

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462199

研究課題名(和文) 中皮腫における胸腔内治療法の構築及び新規バイオマーカーの探索

研究課題名(英文) The search for effective intrapleural therapies and new biomarkers of 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) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：胸膜中皮腫を極めて難治性の疾患から治療によって予後改善が期待できる疾患にするために、有効な胸腔内局所療法の開発及び、新しい中皮腫バイオマーカーの探索を目的とした基礎実験を行った。胸腔内局所療法の実験に関しては、マウス中皮腫胸腔内及び皮下モデルを作製し、これを使用し、抗癌剤(Gemcitabine)と免疫制御抗体である抗PD-1抗体及び抗CTLA4抗体との併用療法による腫瘍根治モデルを作製した。また、新しいバイオマーカーの探索実験では、2種類のプロテオーム解析法を用い、20種類の候補タンパク質を同定した。現在、その有効性を検討中である。

研究成果の概要(英文)：We conducted basic experiments with the aim of developing effective intrapleural therapies and finding new biomarkers for mesothelioma. We made two mesothelioma mouse models with transplanted mouse cancer cell lines intrapleurally or subcutaneously. Then, using these models, we found an excellent combination therapy of an anti-cancer agent (Gemcitabine), an anti-PD-1 antibody and anti-CTLA4 antibody which eradicated the tumors. With regard to searching new biomarkers using two proteomic analysis methods, we found twenty candidate proteins. Now, we are testing their effectiveness.

研究分野：呼吸器外科

キーワード：中皮腫 胸腔内治療 バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

日本の歴史的なアスベスト曝露の状況を考えると、中皮腫による死亡者数は、今後 20 年近く増加し続けると考えられている。周知のごとく、現時点での中皮腫の予後は極めて不良で、生存期間中央値は 6~18 ヶ月である。

これまで、胸膜中皮腫に対する治療方針は、実質臓器の腫瘍に対する治療方針と同様であった。すなわち、早期の症例では手術による肉眼的な完全切除 ± 補助療法として化学放射線療法を行い、進行例に対しては全身化学療法を行うというものであった。しかし、胸膜中皮腫は、外科的に完全切除が容易な肝臓、肺などの実質臓器に発生するのではなく、胸腔内という特殊な空間に発生し、大血管、食道、気管、椎体、反回神経などの切除不能な重要臓器の表面を覆う胸膜に沿って進展し増大していく。そのため、厳密には手術での完全切除は難しいと考えられている。実際に、Sugarbaker らによって、早期症例に対する最も有望な治療法として提唱された胸膜肺全摘術を含む集学的治療を施行した場合でさえも、術後経過観察中にほとんどの症例で局所再発を認めている。また、完全切除を迫るための胸膜肺全摘術自体が、高齢者には過大侵襲となり、術後の QOL が著しく損なわれる場合が多い。進行症例に対して行われる化学療法に関しても、近年、Pemetrexed や種々の分子標的治療薬が登場し、臨床試験が行われたが、Pemetrexed による生存期間の延長はわずか数か月であり、分子標的薬に関しては、今のところ臨床的に効果が証明されたものはない。

従って、現在の治療ストラテジーでは、予後の改善には限界があり、低侵襲かつ局所制御の向上を目指した新たな治療ストラテジーが必要である。

そこで我々は、(1)中皮腫の解剖学的特徴を考慮し、局所制御を高めるための有効な胸腔内局所療法の開発、(2)中皮腫の中でも特に難治性の病理組織型(肉腫型及び二相型)に対する腫瘍マーカーの開発という 2 つのテーマを掲げ、まずは基礎実験を行う方針とした。

2. 研究の目的

(1) 有効な胸腔内局所療法の開発。マウスの中皮腫モデルを作製し、これを用いて、種々の免疫療法と種々の抗癌剤を併用し、最も治療効果の高い局所療法を探索する。

(2) 中皮腫の中でも難治性かつ有用な腫瘍マーカーの存在しない肉腫型及び二相型の中皮腫に特異的な腫瘍マーカーの探索。数種のプロテオーム解析の手法を用い、新規バイオマーカーの候補タンパク質を探索し、その有用性臨床検体(組織、血液など)を用いて検討する。

3. 研究の方法

(1) 有効な胸腔内局所療法の開発。BALB/c 及び C57BL/6J の 2 系統のマウスの皮下及び胸腔内に、腹腔にアスベストを留置し作製したマウス中皮腫細胞株 (AB-1、AE-17。Australia Cell Bank 社より購入) を移植し、マウス中皮腫胸腔内及び皮下モデルを作製する。その後、上記モデルを用いて、抗癌剤(ゲムシタピン)、免疫制御抗体(抗 PD-1 抗体及び抗 CTLA4 抗体)の単独及び併用療法における抗腫瘍効果の確認と最も有効な投与方法を探索する。さらに、種々の抗癌剤と免疫療法の組み合わせを試し、最も有効な胸腔内治療法を探索する。

(2) 難治性中皮腫に特異的な腫瘍マーカーの探索。ランダム免疫法を用いた中皮腫に対する網羅的な単クローン性抗体の作製を行う。また、二次元電気泳動法を用いたヒト中皮腫細胞株同士の比較から、難治性中皮腫特異的なタンパク質を探索する。さらに、これらの新規バイオマーカー候補タンパク質の有用性について臨床検体(組織、血液など)を用いて検討する。

4. 研究成果

(1) 胸腔内局所療法の実験に関しては、まず、2 系統のマウスにおける中皮腫胸腔内及び皮下モデル(生後 6~8 週のメス BALB/c 及び C57BL/6J のマウスにおいて、マウス中皮腫細胞株(AB12 及び AE17)を移植、生着させたもの)を作製した。(図 1)

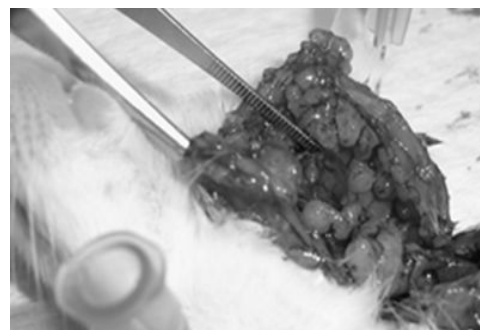


図 1 中皮腫胸腔内モデル (BALB/c)

その後、上記モデルの内、BALB/c 皮下モデルを用いて、免疫制御抗体療法（抗 PD-1 抗体及び抗 CTLA4 抗体）の治療実験を行った。結果、いずれも単独では、抗腫瘍効果は不十分であることが判明した。次に免疫療法との相乗効果が報告されている抗癌剤（Gemcitabine、ジェムシタピン）と免疫制御抗体である抗 PD-1 抗体及び抗 CTLA4 抗体との併用療法を行った。結果、Synergic effect によるマウス中皮腫腫瘍根治モデルを作製した。（図 2）

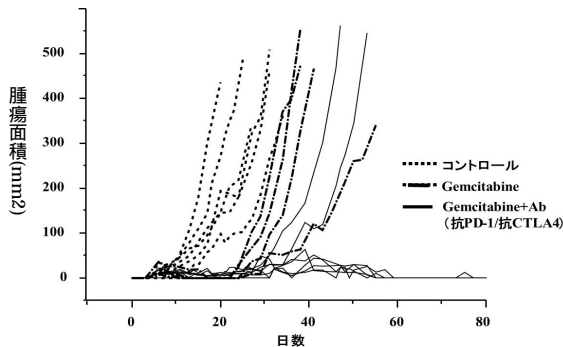


図 2 抗癌剤と免疫療法の相乗効果

現在、上記と同様の併用療法で、マウス中皮腫胸腔内モデルにおける腫瘍根治モデルを作製中である。今後はこれらのモデルを用いて、胸腔内治療を中心に、薬剤の組み合わせ（シスプラチン、ペメトレキセド、IL-2 などのサイトカイン、NKT 細胞療法など）最も有効な投与方法、投与スケジュールの検討を行う。また同時に、同モデルを用いて、免疫学的及び病理学的手法で、腫瘍の根治及び再発に関するメカニズムの解析を行う。

（2）難治性の病理組織型である二相型、肉腫型に対するバイオマーカーの探索実験では、2 種類の実験手法を用いた。まず、ヒト中皮腫細胞株を免疫源とするランダム免疫法を用いて、網羅的に中皮腫に対する単クローン性抗体を作製し、ハイブリドーマのヒト中皮腫細胞株と中皮腫組織を用いたスクリーニングを行った。最終的に 6 種類の抗体を選択し、ヒト肺癌組織を免疫染色し抗体の特異性を検討した。結果、もっとも有望と思われる抗体に関して、中皮腫に高発現するも、肺癌でも細胞質の豊富な腫瘍細胞に低から中等度発現することが判明した。ランダム免疫法を用いた中皮腫に対する網羅的な単クローン性抗体の作製実験では、我々が目的とした新しく有望な特異的なタンパク質の発見には至らなかった。

次に、二次元電気泳動法を用いた実験では、中皮腫の二相型細胞株（MSTO-211H）と上皮型細胞株（NCI-H226、MES04）で発現量の異なるタンパク質（40 種類）を選択し、質量分析法を用いて 20 個を同定した。（図 3）

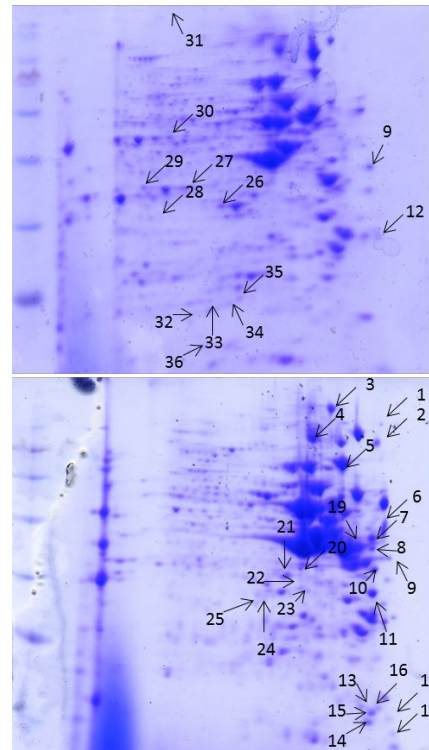


図 3 二次元電気泳動（上段：二相型中皮腫細胞株 MSTO-211H、下段：上皮型中皮腫細胞株 NCI-H226）

この中で、より悪性度が高く予後不良な二相型の中皮腫細胞株で発現の増加するタンパク質に注目すると、TGF-beta シグナルを調整し、乳癌の転移能を増大させるという報告や食道癌の予後不良因子としての報告がある Annexin A1 や腫瘍の発生、進展、維持に関与していると報告される Serine/arginine-rich splicing factor 3 や子宮頸癌の予後との関連が報告されている Peroxiredoxine-2 などが含まれていた。今後は、他のプロテオーム解析（並行して施行中のショットガンプロテオミクス法）の結果も照らし合わせ、候補タンパク質を絞り、ヒト中皮腫組織の免疫染色を行い、その有効性を検討する予定である。臨床検体の集積に関しては、北里大学病院、横須賀共済病院から、症例の集積を継続する予定である。

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 0件)

〔図書〕(計 0件)

〔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:

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

塩見 和 (SHIOMI, Kazu)

北里大学・医学部・講師

研究者番号: 50398682

(2) 研究分担者

佐藤 雄一 (SATO, Yuichi)

北里大学・医療衛生学部・教授

研究者番号: 30178793

玉内 秀一 (TAMAUCHI, Hidekazu)

愛媛県立医療技術大学・保健科学部・教授

研究者番号: 60188414

佐藤 之俊 (SATO, Yukitoshi)

北里大学・医学部・教授

研究者番号: 90321637

江島 耕二 (ESHIMA, Koji)

北里大学・医学部・准教授

研究者番号: 30327324

(3) 連携研究者

()

研究者番号: