

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25463116

研究課題名(和文)新規磁性抗癌剤を用いた口腔癌の遠隔転移に対する温熱免疫化学療法の開発

研究課題名(英文) Immunotherapy combined with hyperthermia for distant metastases of oral cancer using magnetic anticancer 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

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)：新規磁性抗癌剤を用いて口腔癌の局所の温熱療法を行うことによって免疫賦活による遠隔転移に対する温熱免疫化学療法の開発を行うことを目的とする。細胞実験にて新規磁性体を42.5度に加温しヒト由来扁平上皮癌細胞のHSP70/HSP90の発現を調べたところ、温熱後直後からHSP70/HSP90が上昇し、温熱による免疫活性を明らかになった。動物実験では、ヒト由来扁平上皮癌細胞株をヌードマウスの両側大腿部1か所ずつに移植後、片部位の腫瘍のみ新規磁性体を投与し交流磁場にて温熱療法を行ったところ温熱効果で免疫活性を示し抗腫瘍効果を発揮した。

研究成果の概要(英文)：This study is to evaluate the immunostimulation activity treated with immunotherapy combined with local hyperthermia using new magnetic anticancer drug. We examined the expression of heat shock protein 70 and heat shock protein 90 (HSP70/HSP90) treated with 42.5 degree hyperthermia using magnetic anticancer drug in cultured human oral cancer cells. Expression of HSP70/HSP90 has been increased after local hyperthermia, indicating that immunostimulation activity is provided by hyperthermia. Cultured human oral cancer cells are inoculated on both side of the leg in nude mice and magnetic anticancer drug was injected into the left tumor. The leg tumor is irradiated with a magnetic field, the tumor-specific local hyperthermia induces decrease of both tumors after treatment. These results suggest that local hyperthermia treatment induced immunostimulation activity.

研究分野：口腔外科学

キーワード：温熱免疫化学療法 口腔癌の遠隔転移 新規磁性抗癌剤

## 1. 研究開始当初の背景

口腔癌の頸部リンパ節転移、遠隔転移は予後を決める因子で、特に遠隔転移に対しては根治的療

法が困難となり姑息的な治療が主体となる。

この温熱療法は腫瘍を 42.5 以上に加温させることで抗腫瘍効果を得る方法であるが、この温熱療法自体に全身の免疫機能を活性化させる作用がある。

## 2. 研究の目的

本研究ではわれわれが開発した新規磁性抗癌剤を用いて口腔癌の局所の温熱療法を行うことによって原発のみならず免疫賦活による遠隔転移に対する温熱免疫化学療法の開発を行うことを目的とする。

## 3. 研究の方法

共振回路を利用した交流磁場発生装置を用いて、ヒト由来扁平上皮癌細胞株における温度感受性と heat shock protein (HSP) の発現を検討するため、ヒト由来扁平上皮癌細胞株を調整し、培養用インキュベーターで 42.5 に加温刺激を行った。刺激後、MTT assay 法で死細胞の定量と Western blotting で HSP の発現の評価を行った。同様に、交流磁場発生装置を用いて加温刺激した時の温度感受性についても検討した。次に、本磁性抗癌剤を腫瘍局所の選択的温熱療法のみならず免疫賦活によって遠隔転移を抑制する新たな温熱免疫化学療法の抗腫瘍効果を検討するため、ヒト由来扁平上皮癌細胞株を移植したマウスモデルを用いて研究を行った。マウスヒト由来扁平上皮癌モデルを作製するため、ヒト由来扁平上皮癌細胞 ( $5 \times 10^5$  cells/ml) をイソフルラン吸入下にてヌードマウスの両側大腿部に移植し腫瘍直径が 10mm になった時点で投与を開始した。腫瘍局所に濃度を変えた本磁性抗癌剤 (1mg/kg、5mg/kg、25mg/kg) を投与した。また、本磁性抗癌剤のマウスの 50% 生存値(LD50)は

約 190mg/kg であることは確認されている。ヌードマウスの腫瘍部が 42.5 に安定となるように交流磁場の電流、電圧を調整した。治療群を以下の 4 グループに分けた。コントロール (磁性抗癌剤投与なし) 磁性抗癌剤を左大腿に局所投与のみ 交流磁場にて磁場印加 (磁性抗癌剤投与なし) 磁性抗癌剤局所投与後、交流磁場にて磁場印加腫瘍が直径 10mm を超えた時点で実験を開始した。群と 群は腫瘍部を含め装置 (コイル 30mm) 内に入れ、磁場印加を 30 分間行い、加温した。同様の過程を週 2 回、3 週間行った。抗腫瘍効果の評価では、治療開始後から連日腫瘍を写真撮影にて記録するとともに腫瘍サイズから腫瘍体積を毎日計測した。また、投薬開始後 3 週間目に腫瘍組織を摘出し、病理学的解析を行った。

## 4. 研究成果

細胞実験にて新規磁性体を 42 度に加温しヒト由来扁平上皮癌細胞に発現する HSP70/HSP90 をウェスタンブロッティングで調べたところ、温熱後直後から HSP70/HSP90 が発現していることが判明し、温熱による免疫活性を明らかになった。動物実験では、ヒト由来扁平上皮癌細胞株をヌードマウスの両側大腿部 1 か所ずつに移植後、片部位の腫瘍のみ新規磁性体を投与し交流磁場にて温熱療法を行ったところ温熱効果で免疫活性を示し抗腫瘍効果を認めた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 15 件)

1. Kitajima H, Oshima M, Iwai T, Ohhara Y, Yajima Y, Mitsudo K, Tohnai I: Computational fluid dynamics study of intraarterial chemotherapy for oral cancer. BioMed Eng OnLine. 査読有 16:57, 2017, DOI 10.1186/s12938-017-0348-5

2. Minamiyama S, Mitsudo K, Hayashi Y, Iida M, Iwai T, Nakashima H, Oguri S, Ozawa T, Koizumi T, Hirota M, Kioi M, Tohnai I: Retrograde superselective intra-arterial chemotherapy and daily concurrent radiotherapy for squamous cell carcinoma of buccal mucosa Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol. 査読有 124, 2017, 16-23.
3. Okubo M, Kioi M, Nakashima H, Sugiura K, Mitsudo K, Aoki I, Taniguchi H, Tohnai I: M2-polarized macrophages contribute to neovasculogenesis, leading to relapse of oral cancer following radiation. Sci Rep. 査読有 6:27548, 2016. doi: 10.1038/srep27548.
4. Sato I, Umemura M, Mitsudo K, Fukumura H, Kim J-H, Hoshino Y, Nakashima H, Kioi M, Nakakaji R, Sato M, Fujita T, Yokoyama U, Okumura S, Eguchi H, Oshiro H, Tohnai I, Ishikawa Y.: Simultaneous hyperthermia-chemotherapy with controlled drug delivery using single-drug nanoparticles. Sci Rep. 査読有 22:6:24629, 2016. doi: 10.1038/srep24629.
5. Hayashi Y, Nakamura T, Mitsudo K, Yamaguchi H, Ono T, Azami Y, Takayama K, Suzuki M, Hatayama Y, Tsukiyama I, Hareyama M, Kikuchi Y, Fuwa N, Tohnai I: Retrograde intra-arterial chemotherapy and daily concurrent proton beam therapy for recurrent oral cavity squamous cell carcinoma: Analysis of therapeutic results in 46 cases. Head Neck. 査読有 2016 Mar 28. doi: 10.1002/hed.24421.
6. Hayashi Y, Nakamura T, Mitsudo K, Kimura K, Yamaguchi H, Ono T, Azami Y, Takayama K, Hirose K, Yabuuchi T, Suzuki M, Hatayama Y, Kikuchi Y, Wada H, Fuwa N, Hareyama M, Tohnai I: Re-irradiation using proton beam therapy combined with weekly intra-arterial chemotherapy for recurrent oral cancer. Asia Pac J Clin Oncol. 査読有 2016 May 25. doi: 10.1111/ajco.12502.
7. Shimizu M, Mitsudo K, Koike I, Taguri M, Iwai T, Koizumi T, Oguri S, Kioi M, Hirota M, Inoue T, Tohnai I: Prognostic value of 2-[18 F]fluoro-2-deoxy-D-glucose positron emission tomography for patients with oral squamous cell carcinoma treated with retrograde superselective intraarterial chemotherapy and daily concurrent radiotherapy. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol. 査読有 121(3), 2016, 239-247.
8. Takayama K, Nakamura T, Takada A, Makita C, Azami Y, Toyomasu Y, Kato T, Kikuchi Y, Daimon T, Mitsudo K, Tohnai I, Fuwa N. Treatment results of alternating chemoradiotherapy followed by proton beam therapy boost combined with intra-arterial infusion chemotherapy for stage III-IVB tongue cancer. J Cancer Res Clin Oncol. 査読有 142(3), 2016, 659-667.
9. 光藤健司、小泉敏之、飯田昌樹、岩井俊憲、中島英行、小栗千里、廣田 誠、來生 知、藤内 祝：進行口腔癌に対する逆行性超選択的動注化学放射線療法 - 頸部リンパ節転移に対する治療効果 - : 口腔腫瘍 査読有 28(2), 2016, 27-32.
10. 光藤健司：進行口腔癌に対する逆行性超選択的動注化学放射線療法：口腔腫瘍 査読有 28(3), 2016, 122-127.
11. Mitsudo K, Koizumi T, Iida M, Iwai T, Nakashima H, Oguri S, Kioi M, Hirota M, Koike I, Hata M, Tohnai I: Retrograde superselective intra-arterial chemotherapy and daily concurrent radiotherapy for stage III and IV oral cancer: Analysis of therapeutic results in 112 cases. Radiother

- Oncol. 査読有 111, 2014, 306-310.
12. Iida M, Takayama E, Naganawa K, Mitsudo K, Adachi M, Baba J, Fujimoto-Muto M, Motohashi M, Mizuno-Kamiya M, Kawaki H, Kioi M, Ichinose M, Sumitomo S, Muramatsu Y, Shikimori M, Tohnai I, Kondoh N.: Increase of Peripheral Blood CD57+ T-Cells in Patients with Oral Squamous Cell Carcinoma. Anticancer Res. 査読有 34(10), 2014, 5729-5734.
  13. Mukai Y, Hata M, Mitsudo K, Koike I, Koizumi T, Oguri S, Kioi M, Omura M, Tohnai I, Inoue T. Radiation therapy with concurrent retrograde superselective intra-arterial chemotherapy for gingival carcinoma. Strahlenther Onkol. 査読有 190(2), 2014, 181-185.
  14. Sato I, Umemura M, Mitsudo K, Kioi M, Nakashima H, Iwai T, Feng X, Oda K, Miyajima A, Makino A, Iwai M, Fujita T, Yokoyama U, Okumura S, Sato M, Eguchi H, Tohnai I, Ishikawa Y. Hyperthermia generated with ferucarbotran (Resovist®) in an alternating magnetic field enhances cisplatin-induced apoptosis of cultured human oral cancer cells. 査読有 J Physiol Sci. 64(3), 2014, 177-183.
  15. 光藤健司 : Current Organ Topics: Head and Neck Cancer 頭頸部癌、進行口腔癌に対する逆行性超選択的動注化学放射線療法 : 癌と化学療法 査読有 41(7), 2014, 833-836.

〔学会発表〕(計5件)

1. Mitsudo K, Koizumi T, Hayashi Y, Iida M, Iwai T, Nakashima H, Oguri S, Kioi M, Hirota M, Tohnai I: Retrograde superselective intra-arterial chemotherapy and daily concurrent radiotherapy for stage III and IV oral cancer: Analysis of therapeutic

results in 112 cases. Society Symposia 10. 6th World Oral Cancer Congress of the International Academy of Oral Oncology (IAOO), India, 2017, 5.

2. Mitsudo K, Oguri S, Minamiyama S, Iida M, Iwai T, Nakashima H, Koizumi T, Kioi M, Hirota M, Tohnai I: Organ preservation with daily concurrent chemoradiotherapy using retrograde superselective intra-arterial infusion for locally advanced tongue cancer: analysis of therapeutic results in 101 cases. 2016 American Society of Clinical Oncology (ASCO) Annual Meeting, Chicago, 2016, 6.
3. Mitsudo K, Tohnai I: Retrograde superselective intra-arterial chemotherapy and daily concurrent radiotherapy for advanced oral cancer. Symposium "Oral Cancer" 4th Congress of Asian Society of Head and Neck Oncology (ASHNO), Kobe, 2015, 6
4. Mitsudo K, Tohnai I: Regional Session: Asia: Chemoradiotherapy: Intra-arterial Infusion for Oral Cancer. 22nd International Oral and Maxillofacial Surgery (ICOMS), Melbourne, Australia, 2015, 10.
5. Mitsudo K, Nishiguchi H, Yamamoto N, Tohnai I Thermochemoradiotherapy using superselective intra-arterial infusion for N3 cervical lymph node metastases of tongue squamous cell cancer. 6th Asian Congress of Hyperthermic Oncology, Fukui, 2014, 9.

〔図書〕(計4件)

1. Mitsudo K, Tohnai I, Springer (Editor: Ohnishi T, Yoshikawa T, Kokura S.), Clinical Science in Cancer Patients Chapter 16 Combination Therapy with Hyperthermia and Chemoradiotherapy: Oral Cancer: Hyperthermic Oncology from Bench to Bed. 2016, p177-192.

2. 光藤健司, 篠原出版, 『癌の臨床』特集 癌の臨床 3 「頭頸部・口腔がん治療の未来を展望する」 進行口腔癌の臓器温存を目指した集学的アプローチ：超選択的動注化学放射線療法を中心に．2016, p109-119.
3. 光藤健司、藤内 祝, クインテッセンス出版：口腔外科ハンドマニュアル'16 . 「Chapter 2 口腔外科手術の基本を知る」 進行口腔がんの超選択的動注化学放射線療法．日本口腔外科学会編，2016, p134-141.
4. Tohnai I, Mitsudo K, Springer Japan (Editor: Kirita T., Omura K.), Chemotherapy Oral Cancer: Diagnosis and Therapy. 2015, p319-333.

〔産業財産権〕(なし)

〔その他〕

ホ　　－　　ム　　ペ　　－　　ジ

<http://www.ycu-oms.jp/hyperthermia.html>

## 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

小栗千里 (OGURI, Senri)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：30400394

藤内 祝 (TOHNAI, Iwai)

横浜市立大学・医学研究科・教授

研究者番号：50172127