

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 26 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09174

研究課題名(和文)小細胞肺癌治療のパラダイムシフトを指向した治療研究

研究課題名(英文)New therapeutic strategy for small-cell lung cancer

研究代表者

磯部 威 (Isobe, Takeshi)

島根大学・医学部・教授

研究者番号：70284198

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト肺小細胞がんの細胞株であるNCI-N417(N417)を用い、塩酸イリノテカン(CPT-11)の耐性細胞(N417R)を作成した。ヌードマウスにN417とN417Rを移植しCPT-11をA群：通常法(週1回腹腔内投与×3週)、B群：抗血管療法(連日投与×3週)、C群：コントロールの比較試験を行った。治療効果は、コントロール群と比較して、B群が最も高く、次いでA,C群の順であった。治療後に得られた癌組織を用いて免疫組織学的な検討を行い、通常投与のA群に比べ、Daily投与のB群で血管新生が阻害されており、臨床応用が期待されるCPT-11投与方法として連日投与があげられる。

研究成果の概要(英文)：Small-cell lung cancer (SCLC) conveys a poor prognosis due to the limited efficacy of existing treatment strategies. To provide clinically relevant strategies for studying new therapeutics and tumor biology, we established a reproducible orthotopic model of human SCLC cells in the nude mouse. (Isobe T: J Thorac Oncol 2013)  
Human SCLC cell (N417) was injected into the lung of nude mice. The mice were randomly assigned to receive one of the following three treatments (8 mice in each treatment group): 1) injection per week of CPT-11, 2) daily injection of low-dose CPT-11, 3) control group. The mice were then examined daily for evidence of tumor development. Daily CPT-11 treatment resulted in an increase of apoptosis and decrease of proliferation both tumor cells and tumor related endothelial cells. The development of our orthotopic model of SCLC provide a means for a better understanding the biology of SCLC and will enable evaluation of novel therapeutic strategies.

研究分野：呼吸器病学

キーワード：肺癌 小細胞癌 血管新生

1. 研究開始当初の背景

近年、肺癌の治療は個別化が進み、非小細胞肺癌においては分子標的治療薬の登場により大きく治療成績が向上した。一方、小細胞肺癌で承認された分子標的薬はなく、約 20 年間治療成績は向上していない。発癌・進展機構の解明や新たな治療戦略の開発のためには小細胞肺癌のマウスモデルの開発、分子生物学的な検討に加えて標準的治療の問題点である局所制御率の向上を指向した臨床研究を積極的に検討する必要がある。小細胞肺癌の新たな治療戦略の開発のためには、腫瘍の遺伝子異常、血管新生の両者のコンポーネントについて検討する必要がある。小細胞肺癌は外科切除が行われる機会が極めて少ないため、ヒトの組織を用いて腫瘍の分子生物学や新生血管、微小環境についての検討は十分には行われていない。ヒトの正常組織における血管内皮細胞の分裂速度は 1 年以上と非常に遅いため、治療の標的とはならないが、がんの新生血管の血管内皮細胞の分裂速度は数日と早いため、治療の標的となりうる。われわれが作成した小細胞肺癌の同所性移植モデル (Isobe T, et al. J Thorac Oncol. 2013) は、移植したヒト肺癌がマウスの肺の局所で増大し、次いで縦隔リンパ節転移を生じ、マウスは呼吸不全のため死亡するという、実臨床に類似したモデルである。ヒトのがんを研究するために最もよく使用される一般的な実験モデルは、マウス皮下に腫瘍を形成させ、結果として得られた異種移植片に人のがんの有効と思われる様々な薬を投与したものである。この方法では、患者の実際の腫瘍の反応をほとんど予見できない。このモデルでは、移植後、腫瘍の増大に際し、血管新生促進分子である VEGF (vascular endothelial growth factor) と血管新生の指標である微小血管密度 (MVD) が増加していることから抗血管療法が新たな治療ターゲットと考えられる。一方、小細胞肺癌の再発は多くが局所再発、または脳転移であることが指摘されているが、前者に深くかかわる要因として治療中の薬剤耐性細胞の出現があげられる。我々の同所性移植モデルにおいても、小細胞癌に有効な薬剤を投与することで腫瘍縮小効果は得られるものの、消失には至らないことが確認されている。抗がん薬の投与は、最大耐用量に近い用量を投与してその後、毒性の回復を待ってから投与を繰り返す、といった方法が一般的であるが、Paclitaxel のように、分割投与することで抗癌薬の用量規定因子となる血液毒性、非血液を回避し、血管内皮細胞を標的とした抗血管療法が可能となる。イリノテカン<sup>®</sup>は、日本における比較試験の結果、小細胞肺癌においてシスプラチンと併用療法を行うことで有用性が証明され、小細胞肺癌治療のキードラッグであるが、少量分割投与が可能で薬剤であるため、抗血管療法として有用である可能性があるが、小細胞肺癌患者

者での少量分割投与のエビデンスは確立していない。

2. 研究の目的

ヒト小細胞肺癌細胞を用い、ヌードマウスの同所性移植モデルにおいてイリノテカンの抗腫瘍効果と血管新生阻害作用を検討する。次いでイリノテカンの daily dose intensive chemotherapy による新たながん治療戦略について検討を行う

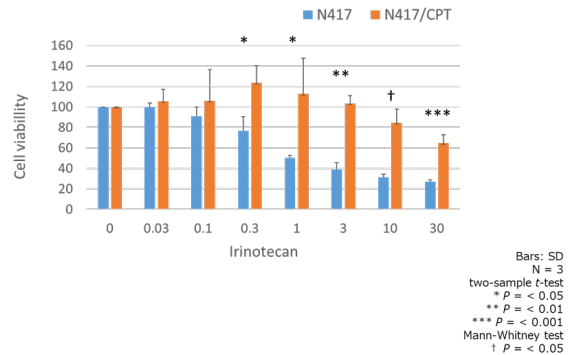
3. 研究の方法

ヒト小細胞肺癌細胞株に低濃度の CPT-11 を暴露させ段階的に濃度を上げて継代培養を行い CPT-11 耐性株を樹立した。in vivo での dose intensive chemotherapy と抗血管療法としての CPT-11 の効果を検証し、臨床試験の実施計画書の作成を行う。

4. 研究成果

ヒト肺小細胞肺癌の細胞株である NCI-N417 を用い、塩酸イリノテカンの耐性細胞 (NCI-N417-CPT11R) を作成した (図 1)。

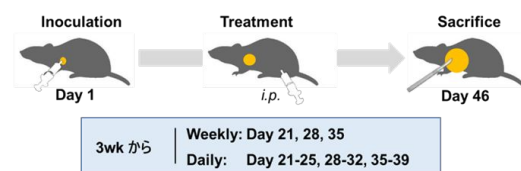
図 1



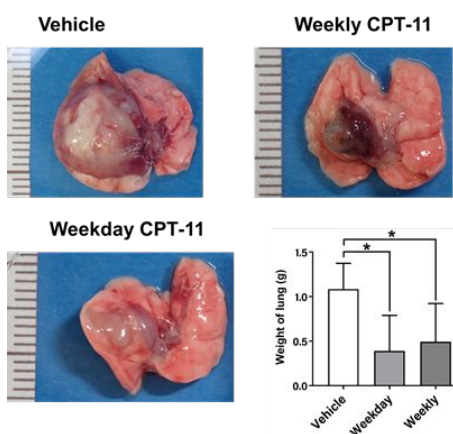
ヌードマウスに NCI-N417 と NCI-N417-CPT11R を移植した。腫瘍が局所で増大する時期に、塩酸イリノテカンを通常法 (週 1 回腹腔内投与 × 3 週)、抗血管療法 (連日投与 × 3 週)、コントロールの 3 群の比較試験を行なった。同所性移植の方法は、ヌードマウスにペントバルビタール 50 mg/kg を腹腔内投与し、麻酔下にヌードマウスの左胸部皮膚を約 1 cm 切開し、壁側胸膜を露見させた後にシリンジおよび 30G の注射針にてマトリジェルと混合した癌細胞をヌードマウスの左肺に 1.5x10<sup>6</sup> 個注入する。皮膚切開部をオートクリップで閉じ、右側臥位として麻酔からの自然覚醒まで経過観察する。移植後 2 週間後に、コントロール (無治療)、各薬剤の投与群での比較試験を行う。移植後 46 日目にペントバルビタール 100 mg/kg 腹腔内投与で安楽死させたのち、左肺への腫瘍生着、縦隔リンパ節転移、腹膜播種、胸水の有無を肉眼的に観察し肺を腫瘍と共に摘出し、肺重量を計測する。摘出した腫瘍組織を一部は凍結保存、残りはホルマリン固定し、分子生物学的、免疫組織学的検討を行う。(図 2)。

図 2

Day 1に  $1 \times 10^6$  cells/100  $\mu$ L (50  $\mu$ L RPMI + 50  $\mu$ L Matrigel) を左肺に移殖



コントロールに比較して CPT-11 投与マウスでは優位に腫瘍を含む肺重量の低下が認められ、少量週 5 日投与 (weekday) 群で最も効果が高かった。



治療後に得られたヌードマウスの癌組織を用いて、免疫組織学的な検討を行った。検討項目は、血管新生促進因子である VEGF、bFGF、IL-8、腫瘍における血管新生の評価として CD31、細胞増殖能として BrdU、アポトーシスとして TUNEL の各因子とした。摘出肺腫瘍のホルマリン固定後パラフィン包埋し、4  $\mu$ m の薄切切片を作成した。脱パラフィンを行った後、VEGF、bFGF、IL-8、CD31 のそれぞれの抗体により、自動免疫染色装置を用いて免疫染色を行った。少量週 5 日投与 (weekday) 群では、腫瘍内の血管新生が抑制されており、その要因としては血管内皮細胞の増殖抑制とアポトーシスの亢進が考えられた。以上のことから、臨床応用が期待される CPT-11 投与方法として連日投与があげられる。現在、CPT-11 は小児悪性固形腫瘍で D 法：1 日 1 回、20 mg/m<sup>2</sup> を 5 日間連日点滴静注する。これを 1 週毎に 2 回繰り返し、少なくとも 1 週間休薬する。これを 1 コールとして、投与を繰り返す用法、用量が承認されている。小細胞肺癌では、1 日 1 回、100 mg/m<sup>2</sup> を 1 週間間隔で 3 ~ 4 回点滴静注し、少なくとも 2 週間休薬する用法、用量が承認されているため、臨床試験によって適正な用量の設定が必要となる。

しかしながら、マウスに対する抗腫瘍効果は十分でなく、CPT 単剤に加えて他の薬剤の併用の検討実験が必要と考えられる。本研究を

発展させて、現在小細胞肺癌に対して使用可能な薬剤との併用療法の有効性を検討する研究を計画している。

小細胞肺癌は非小細胞肺癌に比較して、有効な抗がん剤が少なく分子標的治療薬や免疫チェックポイント阻害薬で使用可能な薬剤がない。分子メカニズムの解明と共に、血管新生が強い小細胞肺癌の局所における微小環境に注目した検討が今後は必要と考えられる。今後は分子メカニズムと微小環境の解明によって、わずかな治療効果の差を臨床試験によって積み上げていくことが重要と考えられる。

## 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 5 件)

・ Tsubata Y, Sutani A, Okimoto T, Murakami I, Usuda R, Okumichi T, Kakegawa S, Togashi K, Kosaka S, Yamashita Y, Kishimoto K, Kuraki T, Isobe T: Comparative analysis of tumor angiogenesis and clinical features of 55 cases of pleomorphic carcinoma and adenocarcinoma of the lung. *Anticancer Res.* 35:389-94. 2015

・ Putra AC, Eguchi H, Lee KL, Yamane Y, Gustine E, Isobe T, Nishiyama M, Hiyama K, Poellinger L, Tanimoto K.: The A Allele at rs13419896 of EPAS1 Is Associated with Enhanced Expression and Poor Prognosis for Non-Small Cell Lung Cancer. *PLoS One.* 2015 Aug 11;10(8):e0134496. doi: 10.1371

・ Tsubata Y, Hayashi M, Tanino R, Aikawa H, Ohuchi M, Tamura K, Fujiwara Y, Isobe T, Hamada A.: Evaluation of the heterogeneous tissue distribution of erlotinib in lung cancer using matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry imaging. *Sci Rep.* 7:12622. doi: 10.1038/s41598-017-01262-2

・ Tanino R, Tsubata Y, Harashima N, Harada M, Isobe T: Novel drug-resistance mechanisms of pemetrexed-treated non-small cell lung cancer. *Oncotarget.* 9:16807-16821, 2018

・ Okimoto T, Tsubata Y, Hotta T, Hamaguchi M, Okuno T, Shiratsuki Y, Kodama A, Nakao M, Amano Y, Hamaguchi S, Kurimoto N, Tobita R, Isobe T: Successful rechallenge with ceritinib after leukocytoclastic vasculitis during ceritinib treatment for non-small cell lung cancer harboring the EML4-ALK fusion protein. *Oncotarget.* 9:20213-20218. 2018

〔学会発表〕(計 7 件)

1. R. Tanino, Y. Tsubata, N. Harashima, M. Harada, T. Isobe :

Pemetrexed-Resistant Non-Small Cell Lung Cancer Cell Lines Have Novel Drug-Resistant Mechanisms. 18th World Conference on Lung Cancer. Yokohama-shi, October 15-18, 2017

2. Y. Tsubata : Approach and Management for Treatment of Elderly Cancer Patients in Japan: Current Status and Future Prospects. SIOG 2017 Annual Conference. Warsaw, November 9-11, 2017

3. Y. Tsubata, Y. Shiratsuki, T. Okuno, A. Kodama, M. Nakao, Y. Amano, T. Hotta, M. Hamaguchi, T. Okimoto, S. Hamaguchi, Y. Nishiyama, T. Kimura, H. Iwata, S. Tsumoto, T. Isobe : A prospective feasibility study and construction of regional co-operation network for the elderly thoracic malignancy patients using comprehensive geriatric assessment (CGA) tools. SIOG 2017 Annual Conference. Warsaw, November 9-11, 2017

4. T. Isobe, Y. Tsubata, R. Tanino, Y. Mori, M. Nakao, Y. Amano, T. Hotta, N. Koba, M. Hamaguchi, T. Okimoto, T. Hoshino, S. Hamaguchi, A. Sutani, Y. Awaya, H. Takeyama, M. Fujita, A. Hamada : The evolution of targeted therapy in non-small cell lung cancer. 9th International Symposium on Nanomedicine ( ISNM2015 ). Tsu-shi, December 10-12, 2015

5. Y. Fujita, J. Lin, R. Tanino, T. Yamamoto, J. Fujihara, H. Takeshita, T. Isobe : Medical Applications of Zinc Oxide Films and Nanoparticles. The 4th Japan-China Symposium on Nanomedicine. Kitakyusyu-shi, May 12-13, 2016

6. T. Isobe, C. Sano, R. Tanino, T. Tatano, R. Tanino, Y. Mori, M. Nakao, Y. Amano, T. Hotta, M. Hamaguchi, T. Okimoto, Y. Tsubata, S. Hamaguchi, H. Takeyama : Establishment of the Novel Mouse Models of Human Lung Nontuberculous Mycobacterial Infections. ATS2016. San Francisco, May 13-18, 2016

7. Y. Tsubata, M. Nakao, T. Okimoto, A. Sutani, M. Horiguchi, C. Yamashita, H. Ohtsu, T. Isobe : A clinical study on activity of NAMPT and SIRT1 gene expression in neutropenia with cancer chemotherapy. ASCO2016. Cicago, June 3-7, 2016

〔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

磯部 威 (ISOBE Takeshi)

島根大学医学部内科学講座 呼吸器・臨床腫瘍学・教授

研究者番号：70284198

##### (2) 研究分担者

津端 由佳里 (TSUBATA Yukari)

島根大学医学部附属病院 呼吸器・化学療法内科・講師

研究者番号：50643417

須谷 顕尚 (SUTANI Akihisa)

島根大学医学部附属病院 呼吸器・化学療法内科・講師

研究者番号：80306290

沖本 民生 (OKIMOTO Tamio)

島根大学医学部附属病院 呼吸器・化学療法内科・助教

研究者番号：00733586

濱口 俊一 (HAMAGUCHI Synichi)

島根大学医学部附属病院 呼吸器・化学療法内科・助教

研究者番号：70609354

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

##### (4) 研究協力者

( )