

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861964

研究課題名(和文) 口腔癌の頸部リンパ節転移に対する新規磁性抗癌剤を用いた選択的ハイパーサーミア

研究課題名(英文) Selective hyperthermia using magnetic anti-cancer compound for neck metastasis of oral squamous cell carcinoma

研究代表者

飯田 昌樹 (IIDA, Masaki)

横浜市立大学・附属病院・指導診療医

研究者番号：70613511

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：口腔扁平上皮癌患者において、大きな頸部リンパ節転移や多発リンパ節転移を有する症例は予後が不良である。このような症例に対して、われわれは浅側頭動脈と後頭動脈を入口とした逆行性超選択的動注化学放射線治療に加えて、頸部への温熱療法を併用している。一方でわれわれは、磁性を有し、磁場による薬剤輸送システムと抗腫瘍効果を併せ持つ薬剤E1236を開発した。本研究で、E1236の抗腫瘍効果、交流磁場印加による温熱療法の効果を、腫瘍細胞およびマウスの舌癌モデルにおいて評価したところ、細胞実験と動物実験の両方でE1236は抗腫瘍効果を示し、さらに交流磁場印加によって抗腫瘍効果は増強された。

研究成果の概要(英文)：Patients of oral squamous cell carcinoma with bulky or multiple cervical lymph node metastases have a poor prognosis. Our strategy for these patients is the chemoradiotherapy using superselective intra-arterial infusion combined with hyperthermia. On the other hand, we developed new compound for magnet-guided delivery with anti-cancer activity named E1236. This compound has a magnetic property, so it can be used for thermochemotherapy. This study was to evaluate the anti-cancer efficacy of this new drug. We evaluated the combined two-fold strategy, i.e., chemotherapy with E1236 and alternating magnetic field induced heating of this drug to induce local hyperthermia, in both cultured cancer cells and cancer-bearing nude mouse. We found this new drug is effective as anti-cancer agent in both cultured cancer cells and mouse model of tongue cancer, and that alternating magnetic field exposure enhanced the anti-cancer effect.

研究分野：口腔癌

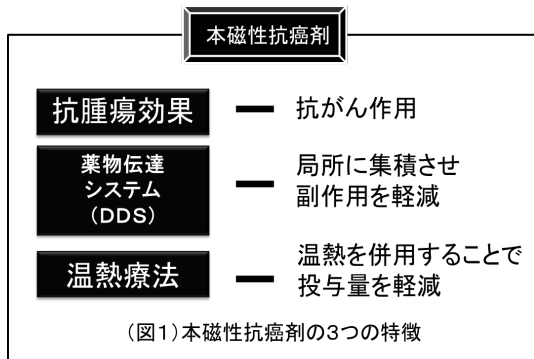
キーワード：口腔癌 ハイパーサーミア 新規磁性抗癌剤 頸部リンパ節転移

1. 研究開始当初の背景

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。申請者らのグループは、従来では手術療法しか治療法が選択できなかった進行口腔癌症例に対し超選択的動注化学放射線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。しかしながら、頭頸部癌の頸部多発性リンパ節転移症例(N2b, 2c)あるいは6cm以上の頸部リンパ節転移を有するN3症例については、本療法のみでは制御が困難となることもある。そこでわれわれはN2、N3症例に対しては逆行性の超選択的動注化学放射線療法と頸部へのハイパーサーミアを併用することによって原発のみならず、頸部リンパ節転移の制御を目指している。これまでにわれわれは口腔癌に対するハイパーサーミアの抗腫瘍効果について基礎および臨床研究を行い、その有用性を報告した。

われわれは横浜市立大学循環器制御学講座と共同で新規磁性化合物(EI 236)を同定した(図1)。この化合物は、常温で磁性を有する磁性体で、DNAの切断を誘導することで、抗癌作用がある。さらに磁石にて誘導できることから局所への抗癌剤の集中的な投与が可能となり、化合物自体に発熱効果があることからハイパーサーミアが可能となった。現在までにわれわれはこのEI 236を利用したDDSの開発を試み、動物実験にてその有用性を証明し発表した。EI 236を用いたハイパーサーミアの特徴としては、磁石にて誘導できる性質からターゲットとする腫瘍組織に移行すること可能となり、交流磁場印加による組織内加温が可能である。

今回、申請者らのグループが開発した新規磁性抗癌剤を用いた頸部のリンパ節転移に対する抗腫瘍効果について、ウサギ舌癌頸部リンパ節転移モデルを作成し検討を行った。



2. 研究の目的

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

プリーター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EI 236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ハイパーサーミアが施行できる画期的な治療法である。

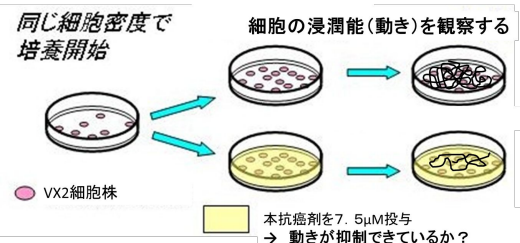
本研究の目的は、新規磁性体EI 236を利用することにより、局所におけるハイパーサーミアと化学療法の両者の効果による相乗的作用をin vitro、in vivoにおいて検討し、その効果を実証することである。

3. 研究の方法

新規磁性抗癌剤のウサギ由扁平上皮癌細胞株に対する浸潤能抑制の解明

(1)新規磁性抗癌剤の扁平細胞株へのアポトーシス誘導の検討

腫瘍細胞はウサギ由来扁平上皮癌細胞株(VX2)を用いる。VX2(5×10⁵cells)と本抗癌剤7.5μMをFACSチューブに入れる。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する。上清を除去し250μlのTrypsinを加える。攪拌後10分室温放置。200μlのTrypsin inhibitorを添加し、攪拌後10分室温放置。200μl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。



(2)ウサギ由来扁平上皮癌細胞株に対して新規磁性抗癌剤が及ぼす浸潤能抑制を解明する。

VX2 癌細胞株(1×10⁴cells/ml)をチャンバースライドに撒く。24時間後、7.5μMの本抗癌剤を投与する。顕微鏡で細胞の動きを30分おきに24時間撮影する。細胞が動きをプロットし、距離を求める。

ウサギ舌癌リンパ節転移モデルを用いた新規磁性抗癌剤の抗腫瘍効果の検討

(3)ウサギ舌癌モデルに対する新規磁性抗癌剤局所投与の検討

ウサギの舌にVX2癌細胞を移植する。細胞数は5.0×10⁸個とする。舌の腫瘍径10mmとなった時点で実験開始とする。イソフルランを用いた吸入麻酔下に、腫

瘍部位に局所に本抗癌剤（5mg/kg）を投与する。週2回、3週間行い、舌癌部・リンパ節の組織標本を作成し、HE染色、TUNEL法、鉄染色で評価を行う。

(4)ウサギの舌癌頸部リンパ節転移モデルの確立

ウサギの舌に VX2 癌細胞（細胞数：5.0×10⁸個）を移植する。ウサギの VX2 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（Cancer Sci.94, 834-839, 2003）ため、VX2 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する。

(5)交流磁場発生装置を用いたウサギリンパ節転移モデルによるハイパーサーミアの検討

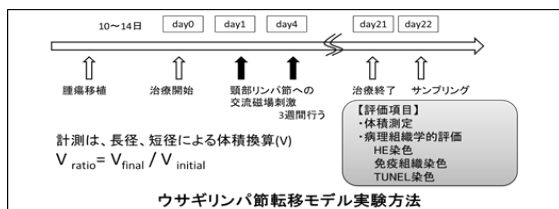
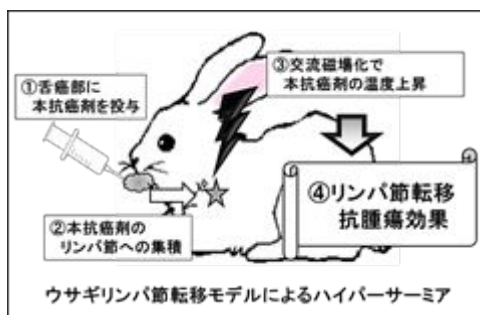
ウサギの舌に VX2 癌細胞を移植し、腫瘍径 10mm を超えリンパ節転移が確認されたら実験開始とする。

イソフルランを用いた吸入麻酔下に、腫瘍部位に局所に本磁性体（5mg/kg）を投与する。

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（下図）、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う。ウサギの頸部が入る交流磁場の温熱を行う機器については申請者らのグループが共同研究を行っている横浜国立大学工学部から装置の提供をしていただいた。



4. 研究成果

動物実験および細胞実験で使用する予定であったウサギ由来扁平上皮癌 VX2 細胞に代わって、ヒト由来扁平上皮癌 OSC19 細胞を用いて、新規磁性抗癌剤 E1236 の抗腫瘍効果を検討した。細胞を変更した主な理由としては、細胞実験において様々な種類の口腔癌細胞

を検討した結果、新規磁性抗癌剤 E1236 が OSC19 細胞に対して、より優れた抗腫瘍効果を発揮すること、また家兎よりも安価で使用匹数を確保しやすく、飼育しやすいヌードマウス BALB-C nu/nu に OSC19 細胞が移植可能であったことが挙げられる。

平成 25 年度における研究で、細胞実験では新規磁性抗癌剤 E1236 のヒト由来扁平上皮癌 OSC19 細胞に対するアポトーシス誘導による細胞障害性の検討、およびヒト由来扁平上皮癌 OSC19 細胞に対して新規磁性抗癌剤 E1236 が及ぼす浸潤抑制能と遊走能低下の検討を行った。動物実験では、新規磁性抗癌剤 E1236 がヌードマウス舌癌頸部リンパ節転移モデルに対して局所投与下においても抗腫瘍効果を発揮できることを証明する目的で、ヒト由来扁平上皮癌 OSC19 細胞をヌードマウス BALB-C nu/nu の舌に移植して、移植後 16 日後、18 日後、20 日後、22 日後にリンパ節を摘出して、転移の有無、原発部位と転移リンパ節の大きさ、個数、節外浸潤の有無について病理組織学的検討を行い、舌癌の発症とともに頸部リンパ節転移が起きていることを確認した。

平成 26 年度における研究では、作成法を確立したヌードマウス BALB-C nu/nu の舌癌頸部リンパ節転移モデルに、新規磁性抗癌剤 E1236 を投与する際の最適濃度と投与量を LD50 の理論に基づいて検討を行い、決定した。この最適濃度と投与量で、新規磁性抗癌剤 E1236 をマウス舌癌頸部リンパ節転移モデルの舌に局所注射したところ、薬剤が頸部の転移リンパ節にも流入していることを病理組織学的に確認した。このマウス舌癌頸部リンパ節転移モデルに新規磁性抗癌剤 E1236 を局所注射したのに対して、交流磁場装置を用いた磁場印加によるハイパーサーミアを週 3 回の頻度で 4 週間行った。これについて舌を摘出して各種染色による病理組織学的検討を行ったところ、癌細胞の消失を確認できた。さらに、鉄染色では新規磁性抗癌剤 E1236 が腫瘍組織に流入していることが確認できた。また、TUNEL 染色ではアポトーシスが起きていることが確認できた。

平成 27 年度における研究では、実際の臨床を想定し、動物実験用サーモトロンを用いて新規磁性抗癌剤 E1236 を局所注射したマウス舌癌頸部リンパ節転移モデルに対してハイパーサーミアを施行したところ、病理組織学的に抗腫瘍効果を認めた。

これらの結果から、本研究で用いた新規磁性抗癌剤 E1236 は口腔癌の新たな治療薬として有望であることと考えられる。また、新規磁性抗癌剤の局所投与とハイパーサーミアの併用療法が、マウス舌癌頸部リンパ節転移モデルにおいて、原発巣と頸部リンパ節転移の両方に抗腫瘍効果を認めたことから、当科で行っている超選択的化学療法とハイパーサーミアの併用療法に、将来的に応用可能であることが示唆された。

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8件)

Iida M, Mitsudo K, Koizumi T,
Nakashima H, Iwai T, Oguri S, Hirota
M, Kioi M, Tohnai I.

Thermochemoradiotherapy using
retrograde superselective
intra-arterial infusion for advanced
oral cancer with cervical lymph node
metastases. 22nd International Oral
and Maxillofacial Surgery (ICOMS),
Melbourne, Australia, 27-30 Oct, 2015

Iida M, Mitsudo K, Ohara Y, Ohya T,
Koizumi T, Nakashima H, Iwai T, Oguri
S, Kioi M, Hirota M, Tohnai I: Clinical
evaluation of
thermochemoradiotherapy using
retrograde superselective
intra-arterial infusion for advanced
oral squamous cell carcinoma with
cervical lymph node metastases. 6th
Asian Congress of Hyperthermic
Oncology, AOSSA Fukui(Fukui), 5-6 Sep,
2014

Iida M, Mitsudo K, Ohara Y, Ohya T,
Koizumi T, Nakashima H, Iwai T, Oguri
S, Kioi M, Hirota M, Tohnai I. Clinical
evaluation of
thermochemoradiotherapy using
retrograde superselective
intra-arterial infusion for advanced
oral cancer with cervical lymph node
metastases. American Association of
Oral and Maxillofacial Surgeons 96th
Annual Meeting, Honolulu, USA, 8-13
Sep, 2014

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・指導診療医
研究者番号：70613511