

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 25 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591665

研究課題名（和文）宿主・腫瘍相乗的サイトカイン産生連鎖機構の制御による癌悪液質の回避

研究課題名（英文）Therapeutic potential for cancer cachexia by modulating the tumor-host inflammatory interactions

研究代表者

三木 誓雄（Miki Chikao）

三重大学・大学院医学系研究科・客員教授

研究者番号：50242962

研究成果の概要（和文）：我々はこれまでに、宿主・腫瘍相乗的サイトカイン産生連鎖機構が「癌悪液質」の形成に大きな役割を果たしていることを明らかにしてきた。このサイトカインプロファイルの変化の中で最も上流に位置するのは Interleukin (IL)-1 と IL-6 cascade であることも明らかとなった。本研究では大腸癌患者における癌悪液質を評価し、IL-1 receptor antagonist (ra)を用いた分子標的治療が担癌宿主の宿主-癌組織間の偏った IL-1-IL-6 cascade を正常化し、宿主を癌悪液質から離脱できる可能性を示す。大腸癌患者 300 名の血中 CRP 値、血中アルブミン値、リンパ球数、術前体重減少率の検討により血中アルブミン値が CRP 値と最も強く負に相関していることが判明した ($r = -0.411$, $p < 0.0001$)。CRP, アルブミンの各カットオフ値を 0.5mg/dL, 3.5g/dL とし、大腸癌患者を 4 群に分類した。A 群（CRP 陰性かつアルブミン値正常）、B 群（CRP 陰性かつアルブミン低値）、C 群（CRP 陽性かつアルブミン値正常）、D 群（CRP 陽性かつアルブミン低値）。大腸癌 stageIV では C・D 群は約 60% を占め、StageIII では約 30%、Stage I, II でも 15~30% であった。この血中 CRP 値、血中アルブミン値による癌悪液質のスコアリングは、大腸癌根治術後の再発リスクと関連していた。大腸癌組織及び正常組織中の IL-1 beta、IL-6 値は D 群では大腸癌組織中に炎症性サイトカインが正常組織の 4~5 倍量発現していた。In vitro では、大腸癌細胞株に IL-1beta のみ、IL-1beta/IL-1ra、IL-1ra のみの添加後、1h, 3h, 6h, 12h, 24h 後に上清を採取し soluble IL-6, soluble glycoprotein 130 を測定すると、IL-1ra のみの添加後で control より低発現、IL-1beta のみ添加後では高発現、両方添加では control よりやや高発現であったが、IL-1beta のみ添加より低発現であった。以上より、大腸癌患者の血清中増殖因子が癌悪性度だけでなく癌悪液質に関わることから、抗炎症性サイトカインによる炎症性サイトカイン制御すなわち、IL-1ra による増殖因子の制御が、癌の進展のみならず、癌悪液質改善に寄与する可能性があることが示された。

研究成果の概要（英文）：Previously, we demonstrated that the tumor-host inflammatory interactions play an important role in the formation of cancer cachexia. We also showed that the top of tumor-host inflammatory interactions is the Interleukin (IL)-1-IL-6 cascade. Firstly, we evaluated the status of cancer cachexia in patients with colorectal cancer (CRC). We sought to investigate the possibility of therapeutic potential of IL-1 receptor antagonist (ra) for of patients' cachexia by modulating IL-1-IL-6 cascade. In 300 patients with CRC, there is significantly negative correlation between serum C reactive protein (CRP) and serum albumin. We divided CRC patients into four groups; group A: CRP<0.5 mg/dl and albumin>3.5 g/dl, group B: CRP<0.5 mg/dl and albumin<3.5 g/dl, group C: CRP>0.5 mg/dl and albumin>3.5 g/dl, group D: CRP>0.5 mg/dl and albumin<3.5 g/dl. Approximately 60% of patients with stage IV CRC belong to the group C or D, indicating that these patients may have the pre-cachexic or cachexic state. Approximately 30% of patients with stage III CRC belong to the group C or D. Even in patients with stage I or II CRC, 15-30% of them belong to these groups. This cancer cachexia scoring system is associated with disease recurrence of CRC patients with curative surgery. With regard to the measurement of IL-1

beta and IL-6 in both cancer and adjacent normal tissue, the expression of these pro-inflammatory cytokines in patients with group D is approximately four to five times higher than those with the other groups. Experimentally, IL-1ra inhibits the expressions of soluble IL-6 and soluble glycoprotein 130 in HT29 colorectal cancer cell line. IL-1 beta enhances the expressions of soluble IL-6 and soluble glycoprotein 130. The simultaneous administration of IL-1ra and IL-1 beta slightly enhances these expressions, compared with the control. These results suggest that the cancer cachexia scoring system based on the serum CRP and albumin is associated with colorectal cancer progression and the tumor-host cytokine imbalance. The control of IL-1-IL-6 cascade may contribute the improvement of cancer cachexia and cancer progression in colorectal cancer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：ライフサイエンス(共通基礎研究)

科研費の分科・細目： 外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：大腸癌、サイトカイン、IL-1ra

1. 研究開始当初の背景

癌患者の予後及び QOL は病理学的進行度より、むしろ『担癌宿主の生体環境の変化』に強く規定されると言われている。「癌悪液質」がまさにその変化した状態にあたるが、その本態はよくわかっていなかった。我々は、宿主・腫瘍相乗的サイトカイン産生連鎖機構が「癌悪液質」の形成に大きな役割を果たしていることを明らかにしてきた。すなわち癌組織が産生する微量のサイトカインが全身を循環する免疫担当細胞にシグナルを発し、様々なサイトカインや腫瘍増殖因子の産生を促し肝糖新生の抑制やエネルギー消費の亢進を促し、体蛋白の異化すなわち癌悪液質を誘導する蛋白崩壊・免疫異常を惹起する。その一方で増殖因子を癌細胞自らのレセプターに反応させ、癌組織間質の血管新生や腫瘍免疫抑制を促しつつさらに大量のサイトカインを再び全身に向け放出する。これにより、癌の増殖とともに消耗していく担癌宿主の中において、癌組織だけが増殖に必要な自らの生体環境を守り続け、宿主が死亡するまで増殖を続けていく。この癌悪液質の本態は、まさにサイトカインを介する宿主-腫瘍間の autocrine あるいは paracrine 機構によって形作られていることを示してきた。大腸癌患者において、この変化が比較的早期から出現している場合があり、こういった癌患者では早期から栄養状態が低下し、免疫能も抑制

され病理学的進行度とは独立して生存期間が短縮していることが判明した。そして、このサイトカインプロファイルの変化の中で最も上流に位置していたのは IL-1-IL-6 cascade であることも明らかとなった。IL-1-IL-6 network を負に制御するのが IL-1ra と IL-1RII であり、この IL-1-IL-6 network を負に制御することそのものにも抗腫瘍効果があるともいえる。さらに IL-1-IL-6 network は血管内皮細胞増殖因子、肝細胞増殖因子など様々な腫瘍増殖因子を誘導することから、大腸癌増殖に対し IL-1-IL-6 cascade が autocrine に作用するという一方で、さらに、大腸癌細胞は IL-1-IL-6 network に negative feedback をかける抗炎症性サイトカインである IL-1ra も正常細胞と同様産生するが、腫瘍進展に先立ち IL-1ra 産生能力が失活していく。一般に正常人では外部からのストレス刺激に対し産生される IL-1 に対し 100 倍量の IL-1ra が産生されるが、我々の研究では、癌の進行に先立ち相対的に IL-1ra の産生が低下し、手術侵襲など腫瘍外部からの炎症性刺激に対し、IL-1ra 不足により IL-1-IL-6 cascade にブレーキがかからなくなり、腫瘍がさらに過大な IL-6、血管内皮細胞増殖因子、肝細胞増殖因子など様々な腫瘍増殖因子を産生し、術後早期の再発に関与することが判明した。さらにこの autocrine 機構の中心を成す IL-1-IL-6 cascade におい

て外部より IL-1ra を補填すると培養癌細胞における VEGF 産生が 80%以上抑制された。したがって、相対的な IL-1ra 産生量不足に代表される宿主・癌組織間の IL-1-IL-6 cascade を正常化することにより、宿主のエネルギー代謝が正常化し、癌悪液質が回避でき切除不能や再発により化学療法の維持や緩和医療を必要とする患者の QOL を向上させることが可能になると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では大腸癌患者における癌悪液質を評価し、IL-1 receptor antagonist (ra)を用いた分子標的治療が担癌宿主の宿主・癌組織間の偏った IL-1-IL-6 cascade を正常化し、宿主を癌悪液質から離脱できる可能性を示す。

3. 研究の方法

(1) 臨床検体を用いた検討

当科で手術を行い、同意が得られた大腸癌患者の血液、癌および近傍正常組織を用い、臨床データ、サイトカイン測定を行った。

(2) 大腸癌細胞株を用いた検討

In vitro での IL-1-IL-6 cascade に関するサイトカイン反応を、HT29 大腸癌細胞株を用い、IL-1beta のみ、IL-1beta/IL-1ra、IL-1ra のみの刺激後、1h, 3h, 6h, 12h, 24h 後に上清を採取し soluble IL-6, soluble glycoprotein 130 等のサイトカインを ELISA にて測定した。

(3) In vitro における癌患者単球への IL-1ra 遺伝子導入

(4) 担癌ラット骨髄造血幹細胞への IL-1ra 遺伝子導入による悪液質回避

(5) 担癌ラットのエネルギー代謝の評価と総括

4. 研究成果

(1) 癌悪液質スコアリングによる大腸癌分類
血中 CRP 値と栄養学的指標との関連 (血中アルブミン、リンパ球数、術前体重減少率) を大腸癌患者 300 名で検討したところ、血中アルブミン値が CRP 値と最も強く負に相関していることが判明し ($r = -0.411, p < 0.0001$), ROC 分析で CRP, アルブミンの各カットオフ値を 0.5mg/dL, 3.5g/dL とし、その結果を基に癌患者の栄養状態を以下の 4 群に分類した。すなわち、A 群 (CRP 陰性かつアルブミン値正常) は健常人のパターンに属するグループで、B 群 (CRP 陰性かつアルブミン低値) は通常の下栄養のパターンであり、C 群 (CRP 陽性かつアルブミン値正常) は癌悪液質準備状態であり、D 群 (CRP 陽性かつアルブミン低値) は癌悪液質が完成した患者のグループである。

(2) 癌悪液質スコアリングと大腸癌臨床病期との関連

大腸癌の各臨床病期に、A~D 群が実際のどの程度含まれているかを示したものである。遠隔転移を有する stage IV では C・D 群は約 60%

を占め、リンパ節転移を認めるものの、治癒切除可能である Stage III には約 30%、一般的に外科的治療のみで補助化学療法は必要ないとされている Stage I, II の段階でも実に 15~30% の患者に癌悪液質が完成、あるいは完成しつつあった。すなわち、臨床病期の進行とともに C・D 群が存在する割合は増えるが、比較的早期癌の段階でも約 1/4 の患者はすでに悪液質に移行していたのである。一方、通常の下栄養を示す B 群が占める割合はいずれの病期においても 10% 程度で差がなく、D 群と異なり B 群の栄養不良は癌の進行とは関係ないことが示唆された。

(3) 大腸癌組織及び正常組織中炎症性サイトカイン

D 群では癌組織に特異的に炎症性サイトカインが正常組織の 4~5 倍量発現していることが判明した。このことは、我々のこれまでの研究成果である癌組織が特異的に産生している IL-6 が癌悪液質の原因となることを裏付けており、また一般に癌組織由来の IL-6 は 5-Fu などの抗癌剤に対する耐性の原因となることから、癌組織における IL-6 産生を制御できる治療法は、早期癌、高度進行癌の両者に対して、通常の下栄養の作用を増強し、予後を改善できる可能性がある。すなわち、この患者群こそが炎症性サイトカインを抑制しつつ、同時に栄養補給できる栄養療法を必要としているのである。そして、全身状態の改善とともに、抗癌剤治療 IL-6 が誘導する VEGF などの癌細胞増殖因子に対する分子標的治療が有効になれば、予後はさらに改善するはずである。

(4) In vitro study

大腸癌細胞株 HT29 に IL-1beta のみ、IL-1beta/IL-1ra、IL-1ra のみの添加後、1h, 3h, 6h, 12h, 24h 後に上清を採取し soluble IL-6, soluble glycoprotein 130 を測定すると、IL-1ra のみの添加後で control より低発現、IL-1beta のみ添加後では高発現、両方添加では control よりやや高発現であったが、IL-1beta のみ添加より低発現であった。

IL-1beta 刺激 6h, 12h 後ではコントロールと比べ、IL-6 receptor の splice variant および membrane-bound form の両方の発現が亢進していた。また、IL-1ra は soluble IL-6 receptor 発現を抑制していた。大腸癌組織 (C) 及び正常組織 (N) 中の soluble IL-6 receptor と IL-1beta の発現比すなわち、soluble IL-6 receptor C/N 比と IL-1beta C/N 比は有意な正の相関を示した。

(5) In vitro における癌患者単球への IL-1ra 遺伝子導入、担癌ラット骨髄造血幹細胞への IL-1ra 遺伝子導入による悪液質回避、担癌ラットのエネルギー代謝の評価と総括

当初予定したこれらの研究は、樹立細胞株を用いるのではなく患者から供せられた単球

を用いるため、研究期間内にあらゆる方法を用いて実験を行ったが、信頼性、再現性のある結果を得ることができなかった。しかし、様々な問題点が明らかとなりそれを解決するための方法やノウハウも蓄積できたため、今後の研究に生かしていく予定である。

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 23 件)

- (1) Tanaka K, Saigusa S, Toiyama Y, Koike Y, Okugawa Y, Yokoe T, Inoue Y, Kobayashi M, Miki C, Kusunoki M. TS and DPD mRNA levels on formalin-fixed paraffin-embedded specimens as predictors for distant recurrence of rectal cancer treated with preoperative chemoradiotherapy. *J Surg Oncol*. 2012;105:529-34. (査読有り)
- (2) Kawamoto A, Yokoe T, Tanaka K, Saigusa S, Toiyama Y, Yasuda H, Inoue Y, Miki C, Kusunoki M. Radiation induces epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer cells. *Oncol Rep*. 2012;27:51-7. (査読有り)
- (3) Mohri Y, Miki C, Tanaka K, Kawamoto A, Ohi M, Yokoe T, Kusunoki M. Clinical Correlations and Prognostic Relevance of Tissue Angiogenic Factors in Patients with Gastric Cancer. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*. 2011 Nov 28. (査読有り)
- (4) Hamamura K, Nakaya M, Nakagawa M, Miyazaki M, Miki C. A case of stage IV rectal cancer with whom EPA oral nutritional supplements could resolve cachectic condition and promote patient compliance with cancer chemotherapy. *Gan To Kagaku Ryoho*. 2011;38:845-8. Japanese. (査読有り)
- (5) Saigusa S, Toiyama Y, Tanaka K, Yokoe T, Okugawa Y, Fujikawa H, Matsusita K, Kawamura M, Inoue Y, Miki C, Kusunoki M. Cancer-associated fibroblasts correlate with poor prognosis in rectal cancer after chemoradiotherapy. *Int J Oncol*. 2011;38:655-63. (査読有り)
- (6) Miki C, Kusunoki M. Perioperative nutritional management in various clinical condition: diseases of lower digestive system. *Nihon Geka Gakkai Zasshi*. 2010;111:368-72. Japanese. (査読有り)
- (7) Saigusa S, Tanaka K, Toiyama Y, Yokoe T, Okugawa Y, Koike Y, Fujikawa H, Inoue Y, Miki C, Kusunoki M. Clinical significance of CD133 and hypoxia inducible factor-1 α gene expression in rectal cancer after preoperative chemoradiotherapy. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*. 2011;23:323-32. (査読有り)
- (8) Toiyama Y, Inoue Y, Yasuda H, Saigusa S, Yokoe T, Okugawa Y, Tanaka K, Miki C, Kusunoki M. DPEP1, expressed in the early stages of colon carcinogenesis, affects cancer cell invasiveness. *J Gastroenterol*. 2011;46:153-63. (査読有り)
- (9) Okugawa Y, Miki C, Toiyama Y, Yasuda H, Yokoe T, Saigusa S, Hiro J, Tanaka K, Inoue Y, Kusunoki M. Loss of tumoral expression of soluble IL-6 receptor is associated with disease progression in colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2010;103:787-95. (査読有り)

- (10) Hiro J, Inoue Y, Toiyama Y, Yoshiyama S, Tanaka K, Mohri Y, Miki C, Kusunoki M. Possibility of paclitaxel as an alternative radiosensitizer to 5-fluorouracil for colon cancer. *Oncol Rep*. 2010;24:1029-34. (査読有り)
- (11) Saigusa S, Tanaka K, Toiyama Y, Yokoe T, Okugawa Y, Kawamoto A, Yasuda H, Morimoto Y, Fujikawa H, Inoue Y, Miki C, Kusunoki M. Immunohistochemical features of CD133 expression: association with resistance to chemoradiotherapy in rectal cancer. *Oncol Rep*. 2010;24:345-50. (査読有り)
- (12) Inoue Y, Yokobori T, Yokoe T, Toiyama Y, Miki C, Mimori K, Mori M, Kusunoki M. Clinical significance of human kallikrein7 gene expression in colorectal cancer. *Ann Surg Oncol*. 2010;17:3037-42. (査読有り)
- (13) Saigusa S, Toiyama Y, Tanaka K, Yokoe T, Okugawa Y, Kawamoto A, Yasuda H, Inoue Y, Miki C, Kusunoki M. Stromal CXCR4 and CXCL12 expression is associated with distant recurrence and poor prognosis in rectal cancer after chemoradiotherapy. *Ann Surg Oncol*. 2010;17:2051-8. (査読有り)
- (14) Toiyama Y, Inoue Y, Saigusa S, Okugawa Y, Yokoe T, Tanaka K, Miki C, Kusunoki M. Gene expression profiles of epidermal growth factor receptor, vascular endothelial growth factor and hypoxia-inducible factor-1 with special reference to local responsiveness to neoadjuvant chemoradiotherapy and disease recurrence after rectal cancer surgery. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*. 2010;22:272-80. (査読有り)
- (15) Toiyama Y, Miki C, Inoue Y, Minobe S, Urano H, Kusunoki M. Loss of tissue expression of interleukin-10 promotes the disease progression of colorectal carcinoma. *Surg Today*. 2010;40(1):46-53. (査読有り)
- (16) Inoue Y, Miki C, Yanagi H, Noda M, Kusunoki M. Chemo-diversion strategy for unresectable colorectal carcinoma: report of two cases. *Hepatogastroenterology*. 2009;56(94-95):1359-61. (査読有り)
- (17) Toiyama Y, Mizoguchi A, Kimura K, Hiro J, Tutsumi T, Inoue Y, Miki C, Kusunoki M. Overexpression of the signal peptide whirlin isoform 2 is related to disease progression in colorectal cancer patients. *Int J Oncol*. 2009;35:709-15. (査読有り)
- (18) Inoue Y, Tanaka K, Yokoe T, Saigusa S, Toiyama Y, Miki C, Kusunoki M. Microdissection is essential for gene expression analysis of irradiated rectal cancer tissues. *Oncol Rep*. 2009;22:901-6. (査読有り)
- (19) Yasuda H, Tanaka K, Saigusa S, Toiyama Y, Koike Y, Okugawa Y, Yokoe T, Kawamoto A, Inoue Y, Miki C, Kusunoki M. Elevated CD133, but not VEGF or EGFR, as a predictive marker of distant recurrence after preoperative chemoradiotherapy in rectal cancer. *Oncol Rep*. 2009;22:709-17. (査読有り)

(20) Saigusa S, Tanaka K, Toiyama Y, Yokoe T, Okugawa Y, Ioue Y, Miki C, Kusunoki M. Correlation of CD133, OCT4, and SOX2 in rectal cancer and their association with distant recurrence after chemoradiotherapy. *Ann Surg Oncol*. 2009;16:3488-98. (査読有り)

(21) Okugawa Y, Miki C, Toiyama Y, Koike Y, Inoue Y, Kusunoki M. Serum level of soluble vascular cell adhesion molecule 1 is a valuable prognostic marker in colorectal carcinoma. *Dis Colon Rectum*. 2009;52:1330-6. (査読有り)

(22) Toiyama Y, Miki C, Inoue Y, Okugawa Y, Tanaka K, Kusunoki M. Serum hepatocyte growth factor as a prognostic marker for stage II or III colorectal cancer patients. *Int J Cancer*. 2009;125:1657-62. (査読有り)

(23) Inoue Y, Toiyama Y, Tanaka K, Miki C, Kusunoki M. A comprehensive comparative study on the characteristics of colorectal cancer chemotherapy. *Jpn J Clin Oncol*. 2009;39:367-75. (査読有り)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三木 誓雄 (Miki Chikao)
三重大学・大学院医学系研究科・客員教授
研究者番号：50242962

(2) 研究分担者

楠 正人 (Kusunoki Masato)
三重大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：50192026

毛利 靖彦 (Mohri Yasuhiko)
三重大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：70345974

内田 恵一 (Uchida Keiichi)
三重大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号：30293781

荒木 俊光 (Araki Toshimitsu)
三重大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：70343217

吉山 繁幸 (Yoshiyama Shigeyuki)
三重大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：60444436