

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

川崎医科大学 泌尿器科
(主任: 田中啓幹教授)

山 本 省 一

(昭和59年11月17日受付)

Potentiation of Cytotoxic Effects of Anticancer Drugs on Human Neoplastic Cell Lines by β-Type Interferon

Shoichi Yamamoto

Department of Urology, Kawasaki Medical School

(Accepted on November 17, 1984)

種々の化学療法剤の抗腫瘍効果がインターフェロンとの併用によって増強するかどうかを培養ヒト細胞を用いて検討した。実験にはヒト膀胱癌由来の HT-1376 細胞を主に用い、その結果をヒト子宮頸癌由来の HeLa 細胞で比較検討した。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), 抗生物質として; acracinomycin (ACM), adriamycin (ADM), actinomycin-D (ACD), cycloheximide, mitomycin-C (MMC), peplomycin (PEP), puromycin, アルキル化剤として; nimustine hydrochloride (ACNU), melphalan, vinca alkaloid として; vincristine (VCR), VP-16, その他; cisplatin (CDDP) である。インターフェロンはヒト線維芽細胞から誘導したβ型を用いた。HT-1376 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した薬剤は, ADM, PEP, ACNU, CDDP の4剤であった。一方, HeLa では相乗効果が得られた薬剤は ACM, ADM, PEP, 5-FU, ACNU, CDDP の6剤で ACM, 5-FU を除き, 両細胞での併用有効薬剤は一致した。

Experiments were performed to ascertain whether the antitumor effect of various anticancer drugs might be enhanced by β-type interferon mainly using HT-1376 cells originating from human bladder cancer. The results of these experiments were compared with those of HeLa cells originating from human uterine cervix cancer. The effects of the drugs were studied by colony formation assay. The drugs studied were as follows: four metabolic antagonists; cytosine arabinoside (Ara-C), 5-fluorouracil (5-FU), 6-mercaptopurine (6-MP) and methotrexate (MTX), seven antibiotics; acracinomycin (ACM), adriamycin (ADM), actinomycin-D (ACD), cycloheximide, mitomycin-C (MMC), peplomycin (PEP) and

puromycin, two alkylating agents; nimustine hydrochloride (AONU) and melphalan, two vinca alkaloids; vincristine (VCR) and VP-16, and, one other drug; Cisplatin (CDDP). Interferon was a preparation of β -type induced by human fibroblasts. In the case of HT-1376, a synergistic potentiation of the cytotoxic effect by concomitant application was observed with ADM, PEP, ACNU and CDDP. On the other hand, in the case of HeLa, the synergistic potentiation was observed with ACM, ADM, PEP, 5-FU, ACNU and CDDP.

Key Words ① Interferon ② Chemotherapy ③ Human neoplastic cell lines

緒 言

1962年 Pauker¹⁾が、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、Gresser²⁾や Borden³⁾の総説に記載されているようにインターフェロンの腫瘍細胞増殖抑制効果に関して多くの報告がみられる。しかし、一部の限られた種類の腫瘍を除き、インターフェロン単独での完全な治療はそれほど期待できない。Chirigosと Pearson⁴⁾が、マウス LSTRA leukemia に対し、BCNUとインターフェロンの併用療法の有効性を報告して以来、*in vitro*, *in vivo*の実験条件でインターフェロンと化学療法剤との併用、あるいは、放射線との併用療法とに関して若干の報告がある。⁵⁾⁻⁷⁾

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り増強することを報告した。^{8),9)}さらに、ヒト培養子宮癌細胞(HeLa)を主に用いて種々の抗癌剤とインターフェロンの併用療法の結果を本誌に報告した。¹⁰⁾

今回、我々はヒト膀胱癌由来細胞株 HT-1376に対する種々の化学療法剤の細胞増殖抑制効果、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検討した。インターフェロンとの併用で有効な化学療法剤の種類をさらに実験的に確定することは、将来臨床応用において意義がある。

材 料 と 方 法

1. 薬 剤

用いた化学療法剤は、代謝拮抗剤として；

cytosine arabinoside (Ara-C, Nippon Sinyaku Co., Kyoto), 5-fluorouracil (5-FU, Hoffmann-LaRoche Inc., Basel), 6-mercaptopurine(6-MP, Takeda Yakuin Inc., Osaka), methotrexate (MTX, Lederle, NJ), 抗生物質として； acracinomyacin (ACM, Sanraku Ocean Co., Fujisawa), adriamycin (ADM, Kyowa Hakko Co., Tokyo), actinomycin-D (ACD, Merk & Co., Inc., NJ), cycloheximide (Sigma Chem. Co., Mo), mitomycin-C

Table 1 Anticancer drugs and their concentrations examined.

Drugs	Concentrations examined (ng/ml)
A) Antimetabolites	
Ara-C	12.5—59
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) Vinca alkaloids	
VCR	0.01—10
VP-16	0.01—100
E) Other	
CDDP	12.5—10,000

(MMC, Kyowa Hakko Co., Tokyo), peplo-mycin (PEP, Nihon Kayaku Co., Tokyo), puromycin (Makor Chem., Jerusalem), アルキル化剤として; nimustine hydrochloride (ACNU, Sankyo Co., Tokyo), Melphalan (Burroughs Wellcome & Co., Eng.), vinca alkaloid として; vincristine (VCR, Eli Lilly & Co., Ind.), VP-16 (Bristol-Myers Co., Tokyo), その他; Cisplatin (CDDP, Bristol-Myers Co., Tokyo) の 16 剤である (Table 1).

2. 細胞と培養

薬剤感受性テストに使用した腫瘍細胞は、ヒト膀胱癌より培養化された HT-1376¹¹⁾ を用い、その結果の一部をヒト子宮頸癌細胞 HeLa と比較した。培地は Ham's F12 (日本製薬) + 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。

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 β 型を用いた。その比活性は、 2.4×10^8 I.U./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, Calif.) に細胞をまき込み、37°C, 5% CO₂ 下で保温した。まき込み細胞数は対照群で 100~200 個/シャーレのコロニーができるように調整し、その細胞をまき込んだ細胞が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。使用したインターフェロンの濃度は HeLa, HT-1376 とも 500 I.U./ml とした。このインターフェロンの濃度でそれぞれの細胞の生存率は 70~90% であった。薬剤添加後、37°C, 5% CO₂ 下で 7 日間培養し、100% メタノールで固定後、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。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 Aapro ら¹²⁾ に準じ、単独療法群それぞれの生存率の積が、併用療法群の生存率より有意に大きいときを有効と判定した。

結 果

HT-1376 を用いた実験でインターフェロンとの併用によりその細胞増殖抑制効果が相乗的に増強された抗腫瘍剤は ADM, PEP, ACNU, CDDP の 4 剤であった (Fig. 1)。この HT-1376 での結果を他のヒト悪性細胞で比較検討した。HeLa 細胞では、ACR, ADM, 5-FU, PEP, CDDP, ACNU の 6 剤で併用療法で有効であり、とくに PEP とインターフェロンの併用療法は有効であった (Fig. 2)。

ついで、併用療法で有効であった薬剤の濃度を一定にし、インターフェロンの濃度を変えて併用効果を検討した。その結果、HT-1376 を用いた実験では、インターフェロンの濃度依存性に細胞増殖抑制効果がみられ、また、PEP, CDDP との併用で臨床的に用いられる比較的低濃度のインターフェロンで 50% 以下の細胞生存率を示した (Fig. 3)。一方、HeLa 細胞の実験では、併用療法でインターフェロンの濃度依存性細胞増殖抑制効果は HT-1376 細胞の場合とほぼ同程度であり、特に PEP 50ng/ml とインターフェロンとの併用療法では細胞増殖抑制効果が著しかった (Fig. 4)。

考 案

ヒト膀胱癌由来の HT-1376 細胞を用い、種類の化学療法剤の抗腫瘍効果がインターフェロンにより増強されるかどうかを検討した。そして、その結果の一部をヒト子宮頸癌由来の HeLa 細胞での以前の実験成績と比較した。その結果、HT-1376 細胞では ADM, PEP, ACNU, CDDP の 4 剤での併用療法が有効であった。一方、HeLa 細胞では、5-FU, ACM, ADM, PEP, ACNU, CDDP の 6 剤でインターフェロンとの併用により細胞増殖抑制効果の増強がみ

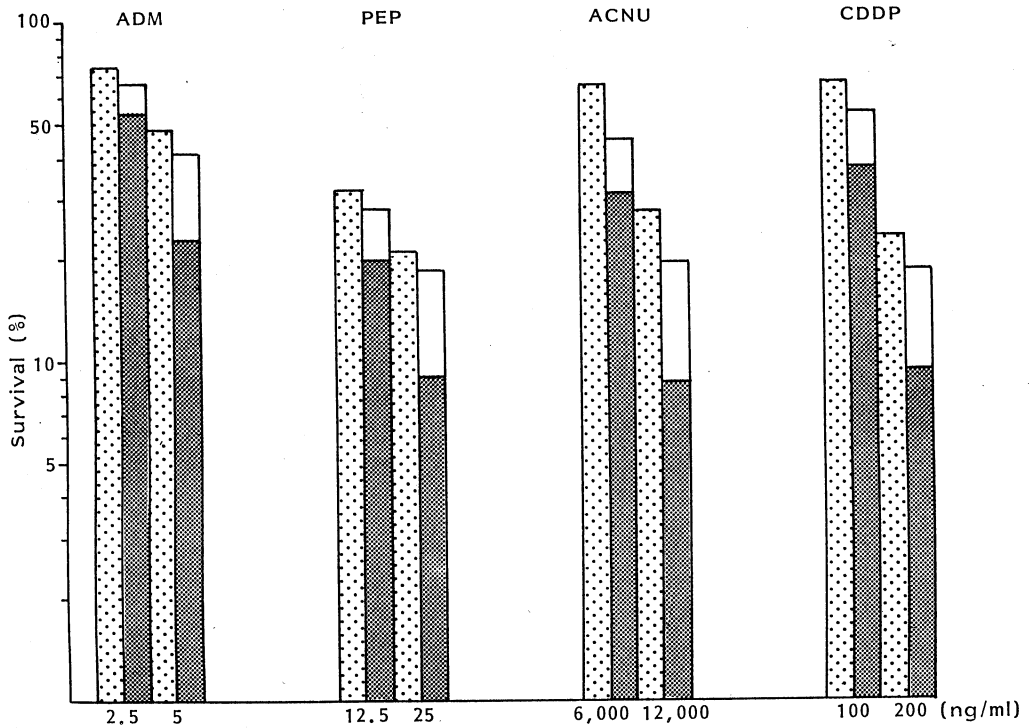


Fig. 1. Synergistic cytotoxic effects of the combined treatment of interferon and anticancer drugs on the growth of HT-1376 cells. The survival of control cultures was taken as 100%. drug alone, expected value (The survival percent of cells treated with drug alone was multiplied with the survival percent of treated with interferon.), drug+interferon.

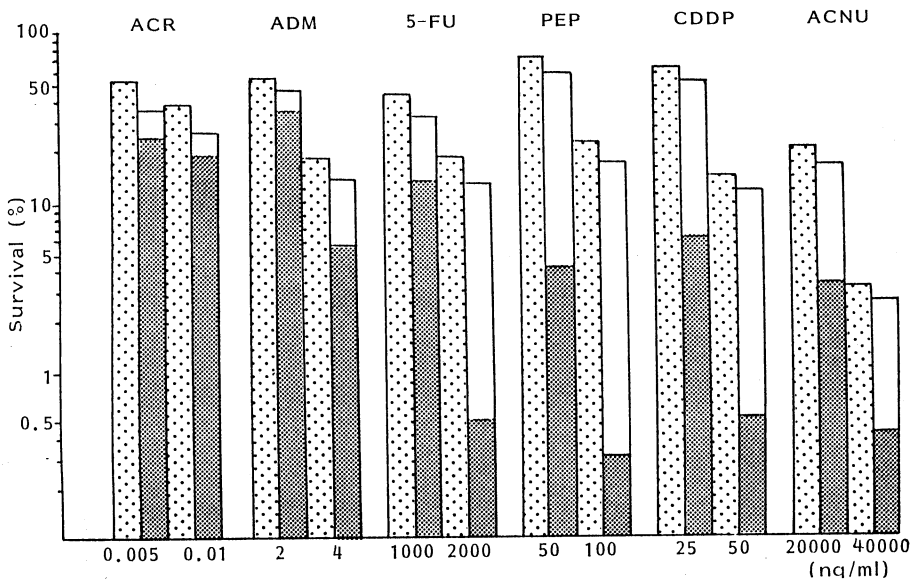


Fig. 2. Synergistic cytotoxic effects of the combined treatment of interferon and anticancer drugs on the growth of HeLa cells. drug alone, expected value (see the legend of Figure 1), drug+interferon.

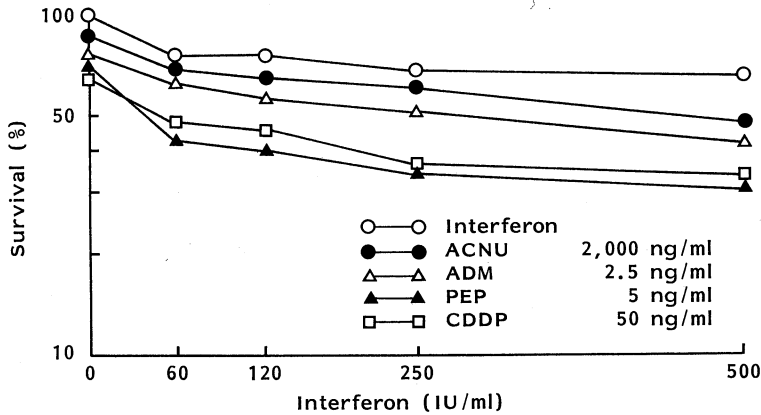


Fig. 3. Relation of cytotoxic effects of anticancer drugs on HT-1376 cells and concentrations of interferon.

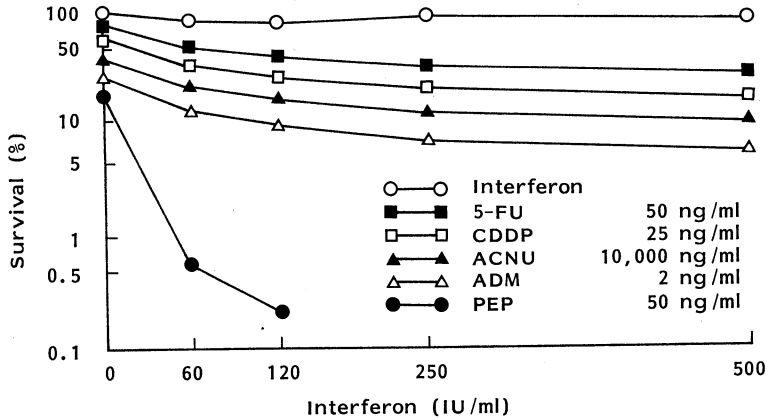
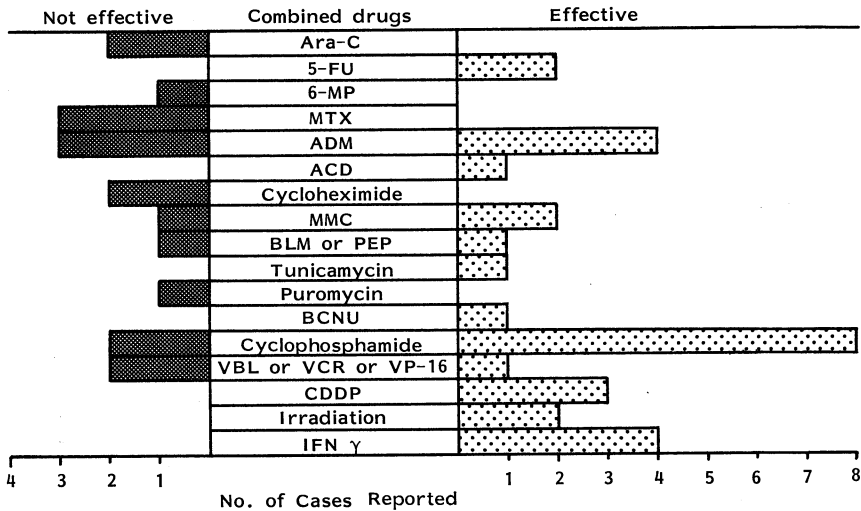


Fig. 4. Relation of cytotoxic effects of anticancer drugs on HeLa cells and concentrations of interferon.

られた。Chirigos と Pearson⁴⁾ が、マウス LSTRA leukemia に対し、インターフェロンと BCNU の併用療法の有効性を報告して以来、インターフェロンと種々の化学療法剤の併用療法に関する報告がかなりある。^{5)~9), 12)~28)} Table 2 にそれらの報告を一括表示した。インターフェロンとの併用が相乗的な作用を示すと報告された薬剤は 5U-F, ACM, MMC, Cyclophosphamide, CDDP などが比較的多くみられ、その他、放射線、インターフェロンα または β と γ との併用が有効であった。^{7), 29)~35)} しかし、*in vivo* で活性化されて抗腫瘍作用を示す Cyclophosphamide のかわりに、培養条件下で有効な Melphalan を用いた我々の実験で

は、インターフェロンとの併用効果はなかった。また、我々は PEP と β 型インターフェロンの併用が HeLa 細胞、MCF-7 細胞、WI-38 CT-1 細胞などの悪性細胞にきわめて有効であったことを報告したが、³⁴⁾ HT-1376 細胞を用いた今回の実験では、その相乗効果はそれほど著しくなかった。

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、どの薬剤の細胞増殖抑制効果がインターフェロンとの併用で有効かを検討した。その結果、断定はできないが、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、Vinca alkaloids などのマイクロフィラ

Table 2 Reported case of combination therapy of interferon and anticancer drugs.

メント形成阻害剤は無効であった。このことはインターフェロンが細胞の2'-5'-oligoadenylate synthetaseの合成を誘導し、細胞内のendonucleaseの合成を高め、核酸を崩壊させる機構と関係があるのかもしれない。

また、インターフェロンは悪性腫瘍細胞に対し、cytosidalよりむしろ、cytostaticな作用を示すとされ、主にG₁ arrestをおこすという報告がある。³⁵⁾したがってG₁停止した細胞がS, G₂に進まないとするならばS, G₂期に特異的に作用する化療剤の効果はインターフェロンによって増強しないかもしれない。

また、我々はHeLa細胞をBALB/C nu/nu

に移植し、5-FUあるいはPEPとインターフェロンの併用がそれぞれの薬剤単独療法に比べ、有意に腫瘍の増大を抑制することを報告した。³⁵⁾このように、*in vitro*で得られた実験成績の一部が*in vivo*の実験で一致するかどうかを我々はすでに確認している。今後、さらに細胞の種類、薬剤の投与方法、投与量、投与間隔を変え、より効果的なインターフェロンと抗癌剤との併用療法を検討する必要があると考えている。

稿を終えるにあたり、御指導と御校閲を戴いた泌尿器科学田中啓幹教授、実験病理学難波正義助教授に深く感謝いたします。

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: Rationale for clinical trials in neoplastic disease. *Ann. intern. Med.* 91: 472-479, 1979
- 4) Chirigos, M. A. and Pearson, J. W.: Cure of murine leukemia with drug and interferon treatment. *J. N. C. I.* 51: 1367-1638, 1973
- 5) 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

- 6) 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
- 7) 三好武美, 李 富雄, 有水 昇: Sarcoma 180細胞におけるインターフェロンの放射線照射に及ぼす修飾効果. *医学のあゆみ* 112: 526—528, 1980
- 8) 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
- 9) 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
- 10) 山本省一, 田中啓幹, 難波正義: 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. *川崎医学会誌* 10: 92—99, 1984
- 11) Rasheed, S., Gardner, M. B., Rongey, R. W., Nelson-Rees, W. A. and Arnstein, P.: Human bladder carcinoma; characterization of two new tumor cell lines and search for tumor viruses. *J. N. C. I.* 58: 881—890, 1977
- 12) Aapro, M. S., Alberts, D. S. and Salmon, S. E.: Interactions of human leukocyte interferon with vinca alkaloids and other chemotherapeutic agents against human tumors in clonogenic assay. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 10: 161—166, 1983
- 13) Schabel, F. M., Jr., Laster, W. R., Jr., Trader, M. W., Mowshowitz, S. L. and Smith, G. D.: Anticancer activity of mouse interferon alone and in combination with cis-diamminedichloroplatinum II or mitomycin C against leukemia P388 in mice. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* 190, 1982
- 14) Mowshowitz, S. L., Chin-Bow, S. T. and Smith, G. D.: Interferon and cis-DDP; combination chemotherapy for P388 leukemia in CDF 1 mice. *J. Interferon Res.* 2: 587—591, 1982
- 15) Inoue, M. and Tan, H.: Enhancement of actinomycin-D and cisdiaminedichloroplatinum(II)-induced of killing human fibroblasts by human β -interferon. *Cancer Res.* 43: 5484—5488, 1983
- 16) Oku, T., Imanishi, J. and Kishida, T.: Assessment of anti-tumor cell effect of human leukocyte interferon in combination with anticancer agents by a convenient assay system in monolayer cell culture. *Gann* 77: 667—674, 1982
- 17) Bosch, J. V. and Zirvi, K. A.: Growth state-specific responsiveness of primary cultures of a nude mouse-xenografted human colon carcinoma to 4'-deoxydoxorubicin and a crude human leukocyte α -interferon preparation. *Cancer Res.* 42: 3789—3792, 1982
- 18) Satomi, H., Oku, T., Kita, M., Imanishi, J. and Kishida, T.: Antimetastatic effect of interferon against murine osteogenic sarcoma. *Interferons, Proc. Int. Symp. Interferons*, ed. by Kishida, T., Osaka, Japan Convention Services Inc. 1983, pp. 57—62
- 19) Kidowaki, T., Tozawa, M., Sakamoto, I., Tanaka, T., Sawada, T., Kusunoki, T., Oku, T. and Kishida, T.: Effects of interferon on C 1300 mouse neuroblastoma. *Interferons, Proc. Int. Symp. Interferons*, ed. by Kishida, T. Osaka, Japan Convention Services Inc. 1983, pp. 96—100
- 20) Heremans, H., Billiau, A. and Somer, P. D.: Combined therapy with interferons and cyclophosphamide in experimental tumors in mice. *Interferons, Proc. Int. Symp. Interferons*, ed. by Kishida, T. Osaka, Japan Convention Services Inc. 1983, pp. 71—76
- 21) Balkwill, F. R., Moodie, E. M., Freedman, V., Lane, E. B. and Fantes, K. H.: An animal model system for investigating the antitumor effects of human interferon. *J. Interferon Res.* 3: 319—326, 1983

- 22) Maheshwari, R. K., Sreevalsan, T., Silverman, R. H., Hay, J. and Friedman, R. M.: Tunica-mycin enhances the antiviral and anticellular activity of interferon. *Science* 219: 1339—1341, 1983
- 23) Marquet, R. L., Schellkens, H., Westbroek, D. L. and Jeekel, J.: Effect of treatment with interferon and cyclophosphamide on the growth of a spontaneous liposarcoma in rats. *Int. J. Cancer* 31: 223—226, 1983
- 24) Bröstrom, L. A.: The combined effect of interferon and methotrexate on human osteosarcoma and lymphoma cell lines. *Cancer Lett.* 10: 83—90, 1980
- 25) Slater, L. M., Wetzel, M. W. and Cesario, T.: Combined interferon-antimetabolite therapy of murine L1210 leukemia. *Cancer* 48: 5—9, 1981
- 26) Kuwata, T., Fuse, A. and Morinaga, N.: Combined effects of interferon and antitumor drugs on the growth of human transformed cells *in vitro*. *Int. Soc. Chemotherapy, Proceedings of 10th International Congress of Chemotherapy. 1978*, pp. 1103—1106
- 27) Balkwill, F. R. and Moodie, E. M.: Positive interactions between human interferon and cyclophosphamide or adriamycin in a human tumor model system. *Cancer Res.* 44: 904—908, 1984
- 28) Tozawa, M., Kidowaki, T., Tanaka, T., Sawada, T., Kusunoki, T., Oku, T. and Kishida, T.: Effects of interferon on C 1300 mouse neuroblastoma. *Cancer Treat. Rep.* 66: 1575—1577, 1982
- 29) Fleischmann, W. R., Jr., Georgiades, J. A., Osbone, L. C. and Johnson, H. M.: Potentiation of interferon activity by mixed preparations of fibroblast and immune interferon. *Infect. Immun.* 26: 248—253, 1979
- 30) Clercq, E. D., Zang, -X., Huygen, K. and Leyten, R.: Inhibitory effect of interferon on growth of spontaneous mammary tumors in mice. *J. N. C. I.* 69: 653—657, 1982
- 31) Clercq, E. D., Zang, Z. -X. Zang, Z. -X. and Huygen, K.: Synergism in the antitumor effects of type I and type II interferon in mice inoculated with leukemia L 1210 clls. *Cancer Lett.* 15: 223—228, 1982
- 32) Fleischmann, W. R., Jr.: Potentiation of the direct anticellular activity of mouse interferons: mutual synergism and interferon concentration dependence. *Cancer Res.* 42: 869—875, 1982
- 33) Miyoshi, T., Saito, M., Arimizu, N., Makino, H., Yamaura, A., Kono, M., Senba, A., Shin, H., Nishiyama, H., Akiyama, S. and Yanagihara, F.: Preliminary study of children's malignant brain tumors with interferon (IFN- α) and radiation. *Interferons, Proc. Int. Symp. Interferons*, ed. by Kishida, T. Osaka, Japan Convention Services Inc. 1983, pp. 420—430
- 34) 難波正義, 山本省一, 三好敏裕, 延原正弘: インターフェロンによる化学療法剤の制癌効果の増強. *組織培養* 10: 2—6, 1984
- 35) Fuse, A. and Kuwata, T.: Inhibition of DNA synthesis of synchronized RSa cells by human leukocyte interferon. *J. N. C. I.* 58: 891—895, 1977
- 36) Yamamoto, S., Tanaka, H., Kanamori, T., Nobuhara, M. and Namba, M.: *In vitro* studies on potentiation of cytotoxic effects of anticancer drugs by interferon on a human neoplastic cell line (HeLa). *Cancer Lett.* 20: 131—138, 1983