学位論文題名

BCG 由来 DNA 画分の大腸癌肝転移抑制効果
に関する実験的検討
学位論文内容の要旨

I. 目的

大腸癌の手術成績を向上させるためには、再発形式として最も頻度の高い肝転移を予防する効果的な補助療法の確立が重要であり、様々な臨床的あるいは実験的研究が行われている。術後肝転移再発の機序としては術中門脈内に存在した遊離癌細胞が肝臓に着床するか、あるいは手術時すでに存在していた微小転移巣が増殖することが考えられる。さらに全身麻酔や手術侵襲による宿主側の免疫能低下がこれを助長する要因となっており、周術期における免疫療法の重要性が指摘されている。そこで、肝転移形成の初期段階における免疫療法の有用性を評価するために、BCGから抽出されたDNA画分を用いて、マウス大腸癌肝転移モデルにおける転移抑制効果とその免疫学的機序を検討した。

II. 方法

1. 実験材料

実験動物は6～7週齢の雌性BALB/cマウス(日本クレア社より購入)を用いた。マウス可移植性大腸癌株Colon-26は癌研化療センターより培養系を分与され、10% FCS加RPMI培地で継代し使用した。薬剤はMY-1(BCGの水溶性成分から抽出された70.0% DNA, 28.0% RNAからなる核酸画分、三井製薬工業株式会社より供与)を適量のPBSに溶解して使用した。

2. 肝転移抑制試験

ネブタール麻酔下で開腹後、Colon-26の細胞浮遊液 1×10^4 個を30Gリンパ管造影針を用いて腸間膜静脈内に注入し、肝転移モデルを作製した。皮下移植腫瘍に対する予備実験の結果をもとに、MY-1の投与は1回300 μ gを移植後12日まで隔日7回とした。治療群では術中の門脈内投与の効果を評価するため、移植日の投与経路から、閉腹前に脾臓内に投与するIS群(n=21)と閉腹後皮下に投与するSC群(n=22)の2群に分け、その後の6回はいずれも皮下投与とした。対照群(n=22)には等量のPBSを7回皮下投与した。効果判定は、移植後21日に約半数のマウスを犠牲死させ肝を摘出し、肝湿重量と肝表面の転移結節個数を測定した。また残りのマウスを生存させ、移植日よ

り死亡するまでの期間を観察した。

3. 腫瘍中和試験

In vivo 腫瘍中和試験は脾細胞を用いたWinn assayにより行った。脾細胞浮遊液を作製し、プラスチックシャーレ法により非付着性細胞および付着性細胞を分離・採取した。免疫動物(donor)は担癌治療マウス、担癌無治療マウスおよび無処置マウスの3群とし、前二者は肝転移モデルを作製後、MY-1あるいはPBSを移植日より隔日7回皮下投与し、移植後14日に脾臓を摘出した。脾細胞(E)とColon-26の浮遊細胞 5×10^5 個(T)を適当なE/T比で混和し、マウス(recipient)の右側腹壁皮下に移植した。非付着性細胞のE/T比は100:1、付着性細胞では5:1とした(各群n=6~8)。さらにeffector細胞を検索するため、担癌治療マウスの非付着性細胞浮遊液を抗アシアロGM1抗体およびモノクローナル抗体(抗Thy1.2, 抗L3T4, 抗Lyt2.2)と補体処理を行い、E/T比100:1で中和試験を行った(各群n=6)。効果判定は、皮下移植後14日に腫瘍の長径と短径を測定し(長径) $\times$ (短径)²から推定腫瘍体積を求め比較した。

4. 統計処理

得られた数値はすべて平均 $\pm$ 標準誤差で表し、平均値の差はStudent-t検定、生存期間に関してはGeneralized Wilcoxon検定を用い、危険率5%以下を有意とした。

III. 結果

1. 肝転移抑制効果

Colon-26の細胞浮遊液 1×10^4 個を門脈内に注入する際の手術成功率は94.1%であり、また肝転移巣形成率は100%であった。移植後21日の対照群の肝重量は 7.10 ± 0.36 g、肝表面の転移結節個数は 111 ± 7 個であった。一方SC群ではそれぞれ 4.02 ± 0.48 g、 45 ± 9 個、IS群では 3.24 ± 0.38 g、 32 ± 7 個であり、対照群に比べ治療群ではいずれも有意な抑制を示した($p < 0.01$)。マウスの生存期間は対照群の 24.1 ± 0.7 日に対し、SC群 30.4 ± 1.4 日、IS群 32.7 ± 1.3 日であり、いずれも有意に延長された($p < 0.01$)。しかし、治療群間の比較ではIS群でより良好な結果が得られたが、有意差は認められなかった。

2. 腫瘍中和試験

非付着性細胞を用いた試験では、無処置マウスを除く担癌マウスの脾細胞はいずれも有意な中和活性を示した。しかし、担癌マウスの中では治療マウスの中和活性がさらに強く、無治療マウスとの差は有意であった($p < 0.05$)。一方付着性細胞を用いた試験では、いずれのマウスの脾細胞も中和活性を認めなかった。抗体+補体処理によるeffector細胞の検索では、抗アシアロGM1抗体+補体処理では中和活性は減弱しなかったのに対し、抗Thy1、抗L3T4、抗Lyt2抗体+補体の処理を行うといずれも中和活性は消失した。

IV. 考察

術後の補助療法は腫瘍残量の少ない術後早期から開始することが望ましく、周術期に

如何なる治療法を選択すべきかは重要な課題である。一般に化学療法剤は効果が速やかで比較的明確にあらわれる反面、逆に宿主に対する副作用は少なくない。さらに感受性のない化療剤の投与は逆に転移を促進する場合があります、術後早期の抗癌剤の投与には慎重を要する。それに対して免疫療法は効果は緩徐ながら、宿主の生体防御能を増強するとともに、術後早期の免疫能の低下を予防することができ、合目的な手段であると思われる。

一方、MY-1はマウスやモルモットの数種の同系腫瘍の増殖を抑制し、特に腫瘍内投与の効果は著明であり、100 μ gあるいはそれ以上のMY-1を6回腫瘍内投与すると、殆ど全ての腫瘍が退縮すると報告されている。その作用機序は、皮下に移植したMeth A肉腫が完全退縮する過程において、初期には腫瘍細胞周囲にNK細胞およびマクロファージを集積させ、腫瘍が退縮する14日目頃にはL3T4陽性細胞を介した腫瘍特異免疫が成立するとされている。しかし、転移の抑制を目的とした検討はルイス肺癌以外の実験系ではいまだ評価されていない。本実験では、Colon-26を用いた大腸癌の肝転移モデルにより、MY-1の転移抑制効果を検討した。

SC群およびIS群のいずれにおいても肝転移が有意に抑制されたが、2つの治療群の間では差は認められず、one shotのみの門脈内投与では十分な効果の増強は得られないものと考えられた。そこでMY-1の全身投与の抗腫瘍効果の機序を解明するために脾細胞を用いて腫瘍中和試験を行った。担癌無治療マウスの非付着性細胞にも中和活性を認めたが、MY-1を投与したマウスではその活性は有意に増強された。すなわち腫瘍の移植によって脾内リンパ球の活性化が起こり、MY-1はその活性化をさらに高めたものと考えられた。また治療マウスの非付着性細胞に抗アジアロGM1抗体+補体処理を行っても中和活性は減弱しなかったのに対し、抗Thy1、抗L3T4、抗Lyt2抗体+補体の処理ではいずれも中和活性は消失したことから、この作用は主に脾内Tリンパ球の活性化に起因することが示唆された。

V. 結 語

MY-1による免疫賦活は初期段階の肝転移形成を抑制し、その作用は主に脾内Tリンパ球の活性化によるものと考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 内 野 純 一
副 査 教 授 細 川 眞澄男
副 査 教 授 柿 沼 光 明

学 位 論 文 題 名

BCG 由来 DNA 画分の大腸癌肝転移抑制効果 に関する実験的検討

大腸癌の再発形式として肝転移は最も頻度が高く、遠隔成績を向上させるためには、肝転移を予防する効果的補助療法の確立が必要である。術後肝転移再発の機序として、門脈内の遊離癌細胞が肝臓に着床する、あるいはすでに存在していた微小転移巣がその後増殖することが考えられている。さらに手術による宿主の免疫能低下は転移を助長する一因とされ、術後早期の免疫療法の有用性が指摘されている。一方、BCGより抽出されたDNA画分(MY-1)はマウスやモルモットの数種の同系腫瘍の増殖を著明に抑制し、ルイス肺癌の肺転移を抑制することが示されている。その作用機序として皮内に移植したMeth A線維肉腫が完全退縮する過程において、初期にはNK細胞の活性化をもたらし、後期にはL3T4陽性細胞を介した腫瘍特異免疫が成立するとされている。本研究では、肝転移形成の初期段階における免疫療法の有用性を評価するために、マウス大腸癌肝転移モデルを用いてMY-1の転移抑制効果とその免疫学的機序を検討した。

研究方法：

実験動物は6～7週齢の雌性BALB/cマウスを使用し、腫瘍はマウス可移植性大腸癌株Colon-26を用いた。薬剤は新しいBRMの一つであるMY-1(BCGの水溶性成分から抽出された70.0%DNA、28.0%RNAからなる核酸画分、徳永ら、JNCI、1984)を使用し

た。

Colon-26の腫瘍細胞 1×10^5 個を腸間膜静脈内に注入することにより肝転移モデルを作製した。肝転移抑制試験では、治療群にはMY-1を1回300 μ g、移植日より7回隔日投与したが、7回とも皮下に投与するSC群と移植日は閉腹前に脾臓内に投与、以後6回は皮下投与を行うIS群の2群とした。対照群には等量のPBSを7回皮下投与した(各群 $n = 21 \sim 22$)。効果判定は、移植21日後に肝を摘出し、肝表面の転移結節個数と肝湿重量を測定するとともに、残りマウスを生存させ、生存期間を観察した。

免疫学的機序を解明するために脾細胞を用いたWinn assayを行った。免疫動物は、無処置マウス、担癌無治療マウス、担癌治療マウスの3群とし、後二者は肝転移モデルを作製後、無治療マウスにはPBSを、治療マウスにはMY-1を7回投与し、移植14日後に脾臓を摘出した。脾細胞浮遊液をプラスチックシャーレ法により非付着性細胞および付着性細胞に分離し、それぞれ100:1あるいは5:1のE/T比で別のマウスの腹壁皮下に移植した(各群 $n = 6 \sim 8$)。さらに非付着性細胞に対しては、抗アジアロGM1抗体およびモノクローナル抗体(抗Thy1.2, 抗L3T4, 抗Lyt2.2)と補体処理を行い、negative selectionによりeffector細胞を検索した(各群 $n = 6$)。

研究結果：

腫瘍細胞を門脈内に注入する際の手術成功率は94.1%であり、移植21日後の肝転移形成率は100%であった。肝表面の転移結節個数と肝湿重量は、対照群ではそれぞれ平均111個、7.10gであったが、SC群ではそれぞれ45個、4.02g、IS群では32個、3.24gであり、治療群ではいずれも有意に転移が抑制された($p < 0.01$)。またマウスの生存期間は有意に延長され($p < 0.01$)、平均生存期間は対照群24日に対し、SC群30日、IS群33日であった。なお治療群間の比較では、IS群が良好であったが、有意差を認めなかった。

非付着性細胞を用いた中和試験では、無処置マウスの脾細胞は中和活性を認めなかったが、担癌マウスの脾細胞はいずれも有意に高い中和活性を示した。しかし担癌マウスの中では治療マウスの活性がさらに強く、無治療マウスとの差は有意であった($p < 0.05$)。抗体+補体処理によるeffector細胞の検索では、抗アジアロGM1抗

体＋補体処理では中和活性は減弱しなかったのに対し、抗Thy1、抗L3T4、抗Lyt2抗体＋補体の処理を行うといずれも中和活性は消失した。

以上より、MY-1による免疫賦活は初期段階の肝転移形成を抑制し、その作用は主に脾内Tリンパ球の活性化によるものと示唆された。

審査にあたって、細川教授よりDNAを主成分とするMY-1のBRMにおける位置づけとその作用機序について、柿沼教授より生体内におけるDNAの免疫学的作用について、などの質疑があったが、申請者はおおむね妥当な回答を行った。

大腸癌の肝転移を予防する補助療法としてDNA製剤を用いた報告はなく、本研究では、MY-1の全身投与が初期段階の肝転移を抑制すること、その作用機序として担癌状態におけるTリンパ球の活性化が高められることが明かにされ、MY-1が大腸癌の肝転移抑制剤として応用し得る可能性を示唆した点で意義があり、学位の授与に値するものと考えらる。