

学 位 論 文 題 名

肝癌に対する血管新生抑制剤TNP-470(AGM-1470)単独
およびcisplatin併用による抗腫瘍効果および血清銅値の意義

学位論文内容の要旨

I 緒 言

固形腫瘍の生体内増殖には継続的な血管新生が必須である。したがって、血管新生の抑制は腫瘍の増殖を抑制すると考えられる。現在までに血管新生を抑制するさまざまな物質が報告されてきたが、臨床応用に至ったものはなかった。しかし、最近開発されたTNP-470(AGM-1470)は、血管新生抑制効果が高く副作用が少ないため、血管新生抑制剤としての臨床応用が可能とされ、現在米国で第1相試験が行われている。

本研究では、ラット肝癌に対する本剤単独およびcisplatinとの併用による抗腫瘍効果をみると共に、本剤投与後に、血管新生のco-factorと言われている銅の血清値の変化を検討した。

II 方 法

1. 実験動物と腫瘍細胞：実験動物は5ないし6週齢、体重150から200gのWistar-King A雄性ラットを用いた。腫瘍細胞は、3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzenの経口投与により教室で樹立し、継代しているラット肝癌細胞を用いた。培養肝癌細胞107個をラットの背部皮下に接種し担癌ラットを作成した。

2. 薬剤の投与方法：

実験1；担癌ラットに対しTNP-470を腫瘍接種当日より7日間連日皮下投与し、腫瘍接種4週間までの期間における腫瘍体積を算出し、本剤の抗腫瘍効果を検討した。薬剤の投与量は5mg/kg、10mg/kg、20mg/kg、30mg/kgとした。

実験2；担癌ラットに対しTNP-470 20mg/kgとcisplatin 0.5mg/kgの同時併用投与を腫瘍接種日より7日間連日行ない（A群）、それぞれの薬剤を単独で投与した2群（B、C群）およびコントロール群（D群）と抗腫瘍効果を比較した。また、TNP-470 20mg/kgを腫瘍接種当日より7日間投与し、次の7日間にcisplatin 0.5mg/kgを投与する群（E群）と、薬剤投与順序をE群の逆にした群（F群）の抗腫瘍効果を比較した。観察期間は実験1と同様とした。

3. 血清銅の測定：実験1の各群の血清銅値を原子吸光光度計（日立社Z-8000）を用いて週1回、4週にわたり測定した。また、腫瘍を接種せず薬剤の投与を実験1と同様に行った非担癌ラットに対しても血清銅を同様の方法で測定した。

4. 組織学的検討：Hematoxylin-Eosin染色で、腫瘍組織の変化を観察するとともに、腫瘍内で毛細血管に富む部位を200倍の視野で5か所を選び、毛細血管数を数えて平均したものを、毛細血管密度とし、検討項目に加えた。

III 結 果

1. TNP-470の腫瘍増殖への効果：TNP-470の5mg/kg投与群はコントロール群と比較して、腫瘍増殖抑制効果を認めなかったが、投与量を10mg/kg、20mg/kg、30mg/kgに増量すると用量依存性に増殖抑制効果が増強し、抑制の期間が延長した。

2. TNP-470とcisplatinの併用による抗腫瘍効果：両薬剤を同時に併用したA群の抗腫瘍効果は、B群およびD群と比較して有意に増強されたが、cisplatin単独投与のC群との間には有意差がなかった。また、両薬剤を異時性に併用したE、F群の抗腫瘍効果はコントロール群との比較では、ともに有意に抑制された。E、F群間は、3週までは有意差がなかったが、それ以降はF群の体積がE群と比較して有意に小さかった。同時併用と異時併用との比較、すなわちA群とE、F群との比較では、A・E群間には有意差はなく、A・F群間では、F群の腫瘍増殖がA群と比較して有意に抑制された。

3. TNP-470の血清銅値への影響：薬剤非投与の正常ラットの血清銅値は100 μ g/dl前後の値を維持したが、担癌ラットでは腫瘍の増殖に伴って血清銅値は漸増した。TNP-470投与群においては、投与終了直後にコントロール群と比較して有意な血清銅値の上昇がみられたが、担癌・非担癌群間には有意差はなかった。薬剤投与終了1週以降の血清銅値は、非担癌ラットでは正常ラットと同様の値を維持したのに対し、担癌ラットでは、低下後、再上昇をした。担癌コントロール群との比較では、TNP-470 5mg/kg、10mg/kg投与群の血清銅値は腫瘍接種3週後においてコントロール群より有意に高値であった。腫瘍接種2週以降における各治療群間の比較では、TNP-470の投与量が少ないほど血清銅値が高い傾向がみられた。

4. 組織学的血管新生への効果：TNP-470単独投与群では、腫瘍細胞自体の変性はみられず、巣状、帯状あるいはび慢性の壊死が主な所見であった。cisplatin併用群では、前述の所見に細胞単位での変性、壊死の所見が加わっていたが、薬剤の投与順序による組織学的差異は明らかではなかった。毛細血管密度は、TNP-470 20mg/kg、30mg/kg投与群ともに3週後まではコントロール群より有意に少なく、4週後には有意差がなかった。

IV 考 察

本研究では、まずTNP-470のラット実験肝癌に対する抗腫瘍効果を検討した。その結果、本剤単独で、用量依存性の抗腫瘍効果を認めた。文献的には、本剤は転移抑制効果が高く、原発巣に対する効果は少ないとの報告がある。その理由としては、ある程度大きさに成長した腫瘍の血管新生を抑制しても、既存の血管からの栄養により腫瘍の増殖が持続するためと考えられるが、本研究では腫瘍接種当日より本剤の投与を開始したた

め、腫瘍の着床に必要な血管の新生が抑制され抗腫瘍効果が現れたと考えられた。

本剤とcisplatinとの併用に関しては、両剤を同時に併用した場合や本剤投与後にcisplatinを投与した場合の抗腫瘍効果の増強は明らかではなかった。一方、cisplatin投与後に本剤を投与した場合には、著明な抗腫瘍効果の増強とその期間の延長を認めた。その機序に関しては、cisplatin投与により変性を受けた腫瘍細胞が再度増殖するために必要な血管新生をTNP-470が抑制したためと推察された。両剤の同時投与やTNP-470の投与を先行させた場合では、TNP-470の血管新生抑制作用によりcisplatinの腫瘍組織内への移行が抑制的に働いたために抗腫瘍効果の増強が得られなかったと考えられた。

TNP-470の投与直後に血清銅の有意な上昇が認められたが、担癌、非担癌群間に差を認めなかった。すなわち、これは担癌の有無に関係のないTNP-470投与自体の影響であると考えられた。非担癌群では本剤の投与中止後1週以降では血清銅値の上昇はなく、正常ラットと差がなかった。すなわち、本剤の血清銅増加作用は投与中止1週までには消失すると考えられた。担癌ラットでは本剤投与中止後1週目に血清銅は一旦低下するが、その後腫瘍の増殖に伴い、再上昇が認められた。コントロール群においても腫瘍増殖に伴って血清銅は漸増傾向を示したため、この血清銅の上昇はTNP-470の効果ではなく、担癌の影響と考えられた。しかし、TNP-470治療群（5mg/kg、10mg/kg）の血清銅値は腫瘍接種3週後にはコントロール群より有意に高値であり、またTNP-470治療群間にも2、3週後の値に有意差があったことから、これらの群の血清銅値は担癌の影響だけでなく、血管新生抑制効果の消失の影響を受けているものと推察された。TNP-470治療群（20mg/kg、30mg/kg）において腫瘍内毛細血管密度と血清銅値が正の相関を示していたことから腫瘍内毛細血管の再増殖と血清銅との関連性が推察された。

V 結 語

1. TNP-470はラット肝癌に対して用量依存性の抗腫瘍効果を示した。
2. cisplatin投与後にTNP-470を投与すると、強い併用効果を認めた。
3. TNP-470の腫瘍血管新生への効果は抗腫瘍効果とほぼ平行した。
4. TNP-470自体に血清銅値を増加させる効果があった。
5. TNP-470の抗腫瘍効果の消失による腫瘍の急激な増殖、腫瘍内血管の増加に伴い血清銅値が上昇した。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 内 野 純 一

副 査 教 授 齊 藤 秀 哉

副 査 教 授 細 川 真澄男

学 位 論 文 題 名

肝癌に対する血管新生抑制剤TNP-470(AGM-1470)単独 およびcisplatin併用による抗腫瘍効果および血清銅値の意義

固形腫瘍の生体内増殖のためには継続的な血管新生が必須であるので、血管新生の抑制は腫瘍の増殖を抑制すると考えられる。現在までに血管新生を抑制するさまざまな物質が報告されてきたが、臨床応用に至ったものはなかった。しかし、最近開発されたTNP-470(AGM-1470)は、血管新生抑制効果が高く副作用が少ないため、血管新生抑制剤としての臨床応用が可能であり、現在米国で第1相試験が行われている。

そこで著者は、ラット肝癌に対する本剤単独およびcisplatinとの併用による抗腫瘍効果をみると共に、本剤投与後に、血管新生のco-factorと言われている銅の血清値の変化を検討した。

研究 方 法

1. 実験動物と腫瘍細胞：実験動物はWistar-King A雄性ラットを用いた。腫瘍細胞は、3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzenの経口投与により教室で誘発し、継代しているラット肝癌細胞を用いた。培養肝癌細胞107個をラットの背部皮下に接種し担癌ラットを作成した。

2. 薬剤の投与方法：実験(1)；担癌ラットに対しTNP-470を腫瘍接種当日より7日間連日皮下投与した。薬剤の投与量は5mg/kg、10mg/kg、20mg/kg、30mg/kgとした。実験(2)；担癌ラットに対し

TNP-470 20mg/kgとcisplatin 0.5mg/kgの同時併用投与を腫瘍接種日より7日間連日行ない（A群）、それぞれの薬剤を単独で投与した2群（B、C群）およびコントロール群（D群）と抗腫瘍効果を比較した。また、TNP-470 20mg/kgを腫瘍接種当日より7日間投与し、次の7日間にcisplatin 0.5mg/kgを投与する群（E群）と、薬剤投与順序をE群の逆にした群（F群）の抗腫瘍効果を比較した。観察期間は実験1、2とも4週までとした。

3. 血清銅の測定：実験1の各群の血清銅値を原子吸光光度計（日立社Z-8000）を用いて週1回、4週にわたり測定した。また、腫瘍を接種せず薬剤の投与を実験1と同様に行った非担癌ラットに対しても血清銅を測定した。

4. 組織学的検討：腫瘍組織の変化を観察するとともに、腫瘍内で毛細血管に富む部位を200倍の視野で5か所選んでその数を数えて平均したものを、毛細血管密度とし、検討項目に加えた。

研究結果

1. TNP-470の腫瘍増殖への効果：TNP-470の単独投与により用量依存性に増殖抑制効果が増強し、抑制の期間が延長した。

2. TNP-470とcisplatinの併用による抗腫瘍効果：両薬剤を同時に併用したA群の抗腫瘍効果は、cisplatin単独投与群と有意差がなかった。また、両薬剤を異時性に併用したE、F群の間の比較では、3週以降ではF群の体積がE群と比較して有意に小さかった。同時併用と異時併用との比較では、A・E群間には有意差はなく、A・F群間では、F群の腫瘍増殖がA群と比較して有意に抑制された。

3. TNP-470の血清銅値への影響：TNP-470投与群においては、投与終了直後にコントロール群と比較して有意な血清銅値の上昇がみられたが、担癌・非担癌群間には有意差はなかった。薬剤投与終了1週以降の血清銅値は、非担癌ラットでは正常ラットと同様の値を維持したのに対し、担癌ラットでは、低下、再上昇を認めたが、各群間の比較では、TNP-470の投与量が少ないほど血清銅値が高い傾向がみられた。

4. 組織学的血管新生への効果：TNP-470単独投与群では、腫瘍細

胞自体の変性はみられず、巣状、帯状あるいはびまん性の壊死が主な所見であった。cisplatin併用群では、前述の所見に細胞単位での変性、壊死の所見が加わっていた。毛際血管密度は、TNP-470 20mg/kg、30mg/kg投与群ともに3週後まではコントロール群より有意に少なく、4週後には有意差がなかった。

以上より以下の結論が得られた。1. TNP-470は単独投与で用量依存性の抗腫瘍効果を示した。2. cisplatinの投与後に本剤を用いると、強い併用効果を認めた。3. 本剤の腫瘍血管新生への効果は抗腫瘍効果とほぼ平行した。4. 本剤自体は血清銅値を増加させる効果があった。5. 本剤の抗腫瘍効果の消失による腫瘍の急激な増殖、腫瘍内血管の増加に伴い血清銅値が上昇した。

審査にあたって、斉藤教授より本剤投与による体重の変化、本剤の作用機序、本剤とcisplatinとの相互作用について、細川教授より本剤の腫瘍細胞や血管内皮細胞以外への直接作用、抗腫瘍効果と血清銅の関連性、正常ラットでも血清銅が上昇する機序について、浅香教授よりin vitroでの効果、AFPとの関連性などに関し質疑があったが、申請者は概ね妥当な回答を行った。

本研究では、新しいタイプの抗癌剤として現在注目されている本剤の臨床応用に際し重要と考えられるいくつかの知見を実験的に明らかにした点で意義があり、博士（医学）に値するものとする。