

令和元年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：2016～2018

課題番号：16K10706

研究課題名(和文) マウス中皮腫モデルを用いた胸腔内治療法の開発及び中皮腫の新規バイオマーカーの探索

研究課題名(英文) The search for effective intra-pleural therapies using mouse models 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) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：胸膜中皮腫に対する有効な胸腔内局所療法の開発及び、新規中皮腫バイオマーカーの探索を目的に基礎研究を行った。マウス中皮腫胸腔内及び皮下モデルを用い、抗癌剤の胸腔内注入や胸腔内灌流を施行した。また、同モデルを用いて、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根治率2/3の系を作製した。さらに、ヒトの中皮腫病理組織を材料とし、ショットガンプロテオミクス法を用いたプロテオーム解析を行い、中皮腫の病理組織型である上皮型、二相型、肉腫型、及び正常中皮細胞の4群比較で発現に差のあるいくつかの候補タンパク質を同定した。現在、免疫染色を用いて、それらの有用性を検討中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

有効な胸腔内局所療法の開発(胸腔内への薬物、細胞の投与実験)は、大きなチャレンジであるが、胸膜中皮腫だけでなく、肺癌胸膜播種、さらに胃癌、大腸癌、卵巣癌などの腹膜播種に対しても応用できる可能性が高いため、今後も継続が必要である。我々のマウス中皮腫モデルは、従来は観察できなかった免疫応答も詳細に検討できるため、胸腔内治療の基礎実験には欠くことができない。また、難治性の組織型である肉腫型、二相型中皮腫に対するバイオマーカーの探索は、早期診断や新規治療オプションの開発につながる。

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 performed intrapleural injection of anticancer drug and intrathoracic perfusion therapy using mouse models of mesothelioma. Furthermore, we found an excellent combination therapy of anti-PD-1 and anti-CTLA4 antibodies which eradicated the tumors in two thirds of mice. With regard to searching new biomarkers, we did shotgun proteomics analysis and found several candidate proteins which express differently in histological types. Now, we are testing their effectiveness by immunostaining.

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、中皮腫による死者数は、今後 20 年近く増加し続けると考えられている。これまで、胸膜中皮腫に対する治療方針は、他の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(中皮)に沿って進展し、その後腫瘍を形成し、さらに増大していく。そのため、早期診断が難しいばかりでなく、厳密には早期の症例ですら完全切除は難しい。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、胸膜肺全摘術の過大侵襲を考慮し、肺を残して胸膜のみを切除する試み(術式)が行われ始めているが、根治率の上昇は望めない。さらに、進行症例に対して行われる化学療法に関しても、近年、新規抗癌剤である 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、生存期間の延長はわずかである。結果的に、現在でもなお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。

従って、現在の治療ストラテジーでは、中皮腫の予後改善には限界があり、低侵襲かつ局所制御率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。つまり、新しい胸腔内治療の開発と新規バイオマーカーの探索が必要である。

胸腔内局所療法に関しては、これまで実地臨床において散発的に行われてきたが、広く受け入れられているものはない。しかし、松崎や Su らの肺癌の癌性胸膜炎に対するシスプラチン胸腔内投与の報告や、Boutin らの中皮腫の早期症例に対する IFN- γ の胸腔内投与の報告では、治療群に予後、奏効率の改善が認められている (Matsuzaki Y et al. Ann Thorac Surg 2004;78:1769-72、Su WC et al. Oncology 2003;64:18-24、Boutin C et al. Cancer 1994;74:2460-67)。

従って、有効な胸腔内局所療法は中皮腫の予後を改善する可能性が十分あると考えられるが、臨床応用には、動物実験を用いたさらなる詳細な検討が必要である。

また、中皮腫の新規バイオマーカー探索研究に関しては、申請者らや Robinson らによる中皮腫腫瘍マーカーの研究で、Mesothelin 関連タンパク質 (N-ERC/Mesothelin、SMRP : Soluble Mesothelin Related Protein) が、腫瘍マーカーとして有用性が高いことが証明され、臨床応用されている (Shiomi K. et al. Clin Cancer Res. Mar 1;14(5):1431-1437, 2008、Shiomi K et al. Cancer Sci. 2006 ;97(9):928-32、Robinson BW et al. J Thorac Oncol. 2006 ;1(2):172-4)。現在、米国で Hassen らによって、Mesothelin 分子に対する抗体と化学療法併用での臨床試験(第 2 相)が行われており、その結果に期待が寄せられている。しかし、この Mesothelin 関連分子は、中皮腫の約 6 割を占める病理組織型(上皮型)において有用な腫瘍マーカーとなるが、難治性であるその他の病理組織型(肉腫型、二相型)の腫瘍マーカーにはならない。中皮腫全体の予後改善には、新たな腫瘍マーカーが必要である。

2. 研究の目的

有効な胸腔内局所療法の開発

難治性の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

3. 研究の方法

有効な胸腔内局所療法の開発

先行実験で作製したマウスにおける中皮腫胸腔内及び皮下モデル (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)を移植させたもの)を用い、最も治療効果の高いレジメン(抗癌剤 Gemcitabine、抗 PD-1 抗体、抗 CTLA-4 抗体など)の探索と、同時に、薬剤の効果的な胸腔内投与方法の検討を行った。胸腔内温熱化学療法のポンプはアトー株式会社のペリスタポンプ(AC-2110)を、胸腔内留置チューブはアズワン・シリコンチューブを使用した。また、ゲルに関しては、最初はアルギン酸塩化カルシウムゲルを用いた。

難治性の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

我々は二次元電気泳動法及び質量分析法を用いた先行研究で、2 種類のヒト中皮腫細胞株(二相型と上皮型)で発現の異なるタンパク質を 20 個同定している。今回、さらに多くの候補タンパク質を同定するため、ヒト中皮腫のパラフィン組織を用いて、より高感度で、検出力のある質量分析器を用いたプロテオーム解析(ショットガンプロテオミクス法)を行った。

4. 研究成果

有効な胸腔内局所療法の開発
最も治療効果の高いレジメンの開発に関しては、AB12 細胞株/BALB/c の系で、細胞障害性抗がん剤の Gemcitabine を含まない、抗 PD-1 抗体及び抗 CTLA4 抗体の併用療法で根治率 2/3 を達成した(図1)。今後は、根治度をさらに上げるため、これらの免疫チェックポイント阻害剤と相性のいい抗癌剤の探索を行う予定である。

また、上記実験系で「根治」したマウスに、中皮腫細胞株 AB12 のみならず、他のがん種の細胞株(腎癌、大腸癌、血管肉腫、等)を移植すると、これ

らも同様に根治または生着が阻害されるという現象が認められた(図1)。そのため、この系を用いて抗 PD-1 抗体及び抗 CTLA4 抗体の作用に、非特異的抗腫瘍免疫が関与しているかどうかを検討する実験を開始した。

薬剤の効果的な胸腔内投与方法の検討に関しては、作製した2系統のマウス中皮腫モデルの胸腔内にシリコンチューブを留置し、抗癌剤を数回連続投与方法や灌流療法を試みたが、抗癌剤(小分子化合物)の胸腔内での吸収が早いため、十分な予後の延長は認められなかった(図2)。

従って、薬物の徐放効果を高めるため、また将来的に胸腔内に投与する免疫細胞の局所での安定性を高めるために、ゲルを用いた実験を開始した。まずは、アルギン酸塩化カルシウムゲルを用いて実験を行った。結果はゲル自体の生体毒性のためか、2/3 が死亡した。今後は、ヒアルロン酸ゲル、ゼラチン、PLGA マイクロスフェアなど用いて検討する予定である。免疫細胞に関しては、足場素材として RCP petaloid μ -piece を使用し胸腔内に投与する予定である。

難治性の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

胸膜炎の胸水から作成した中皮細胞のセルブロック、及び胸膜中皮腫の上皮型、肉腫型、二相型の組織のパラフィン切片を用い、これらの組織に発現するタンパク質を比較した(ショットガンプロテオミクス法を用いたプロテオーム解析)。同定した 1919 個のタンパク質の中から、まずは、中皮細胞や上皮型中皮腫では発現が確認できず、二相型及び肉腫型中皮腫で発現するタンパク質、2 個を選択した。これらは間質の線維化や腫瘍の増殖に関連する FKBP10 遺伝子と、コレステロール代謝や肝細胞癌や肉腫の増殖に関わる HDLBP 遺伝子がコードするタンパク質である(図3)。今後は、これらの候補タンパク質に対する抗体を用いて免疫組織染色を行い、その有用性を検討する。

図1 腫瘍根治モデルと他がん種生着阻害

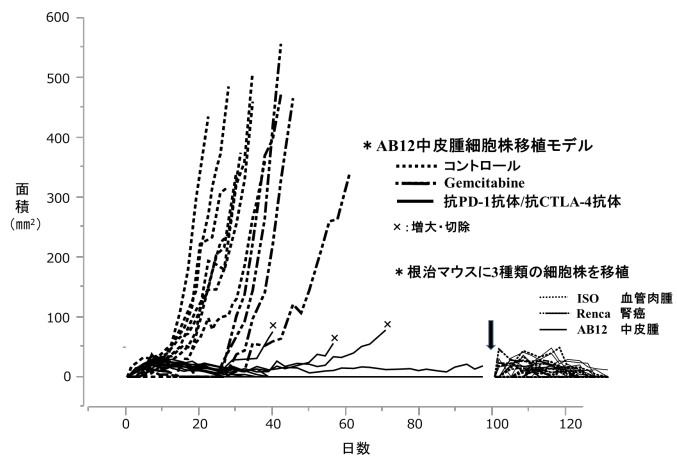


図2 マウス胸腔内温熱化学療法

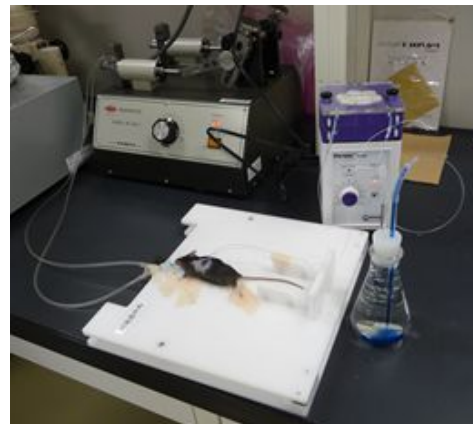
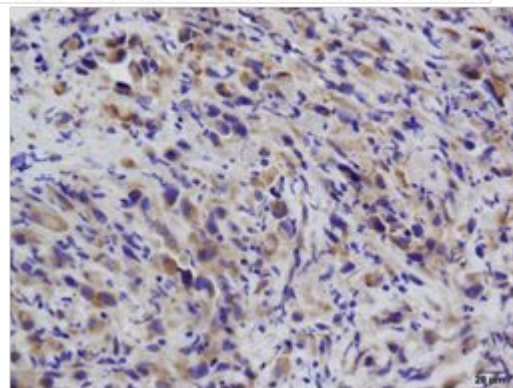


図3 免疫染色(HDLBP)、二相型中皮腫



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〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
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：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：江島耕二

ローマ字氏名：(ESHIMA, Koji)

所属研究機関名：北里大学

部局名：医学部

職名：准教授

研究者番号(8桁): 30327324

研究分担者氏名：玉内秀一

ローマ字氏名：(TAMAUCHI, Hidekazu)

所属研究機関名：大東文化大学

部局名：スポーツ健康科学部

職名：教授

研究者番号(8桁): 60188414

研究分担者氏名：佐藤之俊

ローマ字氏名：(SATO, Yukitoshi)

所属研究機関名：北里大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号(8桁): 90321637

(2)研究協力者

研究協力者氏名:

ローマ字氏名:

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。