

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 22 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791998

研究課題名(和文) 口腔癌に対するBCGを用いた新規抗癌剤併用療法の開発

研究課題名(英文) Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guérin (BCG) enhances the antitumour activity of 5-fluorouracil in the mouse oral cancer model.

研究代表者

村上 純 (Murakami, Jun)

岡山大学・大学病院・助教

研究者番号：40362983

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)：今回われわれはマウス由来頬部扁平上皮癌sq-1979株を担癌させたC3H:HeNマウスを対象に、腫瘍摘出後の再発転移へのBCGの影響を検討した。播種腫瘍が一定の大きさに達した時点で摘出し、BCG菌株と5-FUの単独、併用投与を週1回、死亡するまで行い、生存率等、多角的に解析した。局所再発はBCG単独投与群では抑制できず、5-FU群もしくは5-FU/BCG併用投与群において抑制された。また、5-FU/BCG併用群において肺転移が抑制された。さらに、生存率の比較では、非投薬コントロール群と比較して、5-FU/BCG併用投与群は有意に生存率の向上を認め、延命に寄与する事が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Our aim was to investigate the adjuvant potential of BCG using mouse oral cancer model. Sq-1979 cheek cancer cells were injected subcutaneously into the flank in C3H/HeN mice. After certain growth, tumors were resected and mice were weekly treated with BCG and/or 5-FU. The mice were randomized to four groups: no-treatment control, 5-FU, 5-FU/BCG and BCG group. All groups showed no side effects for chemotherapy, and BCG has been found to have safety profiles. We evaluated the tumor recurrence and survival response in mice. 5-FU along with BCG treatment results in a reduction of recurrence and significantly improved survival. Furthermore, the lung metastasis rate is also lower than other groups. On the other hand, other groups did not show advantage in anti-tumor activity over no-treatment control. Accordingly, 5-FU along with BCG therapy may be a safe and useful adjuvant option for preventing recurrence and improving survival in oral cancer.

研究分野：病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード：口腔癌 抗がん剤 併用療法

1. 研究開始当初の背景

現在、癌は日本人の死因の一つとして大きな割合を占めており、その対策は現代医療の最大の課題である。抗癌剤治療は、癌患者に対して長期にわたる大きな負担となる副作用を伴う薬剤の投与を行う。時として、その強すぎる副作用を理由として、抗癌剤治療の継続を断念する場合もある。

そうした副作用を軽減すべく、効果的な様々な抗癌剤の併用投与が試みられてきた。多剤併用投与により、薬剤投与量を減らすことも可能となるため、効果的かつ副作用を伴わない併用治療薬の開発は緊急課題である。

従来より、表在性膀胱癌の治療において、BCG (Bacillus Calmette-Guerin) 生菌を用いた BCG 膀胱療法は臨床的有用性の確立した癌免疫療法である。しかし、その他の部位の固形癌には適用されず、有効性の検証にまで至っていない。しかしながら BCG 療法は、その副作用が少ない点、さらには他剤との併用可能な点などから、他臓器での癌治療においても、BCG 療法の利用の可能性が見込まれ、臨床上的利点は大きい。

そこで申請者は、口腔癌に対しても、BCG 療法を抗癌剤と併用利用することで、抗癌剤投与量の低減につながるのではないかと、また、副作用の軽減が期待できる新規抗癌剤併用療法を確立できるのではないかとこの着想に至った。

BCG 生菌の癌への応用については、膀胱癌での単剤での利用についての報告がその殆どを占める。特に、口腔癌への適用に関する報告は殆ど無く、さらに他の抗癌剤との併用効果については大変興味深い課題である。

2. 研究の目的

難治性で転移しやすい口腔癌に対する抗癌剤治療において、効果的な抗癌剤併用治療方策やプロトコールの開発は緊急課題である。BCG 生菌療法は、現在その副作用が少ない点などから、表在性膀胱癌に限られ利用されて

いる。他の臓器の癌、特に口腔癌においても、BCG 療法を改良し、適用することで効果が認められれば、臨床上的利点は大きい。

申請者は、口腔癌に対する BCG 生菌を効果的かつ安全な抗癌剤併用治療薬の可能性を検討することで、新規抗癌剤併用療法を確立したい。

3. 研究の方法

本申請研究課題では、口腔癌担癌モデルマウスを用いて、以下の点について明らかにする。

1. BCG 生菌による抗癌剤 5-FU 併用効果を検討する (平成 24 年度)。
2. シスプラチン (CDDP) 等、口腔癌で頻用される抗癌剤での併用効果を検討する (平成 25 年度)。
3. それぞれの効果の分子メカニズムを解明する (平成 26 年度)。

申請者は、申請時点において、口腔癌担癌モデルマウスを用いて、BCG 生菌と抗癌剤 5-FU の併用による抗腫瘍効果の増強を明らかにしており (未発表)、本申請研究課題においてはそれを発展させたい。

C3H:HeN マウスに対して、同マウス由来頬部扁平上皮癌 sq-1979 株を背部皮下もしくは尾静脈より播種、担癌させ、口腔癌担癌モデルマウスを作製。全体を実験通じて供する。口腔癌担癌マウスモデルを作製し、in vivo での BCG 生菌と抗癌剤併用による抗腫瘍効果を検討する。

検討対象としては、薬剤非投与群、BCG 単投与群、抗癌剤 (5-FU、CDDP) 単投与群、BCG・抗癌剤併用投与群の 4 群、各 7 匹に分け、比較する。薬剤投与は腹腔内、BCG 投与は皮下にて、週 1 回、計 9 回もしくは死亡するまで行う。

・BCG・5-FU 併用による、発癌初期段階における抗腫瘍増大効果についての検討

sq-1979 細胞背部担癌マウスを作製し(1×10⁷個/匹)、腫瘍細胞播種と同時に投薬開始する。これは初期腫瘍を模したマウスモデルにおける腫瘍増大抑制効果を検討するため、薬剤非投与群、BCG 単独投与群、5-FU 単独投与群、BCG・5-FU 併用投与群の4群(背部皮下に腫瘍播種)を対象とする。投薬は週1回、計9回行う。腫瘍径を caliper にて毎週計測し長径×短径×短径を体積として換算し、抗腫瘍増大効果を比較検討する。

・BCG・5-FU 併用による、遠隔転移阻害効果、ならびに延命効果についての検討

sq-1979 細胞をマウス尾静脈より播種し担癌させ(1×10⁶個/匹)、播種と同時に投薬開始する。これはマウスモデルにおける腫瘍遠隔転移阻害効果と延命効果を検討するため、薬剤非投与群、BCG 単独投与群、5-FU 単独投与群、BCG・5-FU 併用投与群の4群を対象とする。投薬は週1回、死亡するまで行う。各群の生存日数から、BCG・抗癌剤併用による延命効果を比較検討する。さらに死亡後の個体より各臓器を摘出し、腫瘍の転移の有無を検討比較する。

・BCG・5-FU 併用による、局所腫瘍再発阻害効果についての検討

また、腫瘍摘出後の再発ならびに遠隔転移への BCG の影響を検討すべく、sq-1979 細胞をマウス背部皮下に播種し担癌させ(1×10⁶個/匹)、播種腫瘍が一定の大きさに達した時点で摘出した(200 cm³)モデルマウスも作製し、腫瘍摘出後から投薬を行った。薬剤非投与群、BCG 単独投与群、5-FU 単独投与群、BCG・5-FU 併用投与群の4群を対象とする。投薬条件は上記同様で週1回、死亡するまで行い、腫瘍再発率、生存率、死亡個体臓器から遠隔転移率、免疫組織学的検討等、多角的に解析した。

・小動物用 PET イメージングによる遠隔転移阻害効果ならびに腫瘍集積阻害効果につい

での検討

尾静脈から腫瘍播種した担癌マウスを対象に、薬剤非投与群、BCG 単独投与群、5-FU 単独投与群、BCG・5-FU 併用投与群の4群に分類し、臓器転移モデルを作製する。その後、18F-FDG (フルオロデオキシグルコース) ブロープを投与し、PET 撮影 (Clairvivo PET : 島津製作所)、腫瘍の全身での転移状況を比較検討する。さらに背部皮下に腫瘍播種した担癌マウス4群についても PET 撮影し、投薬が及ぼす腫瘍への集積状況を検討する。

・抗癌剤 CDDP での感受性増強効果検討

5-FU と同様に口腔癌で頻用される白金製剤 CDDP についても同様に検討、BCG による増強効果の有無を明らかにする。

4. 研究成果

・BCG・抗癌剤併用による、発癌初期段階における抗腫瘍増大効果についての検討

初期段階の腫瘍を模して投薬の影響を検討すべく sq-1979 腫瘍細胞背部皮下播種と同時に担癌マウスに投薬を開始したマウスモデルを対象に腫瘍増大抑制効果を検討した。背部皮下の腫瘍増大(腫瘍径より算出)は投薬群と非投薬群で大差なく、5-FU/BCG 併用投与群において若干腫瘍増大抑制を認めるものの、有意ではなかった。

・BCG・抗癌剤併用による、遠隔転移阻害効果、ならびに延命効果についての検討

マウス尾静脈より播種担癌させ、播種と同時に投薬開始した腫瘍遠隔転移マウスモデルを対象に、死亡するまで投薬を行った。投薬による遠隔転移阻害効果と延命効果を検討した。各群の生存日数から、BCG・抗癌剤併用による延命効果を比較検討した。さらに死亡後の個体より各臓器を摘出し、腫瘍の転移の有無を検討比較した。

初年度には、背部腫瘍担癌マウスを用いて投薬の有無による延命効果を検討したが、明らかな結果を得ることが出来なかった。このこ

とは、腫瘍残存下では薬剤の効果が発揮されない可能性を示唆するものであったことから、次年度以降、より臨床に近い投薬手法として、腫瘍摘出術後の化学療法を模し、マウス背部皮下に腫瘍を移植し、一定の大きさに増大した後に摘出し、BCG 生菌ならびに 5-FU 併用投与を行い、局所再発抑制効果、延命効果などを検討した。

腫瘍摘出後のマウスに対して、背部皮下での局所腫瘍再発は BCG 単独投与群では抑制できず、5-FU 群もしくは 5-FU/BCG 併用投与群において抑制された。(再発率：非投与群 91%、5-FU 群 64%、5-FU/BCG 併用群 50%、BCG 群 92%) また、死亡したマウスにおける遠隔転移の有無を検討したところ、5-FU/BCG 併用群において肺転移が抑制された。(肺転移率：非投与群 78%、5-FU 群 86%、5-FU/BCG 併用群 40%、BCG 群 75%) さらに、それぞれの群における生存率の比較では、非投薬コントロール群と比較して、5-FU、BCG 単独投与群では生存率の向上は認められるものの、有意ではなかった。一方、5-FU/BCG 併用投与群は有意に生存率の向上を認め、延命に寄与する事が明らかとなった。

・小動物用 PET イメージングによる遠隔転移阻害効果ならびに腫瘍集積阻害効果についての検討

尾静脈から腫瘍播種した臓器転移モデル担癌マウスを対象に、薬剤非投与群、BCG 単独投与群、5-FU 単独投与群、BCG・5-FU 併用投与群の 4 群に分け、それぞれのマウスに 18F-FDG プローブを投与し、PET 撮影を行った。全ての群において肺での集積を認め、各群における遠隔臓器転移状況ならびに、18F-FDG 集積に違いを認めなかった。さらに背部皮下に腫瘍播種した後、摘出、背部皮下に局所再発をきたしたマウスにおいても 18-FDG PET 撮像した。投薬群 3 群における局所再発腫瘍への 18-FDG 集積は非投薬コントロール群よりも少ない結果を得た。(%ID/g

tissue:非投与群 5.28、5-FU 群 1.85、5-FU/BCG 併用群 3.28、BCG 群 2.07) 5-FU 単独、5-FU/BCG 併用投与群のみならず BCG 単独投与群においても 18-FDG 集積が少ない結果は興味深く、BCG 単独投与であっても腫瘍の悪性度の低下をきたす治療効果の可能性を示唆する結果と言えた。

〔結論〕今回の結果より、口腔癌治療においても、BCG 療法の利用の可能性が見込まれ、臨床上の利点は大きいと考えられた。

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)

第 52 回日本癌治療学会学術集会

2014 年 8 月 28~30 日 神奈川県、横浜

口腔癌細胞株担癌マウスに対する BCG 生菌と 5-FU 併用療法による延命効果の検討

村上 純、大原 直也、中山 真彰、辻極 秀次、長塚 仁、此内 浩信、柳 文修、苔口 進、久富 美紀、藤田 麻里子、畦坪 輝寿、浅海淳一

NPO 法人日本歯科放射線学会第 55 回学術大会

2014 年 6 月 6~8 日 東京

口腔癌細胞株担癌マウスに対する BCG 生菌と 5-FU 併用による転移抑制と延命効果の検討

村上 純、大原 直也、中山 真彰、辻極 秀次、長塚 仁、此内 浩信、柳 文修、苔口 進、久富 美紀、藤田 麻里子、畦坪 輝寿、浅海淳一

第 68 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会

2014 年 5 月 8~9 日 東京

口腔癌に対する BCG 生菌と 5-FU 併用療法による延命効果の検討

村上 純、此内浩信、柳 文修、久富 美紀、

畦坪 輝寿、藤田 麻里子、浅海 淳一

第 55 回歯科基礎医学会学術大会・総会

2013 年 9 月 20～22 日 岡山

口腔癌に対する BCG 生菌療法による抗腫瘍、
延命効果の検討

村上 純、大原 直也、中山 真彰、辻極 秀
次、長塚 仁、此内 浩信、柳 文修、浅海
淳一

第 22 回 硬組織再生生物学会学術大会・総 会

2013 年 8 月 22 日 神奈川、川崎

口腔癌細胞株に対する 5-FU・BCG 生菌併用療
法の検討

李海婷、村上 純、大原 直也、中山 真彰、
玉村 亮、辻極 秀次、長塚 仁、此内 浩
信、柳 文修、畝坪 輝寿、久富 美紀、浅
海 淳一

NPO 法人日本歯科放射線学会第 54 回学術 大会

2013 年 5 月 31～6 月 2 日 福岡、福岡

口腔癌に対する BCG 生菌療法による抗腫瘍、
延命効果の検討

村上 純、此内 浩信、柳 文修、久富 美
紀、松崎 秀信、畦坪 輝寿、藤田 麻里子、
原 麻里奈、竹信 俊彦、浅海 淳一

第 67 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会

2013 年 5 月 22～24 日 栃木県、宇都宮

口腔癌に対する BCG 生菌と 5-FU 併用療法に
よる抗腫瘍効果の検討

村上 純、此内 浩信、柳 文修、久富 美
紀、松崎 秀信、畦坪 輝寿、藤田 麻里子、
原 麻里奈、竹信 俊彦、浅海 淳一

NPO 法人日本歯科放射線学会第 53 回学術 大会

2012 年 6 月 1～3 日 岩手県、盛岡

口腔癌に対する BCG 生菌と 5-FU 併用療法に
よる抗腫瘍効果の検討

村上 純、此内 浩信、柳 文修、久富 美
紀、松崎 秀信、畦坪 輝寿、藤田 麻里子、
原 麻里奈、竹信 俊彦、浅海 淳一

〔図書〕(計 3 件)

Computed Tomography: New Research

Clinical application of cone-beam
computed tomography by general
practitioners. In:Computed Tomography:
New Research.

Murakami J, Hisatomi M, Wakasa T, Asaumi
J. Jae Hyun Park, ed.

Nova Science Publishers p101-110,2013

Encyclopedia of DNA Research (3 Volume Set)

hTERT in cancer chemotherapy: A novel
target of histone deacetylase inhibitors.
In: Encyclopedia of DNA Research (3 Volume
Set).

Murakami J, Asaumi J, Tsujigiwa H, Yamada
M, Koheguchi S, Nagatsuka H, Yamamoto T,
You-Jin Lee. Samuel J. Duncan and Patricia
H. Wiley, eds.

Nova Science Publishers p183-218,2012

Encyclopedia of Cancer Treatment (2 Volume Set)

Role of O6-methyl guanine-DNA methyl
transferase and the effect of O6-
benzylguanine in cancer chemotherapy.
In:Encyclopedia of Cancer Treatment (2
Volume Set).

Murakami J, Asaumi J, Tsujigiwa H, Yamada
M, Koheguchi S, Nagatsuka H, Yamamoto Y,
Lee YJ. Timothy B. Dunn and Jennifer E.
Holmes, eds.

Nova Science Publishers p183-218,2012

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村上 純 (MURAKAMI, Jun)

岡山大学病院 歯科放射線科・口腔診断科・
助教

研究者番号： 40362983

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：