

令和 5 年 5 月 24 日現在

機関番号：32710  
研究種目：基盤研究(C)（一般）  
研究期間：2020～2022  
課題番号：20K10150  
研究課題名（和文）側方漏光性光ファイバーを応用した口腔癌に対する新規光線力学的免疫温熱療法の確立  
  
研究課題名（英文）Establishment of a novel photodynamic immunothermal therapy for oral cancer using lateral light leaking optical fibers  
  
研究代表者  
徳山 麗子（Tokuyama, Reiko）  
  
鶴見大学・歯学部・学内講師  
  
研究者番号：20380090  
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：口腔癌を含む悪性腫瘍に対する三大標準治療を補完し得る治療法の確立が急務となっている。本研究は、温熱療法と免疫療法に光線力学療法を併せた、新たな治療法の開発を試みようとする研究である。口腔癌細胞株を用いて担癌モデルマウスを作製し、特定の癌抗原に対する抗体に光感受性物質であるIR700を共有結合させた抗体を投与し、680-690nmの光照射により、腫瘍細胞の死滅が誘導できるか否かを検討した。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究における新たな光線力学的免疫温熱療法は、IR700を共有結合させた特異的癌抗原に対する抗体を投与したのち、腫瘍組織へ側方漏光性光ファイバーを刺入し、これを通して特定波長（680-690nm）の光を腫瘍組織全体に内部から照射し、腫瘍全体に十分な温熱効果をもたらす、細胞死を誘導しようとするものであった。この研究から想定した成果が得られれば、より低侵襲な新たな癌治療の開発へと発展することが期待できたが、今回の成果では十分でなく、今後さらなる検討が必要である。

研究成果の概要（英文）：There is an urgent need to establish a therapeutic method that can complement the three major standard treatments for malignant tumors including oral cancer. This study attempts to develop a new therapeutic method that combines hyperthermia and immunotherapy with photodynamic therapy. We prepared tumor-bearing model mice using oral cancer cell lines, and administered an antibody against a specific cancer antigen to which IR700, a photosensitizer, was covalently bound. It was examined whether the death of tumor cells could be induced by irradiating this with light of 680-690 nm.

研究分野：外科歯学

キーワード：口腔癌 光線力学的免疫温熱療法

### 1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍に対しては、従来外科療法、放射線療法および化学療法の三大標準治療が行われてきたが、癌患者の高齢化、抗癌治療の障害となり得るさまざまな全身疾患を有する患者の増加等を背景として、第4の治療法の確立が強く求められている。現在、この第4の治療法として免疫療法と温熱療法の2つが期待されているが、最近、免疫療法と温熱療法の概念を統合した新たな光線力学的免疫温熱療法と言える方法が報告された (Nat Med.;17(12):1685-1691,2012, Oncotarget; 9(27): 19026-19038, 2018)。この方法は、特定の癌抗原に対する抗体に光感受性物質である IR700 を共有結合させ、これを投与することで腫瘍細胞にのみ IR700 を付着させ、次いで表層から 680-690nm の近赤外線を照射し、IR700 に熱を発生させることにより腫瘍細胞のみを 42.5 以上とし選択的にアポトーシスを誘導する方法である。本治療法は近赤外線を照射するものであり、また癌抗原特異的抗体を用いることから、正常細胞への影響がないなどの利点がある。一方、近赤外線の深達度の制限から、表層の癌にしか応用できないという欠点があり、治療対象となる癌が大きく限定されてしまうのが実状である。そこで、この方法を改良することで、様々な部位の癌に適応出来る可能性、さらに、より効果的に作用させ得る方法に着目した。

### 2. 研究の目的

最近、側方漏光性光ファイバーと呼ばれる光ファイバーが開発された。未だ医療分野での応用はされておらず、現在は建築分野やアート・デザイン分野での照明に利用されている。このファイバーは光源を変えることでさまざまな波長の光を導光できるのはもちろん、細く曲げに強い。さらにファイバーの先端からに加え、ファイバー側面からあらゆる方向へ均一に光が照射されるという特性をもっている。この側方漏光性を利用すれば、本ファイバーを腫瘍内部に刺入することにより、腫瘍組織全体に内部から特定波長の光を照射することが可能となる。このことから、われわれは前述した光線力学的免疫温熱療法に、この側方漏光性光ファイバーを応用することにより、表層癌のみでなく深部癌にも適応可能な新たな光線力学的免疫温熱療法を開発できる可能性に着目した。

われわれが想定する新たな光線力学的免疫温熱療法は、IR700 を共有結合させた特異的癌抗原に対する抗体を投与したのち、腫瘍組織へ側方漏光性光ファイバーを刺入し、これを通して特定波長 (680-690nm) の光を腫瘍組織全体に内部から照射し、腫瘍全体に十分な温熱効果をもたらす、細胞死を誘導しようとするものである。本研究は、この新たな治療法を確立すべく、まずは腫瘍自体を目視でき、装置がどのような状態であるかを常時観察できることから、臨床的に本治療法が利用しやすい口腔癌を対象として、動物実験により本治療法の適用法、有効性等につき詳細に検討し、将来のヒトへの臨床応用の基盤とすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

本研究では、側方漏光性光ファイバーを利用した新たな光線力学的免疫温熱療法の固形癌への有効性につき、マウス担癌モデルを用いて検証した。

#### (1) 本治療に適した側方漏光性光ファイバーを用いた照射装置の開発

本治療法を実際に臨床応用するに当たっては、身体各部位の固形癌に対応できる形態の光ファイバーと適正な出力を備えた照射装置の開発が必須となる。まず光ファイバーに関しては、工業分野等ですでに利用されている側方漏光性光ファイバー (Fibrance® Light-Diffusing Fiber、コーニングインターナショナル株式会社) を用いた。この光ファイバーは光源から input された光の 90% が側面から、残り 10% が先端から照射されるように設計されており、細い (内径 0.17mm、外径 0.23mm、ジャケット径 0.9mm) 筒状の光ファイバーの周囲全方向に光エネルギーが放射されるというものである。次に光源に関しては、すでに販売されている波長レンジ 405-1000nm の波長の光を照射でき、出力も調整可能なものを購入した。これらを研究協力が得られた企業とともに組み合わせ、690nm の波長の出力が可能な照射装置とした。

#### (2) 担癌モデルマウスの作製

本治療法の実施方法および有効性を検討することを目的に、まず複数の口腔癌細胞株を用いて担癌モデルマウスを作製した。用いるマウスは、ヌードマウスとした。また移植する口腔癌細胞株は、口腔底扁平上皮癌由来 Ho-1-u-1 細胞、歯肉癌由来 Ca9-22 細胞、舌癌由来 HSC-4 細胞、SAS 細胞および HSC-3 細胞の 5 細胞株とした。これらをマウス背部に移植し、担癌モデルマウスを作製した。

#### (3) 側方漏光性光ファイバーを用いた光線力学的免疫温熱療法の治療効果の検討

まず、すでに論文 (Nat Med.;17(12):1685-1691,2012, Oncotarget; 9(27): 19026-19038, 2018) 等で発表されている方法を踏襲し、特定の癌抗原に対する抗体に光感受性物質である IR700 を共有結合させ、抗体を作製した。今回、癌抗原としては、WT1 を対象とした。作製した

抗体を *in vitro* で各種口腔腫瘍細胞に投与し、実際に癌細胞に結合することを確認（蛍光顕微鏡等により腫瘍細胞細胞膜表面に IR700 による蛍光が現れることを確認する）した後、680-690nm の光照射により、腫瘍細胞の死滅が誘導できるか否かを検討し、治療に際し、使用可能な光増感物質結合癌抗原特異的抗体の作製完了とした。これを用いて、前項 2 ) の研究により各種口腔癌細胞株を用いて作製した担癌モデルマウスの背部腫瘍に対し、前項 1 ) で開発した側方漏光性光ファイバー照射装置を用いて治療を行った。治療施行の時期については、担癌モデルマウスを用いた新規治療を検証した過去の報告を参考に、腫瘍体積 400~800mm<sup>3</sup> を目安として行うこととし、IR700 結合抗体を投与したマウス背部腫瘍に光ファイバーを刺入した。照射条件は 680-690nm の近赤外光を種々の照射時間で照射し、それぞれにおける抗腫瘍効果を検証した。治療効果の判定に当たっては、治療群と対象群で経時的に腫瘍径を計測して体積を算出し、腫瘍体積の増減を経時的に比較検討した。また、各群の腫瘍組織を適宜採取し、病理組織学的検討および免疫組織化学的検討を行い、光ファイバー周囲における抗腫瘍効果の確認を行うことで、照射光の到達深度についても検討した。さらに、腫瘍体積の大きい症例への副作用の少ない、身体的負担の少ない治療としても有効であることが期待できるため、腫瘍体積 800~1500mm<sup>3</sup> 程度の担癌マウスにも同様に応用し、検討した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 担癌モデルマウスにおける治療効果

担癌モデルマウスに対して上記の通り治療を行った。治療時の様子を図 1 に示す。また、その結果を経過時間とともに図 2 に示す（HSC-4 を代表例として示す）。

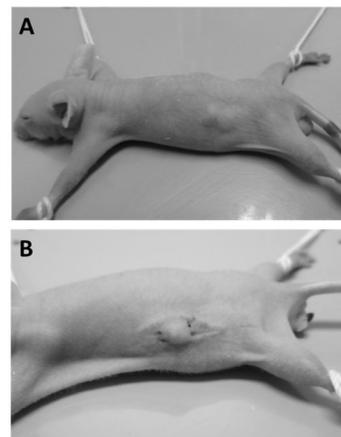


図1：治療時肉眼所見（A：治療前、B：治療後）

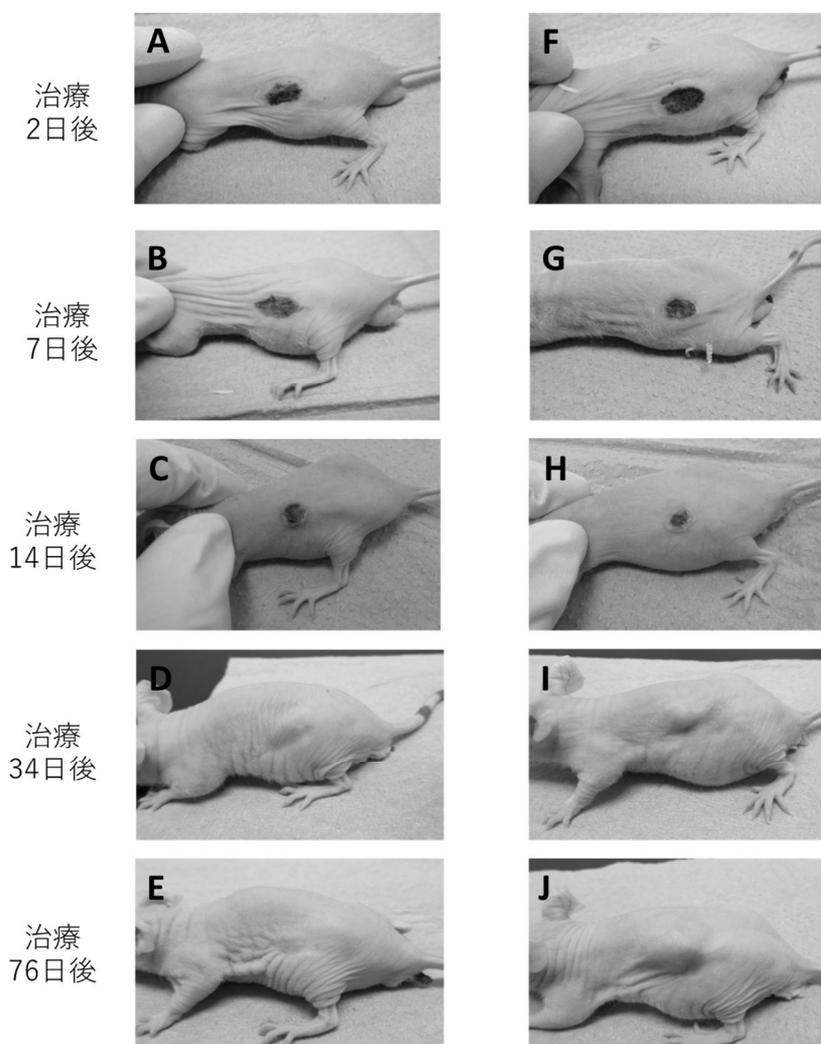


図2：治療後肉眼所見

A~E：治療後改善個体、F~J：治療後再発個体

治療後腫瘍はほとんどの個体で縮小を見たが、一部の個体では効果が認められなかった。これ

は、今後ファイバーの出力や、IR700 結合抗体の投与方法の改善等が必要であると考えられた。また、一部の個体では再発や縮小後すぐの増大も認められた。これも抗体の結合や照射範囲の問題があると考えられた。全研究期間を通してマウスの体重変化は認めず(図3) 明らかな副作用はないと考えられるが、治療法については今後根本的な改良が必要であると考えられた。

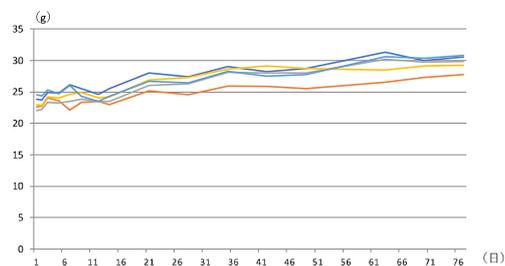


図3：マウス体重

加えて、腫瘍体積の大きな担癌マウスに関しては、ヌードマウスでは個体への負担が大きかったため、EG7-OVA を使用して C57BL/6 に背部移植し担癌マウスとし、治療を行ったが、腫瘍の縮小傾向は認められるものの、有意差は見出せず、これも抗体の改良、照射装置の改良等が必要であると考えられた。

今後は、すでに同様の着眼点による抗体薬や照射装置が開発されつつあるので、それらも応用しながら、口腔癌に対して、T1~2 症例には根治的治療法として、T4 症例にはサルベージとしての姑息的治療法として、有用であるかどうかを念頭に、動物実験による検討を続ける予定である。

## 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 5件）

1. 著者名 Reiko Tokuyama-Toda, Hirochika Umeki, Shinji Ide, Fumitaka Kobayashi, Shunnosuke Tooyama, Mai Umehara, Susumu Tadokoro, Hiroshi Tomonari, Kazuhito Satomura	4. 巻 11(3)
2. 論文標題 A New Implantation Method for Orthodontic Anchor Screws: Basic Research for Clinical Applications	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biomedicines	6. 最初と最後の頁 665
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/biomedicines11030665	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Tokuyama-Toda R, Terada-Ito C, Muraoka M, Horiuchi T, Amemiya T, Fukuoka A, Hamada Y, Takebe Y, Ogawa T, Fujii S, Kikuta T, Sejima S, Satomura K	4. 巻 12(11)
2. 論文標題 Improving the Detection Sensitivity of a New Rapid Diagnostic Technology for Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Using a Trace Amount of Saliva	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Diagnostics	6. 最初と最後の頁 2568
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/diagnostics12112568	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Tsutsumi-Arai C, Iwamiya Y, Hoshino R, Terada-Ito C, Sejima S, Akutsu-Suyama K, Shibayama M, Hiroi Z, Tokuyama-Toda R, Iwamiya R, Ijichi K, Chiba T, Satomura K	4. 巻 19(6)
2. 論文標題 Surface Functionalization of Non-Woven Fabrics Using a Novel Silica-Resin Coating Technology: Antiviral Treatment of Non-Woven Fabric Filters in Surgical Masks	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Int J Environ Res Public Health	6. 最初と最後の頁 3639
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijerph19063639	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Tokuyama-Toda R, Muraoka M, Terada-Ito C, Ide S, Horiuchi T, Amemiya T, Fukuoka A, Hamada Y, Sejima S, Satomura K	4. 巻 11
2. 論文標題 Feasibility of Rapid Diagnostic Technology for SARS-CoV-2 Virus Using a Trace Amount of Saliva	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Diagnostics	6. 最初と最後の頁 2024
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/diagnostics11112024	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Tadokoro S, Tokuyama-Toda R, Tatehara S, Ide S, Umeki H, Miyoshi K, Noma T, Satomura K	4. 巻 10
2. 論文標題 A New Induction Method for the Controlled Differentiation of Human-Induced Pluripotent Stem Cells Using Frozen Sections	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 2827
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells10112827	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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	里村 一人  (Satomura Kazuhito)  (80243715)	鶴見大学・歯学部・教授   (32710)	
研究分担者	井出 信次  (Ide Shinji)  (00611998)	鶴見大学・歯学部・助教   (32710)	
研究分担者	寺田 知加  (Terada Chika)  (40460216)	鶴見大学・歯学部・助教   (32710)	

#### 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
---------	---------