

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 9 月 14 日現在

機関番号：32666  
研究種目：基盤研究(C) (一般)  
研究期間：2013～2015  
課題番号：25461173  
研究課題名(和文) 特発性間質性肺炎合併肺癌の化学療法関連急性増悪予測バイオマーカーの探索的研究  
  
研究課題名(英文) Research for biomarker of chemotherapy related-acute exacerbation of idiopathic interstitial pneumonias  
  
研究代表者  
峯岸 裕司 (Minegishi, Yuji)  
  
日本医科大学・医学部・講師  
  
研究者番号：80386234  
  
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的の第一は、特発性間質性肺炎(IIPs)合併進行肺癌患者における化学療法関連IIPs急性増悪の予測因子を探索すること、第二は、致死的な急性増悪と急性増悪以外の呼吸不全の鑑別に有用なマーカーを探索することにある。化学療法関連急性増悪が確認された5例中、びまん性肺胞傷害型肺障害が強く示唆された2例と全経過中に急性増悪を発症のない対照症例2例にプロテオーム解析を実施し、サンプル間のタンパク質発現を比較した。急性増悪例と非急性増悪例の比較では炎症性サイトカインやTGFファミリー、TNFファミリーに差が認められていた。急性増悪前後のサンプル比較では、炎症性サイトカインに変化認められた。

研究成果の概要(英文)：The aims of this proteomic analysis for lung cancer patients combined with IIPs are follows; the first is to discover biomarkers to predict the acute exacerbation (AE) of IIPs caused by chemotherapy, the second is to discover useful biomarkers for diagnosis of AE of IIPs. In clinical trials, AE of IIPs was occurred in five cases out of fifty case. The two cases were compared with two control cases who did not occur an AE during all clinical course. Proteomic analyses of serum samples were performed using antibody array. In AE cases, IL-12, -16, 22, -33, MMP-10, -11, -19, and TGF-beta1 were up-regulated at the onset of AE. And Angiopoietin-1, -2, c-Kit, IGF-BP3, PDGFB, TGF-beta2, TGF-beta-receptor3 were down-regulated. In comparison two AE cases with two control cases E-cadherin, FGF-acidic, GM-CSF, INF-beta, and IGF-II were relatively high. And beta2-microglobulin, Bone BMP-7, CD14, CRP, HER3, IL-6, MCP-2, MMP-10, NGF-beta, TNF-alfa, TGF-beta2 were relatively low.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：間質性肺炎 肺癌 急性増悪 化学療法 バイオマーカー プロテオーム解析

### 1. 研究開始当初の背景

特発性間質性肺炎 (IIPs) 特に最も高頻度とされる特発性肺線維症 (IPF) には、高頻度に肺癌が合併し、IPF は肺癌の独立した危険因子であることが明らかとなっている。このため、肺癌の実臨床においても間質性肺炎は避けては通れない合併症である。しかしながら、IIPs 合併肺癌治療に関して、ガイドラインはもちろん、症例や薬剤選択に関して指針となるようなエビデンスは確立されておらず、治療に関連した致命的な間質性肺炎急性増悪は臨床上重大な問題であり、治療を困難にしている。

IIPs 合併肺癌の治療戦略は、1. 安全性の高い治療方法の確立、2. 急性増悪の危険性に応じた適切な患者選択の二つが考えられる。しかしながら、特定の治療法の安全性を検証した前向き試験は乏しく、さらに間質性肺炎の急性増悪についても、肺癌の合併に関わらず、リスクを評価するのに有用な因子は特定されていない。

びまん性肺疾患に関する調査研究班の IIPs 合併肺癌の実態調査の結果、化学療法による急性増悪発症率は 13.1%、治療別ではプラチナ製剤とエトポシド療法およびカルボプラチンとパクリタキセル療法の安全性が高く、これらは我々の前向き試験の報告とも一致し、標準的治療として認識されつつある。我々は症例規模を約 80 例で化学療法の有効性と安全性を検証するとともに急性増悪予測・誘導因子の検討を目的に「特発性間質性肺炎合併肺癌に対する化学療法の認容性試験」(日本医科大学付属病院薬物治療倫理審査委員会承認) を 2009 年より開始している。目的は本病態における標準治療の確立を目指すとともに、臨床背景因子に加えて、付随研究として患者血清の網羅的タンパク質発現解析を実施、急性増悪の危険因子を同定し、臨床応用することを目的にしており、二つの重要な治療戦略を同時に確認することを目標にしている。

### 2. 研究の目的

本研究の目的の第一は、特発性間質性肺炎 (IIPs) 合併進行肺癌患者における化学療法関連 IIPs 急性増悪を予測する新たなバイオマーカーを探索することである。目的の第二は、IIPs 合併進行肺癌の治療中最も懸念される致命的な急性増悪と急性増悪以外の呼吸不全の鑑別に有用な新たなバイオマーカーを探索することにある。

将来的には、これらの新たなバイオマーカーの機能・機構を解明することにより、IIPs 急性増悪の発症機序を明らかにし、急性増悪の予防法および治療法の開発に結びつけることである。

### 3. 研究の方法

#### 1) IIPs 合併肺癌患者の血清サンプル

間質性肺炎合併進行非小細胞肺癌に対するカルボプラチン+パクリタキセル併用療

法の認容性試験ならびに間質性肺炎合併進行小細胞肺癌に対するカルボプラチン+エトポシド療法の認容性試験の参加者より血液サンプルの提供および研究について文書により同意を取得した。血液サンプルの提供時期は、化学療法開始前および急性増悪発症後から治療介入前の 1 もしくは 2 ポイントとした。餅入り茶分離スピッツに 7ml の血液を採取、遠心分離後、上清を分注し、-80 で冷凍保存した。

#### 2) IIPs 合併進行肺癌に対する化学療法の認容性試験 (日本医科大学付属病院薬物倫理審査委員会承認)

投与量および投与スケジュールは、非小細胞肺癌では、カルボプラチン AUC5 を第 1 日目、パクリタキセル 100mg/m<sup>2</sup> を第 1, 8, 15 日目にいずれも点滴投与、4 週間を 1 サイクルとし、合計 4 サイクルを目標とする。小細胞肺癌では、カルボプラチン AUC6 を第 1 日目、エトポシド 100mg/m<sup>2</sup> を第 1 日目より 3 日連続、いずれも点滴投与、4 週間を 1 サイクルとし、合計 4 サイクルを目標とする。

#### 3) 血清サンプルの網羅的蛋白発現解析

##### a) 症例およびサンプル

解析対象は、化学療法関連急性増悪を呈した 2 症例 (A, B) の治療開始前血清 (サンプル A, B) および同一症例の急性増悪発症後血清 (サンプル a, b) ならびに急性増悪未発症 2 症例 (C, D) の治療開始前血清 (サンプル C, D) とした。

##### b) 抗体アレイによるサイトカイン

###### プロファイル解析

Antibody Array Assay Kit (Full Moon BioSystems, Inc., Dalian, China) を用い、使用説明書に従い以下の操作を実施した。血清サンプルから抽出されたタンパク質は、ビオチン化され、ビオチン標識タンパク質は Cytokine Profiling Antibody Array (SCK300, Full Moon BioSystems, Inc.) スライド上に 80 μg/1 毎を添加し、Blocking Solution にて室温で 45 分間固定を実施した。スライドを洗浄後、シェイカー (35rpm、室温 2 時間) 上でビオチン標識タンパク質と抗体への反応を実施した。続いて Wash Solution にて 10 分、3 回洗浄した後、Cy3 ストレプトアビジンを用いて検出した。Axon GenePix スキャナーを用いてアレイのスキャンニングを実施、シグナル強度を判定した。

### 4. 研究成果

#### 1) 特発性間質性肺炎合併進行肺癌に対する化学療法の認容性試験

特発性間質性肺炎合併進行小細胞肺癌に対するカルボプラチン+エトポシド併用療法の認容性試験に関しては、現在も登録を継続中である。特発性間質性肺炎合併進行非小細胞肺癌に対するカルボプラチン+パクリタキセル併用療法の認容性試験は登録が完了した。登録された 35 例中 2 例が治療開始後、自己免疫疾患を発症したため解析から除

外され、残る 33 例で解析が実施された。

患者背景 (Table 1) は、男性 30 例 (91%)、平均年齢 68 歳 (55-78 歳)、特発性間質性肺炎の臨床病型は IPF 16 例 (48%)、ECOG PS 0 が 16 例 (48%)、PS 1 が 17 例 (52%)、肺癌組織型は、腺癌 13 例/扁平上皮癌 14 例/非小細胞肺癌 6 例、病期が、A 期 13 例/ B 期 7 例/ 期 10 例/術後再発 3 例であった。抗腫瘍効果 (Table 2) では、奏効率 69.7%、病勢制御率 93.9%、効果持続期間中央値 5.8 ヶ月、全生存期間中央値 11.3 ヶ月、1 年生存率 39.4%であった。一方、有害事象では、試験治療関連急性増悪が 4 例 (11.8%) に認められたが、死亡例は認めなかった。さらに全治療経過中の急性増悪は 5 例 (15.2%) であった。その他の有害事象の頻度は、間質性肺炎非合併非小細胞肺癌に対する同治療のプロファイルと遜色ないか、血液毒性については低頻度である傾向が認められた。

## 2) 抗体アレイによるサイトカインプロファイル解析

解析対象の 4 症例の臨床背景は Table 1 に示す。全例が男性、喫煙者、ECOG performance status 0-1、HRCT による IIPs の臨床病型は特発性肺線維症 (IPF) である。化学療法は、2 例がカルボプラチン+パクリタキセル療法、2 例がカルボプラチン+エトポシド療法であった。2 例 (症例 A、B) が試験化学療法により急性増悪を発症、2 例 (症例 C、D) は全治療経過を通して急性増悪を含む肺障害を認めなかった症例から急性増悪症例と性別、年齢、IIPs 病型、喫煙歴を調節し選択された。

Table 1. 解析対象患者の背景

	Patient A	Patient B	Patient C	Patient D
Gender	male	male	male	male
Age, years	67	75	65	70
Performance status	0	0	0	1
Initial chemotherapy	carboplatin+paclitaxel	carboplatin+etoposide	carboplatin+etoposide	carboplatin+paclitaxel
HRCT pattern of IIPs	IPF	IPF	IPF	IPF
chemotherapy-related acute exacerbation	+	+	-	-
	case	case	control	control
Pre-treatment laboratory data				
PaO <sub>2</sub> , Torr		74.4	78.1	68.9
%VC, %		81.7	111	84.7
%DLCO, %		47.3	70	43
KL-6,	485	767	400	846

Table 2. サイトカイン関連抗体アレイの解析結果

Protein List	Fold change between samples		
	sample a/A	sample b/B	samples (A,B) /samples (C,D)
Angiopoietin-1	0.94	0.70	1.01
Angiopoietin-2	0.85	0.67	1.05
Beta-2-Microglobulin	0.91	1.30	0.54
BMP-2	1.06	0.88	1.26
BMP-4	1.00	0.84	0.76
BMP-7/OP-1	0.95	1.00	0.45
Cadherin-pan	0.90	1.07	1.92
Catenin-alpha1	1.42	0.85	1.48
Catenin-beta 1	0.95	1.16	1.12

Catenin-gamma	0.86	0.78	1.47
CD14	1.07	0.94	0.54
CD40	1.07	0.72	1.02
CD44	0.88	0.97	0.86
C-Kit	0.67	0.80	0.82
C-reactive Protein	15.52	6.02	0.25
E-cadherin	0.85	1.20	1.70
EGF	1.01	0.99	0.78
EGFR	1.03	0.95	1.13
EGR1	0.93	0.96	0.73
Ferritin	1.40	0.98	1.14
FGF-4	1.07	0.99	1.04
FGF-5	0.99	0.86	0.92
FGF-10	0.87	0.96	1.06
FGF-16	1.00	0.93	0.94
FGF-17	1.05	1.00	1.01
FGF-acidic	1.31	0.92	1.72
FGF-basic	1.05	0.99	0.73
FGFR1 Oncogene Partner	0.83	0.83	0.78
FGFR2	0.88	0.92	0.94
FGFR3	1.28	0.87	1.19
G-CSF	1.26	0.94	1.69
GM-CSF	1.14	1.09	1.69
IFN-beta	0.98	0.87	1.57
IFN-gamma	0.91	1.07	0.84
IFN-lambda2	0.99	0.80	1.21
IGF 1R	0.68	0.95	1.10
IGF-BP1	0.82	0.85	1.12
IGF-BP2	0.85	1.02	0.81
IGF-BP3	0.62	0.89	0.95
IGF-BP5	1.01	0.92	1.34
IGF-BP7	0.88	0.94	1.02
IGF-I	1.02	1.05	1.17
IGF-II	1.18	1.14	1.59
IL-1 alpha	1.09	0.90	1.30
IL-1 beta	0.88	0.95	0.83
IL-1RA	1.20	0.93	1.16
IL-2	1.13	0.81	0.88
IL-3	1.29	0.91	1.41
IL-4	1.04	0.92	1.01
IL-5	1.34	0.99	1.25
IL-6	1.10	1.00	0.65
IL-7	1.07	1.01	0.70
IL-8	1.00	0.83	0.88
IL-9	1.24	1.07	1.11
IL-10	0.93	0.87	0.99
IL-11	0.94	1.06	0.70
IL-12	2.62	1.06	0.83
IL-13	1.05	1.08	1.14
IL-15	1.00	0.94	0.78
IL-16	1.21	1.00	1.40
IL-17 (IL-17A)	1.11	1.01	1.05
IL-17B	1.13	1.01	1.00
IL-17D	1.12	1.01	0.92
IL-17E	1.17	1.03	1.06
IL-17F	1.18	1.00	1.06
IL-19	0.98	1.02	1.22
IL-20	1.07	0.91	1.07
IL-21	1.15	0.98	1.15
IL-22	1.32	1.02	1.47
IL-31	1.16	1.01	1.21

IL-33	1.30	1.09	1.31
MCP-1/MCAF	0.94	0.91	0.67
MCP-2	1.08	0.94	0.55
MCP-3	0.85	1.07	0.71
MCP-4	0.87	0.97	0.80
M-CSF	1.02	1.02	1.29
MMP-1	0.95	1.62	1.25
MMP-2	1.41	0.72	0.86
MMP-3	0.91	0.98	0.91
MMP-7	0.92	1.10	1.07
MMP-8	0.79	1.07	1.36
MMP-9	0.92	1.02	0.89
MMP-10	1.60	2.30	0.59
MMP-11	1.30	1.27	0.97
MMP-13	0.94	1.43	1.16
MMP-14	0.95	1.22	0.94
MMP-15	0.83	1.33	1.10
MMP-16	0.98	1.33	0.67
MMP-19	1.04	1.22	0.98
MMP-23	0.96	1.04	0.81
NGF beta	1.19	0.72	0.54
NGFR	1.07	0.98	0.79
PDGF-AA	1.04	1.03	1.28
PDGFB	0.92	0.64	0.95
PDGF-BB	0.97	0.99	1.13
PDGFR alpha	0.99	0.87	1.34
PDGFR beta	0.85	1.00	0.84
sIL-2R alpha	1.00	1.07	0.68
STAT1	0.88	1.14	1.11
STAT3	0.93	1.09	1.13
STAT5A	0.94	1.12	0.87
STAT5A/B	0.85	1.20	1.25
STAT6	1.04	0.92	0.84
sTNF-receptor	0.92	1.05	1.21
sTNF-receptor II	1.04	1.16	1.25
TNF-alpha	1.03	0.90	0.65
TNF-beta	1.13	1.30	1.19
TGF beta Receptor II	1.15	0.82	1.22
TGF beta Receptor III	0.79	0.54	0.82
TGF-alpha	1.24	0.92	1.36
TGF-beta1	1.62	1.09	0.64
TGF beta2	0.84	0.75	0.96
TGF beta3	0.91	0.91	0.97
VEGF	1.15	0.84	0.79
VEGFB	1.78	0.84	1.07

a) 急性増悪特異的バイオマーカーの探索

化学療法関連急性増悪を発症した2症例について、化学療法開始前 (Sample A, B) と急性増悪発症後かつステロイド治療開始前 (Sample a, b) の血清サイトカインプロファイルと比較検討した (Table 2)。急性増悪前後で最も顕著に変動したタンパク質は、CRPであったが、CRPは非特異的に上昇する炎症マーカーであり、急性増悪と他の炎症性疾患 (感染症など) との鑑別診断への有用性は乏しい。その他、共通して上昇傾向を示したサイトカイン関連タンパク質は、インターロイキン (IL) -12、16、22、33、MMP (matrix metalloproteinase) -10、11、19、TGF (tumor growth factor) 1であった。さらに共通し

て低下傾向を示したタンパク質は、Angiopoietin-1、2、c-Kit、IGF (insulin-like growth factor) -BP3、PDGF (Platelet-Derived Growth Factor) B、TGF 2、TGF-receptor3であった。しかしながら、相反する傾向を示すタンパク質も少なからず認められており、これらサイトカイン関連タンパク質の役割について更なる検討が必要と考えられる。

b) 急性増悪予測バイオマーカーの探索  
急性増悪を発症した2症例 (Sample A, B) と非急性増悪の2例 (Sample C, D) の化学療法開始前血清のサイトカインプロファイルと比較検討した (Table 4)。急性増悪症例で特に高値を示していたタンパク質は、E-cadherin、FGF (fibroblast growth factors) -acidic、G (granulocyte) -CSF (colony stimulating factor)、GM (granulocyte macrophage) -CSF、interferon- $\gamma$ 、IGF-1であった。さらに急性増悪症例で著明に低値を示していたタンパク質は、2-microglobulin、BMP (fibroblast growth factors) -7、CD14、CRP、HER3、IL-6、MCP (Monocyte Chemotactic Protein) -2、MMP-10、NGF (nerve growth factor) - $\beta$ 、TNF (Tumor Necrosis Factor) - $\alpha$ 、TGF- $\beta$  2であった。急性増悪2症例では、炎症性サイトカイン GM-CSFが高値を示す一方で、同じく炎症性サイトカインである IL-6、TNF- $\alpha$  は低値であった。抗炎症サイトカインである TGF- $\beta$  は、急性増悪2症例で低値を示していた。本研究期間内には、これらの因子から更に特定の因子を絞り込み、実際の機能解析を実施するには至らなかったが、研究の進捗に重要なデータが得られたと判断している。

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 1 件)

第56回日本肺癌学会学術集会・横浜  
渥美健一郎、峯岸 裕司、清家 正博、弦間 昭彦ほか  
特異性間質性肺炎合併進行非小細胞肺癌に対するカルボプラチン+パクリタキセル療法の認容性試験

〔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

峯岸 裕司 (MINEGISHI, Yuji)  
日本医科大学・医学部・講師  
研究者番号：80386234

##### (2) 研究分担者

清家 正博 (SEIKE, Masahiro)  
日本医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：30366687

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：