

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士 (医学)	氏名	高砂 健
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項 2 項該当		
論文題目 Anti-tumor necrosis factor-alpha monoclonal antibody suppresses colorectal cancer growth in an orthotopic transplant mouse model (同所移植マウスモデルにおいて抗 TNF α 抗体製剤は大腸癌の成長を抑制する)			
論文審査担当者			
主査	教授	大毛 宏喜	印
審査委員	教授	平田 信太郎	
審査委員	准教授	岡本 渉	
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>【背景と目的】</p> <p>抗 TNF (腫瘍壊死因子) α 抗体製剤は、TNFα の活性を阻害することで炎症を抑制し、炎症性腸疾患や関節リウマチなどの自己免疫疾患に対する主要な治療薬として使用されている。しかし、TNFα はその名の通り当初は、腫瘍壊死を引き起こす因子として特定されたサイトカインあり、抗 TNFα 抗体製剤はこれまで免疫抑制による悪性腫瘍増悪のリスクが懸念されてきた。近年、高齢の炎症性腸疾患および 関節リウマチの患者数が増加しており、より多くの癌患者が抗 TNFα 抗体製剤の投与を検討されることが想定される。さらに腫瘍患者への免疫チェックポイント阻害剤の投与に伴う大腸炎などの免疫関連有害事象に対する抗 TNFα 抗体製剤の投与は今後増加することが予想される。そのため抗 TNFα 抗体製剤が腫瘍に与える影響について調べることは実臨床において大きな意義がある。これまでの観察研究では抗 TNFα 抗体製剤の悪性腫瘍増悪のリスクについて否定的な報告が見られ、基礎研究では炎症性発癌モデルや大腸癌皮下移植モデルなどで腫瘍抑制に働くことが報告されている。しかし、抗 TNFα 抗体製剤使用中に腫瘍が増悪したとの症例報告もあり、実際の抗 TNFα 抗体製剤の悪性腫瘍に対する影響について様々な見解があるのが現状である。また、実臨床ではその他の免疫抑制剤を使用している症例も多く、抗 TNFα 抗体製剤単独での悪性腫瘍増悪のリスクについて評価するのは困難である。これまで行われてきた皮下異種移植モデルは腫瘍微小環境 (TME) の再現性に乏しく、炎症性発癌モデルに関しては、薬剤が腫瘍自体に与える純粋な影響を評価することは困難と考えられた。そこで今回、我々は TME の評価に適し、腫瘍の進行、血管新生、浸潤、間質、転移の評価に推奨される大腸癌同所移植マウスモデルにおいて、腸炎がない状態での抗 TNFα 抗体製剤が移植腫瘍、および TME に与える純粋な影響を評価することを目的とした。また、TNFα は、高用量を腫瘍に直接投与するとその名の通り腫瘍壊死が誘発するが、腫瘍によって産生されるような少量の TNFα は腫瘍増殖に働く可能性も近年考えられており、実際に TNFα 自体が腫瘍増殖能に与える影響を同所移植に用いる CT26 細胞株に TNFα を加えて培養することで評価した。</p> <p>【方法】</p> <ul style="list-style-type: none"> ・CT26 細胞株に TNFα を投与し、インキュサイトにタイムラプス観察を 2 日間行うことで細胞増殖能に TNFα が与える影響を評価した。 ・BALB/c マウスの盲腸に BALB/c 由来の大腸癌細胞株である CT26 を移植することで同所移植モデルを作成した。移植日を含め 1 週ごとに抗 TNFα 抗体製剤を腹腔内投与し、移植 3 週後にサクリファイスを行い、腫瘍を摘出し腫瘍のサイズや重量の変化を測定した。 ・摘出した腫瘍から RNA を抽出し、RNA シークエンス解析を行った。 ・RNA シークエンス解析の結果に基づき腫瘍の増殖能、腫瘍免疫、間質、血管新生について免疫組織学的染色を行うことで、抗 TNFα 抗体製剤が TME に与える影響を評価した。 <p>【結果】</p> <p>大腸癌組織内の濃度に近い低濃度の TNFα (100 pg/mL) と CT26 を培養した結果、コントロール群と比較して、48 時間で有意な細胞増殖が観察された。このことから大腸癌組織内の濃度に近い低濃度では、TNFα は腫瘍増殖に働いていることが示唆され、大腸腫瘍にお</p>			

いて TNF α を抑制することは腫瘍増殖抑制に働く可能性が考えられた。同所移植モデルにおいて、コントロール群と比較して、抗 TNF α 抗体製剤群では、有意に腫瘍重量及び体積の減少を認めた。両群ともに明らかなリンパ節転移や肝転移は認めなかった。RNA シークエンス解析では、コントロール群と比べて抗 TNF α 抗体製剤群で免疫関連のパスウェイが亢進し、間質関連のパスウェイ、腫瘍増殖に関連したパスウェイが抑制されており、Gene Ontology 解析ではそれらに加え血管新生関連遺伝子の抑制を認めた。ネットワーク解析ではコントロール群と比べて抗 TNF α 抗体製剤群で FN (Fibronectin) 1、MMP (matrix metalloproteinase) 9 などの細胞増殖、浸潤に関わる遺伝子の抑制が目立ち、腫瘍細胞の増殖、浸潤の抑制、血管新生、腫瘍浸潤の抑制、アポトーシスの亢進といった機能に働くネットワークを形成していた。

免疫組織化学染色では腫瘍増殖 (Ki67) の抑制、アポトーシス (TUNEL) の増加、間質反応 (α -SMA, Type1 collagen, Fibronectin) の抑制、血管新生 (CD31) の抑制、腫瘍免疫 (CD8, CD4, NKp46/NCR1) の亢進と腫瘍関連マクロファージ (F4/80, CD163) の抑制を認めた。

【結論】

大腸癌同所移植マウスモデルでは、抗 TNF α 抗体製剤の投与で腫瘍が縮小し、TME は腫瘍進行に対して抑制的に働いていた。

以上の結果から、本論文は腸炎がない条件下で抗 TNF α 抗体製剤が大腸癌同所移植腫瘍、および TME に与える（純粋な）影響を初めて明らかにし、抗 TNF α 抗体製剤による免疫抑制が悪性腫瘍増悪のリスクとはならないことを示した。よって審査委員会委員全員は、本論文が高砂 健に博士（医学）の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。