

学位論文題名

癌細胞に対する IgG-Fc-mitomycinC 結合体の効果

学位論文内容の要旨

緒言

免疫グロブリンIgGは腫瘍組織に集積することが知られており、これは腫瘍細胞や腫瘍間質細胞に存在するFcレセプター(以下FcR)にIgGが結合するためと考えられている。ヒト血清由来のIgGを臨床に用いることは、その供給に限界があり、感染症治療の場合Fc部分が廃棄されていること、さらには遺伝子工学的にFc部分については人工的に生産しうる可能性があることなどから、ヒトIgGのFc部分(以下Fc)に注目し、これをMitomycinC(以下MMC)に結合させたFc-MMCを作製し、その抗腫瘍効果について検討した。

研究方法

1. Fc-MMC結合体の作製法: ヒト血清由来のIgGをパブリン処理後、抗Fc抗体カラム法を用いてFcを採集した。FcとMMCに水溶性カルボジイミドを加えて反応させ、Fc-MMC結合体を得た。Fc-MMCのMMC結合モル比は1:3であった。

2. 癌細胞: *in vitro*実験には、マウス大腸癌細胞Colon26、ヒト肝癌細胞HLE、およびヒト胃癌細胞MKN28、MKN74を用いた。*in vivo*実験にはColon26と、FcRの存在が既に知られているマウス白血病細胞P388を実験に供した。

3. Fc結合試験: Na 125 I溶液(1mCi)とFc溶液を反応させ 125 I標識Fc(1×10^6 cpm)を得た。4種の癌細胞を24時間培養後 125 I-Fcを加え、10分、20分、30分、60分接触後、ガンマーカウンターで放射活性を測定した。さらに、非標識Fcを30分接触させた後、 125 I-Fcを30分接触させ同様に放射活性を測定した。

4. 培養癌細胞に対する増殖抑制試験: 4種の癌細胞を24時間培養後 $1 \mu\text{g/ml}$ のMMCおよびMMC換算で同等量のFc-MMC(以下Fc-MMC量はMMC換算量)を含む培養液を加え、10分、30分、60分接触させた。次いで薬剤を含まない培養液を加え48時間培養した。0.4%クリスタルバイオレットで染色後、試験波長540nm、参考波長630nmの吸光度(OD)をPlate Analyserを用いて測定し、次式により抑制率を求めた。

$$\text{抑制率} = (1 - \text{薬剤添加群の吸光度} / \text{薬剤非添加群の吸光度}) \times 100 (\%)$$

さらにFc-MMC抑制率/MMC抑制率を求め増殖抑制効果を検討した。次に同様に培養後MMC、Fc-MMC、Fcを含む培養液を加え、72時間接触させた。MMC濃度を 1×10^{-4} 、 1×10^{-3} 、 1×10^{-2} 、 1×10^{-1} 、1、 $1 \times 10 \mu\text{g/ml}$ とし、FcはFc-MMCと同量とした。同様に抑制率を求め、dose-response curveより IC_{50} を求め検討した。

6. マウス移植腫瘍に対する抗腫瘍効果

1) 雄5週齢のBALB/cマウスの皮下にColon26を 1×10^6 個移植し、無処置対照群、MMC群、Fc-MMC群とした($n=6$)。腫瘍移植後1日と5日目にMMCおよびFc-MMCを2.5mg/Kgを腹腔内に投与し、移植後20日間腫瘍径を測定し検討した。腫瘍の大きさは長径 \times 短径(mm^2)で表現した。

2) 雌6週齢のCDF₁マウスの腹腔内にP388を 1×10^6 個移植し、同様に3群に分け実験に供した。

腫瘍移植後1日と5日目にMMCおよびFc-MMCを1.25mg/Kgおよび2.5mg/Kgを腹腔内に投与した。移植後40日間観察し、平均生存日数の比T/Cを求め検討した。さらにMMC2.5mg/Kg投与群では体重の変化についても検討した。

結 果

1. 培養癌細胞へのFcの結合：癌細胞いずれにも ^{125}I -Fcの結合が認められ、その結合量は時間とともに増加した。特にヒト癌細胞では10分から20分にかけてFc結合量が著しく増加し、60分でほぼ一定となった。 ^{125}I -Fcの結合は非標識Fcの前処置により阻止された。

2. 培養癌細胞に対する増殖抑制効果：ヒト癌細胞では、薬剤との接触時間が10分からFc-MMCの増殖抑制効果が有意に強く、30分接触ではMMCに比べ2倍以上の著しい増殖抑制効果を示した。72時間接触の増殖抑制効果では、MMCとFc-MMCはともに濃度依存的な増殖抑制効果を認めしたが、 IC_{50} に差を認めなかった。

3. マウス移植腫瘍に対する抗腫瘍効果

1) Colon26腹腔内移植マウス：腫瘍の大きさは20日目ではMMC投与群は $1900.0 \pm 476.2 \text{mm}^2$ 、Fc-MMC投与群が $1448.1 \pm 262.9 \text{mm}^2$ と無処置群 $2725.5 \pm 273.8 \text{mm}^2$ に比べ有意に小さかったが、MMCとFc-MMC投与群に差は認められなかった。

2) P388腹腔内移植マウス：MMC1.25mg/Kg投与群では、T/CはMMC投与群が1.683、Fc-MMC投与群では3.250と平均生存日数が有意に延長した。MMC2.5mg/Kg投与群では、T/CはMMC投与群が2.672、Fc-MMC投与群が3.409であった。MMC投与群では腫瘍移植後6日までFc-MMC群に比べ有意に体重減少が認められた。

考 案

抗癌剤を腫瘍に集めるcarrierとしてFcに注目した。培養癌細胞に ^{125}I -Fcが結合することが確認され、また非標識Fcを反応させることにより ^{125}I -Fcの結合が阻止されたことから、細胞へのFcの結合はFcRを介したものと考えられた。ヒト癌細胞に結合するFcの量は時間とともに放物線状に増加し、30分での結合量は60分結合量の90%以上になることから、Fcのdrug carrierとしての有用性が推測された。MMCの抗腫瘍効果は濃度依存性とされているが、Fc-MMCは薬剤との10分接触においてMMCよりも有意に増殖抑制効果を示し、30分接触ではMMC抑制率の2倍以上の著しい増殖抑制効果を認めた。これはMMCが短い時間では十分に細胞内に取り込まれないのに対して、Fc-MMCでは細胞のFcRを介して短い時間で結合することにより、MMC単体より多くのMMCが細胞に取り込まれた結果と考えられた。

Colon26マウス皮下移植モデルでは、MMC、Fc-MMCの腹腔内投与により腫瘍の大きさはFc-MMC投与群の方がMMC投与群よりも腫瘍増殖が遅い傾向が認められた。P388のマウス腹腔内移植モデルでは、Fc-MMC1.25mg/Kg投与群ではMMC投与群よりも有意に平均生存日数が延長した。Fc-MMC投与群ではFcRを介して、Fc-MMCが短い時間で結合し細胞内に取り込まれることから、癌細胞中のMMC濃度が保たれたことがMMC単体よりも優れた抗腫瘍効果を示したと考えられた。MMCは投与量を増量することにより抗腫瘍効果を高めることが可能であるが、同時に副作用も増大する。本研究でもMMC1.25mg/Kg投与群よりも2.5mg/Kg投与群の平均生存日数が延長したが、MMC2.5mg/Kg投与群では腫瘍移植後6日目までにMMCの副作用と考えられた体重減少が認められた。この結果は正常細胞と癌細胞のMMCの取り込みには差が無いために副作用が発現したが、Fc-MMCではFcRを介して癌細胞やFcRを有する正常細胞に結合するが、細胞内へのFc-MMCの取り込みに差があることにより副作用の発現が抑えられたと考えられた。

本研究によりFc-MMCはMMC単独より抗腫瘍効果が優れていることが判明し、Fc-MMCの臨床応用の可能性が示されたが、今後さらに生体内での動態、腫瘍組織への選択的集積性、毒性試験のほかFcRを有する正常細胞への影響についても検討が必要である。

ま と め

- 1) Radio Immuno Assay法で、培養癌細胞にFcがFcRを介して結合することを確認した。
- 2) Fcは30分でも十分癌細胞に結合しており、Fc-MMCは30分の接触でMMCよりも強い増殖抑制効果を認めた。
- 3) マウス移植腫瘍においてFc-MMCは、MMCよりも腫瘍増殖抑制および平均生存日数延長の効果を認めた。
- 4) Fc-MMCはMMCの抗腫瘍効果を増大することが確認された。

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 西 信 三

学 位 論 文 題 名

癌細胞に対する IgG-Fc-mitomycinC 結合体の効果

免疫グロブリンIgGは腫瘍組織に集積することが知られており、これは腫瘍細胞や腫瘍間質細胞に存在するFcレセプター（以下FcR）にIgGが結合するためとされている。著者は抗癌剤を腫瘍に集めるcarrierとしてIgGのFc部分（以下Fc）に注目し、ヒトIgGのFcにmitomycinC（以下MMC）を結合させたFc-MMCを作製し、抗腫瘍効果について検索した。

in vitro実験として、マウス大腸癌細胞Colon26、ヒト肝癌細胞HLE、およびヒト胃癌細胞MKN28、MKN74を用い、in vivo実験にはColon26とFcRの存在が既に知られているマウス白血病細胞P388を用いた。in vitro実験では作製した¹²⁵I標識Fcを4種の癌細胞にそれぞれ10分、20分、30分、60分接触させ、放射活性を測定した。さらに、非標識Fcを30分接触させた後、¹²⁵I-Fcを30分接触させ同様に放射活性を測定した。次に、癌細胞に1μg/mlのMMCおよびMMC換算で同等量のFc-MMC（以下Fc-MMC量はMMC換算量）と、10分、30分、60分接触させた。さらに薬剤を含まない培養液を加え48時間培養した。0.4%クリスタルバイオレットで染色後、試験波長540nmの吸光度を測定し、抑制率（(1-薬剤添加群の吸光度/薬剤非添加群の吸光度)×100%）を求めFc-MMC抑制率/MMC抑制率から増殖抑制効果を検討した。次に、MMC、Fc-MMC、Fcを含む培養液を加え72時間接触させた。MMC濃度を 1×10^{-4} 、 1×10^{-3} 、 1×10^{-2} 、 1×10^{-1} 、1.10 μg/mlとし、FcはFc-MMCと同量とした。抑制率からdose-response curveを求めIC₅₀から増殖抑制効果を検討した。in vivo実験は雄5週齢のBALB/cマウスの皮下にColon26を 1×10^6 個移植し、無処置対照群、MMC群、Fc-MMC群とした(n=6)。腫瘍移植後1日と5日目にMMCおよびFc-MMCを2.5mg/Kgを腹腔内に投与し、移植後20日間腫瘍径を測定し、体積（ $1/2 \times (\text{長径}) \times (\text{短径})^2$ ）を求め検討した。さらに、雌6週齢のCDF₁マウスの腹腔内にP388を 1×10^6 個移植し、同様に3群に分け腫瘍移植後1日と5日目にMMCおよびFc-MMCを1.25 mg/Kgおよび2.5mg/Kgを腹腔内に投与した。移植後40日間観察し、平均生存日数の比T/Cを求め検討した。MMC2.5mg/Kg投与群では体重の変化についても検討した。

実験の結果は、in vitro実験では癌細胞いずれにも¹²⁵I-Fcの結合が認められ、その結合量は時間とともに増加し、60分ではほぼ一定となった。¹²⁵I-Fcの結合は非標識Fcの前処置により阻止された。ヒト癌細胞では、薬剤との接触時間が10分からFc-MMCの増殖抑制効果が

有意に強く、30分接触ではMMCに比べ2倍以上の著しい増殖抑制効果を示した。72時間接触の増殖抑制効果では、MMCとFc-MMCはともに濃度依存的な増殖抑制効果を認めたが、 IC_{50} に差は認めなかった。in vivo実験では腫瘍の体積は20日後ではMMC投与群は $1900.0 \pm 476.2 \text{ mm}^3$ 、Fc-MMC投与群が $1448.1 \pm 262.9 \text{ mm}^3$ と無処置群 $2725.5 \pm 273.8 \text{ mm}^3$ に比べ有意に小さかったが、MMCとFc-MMC投与群に差は認められなかった。平均生存日数の比はMMC1.25mg/Kg投与では、T/CはMMC投与群が1.683、Fc-MMC投与群では3.250と平均生存日数が有意に延長した。MMC2.5mg/Kg投与では、T/CはMMC投与群が2.672、Fc-MMC投与群が3.409であった。MMC投与群では腫瘍移植後6日目までFc-MMC群に比べ有意に体重減少が認められた。

以上より培養癌細胞に ^{125}I -Fcが結合することが確認され、非標識Fcを反応させることにより ^{125}I -Fcの結合が阻止されたことから、細胞へのFcの結合はFcRを介したものと考えられた。ヒト癌細胞に結合するFcの量は、30分では60分結合量の90%以上になることより、Fcのdrug carrierとしての有用性がうかがえた。増殖抑制効果では、Fc-MMCは10分接触からMMCよりも有意に強く、30分接触ではMMC抑制率の2倍以上の著しい増殖抑制効果を認めた。これはMMCが短い時間では十分に細胞内に取り込まれないのに対して、Fc-MMCでは細胞のFcRを介して短い時間で結合することにより、MMC単体より多くのMMCが細胞に取り込まれた結果と考えられた。P388のマウス腹腔内移植モデルでは、Fc-MMC1.25mg/Kg投与群ではMMC投与群よりも有意に平均生存日数が延長した。Fc-MMC投与群ではFcRを介して、Fc-MMCが短い時間で結合し細胞内に取り込まれることから、癌細胞中のMMC濃度が保たれたことがMMC単体よりも優れた抗腫瘍効果を示したと考えられた。MMC2.5mg/Kg投与群では腫瘍移植後6日目までにMMCの副作用と考えられた体重減少が認められた。MMCでは正常細胞と癌細胞への取り込みに差が無いために副作用が発現したが、Fc-MMCではFcRを介して癌細胞やFcRを有する正常細胞に結合するが、細胞内へのFc-MMCの取り込みに差があることにより副作用の発現が抑えられたと考えられた。

本研究により①培養癌細胞にFcがFcRを介して結合②Fc-MMCはヒト癌細胞との30分接触でMMCよりも強い増殖抑制効果③マウス移植腫瘍を用いた実験においてFc-MMCは、MMCよりも平均生存日数延長ならびに体重減少の程度が少ないという点が明らかになった。

審査に当たり、細川眞澄男教授よりIgGのFcに注目した理由についての質問があった。また西信三教授よりFc-MMC投与による生体内正常IgGとの関係についての質問があった。いずれの質問に対しても、申請者はFcの癌細胞への結合性と遺伝子工学的に人工生産する可能性や、IgGの生体内や細胞での動態、癌特異抗体とIgGの違いなどを本研究や文献を引用し、豊富な知識に基づいて明解に回答した。

以上、本研究によりFc-MMCの抗腫瘍効果はMMCより優れていることが判明し、Fc-MMCの臨床応用の可能性が示されたので今後さらに、生体内動態、選択的集積性、毒性試験、正常細胞への影響について検討されることが期待される。

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り、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。