

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 25 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592077

研究課題名(和文) 悪性胸膜中皮腫における抗IL-6受容体抗体療法の開発

研究課題名(英文) Interleukin-6 (IL-6) receptor antibody therapy to malignant pleural mesothelioma

研究代表者

松本 成司 (Matsumoto, Seiji)

兵庫医科大学・医学部・講師

研究者番号：60412011

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：Interleukin-6 (IL-6)は、関節リウマチなどに深く関与し、IL-6受容体抗体トシリズマブ(アクテムラ)は関節リウマチ治療に用いられている。今回、悪性胸膜中皮腫に対するトシリズマブの効果を評価した。トシリズマブは単剤で10～25%の増殖抑制を認めたが、ペメトレキセド、シスプラチン、トシリズマブの組み合わせでは、3剤併用投与は2剤併用より高い抗腫瘍効果を認めた。また、MEK阻害剤との併用では、MEK阻害剤単剤と比較し10～12%の増殖抑制効果の増加を認めた。p-Stat3はトシリズマブ単剤で1/3～1/5に減少、MEK阻害剤を追加した場合、さらに約30～50%減少した。

研究成果の概要(英文)：Interleukin-6 (IL-6) is associated with rheumatoid arthritis. Tocilizumab (Actemra : a humanized anti-IL-6R antibody) is used for rheumatoid arthritis therapy. We investigated the effect of tocilizumab to malignant pleural mesothelioma. Tocilizumab suppressed malignant pleural mesothelioma cell growth and reductions were 10-25%. We compared the combination effect of pemetrexed, cisplatin and tocilizumab. The combination of pemetrexed, cisplatin and tocilizumab was more effective than any other two drugs combinations. We have already confirmed the effect of MEK inhibitor. We checked the combination effect of tocilizumab and MEK inhibitor. The combination of tocilizumab and MEK inhibitor suppressed malignant pleural mesothelioma cell growth more than a single administration of MEK inhibitor. Tocilizumab reduced the phospho-Stat3 expression to 1/3-1/5. The combination of tocilizumab and MEK inhibitor reduced more the phospho-Stat3 expression.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：悪性胸膜中皮腫

1. 研究開始当初の背景

悪性胸膜中皮腫は石綿暴露により発生、胸壁を置換するように胸腔内を進展し、自覚症状として胸水貯留、それに伴う呼吸困難、疼痛、全身倦怠感を認める。本学の中野らは血清中 IL-6 値が肺癌患者より悪性胸膜中皮腫患者において高値であることを報告し(Br J Cancer 1998 907-912)、H Yeh らは肺癌において IL-6 が Stat 3 を介し VEGF を増加させ胸水産生を促進することを認めている(Oncogene 2006 4300-4309)。本学の安光らは悪性胸膜中皮腫患者において、血清中 VEGF は健康人と比較し高値を示し、病状の進行と共に上昇することを報告している

(J Thorac Oncol 2010 479-83)。

in vitro において安達らは IL-6 レセプターモノクローナル抗体投与により悪性胸膜中皮腫細胞株の増殖抑制効果を認めた(Int J Cancer 2006 1303-1311)。

IL-6 は、炎症反応、種々の細胞の分化誘導や増殖、免疫反応の調節あるいは血小板増多等など、多様な生理作用を有しており、関節リウマチ、全身型若年性特発性関節炎、キャッスルマン病の病態に深く関与していることが知られている。

トシリズマブ(アクテムラ)はヒト化抗ヒト IL-6 レセプターモノクローナル抗体であり国産初の抗体医薬品として製造承認を取得、キャッスルマン病、関節リウマチ、多関節に活動性を有する若年性特発性関節炎、全身型若年性特発性関節炎に対して安全性と有効性が認められ(西本ら Blood 2008 3959-3964、西本ら Blood 2005 2627-2632)、日常の臨床に用いられている。

以上より、悪性胸膜中皮腫において IL-6 は IL-6 / Stat3 シグナル伝達を活性化することで、細胞増殖を促進し、また VEGF 産生に関与していることが推察される。IL-6 シグナル伝達を IL-6 レセプターモノクローナル抗体投与により遮断することで悪性胸膜中皮腫細胞株の増殖抑制効果が得られると考えられるため、本研究を企画した。

2. 研究の目的

この研究は悪性胸膜中皮腫における IL-6 の作用を検討し、抗 IL-6 受容体抗体トシリズマブ(アクテムラ)投与による抗腫瘍効果を評価し、臨床試験への導入とすることが目的である。そのために以下を検討する。

(1) 悪性胸膜中皮腫における IL-6 の作用 (IL-6 オートクラインによる増殖促進、Stat 3 を介した VEGF 産生)

(2) 悪性胸膜中皮腫細胞株培地中、患者血性中の IL-6、VEGF 濃度

(3) 悪性胸膜中皮腫に対するトシリズマブ(アクテムラ)作用 (IL-6 受容体下流のシグナル伝達の抑制、VEGF 産生抑制および抗腫

瘍効果)

3. 研究の方法

(1) 悪性胸膜中皮腫に対するトシリズマブの効果検討(in vitro)

悪性胸膜中皮腫細胞株(H2052, H211, H28 H226, H2452)をそれぞれ、96 well プレートに 5.0×10^3 / well ずつまき、24 時間後、各濃度に希釈した薬剤を投与した。72 時間の後、Cell Counting Kit-8 (Dojindo Molecular Technologies, Inc.)を加え、WST-8 assay を行った。

(2) 悪性胸膜中皮腫に対するトシリズマブ、アリムタ、シスプラチン単剤、または併用の効果検討

H2052 を 96 well プレートに 5.0×10^3 / well ずつまき、24 時間後、各濃度に希釈した薬剤を投与した。72 時間の後、Cell Counting Kit-8 (Dojindo Molecular Technologies, Inc.)を加え、WST-8 assay を行った。

まず、ペメトレキセド、10nM、シスプラチン 100nM、トシリズマブ 2mg/ml の単剤での評価を行い、次に 2 剤ずつ併用試験を行った。最後に 3 剤併用試験を行いそれぞれの細胞増殖抑制効果を比較、検討した。

(3) 悪性胸膜中皮腫細胞株のマウス皮下モデルの確立

悪性胸膜中皮腫細胞株(H2052, H211, H28 H226, H2452)をそれぞれ、 5.0×10^6 個をヌードマウスの皮下に接種し、定着率および定着後の生育を観察した。

(4) 悪性胸膜中皮腫手術患者の経時的血中サイトカインの測定

悪性胸膜中皮腫患者に対する手術(胸膜肺全摘術または肺剥皮術)を施行された患者の術前、術後の血中サイトカインの測定を行った。測定したサイトカインは 12 種類(IL1a, IL1b, IL2, IL5, IL6, IL10, IL12, IL13, Gm-csf, TNFa, G-csf, TGF-b1)を ELISA 法にて測定した。

(5) トシリズマブと他の分子標的薬剤との併用効果

WST-8 による薬剤抗腫瘍効果測定
悪性胸膜中皮腫細胞株を 96 well プレートに 5.0×10^3 / well ずつまき、24 時間後、MEK 阻害剤(Trametinib)またはトシリズマブを投与した。72 時間の後、Cell Counting Kit-8 (Dojindo Molecular Technologies, Inc.)を加え、WST-8 assay を行った。

MEK 阻害剤、トシリズマブ単剤の場合と MEK 阻害剤、トシリズマブ併用投与と比較した。

Western blot (p-Stat3)

悪性胸膜中皮腫細胞株を 6 well プレートに

5.0 × 10³ / well ずつまき、24 時間後、MEK 阻害剤 (Trametinib) またはトシリズマブ 5ug/ml を投与後、蛋白を抽出した。p-Stat3 抗体は Phospho-Stat3 (Tyr705) (D3A7) XP Rabbit mAb (Cell Signaling Technology) を使用した。

4. 研究成果

(1) 悪性胸膜中皮腫に対するトシリズマブの効果検討 (in vitro)

悪性胸膜中皮腫細胞株 H2052, H211, H28 H226, H2452 に対してトシリズマブ (最大 5ug/ml) を投与した。いずれの細胞においても増殖抑制効果は数 ~ 10% の増殖抑制効果であった。

(2) 悪性胸膜中皮腫に対するトシリズマブ、アリムタ、シスプラチン単剤、または併用の効果検討

コントロールに対してペメトレキセド、10nM, シスプラチン 100nM, トシリズマブ 2mg/ml のそれぞれ単剤投与で 25% の増殖抑制を認めた。次にペメトレキセド 10nM, トシリズマブ 2mg/ml の併用投与では 25% の増殖抑制、シスプラチン 100nM, トシリズマブ 2mg/ml の併用投与では 37% の増殖抑制を認めた。これはペメトレキセド 10nM, シスプラチン 100nM 併用投与と同等の効果であった。最後にペメトレキセド 10nM, シスプラチン 100nM, トシリズマブ 2mg/ml の 3 剤併用投与では 60% の増殖抑制を認めた。

(3) 悪性胸膜中皮腫細胞株のマウス皮下モデルの確立

現在保有する悪性胸膜中皮腫細胞株 5 種類についてそれぞれ 500 万個をヌードマウスの皮下に接種し、皮下腫瘍の形成を観察した。そのうち H226 が安定的に皮下腫瘍を形成することを確認出来た。

(4) 悪性胸膜中皮腫手術患者の経時的血中サイトカインの測定

悪性胸膜中皮腫患者の血液中 IL-6 については高値であり、予後との関連性は報告されている。しかし手術侵襲ストレスおよび術後経時的な変化に関する報告は認められない。IL-6 は術後翌日に一過性の上昇を認めたが、術後 7 日目には低下していた。G-csf は術後翌日に高値を示し、術後 7 日目にもわずかではあるが高値を認めた。また、TGF-β1 は術前から高値を示し、術後も同様に高値を維持していた。他のサイトカインについては有意な変化は認められなかった。

(5) トシリズマブと他の分子標的薬剤との併用効果

我々は悪性胸膜中皮腫細胞株に対する MEK 阻害剤の抗腫瘍効果を確認出来ている。MEK 阻害にて Stat3 活性抑制を認めているため、トシリズマブ投与による IL-6/Stat3 抑制効果

の増強が予想される。そのため、トシリズマブと MEK 阻害剤の併用効果を WST アッセイおよび Stat3 活性をウェスタンブロットで評価した。

WST-8 による薬剤抗腫瘍効果測定

MEK 阻害剤 (Trametinib) にトシリズマブ 5ug/ml を併用した場合、MEK 阻害剤単剤と比較し、H226 で 10%、H2052 で 12% の増殖抑制効果の増加を認めた。

Western blot (p-Stat3)

211H の場合、コントロールと比較し、トシリズマブ 5ug/ml 投与で p-Stat3 は 1/5 に減少、MEK 阻害剤を追加した場合、さらに約 30% 減少した。H2052 の場合、トシリズマブ 5ug/ml 投与で p-Stat3 は 1/3 に減少、MEK 阻害剤を追加した場合、さらに約 50% 減少した。

現在、悪性胸膜中皮腫細胞株のマウス皮下モデルを用いた悪性胸膜中皮腫に対すトシリズマブの抗腫瘍効果を検証中である。

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 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

松本 成司 (MATSUMOTO, Seiji)

兵庫医科大学・医学部・講師

研究者番号：60412011

(2)研究分担者

長谷川 誠紀 (HASEGAWA, Seiki)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：10252438

近藤 展行 (KONDOU, Nobuyuki)

兵庫医科大学・医学部・講師

研究者番号：50402889

西本 憲弘 (NISHIMOTO, Norihiro)

東京医科大学・医学部・教授

研究者番号：80273663

多久和 輝尚 (TAKUWA, Teruhisa)

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号：00412049

黒田 鮎美 (KURODA, Ayumi)

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号：90642570

(3)連携研究者

()

研究者番号：