

Angiogenesis is an essential factor in the growth and metastasis of solid tumors. Major angiogenesis factors are VEGF, bFGF and IL-8.^{27,28} Solid tumors cannot grow beyond a few millimeters in size without angiogenesis.^{29,30} There are several studies showing that IFN- α inhibits angiogenesis by downregulating angiogenesis factors such as VEGF, bFGF and IL-8.³¹⁻³⁵ For example, Dinney *et al.*³² systematically administered IFN- α to a nude mice model of bladder tumor and reported the decrease of *in vivo* expression of bFGF and of blood vessel density in the tumors, which then resulted in the shrinkage of tumor size. In contrast, Hong *et al.*³⁶ found no relationship between the suppression of angiogenesis due to IFN and the expression of bFGF or VEGF. In the present study, IFN- α did not inhibit, but slightly promoted, angiogenesis through upregulating angiogenesis factors under the current experimental conditions. The reason for these contrary findings is unclear, and the action of IFN on angiogenesis of HCC tumors should be further evaluated with caution by using different types and doses of IFN and different HCC cell lines. In contrast, the 5-FU group and the combination group had a significant decrease in blood vessel counts in the tumor compared to the control. Decrease in bFGF expression was observed in the 5-FU group, suggesting that the antiangiogenesis effects of 5-FU may be mediated by downregulation of bFGF. In the combination group, a significant decrease in angiogenesis factor expression was not observed, and IL-8 significantly increased. Although the true mechanism is unknown, the following two possibilities should be considered: (i) suppression of another unknown angiogenesis factor would be involved in the mechanism of antiangiogenesis action of the combination treatment; and (ii) 5-FU or combination treatment could directly act on the blood vessels and inhibit neovascularization.

The effects of IFN- α are mediated through the interaction with the specific cell surface receptor, type I IFN receptor. This receptor consists of two chains, IFNAR-1 and IFNAR-2, and they can be present in different forms.^{35,37-40} Yano *et al.*¹⁴ reported strong expression of IFNAR-2 on the cell surface of HAK-1B. In our current study, the IFNAR-2 expression level decreased slightly in the IFN- α alone group and significantly in the combination group. This decrease in the combination group indicates that the ligand-receptor reaction occurs more frequently and this could induce ligand-induced downregulation of the receptor, as previously indicated by Lau *et al.*⁴¹ and Maxwell *et al.*⁴² Whether 5-FU could influence the ligand-receptor reaction should be further examined to clarify this point.

The combination of IFN- α and 5-FU did not produce additional or synergic antitumor effects *in vitro*, whereas the combination enhanced the antitumor effects *in vivo*. This *in vivo* mechanism of action would be related to the S-phase arrest in the cell cycle and the induction of apoptosis.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Ms Akemi Fujiyoshi for her excellent technical assistance. This work was supported

by a Grant-in-Aid for Cancer Research from the Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan (Grant #14230501).

REFERENCES

- 1 Fujii T, Takayasu K, Muramatsu Y *et al.* Hepatocellular carcinoma with portal tumor thrombus: analysis of factors determining prognosis. *Jpn. J. Clin. Oncol.* 1993; 23: 105-9.
- 2 Llovet JM, Bustamante J, Castells A *et al.* Natural history of untreated nonsurgical hepatocellular carcinoma: rationale for the design and evaluation of therapeutic trials. *Hepatology* 1999; 29: 62-7.
- 3 Okuda K, Ohtsuki T, Obata H *et al.* Natural history of hepatocellular carcinoma and prognosis in relation to treatment. Study of 850 patients. *Cancer* 1985; 56: 918-28.
- 4 Cady B. Natural history of primary and secondary tumors of the liver. *Semin. Oncol.* 1983; 10: 127-34.
- 5 Wadler S, Wiernik PH. Partial reversal of doxorubicin resistance by forskolin and 1,9-dideoxyforskolin in murine sarcoma S180 variants. *Cancer Res.* 1988; 48: 539-43.
- 6 Sakon M, Nagano H, Dono K *et al.* Combined intraarterial 5-fluorouracil and subcutaneous interferon-alpha therapy for advanced hepatocellular carcinoma with tumor thrombi in the major portal branches. *Cancer* 2002; 94: 435-42.
- 7 Pestka S, Langer JA, Zoon KC, Samuel CE. Interferons and their actions. *Annu. Rev. Biochem.* 1987; 56: 727-77.
- 8 Yanai Y, Horie S, Yamamoto K *et al.* Characterization of the antitumor activities of renal cell carcinoma cell in vitro. *J. Interferon Cytokine Res.* 2001; 21: 1129-36.
- 9 Foster GR, Rodrigues O, Ghouze F *et al.* Different relative activities of human cell-derived interferon-alpha subtypes: IFN-alpha 8 has very high antiviral potency. *J. Interferon Cytokine Res.* 1996; 16: 1027-33.
- 10 Yanai Y, Sanou O, Yamamoto K, Yamauchi H, Ikegami H, Kurimoto M. The anti-tumor activities of interferon (IFN)-alpha in chronic myelogenous leukaemia (CML)-derived cell lines depends on the IFN-alpha subtypes. *Cancer Lett.* 2002; 185: 173-9.
- 11 Schwartz EL, Hoffman M, O'Connor CJ, Wadler S. Stimulation of 5-fluorouracil metabolic activation by interferon-alpha in human colon carcinoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1992; 182: 1232-9.
- 12 Wadler S, Horowitz R, Mao X, Schwartz EL. Effect of interferon on 5-fluorouracil-induced perturbations in pools of deoxynucleotide triphosphates and DNA strand breaks. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 1996; 38: 529-35.
- 13 Kase S, Kubota T, Watanabe M, Teramoto T, Kitajima M, Hoffman RM. Recombinant human interferon alpha-2a increases 5-fluorouracil efficacy by elevating fluorouridine concentration in tumor tissue. *Anticancer Res.* 1994; 14: 1155-9.
- 14 Yano H, Iemura A, Haramaki M *et al.* Interferon alpha receptor expression and growth inhibition by interferon alpha in human liver cancer cell lines. *Hepatology* 1999; 29: 1708-17.
- 15 Yano H, Iemura A, Fukuda K, Mizoguchi A, Haramaki M, Kojiro M. Establishment of two distinct human hepatocellular carcinoma cell lines from single nodule showing

- clonal dedifferentiation of cancer cells. *Hepatology* 1993; 18: 320-7.
- 16 Hisaka T, Yano H, Ogasawara S *et al.* Interferon-alphaCon1 suppresses proliferation of liver cancer cell lines in vitro and in vivo. *J. Hepatol.* 2004; 41: 782-9.
 - 17 Oka Y, Naomoto Y, Yasuoka Y *et al.* Apoptosis in cultured human colon cancer cells induced by combined treatments with 5-fluorouracil, tumor necrosis factor- α and interferon- α . *Jpn. J. Clin. Oncol.* 1997; 27: 231-5.
 - 18 Chu E, Zinn S, Boarman D, Allegra CJ. Interaction of gamma interferon and 5-fluorouracil in the H630 human colon carcinoma cell line. *Cancer Res.* 1990; 50: 5834-40.
 - 19 Guglielmi A, Aschele C, Mori A *et al.* In vitro synergism between 5-fluorouracil and natural beta interferon in human colon carcinoma cells. *Clin. Cancer Res.* 1995; 1: 1337-44.
 - 20 Takeda H, Haisa M, Naomoto Y *et al.* Effect of 5-fluorouracil on cell cycle regulatory proteins in human colon cancer cell line. *Jpn. J. Cancer Res.* 1999; 90: 677-84.
 - 21 Li MH, Ito D, Sanada M *et al.* Effect of 5-fluorouracil on G1 phase cell cycle regulation in oral cancer cell lines. *Oral Oncol.* 2004; 40: 63-70.
 - 22 Johnson KR, Wang L, Millar MC 3rd, Willingham MC, Fan W. 5-Fluorouracil interferes with paclitaxel cytotoxicity against human solid tumor cells. *Clin. Cancer Res.* 1997; 3: 1739-45.
 - 23 McGinn CJ, Pestalozzi BC, Drake JC *et al.* Cell cycle regulation of G0/G1 transition in 5-fluorouracil-sensitive and -resistant human colon cancer cell lines. *Cancer J.* 2000; 6: 234-42.
 - 24 Okamoto S, Sakai M, Uchida J, Saito H. 5-Fluorouracil induces apoptotic cell death with G2 arrest in human breast cancer grafted in nude mice. *Anticancer Res.* 1996; 16: 2699-704.
 - 25 Yoshikawa R, Kusunoki M, Yanagi H *et al.* Dual antitumor effects of 5-fluorouracil on the cell cycle in colorectal carcinoma cells: a novel target mechanism concept for pharmacokinetic modulating chemotherapy. *Cancer Res.* 2001; 61: 1029-37.
 - 26 Kawashima R, Haisa M, Kimura M *et al.* Cyclin A correlates with the sensitivity of human cancer cells to cytotoxic effects of 5-FU. *Int. J. Oncol.* 2004; 24: 273-8.
 - 27 Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J. Natl. Cancer Inst.* 1990; 82: 4-6.
 - 28 Folkman J. How is blood vessel growth regulated in normal and neoplastic tissue? G.H.A. Clowes Memorial Award lecture. *Cancer Res.* 1986; 46: 467-73.
 - 29 Kerbel RS. Tumor angiogenesis: past, present and the near future. *Carcinogenesis* 2000; 21: 505-15.
 - 30 Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000; 407: 249-57.
 - 31 Takemoto Y, Yano H, Momosaki S *et al.* Anti-proliferative effects of interferon- α Con1 on ovarian clear cell carcinoma *in vitro* and *in vivo*. *Clin. Cancer Res.* 2004; 10: 7418-26.
 - 32 Dinney CP, Bielenberg DR, Perrotte P *et al.* Inhibition of basic fibroblast growth factor expression, angiogenesis, and growth of human bladder carcinoma in mice by systemic interferon-alpha administration. *Cancer Res.* 1998; 58: 808-14.
 - 33 Noguchi R, Yoshiji H, Kuriyama S *et al.* Combination of interferon-beta and the angiotensin-converting enzyme inhibitor, perindopril, attenuates murine hepatocellular carcinoma development and angiogenesis. *Clin. Cancer Res.* 2003; 9: 6038-45.
 - 34 George MM, Li SD, Mindikoglu AL *et al.* Platelet sparing effect of COX II inhibition used with pegylated interferon alfa-2a for the treatment of chronic hepatitis C: a short term pilot study. *Cytokine* 2004; 27: 159-65.
 - 35 Pestka S. The interferon receptors. *Semin. Oncol.* 1997; 24: S9-18-S19-40.
 - 36 Hong YK, Chung DS, Joe YA *et al.* Efficient inhibition of *in vivo* human malignant glioma growth and angiogenesis by interferon-beta treatment at early stage of tumor development. *Clin. Cancer Res.* 1998; 58: 808-14.
 - 37 Domanski P, Witte M, Kellum M *et al.* Cloning and expression of a long form of the beta subunit of the interferon alpha beta receptor that is required for signaling. *J. Biol. Chem.* 1995; 270: 21606-11.
 - 38 Lutfalla G, Holland SJ, Cinato E *et al.* Mutant U5A cells are complemented by an interferon-alpha beta receptor subunit generated by alternative processing of a new member of a cytokine receptor gene cluster. *EMBO J.* 1995; 14: 5100-8.
 - 39 Novick D, Cohen B, Rubinstein M. The human interferon alpha/beta receptor: characterization and molecular cloning. *Cell* 1994; 77: 391-400.
 - 40 Uze G, Lutfalla G, Gresser I. Genetic transfer of a functional human interferon alpha receptor into mouse cells: cloning and expression of its cDNA. *Cell* 1990; 60: 225-34.
 - 41 Lau AS, Hannigan GE, Freedman MH, Williams BR. Regulation of interferon receptor expression in human blood lymphocytes *in vitro* and during interferon therapy. *J. Clin. Invest.* 1986; 77: 1632-8.
 - 42 Maxwell BL, Talpaz M, Gutterman JU. Down-regulation of peripheral blood cell interferon receptors in chronic myelogenous leukemia patients undergoing human interferon (HuIFN alpha) therapy. *Int. J. Cancer* 1985; 36: 23-8.

インターフェロンの抗腫瘍効果

矢野 博久* 神代 正道*

索引用語：肝細胞癌，インターフェロン，PEG-インターフェロン，アポトーシス

1 はじめに

インターフェロン(IFN)は、抗ウイルス作用、細胞増殖抑制作用、血管新生抑制作用、免疫応答調節作用、MHC抗原発現調節作用など、多彩な生物活性を有するサイトカインであり、 α 、 β 、 ω からなるI型IFNと、 γ からなるII型IFNに大きく分類される¹⁾。 α や β などのI型IFNは、C型慢性肝炎などのウイルス性疾患、慢性骨髄性白血病や腎細胞癌などの腫瘍性疾患の治療薬として臨床的に使用されている²⁾。

C型慢性肝炎は、長期的経過で肝硬変・肝細胞癌へと進展する例が多く、肝病変の進展阻止は重要な問題である。近年、C型慢性肝炎あるいは肝硬変に対してIFN療法を行うことにより、ウイルスの完全排除と関係なく、肝機能の改善や肝発癌率の低下が誘導されることが報告されている^{3~5)}。さらに、肝細胞癌の切除術後の再発防止に対するIFN投与の有用性や^{6,7)}、進行肝癌の治療に対するIFNと抗癌剤の併用療法の有用性^{8,9)}も報告され

ている。このように肝癌発生予防や治療に対するIFNの有用性が臨床的に明らかにされつつあるが、その作用メカニズムはいまだ明らかにされていない。臨床的に明らかな肝細胞癌の合併を認めないにもかかわらず、血清の α -fetoprotein (AFP)の持続高値を呈するC型慢性肝炎患者は、肝細胞癌発症のハイリスク群に位置する¹⁰⁾。最近、これらの患者に対して、肝庇護剤を投与した場合、肝機能の改善はみられても、血清AFP値の低下は見られないのに対し、IFNを投与すると肝機能の改善と血清AFP値も有意に低下すると報告されている¹¹⁾。このAFP低下の機序も不明だが、もしかするとIFNが、臨床的に不顕性な肝癌細胞に直接的に作用を示し、その結果AFPの低下を誘導しているのかもしれない。このように、IFNによる直接的な増殖抑制作用が、IFNによる肝癌発症、再発抑制や肝癌治療にも関連している可能性が十分考えられる。

筆者らは、IFNの肝癌細胞に対する作用を明らかにするために、種々のIFNによる増殖

Hirohisa YANO et al : Anti-tumor action of interferon

*久留米大学医学部病理学教室 [〒830-0011 久留米市旭町 67]

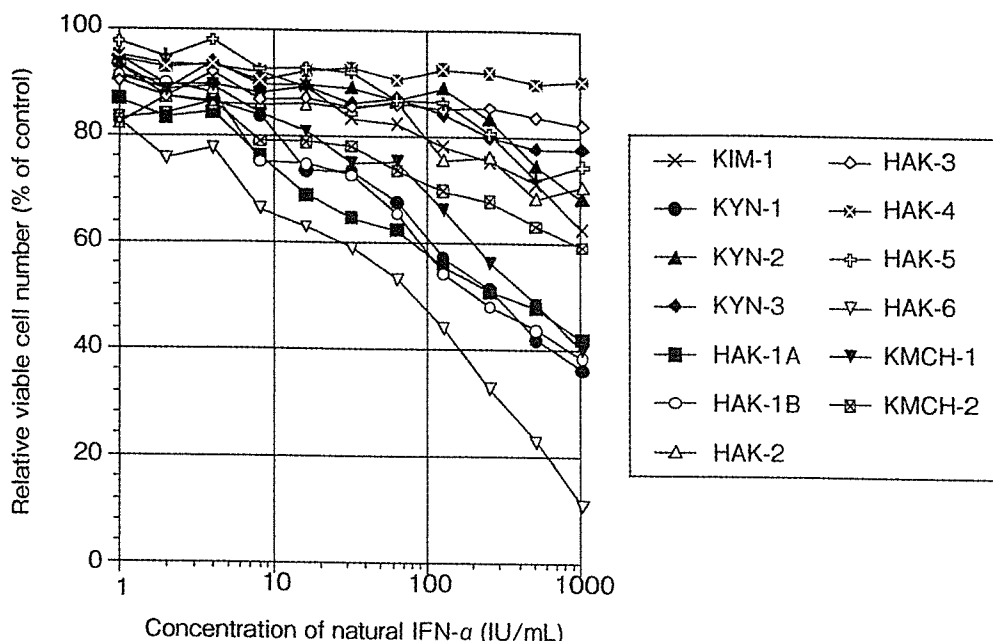


図1 ヒト天然型IFN- α 製剤(OIF[®])の13種類の肝癌細胞株に対する増殖抑制作用
13種類の肝癌細胞株を1~1,024 U/mLのIFN- α 添加培地で培養し、96時間目にIFN- α 非添加培養(コントロール)と比較した生細胞数の割合(%)を示す。

抑制作用やその機序解明などに関して、培養肝癌細胞を使用し検討を行っているが^{12~17)}、本稿では、そのデータの一部を以下に紹介する。

2 ヒト天然型IFN- α の肝癌細胞株に対する*in vitro*の増殖抑制作用

われわれは、当教室で独自に樹立・維持されている11種類の分化度の異なる肝細胞癌細胞株と2種類の混合型肝癌株の合計13株の肝癌の細胞株を使用して実験を行った。IFN- α , - β の作用発現には、AR-1鎖とAR-2鎖から構成されるI型IFNレセプターの発現が前提となるが、これらの発現をmRNAレベルで確認し、AR2鎖に関しては、蛋白レベルでも、13株中12株の肝癌細胞に種々の程度に発現を確認している¹²⁾。天然型IFN- α (1~1,024 IU/mL, OIF[®])を13種類の肝癌細胞株に対し24~96時間接触させると、大部分の細胞株で時間依存性の細胞増殖抑制作用が認められた¹²⁾。また、IFN- α 接触後96時間

目では、すべての細胞株で種々の程度に濃度依存性に細胞増殖が抑制された(図1)。IFN- α の増殖抑制作用に対する感受性と細胞株のオリジナル腫瘍の組織学的異型度との間に関連性は認めなかった。また、細胞表面のAR-2鎖の発現とIFN- α による増殖抑制作用との関連性に関しては、AR-2鎖の発現が極端に低い細胞は、増殖抑制作用が乏しかったが、ある程度以上の発現がある細胞では、発現と増殖抑制作用とは必ずしも相関していなかった¹²⁾。

3 IFN- α サブタイプの肝癌細胞株に対する*in vitro*の増殖抑制作用

IFN- α には、少なくとも13種類のサブタイプ遺伝子(α 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 13, 14, 16, 17, 21)がある。各サブタイプ分子が構造的に極めて類似しており、共通のレセプター分子を介して細胞内にシグナルを送るにもかかわらず、抗ウイルス作用、細胞増殖抑制作用などの生物学的作用や標的細胞特異性にはサブ

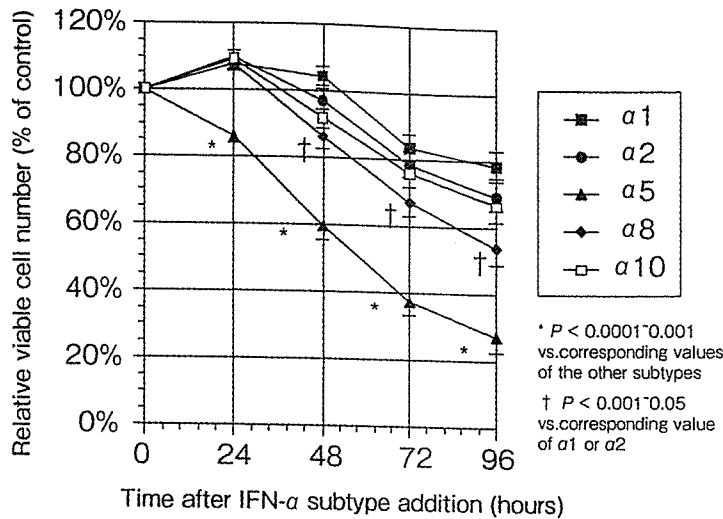


図2 5種類のIFN- α サブタイプ(a1, a2, a5, a8, a10)の肝癌細胞株に対する経時的な増殖抑制作用

13種類の肝癌細胞株を1,024 IU/mLの各種IFN- α サブタイプ添加培地で24, 48, 72あるいは96時間培養し, 各種IFN- α サブタイプの各時点におけるIFN- α 非添加培養(コントロール)と比較した生細胞数の割合(%)を算出した. さらに, IFN- α サブタイプ毎に13株の生細胞数の割合の平均値を算出しプロットしたものを図に示す. IFN- α 5の平均値がいずれの測定時間でも最も低く, 最も強い増殖抑制作用を示していた. 値は, 平均値 \pm 標準誤差を示す.

タイプ間で差があると言われている¹⁸⁾. 上記実験に使用した天然型IFN- α の成分は, 約75%がa2で, 残り25%がa8で構成されている. IFN- α のサブタイプによって肝癌細胞の増殖抑制作用に違いがないか, 5種類のリコンビナントIFN- α 1, 2, 5, 8, 10を使用し検討を行った. その結果, 各IFN- α サブタイプの増殖抑制作用に対して13種類の細胞株は, それぞれ異なる感受性を示したが, 特にa5とa8に高感受性を示す細胞株が多いことが判明した¹⁴⁾. サブタイプ別の経時的な増殖抑制効果を13株の平均値で比較すると, a5が終始効果が最も強く, 次いでa8, a10, a2, a1の順であった(図2). a5の増殖抑制効果は, 他のサブタイプより早期に出現し接触後24時間目から認められた. 現在使用されているIFN- α 製剤は, 製剤毎に含有するIFN- α のサブタイプが異なり, したがって, 肝癌細胞の増殖抑制能も異なる可

能性が考えられる. 次に, この点に関して検討を行った.

4

IFN- α 製剤およびIFN- β 製剤間の肝癌細胞株に対する*in vitro*の増殖抑制作用と増殖抑制機序の比較

最初の実験に使用したヒト天然型IFN- α (OIF[®])に加え, コンセンサスIFN (rIFN- α Con1, Advaferon[®]), IFN- α 2b (Intron[®] A), ペグ(PEG)-IFN- α 2b (PegIntron[®])の合計4種類のIFN- α 製剤と, 1種類の天然型IFN- β 製剤(FERRON[®])の13種類に肝癌細胞株に対する増殖抑制作用を比較検討した. 1,024 IU/mLの各種IFN添加培地で96時間培養後に, IFN非添加培養(コントロール)と比べ生細胞数の割合が50%以下まで低下した細胞株の数は, ヒト天然型IFN- α では, 5株¹²⁾, コンセンサスIFNでは, 7株¹⁷⁾, IFN- α 2bとPEG-IFN- α 2bでは, いずれも2株¹⁵⁾,

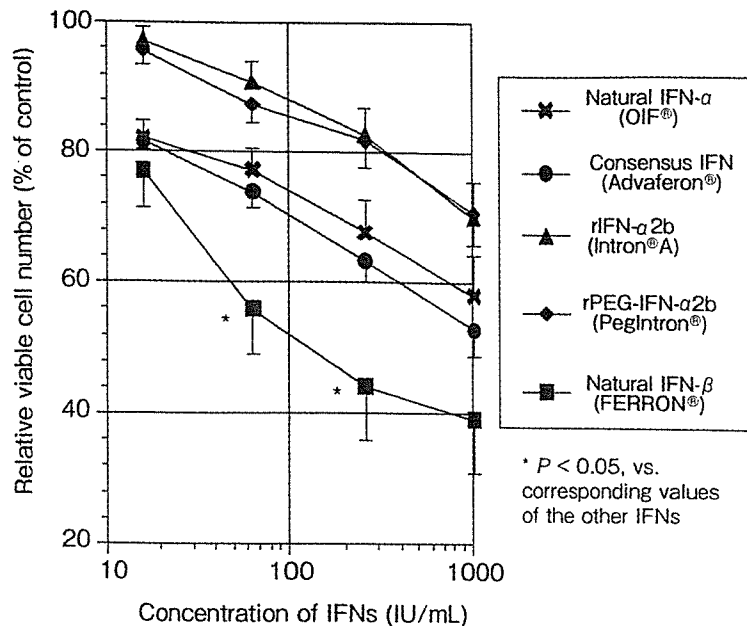


図3 4種類のIFN- α 製剤(ヒト天然型IFN- α , コンセンサスIFN, IFN- α 2b, PEG-IFN- α 2b)と1種類の天然型IFN- β 製剤の肝癌細胞株に対する増殖抑制作用

13種類の肝癌細胞株を16~1,024 IU/mLの各種IFN製剤添加培地で96時間培養し、各種IFN製剤に関してIFN- α 非添加培養(コントロール)と比較した生細胞数の割合(%)を算出した。さらに、IFN製剤毎に13株の生細胞数の割合の平均値を算出しプロットしたものを図に示す。IFN- β の平均値がいずれの測定時間でも最も低く、最も強い増殖抑制作用を示していた。値は、平均値 \pm 標準誤差を示す。

天然型IFN- β では、10株であった(未発表データ)。これらの細胞株の50%増殖抑制濃度(IC50)は、ヒト天然型IFN- α では、86~466 IU/mL, コンセンサスIFNでは、128~804 IU/mL (0.128~0.804 ng/mL), IFN- α 2bでは、628~919 IU/mL, PEG-IFN- α 2bでは、832~839 IU/mL, 天然型IFN- β では、15~153 IU/mLであり、IFN- α 2bとPEG-IFN- α 2bのIC50値は、他より高く、逆にIFN- β のIC50値は最も低かった。IFNの製剤別の増殖抑制作用を13株の平均値で比較すると、天然型IFN- β , コンセンサスIFN, 天然型IFN- α , PEG-IFN- α 2b・IFN- α 2bの順に強い作用を認めた(図3)。特に、天然型IFN- β では、経時的に増殖抑制作用が増大し、接触96時間後では、低濃度でも比較的強い増殖抑制効果が見られた。PEG-

IFN- α 2bやIFN- α 2bの増殖抑制作用が比較的低いと言う結果は、上記の5種類のサブタイプの中でIFN- α 2の増殖抑制作用が比較的低いという結果とよく一致していた。

各種IFNを肝癌細胞の培地に添加し、48から72時間培養し細胞形態を観察すると細胞質の縮小や核の濃縮・核の断片化など、アポトーシスに特徴的な細胞像の出現が認められた。またこのような細胞からDNAを採取しアガロースゲル内で電気泳動すると、アポトーシスの生化学的なマーカーであるDNA ladderの形成が認められた(図4)。アポトーシス誘導は、使用したIFNの種類、濃度、そして細胞株により差を認めるものの、最低でも13株中10株で認められた^{12, 15, 17)}。IFN- α 誘導性アポトーシスでは、caspase-9, caspase-8, caspase-7, caspase-3の活性化と共に

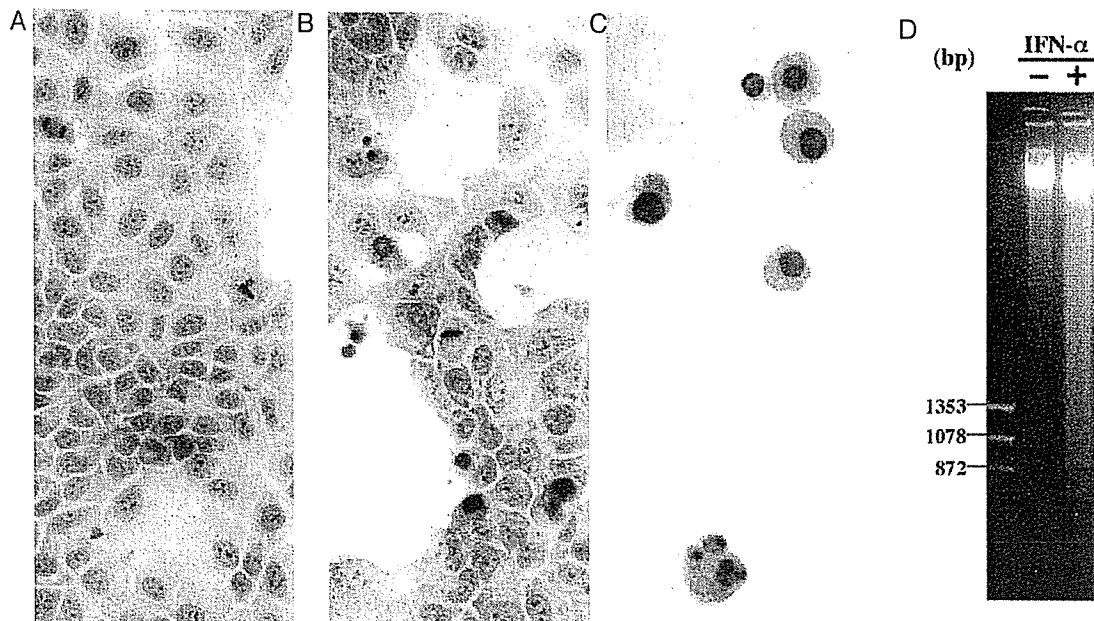


図4 ヒト天然型IFN- α の肝癌細胞株に対するアポトーシス誘導

A～CにIFN- α 添加あるいは非添加培養時の肝細胞癌細胞株KIM-1株の細胞形態を示す(A: IFN- α 非添加培養, 200倍; B: 1,000 IU/mL IFN- α 添加培養, 200倍; C: Bの強拡大, 400倍, ヘマトキシリン・エオジン染色). Dは, IFN- α 添加によりアポトーシスの生化学的指標であるDNAラダーの出現を認める.

cytochrome cやSmac/DIABLOのミトコンドリアから細胞質への放出がみられ, ミトコンドリア系のアポトーシス誘導経路の関与が示唆されるが¹³⁾, TRAILやTRAIL-R1, -R2などの発現亢進も見られており(未発表データ)デスリガンド-デスレセプターを介した経路の関与も考えられ, 今後更なる検討が必要である. アポトーシス誘導以外の増殖抑制の機序としてすべての細胞株で細胞周期の進行停止誘導が認められ, S期での停止誘導が11株, G₂/M期での停止誘導が1株, G₁期での停止誘導が1株で認められた¹²⁾.

5

IFN- α 製剤製剤の肝癌細胞株に対する*in vivo*の増殖抑制作用と増殖抑制機序

肝細胞癌細胞株HAK-1B¹⁹⁾をヌードマウスの皮下に接種し, 約1週間後5～10 mmの腫瘍径の腫瘍が形成された時点から, 各種

IFN- α 製剤を投与し*in vivo*における増殖抑制作用の検討を行った. IFN- α あるいはコンセンサスIFN- α に関しては, C型慢性肝炎患者の治療に使用される投与量にほぼ相当する量(臨床量)(天然型IFN- α : 4,000 IU/mouse, 2.0×10^5 IU/kg; コンセンサスIFN: 0.01 μ g/mouse, 0.5 μ g/kg), その10倍量あるいは100倍量を14日間連日マウスの皮下に接種し, 腫瘍の経時的な推定体積や, 15日目に摘出された腫瘍の組織像を比較検討した. その結果, 14日目の腫瘍体積は, IFN- α の臨床量投与によりIFN- α を投与しなかったマウス(コントロール)に比べ, 天然型IFNで30%前後(未発表データ), コンセンサスIFNで40%前後減少し¹⁷⁾, 100倍量投与したマウスではいずれのIFNでも腫瘍がほぼ消失した. コンセンサスIFNを投与されたマウスの腫瘍組織では, 肝癌細胞のアポトーシス数が増加し, 腫瘍内血管の減少も認めら

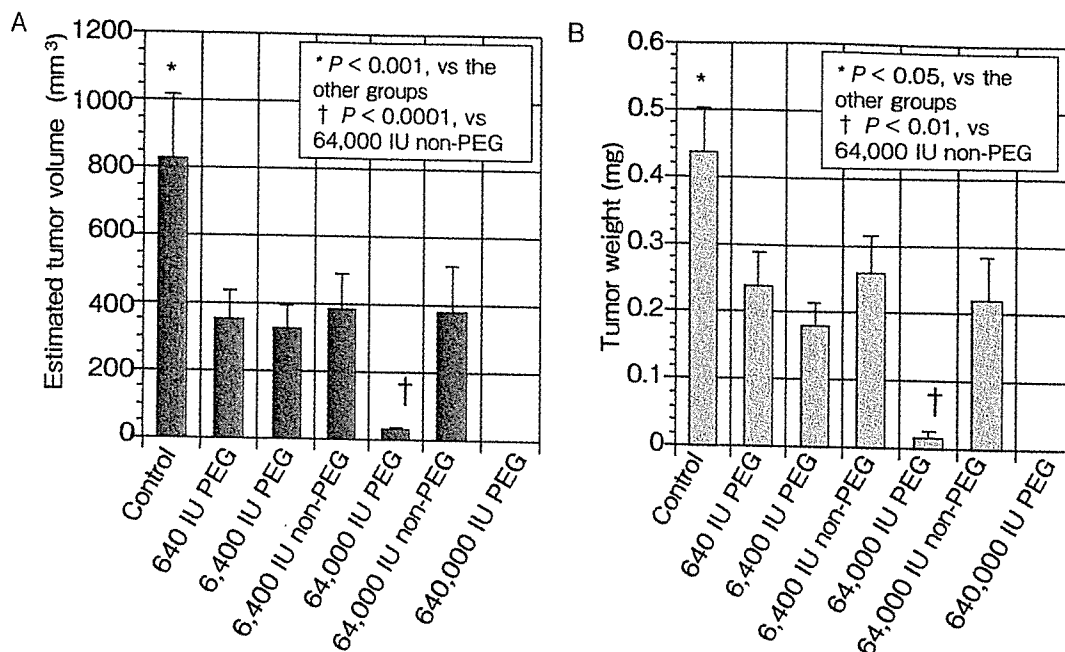


図5 PEG-IFN- α 2bとIFN- α 2bの*in vivo*における抗腫瘍効果の比較

ヌードマウス皮下にヒト肝癌腫瘍を作成し、640、6,400、64,000、640,000 IUのPEG-IFN- α 2b、6,400 IU、64,000 IUのIFN- α 2bあるいは培養液(コントロール)を1週間に2回、合計4回ヌードマウスの皮下に接種し、腫瘍の腫瘍体積(A)および腫瘍重量(B)をそれぞれIFN接種開始から14日目と15日目に比較した。同じ活性のPEG-IFN- α 2bとIFN- α 2b投与では、PEG-IFN- α 2b投与の方が腫瘍の体積および重量ともに低い値を呈した。640 IU PEG-IFN- α 2bのヌードマウスへの投与は、C型慢性肝炎の治療にヒトに使用する量に相当。PEGは、PEG-IFN- α 2b、non-PEGは、IFN- α 2bの略。値は、平均値 \pm 標準誤差を示す。

れた。このように、これらIFN- α 製剤は臨床量で肝癌の増殖を抑制し、その増殖抑制機序としてアポトーシスの誘導と血管新生抑制が示唆された¹⁷⁾。

次に、PEG-IFN- α 2bについて検討を行った。PEG-IFN- α 2bは、PEG化により吸収・排泄速度が低下し、通常のIFNに比べ生物学的半減期が数倍延長する結果、長時間IFN- α 2bの血液濃度が維持されるという特徴を有する。臨床量の1/3量(640 IU/mouse, 3.2×10^4 IU/kg)、その10倍、100倍、1,000倍量を1週間に2回、合計4回皮下に投与し腫瘍の経時的な推定体積や、15日目に摘出された腫瘍の重量や組織像を比較した。その結果、臨床量の1/3量の投与でコントロールに比べ約50%前後、腫瘍の体積および重量が

減少した(図5)。増殖抑制機序としては、アポトーシスの誘導を認めたが、血管新生抑制は確認できなかった。PEG-IFN- α 2bと同じ活性(IU)のIFN- α 2bを同様の方法で投与し抗腫瘍作用をPEG-IFN- α 2bを投与した場合と比較すると、PEG-IFN- α 2bを投与した方が、腫瘍のアポトーシス誘導は高度であり、有意により強い抗腫瘍作用を認めた(図5、図6)。*in vitro*では、PEG-IFN- α 2bはIFN- α 2bと同程度に増殖抑制効果が最も低いIFN- α 製剤であったが、PEG化により長時間血中IFN- α 2bの濃度が維持されたことにより、肝癌細胞に持続的に作用し、非PEG化IFN- α 2bや他のIFN- α 製剤より強い増殖抑制作用を発揮したと推察される¹⁵⁾。

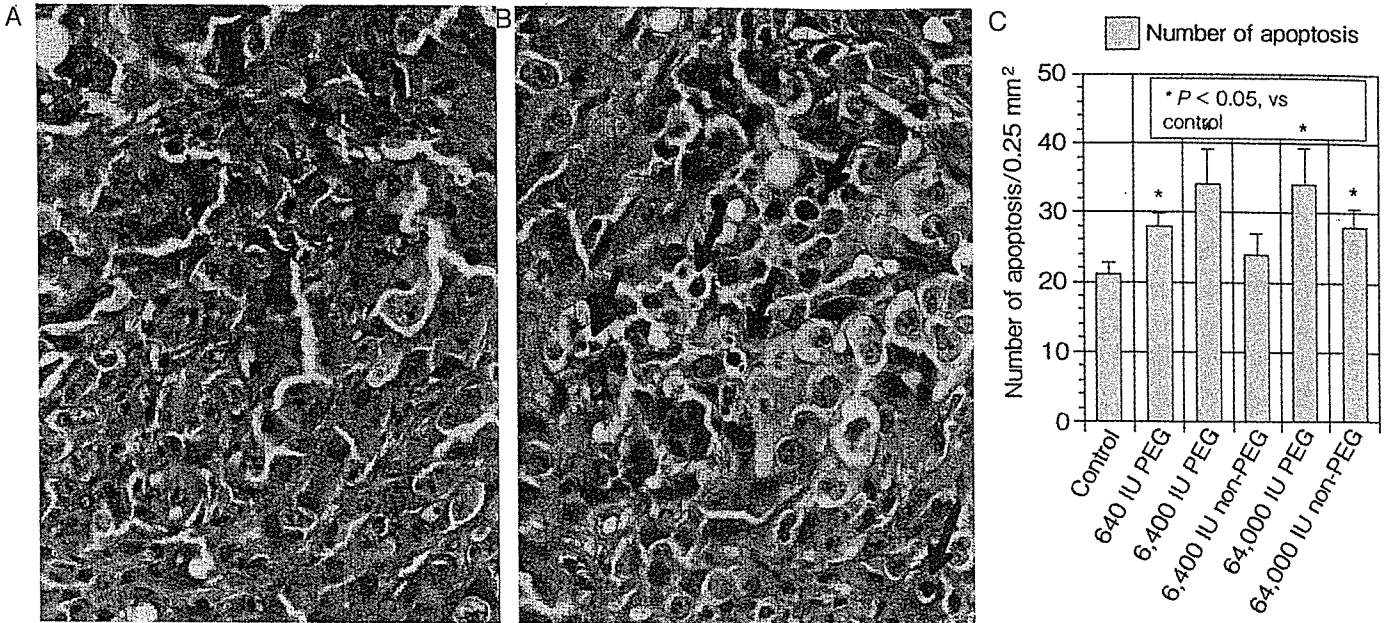


図6 PEG-IFN- α 2bあるいはIFN- α 2bのヌードマウス皮下移植ヒト肝癌腫瘍組織に対する作用

ヌードマウス皮下にヒト肝癌腫瘍を作成し、640, 6,400, 64,000, 640,000 IUのPEG-IFN- α 2b, 6,400 IU, 64,000 IUのIFN- α 2bあるいは培養液(コントロール)を1週間に2回、合計4回ヌードマウスの皮下に接種し、15日目に切除した腫瘍からHE染色標本を作製し、腫瘍細胞のアポトーシスを測定した。A, Bに、腫瘍の組織像(200倍、ヘマトキシリン・エオジン染色)を示す。コントロール(A)に比べ、6,400 IU PEG-IFN- α 2b投与マウス(B)の腫瘍組織にアポトーシスの出現が目立つ。Cには、各種活性のPEG-IFN- α 2bあるいはIFN- α 2bを投与されたマウスおよびコントロールマウスの皮下腫瘍の癌細胞のアポトーシス数の測定結果を示す。PEG-IFN- α 2bあるいはIFN- α 2bの投与量が増えるとアポトーシス数は増加し、同じ活性では、IFN- α 2bに比べPEG-IFN- α 2bの方がアポトーシス数は増加している。64,000 IU PEG-IFN- α 2b投与マウスは、腫瘍が消失したため測定値なし。値は、平均値 \pm 標準誤差を示す。

6 おわりに

これまでのわれわれの検討により、肝癌細胞がIFN- α の作用発現に重要なI型IFNのレセプターを発現していること、IFN- α が、*in vitro*では、肝癌細胞株に対しアポトーシス・細胞周期の進行停止などを誘導し直接的に増殖を抑制すること、*in vivo*では、臨床量のIFN投与でも、アポトーシス誘導などにより抗腫瘍作用がもたらされることが明らかとなった。ヒトの肝細胞癌および非癌部組織は、比較的高頻度にIFNAR-2鎖を発現しており¹⁶⁾、今回の実験結果から、IFN投与による肝発癌・再発抑制機序の一つとしてIFNによる直接的抗腫瘍作用が考えられる。また、血

清AFP持続高値のC型慢性肝炎患者がIFN投与後に血清AFP値が低下する機序が、臨床的に不顕性な初期の段階の肝癌細胞のIFNによる直接的排除である可能性も推察される。

文献

- 1) Pestka S, Langer JA, Zoon KC et al : Interferons and their actions. *Ann Rev Biochem* 56 : 727-777, 1987
- 2) Gutterman JU : Cytokine therapeutics: lessons from interferon α . *Proc. Natl Acad Sci USA* 91 : 1198-1205, 1994
- 3) Kashiwagi K, Furusyo N, Kubo N et al : A prospective comparison of the effect of interferon-alpha and interferon-beta treatment in patients with chronic hepatitis C on the incidence of hepatocel-

- lular carcinoma development. *J Infect Chemother* 9 : 333-340, 2003
- 4) Mazzella G, Accogli E, Sottili S et al : Alpha interferon treatment may prevent hepatocellular carcinoma in HCV-related liver cirrhosis. *J Hepatol* 24 : 141-147, 1996
 - 5) Nishiguchi S, Kuroki T, Nakatani S et al : Randomised trial of effects of interferon-*a* on incidence of hepatocellular carcinoma in chronic active hepatitis C with cirrhosis. *Lancet* 346 : 1051-1055, 1995
 - 6) Kubo S, Nishiguchi S, Hirohashi K et al : Effects of long-term postoperative interferon-alpha therapy on intrahepatic recurrence after resection of hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. A randomized, controlled trial. *Ann Intern Med* 134 : 963-967, 2001
 - 7) Ikeda K, Arase Y, Saitoh S et al : Interferon beta prevents recurrence of hepatocellular carcinoma after complete resection or ablation of the primary tumor-A prospective randomized study of hepatitis C virus-related liver cancer. *Hepatology* 32 : 228-232, 2000
 - 8) Obi S, Yoshida H, Toune R et al : Combination therapy of intraarterial 5-fluorouracil and systemic interferon-alpha for advanced hepatocellular carcinoma with portal venous invasion. *Cancer* 106 : 1990-1997, 2006
 - 9) Sakon M, Nagano H, Dono K et al : Combined intraarterial 5-fluorouracil and subcutaneous interferon-alpha therapy for advanced hepatocellular carcinoma with tumor thrombi in the major portal branches. *Cancer* 94 : 435-442, 2002
 - 10) Ikeda K, Saitoh S, Koida I et al : A multivariate analysis of risk factors for hepatocellular carcinogenesis: a prospective observation of 795 patients with viral and alcoholic cirrhosis. *Hepatology* 18 : 47-53, 1993
 - 11) Murashima S, Tanaka M, Haramaki M et al : A decrease in AFP level related to administration of interferon in patients with chronic hepatitis C and a high level of AFP. *Dig Dis Sci* 51 : 808-812, 2006
 - 12) Yano H, Iemura A, Haramaki M et al : Interferon alfa receptor expression and growth inhibition by interferon alfa in human liver cancer cell lines. *Hepatology* 29 : 1708-1717, 1999
 - 13) Yano H, Ogasawara S, Momosaki S et al : Expression and activation of apoptosis-related molecules involved in interferon-*a*-mediated apoptosis in human liver cancer cells. *Int J Oncol* 26 : 1645-1652, 2005
 - 14) Yano H, Yanai Y, Momosaki S et al : Growth inhibitory effects of interferon-*a* subtypes vary according to human liver cancer cell lines. *J Gastroenterol Hepatol* 21 : 1720-1725, 2006
 - 15) Yano H, Ogasawara S, Momosaki S et al : Growth inhibitory effects of pegylated IFN *a*-2b on human liver cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *Liver Int* 26 : 964-975, 2006
 - 16) Takayama A, Yano H, Ogasawara S et al : Expression of Hu-IFN-*a* R2 chain of Type I interferon receptor in human hepatocellular carcinoma and non-cancerous tissues. *Int J Mol Med* 6 : 621-627, 2000
 - 17) Hisaka T, Yano H, Ogasawara S et al : Interferon-*a* Con1 suppresses proliferation of liver cancer cell lines *in vitro* and *in vivo*. *J Hepatol* 41 : 782-789, 2004
 - 18) 大塚浩史, 山岡 隆 : IFN-aおよびb (wを含む). インターフェロン—その研究の歩みと臨床応用への可能性—. 総監修 岸田綱太郎, 編集 今西二郎. (株) ライフ・サイエンス, 東京, 1998
 - 19) Yano H, Iemura A, Fukuda K et al : Establishment of two distinct human hepatocellular carcinoma cell lines from a single nodule showing clonal dedifferentiation of cancer cells. *Hepatology* 18 : 320-327, 1993

*

*

*