

## 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6月11日現在

機関番号：82606

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790624

研究課題名（和文） 膵がん患者を対象とした悪液質改善作用及び抗腫瘍効果を有する新規治療法の研究

研究課題名（英文） Innovation of anti-cachectic therapy with anti-tumor effect for pancreatic cancer

研究代表者

光永 修一（MITSUNAGA SHUICHI）

独立行政法人国立がん研究センター・臨床開発センター・研究員

研究者番号：20466197

研究成果の概要（和文）：進行膵がんでは、悪液質を認めた患者は極めて予後不良であるが、有効な治療は確立していない。そのため、悪液質改善作用を有する抗腫瘍剤の有効性が強く示唆される。そこで、本研究は、炎症性サイトカインに着目して悪液質誘導分子を同定し、その阻害薬の開発に重要な情報を得ることを目的に行われ、A) 臨床研究より抗悪液質療法に適した標的分子としてインターロイキン 6 (IL-6) が有力であること、B) 膵がんの悪液質モデルとして膵がん神経浸潤マウスモデルが妥当であることを明らかにした。研究C) マウス悪液質モデルを用いた標的分子阻害効果の検討では、ヒト IL-6 受容体の阻害により神経浸潤が抑制される傾向にあったが、悪液質抑制効果については本研究期間では十分な結果が得られなかった。

研究成果の概要（英文）：Cancer cachexia is a major cause of death in advanced pancreatic cancer. Anti-cachectic drug concomitant with anti-tumor effect is useful in treatment for patients with pancreatic cancer. This study aimed to reveal the target molecule whose inhibition suppresses cachexia and tumor progression in a noble murine model for cachexia of pancreatic cancer. This study clearly showed interleukin-6 is promising target, and murine model of neural invasion using human pancreatic cancer cell is appropriated for the model of cancer cachexia. The inhibition of IL-6 pathways suppressed neural invasion, but it was difficult to confirm the improvement of cancer cachexia in our noble model of cancer cachexia.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科学一般（含心身医学）

キーワード：緩和医療

## 1. 研究開始当初の背景

悪液質は、体重減少、倦怠感、貧血、食欲不振、肝機能異常など、特徴的な病状悪化が複合した状態であり、予後と強く関連する。

進行膵がん患者では、悪液質を認めた患者は極めて予後不良であるが、有効な治療は確立していない。そのため、膵がんの有効な抗腫瘍剤は、抗腫瘍効果のみならず病状改善作用

を有しているものが有望であることが示唆される。炎症性サイトカインは、悪液質の原因分子として有力とされ、膵がんの浸潤を促進することが報告されている。したがって、炎症性サイトカインの阻害は、悪液質および予後を改善する可能性がある。悪液質の原因分子は、さまざま組織に影響を及ぼすと考えられる。また、その血中濃度は高値となり、病状の悪化と正の相関を示すことが予想される。この関係は、膵がん患者の血液検体および臨床情報を用いて解析可能である。これらの解析から得られた候補分子は悪液質の原因分子として有望であり、研究対象とする標的分子として妥当と考察する。

一方、我々は、膵がん組織の病理像と病態との関連性を検討し、膵がんでほぼ必発する神経浸潤は重要な予後因子であり、悪液質症状と相関することを初めて明らかにした。さらに、神経浸潤の詳細な検討を可能とするため、膵がん神経浸潤マウスモデルを確立した。このモデルでは、腫瘍は、比較的高い分化度を保持して神経中枢方向へ連続進展する。この特徴は、ヒト膵がん神経浸潤の組織像に類似している。よって、我々の動物モデルは、神経浸潤モデルとして妥当であるため、神経浸潤と悪液質の因果関係を評価する適切なモデルと考えられる。我々の動物モデルが悪液質モデルとして妥当であれば、炎症性サイトカインの阻害による、悪液質改善作用、および神経浸潤の抑制効果は解析可能である。これらの検討から、抗悪液質療法の臨床応用を目指すうえで、その効果を予測する重要な情報が得られると期待される。

本研究は、神経浸潤の悪液質への関与という新規知見に基づいている点で、独創的で新規性がある。また、独自に確立したマウスモデルは、臨床情報により選択された標的分子の機能解析ツールとして用いるだけでなく、浸潤様式が臨床像と類似しているため、臨床へのアプローチも可能である。本研究は、基礎と臨床が直結した研究開発であり、その成果は、膵がん患者の治療に寄与し、多くの人々が悪液質の改善による恩恵を受けられることが期待される。

## 2. 研究の目的

進行膵がんでは、悪液質を認めた患者は極めて予後不良であるが、有効な治療は確立していない。そのため、悪液質改善作用を有する抗腫瘍剤の有用性が強く示唆される。そこで、本研究は、炎症性サイトカインに着目して悪液質誘導分子を同定し、その阻害薬の開発を目指す。具体的には、A) 抗悪液質療法に適した標的分子の同定、B) マウス悪液質モデルの確立、C) マウス悪液質モデルにおける標的分子の作用と阻害効果の確認、を目的とする。

## 3. 研究の方法

抗悪液質療法の臨床応用を目指すうえで、炎症性サイトカインに着目して、病状と強く関わる分子を標的分子として選択し、マウス悪液質モデルを用いて標的分子の阻害による治療の可能性を見極めたいと考えている。具体的には、以下の研究を計画した。

A) 抗悪液質療法に適した標的分子の同定に関する臨床研究

A-1: 対象症例

切除不能膵がん症例で、初回治療として全身化学療法が予定されかつ投与可能である症例のうち、本研究への参加について患者本人から文書で同意が得られた患者

A-2: 悪液質誘導分子もしくは類縁する分子の測定項目 (表1)

炎症性サイトカインの血中濃度を測定し、全身状態の低下、倦怠感、体重減少、低栄養

手法	検査項目		
Multi-plex	顆粒球単球コロニー刺激因子 (GM-CSF)	インターフェロニン $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )	インターロイキン-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )
	インターロイキン-2 (IL-2)	インターロイキン-6 (IL-6)	インターロイキン-10 (IL-10)
	インターロイキン-10 (IL-10)	インターロイキン-12 (IL-12)	腫瘍壊死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )

、炎症反応の亢進、などの悪液質症状との相関を検討して、悪液質と強い関わりのあるサイトカインを抗悪液質療法に適した標的分子として同定する。

A-3: 病状に関する測定項目

広範囲かつ詳細に病状を評価するため、症状評価票を用いてスコア化された自覚症状、生体インピーダンス法により測定された体組成成分、および、一般臨床で採取可能な検査所見および臨床情報を記録する。

A-4: 解析

病状に関する測定項目と血中悪液質誘導分子濃度との関係を解析し、血中悪液質誘導分子濃度および測定項目により層別化される症例群の予後を検討する。

A-5: 抗悪液質療法に適した標的分子の選定

血中濃度を測定した悪液質誘導分子のうち、血中濃度高値が病状の悪化や不良な予後などに強く関わる分子を標的分子とする。

B) マウス悪液質モデルの確立

B-1: 膵がん神経浸潤マウスモデルの作製

SCID マウスの坐骨神経に、PBS 2.5  $\mu$ l にヒト膵癌細胞株である Capan-1 を  $2.5 \times 10^5$  個くわえた細胞浮遊液を直接注入する。また、比較対象群として、同様の細胞浮遊液を皮下に注入した皮下腫瘍モデル、同量の PBS を注入した Sham 手術群を作製する。

## B-2: 実験的悪液質の測定

実験的悪液質を、摂食量の低下を伴わない体重減少と定義し、皮下腫瘍モデルやSham手術群と比較して、膵がん神経浸潤マウスモデルが実験的悪液質を呈することを確認する。また、脂肪量および骨格筋量として、精巢上体周囲脂肪織およびヒフク筋の重量を測定し、体組成の構成成分の変動を明らかにする。

## B-3: 神経浸潤と相関する臨床像の確認

臨床において、神経浸潤は、CT画像における動脈周囲の軟部影で評価される。計画Aでの臨床研究において、CT画像における動脈周囲の軟部影と相関する臨床像を明らかにし、膵がん神経浸潤マウスモデルで認められる変化と共通する病状悪化が存在することを確認する。具体的には、体組成および肝由来の炎症性蛋白の産生、などを想定している。

## C) マウス悪液質モデルにおける標的分子の作用と阻害効果の確認

### C-1: 標的分子の発現解析

Sham手術群、神経浸潤モデルの血液および組織中mRNAを採取し、標的分子の血中濃度と組織中mRNA発現量を、ELISA法およびreal time RT-PCR法を用いてそれぞれ定量する。

### C-2: 標的分子の阻害による作用の確認

実験C-1において神経浸潤モデルの腫瘍において高発現が確認された標的分子の腫瘍細胞への作用を確認し、標的分子に関わる遺伝子をsiRNAにてノックダウンした細胞株を用いて神経浸潤モデルを作成し、標的分子の腫瘍細胞に対する阻害効果を確認する。

## 4. 研究成果

### A) 抗悪液質療法に適した標的分子の同定に関する臨床研究

解析対象となったのは進行膵がん 99例であった。全例に初発治療として全身化学療法が行われた。そのうち、測定が可能であった症例の炎症性サイトカイン血中濃度を表2に示す。

Multiplex法による測定により、従来測定が困難とされていたIL-1 $\beta$ の検出率は30.3%であり(中央値0.00pg/mL)、IL-6の検出率は96.9%であった(中央値1.465pg/mL)。

炎症性サイトカイン濃度の中央値をカットオフとして高値群と低値群に解析対象集団を群分けして全生存と無増悪生存の予後

表2. 炎症性サイトカインの血中濃度 (進行膵がん 99例)

Variables	N	Median (range) (pg/mL)	Mean (95%CI) (pg/mL)	Detection rate (%)
GM-CSF	97	0.00 (0.00-289.0)	7.15 (-0.68-15.0)	34.0
IFN- $\gamma$	99	0.00 (0.00-16.10)	0.83 (0.39-1.27)	22.2
IL-1 $\beta$	99	0.00 (0.00-28.3)	0.43 (-0.13-1.00)	30.3
IL-2 $\beta$	99	0.00 (0.00-26.70)	0.56 (0.01-1.11)	17.2
IL-6	96	1.465 (0.00-34.30)	3.63 (2.51-4.73)	96.9
IL-8	98	19.7 (2.31-206.0)	32.9 (25.0-40.7)	100.0
IL-10	99	1.77 (0.00-486.0)	13.5 (1.06-25.9)	89.9
IL-12	98	0.00 (0.00-1700.0)	184.0 (-10.1-63.6)	46.9
TNF- $\alpha$	99	7.46 (0.00-152.0)	10.0 (7.02-13.0)	99.0

因子解析を行ったところ、全生存および無増悪生存共に予後不良因子となったのはIL-6高値であった。

IL-6高値群は、performance statusの悪化、除脂肪体重の減少、倦怠感スコアなどの病状悪化を認め(図1)、貧血・低アルブミン血症・炎症反応の増悪も認められたため、悪液質と言える病状に陥っていると判断できる。

以上の結果より、IL-6高値の膵がん患者は悪液質を呈して予後不良となるためIL-6は

表3. 炎症性サイトカイン濃度による全生存と無増悪生存の予測能

全生存	Tested factor	N	単変量解析 P	多変量解析	
				HR (95%CI)	P
GM-CSF	High	32	0.021	1.14 (0.67-1.92)	0.636
IFN- $\gamma$	High	22	0.739		
IL-1 $\beta$	High	30	0.018	1.95 (1.18-3.23)	0.009
IL-2 $\beta$	High	17	0.073		
IL-6	High	49	<0.001	2.12 (1.33-3.38)	0.002
IL-8	High	49	0.040	1.23 (0.78-1.93)	0.370
IL-10	High	52	0.542		
IL-12	High	46	0.471		
TNF- $\alpha$	High	49	0.661		

無増悪生存	Tested factor	N	単変量解析 P	多変量解析	
				HR (95%CI)	P
GM-CSF	High	32	0.009	1.32 (0.80-2.19)	0.279
IFN- $\gamma$	High	22	0.717		
IL-1 $\beta$	High	30	0.012	1.65 (0.97-2.80)	0.067
IL-2 $\beta$	High	17	0.047	1.28 (0.70-2.33)	0.418
IL-6	High	49	0.007	1.59 (1.03-2.46)	0.039
IL-8	High	49	0.051		
IL-10	High	52	0.304		
IL-12	High	46	0.777		
TNF- $\alpha$	High	49	0.841		

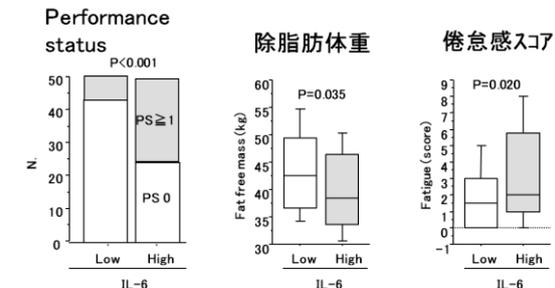
HR: Hazard ratio, CI: Confidence interval, Survival time data were analyzed using the Cox hazard regression model. Level of significance was set at P < 0.05.

抗悪液質療法の標的分子として有力と考えられた。

### B) マウス悪液質モデルの確立

膵がん神経浸潤マウスモデル(神経浸潤モデル N=8)、膵がん皮下腫瘍マウス(皮下腫瘍マウス N=8)、神経内PBS注入マウス(PBS

図1. IL-6高値群で悪化している症状

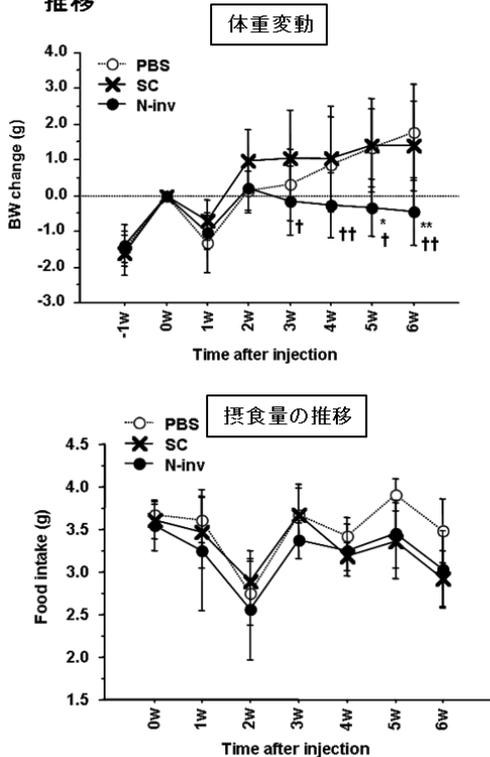


マウス N=4)を作製し、6週間まで体重と食事を経時的に測定すると、神経浸潤マウスは、皮下腫瘍やPBSマウスと比べて、摂食量の減

少を伴わない体重減少を認めた(図2)。

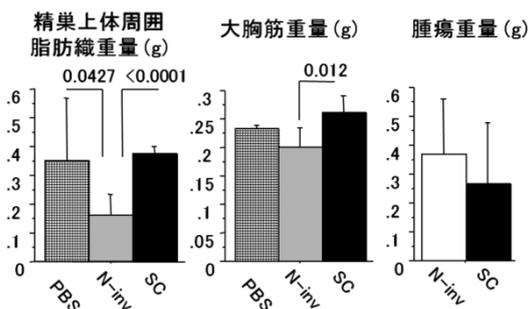
神経浸潤モデルは、筋肉や脂肪組織の重量が低下しており(図3)、図2の結果を併せて悪液質モデルとして妥当である。また、神経浸潤モデルと皮下腫瘍マウスの腫瘍重量に差がなかったことから、神経内に膵がん細胞が存在することが悪液質発症に重要な役割を果たすことが示唆された(図3)。

図2. マウス神経浸潤モデル(N-inv)、皮下腫瘍マウス(SC)、PBS神経注入マウス(PBS)での、体重変動と摂食量の推移



進行膵がん72例を用いて、CT画像で評価された神経浸潤の有無と病状の重症度との関連を検討した。神経浸潤が高度な症例では、体重減少、脂肪量の検証、高度の食欲不振と疼痛を認めた(図4)。炎症反応の指標であるC反応性蛋白の血中濃度は、神経浸潤群で高い傾向を認めた。よって、進行膵がん患者においても、神経浸潤と悪液質との関連が示

図3. 6週間経過した、マウス神経浸潤モデル(N-inv)、皮下腫瘍マウス(SC)、PBS神経注入マウス(PBS)での、腫瘍と臓器の重量

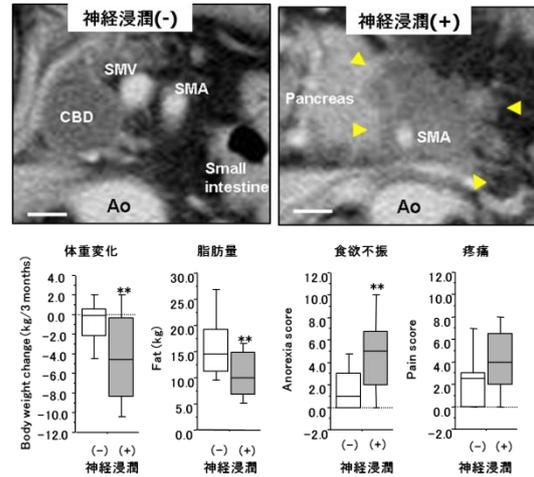


唆された。

C) マウス悪液質モデルにおける標的分子の作用と阻害効果の確認

膵がん神経浸潤マウスモデル(神経浸潤モデル N=6)、膵がん皮下腫瘍マウス(皮下腫瘍マウス N=8)、神経内 PBS 注入マウス(PBS マウス N=4)を作製し、4週後に体重、血中マ

図4. 進行膵がん症例における神経浸潤の有無と病状の関連



ウス IL-6 濃度、腫瘍マウス IL-6mRNA 発現を測定したところ、神経浸潤モデルは体重減少とマウス IL-6 血中濃度上昇を認め(図5)、神経浸潤は皮下腫瘍と比べて腫瘍重量は増加しないもののヒト IL-6mRNA 発現の上昇を認めた(図6(次ページ))。

図5. 各種モデルでの、4週間の体重変化とマウスIL-6血中濃度

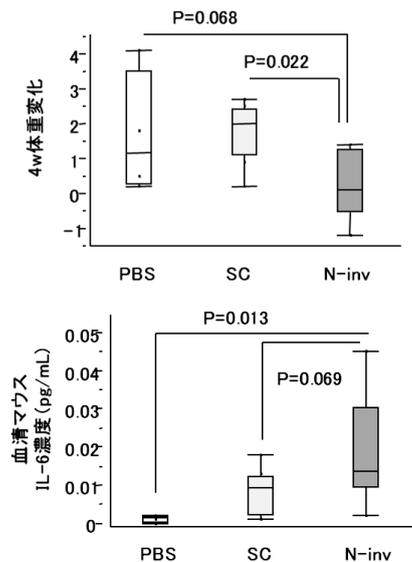
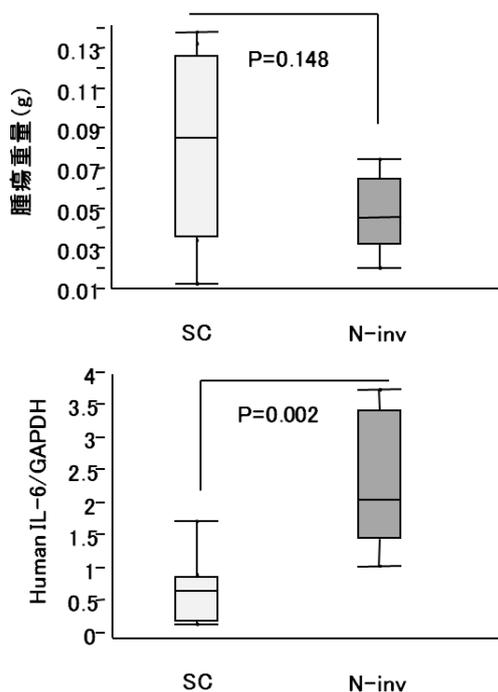
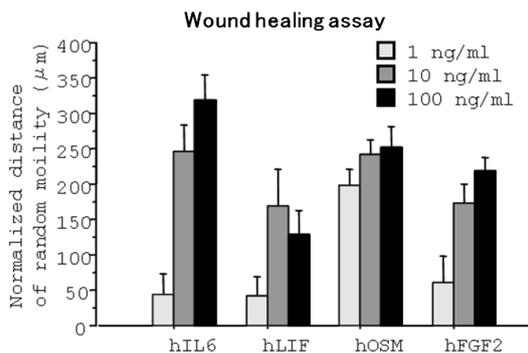


図6. 腫瘍モデルでの、腫瘍重量と腫瘍ヒトIL-6mRNA発現



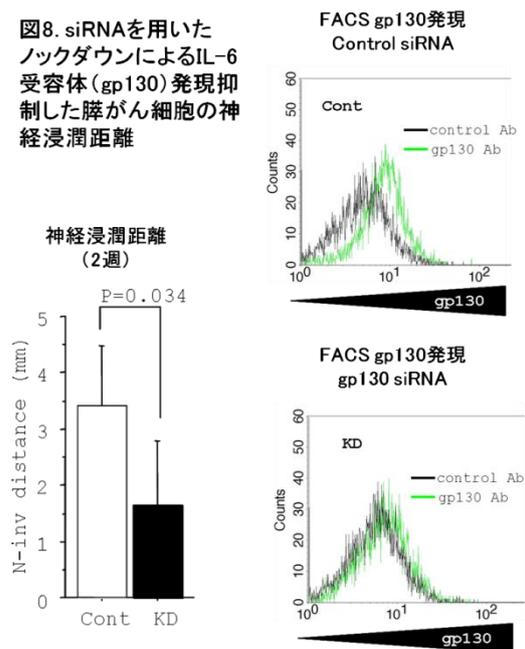
IL-6 刺激による膵がん細胞 (Capan-1) の遊走能への影響を検討するため、リコンビナントヒト IL-6 を用いた wound healing assay および boyden chamber を用いたケモタキシス assay を行った。いずれのアッセイ系でも IL-6 の濃度依存性に遊走能が亢進した (図 7.)。IL-6 刺激による細胞増殖への影響も検討したが、明らかな作用を認めなかった。

図7. 膵がん細胞の遊走能に対するヒトIL-6の影響



IL-6 刺激は膵がん細胞の遊走能を亢進させるため、IL-6 に対する細胞内キナーゼを有する受容体である gp130 mRNA を siRNA にてノックダウンした膵がん細胞を用いて神経浸潤モデルを作製した。ノックダウンによる膜表面 gp130 蛋白発現は、FACS にて評価した (図 8)。膵がん細胞の gp130 mRNA ノックダウンにより、神経内注入 2 週後の神経浸潤距離は有意に抑制された (図 8)。よって、IL-6 経路の阻害により神経浸潤が抑制されることが明らかとなった。

図8. siRNAを用いたノックダウンによるIL-6受容体 (gp130)発現抑制した膵がん細胞の神経浸潤距離



次に、shRNA を用いてヒト IL-6 mRNA をノックダウンする膵がん細胞 (Capan-1) の作製を試みたが、研究期間内では安定した IL-6 mRNA ノックダウンされた細胞を調製することが困難であった。

また、IL-6 経路を阻害する薬剤を神経浸潤モデルに投与した治療実験を行ったが、研究期間内では安定したデータが得られなかった。

上記 2 つの実験は、研究期間終了後も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 3 件)

1. Imoto A, Mitsunaga S, Neural invasion induces cachexia via astrocytic activation of neural route in pancreatic cancer, Int J Cancer, 査読有、Epub ahead of print, 2012, doi: 10.1002/ijc.27594、
  2. Mitsunaga S, Nerve invasion distance is dependent on laminin gamma2 in tumors of pancreatic cancer, Int J Cancer, 査読有、Vol.127, No. 4, 2010, pp.805-819、
  3. Morizane C, Mitsunaga S, Construction and Validation of a Prognostic Index for Patients With Metastatic Pancreatic Adenocarcinoma, Pancreas, 査読有、Vol. 40, No. 3, 2011, pp.415-421、
- [学会発表] (計 10 件)

1. Mitsunaga S. Neural invasion induces cachexia and pain in pancreatic cancer. 6<sup>th</sup> Cachexia Conference December 8-10, 2011 Milan, Italy
2. 光永修一. 進行膵がんにおいて、病状悪

化を認める IL-6 高値群のうち IL-1 高値群は予後不良である第 42 回日本膵臓学会大会 2011 年 7 月 29 日青森

3. Mitsunaga S. Use of elevated IL-1 to predict prognosis in patients with advanced pancreatic cancer with high IL-6 and wasting condition. 2011 ASCO Annual Meeting June 5-8, 2011 Chicago, U.S.A.

4. 光永修一. 膵がんにおける抗 IL-6 療法の意義第 84 回日本内分泌学会学術集会 2011 年 4 月 23 日神戸市

5. Mitsunaga S. Clinical significance of the elevation of serum IL-6 level in advanced pancreatic cancer (Abstract No:181) 2011 Gastrointestinal Cancers Symposium 2011/1/20-22 San Francisco

6. 光永修一. 進行膵がんにおいて、血中インターロイキン 6 濃度の経時的上昇は、腫瘍量および悪液質症状の増悪と関連する. 第 31 回日本臨床薬理学会年会. 2010/12/1-3 京都

7. 光永修一. Astrocytic activation by neural invasion modulates pain in pancreatic cancer. (膵がん患者の疼痛には神経浸潤に由来する脊髄アストロサイトの活性化が関与する) 第 69 回 日本癌学会学術総会. 2010/09/22-24 大阪

8. Mitsunaga S. Low Level of Circulating IL-6 is Associated with Neutropenia of Gemcitabine in Advanced Pancreatic Cancer. 第 14 回国際膵臓学会 第 41 回日本膵臓学会大会合同会議. 2010/07/11-13 福岡

9. Mitsunaga S. Role of IL-6 in cachexia progression in advanced pancreatic cancer. (Abstract No:4101) 2010 ASCO Annual Meeting June 4-8, 2010 Chicago

10. 光永修一 進行膵がん患者において、インターロイキン 6 の血中濃度は、C 反応性蛋白、アルブミン、倦怠感と相関する. 第 8 回日本臨床腫瘍学会学術集会 2010/03/18-19 東京

[図書] (計 2 件)

光永修一、医学図書出版株式会社、特集膵・胆道癌における分子標的治療の動向 膵癌における IL-6 の発現と治療応用、胆と膵、2010

光永修一、科学評論社、膵がん患者の「るいそう」と IL-6、腫瘍内科、2010

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

名称：膵がん治療剤

発明者：光永修一

権利者：光永修一・中外製薬株式会社

種類：特願

番号：2010-122838

出願年月日：2010/5/28

国内外の別：国内

名称：膵癌治療剤

発明者：光永修一

権利者：独立行政法人国立がん研究センター

中外製薬株式会社

種類：特許出願

番号：PCT/JP2011/62191

出願年月日：2011. 5. 27

国内外の別：外国 (国際)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

光永 修一 (MITSUNAGA SHUICHI)

独立行政法人国立がん研究センター・臨床

開発センター・研究員

研究者番号：20466197

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：