

学位論文題名

Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ の悪性神経膠腫に対する  
生物学的作用の基礎的研究

学位論文内容の要旨

I. 研究目的

現在、本邦において臨床試験が進行中の、悪性神経膠腫に対する腫瘍壊死因子(TNF)の頭蓋内局所投与療法の可能性を検討するため、TNFの悪性神経膠腫細胞に対する直接腫瘍細胞障害効果と腫瘍細胞の生物学的反応を検討すると共に、悪性神経膠腫患者へのTNF局所投与時の中枢神経系内におけるTNF局所濃度の時間的経過、さらに、二次的に惹起される中枢神経系ないの免疫担当細胞浸潤とサイトカイン反応を解析・検討した。

II. 方法

TNF (human natural tumor necrosis factor- $\alpha$ : 持田 MHR-24) の glioblastoma 細胞株に対する増殖抑制効果を MATT アッセイ, コロニー形成制御試験,  $^3\text{H}$ -チミジン取り込み試験にて評価した。TNF 抵抗性の機序解析とし, 細胞内 Mn-SOD 量 (ELISA 法) を測定した。また培養上清中の prostaglandin  $\text{E}_2$  ( $\text{PGE}_2$ , RIA 法), Interleukin (IL)  $1\beta$  (ELISA 法), IL-2 活性 (CTLL-2 細胞によるバイオアッセイ), IL-6 (MH60細胞によるバイオアッセイ), IL-8 活性 (ヒト好中球遊走試験) を測定した。

さらに再発悪性神経膠腫 6 症例に対し, TNF の腫瘍腔内局所投与 (1, 250~10, 000JRU) を行い, 継時的に髄液および腫瘍局所貯留液の採取を行って, 免疫担当細胞浸潤とサイトカイン反応を検索した。浸潤細胞はサムソン, メイ・キムザ, 非特異的エステラーゼ染色にて, 細胞数・細胞種類をみた。更に, フローサイトメーターにて細胞表面抗原を調べ細胞サブセットを同定した。検体中の TNF 濃度は L929細胞を用いる生物活性測定法で定量した。また IL- $1\beta$ , IL-2 活性, IL-6 活性,  $\text{PGE}_2$  の測定を行った。さらに IL-8 活性測定を好中球遊走試験にて行い, 高速液体クロマトグラフィによる分画分析を行った。インターフェロン (IFN) 生物活性は cytopathic effect inhibition assay にて測定した。また IFN- $\beta$  (ELISA 法), IFN- $\gamma$  (RIA

法)の定量も合わせ行った。TGF- $\beta$ の定量はELISA法にて行った。

### Ⅲ. 結 果

① GlioblastomaのTNFに対する感受性：MTT assayでは14株のglioblastoma細胞はTNFに対し大部分抵抗性を示した。しかし、被検細胞数を減らし培養期間を延長すると、半数の細胞株が増殖抑制反応を示した。colony形成抑制試験では、6細胞株のうち5細胞株がTNFにより有意な抑制を受けた。

また<sup>3</sup>H-thymidine取り込み試験にて14細胞株中9細胞株が有意なDNA合成の抑制を受けた。

② TNFにより細胞内Mn-SOD量とPGE<sub>2</sub>産生量の変化：TNF刺激によりglioblastoma細胞はPGE<sub>2</sub>産生の増加を示した。その産生増加と前述のTNF感受性は相関する傾向を認めた。Glioblastoma細胞の多くがTNF刺激に対し細胞内Mn-SOD量の増加を示したが、TNF感受性とは相関しなかった。TNF全処理によるMn-SODの誘導を行ってもTNF感受性は変化しなかった。

③ Glioblastoma細胞のサイトカイン産生に対するTNFの影響：15細胞株中13株がTNF刺激に反応してIL-6産生を増した。IL-8活性(好中球遊走活性)は15細胞株中11株が上清中に産生しており、TNF刺激にて、産生増加(7株)また誘導(4株)を受けた。HPLCの溶出時間(38分)により、この活性はIL-8によるものであることが確認された。TNF刺激の有無によらず、IL-2生物活性、IL-1 $\beta$ (ELISA)はglioblastomaの培養上清中には検出されなかった。

④ 悪性神経膠腫患者の髄液および局所貯留液における免疫担当細胞浸潤とサイトカイン反応：一回あたり5,000単位以上の投与量にて投与後2~8時間にて、髄液中に10~15単位/mlのTNF活性が検出され、24時間以内に検出限界以下に低下した。TNF投与後、髄液中には2~4時間で顕著な白血球浸潤が生じた。これは8~12時間で好中球主体の第1のpeak(200~4,000個/mm<sup>3</sup>)をとり、24時間後に単核球優位の第2のpeakを示し、48時間以内にはほぼ消失する二相性を示した。単核球のうち大きなものは、Azur顆粒を含みnon-specific esterase染色陽性で、flow cytometryにてCD11b、CD13、CD14陽性の単核球で、小さなリンパ球様単核球は、CD4陽性CD8陰性のT細胞であった。髄液中の好中球遊走因子活性はTNF投与により全症例において増加または陽転した。HPLC解析にて、この活性の主要な部分はIL-8であることが判明した。TNFは全症例の髄液中および腫瘍

腔内の IL-6 活性を上昇させた (peak 8~12時間) IL-1 $\beta$  は、6例の髄液中3例において TNF 投与により陽性となる反応を示した (peak 8時間)。PGE<sub>2</sub> 濃度は TNF 投与 4~12時間 で最高値を示す増加を示した。腫瘍腔内ではやや高い値を示して同様に変動した。TGF $\beta$  は TNF 投与以前の 6例中4例の髄液に、5例中3例の腫瘍腔液に検出されたが著明な変化は認めなかった。IL-2, IFN 活性, IFN- $\beta$ ,  $\gamma$  は陰性であった。

#### IV. 考 察

TNF の glioblastoma 細胞への直接の腫瘍細胞障害効果に関しては、MTT assay, コロニー形成抑制試験, <sup>3</sup>H-thymidine 取り込み試験により、TNF は glioblastoma 細胞に対し顕著な殺細胞効果を有さないものの、増殖抑制効果を示し得ることが示された。さらに、この抵抗性の機序を解析するための細胞内 Mn-SOD 濃度の測定では、glioblastoma 細胞内の Mn-SOD は TNF により濃度が増加したが、TNF 感受性と相関せず、Mn-SOD の誘導によっても抵抗性は増加しなかった。一方、TNF 処理により培養上清中に PGE<sub>2</sub> の放出が増加する現象は glioblastoma 細胞の TNF 感受性と相関する傾向が認められ、フォスホリパーゼ A<sub>2</sub> の賦活化を介する細胞障害の機序が glioblastoma 細胞において成立することが示唆された。一方、TNF 刺激に glioblastoma 細胞はよく反応し、IL-6, IL-8 などのサイトカイン産生を増加させた。この結果は glioblastoma 細胞の多くは機能的 TNF 受容体を持つが、そのシグナル伝達は顕著な殺細胞効果をもたらさないことを示唆する。換言すれば、TNF は glioblastoma に対し代謝修飾または分化誘導を引き起こし、増殖静止効果をもたらすと推測された。

実際の悪性神経膠腫患者に対し TNF の頭蓋内投与を行い、それによって誘発される二次的な免疫担当細胞反応とサイトカインの変動をみた。TNF の髄液内の濃度の時間的推移は数時間の半減期をもって 10U/ml 程度が検出された。これは TNF の血中での半減期と比較するとかなり長い。しかし、直接の腫瘍細胞障害活性を得るのに必要な TNF の濃度および暴露期間を鑑みるに、少なくとも現時点での投与方法・投与量では TNF の直接効果は期待できないものと考えられた。TNF の頭蓋内投与によって誘発される二次的な免疫担当細胞反応の変動をみると、まず好中球の顕著な浸潤が腫瘍局所を含めた中枢神経内に起こり、さらに少し遅れて単球および helper T 細胞の浸潤が生じることが判明した。この機序解析として IL-8 活性 (好中球遊走活性) の測定を行い、その結果 TNF 投与後に認められる細胞浸潤には IL-8 を含む二次的サイトカイン反応が関与していることが示唆された。また本研究の結果により、TNF は IL-6 や IL-1 などのサイトカイン反応を中枢神経内に誘導することも判明した。これらの浸潤細胞や連動する

サイトカインが宿主による腫瘍の拒絶にどの様に関わるかは今後の課題ではあるが、中枢神経内に投与された TNF の抗腫瘍活性の少なくとも一部は明かにし得たものと考えられる。

## 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 阿 部 弘

副 査 教 授 細 川 眞澄男

副 査 教 授 皆 川 知 紀

悪性神経膠腫に対する腫瘍壊死因子 (TNF) の頭蓋内局所投与療法の可能性を検討するため、TNF の悪性神経膠腫細胞に対する直接腫瘍細胞障害効果と腫瘍細胞の生物学的反応を検討するとともに、悪性神経膠腫患者への TNF 局所投与時の中枢神経系内における TNF 局所濃度の時間的経過、さらに、二次的に惹起される中枢神経系内の免疫担当細胞浸潤とサイトカイン反応を解析・検討した。

Glioblastoma 細胞の TNF に対する感受性をみるための MTT assay では14株の glioblastoma 細胞は TNF に対し大部分抵抗性を示し直接の殺細胞効果は弱いと考えられた。しかし、被検細胞数を減らし培養期間を延長すると、半数の細胞株が増殖抑制反応を示し、また Colony 形成抑制試験では、6細胞株のうち5細胞株が TNF により有意な抑制を受けた。また  $^3\text{H}$ -thymidine 取り込み試験にて14細胞株中9細胞株が有意な DNA 合成の抑制を受け TNF は glioblastoma 細胞に対し増殖静止作用は持つと考えられた。さらに TNF 刺激により glioblastoma 細胞は prostaglandin  $\text{E}_2$  産生の増加を示した。この産生増加し前述の TNF 感受性とは相関する傾向を認めた。Glioblastoma 細胞の多くが TNF 刺激に対し細胞内 Mn-SOD 量の増加を示したが、TNF 感受性とは相関しなかった。また TNF 前処理による Mn-SOD の誘導を行っても TNF 感受性は変化しなかった。Glioblastoma 細胞のサイトカイン産生に対する TNF の影響では15細胞株中13株が TNF 刺激に反応して interleukin 6 (IL-6) 産生を増した。IL-8 活性 (好中球遊走活性) は15細胞株中11株が上清中に産生しており、TNF 刺激にて、産生増加 (7株) または誘導 (4株) を受けた。HPLC の溶出時間 (38分) により、この活性は IL-8 によるものであることが確認された。

さらに、実際の悪性神経膠腫患者に対し TNF を頭蓋内局所投与を行った試験においては、一

回あたり5,000単位以上の投与量にて投与後2～8時間にて、髄液中に10～15単位/mlのTNF活性が検出され、24時間以内に検出限界以下に低下した。TNF投与後、髄液中には2～4時間で顕著な白血球浸潤が生じた。これは8～12時間で好中球主体の第1のpeak(200～4,000個/mm<sup>3</sup>)をとり、24時間後に単核球優位の第2のpeakを示し、48時間以内にはほぼ消失する二相性を示した。単核球のうち大きなものは、Azur顆粒を含みnon-specific esterase染色陽性で、flow cytometryにてCD11b, CD13, CD14陽性の単球での、小さなリンパ球様単核球は、CD4陽性CD8陰性のT細胞であった。髄液中の好中球遊走因子活性はTNF投与により全症例において増加または陽転した。HPLC解析にて、この活性の主要な部分はIL-8であることが判明した。またTNFは全症例の髄液中および腫瘍腔内のIL-6活性を上昇させた(peak8～12時間)IL-1βは、6例の髄液中3例においてTNF投与により陽性となる反応を示した(peak8時間)。Prostaglandin E<sub>2</sub>濃度はTNF投与4～12時間で最高値を示す増加を示した。腫瘍腔内ではやや高い値を示して同様に変動した。TGFβはTNF投与以前の6例中4例の髄液に、5例中3例の腫瘍腔液に検出されたが著明な変化は認めなかった。IL-2, IFN活性, IFN-β, γは陰性であった。

以上の結果より、TNFは悪性神経膠腫細胞に対し細胞内物質代謝を変化させ増殖静止的に働くことが示され、局所投与を行うと免疫担当細胞浸潤や二次的サイトカイン産生を惹起して、抗腫瘍効果をもたらす可能性があることが示唆された。

口頭発表の審査会において、皆川知紀教授より、glioblastoma細胞のTNF受容体発現について、Mn-SODがTNFのglioblastoma細胞障害に関与する機序について、glioblastoma細胞のIL-6産生の理由とその治療への応用の可能性の有無について、さらに今回の治療試験の臨床成績についての質問がなされた。また、細川眞澄男教授より髄液内でのサイトカイン産生の産生源について、さらに認められた免疫学的賦活効果のうち、腫瘍拒絶に最も効果が期待できるものについての質問がなされた。これに対し申請者は概ね妥当な回答を行った。その後、行われた皆川・細川両副査教授との試問においても、概ね適切な回答がなされた。

本研究はTNFの悪性神経膠腫に対するin vitro作用と宿主のin vivoでの生物学的反応を詳細な解析を行い、TNFのbiological response modifierとしての可能性を明らかにしたものであり、有意義な研究と考えられ、学位授与に値する。