

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09311

研究課題名(和文) 胸膜中皮腫に対する胸腔内局所療法の開発と新規バイオマーカーの探索

研究課題名(英文) Development of new intrathoracic therapies and biomarkers for pleural mesothelioma

研究代表者

塩見 和 (Shiomi, Kazu)

北里大学・医学部・講師

研究者番号：50398682

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：マウス中皮腫胸腔内モデルを用い、小分子化合物の抗癌剤であるGemcitabineをゲルとともに胸腔内投与した際の徐放効果を正確に評価する実験系を確立した。ヒト中皮腫組織検体を材料としたショットガンプロテオミクス法を用いた中皮腫の新規バイオマーカーの探索に関しては、有用な分子の同定には至らなかった。現在、マウス中皮腫細胞株を皮下移植した用いたモデルを用いて、中皮腫にも効果が期待される免疫チェックポイント阻害剤投与前後で動く腫瘍浸潤リンパ球内のバイオマーカー候補分子の同定を試みている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胸腔内腫瘍に対して薬物を効果的に作用させる治療法の開発は、胸膜中皮腫の予後を改善するために重要である。我々は、マウス胸腔内に抗癌剤を投与した際に徐放効果を正確に評価するための実験系を確立した。今後、この実験系を用い、種々のゲルとともに抗癌剤を胸腔内に投与し、最も有効な胸腔内治療法を検討する。本治療法は、腹腔内腫瘍に対しても利用できるため、多くのがん種で役立つ可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Using mouse models of pleural mesothelioma, we have established an experimental system to evaluate sustained release effect of Gemcitabine, a small molecule anticancer drug, administered intrapleurally together with gel. Novel proteins that are candidates of biomarkers for mesothelioma were not identified by a shotgun proteomics approach using human mesothelioma tissue specimens. Therefore, using mouse model which is inoculated subcutaneously with mouse mesothelioma cell lines, we are trying to identify molecules which are differently expressed in tumor-infiltrating lymphocytes before and after administration of immune checkpoint inhibitors.

研究分野：呼吸器外科学

キーワード：胸膜中皮腫 胸腔内治療 バイオマーカー 免疫療法

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

高齢者に多い胸膜中皮腫に対する治療として、侵襲の大きな外科手術や全身化学療法が行われているが、予後は極めて不良である。その理由として、解剖学的理由のため手術での局所制御が難しいこと(肉眼的完全切除が限界である) 化学療法に極めて抵抗性の亜集団が存在することがあげられる。従って、胸膜中皮腫の予後を改善するためには、低侵襲かつ局所制御効果の高い新しい胸腔内治療法の開発、および難治性組織型の治療効果予測や治療ターゲットとなるバイオマーカーの開発が必要である。

### 2. 研究の目的

- (1) マウス中皮腫モデルを用いた低侵襲かつ局所制御効果の高い胸腔内治療法の開発
- (2) マウスおよびヒトの検体を用いた新規バイオマーカーの開発

### 3. 研究の方法

- (1) 小分子化合物の抗癌剤である Gemcitabine (GEM) をゲルとともにマウス中皮腫モデルの胸腔内に投与した際の徐放効果を正確に評価するために、HPLC(高速液体クロマトグラフィー)を用いた測定系を確立する。その後、GEM をアスパラギン酸塩化カルシウムゲル、ヒアルロン酸ゲル、ゼラチン、PLGA マイクロスフェアなどを用いて、GEM や抗体(抗 PD-1 抗体、抗 CTLA-4 抗体)を胸腔内投与し、生体適合性、徐放効果、および予後の面から有効な治療法を検討する。
- (2) 中皮腫にも効果が期待される免疫チェックポイント阻害剤(ICI)の効果予測マーカーの探索。マウス中皮腫皮下モデルを使用し、プロテオーム解析に必要な腫瘍浸潤リンパ球数を検討後、抗体投与群(抗 PD-1 抗体 + 抗 CTLA-4 抗体)、非投与群で、腫瘍浸潤リンパ球を採取、その後、プロテオーム解析を行い、ICI 投与で発現に差が認められるタンパク質を同定する。
- (3) 難治性亜集団(病理組織診断: 二相型、肉腫型)に対するショットガンプロテオミックス法を用いた新規バイオマーカーの探索。ヒトの中皮腫病理組織およびコントロールとして、胸水セルブロックを材料とし、ショットガンプロテオミックス法を用いた網羅的なプロテオーム解析を行う。上皮型、二相型、肉腫型、中皮細胞(セルブロック)で発現に差のある候補タンパク質を同定し、その中から、難治性の病理組織型である二相型、肉腫型のバイオマーカーとなりうるタンパク質を探索する。

### 4. 研究成果

- (1) GEM、GEM 代謝物(1'-Epi2',2'-Difluoro-2'-deoxyuridine) 内部標準物質(2'-Deoxyuridine)の分離、定量が可能となった。現在、徐放効果の基準となる血中 GEM 濃度曲線作成のための、GEM 投与量を検討中である。今後は、薬物担体として、ハイドロゲルをはじめとした半固形製剤(ヒアルロン酸ゲル、ゼラチン、水溶性多糖類など)、フィルム製剤、粒子状製剤を用い、GEM をマウス中皮腫胸腔内モデル(細胞株 AB12 を BALB/c の胸腔内に移植)に投与し、徐放効果および予後の観点から最も有効な胸腔内治療法を探索する。
- (2) マウス脾臓より CD8+T 細胞、CD4+T 細胞を採取しプロテオーム解析を行った結果、 $1 \times 10^5 \sim 10^6$  個のリンパ球があれば、2500 程度のタンパク質の同定が可能であることが分かった。また、マウス中皮腫細胞株(AB12)を BALB/c の皮下に移植したモデルでは、径 10 mm 前後の腫瘍塊が 10 匹分あれば、 $1 \times 10^5$  個の CD8+T 細胞、CD4+T 細胞が採取できることを確認した。次に、マウス中皮腫細胞株 AB12 を BALB/c の皮下に移植したモデルを用い、抗体投与群(抗 PD-1 抗体 + 抗 CTLA-4 抗体)、非投与群に分け、腫瘍浸潤リンパ球を採取し、初回のプロテオーム解析を行った。現在、Validation 及び Selection を目的として、再実験に加え、マウスの系統を代えたモデル(細胞株: MC38、マウス: C57BL/6J)で同様の実験を行っている。今後は、これらのプロテオーム解析の結果から ICI 投与で動く分子バイオマーカー候補を選択し、腫瘍組織での発現および血中での動態を確認する。
- (3) ショットガンプロテオミックス法を用いて中皮腫バイオマーカーの探索を行った。難治性の組織型(二相型、肉腫型)と上皮型および中皮細胞との比較で発現に差のあるタ

ンパク質として、FKBP10(FK506 Binding Protein 10)、HDLBP (High Density Lipoprotein Binding Protein)、MAP4 (Microtubule Associated Protein 4)、LIMA1(LIM Domain And Actin Binding 1)、を選択した。

FKBP10 に関しては、非特異的な染色が認められた。HDLBP に関しては、上皮様及び紡錘形の腫瘍細胞に強く、その他の正常細胞に弱い発現が認められた。しかし、中皮細胞でも中等度の発現が認められた。現在、MAP4 の免疫組織染色中である。現在の手法で、有用な候補タンパク質が同定できない場合は、コントロールを胸水セルブロックから中皮細胞と同様の免疫染色結果を示す Adenomatoid tumor に変更し、再度プロテオーム解析を行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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	江島 耕二  (Eshima Koji)  (30327324)	北里大学・医学部・准教授   (32607)	
研究分担者	小寺 義男  (Kodera Yoshio)  (60265733)	北里大学・理学部・教授   (32607)	

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