

—平成14年度 岐阜薬科大学特別研究費（奨励）—

AMF を用いた新規な腫瘍免疫療法

羽賀新世

1. 緒言

オートクラインモティリティファクター (AMF) は悪性黒色肉腫 (メラノーマ) 細胞の分泌物中から発見されたサイトカインで¹⁾、細胞運動を刺激することで、腫瘍の浸潤・転移を促進する、がん悪性化因子である。その後クローニングにより、糖代謝酵素であるホスホヘキソースイソメラーゼ (PHI) と同一分子であったことが明らかにされた²⁾。シグナルペプチドを持たない分子が、なぜ細胞の幼弱化にともない分泌されるのかという生理的な意味は不明だが、病期の進行したがん患者の血漿や組織で高い PHI 活性が認められることは 1970 年代から報告されており、現在ではそれらは AMF であったと理解されている。

AMF はすべての細胞運動刺激に対し、数 10 フェムトモルという低濃度で最大の活性を示す³⁾が、その阻害は困難であった。何故なら、担癌宿主における、抗 AMF 抗体による中和は、宿主に抗-抗体を生じさせることから、一時的に効果があっても、がんのような長期の治療が必要な場合、いずれ効果は期待できなくなるからである。また PHI の酵素活性阻害剤も AMF の活性阻害剤となるが⁴⁾、当然、極めて毒性が高い。

様々ながんの病態は、宿主から発生したがんが宿主と複雑な相互作用をすることによって表現される。AMF はその名の通り、オートクラインに腫瘍に作用すると考えられてきたが、近年、腫瘍周辺にパラクラインにも作用し、細胞の運動性を刺激することが分かってきている⁵⁻⁷⁾。

例えば、腹腔腫瘍由来の AMF は腹膜や横隔膜の中皮細胞に作用し、敷石状の細胞層に間隙を生じさせる。その結果、宿主のリンパや血液が腹腔内に流入し、腹水の貯留が促進される⁸⁾。腹腔内に出来た固形癌や肺癌に由来する、腹水や胸水の貯留は、患者を衰弱させ QOL の著しい低下をもたらす。この実験の過程で、数 10 ナノから数マイクロモルという、AMF の最大活性濃度からするとかなりの高濃度の AMF を動物に投与すると、動物に抗 AMF 抗体が誘導され、がんによる腹水貯留を著明に抑制しうることを偶然に見出した。本稿では、この現象を治療に応用すべく行った試験について得られた結果を報告する。

2. 実験方法

担癌モデルは、ハプロタイプがそれぞれ同一の、Balb/c 系マウス x Ehrlich 腹水癌モデルおよび C57BL6 系マウス x B16 メラノーマモデルを用いた。AMF は pGEX6P プラスミドにより大腸菌に発現させたリコンビナントを用いた。ヒト血漿は、太田安彦博士より、石川県立病院呼吸器外科で健常人、肺癌患者それぞれから IC の後、採血されたものを供与された。

3. 結果・考察

1. 腹水癌に対する作用

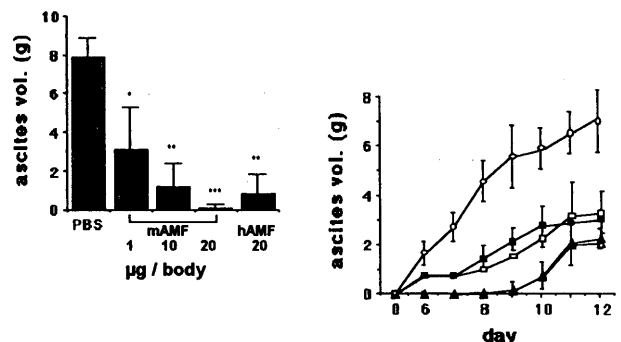


図 1 腹水癌の増殖抑制。左図、AMF 投与による 14 日後の効果。右図、経時変化。○は対照、□は熱変性させたヒト VEGF、■は非変性ヒト VEGF、△は熱変性させたヒト AMF、▲は非変性ヒト AMF。

マウスあたり 10 マイクログラム以上の AMF を投与すると、腹水癌の増殖は顕著に抑制された。ちなみに数 10 から 100 ナノグラムでは、前述のように腹水貯留は有意に増加する。マウスに対する腫瘍増殖抑制効果は、アジュバントや熱変性を伴わない、活性のあるマウス由来の AMF で最も効率が高い。腹水貯留因子として最も研究が進んでいる血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) についても、過剰投与による同様な効果が観察されたが、AMF に比較して弱いものであった。

数 10 マイクログラムの AMF は担癌宿主にも、抗 AMF 抗体を誘導する。ELISA 法により測定した結果、2 から 10 倍の抗体価が測定された。非担癌時には抗 AMF 抗体は検出限界以下である。この抗 AMF 抗体の宿主内における作用としては当然、AMF による転移・浸潤、あるいは腹水貯留などの増強効果に対する中和が考えられるが、これ以外にも抗 AMF 抗体は腫瘍に対する直接的なアポトーシス誘導を

起こしうる⁸⁾。この効果は、化学療法に用いられる抗腫瘍剤との併用で著しく増強されることから、応用法の一つとして期待出来る。

2. 固形癌および転移に対する作用

図. 2 に、皮膚がんのフッドパットでの増殖を示した。このモデルでは、AMF で予め免疫しておく、腫瘍移植後、2 週間ほどで、非免疫群と増殖に差が現れはじめる。

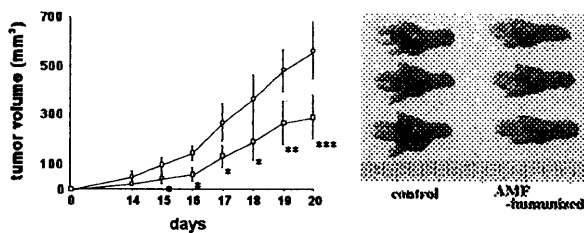


図. 2 メラノーマの増殖抑制。左図、○は対照、□は処理群の腫瘍増殖曲線を示す。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ の統計学的有意差。右図は腫瘍塊の外観。

この後、腫瘍塊を切除すると、肺への転移が観察されるが、対照群での転移結節数が 17 ± 2 であったのに対し、AMF 免疫群では 6 ± 2 と有意に減少しており、なかには全く転移結節を認めなかった個体もあった。この結果は、AMF 投与を術後の転移や再発防止に向けたワクチンのように利用できることを示すものである。

3. がん患者血漿中の抗 AMF 抗体価

肺癌は、人種、地域差などに関係なく、部位別としてほぼ共通に高い発生率を有するがんで、臓器としての特徴から転移発生も多く、診断時病期 IV での 5 年生存率は 20% を下回る。特に男性では常に死亡率の上位を占める癌種である。

健康人では血漿中から抗 AMF 抗体は検出されないが、術直前に採取された肺癌患者血漿からは抗体が検出される。そのレベルは図. 3 に示すように、病期の進行と共に減少し、I・II 期と III・IV 期との間には有意差が認められた。また、手術により腫瘍を摘除された患者では、術後時間の経過にともなう抗体価の減少がみられた。これらの相関の意味は、二通りに考察できる。すなわち、病期が進行して免疫能が低下したため抗体価が減少した、あるいは抗体価が上昇しなかったから病期が進行した、ということである。

ELISA 法では抗原と強固に結合している抗体の定量は困難である。患者由来血漿中では一部は結合していることが予想されるため、厳密な値とはいえないかも知れない。しかし、今後とも症例数を増やし、それぞれの生存率などをトレースすることで、有効な予後因子、あるいは術後ケ

アの指標として、術前における抗 AMF 抗体価の測定が、利用出来るようになるかも知れない。

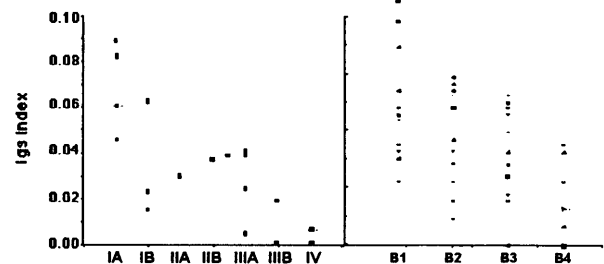


図. 3 がん患者血漿中の抗 AMF 抗体価。左図は病期 (stage IA が初期、stage IV が最も進行している) との関連。右図は術後経過 (B1 は術 1 週間後、B4 は術 4 週間後を示す) との関連。

4. 結 論

従来の抗腫瘍免疫は腫瘍細胞そのものを標的にしたもので、樹状細胞の利用や、遺伝子導入など煩雑な操作が必要であったが、本稿で紹介した治療モデルは、AMF を担癌宿主に投与するだけという至極簡便なものであり、副作用発現の可能性も低い。腫瘍特異的な外性因子は AMF 以外にも数多く知られており、また化学療法との併用など幅広い応用が考えられる。特に術後の再発や転移抑制にむけての効果が期待される。術前あるいは診断時における抗 AMF 抗体価の測定は、今後試験数を増やすことによって、有効な予後判定因子となる可能性がある。

5. 引用文献

- 1) Liotta, LA *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 3302-3306 (1986)
- 2) Niinaka, Y *et al.* Cancer Res. 58: 2667-2674 (1998)
- 3) Haga, A *et al.* Biochim. Biophys. Acta. 1480: 235-244 (2000)
- 4) Watanabe, H *et al.* Cancer Res. 56: 2960-2963 (1996)
- 5) Funasaka, T *et al.* Biochem. Biophys. Res. Commun. 284: 1116-1125 (2001)
- 6) Funasaka, T *et al.* Biochem. Biophys. Res. Commun. 293: 192-200 (2002)
- 7) Funasaka, T *et al.* Int. J. Cancer 101: 217-223 (2002)
- 8) Haga, A *et al.* Int. J. Cancer in press