

博士（歯学） 松下和裕

学位論文題名

ONo-4007 induces specific anti-tumor
immunity mediated by TNF- α

(ONo-4007での TNF- α 初期発動による抗腫瘍特異免疫の誘導)

学位論文内容の要旨

【目的】

Lipid A は、グラム陰性菌の細胞壁構成成分である Lipopolysaccharide (LPS) の活性部位であり、生体の免疫能を増強させる。しかし、Lipid A は発熱、肝障害、エンドトキシンショックなどの副作用が強く、臨床応用は困難とされてきた。そこで、これを臨床的に応用可能とするため、副作用を減弱した Lipid A 誘導体が開発されてきている。これまでに、この誘導体の 1 つである ONo-4007 がラット肝細胞癌に有効であり、その機序として腫瘍組織に局所選択的に産生される TNF- α が関与していることが報告されている。今回、他の腫瘍に対する ONo-4007 の治療効果の検討と機序の解析、ならびに治癒ラットにおける抗腫瘍特異的免疫応答の誘導について検討した。

【材料と方法】

1. 動物および細胞

動物には Wistar King Aptekman/Hok (WKAH) ラット（雌、8~12 週齢）を用いた。細胞は、3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzen 誘発 WKAH ラット可移植性肝細胞癌 KDH-8 (*in vivo* 繼代株) 、このサブクローン cKDH-8/11 (*in vitro* 繼代株) 、methylcholanthrene 誘発 WKAH ラット可移植性線維肉腫 KMT-17 (*in vivo* 繼代株) 、このサブクローン A-3 (*in vitro* 繼代株) 、および 1-ethyl-1-nitrosourea 誘発 WKAH ラット可移植性神経膠芽腫 KEG-1 (*in vitro* 繼代株) を用いた。

2. 薬品

小野薬品工業より享受した Lipid A 誘導体 ONo-4007 を用いた。

3. 治療方法

各腫瘍細胞 (1×10^5 個) を同系 WKAH ラットの右背部皮下に移植し、ONo-

4007 (3.0mg/kg) あるいはコントロールとしてリン酸緩衝生理食塩水(PBS)を、腫瘍移植後5~7日目より5~7日間隔で、3~5回静脈内投与した。

4. 家兎抗 TNF- α 抗体作製と投与

リコンビナントラット TNF- α (Pepro Tech Inc) と Freund Complete Adjuvant (DIFCO) との w/o 型エマルジョンを家兎へ免疫し、39日後に血清を採取した。この血清を硫酸ナトリウムを用いた塩析により粗精製し、更に濃縮と透析を行った。得られた抗体濃度は 152 mg protein/ml で、1 ml当たり 2 mg のリコンビナントラット TNF- α を中和可能であった。本抗体の静脈内への投与は約 6 mg protein/rat を ONO-4007 投与の 30 分前に行った。

5. 腫瘍組織ホモジネート作製

KDH-8 細胞 (1×10^5 個) を皮下移植後、7、14、21、28日目にONO-4007 を投与、あるいは家兎抗 TNF- α 抗体を併用投与し、最終投与 90 分後に犠牲死させて腫瘍組織を摘出し、腫瘍 100 mg当たり 1 ml の RPMI-1640 (10% FBS) でホモゲナイズしてホモジネートを作製した。

6. 腫瘍組織内サイトカイン測定

組織ホモジネート中の TNF- α 、IL-1 β 、IFN- γ 量を ELISA (BioSource International) にて測定した。

7. 腫瘍細胞による免疫

KDH-8 細胞 (1×10^7 個) をマイトイシン C (50 μ g/ml、協和発酵) で 1 時間処理し、0、7、14 日目の計 3 回 1×10^6 個を皮下に接種し同系ラットを免疫した。

8. 脾細胞の調製

KDH-8 治癒および正常ラットの脾臓を無菌的に摘出し、ルーズフィットイングガラスホモゲナイザーとステンレスメッシュを用いて脾細胞浮遊液を調製し、Tris-NH₄Cl 緩衝液で赤血球を溶血させた。

9. Winn assay (*in vivo* 腫瘍中和活性測定試験)

正常ラットに ^{60}Co (300 rad) を前日に照射し、脾細胞と腫瘍細胞を混合移植した。腫瘍中和活性は腫瘍細胞単独移植の腫瘍増殖と比較し、抑制率で判定した。

10. 脾細胞の分離、収集

脾細胞から抗体、補体を用いた negative selection により CD4 陽性細胞画分、

CD8 陽性細胞画分、マクロファージ細胞画分を調製した。

【結果】

1. ONO-4007 の肝細胞癌 (KDH-8) に対する治療効果

KDH-8 細胞担癌ラットは、PBS 投与群では全例が腫瘍死するのに対し、ONO-4007 治療群では腫瘍直径が 20mm に達した 2 週目ころより退縮し始め、19 匹中 13 匹が完全治癒した。同様の実験を 5 回繰り返し、合計で 109 匹中 59 匹 (54.1%) が完全治癒した。また、腫瘍死したラットの平均生存日数は、ONO-4007 治療群では 53.8 ± 9.7 日、PBS 投与群では 47.7 ± 6.7 日と、治療群では生存期間が有意 ($p < 0.01$) に延長した。

2. ONO-4007 の他の腫瘍に対する治療効果

cKDH-8/11、KMT-17、KEG-1 細胞 1×10^5 個を皮下移植し、担癌ラットを ONO-4007 で治療したが全例腫瘍死し、生存日数の延長も見られなかった。

3. ONO-4007 治療効果と *in vitro* TNF- α 感受性との相関

上記 4 系の腫瘍細胞の TNF- α 感受性を測定した。その結果、治療効果がみられた KDH-8 細胞にのみ感受性があり、TNF- α への感受性が治療効果を左右する因子であると推定された。そこで、腫瘍局所に產生される TNF- α の治療効果への関与を確認するため、家兎抗 TNF- α 抗体と ONO-4007 を併用投与し治療効果への影響を確認した。抗体併用投与により、KDH-8 腫瘍中の TNF- α 量が有意に低下するとともに、ラットはすべて腫瘍死し治療効果は消失した。

4. 治癒ラットの抗腫瘍移植抵抗性獲得

ONO-4007 治療による治癒ラットは KDH-8 細胞に対する強い移植抵抗性を獲得していた。すなわち、これらラットは最小移植数の 100 倍以上の KDH-8 細胞を再移植しても腫瘍形成は見られなかった。さらに TNF- α 非感受性で ONO-4007 治療に抵抗性を示した cKDH-8/11 亜株に対しても強い移植抵抗性を示した。

5. 治癒ラット脾細胞の抗腫瘍免疫応答性

治癒ラットの脾細胞は KDH-8 細胞に対してのみ腫瘍細胞中和活性を示し、その特異的免疫応答は CD4 陽性細胞画分が担っていた。

【考察】

ONO-4007 は TNF- α 感受性である KDH-8 担癌ラットに対して強い治療効果を示し、54.1% が完全治癒した。また、家兎抗 TNF- α 抗体併用投与により治療効果は完全に消失した。このことは、ONO-4007 治療効果の初期発動において、腫

瘍組織局所に産生される TNF- α が必要不可欠な因子であることを示している。さらに、完全治癒ラットには同型腫瘍 (KDH-8 および cKDH-8/11) に対する強い移植抵抗性が誘導され、しかも脾細胞には KDH-8 細胞特異的中和活性が認められたことから、TNF- α は直接腫瘍細胞を傷害することによって、腫瘍特異的免疫応答を誘導している可能性が推察された。なお、上記脾細胞の抗腫瘍中和活性が CD 8 陽性細胞画分には認められず、CD4 陽性細胞画分に認められたことの意味については今後検討する予定である。

学位論文審査の要旨

主査教授 戸塚 靖則
副査教授 福田 博
副査教授 松本 章
副査教授 細川 真澄男

学位論文題名

ONo-4007 induces specific anti-tumor immunity mediated by TNF- α

(ONo-4007での TNF- α 初期発動による抗腫瘍特異免疫の誘導)

審査は、審査員全員出席の下に、申請者に対して提出論文とそれに関連した科目について口頭試問により行われた。審査論文の概要は、以下の通りである。

グラム陰性菌の細胞壁構成成分の活性部位 (Lipid A) からの誘導体であるONo-4007は、ラット肝細胞癌の治療に有効であり、その機序として腫瘍組織に局所選択的に産生されるTNF- α の関与が報告されているが、その詳細は不明である。本研究は、腫瘍に対するONo-4007の治療効果の検討とその機序の解析、ならびに治癒ラットにおける抗腫瘍特異的免疫応答の誘導について検討したものである。

動物は8~12週齢の雌 WKAHラットを使用し、腫瘍細胞は、3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzen誘発ラット肝細胞癌KDH-8、そのサブクローンcKDH-8/11、methylcholanthrene誘発ラット線維肉腫KMT-17、そのサブクローンA-3、及び1-ethyl-1-nitrosourea誘発ラット神経膠芽腫KEG-1を用いた。

ラットの右背部皮下に各腫瘍細胞 (1×10^5 個)を移植し、5~7日目後より5~7日間隔で、ONo-4007 (3.0 mg/kg) ないしリン酸緩衝生理食塩水(PBS:コントロール)を、計3~5回静脈内投与し、ONo-4007の腫瘍に対する治療効果を検討した。結果は、KDH-8担癌ラットでは、PBS投与全例が腫瘍死したのに対し、治療群は腫瘍径が20mmに達した2週目ころより退縮し始め、109匹中59匹 (54.1%) が完全治癒した。また、腫瘍死したラットの平均生存日数も治療群で有意に延長していた。一方、cKDH-8/11、KMT-17、KEG-1担癌ラットにおいては、ONo-4007の治療効果は認められず、全例が腫瘍死し、生存日数の延長もみられなかった。

ONo-4007の治療効果と腫瘍細胞のTNF- α 感受性との関連を明らかにするため、各腫瘍細胞のTNF- α 感受性を測定した。結果は、治療効果がみられたKDH-8にのみ感受性がみられた。さらに、リコンビナントラットTNF- α を用いて作成した家兎抗TNF- α 抗体をONo-4007と併用して投与したところ、KDH-8腫瘍組織中のTNF- α 量が約1/10に低下するとともに、ラットは全例が腫瘍死し、腫瘍局所で產生されるTNF- α がONo-4007の治療効果の発現に不可欠な因子であることが確認された。ただし、KDH-8のTNF- α 感受性は比較的高濃度のTNF- α を用いた場合でも約20%に留まっており、ONo-4007による治療効果はTNF- α の直接作用のみではないことが示唆された。なお、抗TNF- α 抗体の投与は腫瘍組織中のIL-1 β 、IFN- γ 产生に特に影響を与えるなかった。

そこで、ONO-4007治療による治癒ラットにKDH-8 (1×10^5 個～ 1×10^7 個) 、cKDH-8/11 (1×10^5 個) 、KEG-1 (1×10^5 個) を移植し、抗腫瘍移植抵抗性の有無を検討した。その結果は、治癒ラットはKDH-8に対してのみならず、TNF- α 非感受性でONO-4007治療に反応しなかったcKDH-8/11に対しても強い移植抵抗性を示し、治癒ラットにはKDH-8とcKDH-8/11に対して特異的免疫が成立していることが明らかとなつた。

Winn assayにおいても、治癒ラットの脾細胞はKDH-8とcKDH-8/11に中和活性を示すことが確認された。最後に、この中和活性が脾細胞中のいずれの細胞によるものかを明らかにするため、脾細胞成分をCD4陽性細胞画分、CD8陽性細胞画分、マクロファージ細胞画分に調製し、KDH-8細胞を用いて、Winn assayを行つた。その結果、中和活性は脾細胞のCD4陽性細胞画分に存在することが確認され、KDH-8とcKDH-8/11に対する特異的免疫応答はCD4陽性細胞画分が担つてゐることが明らかとなつた。

論文の審査にあたつて、論文申請者による研究の要旨の説明後、本研究ならびに関連する研究について、主査および副査より質問が行われた。いずれの質問についても、論文申請者から明快な回答が得られ、また将来の研究の方向性についても具体的に示された。本研究は、ONO-4007による治療効果の発現にはTNF- α が必要不可欠であるが、その治療効果はTNF- α の直接作用のみによるものではなく、TNF- α が直接腫瘍細胞を傷害することによって誘導された腫瘍特異的免疫が重要な役割を果たしていること、さらにこの特異的免疫応答は脾細胞成分中のCD4陽性細胞画分が担つてゐることを明らかにしたことが高く評価された。本研究の業績は、口腔外科の分野はもとより、関連領域にも寄与するところ大であり、博士(歯学)の学位授与に値するものと認められた。