

令和 5 年 6 月 28 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2022

課題番号：17K11882

研究課題名(和文) 腫瘍治療電場(TTF)を用いた口腔癌に対する低侵襲治療法の開発

研究課題名(英文) Development of minimally invasive treatment for oral cancer using Tumor Treating Fields (TTF)

研究代表者

小泉 敏之(KOIZUMI, Toshiyuki)

横浜市立大学・医学部・講師

研究者番号：80323575

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：フェルカルボトランの交流磁場での温度上昇は温熱治療として臨床応用の可能性を示唆した。口腔癌細胞への温熱刺激でのEGFR発現誘導はセツキシマブに対する増感の可能性を示すものであり、新規低侵襲治療法開発への応用可能性が期待できる重要な知見と考えられた。本研究期間では交流磁場下での抗腫瘍効果について一定の方向性は示せたものの、TTFでの交流電場下での効果を検証するモデルの確立に課題が残った。そのため、交流磁場下での抗腫瘍効果(温熱による抗腫瘍効果および抗腫瘍薬との併用効果)については、動物実験レベルまで検討をすすめることができたものの、TTF治療での効果については明確な結果は確認できなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年のがん治療においては単に生存率の向上を目指すだけでなく、低侵襲かつ生存率向上に寄与する治療法の開発が求められている。本研究では、新たな低侵襲性治療法としての可能性が期待できる腫瘍治療電場(TTF)およびその他の候補として、交流磁場下での温熱効果に着目して抗腫瘍効果の検索を行い、これらの新規低侵襲治療法への応用可能性を検討した。特に、市販薬であるフェルカルボトランの交流磁場下での温度上昇による抗腫瘍効果、口腔扁平上皮癌細胞への温熱刺激でのEGFR発現誘導によるセツキシマブに対する感受性増強の可能性は、今後の新規低侵襲治療法開発への応用可能性を示唆する結果と考えられた。

研究成果の概要(英文)：The temperature increase of Ferucarbotran with alternating magnetic field suggested the possibility of its clinical application as hyperthermia therapy. The induction of EGFR expression by hyperthermia stimulation of oral cancer cells indicates the possibility of sensitization to cetuximab, which is considered an important finding with potential application to the development of a novel minimally invasive treatment. Although we were able to show a certain direction of the anti-tumor effect under alternating magnetic field during this study period, the establishment of a model to verify the effect under alternating electric field at TTF remained an issue. Therefore, although we were able to examine the antitumor effects under alternating magnetic fields (antitumor effects of hyperthermia and combined effects with antitumor drugs) up to the animal experimental level, we could not confirm clear results on the effects of TTF treatment.

研究分野：口腔外科学

キーワード：口腔癌 低侵襲治療 交流電場 交流磁場

1. 研究開始当初の背景

口腔癌の標準治療は手術であり構音障害、顔面変形による審美障害など術後の QOL 低下が大きな問題となる。申請者は、進行口腔癌に対する超選択的動注化学放射線療法(図1)を確立し(Tohnai I, et al, Oral Oncol, 1998)これを治療の主体として原発部位の手術回避の可能性について長年検討している。従来、手術のみが選択肢であった症例に対しても超選択的動注化学放射線療法により原発部位の手術を回避し臓器機能を温存しており、さらに予後規定因子として重要な頸部の転移リンパ節に対しては温熱療法(ハイパーサーミア)の併用で予後の改善に努めている(Mitsudo K, Koizumi T, et al, Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2012)。本研究においては、さらなる低侵襲治療法として、また放射線治療や化学療法に対して抵抗性を示す症例にも有効性が期待できる治療法として腫瘍治療電場(Tumor Treating Fields、以下 TTF)に着目した。TTF は再発の多形性膠芽腫(GBM)に用いられる治療である。GBM の治療においては頭皮に非侵襲性 INE トランスデューサーアレイ(アレイ)を貼り、低強度の交流電場をかけ脳内の腫瘍に対して腫瘍の増殖を抑える働きをする(図2)。これを口腔癌の予後規定因子として重要な頸部リンパ節転移の治療に応用する。頸部皮膚にアレイを貼り、交流電場をかけることで転移リンパ節に集中的に作用し高い抗腫瘍効果をもたらす、更なるリンパ節転移や遠隔転移を抑えられる可能性があると考えられる。さらに、TTF に化学療法を併用することで新たな口腔癌治療の開発を目指す。本研究では口腔癌に対する化学療法において標準的に用いられている薬剤(シスプラチンおよびセツキシマブ等)を用いて、TTF との併用による効果を検討する意義は高いと考えられた。また、交流電場単独での腫瘍への影響については、交流電場による治療として Electrochemotherapy(ECT)(電気化学療法)と呼ばれる治療効果の報告が散見される程度である。この治療法は Mir らによって提唱された治療法であり、高電圧パルスをかけることで細胞膜に電氣的穿孔を生じさせ、がん細胞内に大量の抗癌剤を移入させて抗腫瘍効果を増強するものである。高電圧パルスは 1000V/cm 以上の電圧をかけることで抗腫瘍効果を強く発現するが、電場内の正常組織の損傷も高度となることが報告(長谷川 他、2000)されており、低侵襲な治療とは言い難い。そこで、低電圧の交流電場による抗腫瘍効果について着目し、BGM 治療に用いられている低強度交流電場治療を口腔癌へ応用する考えに至った。

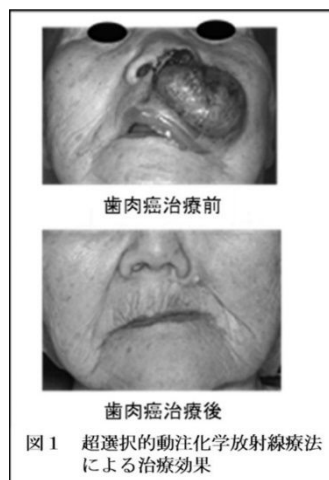


図1 超選択的動注化学放射線療法による治療効果



図2 TTF 発生装置

2. 研究の目的

近年のがん治療においては単に生存率の向上を目指すだけでなく、低侵襲かつ生存率向上に寄与する治療法の開発が求められている。特に、機能障害や審美障害が大きな問題となる口腔癌治療においては低侵襲な治療法を開発することが非常に重要と考えられる。そこで、再発膠芽腫治療に用いられている腫瘍治療電場(Tumor Treating Fields、以下 TTF)に着目した。TTF は低強度の交流電場を患者の皮膚に貼られた非侵襲性 INE トランスデューサーアレイを介して腫瘍に与え、腫瘍の増殖を抑える非常に低侵襲な治療である。本研究は、TTF の口腔癌に対する有効性を確認することで新たな低侵襲性治療法となる可能性を検討し、さらに化学療法との併用による抗腫瘍効果増強の可能性について検討することで、口腔癌の新たな治療法の確立を目指すものである。また、同様に低侵襲治療としての発展が見込まれる交流磁場下での抗腫瘍効果の検討を行うことで新規低侵襲治療法への応用可能性を検討することで、これら低侵襲治療として有効性が見込まれる方法を検索することも目標とする。

3. 研究の方法

本研究での目標を端的に3点挙げ、それぞれについて研究方法を述べる。

(1): 口腔癌における TTF の抗腫瘍効果を確かめる。交流電場発生機を用いて電場の強度や印加する時間等を検討し、最適な電場条件について検討を行う。また、電場下に加え、同様に低侵襲治療としての発展が見込まれる磁場下での検討も併せて行うこととし、抗腫瘍効果の発現について有効性が認められる可能性が高い条件を第一に検討をすすめる。培養細胞を用いる実験は、口腔癌細胞としてヒト由来舌扁平上皮癌細胞(HSC-3、OSC-19)を用いて検討する。交流電場発生は AmeriThermo、交流磁場発生は HOT SHOT を使用する。これらは電流、周波の自己調節が可能である。これにより口腔癌細胞における最適な交流電場および磁場の強度、印加時間を検索する。

(2): 動物実験において頸部リンパ節転移モデルを作成し交流電場によつての抗腫瘍効果を検討する。至適条件を絞つたうえで動物実験を行うことを目標に、アレイの当て方や方向、印加時間などの検討を行う。この実験系の安定性を確認するとともに、動物実験系としての応用が困難であれば交流磁場での検討を行うこととする。

口腔癌細胞における交流電場印加による抗腫瘍効果で得た知見をもとに、動物モデルにおいても同様の原理で抗腫瘍効果がみられるかを検討する。

マウスヒト由来扁平上皮癌リンパ節転移モデルの検討

交流電場、磁場強度の検討

(3): 口腔癌治療で標準的に使用される抗腫瘍薬剤、分子標的薬(シスプラチンおよびセツキシマブ)との併用での抗腫瘍効果への影響を検討する。

TTF 治療は薬剤との併用で、より高い抗腫瘍効果を示せると考えている。抗腫瘍薬剤との併用での検討に際しては抗腫瘍効果のみならず、有害事象についての検討も行う。細胞実験における交流電場印加については交流電場発生装置を用いる。口腔癌細胞に電場を印加し効果を検討する。検討項目としては抗腫瘍効果のみならず、交流電場の作用機序に関連したアポトーシスの誘導や細胞周期についても検討する。アポトーシスの誘導をみるためには Apoptosis assay kit を用いて細胞に測定試薬を作用させフローサイトメトリーで細胞の状態別にその数を検出する。最も効果が高いと思われる条件でのアポトーシスの数を無刺激のものと比較し交流電場刺激によるアポトーシスの誘導について検討する。抗腫瘍薬剤との併用による影響については培養細胞実験でも、動物実験においても併用による抗腫瘍効果の増強やそれぞれの単独との効果の比較を行い、2つの治療法の併用による相乗効果を検討する。電場下での検討が困難であれば、交流磁場下での効果を検討することとする。

4. 研究成果

(1): 口腔癌における交流磁場発生機を用いた電場の強度や印加する時間等の検討

交流磁場下での変化を確認する目的で、市販造影剤であるフェルカルボトランを細胞培地に溶解することでの反応を観察した。その結果、交流磁場下ではフェルカルボトラン溶解細胞培地が発熱することが示された(図3)

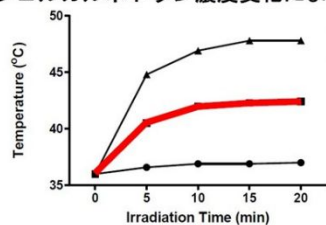
左上段にフェルカルボトラン濃度変化による温度上昇を、左下段に交流磁場発生装置の電流変化による温度上昇を示す。また、右に細胞培地に溶解したフェルカルボトランと温度変化を可視化した図を示す。右下段において、左は刺激前、右は交流磁場(308kHz、電流250A)

印加10分の状態を示す。交流磁場下でのフェルカルボトランの温度上昇が確認できる。このことから、交流磁場を用いることで温熱が発生することが示唆され実臨床でも用いられている癌温熱療法(ハイパーサーミア)への治療応用の可能性が示された。

(2): 動物実験における交流電場加下、磁場下での検討

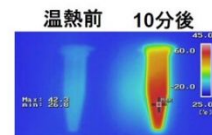
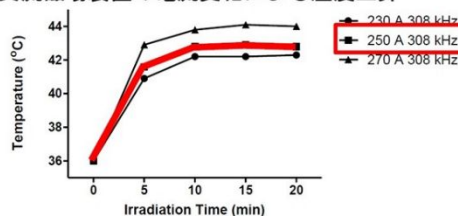
化学療法と違い TTF の作用は機器作動中にのみ期待される。TTF は1日18時間以上の継続使用が必要とされ、実臨床において頸部に TTF を使用する際は、もともと剃毛の必要性が少ない部位であり、さらにアレイ貼付部を隠すことができることから整容性の問題は比較的少ないという実臨床への応用の際には大きな利点があると考えた。しかし、動物モデルではアレイの当て方、方向、印加時間の検討では、動物モデルでのアレイ貼付の維持、継続使用は、その安定性に課題が残った。そのため、アレイを貼付することでの電場発生下での詳細な検討は、初期検討としては困難と判断し、まずは上記(1)で使用したフェルカルボトラン注入および交流磁場発生装置を用いた交流磁場下での検討を動物実験での中心とすることとし検討をすすめた。

図3 交流磁場下でのフェルカルボトランによる発熱
フェルカルボトラン濃度変化による温度上昇



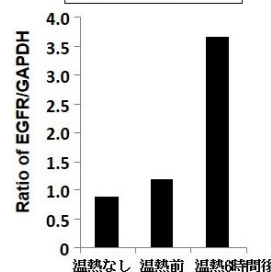
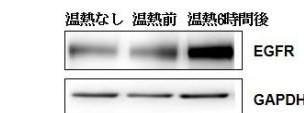
細胞培地に溶解したフェルカルボトラン

交流磁場装置の電流変化による温度上昇



サーモグラフィー

図4 温熱療法による扁平上皮癌細胞のEGFR発現誘導



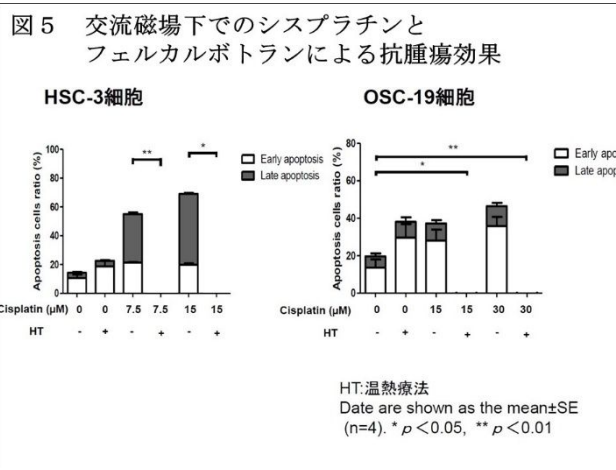
併用薬剤としてはセツキシマブ (Cetuximab) を使用した。上皮成長因子受容体 (EGFR) に結合して、EGFR の働きを阻害するモノクローナル抗体であり、交流磁場下での発熱(加温)により、セツキシマブ感受性を高める可能性があるかを検証する目的で、扁平上皮癌細胞を温熱刺激することで EGFR の発現が誘導されるかを Western blotting 法を用いて検討した(図4)。その結果、6時間の温熱刺激で EGFR 発現が誘導されることが示された。このことから、温熱刺激を行うことでセツキシマブへの感受性を高められる可能性が示唆された。

さらに、シスプラチンを併用した交流磁場下での抗腫瘍効果をアポトーシスの誘導を指標に検討を行い、交流磁場下でのシスプラチンとフェルカルボトランの併用での抗腫瘍効果が確認しれ(図5) これは交流磁場下での温熱効果の上乗せによるシスプラチンの抗腫瘍効果の増強を示唆するものと考えられた。

(3):フェルカルボトランを用いた交流電場発生装置による交流電場とセツキシマブ併用による抗腫瘍効果の検討。

前述の通り、TTF 治療を動物実験モデルで行うにあたりアレイ貼付の安定性に課題が残ったため、フェルカルボトラン注入および交流磁場発生装置を用いた交流電場下での検討が有効性の検証に有利であると判断し、セツキシマブ併用での検証を動物実験で行った。

マウスモデルにおいて、フェルカルボトランを腫瘍部に局所投与し、交流磁場下で発熱させた。これによりセツキシマブが標的とする EGFR の発現を誘導させた後、セツキシマブ併用による抗腫瘍効果の増強についての検討を行った(図6)。



治療群を以下の6グループに分けて検討を行った。

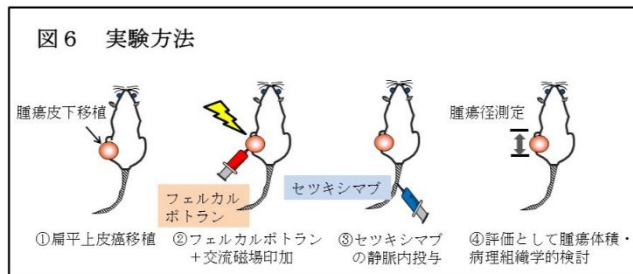
- ① コントロール群 (フェルカルボトラン・セツキシマブ投与なし)
- ② フェルカルボトランを左大腿に局所投与のみ行った群
- ③ セツキシマブの静脈投与のみを行った群

④ フェルカルボトラン投与後、交流磁場にて磁場印加を行った群

⑤ フェルカルボトラン・セツキシマブの静脈投与のみを行った群

⑥ フェルカルボトランを投与し交流磁場にて磁場印加による温熱加温後、セツキシマブを静脈投与した群

コントロール 群に比較し、磁場印加による温熱とセツキシマブ静脈投与を併用した 群で腫瘍の縮小傾向を認めた。しかし、検定上での優位性は示せず今後も引き続きより有効な条件設定を含めた検討が必要であると考えられる。



結論: 臨床で実際に使用されているフェルカルボトラン(市販造影剤)を使用した交流磁場環境下での温度上昇から、これらを用いた癌温熱療法(ハイパーサーミア)への臨床応用の可能性、さらに癌細胞への温熱刺激での EGFR 発現誘導によるセツキシマブに対する感受性増強の可能性については今後の新規低侵襲治療法開発への応用可能性が期待できる事象であり、今後も検討を続けるべき重要な知見と考えられた。しかし、動物モデルでは検定上の優位性を示すことはできず、今後も検討が必要である。

また、本研究期間では交流磁場下での抗腫瘍効果について一定の方向性は示せたものの、TTF での交流電場下での効果を検証するモデルの確立について、主に動物モデルでのアレイの安定性の問題から課題が残る結果となった。そのため、交流磁場下での抗腫瘍効果(温熱による抗腫瘍効果および抗腫瘍薬との併用効果)の検討については、動物実験レベルまですすめることができたが、TTF 治療での効果については十分な検討が尽くせたとはいえず、明確な結果を得ることはできなかった。これらの点は本研究での重要な課題と考え、引き続き検討を行う必要があると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Osawa Kohei, Umemura Masanari, Nakakaji Rina, Tanaka Ryo, Islam Rafikul Md, Nagasako Akane, Fujita Takayuki, Yokoyama Utako, Koizumi Toshiyuki, Mitsudo Kenji, Ishikawa Yoshihiro	4. 巻 111(1)
2. 論文標題 Prostaglandin E2receptor EP4 regulates cell migration through Orai1	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 160 ~ 174
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14247	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 T. Koizumi, S. Minamiyama, Y. Hayashi, K. Osawa, N. Ohashi, T. Ohya, M. Iida, T. Iwai, S. Oguri, M. Hirota, M. Kioi, K. Mitsudo	4. 巻 17(2)
2. 論文標題 Retrograde superselective intra-arterial chemoradiotherapy for squamous cell carcinoma of the buccal mucosa INTRODUCTION	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Radiation Research	6. 最初と最後の頁 283-291
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18869/acadpub.ijrr.17.2.283	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nozato T, Koizumi T, Hayashi Y, Iida M, Iwai T, Oguri S, Hirota M, Kioi M, Koike I, Hata M, Tohnai I, Mitsudo K.	4. 巻 39(3)
2. 論文標題 Thermochemoradiotherapy Using Superselective Intra-arterial Infusion for Patients With Oral Cancer With Cervical Lymph Node Metastases.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Anticancer Res.	6. 最初と最後の頁 1365-1373
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancerres.13250.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sakuma K, Koizumi T, Mitsudo K, Ueda J, Hayashi Y, Iwai T, Hirota M, Kioi M, Yoshii H, Kaizu H, Hata M, Tanaka A, Tohnai I.	4. 巻 35(1)
2. 論文標題 Retrograde superselective intra-arterial chemoradiotherapy combined with hyperthermia and cetuximab for carcinoma of the buccal mucosa with N3 lymph node metastasis: a case report.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oral Radiol.	6. 最初と最後の頁 77-83
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11282-018-0319-y.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Koizumi Toshiyuki, Ohya Takashi, Oguri Senri, Iwai Toshinori, Kioi Mitomu, Mitsudo Kenji	4. 巻 -
2. 論文標題 Patient with severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 nosocomial infection undergoing superselective intra arterial chemoradiation therapy for maxillary gingival carcinoma: A case report	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Oral Science International	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/osi2.1188	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件(うち招待講演 1件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 大澤昂平, 中鍛治里奈, 小泉敏之, 光藤健司
2. 発表標題 プロスタグランディン受容体EP4の口腔がん細胞遊走能への影響とメカニズム解明
3. 学会等名 第38回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 19.小泉敏之, 野里朋代, 飯田昌樹, 南山周平, 林 雄一郎, 中鍛治里奈, 大澤昂平, 小栗千里, 廣田 誠, 來生 知, 光藤健司
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第23回関東ハイパーサーミア研究会・全身ハイパーサーミア合同学術研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 20.小泉敏之, 野里朋代, 飯田昌樹, 南山周平, 林 雄一郎, 中鍛治里奈, 大澤昂平, 小栗千里, 廣田 誠, 來生 知, 光藤健司
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第36回日本ハイパーサーミア学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Koizumi T, Iida M, Mitsudo K
2. 発表標題 Thermochemoradiation therapy using superselective intra-arterial infusion for advanced oral cancer with cervical lymph node metastasis contacted with the mandible.
3. 学会等名 The 7th Asian Congress of Hyperthermic Oncology (ACHO) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Toshiyuki Koizukmi, Masaki Iida, Kenji Mitsudo
2. 発表標題 Thermochemoradiation therapy using superselective intra-arterial infusion for advanced oral cancer with cervical lymph node metastasis contacted with the mandible.
3. 学会等名 The 7th Asian Congress of Hyperthermic Oncology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小泉敏之、野里朋代、藤内祝、光藤健司
2. 発表標題 当科における進行口腔癌に対する根治的臓器温存療法 - 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 -
3. 学会等名 日本ハイパーサーミア学会 39 回大会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小泉敏之、矢島康治、南山周平、陳雪霏、下田愛美、平林大樹、小栗千里、岩井俊憲、來生知、光藤健司
2. 発表標題 SARS-CoV-2陽性後も動注化学放射線療法を継続した上顎歯肉癌の1例
3. 学会等名 第67回日本口腔外科学会総会・学術集会
4. 発表年 2022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 (KIOI Mitomu) (30545059)	横浜市立大学・附属病院・准教授 (22701)	
研究分担者	藤内 祝 (TOHNAI Iwai) (50172127)	横浜市立大学・医学研究科・客員教授 (22701)	
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)	

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
---------	---------