

学位論文題名

TNP-470 Antiangiogenic Therapy for  
Advanced Murine Neuroblastoma

(血管新生阻害剤 TNP-470 を用いたマウス進行神経芽腫の治療)

学位論文内容の要旨

I 目的

血管新生は悪性腫瘍の増殖、転移に重要な役割を果たしており、血管新生阻害剤による腫瘍進展の抑制が悪性腫瘍に対する新たな治療法として期待されている。なかでも合成血管新生阻害剤である TNP-470 は強い腫瘍血管増生抑制作用を持ち、マウスのメラノーマ、ヒトの乳ガン他で増殖抑制効果が報告され、乳ガンに対する臨床試験も始められている。

小児固形腫瘍としてもっとも頻度の高い神経芽腫は比較的血流の豊富な腫瘍であり血管新生阻害による抗腫瘍効果が期待される。ヒト神経芽腫の実験モデルとして確立されたマウス神経芽腫 C1300 でも血管新生が腫瘍増殖に重要な役割を果たしていると考えられ、腫瘍血管をターゲットとした抗体治療が有効であったとの報告がされている。しかしながら血管新生阻害剤の効果に関する報告は現在まで認められず、その治療に関してはいまだ十分な検討はされていない。そこで、本研究ではマウス神経芽腫 C1300 およびそのより浸潤性、転移性の高い変異株である TBJ に対し血管新生阻害剤 TNP-470 の投与を行いその治療効果について検討した。

II 方法

動物実験には NIH より入手した 5-7 週令の雄性 A/J マウスを用いた。マウス神経芽腫 C1300 および TBJ は当研究室にて継代培養したものを用い、10%FCS 添加 RPMI1640 培地にて 37°C、5%CO<sub>2</sub> 下で培養した。

TNP-470 は TAP Pharmaceutical Inc. より提供を受けた。実験毎に TNP-470 の 10%エタノール溶液を前日に作成、実験直前に 0.9%生食にて 1:50 に希釈し使用した。

マウスは 1x10<sup>6</sup> 個の C1300 または TBJ 腫瘍細胞を右上腹部皮下に接種され、10 日後より隔日で計 6 回 30mg/kg の TNP-470 または生食を左下腹部に皮下投与された。マウス体重および皮下腫瘍体積 (体積 = 縦径 x 横径 x [縦径 + 横径 / 2] x 0.5236) は 8 日後より隔日で計測された。転移巣の検索を目的として腫瘍接種後 2-3 日目にマウスを犠牲死させ、原発巣、リンパ節、肝、腎、脾、副腎、肺、心の各臓器の重量を計測、また転移結節数を肉眼的、顕微鏡的に検討した。

2 群間の平均値の統計解析には unpaired t test または U test を用い、転移率の解析には Fisher's Exact test を用いた。生存率は Kaplan-Meier 法を用いて算出し、log rank test にて検定した。危険率 5%以下を有意と判定した。

### III 結果

1. TNP-470 は C1300 および TBJ 担癌マウスの原発巣の体積増加を有意に抑制した ( $p < 0.01$ )。
2. C1300 担癌マウスのリンパ節および肝転移を TNP-470 は抑制しなかった。
3. TBJ 担癌マウスのリンパ節および肝転移を TNP-470 は有意に抑制した ( $p = 0.021$ )。
4. TNP-470 は C1300 担癌マウスの平均生存期間および累積生存率を延長しなかった。
5. TNP-470 は TBJ 担癌マウスの平均生存期間および累積生存率を有意に延長した ( $p < 0.05$ )。
6. C1300 および TBJ 担癌マウスともに TNP-470 投与により脾重量の減少を認めた ( $p < 0.01$ )。

### IV 考案

神経芽腫は進行度により予後が大きく異なる。特に進行度の高いものはしばしば難治性であり治療に困難を来すことが少なくない。一方、このような症例では腫瘍血管も豊富なことが多く、TNP-470 による抗腫瘍効果が期待されうる。本研究でも TNP-470 による抗腫瘍効果は悪性度の高い TBJ 神経芽腫により強く認められた。TBJ 神経芽腫は C1300 神経芽腫より豊富な腫瘍血管を持つと示唆されており、この差により TNP-470 に対する感受性が異なる可能性が考えられる。TNP-470 はまた、ある種の腫瘍細胞に対しては直接の抑制効果を持つと考えられている。当研究室でも既にマウス神経芽腫に対する TNP-470 の In Vitro 抑制効果を報告しており、悪性度の高い TBJ 神経芽腫がより高い感受性を示した。しかしながらその濃度は血管内皮細胞増殖抑制濃度に比較し著明に高値であり、本研究で用いた通常投与量の TNP-470 では神経芽腫細胞増殖の直接抑制効果は少ないと考えられる。

本研究では TNP-470 によりマウス神経芽腫の腫瘍増殖抑制、転移抑制、延命効果が認められたが完全緩解は認められず、TNP-470 投与終了後 C1300 担癌マウスでは原発巣増大により、TBJ 担癌マウスでは広範な肝転移により腫瘍死した。TNP-470 の血管内皮細胞に対する抑制作用が cytotoxic と考えられることを考慮すると、TNP-470 単独療法では有効な治療法とはなり難い。相乗効果の期待される他の抗癌剤または血管新生阻害剤との併用療法で TNP-470 はより有効な治療効果をあげると考えられる。

通常投与量の TNP-470 には致死的な副作用は認められていない。マウスでは下痢と体重減少が投与量を規定する副作用とされているが、本研究ではそのいずれも認められず脾重量の有意な減少のみを認めた。マウスの脾機能に対する TNP-470 の作用に関しては、脾重量の減少から宿主の抗腫瘍免疫に対する影響を示唆する報告や脾細胞機能に対するなんらかの作用を示唆する報告がある一方で、TNP-470 が宿主の免疫系には影響しないとの報告もありその抗腫瘍効果と脾機能との関連については明らかではない。興味深いことに本研究では TBJ 担癌マウスにのみ脾重量の回復が認められ C1300 担癌マウスの脾重量は減少したままであった。C1300 担癌マウスは TBJ 担癌マウスに比較して免疫療法に対する感受性が非常に高く、またその免疫賦活には NK 活性が重要な役割を果たしており、この宿主免疫系における異なった反応により脾重量変化に差が認められた可能性がある。脾に対する TNP-470 の作用とその機序に関してはさらなる研究が必要と考えられる。

### V 結語

血管新生阻害剤 TNP-470 はマウス神経芽腫における原発腫瘍増殖を有意に抑制した。

悪性度の高い TBJ 担癌マウスに対し TNP-470 は遠隔転移を有意に抑制し、生存率を有意に延長した。

TNP-470 投与により脾重量は有意に減少した。

TNP-470 による進行神経芽腫治療の可能性が示唆された。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 藤 堂 省  
副 査 教 授 加 藤 紘 之  
副 査 教 授 細 川 真 澄 男

学 位 論 文 題 名

## TNP-470 Antiangiogenic Therapy for Advanced Murine Neuroblastoma

(血管新生阻害剤 TNP-470 を用いたマウス進行神経芽腫の治療)

進行神経芽腫に対する集学的治療の成績は極めて不良であり、より有効な治療法が求められている。一方、血管新生阻害剤 TNP-470 を用いた悪性腫瘍の治療が最近注目されており、腫瘍血管の発達した悪性腫瘍の治療として期待されている。申請者は進行神経芽腫が豊富な腫瘍血管を持つことに着目し「TNP-470 が進行神経芽腫治療の有効な手段となるのではないか」という仮説を検証した。実験は、マウス神経芽腫 C 1 3 0 0 およびより悪性度の高い T B J を担癌したマウスに TNP-470 を投与し、原発巣の体積変化、生存期間、主要臓器の転移率、体重、主要臓器の重量変化などの測定を行って、コントロールと比較した。その結果、TNP-470 はマウス神経芽腫の腫瘍増殖および遠隔転移を抑制し、その効果は悪性度の高い T B J 神経芽腫に強い傾向がみられた。TNP-470 は T B J 神経芽腫の生存期間を延長した。副作用として下痢、体重減少を認めなかったが、脾重量の減少を認めた。これらの実験事実は、進行神経芽腫の新たな治療法としての TNP-470 の有用性を示唆する。さらに、集学的治療の一環としての化学療法と併用による相乗効果も期待される。

審査にあたって、加藤教授から腫瘍の悪性度と血管新生阻害作用の関係、血管内皮細胞の検索の有無、薬剤投与期間と抗腫瘍効果との関連、化学療法との相互関係、脾への影響について質問があった。申請者は TNP 470 を用いた実験的治療に関する文献、マウスおよびヒト神経芽腫の細胞生物学的、腫瘍免疫学的文献、申請者自身の実験データを用いて腫瘍悪性度と腫瘍血管増生の相関が実験的臨床的に示唆され TNP 470 の効果がより期待されること、血管内皮細胞の定量的検索はなされていないこと、TNP 470 は長期投与が可能でありより効果的であること、抗癌剤との併用による相乗効果が認められること、脾臓に対する影響については現在明らかでなく今後の検討が必要なことを回答した。次いで、細川教授より薬剤の投与経路と治療効果との関連、血管新生因子発現の検討の有無、血管新生阻害治療の概念とその利点についての質問があった。申請者は TNP 470 を含

む血管新生阻害剤を用いた基礎理論および実験的治療に関する文献、申請者自身の実験データを用いて全身投与方法として皮下投与が最も簡便かつ効果的であること、腫瘍細胞上に血管接着分子の発現は認められないが、血管新生因子の産生については検討されていないこと、正常細胞をターゲットとする血管新生阻害剤治療の概念から副作用の少なく耐性発現の低い治療が可能となることを回答した。最後に、藤堂教授から転移巣抑制の機序、担癌状態の細胞性免疫との関連についての質問があった。申請者はTNP 470を用いた実験的治療に関する文献、マウスおよびヒト神経芽腫の細胞生物学的、腫瘍免疫学的文献、申請者自身の実験データなどを引用し、転移巣が血管内皮細胞の抑制を介し腫瘍細胞の着床発育および増殖進展の両面で抑制される可能性が高いことTNP 470の直接の抗腫瘍効果は副次的なものであること、ヒトとマウス神経芽腫に共通して宿主のNK活性LAK活性が抗腫瘍免疫に重要な役割を持ちある種の癌関連抗原も関与していること、悪性度の非常に高い神経芽腫では逆に宿主の腫瘍免疫は活性化されず血管新生阻害剤治療の重要性が高まることを明快に答えた。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、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。