

厚生労働科学研究委託費（革新的がん医療実用化研究事業） 委託業務成果報告

医師主導治験の準備と実施 a. プロジェクトの総合推進

担当責任者：金田安史（大阪大学大学院医学系研究科 遺伝子治療学分野 教授）
奥村明之進（大阪大学大学院医学系研究科 呼吸器外科 教授）
中野孝司（兵庫医科大学呼吸器内科 教授）
安宅信二（国立病院機構 近畿中央胸部疾患センター 肺腫瘍内科 肺癌研究部長）

研究要旨

医師主導治験推進のために、キックオフミーティングを開催（H26年11月8日）、悪性胸膜中皮腫の病態と標準的治療等の現況、治験届までの業務分担ならびに工程を確認した。患者の選定のために、悪性胸膜中皮腫の悪性度と血中HMGB1濃度の相関を見出した。この悪性度には、腫瘍間質組織からのIL-6やTGF-βの関与が示唆された。本研究の医師主導臨床研究の対象は、化学療法抵抗性の悪性胸膜中皮腫であるため中皮腫細胞に対する各種薬剤の効果を検証した。

A. 研究目的

本研究で化学療法抵抗性になった癌に対する不活性化センダイウイルス粒子 HVJ envelope (HVJ-E)の有効性を実証するため、化学療法抵抗性 MPM に対する医師主導治験（第I相）を実施し、オーファン申請後に第II相治験で国内承認を取得する。そのために悪性胸膜中皮腫の病態把握、患者の選定、各種薬剤の効果について検討する。

B. 研究方法

平成26年11月8日に全員が参加してキックオフ会議を開催した。

患者の選定のために、中皮腫や肺癌を発症していない石綿暴露者ならびに肺癌、胸膜中皮腫患者で HMGB1 を測定した。6ml の採血を行い 2400G、6 分間遠心処理を行い

ELISA(HMGB1 ELISA Kit ®,シノテスト株式会社)にて血清中の HMGB1 を測定した。石綿曝露症例はその画像所見を胸膜プラーク、胸膜肥厚、線状・網状影、粒状影、胸水、すりガラス影、牽引性気管支拡張、蜂巣肺に大別しその有無、血清 HMGB1 値との相関を検討した。なおこの研究は国立病院機構近畿中央胸部疾患センターの臨床試験審査委員会にて承認を受けたのち開始されている。また、本研究について本人に十分な説明を行い同意文書への署名を確認後、採血を行った。

（倫理面への配慮）

本研究は院内の臨床試験審査委員会にて承認を受けたのち開始となっている。また、本研究について本人に十分な説明を行い同意文書への署名を確認後、採血を行った。

本研究の医師主導臨床研究の対象は、化学療法抵抗性の悪性胸膜中皮腫である。現在の標準的化学療法はシスプラチン+ペメトレキセ併用療法（CDDP/PEM）であるが、CDDP/PEM に不応であっても、他の化学療法剤が奏効する場合がある。中皮腫細胞に対する各種薬剤の効果を検証した。

C. 研究成果

1. キックオフ会議

平成 26 年 11 月 8 日午後 1 時 30 分より大阪大学医学系研究科基礎研究棟 10 階セミナー室で全員が参加して約 3 時間、会議を行った。金田より HVJ-E の抗腫瘍効果と安全性試験の現況、中野より悪性胸膜中皮腫の病態と治療の現状、李より治験薬 GMP 製剤の製造状況について、説明があり質疑応答を行った。現在では治療法がないが、HVJ-E の抗腫瘍効果が期待できること、難治性があるために既存の化学療法後は、HVJ-E の選択が可能であること、参画機関からの適応患者の紹介を行うことを確認した。

2. 中皮腫化学療法の治療抵抗性獲得の解明と二次治療法の開発

^{1D} 受容体の選択的阻害薬である Naftopidil は、^{1D} 受容体阻害作用とは無関係に、TNF-alpha, FasL の発現を増強し、caspase 8 を介して caspase 3 を活性化させて中皮腫細胞にアポトーシスを起こすことが明らかになった。 A_3 アデノシン受容体を介する中皮腫細胞のアポトーシス誘導による抗中皮腫活性は、臨床応用に十分に期待が持たれる成績であったので、アデノシン・デアミナーゼ阻害剤 EHNA による効果

を確認したところ、細胞内のアデノシンの増加等により、中皮腫細胞のアポトーシスの促進、増殖抑制が確認された。誘導されるアポトーシスの経路は、アデノシンが細胞内に取り込まれる内在性経路と受容体を介する外在性経路に分類されるが、アデノシン受容体の中では特に A_3 受容体が中皮腫細胞のアポトーシス誘導には重要であった。中皮腫に対する二次治療法に関しては、創薬研究で既に合成した Naftopidil analogue が抗中皮腫活性を有することを明らかにした。

3. 胸膜中皮腫における診断マーカーとしての血清 HMGB1 (high-mobility group box 1)

測定意義に関する研究

2012 年 4 月より 2014 年 5 月までに近畿中央胸部疾患センターにおいて定期外来検診を受けている石綿曝露者 190 例ならびに胸膜中皮腫 12 例(上皮型 4 例、肉腫型 4 例、その他組織型 4 例)、肺癌 14 例の血清 HMGB1 を測定した。胸膜中皮腫、肺癌症例は細胞診・組織診にて診断された症例とした。石綿曝露者での血清中 HMGB1 は中央値 2.2ng/ml(95%CI: 2.2-2.8)であった。肺癌患者と中皮腫患者での血清中 HMGB1 は中央値 6.0ng/ml (95%CI: 4.7-9.0)であり、悪性疾患を併発していない石綿曝露者よりも有意に高い HMGB1 値を示した。良性石綿疾患において画像所見、喫煙歴、性別、年齢と HMGB1 値との明らかな相関はなかった。

4. 胸膜中皮腫・肺癌などの胸部悪性腫瘍の悪性度上昇に関わる分子の検討

(1) 肺癌細胞における EMT と IL-6 の役割

肺癌細胞株 A549 は TGF β により EMT が誘導され、IL-6 を追加することにより N-cadherin と Vimentin の発現が増加した。すなわち、IL-6 は EMT 誘導を促進することが示された。(図 1)

(2) ヒト線維芽細胞の活性

ヒト線維芽細胞は TGF β により活性化され、EGF、TGF β 、VEGF、IL-6 を産生する。IL-6 の添加は、これらのサイトカインの産生をさらに増加させることが示された。(図 2)

(3) ヒト線維芽細胞の培養上清による EMT

ヒト線維芽細胞培養上清で A549 を培養すると、E-cadherin の減少、N-cadherin の増加、Vimentin の増加が著明であり、EMT が強く誘導された。さらに、ヒト線維芽細胞培養上清に IL-6 中和抗体を加えると、EMT 誘導は減弱された。(図 3)

(4) ピルフェニドンによるヒト線維芽細胞の抑制

ヒト線維芽細胞は TGF β で活性化され、ACTA2 と α 1 型コラーゲンの遺伝子発現が upregulate されるが、ピルフェニドンの投与によりこれらの発現が減弱した。すなわち、ピルフェニドンは線維芽細胞の活性化を抑制することが示唆された。(図 4)

D. 考察

1. キックオフ会議での議論から HVJ-E による悪性胸膜中皮腫の医師主導治験の意義が再確認され、患者のリクルートも十分可能であると考えられる。
2. 本研究の医師主導臨床研究の対象は、化学療法抵抗性の悪性胸膜中皮腫である。現在の標準的化学療法はシスプラチン + ペメトレキセ併用療法 (CDDP/PEM) であるが、Naftopidil や EHNA は二次療法になりうる。
3. HMGB1 は敗血症性ショック、膠原病、DIC 等の炎症性疾患で上昇する事が報

告されている。また悪性黒色腫、結腸癌、乳癌といった悪性疾患での HMGB1 値の上昇も報告されており悪性疾患においてもバイオマーカーとしての役割が期待される。今回の検討でも石綿曝露者と比較して悪性疾患症例 (肺癌・胸膜中皮腫) では血清 HMGB1 は有意に高い HMGB1 値を示しており、石綿曝露者において悪性疾患の早期発見に HMGB1 測定が有用である可能性が考えられた。今後 HMGB1 と悪性胸膜中皮腫の病勢との関連ならびに実施計画書への反映を検討する予定である。

4. 今回の研究により、肺癌が EMT を獲得する際に TGF β と IL-6 が関与することが明らかにされた。今回さらに、これらのサイトカインが活性化された線維芽細胞によって供給されることも明らかになった。すなわち図 5 に示すように、癌細胞が産生する TGF β により肺癌組織間質の線維芽細胞が活性化され TGF β と IL-6 が分泌され、これらのサイトカインは肺癌細胞の EMT をさらに促進し、浸潤能と転移能を高度に獲得していくと考えられる。このような癌の悪性化のスパイラルを遮断することが癌の進展を止めるために必要であると考えられる。今回、ピルフェニドンが活性化された線維芽細胞からのサイトカインの産生を減弱することが明らかになった。このような作用を持つ薬剤を発見・開発することが肺癌治療成績の向上につながると期待される。悪性胸膜中皮腫は完全切除が不可能であり、放射線治療を行うには照射範囲が大きく根治的照射は難しく、有効な化学療法も確立されていない。これらの状況下では、悪性胸膜中皮腫の治療には新たな方法論が必要である。

今回の研究では腫瘍間質の繊維芽細胞の制御による EMT の抑制の可能性が示唆された。繊維芽細胞と癌細胞の相互作用には TGF と IL-6 などのサイトカインが関与している。これらのサイトカインの抑制は悪性胸膜中皮腫の治療抵抗性を減弱し、腫瘍の治療の効果を向上させると期待される。今後の研究では、腫瘍細胞への遺伝子導入により、腫瘍細胞と繊維芽細胞からのサイトカインによる相互作用作用を抑制することを明らかにする予定である。遺伝子導入には、当研究グループで既に確立されている HVJ ベクターを用いる。また、悪性胸膜中皮腫の病理組織的診断は通常の病理学的評価では困難なことが多く、特殊な免疫組織染色が必要である。現在、その染色方法の確立しつつある。

E. 結論

HVJ-E による悪性胸膜中皮腫の医師主導治験は十分期待できる。悪性胸膜中皮腫に対する現在の標準的化学療法はシスプラチン+ペメトレキセ併用療法 (CDDP/PEM) であるが、CDDP/PEM に不応であっても、他の化学療法剤が奏効する可能性がある。血清 HMGB1 値は石綿曝露者と比較して肺癌や胸膜中皮腫症例で高値を示しており悪性疾患発症のバイオマーカーとして有効である可能性が示唆された。肺癌の EMT には癌細胞と繊維芽細胞の協調関係が関与しており、この関係を遮断する治療方法・薬剤の開発が今後の癌治療に必要である。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Clinical predictor of pre- or minimally invasive pulmonary adenocarcinoma: possibility of sub-classification of clinical T1a. Sawabata N, Kanzaki R, Sakamoto T, Kusumoto H, Kimura T, Nojiri T, Kawamura T, Susaki Y, Funaki S, Nakagiri T, Shintani Y, Inoue M, Minami M, Okumura M. Eur J Cardiothorac Surg. 45(2):256-261, 2014.
- 2) Multimodality treatment for advanced thymic carcinoma: outcomes of induction therapy followed by surgical resection in 16 cases at a single institution. Shintani Y, Inoue M, Kawamura T, Funaki S, Minami M, Okumura M. Gen Thorac Cardiovasc Surg. in press.
- 3) Impact of cardiopulmonary complications of lung cancer surgery on long-term outcomes. Nojiri T, Inoue M, Takeuchi Y, Maeda H, Shintani Y, Sawabata N, Hamasaki T, Okumura M. In press.
- 4) Surgery for pulmonary malignancies in patients with a previous history of head and neck squamous cell carcinoma. Kanzaki R, Inoue M, Minami M, Shintani Y, Nakagiri T, Funaki S, Kogo M, Yura Y, Inohara H, Sawabata N, Okumura M. Surg Today 44:2243-2248, 2014.
- 5) 中野孝司 ” 転移性肺腫瘍 “ 今日の治療指針 2014 年度版 308-309、2014 .
- 6) 中野孝司、寺田貴晋 ” 中皮腫の治療 “ 縦隔腫瘍・胸膜腫瘍、腫瘍病理鑑別診断アトラス 277-281, 2014.
- 7) 中野孝司、栗林康造、大搦泰一郎 “ 胸膜中皮腫およびその他の胸膜疾患 ” 呼吸器疾患診療最新ガイドライン

271-277, 2014.

- 8) 中野孝司 “ じん肺症 ” 今日の治療指針
2015 年度版 331-332, 2015.

2 . 学会発表

- 1) 第 5 5 回日本肺癌学術集会(京都)

“ 纖維形成型悪性胸膜中皮腫の
FDG-PET 所見の検討 ” 寺田 貴普,
田端 千春, 堀尾 大介, 柴田 英輔,
金村 晋吾, 政近 江利子, 本田 実
紀, 神谷 瞳, 三上 浩司, 野木 佳
孝, 大搦 泰一郎, 栗林 康造, 家城
隆次, 中野 孝司, 近藤 展行, 長谷
川 誠紀, 鳥井 郁子, 辻村 亨, 塚
本 吉胤, 廣田 誠一 2014 年 11 月

- 2) 第 5 5 回日本肺癌学術集会(京都)

“ 悪性胸膜中皮腫における、胸膜切
除・肺剥皮術を施行した症例に対する
術後化学療法の見直し ” 大搦泰一郎, 家
城隆次, 堀尾大介, 金村晋吾, 柴田英
輔, 政近江利子, 神谷瞳, 本田実紀, 三
上浩司, 野木佳孝, 寺田貴普, 栗林康
造, 田端千春, 黒田鮎美, 橋本昌樹, 多
久和輝尚, 松本成司, 近藤展行, 長谷
川誠紀, 中野孝司 2014 年 11 月

- 3) IMIG2014 (Cape town)

“ Postoperative chemotherapy after
pleurectomy/decortication for
malignant pleural mesothelioma ”
Kozo Kuribayashi, Taiichiro Otsuki,
Ryuji Ieki, Koji Mikami, Yoshitaka
Nogi, Takayuki Terada, Chiharu
Tabata, Masaki Hashimoto, Teruhisa
Takuwa,

- 4) Gefitinib/chemotherapy vs
chemo -therapy in EGFR
mutation-positive NSCLC after
progression on first-line gefitinib :
the Phase III, randomised IMPRESS
study Shinji Atagi, Jean-Charles
Soria, Tony SK Mok, Yi-Long Wu,
Sang-We Kim, Jin-Ji Yang,
Myung-Ju Ahn, Jie Wang, Chih-Hsin
Yang, You Lu, Santiago Ponce,
Xiaojin Shi, Alan Webster, Haiyi
Jiang, Kazuhiko Nakagawa
Shinji Atagi, Jean-Charles Soria, Tony SK
Mok, Yi-Long Wu, Sang-We Kim,
Jin-Ji Yang, Myung-Ju Ahn, Jie
Wang, Chih-Hsin Yang, You Lu,
Santiago Ponce, Xiaojin Shi, Alan
Webster, Haiyi Jiang, Kazuhiko
Nakagawa 第 55 回日本肺癌学会学
術集会 2014.11 (国内)

- 5) EGFR 遺伝子変異陽性 NSCLC の 1 次
治療として erlotinib+bevacizumab を評価
するランダム化第 II 相試験 : JO25567
安宅 信二, 瀬戸 貴司, 加藤 晃史, 西
尾 誠人, 後藤 功一, 山本 昇,
岡本 勇, 山中 竹春, 原田 亮介, 福
岡 正博, 山本 信之 第 55 回日本肺癌学
会学術集会 2014.11 (国内)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

