

## 【原著・臨床】

## Clarithromycin 投与非小細胞肺癌患者末梢血単核球における interleukin-12 mRNA の発現

寺本 正治<sup>1)</sup>・喜多 英二<sup>2)</sup>・三笠 桂一<sup>1)</sup>・濱田 薫<sup>1)</sup>・古西 満<sup>1)</sup>・前田 光一<sup>1)</sup>  
坂本 正洋<sup>1)</sup>・辻本 正之<sup>1)</sup>・森 啓<sup>1)</sup>・澤木 政好<sup>1)</sup>・成田 亘啓<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> 奈良県立医科大学第二内科\*, <sup>2)</sup> 同 細菌学教室

(平成 8 年 12 月 3 日受付・平成 9 年 1 月 20 日受理)

我々は手術不能原発性肺癌患者に clarithromycin (CAM) を投与し、生存期間の延長を報告し、その機序として宿主要因と癌悪液質改善とを報告している。今回は非小細胞癌患者に CAM を投与し末梢血単核球中 interleukin (IL)-12 mRNA 発現の推移を Revers Transcriptase-assisted Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) 法を用い、非投与症例と比較検討した。対象は当科に入院した初回治療の非小細胞肺癌患者 11 例 (CAM 投与例 9 例, 非投与例 2 例) で CAM 投与例 9 例の平均年齢は 65.7 ± 10.4 歳, 性別は男性 7 例, 女性 2 例で, CAM 非投与 2 例の年齢は 77 歳と 56 歳, 男性 2 例である。結果は末梢血単核球中 IL-12 subunit p 40 mRNA の発現が CAM 投与で増強傾向を示し、生存期間延長の機序の 1 つと考えられた。

**Keywords:** 非小細胞肺癌, clarithromycin, interleukin-12

マクロライド薬は生体内のサイトカイン産生能調節作用を有することが知られている<sup>1)</sup>。我々はすでに原発性肺癌患者に clarithromycin (CAM) 投与を試み、非小細胞肺癌患者で生存期間が有意に延長することを報告し<sup>2)</sup>、CAM 投与患者の癌悪液質の改善と種々の臨床指標の改善<sup>3,4)</sup>をも報告している。近年サイトカインのなかでも interleukin (IL)-12 の抗腫瘍効果が注目されており、肺癌患者の CAM 投与が IL-12 の産生促進に関与している可能性が推察される。そこで、CAM 投与原発性非小細胞肺癌患者から分離した末梢血単核球中の IL-12 mRNA 発現を Reverse Transcriptase-assisted Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) を用い非投与症例と比較検討を行った。本研究から、CAM 投与で末梢血単核球総 RNA 中 IL-12 mRNA の発現が増強し、投与患者の生存期間延長に寄与している可能性が推察された。

### I. 対象と方法

#### 1. 対象

対象は当科に入院した切除不能の初回治療の原発性非小細胞肺癌患者 11 例 (CAM 投与例 9 例, 非投与例 2 例) で、CAM 投与例 9 例の平均年齢は 65.7 ± 10.4 歳, 性別は男性 6 例, 女性 3 例, 組織型は腺癌 2 例, 扁平上皮癌 5 例, 大細胞癌 2 例, 臨床病期はⅢ B 期 4 例, Ⅳ 期 5 例, 前治療は放射線療法併用化学療法 5 例, 化学療法単独 3 例, 放射線療法単独 1 例, 治療効果は Partial Response (PR) 3 例, No Change (NC) 5 例, Progressive Disease (PD) 1 例であった。CAM 非投与

2 例は年齢 77 歳と 56 歳, 性別は男性 2 例, 組織型は腺癌 1 例, 扁平上皮癌 1 例, 臨床病気はⅢ B 期 1 例, Ⅳ 期 1 例, 前治療は放射線療法単独 1 例, 放射線療法併用化学療法 1 例, 治療効果は NC 1 例, PR 1 例であった (Table 1)。化学療法は全例 MVP 療法 (Mytomycin C 8 mg/m<sup>2</sup> day 1, Vindesine 3 mg/m<sup>2</sup> day 2 and 8, Cisplatin 100 mg/m<sup>2</sup> day 1), 放射線療法は 2 Gy/日を週 5 回毎日で総線量 40~60 Gy とし, 化学療法同時併用または単独で照射した。CAM の投与は退院 2 週後の初回外来受診日から 200 mg × 2 回/日の経口投与を開始した。

また臨床病期, 腫瘍縮小効果判定は日本肺癌学会の肺癌取り扱い規約<sup>5)</sup>に準拠した。

#### 2. 方法

CAM 投与前と投与 3 か月時とに患者から採血したヘパリン加静脈血から比重遠心法で単核球分画を分離し, 1 × 10<sup>6</sup>個の単核球から TRIZOL (GIBKO BRL, Gathersburg, MD USA) を用いた Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform (AGPC) 法<sup>6)</sup>で総 RNA を抽出した。0.1 μg の RNA を逆転写酵素反応緩衝液 (20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 各 1 mM の dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 0.25 μg Oligo (dT)<sub>12-18</sub> Primer, 10 単位 RNAasin (TOYOBO, 大阪)) と 50 単位 Reverse Transcriptase (GIBKO BRL, Gathersburg, MD USA) とを混合し 43 °C 90 分の反応で RNA を cDNA

Table 1. Patients characteristic

Case	CAM	Age (yr)	Sex	Histology	Stage	Basic Therapy	Response
1	+	62	male	squamous cell carcinoma	IV (T4N2M1)	MVP, RT	PD
2	+	75	female	squamous cell carcinoma	III B (T4N2M0)	MVP	PR
3	+	66	male	large cell carcinoma	IV (T4N2M1)	MVP, RT	NC
4	+	51	male	adenocarcinoma	IV (T4N2M1)	MVP	NC
5	+	50	female	squamous cell carcinoma	IV (T4N2M1)	MVP, RT	NC
6	+	71	male	squamous cell carcinoma	III B (T4N2M0)	MVP, RT	PR
7	+	77	male	squamous cell carcinoma	III B (T4N1M0)	MVP, RT	PR
8	+	77	male	large cell carcinoma	III B (T4N2M0)	RT	NC
9	+	62	female	adenocarcinoma	IV (T4N1M1)	MVP	NC
10	-	77	male	adenocarcinoma	III B (T4N3M0)	RT	NC
11	-	56	male	squamous cell carcinoma	IV (T3N3M1)	MVP, RT	PR

MVP = mitomycin C + vindesine + cisplatin

PD: progressive disease, NC: no change, PR: partial response

CAM: clarithromycin

に変換した。4  $\mu$ l の cDNA を PCR 緩衝液 (25 mM KCL, 10 mM Tris-HCl (pH 8.4), 2.5 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 1  $\mu$ M Primers, 0.25 単位 Taq DNA polymerase (GIBKO BRL, Gathersburg, MD USA) に混合しミネラルオイルを重層した。この反応液を Thermal cycler (日本ジェネティクス, 東京) で 94  $^{\circ}$ C 1 分, 60  $^{\circ}$ C 1 分, 72  $^{\circ}$ C 1 分を 35 cycle 行い, 得られた PCR 産物を 1.0 % アガロースゲル電気泳動 (100 V, 35 分) し, エチジウムブロマイド染色で IL-12 mRNA の発現を確認した。IL-12 p 35 の検出には sense primer: GACCACCTCAGTTTGGCCAG と anti-sense primer: GGCCAGGCAACTCCCATTAG とを用い, IL-12 p 40 の検出には sense primer: CCAAGAACTTGCAGCTGAAG と antisense primer: TGGGTCTATTCCGTTGTGTC とを用いた。なおコントロールの G 3 PDH の検出には sense primer: TGAAGGTCCGAGTCAACGGATTTGGT と antisense primer: CATGTGGGCCATGAGGTCCACCAC とを用い, 同時に検出した。

なお, 123 bp DNA Ladder を用い, 各 PCR 産物の分子量を算出しサイトカインの同定を行った。

## II. 成績

### 1. 電気泳動結果

#### 1) IL-12 p 35 と p 40 mRNA

CAM 投与例の症例 1 の電気泳動結果では初回外来受診日の CAM 投与前は IL-12 p 35 mRNA の発現は認め, p 40 mRNA の発現は認めなかった。しかし CAM 投与 3 か月時では p 35 と p 40 との両方の発現を認めた (Fig. 1)。一方, CAM 非投与例症例 10 の電気泳動結果では初回外来受診日, 3 か月時とも IL-12 p 35 mRNA の発現は認めたが, p 40 mRNA の発現は認めなかった (Fig. 2)。

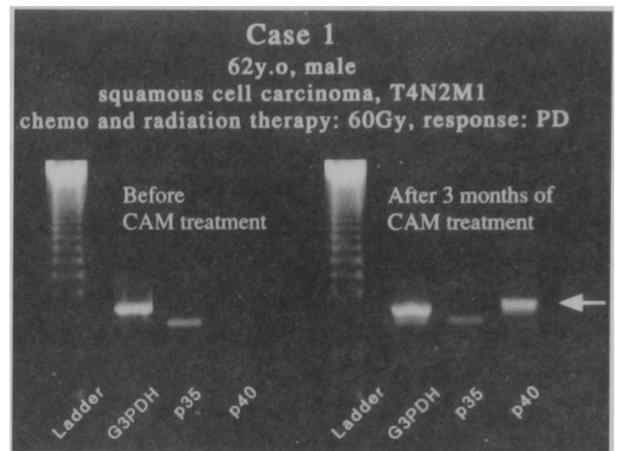


Fig. 1. Induction of IL-12 mRNA in RNAs of peripheral blood mononuclear cells by clarithromycin.

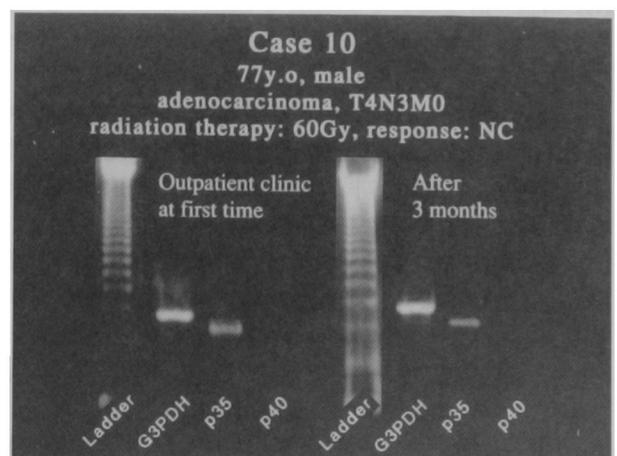


Fig. 2. Induction of IL-12 mRNA in RNAs of peripheral blood mononuclear cells by non clarithromycin.

Table 2. Expression of mRNA for IL-12 p 35 and p 40 in RNAs of peripheral blood mononuclear cells of clarithromycin-treated patients

	CAM+		CAM-	
	before CAM treatment	after 3 months of CAM treatment	at first time	after 3 months
p 35	9/9 (100%)	9/9 (100%)	9/9 (100%)	9/9 (100%)
p 40	2/9 ( 22.2%)	9/9 (100%)	0/2 ( 0%)	0/2 ( 0%)

## 2) IL-12 mRNA 発現のまとめ

IL-12 p 35 mRNA の発現は CAM 投与患者、非投与患者全例で投与前と投与 3 か月時とに認めた。一方、IL-12 p 40 mRNA の発現は CAM 投与前で 9 例中 2 例 (22.2%) に発現を認め、投与 3 か月時で全例 (100%) に発現を認めた。しかし CAM 非投与 2 例は初回外来受診日と 3 か月時とも IL-12 p 40 mRNA の発現は認められなかった (Table 2)。

## III. 考 察

我々は慢性下気道感染症患者のマクロライド薬長期投与が患者末梢血単核球の Natural Killer (NK) 細胞活性の増強<sup>7)</sup> や IL-2・4 産生能の増強<sup>8)</sup> を誘導することを見いだした。そこでマクロライド薬の Biological Response Modifier (BRM) 活性に注目し、原発性非小細胞肺癌患者への CAM 長期投与が CAM 投与患者の生存期間を延長することを明らかにした<sup>9)</sup>。今回は BRM 活性の中の抗腫瘍効果を CAM 投与患者末梢血単核球中 IL-12 mRNA の発現を RT-PCR 法を用い、非投与症例と比較検討した。

IL-12 は分子量 35 kD の subunit p 35 と分子量 40 kD の subunit p 40 とが分子内ジスルフィド結合した異型二量体の糖蛋白で、両方の発現で活性を示すとされている<sup>9)</sup>。IL-12 は主にマクロファージから産生され NK 細胞の活性化や T-helper 1 細胞からの IFN- $\gamma$  産生を誘導することで抗腫瘍結果を示すと報告されている<sup>10,11)</sup>。

今回の検討から CAM 投与症例で末梢血単核球中 IL-12 p 40 mRNA の発現が CAM 投与前と比較して増強したので、CAM が非小細胞肺癌患者の末梢血単核球の IL-12 産生を誘導する可能性が示唆された。

マクロライド薬がサイトカイン産生におよぼす影響はこれまで種々報告されており、喜多ら<sup>1)</sup>は CAM 投与マウス脾細胞で RT-PCR 法を用いてサイトカイン mRNA の発現変化を調べ、各種サイトカイン mRNA 合成は一定の間隔で亢進・抑制が起こっていること、 $\beta$  actin mRNA には変化が認められないことから誘導性蛋白の合成のみをマクロライド薬が調節する可能性を報告している。今回の検討から、CAM 投与前に比べ投与 3 か月時に末梢血単核球中 IL-12 p 40 mRNA の発現が増強したことから、CAM 投与が末梢血単核球の

IL-12 産生を誘導し抗腫瘍効果を示す可能性が示唆された。さらに症例数を増加して検討するとともに、定量的 PCR 法を用いた IL-12 mRNA の定量と痛病巣局所における IL-12 mRNA の発現の検討とが必要と考えられる。

## IV. 結 語

CAM 投与非小細胞肺癌患者末梢血単核球の IL-12 mRNA の発現を RT-PCR を用いて検討した。

CAM 投与が末梢血単核球中 IL-12 p 40 mRNA の発現を増強することが明らかになった。

CAM が末梢血単核球の IL-12 産生を誘導し抗腫瘍効果を示す可能性が示唆された。

この論文は第 44 回日本化学療法学会総会において、編集委員会より学会誌に投稿するよう推薦を受けたものである。

## 文 献

- 1) 喜多英二, 澤木政好, 三笠桂一: マクロライド剤のサイトカイン産生に対する影響。炎症と免疫 3: 68~73, 1995
- 2) 三笠桂一, 他: 原発性肺癌に対する clarithromycin 長期投与の試み—Biological response modifier としての可能性—。Chemotherapy 42: 1293~1298, 1994
- 3) 坂本正洋, 他: Clarithromycin (CAM) 投与による非小細胞肺癌患者におけるサイトカインの変動。日本癌学会誌 55: 211, 1996
- 4) 寺本正治, 他: 原発性肺癌患者に対する clarithromycin 長期投与の検討—臨床的指標に与える影響について—。日化療会誌 44: 451~458, 1996
- 5) 日本肺癌学会編: 肺癌取扱い規約 (改訂第 4 版)。金原出版, 東京, 1995
- 6) Piotr C, Nicoletta S: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem 162: 156~159, 1987
- 7) 三笠桂一, 他: 慢性下気道感染症におけるエリスロマイシン治療の Natural Killer 細胞活性に与える影響について。感染症誌 63: 811~815, 1989
- 8) 前田光一, 他: マクロライド薬投与におけるサイトカインの変動。日化療会誌 43: 825~829, 1995
- 9) Kobayashi M, Fitz L, Ryan M, et al.: Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects of human B-lymphocytes. J Exp Med 170: 827~845, 1989
- 10) Robertson M J, Soiffer R J, Wolf S F, et al.: Response of human natural killer (NK) cells to NK cell stimulatory factor (NKSF): cytolytic activity and proliferation of NK cell are differentially regulated by NKSF. J Exp Med 175: 779~788, 1992
- 11) Chan S H, et al.: Induction of Interferon  $\gamma$  production by natural killer cell stimulatory factor: characterization of the responder cells and synergy with other inducers. J Exp Med 173: 869~879, 1992

Expression of IL-12 mRNA in peripheral blood mononuclear cells from  
inoperable non-small cell lung cancer patients treated  
with clarithromycin

Shoji Teramoto<sup>1)</sup>, Eiji Kita<sup>2)</sup>, Keiichi Mikasa<sup>1)</sup>, Kaoru Hamada<sup>1)</sup>,  
Mitsuru Konishi<sup>1)</sup>, Koichi Maeda<sup>1)</sup>, Masahiro Sakamoto<sup>1)</sup>, Masayuki Tsujimoto<sup>1)</sup>,  
Kei Mori<sup>1)</sup>, Masayoshi Sawaki<sup>1)</sup> and Nobuhiro Narita<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> Internal Medicine II, Nara Medical University, 840 Shijocho, Kashihara, Nara 634, Japan

<sup>2)</sup> Bacteriology, Nara Medical University

We found that long-term treatment with clarithromycin (CAM) prolonged the survival time of patients with inoperable primary non-small-cell lung cancer. In the present study, we examined peripheral blood mononuclear cells for changes in the expression of mRNA IL-12 subunit p 35 and p 40 by RT-PCR. The study included 11 patients with inoperable primary non-small-cell lung cancer. They received basic therapy consisting of chemotherapy, radiotherapy or both. After discharge, 9 patients were assigned to CAM treatment and 2 were assigned to a non-CAM group as controls. The expression of IL-12 subunit p 40 mRNA was elevated 3 months after the initiation of CAM treatment. These results indicate that CAM may exhibit anti-tumor effect by inducing the expression of IL-12 in peripheral blood mononuclear cells.