

学位論文題名

Novel models of cancer-related anemia
in mice inoculated with IL-6-producing tumor cells

(IL-6産生腫瘍株移植マウスを用いた新規癌性貧血モデルに関する研究)

学位論文内容の要旨

【背景と目的】新規に癌と診断された未治療の癌患者における貧血の頻度は約 30% であり、ヘモグロビンレベルの低下は癌患者の一般状態不良と相関すると報告されている。このような癌性貧血は失血・溶血あるいは栄養欠乏などで単純に説明できないと考えられ、炎症性サイトカインを介した赤血球生成障害の可能性が示唆されている。一方、炎症性サイトカインである IL-6 は、乳癌、大腸癌、肺癌の患者血清中に検出され、癌患者においてヘモグロビン値と負の相関を示すことが報告されている。また免疫療法として IL-6 を癌患者に投与した臨床試験において貧血の発症が報告されている。そこで本研究では、IL-6 が癌性貧血の発症に関与している可能性を検討するため、IL-6 産生株であるヒト肺癌株 LC-06-JCK 及びマウス結腸癌株 colon26 clone 5 を皮下に移植した動物モデルを作成し、貧血の発症と IL-6 との関連性を解析した。

【材料と方法】<癌細胞>副甲状腺ホルモン関連タンパク (PTHrP) を産生するヒト肺癌株 LC-06-JCK 及びヒト膵癌株 PAN-07-JCK は実験動物中央研究所より入手した。IL-6 を高産生するマウス結腸癌株 colon 26 clone 5 は癌悪液質誘導株である colon26 から中外製薬株式会社にて大内らにより樹立された。<動物モデル>雄性ヌードラット F344/N はクレアより購入した。雄性ヌードマウス BALB/c nu/nu 及び雄性 CDF1 マウスは日本チャールズリバーより購入した。LC-06-JCK 株及び PAN-07-JCK 株は癌組織片をヌードマウス皮下に移植することで継代維持した。Colon26 clone 5 株は、10%牛胎児血清を含む RPMI1640 培地にて、5%炭酸ガス 37℃の細胞培養恒温器中で継代培養した。0.05%トリプシン 0.02% EDTA を用いて培養細胞を回収し、単細胞浮遊液を調製し 10⁶ 個の細胞を CDF1 マウス皮下に移植した。<血清中サイトカイン、アルブミン及びヘモグロビンの測定>血清中サイトカイン及びアルブミンは市販の ELISA キットを用いて定量した。ヒト IL-6 ELISA : R&D System 社、マウス IL-6 ELISA : Pierce 社、マウスエリスロポエチン (EPO) ELISA : R&D System 社、マウスアルブミン ELISA : シバヤギ社。ヘモグロビンはシスメックス社の動物用多項目自動血球計数装置 KX-21NV を用いて測定した。<ラット抗マウス IL-6 受容体モノクローナル抗体投与>IL-6 産生腫瘍担癌マウスでの貧血発症における IL-6 の役割を検討するため、ラット抗マウス IL-6 受容体モノクローナル抗体 MR16-1 を用いた。マウス IL-6 受容体はマウス IL-6 だけでなくヒト IL-6 とも結合することから、MR16-1 は、マウス IL-6 だけでなくヒト IL-6 の生物活性も阻害することができる。MR16-1 抗体は 20 mg/kg の用量で LC-06-JCK 皮下移植マウスモデルにおいて腹腔内投与した。<ヒト化抗ヒト PTHrP モノクローナル抗体投与>ヒト化抗ヒト PTHrP モノクローナル抗体は 1 mg/kg の用量で LC-06-JCK 及び PAN-07-JCK 担癌ラットモデルにおいて静脈内投与した。

【結果】これまでヒト肺癌株 LC-06-JCK 及びヒト膵癌株 PAN-07-JCK は PTHrP を産生し、ヌードラット皮下移植モデルにて共に体重減少を特徴とする癌悪液質を発症することが報告されているが、ヘモグロビン低下及び赤血球数の減少は LC-06-JCK 移植ヌードラットでのみ観察された。また、ヒト型化抗ヒト PTHrP モノクローナル抗体は、LC-06-JCK 担癌ラットの癌悪液質を改善することが報告されているが、貧血の改善効果は認められなかった。これらのことから、癌性貧血は癌悪液質とは異なる機序により発症することが示唆された。また、LC-06-JCK 担癌ヌードラットでは血清中に高濃度の IL-6 が検出されることが報告されており、従って LC-06-JCK 担癌ヌードラットでのみ認められた貧血は、PTHrP ではなく IL-6 に起因する可能性が推測された。次に癌性貧血に IL-6 が関与している可能性を検証するため、IL-6 の作用を阻害するラット抗マウス IL-6 受容体抗体 MR16-1 を用いて検討を行った。MR16-1 はマウス IL-6 受容体特異的モノクローナル抗体であり、ラット IL-6 受容体には交差性を示さないため、マウス皮下移植モデルでの検討を行った。PAN-07-JCK 担癌ヌードマウスと異なり、LC-06-JCK 担癌ヌードマウスにおいて、移植後 51 日、65 日、72 日で非担癌マウスと比較して有意にヘモグロビンは減少し、血清中ヒト IL-6 の上昇が認められた。また、非担癌マウスと比較して有意に血清アルブミンが低下しマウス EPO が上昇した。さらに IL-6 産生株である colon26 clone 5 細胞を皮下移植したマウスにおいても、移植後 28 日及び 35 日にて非担癌マウスと比較して有意にヘモグロビンが減少し、血清中マウス IL-6 濃度が上昇した。そこで、LC-06-JCK 皮下移植ヌードマウスにおいてラット抗マウス IL-6 受容体モノクローナル抗体 MR16-1 を投与した結果、ヘモグロビン及び血清アルブミンの減少を有意に抑制した。一方、血清中ヒト IL-6 及びマウス EPO 濃度は MR16-1 投与で有意な変化は認められなかった。血清中マウス IL-6 は MR16-1 投与によらず検出限界以下であった。

【考察】これまで癌患者において血清 IL-6 レベルの亢進とヘモグロビン低下との間に相関性が報告されており、本論文でも LC-06-JCK と colon26 clone 5 担癌マウスモデルにおいて、血清 IL-6 レベルの上昇とヘモグロビンの低下が認められた。ここで LC-06-JCK で貧血と共に認められた血清アルブミン減少は、IL-6 による炎症性急性期反応であると考えられ、臨床的に血清アルブミン減少は癌患者の予後因子とされているが、単に栄養不良を意味するのではなく、血清アルブミン減少を誘導する IL-6 が予後に影響している可能性が考えられた。また、癌悪液質マウスモデルでも血清中 IL-6 が高値を示し、IL-6 中和抗体投与により悪液質発症を抑制することが報告されている。今回、LC-06-JCK 担癌マウスモデルにおいて、ラット抗マウス IL-6 受容体抗体を投与することで貧血発症を抑制したことから、IL-6 が癌性貧血の原因となっている可能性が示された。現在までに IL-6 による貧血発症機序は未だ解明されていないが、IL-6 は鉄利用を制御するホルモンである hepcidin の肝細胞での産生を誘導することが報告されていた。本論文の癌性貧血モデルでは血清中 EPO レベルは亢進していたことから、IL-6 による貧血発症機序として、EPO 産生抑制ではなく hepcidin 産生亢進による鉄利用抑制に起因する赤血球生成障害が推測された。

【結論】本論文で示した新規貧血マウスモデルは、癌性貧血における IL-6 の関与を示唆するとともに、癌患者における貧血の新たな治療法の探索に有用であると考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 岩 永 敏 彦

副 査 教 授 秋 田 弘 俊

副 査 教 授 西 村 孝 司

学 位 論 文 題 名

Novel models of cancer-related anemia in mice inoculated with IL-6-producing tumor cells

(IL-6産生腫瘍株移植マウスを用いた新規癌性貧血モデルに関する研究)

本研究では、IL-6が癌性貧血の発症に関与している可能性を検討するため、IL-6産生株であるヒト肺癌株LC-06-JCK及びマウス結腸癌株 colon26 clone 5を皮下に移植した動物モデルを作成し、貧血の発症とIL-6との関連性を解析した。その結果、LC-06-JCKと colon26 clone 5担癌マウスモデルにおいて、血清IL-6レベルの上昇とヘモグロビンの低下が認められた。ここでLC-06-JCKで貧血と共に認められた血清アルブミン減少は、IL-6による炎症性急性期反応であると考えられ、臨床的に血清アルブミン減少は癌患者の予後因子とされているが、単に栄養不良を意味するのではなく、血清アルブミン減少を誘導するIL-6が予後に影響している可能性が示唆された。今回、LC-06-JCK担癌マウスモデルにおいて、ラット抗マウスIL-6受容体抗体を投与することで貧血発症を抑制したことから、IL-6が癌性貧血の原因となっていることが確認された。従って、本研究で構築した新規貧血マウスモデルは、癌性貧血におけるIL-6の関与を示唆するとともに、今後、本マウスモデルを用いて更なる実験を遂行する事により、癌患者における貧血の新たな治療法の探索に有用であることが示された。

学位論文発表後、主査の岩永敏彦教授から、本癌性貧血モデルにおけるIL-6に係る標的分子、あるいはIL-6に加えてLIFなど他のサイトカインレベルについて質問があった。この点に対して、他の文献を例にIL-6依存的に肝細胞でのhepcidin遺伝子レベルの増強が認められることから癌性貧血の新たなターゲットである可能性が高いことを考慮し、現在質量分析システムを用いたhepcidinの測定系を確立した所であることを回答した。またIL-6を介したhepcidinの発現増強による癌性貧血の関与を確認する為に、本癌性貧血モデルにおける血清鉄レベルの測定の必要性があることも回答に加えた。さらに、これまでに報告された腫瘍モデルにおいて、他のサイトカインについても、上昇の可能性のあることを言及し、今後本研究で確立された癌性貧血モデルを用いて詳細に検討する予定である旨を回答した。

次に副査の秋田弘俊教授から、実際に癌性貧血モデルにおいてhepcidinをターゲットにした治療実験は行われているか否かについての質問があった。この点に対して、今後本モデルにおけるIL-6シグナル依存的なhepcidinの制御機構を明らかにするとともに、hepcidinをターゲットにした治療実験を行う予定であると回答した。また本癌性モデルにおいてIL-6受容体に対する抗体を用いる事で、血清アルブミンレベルの低下が回復するか否かについての質問があった。これに対して、IL-6のみならず癌悪液質の中の他の因子によってもアルブミンの低下がおこる可能性はあるものの、IL-6受容体抗体を投与する事で、実際に血清アルブミンレベルの低下が有意に回復することを確認したと回答した。

また、副査である西村孝司教授から、担癌生体内で未熟赤血球の異常な髄外造血の可能性

についての質問があった。これに対して、癌患者生体内においても血清 IL-6 レベルの上昇が認められることを述べ、IL-6 依存的な赤血球の異常産生の可能性も否定できない事を述べた。さらに、癌患者における貧血治療に関する最近の知見と抗 IL-6 受容体抗体の臨床応用に関する今後の展望についての質問に対して、実際にキャッスルマン病や関節リウマチ等自己免疫疾患に対しての抗 IL-6 受容体抗体が臨床応用され、それらの疾患の軽減効果が示されていることを例に挙げ、今後、癌疾患患者に対しても抗 IL-6 受容体を用いることによる貧血や過剰な炎症疾患の改善効果や、患者の QOL の向上に向けた応用の可能性があるとの見解を述べた。

最後に、聴講者から、抗 IL-6 受容体抗体の結合によって他のサイトカインが gp130 分子を介した刺激をも阻害する可能性もあるか否かの質問があった。これに対して、確かに抗 IL-6 受容体抗体投与によって gp130 分子を使用する他のサイトカインシグナル伝達を阻害する可能性も否定できないとの回答を行った。

この論文は、新規癌性貧血モデルが確立されたことだけでなく、癌性貧血モデルを用い IL-6 シグナルカスケード依存的な癌性貧血発症の作用機序を示した点で高く評価され、今後、癌患者の貧血改善を目指した新規治療法の開発に寄与することが期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、これまでの研究活動における研鑽なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。