



Title	rTNF- $\alpha$ のin vivoにおける抗腫瘍作用機作の研究
Author(s)	万田, 利孝
Citation	大阪大学, 1989, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/36730">https://hdl.handle.net/11094/36730</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"&gt;https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> >大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名・(本籍)	まん 万	だ 田	とし 利	たか 孝
学位の種類	薬	学	博	士
学位記番号	第	8 5 0 8	号	
学位授与の日付	平成元年3月10日			
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当			
学位論文題目	rTNF- $\alpha$ のin vivoにおける抗腫瘍作用機作の研究			
論文審査委員	(主査) 教授 三村 務			
	(副査) 教授 近藤 雅臣      教授 岩田平太郎      教授 西原 力			

## 論文内容の要旨

腫瘍壊死因子 (Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) は, BCG 等で前処置されたマウスに LPS を静脈内投与することによって血清中に出現する, マクロファージ由来の抗腫瘍性タンパク質である。近年の遺伝子工学の進歩により, 1984年ヒトTNF- $\alpha$ の遺伝子がクローニングされ, 大腸菌を用いて遺伝子組換えヒトTNF- $\alpha$  (recombinant human tumor necrosis factor- $\alpha$ , rTNF- $\alpha$ ) の大量生産が可能となった。著者はこのrTNF- $\alpha$ を用いてin vivoにおける抗腫瘍作用およびその作用機作について検討した。

rTNF- $\alpha$ の抗腫瘍作用の特徴をマウスに移植した種々の腫瘍を使用して詳細に研究した。まず, rTNF- $\alpha$ の投与時期と抗腫瘍作用との関係を調べた。マウスのMeth A線維肉腫 (Meth A) 細胞をマウスの皮内に移植後7あるいは10日目にrTNF- $\alpha$ を静脈内投与すると, 腫瘍に出血壊死が生じ, 腫瘍の増殖は明らかに抑制されたが, 移植後3日目の投与ではそのような抗腫瘍作用はほとんど認められなかった。

各種マウス腫瘍をマウスの皮内あるいは皮下に移植し, 7~11日間増殖させて固型腫瘍を作らせたのち, rTNF- $\alpha$ を静脈内投与したところ, rTNF- $\alpha$ は用量依存的に腫瘍出血壊死, 増殖抑制および延命効果を示した。腫瘍をマウスの後肢筋肉内に移植した場合にも同様にrTNF- $\alpha$ の投与により出血壊死が生じ, 腫瘍の増殖が強く抑制された。しかし, 各種マウス腫瘍を腹腔内に移植し, rTNF- $\alpha$ を静脈内あるいは腹腔内へ投与した実験では, 強い抗腫瘍効果は観察されなかった。

固型腫瘍の実験に使用した各種マウス腫瘍細胞をin vitroでrTNF- $\alpha$ とともに培養したところ, rTNF- $\alpha$ は直接細胞障害作用をほとんど示さなかった。しかし, 牛肺動脈由来血管内皮細胞 (CPAE)

およびマウス線維芽細胞 (L 9 2 9) には  $rTNF-\alpha$  の障害作用が認められた。

これらの結果は、 $rTNF-\alpha$  は固型腫瘍に対して出血壊死を示すユニークな抗腫瘍物質であり、その作用機作は直接腫瘍細胞を障害することに基づくのではなく、腫瘍の増殖に関連した間接的な機構によることが示唆された。

次に、 $rTNF-\alpha$  の抗腫瘍作用機作を検討するため、 $rTNF-\alpha$  投与後のMethA固定腫瘍内の組織学的形態変化を経時的に検討した。MethA移植7日後に $rTNF-\alpha$ を静脈内投与すると、その30分後には腫瘍内の毛細血管前部小動脈および毛細血管が拡張した。1時間後では毛細血管内で血流のうっ滞あるいは赤血球の膠着を認めた。2時間後にはフィブリン線維の沈着や血小板凝集等による毛細血管の閉塞および出血が観察された。閉塞された血管支配領域ではMethA細胞の膨化、核濃縮等の変化が認められた。このとき、腫瘍内血管の様子を調べるためカーボン粒子を静脈内投与したところ、カーボン粒子の毛細血管への沈着は全く観察されなかった。さらに、抗凝血剤dico marolの前処置によって $rTNF-\alpha$ の抗腫瘍作用は明らかに抑制され、 $rTNF-\alpha$ の抗腫瘍作用の発現は腫瘍内毛細血管内での血栓形成と関係があることが示唆された。

腫瘍細胞の微細構造の変化を電顕により調べたところ、 $rTNF-\alpha$ の投与後経時的に腫瘍の細胞質内にprimaryおよびsecondaryライソゾームが増加し、2時間後には細胞膜の消失および核の不整等、MethA細胞に強い変性が認められた。

腫瘍移植3日目と7日目以降における $rTNF-\alpha$ の抗腫瘍作用の著しい差異は、腫瘍内毛細血管の発達の差であることが静脈内投与されたカーボン粒子による黒染によって示された。つまり、移植7日目で見られた細かい網目状の毛細血管の密な分布が、移植3日目ではわずかであった。腫瘍近傍の新生毛細血管のない正常組織や毛細血管の発達が腫瘍内と比べて未熟である炎症性新生毛細血管に対して $rTNF-\alpha$ は作用を示さなかった。これは、新生毛細血管の十分な発達が $rTNF-\alpha$ の抗腫瘍作用の発現に重要であることを示唆している。

これらの結果より、 $rTNF-\alpha$ は選択的に腫瘍内の新生毛細血管内で微小血流を停止させることにより、その近傍に酸素欠乏を生じせしめ、腫瘍細胞内のライソゾームが増加し、腫瘍細胞の自己融解へと進むものと考えられた。

次に、MethA固型腫瘍に対する $rTNF-\alpha$ の抗腫瘍作用の発現にいかなる受容体あるいは化学伝達物質が関与しているかを検討した。セロトニン受容体遮断薬であるketanserine, cyproheptadine およびspiperoneの前処置によって $rTNF-\alpha$ の抗腫瘍作用は明らかに減弱された。しかし、他のタイプの受容体遮断薬 (ヒスタミンH<sub>1</sub>およびH<sub>2</sub>, アドレナリン $\alpha$ および $\beta$ , ドーパミンそしてアセチルコリン受容体遮断薬) では影響されなかった。この事実より、セロトニンが $rTNF-\alpha$ の抗腫瘍作用発現の仲介物質である可能性が考えられるので、セロトニン自身の抗腫瘍作用を検討した。セロトニンをMethA移植7日目に静脈内投与したところ、腫瘍に出血壊死が生じ腫瘍の増殖が抑制された。しかし、腫瘍内の毛細血管の発達がまだ未熟である移植3日目に投与した場合は抗腫瘍効果は得られなかった。この現象は $rTNF-\alpha$ と極めてよく類似していた。さらに、MethA移植後7日目より週2回、3週間にわたってセロトニンを静脈内投与した場合には延命効果も得られた。

rTNF- $\alpha$ と同様、セロトニンはin vitro培養MethA細胞に対して直接細胞障害作用を示さなかった。

これらの結果より、セロトニンはrTNF- $\alpha$ の抗腫瘍作用の発現に何らかの重要な役割を果たしていることが示唆された。

以上より、遺伝子工学で生産されたrTNF- $\alpha$ のマウス腫瘍に対するin vivoでの抗腫瘍作用を明らかにするとともに、既存の癌化学療法剤と全く異なるその作用機作の特殊性を明らかとした。

## 論文の審査結果の要旨

TNF- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ )はマクロファージにより産生されるタンパク質で、移植された腫瘍が出血性壊死を引き起こし、その増殖を抑制するが、正常細胞に作用しないことが報告されている。

本研究は、遺伝子組換えヒトTNF- $\alpha$  (rTNF- $\alpha$ )を用いて、その抗腫瘍作用機構を考察したものである。

その結果、rTNF- $\alpha$ は、従来の癌化学療法剤とは全く異なる機作で作用を発現することを明らかにした。すなわち①rTNF- $\alpha$ はマウスの皮内あるいは筋肉内に移植された種々の固形腫瘍に出血性壊死をおこし、腫瘍の増殖を強く抑制しマウスを延命させる。②rTNF- $\alpha$ は腫瘍内毛細血管に作用し、その毛細血管がフィブリンおよび血小板凝集等により閉塞され、微小循環の障害により酸素不足を生じ、それに伴い腫瘍細胞質内のライソゾームの増加がおこり、腫瘍細胞が自己融解をきたす。③rTNF- $\alpha$ の抗腫瘍作用の発現に、serotoninが重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

以上の知見は、TNF- $\alpha$ による抗腫瘍作用機構解明の手掛りとして重要であり、学位論文に値すると考えられる。