

【原著・臨床】

非小細胞肺癌患者における clarithromycin の Th 1, Th 2
サイトカインに与える影響

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

¹⁾奈良県立医科大学第2内科*, ²⁾同 細菌学教室

(平成12年6月8日受付・平成12年7月21日受理)

14員環マクロライド系抗菌薬 clarithromycin (CAM) は biological response modifier (BRM) 作用を有し、非小細胞肺癌患者への投与により生存期間の延長・quality of life (QOL) の改善が得られた。今回、臨床的検討として抗癌化学療法・放射線療法を施行しなかった CAM 投与非小細胞肺癌患者を対象に末梢血単核球中の cytokine mRNA の変動を検討した。その結果、CAM 投与後に IL-12, IFN- γ は増強し、IL-10 は抑制された。また基礎的検討としてマウス肺癌モデルに CAM を経口投与し脾細胞の cytokine mRNA の変動を検討したところ CAM 投与後に IL-12, IFN- γ mRNA は増強し、IL-6, IL-10 mRNA は抑制された。以上から CAM の投与は非小細胞肺癌の担癌状態での cytokine を Th 1 優位に導くことが示唆された。

Key words: clarithromycin, 非小細胞肺癌, biological response modifier (BRM) effect, cytokine

われわれは erythromycin や clarithromycin (CAM) などの14員環マクロライド系抗菌薬の長期投与がびまん性汎細気管支炎をはじめとする慢性下気道感染症の予後を著明に改善することを報告してきた¹⁻³⁾。その機序の1つとして CAM が biological response modifier (BRM) 作用を有することがあげられる^{4,5)}。われわれは CAM の BRM 作用に注目し、非小細胞肺癌患者における CAM の投与が生存期間を延長し、quality of life (QOL) を改善することを報告した^{6,7)}。

今回われわれは CAM の非小細胞肺癌に対する BRM 作用の機序検討のため臨床的検討では抗癌化学療法・放射線療法などの他の治療法を行っていない切除不能非小細胞肺癌患者の末梢血単核球中 cytokine mRNA に与える CAM の影響について検討した。

基礎的検討ではマウス肺癌モデルに CAM を経口投与し、その脾細胞中の cytokine mRNA の変動について検討した。またわれわれの検討ではIV期・P.S. 不良といった進行例には CAM の投与による予後の改善が認められない症例が多く⁸⁾、癌の進行状況と CAM の BRM 作用の影響の関連について検討するためにマウス肺癌モデルを CAM 早期投与開始群と後期投与開始群にわけそれぞれの cytokine mRNA を測定した。

I. 材料と方法

1) 臨床的検討

対象は抗癌化学療法や放射線療法をなんらかの理由で行えなかった非小細胞肺癌患者5例である (Table 1)。平均年齢は75歳、男性3例、女性2例であった。組織型は腺癌3例、扁平上皮癌2例で病期は3期2例、4期

3例であった。また、performance status (P.S.) は1が3例、2が1例、3が1例であった。診断後十分なインフォームドコンセントを受けた後 CAM 200 mg を1日2回投与し、投与前、投与1か月後、3か月後に末梢静脈よりヘパリン加採血を行い、Ficol-Paque research grade[®] (Pharmacia Biotech, USA) を用いた比重遠心法で単核球を分離し phosphate buffered saline without Ca or Mg [PBS (-)] にて洗浄後、TRIzol[®] (GIBCO BRL, USA) を用いた AGPC 法にて末梢血単核球の total RNA を単離し、reverse transcriptase-assisted polymerase chain reaction (RT-PCR) を行った。非小細胞肺癌患者症例での RT-PCR ではより定量性を得るために PCR cycle を25回とし、得られた PCR 産物を 1.5% agarose gel にて電気泳動後、nylon membrane (Hybond N[®], Amersham, Germany) に転写し、glycerol-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH), interleukin 10 (IL-10), interleukin 12 (IL-12), interferon gamma (IFN- γ) に特異的な digoxigenin labeled probe にて southern blot hybridization を行い、nitro blue

Table 1. Patient characteristics

Case no.	Age	Sex	Histology	Stage	P. S.
1	60	F	Ad	IV	1
2	73	F	Ad	IV	1
3	78	M	Sq	IIIa	2
4	79	M	Sq	IV	3
5	84	M	Ad	IIIb	1

Ad: Adenocarcinoma, Sq: Squamous cell carcinoma

tetrazolium chloride/5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (NBT/BCIP)にて発色反応を行った。それぞれの発色をdensitometerにて測定し、発色量を数値化し、G3PDH量にて補正し、各cytokine mRNA発現量とした。

2) 基礎的検討

マウス肺癌モデルとしてC57BL/6マウスを用いた。C57BL/6マウスにルイス肺癌細胞 1×10^6 細胞を腹壁皮下接種した。CAMの投与は10 mg/kg/dayを胃管ゾンデを用いて連日経口投与した。腫瘍接種7日後からCAM投与開始したものを早期投与開始群とし、腫瘍接種14日後からCAM投与開始した群を後期投与開始群とし、それぞれCAM非投与群と比較した (Table 2)。CAM早期投与開始群は投与開始7日後である腫瘍接種14日後に、CAM後期投与開始群は投与開始7日後である腫瘍接種21日後にマウスを犠牲死させ、脾細胞を採取し脾細胞中のtotal RNAをAGPC法にて単離した。単離したtotal RNAをRT-PCR法にてinterleukin 6(IL-6), IL-10, IL-12 mRNAを検出し、densitometerで測定したものを β -actinにて比較補正、定量化した。また定量性をより正確にするためIFN- γ についてはnorthern blot hybridization法を用いて測定した。方法は単離したtotal RNA 10 μ gをBiodot® (Biorad, USA)を用いてdot blottingをnylon membrane (Hybond N⁺®, Amersham, Germany)に行った。IFN- γ mRNAに特異的なdigoxigenin labeled probeを用いてhybridizationを行い、NBT/BCIPにて発色反応を行った。同様にtotal RNA 5 μ gをdot blottingを行い、 β -actin mRNAを検出した。densitometerを用いて β -actin, IFN- γ の発色を数値化し、IFN- γ mRNAを β -actin mRNAで比較補正・定量化した。なお、それぞれの群の比較にはManwhit-

neyのU検定にて行った。

II. 結果

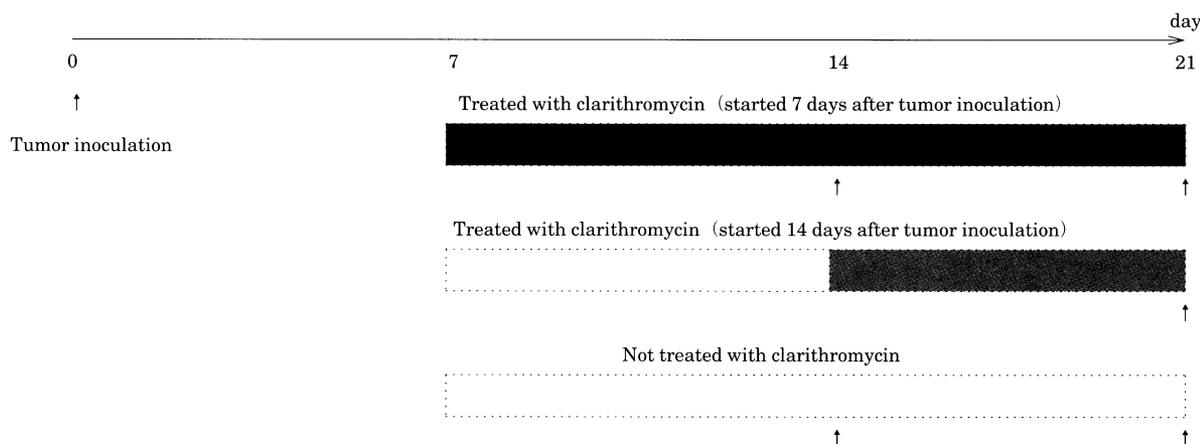
1) 臨床的検討

抗癌化学療法や放射線療法が施行できなかった非小細胞肺癌患者のCAM投与前後の末梢血単核球中cytokine mRNAの変動について代表例の結果をFig. 1に示す。IL-10 mRNAはCAM投与開始1か月後・3か月後ともにCAM投与前に比較して抑制されていた。IL-12 mRNAはCAM投与開始1か月後は投与前とほぼ同様の発現が認められていたがCAM投与3か月後には投与前に比較して増強していた。IFN- γ mRNAも同様にCAM投与開始1か月後は投与前とほぼ同様の発現が認められていたがCAM投与3か月後には投与前に比較して増強していた。比較定量の結果でもIL-10 mRNAは投与1か月後に有意に抑制され、IL-12 mRNAはCAM投与1か月後に有意に増強し、IFN- γ mRNAはCAM投与3か月後に有意に増強していた (Fig. 2)。

2) 基礎的検討

脾細胞中のIL-6 mRNAは早期投与開始群ではCAM投与後にCAM非投与群に比較して抑制されたが、後期投与開始群では有意差は認められなかった (Fig. 3)。IL-10 mRNAは早期投与開始群はCAM投与後にCAM非投与群に比較して抑制され、腫瘍接種14日後からCAM投与開始した群でも同様に抑制された (Fig. 4)。IL-12 mRNAは早期投与開始群はCAM投与後にCAM非投与群に比較して増強されたが、後期投与開始群では有意差は認められなかった (Fig. 5)。IFN- γ mRNAは腫瘍接種7日後からCAM投与した群ではCAM投与後にIFN- γ mRNAの増強が認められた。また、後期投与開始群でも有意差は認められなかったもののIFN- γ mRNAの増強傾向が認められた ($p=0.0686$) (Fig. 6)。

Table 2. Protocol for clarithromycin treatment in mice lung cancer models



* ↑: sacrificed (n=5)

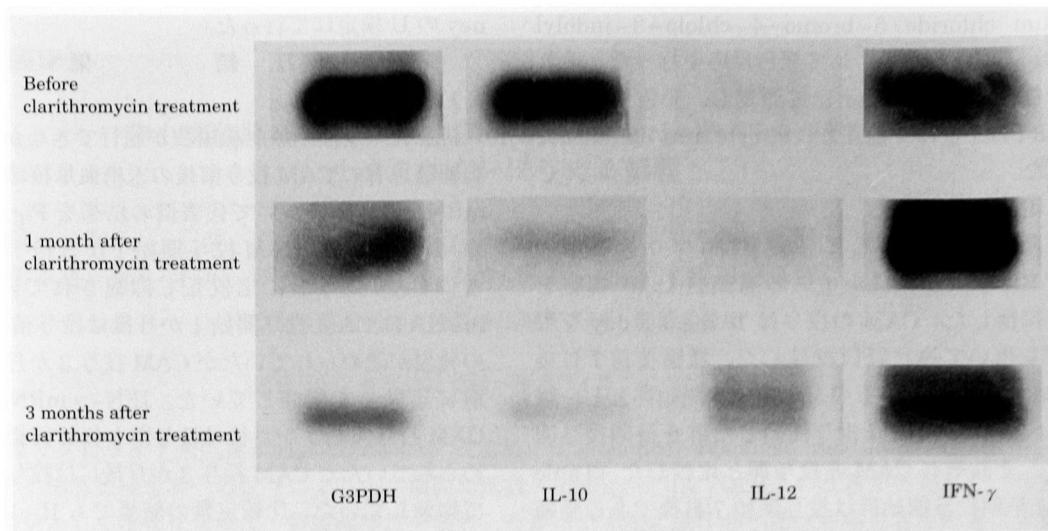


Fig. 1. Changes in cytokine mRNA of PBMC before and after clarithromycin treatment (Southern Blot Hybridization).

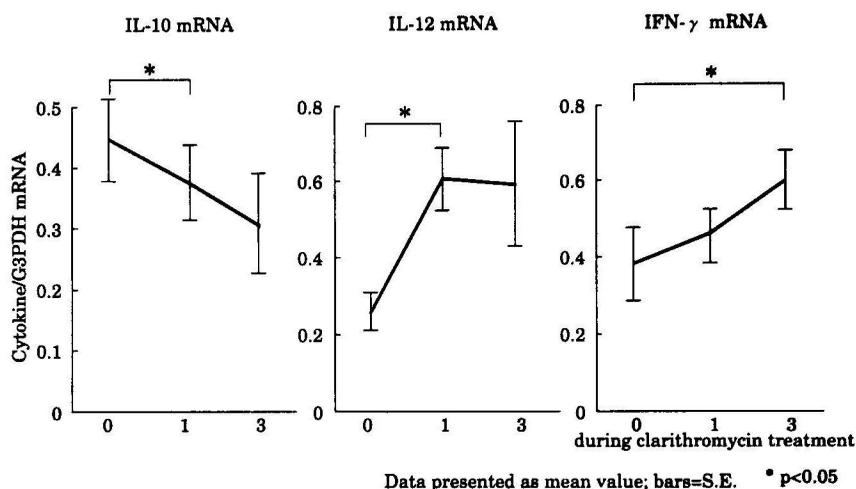


Fig. 2. Changes in cytokine mRNA levels of patients receiving clarithromycin treatment.

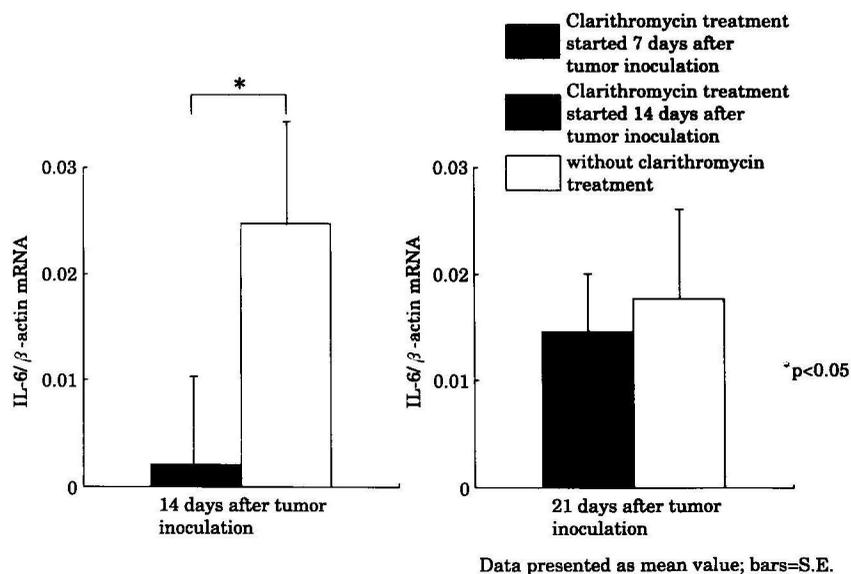


Fig. 3. Changes in IL-6 mRNA levels in mice spleen cells (RT-PCR).

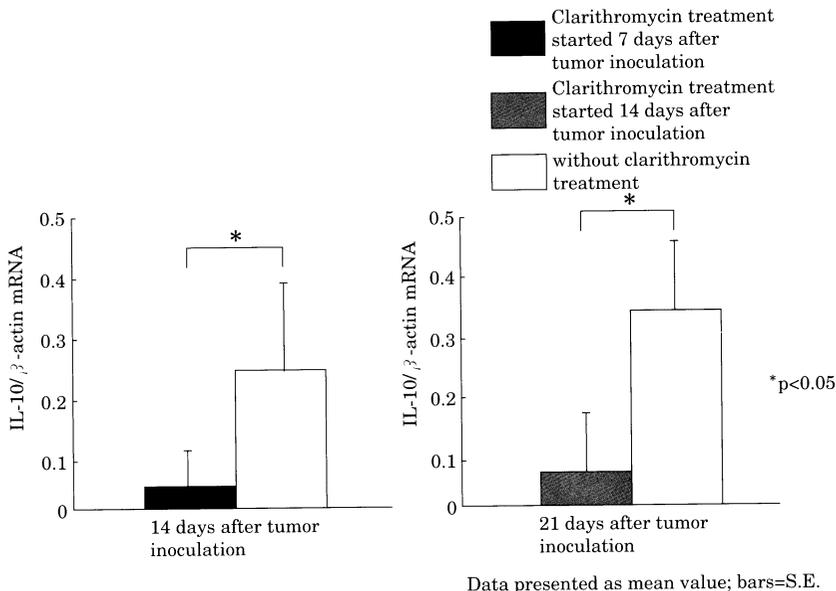


Fig. 4. Changes in IL-10 mRNA levels in mice spleen cells (RT-PCR).

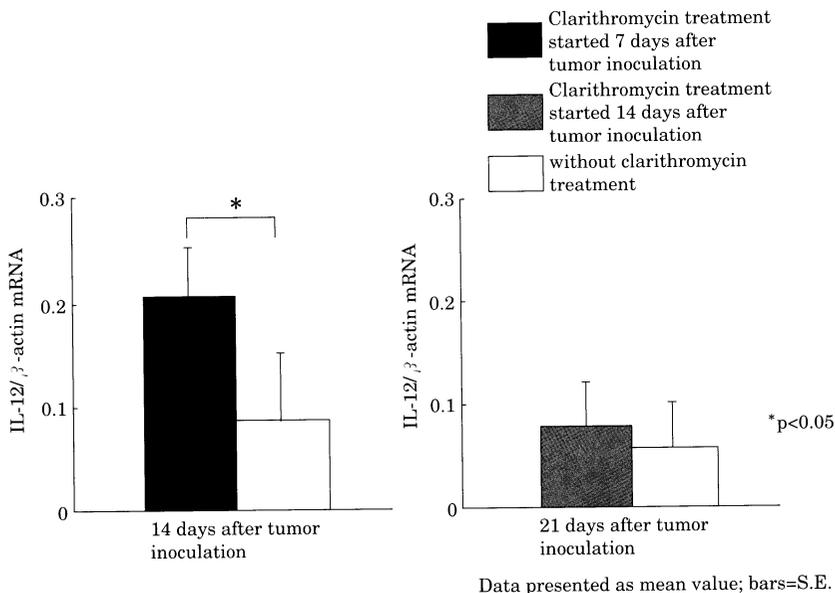


Fig. 5. Changes in IL-12 mRNA levels in mice spleen cells (RT-PCR).

III. 考 察

今回われわれは非小細胞肺癌に対するCAMのBRM作用機序解明のためCAMによるcytokine mRNAの変動について検討した。その結果、臨床的検討ではCAM投与後にIL-12, IFN- γ mRNAの増強が認められ、IL-10 mRNAの抑制が認められた。さらに、基礎的検討でもCAM投与後にIL-12, IFN- γ mRNAが増強され、IL-6, IL-10 mRNAが抑制され、Th 1 優位のcytokine産生に変動していた。また、CAM投与の開始時期を早期と後期にわけたが早期投与開始群と比較して進行担癌状態である後期投与開始群ではCAMによるcytokine mRNAの変動は少なかった。

担癌状態では宿主は初期には腫瘍局所や末梢血におい

て抗腫瘍免疫が活性化し、IL-2, IL-12, IFN- γ などのTh-1 cytokineが産生されるがその後にIL-2, IL-12, IFN- γ などのTh-1 cytokineの産生は徐々に低下するようになる。これは腫瘍の進行により細胞性免疫が低下することによると考えられている^{9,10}。

抗腫瘍活性を有する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、細胞性免疫の重要な機能を有している^{11,12}。また、腫瘍接種動物を対象にrIL-12腹腔内投与モデルでは腫瘍の縮小・消失効果が得られ、非常に強い抗腫瘍効果を有することが判明している。

腫瘍の進行とともに抗腫瘍活性が低下する一方でIL-

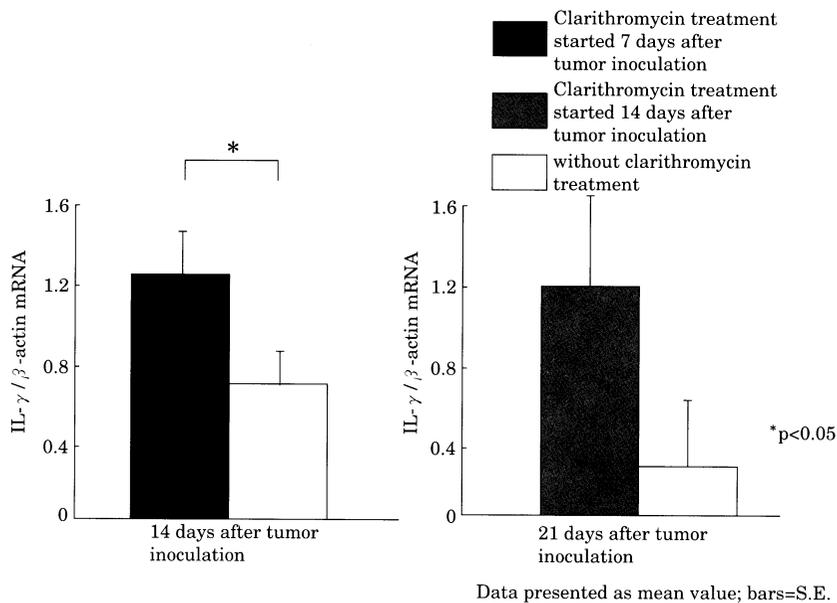


Fig. 6. Changes in IFN- γ mRNA levels in mice spleen cells (Northern blot hybridization).

6, TNF- α などのTh 2 cytokineの産生が腫瘍局所、全身で増加し、担癌宿主に癌悪疫質を生じさせる要因の一つとされている¹³⁻¹⁵。また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る¹⁶。

われわれの検討ではCAM投与後にIL-12やIFN- γ といったTh 1 cytokine mRNAは増強し、IL-6, IL-10 mRNAといったTh 2 cytokine mRNAは抑制されている。したがってTh 1/Th 2のimbalanceな状態となった担癌宿主はCAMの投与によりサイトカイン産生をTh 1優位に導いておりBRM療法としての機能を十分に満たしているものと考えた。

またCAMの投与は副作用も少なく、投与手段も経口投与であることから現在の担癌宿主に対するBRM療法として望ましいものであると考えられる。しかし現在のところCAMの投与によりcytokine mRNAが制御される機序については不明であり、今後さらに検討する必要がある。

われわれの臨床的検討においても^{6,7}基礎的検討においても¹⁷放射線療法や抗癌化学療法を行った上でCAMを投与しサイトカインの変動を検討してきた。今回の検討では抗癌化学療法や放射線療法を受けることができない状態でも臨床例ではcytokine mRNAの産生がTh 1優位に誘導されることが示され、CAMの投与は抗癌化学療法や放射線療法を受けることができない患者でも容易に施行することができ、副作用も少ないことからBRM療法として優れた手段であると考えられる。

基礎的検討ではCAM後期投与開始群はcytokine mRNAの変動がCAM早期投与開始群より少なかったことから担癌状態が続き抗腫瘍免疫が低下した状態からCAMを投与開始した場合では得られる効果は担癌初期

から投与した場合と比較して少ない可能性があることが示された。われわれの検討ではIV期やP. S.不良症例などではCAMによる生存期間延長・各種臨床パラメータの改善・血清中IL-6の低下が認められない症例が多かった⁸。これらの臨床的検討を背景とし、基礎的検討で投与開始時期を早期と後期にわけ、cytokine mRNAの変動を比較・検討した。その結果、早期投与開始群と後期投与開始群のcytokine mRNAの変動は臨床での検討と相関した。しかしながらIV期・P. S.不良な症例でもCAMによるQOLの改善や臨床パラメータの改善が見られることもあり、今後CAM投与により得られるcytokine mRNAの変動の機序やcytokine mRNAがTh 1優位に導かれぬ症例についての原因の検討は生存期間を含む臨床パラメータも加え今後さらに症例を重ね検討を行うことが必要であると考えられる。

文 献

- 1) 澤木政好, 三上理一郎, 三笠桂一, 他: 慢性下気道感染症におけるErythromycinの長期化学療法の検討I—Amoxicillinとの対比。感染症誌 60: 37~44, 1986
- 2) 三笠桂一, 古西 満, 澤木政好, 他: 慢性下気道感染症におけるErythromycinの長期化学療法の検討—投与期間3年以上の症例を中心に。感染症誌 63: 561, 1992
- 3) 三笠桂一, 澤木政好, 喜多英二, 他: Erythromycin無効の慢性下気道感染症に対するClarithromycinの有効性について。日化療会誌 41: 412~413, 1993
- 4) Kita E, Sawaki M, Nihsikawa F, et al.: Enhanced interleukin production after long term administration of Erythromycin stearate. Pharmacology 41: 177~183, 1990
- 5) Hamda K, Kita E, Sawaki M, et al.: Antitumor effect of Erythromycin in mice. Chemotherapy 41: 59~69, 1995

- 6) 三笠桂一, 澤木政好, 喜多英二, 他: 原発性肺癌に対する clarithromycin の長期投与の試み。—Biological Response Modifier としての可能性—。Chemotherapy 42: 1293~1298, 1994
- 7) Mikasa K, Sawaki M, Kita E, et al.: Significant survival benefit to patients with advanced non-small-cell lung cancer from treatment with clarithromycin. Chemotherapy 43: 288~296, 1997
- 8) 坂本正洋, 三笠桂一, 眞島利匡, 他: Clarithromycin 投与非小細胞肺癌患者における予後予測因子の検討。日化療会誌 48: 112~114, 2000
- 9) Zou J, Shimizu J, Ikegami K, et al.: Tumor bearing mice exhibit a progressive increase in tumor antigen presenting cell function and a reciprocal decrease in tumor antigen-response CD⁴+T cell activity. J. Immunol. 148: 648~655, 1992
- 10) Yamamoto N, Zou J, Li X, et al.: Regulatory Mechanisms for production of IFN- γ and TNF by antitumor T cell or macrophages in the tumor bearing state. J. Immunol. 154: 2281~2290, 1995
- 11) Brunda M J, Luistro L, Warriar R R, et al.: Anti-tumor and antimetastatic activity of Interleukin 12 against Murine tumors. J. Exp. Med. 178: 1223~1230, 1993
- 12) Nastala C L, Edington H D., McKinney T G, et al.: Recombinant IL-12 administration induces tumor regression in association with IFN- γ production. J. Immunol. 153: 1697~1706, 1994
- 13) Strassmann G, Fong M, Kenny J S, et al.: Evidence for the involvement of interleukin 6 in experimental cancer cachexia. J. Clin. Invest. 89: 1681~1684, 1992
- 14) Strassmann G, Jacob C D, Evans R, et al.: Mechanisms of experimental cancer cachexia. Interaction between mononuclear phagocytes and colon-26 carcinoma and its relevance to IL-6-mediated cancer cachexia. J. Immunol. 148: 3674~3678, 1992
- 15) Beutler B, Greenwald D, Hulmes J, et al.: Identity of tumor necrosis factor and the macrophage-secreted factor cachectin. Nature. 316: 552, 1985
- 16) D' Andrea A, Aste-Amezaga M, Nicholas M, et al.: Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. J. Exp. Med. 178: 1041~1048, 1993
- 17) 植田勝廣, 三笠桂一, 浜田 薫, 他: ルイス肺癌細胞皮下接種マウスモデルにおける clarithromycin のサイトカイン発現に及ぼす影響。肺癌 39: 117~124, 1999

Clarithromycin regulates cytokine mRNA in non-small cell lung cancer

Toshimasa Majima¹⁾, Keiichi Mikasa¹⁾, Masahiro Sakamoto¹⁾, Kaoru Hamada¹⁾, Mitsuru Konishi¹⁾, Kouichi Maeda¹⁾, Eiichiro Yoshimoto¹⁾, Kouichi Murakawa¹⁾, Ken Takahashi¹⁾, Eiji Kita²⁾ and Nobuhiro Narita¹⁾

¹⁾Second Department of Internal Medicine, Nara Medical University, 840 Shijocho, Kashihara-shi, Nara 634-8522, Japan

²⁾Department of Bacteriology, Nara Medical University

Clarithromycin (CAM), a fourteen-membered macrolide, has some effects as a biological response modifier in addition to its antibiotic effects. Long-term CAM treatment improves the prognosis and quality of life of patients with inoperable non-small cell lung cancer. In the present study, we evaluated the expression of cytokine mRNA in peripheral blood mononuclear cells taken from these patients treated with CAM and in spleen cells from an experimental mouse model. The mice were inoculated subcutaneously with Lewis lung cancer cells and treated with or without CAM. Two weeks after the inoculation, the mice were sacrificed and the spleen cells were examined. The expression of both IL-12 and IFN- γ mRNA were increased in humans after CAM treatment (1-3 months). On the contrary, the expression of IL-10 mRNA decreased. As in the human study, the expression of both IL-12 and IFN- γ mRNA increased in mice, while the expression of both IL-6 and IL-10 mRNA decreased. These results suggest that CAM treatment regulates the Th 1/Th 2 balance (stimulation of Th 1 type response and suppression of Th 2 type response) in both cancer-bearing patients and an experimental animal model.