

平成 21 年 6 月 28 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18590875
 研究課題名（和文） 肺癌患者における癌細胞殺傷蛋白グラニューライシンと癌免疫療法
 研究課題名（英文） Analysis of cytotoxic effect of human Granulysin by using novel PK/PD model.
 研究代表者 久保 昭仁

研究成果の概要：

無差別的な細胞傷害性を示さない分子標的薬剤を用いて癌性胸膜炎で胸に細胞浸出液が貯留した肺癌患者を行い、その際に廃棄される胸水を用いることで細胞障害性キラーT細胞が分泌する細胞障害因子グラニューライシン(Gra)を測定し治療反応性との相関を検討した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,500,000	0	1,500,000
2007年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	600,000	4,100,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器病学

キーワード：肺癌、免疫療法

1. 研究開始当初の背景

(1) 肺癌は本邦で死亡原因第一位である悪性腫瘍の中でも死因の最多であり、近年の化学療法、分子標的治療の進歩にもかかわらず難治性疾患の代表である。したがって新たなコンセプトに根ざした新しい治療法の開発が急務である。また、ヒト肺癌発症のメカニズムや免疫監視機構については不明な部分が多く、ヒトの生体内（肺癌患者）における抗腫瘍免疫調節機構も未解明である。

(2) 本研究代表者の久保は、これまでに肺癌化学療法の代表的な標的遺伝子トポソメラーゼ (Top) II 遺伝子変異による抗腫瘍剤耐性メカニズ

ムを証明し(Cancer Res, 1996)、細胞周期を制御する癌抑制遺伝子RBとRB関連遺伝子の肺癌、悪性中皮腫の癌化における異常の解明(Oncogene, 2000)、また、肺粘表皮癌の原因遺伝子のクローニングに成功し、この異常によって発生と分化に重要なNotchシグナル伝達系の機能が破壊されることを示し(Nature Genetics, 2003)、細胞周期エンジンCDK4を特異的に阻害する分子標的薬を初めて同定し、分子標的薬の開発に重要な実験を行うなど(Clin Cancer Res, 1999; JNCI, 2001)、悪性腫瘍の分子メカニズムに関する種々の研究を行ってきた。

(3) 本研究代表者の久保は、癌性体腔液（癌性胸膜炎）を利用した薬物動態・薬力学的解析法の検討を行っており、Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Assessment by Serial Sampling of malignant effusions (PHASSION 法)と命名し、癌性胸膜炎合併肺癌に対するEGFR チロシンキナーゼ阻害剤 (ETKI) による治療をモデルとして治療感受性予測因子と効果判定法の確立を行ってきた。

(4) Gefitinib や、Trastuzumab の成功に代表されるように、近年の分子標的薬による新しい癌治療が試みられているが、未だ肺癌の根治には程遠い状態であり、さらなるブレークスルーが必須である。Total cell kill といわれるように従来の抗癌剤は宿主の免疫能を廃絶させるものであり、免疫療法とは相容れるものではなかった。しかしながら患者の免疫機能の温存が可能な分子標的薬の開発に伴い、癌の免疫療法は今後いっそう重要となる。肺癌に対する免疫監視機構、癌免疫監視機構において重要なキラーT細胞の分化及び抗腫瘍免疫機構の解明が急務である。

(5) 細胞障害性キラーT細胞が分泌する細胞障害因子granulysin (Gra)が強力な殺腫瘍細胞作用を有することが報告された。Graは結核菌殺傷にも重要な役割を果たすことが明らかになりつつある。また、Graは担癌患者の血中レベルが低下することが報告されており、癌免疫において重要な役割を果たしている可能性があるが、詳細はほとんどわかっていない。

2. 研究の目的

細胞障害性キラーT細胞が分泌する細胞障害因子グラニューライシン(Gra)の分子標的治療における役割を検討し、ヒト生体内におけるGraの癌細胞に対する殺細胞効果を評価する。

3. 研究の方法

(1)対象

癌性胸膜炎を合併した非小細胞肺癌患者である。適格条件は以下のとおりである。

- ① 組織診または細胞診による非小細胞肺癌の診断。
- ② 胸腔ドレナージが必要な癌性胸膜炎の症例で胸水中に癌細胞が証明されていること。
- ③ 測定可能病変または評価可能病変を有する症例。
- ④ 登録時年齢が20歳以上。
- ⑤ PS 0-3。
- ⑥ 主要臓器機能が保たれている症例。
- ⑦ 書面によるインフォームドコンセント。

ただし、間質性肺炎や高度の肺疾患合併例、コントロール不能の重篤な合併症を有する症例、その他担当医により本試験の対象として不適当と判断される症例は除外することとした。

(2) プロトコール治療および検体採取
胸腔ドレナージ開始後に、ETKI投与を開始する。ETKI開始前を0時間とし投与開始後3、24、72時間後まで経時的に血液及び癌性胸水を採取した。

① 血液検体

採取した血液は血清、血漿用に分け、室温、1750RCFで遠心分離後-80℃で保存した。

② 胸水および胸水中の癌細胞

室温、780RCFで遠心分離し胸水は分離後-80℃で保存。初回の遠心分離で得られた沈渣を再度胸水に懸濁後、フィコール遠心分離法で癌細胞を濃縮した。得られた癌細胞塊はホルマリン固定後、パラフィン包埋を行ない以降の解析に用いた。

(3) 癌細胞のEGFR遺伝子変異解析

パラフィン包埋したセルブロックより薄切切片を作成後、PNA-LNA PCR Clamp法(三菱化学メディエンス株式会社)でEGFR遺伝子変異解析を行なった。

(4) ETKI(Gefitinib)の薬物動態

ETKI血中濃度の測定は高速液体クロマトグラフィー/質量分析法(HPLC/MS/MS)(株式会社新日本科学)で測定を行なった。胸水中ETKI濃度はこれまで測定報告がないが、HPLC/MS/MSにより血漿中濃度測定法を胸水へ準用して行った。

(5) 血清、胸水中Gra濃度測定

血清、胸水中Gra濃度測定にはサンドイッチELISAを用いた。方法を以下に示す。

①PBSバッファーに懸濁した抗Gra抗体mAb RB1 (MBL)を0.2ug/wellになるように96穴プレートに加え4℃で一晩静置し固相化を行った。

②0.1% Tween20含有PBS(PBST)で洗浄後 Assay Diluent (BD Bioscience)をブロッキングバッファーとして200ul/well加え室温で1時間静置しブロッキングを行った。

③PBSTで洗浄後、Assay Diluentで希釈したスタンダード(0, 0.16, 0.31, 0.63, 1.25, 2.50, 5.00, 10.00 ng/ml)と同様に Assay Diluentで希釈した血清(4倍希釈)、胸水(5倍希釈)をプレートへ加え室温で2時間静置し一次抗体への吸着を行った。

④PBSTで洗浄後、Assay Diluentに懸濁したビオチン標識抗Gra抗体mAb RC8 (MBL)を10ng/wellになるように加え室温で1時間静置した。

⑤PBSTで洗浄後、PBSTに懸濁したHRP-conjugated streptavidin (MBL)を0.2ug/wellになるように加え室温で1時間静

置した。

⑥ PBST で洗浄後、100ul/well の TMB Solution (Wako) を加え室温で 30 分間静置し発色反応を行った。

⑦ 2M H₂SO₄ 100ul/well を加え発色反応を停止させた後、波長 450nm で吸光度を測定、濃度を算出した。

4. 研究成果

(1) 患者背景

本研究でモデルとした gefitinib の薬力学・薬物動態学研究における参加患者背景を表 1 に示す。男性 8 例、女性 12 例、20 例全例が腺癌であった。全身状態は PS0-1 が 14 例、2-3 が 6 例と比較的全身状態の良好な症例が多かった。参加患者の全生存期間(中央値: 42.7 週)を図 1 に、無増悪生存期間(中央値: 21.4 週)を図 2 に、癌性胸膜炎増悪による胸水再貯留までの期間(中央値: 24.6 週)を図 3 にそれぞれ示す。化学療法歴のない症例が 10 例あり、大量の癌性胸水のために従来の化学療法の適応となりにくい病状を反映しているものと考えられた。

表 1 患者背景

No. of patients		20
Gender (M/F)		8/12
Age (range), yrs		67.5 (42-85)
Performance status		
	0	2
	1	12
	2	3
	3	3
Histology	adeno.	20
Smoking	never	9
	former	9
	current	2
No. of prior chemo		
	0	10
	1	4
	≥ 2	6
EGFR gene status		
mutation + (n=10)	exon18 G719A/S	2
	exon19 deletion	2
	exon21 L858R	5
	exon21 L861Q	1
amplification +		13

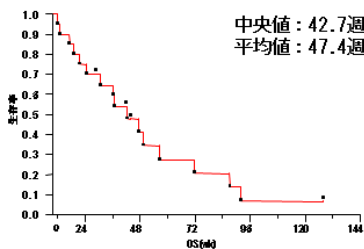


図1 全生存期間

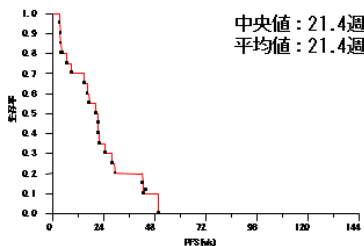


図2 無増悪生存期間

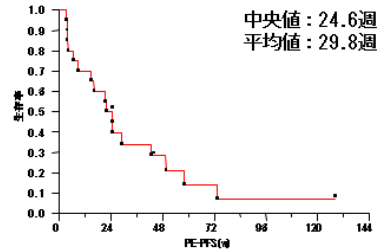


図3 胸水再貯留までの期

(2) Gefitinib の薬物動態学的検討
 gefitinib250mg の経口投与後 24 時間までの血中薬物動態を図 4 に、1 日 1 回経口投与開始 72 時間までの胸水中薬物動態の結果を図 5 に示す。gefitinib250mg 単回経口投与での最大血中濃度 (C_{max}, geometric mean) は 238ng/ml、最大血中濃度到達時間 (T_{max}, arithmetic mean) は 4.9 時間 (中央値 3.0 時間)、24 時間までの血中濃度曲線下面積 (AUC₀₋₂₄, geometric mean) は 3697ng·h/ml であった。gefitinib250mg 単回経口投与での胸水中 C_{max} は 60ng/ml、T_{max} は 18.9 時間 (中央値 24 時間)、AUC₀₋₂₄ は 3697ng·h/ml であった。血中 gefitinib 薬物動態はこれまでの日本人第 I 相試験の報告とほぼ同様であった。また、gefitinib の胸水への移行はピークが血中のそれよりも約 14 時間遅れ、初回投与 24 時間で血中 gefitinib の約 27% が胸水中へ移行していることが明らかになった。これまで報告のなかった gefitinib の胸水中薬物動態に関して検討を行った。gefitinib の胸水 T_{max} は血中のそれよりも約 14 時間遅れ、投与開始 24 時間での AUC は血中の約 27% であった。しかし gefitinib 反復投与 72 時間での胸水濃度は、gefitinib 反復投与 72 時間での血中濃度の報告とほぼ同等であり gefitinib の胸水中への蓄積が示唆され、癌性胸膜炎症例における gefitinib の臨床効果と関連するものと考えられた。

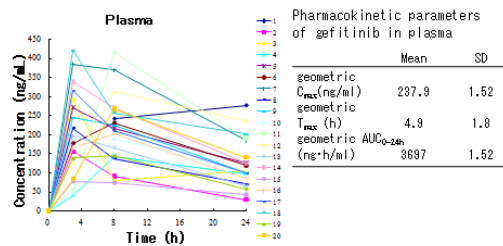


図4 血漿中 gefitinib 薬物動態

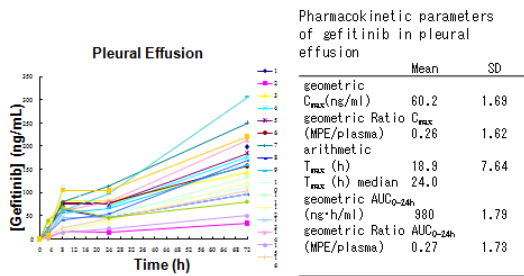


図5 胸水中gefitinib 薬物動態

(3)血清、胸水中Gra濃度とETKIの臨床効果
 血清、胸水中Gra濃度を表2に示す。
 これらの濃度とETKIの治療反応性
 (Response Rate, RR)に関し相関を検討した。
 胸水中のGra濃度がRRと負の相関を示す傾
 向が見られたものの血清、胸水ともにRRと
 の相関は認められなかった。
 血清に関してはこれまでも測定の結果が
 されており、臨床検査会社による受託測定も
 開始されている。一方、癌細胞が直に接する
 環境である胸水中の濃度を複数症例に関し
 て測定した報告は本研究が初めてである。
 現在、gefitinibに続き、新規のETKIであ
 るelrotinibに関しても同様の検体採取を
 行っており、症例数を増やすことにより、Gra
 の癌細胞に対する殺細胞効果の詳細なメカ
 ニズムが解明されると思われる。

表2 癌性胸膜炎合併肺癌患者のGra濃度

No. of patients	20
Serum	
Range	0.0135-192.169 ng/ml
Median concentration	0.68 ng/ml
Average concentration	30.111 ng/ml
Pleural Effusion	
Range	0.058-127.755 ng/ml
Median concentration	3.443 ng/ml
Average concentration	15.886 ng/ml

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 6 件)

- (1) Sasaki H, Kubo A, Fujii Y, et al. (計
 15 人 11 番目), EGFR R497K polymorphism
 is a favorable prognostic factor for
 advanced lung cancer, J Cancer Res
 Clin Oncol, 査読あり, 135, 2009,
 313-8.
- (2) Ishii T, Kubo A, et al. (計 10 人 10
 番目), Full-Length Cytokeratin 8 Is
 Released and Circulates in Patients
 with Non-Small Cell Lung Cancer, Tumor
 Biology, 査読あり, 29, 2008, 57-62.
- (3) Sasaki H, Kubo A, Fujii Y, et al.

(計 14 人 9 番目), A novel EGFR
 mutation D1012H and polymorphism
 at exon 25 in Japanese lung cancer,
 J Cancer Res Clin Oncol, 査読あり,
 134, 2008, 13372-6.

- (4) Kanaji N, Kubo A, et al. (計 6 人 6 番
 目), Compensation of type I and type II
 cytokeatin pools in lung cancer, Lung
 Cancer, 査読あり, 55, 2007, 295-302.
- (5) Okabe T, Tkada M, Nakagawa K, (計 9 人
 6 番目), Differential constitutive
 activation of the epidermal growth
 factor receptor in non-small cell lung
 cancer cells bearing EGFR gene
 mutation and amplification, Cancer Res,
 査読あり, 67, 2007, 2043-56.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久保 昭仁 (Akihito Kubo)

独立行政法人国立病院機構 (近畿中央胸部疾
 患センター臨床研究センター)・治験管理研
 究室・治験管理研究室長・60416245

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

① 岡田 全司 (Masaji Okada)

独立行政法人国立病院機構 (近畿中央胸部疾
 患センター臨床研究センター)・臨床研究セン
 ター・臨床研究センター長・40160684

② 高田 實 (Minoru Takada)

独立行政法人国立病院機構 (近畿中央胸部疾
 患センター臨床研究センター)・臨床研究セン
 ター・肺がん研究部長・20373516

③ 河原 正明 (Masaaki Kawahara)

独立行政法人国立病院機構 (近畿中央胸部疾
 患センター)・統括診療部・統括診療部長・
 30344352