

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 15 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22592243

研究課題名（和文） 家兎移植 VX2 舌癌に対する新規磁性抗癌剤を用いた温熱化学療法の有用性の検討

研究課題名（英文） Thermochemotherapy with controlled drug delivery using a novel magnetic anti-cancer drug

研究代表者

光藤 健司 (MITSUDO KENJI)

横浜市立大学・医学部・准教授

研究者番号：70303641

研究成果の概要（和文）：今回新しく同定された新規磁性抗癌剤は、濃度依存的に DNA を断片化および細胞増殖抑制することで、抗腫瘍効果が得られ、磁性体であるため、永久磁石を用いた磁場印加により、局所への集積が可能である。さらに高周波磁場印加により組織内温熱療法も可能である。われわれはこの新規磁性抗がん剤の抗腫瘍効果を評価し、家兎 VX2 癌を移植した舌腫瘍モデルを作成し、実際に新規磁性抗がん剤を用いた動物実験を行った。その結果優れた抗腫瘍効果を認め、新しい口腔癌治療となることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：A new magnetic anticancer drug (=New drug) was developed giving an anti-tumor effect by fragmenting DNA and controlling cell proliferation, depending on its density. The New drug is characterized by being a magnetic substance, which accumulates locally through impression of a magnetic field using a permanent magnet. As a result, it could be used as a drug delivery system. In addition, it was clarified that the New drug generates heat because of the high frequency magnetic field impression; thus, it is expected to be effective for intra-tissue hyperthermia.

We performed a comparative MTT assay assessing the antitumor effects of the New drug against cisplatin(CDDP), an anticancer drug mainly used for oral cancer. We also created a tongue tumor model into which the VX2 cell line was transplanted, and performed an animal experiment using the New drug. This result suggests that EI236 become a new drug for the treatment of oral cancer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：口腔癌、新規磁性抗癌剤、家兎 VX2 癌、温熱療法、Drug Delivery System

1. 研究開始当初の背景

(1) 従来では手術療法しか治療法が選択できなかった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(頭頸部癌 33, 226-231, 2007)。本法は浅側頭動脈より弯曲状のカテーテルを逆行性に腫瘍栄養動脈に超選択的に挿入することで、腫瘍内に高濃度の抗がん剤を投与することが可能である。また、カテーテルの長期留置ができることから、放射線との同時併用が可能である。さらにSeldinger法による超選択的動注法と比較すると脳梗塞などのリスクが低いなど安全性が高いという利点がある。そのため、従来の化学療法と比較して抗がん剤の投与量を減らすことができ、全身的な副作用を抑えることも可能で、高い抗腫瘍効果が得られている。

一方、温熱療法は、人為的に腫瘍を42.5℃に上昇させることで抗腫瘍効果を得る方法であり、1970年代より臨床応用されている(Cancer 34, 122-129, 1974, Cancer 58, 1589-1595, 1986)。これまでにわれわれは温熱療法の抗腫瘍効果について基礎および臨床研究を行っており(Oncology 62, 234-240, 2002, Cancer Sci 94, 834-83, 2003)、現在では大きな頸部リンパ節転移を有する口腔癌症例に対し超選択的動注化学療法と温熱療法を併用し、著効を得ている(第54回日本口腔外科学会学術大会シンポジウムにて発表)。

(2) 新たな温熱療法の開発と発展のために、新規磁性体を300万個の化合物のデータベースよりコンピュータ解析によって探索した。その結果数個の新規磁性体の候補化合物を見出し、正確な磁性測定機である超伝導磁束量子干渉計(SQUID)と電子スピン共鳴(ESR)での磁性評価のほか、化合物が磁石にくっつくか否かを検討した。その結果、特に一つの化合物の磁性が強いことが明らかになった。さらに、磁性体が外部磁場からエネルギーを受けることにより磁性体が発熱するか否かを評価するヒステリシスループを調べた結果、この化合物は温熱効果を発揮する可能性を有することが判明した。今回新しく同定された新規磁性抗癌剤は、濃度依存的にDNAを断片化および細胞増殖抑制することで、抗腫瘍効果が得られることが判明している。また、磁性体であるため、永久磁石を用いた磁場印加により、局所への集積が可能であり、Drug Delivery System(DDS)が可能であることも確認されている。さらに、磁性体である本剤は高周波磁場印加により発熱することも明らかになり、組織内温熱療法としての効果も期待できる。

2. 研究の目的

本研究では、単剤で抗腫瘍効果を有するだけでなく磁場を用いることで腫瘍局所への集積および温熱療法の併用が可能となる新規磁性抗癌剤を応用し新しい口腔癌治療の開発を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 新規磁性抗癌剤の抗腫瘍効果の比較検討
腫瘍細胞は家兔に可移植性であり、ヒトの口腔癌のうち最も多い扁平上皮癌に類似した組織型を有するVX2細胞株を使用した。

1mg/ml Poly-L-Lysineで24時間コートした2枚の24穴プレートに、VX2細胞を1穴あたり 2×10^4 個播種し、37℃、5%CO₂条件下で24時間培養した。その後、1枚のプレートを新規磁性抗癌剤刺激群とし、1.9μM、3.8μM、7.5μM、15μM、30μMの新規磁性抗がん剤で刺激を加えた。また、もう1枚のプレートをCDDP刺激群とし、1.9μM、3.8μM、7.5μM、15μM、30μMのCDDPで刺激を加えた。コントロール群には培地交換のみ行った。再び37℃、5%CO₂条件下で24時間培養した後、培地を500μlのMTT溶液に交換し、さらに1時間培養した。その後、MTT溶液を捨て、500μlのlysolate bufferを加えて紫色の沈殿したホルマザンを溶解し、吸光度測定器を用いて570nmの吸光度(optical density = OD)を測定した。細胞生存率(viability rate = VR)は以下の式を用いて算出した。

$$VR = \{ (OD_t - OD_b) / (OD_c - OD_b) \} \times 100\%$$

(ここでOD_tは薬剤刺激を行った群のOD, OD_bはBlankのOD, OD_cはコントロール群のODを指す。)

(2) VX2癌を移植した舌腫瘍家兔に対する新規磁性抗癌剤を用いた動物実験

実験動物および腫瘍細胞

動物実験は横浜市立大学動物実験ガイドラインに従って行った。実験動物として、体重2.0~2.5kgの雄性日本白色家兔(n=9)を使用した。腫瘍細胞はMTTアッセイと同様にVX2細胞株を使用した。移植手技は、約4週間毎に家兔の大腿筋肉内に継代移植されていたVX2癌を摘出し、生理食塩液内で細断した後、20μmのフィルターを使用して濾過して細胞浮遊液を作成した。これを9羽の家兔舌筋肉内に0.2mlずつ注入移植し、実験は移植後10日で、腫瘍の長径が7~8mmに達したものを使用した。

薬剤投与方法

9羽の家兔を9群に分類した。すなわちコン

トロール群, CDDP 連日投与群, CDDP 隔日投与群, 新規磁性抗癌剤 10mg 投与群, 新規磁性抗癌剤 20mg 投与群, 新規磁性抗癌剤 50mg 投与群, 新規磁性抗癌剤 10mg 投与+磁石群, 新規磁性抗癌剤 20mg 投与+磁石群, 新規磁性抗癌剤 50mg 投与+磁石群である。薬剤投与は耳静脈より緩徐に行い, 磁石を使用した群では, 薬剤投与直後より舌腫瘍部に直径 20mm の円柱形のネオジウム永久磁石 (650mT) を固定し, 1 時間磁場を印加した。本実験系を 7 日間連日行った。

抗腫瘍効果の測定

抗腫瘍効果は腫瘍体積の測定と病理組織学的評価で判定した。腫瘍体積は全身麻酔下で腫瘍径を連日測定し, 以下の式を用いて算出した。

$$\text{腫瘍体積} = 0.5 \times (\text{長径} \times \text{短径}^2)$$

病理組織学的評価

実験終了後, 全身麻酔下に家兔を屠殺して舌を摘出し, 10%ホルマリン液にて固定した。標本はパラフィンに包埋し, 4 μ m の切片を作製して HE 染色を行って病理組織学的に検討した。

4. 研究成果

(1) 新規磁性抗癌剤の抗腫瘍効果の比較検討 MTT アッセイの結果を図に示す。(図 1) VX2 細胞の CDDP に対する IC₅₀ はおよそ 7.5 μ M であり, 新規磁性抗癌剤に対する IC₅₀ もおよそ 7.5 μ M であった。この結果より, 新規磁性抗癌剤は CDDP とほぼ同等以上の抗腫瘍効果を有することが判明した。

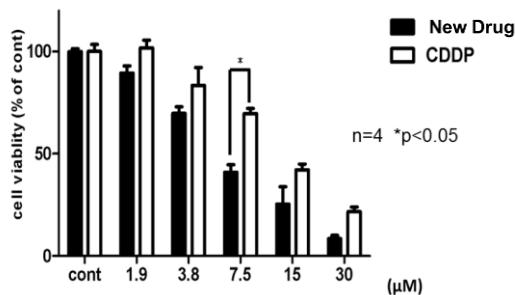


図 1 新規磁性抗癌剤の抗腫瘍効果

(2) VX2 癌を移植した舌腫瘍家兔に対する新規磁性抗癌剤を用いた動物実験

腫瘍体積変化

薬剤投与開始から実験終了までの腫瘍体積変化をグラフに示す。(図 2) 新規磁性抗癌剤 50mg 投与+磁石群および CDDP 投与群が最も著効を示した。一方, 新規磁性抗癌剤 20mg +磁石群と新規磁性抗癌剤 50mg では腫瘍体積はほぼ変化が見られなかった。残りの群で

は経時的に腫瘍は増大した。

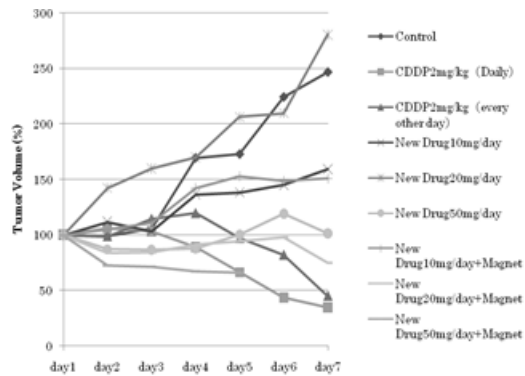


図 2 腫瘍体積変化

病理組織学的評価

HE 染色では, CDDP 投与群と新規磁性抗癌剤 50mg 投与群において全体的な腫瘍細胞の核の消失を認めた。また, 新規磁性抗癌剤 50mg 投与+磁石群, 新規磁性抗癌剤 20mg 投与+磁石群においては一部で腫瘍細胞の核の消失を認めた。しかし, 新規磁性抗癌剤 10mg 投与群, 新規磁性抗癌剤 20mg 投与群, 新規磁性抗癌剤 10mg 投与+磁石群では腫瘍細胞の核の消失はほとんど認められなかった。(図 3)

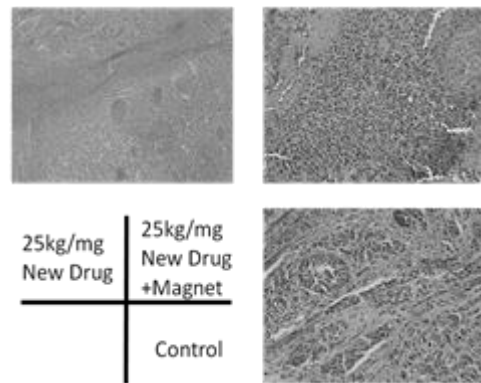


図 3 病理組織学的評価

(3) 今回の実験では, 新規磁性抗癌剤は CDDP とほぼ同等以上の抗腫瘍効果を有することが判明した。また, 家兔 VX2 癌を用いた動物実験において新規磁性抗癌剤の抗腫瘍効果が発揮されることが判明した。また, 新規磁性抗癌剤単独群と新規磁性抗癌剤+磁石群を比較すると, 磁石を併用した群の方がより抗腫瘍効果を発揮しており, 永久磁石による新規磁性抗癌剤の集積効果が認められた。新規磁性抗癌剤は, 単剤で抗腫瘍効果を有するだけでなく磁場を用いることで腫瘍局所への

集積および温熱療法の併用が可能となることから新しい口腔癌治療とな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2件)

1. Mitsudo K, Koizumi T, Iida M, Mitsunaga S, Tohnai I.: Thermochemoradiotherapy for Oral Cancer with N2, 3 Cervical Lymph Node Metastases using Retrograde Superselective Intra-Arterial Infusion. *Thermal Med.* 28(2): 23-28, 2012. (査読有)
2. Mitsudo K, Koizumi T, Iida M, Iwai T, Oguri S, Yamamoto N, Itoh Y, Kioi M, Hirota M, Tohnai I.: Thermochemoradiotherapy using superselective intra-arterial infusion via superficial temporal and occipital arteries for oral cancer with N3 cervical lymph node metastases. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 83(5): e639-e645, 2012. (査読有)

[学会発表] (計8件)

1. Mitsudo K, Koizumi T, Iwai T, Nakashima H, Oguri S, Kioi M, Hirota M, Tohnai I.: Organ preservation with daily concurrent chemoradiotherapy using retrograde superselective intra-arterial infusion for stage III, IV oral cancer: analysis of therapeutic results in 112 Cases. American Society of Clinical Oncology (ASCO) Annual Meeting, Chicago (USA), 2013, 6, 1.
2. Sato I, Mitsudo K, Iida M, Nakashima H, Eguchi H, Koizumi T, Kioi M, Ishikawa Y, Tohnai I.: Development of oral cancer treatment using a new magnetic anticancer drug. 11th International Congress of Hyperthermic Oncology, Hyatt Kyoto, (Kyoto), 2012, 8, 31.
3. Iida M, Mitsudo K, Koizumi T, Iwai T, Oguri S, Kioi M, Hirota M, Nakashima H, Tohnai I.: Clinical evaluation of thermochemoradiotherapy for advanced head and neck cancer. 11th International Congress of Hyperthermic Oncology, Hyatt Kyoto,

- (Kyoto), 2012, 8, 30.
4. Koizumi T, Mitsudo K, Iida M, Iwai T, Oguri S, Kioi M, Hirota M, Tohnai I.: Thermochemoradiotherapy using superselective intra-arterial infusion via superficial temporal and occipital arteries for advanced oral cancer with cervical lymph node metastases. 11th International Congress of Hyperthermic Oncology, Hyatt Kyoto, (Kyoto), 2012, 8, 30.
5. Nakashima H, Kioi M, Ookubo M, Sugiura K, Sato I, Iida M, Mitsudo K, Husain SR, Puri RK, Tohnai I.: Hyperthermia sensitizes resistant human oral cancer cells to IL-13 cytotoxin. 11th International Congress of Hyperthermic Oncology, Hyatt Kyoto, (Kyoto), 2012, 8, 30.
6. Mitsudo K, Koizumi T, Iida M, Iwai T, Oguri S, Yamamoto N, Kioi M, Hirota M, Tohnai I.: Thermochemoradiotherapy using superselective intra-arterial infusion via superficial temporal and occipital arteries for oral cancer with N3 cervical lymph node metastases. 11th International Congress of Hyperthermic Oncology, Hyatt Kyoto, (Kyoto), 2012, 8, 30.
7. Yamamoto N, Matsumoto K, Furue H, Hagiwara S, Nishikawa M, Hibi H, Shigetomi T, Mitsudo K, Tohnai I, Kobayashi T, Ueda M.: Hyperthermia using magnetic nanoparticle combined with intratumoral dendritic cells enhance antitumor effect. 11th International Congress of Hyperthermic Oncology, Hyatt Kyoto, (Kyoto), 2012, 8, 30.
8. Mitsudo K, Yamamoto N, Koizumi T, Iwai T, Nishiguchi H, Hirota M, Tohnai I.: Thermochemoradiotherapy using superselective intra-arterial infusion via a superficial temporal artery and an occipital artery for N3 cervical lymph node metastases of oral cancer. 3rd World Congress of International Academy of Oral Oncology, Singapore (Singapore), 2011, 7, 15.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

光藤健司 (MITSUDO KENJI)
横浜市立大学・医学部・准教授
研究者番号: 70303641

(2)研究分担者

藤内 祝 (TOHNAI IWAI)

横浜市立大学・医学研究科・教授

研究者番号：50172127

黒谷玲子 (KUROTANI REIKO)

横浜市立大学・医学研究科・特任助教

研究者番号：00453043

(平成23年度で分担者としての期間終了)