

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24593030

研究課題名(和文) BCGと抗癌剤併用療法による抗腫瘍転移効果についての分子イメージング解析研究

研究課題名(英文) Molecular imaging analysis of the antitumour activity of 5-fluorouracil combine with Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guérin (BCG) in the mouse oral cancer model.

研究代表者

柳 文修 (Yanagi, Yoshinobu)

岡山大学・大学病院・講師

研究者番号：50284071

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：今回、申請者は、口腔癌に対するBCG生菌と抗癌剤併用療法による腫瘍転移阻害効果を分子イメージング手法にて解析し、その可能性を検討した。口腔癌担癌マウスを用いて、BCG生菌と各種抗癌剤併用による肺転移阻害効果の検討をし、全身転移阻害効果についてPETでの検討を行った。マウス背部皮下に同マウス由来頬部扁平上皮癌株を腫瘍播種し、一定の大きさに達した腫瘍を摘出し、投薬をした(非投薬群、5-FU単独投与群、5-FU/BCG併用投与群、BCG単独投与群)。5-FU/BCG併用投与群において局所再発率の低下を認めた。局所再発、転移巣はPETで確認可能で、いずれの投薬群でも肺転移を認めた。

研究成果の概要(英文)：Our aim was to investigate the adjuvant potential of BCG combined with 5-FU for oral cancer. Then, we compared 18F-FDG PET/CT-based molecular imaging evaluation, with corresponding groupwise overall survival, tumor growth and metastasis. Sq-1979 cheek cancer cells were injected subcutaneously into the flank in C3H/HeN mice. After certain growth, tumors were resected and mice were weekly treated with BCG (Tokyo strain;  $1 \times 10^6$  CFU/mouse) and/or 5-FU. The mice were randomized to four groups. 5-FU along with BCG treatment results in a reduction of recurrence and significantly improved survival. The effects of treatment on 18F-FDG uptake were also studied with those had locally metastatic tumors. This analysis revealed that 5-FU-, 5-FU/BCG-, and BCG-treatment resulted in a reduction of 18-FDG uptake within locally metastatic tumor compared with non-treated mice group. Interestingly, 18F-FDG PET imaging confirmed decreased metabolism even in the xenografts following BCG single treatment.

研究分野：外科系歯学

キーワード：BCG 免疫療法 口腔癌

## 1. 研究開始当初の背景

従来から、表在性膀胱癌の治療において、BCG (Bacillus Calmette-Guerin) 生菌を用いた BCG 膀胱療法は臨床的有用性の確立した癌免疫療法である。しかし、その他の部位の固形癌には適用されず、有効性の検証にまで至っていない。しかしながら BCG 療法は、その副作用が少ない点、さらには他剤との併用可能な点などから、他臓器での癌治療においても、BCG 療法の利用の可能性が見込まれ、臨床上的利点は大きい。現在申請者は、口腔癌担癌モデルマウスを用いて、BCG 生菌と抗癌剤 5-FU(フルオロウラシル)の併用効果を検討し、BCG 併用による腫瘍縮小効果を明らかにしている。

そこで申請者は、これまでの研究を進展させ、BCG 生菌と抗癌剤併用療法により、腫瘍転移阻害効果を生むのではないかとこの着想に至った。その検討には、PET (ポジトロン断層法: Positron Emission Tomography) 撮像などの分子イメージング手法を用い、新規腫瘍転移阻害療法を確立したい。

BCG 生菌の癌への応用については、膀胱癌での単剤での利用についての報告がその殆どを占める。特に、口腔癌への適用に関する報告は殆ど無く、さらに他の抗癌剤との併用効果については大変興味深い課題である。分子イメージング研究の手法としては、最近では PET など臨床医療機器を利用した手法も使われ始めてきた。しかし、動物実験用 PET 装置を有する施設は少ない。本申請研究は、本学に新たに導入された動物用 PET 装置を活用して撮像し、遠隔転移を検討するものである。

## 2. 研究の目的

BCG 生菌療法は、その副作用が少ない点などから、表在性膀胱癌に限って利用されてきた。これまでに申請者は、口腔癌においても、BCG 生菌と抗癌剤を併用し、適用することで腫瘍縮小効果を認めてきた。

今回、申請者は、口腔癌に対する BCG 生菌と

抗癌剤併用療法による腫瘍転移阻害効果を分子イメージング手法にて解析し、効果的かつ安全な抗癌剤併用治療薬として、その可能性を検討することで、新規腫瘍転移阻害療法を確立したい。

## 3. 研究の方法

本申請研究課題では、口腔癌担癌モデルマウスを用いて、

**1. BCG 生菌と各種抗癌剤併用による肺転移、血管新生阻害効果を検討する。(平成 24 年度)**

**2. BCG 生菌と各種抗癌剤併用による全身転移阻害効果を PET で検討する。(平成 25、26 年度)**

**上記 2 点に際し、**

口腔癌担癌マウスモデルを作製し、in vivo での BCG 生菌と抗癌剤併用による抗腫瘍効果を検討する。

### ・口腔癌担癌マウスモデル作製

C3H:HeN マウスに対して、同マウス由来頬部扁平上皮癌 sq-1979 株を背部皮下もしくは尾静脈より播種、担癌させ、モデルマウスを作製。全体を実験通じて供する。申請者は、申請時点において、口腔癌担癌モデルマウスを用いて、BCG 生菌と抗癌剤 5-FU の併用による抗腫瘍効果の増強を明らかにしており(未発表)、本申請研究課題においてはそれを進展させたい。

検討対象としては、薬剤非投与群、BCG 単独投与群、抗癌剤(5-FU、CDDP)単独投与群、BCG・抗癌剤併用投与群の 4 群、各 7 匹に分け、比較する。薬剤投与は腹腔内、BCG 投与は皮下にて、週 1 回、9 週間とする。

### ・BCG・抗癌剤併用による、抗腫瘍増大効果についての検討

上記 4 群担癌マウス(背部皮下に腫瘍播種)を対象とする。腫瘍径を毎週計測、抗腫瘍増大効果を比較検討する。

### ・BCG・抗癌剤併用による、延命効果について

## での検討

上記4群担癌マウス(尾静脈より腫瘍播種)を対象とする。各群の生存日数から、BCG・抗癌剤併用による延命効果を比較検討する。

### ・小動物用 PET イメージングによる遠隔転移阻害効果についての解析

上記4群担癌マウス(尾静脈より腫瘍播種)を対象とする。臓器転移モデルを作製する。その後、18F-FDG(フルオロデオキシグルコース)プローブを投与し、PET撮影(Clairvivo PET:島津製作所)腫瘍の全身での転移状況を比較検討する。

### ・抗癌剤 CDDP での感受性増強効果、遠隔転移阻害効果検討

5-FUと同様に口腔癌で頻用される白金製剤CDDPについても同様に検討、BCGによる増強効果の有無を明らかにする。

## 4. 研究成果

### ・口腔癌担癌マウスモデル系確立

C3H:HeN マウスに対して、同マウス由来頬部扁平上皮癌sq-1979株を背部皮下もしくは尾静脈より播種、担癌させ、モデルマウスを作製。全体を実験通じて供した。作製に際しての播種癌細胞数決定ではその形成能の確実性などから判断し、 $1 \times 10^7$ 個が適当と判断し、背部皮下に播種した。また、肺転移モデルマウスとしては、マウス尾静脈より腫瘍播種としたが、その肺転移の確実性、生存日数などから判断し、 $1 \times 10^6$ 個が適当と判断した。これにより、3か月程度で癌死する肺転移モデルスケジュールを確立出来た。

### ・BCG・抗癌剤併用による、抗腫瘍増大効果についての検討結果

背部皮下担癌マウスにおける薬剤非投与群、BCG単独投与群、5-FU単独投与群、BCG・5-FU併用投与群の4群を比較した。投薬開始早期の段階より5-FU/BCG併用群において抗腫瘍増大効果を認め、5-FU単独群と比較し併用効果を示した。特に5-FU低濃度(30mg/kg)に

おいてその傾向は顕著であった(有意差なし)。また、堵殺時計測の腫瘍重量も容積の結果と同様の傾向を示した(有意差なし)。BCG単独群では抗腫瘍増大効果を認めなかった。さらに、白金製剤シスプラチン(CDDP)とBCG併用による抗腫瘍増大作用についても検討した。その結果、若干の併用効果を示す条件もあったが、その効果は不安定で、堵殺時計測の腫瘍重量も容積の結果と不一致な群もあり、CDDPとBCG併用効果は明確ではなかった。この事より、シスプラチンとBCGの併用による抗腫瘍増大効果は顕著ではなく、併用効果は5-FUに特有なものであると考えられた。

### ・BCG・抗癌剤併用による、延命効果についての検討結果

尾静脈より腫瘍播種した担癌マウス4群を対象に生存日数を比較した。薬剤非投与群は、播種後50日辺りより死亡開始、60日までに全個体死亡した。BCG単独投与群、5-FU単独投与群、BCG・5-FU併用投与群については、薬剤非投与群とは有意差を持って延命効果を認めた。しかし、投薬3群間に有意差を認めることはできなかった。他の腫瘍担癌モデルについても同様に4群に分け、検討した(C57BLマウスを対象にLLC肺癌細胞株を尾静脈より播種)。結果、口腔癌マウスモデル同様、薬剤非投与群は、45日までに全個体死亡した一方で、BCG単独投与群、5-FU単独投与群、BCG・5-FU併用投与群は、薬剤非投与群とは有意差を持って延命効果を認めた。しかし、投薬3群間に有意差を認めることはできなかった。この事は、腫瘍が残存している状況では投薬による延命効果を求めることは難しいことを示唆するものであった。しかし、BCG生菌のみでも延命効果を有したことは、临床上、BCG生菌の予防的投与の有効性もありうると考えた。

### ・小動物用 PET イメージングによる遠隔転移阻害効果についての解析結果

尾静脈より腫瘍播種した肺転移担癌マウスを対象に、上記4群に分類、投薬し、18F-FDGプローブを投与し、PET撮影(Clairvivo PET: 島津製作所)、腫瘍の全身での転移状況を比較検討した。その結果、全てのマウスで肺転移を認め、解析ソフトPMOD(PET TECHNOLOGY SUPPLIES. INC)を用いた画像解析の結果、4群における肺への18-FDG集積(%ID/g tissue)は差を認めなかった。さらに撮像後のマウスから摘出した臓器(心臓、肺、腎臓、肝臓、脾臓)を対象にガンマカウンターAccuFLEX ARC-7010(ALOKA Co., Ltd.)による18F-FDGプローブ集積も検討した。その結果、肺以外の臓器における転移は認めなかった。こうした結果は、腫瘍が残存する状況下での投薬効果が低いことを示唆すると考えられた。そこで、新たな遠隔転移、再発モデルとして、マウス背部皮下に腫瘍細胞株を播種し、一定の大きさになった後摘出(体積積算値200 cm<sup>3</sup>)、その後投薬開始し、投薬の抗腫瘍効果(局所再発阻害、肺転移阻害、遠隔臓器転移阻害)を18F-FDG PET撮像ならびにガンマカウンター計測、回収臓器からのHE染色で検討した。その結果、18F-FDG PET撮像からのPMOD(PET TECHNOLOGY SUPPLIES. INC)画像解析では、背部に再発した腫瘍部については、非投薬群での局所再発腫瘍に対し、投薬群での局所再発腫瘍での18-FDG集積(%ID/g tissue)は有意に低下しており、局所再発腫瘍の糖代謝低下、悪性度の低下等が窺え、画像上での、非侵襲下での腫瘍の質的診断を可能とするPETの有用性を示すことが出来た。また、PETでの再発腫瘍への集積結果はガンマカウンターでの18-FDG集積結果(%ID/g tissue)とほぼ一致し、生体内において非侵襲的に集積を可視化することができることを示唆できた。回収した腫瘍については、固定後、パラフィン包埋し、HE染色を行う予定である。

以上より、薬剤非投与群、BCG単独投与群、5-FU単独投与群、BCG・5-FU併用投与群の4群を比較し、様々な結果を得た。BCGは単独投与でも、5-FU単独投与群、BCG・5-FU併用投与群同様の生存期間の延長を認めた。そして、PET撮像によって、BCG単独投与を含む全投薬群において局所再発腫瘍での18F-FDG集積の低下を認めた。この事は、腫瘍悪性度の低下を示唆するものと考えられるが、PET撮像によって、BCGが有する抗腫瘍効果を非侵襲的に可視化する事が出来た。

#### 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 0件)

[学会発表](計 9件)

#### The 10th Asian Congress of Oral and Maxillofacial Radiology.

November 20-22, 2014. Bali-Indonesia.

*Mycobacterium bovis bacillus*

Calmette-Guérin (BCG) enhances the antitumour activity of 5-fluorouracil in the mouse oral cancer model.

Yoshinobu YANAGI, Jun MURAKAMI, Naoya OHARA, Masaaki NAKAYAMA, Susumu KOKEGUCHI, Hidetsugu TSUJIGIWA, Hitoshi NAGATSUKA, Hironobu KONOUCI, Miki HISATOMI, Mariko FUJITA, Teruhisa UNETSUBO and Jun-ichi ASAUMI

#### 第52回日本癌治療学会学術集会

2014年8月28~30日 神奈川県、横浜

口腔癌細胞株担癌マウスに対するBCG生菌と5-FU併用療法による延命効果の検討

村上 純、大原 直也、中山 真彰、辻極 秀次、長塚 仁、此内 浩信、柳 文修、苔口 進、久富 美紀、藤田 麻里子、畦坪 輝寿、浅海淳一

**NPO 法人日本歯科放射線学会第 55 回学術大会**

2014 年 6 月 6～8 日 東京

口腔癌細胞株担癌マウスに対する BCG 生菌と 5-FU 併用による転移抑制と延命効果の検討

村上 純、大原 直也、中山 真彰、辻極 秀次、長塚 仁、此内 浩信、柳 文修、苔口 進、久富 美紀、藤田 麻里子、畦坪 輝寿、浅海淳一

**第 68 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会**

2014 年 5 月 8～9 日 東京

口腔癌に対する BCG 生菌と 5-FU 併用療法による延命効果の検討

村上 純、此内浩信、柳 文修、久富 美紀、畦坪 輝寿、藤田 麻里子、浅海 淳一

**第 55 回歯科基礎医学会学術大会・総会**

2013 年 9 月 20 日～22 日 岡山

口腔癌に対する BCG 生菌療法による抗腫瘍、延命効果の検討

村上 純、大原 直也、中山 真彰、辻極 秀次、長塚 仁、此内 浩信、柳 文修、浅海 淳一

**第 22 回 硬組織再生生物学会学術大会・総会**

2013 年 8 月 22 日 神奈川、川崎

口腔癌細胞株に対する 5-FU・BCG 生菌併用療法

李海婷、村上 純、大原 直也、中山 真彰、玉村 亮、辻極 秀次、長塚 仁、此内 浩信、柳 文修、畦坪 輝寿、久富 美紀、浅海 淳一

**NPO 法人日本歯科放射線学会第 54 回学術大会**

2013 年 5 月 31～6 月 2 日 福岡、福岡

口腔癌に対する BCG 生菌療法による抗腫瘍、延命効果の検討

村上 純、此内 浩信、柳 文修、久富 美紀、松崎 秀信、畦坪 輝寿、藤田 麻里子、原 麻里奈、竹信 俊彦、浅海 淳一

**第 67 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会**

2013 年 5 月 22～24 日 栃木県、宇都宮

口腔癌に対する BCG 生菌と 5-FU 併用療法による抗腫瘍効果の検討

村上 純、此内 浩信、柳 文修、久富 美紀、松崎 秀信、畦坪 輝寿、藤田 麻里子、原 麻里奈、竹信 俊彦、浅海 淳一

**NPO 法人日本歯科放射線学会第 53 回学術大会**

2012 年 6 月 1～3 日 岩手県、盛岡

口腔癌に対する BCG 生菌と 5-FU 併用療法による抗腫瘍効果の検討

村上 純、此内 浩信、柳 文修、久富 美紀、松崎 秀信、畦坪 輝寿、藤田 麻里子、原 麻里奈、竹信 俊彦、浅海 淳一

〔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：  
出願年月日：  
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

柳 文修 (YANAGI Yoshinobu)

岡山大学・大学病院・講師

研究者番号： 50284071

### (2) 研究分担者

辻極 秀次 (TSUJIGIWA Hidetsugu)

岡山理科大学・理学部・教授

研究者番号： 70335628

(H24)

畦坪 輝寿 (UNETSUBO Teruhisa)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号： 30633606

(H25-H26)

### (3) 連携研究者

大原 直也 (OHARA Naoya)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号： 70223930

長塚 仁 (Nagatsuka Hitoshi)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号： 70237535