

氏名(本籍)	いしげかずのり 石毛和紀(茨城県)		
学位の種類	博士(医学)		
学位記番号	博甲第5107号		
学位授与年月日	平成21年3月25日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	人間総合科学研究科		
学位論文題目	Potent <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> antitumor activity of Interleukin-4-conjugated <i>Pseudomonas</i> exotoxin against human biliary tract carcinoma (胆道系悪性腫瘍に対する IL-4 conjugated <i>Pseudomonas</i> Exotoxin の抗腫瘍効果)		
主査	筑波大学教授	医学博士	松村 明
副査	筑波大学准教授	医学博士	佐々木 亮 孝
副査	筑波大学准教授	博士(医学)	植野 映
副査	筑波大学講師	博士(医学)	佐藤 浩 昭

論文の内容の要旨

【目的】

日本は胆道癌(胆嚢癌, 肝内胆管癌, 肝外胆管癌)の世界有数の好発地域であるとともに, 近年その発症数, 死亡数が増加傾向にある。早期診断例は多くなく, また化学療法にも感受性が乏しい難治性腫瘍である。IL-4 と *pseudomonas* exotoxin を結合した IL-4 conjugated *pseudomonas* exotoxin (IL-4-PE) は IL-4 受容体の高発現が見られる癌細胞株に対して非常に効果的な殺細胞効果, 抗腫瘍効果が実験的に得られている分子標的薬, サイトトキシンのひとつである。本研究においては, 胆道癌および非癌胆道組織における IL-4 受容体の発現の有無と, 胆道癌由来の癌細胞株における IL-4 受容体発現の検討と IL-4-PE の胆道癌細胞に対する殺細胞効果, 抗腫瘍効果を検証することにより, 胆道癌に対する分子標的治療としての IL-4-PE の有用性を検討した。

【対象と方法】

1. ヒト癌組織における IL-4 受容体発現の検討
 - ・ヒト胆道癌組織(胆嚢癌 42 例, 肝外胆管癌 18 例, 肝内胆管癌 30 例), および非癌胆道組織(非癌胆嚢 17 例, 非癌肝内胆管 12 例)において, 免疫組織染色を行い IL-4 受容体の発現を検索した。また, ヒト胆嚢および胆道癌の手術検体組織(非癌胆嚢 2 例, 胆嚢癌 3 例, 肝内胆管癌 2 例, 肝外胆管癌 2 例)を用い Western blot analysis を行い, 組織内の IL-4 受容体タンパクの有無を検索した。
2. ヒト胆道癌細胞株における IL-4 受容体発現の検討
 - ・8種の胆道癌由来細胞株を用いて, 以下の *in vitro* 実験を行った。
 - i) IL-4 受容体 mRNA の発現の有無を RT-PCR によって検索した。各細胞株より得られた RNA より, cDNA を合成し IL-4 受容体特異的 primer を用いて, Taq-man PCR 法で増幅, 検索した。
 - ii) IL-4 受容体タンパクの発現を Western blot analysis により検索した。各胆道癌細胞株 1×10^6 個よりライセートを作成し, IL-4 受容体の検出を行った。膵臓癌細胞株 Panc-1 を陽性コントロールとして用いた。
 - iii) 放射性ラベル IL-4 を用いた細胞表面の IL-4 受容体への IL-4 の結合能について評価した。IL-4 を 125-I

で放射性ラベリングを行い、各胆道癌細胞株と反応させ、細胞表面に結合した放射性ラベル IL-4 を計測した。

3. ヒト胆道癌細胞株に対する、IL-4-PE の細胞障害効果（タンパク合成阻害効果）の検討

・8種の胆道癌細胞株に対して、IL-4-PE を 0-1000ng/ml の濃度で 24 時間反応させた。その後、放射性ラベルロイシンを添加し、その細胞内取り込みを計測することにより、タンパク合成阻害効果を相対的に評価した。

4. 皮下腫瘍マウスモデルにおける IL-4-PE の抗腫瘍効果の検討

・胆嚢癌細胞株を 4 週齢のヌードマウスの皮下に注入し、皮下腫瘍を形成させることにより担癌モデルを作成した。IL-4-PE の腫瘍内局注群、vehicle の腫瘍内局注群、IL-4-PE の腹腔内投与群、vehicle の腹腔内投与群の計 4 群、各群 5 匹のモデルマウスで、皮下腫瘍の volume を計測し、抗腫瘍効果を評価した。

5. 腹膜播種マウスモデルにおける IL-4-PE の抗腫瘍効果と生存期間延長効果の検討

・胆嚢癌細胞株を 4 週齢のヌードマウスの腹腔内に撒布し、腹膜播種モデルとした。IL-4-PE 腹腔内投与群、vehicle 投与群の 2 群、各 10 匹のモデルマウスを用いて生存期間の変化を検討した。

【結果】

1. ヒト癌組織における IL-4 受容体発現

免疫染色におけるヒト胆道癌における IL-4 受容体の発現検討では、胆嚢癌 42 例中 25 例（60%）、肝外胆管癌 18 例中 9 例（50%）、肝内胆管癌 30 例中 19 例（63%）に IL-4 受容体の染色像が得られた。組織学的進行度や分化度による発現の差は見られなかった。一方で非癌胆嚢、非癌肝内胆管組織には IL-4 受容体の染色像は認められなかった。ヒト胆道癌組織の western blot analysis では、胆道癌組織 7 例すべてにおいて、IL-4 受容体タンパクの発現が認められた。非癌胆嚢より作成したライセートでは IL-4 受容体タンパクの発現は見られなかった。

2. ヒト胆道癌細胞株における IL-4 受容体発現

胆道癌細胞株を用いた RT-PCR では 8 種すべての細胞株において、IL-4 受容体の mRNA 発現が認められた。また、western blot analysis においても、IL-4 受容体タンパクの発現が 8 種すべての細胞株において認められ、胆嚢癌細胞株 2 種ではとくに高発現が示唆された。放射性ラベル IL-4 を利用した、IL-4 結合能の検討では、すべての細胞株において IL-4 の結合が確認された。結合能の細胞間での比較では、先の western blot analysis において IL-4 受容体タンパクの高発現が示唆された 2 種の胆嚢癌細胞株において、IL-4 の結合量が多い結果であった。

3. ヒト胆道癌細胞株に対する IL-4-PE の細胞障害効果（タンパク合成阻害効果）

IL-4-PE を用いて行った細胞障害性実験では、8 種の細胞株すべてにおいて IL-4-PE 濃度依存性にアミノ酸ロイシンの取り込み・利用の低下が見られた。Western blot analysis および IL-4 結合能試験で IL-4 受容体高発現、放射性ラベル IL-4 の高結合を示した 2 種の細胞で、とくに細胞障害作用が顕著であった。さらに別の 2 種の細胞で、IC50 が 10ng/ml を下回り、計 4 種の細胞で強い感受性が示された。また、この IL-4-PE の細胞障害は IL-4 との競合作用が認められ、IL-4-PE が IL-4 受容体特異的な結合および細胞障害であることが示された。

4. 皮下腫瘍マウスモデルにおける IL-4-PE の抗腫瘍効果

胆嚢癌細胞株を用いた皮下腫瘍モデルマウスでは、IL-4-PE の腫瘍内投与・腹腔内投与ともに、有意な腫瘍の縮小効果が観察された。とくに IL-4-PE の腫瘍内投与では 5 匹中 2 匹において腫瘍の消失を認め、抗腫瘍効果はより顕著であった。

5. 腹膜播種マウスモデルにおける IL-4-PE の抗腫瘍効果と生存期間延長効果

胆嚢癌細胞株を用いた腹膜播種モデルマウスを用いた IL-4-PE の腹腔内投与の効果検討においては、コン

トロール群では、血性腹水の出現およびカヘキシアを呈し死亡、その median survival period は 5 週であった。対して、IL-4-PE 腹腔内投与群においては、その発症は遅延し、median survival period は 13 週となり、8 週間の生存期間延長が見られた。また、IL-4-PE 治療群では 6 匹（60%）のモデルマウスで 20 週以上の生存期間が得られた。

【考察】

ヒト胆道癌組織を用いた検討により、半数以上の胞道癌において、IL-4 受容体を高発現することが明らかとなった。また、その発現は胆道癌の分化度、あるいは進行度との関連は見られなかった。一方で、正常胆嚢組織、正常胆管組織においては IL-4 受容体の発現は認めず、IL-4 受容体は胆道癌に対する新規標的分子になりうる可能性が示唆された。ヒト胆道癌細胞株を用いた検討では、IL-4-PE の良好な細胞障害が、8 種中 4 種で認められ、そのうち特に 2 種では非常に高い感受性を示した。これより、胆道癌細胞株が IL-4-PE が十分に効果を発揮し得るだけの受容体を発現していると考えられる。ヌードマウスを用いた担癌モデルにおいては、皮下腫瘍モデルのみならず、腹膜播種モデルにおいても、IL-4-PE の良好な抗腫瘍効果が観察された。胆道癌は比較的早期に腹腔内への転移病巣を形成しやすく、腹膜播種は根治的外科手術を不可能とする治療困難な病態であるが、IL-4-PE 腹腔内投与は局所的な投薬による腫瘍細胞への高濃度の薬剤暴露が得られることにより、腹腔内の播種病巣に良好な細胞障害を惹起することが示唆された。

【結論】

半数以上の胆道系悪性腫瘍症例において IL-4 受容体の高発現が認められ、ヒト胆道癌由来細胞株を用いた担癌モデルにおいて IL-4-PE は良好な抗腫瘍効果を示した。IL-4 受容体を標的とした IL-4-PE によるサイトトキシン療法は胆道癌に対し、新規分子標的治療として有用な治療法になりうると思われる。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は難治性の胆道癌に対する IL-4 および pseudomonas toxin を合わせて用いた新規薬剤による治療の可能性を検討した研究であり、臨床検体と培養細胞系、動物モデルを用いて詳細な検討がなされており、今後の臨床応用に期待が持たれる斬新な研究内容である。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。