

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20552

研究課題名(和文) 頸部リンパ節転移に対する既存抗癌剤の磁性化薬を用いた新規治療法の開発

研究課題名(英文) Novel thermo-chemotherapy for oral cancer using a new magnetic anti-cancer drug

研究代表者

佐藤 格 (SATO, Itaru)

横浜市立大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：00737710

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：磁性パクリタキセルはヒト由来扁平上皮癌細胞株に対して、アポトーシスを誘導させた。また、温熱することでよりアポトーシスが誘導させた。浸潤能抑制試験においても、磁性パクリタキセルによって、細胞の動きが抑制された。温熱することでより抑制することが確認された。細胞実験において、磁性パクリタキセルはヒト由来扁平上皮癌細胞株において抗癌活性が認められ、温熱効果も有用であった。動物実験では、マウスの舌に移植したヒト由来扁平上皮癌細胞株の腫瘍の縮小を認めており、病理組織学的初見において頸部リンパ節の転移の抗癌活性を認めていた。CTによる評価では、アーチファクトが大きく評価困難であった。

研究成果の概要(英文)：Radical surgery for patients with head and neck cancer often causes major dysfunctions, such as dysphagia, dysarthria, or mastication disorder, leading to impaired quality of life. Here, a new magnetic anticancer drug has been developed. This drug has two characteristics; anti-cancer effect and hyperthermic effect in combination with an alternating current magnetic field (ACMF). We have evaluated the anti-cancer effects of a new magnetic anticancer drug using oral cancer cells in vitro. The results in this study demonstrated the unique property of the novel magnetic anticancer compound. In particular, this drug had anti-cancer effect with heat induction in an ACMF. This drug may thus be useful in a novel cancer therapy in the future.

研究分野：口腔癌

キーワード：抗癌剤 温熱療法

### 1. 研究開始当初の背景

われわれはIHI株式会社との医工連携にて、市販パクリタキセルの薬効成分を磁性化することに成功した。この化合物は、いわゆるミセル化とは違い、薬効成分自体を磁性化したものである。これは、本研究室で同定された磁性有機化合物でありながら、抗がん作用を持つFe(Salen)という化合物の詳細な構造解析結果を基盤にしている。われわれは市販のパクリタキセルを磁性化したものを“磁性パクリタキセル”と命名した。これまでに、乳がん細胞において従来のパクリタキセルが持つ「抗癌作用」と同等の効果が発揮されることを確認している。また、磁性という特徴により「CT造影効果」や、IHクッキングヒーター原理を用いた交流磁場印加による「発熱作用」があることから温熱療法が可能である。つまり、磁性パクリタキセルは、抗癌作用を持ち、CTによって画像化および定量化が可能であり、さらに発熱を使った温熱療法に利用できる。現在までにわれわれはこの磁性パクリタキセルを利用したドラッグデリバリーシステムの開発を試みた。動物実験にてその有用性を証明し、第73回日本癌学会学術総会(横浜)にて発表した。以上から本研究において、マウス舌癌頸部リンパ節転移モデルに対しても磁性パクリタキセルは大変有用であると考え、申請者らのグループは臨床において頸部リンパ節転移(N2, N3)症例に対しては外部加温法であるRF誘電加温法を用いているが、頸部の転移リンパ節の位置によってはアプリケーションが装着できないこともあり、十分な温熱効果が得られないことがある。一方、磁性パクリタキセルの基盤としているFe(Salen)は原発のみならず頸部へ転移リンパ節への移行が可能であることから、本薬剤においても通常の外部加温法では温熱効果が得にくいような転移リンパ節に対しても温熱療法ができる画期的な治療法になると考える。

本研究では、磁性パクリタキセルを利用することにより、頸部転移リンパ節を対象として、パクリタキセルが持つ抗癌活性と温熱療法の両者の効果による相乗的作用とCT造影効果をin vitro, in vivoにおいて検討し、その効果を実証した。

### 2. 研究の目的

頭頸部癌のなかでもとりわけ口腔癌は、手術療法によって摂食・嚥下障害、構音障害、顔面の変形による審美障害が生じるため、術後のQOL低下が問題となる。そこでわれわれは進行口腔癌に対し、逆行性の超選択的この治療法によって原発部位の手術回避が可能となり、治療後の機能が温存されるようになった。局所の超進行動注化学放射線療法を治療戦略としている。しかしながら、再発症例、頸部の多発性リンパ

節転移などは超選択的動注化学放射線療法だけでは制御困難な症例もあることから、このような症例に対しては温熱療法の併用を行っている。今回の研究では、われわれはマウス舌癌頸部リンパ節転移モデルを作成し、申請者らのグループが開発した磁性パクリタキセルを用いて、頸部のリンパ節転移に対する抗腫瘍効果の検討を目的とした。

### 3. 研究の方法

本研究では、申請者らのグループが開発した磁性パクリタキセルを用いて口腔癌の原発巣に投与することによって、リンパ流を介して頸部の転移リンパ節へ本抗癌剤が流入し、原発巣および頸部への選択的温熱療法を行い、転移リンパ節に対する抗腫瘍効果につき検討を行った。

平成27年度では、磁性パクリタキセルのヒト由来扁平上皮癌細胞株に対する抗癌活性と温熱効果の解明を行うため、FACSを用いた。腫瘍細胞はヒト由来扁平上皮癌細胞(OSC-3、HSC-19)を用いた。OSC-3、HSC-19( $5 \times 10^5$  cells)と本抗癌剤7.5  $\mu$ MをFACSチューブに入れた。温熱は交流磁場にて行った。コントロールは、本抗癌剤の刺激なし。遠心し上清を除去しbuffer solutionを添加して攪拌し遠心した。上清を除去し250  $\mu$ lのTrypsinを加える。攪拌後10分室温放置。200  $\mu$ lのTrypsin inhibitorを添加し、攪拌後10分室温放置。200  $\mu$ lのアネキシンV溶液添加。冷暗室で10分間放置。フィルターをかけた後にBD FACSCanto フローサイトメトリーで測定。アポトーシスの割合と顕微鏡を用いて浸潤能を測定した。OSC-3、HSC-19癌細胞株( $1 \times 10^4$  cells/ml)をチャンバースライドに撒いた。24時間後、7.5  $\mu$ Mの本抗癌剤を投与した。顕微鏡で細胞の動きを30分おきに24時間撮影した。細胞の動きをプロットし、距離を求めた。

動物実験のモデルとして、マウスの舌にHSC-19癌細胞(細胞数: $5.0 \times 10^8$ 個)を移植する。マウスのHSC-19癌細胞については移植後約20日後に頸部リンパ節への転移が起こることが報告されている(Sano D. et al. Head Neck Oncol. 2009)ため、HSC-19癌細胞を舌に移植し、移植後16日、18日後、20日後、22日後にリンパ節を摘出し、転移の有無、原発と転移リンパ節の大きさ、個数について病理組織学的に評価した。

平成28年度では、頸部リンパ節への転移における本薬剤の抗癌活性・温熱療法による抗腫瘍効果とCT造影効果を、マウスを利用した動物実験において証明した。マウスの舌にHSC-19癌細胞を移植し、腫瘍径5mmを超えリンパ節転移が確認されたら実験開始とした。イソフルランを用いた吸入麻酔下にて、腫瘍部位に局所に本抗癌剤(5mg/kg)を投与した。コントロール群は投与なし。投与後、頸部をコイル径100mm

の内部へ挿入し、磁場印加を行う。週2回、3週間行い定期的にCT撮影を行った。舌・リンパ節の組織標本を作成し、HE染色、TUNEL法、免疫組織染色で評価を行った。温熱を行うためのマウスの頸部が入る交流磁場機器については申請者らのグループが開発した装置を使用した。

#### 4. 研究成果

磁性パクリタキセルはヒト由来扁平上皮癌細胞株に対して、アポトーシスを誘導させた。また、温熱することでよりアポトーシスが誘導させた。浸潤能抑制試験においても、磁性パクリタキセルによって、細胞の動きが抑制された。温熱することでより抑制することが確認された。細胞実験において、磁性パクリタキセルはヒト由来扁平上皮癌細胞株において抗癌活性が認められ、温熱効果も有用であった。動物実験では、マウスの舌に移植したヒト由来扁平上皮癌細胞株の腫瘍の縮小を認めており、病理組織学的初見において頸部リンパ節の転移の抗癌活性を認めていた。CTによる評価では、アーチファクトが大きく評価困難であった。

われわれが開発した磁性パクリタキセルは、従来のパクリタキセルが持つ「抗癌作用」と同等の効果を発揮し、磁性という特徴から多くの効果が期待される稀有な磁性体抗癌剤を開発し、温熱療法・CT造影剤に利用する点は、本研究の特徴であり、独創的な点である。本研究では、本薬剤が局所での抗癌活性を発揮し、交流磁場印加による局所での「選択的温熱療法」、さらには「CT造影剤」として使用可能であることを証明した。さらに、本研究において従来の外部加温である温熱療法を上回る効果が得られることを証明した。今後、局所での集中的治療、投与量の軽減を可能とし、副作用軽減にも寄与できるかのしれない。また、本研究における装置開発により、リンパ節転移に対する手術が回避出来ればQOLの向上が期待できる。さらに、将来的に本研究の成果が臨床応用されれば、現在抱える患者負担の問題を含めた治療上の問題点を解決し、新たな治療法となるため、本研究は非常に意義のあるものであると考える。

#### 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1件)

Sato I, Umemura M, Mitsudo K, Fukumura H, Kim J-H, Hoshino Y, Nakashima H, Kioi M, Nakakaji R, Sato M, Fujita T, Yokoyama U, Okumura S, Oshiro H, Eguchi H, Tohnai I, and Ishikawa Y: Simultaneous hyperthermia-chemotherapy with controlled drug delivery using single-drug nanoparticles. Scientific Reports, 6:24629, 2016, 査読有

〔学会発表〕(計2件)

Itaru Sato, Masanari Umemura, Kenji Mitsudo, Hideyuki Nakashima, Mitomu Kioi, Hruki Eguchi, Makoto Ohtake, Kayoko Oda, Rina Nakakaji, Iwai Tohnai and Yoshihiro Ishikawa. Novel thermo-chanti-cancer drug. The 18th ECCO European Cancer Organisation- 40th ESMO European Cancer Congress Scientific Committee, Vienna Wien, 2015, 9emothepy for oral cancer using a new magnetic

佐藤 格、光藤健司、梅村将就、江口春樹、中鍛治里奈、小泉敏之、中島英行、來生 知、石川義弘、藤内 祝：口腔癌に対する新規磁性抗癌剤を用いたハイパーサーミアの開発。日本ハイパーサーミア学会第32回大会，KKRホテル大阪(大阪府大阪市)，2015，9。

〔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：  
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

佐藤 格 (SATO, Itaru)

横浜市立大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：737710

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：

(4) 研究協力者

( )