

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659378

研究課題名(和文)ゾレドロネート投与と発熱およびサイトカイン産生に関する検討

研究課題名(英文)Fever and producing cytokines after Zoledronic acid administration

研究代表者

毛利 久継 (Mouri, Hisatsugu)

金沢大学・大学病院・講師

研究者番号：50397212

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：ゾレドロネート投与後に生じる発熱の機序を明らかにしようと試みた。10症例中9例に発熱がみられた。投与前後で得た血清は全て、単核球をゾレドロネートで刺激後に採取した上清は38以上の高熱3例、37.9-37.0の微熱2例、36.9以下の無熱1例を用い、サイトカインを測定した。血清では、無熱の症例では前後での変化に乏しかったが、その他の症例ではIP-10、MCP-1、GROが誘導されていた。微熱症例と高熱症例との明らかな差異はみられなかった。上清の検討でも同様であった。37度以上の発熱の有無での比較を行うことが必要と考えられたが、現在までには発熱の予測因子を明らかにできなかった。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was define the mechanism of fever after Zoledronic acid(Zol) administration.9 of 10 cases experienced fever.All the serum samples obtained before and after Zol administration were used cytokine analysis.Supernatant samples of mononuclear cells after stimulation by Zol were selected (three over 38 degrees, two 37.9 - 37.0 degrees, and one 36.9 degrees or less). Cytokine levels of the case with apyrexia were almost no change after Zol administration. IP-10, MCP-1, and GRO were elevated in other cases.The clear difference between low grade fever cases and a high fever cases was not seen. Results of analysis in supernatant was also the same. More cases without fever were required. The predictive factor of fever after Zol administration was not clarified.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内科学一般(含心身医学)

キーワード：ゾレドロネート 発熱 サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

転移性がん症例の 60-84%に骨転移が存在するといわれている。骨転移は著しく quality of life(QOL)低下させる要因であり、臨床上非常に重要である。骨転移形成には、活性化された破骨細胞による骨吸収が必須と考えられている。ビスフォスフォネートは破骨細胞の活性を選択的に阻害し、溶骨性病変の新規発生と病的骨折の予防作用、高カルシウム血症の是正といった様々な作用を有している。ビスフォスフォネートは低カルシウム血症や肝障害などの副作用を有するが、最も頻度の高い有害事象は発熱である。ゾレドロネートは従来のビスフォスフォネート系薬剤と比較し、より強力な第 3 世代ビスフォスフォネート製剤である。肺癌を中心とした固形癌において骨関連事象を軽減させることが比較試験で示され (J Clin Oncol. 23, 3314-21, 2005)、今後ビスフォスフォネート系薬剤の中でも中心的な役割を果たしていくと推察されるが、国内臨床試験では最も高頻度にみられた副作用はやはり発熱(53.8%)であり、従来のビスフォスフォネート系薬剤と比較しても高率である。骨転移を有する患者は一般に易感染状態であり、ゾレドロネート投与後に発熱をきたした場合、感染症と極めて鑑別が困難である。またゾレドロネートによる発熱のため抗がん剤治療が遅れ治療に支障を来す場合がある。発熱は QOL を損ね、食欲不振、全身倦怠感などが深刻となる場合も多く経験される。これらのことからゾレドロネート投与後に生じる発熱の機序について解明することは臨床上非常に有用と考えられる。当研究室では以前よりゾレドロネートの生物学的活性に関心を持ち、近年ではその抗腫瘍効果に関して検討している (Mol cancer ther. 8, 119-26, 2008)。そうした経緯もあり、申請者は、ゾレドロネート投与後に生じる発熱の機序を明らかにする研究を計画するに至った。

2. 研究の目的

ゾレドロネートにより治療された骨転移患者の血清および血球の炎症性サイトカイン発現を検討し、発熱のバイオマーカーとなりうる候補因子を同定する。バイオマーカーが明らかになった場合には、発熱予防のため阻害因子の開発やその効果を検証する in vitro 試験を行い、臨床応用の根拠となるエビデンスを蓄積する予定とした。

3. 研究の方法

研究開始時に、以下の項目を予定した。

(1) 骨転移患者の単核球に対するゾレドロネートの炎症性サイトカイン誘導作用の検討

骨転移患者より末梢血を採取し、単核球を分離したのちゾレドロネートを添加し、培養上清中の炎症性サイトカインならびにケモ

カイン濃度を ELISA 法で、細胞内の mRNA 発現を RT-PCR で検討し、ゾレドロネートにより誘導される因子を同定する。

(2) 骨転移患者にゾレドロネート投与後の血漿中炎症性サイトカイン濃度の測定

ゾレドロネートで治療された骨転移患者の末梢血を採取 (治療前、1 日後) し、血漿中の炎症性サイトカインならびにケモカイン濃度を ELISA 法で測定する。

(3) 骨転移患者にゾレドロネート投与後の末梢血単核球および好中球中の炎症性サイトカイン mRNA レベルの測定

ゾレドロネートで治療された骨転移患者の末梢血を経時的に採取 (治療前、1 日後) し、単核球を分離したのち、炎症性サイトカインならびにケモカイン mRNA 発現を RT-PCR で検討する。

(4) ゾレドロネートにより惹起される発熱予測のバイオマーカー候補として絞り込まれた因子についての検討

炎症性サイトカイン測定によるゾレドロネート投与後発生する発熱の予測システムの開発

骨転移患者の治療前に血漿または血球を採取しゾレドロネート刺激によるバイオマーカー炎症性サイトカイン産生を in vitro で解析し、バイオマーカー候補因子の発現により発熱の有無を予測する。次に、骨転移患者にゾレドロネート治療を行い、発熱の有無を確認する。最終的に、バイオマーカー候補因子による発熱予測の妥当性を統計的に解析する。

ゾレドロネートによる炎症性サイトカイン誘導のメカニズム解析

ゾレドロネートにより惹起される炎症性サイトカイン発現について、サイトカイン受容体、接着分子、細胞内シグナル伝達経路、転写因子などの関与を in vitro 試験において詳細に解析する。さらに、機序が明らかになった場合には、発熱予防のため阻害因子の開発やその効果を検証する in vitro 試験を行い、臨床応用の根拠となるエビデンスを蓄積する予定とした。

4. 研究成果

2011 年に院内の倫理審査委員会の承認を得た後、サンプルの採取を開始した。

患者の条件は、組織学的に固形癌と診断され、画像的に骨転移を有することを大前提とし、その他、従来の報告を参考とすると、

(1) これまでにゾレドロネートあるいはその他のビスフォスフォネート製剤の投与をうけていない (経口薬は容認)

(2) 骨髄機能正常

- (3)肝、腎機能正常
 - (4)慢性もしくは急性の感染巣がない
 - (5)発熱がない(38 以上)
 - (6)CRP 正常
 - (7)化学療法、放射線治療、免疫療法といった治療を受けていない(2週間~4週間前)
 - (8)ステロイドが投与されていない(1週間~4週間前)
- といったことが挙げられた。

しかし進行癌では、感染症を伴わなくても、CRP が陽性となる症例は決して珍しくはない。骨転移を有する患者はかなりの進行癌であり、CRP は高率に陽性となっていることが予想された。CRP 正常患者だけを選択しては症例集積が遅れる可能性が高いと考え、除外した。また、化学療法や放射線治療の条件も、倫理的に問題が生じる可能性があり、除外せざるを得ないと考えた。ステロイドは結果にかなり影響を与えると予想されたため、ステロイドが投与されてから1週間は間隔をあけることとした。なお Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAID) の投与に関しては、既に投与されている患者が多数を占めると予想されたため、容認した。当面の目標症例数は10例(症例集積が順調であれば20例)とした。なお熱型の観察が不可欠のため、対象患者は原則入院とした。

同意書を取得後、患者に対して、ゾレドロネートは4mgを15分以上かけて投与した。その直前に末梢血30mlを採取した(20mlは単核球分離、10mlは血清保存のため)。

ゾレドロネート投与24時間後に、血清保存のため末梢血10mlを採取した。

単核球の分離はLSM®を用いて行った。分離後24wellのプレートに1wellにつき 4×10^5 個ずつの細胞数となるように調整した。ゾレドロネートは1000、100、10、1、0.1、0.01、0.001、0.0001、0ng/mlの濃度にわけ単核球に投与した。陽性コントロールはLipopolysaccharide (LPS)を10ng/mlとなるように調整し、投与した。24時間培養後、上清と細胞をそれぞれ回収し、-80にて凍結保存とした。

対象患者の適格条件はそれほど厳しく設定はしなかったものの、予定よりも症例の集積は遅れ、2011年度5例、2012年度5例と2年ではようやく当初の目標症例数に達した。

症例の内訳は膵癌4例、肺癌2例、胃癌1例、原発不明癌2例、心臓原発平滑筋肉腫1例と多岐にわたった(表1)。平均年齢は61歳(51-68歳)、男性7例、女性3例であった。WBCの中央値は7030(2740-13320)/ μ lであり、10例中4例が高値であった(40%)。CRPの中央値は1.6(0.1-14.3)mg/dlで、10例中7例が高値であった(70%)。

ゾレドロネート投与後、臨床的には9例で発熱がみられた(90%)。38以上のhigh feverが6例、37-37.9のlow grade feverが3

例であった。無熱の症例は1例のみであった。

2013年度は、臨床サンプルの解析を試みた。ゾレドロネート投与前後に採取した血清サンプルは全例用いることとした。単核球をゾレドロネート刺激後、24時間で採取した上清に関しては、サンプル数が多いため、全例の解析は困難と判断した。本来であれば発熱がみられた症例と、無熱の症例を同数集積し、データを解析したいところではあったが、時間的に困難と判断、high fever群の3例、low grade fever群の3例を選択し、データ解析を試みることにした。

Merck Millipore社のMILLIPLEX MAG Kit、Human cytokine/chemokine(磁気ビーズ)を用いて、患者血清ならびに培養上清中の各種サイトカイン/ケモカインを測定した。

(1)患者10例のゾレドロネート投与前、投与24時間後に採取した血清20サンプル

(2)38以上の発熱がみられた3例から得られた単核球を、ゾレドロネート刺激後24時間後に回収した上清(positive controlとしてのLPS刺激も含む)30サンプル

(3)発熱が37.0-37.9までの2例、および36台(発熱なし)であった1例から得られた単核球を、ゾレドロネート刺激後24時間後に回収した上清(positive controlとしてのLPS刺激も含む)30サンプル

の、合計80サンプルを解析した。測定した各種サイトカイン/ケモカインは、以下の38種類である。

IL-1、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-12(p40)、IL-12(p70)、IL-13、IL-15、IL-17、EGF、Eotaxin、Fractalkine、G-CSF、GM-CSF、IFN-、IP-10、MCP-1、MIP-1、MIP-1、TGF-、TNF-、RANTES、FGF-2、Flt-3、GRO、IFN-2、IL-1ra、MCP-3、MDC(CCL22)、sCD40L、TNF-、VEGF

図1にヒートマップのデータを示す。血清サンプルのゾレドロネート投与前、投与後でIP-10、MCP-1、GROが誘導されていた。全く発熱のみられなかった症例のサンプルでは、前後での変化に乏しいが、発熱が37.0-37.9の症例と38以上の発熱がみられた症例との明らかな差異はみられなかった。単核球の培養上清の解析でも38以上の発熱がみられた症例のサンプルとそうでないサンプルとの明らかな差異はみられなかった。やはり37以上の発熱の有無での比較を行うことが必要であると考えられた。以後もゾレドロネート投与前後での血清の保存を継続し、無熱症例の集積に務めたが、集積がはかどらず、現在までにはゾレドロネート投与後に生じる発熱の発生を予測するための因子を明らかとはできなかった。

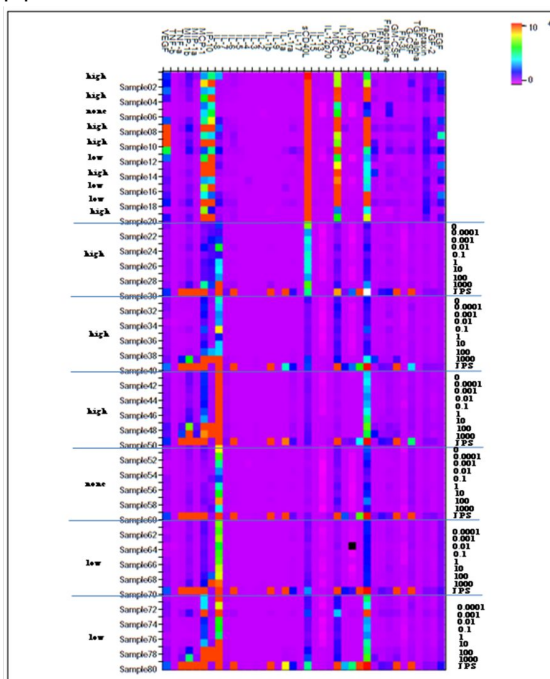
今回の研究では発熱が90%(従来報告では50%前後)の症例でみられ、バランスの良い症例の集積ができなかった。WBCやCRPの基礎値が高く、もともとが発熱しやすい状況にあったことが一因と考えられる。ゾレドロ

ネート投与前、投与後で IP-10、MCP-1、GRO が上昇していたが、こうした結果はこれまで報告されておらず、次の研究に繋げていきたい。

表 1

	原疾患	年齢	発熱	WBC(μ l)	CRP(mg/dl)
1	原疾患不明	68	high fever(day2-3)	9550	14.3
2	肺炎	59	fever(day2-3)	2740	0.1
3	胃癌	61	(-)	3300	0.2
4	肺炎	52	high fever(day2)	13320	3.9
5	原疾患不明	65	high fever(day2)	7110	10.5
6	肺炎	69	low grade fever (day2)	10310	0.8
7	肺炎	51	high fever(day2-3)	5130	0.4
8	心臓平滑筋肉腫	65	low grade fever (day2)	6110	0.1
9	肺炎	54	low grade fever (day2)	6950	2.4
10	肺炎	61	high fever(day2-4)	9080	3.9

図 1



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

毛利 久継 (Mouri, Hisatsugu)

金沢大学・大学病院・講師

研究者番号: 50397212