

内 容 要 旨 目 次

主 論 文

Potential Influence of Interleukin-6 on the therapeutic effect of gefitinib in patients with advanced non-small cell lung cancer harbouring EGFR mutations
(EGFR 遺伝子変異を有する進行非小細胞肺癌患者における Interleukin-6 の gefitinib の治療効果における影響)

田村朋季、加藤有加、大橋圭明、二宮貴一郎、榎本 剛、後藤田裕子、久保寿夫、市原英基、田中健大、市村浩一、前田嘉信、堀田勝幸、木浦勝行

Biochemical and Biophysical Research Communications (掲載予定)
平成 28 年 4 月 第 107 回 米国癌研究会議に発表

主 論 文

Potential Influence of Interleukin-6 on the therapeutic effect of gefitinib in patients with advanced non-small cell lung cancer harbouring EGFR mutations

(EGFR 遺伝子変異を有する進行非小細胞肺癌患者における Interleukin-6 の gefitinib の治療効果における影響)

【緒言】

上皮増殖因子受容体 (EGFR) 遺伝子変異陽性の非小細胞肺癌 (NSCLC) において、第 1 世代の EGFR-チロシンキナーゼ阻害剤 (TKI) は標準的な細胞障害性抗癌剤と比較して、無増悪生存期間 (PFS) を有意に延長し、第 2 世代 EGFR-TKI は全生存期間 (OS) も延長した。しかしながらこれらの薬剤は必ず耐性化する。腫瘍細胞におけるインターロイキン (IL) -6 の過剰発現は、前臨床モデルにおいて、EGFR-TKI に対する治療抵抗性の潜在的メカニズムの一つであると報告されているが、IL-6 の EGFR 陽性 NSCLC における EGFR-TKI の感受性における役割は臨床において示されていない。我々は臨床検体を用いて、腫瘍の IL-6 レベルが EGFR 陽性 NSCLC 患者における EGFR-TKI の効果に影響を及ぼすかどうかを評価し、さらに細胞株における EGFR-TKI と抗 IL-6 抗体の併用の効果について検証した。

【材料と方法】

臨床データベース

2005 年から 2013 年までの間に岡山大学病院においてゲフィチニブ単独療法を受けた患者を後方視的に解析した。解析対象は 1) 進行性、転移性または術後再発 NSCLC で、2) EGFR 遺伝子変異陽性で、3) 根治的手術および放射線照射の適応がなく、4) ゲフィチニブ以前に EGFR-TKI の投与を受けておらず、6) IL-6 免疫染色に十分な腫瘍サンプルを有する患者とした。

腫瘍の IL-6 免疫染色および血清 IL-6 の測定

腫瘍はホルマリン固定された組織ブロックを 4 μm 厚にスライスし、ヘマトキシリン・エオジン染色および抗 IL-6 抗体による免疫染色にて評価を行った。免疫染色の判定は 2 人の内科医 (YK および TT) と 1 人の病理医 (TT) によって独立して評価された。腫瘍細胞のうち陽性細胞が 50% 以下の場合は陰性、51% 以上の場合を陽性と判定した。IL-6 陽性群を P 群、陰性群を N 群と定義した。ゲフィチニブ投与前の末梢血サンプルを -80°C で保存したあった 11 人で、血清 IL-6 レベルを化学発光酵素免疫測定法 (CLEIA) によって測定した。

細胞株における IL-6 の発現とゲフィチニブ・抗 IL-6 抗体感受性

10 種類の EGFR 陽性 NSCLC 細胞株において、酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) によって IL-6 蛋白発現レベルを測定した。ゲフィチニブおよび抗 IL-6 抗体に対する細胞株の感受性を、MTT アッセイによって評価した。

イムノブロットング分析

細胞株から抽出したタンパク質を定量し、ポリアクリルアミドゲル上で電気泳動により分離し、ニトロセルロースメンブレン上に転写し、特異的抗体でプローブし、Enhanced Chemiluminescence Plus で検出した。

統計解析

腫瘍 IL-6 発現レベルと治療効果、特に PFS との因果関係を評価した。群間の差異はカイ 2 乗検定を用いて評価した。PFS は治療開始日から再発日までと定義した。OS は EGFR-TKI の開始日から死亡日までと定義した。PFS と OS の生存曲線は Kaplan-Meier 法にて作成し、Log-rank 検定によって評価した。ロジスティック回帰モデルと Cox 比例回帰モデルにて治療効果と生存の解析を行った。多変量解析では、年齢、性別、喫煙、病期、Eastern Cooperative Oncology Group Performance States、EGFR 変異の種類、ゲフィチニブの投与ラインを解析した。統計分析は、STATA を用いて行った。

【結果】

IL-6 陽性群において、IL-6 陰性群と比較して gefitinib の効果は不良であった

解析を行った時点で、52 人中 29 人で腫瘍の増大をみとめた。52 人中ゲフィチニブの投与前または投与後にプラチナ併用細胞障害性抗癌剤治療を行った患者は 25 人であった。免疫染色の結果は P 群が 28 人、N 群が 24 人であった。両群の背景に有意な差はみとめなかった。奏効割合は P 群で 38%、N 群で 61%と P 群で低い傾向があったが有意差は認めなかった ($p = 0.095$)。解析期間中央値は 50.9 か月であった。全 52 例において 6 ヶ月 PFS 率および中央値 PFS はそれぞれ 84.1%および 18.0 ヶ月であったが、1、2 および 3 年の OS 率はそれぞれ 88.5%、72.9%および 67.8%であった。IL-6 染色で層別化した場合、P 群は N 群よりも PFS 率が悪く (74.5%対 6 ヶ月で 92.4%、中央値は 13.5 ヶ月対未到達; $p = 0.045$)、多変量解析で有意差を認めた (ハザード比 : 2.39; 95%CI : 1.00-5.68; $p = 0.049$)。プラチナ併用細胞障害性抗癌剤治療を行った 25 人におけるプラチナ併用細胞障害性抗癌剤の効果と IL-6 の関係を調べた。25 人の患者のうち 11 人が P 群、14 人が N 群に属していた。プラチナ併用細胞障害性抗癌剤後の PFS は P 群と N 群の間で差を認めなかった (中央値 9.8 対 7.0 ヶ月; $p = 0.475$)。

CLEIA による血清 IL-6 レベルは腫瘍細胞および PFS との相関を認めなかった

52 人中 11 人で血清 IL-6 レベルを評価した。血清 IL-6 レベルは 0.75-23.80 pg/ml で中央値は 2.90 pg/ml であった。血清 IL-6 レベルと腫瘍細胞の IL-6 発現および PFS に相関は認めなかった。

細胞株における IL-6 発現は様々であり IL-6 高発現細胞株ではゲフィチニブと抗 IL-6 抗体の併用量法により抗腫瘍効果が増強する

10 種類の EGFR 陽性 NSCLC 細胞株において IL-6 の発現を ELISA にて調べたところ、11-18 は蛋白レベルで IL-6 高発現を認め、PC-9 は低発現であった。PC-9 と 11-18 はいずれもゲフィチニブに対する感受性を有したが、11-18 は PC-9 と比べ感受性が低かった (IC 50; 131 nM 対 30 nM)。抗 IL-6 抗体による単独治療は *in vitro* で 11-18 および PC-9 のいずれにおいても抗腫瘍効果は認めなかった。一方で抗 IL-6 抗体をゲフィチニブに併用すると、11-18 における細胞増殖の阻害効果の上乗せを示した。抗 IL-6 抗体を加えることで IL-6 シグナル伝達経路の下流の STAT3 の活性化が阻害されていた。

【考察】

今回の後方視的研究では、EGFR 陽性 NSCLC において IL-6 陽性群は陰性群と比較してゲフィチニブの奏効率が低く PFS も短かった。対照的にプラチナ併用細胞障害性抗癌剤の効果は両群において差を認めなかった。このことから IL-6 陽性は EGFR 陽性 NSCLC における予後因子ではなく、EGFR-TKI の効果予測因子であることが推定される。

また細胞株モデルにおいて IL-6 高発現の NSCLC 細胞株はゲフィチニブに対する感受性が低い傾向があったが、抗 IL-6 抗体を併用することで感受性が改善した。

これらの結果から、IL-6 高発現の EGFR 陽性 NSCLC において IL-6 の阻害が腫瘍増殖を阻害するために必要であることが示唆される。本研究データは EGFR-TKI 治療に対する抵抗性または低感受性を克服するための新たな治療戦略につながる可能性がある。

すなわち抗 IL-6 抗体は、IL-6 高発現 EGFR 陽性 NSCLC における IL-6 媒介シグナル伝達の低下を介することでその感受性を改善し、さらなる生存の改善につながると期待される。

本研究はいくつかの制限を有する。まず、サンプル数が少なく、後方視的研究である点あげられる。また臨床検体における IL-6 発現レベルを検討したが、STAT3 などの関連したシグナル伝達発現の検討ができなかったことがある。また重要な点として、腫瘍 IL-6 発現のカットオフについて、過去の関連した研究をもとに設定したが、その妥当性についての検証ができていない点あげられる。また、ゲフィチニブで治療された 2 群間の PFS に統計的な差異があるが、両群が投薬の恩恵を受けているという点あげられる。実際、P 群でも PFS の中央値は 13.5 ヶ月であり、治療へのある程度の反応を示している。したがって、我々は 50%をカットオフとして IL-6 発現の差異を決定したが、これが正しいかどうかについてのさらなる検証が必要であると考えられる。より大きなコホートデータを用いて、今後この問題について検証作業を行う必要がある。本研究結果はいくつかの解釈に制限は有するが、IL-6 発現を抑えることにより、EGFR-TKI 耐性を克服でき

る可能性を示している。

【結論】

IL-6 高発現群において、標準治療であるゲフィチニブの効果が低かった。また細胞株において、IL-6 発現がゲフィチニブに対する感受性に影響を及ぼすことを明らかにした。本研究結果は、活動性癌における IL-6 の潜在的役割を示し、治療標的としての研究の根拠となる。