

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K11678

研究課題名(和文) 口腔癌における磁性抗EGFR抗体を用いた温熱療法の開発

研究課題名(英文) Development of hyperthermia for the treatment of oral cancer using magnetite anti-EGFR antibody.

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) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：我々は温熱療法とEGFR阻害薬の併用療法を実現するため、抗EGFR抗体(セツキシマブ)に磁性体を結合させ、相乗効果を期待した治療法の開発を目指した。

Ironoxideを用いて様々な条件下で検討を行い、その結合状態の安定性について観察を行った。Ironoxideとセツキシマブとの結合については安定性が低く、今後さらなる条件検討が必要であると考えた。またマウスを用いた実験では、温熱療法とセツキシマブの併用療法群において有意に抗腫瘍効果が観察された。今後の磁性抗EGFR抗体と温熱療法の併用について、マウス実験での足掛かりになると考えた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

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。今回の研究ではより生体への侵襲が少なく、かつ抗腫瘍効果の向上が期待できる治療の開発を目指した。抗EGFR抗体に磁性体を結合させることで、分子標的薬による抗腫瘍効果のみならず、同時に腫瘍特異的に加温が可能になる相乗効果が期待できると考えられる。本実験では、安全性が高くかつより高い抗腫瘍効果が得られる工夫を目的に、また口腔癌患者のQOLを維持できる治療を目指してトランスレショナルリサーチを推進する。

研究成果の概要(英文)：To develop the effective hyperthermia treatment combined with EGFR inhibitors, we performed to conjugate magnetite particles with anti-EGFR antibody (Cetuximab). We expected that synergistic efficacy not only EGFR targeted therapy, but also hyperthermia treatment specific for tumor burden.

We tried to conjugate Ironoxide with Cetuximab under the various conditions and evaluated the binding affinity and stability. But, we could not get the stabilized conjugation between Ironoxide and Cetuximab. Therefore, it is necessary to investigate the conditions of temperature, incubation time and so on. In addition, we analyzed the efficacy of combination therapy with hyperthermia and Cetuximab in subcutaneous tumor mouse model. It was found that combination therapy with hyperthermia and Cetuximab reduced the tumor growth compared to the controls. In this study, it should be useful to evaluate combination therapy with hyperthermia and magnetite Cetuximab.

研究分野：口腔癌

キーワード：口腔癌 温熱療法 分子標的薬 磁性体

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。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収めている。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、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。

近年、頭頸部癌に対しては EGFR をターゲットにした分子標的薬剤の臨床試験が進んでいる。その結果、EGFR 阻害薬は再発 / 転移症例や CDDP による CCRT の施行が困難な高齢者に対する標準的治療としての役割を担いつつあり、EGFR は頭頸部癌の治療のターゲットとなっている。

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。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。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。

近年は、ナノ粒子の研究は盛んに行われるようになってきているが、口腔癌における抗 EGFR 抗体に磁性体を付与し、実際に磁場をかけて加温する研究は報告がない。このことから本研究において分子標的治療の抗腫瘍効果に加えて、腫瘍に直接作用した抗体そのものを加温出来ることは、より効果的で、より副作用が少ない治療法の確立が期待され、極めて意義深いものである。これまで我々は臨床の現場において、口腔癌における温熱療法は、その解剖学的に複雑な臓器が集まるエリアであるが故に、直接加温が可能な頸部リンパ節転移のみであった。しかし、抗 EGFR 抗体薬に磁性が付与されれば、外部から間接的に磁場をかけることで、舌癌などの複雑な形態で、かつ口腔内であっても腫瘍特異的に温熱療法が可能になり、抗腫瘍効果の増強が期待される点が独創的である。本研究ではすでに臨床応用されている分子標的薬と温熱療法を用いる事で、より安全性が高く、臨床応用への可能性はより高いと思われる。さらに磁性を持つことで、MRI による薬剤の腫瘍への移行性が確認できることも安全である。本研究により分子標的薬を用いた口腔癌研究の向上に大きく貢献するだけでなく、他領域の癌への応用も考えられ、学術的観点からも大変意義深いと思われる。

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。我々はこれまでに、「温熱療法と EGFR 阻害薬の併用療法の開発」の研究テーマで *in vitro* から *in vivo* マウス実験に至るまで、その抗腫瘍効果を報告してきた。今後はより効率的な温熱療法と EGFR 阻害薬の併用療法を実現するため、抗 EGFR 抗体に磁性体を結合させ、分子標的薬による抗腫瘍効果のみならず、同時に腫瘍特異的に加温が可能になる相乗効果が期待できる治療法の開発を目指す。本実験では、安全性が高くかつより高い抗腫瘍効果が得られる工夫を目的に、トランスレーショナルリサーチを推進する。

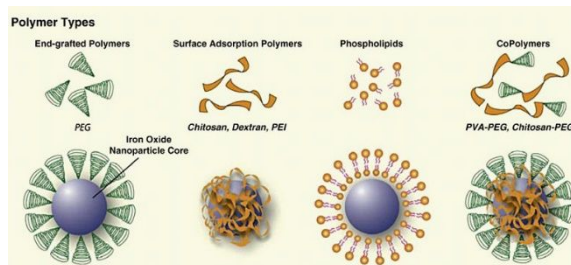
3. 研究の方法

1. 磁性体付与抗 EGFR 抗体の精製：生成方法がシンプルで、安全性の高いものを目標に作成する。
2. *In vitro* にて、磁性体付与抗 EGFR 抗体の腫瘍細胞との結合能および、抗腫瘍効果を通常の抗 EGFR 抗体と比較検討する。
3. *In vitro* で得られた実験データを元に、マウスの皮下腫瘍モデルを用いて磁性体付与抗

EGFR 抗体の腫瘍への集積を MRI で確認し、実際に磁場をかけた際の腫瘍加温状態をサーモグラフで確認する。また抗腫瘍効果を腫瘍のサイズを計測して観察する。

【磁性体付与抗 EGFR 抗体の精製】

1. 市販の試薬 (SIGMA-ALDRICH): Iron oxide を用いる方法。【図 1】
2. Conjugation の確認については、agarose gel electrophoresis にて確認する。



【図 1】 磁性体付与抗 EGFR 抗体の精製

【培養細胞を用いた実験】

1. ヒト扁平上皮癌細胞株 SCC25, OSC-19, SAS, HSC-3 を用いて、磁性体付与抗 EGFR 抗体との結合能を検討する。それぞれの細胞で EGFR の発現レベルに違いがあるため、EGFR 発現レベルと結合能に相関関係があるかを比較検討する。また、磁性体付与抗 EGFR 抗体と、付与していない normal な抗 EGFR 抗体において、抗腫瘍効果に差がないかを cytotoxic assay にて比較検討する。
2. In vitro における温熱との併用効果の検討。1. で得られた条件をもと 6cm dish に上記細胞を培養し、下記のグループに分けて検討を行う。

《EGFR 阻害薬》

Cetuximab を使用する。

- i) PBS ii) normal な抗 EGFR 抗体 iii) 磁性体付与抗 EGFR 抗体

《グループ》

- i) コントロール、ii) 上記試薬のみ、iii) 磁場 (温熱) のみ、iv) 試薬+ 磁場 (温熱)

《検討項目》

- a) Cell viability assay
- b) Protein synthesis assay
- c) Cell apoptosis (Tunel) assay

【動物実験】

マウスを用いた腫瘍加温法の検討

ヒト扁平上皮癌細胞移植ヌードマウスにおける磁性体付与抗 EGFR 抗体と磁場による温熱療法 (以下、HT と略す) と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 HT はサーモトロン RF (山本ビニター社)【図 2】を用いて腫瘍のみを 42~43 に特異的に加温できるように調整を行う。または 40~41 の water bath にて腫瘍加温を行う。ヒト扁平上皮癌細胞株 (SCC25, OSC-19, HSC-3) をヌードマウス (nu/nu Balb/c) の大腿部皮下に腫瘍を移植する。皮下腫瘍が直径 5mm に達したところで治療を開始する。In vitro で得られた基礎的データを参考に最適な HT の条件、磁性体付与抗 EGFR 抗体、投与間隔、投与方法 (経路) の条件を検討する。磁性体付与抗 EGFR 抗体は 尾静脈、腹腔内、腫瘍内投与で注入し、5 日ごとに腫瘍サイズの計測をノギス及び in vivo イメージにて行う。

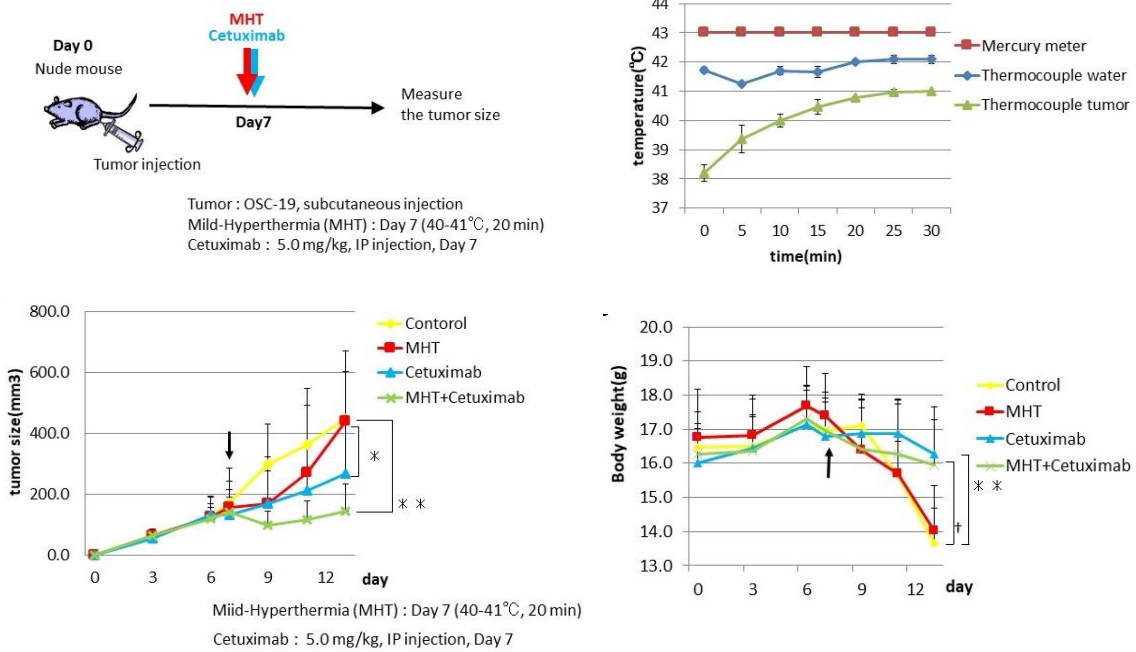


【図 2】 サーモトロン RF によるマウス大腿部皮下腫瘍への加温法

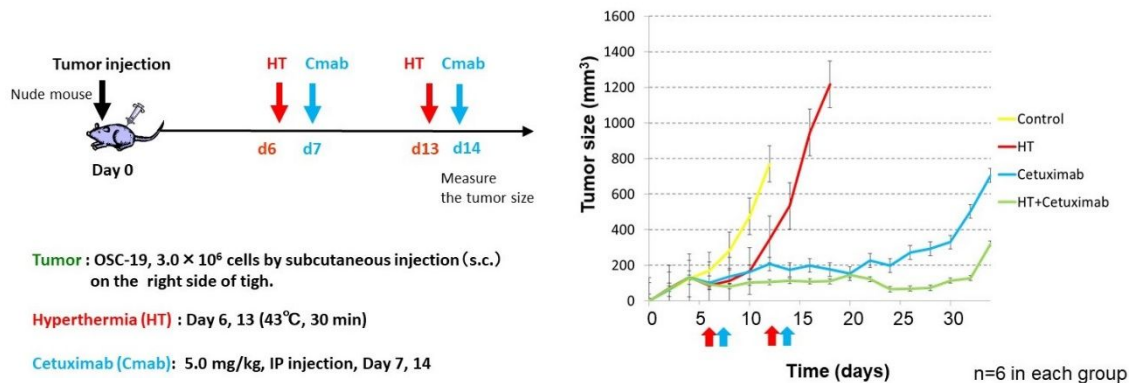
4. 研究成果

1. 市販薬である Ironoxide (SIGMA-ALDRICH) を用いる方法において、様々な条件下で検討を行い、磁性体と抗 EGFR 抗体との結合、保存状態、保存期間において結合状態の安定性について観察を行った。Ironoxide と抗 EGFR 抗体 (セツキシマブ) との結合については脆弱で安定性が低く、Ironoxide 以外の磁性体を用いての検討が必要であると考えられた。
2. 上記 1 の in vitro での実験結果が思うように進めることが出来なかったため、in vivo での HT と Cetuximab での併用について、条件検討も含め実験を進めた。腫瘍移植後 day7 で麻酔下に 43 ・ 30 分の HT (Water bath) および cetuximab5.0mg/kg 腹腔内投与を行った。HT 単独では施行後 2 日間程度腫瘍の抑制効果が認められたが、その後対照

群と同程度の腫瘍の増大を認めた。HT と cetuximab を併用することにより、cetuximab 単独での作用よりも軽度の抗腫瘍効果の増大が認められた。



3. 腫瘍移植後 day6, day13 に 43 °C・30 分の HT、day7, day14 で cetuximab 5.0mg/kg 腹腔内投与を行った。HT 単独では無治療群と比較すると腫瘍の増殖は抑制されたが、2 回の治療後速やかに腫瘍の増大を認めた。一方、セツキシマブ単独投与群では day20 までは腫瘍の増大は緩やかであった。HT と cetuximab の併用群においては day30 までは腫瘍の増大を認めず、他のコントロール群と比較して有意に抗腫瘍効果が認められた。今回の実験では磁性抗 EGFR 抗体投与群との比較検討は行えなかったが、今後の磁性抗 EGFR 抗体と温熱療法の併用について、in vivo 実験での足掛かりになると考えた。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件(うち招待講演 0件/うち国際学会 2件)

| |
|--|
| 1. 発表者名 Nakashima H, Kioi M, Yanagida K, Okubo M, Sugiura K, Mitsudo K, Tohnai I |
| 2. 発表標題 Targeting of interleukin-13 receptor 2 for treatment of head and neck squamous cell carcinoma induced by conditional deletion of TGF- and PTEN signaling. |
| 3. 学会等名 6th World Oral Cancer Congress of the International Academy of Oral Oncology (IAOO), Bangalore, India (国際学会) |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Kioi M |
| 2. 発表標題 Recent advances in molecular-targeted therapy for oral cancer. |
| 3. 学会等名 Symposium, 23rd International Conference on Oral and Maxillofacial Surgery, Hong Kong, (国際学会) |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 來生 知, 林 雄一郎, 南山周平, 飯田昌樹, 岩井俊憲, 小栗千里, 小泉敏之, 廣田 誠, 光藤健司, 藤内 祝 |
| 2. 発表標題 進行口腔癌に対するcetuximab併用動注化学放射線療法の安全性とその上乗せ効果. |
| 3. 学会等名 第36回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会, 新潟, 2018, 1. |
| 4. 発表年 2018年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------|---|--|----|
| 研究分担者 | 來生 知 (K10I Mitomu) (30545059) | 横浜市立大学・附属病院・准教授 (22701) | |

6. 研究組織（つづき）

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------|--|---|----|
| 研究分担者 | 光藤 健司 (MITSUDO Kenji) (70303641) | 横浜市立大学・医学研究科・教授 (22701) | |
| 研究分担者 | 岡本 喜之 (OKAMOTO Yoshiyuki) (80536227) | 横浜市立大学・医学研究科・客員研究員 (22701) | |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
| | |