

インターフェロンと化学療法剤の併用による 培養ヒト悪性腫瘍細胞の増殖抑制効果

山本 省一¹⁾, 田中 啓幹¹⁾, 難波 正義²⁾

¹⁾川崎医科大学 泌尿器科

²⁾同 実験病理

(昭和58年12月22日受付)

Potentialiation of Cytotoxic Effects of Anticancer Drugs on Human Neoplastic Cells by Interferon

Shoichi Yamamoto¹⁾, Hiroyoshi Tanaka¹⁾
and Masayoshi Namba²⁾

¹⁾Department of Urology, Kawasaki Medical School

²⁾Department of Experimental Pathology, Kawasaki
Medical School

(Accepted on Dec. 22, 1983)

種々の化学療法剤の抗腫瘍作用をインターフェロンが増強するかどうかを組織培養法を用いて調べた。用いた細胞はヒト子宮頸癌由来の HeLa 細胞, ヒト乳癌由来の MCF-7 細胞, 正常ヒト線維芽細胞を ⁶⁰Co ガンマ線照射で培養内で悪性化した WI-38 CT-1 細胞である。また, 正常ヒト細胞として, 正常ヒト胎児肺由来の線維芽細胞(WI-38)を用いた。薬剤の効果は, コロニー形成法で判定した。検討した抗癌剤は, 代謝拮抗剤として; cytosine arabinoside (Ara-C), 5-fluorouracil (5-FU), 6-mercaptopurine (6-MP), methotrexate (MTX), 抗癌抗生物質として; aclacinomycin (ACM), adriamycin (ADM), actinomycin D, cycloheximide, mitomycin C (MMC), peplomycin (PEP), puromycin, アルキル化剤として; nimustine hydrochloride (ACNU), melphalan, その他の薬剤として vincristine (VCR), cisplatin (CDDP) などである。インターフェロンはヒト線維芽細胞で産生された β 型を用いた。HeLa 細胞を用いて, インターフェロンとの併用により細胞増殖抑制作用の増強の認められた薬剤は, PEP, ACM, ADM, CDDP, 5-FU, ACNU であった。しかし, 正常細胞 (WI-38) では, インターフェロンと PEP または 5-FU との併用効果はなかった。

Whether the antitumor effect of various anticancer drugs might be enhanced by interferon was ascertained in experiments using HeLa cells originating from a human carcinoma of the uterine cervix, MCF-7 cells from a human breast cancer, WI-38 CT-1 cells which were neoplastically transformed in culture by ⁶⁰Co gamma rays, and normal human embryo fibroblasts (WI-38). The effects of drugs were

assessed by counting cell colonies formed in culture. The drugs studied included four metabolic antagonists; cytosine arabinoside, 5-fluorouracil (5-FU), 6-mercaptopurine (6-MP) and methotrexate (MTX), seven antibiotics; aclacinomycin (ACM), adriamycin (ADM), actinomycin-D, cycloheximide, mitomycin-C (MMC), peplomycin (PEP) and puromycin, two alkylating agents; nimustin hydrochloride (ACNU) and melphalan and two other drugs; vincristine (VCR) and cisplatin (CDDP). Interferon was a β -type produced by human fibroblasts. In the experiment with HeLa cells, synergistic potentiation of cytotoxic effects by concomitant application of interferon was observed with PEP, ACM, ADM, CDDP, 5-FU and ACNU. Synergistic cytotoxicity was also found in MCF-7 and WI-38 CT-1 cells by the combined treatment with PEP and interferon, but was not revealed in normal human cells (WI-38).

Key Words ① Chemotherapy ② Interferon ③ Neoplastic cultured human cells

はじめに

ヒト悪性腫瘍に対する化学療法剤による治療には、多くの工夫がなされている。すなわち、2種類以上の化学療法剤による多剤併用療法をはじめ、放射線との併用、免疫併用療法、化学療法剤の剤型の変更などである。これらの目的は薬剤の抗悪性腫瘍効果の増大、薬剤耐性細胞出現の防止、薬剤に対する副作用の低減、宿主防御能の増強などにある。

Paucker らが¹⁾、インターフェロンがマウスL細胞の増殖を抑制することを報告して以来、Gresser や²⁾、Borden の³⁾ 総説に記載されているように、インターフェロンが腫瘍細胞の増殖抑制作用を示した報告はきわめて多い。また、現在、インターフェロンは臨床的に phase II study が行われており、その有効性を示す報告もみられる⁴⁾。

我々は培養条件下で、ヒト悪性腫瘍細胞に対する5-FUの細胞増殖抑制効果が、インターフェロンによって増強することを報告した^{5),6)}。ヒト悪性腫瘍細胞に対するインターフェロンと化学療法剤との併用効果を検討した報告は意外に少ない。現在までの報告をみると、Kuwata らはヒト線維芽細胞を Rous ウイルスと SV 40 ウイルスの2種類のウイルスの処理によって、悪性化した RSa, RSb 細胞を用いて、インター

フェロンが cyclophosphamide, puromycin の抗腫瘍性を高めることを報告した⁷⁾。また、Oku らは BLM, MMC, Ara-C などとインターフェロンとの併用がヒト咽頭癌由来の KB 細胞で相加的細胞増殖抑制効果を示すことを報告した⁸⁾。そのほか、Slater らが⁹⁾ マウス白血病細胞 L1210 を移植したマウスで MTX が、Chirigos と Pearson は¹⁰⁾ マウス白血病で BCNU が、Gresser らは¹¹⁾ マウスリンパ肉腫に cyclophosphamide が、インターフェロンとの併用で有効であったと報告している。

今回、我々は種々の化学療法剤のヒト悪性腫瘍細胞増殖抑制作用がインターフェロンとの併用により増強されるかどうかを組織培養法を用いて検討した。この方法の利点は多数の抗癌剤とインターフェロンとの併用の有効性を短期間に再現性をもって調べることができることにある。どの種類の化学療法剤の細胞増殖抑制作用がインターフェロンで増強するかを知ることは、将来のインターフェロンの臨床面での応用に重要であると考えられる。

材料と方法

1. 薬 剤

15種類の薬剤の細胞増殖抑制作用が、インターフェロンによって増強するかどうかを検討した。使用した薬剤は、代謝拮抗剤として、

cytosine arabinoside (Ara-C, Nippon Shinyaku Co., Ltd., Kyoto), 5-fluorouracil (5-FU, Hoffmann-LaRoche Inc., Basel), 6-mercaptopurine (6-MP, Takeda Yakuhin Inc., Ltd., Osaka), methotrexate (MTX, Lederle, Nj.) を、抗癌抗生物質として、aclacinomycin (ACM, Sanraku Ocean Co., Ltd., Fujisawa), adriamycin (ADM, Kyowa Hakko Co., Ltd., Tokyo), actinomycin-D (ACD, Merk & Co., Inc., NJ.), cycloheximide (Sigma Chem., Co., MO.), mitomycin-C (MMC, Kyowa Hakko Co., Ltd., Tokyo), peplomycin (PEP, Nihon Kayaku Co., Ltd., Tokyo) puromycin (Makor Chem., Ltd., Jerusalem), アルキル化剤として nimustine hydrochloride (ACNU, Sankyo Co., Ltd., Tokyo), melphalan (Barroughs Wellcome & Co., Eng.), その他, cisplatin (CDDP, Bristol-Myers Co., Ltd., Tokyo), vincristine (VCR, Eli Lilly & Co., Inc., USA) の15種類であった。今回の実験に使用した薬剤のあるものは臨床的に使用されていない。しかし、それらの薬剤を用いた理由は、インターフェロンの細胞増殖抑制作用の機構を推定する目的で使用した。それぞれの薬剤は使用直前にリン酸緩衝食液 (PBS) に溶き、培地で希釈し添加した。

2. 細胞と培養

薬剤感受性テストに使用した腫瘍細胞は、ヒト子宮頸癌より培養化された HeLa 細胞¹²⁾、ヒト乳癌より培養化された MCF-7 細胞¹³⁾、ヒト正常線維芽細胞を ⁶⁰Co ガンマ線照射で培養内で悪性化した WI-38 CT-1 細胞¹⁴⁾ である。ヒト正常細胞として、正常ヒト胎児肺由来の線維芽細胞 (WI-38)¹⁵⁾ を用いた。培地は Eagle's MEM (日水製薬) + 10% 胎児牛血清 (Flow Lab., USA) を用いた。細胞は TD 35 培養ビンで単層培養法で維持した。細胞の継代は PBS に 0.2% に溶いたトリプシン (Difco Lab., Detroit, MI. 1:250) で行った。

3. インターフェロン

ヒト線維芽細胞を poly I:C で誘導して得

たインターフェロン (Mochida Pharmaceutical Co., Ltd.) を用いた。その比活性は、 2.4×10^8 IU/mg 蛋白であった。

4. 細胞増殖抑制効果の判定

対数増殖期の細胞を 0.2% トリプシン液で処理し、浮遊単個細胞とし、5 ml の培地を含む 6 cm プラスチックシャーレ (Falcon Plastics, Oxnard, Ca.) にコロニーが 100-200 個できるように細胞をまき込み、ただちにシャーレを CO₂ フラン器に移し、37°C, 5% CO₂ 下で保温した。細胞がシャーレ表面に附着し、継代時の損傷から回復する 4-5 時間後に、各薬剤およびインターフェロンを、それぞれ単独または組み合わせて添加した。各薬剤濃度は **Table 1**

Table 1. Anticancer drugs and their concentrations

Drugs	Concentrations examined (ng/ml)
A) Antimetabolites	
Ara-C	12.5-50
5-FU	500-4,000
6-MP	1,000-100,000
MTX	100,000-400,000
B) Antibiotics	
ACM	0.0025-100,000
ADM	0.25-5
ACD	0.0001-0.01
Cycloheximide	125-1,000
MMC	5-200
PEP	50-200
Puromycin	10-1,000
C) Alkylating agents	
ACNU	5,000-50,000
Melphalan	100-10,000
D) Others	
CDDP	12.5-10,000
VCR	0.01-10

に示したようにそれぞれ異なるが、細胞の生存率が約 50% になる濃度を中心に、少なくとも高・低の 2 濃度の 3 濃度を原則として用いた (**Table 1**)。使用したインターフェロンの濃度は HeLa 細胞、MCF-7 細胞では 500 IU/ml、

WI-38 細胞では250 IU/ml とした。WI-38 CT-1 細胞はインターフェロンに感受性が高く50 IU/ml とした。これらのインターフェロン濃度で、それぞれの細胞は70-90%の生存率を示した。薬剤添加後、37°C、5% CO₂ 下で7日間培養し、細胞を100%メタノールで固定し、2%ギムザ液で染色し、20個以上の細胞よりなるコロニーを数えた。薬剤の1濃度につき3枚のシャーレを用いた。細胞生存率は薬剤処理群のコロニー数を未処理対照群のコロニー数で割り、その百分率で示した。実験は少なくとも2回行い、再現性を確認した。各種薬剤とインターフェロンとの併用効果の判定は、薬剤かインターフェロンかの単独の処理によって低下した生存率の積以上に併用療法の生存率が統計学的に有

意に低下すれば併用療法は有効と判定した。

結 果

Table 1 で示した15種類の抗癌剤の細胞増殖抑制作用がインターフェロンで増強するかどうかを HeLa 細胞で調べた。その結果、**Fig. 1** に示したように、ACM, ADM, 5-FU, PEP, CDDP, ACNU の6剤の細胞増殖抑制作用はインターフェロンで増強した。特に PEP とのインターフェロンの併用療法はきわめて有効であった。すなわち0.1 μg/ml の PEP では21%の生存率、500 IU/ml のインターフェロンのみでは78.6%の生存率であったが、0.1 μg/ml PEP と500 IU/ml のインターフェロン併用では生存率は0.3%と著明に低下した。この場

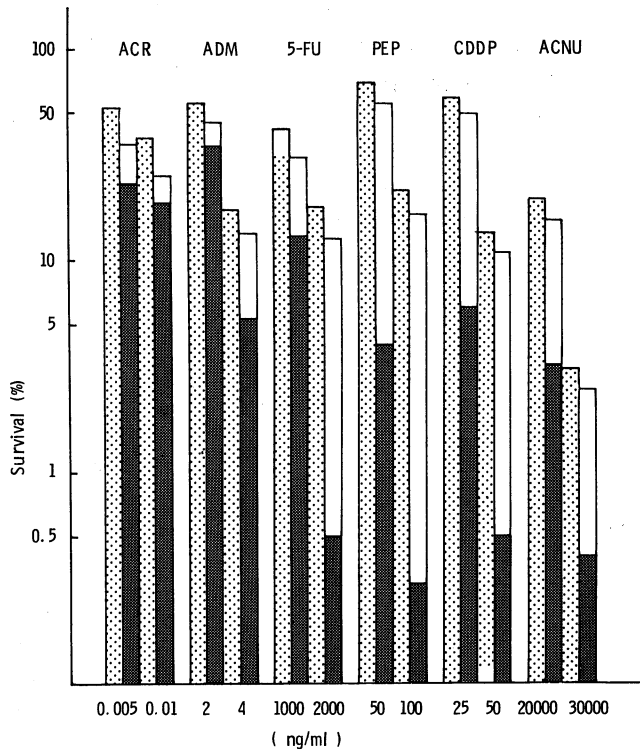


Fig. 1. Synergistic cytotoxic effects of the combined treatment of interferon and anticancer drugs on the growth of HeLa cells. The survival of control cultures was taken as 100%. [dotted] drug alone, [white] expected value (The survival percent of cells treated with drug alone was multiplied with the survival percent of cell treated with interferon), [black] drug+interferon.

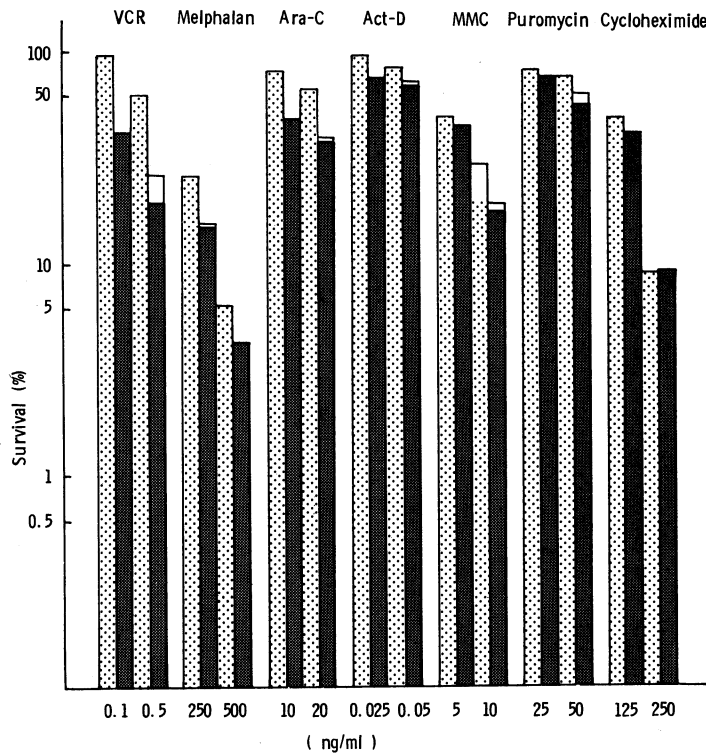


Fig. 2. The ineffective cases of the combined treatment with interferon and anticancer drugs. drug alone, expected value (The same as Fig. 1), drug+interferon.

合、もし、PEP とインターフェロンとの細胞増殖抑制作用が相加的だと仮定すれば、併用療法によって予想される生存率(予想値)は、 $0.21 \times 0.786 = 0.17$ (17%) であるので、PEP とインターフェロンとの併用はきわめて有効であったことを示している。併用効果のなかった薬剤は **Fig. 2** に示した。この場合は、細胞生存率は予想値よりもむしろ高いか、あるいは、わずかに低く、インターフェロンがこれらの化学療法剤の細胞増殖抑制効果を高めなかった。

MCF-7 および WI-38 CT-1 細胞でインターフェロンと PEP との併用効果を検討した。その結果、**Fig. 3** に示すように PEP とインターフェロンとの併用は、相乗的細胞増殖抑制作用を示した。一方、正常細胞でインターフェロンと 5-FU または、PEP との併用効果をみると、

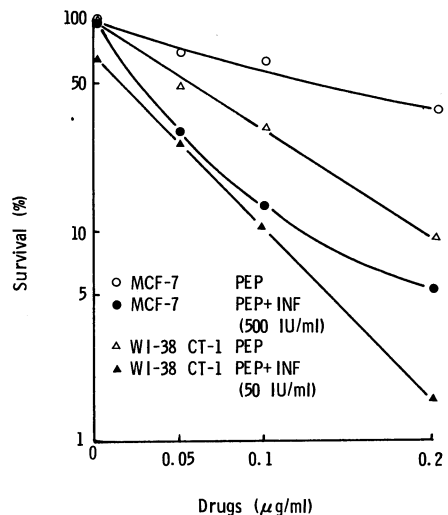


Fig. 3. Synergistic cytotoxic effects of the combined treatment with PEP and interferon on the growth of MCF-7 or WI-38 CT-1 cells.

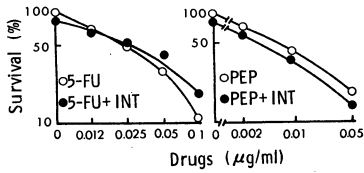


Fig. 4. Effects of the combination of 5-FU or PEP with interferon on the growth of normal human cells (WI-38).

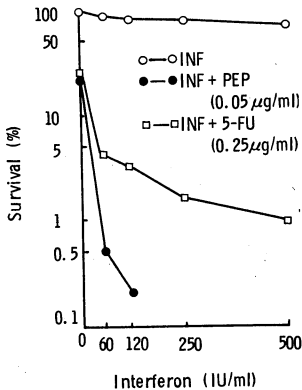


Fig. 5. Potentiation of cytotoxicity of 5-FU or PEP by increasing doses of interferon in HeLa cells.

Fig. 4 に示すようにその効果は全くなかった。次に PEP と 5-FU の濃度を一定にし、インターフェロンの濃度を変え、HeLa 細胞を用いて併用療法の有効性をみた。その結果、インターフェロンの濃度に依存して細胞増殖抑制がみられた (Fig. 5)。

考 案

ヒト子宮頸癌由来の HeLa 細胞、ヒト乳癌由来の MCF-7 細胞、ヒト正常線維芽細胞を悪性化した WI-38 CT-1 細胞、そしてヒト正常線維芽細胞 (WI-38) を用い、15 種類の化学療法剤の細胞増殖抑制作用がインターフェロンとの併用により増強するかどうかを組織培養法で検討した。その結果、HeLa 細胞では PEP, ACM, ADM, CDDP, 5-FU, ACNU の細胞増殖抑制作用がインターフェロンとの併用により著明に増強した。また、MCF-7 および WI-38 CT-1 細胞でもインターフェロンと PEP との併用は有効

であった。しかし、正常線維芽細胞 (WI-38) に対しては併用効果はみられなかった。

今回の我々の実験で、PEP とインターフェロンとの併用療法はきわめて有効であった。しかも、Fig. 5 で示したように、PEP との併用の場合は、低濃度のインターフェロン (60-120 IU/ml) で著明な細胞増殖抑制効果がみられた。この事は、臨床的血中濃度¹⁶⁾ のインターフェロンと PEP との併用療法が有効であることを示している。そのうえ、PEP との併用は HeLa 以外の MCF-7, WI-38 CT-1 などの他の悪性細胞にも有効であった。このことは、インターフェロンと PEP との併用は臨床的適用の可能性が大きいことを示している。

インターフェロンの抗腫瘍作用とは、その直接的な作用として細胞の分化の誘導、増殖抑制、細胞表面の抗原性の増強が報告されており、また、間接的には、NK 細胞の活性化などの免疫機構を介して抗腫瘍作用を示すとされている¹⁷⁾。

また、インターフェロンは細胞の 2'-5'-oligoadenylate synthetase の合成を誘導し、細胞内の endonuclease の合成を高め、その結果 RNA を崩壊させ、細胞を死滅させる可能性があることが報告されている^{18), 19)}。我々は作用機構の解明されている化学療法剤をインターフェロンと併用し、どの化学療法剤の細胞増殖抑制効果がインターフェロンとの併用により高まるかを検討した。断定はできないが、一般的に核酸、特に DNA と反応するものが、インターフェロンとの併用に有効であり、蛋白合成阻害剤、VCR などは無効であった。このことは、前述したインターフェロンによる細胞の endonuclease の活性化と関係があるのかもしれない。

また、インターフェロンが腫瘍細胞の細胞周期における S, G₂ 期への移行率を下げるという報告もある⁹⁾。S 期への移行阻害は G₁ 後期でおこり、この時期が最もインターフェロンが効果的であるといわれている²⁰⁾。このように、インターフェロンが細胞の S, G₂, M 期への移行を阻害するとすれば、反対に、S, G₂, M 期に

特異的に作用する化学療法剤はインターフェロンと併用しても効果はないかもしれない。

我々は組織培養法を用い、短期間に、多くの抗癌剤の細胞増殖抑制がインターフェロンにより増強するかどうかを再現性をもって検討することができた。しかし、*in vitro* で得られた成績が *in vivo* の成績とどの程度一致するか今後確認する必要がある。我々は、培養条件下で 5-FU とインターフェロンとの併用が、5-FU またはインターフェロン単独処理に比べ、HeLa

細胞、ヒト骨髄腫、バーキットリンパ腫(Raji), WI-38 CT-1 などの細胞増殖を有意に抑制することを報告した^{5),6)}。その後 HeLa 細胞を BALB/C nu/nu マウスに移植し、5-FU あるいは PEP とインターフェロン併用投与によって HeLa 細胞の増殖を調べた。その結果、それぞれの単独投与に比べ、併用の場合が有意に腫瘍の増大を抑制することを確認した²¹⁾。我々の今回の実験結果は将来の動物実験さらには臨床面への応用への目安となるであろう。

文 献

- 1) Pauker, K., Cantell, K. and Henle, W.: Quantitative studies on viral interference in suspended L cells. III. Effect of interfering viruses and interferon on the growth rate of cells. *Virology* 17: 324—334, 1962
- 2) Gresser, I.: Antitumor effects of interferon. *Adv. Cancer Res.* 16: 97—140, 1972
- 3) Borden, E. C.: Interferons: Retention for clinical trials in neoplastic disease. *Ann. intern. Med.* 91: 472—479, 1979
- 4) Quesada, J. R., Swanson, D. A., Trindade, A. and Gutterman, J. U.: Renal cell carcinoma: antitumor effects of leukocyte interferon. *Cancer Res.* 43: 940—947, 1983
- 5) Miyoshi, T., Ogawa, S., Kanamori, T., Nobuhara, M. and Namba, M.: Interferon potentiates cytotoxic effects of 5-fluorouracil on cell proliferation of established human cell lines originating from neoplastic tissues. *Cancer Lett.* 17: 239—247, 1983
- 6) Namba, M., Miyoshi, T., Kanamori, T., Nobuhara, M., Kimoto, T. and Ogawa, S.: Combined effects of 5-fluorouracil and interferon on proliferation of human neoplastic cells in culture. *Gann* 73: 819—824, 1982
- 7) Kuwata, T., Fuse, A. and Morinaga, N.: Effects of cycloheximide and puromycin on the antiviral and anticellular activities of human interferon. *J. gen. Virol.* 37: 195—198, 1977
- 8) Oku, T., Imanishi, J. and Kishida, T.: Assessment of antitumor effect of human leukocyte interferon in combination with anticancer agent by a convenient assays system in monolayer cell culture. *Gann* 73: 667—674, 1982
- 9) Slater, L. M., Wetzel, M. W. and Cesario, T.: Combined interferon-antimetabolite therapy of murine L 1210 leukemia. *Cancer* 48: 5—9, 1981
- 10) Chirigos, M. A. and Pearson, J. W.: Cure of murine leukemia with drug and interferon treatment. *JNCI* 51: 1367—1368, 1973
- 11) Gresser, I., Maury, C. and Tovey, M.: Efficacy of combined interferon cyclophosphamide therapy after diagnosis of lymphoma in AKR mice. *Eur. J. Cancer* 14: 97—99, 1978
- 12) Gey, G. O., Coffman, W. D. and Kubicek, M. T.: Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Res.* 12: 264—265, 1952
- 13) Soule, H. D., Vazquez, J., Long, A. and Albert, S.: A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *JNCI* 51: 1409—1416, 1973
- 14) Namba, M., Nishitani, K. and Kimoto, T.: Carcinogenesis in tissue culture. 29: Neoplastic transformation of normal human diploid cell strain, WI-38, with Co-60 Gamma rays. *Jpn. J. exp. Med.* 48: 303—311, 1978

- 15) Hayflick, L.: The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* 37 : 614—636, 1965
- 16) Gutterman, J. U., Blumenschein, G. R., Alexanian, R., Yap, H-Y., Buzdar, A. U., Cabanillas, F., Hortobagyi, G. N., Hersh, E. M., Rasmussen, S. L., Harmon, M., Kramer, M. and Pestka, S.: Leukocyte interferon-induced tumor regression in human metastatic breast cancer, multiple myeloma, and malignant lymphoma. *Ann. intern. Med.* 93: 399—406, 1980
- 17) Belardell, F., Gresser, I., Maury, C. and Maunoury, M.-T.: Antitumor effects of interferon in mice injected with interferon-sensitive and interferon-resistant Friend leukemia cells. I. *Int. J. Cancer* 30: 813—820, 1982
- 18) Baglioni, C., Minks, M. A. and Maroney, P. A.: Interferon action may be mediated by activation of a nuclease by pppA2' p5' A2' p5'A. *Nature* 273 : 684—687, 1978
- 19) Havanessian, A. G., Wood, J., Meurs, E. and Montagnier, L.: Increased nuclease activity in cells treated with pppA2' p5' A2' p5A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76 : 3261—3265, 1979
- 20) Fuse, A. and Kuwata, T.: Inhibition of DNA synthesis of synchronized R5a cells by human leukocyte interferon. *JNCI* 58 : 891—895, 1977
- 21) Namba, M., Yamamoto, S., Tanaka, H., Kanamori, T., Nobuhara, M. and Kimoto, T.: In vitro studies on potentiation of cytotoxic effects of anticancer drugs or Co-60 gamma ray by interferon on human neoplastic cells. *Cancer (in press)* 1984