

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861169

研究課題名(和文)抗TNF-a抗体の発癌に与える影響 - 大腸癌を抑制する? -

研究課題名(英文)Effect of anti TNF-a antibody against colon cancer : Does anti TNF-a antibody inhibits growth of colon cancer?

研究代表者

羽根田 祥 (Haneda, Sho)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・大学院非常勤講師

研究者番号：20436140

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：クローン病の大腸癌発生率は一般と比べて高いことはよく知られている。一方、クローン病の治療薬として抗TNF-a抗体が近年頻用されているが、抗TNF-a抗体が癌の発生や進展に関与している可能性が指摘されているが、まだ結論が得られていない。本研究では抗TNF-a抗体が大腸癌細胞株の増殖能に対して及ぼす影響を検討することを目的とした。

各種大腸癌細胞株にTNF-aのみを投与したとき、次いでTNF-aと抗TNF-a抗体両方を投与した時の癌細胞株の増殖能をCCK-8 assayを用いて検討したところ、各細胞株はTNF-aでは増殖能が抑制され、抗TNF-a抗体では増殖が促進されることが判明した。

研究成果の概要(英文)：[Background and Aim] The risk of incidence of colorectal cancer in Crohn's disease is high. On the other hand, TNF-a inhibitors are frequently used for the treatment of Crohn's disease. There may be a risks for cancer emergence by using anti TNF-a drugs, but it is still controversial. The aim of the present study was to investigate the effect of anti TNF-a antibody for growth of colorectal cancer.

[Materials and Method] We used colon cancer cell lines (COLO205, DLD1, HCT8, HCT116, HT29) and stimulate those cells with TNF-a, anti TNF-a antibody. Proliferation was determined by using CCK-8 assay.

[Results and Conclusions] TNF-a reduced growth of colon cancer cells, while blockage of TNF-a by anti TNF-a antibody reduced progression of colon cancer cells. Thus, TNF-a plays a profound role in malignancy of colorectal cancer, and inhibition of TNF-a represents a promising therapeutic option.

研究分野：下部消化管

キーワード：Crohn's disease anti TNF-a colon cancer

## 1. 研究開始当初の背景

原因不明の慢性炎症腸疾患であるクローン病は難病の特定疾患に指定されており、根治治療法はいまだない。抗 TNF- $\alpha$ 抗体製剤や副腎皮質ステロイド剤、5-ASA 製剤などの抗炎症薬をはじめとする薬物治療で寛解状態をなるべく維持し、悪化時には手術療法を行って治療していく。10~20 代の若年発症が多いことがこの疾患の特徴であり、生涯にわたり治療を続けていく必要がある。手術をしても再発し、手術は経過中に複数回施行されることが多く、腸管切除を繰り返すことによる短腸症候群を発症する患者も少なくない。現在のクローン病の治療は抗 TNF- $\alpha$ 抗体をはじめとする複数の治療薬を使い分け、組み合わせで使用していくことによりいかにこの寛解状態を維持して手術回数を減らして QOL を高めていくかということにかかっている。

クローン病患者における大腸癌の発生は、一般に比べて高率である。慢性炎症が発癌に関与することはよく知られており、それには種々の炎症性サイトカインが作用すると言われているが、炎症性発癌のメカニズムはいまだ不明な点も多い。

抗 TNF- $\alpha$ 抗体は、2002 年にクローン病でインフリキシマブが適応になって以降、炎症性腸疾患においてその適応は拡大しており、現在ではその高い有効性から、特にクローン病治療において不可欠な薬剤となっている。わが国における炎症性腸疾患の患者数は年々増加しており、最近潰瘍性大腸炎やペーチェット病にも抗 TNF- $\alpha$ 抗体の適応が広がられたことから、今後抗 TNF- $\alpha$ 抗体を使用する患者の数はますます増えていくと考えられる。

こうした中、抗 TNF- $\alpha$ 抗体が発癌の発生や進展に関与する可能性が以前から指摘されている。当科では、クローン病に対しインフリキシマブが投与された後、大腸癌と診断された症例を 5 例経験しているが、5 例ともすでにリンパ節転移や遠隔転移を伴っており、3 例は 2 年以内に死亡している。インフリキシマブを投与されていない患者に発生した大腸癌に比べ、進行した状態で診断される、予後が不良である傾向がみられた。

抗 TNF- $\alpha$ 抗体と種々の癌発生に関してはこれまで多くの研究がなされているが、抗 TNF- $\alpha$ 抗体が発癌のリスクであるとするものと、逆に発癌を抑えるとするもののがみられ、結論は出ていない。TNF- $\alpha$ は細胞内シグナル分子 NF- $\kappa$ B を介して発癌に促進的に作用することが知られており、抗 TNF- $\alpha$ 抗体が結果的に大腸癌発生(炎症性発癌)を予防しうるとする科学的根拠ともなっている。抗 TNF- $\alpha$ 抗体により癌の発生が抑制され

たとする基礎的研究は種々の癌でみられる。ただ、当科で経験した、インフリキシマブ投与後に大腸癌と診断された症例は、いずれもインフリキシマブ投与開始から大腸癌の診断までの期間が長くなく、インフリキシマブ投与開始時にはすでに癌が存在していた可能性が高い。すなわち、インフリキシマブが、すでに発生している大腸癌の増殖や浸潤・転移にどう関与するかどうかが重要である。

## 2. 研究の目的

クローン病にはいまだ根治治療法はなく、患者の多くは手術を繰り返しながら生涯治療を続けていくことを必要としている。抗 TNF- $\alpha$ 抗体は近年クローン病をはじめとした炎症性腸疾患の治療に広く用いられており、高い有効性がある一方で大腸癌の発生や進展に関与する可能性が以前から指摘されている。しかしこれまでは大腸癌への関与を明らかにした研究報告はなく、逆に発癌を抑えるという報告もみられ、結論が得られていない。本研究の目的は、抗 TNF- $\alpha$ 抗体の大腸癌に対する作用を解明することである。

## 3. 研究の方法

### (1)大腸癌細胞株を用いた研究

当科で保有している種々の大腸癌細胞株を抗 TNF- $\alpha$ 抗体(アダリムマブ™を予定している。以下同様)により刺激した群と刺激しない群とにわけ、両群をそれぞれ 24~72 時間培養し、培養後の細胞数(増殖能)浸潤能を測定する。増殖能は WST-8-based colorimetric assay を用いて、浸潤能は matrigel invasion chamber を用いて行い、それぞれ両群で比較する。

### (2)炎症性発癌の動物モデルを用いた研究

発癌物質である Azoxymethane(AOM)の単回腹腔内投与(10mg/kg)およびその後の Dextran sulfate sodium(DSS)(0,75%)の経口投与による大腸の炎症性発癌モデル(DSS/AOM colitic cancer model)を作成する。

作成した AOM / DSS マウスを抗 TNF- $\alpha$ 抗体投与群と非投与群にわけ、投与群にはアダリムマブを 2 週間隔で皮下投与する。投与後 1 カ月後にマウスから大腸癌組織を採取し、抗 TNF- $\alpha$ 抗体投与群と非投与群で癌の進展に差が生じるかどうかを調べる。

### (3)大腸癌細胞を移植した動物を用いた研究

(1)で変化のみられた大腸癌細胞株をマウスの皮下に移植する。移植した細胞株が腫瘍増殖する指摘条件を検討する。抗 TNF- $\alpha$ 抗体投与群と非投与群にわけ、腫瘍増殖がはっきり見られるようになった時期(おおむね 100 日前後と推測される。検討後に決定する)に移植した癌の進展に差が生じるかどうかを調べる。

#### 4. 研究成果

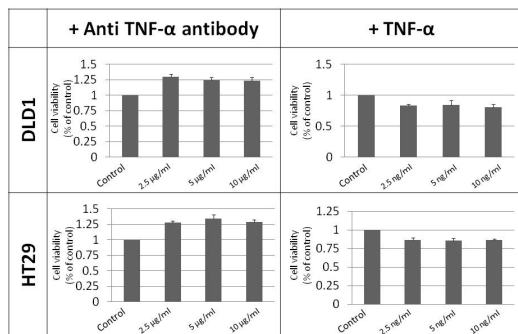
当初の研究計画に沿って、癌細胞株を用いた *in vitro* の実験およびマウスを用いた *in vivo* の実験を行った。

##### (1) *in vitro* の系

TNF- $\alpha$  が発現していることが知られている大腸癌細胞株 6 種 (COLO205, DLD1, HCT8, HCT116, HT29) と、TNF- $\alpha$  の発現量が比較的多いことが知られている膵癌細胞株 1 種 (BxPC3) をもちいて抗 TNF- $\alpha$  抗体、TNF- $\alpha$  にそれぞれ暴露した時の細胞増殖能を検討した。

DLD1, HT29

2 種の大腸癌細胞株 DLD1 と HT29 について CCK-8 assay を用いて細胞増殖能をそれぞれ検討した。DLD1、HT29 とともに TNF- $\alpha$  単独だと細



胞増殖が抑制され、TNF- $\alpha$  に抗 TNF- $\alpha$  抗体を加えて投与すると細胞増殖が促進されていたという結果が得られた(図 1)。

(図 1) DLD1, HT29 に対する CCK-8 assay

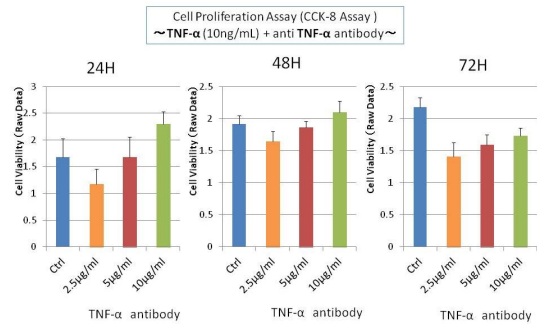
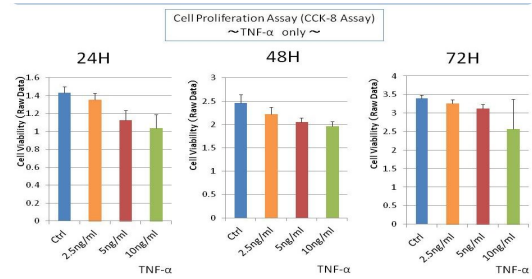
BxPC3, HCT8

次に、膵癌細胞株 BxPC3 および大腸癌細胞株 HCT8 についておこなった CCK-8 assay の結果を図 2・3 に示す。

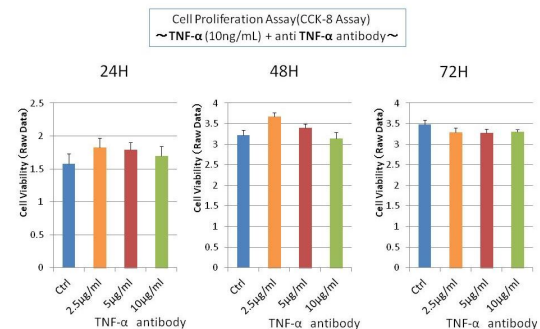
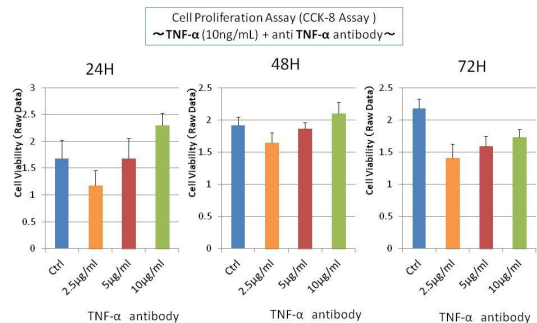
まず、BxPC3 に TNF- $\alpha$  のみを各濃度 (2.5 $\mu$ g/ml, 5 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml) で暴露した場合について 24 時間後、48 時間後、72 時間後にそれぞれ cell viability を測定して増殖能を検討した。次いで、TNF- $\alpha$  (10 $\mu$ g/ml) に加えて各濃度 (2.5 $\mu$ g/ml, 5 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml) の抗 TNF- $\alpha$  抗体に暴露してそれぞれ cell viability を測定して増殖能を検討した(図 2)。

次に、HCT8 についても同様にして実験を行い、TNF- $\alpha$  単独の場合、TNF- $\alpha$  に抗 TNF- $\alpha$  抗体を加えて細胞株に暴露した場合の細胞増殖能を測定した(図 3)。

いずれの細胞株も TNF- $\alpha$  単独では濃度依存的に細胞増殖が抑制され、TNF- $\alpha$  に抗 TNF- $\alpha$  抗体を加えて暴露すると細胞増殖が促進されていた。



(図 2) BxPC3 に TNF- $\alpha$  単独(上段)、TNF- $\alpha$  + 抗 TNF- $\alpha$  抗体(下段)を投与した時の CCK-8 assay



(図 3) HCT8 に TNF- $\alpha$  単独(上段)、TNF- $\alpha$  + 抗 TNF- $\alpha$  抗体(下段)を投与した時の CCK-8 assay

以上の結果から、今回の実験で検討した癌細胞株 (DLD1、HT29、BxPC3、HCT8) に対しては TNF- $\alpha$  には細胞増殖を抑制する効果があり、抗 TNF- $\alpha$  抗体には TNF- $\alpha$  の働きを抑制することによって癌細胞株の成長が促進される方向に働く作用があるのではないかと推察された。

(2) in vivo の系

in vivo の実験系としては 炎症性発癌動物モデルとして AOM / DSS マウスを作製し、抗 TNF-a 抗体を投与して生体内で実際の癌抑制効果を検討する実験と、マウスの皮下に大腸癌細胞を移植し、そのうえでマウスに抗 TNF-a 抗体を投与して癌細胞の増殖を計測する実験を施行する予定であった。

まず AOM / DSS マウスの作成として 5 匹のマウスに AOM(10mg/kg)の腹腔内投与をおこなった。現在初回投与を行ったところである。その後そのマウスに 0.75%DSS を服用させ、炎症性発癌モデルのマウスを作製する予定であったが、AOM / DSS マウス作製には 100 日間を必要とするため、この研究期間中に AOM / DSS マウスを作製するまでには至らなかった。

この 2 年間の研究期間では in vivo の実験までは残念ながら終了することができなかった。しかし、invitro の系であっても大腸癌細胞株に対する TNF-a、抗 TNF-a 抗体の働きを検討した報告はこれまでにされておらず、十分に意義のある結果が得られたと考えている。本研究期間は終了したものの、現在も研究は継続中である。

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 4 件)

Funayama Y, Takahashi K, Ikezawa F, Haneda S, Saijo F, Saito M, Tokumura H. Parastomal hernia repair with the Sugarbaker technique using e-PTEE mesh. Surgery Today, 2015 (Epub ahead of print) DOI: 10.1007/s00595-015-1137-z 査読あり

Kajiwarra T, Miura K, Ohnuma S, Shimada M, Komura T, Toshima M, Kohyama S, Kudoh K, Haneda S, Musha H, Naitoh T, Shirasaka T, Unno M.

Gastrointestinal toxicities of 5-fluorouracil increase the proportion of regulatory T cells in intestinal tract: advantages of alternate-day s-1 administration.

International journal of clinical oncoloty, 2015 (Epub ahead of print)

DOI: 10.1007/s10147-015-0791-x

査読あり

Komura T, Miura K, Shirasaka T, Ohnuma S, Shimada M, Kajiwarra T, Fujishima F, Philchenkov A, Nakagawa K, Kudoh K, Haneda S, Toshima M, Kohyama A, Musha H, Naitoh T, Shibata C, Unno M

Usefulness of alternate-day administration of S-1 ad leucovorin in a xenograft mouse model of colorectal cancer: a shorter drug-free interval leads to more efficient antitumor effects.

International journal of clinical oncoloty, 20(1), 117-125, 2015

DOI: 10.1007/s10147-014-0699-x.

査読あり

Kawakami Y, Endo K, Ishii T, Haneda S, Fujishima F, Kakuta Y, Shiga H, Kinouchi Y, Shimosegawa T.

Ileocecal ulcers accompanied by relapsing polychondritis: a case report.

Springerplus, Dec 7, 3, 2014

DOI: 10.1186/2193-1801-3-714

査読あり

[学会発表](計 3 件)

羽根田 祥, 長尾 宗紀, 工藤 克昌, 神山 篤史, 森川 孝則, 武者 宏昭, 阿部 友哉, 田中 直樹, 大沼 忍, 佐々木 宏之, 青木 豪, 唐澤 秀明, 元井 冬彦, 吉田 寛, 林 洋毅, 中川 圭, 岡田 恭穂, 片寄 友, 内藤 剛, 柴田 近, 海野 倫明

クローン病における HPN 導入基準の検討

第 114 回日本外科学会定期学術集会

2014 年 4 月 3 日 ~ 5 日 国立京都国際会館 (京都府)

羽根田 祥, 長尾 宗紀, 工藤 克昌, 神山 篤史, 森川 孝則, 武者 宏昭, 阿部 友哉, 田中 直樹, 大沼 忍, 佐々木 宏之, 青木 豪, 唐澤 秀明, 元井 冬彦, 吉田 寛, 林 洋毅, 岡田 恭穂, 中川 圭, 片寄 友, 内藤 剛, 海野 倫明

クローン病における腸管不全発症症例の検討

第 100 回日本消化器病学会総会

2014 年 4 月 23 日 ~ 26 日 東京国際フォーラム (東京都)

Sho Haneda, Shinobu Ohnuma, Hiroaki Musha, Takanori Morikawa, Munenori Nagao, Tomoya Abe, Naoki Tanaka, Katsuyoshi Kudo, Hiroyuki Sasaki, Atsushi Kohyama, Takeshi Aoki, Hideaki Karasawa, Megumi Obara, Emiko Kono, Hiroki Hayashi, Kei Nakagawa, Hiroshi Yoshida, Fuyuhiko Motoi, Chikashi Shibata, Yu Katayose, Takeshi Naitoh, Michiaki Unno

Outcome of surgical treatment for Crohn ' s disease.

49th Congress of the European Society for Surgical Research

21-24 May, 2014 (Budapest, Hungary)

[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：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

6. 研究組織

(1) 研究代表者

羽根田 祥 (Haneda, Sho)  
東北大学・大学院医学系研究科・大学院非常  
勤講師  
研究者番号：20436140

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者