

学 位 論 文 題 名

血管新生阻害剤 TNP-470 (AGM-1470) の colon-26 に
対する増殖抑制効果および肝転移抑制効果

学位論文内容の要旨

I. 目 的

血管新生阻害剤 TNP-470 (AGM-1470, 以下 TNP) は、強力な血管内皮細胞の増殖抑制効果により血管新生を阻害するとされ、この抑制効果は細胞周期への影響によることが明らかにされた。一方、TNP はそれ自体腫瘍細胞にも増殖抑制効果を持ち、*in vitro* で各種癌細胞の増殖を抑制し、*in vivo* でも各種固形腫瘍の増殖抑制や転移抑制効果を持つことが報告されている。しかし、大腸癌細胞に関する TNP の抑制効果や、臨床上問題となる肝転移巣に対する基礎的研究の報告はきわめて少ない。colon-26 に対する TNP の *in vitro* での増殖抑制効果、細胞周期への影響、*in vivo* での肝転移抑制効果について検討した。

II. 方 法

1. 実験材料 腫瘍細胞はマウス可移植性大腸癌株 colon-26 を、実験動物は雌性 BALB/c (体重 19g-21g) を使用した。

2. 実験群 *in vitro* 試験の TNP 濃度は、control (0ng/ml), 1 ng/ml, 10ng/ml, 100ng/ml, 1 μ g/ml, 10 μ g/ml の 6 種類の濃度で増殖抑制試験 (各濃度 n=4) を施行した。走査電子顕微鏡による形態観察、細胞周期の解析、cyclin D1 m-RNA の発現は 100ng/ml 以上の濃度を用いた。*in vivo* 試験は、TNP 濃度は control (5% arabic gum のみ)、1mg/kg, 5mg/kg, 10mg/kg, 100mg/kg の 5 群での肝転移増殖抑制試験 (各 n=5) と、TNP に 5-Fluorouracil (以下、5-Fu) を併用した肝転移抑制試験を施行した。

3. colon-26 細胞増殖抑制試験 day 0 にフラスコ内に colon-26 を 5×10^4 個に静置させ、24 時間後に TNP を各濃度となるよう調整した。day 3, 5 に TNP 溶液の交換を行い、day 1, 3, 5, 7 にトリパンプルを用い細胞数を測定した。

4. 走査電子顕微鏡による形態観察 60mm dish 上に 8.5mm の SEM plate を置き、colon-26 を 5×10^4 個 dish 内に静置させた。2 時間後 TNP を追加し、48 時間後 1% glutaraldehyde を用い 1 時間固定した。ethanol を用い脱水し、acetic isopentyl 反応後臨界点乾燥した。Au + Pd にて coating し、ion sputter で処理後 S-4500 を用い、5000 倍率で細胞表面を観察した。

5. 細胞周期の解析 フラスコ内に colon-26 を 1×10^6 個静置させ、2 時間後 TNP を調整し、各濃度 5 検体を作製した。48 時間後、0.2% trypsin を用い、single cell の細胞を採取した。80% ethanol 24 時間固定後、0.1% pepsin、0.02% RNase を加え、0.005% propidium iodide で染色、EPICS Elite により腫瘍核 DNA 量を測定し、細胞周期解析 program を用いて G1 期、S 期、G2M 期の細胞比率を算出した。

6. ノーザンブロットによる cyclin D1 m-RNA の解析 フラスコ内の colon-26、 5×10^6 個を各 TNP 濃度で 48 時間処理し、RNAzol B キットにて total RNA を抽出した。total RNA 10 μ g を 1% アガロースゲルで 60 分電気泳動し、ナイロンメンブレンでトランスファーし、UV 照射にて RNA を固定、乾燥させた。3 時間のプレハイブリダイゼーション後、cyclin D1 プローブを

^{32}P にて標識し、24時間ハイブリダイゼーションを施行した。フィルターを洗浄、リンス後、 -80°C で2時間オートラジオグラフィーを行い現像した。

7. 肝転移増殖抑制試験 day 0にエーテル麻酔下に30Gリンパ管造影針を用いて腸間膜静脈を穿刺し、colon-26を 1×10^4 個注入し肝転移を作成した。day1、5、9、13に右腹壁に各濃度のTNPを皮下注射し、day17に犠牲死させ、肝表面の転移結節個数を測定した。

8. TNP、5-Fu併用試験 day 0に肝転移を作成し、TNP 5mg/kgをday1、5、9、13に右腹壁に皮下投与した。5-Fuは0.5mg/kg/dayをday 0より24時間腹腔内持続投与とした。治療群はcontrol群(無治療)、5-Fu単独投与(5-Fu群)、TNP単独投与(TNP群)、5-FuとTNPの併用群(TNP+5-Fu群)とし、day 15に犠牲死させ、肝転移結節個数を測定した。

9. 統計学的検討 得られた数値は、平均値 $\pm$ 標準偏差で表し、統計学的処理には、一元配置分散分析とFisher'PLSDを用い、 $p<0.05$ を有意差とした。

III. 結 果

1. 増殖抑制試験 day 7における各群間の細胞数($\times 10^4$)、100ng(57.0 ± 26.6)、 $1 \mu\text{g}$ (23.0 ± 10.5)、 $10 \mu\text{g/ml}$ (13.0 ± 3.8)の3群はcontrol(383.0 ± 43.7)、1ng(346.0 ± 50.9)、10ng/ml(457.0 ± 36.7)の3群に比し有意の細胞増殖抑制を認めた($p<0.05$)。

2. 走査電子顕微鏡所見 controlでは著明なmicrovilli、microtubuleを認めたが、TNP 100ng/ml、 $1 \mu\text{g/ml}$ 群ではmicrovilli、microtubuleが著明に減少し、 $10 \mu\text{g/ml}$ で処理したcolon-26は、細胞表面は滑で、microvilli、microtubuleの増生を認めなかった。

3. 細胞周期 各濃度におけるG1、S、G2M期の比率(%)はそれぞれcontrol群 61.6 ± 1.5 、 37.5 ± 1.3 、 0.9 ± 0.4 、100ng群 69.4 ± 1.3 、 27.5 ± 1.1 、 3.1 ± 0.3 、 $1 \mu\text{g}$ 群 71.2 ± 1.4 、 26.4 ± 1.4 、 2.3 ± 0.8 、 $10 \mu\text{g/ml}$ 群 73.9 ± 1.6 、 22.9 ± 1.6 、 3.1 ± 0.9 であり100ng/ml以上の3群は有意にcontrol群よりG1期の細胞数の比率は増加し、S期の比率は減少していた($p<0.05$)。

4. cyclin D1 m-RNAの解析 cyclin D1 m-RNAは4.3kbに発現し、100ng、 $10 \mu\text{g/ml}$ ではcontrolに比し発現量は抑制されていた。

5. 肝転移増殖抑制試験 肝転移結節個数は、control群 5.7 ± 1.5 、1mg/kg群 3.0 ± 1.7 、5mg/kg群 1.3 ± 1.5 、10mg/kg群 1.0 ± 1.0 、100mg/kg群 1.0 ± 1.0 と、controlに比しTNP 5mg/kg以上の群では有意に肝転移結節個数は減少していた($p<0.05$)。

6. TNP、5-Fu併用試験 各群における肝転移結節個数は、control群 14.8 ± 6.9 、TNP群 6.3 ± 5.5 、5-Fu群 7.0 ± 3.2 、TNP+5-Fu群 5.0 ± 3.8 と、controlより他の3群の肝転移結節個数は有意に減少していた($p<0.05$)が、単独投与群と併用群間には有意差を認めなかった。

IV. 考 察

TNPがヒト臍帯静脈血管内皮細胞のcyclin D1の発現を抑制し、細胞周期をG1期で停止させ細胞分裂を抑制するとする報告があり、in vitroでの腫瘍細胞の増殖抑制の可能性と示唆している。今回の実験でもcolon-26は100ng/ml以上の濃度で有意に細胞増殖は抑制され、G1期の細胞の比率は増加、S期の比率は減少し、cyclin D1 m-RNAの発現量は抑制されていた。

TNPは5mg/kg以上の濃度では有意に肝転移の増殖を抑制し、5-Fuと同等の抗腫瘍効果を示し、原発巣切除後の微小肝転移巣に対する補助療法として期待できると考えられた。しかしTNPと5-Fuの併用効果はみられず、TNPによるcolon-26の増殖抑制がin vivoでも発現し、5-FuのDNA合成阻害作用が減弱したことが推察された。

V. 結 語

1. TNPはin vitroでは100ng/ml以上の濃度でcolon-26の増殖を有意に抑制した。この増殖抑制作用の機序の1つとして、TNPがG1期におけるcyclin D1の発現を抑制し、細胞周期をG1期からS期へ移行するのを阻害することが考えられた。

2. TNPはin vivoにおいても5mg/kg以上の濃度で有意に肝転移増殖を抑制したが、この効

果は5-Fuの併用では増強しなかった。TNPの大腸癌原発巣切除後の微小肝転移に対する補助療法としての有効性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 内 野 純 一

副 査 教 授 浅 香 正 博

副 査 教 授 玉 木 長 良

学 位 論 文 題 名

血管新生阻害剤 TNP-470 (AGM-1470) の colon-26 に 対する増殖抑制効果および肝転移抑制効果

血管新生阻害剤 TNP-470 (AGM-1470, 以下 TNP) は、その強力な血管内皮細胞の増殖抑制効果により血管新生を阻害するとされ、この抑制効果は細胞周期への影響によることが明らかにされている。一方、TNP はそれ自体腫瘍細胞にも増殖抑制効果を持ち、*in vitro* で各種癌細胞の増殖を抑制し、*in vivo* でも各種固形腫瘍の増殖抑制や転移抑制効果を持つことが報告されている。しかし、大腸癌細胞に関する TNP の抑制効果や、臨床問題となる肝転移巣に対する基礎的報告はきわめて少なく、今回申請者は colon-26 を用いて TNP の *in vitro* での増殖抑制効果、細胞周期への影響、*in vivo* での肝転移抑制効果について検討した。

in vitro での実験結果として、TNP は 100 ng/ml 以上の濃度で有意に colon-26 の増殖を抑制し、TNP により走査電子顕微鏡所見としては著明な microvilli、microtubules の減少が観察された。細胞周期の解析は、TNP により G1 期の細胞数の比率は増加し、S 期の比率は減少し、cyclin D1 mRNA の発現量は抑制されていた。TNP の *in vitro* での colon-26 の増殖抑制効果の機序の 1 つとして、G1 期における cyclin D1 mRNA の発現を抑制し、G1 期から S 期への移行を阻害している可能性があることを示した。*in vivo* の実験結果として、TNP は 5 mg/kg 以上の濃度では有意に肝転移の増殖を抑制し、5-Fu と同等の抗腫瘍効果を認めたが TNP と 5-Fu の併用では、TNP、5-Fu 単独に比し抗腫瘍効果の増強はみられなかった。TNP は大腸癌原発巣切除後の微小肝転移に対する補助療法として有効であることを示した。

審査に当たって、浅香教授から TNP による腫瘍内血管数の変化と過去の文献的報告例、FGF 等血管新生因子と TNP との関連、colon-26 の p53 異常、TNP が cell cycle に影響を及ぼす機序と cyclin D1 以外の因子の可能性、TNP と 5-Fu とに相乗効果がみられない理由の質疑があった。これに対し申請者は、文献的には TNP による腫瘍内血管の減少の報告はあるが、今回は、HE 染色、第 8 因子染色では TNP による colon-26 肝転移巣内の腫瘍血管の減少はみられなかったこと、bFGF 産生性の腫瘍ではより TNP の抗腫瘍効果が観察されたとの報告があること、マウス wild type p53 によるノーザンブロットの解析ではバンドが 2 つ観察され、colon-26 の polyclonal な性質による 2 種類の異常の可能性があること、TNP が cyclin D1 に影響を及ぼす機序や cyclin D1 以外の因子の存在は現在不明であること、TNP と 5-Fu の併用効果がみられない理由として、TNP による colon-26 の増殖抑制効果が *in vivo* でも発現し 5-Fu の DNA 合成阻害作用が減弱したと推察されることが述べられた。

玉木教授より、TNP の血管新生阻害による血流の低下を画像的に評価する方法と過去の文献的報告例、今回の *in vivo* での肝転移増殖抑制効果の主因、TNP の肝重量の変化と肝毒

性等の副作用、TNPと5-Fuのin vitroでの増殖抑制効果の比較について質疑があった。これに対しTNPは腫瘍内の微小血管の新生を阻害していると考えられ、画像的に評価するのは困難であり、文献的報告もないこと、肝転移増殖抑制効果の因子として血管新生阻害作用と直接の抗腫瘍効果の2つが考えられるがどちらが主因であるかは判断できないこと、今回の実験ではTNPにより肝重量は腫瘍が小さいため差がなかったこと、正常肝の病理組織学的変化はみられなかったこと、副作用は高濃度では体重減少が報告されているが今回は変化がなかったこと、in vitroのTNPの作用は増殖抑制であり殺細胞効果ではなく細胞数は減少しないのに対し5-Fuでは細胞数が減少することを回答した。

内野教授より臨床上肝転移はhypovascularである肝転移モデルにTNPを用いた理由について質疑があり、肝転移は画像上はhypovascularであるが画像上捕らえられない微小な腫瘍血管が存在していると考えられるためTNPの微小血管新生阻害作用を期待して使用したことを回答した。

TNPによるin vitroでのcolon-26に対する増殖抑制効果とその1因にcyclin D1を介した細胞周期への影響の関与を示唆したこと、TNPが大腸癌切除後の微小肝転移巣に対する補助療法としての有用性を示唆した点で意義がある。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、また研究者として誠実かつ熱心であることから、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。