

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20551

研究課題名(和文) 口腔癌に対するICGを用いた光線力学温熱療法の開発

研究課題名(英文) Development of Photodynamic Hyperthermia Therapy using ICG for oral cancer

研究代表者

飯田 昌樹 (IIDA, Masaki)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：70613511

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は超選択的動注化学放射線療法に応用可能な新たな癌治療戦略としてICGを用いた超選択的動注法による光線力学温熱療法(PHT)の開発を行うことである。ICGは光照射により発熱することが知られており、申請者らが行っている超選択的動注法を用いてICGを腫瘍の栄養動脈に投与し腫瘍組織に高濃度を集積させることで、光照射による温熱療法と光線力学療法の治療効果をそれぞれ向上させることが期待できる。本研究ではヌードマウス皮下腫瘍モデルを用いた動物実験によって、超選択的動注法を用いたICGによるPHTで有効な抗腫瘍効果が得られることを確認し、口腔癌に対する有望な治療法となり得ることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to develop photodynamic hyperthermia therapy (PHT) by superselective intra-arterial infusion method using ICG as a new cancer treatment strategy applicable to superselective intra-arterial chemoradiotherapy. It is known that ICG generates heat by light irradiation. ICG is administered to the tumor feeding artery by using superselective intra-arterial infusion method, and it is accumulated at a high concentration in the tumor tissue. This method may improve the therapeutic effect of hyperthermia and photodynamic therapy. In this study, animal experiments using nude mice subcutaneous tumor model suggest that forceful antitumor effect in PHT by ICG using superselective intra-arterial infusion method is obtained, which can be a promising treatment for oral cancer.

研究分野：口腔癌

キーワード：口腔癌 インドシアニングリーン 温熱療法 光線力学療法

### 1. 研究開始当初の背景

進行口腔癌の治療は手術療法が主体となるが、切除範囲が大きくなるため、摂食・嚥下障害、構音障害、顔面の変形による審美障害が生じ QOL の低下が問題となる。手術以外の治療法としては一般的に全身化学療法と放射線療法の併用療法が行われているが治療成績は十分でない。申請者らは進行口腔癌に対する新たな治療戦略として、浅側頭動脈あるいは後頭動脈より腫瘍の栄養動脈に特殊なカテーテルを挿入して直接抗癌剤を投与する超選択的動注化学療法と放射線療法の併用療法である超選択的動注化学放射線療法を確立し、従来は手術療法でしか根治できなかった症例に対しても、この治療法を用いることで原発部位の手術回避、臓器温存を可能としてきた。一方、多発あるいは大きな頸部リンパ節転移症例 (N2, 3) に対しては超選択的動注化学放射線療法に加えて温熱療法を併用することで良好な結果を得ている。温熱療法は腫瘍を 42.5 に上昇させることで抗腫瘍効果を得る方法である。癌細胞に熱を加えた場合、42.5 を過ぎると急激に癌細胞が死滅し(図 1)、さらに正常細胞に比べ癌細胞の方が熱に弱いことが知られており、この性質を利用して正常細胞にはダメージを与えず癌細胞のみを選択的に死滅させるのが温熱療法である。近年、温熱療法は癌治療の補助療法として研究や臨床の場で進歩を遂げてきた。温熱療法は、Radio Frequency(以下 RF)誘電加熱装置やマイクロ波加熱装置を用いた外部加熱法が一般的である。しかし、口腔癌の解剖学的特徴と RF 誘電加熱装置のアプリーケーターの構造から、原発巣に対して温熱療法を行うことは不可能であった。そこで、申請者らはインドシアニングリーン (ICG) を用いた光線力学温熱療法 (Photodynamic Hyperthermal Therapy: PHT) に着目した。ICG は蛍光造影法の検査試薬、肝機能検査に対する試薬として広く使用されている安全で安価な物質である。一方で、ICG は 800nm 付近に吸収波長を有し、同波長で光照射を行うことで発熱することが明らかになっており(図 2)、温熱療法への応用が可能である。また、この物質は 600-800nm の光を吸収して活性酸素を発生させることが明らかになっている。このように発生した活性酸素は腫瘍細胞を破壊することから光線力学療法 (Photodynamic Therapy:PDT) も可能である。すなわち、ICG は温熱療法と PDT の効果を同時に発揮することが出来

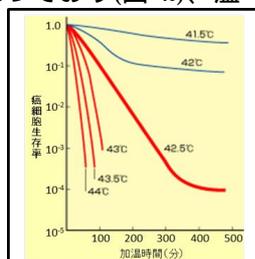


図1 CHO細胞を異なる温度で加熱したときの細胞生存率曲線  
Dewey et al: Radiology, 123, 463-474, 1977. より引用改変

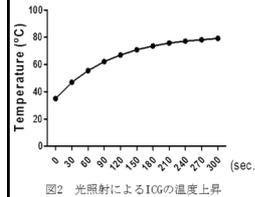


図2 光照射によるICGの温度上昇

る(図 3)。さらに、臨床応用では申請者らが行っている超選択的動注法により ICG を腫瘍の栄養動脈に直接投与し腫瘍組織に集積させることで、ICG による温熱療法と PDT の治療効果をより向上させることが可能である。

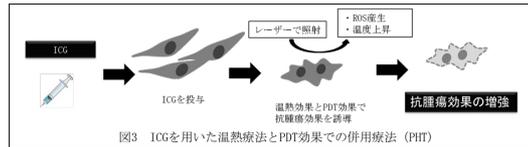


図3 ICGを用いた温熱療法とPDT効果での併用療法 (PHT)

### 2. 研究の目的

本研究の目的は超選択的動注化学放射線療法に应用可能な新たな癌治療戦略として ICG を用いた超選択的動注法による PHT の開発を行うことである。

本研究では、まずヒト由来扁平上皮癌細胞株において ICG を用いた PHT の抗腫瘍効果を検討する。ヒト由来扁平上皮癌細胞について、ICG に光照射することで発生する熱による温熱効果と抗癌活性のある ROS の産生量を評価する。また、細胞周期を測定し作用機序を証明することで動物実験の条件検討を行うことを目的とする。次に、細胞実験で得られた結果を元にしてヒト由来扁平上皮癌細胞株によるヌードマウス皮下腫瘍モデルを用いて動物実験を行う。申請者らが行っている超選択的動注化学療法では、浅側頭動脈と後頭動脈の 2 経路から、腫瘍の栄養動脈へカテーテルを挿入し抗癌剤の投与を行っている。この特徴を利用するため実際の臨床で行っている動注を想定して、ICG を腫瘍内および傍腫瘍組織へ投与し光照射することで抗腫瘍効果の検討を行う。

ICG は蛍光造影法の検査試薬としてセンチネルリンパ節生検のためのリンパ流の同定、あるいは内シャントや血管柄付き遊離皮弁の血流動態評価などですでに臨床応用されている。ICG は温熱療法と PDT の 2 つの抗腫瘍効果が得られる特性を有しており、これを口腔癌に応用することは独創的である。さらに申請者らが行っている超選択的動注法に適用することで、既存の温熱療法では困難であった口腔癌の原発巣への効果的な温熱療法が可能となる。さらに温熱療法は局所の加温であっても全身に対する免疫賦活が起こり、遠隔転移を抑制する事が可能となるかもしれない。特に ICG はすでに臨床応用されていることから安全性が高く、また臨床応用への可能性も高い。よって、ICG を用いた PHT は口腔癌治療の向上に大きく貢献するだけでなく、全身の免疫賦活も得られ、学術的観点からも大変意義深いものと思われる。

### 3. 研究の方法

A. ヒト由来扁平上皮癌細胞株における ICG を用いた PHT の抗腫瘍効果の検討 ICG への光照射における発熱条件の検討 ICG の発熱させるために近赤外線治療器の発

熱条件の検討を行う。近赤外線治療器を用いて温度上昇の検討を行ったところ、生体深達PHTの効果が高い800nmの波長のレーザーをICGに当てることで80以上の温度上昇を示した。温熱療法では通常42.5以上の加温が必要であるが、実際に生体への加温を行う場合の装置の出力、電力の環境を設定する必要がある。そのため温熱療法の温度に適した条件に設定するため、ICGの濃度と装置の環境を検討する。

#### B. ヒト由来扁平上皮癌細胞株に対する PHT の抗腫瘍効果の検討

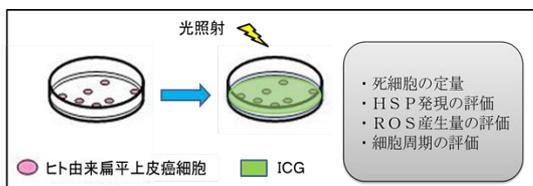
ヒト由来扁平上皮癌細胞株に対して、ICGへの光照射における発熱による抗腫瘍効果を評価する。一般的には温熱療法を行うことで熱ショック蛋白(HSP)の濃度が高まることが知られている。そこで、温熱を加えた際のHSP発現量を評価するために、ヒト由来扁平上皮癌細胞株を調整し、上記で検討した発熱条件でICGへの光照射を行う。温熱刺激後、MTT assay法で死細胞の定量とWestern blottingでHSPの発現の評価をする。

#### C. ヒト由来扁平上皮癌細胞株に対する PHT における ROS 産生の検討

ヒト由来扁平上皮癌細胞株に対して、ICGへの光照射におけるROS産生量を評価する。ヒト由来扁平上皮癌細胞株を調整し、上記で検討した発熱条件でICGへの光照射を行う。ROSの産生量を評価する。ヒト由来扁平上皮癌細胞株を調整し、DCFH-DAの蛍光強度をマイクロプレートリーダーで測定する。

#### D. ヒト由来扁平上皮癌細胞株に対する PHT による細胞周期変化の解析

ICGへ光照射による温熱効果とROS産生による癌細胞の細胞周期の変化を解明し、細胞傷害性のメカニズムと動物実験方法を確立することを目的とする。ヒト由来扁平上皮癌細胞株を用い、ICGを投与する。上記条件で光照射を行う。Cycle TEST PLUS DNA Reagent Kitで処理し、BD FACS Canto フローサイトメトリーで測定する。



#### ．ヌードマウス皮下腫瘍モデルにおける抗腫瘍効果の検討

前年度までに得られた結果を元にして、ヒト由来扁平上皮癌細胞を移植したマウスモデルを作成する。動注化学療法を想定して、ICGを腫瘍内および傍腫瘍投与し光照射によるPHTを行い抗腫瘍効果を検討する。

##### 実験方法

A. マウスヒト由来扁平上皮癌モデルの検討  
ヒト由来扁平上皮癌細胞(5×10<sup>5</sup>cells/ml)をイソフルラン吸入下にてヌードマウスの大腿部に移植し腫瘍直径が5mmになった時点

でICGの投与を開始する。

#### B. 投与量の検討

市販濃度の範囲内で濃度を変えたICGを腫瘍局所に投与する。この範囲内で温熱療法およびPDTによる有効な抗腫瘍効果が得られ、かつ副作用が最小限に抑えられる投与量を検討する。副作用の検討としてはマウスの体重減少、行動異常、各臓器の組織学的変化(H-E染色)を観察する。

#### C. 発熱条件の検討

ICG発熱条件の検討を目的として、横浜市立大学循環制御医学教室の協力により予備実験を行った。近赤外線治療器(東京医研株式会社)で、ICG(5mg/ml)をマウス大腿部に局所投与で50度以上の上昇を確認した。ICGの温熱療法への応用には既存の装置で十分であり、近赤外線治療機器の出力、ICGの濃度を調整することで温熱療法に適切な発熱条件を動物実験で検討する。

#### D. 治療群による抗腫瘍効果の比較検討

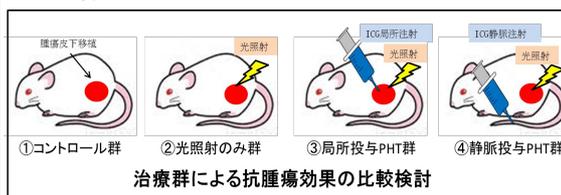
治療群を以下の4グループに分ける(各群10匹)。

コントロール群：ICG投与なし、光照射なし

光照射のみ群：ICG投与なし、光照射あり

局所投与 PHT 群：ICGを大腿部に局所投与し光照射

静脈投与 PHT 群：ICGを静脈投与し光照射



腫瘍が直径5mmを超えた時点で実験を開始する。群、群、群は光照射によるPHTを週に2回、3週間行う。

#### E. 抗腫瘍効果の評価

治療開始後から連日腫瘍を写真撮影して記録するとともに、腫瘍サイズから腫瘍体積[体積=0.5×(長径×幅径<sup>2</sup>)]を毎日計測する。また、治療開始後3週間目に腫瘍組織を摘出し、病理学的解析を行う。具体的には、腫瘍摘出後、半割した腫瘍内部を記録し(写真撮影)、腫瘍組織のパラフィン切片を作製し、H-E染色を行い、腫瘍組織観察を行う。また、腫瘍組織の蛍光TUNEL染色によって、本抗癌剤によるアポトーシス誘導について検討を行う。免疫賦活によって転移性癌を制御している評価として免疫染色しHSP70の腫瘍内局在を調べる。

#### 4. 研究成果

平成27年度は、ヒト由来扁平上皮癌細胞株においてインドシアニングリーンを用いたPHTの抗腫瘍効果を検討した。ヒト由来扁平上皮癌細胞株にインドシアニングリーンを

投与し、光照射を行うことで発生する熱による温熱効果と、抗癌活性のある ROS の産生量の評価を行った。

平成 28 年度は、ヌードマウス皮下腫瘍モデルを用いた動物実験において抗腫瘍効果の検討を行った。まずヒト由来扁平上皮癌細胞をイソフルラン吸入下にてヌードマウスの大腿部に移植し、ヌードマウス皮下腫瘍モデルを作成し、大腿部の腫瘍直径が 5mm になったものを皮下腫瘍モデルとして用いた。市販濃度の範囲内で濃度を変えたインドシアニングリーンを腫瘍局所に投与し、温熱療法および PDT による有効な抗腫瘍効果が得られ、かつ副作用が最小限に抑えられる投与量を検討した。

平成 29 年度は、マウス皮下腫瘍モデルをコントロール群(ICG 投与なし、光照射なし)、光照射のみ群(ICG 投与なし、光照射あり)、局所投与 PHT 群 (ICG を大腿部に局所投与し光照射)、静脈投与 PHT 群 (ICG を静脈投与し光照射) の 4 群に分けて抗腫瘍効果を検討した。その結果、群と群で著明な抗腫瘍効果を認めしたが、動注を想定した群よりも群の方が高い抗腫瘍効果を認めた。

#### 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)

1. Hayashi Y, Mitsudo K, Sakuma K, Iida M, Iwai T, Nakashima H, Okamoto Y, Koizumi T, Oguri S, Hirota M, Kioi M, Koike I, Hata M, Tohnoi I: Clinical outcomes of retrograde intra-arterial chemotherapy concurrent with radiotherapy for elderly oral squamous cell carcinoma patients aged over 80 years old. *Radiat Oncol*, 12(1):112, 2017. doi:10.1186/s13014-017-0847-3. 査読あり
2. Minamiyama S, Mitsudo K, Hayashi Y, Iida M, Iwai T, Nakashima H, Oguri S, Ozawa T, Koizumi T, Hirota M, Kioi M, Tohnoi I: Retrograde superselective intra-arterial chemotherapy and daily concurrent radiotherapy for T2-4N0 tongue cancer: control of occult neck metastasis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*, 124(1):16-23, 2017. doi: 10.1016/j.oooo.2017.02.004. Epub 2017 Feb 21. 査読あり

[学会発表](計 6 件)

1. Mitsudo K, Koizumi T, Hayashi Y, Sugiura K, Iida M, Iwai T, Nakashima H, Oguri S, Kioi M, Hirota M, Tohnoi I: Retrograde superselective intra-arterial chemotherapy and daily concurrent radiotherapy for stage III and IV oral cancer: Analysis of therapeutic results in 112 cases.

Society Symposia 10. Japanese Society Novel Therapeutic Approaches. 6th World Oral Cancer Congress of the International Academy of Oral Oncology (IAOO) Bangalore, India, 2017, 5.

2. 小泉敏之, 光藤健司, 飯田昌樹, 佐藤 格, 飯坂友宏, 南山周平, 林 雄一郎, 野里朋代, 中鍛治里奈, 大澤昂平, 藤内祝: 進行口腔癌に対する超選択的動注化学放射線療法とハイパーサーミアの併用療法 - 下顎骨に接した頸部リンパ節転移に対する治療 -. 日本ハイパーサーミア学会第 34 回大会, 京都, 2017, 9.
3. 野里朋代, 光藤健司, 小泉敏之, 飯田昌樹, 佐藤 格, 飯坂友宏, 南山周平, 林雄一郎, 中鍛治里奈, 大澤昂平, 藤内祝: 進行口腔癌に対する逆行性超選択的動注化学放射線療法とハイパーサーミアの併用療法 - 頸部リンパ節転移に対する治療効果 -. 日本ハイパーサーミア学会第 34 回大会, 京都, 2017, 9.
4. Koizumi T, Mitsudo K, Iida M, Nakashima H, Ueda J, Oguri S, Iwai T, Hirota M, Kioi M, Tohnoi T: A case report of thermobiochemoradiation therapy using superselective intra-arterial infusion for carcinoma of the buccal mucosa with N3 lymph node metastases. The 12th International congress of hyperthermic oncology, New Orleans, USA, 2016, 4.
5. M. Iida, K. Mitsudo, T. Koizumi, H. Nakashima, T. Iwai, S. Oguri, M. Hirota, M. Kioi, I. Tohnoi: Thermochemoradiotherapy using retrograde superselective intra-arterial infusion for advanced oral cancer with cervical lymph node metastases. International Conference on Oral and Maxillofacial Surgery 2015, Melbourne, 2015, 10.
6. 飯田昌樹, 光藤健司, 小泉敏之, 佐藤 格, 中島英行, 岩井俊憲, 小栗千里, 來生 知, 廣田 誠, 藤内 祝: 進行口腔癌頸部リンパ節転移症例に対する逆行性超選択的動注化学放射線療法とハイパーサーミアの併用療法 - 病理結果と予後 -. 日本ハイパーサーミア学会第 32 回大会, 京都, 2015, 10.

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

飯田 昌樹 (IIDA Masaki)  
横浜市立大学・附属病院・助教  
研究者番号: 70613511