

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462838

研究課題名(和文) 口腔癌根治を目指した放射線治療の挑戦 分子標的薬と抗癌剤の最適な併用法の追究

研究課題名(英文) Challenge of radiotherapy for oral cancer -definition of appropriate combination both cetuximab and docetaxel-

研究代表者

工藤 隆治 (KUDOH, Takaharu)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学系)・助教

研究者番号：10263865

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：放射線照射前、照射中と照射後に、ドセタキセルとセツキシマブの投与を行い、コロニー形成能とアポトーシス解析を用いて至適投与順序を決定することが目的である。B88細胞とCAL27細胞に対しin vitro実験では放射線の線量は4グレイが、ドセタキセルでは2時間処理では4 ng/ml、セツキシマブでは25 microg/mlが至適濃度であることが判明した。これらにて解析を行った結果、放射線照射前、照射中および照射後のどの時期にドセタキセルやセツキシマブを投与しようとも有意差は認められなかった。今後、他の薬剤と放射線照射による至適投与順序を決定し、最適な臓器温存治療のレジメンを決定する必要がある。

研究成果の概要(英文)：Before, during and after irradiation, determine an appropriate combination both cetuximab and docetaxel in vitro using analyses of colony formation assay and apoptosis. First, in vitro experiment to B88 cell and CAL27 cell. In the analysis, it became clear that 4 Gy was an appropriate dose and docetaxel was 4 ng/ml, cetuximab was 25 microg/ml in 2 hour processing. The significant difference was not accepted even if it prescribed docetaxel or cetuximab for each period of irradiation. There is a mission which determines an appropriate combination by other medicines and irradiation in vitro and vivo from now on, and determines the regimen of the optimal organ preservation treatment.

研究分野：放射線腫瘍学

キーワード：癌 細胞実験 放射線照射 ドセタキセル セツキシマブ

1. 研究開始当初の背景

口腔癌ではSeldinger法によるシスプラチン(CDDP)の超選択的動注化学療法と放射線照射との併用により、高い局所制御率が報告されている(Am J Neuroradiol. 21(10):1917-22, 2000, Oral Oncol. 47(7):665-70, 2011)。Seldinger法は腫瘍の複数の栄養動脈に超選択的に注入できる利点があるが、脳血栓塞栓症の発症の危険性がある。しかし、浅側頭動脈(STA)よりの逆行性超選択的動注化学療法では、その危険性が低く、さらに放射線照射中に薬剤を投与することができるため、CDDPの同時併用によって最大の抗腫瘍効果が得られる(Int J Radiat Oncol Biol Phys. 72(4):1090-1100, 2008)。最近、微小管の重合促進及び脱重合抑制によって細胞分裂を阻害する新規の抗癌剤ドセタキセル(DOC)が口腔癌に適用となった。われわれは、口腔癌にSeldinger法でDOCの超選択的動注化学療法を行い、CDDPよりも優れたCR率(69.2%)を得ている(Gan To Kagaku Ryoho. 38(5):777-81, 2011)。また、STAよりの逆行性超選択的動注化学放射線療法においても、DOCはCDDPに比べて口腔癌に対する有効性が高いことが報告されている(Int J Radiat Oncol Biol Phys. 83(5):639-45, 2012, Int J Radiat Oncol Biol Phys. 79(5):1428-35, 2011, Oral Oncol. 46(12):860-3, 2010)。

頭頸部癌の臨床における、DOCを用いた報告でも、CDDPの場合と同様に、放射線照射と同時に投与されている。しかし、頭頸部扁平上皮癌であるCAL 27細胞では、放射線照射後にDOCを投与する方が有効であると報告されている(ONCOLOGY REPORTS. 23:1339-43, 2010)。一方、マウスの空腸粘膜に乳癌Mca-4細胞を移植した場合には、放射線照射の24時間前にDOCを投与する方が有効であることが報告されている(Clin Cancer Res. 5(12):4191-8, 1999)。すなわち、放射線照射との併用において、最大の抗腫瘍効果を示すDOCの投与のスケジュールに定まった見解がない。そこで、本研究では、細胞はウサギに可移植性のVX2癌細胞を用いる。in vitro, in vivoの実験で、最大の抗腫瘍効果を示すDOCと放射線照射の併用時期を明らかにすることを、まず目指す(図1)。口腔癌の放射線治療には、外部照射と密封小線源治療(brachytherapy)があるため、両方の照射法を検討する。外部照射は150 kVp X-ray generatorを用いる。Brachytherapyでは、高線量率遠隔操作式後

装填法(HDR RALS)にて、われわれはマイクロセレクトロンHDR (Nucletron, オランダ)を用いて、細胞に正確に放射線照射できる実験系を発表した(第24回日放腫、2011年)。これは、細胞を封入したフレキシブルチューブ(サイズ6フレンチ)及び線源通過用のそれを、散乱体である寒天印象剤中で固定するものである(図2)。HDR RALSはこの実験系を用いて行う。

動物実験モデルは、ウサギの耳介の栄養動脈にカテーテルを留置したモデルを用いる(図3, Lab Animals. 33:175-84, 1999)。放射線照射は、上記の細胞実験と同様に、150 kVp X-ray generatorによる外部照射と、腫瘍周囲への線源通過用フレキシブルチューブを埋め込むHDR brachytherapyの双方で行う。最大の抗腫瘍効果を示すのが、DOCと放射線照射の同時併用ならば、臨床においては、その完遂率が問題となる。そこで、われわれが着目したのが、最近注目されている分子標的治療との併用である。分子標的薬の登場により、殺細胞性の抗癌剤が中心であった癌の化学療法の分野に変化をもたらしつつある。口腔癌においても、扁平上皮癌において上皮成長因子受容体(EGFR)が高発現し、その発現が重要な予後因子であることが知られている。抗EGFR抗体薬であるセツキシマブ(Cmab)は、放射線増感作用を有し(Clin Cancer Res. 6(2):701-8, 2000)、進行頭頸部癌に対して、放射線治療との併用により、有意の局所制御率と全生存率の向上が報告されている(N Engl J Med. 354:567-78, 2006, Lancet Oncol. 11:21-8, 2010)。しかし、Cmabは2012年12月に承認・導入された新規薬剤のため、DOCを用いた動注化学療法併用の放射線照射に、さらにCmabを併用した報告はされていない。そこで、超選択的動注化学療法の動物実験モデルを用いて、Cmab投与による治療効果の上積みによりDOCを減量できれば、DOCによる有害事象を最小限にしながら、治療効果の増加が見込まれる。本研究では、口腔癌における最大の抗腫瘍効果を示すDOCの投与スケジュール(放射線療法との併用)及び、DOC及びCmabを併用した放射線治療の治療効果を、in vitroとin vivo実験で決定し、非手術症例での口腔癌治療の成績の向上を目指したいと考えている。

2. 研究の目的

DOCは、CDDPと同様に、口腔癌に対する動注化学療法に用いられ、高い有効性が報告されている。しかし、DOCの投与と放射線

照射のスケジュールに、統一された結論はない。本研究では、口腔癌に対して、放射線照射の併用によって、最大の抗腫瘍効果が得られる DOC と放射線照射の投与スケジュールを invitro、invivo の実験で決定することを第一の目的とする。

昨年、我が国において、口腔癌に対して初めて承認・導入された分子標的薬 Cmap についても、放射線治療との併用が有効とされながらも、化学放射線治療に対する上乗せ効果は証明されておらず、今後の課題である。本研究では、第二の目的として、DOC 及び Cmap の 2 剤と放射線の併用効果を検討する。

3. 研究の方法

(1) 培養扁平上皮癌細胞 (VX2 癌細胞) に対する放射線照射の至適線量と DOC の濃度の決定

VX2 癌細胞に対する DOC と放射線照射の最適な時期の検討 (in vitro)

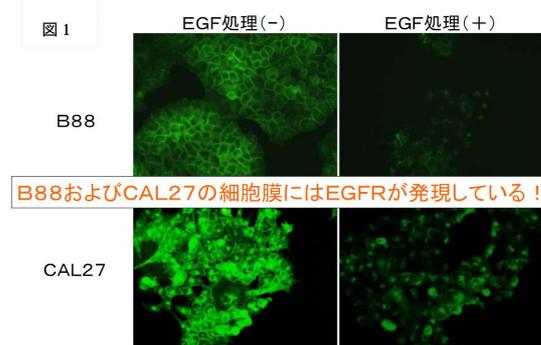
(2) NZW ウサギに VX2 癌細胞を移植し栄養動脈にカテーテルを留置した動物実験モデルの作成と、このモデルを用いた DOC と放射線照射の最適な時期の検討 (in vivo)、前記で構築したモデル (in vivo 実験系) を用いた Cmap 単剤併用放射線照射群と、Cmap と DOC の 2 剤併用放射線照射群における治療効果の比較と検討

4. 研究成果

(1) まず細胞として B88 細胞と CAL27 細胞を用いた。両細胞共に EGFR の発現が確認された (図 1)。

Progress Report 2016.1.6

各種細胞 (B88、CAL27) における EGFR の発現の確認



(2) 本設定における、B88 細胞と CAL27 細胞の 6 ウェルプレートへの至適播種数は、コロニー形成能及び MTT アッセイから、100-200 個が適切である事が確認された。

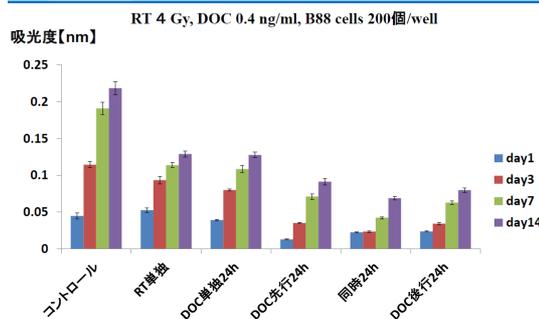
(3) コロニー形成能及び MTT アッセイを用いた B88 細胞と CAL27 細胞に対する DOC と Cmap の濃度、放射線量の決定：DOC は 2 時間処理が 4-5ng/ml、24 時間処理は 0.4-0.

5ng/ml、Cmap は 2 時間処理は 25µg/ml、24 時間処理は 2.5µg/ml、放射線量は 3-4 グレイが適切と考えられた。

(4) 上記の条件を用いて、B88 細胞や CAL27 細胞を用いて、薬剤と放射線照射の最適な時期を検討するために、コロニー形成能及び MTT アッセイを施行したところ、有意差は確認できなかった (図 2-5)。

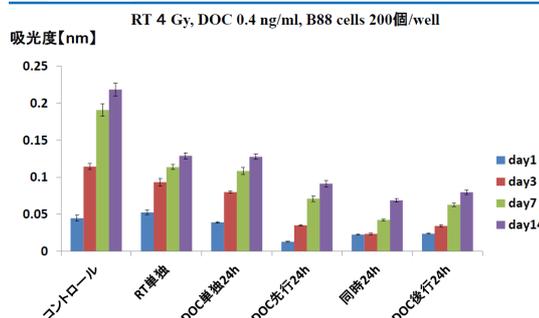
Progress Report 2015.7.9

図 2: 24h 処理群の MTT アッセイ



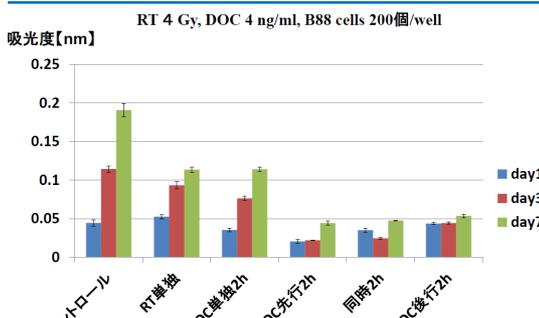
Progress Report 2015.7.9

図 3: 24h 処理群の MTT アッセイ



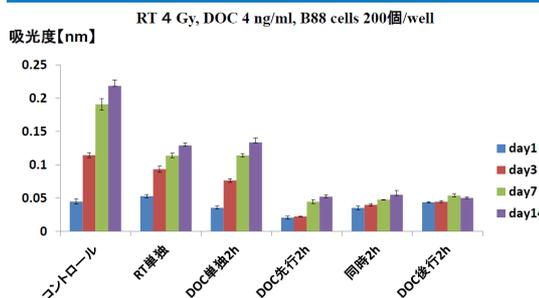
Progress Report 2015.5.13

図 4: 2h 処理群の MTT アッセイ



Progress Report 2015.7.9

図 5: 2h 処理群の MTT アッセイ



(5) B88 細胞と CAL27 細胞に対する DOC と Cmax の濃度と放射線量を考えられる限りの変更を行い、薬剤と放射線照射の最適な時期の検討を行ったが、有意差は確認できなかった。

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)

Kudoh T, Ikushima H, Kudoh K, Furutani S, Kawanaka T, Kubo A, Takamaru N, Tamatani T and Miyamoto Y: Effectiveness of Newly Developed Water-Equivalent Mouthpiece during External Beam Radiation for Oral Cancer, *Annals of Carcinogenesis*, Vol.1. No.2, pp.1-5, 2017. (査読あり)
Kudoh K, Kudoh T and Miyamoto Y: A case of tophaceous pseudogout of the temporomandibular joint extending to the base of the skull, *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, Vol.46, No.3, pp.355--359, 2016. (査読あり)

[学会発表](計6件)

工藤 隆治, 久保 亜貴子, 川中 崇, 古谷 俊介, 生島 仁史: 頭頸部癌に対する IMRT の予防的頸部 CTV 設定の妥当性の検証, 日本放射線腫瘍学会第 29 回学術大会, 2016 年 11 月 25-27 日. 国立京都国際会館「京都府・京都市」.
玉谷 哲也, 高丸 菜都美, 鎌田 久美子, 横田 美保, 山村 佳子, 工藤 景子, 大江 剛, 工藤 隆治, 高橋 章, 藤澤 健司, 永井 宏和, 宮本 洋二: 当科における早期口腔扁平上皮癌患者の臨床的検討, 第 64 回 NPO 法人日本口腔科学会中国・四国地方部会, 2016 年 10 月 28-29 日. 国際ホテル宇部「山口県・宇部市」.
高橋 章, 鎌田 久美子, 山村 佳子, 高丸 菜都美, 工藤 隆治, 工藤 景子, 大江 剛, 藤澤 健司, 玉谷 哲也, 永井 宏和, 宮本 洋二: 口腔扁平上皮癌の頸部リンパ節転移診断における FDG-PET 検査の有用性, 第 15 回中国四国口腔癌研究会, 2016 年 10 月 28-29 日. 国際ホテル宇部「山口県・宇部市」.
工藤 隆治, 工藤 景子, 高橋 章, 宮本 洋二: 口腔癌に対する強度変調放射線治療の有効性について, NPO 法人日本歯科放射線学会 第 57 回学術大

会・第 13 回定例総会, 2016 年 6 月 18-19 日. グランキューブ大阪「大阪府・大阪市」.

工藤 隆治, 久保 亜貴子, 川中 崇, 古谷 俊介, 生島 仁史: Necessity of postoperative radiation therapy of contralateral neck for lateralized oral squamous cell carcinoma, 日本放射線腫瘍学会第 28 回学術大会, 2015 年 11 月 19-21 日. ベイシア文化ホール「群馬県・前橋市」.

工藤 隆治, 佐々木 幹治, 久保 亜貴子, 川中 崇, 古谷 俊介, 生島 仁史: 頭頸部癌放射線治療中の転移リンパ節のサイズ変化と制御との関連, 日本放射線腫瘍学会 27 回学術大会, 2014 年 12 月 11-13 日. パシフィコ横浜「神奈川県・横浜市」.

[図書](計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

工藤 隆治 (KUDOH, Takaharu)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学系)・助教
研究者番号: 10263865

(2) 研究分担者

生島 仁史 (IKUSHIMA, Hitoshi)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学系)・教授
研究者番号: 90202861
宮本 洋二 (MIYAMOTO, Youji)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学系)・教授
研究者番号: 20200214
玉谷 哲也 (TAMATANI, Tetsuya)
徳島大学病院・講師
研究者番号: 30274236
工藤 景子 (KUDOH, Keiko)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学系)・助教
研究者番号: 70380029
高橋 章 (TAKAHASHI, Akira)
徳島大学病院・講師
研究者番号: 30252688