

学 位 論 文 題 名

ネオカルチノスタチン誘導体（ZSS）の抗腫瘍免疫誘導の機序に関する研究

学位論文内容の要旨

ネオカルチノスタチン（NCS）の誘導体ジノスタチン スチマラマー（ZSS）および親化合物 NCS は強い抗腫瘍作用を有し、それらの抗腫瘍活性は DNA の断片化および DNA 合成阻害作用に基づく殺細胞作用によることが知られている。ZSS は NCS 1 分子にスチレンマレイン酸交互共重合体（SMA）2 分子を結合した高分子抗腫瘍剤である。本研究ではこれらの薬剤が抗腫瘍免疫を活性化する作用を持つ可能性について検討した。

Balb/c マウスに ZSS あるいは NCS の有効治療量を静脈内投与し、1 日から 4 週間後に線維肉腫、Meth A を皮下移植したところ、腫瘍の増殖が抑制され高い頻度で腫瘍が治癒した。ZSS あるいは NCS の前投与は、Meth A 以外の腫瘍（Colon 26 および Sarcoma 180）の増殖をも抑制した。NCS は蛋白部分（アポプロテイン）と非蛋白性の UV 吸収を持つ物質クロモフォアから成っているが、生物活性（細胞障害活性）はクロモフォアにあることが立証されているので、クロモフォアを欠く ZSS（apo-ZSS）について抗腫瘍作用を観察した。その結果、apo-ZSS は腫瘍退縮を誘導せず、ZSS と NCS の前投与による抗腫瘍作用はクロモフォアの直接的な殺細胞活性によることが示唆された。一方、薬剤投与後組織中の薬剤残存が認められなくなった後に移植した腫瘍も退縮すること、また、移植した腫瘍は一過性に増殖した後退縮することが観察されたことから、これら薬剤の前投与による腫瘍の退縮は宿主の免疫系の関与によって起こることが示唆された。

次に、腫瘍退縮過程に関与する免疫系の細胞を検討した。ZSS または NCS を前投与した Balb/c ノードマウスでは Meth A の退縮は誘導されないことから、腫瘍退縮には T 細胞が関与することが示唆された。Meth A 退縮期の ZSS または NCS 前投与マウスの脾細胞を Meth A と混合して移植すると、Meth A の増殖は完全に阻止された。脾細胞を分離しエフェクター細胞を検索すると Thy1.2 陽性ナイロン非付着性の T 細胞であった。この T 細胞には *in vitro* で Meth A 細胞に対する細胞溶解活性は認められなかった。腫瘍退縮開始前のマウスの脾臓では T 細胞の割合が一過性に上昇し、逆に B 細胞およびマクロファージの割合が減少した。リンパ節においても同様に B 細胞の減少が認め

られた。腫瘍退縮期にはこのような細胞組成の変化は認められず、また ZSS 及び NCS 前投与の効果が長期間継続することから、これらの薬剤は腫瘍退縮に關与する免疫細胞の前駆細胞に影響を与える可能性が示された。腫瘍組織内には退縮が始まる前から腫瘍細胞死がみられ、細胞死の領域は時間の経過と共に著しく拡大した。しかし、腫瘍組織内への浸潤細胞は極めて少なく、腫瘍細胞死はサイトカイン等の因子によって起こる可能性が考えられた。抗体またはカラゲナンの投与により免疫細胞を除去したマウスを用いて検討した結果、ZSS と腫瘍移植によりまず Thy1.2 陽性 Lyt2.2(CD8)陽性 asialo GM1 陰性の T 細胞が活性化され、その後に抗腫瘍活性を有する Thy1.2 陽性 Lyt2.2 陽性 asialo GM1 陽性の T 細胞が出現して腫瘍を退縮する事が明かとなった。また、L3T4(CD4)陽性 T 細胞は単独では抗腫瘍活性を示さなかったが、Lyt2.2 陽性 T 細胞の抗腫瘍作用を増強した。

最後に、ZSS の後投与で抗腫瘍免疫が誘導される可能性を検討した。腫瘍移植後に ZSS を投与したところ抗腫瘍効果がみられ、このような効果はその後投与された抗 Thy1.2 抗体により部分的に抑制された。これらのことから、後投与の場合の主作用は ZSS の細胞傷害活性によると考えられるが、抗腫瘍性 T 細胞の活性化もこの場合の ZSS の抗腫瘍作用の一部を担うことが明らかとなった。

本研究から、ZSS 及び NCS が宿主の抗腫瘍免疫を活性化することが示された。抗腫瘍免疫はこれら薬剤の有効治療量で誘導され、かつ後投与でも活性化された。以上のことは、これらの薬剤は臨床に応用した場合も直接的な殺細胞活性と抗腫瘍免疫の活性化により抗腫瘍作用を発揮する可能性を示している。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 沼 操
副 査 教 授 板 倉 智 敏
副 査 教 授 中 里 幸 和
副 査 教 授 斉 藤 昌 之

学位論文題名

ネオカルチノスタチン誘導体 (ZSS) の抗腫瘍免疫誘導の機序に関する研究

ネオカルチノスタチン (NCS) の誘導体ジノスタチン スチマラマー (ZSS) および親化合物 NCS は強い抗腫瘍作用を有し、それらの抗腫瘍活性は DNA の断片化および DNA 合成阻害作用に基づく殺細胞作用によることが知られている。本研究ではこれらの薬剤が抗腫瘍免疫を活性化する作用を持つ可能性について検討した。

Balb/c マウスに ZSS あるいは NCS の有効治療量を静脈内投与し、1 日から 4 週間後に線維肉腫、Meth A を皮下移植したところ、腫瘍の増殖が抑制され高い頻度で腫瘍が治癒した。ZSS あるいは NCS の前投与は、Meth A 以外の腫瘍 (Colon 26 および Sarcoma180) の増殖をも抑制した。ZSS と NCS の前投与による抗腫瘍作用はクロモフォアの直接的な殺細胞活性によることが示唆された。一方、薬剤投与後組織中の薬剤残存が認められなくなった後に移植した腫瘍も退縮すること、また、移植した腫瘍は一過性に増殖した後退縮することが観察されたことから、これら薬剤の前投与による腫瘍の退縮は宿主の免疫系の関与によって起こることが示唆された。

次に、腫瘍退縮過程に関与する免疫系の細胞を検討した。ZSS または NCS を前投与した Balb/c ヌードマウスでは Meth A の退縮は誘導されないことから、腫瘍退縮には T 細胞が関与することが示唆された。Meth A 退縮期の ZSS または NCS 前投与マウスの脾細胞を Meth A と混合して移植すると、Meth A の増殖は完全に阻止された。脾細胞を分離しエフェクター細胞を検索すると Thy1.2 陽性ナイロン非附着性の T 細胞であった。この T 細胞には *in vitro* で Meth A 細胞に対する細胞溶解活性は認められなかった。また、腫瘍組織内には退縮が始まる前から腫瘍細胞死がみられ、細胞死の領域は時間の経過と共に著しく拡大した。しかし、腫瘍組織内への浸潤細胞は極めて少なく、腫瘍細胞死はサイトカイン等の因子によって起こる可能性が考えられた。抗体またはカラゲナンの投与により免疫細胞を除去したマウスを用いて検討した結果、ZSS と腫瘍移植によりまず Thy1.2 陽性 Lyt2.2 (CD8) 陽性 asialo GM1 陰性の T 細胞が活性化され、その後に抗腫瘍活性を有する Thy1.2 陽性 Lyt2.2 陽性 asialo GM1 陽性の T 細胞が出現して腫瘍を退縮する事が明らかとなった。また、L3T4 (CD4) 陽性 T 細胞は単独では抗腫瘍活性を示さなかったが、Lyt2.2 陽性 T 細胞の抗腫瘍作用を増強した。

最後に、ZSS の後投与で抗腫瘍免疫が誘導される可能性を検討した。腫瘍移植後に ZSS を投与したところ抗腫瘍効果がみられ、このような効果はその後投与された抗 Thy1.2 抗体により部分的に抑制された。これらのことから、後投与の場合の主作用は ZSS の細胞傷害活性によると考えられるが、抗腫瘍性 T 細胞の活性化も ZSS の抗腫瘍作用の一部を担うことが明らかとなった。

本研究により、ZSS 及び NCS が宿主の抗腫瘍免疫を活性化することが示された。抗腫瘍免疫はこれら薬剤の有効治療量で誘導され、かつ後投与でも活性化され、臨床応用可能なことを示している。よって審査員一同は、増田悦子氏が博士 (獣医学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。