫瘍集積量の比較

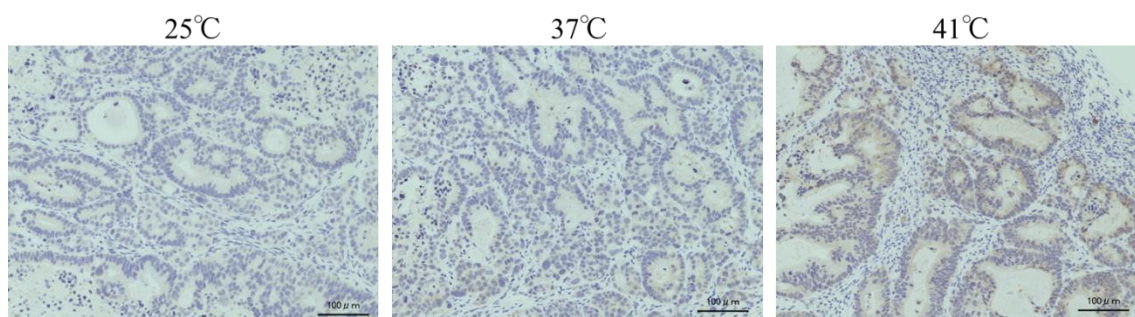
BxPC-3、Capan-1、Ope-xenograft の群では、25°C、37°C、41°Cでのそれぞれの Alexa488 輝度値は、BxPC-3 群が 1063±630、2980±719、3015±408 で、Capan-1 群は 760±378、1881±435、3615±317 で、更に Ope-xenograft 群では 461±268、1469±236、1922±870 で、25°Cに対して 37°Cと 41°Cの間に、温熱付加による Cetuximab の腫瘍集積量の増加を認めた。更に、Capan-1 群では、37°Cと 41°Cの間においても、温熱付加による Cetuximab の腫瘍集積量の増加を認めた。MIAPaCa-2 群においては、25°C、37°C、41°Cでの、それぞれの Alexa488 輝度値は、1632±480、1921±424、1949±345 で、薬剤単独で既に腫瘍集積量は高値であり、温熱付加での Cetuximab の腫瘍集積量の増大は認めなかった。

Abbreviations: Cmax, Cetuximab

* ; $p < 0.05$ versus Cmax + 25 group

** ; $p < 0.05$ versus Cmax + 37 group

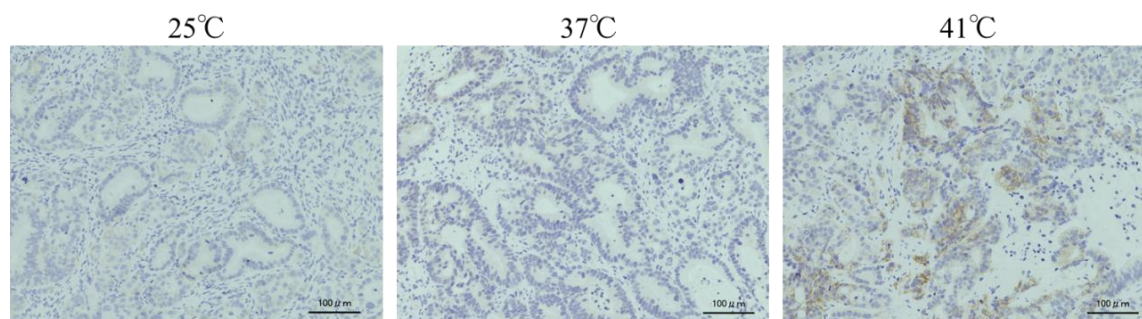
Figure 7. 温熱刺激と Hsp70 の発現



Capan-1 群での、25℃、37℃、41℃での抗 Hsp70 抗体での免疫染色

Capan-1 群での 25℃、37℃、41℃での Hsp70 の発現は、25℃と比較して、41℃の加温群において明らかな Hsp70 の発現の増大を認めた。37℃では発現の増大を認めなかった。

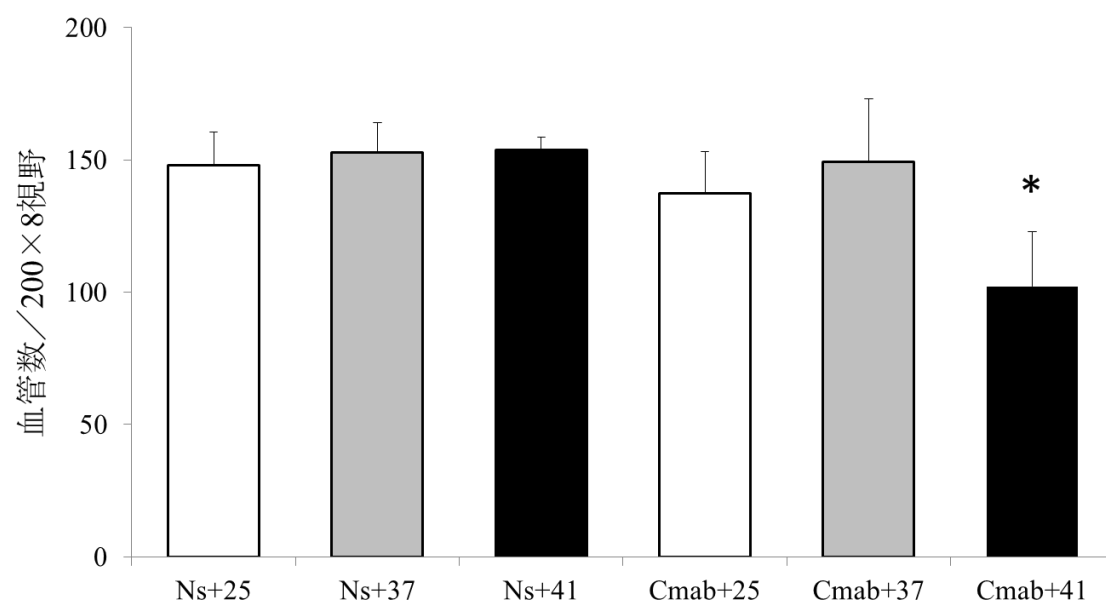
Figure 8. 温熱刺激と EGFR の発現



Capan-1 群での、25°C、37°C、41°Cでの抗 EGFR 抗体での免疫染色

Capan-1 群での 25°C、37°Cでは EGFR の発現は中等度陽性であったが、41°Cでは、EGFR の発現は増強し強陽性であった。

Figure 9. 腫瘍血管数の変化



Cetuximab と温熱付加での腫瘍血管内皮細胞数の検討

Capan-1 群での血管数は、Ns+25 群 (137±17 個) と比較して、Cmab + 41 (102±20 個) で、腫瘍血管数の減少を認めた ($p < 0.05$)。Ns+37 群 (152±11 個)、Ns+41 群 (153±5 個)、Cmab + 25 群 (124±27 個)、Cmab + 37 群 (132±24 個) に関しては差を認めなかった。

Abbreviations: Cmab, Cetuximab; Ns, Normal saline

*; $p < 0.05$ versus Ns + 25 group

9. 参考文献

1. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D: **Global cancer statistics. CA: a cancer journal for clinicians** 2011, **61**(2):69-90.
2. Warshaw AL, Fernandez-del Castillo C: **Pancreatic carcinoma. N Engl J Med** 1992, **326**(7):455-465.
3. Oettle H, Post S, Neuhaus P, Gellert K, Langrehr J, Ridwelski K, Schramm H, Fahlke J, Zuelke C, Burkart C *et al*: **Adjuvant chemotherapy with gemcitabine vs observation in patients undergoing curative-intent resection of pancreatic cancer: a randomized controlled trial. JAMA : the journal of the American Medical Association** 2007, **297**(3):267-277.
4. Yamamoto H, Toyooka S, Mitsudomi T: **Impact of EGFR mutation analysis in non-small cell lung cancer. Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)** 2009, **63**(3):315-321.
5. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, Harris PL, Haserlat SM, Supko JG, Haluska FG *et al*: **Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. N Engl J Med** 2004, **350**(21):2129-2139.
6. Safran H, Iannitti D, Ramanathan R, Schwartz JD, Steinhoff M, Nauman C, Hesketh P, Rathore R, Wolff R, Tantravahi U *et al*: **Herceptin and gemcitabine for metastatic pancreatic cancers that overexpress HER-2/neu. Cancer investigation** 2004, **22**(5):706-712.
7. Kindler HL, Niedzwiecki D, Hollis D, Sutherland S, Schrag D, Hurwitz H, Innocenti F, Mulcahy MF, O'Reilly E, Wozniak TF *et al*: **Gemcitabine plus bevacizumab compared with gemcitabine plus placebo in patients with advanced pancreatic cancer: phase III trial of the Cancer and Leukemia Group B (CALGB 80303). J Clin Oncol** 2010, **28**(22):3617-3622.
8. Fujita H, Ohuchida K, Mizumoto K, Itaba S, Ito T, Nakata K, Yu J, Kayashima T, Hayashi A, Souzaki R *et al*: **High EGFR mRNA expression is a prognostic factor for reduced survival in pancreatic cancer after gemcitabine-based adjuvant chemotherapy. International journal of oncology** 2011, **38**(3):629-641.
9. Cascinu S, Berardi R, Labianca R, Siena S, Falcone A, Aitini E, Barni S, Di Costanzo F, Dapretto E, Tonini G *et al*: **Cetuximab plus gemcitabine and cisplatin compared with gemcitabine and cisplatin alone in patients with advanced pancreatic cancer: a randomised, multicentre, phase II trial. The Lancet Oncology** 2008, **9**(1):39-44.
10. Buchsbaum DJ, Bonner JA, Grizzle WE, Stackhouse MA, Carpenter M, Hicklin DJ,

- Bohlen P, Raisch KP: **Treatment of pancreatic cancer xenografts with Erbitux (IMC-C225) anti-EGFR antibody, gemcitabine, and radiation.** *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2002, **54**(4):1180-1193.
11. Xiong HQ, Rosenberg A, LoBuglio A, Schmidt W, Wolff RA, Deutsch J, Needle M, Abbruzzese JL: **Cetuximab, a monoclonal antibody targeting the epidermal growth factor receptor, in combination with gemcitabine for advanced pancreatic cancer: a multicenter phase II Trial.** *J Clin Oncol* 2004, **22**(13):2610-2616.
 12. Philip PA, Benedetti J, Corless CL, Wong R, O'Reilly EM, Flynn PJ, Rowland KM, Atkins JN, Mirtsching BC, Rivkin SE *et al*: **Phase III study comparing gemcitabine plus cetuximab versus gemcitabine in patients with advanced pancreatic adenocarcinoma: Southwest Oncology Group-directed intergroup trial S0205.** *J Clin Oncol* 2006, **24**(22):3605-3610.
 13. Kullmann F, Hollerbach S, Dollinger MM, Harder J, Fuchs M, Messmann H, Trojan J, Gabele E, Hinke A, Hollerbach C *et al*: **Cetuximab plus gemcitabine/oxaliplatin (GEMOXCET) in first-line metastatic pancreatic cancer: a multicentre phase II study.** *Br J Cancer* 2009, **100**(7):1032-1036.
 14. Krempien R, Muentert MW, Huber PE, Nill S, Friess H, Timke C, Diding B, Buechler P, Heeger S, Herfarth KK *et al*: **Randomized phase II--study evaluating EGFR targeting therapy with cetuximab in combination with radiotherapy and chemotherapy for patients with locally advanced pancreatic cancer--PARC: study protocol [ISRCTN56652283].** *BMC cancer* 2005, **5**:131.
 15. Luo FR, Yang Z, Dong H, Camuso A, McGlinchey K, Fager K, Flefleh C, Kan D, Inigo I, Castaneda S *et al*: **Correlation of pharmacokinetics with the antitumor activity of Cetuximab in nude mice bearing the GEO human colon carcinoma xenograft.** *Cancer Chemother Pharmacol* 2005, **56**(5):455-464.
 16. Ruoslahti E, Bhatia SN, Sailor MJ: **Targeting of drugs and nanoparticles to tumors.** *J Cell Biol* 1983, **188**(6):759-768.
 17. Olive KP, Jacobetz MA, Davidson CJ, Gopinathan A, McIntyre D, Honess D, Madhu B, Goldgraben MA, Caldwell ME, Allard D *et al*: **Inhibition of Hedgehog signaling enhances delivery of chemotherapy in a mouse model of pancreatic cancer.** *Science* 2009, **324**(5933):1457-1461.
 18. Tredan O, Galmarini CM, Patel K, Tannock IF: **Drug resistance and the solid tumor microenvironment.** *J Natl Cancer Inst* 2007, **99**(19):1441-1454.
 19. Minchinton AI, Tannock IF: **Drug penetration in solid tumours.** *Nat Rev Cancer* 2006, **6**(8):583-592.
 20. Jain RK, Stylianopoulos T: **Delivering nanomedicine to solid tumors.** *Nat Rev Clin*

- Oncol* 1038, 7(11):653-664.
21. Olson P, Hanahan D: **Cancer. Breaching the cancer fortress.** *Science* 2009, **324**(5933):1400-1401.
 22. St Croix B, Rago C, Velculescu V, Traverso G, Romans KE, Montgomery E, Lal A, Riggins GJ, Lengauer C, Vogelstein B *et al*: **Genes expressed in human tumor endothelium.** *Science* 2000, **289**(5482):1197-1202.
 23. Akino T, Hida K, Hida Y, Tsuchiya K, Freedman D, Muraki C, Ohga N, Matsuda K, Akiyama K, Harabayashi T *et al*: **Cytogenetic abnormalities of tumor-associated endothelial cells in human malignant tumors.** *Am J Pathol* 2009, **175**(6):2657-2667.
 24. Allport JR, Weissleder R: **Murine Lewis lung carcinoma-derived endothelium expresses markers of endothelial activation and requires tumor-specific extracellular matrix in vitro.** *Neoplasia* 2003, **5**(3):205-217.
 25. Amin DN, Hida K, Bielenberg DR, Klagsbrun M: **Tumor endothelial cells express epidermal growth factor receptor (EGFR) but not ErbB3 and are responsive to EGF and to EGFR kinase inhibitors.** *Cancer Res* 2006, **66**(4):2173-2180.
 26. Bruns CJ, Solorzano CC, Harbison MT, Ozawa S, Tsan R, Fan D, Abbruzzese J, Traxler P, Buchdunger E, Radinsky R *et al*: **Blockade of the epidermal growth factor receptor signaling by a novel tyrosine kinase inhibitor leads to apoptosis of endothelial cells and therapy of human pancreatic carcinoma.** *Cancer Res* 2000, **60**(11):2926-2935.
 27. Crone C: **Modulation of solute permeability in microvascular endothelium.** *Federation proceedings* 1986, **45**(2):77-83.
 28. Sugahara KN, Teesalu T, Karmali PP, Kotamraju VR, Agemy L, Greenwald DR, Ruoslahti E: **Coadministration of a tumor-penetrating peptide enhances the efficacy of cancer drugs.** *Science*, **328**(5981):1031-1035.
 29. Akashi Y, Oda T, Ohara Y, Miyamoto R, Kurokawa T, Hashimoto S, Enomoto T, Yamada K, Satake M, Ohkohchi N: **Anticancer effects of gemcitabine are enhanced by co-administered iRGD peptide in murine pancreatic cancer models that overexpressed neuropilin-1.** *Br J Cancer* 2014, **110**(6):1481-1487.
 30. Bae Y, Nishiyama N, Fukushima S, Koyama H, Yasuhiro M, Kataoka K: **Preparation and biological characterization of polymeric micelle drug carriers with intracellular pH-triggered drug release property: tumor permeability, controlled subcellular drug distribution, and enhanced in vivo antitumor efficacy.** *Bioconjug Chem* 2005, **16**(1):122-130.
 31. Ohara Y, Oda T, Yamada K, Hashimoto S, Akashi Y, Miyamoto R, Kobayashi A, Fukunaga K, Sasaki R, Ohkohchi N: **Effective delivery of chemotherapeutic**

- nanoparticles by depleting host Kupffer cells. *Int J Cancer*.
32. Ujiie K, Kanayama N, Asai K, Kishimoto M, Ohara Y, Akashi Y, Yamada K, Hashimoto S, Oda T, Ohkohchi N *et al*: **Preparation of highly dispersible and tumor-accumulative, iron oxide nanoparticles Multi-point anchoring of PEG-b-poly(4-vinylbenzylphosphonate) improves performance significantly**. *Colloids Surf B Biointerfaces*, **88**(2):771-778.
 33. Wang D, Stockard CR, Harkins L, Lott P, Salih C, Yuan K, Buchsbaum D, Hashim A, Zayzafoon M, Hardy RW *et al*: **Immunohistochemistry in the evaluation of neovascularization in tumor xenografts**. *Biotech Histochem* 2008, **83**(3):179-189.
 34. Dahl O: **Interaction of hyperthermia and chemotherapy**. *Recent results in cancer research Fortschritte der Krebsforschung Progres dans les recherches sur le cancer* 1988, **107**:157-169.
 35. Goldberg SN, Gazelle GS, Solbiati L, Livraghi T, Tanabe KK, Hahn PF, Mueller PR: **Ablation of liver tumors using percutaneous RF therapy**. *AJR Am J Roentgenol* 1998, **170**(4):1023-1028.
 36. Falk MH, Issels RD: **Hyperthermia in oncology**. *Int J Hyperthermia* 2001, **17**(1):1-18.
 37. Christensen DA, Durney CH: **Hyperthermia production for cancer therapy: a review of fundamentals and methods**. *The Journal of microwave power* 1981, **16**(2):89-105.
 38. De Sanctis JT, Goldberg SN, Mueller PR: **Percutaneous treatment of hepatic neoplasms: A review of current techniques**. *Cardiovascular and interventional radiology* 1998, **21**(4):273-296.
 39. Nah BS, Choi IB, Oh WY, Osborn JL, Song CW: **Vascular thermal adaptation in tumors and normal tissue in rats**. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1996, **35**(1):95-101.
 40. van der Zee J: **Heating the patient: a promising approach?** *Ann Oncol* 2002, **13**(8):1173-1184.
 41. Vujaskovic Z, Song CW: **Physiological mechanisms underlying heat-induced radiosensitization**. *Int J Hyperthermia* 2004, **20**(2):163-174.
 42. Urano M, Kuroda M, Nishimura Y: **For the clinical application of thermochemotherapy given at mild temperatures**. *Int J Hyperthermia* 1999, **15**(2):79-107.
 43. Adachi S, Kokura S, Okayama T, Ishikawa T, Takagi T, Handa O, Naito Y, Yoshikawa T: **Effect of hyperthermia combined with gemcitabine on apoptotic cell death in cultured human pancreatic cancer cell lines**. *Int J Hyperthermia* 2009, **25**(3):210-219.
 44. Jolesch A, Elmer K, Bendz H, Issels RD, Noessner E: **Hsp70, a messenger from**

- hyperthermia for the immune system.** *Eur J Cell Biol* 2012, **91**(1):48-52.
45. Evdonin A, Kinev A, Tsupkina N, Guerriero V, Raynes DA, Medvedeva N: **Extracellular HspBP1 and Hsp72 synergistically activate epidermal growth factor receptor.** *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization* 2009, **101**(6):351-360.
 46. Dai C, Whitesell L, Rogers AB, Lindquist S: **Heat shock factor 1 is a powerful multifaceted modifier of carcinogenesis.** *Cell* 2007, **130**(6):1005-1018.
 47. Evdonin AL, Guzhova IV, Margulis BA, Medvedeva ND: **Extracellular heat shock protein 70 mediates heat stress-induced epidermal growth factor receptor transactivation in A431 carcinoma cells.** *FEBS letters* 2006, **580**(28-29):6674-6678.
 48. Mosser DD, Morimoto RI: **Molecular chaperones and the stress of oncogenesis.** *Oncogene* 2004, **23**(16):2907-2918.
 49. Yamauchi T, Ueki K, Tobe K, Tamemoto H, Sekine N, Wada M, Honjo M, Takahashi M, Takahashi T, Hirai H *et al*: **Tyrosine phosphorylation of the EGF receptor by the kinase Jak2 is induced by growth hormone.** *Nature* 1997, **390**(6655):91-96.
 50. Wolf F, Li W, Li F, Li CY: **Non-invasive, quantitative monitoring of hyperthermia-induced EGFR activation in xenograft tumours.** *Int J Hyperthermia* 2011, **27**(5):427-434.
 51. Overgaard J, Gonzalez Gonzalez D, Hulshof MC, Arcangeli G, Dahl O, Mella O, Bentzen SM: **Randomised trial of hyperthermia as adjuvant to radiotherapy for recurrent or metastatic malignant melanoma.** *European Society for Hyperthermic Oncology. Lancet* 1995, **345**(8949):540-543.
 52. Vernon CC, Hand JW, Field SB, Machin D, Whaley JB, van der Zee J, van Putten WL, van Rhoon GC, van Dijk JD, Gonzalez Gonzalez D *et al*: **Radiotherapy with or without hyperthermia in the treatment of superficial localized breast cancer: results from five randomized controlled trials.** *International Collaborative Hyperthermia Group. Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1996, **35**(4):731-744.
 53. Tsukiyama I, Kajiura Y, Ogino T, Akine Y, Egawa S: **Local effect of hyperthermia for superficial and shallow-seated tumors.** *Radiat Med* 1990, **8**(1):22-28.
 54. Liu B, Yang M, Li X, Qian X, Shen Z, Ding Y, Yu L: **Enhanced efficiency of thermally targeted taxanes delivery in a human xenograft model of gastric cancer.** *J Pharm Sci* 2008, **97**(8):3170-3181.
 55. Koning GA, Eggermont AM, Lindner LH, ten Hagen TL: **Hyperthermia and thermosensitive liposomes for improved delivery of chemotherapeutic drugs to solid tumors.** *Pharm Res*, **27**(8):1750-1754.
 56. Colombo R, Da Pozzo LF, Salonia A, Rigatti P, Leib Z, Baniel J, Caldarera E,

- Pavone-Macaluso M: **Multicentric study comparing intravesical chemotherapy alone and with local microwave hyperthermia for prophylaxis of recurrence of superficial transitional cell carcinoma.** *J Clin Oncol* 2003, **21**(23):4270-4276.
57. Chua TC, Moran BJ, Sugarbaker PH, Levine EA, Glehen O, Gilly FN, Baratti D, Deraco M, Elias D, Sardi A *et al*: **Early- and Long-Term Outcome Data of Patients With Pseudomyxoma Peritonei From Appendiceal Origin Treated by a Strategy of Cytoreductive Surgery and Hyperthermic Intraperitoneal Chemotherapy.** *J Clin Oncol*.
 58. Kitamura K, Kuwano H, Watanabe M, Nozoe T, Yasuda M, Sumiyoshi K, Saku M, Sugimachi K: **Prospective randomized study of hyperthermia combined with chemoradiotherapy for esophageal carcinoma.** *J Surg Oncol* 1995, **60**(1):55-58.
 59. Shchepotin IB, Evans SR, Chorny V, Osinsky S, Buras RR, Maligonov P, Shabahang M, Nauta RJ: **Intensive preoperative radiotherapy with local hyperthermia for the treatment of gastric carcinoma.** *Surgical oncology* 1994, **3**(1):37-44.
 60. Berdov BA, Menteshashvili GZ: **Thermoradiotherapy of patients with locally advanced carcinoma of the rectum.** *Int J Hyperthermia* 1990, **6**(5):881-890.
 61. Ohguri T, Imada H, Yahara K, Narisada H, Morioka T, Nakano K, Korogi Y: **Concurrent chemoradiotherapy with gemcitabine plus regional hyperthermia for locally advanced pancreatic carcinoma: initial experience.** *Radiat Med* 2008, **26**(10):587-596.
 62. Maluta S, Schaffer M, Pioli F, Dall'oglio S, Pasetto S, Schaffer PM, Weber B, Giri MG: **Regional hyperthermia combined with chemoradiotherapy in primary or recurrent locally advanced pancreatic cancer : an open-label comparative cohort trial.** *Strahlenther Onkol*, **187**(10):619-625.
 63. Overholser JP, Prewett MC, Hooper AT, Waksal HW, Hicklin DJ: **Epidermal growth factor receptor blockade by antibody IMC-C225 inhibits growth of a human pancreatic carcinoma xenograft in nude mice.** *Cancer* 2000, **89**(1):74-82.
 64. Wild R, Fager K, Flefle C, Kan D, Inigo I, Castaneda S, Luo FR, Camuso A, McGlinchey K, Rose WC: **Cetuximab preclinical antitumor activity (monotherapy and combination based) is not predicted by relative total or activated epidermal growth factor receptor tumor expression levels.** *Mol Cancer Ther* 2006, **5**(1):104-113.
 65. Tonra JR, Deevi DS, Corcoran E, Li H, Wang S, Carrick FE, Hicklin DJ: **Synergistic antitumor effects of combined epidermal growth factor receptor and vascular endothelial growth factor receptor-2 targeted therapy.** *Clin Cancer Res* 2006, **12**(7 Pt 1):2197-2207.
 66. Akashi Y, Oda T, Ohara Y, Miyamoto R, Hashimoto S, Enomoto T, Yamada K,

- Kobayashi A, Fukunaga K, Ohkochi N: **Histological advantages of the tumor graft: a murine model involving transplantation of human pancreatic cancer tissue fragments.** *Pancreas* 2013, **42**(8):1275-1282.
67. Huang ZQ, Buchsbaum DJ, Raisch KP, Bonner JA, Bland KI, Vickers SM: **Differential responses by pancreatic carcinoma cell lines to prolonged exposure to Erbitux (IMC-C225) anti-EGFR antibody.** *J Surg Res* 2003, **111**(2):274-283.
 68. Dong X, Guan J, English JC, Flint J, Yee J, Evans K, Murray N, Macaulay C, Ng RT, Gout PW *et al*: **Patient-derived first generation xenografts of non-small cell lung cancers: promising tools for predicting drug responses for personalized chemotherapy.** *Clin Cancer Res* 2010, **16**(5):1442-1451.
 69. Jin K, Teng L, Shen Y, He K, Xu Z, Li G: **Patient-derived human tumour tissue xenografts in immunodeficient mice: a systematic review.** *Clinical & translational oncology : official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico* 2010, **12**(7):473-480.
 70. Fujimoto S, Kobayashi K, Takahashi M, Konno C, Kokubun M, Ohta M, Shrestha RD, Kiuchi S: **Effects on tumour microcirculation in mice of misonidazole and tumour necrosis factor plus hyperthermia.** *Br J Cancer* 1992, **65**(1):33-36.
 71. Yarmolenko PS, Zhao Y, Landon C, Spasojevic I, Yuan F, Needham D, Viglianti BL, Dewhirst MW: **Comparative effects of thermosensitive doxorubicin-containing liposomes and hyperthermia in human and murine tumours.** *Int J Hyperthermia*, **26**(5):485-498.
 72. Kong G, Anyarambhatla G, Petros WP, Braun RD, Colvin OM, Needham D, Dewhirst MW: **Efficacy of liposomes and hyperthermia in a human tumor xenograft model: importance of triggered drug release.** *Cancer Res* 2000, **60**(24):6950-6957.
 73. Wiedemann GJ, Siemens HJ, Mentzel M, Biersack A, Wossmann W, Knocks D, Weiss C, Wagner T: **Effects of temperature on the therapeutic efficacy and pharmacokinetics of ifosfamide.** *Cancer Res* 1993, **53**(18):4268-4272.
 74. Atkins D, Reiffen KA, Tegtmeier CL, Winther H, Bonato MS, Storkel S: **Immunohistochemical detection of EGFR in paraffin-embedded tumor tissues: variation in staining intensity due to choice of fixative and storage time of tissue sections.** *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 2004, **52**(7):893-901.
 75. Cunningham D, Humblet Y, Siena S, Khayat D, Bleiberg H, Santoro A, Bets D, Mueser M, Harstrick A, Verslype C *et al*: **Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer.** *N Engl J Med* 2004, **351**(4):337-345.

76. Lanneau D, Brunet M, Frisan E, Solary E, Fontenay M, Garrido C: **Heat shock proteins: essential proteins for apoptosis regulation.** *Journal of cellular and molecular medicine* 2008, **12**(3):743-761.
77. Issels RD: **Hyperthermia adds to chemotherapy.** *Eur J Cancer* 2008, **44**(17):2546-2554.
78. Hlatky L, Hahnfeldt P, Folkman J: **Clinical application of antiangiogenic therapy: microvessel density, what it does and doesn't tell us.** *J Natl Cancer Inst* 2002, **94**(12):883-893.
79. Weidemann A, Johnson RS: **Biology of HIF-1alpha.** *Cell death and differentiation* 2008, **15**(4):621-627.
80. Zhang T, Zhang F, Meng Y, Wang H, Le T, Wei B, Lee D, Willis P, Shen B, Yang X: **Diffusion-weighted MRI monitoring of pancreatic cancer response to radiofrequency heat-enhanced intratumor chemotherapy.** *NMR in biomedicine* 2013, **26**(12):1762-1767.
81. Song CW, Shakil A, Griffin RJ, Okajima K: **Improvement of tumor oxygenation status by mild temperature hyperthermia alone or in combination with carbogen.** *Seminars in oncology* 1997, **24**(6):626-632.
82. Adam Chicheł JS, Magda Kubaszewska, Marek Kanikowski: **Hyperthermia – description of a method and a review of clinical applications.** *Rep Pract Oncol Radiother* 2007, **12**(5): 267-275.
83. Kampinga HH, Dikomey E: **Hyperthermic radiosensitization: mode of action and clinical relevance.** *International journal of radiation biology* 2001, **77**(4):399-408.
84. Stewart FA, Denekamp J: **The therapeutic advantage of combined heat and X rays on a mouse fibrosarcoma.** *The British journal of radiology* 1978, **51**(604):307-316.
85. Gupta S, Auerbach A: **Temperature dependence of acetylcholine receptor channels activated by different agonists.** *Biophysical journal* 2011, **100**(4):895-903.
86. Moriggi L, Yaseen MA, Helm L, Caravan P: **Serum albumin targeted, pH-dependent magnetic resonance relaxation agents.** *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* 2012, **18**(12):3675-3686.
87. Berson SA, Yalow RS: **Quantitative aspects of the reaction between insulin and insulin-binding antibody.** *The Journal of clinical investigation* 1959, **38**:1996-2016.
88. Berson SA, Yalow RS, Bauman A, Rothschild MA, Newerly K: **Insulin-I131 metabolism in human subjects: demonstration of insulin binding globulin in the circulation of insulin treated subjects.** *The Journal of clinical investigation* 1956, **35**(2):170-190.
89. Li S, Schmitz KR, Jeffrey PD, Wiltzius JJ, Kussie P, Ferguson KM: **Structural basis**

- for inhibition of the epidermal growth factor receptor by cetuximab. *Cancer Cell* 2005, **7**(4):301-311.
90. Srivastava PK, Menoret A, Basu S, Binder RJ, McQuade KL: **Heat shock proteins come of age: primitive functions acquire new roles in an adaptive world.** *Immunity* 1998, **8**(6):657-665.
 91. Sakamoto N, Kokura S, Okuda T, Hattori T, Katada K, Isozaki Y, Nakabe N, Handa O, Takagi T, Ishikawa T *et al*: **Heme oxygenase-1 (Hsp32) is involved in the protection of small intestine by whole body mild hyperthermia from ischemia/reperfusion injury in rat.** *Int J Hyperthermia* 2005, **21**(7):603-614.
 92. Nakabe N, Kokura S, Shimozawa M, Katada K, Sakamoto N, Ishikawa T, Handa O, Takagi T, Naito Y, Yoshida N *et al*: **Hyperthermia attenuates TNF-alpha-induced up regulation of endothelial cell adhesion molecules in human arterial endothelial cells.** *Int J Hyperthermia* 2007, **23**(3):217-224.
 93. Navas C, Hernandez-Porras I, Schuhmacher AJ, Sibilio M, Guerra C, Barbacid M: **EGF receptor signaling is essential for k-ras oncogene-driven pancreatic ductal adenocarcinoma.** *Cancer Cell* 2012, **22**(3):318-330.
 94. Deramaudt T, Rustgi AK: **Mutant KRAS in the initiation of pancreatic cancer.** *Biochim Biophys Acta* 2005, **1756**(2):97-101.
 95. Kullmann F, Hartmann A, Stohr R, Messmann H, Dollinger MM, Trojan J, Fuchs M, Hollerbach S, Harder J, Troppmann M *et al*: **KRAS mutation in metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma: results of a multicenter phase II study evaluating efficacy of cetuximab plus gemcitabine/oxaliplatin (GEMOXCET) in first-line therapy.** *Oncology* 2011, **81**(1):3-8.

10. 謝辞

本研究は、著者が筑波大学大学院人間総合科学研究科疾患制御医学専攻博士課程在学中に、同大学人間総合科学研究科大河内信弘教授ならびに小田竜也教授のもとに行ったものである。このような研究の機会を与えていただいた両教授、ならびに日頃の研究において指導、助言、助力をいただいた同研究室卒業生の榎本剛史先生、橋本真治先生、山田圭一先生、明石義正先生、大原佑介先生、更に同研究室大学院生である黒川友博先生、稲垣勇紀先生、下村治先生に感謝申し上げます。

また、温熱療法に関して、御助言頂いた同大学放射線腫瘍科櫻井英幸教授、福光延吉先生に感謝申し上げます。