

学位論文題名

Tumor Necrosis Factor- α のヒトグリオーマ細胞
に対する増殖抑制効果についての研究

学位論文内容の要旨

腫瘍壊死因子 tumor necrosis factor- α (TNF)は、1975年、腫瘍に出血壊死を生じる蛋白質として発見され、その後 recombinant TNFが開発され飛躍的に研究が進み、基礎、臨床ともに数多くの報告がみられる。またTNFは、腫瘍細胞に対して直接の殺細胞効果／増殖抑制効果を有するサイトカインとして、癌治療への臨床応用が期待されてきた。脳に原発する代表的悪性腫瘍である悪性神経膠腫に対するTNFの直接腫瘍細胞障害活性に関しては、諸家によりその見解が異なり未だ定説を見ていない。最近ではむしろ、グリオーマ細胞に対するTNFの直接細胞障害作用は非常に低いという報告が多い。

ところで、TNFのcDNAのクローニングによってTNF受容体の構造が解明され、分子量の異なるp55およびp75という2種類の分子がTNF受容体として存在していることが明らかとなった。その機能については、p55TNF受容体は機能的受容体であり、細胞致死活性などに関与していることが明らかになってきている。しかしながら、p75TNF受容体は細胞致死活性には関与していないと考えられているが、本来の機能は依然不明な点が多い。また最近、グリオーマ細胞でp55TNF受容体が優位に発現していたとの報告がある。

現在本邦において、悪性神経膠腫に対するTNFの臨床第II相試験が進行中であるが、TNFの多様な生理活性をうまく引き出すことができればその効果が期待できると思われる。しかしながら、悪性神経膠腫への直接作用に関しては不明な点が多く、治療効果を高めるためには、TNFに対する感受性、受容体、耐性、作用機序などの解析への取り組みが重要であると考えられる。

本研究は、ヒトグリオブラストマ細胞株を用いて、2種類のTNF受容体の発現を解析し、TNFの直接腫瘍細胞障害／増殖抑制効果と細胞周期の関係からその感受性について、さらにグリオブラストマ

細胞の代謝修飾と分化誘導などの生物学的反応について解析検討したものである。

グリオブラストマ細胞12株において、p55およびp75TNF受容体の発現を、PCRおよびフローサイトメリーにて検索したところ、すべての細胞株でp55TNF受容体のRNA転写産物ならびに細胞膜上の受容体蛋白を検出した。この内、p75TNF受容体をも発現していたものは4細胞株であったが、p75TNF受容体のみ発現した細胞はなかった。このことから、グリオブラストマ細胞においてはp55TNF受容体が優位に発現しており、TNFの作用発現にはp55TNF受容体が機能的受容体として関与していると考えられた。

次に、ヒトグリオブラストマ細胞12株に、256 U/mlまでの低濃度TNFを3～7日間作用させると、MTT試験でほとんどの細胞株はTNFの殺細胞効果に対して抵抗性であり、比較的良く反応した細胞株での効果は殺細胞効果ではなく増殖抑制効果と考えられた。さらに低濃度TNFで、³H-thymidine取り込み試験でのDNA合成能を評価すると、9細胞株で抑制効果を認めた。以上より、TNFはグリオブラストマ細胞に対して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唆された。

TNFのグリオブラストマ細胞に対する増殖抑制効果の機序を検討するために、BrdU-PI二重染色法によるフローサイトメリーで細胞周期解析を行なうと、G₀/G₁期細胞の増加とS期細胞の減少をTNFの濃度依存性に認め、このTNFの抗増殖効果の一部はグリオブラストマ細胞のS期におけるDNA合成が抑制されることにより生じることが示された。このG₁期での停止作用が、細胞を分化の過程へと誘導したためかどうかを調べるために、グリオマにおける分化度の指標と考えられているglial fibrillary acidic protein(GFAP)量の変化をフローサイトメリーで調べた。10 U/mlのTNF刺激によって確かに細胞内のGFA蛋白の増加を認め、グリオブラストマ細胞ではTNFにより分化が誘導されることが示された。

TNFの細胞障害活性における作用機序は不明な点が多いが、アキチン酸代謝におけるフォスホリハ³-セA₂の関与が指摘されている。今回の実験結果からも、TNFに感受性を示した細胞株ではTNF処理により培養上清中にPGE₂の放出が増加しており、フォスホリハ³-セA₂の賦活化を介する細胞障害効果が少なくとも一部のグリオブラストマ細胞においてあてはまることが示唆された。

さらに、TNFの殺細胞効果に対するグリオブラストマ細胞の抵抗性の機序を解析するために、細胞内Mn-SODを測定した。Mn-SODはTNFによる細胞障害作用から細胞を防御する防御蛋白質として注目されているfree radical scavengerの一つで、TNF抵抗性の要因とする報告もある。グリオブラストマ細胞内のMn-SODは様々

な値を示し、TNF刺激により濃度および時間依存性にMn-SODが誘導される傾向が見られた。しかしTNF感受性株においてMn-SODは顕著に誘導され、Mn-SODがグリオブラスト-マにおいてTNFに対する防御蛋白質として働く可能性は少ないと考えられた。

直接的な抗腫瘍細胞効果とは別に、TNFにはグリオ-マ由来の細胞からある種のサイトカイン産生を促すことが報告されている。グリオブラスト-マ細胞のサイトカイン産生能に対するTNFの影響について調べたところ、細胞障害作用を示さない比較的低濃度かつ短時間のTNF作用により、IL-6、IL-8、GM-CSFの産生増加を認めた。この事実はTNFの作用を考える上で非常に興味深い。グリオブラスト-マはTNFの細胞障害活性に対して感受性が低い、それは単に無反応であるというのではなく、グリオブラスト-マの代謝のある回路は低濃度・短時間のTNFに非常に敏感に反応することを示している。TNFがこれらの生理活性物質の産生を促すことは、GFAP産生量の増加と同様にグリオブラスト-マ細胞の分化誘導の結果であるのかもしれない。

前述したように、グリオブラスト-マ細胞ではp55TNF受容体が優位で、機能的受容体であると考えられる。p75TNF受容体の機能を推定するために、p55TNF受容体単独とp55およびp75TNF受容体の両者を発現する細胞において、TNFの増殖抑制効果とサイトカイン産生能について比較したが、明らかな違いは見い出せず、一部のグリオブラスト-マ細胞が発現するp75TNF受容体の機能については明らかにできなかった。

以上をまとめると、グリオブラスト-マ細胞はp55TNF受容体という機能的受容体を持ち、低濃度TNFに対しても種々の反応を起こす。その作用は殺細胞効果をもたらすようには働かず、種々のサイトカインやGFAPなどの蛋白産生を促すことにより細胞を分化誘導し、増殖静止効果をもたらすのではないかということである。悪性神経膠腫に対するTNFの臨床効果は未だ明瞭ではないが、本研究により腫瘍細胞の分化誘導療法の一つとしてTNFを利用できる可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 阿 部 弘
副 査 教 授 上 出 利 光
副 査 教 授 皆 川 知 紀

学位論文題名

Tumor Necrosis Factor- α のヒトグリオーマ細胞 に対する増殖抑制効果についての研究

腫瘍壊死因子 tumor necrosis factor- α (TNF)は、その主な作用として、直接の腫瘍細胞に対する殺細胞効果／増殖抑制効果を有するために、各種癌疾患での報告の他、脳腫瘍においても臨床試験が進行中である。しかしながら、ヒトグリオーマ細胞の多くは *in vitro*においてTNFの殺細胞効果に対して抵抗性であると報告されている。本研究は、ヒトグリオブラストマ細胞株を用いて、2種類存在するTNF受容体の発現を解析し、TNFの分化誘導による増殖抑制効果について検討したものである。

グリオブラストマ細胞12株において、p55およびp75TNF受容体の発現を、PCRおよびフローサイトメトリーにて検索したところ、すべての細胞株でp55TNF受容体を検出した。この内、p75TNF受容体をも発現していたものは4細胞株であったが、p75TNF受容体のみ発現した細胞はなかった。このことから、グリオブラストマ細胞においてはp55TNF受容体が優位に発現しており、TNFの作用発現にはp55TNF受容体が機能的受容体として関与していると考えられた。

次に、ヒトグリオブラストマ細胞12株に、256 U/mlまでの低濃度TNFを3～7日間作用させると、MTT試験でほとんどの細胞株はTNFの殺細胞効果に対して抵抗性であった。しかし同様の低濃度TNFで、 ^3H -thymidine取り込み試験でのDNA合成能を評価すると、9細胞株で抑制効果を認めた。以上より、TNFはグリオブラストマ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唆された。

TNFのグリオブラストマ細胞に対する増殖抑制効果の機序を検討するために、BrdU-PI二重染色法によるフローサイトメトリーで細胞周期解析を行なうと、 G_0/G_1 期細胞の増加とS期細胞の減少を認め、このTNFの抗増殖効果の一部はグリオブラストマ細胞のS期におけるDNA合成が抑制されることにより生じることが示された。さらにTNF刺激に

より、グリオマにおける分化度の指標と考えられているglial fibrillary acidic protein(GFAP)量の変化をフローサイトメトリーで調べたところ、細胞内のGFA蛋白の増加を認め、グリオブラストマ細胞ではTNFにより分化が誘導されることが示された。

TNFの細胞障害活性における作用機序は不明な点が多いが、アキトニク酸代謝におけるフォスホリハ⁺-セ⁻A₂の関与が指摘されている。今回の実験結果からも、TNFに感受性を示した細胞株ではTNF処理により培養上清中にPGE₂の放出が増加しており、フォスホリハ⁺-セ⁻A₂の賦活化を介する細胞障害効果が少なくとも一部のグリオブラストマ細胞においてあてはまることが示唆された。

さらに、TNFの殺細胞効果に対するグリオブラストマ細胞の抵抗性の機序を解析するために、細胞内Mn-SODを測定した。Mn-SODは、TNFによる細胞障害作用から細胞を防御する防御蛋白質として注目されているfree radical scavengerの一つで、TNF抵抗性の要因とする報告もある。グリオブラストマ細胞内のMn-SODは様々な値を示し、TNF刺激により濃度および時間依存性にMn-SODが誘導される傾向が見られた。しかしTNF感受性株において顕著に誘導され、Mn-SODがグリオブラストマにおいてTNFに対する防御蛋白質として働く可能性は少ないと考えられた。

直接的な抗腫瘍細胞効果とは別に、TNFにはグリオマ由来の細胞からある種のサイトカイン産生を促すことが報告されている。グリオブラストマ細胞のサイトカイン産生能に対するTNFの影響について調べたところ、細胞障害作用を示さない比較的低濃度かつ短時間のTNF作用により、IL-6、IL-8、GM-CSFの産生増加を認めた。この事実はTNFの作用を考える上で非常に興味深い。グリオブラストマはTNFの細胞障害活性に対して感受性が低いですが、それは単に無反応であるというのではなく、グリオブラストマの代謝のある回路は低濃度・短時間のTNFに非常に敏感に反応することを示している。TNFがこれらの生理活性物質の産生を促すことは、GFAP産生量の増加と同様にグリオブラストマ細胞の分化誘導の結果であるのかもしれない。

前述したように、グリオブラストマ細胞ではp55TNF受容体が優位で機能的受容体であると考えられる。p75TNF受容体の機能を推定するために、p55TNF受容体単独とp55およびp75TNF受容体の両者を発現する細胞において、TNFの増殖抑制効果とサイトカイン産生能について比較したが、明らかな違いは見い出せず、一部のグリオブラストマ細胞が発現するp75TNF受容体の機能については明らかにできなかった。

以上をまとめると、グリオブラストマ細胞はp55TNF受容体という機能的受容体を持ち、低濃度TNFに対しても種々の反応を起こす。その作用は殺細胞効果をもたらすようには働かず、種々のサイトカインやGFAPなどの蛋白産生を促すことにより細胞を分化誘導し、増殖静止効果をもたらすのではないかとということである。悪性神経膠腫に対するTNFの臨床効果は未だ明瞭ではないが、本研究により腫瘍細胞の分化誘導療法の一つとしてTNFを利用できる可能

性が示唆された。