

ルイス肺癌マウスモデルでのクラリスロマイシンの サイトカイン発現に及ぼす効果

奈良県立医科大学第2内科学教室

植田 勝 廣

EFFECTS OF CLARITHROMYCIN ON THE EXPRESSION OF CYTOKINE MESSENGER RNA IN MICE BEARING LEWIS LUNG CARCINOMA CELLS

KATSUHIRO UEDA

Second Department of Internal Medicine, Nara Medical University

Received August 6, 1999

Abstract: A long-term treatment of clarithromycin (CAM), a 14-membered ring macrolide antibiotic, was shown to increase the median survival time for patients with unresectable non small-cell lung cancer. This study was addressed to determine the effects of CAM treatment on the expression of cytokine mRNA in spleen cells of mice bearing Lewis lung carcinoma (LLC). In mice which were not inoculated with LLC cells, there was no difference in the expression profile of cytokine mRNAs between the CAM-treated group and the non-CAM group. In mice bearing LLC, however, the expressions of mRNAs for IL-4, IL-12 p 40, and IFN- γ was increased, but that of IL-6 mRNA was decreased in the CAM-treated group, compared to the non-CAM group. Administration of anticancer agents, including CDDP and VDS, resulted in the suppression of cytokine mRNA expression. The combination therapy of CAM and these anticancer agents restored the expression level of mRNAs for IL-2, IL-4, IL-12, and IFN- γ up to the same level as observed in tumor-bearing mice treated with CAM alone, and also decreased IL-6 mRNA expression. When CAM administration was initiated 1 week after anticancer therapy, these changes for the expression of cytokine mRNAs were more marked. These results suggest that CAM stimulates the well-balanced expansion of helper T-cell subsets in tumor-bearing hosts recovering from immunosuppression caused by anticancer chemotherapy. Thus, CAM may be a promising adjuvant drug to anti-cancer chemotherapy, and treatment with this macrolide should be initiated after some interval but not immediately after basic cancer therapy. (奈医誌. J. Nara Med. Ass. 50, 351~365, 1999)

Key words: clarithromycin, Lewis lung carcinoma, cytokine, animal model

緒 言

clarithromycin(CAM)などの14員環マクロライド系抗生物質長期投与は難治性慢性下気道感染症の予後を一変した有効で安全な画期的治療法で、現在呼吸器領域で非常に注目されている¹⁻⁴⁾。マクロライド長期投与の有効

性発現機序については、マクロライド薬が抗菌力を示さない緑膿菌感染に有効であることから、長期投与により生体内でbiological response modifier(BRM)としての作用を発現し得ると考えられている。マクロライド薬の免疫応答調整作用としては、タクロリムス水和物(tacrolimus hydrate, FK 506)で既によく知られている。タ

タロリムス水和物は、ヘルパーT細胞の細胞質内でプロリンペプチド異性化酵素と結合し、この酵素の活性阻害を通してIL-2遺伝子の転写反応抑制作用を発現するため、臓器移植時の拒絶反応抑制薬や自己免疫疾患治療薬として実際に臨床に用いられている⁹⁾。

近年肺癌は著増し、男性では癌死の1位を占める疾患となり、quality of life(QOL)を考慮に入れた延命可能な新たな治療法が求められている。当教室のMikasa、坂本、寺本ら⁶⁻⁹⁾は切除不能の原発性非小細胞肺癌患者に、予後の改善を期待し、CAM長期投与を試み、QOLの改善と延命効果があることを見出した。

本研究はBRMとしてのマクロライド薬の有効性と、その作用機序の解明を目的として、Lewis肺癌細胞接種マウスを用いて、CAMの担癌宿主の免疫系に及ぼす作用を検討した。

材料と方法

SPFC 57 BL/6 雌マウス(日本SLC社、浜松)にLewis肺癌細胞(理化学研究所、東京)を、 3×10^5 個腹腔皮下に接種し、担癌マウスを作製した。

CAMは原末(ダイナボット社、東京)1gを99.5%エタノール1mlに溶解し、蒸留水で用時希釈した後、10

mg/kg相当量を胃ゾンデを用いて腫瘍接種日から連日経口投与した。CAMのvehicle controlとしては、0.5%エタノール液0.1mlを投与した。

1) CAM 単独投与マウスにおける検討

腫瘍接種・非接種マウス両群にCAM投与群、非投与群を設けた(Fig. 1)。CAM投与群は腫瘍接種日から投与を開始し、2週後に犠牲死させ脾細胞中の各種サイトカインmRNAの発現をreverse transcriptase-assisted polymerase chain reaction(RT-PCR)により検索した。

2) 抗癌化学療法との併用時の検討

抗癌薬投与は、腫瘍接種後7日目にcisplatin(CDDP、日本化薬、東京)6mg/kg、vindesine(VDS、塩野義製薬、大阪)7mg/kgを生理食塩水に溶解し尾静脈から投与した。腫瘍接種群・非接種マウス両群にそれぞれ、CAM同時併用群、抗癌薬投与より遅れてCAMを投与する群(時間差投与群)、及び溶媒対照群(vehicle control)を設けた。抗癌薬投与1, 2, 3週後に脾細胞サイトカインmRNAをRT-PCR法で測定した(Fig. 2)。抗癌薬やCAMを投与しない無治療群も実験に組み入れた。

同時併用群：抗癌薬投与日(day 7)からCAM(10mg/kg/day)を腫瘍接種後28日(day 28)まで連日経口投与した。

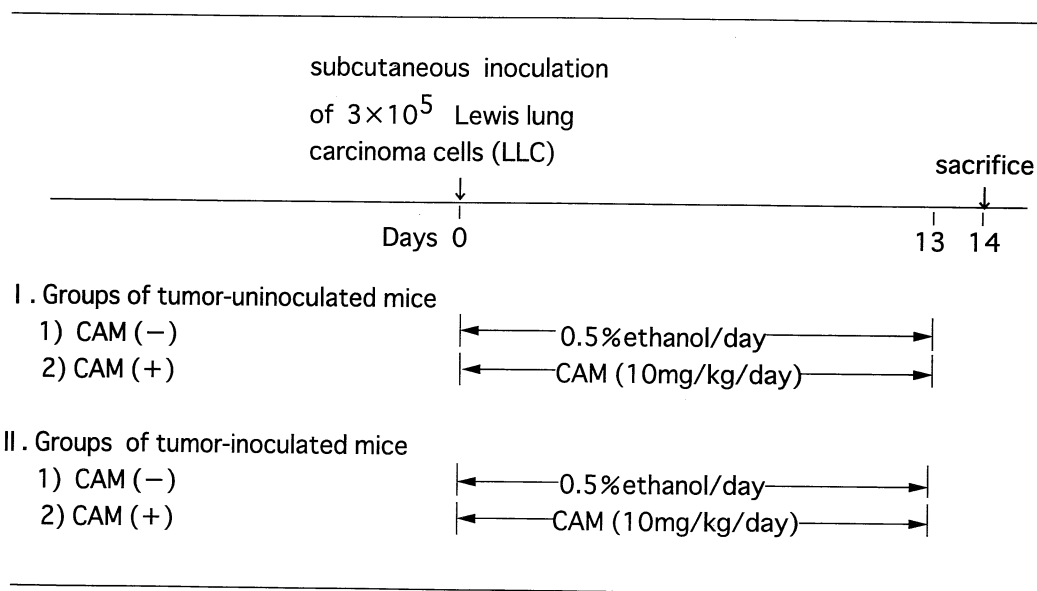


Fig. 1. Experimental protocol

時間差投与群：抗癌薬投与7日後(day 14)からCAMの投与を開始し day 28 まで連日経口投与した。

溶媒対照群(抗癌薬単独投与群)：day 7 に抗癌薬を投与後、0.5%エタノール0.1 mlを day 7 から day 28 まで連日経口投与した。

無治療群：腫瘍接種後、抗癌薬治療もCAM投与も行わないマウス群で day 14 に検体を採取した。

RT-PCR法は以下の手順で行った。

① TRizol(GIBCO BRL社, Gaithersburg, MD)を用いた Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform(AGPC)法で総 RNA を抽出した。

② 各検体あたり 0.8 μ g 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 MgCl₂, 10 mM DTT)および 1 mM の dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 0.25 μ g / μ l Oligo(dT)₁₂₋₁₈ primer, 10 単位 RNase inhibitor, 及び 50 単位 reverse transcriptase(GIBCO BRL社)と混合し 43°C, 90 分反応させ cDNA に変換し残存 RNA は RNase 処置で除去した。なお RNA 濃度は Gene Quant II (Pharmacia Biotech社, Cambridge)で測定した。

③ 4 μ l の cDNA 溶液を PCR 緩衝液(25 mM KCl, 1.25

mM MgCl₂, 10 mM Tris - HCl(pH 8.4)), 2.5 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 0.5 μ M primer, 0.25 単位 Taq DNA polymerase に混合し、ミネラルオイルを重層、DNA thermal cycler(QUICKTHERMO PERSONAL, Nippon Genetics 社, 東京)で 94°C 1 分, 60°C 1 分, 72°C 1 分 1 サイクルとして 20 サイクルの増幅反応を行った。

④ PCR 産物を 1.5% アガロースゲルで電気泳動(100 V, 35 分)で分画後、エチジウムブロマイド染色を行ない、123 bp-ladder(GIBCO BRL 社)の band を基に product size の確認を行なった。

⑤ Quantity One(PDi 社, USA)で各 band の濃度を定量し、 β -actin の発現量に対する比を求めた。

実験に使用した各種サイトカインの特異的な primer の塩基配列は EBML データバンクに登録されている配列を用い、RNA 中の DNA 混入による遺伝子増幅の可能性を排除するため、少なくとも 1 つのイントロンをはさむエクソン部分からデザインした(Table 1)。

腫瘍接種と非接種との検討では 9 匹、抗癌化学療法との併用時の検討では 10 匹、をそれぞれ一群とした。統計的処理は F 検定にて、検定を行った危険率で等分散であ

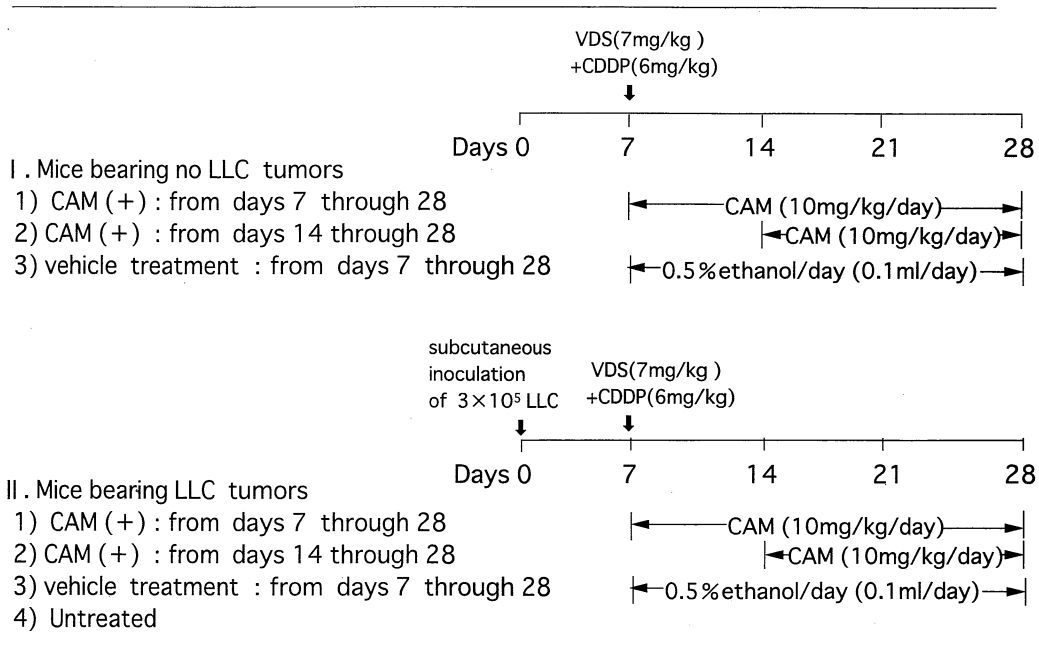


Fig. 2. Experimental protocol

る事を確認し, Students's *t*-test で危険率5%未満を有意とした。

結 果

1) 腫瘍接種と非接種との検討

IL-2 mRNA は腫瘍非接種群で発現せず, 腫瘍接種群では発現したが, CAM 投与・非投与で有意な差はなかった(Fig. 3).

IL-4 mRNA は腫瘍非接種群では発現せず, 腫瘍接種群では発現し, CAM 投与群は非投与群と比較して有意に増強していた($p < 0.05$)(Fig. 4).

IL-6 mRNA は腫瘍非接種群では発現せず, 腫瘍接種群では発現し, CAM 投与群は非投与群と比較して有意に低下していた($p < 0.05$)(Fig. 5).

IL-12 p 40 mRNA は腫瘍非接種群では発現せず, 腫瘍接種群では発現し, CAM 投与群は非投与群と比較して有意に増強していた($p < 0.05$)(Fig. 6).

IFN- γ mRNA も腫瘍非接種群では発現を認めず, 腫瘍接種群で発現し CAM 投与群は非投与群と比較して有意に増強していた($p < 0.05$)(Fig. 7).

以上の結果, 測定した全サイトカインは腫瘍非接種群

で CAM 投与の有無に関係なく発現しなかったが, 腫瘍接種群では発現を認めた($p < 0.01$). 腫瘍接種群では, CAM 投与群は CAM 非投与群と比較して, IL-4, IL-12 p 40, IFN- γ mRNA の発現増強と IL-6 mRNA の発現低下を認めた($p < 0.05$)(Table 2).

2) 抗癌化学療法との併用時の検討

①抗癌薬単独の影響

腫瘍接種後 CAM 投与を行わずに抗癌薬投与のみ行った群と腫瘍接種後 CAM 投与も抗癌薬投与も行わず無治療であった群でサイトカインの mRNA の発現を比較した. day 14 で測定したすべてのサイトカインの mRNA の発現は腫瘍接種後抗癌薬投与のみ行った群のほうが有意に低下していた($P < 0.05$)(Fig. 8).

②同時併用群と溶媒対照群との比較

腫瘍非接種群では, CAM 同時投与群で抗癌薬投与2週後(day 21)にサイトカインの発現が誘導され, 抗癌薬投与2週と3週後(day 21, 28)との IL-2, IFN- γ mRNA の発現は溶媒対照群と比較して有意に増強していた($P < 0.05$)(Fig. 9). 腫瘍接種群では, IL-6, 12 mRNA の発現がみられ, 同時併用群では抗癌薬投与2週と3週後(day 21, 28)に, 溶媒対照群と比較して IL-2, IL-4, IL

Table 1. List of primers

β actin sense primer	5' -TGTGATGGTGGGAATGGGTCAG-3'	product size 514bp
anti-sense primer	5' -TTTGATGTCACGCACGATTTCC-3'	
IL-2 sense primer	5' -ACCCTTGCTAATCACTCCTCAC-3'	product size 543bp
anti-sense primer	5' -TTGTTGAGATGATGCTTTGACA-3'	
IL-4 sense primer	5' -GAATGTACCAGGAGCCATATCC-3'	product size 370bp
anti-sense primer	5' -AATCCATTTGCATGATGCTCTT- 3'	
IL-6 sense primer	5' -ACTGATGCTGGTGACAACCACG-3'	product size 211bp
anti-sense primer	5' -GTTTTCTGCAAGTGCATCATCG-3'	
IFN- γ sense primer	5' -ACTGCCACGGCACAGTCA- 3'	product size 401bp
anti-sense primer	5' -GCGACTCCTTTTCCGCTT- 3'	
IL-12p40 sense primer	5' -AACTGGCGTTGGAAGCACGG-3'	product size 368bp
anti-sense primer	5' -GAACACATGCCACTTGCTG-3'	

-12 p 40, IFN- γ の mRNA 発現の有意な増強と, IL-6 mRNA の有意な発現低下を認めた($P < 0.05$)(Fig. 10).

③時間差投与群と溶媒対照群との比較

腫瘍非接種群では, CAM 時間差投与群で抗癌薬投与 2 週後(day 21)にサイトカインの発現が誘導され, CAM 時間差投与群は抗癌薬投与 3 週後(day 28)で溶媒対照群

と比較して IL-2 が有意に増強し, 抗癌薬投与 2 週と 3 週後(day 21, 28)で溶媒対照群と比較して, IL-4, IL-12 p 40, IFN- γ mRNA が有意に増強していた($P < 0.05$)(Fig. 11). 腫瘍接種群では, CAM 時間差投与群は抗癌薬投与 2 週と 3 週後(day 21, 28)とで, 溶媒対照群と比較して IL-2, IL-4, IL-12 p 40, IFN- γ mRNA は有意に

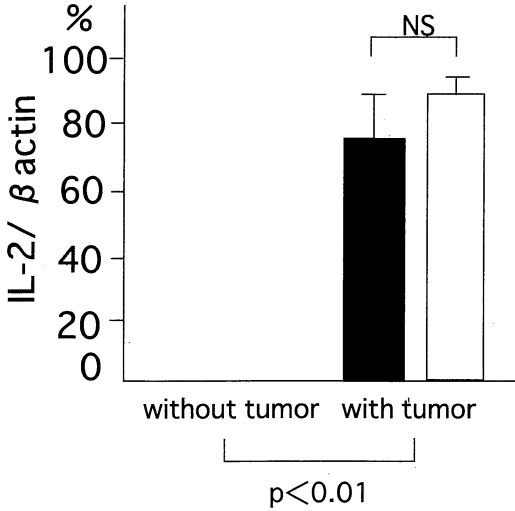


Fig. 3. Expression of IL-2 mRNA
 ■ treated with CAM
 □ not treated with CAM
 NS : not significant

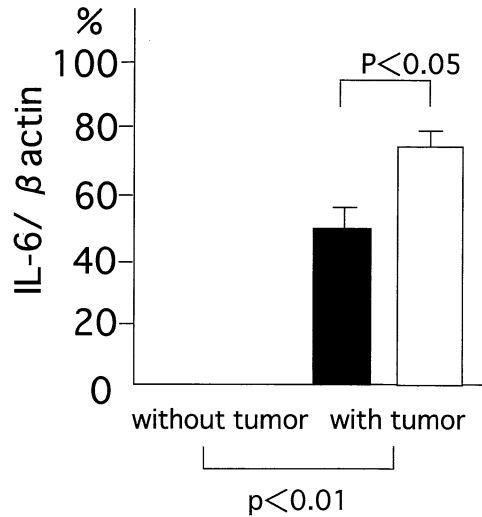


Fig. 5. Expression of IL-6 mRNA
 ■ treated with CAM
 □ not treated with CAM

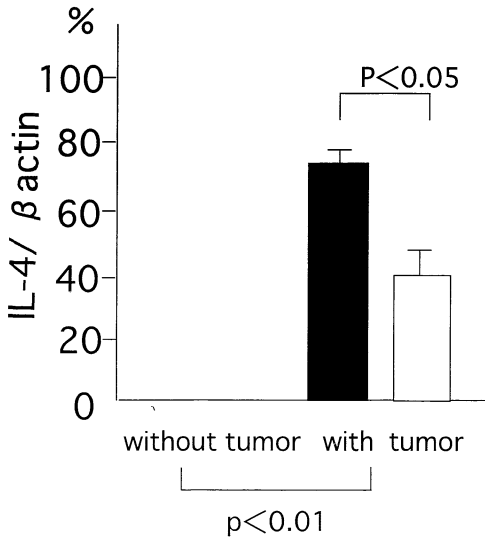


Fig. 4. Expression of IL-4 mRNA
 ■ treated with CAM
 □ not treated with CAM

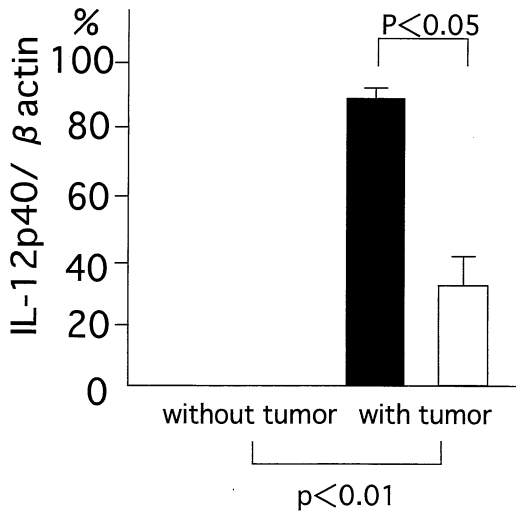


Fig. 6. Expression of IL-12p40 mRNA
 ■ treated with CAM
 □ not treated with CAM

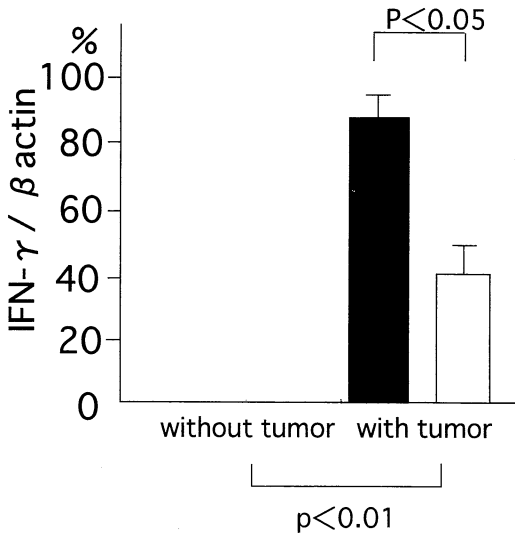


Fig. 7. Expression of IFN- γ mRNA
 ■ treated with CAM
 □ not treated with CAM

発現が増強し、IL-6 mRNA の発現は有意に低下していた(P<0.05)(Fig. 12).

④時間差投与群と同時併用群との比較

腫瘍非接種群では時間差投与群は同時併用群と比較して、抗癌薬投与3週後(day 28)でIL-2, IL-4, IL-12 p 40 mRNA の発現が有意に増強していた(P<0.05). なお、IL-6 mRNA の発現は両群とも非常に弱かった。(Fig. 13).

腫瘍接種群では時間差投与は同時併用と比較して、抗癌剤投与3週後(day 28)でIL-2, IL-4 mRNA 発現が有意に増強し、IL-6 mRNA 発現が有意に低下していた(P<0.05)(Fig. 14).

以上の結果、CAM と抗癌薬を同時期から併用するとCAM非投与と比較してIL-2, IL-4, IL-12 p 40, IFN- γ の mRNA 発現が有意に増強し、IL-6 mRNA 発現が有意に低下する事が確認された(P<0.05)(Table 3). 時間差投与群も同時併用群と同様のサイトカイン変動パターンがみられたが、時間差投与群は同時併用群と比較して更にIL-2, IL-4 の mRNA 発現が増強し、IL-6 mRNA の発現抑制も著明であった。また腫瘍非接種ではいずれの群もIL-6 mRNA の発現は低レベルであったが、腫瘍接種で増強した。担癌マウスにおけるIL-6 mRNA の発現は、CMA の時間差投与により有意に低下

Table 2. Expression levels of cytokine mRNA

Groups of mice	Expression level (cytokine / β - actin)				
	IL-2	IL-4	IL-6	IL-12p40	IFN- γ
without tumor, without CAM	—	—	—	—	—
without tumor, with CAM	—	**	**	**	**
with tumor, without CAM	89.5 \pm 1.9	40.3 \pm 4.5*	79.6 \pm 3.2*	34.3 \pm 3.5*	40.6 \pm 4.1*
with tumor, with CAM	79.6 \pm 1.3	75.3 \pm 2.1	50.4 \pm 1.6	89.6 \pm 3.4	82.6 \pm 3.7

cytokine/ β actin(%)
 mean \pm SD
 (* : p<0.05)
 (** : p<0.01)

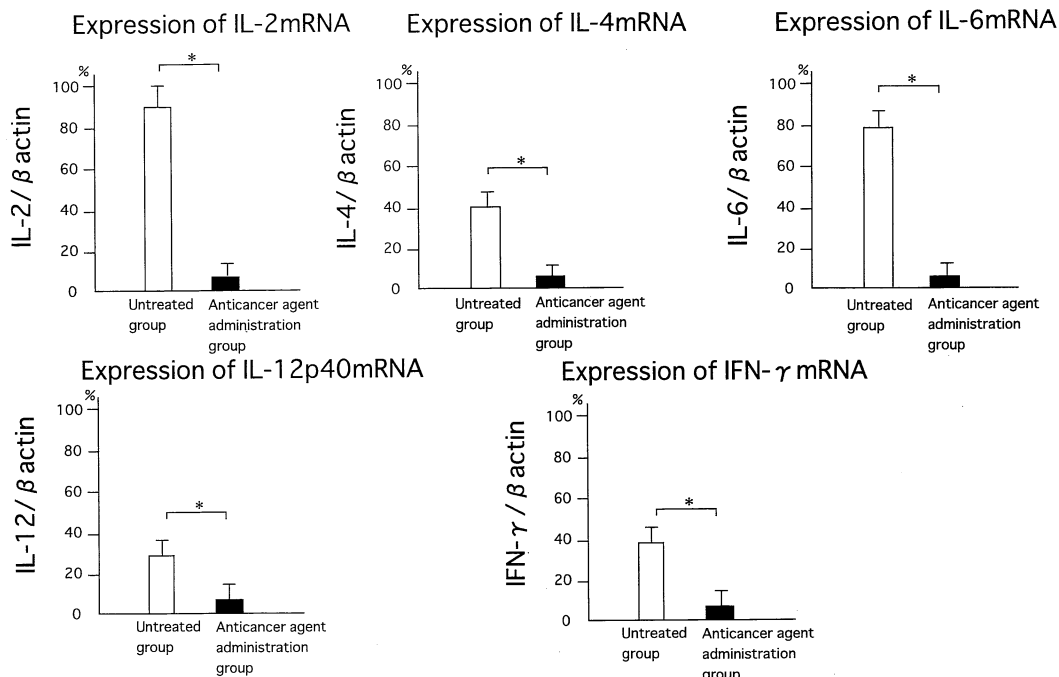


Fig. 8. Effect of anticancer agent
* : P < 0.05

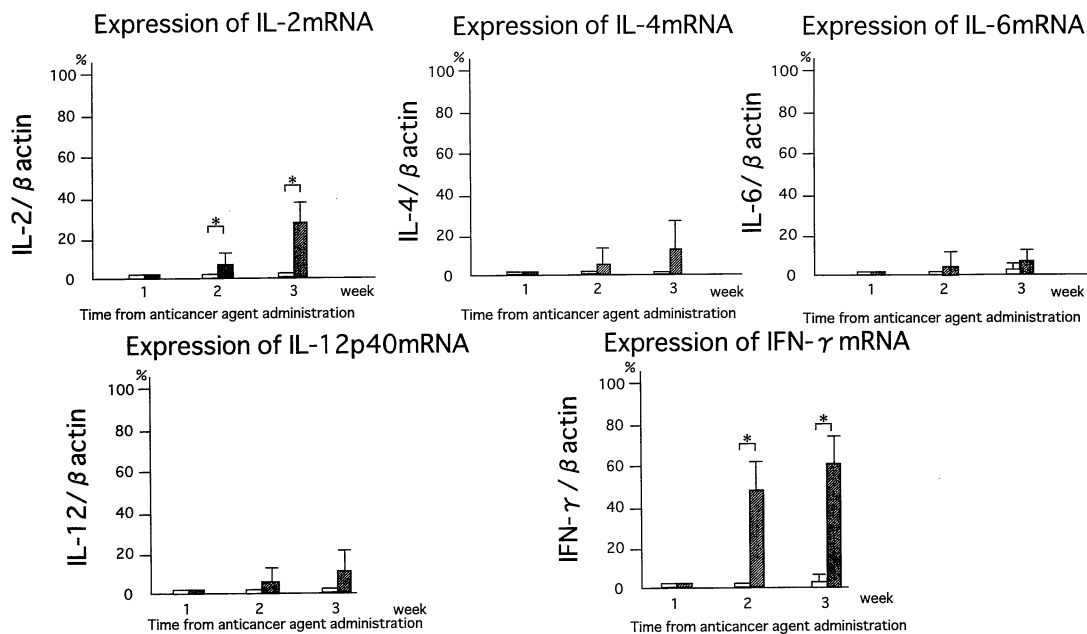


Fig. 9. Comparison of cytokine mRNA expression between combination therapy and vehicle control groups of mice bearing no tumors
□ vehicle control group ■ combination therapy group
* : P < 0.05

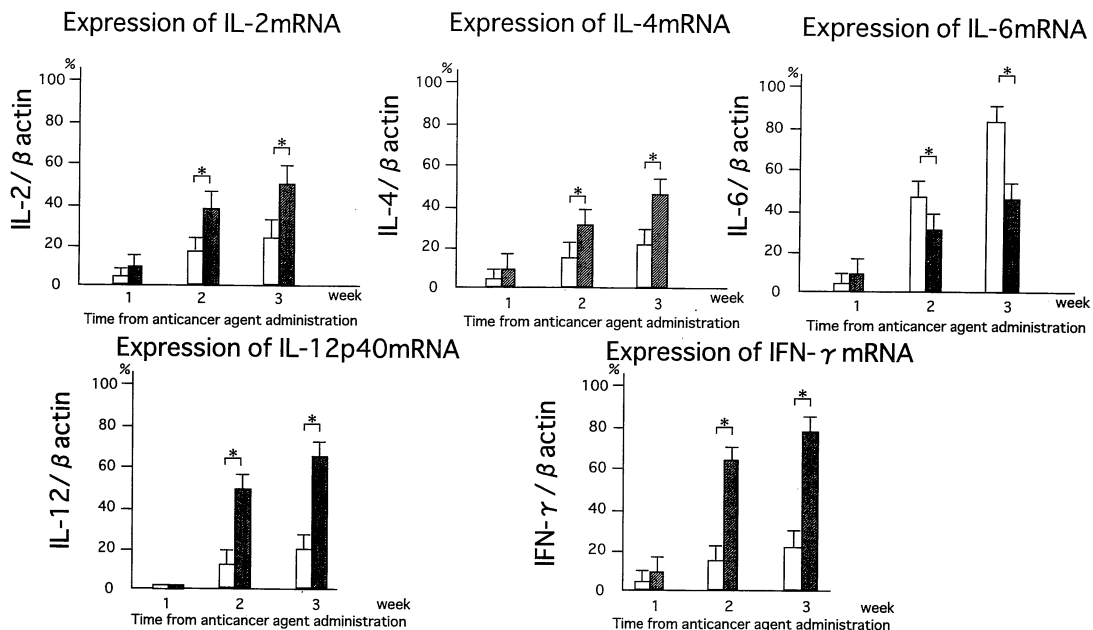


Fig. 10. Comparison of cytokine mRNA expression between combination therapy and vehicle control groups of mice bearing tumors

□ vehicle control group ■ combination therapy group
* : $P < 0.05$

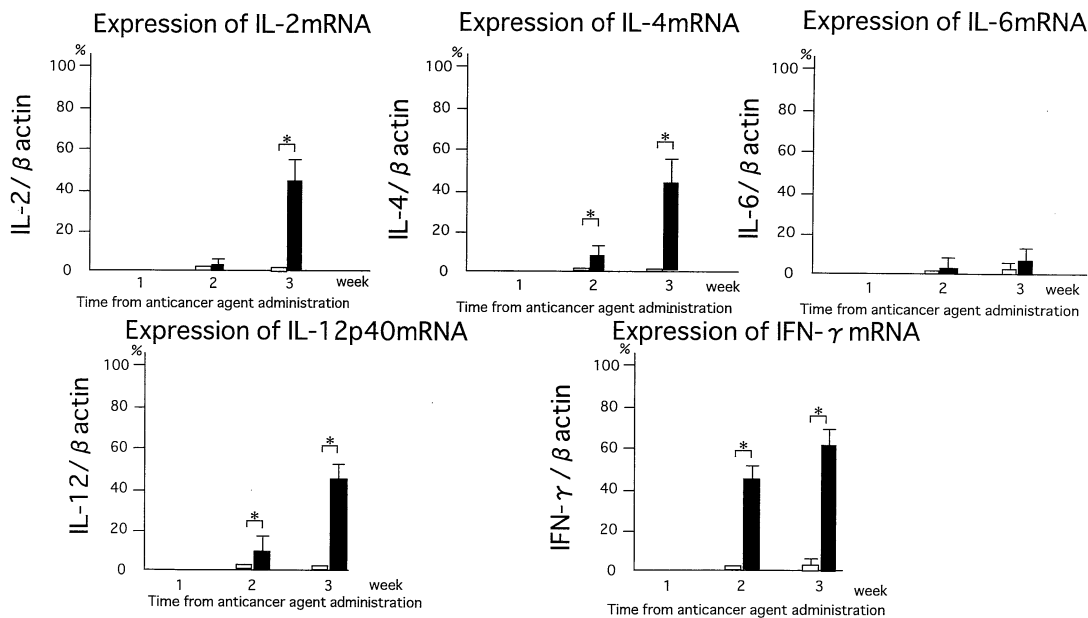


Fig. 11. Comparison of cytokine mRNA expression between delayed CAM-treatment and vehicle control groups of mice bearing no tumors

□ vehicle control group ■ delayed CAM-treatment group
* : $P < 0.05$

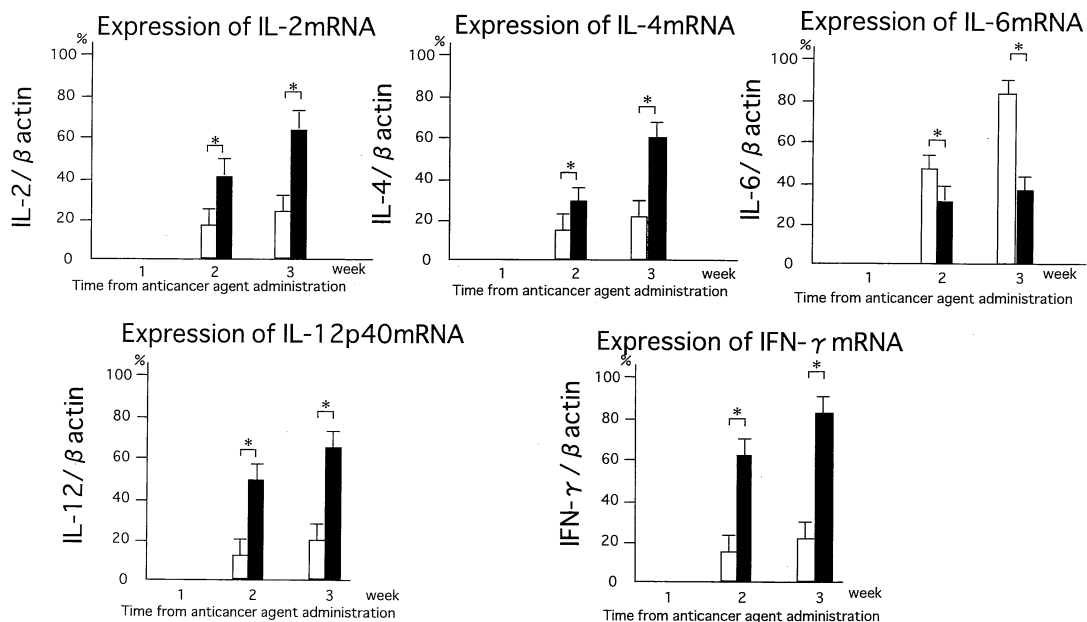


Fig. 12. Comparison of cytokine mRNA expression between delayed CAM-treatment and vehicle control groups of mice bearing tumors

□ vehicle control group ■ delayed CAM-treatment group

* : $P < 0.05$

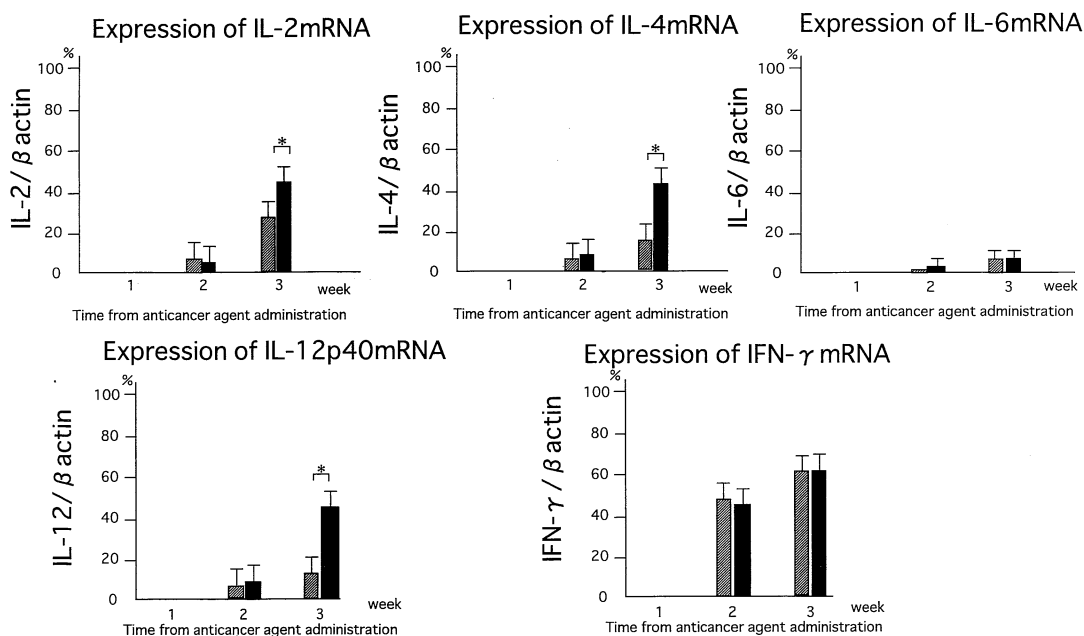


Fig. 13. Comparison of cytokine mRNA expression between delayed CAM-treatment and combination therapy groups of mice bearing no tumors

□ combination therapy group ■ delayed CAM-treatment group

* : $P < 0.05$

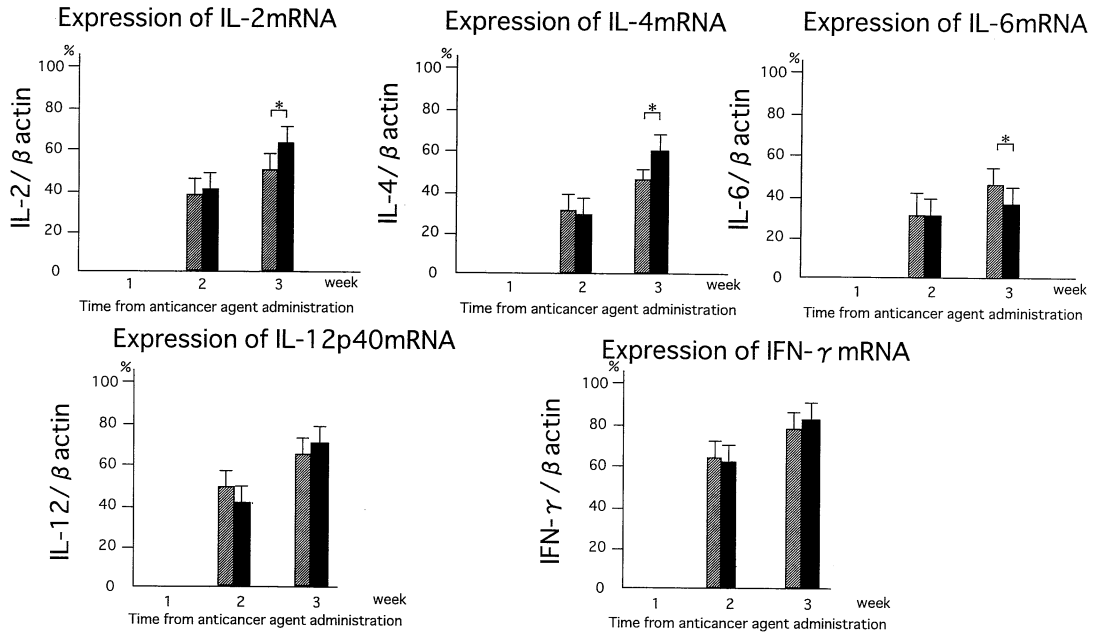


Fig. 14. Comparison of cytokine mRNA expression between delayed CAM-treatment and combination groups of mice bearing tumors
 □ combination therapy group ■ delayed CAM-treatment group
 * : P < 0.05

Table 3. Expression levels of cytokine mRNA

Groups of mice	Expression level (cytokine / β-actin)														
	IL-2			IL-4			IL-6			IL-12p40			IFN-γ		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
without tumor, with CAM from day 7	11.±5.3*	30.±9.1*	8.±9	7.±12	7.±10	11.±9	7.±11	13.±14	48.±15	61.±15					
without tumor, with CAM from day 14	5.±6	48.±10	10.±3	52.±13	7.±9	12.±10	11.±4	48.±9	55.±10	69.±11					
without tumor, without CAM	-	-	-	-	-	7.±6	-	-	-	-	11.±9				
with tumor, with CAM from day 7	12.±8	38.±11	49.±12	10.±11	38.±10	47.±11	10.±8	31.±11	52.±11	44.±12	63.±11	10.±10	62.±7	77.±10	
with tumor, with CAM from day 14	40.±9	62.±9	31.±8	62.±5	29.±8	35.±9	47.±7	63.±9	62.±9	82.±10					
with tumor, without CAM	8.±8	18.±9	28.±10	8.±8	18.±8	22.±10	9.±10	48.±10	84.±9	11.±10	24.±10	8.±7	17.±9	22.±10	

cytokine/actin(%) mean±SD

without tumor : not injected with tumor cells Each group n=10 * : p < 0.05

with tumor : injected with tumor cells

with CAM from day 7 : treated with CAM from day 7(combination therapy group)

with CAM from day 14 : treated with CAM from day 14(delayed CAM-treatment group)

without CAM : not treated with CAM(vehicle control group)

した($P < 0.05$)(Table 3).

考 察

Lewis 肺癌細胞は静脈内投与で、高率に肺に転移する細胞株として知られている。濱田ら¹⁰⁾は尾静脈から Lewis 肺癌細胞投与を行った BDF 1 マウスの強制転移モデルで、CAM の腫瘍肺転移抑制効果を報告している。今回の実験では皮下接種モデルを用いたため、検体採取時、胸腔内と腹腔内との臓器に転移結節を認めず、本動物モデルでは癌転移による臓器障害の影響は少ない。従って、転移を認めない担癌宿主での腫瘍増殖に対する免疫応答の解析に適していると考えられた。

腫瘍接種・非接種マウス群における検討では、担癌状態で誘導される宿主応答に対する CAM の影響を解析した。腫瘍増殖に伴ない、免疫系は腫瘍関連抗原や腫瘍細胞が細胞表面に分泌するムチン等の糖蛋白を認識して活性化される。癌細胞表面に存在する腫瘍関連抗原は主として細胞傷害性 T 細胞(CTL)に認識され活性化を導き、一部は抗原提示細胞によりヘルパー T 細胞に提示され活性化を導く。これらの反応は MHC 拘束性に起こるが、腫瘍細胞上の分泌糖蛋白の中には MHC 非拘束性に CTL を誘導したり、マクロファージ、natural killer (NK) 細胞、或いは $\gamma\delta$ T 細胞の標的になる抗原物質が存在する。活性化ヘルパー T 細胞が産生する IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IFN- γ は CTL に細胞傷害活性を亢進させ、IL-2, IFN- γ などは NK 細胞を活性化し Lymphokine-activated killer cell(LAK 細胞)を誘導する。また腫瘍細胞上の腫瘍関連抗原に特異抗体が結合すると、CTL やマクロファージによる、抗体依存性細胞傷害(ADCC; antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity)をもたらす。この様な様々な様式で、腫瘍の排除機構が活性化される¹¹⁾。

今回の研究から、IL-2, IL-4, IL-6, IL-12 p 40, IFN- γ mRNA は腫瘍非接種群では発現を認めず、腫瘍接種群でのみ発現を認めた。山本ら¹²⁾は CSA 1 M 線維肉腫を同系 BALB/c マウスに移植した系で担癌 2~3 週のマウスの脾細胞全分画を *in vitro* で 48 時間培養すると、正常マウス脾細胞培養上清中には検出しなかった IL-2, IFN- γ , TNF を高濃度に上清中に検出する事を報告し、担癌宿主での腫瘍増殖初期に T 細胞は癌抗原刺激で、一旦活性化されると述べている。今回の腫瘍接種・非接種マウス群での比較検討から、Lewis 肺癌細胞増殖により、腫瘍接種 2 週目迄に脾細胞中に IL-2, IL-4, IL-6, IL-12 p 40, IFN- γ の mRNA 発現が、誘導されると考えられた。

腫瘍非接種群は CAM 投与、非投与にかかわらずサイトカイン mRNA の発現は認められなかったが、腫瘍接種群では CAM 投与により IFN- γ , IL-4, IL-12 p 40 の mRNA の発現が増強、IL-6 mRNA の発現低下がみられた。前田ら¹³⁾は alloxan 静脈内投与により作製した糖尿病マウスに zymosan 腹腔内投与を行い、腹膜炎を惹起させた系で、糖尿病マウスのように炎症作用が低下した状態では、CAM は炎症作用を亢進させ、逆に正常マウスでは炎症作用を抑制する二面性がある事を報告し、この作用は CAM の dual regulatory effect と呼ばれるに至っている。今回の検討でも CAM の作用は宿主の条件によって異なり、CAM のサイトカイン産生に与える作用は担癌マウスでのみ発現される事が実証された。

IL-4 には抗腫瘍作用が知られており、その機序は腫瘍特異的な CTL を長期に誘導することが考えられている¹⁴⁾。Hamada ら¹⁵⁾は担癌マウスでは erythromycin (EM) が IL-4 産生を誘導し、IL-4 によってマクロファージが抗腫瘍活性を発現し得る迄に活性化され得る事をすでに報告している。今回の成績では、担癌マウスにおいてのみ CAM が IL-4 mRNA の発現を増強している事から、CAM の腫瘍増殖抑制作用に IL-4 を介した細胞傷害性マクロファージが関与する可能性も推察できる。一方、IL-6 は悪液質誘導に重要なサイトカインとして知られている¹⁶⁻¹⁸⁾。著者らは非小細胞肺癌患者で CAM 投与が悪液質を改善し血清 IL-6 を低下させる事⁹⁾、IL-6 の変動と生存期間とが相関する事¹⁹⁾を報告している。今回の実験成績で CAM 投与が担癌マウスにおいて IL-6 mRNA の発現を低下させた事実は、臨床成績を裏付けるものと考えられた。IL-12 は NK 細胞を効率よく活性化するのみでなく、IFN- γ 産生を誘導し、IL-12 と IFN- γ 共存下で CD 8 細胞を CTL へ分化させ得ること、さらにマクロファージに対する強い活性化作用を有する事等が知られている^{20,21)}。IFN- γ の抗腫瘍効果には様々なものがあり、MHC クラス抗原、接着分子、IL-2 R、免疫グロブリン FcR などの発現を増強する事で、抗腫瘍免疫応答が多面的に活性化されると考えられている²²⁾。

今回の結果では担癌マウスに CAM を投与すると IFN- γ , IL-12 p 40 mRNA の発現が増強した。この結果から腫瘍接種マウスにおいて、CAM は抗腫瘍活性を担う IFN- γ , IL-4, IL-12 p 40 の mRNA 発現を増強し、悪液質の要因である IL-6 の mRNA 発現を抑制し、担癌宿主の抵抗性を亢進させ得る可能性が考えられた。

次に、抗癌化学療法が宿主に与える影響とそれに対する CAM の効果を検討した。

まず抗癌薬単独のサイトカイン mRNA 発現に与える

影響は、腫瘍接種群では抗癌薬投与で IL-2, IL-4, IL-6, IL-12 p 40, IFN- γ の mRNA の発現は、抗癌薬非投与の場合と比較してすべて有意に低下しており、これらのサイトカインの発現は抗癌薬投与で抑制されるものと考えられた。担癌宿主での抗癌薬静脈内投与の影響を脾細胞サイトカイン mRNA レベルで検討した報告はいまだみられていないので、抗癌薬による宿主免疫能に対する影響を知る上で貴重な結果で、抗癌薬の免疫系に与える毒性のサイトカインレベルでのさらなる検討が必要と考えられた。

また、抗癌薬と CAM を併用した場合は、抗癌薬治療時から CAM 投与を開始すると、CAM 非投与と比較して IL-2, IL-12 p 40, IFN- γ の mRNA 発現が有意に増強し、IL-6 mRNA の発現が有意に低下していた。時間差投与群も同時併用群と同様のサイトカイン mRNA 発現パターンの変動がみられたが、時間差投与群は同時併用群と比較して、IL-2, IL-4 mRNA の発現がさらに増強し、IL-6 mRNA の発現低下は一層顕著になった。これらの事実は、CAM 投与が担癌宿主において Th 1・Th 2 サブセットのバランスのとれた分化を促進する事を示唆するものである。

Collins ら²³⁾ は CDDP の抗腫瘍効果としてリンパ球の関与を指摘し、また抗癌化学療法が、担癌宿主の免疫逃避機構を改善して BRM 療法の効果をさらに増強すると報告している²⁴⁾。更に抗癌薬が癌抗原性を増強する事で、癌細胞によって誘導され得るサブレッサー T 細胞の誘導を抑制し、可溶性免疫抑制因子(SIRS: soluble immune response suppressor)の産生を減少させ、エフェクター細胞機能を増強する事が、現在までに cyclophosphamide, bleomycin, mitomycin C, adriamycin などで確認されている²⁵⁾。

坂本らは Lewis 肺癌細胞皮下接種マウスモデルで、抗癌薬投与により腫瘍増殖抑制を認めるが、CAM を併用投与する場合、抗癌薬と同時期から開始するより、1 週後から開始するほうが、腫瘍増殖抑制効果が強い事を既に報告している²⁶⁾。今回の検討から、抗癌薬投与 1 週後から CAM 投与を開始すると、抗癌薬で抑制された担癌宿主の免疫系において Th 1・Th 2 両サブセットがバランス良く誘導されるものと推察された。癌患者においては、担癌の上に化学療法、放射線など生体防御系への侵襲的作用が加わり、免疫応答が抑制される傾向にある。今回著者は、この様な担癌宿主における CAM の作用をサイトカインレベルで初めて明らかにし得た。

最近、マクロライド薬の抗腫瘍効果が注目されているが、既に、EM をはじめとする 14 員環マクロライドが in

vitro, in vivo で抗菌作用以外に好中球やリンパ球機能を制御し、免疫修飾作用を有することが報告されている²⁷⁻²⁹⁾。Parajuli ら³⁰⁾ は CAM は T, B 細胞の働きが低下している severe combined immunodeficient(SCID) mouse では in vivo で肺癌の転移を抑制しないが、in vitro で腫瘍細胞に対する LAK 活性を増強する事を示し、CAM は NK 細胞や CTL の活性化に何等かの影響を及ぼすことを推察している。また、Sassa ら³¹⁾ は CAM はラットに移植した乳腺癌 13762 NF の増殖を抑制し、その効果は carboplatin や cyclophosphamide と併用した方が強い事を報告している。更に、井上ら³²⁾ は CAM による肺癌細胞株 A 549, SBC-3 の増殖抑制、A 549 の浸潤抑制を、Sawaki ら³³⁾ は A 549 腺癌細胞を用いた腫瘍による血管新生モデルで、CAM の IL-8 抑制による血管新生抑制作用を、Yatsunami ら³⁴⁾ は CAM は in vivo で B 16-BL 細胞の血管新生を抑制する効果がある事を報告している。Nagai ら³⁵⁾ は同じ 14 員環マクロライド薬である roxithro-mycin(RXM)がヒト骨髄性白血病 HL 60 細胞の増殖を抑制すると述べている。藤本ら³⁶⁾ は CAM は非小細胞肺癌細胞に対する直接の殺細胞作用もあるとしている。この様に CAM の宿主と腫瘍細胞に対する作用が報告されているが、今回の結果から、CAM は担癌宿主の Th 1・Th 2 サブセットのバランスを保ちながら、腫瘍に対する生体防御機構を活性化している事が推察された。

結 語

BRM としての CAM の有効性の検討のため、C 57 BL /6 マウスの Lewis 肺癌細胞皮下接種モデルで、腫瘍接種・非接種宿主における、また抗癌化学療法施行宿主における、CAM の各種サイトカイン mRNA 発現に及ぼす影響を RT-PCR 法で検討した。

1) 腫瘍接種と非接種との検討

腫瘍非接種群は CAM 投与、非投与にかかわらずサイトカイン mRNA の発現は認められなかったが、腫瘍接種群で CAM 投与で IFN- γ , IL-4, IL-12 p 40 の mRNA 発現増強、IL-6 mRNA の発現低下みられ、CAM は担癌宿主の免疫系に対して、Th 1・Th 2 サブセットのバランスを保ちながら抗腫瘍活性を亢進させると考えられた。

2) 抗癌化学療法との併用効果

まず抗癌薬単独のサイトカイン発現に与える影響は、腫瘍接種群では抗癌薬投与で IL-2, IL-4, IL-6, IL-12 p 40, IFN- γ の mRNA 発現は抗癌薬非投与の場合と比較してすべて有意に低下しており、これらのサイトカインの発現は抗癌薬投与により抑制されていると考えられ

た。担癌宿主での抗癌薬静脈内投与の影響を脾細胞サイトカイン mRNA レベルでの検討は本研究以外にないが、抗癌薬の宿主免疫能に対する影響を知る上で、貴重な結果であった。

次に、抗癌薬と CAM とを併用した場合では、CAM と抗癌薬を同時期から併用すると CAM 非投与と比較して担癌宿主の Th1・Th2 両系のバランスを保ちながらも Th1 誘導に関する IL-2, IL-12 p40, IFN- γ の mRNA 発現が有意に増強し、悪液質の要因となる IL-6 の mRNA の発現が有意に低下していた。

時間差投与群も同時併用群と同様のサイトカインの変動がみられたが、時間差投与群は同時併用群と比較して更に IL-2, IL-4 mRNA の発現が増強し、IL-6 mRNA の発現がより低下していた。抗癌薬投与下でも CAM はサイトカインの発現に影響を及ぼすが、その作用は投与開始時期によって異なると考えられた。

以上から、CAM の BRM 作用の機序として、担癌宿主のサイトカインネットワークを制御して、T 細胞サブセットのバランスを保ちながら抗腫瘍効果を発現し得る可能性を明らかにした。

(なお本論文の要旨は第 37 回日本胸部疾患学会総会(1997 年 4 月横浜), 第 38 回日本呼吸器学会総会(1998 年 4 月熊本), 第 39 回日本呼吸器学会総会(1999 年 4 月横浜), 第 46 回日本化学療法学会総会(1998 年 6 月和歌山), 第 38 回日本肺癌学会総会(1997 年 11 月仙台), 第 39 回日本肺癌学会総会(1998 年 11 月金沢), 第 35 回日本癌治療学会総会(1997 年 10 月京都), 第 36 回日本癌治療学会総会(1998 年 10 月博多), 第 21 回国際化学療法学会(1999 年 7 月, バーミンガム, イギリス)で発表した。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました奈良県立医科大学第 2 内科学講座成田亘啓教授、細菌学講座喜多英二教授に深甚なる謝意を捧げるとともに御校閲、御助言を賜りました腫瘍病理学講座小西陽一教授に深謝申し上げます。さらに研究の遂行について終始御指導を頂いた故澤木政好助教授、三笠桂一講師に深謝いたします。また、日々御協力頂いた第 2 内科学教室、細菌学教室の諸兄姉に感謝致します。)

文 献

- 1) 澤木政好, 三上理一郎, 三笠桂一, 国松幹和, 伊藤新作, 成田亘啓: 慢性下気道感染症における Erythromycin 長期化学療法法の検討第 1 報 Amoxicillin との対比. 感染症誌. 60: 37-44, 1986.
- 2) 三笠桂一, 澤木政好, 古西 満, 前田光一, 竹内章治, 濱田 薫, 国松幹和, 成田亘啓: 慢性下気道感染症における Erythromycin 長期化学療法法の検討—第 3 報投与期間 3 年以上の症例を中心に—. 感染症誌. 66: 561-567, 1992.
- 3) 工藤翔二, 植竹健司, 萩原弘一, 平山雅清, 許 栄宏, 木村 仁, 杉山幸比古: びまん性汎細気管支炎に対するエリスロマイシン長期投与の臨床効果に関する研究—4 年間治療成績—. 日胸疾会誌. 25: 632-643, 1987.
- 4) Jaffe, A., Francis, J., Rosenthal, M. and Bush, A.: Long-term azithromycin may improve lung function in children with cystic fibrosis. Lancet 351: 420, 1998.
- 5) Wiebe, K., Harringer, W., Franke, U., Struber, M., Krug, N., Korff, F., Wahlers, T., Cremer, J. and Haverich, A.: FK 506 rescue therapy in lung transplantation. Transplant. Proc. 30: 1508-1509, 1998.
- 6) Mikasa, K., Sawaki, M., Kita, E., Hamada, K., Teramoto, S., Sakamoto, M., Maeda, K., Konishi, M. and Narita, N.: Significant survival benefit to patient with advanced non small cell lung cancer from treatment with clarithromycin. Chemotherapy 43: 288-296, 1997.
- 7) 三笠桂一, 澤木政好, 喜多英二, 濱田 薫, 坂本正洋, 寺本正治, 成田亘啓: 肺癌治療における biological response modifier としてのマクロライド薬. 日内会誌. 86: 100-107, 1997.
- 8) 寺本正治, 三笠桂一, 澤木政好, 濱田 薫, 古西満, 前田光一, 坂本正洋, 辻本正之, 森 啓, 喜多英二, 成田亘啓: 原発性肺癌に対する 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.
- 9) 坂本正洋, 三笠桂一, 濱田 薫, 寺本正治, 古西満, 前田光一, 辻本正之, 平井妙代子, 森 啓, 植田勝廣, 澤木政好, 喜多英二, 成田亘啓: 原発性非小細胞肺癌患者の癌悪液質に対する clarithromycin の有用性に関する検討. 日化療会誌. 44: 879-882, 1996.
- 10) 濱田 薫, 坂本正洋, 三笠桂一, 寺本正治, 古西満, 澤木政好, 成田亘啓, 喜多英二: マウス肺癌細胞接種モデルにおける CAM(clarithromycin)の抗腫瘍効果に対する検討. Jap. J. Antibiotics 50: Suppl A, 28-31, 1996.
- 11) 矢田純一: 医系免疫学, 改訂 4 版, 中外医学社, 東京, 388-405 頁, 1995.

- 12) Yamamoto, N., Zou, J. P., Li, X. F., Takenaka, H., Noda, S., Fujii, T., Ono, S., Kobayashi, Y., Mukaida, N. and Matsushima, K. : Regulatory mechanisms for production of IFN- γ and TNF by antitumor T cells or macrophages in the tumor-bearing state. *J. Immunol.* **154** : 2281-2290, 1995.
- 13) 前田光一, 澤木政好, 三笠桂一, 古西 満, 寺本正治, 森 啓, 坂本正洋, 辻本正之, 竹内章治, 濱田 薫, 国松幹和, 成田亘啓, 喜多英二, 櫻葉周三 : clarithromycin の炎症反応に対する dual regulatory effect. 厚生省特定疾患 びまん性肺疾患調査研究班 平成6年度研究報告書 : 166-169, 1994.
- 14) Tepper, R. I., Pattengalle, P. K. and Leder, P. : Murine interleukin-4 displays potent anti-tumor activity in vivo. *Cell* **57** : 503-512, 1989.
- 15) Hamada, K., Kita, E., Sawaki, M., Mikasa, k. and Narita N. : Antitumor effect of erythromycin in mice. *Chemotherapy* **41** : 59-69, 1995.
- 16) 中嶋弘一, 平野俊夫 : IL-6 の基礎と臨床. 癌と化学療法 **18** : 505-514, 1991.
- 17) Strassmann, G., Fong, M., Kenney, J. S. and Jacob, C. O. : Evidence for the involvement of interleukin 6 in experimental cancer cachexia. *J. Clin. Invest.* **89** : 1681-1684, 1992.
- 18) Strassman, G., Jacob, C. O., Evans, R., Beall, D. and Fong, M. : Mechanism 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.
- 19) 坂本正洋, 三笠桂一, 澤木政好, 濱田 薫, 寺本正治, 植田勝廣, 眞島利匡, 古西 満, 前田光一, 辻本正之, 森 啓, 喜多英二, 成田亘啓 : 非小細胞肺癌患者に対する clarithromycin(CAM) の有用性に関する研究—臨床パラメーター及び生存期間と血清 IL-6 に関する検討. 日化療会誌. **44** : 87-89, 1998.
- 20) Zou, J. P., Yamamoto, N., Takenaka, H., Kobayashi, M., Herrmann, S. H., Wolf, S. F., Fujiwara, H. and Hamaoka, T. : Systemic administration of rIL-12 induces complete tumor regression and protective immunity : Response is correlated with a striking reversal of suppressed interferon- γ production by antitumor T cells. *Int. Immunol.* **7** : 1135-1145, 1995.
- 21) Mu, J., Zou, J. P., Yamamoto, N., Tsutsui, T., Tai, X. G., Kobayashi, M., Herrmann, S., Fujiwara, H. and Hamaoka T. : administration of recombinant interleukin 12 prevents outgrowth of tumor cells metastasizing spontaneously to lung and lymph nodes. *Cancer Res.* **55** : 4404-4408, 1995.
- 22) Brown, D. A., Kondo, K. L., Wong, S. W. and Diamond, D. J. : Characterization of nuclear protein binding to the interferon- γ promoter in quiescent and activated human T cells. *Eur. J. Immunol.* **22** : 2419-2428, 1992.
- 23) Collins, J. L. and Kao, M. S. : The anticancer drug, cisplatin, increases the naturally occurring cell-mediated lysis of tumor cells. *Cancer Immunol. Immunother.* **29** : 17-22, 1989.
- 24) 細川真澄男, 袁 嵐 : BRM と化学療法—基礎の立場から—*Biotherapy* **10** : 574, 1996.
- 25) 細川真澄男 : 癌化学療法剤による免疫修飾. 日臨免疫誌. **15** : 530, 1992.
- 26) 坂本正洋, 三笠桂一, 濱田 薫, 古西 満, 前田光一, 善本英一郎, 植田勝廣, 眞島利匡, 澤木正好, 喜多英二, 成田亘啓 : 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.
- 27) Anderson, R. : Erythromycin and roxithromycin potentiate human neutrophil locomotion in vitro by inhibition of leukoattractant-activated superoxide generation and autooxidation. *J. Infect. Dis.* **159** : 966-973, 1989.
- 28) Frascini, F., Scaglione, F., Ferrara, O., Marelli, O., Braga, P. C. and Teodori, F. : Evaluation of the immunostimulating activity of erythromycin in man. *Chemotherapy* **32** : 286-290, 1986.
- 29) van, Rensburg, C. E., Anderson, R., Joone, G., van der Merwe, M. and van Rensburg, A. J. : Effect of erythromycin on cellular and humoral immune functions in vitro and in vivo. *J. Antimicrob. Chemother.* **8** : 467-474, 1981.
- 30) Parajuli, P., Yano, S., Hanibuchi, M., Nokihara, H., Shinohara, T. and Sone S. : Effect of clarithromycin on the distant metastases of human lung cancer cells in SCID mice. *J. Med. Invest.* **44** : 205-210, 1998.

- 31) Sassa, K., Mizushima, Y., Fujishita, T., Oosaki, R. and Kobayashi, M.: Therapeutic effect of clarithromycin on a transplanted tumor in rats. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **43**: 67-72, 1999.
- 32) 井上憲一, 坂田憲史, 芝崎正順, 西 裕一, 坂本芳雄, 松尾博司: 肺癌細胞株 A-549, SBC-3 の浸潤と増殖に対するマクロライド系抗生物質の抑制効果. *Jap. J. Antibiotics.* **51**: Suppl A, 79-80, 1997.
- 33) Sawaki, M., Kita, E., Mikasa K. and Narita N.: Clarithromycin as a potent anti-angiogenesis agent; Possible application for the antitumor agent. *Can. J. Infect. Dis.* **6** Suppl 213, 1995.
- 34) Yatsunami, J., Turuta, N., Wakamatsu, K., Hara, N. and Hayashi, S.: Clarithromycin is a potent inhibitor of tumor-induced angiogenesis. *Res. Exp. Med.* **197**: 189-197, 1997.
- 35) Nagai, M., Yamada, H., Nakada, S., Ochi, K., Nemoto, T., Takahara, S., Hoshina, S. and Horiguchi J.: A macrolide antibiotic, roxithromycin, inhibits the growth of human myeloid leukemia HL 60 cells by producing multinucleate cells. *Mol. Cell. Biochem.* **144**: 191-195, 1995.
- 36) 藤本修一, 岩井直路, 木村秀樹: 14 員環マクロライドの非小細胞肺癌に対する殺細胞作用—新鮮臨床材料を用いての検討. *日癌治.* **33**: 195, 1998.