

【原著・臨床】

非小細胞肺癌患者の末梢血単核球におけるサイトカイン mRNA に対する clarithromycin の影響

眞島 利匡¹⁾・三笠 桂一¹⁾・坂本 正洋¹⁾・古西 満¹⁾・前田 光一¹⁾・濱田 薫¹⁾
 善本英一郎¹⁾・村川 幸一¹⁾・植田 勝廣¹⁾・喜多 英二²⁾・成田 亘啓¹⁾

¹⁾奈良県立医科大学・第2内科学教室,

²⁾同 細菌学教室

(平成10年12月17日受付・平成11年4月19日受理)

切除不能非小細胞肺癌患者15例を対象に14員環マクロライド系抗菌薬 clarithromycin (CAM) を400 mg/日投与し、サイトカイン mRNA の変動を検討した。投与後に IL-12、IFN- γ mRNA は有意に増強し、IL-10 は抑制される傾向であった。CAM は Biological response modifier (BRM) 作用を有し、非小細胞肺癌患者を Th 1 優位な状態へ誘導していることが示唆された。しかし一部の症例では CAM 投与でサイトカイン mRNA の変動はみられず、それらは病期がIV期の症例が多く、CAM の BRM 作用は宿主状態に影響されることも示唆された。

Key words: 非小細胞肺癌, clarithromycin, biological response modifier, サイトカイン

14員環マクロライド系抗菌薬が Biological response modifier (BRM) 作用を有することは最近のさまざまな研究で明らかになってきた^{1,2)}。われわれはその BRM 作用を期待し、切除不能非小細胞肺癌患者に対して CAM の長期投与を試みたところ、生存期間の有意な延長が得られた^{3,4)}。作用機序として、臨床的検討では CAM 投与で Interleukin 12 (IL-12) mRNA の発現増強⁵⁾、NK 活性の上昇⁶⁾、Interleukin 6 (IL-6)、Tumor necrosis factor α (TNF- α) の産生抑制が認められ⁷⁾、これらの関与が示唆された。また、基礎的検討ではマウス肺癌モデルで腫瘍増殖抑制・肺転移抑制も認められ¹⁾、これらも CAM の BRM 作用に関与していると考えられた。特に IL-12 は Natural killer cell stimulatory factor (NKSF) として IFN- γ 、NK 活性の上昇の機序に強くかかわるものとして、抗腫瘍活性である細胞性免疫に関与すると推察された⁸⁻¹⁰⁾。

一方、Interleukin 10 (IL-10) は T 細胞からの IFN- γ 産生を抑制し、NK 活性を抑制する作用があり¹¹⁾、われわれの現在までの検討から CAM 投与後にも IL-12、IFN- γ mRNA の増強が認められなかった症例に何らかの抑制機序が関与している可能性が考えられる。今回、われわれは CAM 投与による IL-12、IL-10、IFN- γ mRNA の変動を測定し、BRM としての作用を検討したので報告する。

I. 材料と方法

1. 対象 (Table 1)

対象は切除不能原発性非小細胞肺癌患者15例 (男性10例、女性5例、平均年齢65歳)、臨床病期はII期1例、III期8例、IV期6例、組織型は扁平上皮癌10例、腺癌5例である。抗癌治療は化学療法・放射線療法併

用は8例、放射線単独治療2例、化学療法単独治療3例、無治療2例である。抗癌治療の効果は partial response (PR) 7例、no change (NC) 5例、progressive disease (PD) 1例である。抗癌治療を行った例は治療終了約4週後にインフォームドコンセントを得た後、無治療の患者はインフォームドコンセントを得た後、CAM 200 mg を1日2回投与する。なお、投与期間中に肺炎などの感染性疾患を合併したものは症例中に含まれていない。

2. 方法

方法は CAM 投与前、投与1か月後、3か月後に患者肘静脈からヘパリン加採血を行い、比重遠心法で単核球を単離した。単離した単核球から TRIZol (GIBCO BRL) を用いた AGPC 法で total RNA を抽出した。抽出した RNA は各検体あたり 1 μ g を逆転写酵素反応緩衝液 (20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂, 10 mM DTT) と各 1 mM の dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 0.25 μ g/ μ l Oligo (dT)₁₂₋₁₈ primer (GIBCO BRL), 10 単位 Ribonuclease inhibitor (東洋紡) と 50 単位 Reverse transcriptase (GIBCO BRL) とに混合し、43°C 90 分の反応で cDNA に変換した。その cDNA を PCR 緩衝液 (10 mM Tris-HCl (pH 8.4), 25 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂) と各 2.5 mM の (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 0.25 単位 Taq DNA polymerase (GIBCO BRL) と各サイトカインに特異的な primer (1 μ M) (Table 2) とに混合し、ミネラルオイルを重層した。この反応液を Thermal Cycler で 94°C 1 分、60°C 1 分、72°C 1 分を 30 cycle 行い、得られた PCR 産物を 1.0% アガロースゲル

電気泳動し、エチジウムブロマイド染色で、IL-10、IL-12 p 40、IFN- γ および housekeeping gene である G 3 PDH m RNA を検出した。各サイトカイン値を Densitometer で測定し、G 3 PDH で比較補正した。

なお、IL-12 には 35 kd の p 35 と 40 kd の p 40 との 2 つの subunit からなり、それらが disulfide binding した異形 2 量体の糖蛋白で両 subunit の発現で生物活性を示すとされているが¹²、以前のわれわれの報告⁵で IL-12 p 35 m RNA の発現は CAM 投与・非投与にかかわらず肺癌全症例で認められており、今回は測定を省略した。

Table 1. Patient characteristics

Case no.	Age	Sex	Histology	Stage	Basic chemotherapy	Response
1	56	M	Sq	III	MVP + RT	PR
2	62	M	Sq	III	MVP + RT	NC
3	74	M	Sq	III	MVP + RT	PR
4	75	F	Sq	III	MVP + RT	PR
5	67	M	Sq	III	MVP + RT	PR
6	70	M	Sq	III	CBDCA + VP-16	PR
7	76	M	Sq	III	RT	NC
8	33	M	Sq	IV	MVP + RT	PR
9	64	M	Sq	IV	MVP + RT	NC
10	55	F	Sq	IV	MVP	PR
11	80	F	Ad	II	RT	NC
12	78	M	Ad	III	MVP + RT	PD
13	52	M	Ad	IV	MVP	NC
14	60	F	Ad	IV	NT	
15	73	F	Ad	IV	NT	

Ad: Adenocarcinoma, Sq: Squamous cell carcinoma
MVP: MMC + VDS + CDDP, RT: radiation therapy, NT: no therapy
PR: Partial Response, NC: No Change, PD: Progressive Disease

Table 2. Primer for PCR

G 3 PDH		
sense primer	5'-TGAAGGTCGGAGTCAACGGATTGGT-3'	product size 983 bp
anti sense primer	5'-CATGTGGGCCATGAGGTCCACCAC-3'	
IL-10		
sense primer	5'-AAGGATCCATGCACAGCTCAGCACTGC-3'	product size 204 bp
anti sense primer	5'-CGACTGGGTCGGGAAGCTTTAAGA-3'	
IL-12 p 40		
sense primer	5'-GGACCAGAGCAGTGAGGTCTT-3'	product size 373 bp
anti sense primer	5'-CTCCTTGTGTCCCCTCTGA-3'	
IFN- γ		
sense primer	5'-ATGAAATATACAAGTTATATCTTGGCTTT-3'	product size 416 bp
anti sense primer	5'-GATGCTCTTGGACCTCGAAACAGCAT-3'	

II. 結 果

全症例では IL-12 p 40 は CAM 投与前に比較して、投与後に有意に m RNA の発現の増強が認められ ($p < 0.05$)、IFN- γ でも投与 3 か月後には有意に m RNA の発現の増強が認められた ($p < 0.05$)。IL-10 では投与後に抑制傾向が認められた (Fig. 1)。IL-12 p 40 の発現が増強した 11 例のうち 9 例で IFN- γ の発現が増強し、IL-10 の発現は 10 例で抑制された。IL-12 の増強が認められた症例は IFN- γ も増強し、IL-10 は抑制している ($p < 0.05$)。

一方、IL-12 p 40 の発現が増強しなかった 4 例では 3 例で IFN- γ の発現増強は認められず、全症例で IL-10 の発現抑制が認められなかった (Table 3)。

また IL-12 が増強されなかった症例は 3 例が IV 期であった。なお組織型・治療効果では一定の傾向は認めなかった。

症例 1 と症例 13 とを例示すると、症例 1 では CAM 投与前で G 3 PDH、IL-10、および IFN- γ の発現が認められ、CAM 投与後 1 か月には IL-10 の発現が抑制され、IL-12 p 40 の発現が認められた。CAM 投与 3 か月

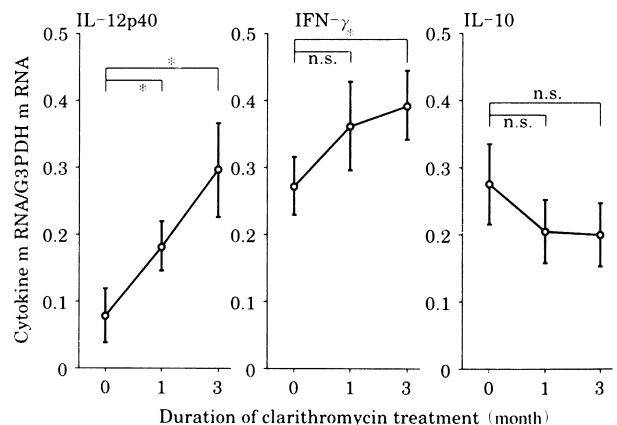


Fig. 1. Changes in cytokine m RNA levels in patients during clarithromycin (CAM) treatment. * $p < 0.05$ compared with before CAM treatment

後には IL-12 p 40, IFN- γ の発現がさらに増強された。症例 13 では CAM 投与前で G 3 PDH, IL-10, および IFN- γ の発現が認められ, CAM 投与後 1 か月には IL-10 の発現は増強され, IFN- γ の発現は CAM 投与前と変わらなかった。CAM 投与 3 か月後には IL-10 の発現は増強され, IFN- γ の発現も CAM 投与前に比較して抑制された (Fig. 2)。

III. 考 察

非小細胞肺癌患者に CAM を投与すると cytokine m RNA は, CAM 投与後に IL-12 と IFN- γ とに有意な増強が, IL-10 は抑制傾向が認められた。IL-12 の増強が認められた症例は IFN- γ も増強し, IL-10 は抑制している ($p < 0.05$)。

IL-12 は T 細胞からの IFN- γ の Inducing factor であるとともに T 細胞の分化を Th 1 表現型へと誘導する機能を有しており, 細胞性免疫の鍵として注目されてい

る⁸⁻¹⁰。特に抗腫瘍免疫でも, 担癌状態では抗腫瘍効果を持つ Interleukin 2 (IL-2) や IFN- γ といったサイトカインが抑制され T 細胞の機能も抑制されていることが報告されており¹³, IL-12 はこうした抗腫瘍免疫を活性化すると考えられている。今回の結果も IL-12 m RNA の増強で, IFN- γ m RNA が増強していることが示唆される。また, IL-10 が抑制される傾向にあったが T 細胞からの IFN- γ 産生を抑制し, NK 活性を抑制する作用があり¹¹, 以前われわれは CAM 投与で IL-6, TNF- α が抑制されることを報告したが, これらのことから非小細胞肺癌患者に対する CAM の投与はサイトカイン m RNA を Th 1 優位に導いていると考えられる。

また IL-12 p 40 の発現が増強しなかった 4 例では 3 例で IFN- γ の発現増強は認められず, 全症例で IL-10 の発現抑制が認められなかった。IL-12 が増強されなかった症例は 3 例が IV 期であった。組織型・治療効果では一定の傾向は認めなかったことから, IV 期のように進行した宿主では CAM 投与による免疫応答が十分に行われないか, IL-10 等のいわゆる Th 2 系のサイトカインを抑制できないため, IL-12, IFN- γ の発現が抑制されている可能性も考えられるが今後の検討が必要である。

以上から CAM は担癌宿主を Th 1 優位の状態へ誘導していると考えられるが, CAM 投与がどのような機序で Th 1 優位の状態へ誘導しているかは今後検討する必要がある。

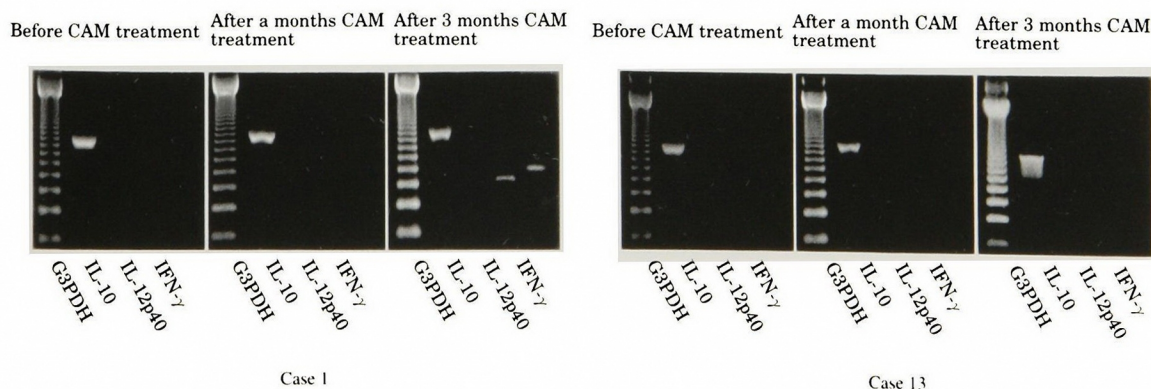
文 献

- 1) Eiji K, Masayoshi S, Fumiko N, et al. 4: Enhanced interleukin production after long term administration of Erythromycin stearate. *Pharmacol.* 41: 177 ~ 183, 1990
- 2) Kaoru H, Eiji K, Masayoshi S, et al.: Antitumor effect of Erythromycin in mice. *Chemotherapy* 41: 59 ~ 69, 1995
- 3) 三笠桂一, 澤木政好, 喜多英二, 他: 原発性肺癌に対

Table 3. Comparison of cytokine m RNA with or without enhancement of IL-12 m RNA

Case no.*	Changes in IFN- γ m RNA	Changes in IL-10 m RNA
1	↑	↓
2	↑	↓
4	↑	↓
5	↑	↓
Patients with enhancement of Il-12 m RNA		
6	↑	↓
10	↑	↓
14	↑	↓
15	↑	↓
3	↑	↑
12	↓	↓
11	↓	↓
Patients without enhancement of Il-12 m RNA		
7	↓	↑
8	↑	↑
9	↓	↑
13	↓	↑

*Case number is same as Table 1.



CAM: clarithromycin

Fig. 2. Expression of cytokine m RNA extracted from peripheral blood mononuclear cells with before and after clarithromycin treatment.

- する clarithromycin の長期投与の試み。-Biological Response Modifier としての可能性-。Chemotherapy 42: 1293~1298, 1994
- 4) Keichi M, Masayoshi M, Eiji, K et al.: Significant survival benefit to patients with advanced non-small-cell lung cancer from treatment with clarithromycin: Chemotherapy 43: 288~296, 1997
 - 5) 寺本正治, 喜多英二, 三笠桂一, 他: 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。日化療会誌 45: 144~147, 1997
 - 6) 坂本正洋, 三笠桂一, 濱田 薫, 他: 非小細胞肺癌患者における Clarithromycin の NK 活性に与える影響および基礎的解析。癌と化学療法 25: 2259~2266, 1998
 - 7) 坂本正洋, 三笠桂一, 濱田 薫, 他: 原発性非小細胞肺癌患者の癌悪液質に対する clarithromycin (CAM) の有用性に関する検討。日化療会誌 44: 879~882, 1996
 - 8) Robertson M, Soffer R J, Wolf S F: 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
 - 9) D'Andrea A, Rengaraju M, Valiante N M, et al.: Production of natural killer cell stimulatory factor (IL-12) by peripheral blood mononuclear cells. J. Exp. Med. 176: 1387~1398, 1992
 - 10) Scott P: IL-12: initiation cytokine for cellmediated immunity. Science 260: 496~497, 1993.
 - 11) D'Andrea A, Aste-Amezaga M, Nicholas M, et al.: Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte Interferon γ -production by suppressing Natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. J. Exp Med. 178. Sep. 1041~1048, 1993
 - 12) 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, 1989
 - 13) Zou J P, Jun S, Kazuhiro I, et al.: Tumorbearing mice exhibit a progressive increase in tumor antigen presenting cell function and a reciprocal decrease in tumor antigen responsive CD 4+ T cell activity. J. Immunol. 154: 2281~2290, 1995

Changes of cytokine mRNA in peripheral blood mononuclear cells from unresectable non-small cell lung cancer patients before and after clarithromycin therapy

Toshimasa Majima¹, Keiichi Mikasa¹, Kaoru Hamada¹, Mitsuru Konishi¹,
Koichi Maeda¹, Masahiro Sakamoto¹, Eiichirou Yoshimoto¹, Koichi Murakawa¹,
Katsuhiko Ueda¹, Eiji Kita², and Nobuhiro Narita¹

¹Internal Medicine II, Nara Medical University, 840 Shijouchou, Kashihara, Nara 634, Japan

²Bacteriology, Nara Medical University

We have reported that long term clarithromycin (CAM) therapy improves the survival time of patients with non-small cell lung cancer. In the present study, we examined peripheral blood mononuclear cells for changes in cytokine mRNA by RT-PCR before and after CAM therapy. The study included 15 patients with unresectable non-small cell lung cancer. Before CAM therapy, 13 patients received basic therapy consisting of chemotherapy, radiotherapy or both. Two patients received no basic therapy. Interleukin-10 (IL-10), Interleukin-12 (IL-12), Interferon- γ (IFN- γ) mRNA were measured before and at one and three months after starting CAM therapy. IL-12 and IFN- γ mRNA were significantly increased, and IL-10 mRNA was decreased. The results suggest that CAM exhibits an antitumor effect that promotes Th lymphocytes shows a Th 1-like cytokine production.