

マウス膀胱腫瘍 (MBT-2) に対する TNF と癌化学療法剤との併用効果の検討

大阪通信病院 (部長: 早原信行)

池本 慎一, 飯盛 宏記, 西本 憲一, 早原 信行

大阪市立大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 前川正信教授)

上水流雅人, 和田 誠次, 前川 正信

COMBINED EFFECT OF TNF AND ANTICANCER CHEMOTHERAPEUTIC AGENTS ON MURINE BLADDER TUMOR (MBT-2)

Shinichi Ikemoto, Hiroki Iimori, Kenichi Nishimoto
and Nobuyuki Hayahara

From the Department of Urology, Osaka Teishin Hospital

Masato Kamizuru, Seiji Wada and Masanobu Hayahara

From the Department of Urology, Osaka City University

The antitumor activity of combination therapy of recombinant human tumor necrosis factor α (rHu-TNF α) and chemotherapeutic agents against murine bladder tumor (MBT-2) was studied. Tumors were intradermally transplanted into the hind leg of C3H/HeN mice and allowed to grow until they reached a diameter of 8 to 10 mm 10 days after transplantation. TNF (3,000 units) was given intraperitoneally from day 10 to day 19, and the chemotherapeutic agents, 5-FU (60 mg/kg), CPM (100 mg/kg), CDDP (10 mg/kg) and ADM (5 mg/kg), were applied once intraperitoneally on day 10. The antitumor effects were evaluated based on tumor volume on day 20. 5-FU, CPM and ADM enhanced the antitumor effect when combined with TNF, but CDDP did not. These findings suggest that combination therapy of TNF and certain antitumor chemotherapeutic agents is effective cancer treatment.

(Acta Urol. Jpn. 38: 285-289, 1992)

Key words: Murine bladder tumor, Tumor necrosis factor, Antitumor chemotherapeutic agent

緒 言

腫瘍壊死因子 (TNF) は1975年 Carswell ら¹⁾により BCG あるいは *C. parvum* 投与2週間後のマウスにさらに lipopolysaccharide (LPS) を投与することにより血中に出現するマクロファージ由来の抗腫瘍性因子として見い出された。TNF は動物種を越えて腫瘍細胞特異的に強い抗腫瘍活性を示すことから新しい抗腫瘍性物質として注目された。近年、遺伝子工学の進歩によりヒト recombinant TNF α (rHu-TNF α) の大量生産が可能となり臨床にも応用されつつあるが、単独では期待されたような抗腫瘍効果はえられていない。そのため他のサイトカインや抗癌剤との併用療法が検討されている。われわれは今回マウス膀胱腫瘍細胞株 (MBT-2)²⁾ を用いて *in vivo* で TNF と各種抗癌剤との併用効果を検討した。

方 法

実験動物は6週齢雄性 C3H/HeN マウスを日本クレアより購入し1~2週間予備飼育したものを用いた。実験腫瘍は化学発癌剤 N-[4-(5-nitro-2-furyl)-2-thiazolyl]formamide (FANFT) で発癌させたマウス膀胱腫瘍 (MBT-2) を用いた。マウス皮下で継代されている MBT-2 を細切し十分な pipetting にて RPMI1640 で細胞浮遊液を作成後 5×10^5 個の細胞をマウス後肢皮下に移植した。TNF はヒト recombinant TNF α (PT-050, 大日本製薬株式会社) を用いた。抗癌剤は 5-fluorouracil (5-FU, 協和発酵), cyclophosphamide (CPM, 塩野義製薬), cis-diamminedichloroplatinum (CDDP, 日本化薬), adriamycin (ADM, 協和発酵) をそれぞれ購入した。腫瘍移植後10日目に長径 8~10 mm の腫瘍が形成され

たマウスを無作為に選び control 群は20匹、他群は10匹ずつグループ分けした。TNF は移植後10日目より10日間連続で腹腔内投与を行い、抗癌剤は10日目に1回だけ腹腔内投与を行った。今回使用した各種抗癌剤の抗与量は Regenass ら³⁾ が in vivo で MethA 細胞に対して TNF との併用で最も増強効果を認めた量を投与した。

効果判定は腫瘍移植後20日目に腫瘍体積で評価した。腫瘍の長径 (L, mm) と短径 (W, mm) を測定し $W^2 \times L \times 1/2$ の式から推定腫瘍体積 (cm³) を求め、また腫瘍増殖抑制率 (inhibition rate: IR) を次式より算出した、 $IR (\%) = (1 - \text{薬剤投与群平均腫瘍体積} / \text{対照群平均腫瘍体積}) \times 100$

結 果

腫瘍移植20日目の平均腫瘍体積 (cm³, mean $\pm$ SD) は control 群 5.44 $\pm$ 0.98, TNF 1,000 単位投与群 4.52 $\pm$ 1.03, TNF 3,000 単位投与群 3.13 $\pm$ 0.98, 10,000 単位投与群では 2.45 $\pm$ 0.61 であり TNF 1,000 単位投与群と control 群との間には有意差を認めなかったが TNF 3,000 単位投与群と TNF 10,000 単位投与群は control 群に対しおのおの $p < 0.01$, $p < 0.01$ で有意差を認めた。しかし TNF 3,000 単位投与群と TNF 10,000 単位投与群の間には有意差を認めなかった。

また抗癌剤との併用療法で 5-FU 単独投与群では腫瘍体積 3.11 $\pm$ 0.76 であるのに対し 5-FU + TNF 3000

単位併用投与群では 2.12 $\pm$ 0.68 であり 5FU 単独投与群, TNF 3,000 単位投与群に対しそれぞれ $p < 0.01$, $p < 0.05$ の有意差をもって併用による増強効果を認めた。

また CPM 単独投与群では腫瘍体積は 0.44 $\pm$ 0.09 であるのに対して CPM + TNF 3,000 単位併用投与群では 0.31 $\pm$ 0.06 であり, CPM 単独投与群, TNF 3,000 単位投与群に対しそれぞれ $p < 0.01$, $p < 0.01$ の有意差をもって併用による増強効果を認めた。

CDDP 単独投与群では腫瘍体積は 2.24 $\pm$ 0.78 であるのに対し CDDP + TNF 3,000 単位併用投与群では 1.92 $\pm$ 0.59 であり TNF 3,000 単位投与群との間には $p < 0.01$ で有意差を認めたが CDDP 単独投与群との間には有意差を認めなかった。

ADM 単独投与群では腫瘍体積は 4.01 $\pm$ 0.64 であるのに対し ADM + TNF 3,000 単位併用投与群では 2.42 $\pm$ 0.42 であり ADM 単独投与群, TNF 3,000 単位投与群との間にそれぞれ $p < 0.01$, $p < 0.05$ の有意差を認めた (Table 1, Fig. 1, Fig. 2)。

考 察

TNF は単独で各種の癌細胞に対して in vitro, in vivo で傷害活性を示すことが知られており現在、臨床に使用され始めている。しかし TNF に対する感受性を持つ癌細胞はそれほど多くはなく、また同じ組織でも個々の腫瘍細胞で感受性に差が認められる^{4,5)}。また TNF は単独で抗腫瘍効果を認めても大量投与

Table 1. Combined effect of TNF and antitumor drugs on MBT-2 transplanted in C3H/HeN mice

Treatment	Tumor volume (day 20) (cm ³ , mean $\pm$ SD)	Inhibition rate (%)
control	5.44 $\pm$ 0.98	
TNF ^{a)} 1000 U	4.52 $\pm$ 1.03	15.9
3000 U	3.13 $\pm$ 0.98	41.8
10000 U	2.45 $\pm$ 0.61	54.4
5-FU ^{b)}	3.11 $\pm$ 0.76	42.1
5-FU + TNF 3000 U	2.12 $\pm$ 0.68	60.6
CPM ^{c)}	0.44 $\pm$ 0.09	91.9
CPM + TNF 3000 U	0.31 $\pm$ 0.06	94.3
CDDP ^{d)}	2.24 $\pm$ 0.78	58.3
CDDP + TNF 3000 U	1.92 $\pm$ 0.59	64.3
ADM ^{e)}	4.01 $\pm$ 0.64	25.4
ADM + TNF 3000 U	2.42 $\pm$ 0.42	54.9

a) intraperitoneally administered the respective dose of 1000 U, 3000 U and 10000 U from day 10 to day 19

b) intraperitoneally administered the dose of 60 mg/kg on day 10

c) intraperitoneally administered the dose of 100 mg/kg on day 10

d) intraperitoneally administered the dose of 10 mg/kg on day 10

e) intraperitoneally administered the dose of 5 mg/kg on day 10

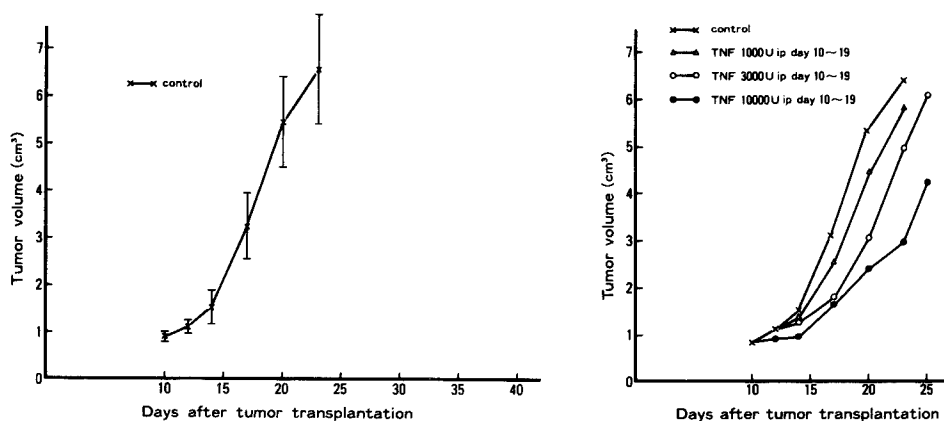


Fig. 1. Growth curve of MBT-2 transplanted in C3H/HeN mice and the effect of TNF on the tumor growth. TNF was intraperitoneally administered the respective dose of 1,000 U, 3,000 U and 10,000 U from day 10 to day 19.

では発熱、ショック、血圧低下、血小板減少等副作用が強く投与可能な量の全身投与では5%前後の有効率しか認められていない⁶⁻⁸⁾。そのため他のサイトカインや抗癌剤との併用によりTNFの投与量を減量し腫瘍の感受性を増加させる試みがなされてきた。サイトカインとの併用ではWilliamsonら⁹⁾は各種ヒト癌細胞に対する*in vitro*細胞傷害活性がインターフェロン α および γ によって増強されると報告している。またAggarwalら¹⁰⁾も各種癌細胞に対してTNFとインターフェロン γ との相乗効果を認めている。Aggarwalらはその機序をインターフェロン γ により腫瘍細胞のTNFレセプター数が増加し増強効果を示すとしているがそれを否定する報告もある^{11,12)}。また抗癌剤との併用では山内ら¹³⁾はLM細胞を用いた*in vitro*, *in vivo*の研究でADM, CDDP, Mitomycin C (MMC), 5-FUがTNFと相乗効果を示すことを報告している。またKullら¹⁴⁾も*in vitro*においてMMCがTNFの作用を増強することを示している。われわれも¹⁵⁾各種腎細胞癌細胞株に対し*in vitro*でTNFと抗癌剤との併用を検討しMMCで増強効果を認めている。TNFと抗癌剤併用による作用増強機序につき渡辺ら¹⁶⁾はTNFに暴露された腫瘍細胞ではRNA合成を伴ったrescue systemが惹起されるが抗癌剤がこのrescue systemを障害しTNFの作用を増強するのではないかと推測している。一方Alexanderら¹⁷⁾はL929を用いた*in vitro*の研究でDNA topoisomerase IIに作用する抗癌剤であるADM, actinomycin D (ACD), VP-16はTNFの抗腫瘍効果を著明に増強するがtopoisomerase IIに関与しないMMC, CDDP, vincristine (VCR), vinblastine (VLB)等は増強しないかしても軽度で

あると報告している。また今回われわれが使用したMBT-2を用いた実験でも*in vitro*, *in vivo*ともにACD, VP-16がTNFの効果を増強することを報告している¹⁸⁾。しかしKrosnickら¹⁹⁾は3-methylcholanthrene誘発のMCA102, 106に対してtopoisomerase IIに作用するADMよりむしろCPMで強い相乗効果を認めている。今回のわれわれの検討では5-FU, CPM, ADMはTNFと併用することにより増強効果を示したがCDDPは増強効果を示さず、TNFがある特定の作用機序を持った抗癌剤とのみ増強効果を示すのではないと考えられた。TNFの抗腫瘍作用は腫瘍細胞⁴⁾や腫瘍血管²⁰⁾に対する直接傷害性だけでなくマクロファージの活性化²¹⁾、リンパ球、好中球の活性化²²⁾などの宿主を介した間接作用を基礎としている。また今回使用した抗癌剤の5-FU, CPM, CDDP, ADMにも免疫に作用し生体の抗腫瘍免疫能を高める作用が知られている²³⁻²⁵⁾。今回の研究では免疫能の検討を行っていないが今後、TNFと抗癌剤との併用効果に関しては免疫学的な側面も検討する必要があると考える。

結 語

マウス膀胱腫瘍(MBT-2)を用いて*in vivo*でTNFと各種癌化学療法剤(5-FU, CPM, CDDP, ADM)との併用効果を検討した。

MBT-2にC3H/HeNマウスに移植し、移植後10日目よりTNF 3,000単位を10日間連続で腹腔内投与し各種癌化学療法剤は移植後10日目に1回だけ腹腔内投与を行った。腫瘍移植後20日目に効果を検討した。5-FU, CPM, ADMはTNFと併用することにより抗腫瘍効果が増強されたがCDDPでは増強効果を

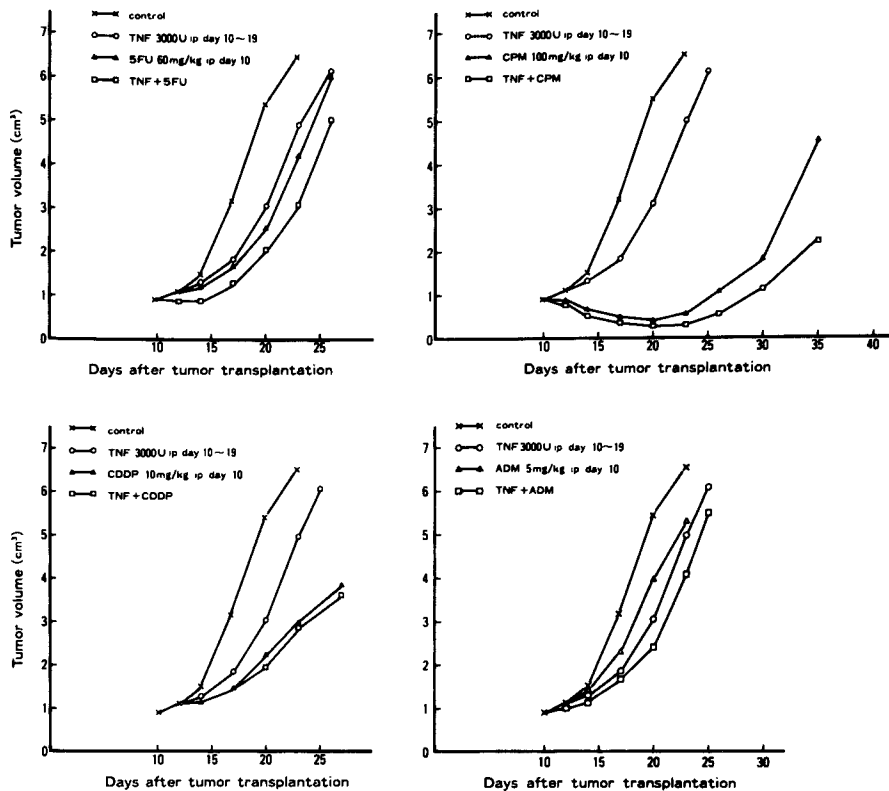


Fig. 2. Combined effect of TNF and antitumor drugs on the tumor growth of MBT-2. TNF was intraperitoneally administered the dose of 3,000 U from day 10 to day 19, and the antitumor drugs, 5FU (60 mg/kg), CPM (100 mg/kg), CDDP (10 mg/kg) and ADM (5 mg/kg), were applied once intraperitoneally on day 10.

認めなかった。TNF の今後の臨床応用に際し適切な癌化学療法剤と併用することにより治療効果を高める可能性が示唆された。

なお、本論文の要旨は第78回日本泌尿器科学会総会において発表した。

文 献

- 1) Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, et al.: An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis in tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* **72**: 3666-3670, 1975
- 2) Soloway MS: Intravesical and systemic chemotherapy of murine bladder cancer. *Cancer Res* **37**: 2918-2929, 1977
- 3) Regenass U, Muller M, Curschellas E, et al.: Anti-tumor effects of tumor necrosis factor in combination with chemotherapeutic agents. *Int J Cancer* **39**: 266-273, 1987
- 4) Watanabe N, Niitsu Y, Neda H, et al.: Anti-tumor effect of tumor necrosis factor against various primarily cultured human cancer cells. *Jpn J Cancer Res* **76**: 1115-1119, 1985
- 5) Sugarman BJ, Aggarwal BB, Hass PE, et al.: Recombinant human tumor necrosis factor α effects on proliferation of normal and transformed cells in vitro. *Science* **230**: 943-945, 1985
- 6) Blick M, Sherwin SA, Rosenblum M, et al.: Phase I study of recombinant tumor necrosis factor in cancer patients. *Cancer Res* **47**: 2986-2989, 1987
- 7) Jakubowski AA, Casper ES, Gabrilove JL, et al.: Phase I trial of intramuscularly administered tumor necrosis factor in patients with advanced cancer. *J Clin Oncol* **17**: 298-303, 1989
- 8) Creaven PJ, Brenner D, Cowens W, et al.: A phase I clinical trial of recombinant human tumor necrosis factor given daily for five days. *Cancer Chemother Pharmacol* **23**: 186-191, 1989
- 9) Williamson BD, Carswell EA, Rubin BY, et al.: Human tumor necrosis factor produced by human B-cell lines: synergistic cytotoxic interaction with human interferon. *Proc Natl Acad Sci USA* **80**: 5397-5401, 1983

- 10) Aggarwal BB, Eessalu TE and Hass PE: Characterization of receptors for human tumor necrosis factor and their regulation by γ interferon. *Nature* **318**: 665-667, 1985
- 11) Rugiero V, Tavernier J, Fiers W, et al.: Induction of the synthesis of tumor necrosis factor receptors by interferon-gamma. *J Immunol* **136**: 2245-2250, 1986
- 12) Taguchi T, Abe S, Nakano K, et al.: Synergistic enhancement of the antitumor activity of recombinant human TNF- α by recombinant human IFN- γ . *Cancer Detect Prev* **12**: 105-114, 1988
- 13) 山内尚文, 渡辺直樹, 大塚善樹, ほか: Tumor Necrosis Factor (TNF) と各種抗癌剤の細胞傷害性相乗効果の解析. *癌と化療* **14**: 2730-2734, 1987
- 14) Kull FC Jr and Cuatrecasas P: Possible requirement of internalization in the mechanism of in vitro cytotoxicity in tumor necrosis serum. *Cancer Res* **41**: 4885-4890, 1981
- 15) Ikemoto S, Hayahara N, Wada S, et al.: Effect of tumor necrosis factor α and anti-cancer chemotherapeutic agents against human renal carcinoma cell lines. *Eur Urol* **19**: 236-239, 1991
- 16) 渡辺直樹, 新津洋司郎, 根田 寛, ほか: 腫瘍細胞および正常2倍体細胞における TNF の細胞傷害性に対する防御機構の解析. *Biotherapy* **1**: 70-78, 1987
- 17) Alexander RB, Nelson WG and Coffey DS: Synergistic enhancement by tumor necrosis factor of in vitro cytotoxicity from chemotherapeutic drugs targeted at DNA topoisomerase II. *Cancer Res* **47**: 2403-2406, 1987
- 18) Alexander RB, Isaacs JD and Coffey DS: Tumor necrosis factor enhances the in vitro and in vivo efficacy of chemotherapeutic drugs targeted at topoisomerase II in the treatment of murine bladder cancer. *J Urol* **138**: 427-429, 1987
- 19) Krosnick JA, Mule JJ, McIntosh JK, et al.: Augmentation of antitumor efficacy by the combination of recombinant tumor necrosis factor and chemotherapeutic agents in vivo. *Cancer Res* **49**: 3729-3733, 1989
- 20) Watanabe N, Niitsu Y, Umeno H, et al.: Toxic effect of tumor necrosis factor on tumor vasculature in mice. *Cancer Res* **48**: 2179-2183, 1988
- 21) Watanabe N, Umetsu T, Sone H, et al.: Stimulation of antitumorigenic cytotoxicity in macrophages by tumor necrosis factor. *Cancer J* **2**: 165-168, 1988
- 22) Collins JL, Kao MS and Patek PQ: Human express natural cytotoxic (NC) cell activity that is similar to murine NC cell activity. *J Immunol* **47**: 2793-2798, 1987
- 23) 新田和男: がん免疫化学療法の新しい方向. *癌と化療* **10**: 1117-1128, 1983
- 24) 細川真澄男: 化学療法と BRM. *Oncologia* **6**: 65-75, 1983
- 25) 細川真澄男, 小林 博: 癌化学療法における抗腫瘍免疫の増強. *癌と化療* **17**: 1402-1406, 1990

(Received on June 3, 1991)

(Accepted on October 3, 1991)