

ヌードマウス可移植性ヒト大腸癌細胞株 LoVo に対する interferon- α , - γ , tumor necrosis factor- α の 抗腫瘍効果の検討

岡山大学医学部第一外科学教室 (主任: 折田薫三教授)

片岡 和彦, 猶本 良夫, 室 雅彦, 小島 一志,
堀木 貞幸, 日伝 晶夫, 田中 紀章, 折田 薫三

(平成 3 年 10 月 9 日受稿)

Key words : nude mouse, human colon cancer, interferon, tumor necrosis factor, cell cycle

緒 言

われわれは natural human interferon- α (IFN- α) と natural human tumor necrosis factor- α (TNF- α) の併用 (OH-1 療法) により著明な抗腫瘍効果の得られることを, *in vitro*, *in vivo* の実験により明らかにし¹⁻³⁾, さらに臨床応用を試みてきた⁴⁾. その作用機序については, 細胞周期の面から, まず *in vitro* において両者の併用により, 腫瘍細胞に著明な S 期蓄積と S-G₂/M block の起こることを flow cytometry を用いて証明した^{2,5)}. さらに *in vivo* においても, 両者の併用により, 腫瘍細胞の細胞周期において, 著明な S 期蓄積と S-G₂/M block のもたらされていることを, 由来の異なる 3 種類のヒト癌細胞株を用いて証明し, 抗腫瘍効果の有力なメカニズムと考えられた⁶⁻⁷⁾. 今回は, *in vitro* において natural human interferon- γ (IFN- γ) に感受性を有する, ヒト大腸癌由来細胞株 LoVo を用い, *in vivo* における IFN- α , - γ , TNF- α の単独及び併用による抗腫瘍効果と, 細胞周期に及ぼす影響について検討した.

材 料 と 方 法

1. 使用動物

CD-1 (ICR) nu/nu 雄性 4 週齢ヌードマウス (日本チャールズ・リバー) を使用し, 当大学動

物実験施設において, specific pathogen-free の条件下で飼育し, 滅菌した水と餌を与えた.

2. 腫 瘍

林原生物化学研究所より供与された, ヒト大腸癌由来細胞株 LoVo を用いた. この細胞は, carcinoembryonic antigen 産生性の adenocarcinoma⁸⁾ で, *in vitro* の実験には継代している LoVo 細胞を用い, *in vivo* の実験にはヌードマウス背部皮下で継代している腫瘍を細切して用いた.

3. 薬 剤

IFN- α , - γ , TNF- α は林原生物化学研究所から供与された. 用いた IFN- α , - γ , TNF- α はいずれも hemagglutinating virus of Japan (HVJ) で刺激した B cell acute lymphatic leukemia line (BALL-1 cells) 由来で, IFN- α は国際単位 (IU), TNF- α は house unit (350 house unit = 1 JRU) で表示した⁹⁾. IFN- γ は lipopolysaccharide (LPS) で刺激した HBL-38 細胞 (human myelomonocytic cell line) 由来で, 国際単位 (IU) で表示した¹⁰⁾.

4. LoVo 細胞に対する IFN- α , - γ , TNF- α の, *in vitro* における抗腫瘍効果

LoVo 細胞を 96 well マイクロプレートに, 1×10^4 cell/well で撒き, 1 日培養した後に IFN あるいは TNF を加え, さらに 3 日培養した後 neutral red を用いた dye-uptake method を施行し,

A_{540} を測定した。この値を、IFN あるいは TNF を加えていないコントロールの A_{540} で除して、% growth を求めた。

5. ヌードマウスを用いた *in vivo* における LoVo 細胞に対する IFN- α 、 γ 、TNF- α の単独および併用による抗腫瘍効果

ヌードマウス背部皮下に、*in vivo* で継代している LoVo 腫瘍 3 mm 角 2 個を移植し、約 10 日後より実験を開始した。

実験 1 では、以下の 6 群に分けて実験を行った。

- A 群：生理食塩液 0.2 ml/mouse/day i.v. (対照群)
- B 群：IFN- α 1×10^6 IU/mouse/day i.v.
- C 群：IFN- γ 1×10^6 IU/mouse/day i.v.
- D 群：TNF- α 1×10^6 U/mouse/day i.v.
- E 群：IFN- α 1×10^6 IU/mouse/day i.v.
- F 群：IFN- γ 1×10^6 IU/mouse/day, TNF- α 1×10^6 U/mouse/day i.v.

実験 2 では、以下の 5 群に分けて実験を行った。

- A 群：生理食塩液 0.2 ml/mouse/day i.v. (対照群)
 - B 群：IFN- α 1×10^6 IU/mouse/day, TNF- α 1×10^6 U/mouse/day i.v.
 - C 群：IFN- γ 1×10^4 IU/mouse/day i.v.
 - D 群：IFN- γ 1×10^5 U/mouse/day i.v.
 - E 群：IFN- γ 1×10^6 IU/mouse/day i.v.
- いずれの実験においても、ヌードマウスは各群 6 匹とし、薬液は day 0 ~ day 20 の連日 3 週間、マウス尾静脈より注入した。

腫瘍は週 2 回、同一測定者によりノギスを用いて、その短径 (a) と長径 (b) を測定した。Battelle Columbus Laboratories Protocol に基づき各測定時の推定腫瘍重量 $W = a^2 \times b / 2$ を算出し、day 0 の推定腫瘍重量で除し、相対的腫瘍重量 (relative tumor weight) を求めた。

6. Cell cycle に及ぼす影響の検討

実験 1 の各群においてそれぞれ、薬剤を 3 週間投与した後の day 21 に、bromodeoxyuridine (BrdU, Becton Dickinson 社) をマウス尾静脈より 50 mg/kg 静注し、2 時間後に屠殺し腫瘍を摘出した。腫瘍を 70% エタノールで固定後、パラフィン包埋切片とし、抗 BrdU 抗体 (Becton Dickinson 社) を用いた ABC 法 (免疫組織化学的方法)¹¹⁾ により染色し、明瞭に標識されているものを選び、2,000 個以上の癌細胞につき、BrdU 陽性細胞の割合である labeling index を算出した。さらに、同一例において、mitosis をおこしている細胞の割合である mitotic index を、ヘマトキシリン・エオジン染色標本で算定した。

結 果

1) LoVo 細胞に対する *in vitro* における IFN- α 、 γ 、TNF- α の抗腫瘍効果 (図 1)

LoVo 細胞に対して、IFN- α は弱い抗腫瘍効果を示し、IFN- γ は著明な抗腫瘍効果を示した。TNF- α は、全く抗腫瘍効果を示さなかった。

2) LoVo 細胞に対する *in vitro* における IFN- α 、TNF- α の抗腫瘍効果

実験 1 の結果 (図 2) では、IFN- γ 単独および IFN- γ と TNF- α の併用により、著明な抗

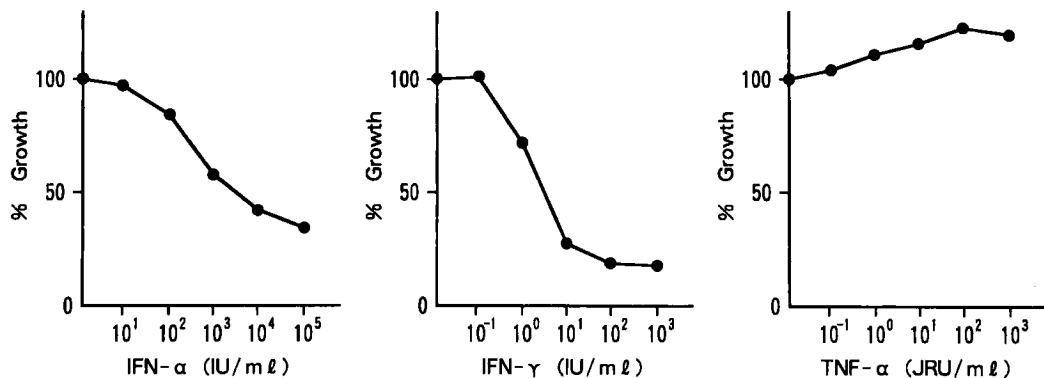


図 1 LoVo 細胞に対する *in vitro* における、IFN- α 、 γ 、TNF- α の抗腫瘍効果

腫瘍効果を認め、対照群との間に有意差を認めた。IFN- α , TNF- α 単独及び組み合わせでは、著明な抗腫瘍効果を認めなかった。

実験2の結果(図3)では、IFN- γ 1×10^4 IU/mouseの連日静注では著明な抗腫瘍効果を認め

なかったが、 1×10^5 IU, 1×10^6 IU/mouseの連日静注により著明な抗腫瘍効果を認め、対照群と

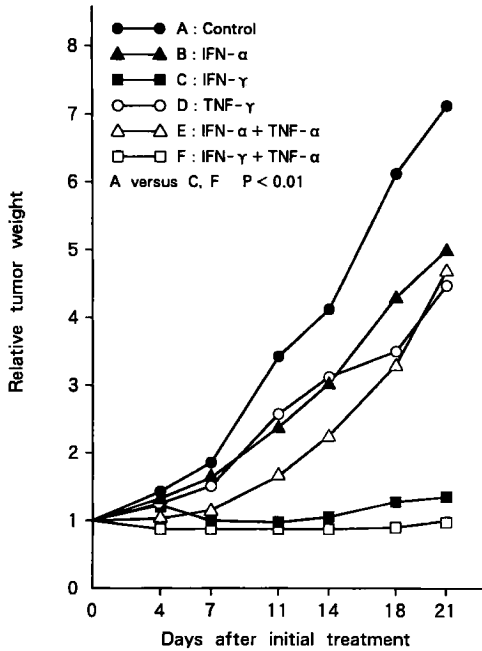


図2 LoVo 細胞に対する *in vivo* における、IFN- α , - γ , TNF- α の抗腫瘍効果 (実験1)

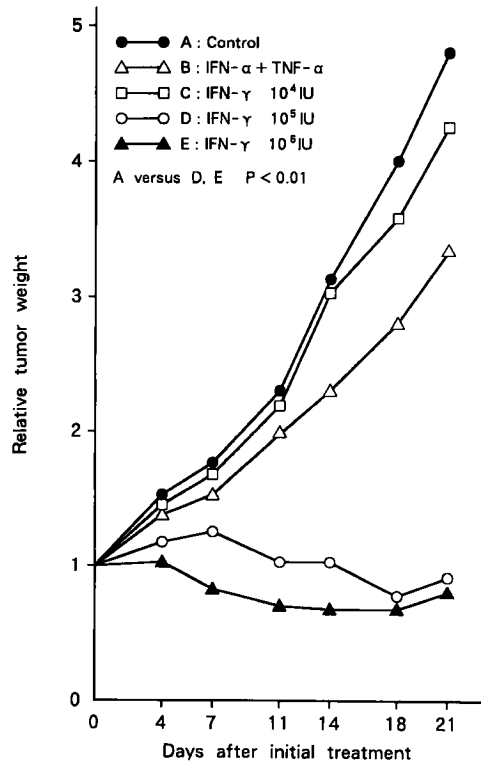


図3 LoVo 細胞に対する *in vivo* における、IFN- α , - γ , TNF- α の抗腫瘍効果 (実験2)

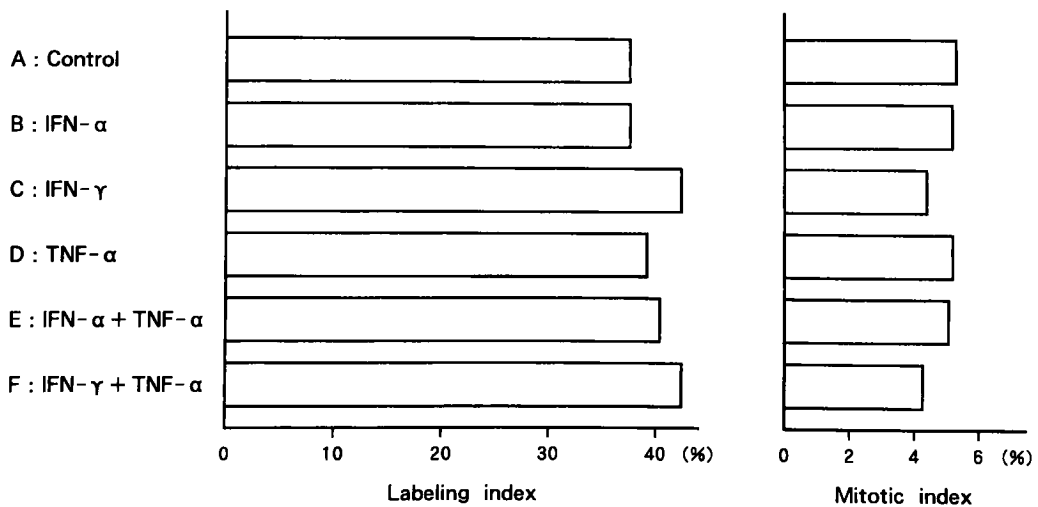


図4 *In vivo* において、IFN- α , - γ , TNF- α を投与した LoVo 細胞における、抗 BrdU 抗体による Labeling index 及び Mitotic index

の間に有意差を認めた。

3) IFN- α , - γ , TNF- α の, LoVo 細胞の cell cycle に及ぼす影響

実験1の腫瘍の, cell cycle の面からの検討では, BrdU による labeling index も mitotic index も各群間で著明な差を認めなかった (図4)。

考 察

BALL-1 細胞を HVJ で刺激することにより, natural type の IFN- α , TNF- α , - β の産生されることが明らかにされた⁹⁾. これを精製することにより得られた natural human IFN- α , TNF- α の抗腫瘍効果について, われわれは今まで, *in vitro*, *in vivo* において検討を加えてきた. その結果, IFN- α と TNF- α を併用することにより, 多くの腫瘍細胞の cell line に対して, 相乗的抗腫瘍効果を示すことが明らかとなった¹⁻³⁾. われわれはこの併用療法を, OH-1 療法として既に臨床応用し, 従来の抗癌剤の無効であった悪性腫瘍に対しても, 優れた臨床効果をあげている⁴⁾. さらにわれわれは, この相乗効果のメカニズムについて検討を加えてきた. まず, *in vitro* において, flow cytometry を用いて, ヒト大腸癌細胞株である RPMI4788 に IFN- α と TNF- α を併用投与したときの cell cycle の変化について検討した. その結果, 癌細胞の S 期から G₂/M 期への移行が block され, S 期に細胞が蓄積し, この細胞はやがて死滅していくことが明らかとなった^{2,5)}. Bromodeoxyuridine (BrdU) は DNA を合成する thymidine の analogue であるため, DNA 合成期すなわち S 期の細胞に取り込まれる. Gratzner ら¹²⁾ により抗 BrdU 抗体が作成され, これを用いて免疫染色することにより, S 期の細胞を陽性に染め出すことが可能となった. われわれはこの方法を用いて, *in vivo* における IFN- α と TNF- α の併用による, 腫瘍細胞の cell cycle に及ぼす効果を検討した. その結果, IFN- α と TNF- α の併用により著明な抗腫瘍効果の認められるヒト大腸癌細胞株 RPMI4788, ヒト乳癌細胞株 MX-1, ヒト胃癌細胞株 NAMKO-1 の3種類の由異の異なるヒト癌細胞において, BrdU による

labeling index が著明に増大し, 同時に検討した mitotic index が小さくなっていることが明らかとなった. すなわち *in vivo* においても, S 期の蓄積と S-G₂/M block のひきおこされることが証明された⁵⁾. 今回用いた LoVo 細胞は, *in vitro* の検討により, IFN- γ に強い感受性を有するが, TNF には全く抵抗性であった. この細胞を選択して, *in vivo* の検討を加えようと考えたのは, IFN- α と TNF- α の併用により著明な抗腫瘍効果を示さない場合の cell cycle の変化について知りたいと考えたからである. 実際, ノードマウスを用いた *in vivo* の実験において, LoVo 細胞に対して IFN- α と TNF- α の併用は, 著明な抗腫瘍効果を示さず, IFN- γ の投与により著明な抗腫瘍効果が認められ, *in vitro* と *in vivo* の結果が一致していた. この腫瘍の cell cycle についての検討では, BrdU による labeling index も, mitotic index も, 各群間で大きな差を認めなかった. われわれは, cell cycle における S 期蓄積と S-G₂/M block を, IFN- α , TNF- α 併用療法における抗腫瘍効果の主要なメカニズムの1つと考えている. 今回検討した LoVo は, この併用療法に感受性を示さない cell line であるが, 同時に cell cycle における S 期蓄積と S-G₂/M block も, この併用によりひきおこされていなかった. 以上より, cell cycle における S 期蓄積と S-G₂/M block が, IFN- α と TNF- α の併用療法に対して感受性を有する場合の抗腫瘍効果のメカニズムとして, 一層強く示唆された. 感受性の差がどこから来るのかについては, 今後さらに検討を続けていきたいと考えている.

IFN は抗原性の違いにより, α , β , γ に分類される. Crane, Blalock らは, IFN- γ が IFN- α , - β に対して低い力価で増殖抑制をもたらすことを報告している^{13,14)}. また, 産生細胞, インデューサー, アミノ酸配列からも予測されるように, 物性, 生物学的作用において, IFN- γ は IFN- α , - β とは大きく異なっている. 今回用いた LoVo 細胞は, *in vitro*, *in vivo* において, IFN- γ に高い感受性を有したが, cell cycle の検討においては大きな変動を認めなかった. このことから, IFN- γ による抗腫瘍効果のメカ

ニズムにおいて、cell cycle の関与は少ない可能性が示唆された。

結 論

In vitro において IFN- γ に高い感受性を有する LoVo 細胞を、ヌードマウス背部皮下に移植し、*in vivo* における IFN- α , - γ , TNF- α の単独、併用効果を検討したところ、IFN- γ 投与群において著明な抗腫瘍効果を認めた。LoVo 細胞の cell cycle に及ぼす効果の検討では、IFN- α , - γ , TNF- α の単独あるいは併用投与群及び対照群において、BrdU による labeling index

にも mitotic index にも大きな差が認められなかった。以上より、IFN- α と TNF- α の併用は感受性を示さない細胞においては、S 期蓄積と S-G₂/M block をひきおこさないことが明らかとなった。

稿を終えるにあたり、IFN- α , - β , TNF- α , LoVo 細胞を供与していただきました、林原生物化学研究所に深謝いたします。

この研究の一部は、第27回日本癌治療学会総会において報告した。

文 献

- 1) Naomoto Y, Tanaka N and Orita K : Antitumor effect of natural human tumor necrosis factor- α and natural human interferon- α in combination against human cancer transplanted into nude mice. *Acta Med Okayama* (1989) **43**, 211—221.
- 2) Naomoto Y, Tanaka N, Fuchimoto S and Orita K : *In vitro* synergistic effects of natural human tumor necrosis factor and natural human interferon- α . *Jpn J Cancer Res* (1987) **78**, 87—92.
- 3) Orita K, Ando and Kurimoto M : Synergism between human tumor necrosis factor and human interferon- α : effects on cells in culture. *Acta Med Okayama* (1987) **41**, 155—160.
- 4) Fuchimoto S, Itano S, Kimura T, Iwagaki H, Maeda T, Hamada H, Kurimoto M and Orita K : Phase 1 and early phase 2 clinical study of a new antitumor lymphokine produced by stimulated B cell line. BALL-1. *Proc Am Soc Clin Oncol Annu Meet* (1986) **22**, 910.
- 5) Muro M, Naomoto Y and Orita K : Mechanism of the combined antitumor effect of natural human tumor necrosis factor- α and natural human interferon- α on cell cycle progression. *Jpn J Cancer Res* (1991) **82**, 118—126.
- 6) 室 雅彦, 猶本良夫, 山本浩史, 立本昭彦, 日伝晶夫, 田中紀章, 折田薫三 : *In vivo* における interferon- α , tumor necrosis factor- α の併用による抗腫瘍効果の細胞周期からみたメカニズムの解析. *医学のあゆみ* (1988) **147**, 67—68.
- 7) 室 雅彦, 猶本良夫, 片岡和彦, 立本昭彦, 日伝晶夫, 田中紀章, 折田薫三 : ヒト腎細胞癌における interferon- α と tumor necrosis factor- α の併用による抗腫瘍効果と細胞周期からみたメカニズムの解析. *医学のあゆみ* (1989) **150**, 217—218.
- 8) Drewinko B, Romsdahl MM, Yang LY, Ahearn MJ and Trujillo JM : Establishment of a human carcinoembryonic antigen-producing colon adenocarcinoma cell line. *Cancer Res* (1976) **36**, 467—475.
- 9) Fukuda S, Ando S, Sanou O, Taniai M, Fujii M, Masaki N, Nakamura, Ando O, Torigoe K, Sugimoto T and Kurimoto M : Simultaneous production of natural human tumor necrosis factor- α , - β and interferon- α from BALL-1 cells stimulated by HVJ. *Lymphokine Res* (1988) **7**, 175—185.
- 10) Ando S, Ohta T, Tanimoto T, Sano O, Yamauchi H, Ando O, Torigoe K and Kurimoto M : Natural human interferon- γ derived from lipopolysacchride-stimulated human myelomonocytic HBL-38 cells. *Jpn Cancer Res* (1988) **79**, 757—765.

- 11) 多田利彦, 児玉哲郎, 渡辺 昌, 佐藤雄一, 下里幸雄: BrdU (Bromodeoxyuridine) モノクローナル抗体を用いた細胞動態解析法の基礎的検討とその臨床応用. 医学のあゆみ (1985) **135**, 510—513.
- 12) Gratzner HG: Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: a new reagent for detection of DNA replication. Science (1982) **218**, 474—475.
- 13) Crane JL Jr, Glasgow LA, Kern ER and Youngner JS: Inhibition of murine osteogenic sarcomas by treatment with type I or II interferon. J Natl Cancer Inst (1978) **61**, 871—874.
- 14) Blalock JE, Georgiades JA, Langford MP and Johnson HM: Purified immune interferon has more potent anticellular activity than fibroblast or leukocyte interferon. Cell Immunol (1980) **49**, 390—394.

**Antitumor effect of interferon- α , γ and/or tumor
necrosis factor- α against human colon cancer line**

(LoVo) transplanted into nude mice

Kazuhiko KATAOKA, Yoshio NAOMOTO, Masahiko MURO,

Kazushi KOJIMA, Sadayuki HORIKI, Akio HIZUTA,

Noriaki TANAKA and Kunzo ORITA

First Department of Surgery,

Okayama University Medical School,

Okayama 700, Japan

(Director : Prof. K. Orita)

We investigated the *in vivo* antitumor effect of recombinant human interferon- α , γ (IFN- α , γ) and/or recombinant human tumor necrosis factor- α (TNF- α) against human colon cancer cells (LoVo) transplanted into nude mice. LoVo cells were very sensitive to IFN- γ and slightly sensitive to IFN- α and resistant to TNF- α *in vitro* by dye uptake method. Intravenous administration of IFN- γ significantly inhibited tumor growth transplanted subcutaneously into nude mice, but IFN- α and/or TNF- α did not show any antitumor effect. Labeling index on staining with bromodeoxyuridine and mitotic index of LoVo cells treated with IFN- α , γ or TNF- α differed slightly from those of the control group. We previously reported that the synergistic antitumor effects on the three cell lines could be examined by the combined use of IFN- α and TNF- α and the mechanism of the synergism was arrested in the S phase of cell cycle of target cells. However in the case of LoVo cells, the combined use of IFN- α and TNF- α was not effective and did not arrest the cells in the S phase of cell cycle. Therefore, arrest in the S phase was suspected to be responsible from the synergistic antitumor activity of IFN- α and TNF- α on the sensitive targets.