

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26462999

研究課題名(和文) 高齢者の異時性口腔癌制御を目的とした血管新生阻害剤局所注入療法の確立

研究課題名(英文) Establishment of peritumoral injections of angiogenesis inhibitor to control asynchronous oral cancer in elderly patients

研究代表者

佐野 和生 (Sano, Kazuo)

福井大学・学術研究院医学系部門・教授

研究者番号：20145270

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：癌の増殖や転移の過程において血管新生は重要な役割を果たしている。ベバシズマブは血管内皮増殖因子の働きを阻害する。ベバシズマブ静脈内投与は副作用を増強するとされるが、抗癌剤の局所投与により全身の副作用は軽減する。

今回、口腔扁平上皮癌移植マウスモデルを用いてベバシズマブ局所投与の効果を検討した。腫瘍血管に対する免疫組織化学的検討、腫瘍細胞のアポトーシスの検討を行った。ベバシズマブ投与群では腫瘍体積が有意に抑制された。また、ベバシズマブ投与群では腫瘍血管の密度が減少するとともに、アポトーシス細胞数は有意に増加した。これらの結果より、口腔扁平上皮癌周囲へのベバシズマブ局所投与の有用性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Angiogenesis serves a crucial role in tumor growth. Bevacizumab inhibits the biological activity of VEGF and is clinically administered by intravenous injection. As intravenous chemotherapy intensifies the side effects in oral squamous cell carcinoma (OSCC) patients. Generally, local injections of antitumor agents decrease side effects. However, the antitumor effects of peritumoral bevacizumab injections in OSCC are not fully understood. The present study examined the effects of peritumoral bevacizumab injections in an experimental nude mouse model of OSCC through immunohistochemical staining and apoptosis assays. Compared with controls, peritumoral bevacizumab injections significantly inhibited tumor growth in OSCC xenografts and treatment with bevacizumab significantly reduced microvessel density and increased level of tumor cell apoptosis. These results support the experimental basis for the clinical development of peritumoral bevacizumab injections for the treatment of OSCC.

研究分野：口腔外科学

キーワード：口腔扁平上皮癌 血管新生阻害剤 bevacizumab 局所投与 抗腫瘍効果

## 1. 研究開始当初の背景

口腔癌に対しては、放射線療法、化学療法を組み合わせた術前療法後に外科的切除、再建を行う集学的治療が一般に行われるようになってきている。放射線併用術前動注化学療法後に縮小手術、または再建を含めた拡大切除手術を行い、これによって治療成績も大幅に向上した (Kitagawa Y, Sano K, et al.: European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging 2003)。しかしながら、超高齢者や重度の全身疾患を有する口腔癌症例では、抗癌剤や放射線療法の副作用のため、集学的治療の施行が困難となる場合がある。

そこで、われわれは、高齢者で全身疾患を有する上顎癌症例に対し、マイクロ波凝固療法を用いて腫瘍の局所コントロールを行い、良好な結果を得た (Matsuura H, Kitao A, Sano K, et al.: Oral Oncology EXTRA 2005)。しかしながら、本療法は高額な医療機器を設置することが必要で、治療法としての一般化は困難である。また、近年、口腔内に癌が多発する高齢患者も多くみられるようになってきた。癌治療、特に手術や集学的治療の既往がある患者や全身状態が良好ではない患者では、治療が困難となる場合も少なくない。

これに対し、局所療法により腫瘍制御を行う方法として、ピシバニール (OK-432) の局所注入療法が挙げられる。ピシバニールは溶連菌の一種であるストレプトコッカス・ピオゲネス Su 株のペニシリン処理凍結乾燥粉末を有効成分とするもので、他剤無効の頭頸部癌に対し、腫瘍内または腫瘍辺縁部に注入することで、腫瘍に対する直接的増殖抑制、免疫細胞にかかわるサイトカインの産出による免疫作用の増強により抗腫瘍効果を示すと考えられている。しかしながら、重大な副作用としてショック、アナフィラキシー様症状、間質性肺炎、急性腎不全があり、高齢者に対してはその使用がしばしば制限される。

近年、血管内皮増殖因子 (Vascular endothelial growth factor: VEGF) と特異的に結合することにより VEGF の生物活性を阻止し、腫瘍組織での血管新生を抑制し、結果的に腫瘍の増殖を阻害する血管新生阻害剤のベバシズマブが開発され、消化器癌患者などに全身投与が行われている。しかしながら、全身投与では重篤な副作用が報告されており、高齢者に対しての使用が躊躇される局面も多い。VEGF は正常な血管新生に際しても重要な物質であるため、ベバシズマブを腫瘍周囲だけに局所注入し投与量を少なくすることで、副作用の著明な軽減が可能となる。これまでに、ベバシズマブの局所注入療法を腫瘍制御に用いた研究報告は

みられない。このため、高齢者異時性口腔癌制御を目的としたベバシズマブの安全な局所注入療法を確立すべく、癌移植モデルを用いて実験的検討を行うこととした。

## 2. 研究の目的

癌の増殖や転移の過程において血管新生は重要な役割を果たしている。ベバシズマブは血管内皮増殖因子の働きを阻害することにより腫瘍血管新生を抑制する抗 VEGF 抗体であり、臨床的には静脈内投与で使用されている。全身疾患を有する患者に対する、抗癌剤の静脈内投与は副作用を増強するとされる。一方、腫瘍に直接作用する抗癌剤の局所投与は全身の副作用を軽減し、抗腫瘍効果を強めるとの報告がある。しかしながら、口腔扁平上皮癌 (Oral squamous cell carcinoma; OSCC) 周囲へのベバシズマブ局所投与の効果については明らかにされていない。今回、OSCC 移植マウスモデルを用いてベバシズマブ局所投与の効果を検討した。

## 3. 研究の方法

(1) 口腔扁平上皮癌細胞株における VEGF-A 発現量の解析

mRNA レベルで口腔扁平上皮癌細胞株 (HSC-2, HSC-3, HSC-4, SAS) における VEGF-A 発現量を real-time PCR により解析した。ヒト角化細胞 HakaT をコントロールとして使用した。

(2) 口腔扁平上皮癌背部皮下移植マウスモデルの作製

OSCC 細胞株 HSC-3 を生後 5 週齢の BALB/c ヌードマウス (雌) の背部皮下に移植した。腫瘍が一定の大きさに達した後に実験を開始した。

(3) ベバシズマブ局所投与法の検討

まず、予備実験として、腫瘍周囲の 2 方向 (頭部と尾部) からインジゴカルミンを 25  $\mu$ l ずつ局所投与し、腫瘍およびその周囲が濃染されるかを確認した。次いで、腫瘍周囲の 2 方向 (頭部と尾部) からベバシズマブ (10 mg/ml)、生理食塩水を週 2 回 4 週間、腫瘍周囲に局所投与を行った。投与開始 4 週後に腫瘍を摘出し、生理食塩水投与群、無処理群と比較検討を行った。

(4) 摘出した腫瘍に対する組織学的・免疫組織学的解析

摘出した腫瘍に対して、血管内皮細胞マーカー CD31 と alpha smooth muscle actin ( $\alpha$ SMA) に対する免疫組織化学的検討、TUNEL 法によるアポトーシスの検討を行った。そして、微小血管密度およびアポトーシス細胞数の定量化を行い、ベ

バシズマブ投与群と対照群（生理食塩水投与群，無処理群）と比較検討した

#### 4. 研究成果

(1) 口腔扁平上皮癌細胞株におけるVEGF-Aの発現

全ての口腔扁平上皮癌細胞株でVEGF-Aの発現(mRNAレベル)が確認できた。その中でも、HSC-3においてVEGF-Aの発現が最も高かった。

(2) 腫瘍およびその周囲への局所投与効果の確認

腫瘍周囲の2方向(頭部と尾部)からインジゴカルミンを局所投与した結果、腫瘍およびその周囲が青紫色に濃染された(図1)。これにより、腫瘍周囲からの局所投与により薬剤が腫瘍に到達することが示された。



図1 インジゴカルミンによる染色

(3) 口腔扁平上皮癌移植マウスモデルにおけるベバシズマブ局所投与の抗腫瘍効果

ベバシズマブ投与開始して28日後、腫瘍を摘出した。組織学的に、摘出標本に扁平上皮癌が確認できた(図2)。腫瘍は皮膚およびその周囲組織を含めて摘出した。生理食塩水投与群、無処理群と比較し、ベバシズマブ投与群では腫瘍体積が有意に抑制された(図3;  $p < 0.01$ )。ベバシズマブ局所投与により口腔扁平上皮癌の増殖が抑制されることが示唆された。

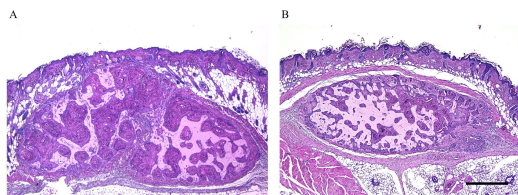


図2 摘出した腫瘍の写真

(A) 無処理群の腫瘍 (B) ベバシズマブ投与群の腫瘍

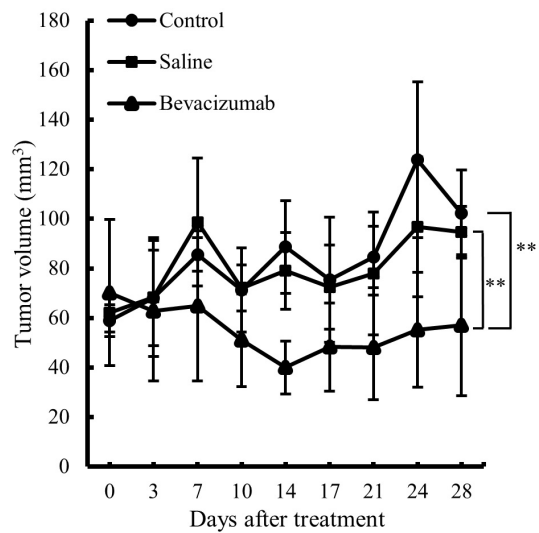


図3 口腔扁平上皮癌移植マウスの腫瘍体積の変化

(4) ベバシズマブ局所投与によるアポトーシス誘導

摘出した腫瘍に対してTUNEL法によるアポトーシスの検討を行った。生理食塩水投与群、無処理群と比較し、ベバシズマブ投与群ではアポトーシス細胞数が有意に増加した(図4)。

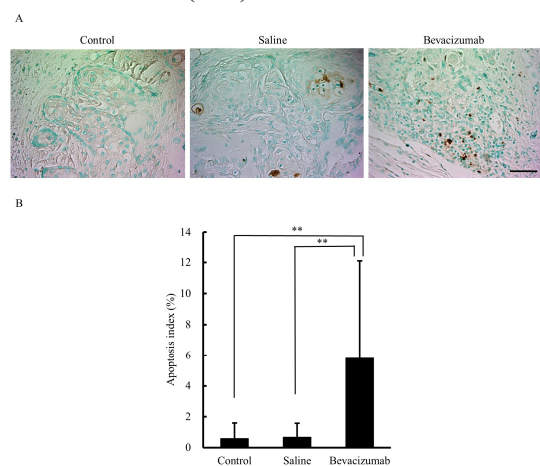


図4 (A)TUNEL染色結果

(B)アポトーシス細胞数の定量化

(5) ベバシズマブ局所投与によるCD31およびαSMA陽性血管の密度

摘出した腫瘍に対してCD31およびαSMA免疫組織化学的検討を行った結果、ベバシズマブ投与群ではCD31陽性血管およびαSMA陽性血管の密度が有意に減少した(図5, 6;  $p < 0.01$ )。これらの結果より、

ベバシズマブ投与群では腫瘍の未熟な血管と成熟した血管の双方とも抑制されることが分かった。

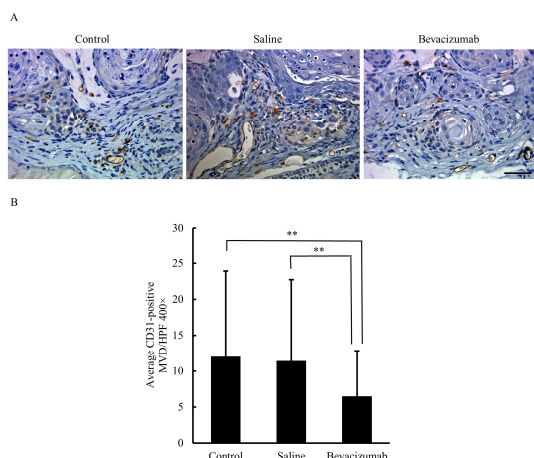


図5 (A) CD31に対する免疫組織化学  
(B) CD31陽性血管の定量化

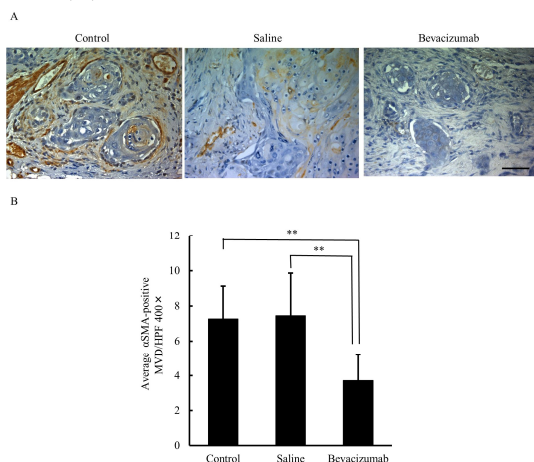


図6 (A) αSMAに対する免疫組織化学  
(B) αSMA陽性血管の定量化

以上の結果により、口腔扁平上皮癌周囲へのベバシズマブ局所投与により腫瘍血管新生の抑制、アポトーシスの誘導がみられたことから、腫瘍周囲へのベバシズマブ局所投与の有用性が示唆された。将来的にベバシズマブ局所投与の臨床応用が可能になるためには、ベバシズマブの作用機序等を含めたさらなる検討が必要になる。今回得られた問題点を踏まえて今後さらに研究を展開していく。

## 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)

Yoshida H, Yoshimura H, Matsuda S, Ryoke T, Kiyoshima T, Kobayashi M, Sano K. Effects of peritumoral bevacizumab injection against oral squamous cell carcinoma in a nude mouse xenograft model: A preliminary study. *Oncology Letters* 15: 8627-8634, 2018.

### 〔学会発表〕(計 1 件)

吉田 寿人、吉村 仁志、松田 慎平、領家 崇、清島 保、佐野 和生：口腔扁平上皮癌移植マウスにおける腫瘍周囲へのベバシズマブ局所投与の効果。第72回日本口腔科学会学術集会。2018.05.12. 愛知県名古屋市

### 〔図書〕(計 0 件)

### 〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕  
なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

佐野 和生 (Sano Kazuo)

福井大学・学術研究院医学系部門・教授

研究者番号：20145270

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし

### (4) 研究協力者

なし