

REVIEW ARTICLE

悪性胸膜中皮腫に対する薬剤感受性の解析と治療戦略

朴 智栄^{1,4}・小川紫都¹・朴 将哲¹・清水淳市¹・堀尾芳嗣¹・
吉田公秀¹・谷田部恭²・関戸好孝³・樋田豊明¹

Chemosensitivity in Malignant Mesothelioma; Future Strategy

Ji Young Park^{1,4}; Shizu Ogawa¹; Jang Chul Park¹; Junichi Shimizu¹; Yoshitsugu Horio¹;
Kimihide Yoshida¹; Yasushi Yatabe²; Yoshitaka Sekido³; Toyoaki Hida¹

¹Department of Thoracic Oncology, ²Department of Pathology and Molecular Diagnostics, Aichi Cancer Center Hospital, Japan;
³Division of Molecular Oncology, Aichi Cancer Research Institute, Japan; ⁴Department of Island and Community Medicine,
Kagoshima University Graduate School of Medical and Dental Sciences, Japan.

ABSTRACT — The incidence of mesothelioma is expected to increase dramatically over the next few decades. Survival of patients with mesothelioma is very poor, regardless of recent advances in chemotherapeutic modalities that combine cisplatin and the new antifolate, pemetrexed. New strategies based on better understanding of the biology of the disease are thus clearly needed to improve the treatment efficacy of this fatal disease. In this study, anti-tumor effect of amrubicin was examined by the colorimetric cell proliferation assay, and dose-dependent inhibition of the proliferation was observed in mesothelioma cell lines. In addition, the combination of cisplatin with amrubicin was more effective than that of cisplatin with pemetrexed. Furthermore, the adjunct use of a cyclooxygenase 2 inhibitor, celecoxib was shown to significantly enhance treatment efficacy of the combination of cisplatin and pemetrexed. These findings suggest that a cyclooxygenase 2 inhibitor may be promising in the treatment of mesothelioma, especially because of its enhancement of the treatment efficacy of conventional anticancer agents without compromising quality of life.

(JLCC. 2009;49:386-391)

KEY WORDS — Malignant mesothelioma, Chemosensitivity, Pemetrexed, Amrubicin (Amrubicinol), Cyclooxygenase 2 inhibitor

Reprints: Ji Young Park, Department of Island and Community Medicine, Kagoshima University Graduate School of Medical and Dental Sciences, 8-35-1 Sakuragaoka, Kagoshima 890-8544, Japan (e-mail: 200503@m3.kufm.kagoshima-u.ac.jp).

要旨 — **目的.** 悪性胸膜中皮腫の化学療法のアプローチは低く生存への寄与も明らかではない。本研究では悪性胸膜中皮腫の薬剤感受性の解析結果に基づいた新たな治療戦略の可能性について検討した。**方法.** 悪性胸膜中皮腫症例から培養株の樹立を行い、MTT法を用いて現在の第1選択レジメンであるシスプラチンとペメトレキセドの感受性の検討を行った。また、従来の悪性胸膜中皮腫に対するkey drugの1つであるアンスラサイクリン系の新規抗癌剤、アムルビシンの感受性についても検討を加えた。さらにシクロオキシゲナーゼ (COX) 酵素阻害剤と

の併用効果についても検討を加えた。**結果.** シスプラチン、ペメトレキセド単剤で悪性胸膜中皮腫に対する増殖抑制効果が認められたが、アムルビシンの増殖抑制効果はさらに強い傾向を示した。さらに、COX-2阻害剤の併用により胸膜中皮腫細胞の増殖抑制増強効果が観察された。**結論.** 薬剤感受性が低く難治性の疾患である胸膜中皮腫に対して、シクロオキシゲナーゼをターゲットにした新しい治療戦略やアムルビシンを用いた治療も今後期待される治療法になりうることが示唆された。

索引用語 — 悪性胸膜中皮腫, 薬剤感受性, ペメトレキ

愛知県がんセンター中央病院¹呼吸器内科, ²遺伝子病理診断部; ³愛知県がんセンター研究所分子腫瘍学; ⁴鹿児島大学大学院医歯学総合研究科国際島嶼医療学講座。
別刷請求先: 朴 智栄, 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科国

際島嶼医療学講座, 〒890-8544 鹿児島市桜ヶ丘8丁目35-1 (e-mail: 200503@m3.kufm.kagoshima-u.ac.jp).

※第48回日本肺癌学会総会シンポジウム「悪性中皮腫の克服に向けて」。

セド, アムルピシン(アムルピシノール), シクロオキシ

ゲナーゼ2酵素阻害剤

はじめに

悪性胸膜中皮腫は、中皮細胞を発生母地とする悪性腫瘍でありアスベスト曝露後20～50年の年月を経て発症すると考えられている。最近の中皮腫の増加は、1974年をピークとした日本のアスベスト輸入量の増加により多量に使用されていたことに関連し、今後、中皮腫による死亡数は年々増加し、2025年ごろに発症のピークが見られると考えられている。¹ stageの早い症例では胸膜肺合併切除術など外科的なアプローチが試みられているものの、悪性胸膜中皮腫では多くの症例に化学療法による全身療法が必要と考えられている。しかしながら化学療法の奏効率は低く、² 化学療法の中心薬剤として使用されてきたドキソルビシン単剤の奏効率はEastern Cooperative Oncology Group (ECOG)の試験で51例に対して14%の奏効率にとどまっている。³ その後、イリノテカンやゲムシタピンなどの新規抗癌剤の登場により、新規抗癌剤とプラチナ製剤との併用療法が行われるようになった。2007年には新規葉酸代謝拮抗薬を用いた併用化学療法であるシスプラチンとペメトレキセドの2剤併用療法が日本でも施行可能となり、生存期間の延長も期待されている。さらに分子標的治療薬などを用いた新しい治療法も試みられてはいるが、依然として予後不良な難治性腫瘍であることに変わりはなく、さらなる有効な治療法の確立が強く望まれている。

治療成績の向上には悪性胸膜中皮腫の増殖メカニズムをターゲットにした新しいアプローチの開発も急務と考えられ、新規治療を難治性の悪性胸膜中皮腫に対する集学的治療として応用することにより生存率が向上することが期待される。我々は、悪性胸膜中皮腫細胞株を用いたシスプラチンとペメトレキセドの抗癌剤感受性について検討を行うとともに、以前よりkey drugの1つであったアンスラサイクリン系の新規抗癌剤、アムルピシンの胸膜中皮腫への効果について検討した。さらに、プロスタグランジン生合成を司るシクロオキシゲナーゼ2 (cyclooxygenase 2; COX-2) は悪性胸膜中皮腫で過剰発現し、またその発現が予後に関連することが報告されており、⁴ COX-2酵素を阻害するCOX-2阻害剤の効果についても検討を加えた。肺癌ではCOX-2酵素阻害剤は肺癌細胞の増殖を抑制し、^{5,6} 臨床試験では化学療法の奏効率の上昇、QOLの改善が見られている。⁷ 難治性の悪性胸膜中皮腫に対するCOX-2酵素阻害剤の効果については、日本で2007年に承認されたセレコキシブを用いて検討し、

薬剤感受性試験結果に基づき新たな治療戦略の可能性について検討した。

対象と方法

当センターで樹立した悪性胸膜中皮腫細胞株 (ACC-MESO-4, Y-MESO-8A, 8D, 9, 12, 14) を96穴マイクロプレートを使用し、種々の薬剤濃度を設定して実験を行い、595 nmの吸光度を用いてMTT [3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide] 法により測定し *in vitro* での薬剤感受性を解析した。

抗癌剤は現在の臨床の第1選択と考えられているシスプラチン、ペメトレキセド、さらにアンスラサイクリン系の新規抗癌剤であるアムルピシン及びアムルピシンの生体内での活性型であるアムルピシノールを使用し検討を行った。COX-2酵素阻害剤としては整形外科領域で頻用されているセレコキシブを用い検討した。濃度設定は臨床的に到達可能濃度を考慮し実験を行った。

結果

シスプラチン、ペメトレキセド、及びアムルピシンの胸膜中皮腫細胞株に対する薬剤感受性の検討結果をFigure 1に示している。臨床的に到達可能濃度はシスプラチンでは50 mg/body 使用の場合13.3 μ M (4 μ g/ml)、ペメトレキセドでは500 mg/m² 使用の場合192.47 μ M (115 μ g/ml)、また、アムルピシンでは45 mg/m² 使用の場合3.2 μ M (1693 ng/ml)と報告されている。3薬剤とも単剤で用量依存的に胸膜中皮腫細胞株の増殖を抑制したが、臨床的に到達可能濃度を考慮した場合、アムルピシンでは到達可能濃度の半分以下の濃度で50%増殖抑制効果が観察されており、最も効果が期待される結果が得られた。体内での活性型であるアムルピシノールを用いた検討でも臨床的に到達可能濃度は45 mg/m² 使用の場合0.64 μ M (333 ng/ml)と報告されているが、同濃度で50%増殖抑制効果が3株中2株で得られている。

Figure 2aにはシスプラチンとペメトレキセドの併用効果、Figure 2bにはシスプラチンとアムルピシノールの併用効果の検討結果を示している。シスプラチンとペメトレキセドとの併用に比べ、シスプラチンとアムルピシノールとの併用にて増殖抑制効果が増強することが期待される結果が得られた。

一方、COX-2酵素阻害剤との併用では、ペメトレキセドに低い感受性を示した細胞株を用いた検討でも、シス

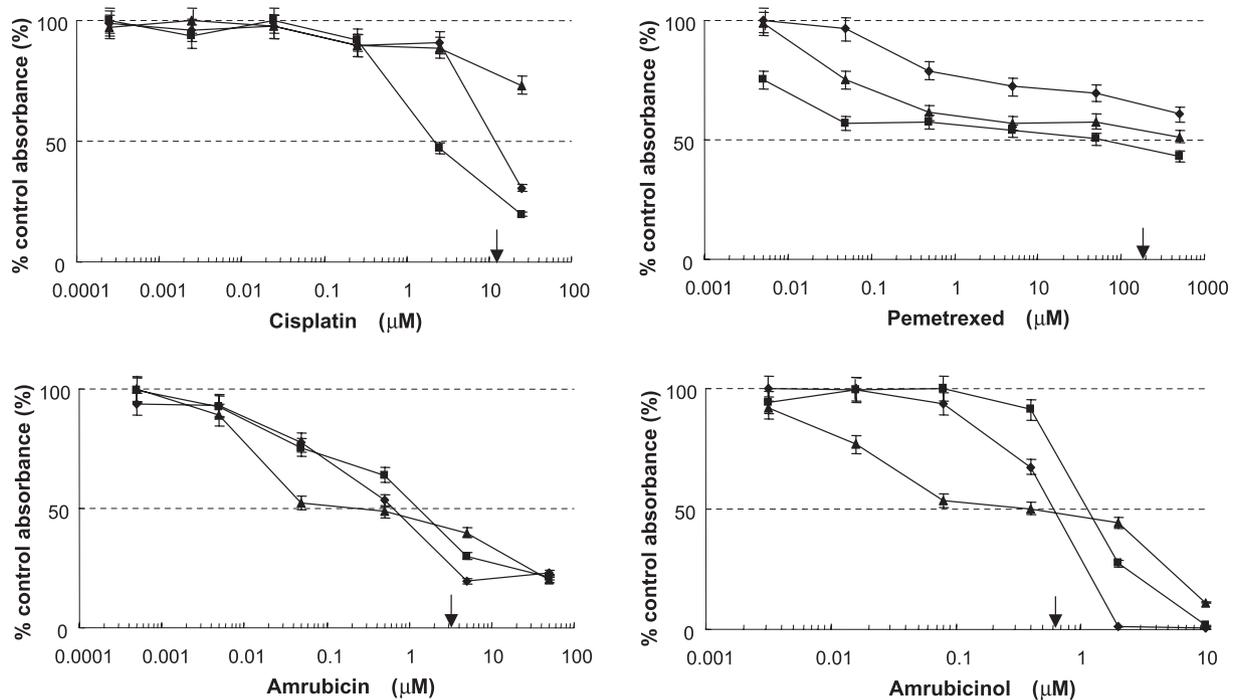


Figure 1. Chemosensitivity to cisplatin, pemetrexed, amrubicin and amrubicinol. ↓; Clinically achievable concentration (serum).

プラチンとペメトレキセドの併用療法に COX-2 阻害剤セレコキシブを 10 μM, 100 μM 加えたところ、胸膜中皮腫細胞の増殖抑制を増強する結果が得られた (Figure 3).

考 察

悪性胸膜中皮腫は胸膜表面を覆う中皮に由来する治療困難な致死率の高い腫瘍であり、アスベスト吸入との関連が知られている。その職業性曝露から今後急速な増加が予測され、悪性胸膜中皮腫に対する治療法の確立が急務と考えられている。本研究では、悪性胸膜中皮腫培養株を用いて、臨床での現在の第 1 選択レジメンと考えられているシスプラチン、ペメトレキセドの感受性の検討を行うとともに、アンスラサイクリン系の新規抗癌剤であるアムルビシンの効果について検討を加え、さらに COX-2 酵素阻害剤の併用増強効果について検討した。その結果、単剤でシスプラチン及びペメトレキセドは胸膜中皮腫細胞の増殖を濃度依存的に抑制したが、ペメトレキセドの増殖抑制効果はそれ程高くはなく、一方、アンスラサイクリン系の新規抗癌剤、アムルビシンの感受性は比較的高く、ペメトレキセドに比して高感受性を示した (Figure 1)。また、シスプラチンとの 2 剤併用効果の検討でも現在の第 1 選択の組み合わせであるシスプラチンとペメトレキセド療法に比べてシスプラチンとアムルビシノールの組み合わせでより高い感受性結果が得ら

れ、今後臨床応用が期待されるレジメンとなる可能性が示唆された。

塩酸アムルビシンは全合成されたアンスラサイクリン系の新規薬剤で、体内で細胞障害活性の 10~100 倍高い活性代謝体 SM-5887-13-OH (アムルビシノール) に変換される。種々の移植腫瘍に対してドキソルビシンと同等あるいは、それ以上の優れた抗腫瘍活性を示し、また、ヒト腫瘍株を移植したヌードマウスにおいて、ドキソルビシンより高い抗腫瘍効果を示している。⁸ 前臨床試験における毒性では、ドキソルビシンと比較し、心臓や腎臓に対する遅延性毒性は軽微であり、特にドキソルビシンで問題となる心毒性は少ないことが報告されている。^{9,10} アムルビシンは進展型小細胞肺癌に対する単剤の臨床試験で、奏効率 75.8%、MST 11.7 ヶ月と、非常に良好な成績が報告され、¹¹ また非小細胞肺癌に対しても、アムルビシンは 18.3% の奏効率を示し、¹² ドセタキセルやパクリタキセル、ピノレルビン、ゲムシタピンに匹敵する抗腫瘍効果が期待できる肺癌治療薬剤の 1 つと考えられている。今回の胸膜中皮腫細胞株を用いた検討でシスプラチンとペメトレキセドの併用に比べ、シスプラチンとアムルビシンの併用で高い増殖抑制効果が期待できる結果が得られたことから、その有用性が臨床試験で確認されれば、胸膜中皮腫の治療における重要な薬剤の 1 つとして臨床応用が進むことが期待される。

シクロオキシゲナーゼはアラキドン酸カスケードにお

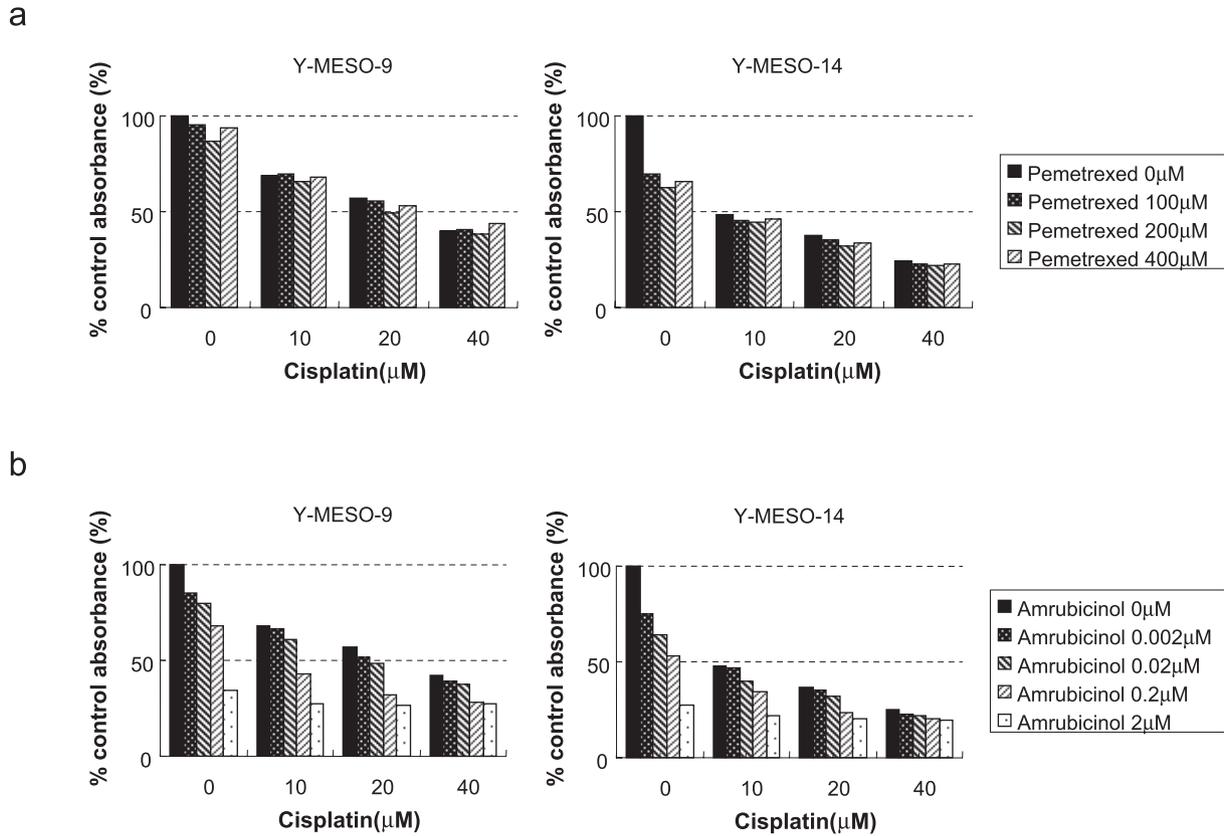


Figure 2. a. Chemosensitivity to cisplatin and pemetrexed. b. Chemosensitivity to cisplatin and amrubicinol.

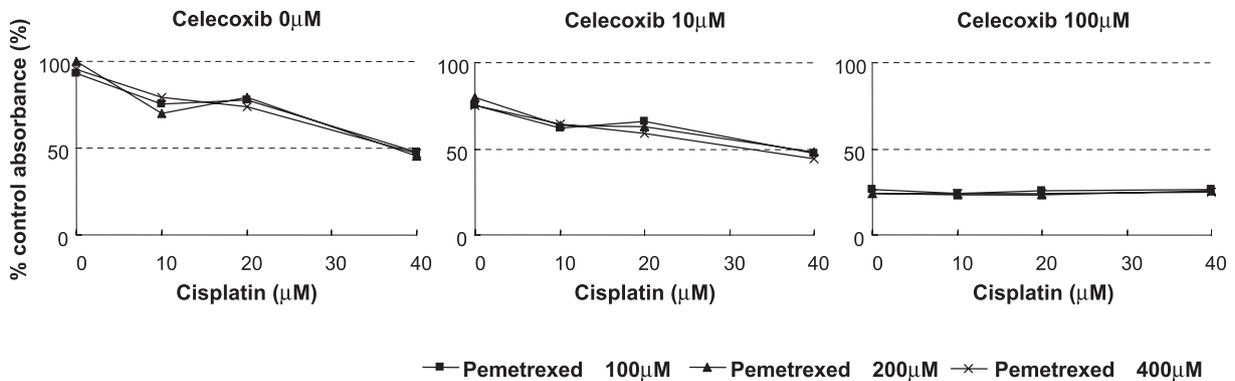


Figure 3. Chemosensitivity to pemetrexed and cisplatin in combination with celecoxib.

いてエイコサノイドを産生する経路を触媒する酵素として知られており、消化管の粘膜保護などに関与するCOX-1と、炎症・疼痛、さらに最近の研究で癌の発生や進展に関与すると考えられているCOX-2の2つのサブタイプに分類される。シクロオキシゲナーゼをターゲットとする非ステロイド性抗炎症薬と腫瘍との関連について、非ステロイド性抗炎症薬の服用者では大腸癌、乳癌、肺癌などの発生率が有意に低いことが疫学調査の結果示されている。^{13,14} COX-2の発現の増強は多くの腫瘍で観

察され報告されているが、胸膜中皮腫でもEdwardsらがCOX-2の発現と予後の関連について報告している。⁴ COX-2の作用として、細胞増殖の促進、^{5,15} 浸潤・転移の促進、¹⁶⁻¹⁸ アポトーシスの抑制、^{5,17} 血管新生の促進、^{6,19} 免疫機能の抑制²⁰⁻²²などが報告されており、COX-2阻害剤による癌に対する増殖抑制効果が期待されている。抗癌剤に対する併用増強効果の機序としては、抗癌剤との接触により癌細胞のCOX-2発現の増強が報告されており、この増強に伴う癌細胞の生存に対するアドバンテー

ジをCOX-2阻害剤が取り除くことにより癌細胞に対する抗癌剤の効果が増強するものと想定されている。^{5,6} マウス移植肺癌を用いた検討でもCOX-2阻害剤で約36%の増殖抑制効果を認め、ドセタキセルやビノレルビンとの併用では、それぞれ65%、55%効果が増強したと報告されている。⁶ 臨床での比較試験では、シスプラチン+ゲムシタビン併用療法にCOX-2阻害剤をON/OFFした結果、COX-2阻害剤を加えることで奏効率は上昇、痛みを含むQOLの改善が見られている。⁷ 一方、胸膜中皮腫を用いた実験では、シスプラチンとピロキシカムの併用にて相乗効果の報告がされている。²³ 単剤での抗腫瘍効果は強くはないが、抗癌剤と異なり、連日の投与が可能であり、また抗癌剤の効果増強、痛みを含むQOLの改善、免疫機能の改善に有用と考えられ、臨床応用が期待される。

結 論

悪性胸膜中皮腫に対する有用な化学療法レジメンとしてアムルピシンを含んだ治療も1つの選択肢となりうる事が示唆された。さらに化学療法にCOX-2阻害剤を併用することにより抗癌剤の効果の増強作用も期待され、難治性の悪性胸膜中皮腫に対する治療戦略の1つとして期待されるものと考えられた。

REFERENCES

- Robinson BW, Lake RA. Advances in malignant mesothelioma. *N Engl J Med*. 2005;353:1591-1603.
- Ong ST, Vogelzang NJ. Chemotherapy in malignant pleural mesothelioma. A review. *J Clin Oncol*. 1996;14:1007-1017.
- Lerner HJ, Schoenfeld DA, Martin A, Falkson G, Borden E. Malignant mesothelioma. The Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) experience. *Cancer*. 1983;52:1981-1985.
- Edwards JG, Faux SP, Plummer SM, Abrams KR, Walker RA, Waller DA, et al. Cyclooxygenase-2 expression is a novel prognostic factor in malignant mesothelioma. *Clin Cancer Res*. 2002;8:1857-1862.
- Hida T, Kozaki K, Muramatsu H, Masuda A, Shimizu S, Mitsudomi T, et al. Cyclooxygenase-2 inhibitor induces apoptosis and enhances cytotoxicity of various anticancer agents in non-small cell lung cancer cell lines. *Clin Cancer Res*. 2000;6:2006-2011.
- Hida T, Kozaki K, Ito H, Miyaiishi O, Tatematsu Y, Suzuki T, et al. Significant growth inhibition of human lung cancer cells both in vitro and in vivo by the combined use of a selective cyclooxygenase 2 inhibitor, JTE-522, and conventional anticancer agents. *Clin Cancer Res*. 2002;8:2443-2447.
- Gridelli C, Gallo C, Ceribelli A, Gebbia V, Gamucci T, Ciardiello F, et al. Factorial phase III randomised trial of rofecoxib and prolonged constant infusion of gemcitabine in advanced non-small-cell lung cancer: the GEMcitabine-COxib in NSCLC (GECO) study. *Lancet Oncol*. 2007;8:500-512.
- Morisada S, Yanagi Y, Noguchi T, Kashiwazaki Y, Fukui M. Antitumor activities of a novel 9-aminoanthracycline (SM-5887) against mouse experimental tumors and human tumor xenografts. *Jpn J Cancer Res*. 1989;80:69-76.
- Morisada S, Yanagi Y, Kashiwazaki Y, Fukui M. Toxicological aspects of a novel 9-aminoanthracycline, SM-5887. *Jpn J Cancer Res*. 1989;80:77-82.
- Suzuki T, Minamide S, Iwasaki T, Yamamoto H, Kanda H. Cardiotoxicity of a new anthracycline derivative (SM-5887) following intravenous administration to rabbits: comparative study with doxorubicin. *Invest New Drugs*. 1997;15:219-225.
- Yana T, Negoro S, Takada M, Yokota S, Takada Y, Sugiura T, et al. Phase II study of amrubicin in previously untreated patients with extensive-disease small cell lung cancer: West Japan Thoracic Oncology Group (WJTOG) study. *Invest New Drugs*. 2007;25:253-258.
- Takeda K, Takifuji N, Negoro S, Furuse K, Nakamura S, Takada Y, et al. Phase II study of amrubicin, 9-aminoanthracycline, in patients with advanced non-small-cell lung cancer: a West Japan Thoracic Oncology Group (WJTOG) study. *Invest New Drugs*. 2007;25:377-383.
- Thun MJ, Namboodiri MM, Heath CW Jr. Aspirin use and reduced risk of fatal colon cancer. *N Engl J Med*. 1991;325:1593-1596.
- Schreinemachers DM, Everson RB. Aspirin use and lung, colon, and breast cancer incidence in a prospective study. *Epidemiology*. 1994;5:138-146.
- Oshima M, Dinchuk JE, Kargman SL, Oshima H, Hancock B, Kwong E, et al. Suppression of intestinal polyposis in Apc delta716 knockout mice by inhibition of cyclooxygenase 2 (COX-2). *Cell*. 1996;87:803-809.
- Kozaki K, Miyaiishi O, Tsukamoto T, Tatematsu Y, Hida T, Takahashi T, et al. Establishment and characterization of a human lung cancer cell line NCI-H460-LNM35 with consistent lymphogenous metastasis via both subcutaneous and orthotopic propagation. *Cancer Res*. 2000;60:2535-2540.
- Tsujii M, DuBois RN. Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. *Cell*. 1995;83:493-501.
- Tsujii M, Kawano S, DuBois RN. Cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer cells increases metastatic potential. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94:3336-3340.
- Tsujii M, Kawano S, Tsuji S, Sawaoka H, Hori M, DuBois RN. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell*. 1998;93:705-716.
- Nataraj C, Thomas DW, Tilley SL, Nguyen MT, Mannon R, Koller BH, et al. Receptors for prostaglandin E(2) that regulate cellular immune responses in the mouse. *J Clin Invest*. 2001;108:1229-1235.
- Yang L, Yamagata N, Yadav R, Brandon S, Courtney RL, Morrow JD, et al. Cancer-associated immunodeficiency and dendritic cell abnormalities mediated by the prostaglandin EP2 receptor. *J Clin Invest*. 2003;111:727-

- 735.
22. DeLong P, Tanaka T, Krukltis R, Henry AC, Kapoor V, Kaiser LR, et al. Use of cyclooxygenase-2 inhibition to enhance the efficacy of immunotherapy. *Cancer Res.* 2003;63:7845-7852.
23. Verdina A, Cardillo I, Nebbioso A, Galati R, Menegozzo S, Altucci L, et al. Molecular analysis of the effects of Piroxicam and Cisplatin on mesothelioma cells growth and viability. *J Transl Med.* 2008;6:27.