

- expression and growth inhibition by interferon alfa in human liver cancer cell lines. *Hepatology*, 29 : 1708 - 1717, 1999
- 11) Yano H, Basaki Y, Oie S, Ogasawara S, Momosaki S, Akiba J, Nishida N, Kojiro S, Ishizaki H, Moriya F, Kuratomi K, Fukahori S, Kuwano M, Kojiro M : Effects of IFN- α on α -fetoprotein expressions in hepatocellular carcinoma cells. *J Interferon Cytokine Res*, 27 : 231 - 238, 2007
 - 12) Yano H, Ogasawara S, Momosaki S, Akiba J, Kojiro S, Fukahori S, Ishizaki H, Kuratomi K, Basaki Y, Oie S, Kuwano M, Kojiro M : Growth inhibitory effects of pegylated IFN α -2b on human liver cancer cells in vitro and in vivo. *Liver Int*, 26 : 964 - 975, 2006
 - 13) Yano H, Ogasawara S, Momosaki S, Akiba J, Nishida N, Kojiro S, Ishizaki H, Kojiro M : Expression and activation of apoptosis - related molecules involved in interferon - α - mediated apoptosis in human liver cancer cells. *Int J Oncol*, 26 : 1645 - 1652, 2005
 - 14) Yano H, Yanai Y, Momosaki S, Ogasawara S, Akiba J, Kojiro S, Moriya F, Fukahori S, Kuruimoto M, Kojiro M : Growth inhibitory effects of interferon - α subtypes vary according to human liver cancer cell lines. *J Gastroenterol Hepatol*, 21 : 1720 - 1725, 2006
 - 15) Takayama A, Yano H, Ogasawara S, Higaki K, Kojiro M : Expression of Hu-IFN - α R2 chain of Type I interferon receptor in human hepatocellular carcinoma and non - cancerous tissues. *Int J Mol Med*, 6 : 621 - 627, 2000
 - 16) Hisaka T, Yano H, Ogasawara S, Momosaki S, Nishida N, Takemoto Y, Kojiro S, katafuchi Y, Kojiro M : Interferon - α Con1 suppresses proliferation of liver cancer cell lines in vitro and in vivo. *J Hepatol*, 41 : 782 - 789, 2004
 - 17) Domanski P, Witte M, Kellum M, Rubinstein M, Hackett R, Pitha P, Colamonici OR : Cloning and expression of a long form of the β subunit of the interferon $\alpha\beta$ receptor that is required for signaling. *J Biol Chem*, 270 : 21606 - 21611, 1995
 - 18) Lutfalla G, Holland SJ, Cinato E, Monneron D, Reboul J, Rogers NC, Smith JM, Stark GR, Gardiner K, Mogensen KE, Kerr IM, Uzé G : 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*, 14 : 5100 - 5108, 1995
 - 19) 大塚浩史, 山岡 隆 : IFN- α および β (ω 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), 第1版, 東京, (株) ライフ・サイエンス, p.24 - 29, 1998
 - 20) Ogasawara S, Yano H, Momosaki S, Akiba J, Nishida N, Kojiro S, Moriya F, Ishizaki H, Kuratomi K, Kojiro M : Growth inhibitory effects of IFN - β on human liver Cancer cells in vitro and *in vivo*. *J Interferon Cytokine Res*. in press : 2007
 - 21) Yano H, Iemura A, Fukuda K, Mizoguchi A, Haramaki M, Kojiro M : Establishment of two distinct human hepatocellular carcinoma cell lines from a single nodule showing clonal dedifferentiation of cancer cells. *Hepatology*, 18 : 320 - 327, 1993
 - 22) Ikeda K, Saitoh S, Koida I, Arase Y, Tsubota A, Chayama K, Kumada H, Kawanishi M : 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

- 23) Murashima S, Tanaka M, Haramaki M, Nakashima Y, Harada K, Ide T, Kumashiro R, Sata M : 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
- 24) Nakao K, Nakata K, Mitsuka S, Ohtsuru A, Ido A, Hatano M, Sato Y, Nakayama T, Shima M, Kusumoto Y, Koji T, Tamaoki T, Nagataki S : Transforming growth factor β 1 differentially regulates α -fetoprotein and albumin in HuH-7 human hepatoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 174 : 1294 - 1299, 1991
- 25) Hatano M, Nakata K, Nakao K, Tsutsumi T, Ohtsuru A, Nakamura T, Tamaoki T, Nagataki S : Hepatocyte growth factor down-regulates the α -fetoprotein gene expression in PLC/PRF/5 human hepatoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 189 : 385 - 391, 1992
- 26) Nakata K, Motomura M, Nakabayashi H, Ido A, Tamaoki T : A possible mechanism of inverse developmental regulation of α -fetoprotein and albumin genes. Studies with epidermal growth factor and phorbol ester. *J Biol Chem*, 267 : 1331 - 1334, 1992
- 27) Nakabayashi H, Watanabe K, Saito A, Otsuru A, Sawadaishi K, Tamaoki T : Transcriptional regulation of α -fetoprotein expression by dexamethasone in human hepatoma cells. *J Biol Chem*, 264 : 266 - 271, 1989

肝細胞癌に対するインターフェロンの効果—基礎的検討から

矢野 博 久 神代 正道¹⁾

要旨: C型慢性肝炎の治療に使用されている5種類のI型インターフェロン(IFN- α , IFN- β)製剤の肝癌細胞の増殖に対する作用を検討した。*In vitro*の細胞増殖抑制作用は、IFN製剤により異なり、IFN- β 製剤が最も強かった。IFNの増殖抑制の主な機序は、アポトーシス誘導や細胞周期進行停止誘導であった。ヌードマウス皮下移植ヒト肝癌組織を用いて*in vivo*におけるIFN製剤の抗腫瘍作用を検討したが、臨床投与量に相当する量のIFN投与により最大50%程度腫瘍の縮小を認めた。*In vitro*で増殖抑制効果が低いIFN製剤でも、PEG化により*in vivo*では増殖抑制作用が増加した。C型慢性肝炎患者へのIFN製剤投与は、ウイルス駆除や肝機能の改善効果のみではなく、極初期のまだ不顕性な段階の肝癌細胞に対して直接的に増殖抑制作用を示し、発癌抑制に寄与する可能性も考えられる。

索引用語: 肝細胞癌, インターフェロン, アポトーシス, α -フェトプロテイン, レセプター

はじめに

インターフェロン(IFN)は、長野・小島によりウイルス抑制因子として1954年に発見され、1957年にイギリスのIsaacsとLindenmannにより、ウイルス増殖における干渉現象を担う因子の意味を込めてIFNと命名された。IFNは、抗ウイルス作用の他、細胞増殖抑制作用、血管新生抑制作用、免疫応答調節作用、抗テロメラーゼ作用など、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⁾。IFN- α には、後述するように多数のサブタイプおよび分子種が存在し、臨床的に使用されているIFN- α 製剤に含まれるサブタイプも製剤毎に若干異なっている。I型とII型のIFNが、それぞれ細胞表面の特異的なレセプターであるI型IFNレセプター(IFNAR)とII型IFNレセプター(IFNGR)に結合することによりシグナルが細胞内に伝わり、共通あるいは別々の遺伝子の発現を誘導する²⁾。 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、メラノーマ、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³⁾。

C型慢性肝炎は、ウイルスの持続感染による肝臓の炎症とともに線維化が進展し、肝硬変、更に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⁴⁾⁻⁶⁾。更に、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⁷⁾⁸⁾、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⁹⁾¹⁰⁾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十分に解明されていないのが現状である。IFNには、細胞増殖抑制作用があることから、

1) 久留米大学医学部病理学講座

Effects of interferon on hepatocellular carcinoma—basic experimental studies
Hirohisa YANO and Masamichi KOJIRO¹⁾

1) Department of Pathology, Kurume University School of Medicine

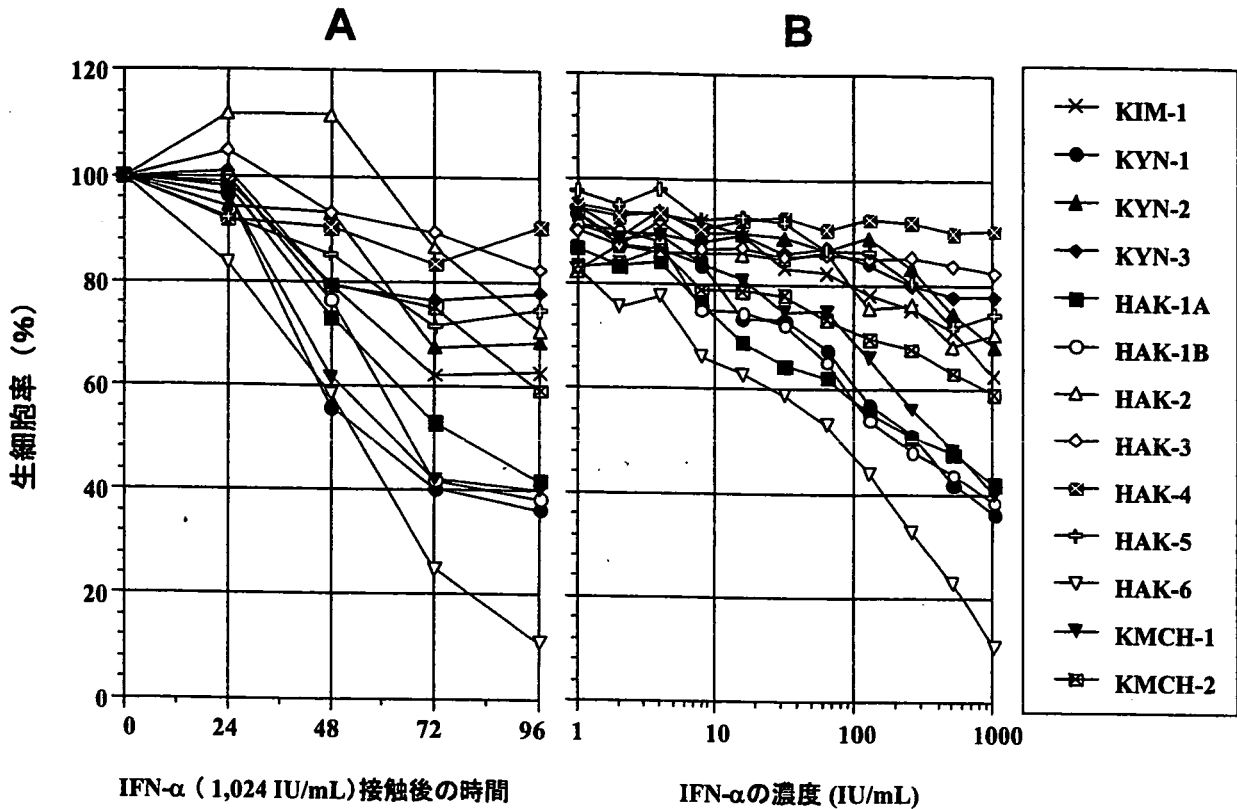


Figure 1. ヒト天然型 IFN- α 製剤 (OIF[®]) の 13 種類の肝癌細胞株に対する増殖抑制作用. A: 13 種類の肝癌細胞株を 1024 U/mL の IFN- α 添加培地で 24 ~ 96 時間培養した際の生細胞率 (IFN- α 非添加培養 [コントロール] と比較した生細胞数の割合 [%]) を示す. B: 13 種類の肝癌細胞株を 1 ~ 1024 U/mL の IFN- α 添加培地で 96 時間培養後の生細胞率を示す.

肝癌細胞に対して直接的に作用して、発癌抑制や抗癌作用を示している可能性も考えられる。

われわれは、I 型 IFN の肝癌細胞に対する作用を明らかにするために、肝癌細胞の IFNAR の発現、臨床的に使用されている種々の I 型 IFN 製剤の肝癌細胞増殖抑制作用とその作用機序などに関して、培養肝癌細胞を使用し *in vitro* や *in vivo* で検討を行って来た^{11)~18)}。

本稿では、われわれの一連の研究成果を中心に、その一部を以下に紹介する。

1 肝細胞癌における I 型 IFN レセプターの発現

I 型 IFN が、その種々の作用を発現するためには、標的細胞上における IFNAR の発現が必須である。IFNAR は、IFNAR-1 鎖と IFNAR-2 鎖の 2 つから構成されており、IFNAR-2 鎖には、IFNAR-2a、-2b、-2c の 3 種類があるが、IFNAR-2c が、インターフェロンとの結合ユニットであ

り IFN の作用発現には最も重要といわれている。IFNAR-1 鎖は、高親和性のレセプターを形成するために必要なユニットであるといわれている¹²⁾¹⁹⁾²⁰⁾。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 種類の混合型肝癌細胞株の合計 13 株の肝癌の細胞株の IFNAR-1 鎖と IFNAR-2 鎖の発現を検討した。まず、RT-PCR 法を用いて mRNA レベルの IFNAR-1 鎖と IFNAR-2c 鎖の発現を検討したところ、すべての細胞株でこれらの発現が確認された。次に、細胞表面の IFNAR-2 鎖の発現を蛋白レベルで検討すると 13 株中 12 株で種々の程度に発現が確認された¹¹⁾。更に、われわれは 69 例の手術切除肝癌およびその非癌部組織における IFNAR-2 鎖の発現に関しても免疫組織化学的に検討を行った。その結果、非癌部では 61 例 (88%) に発現を認めしたが、慢性肝炎と肝硬変で発現に差を認めなかった¹²⁾。12 症例の正常

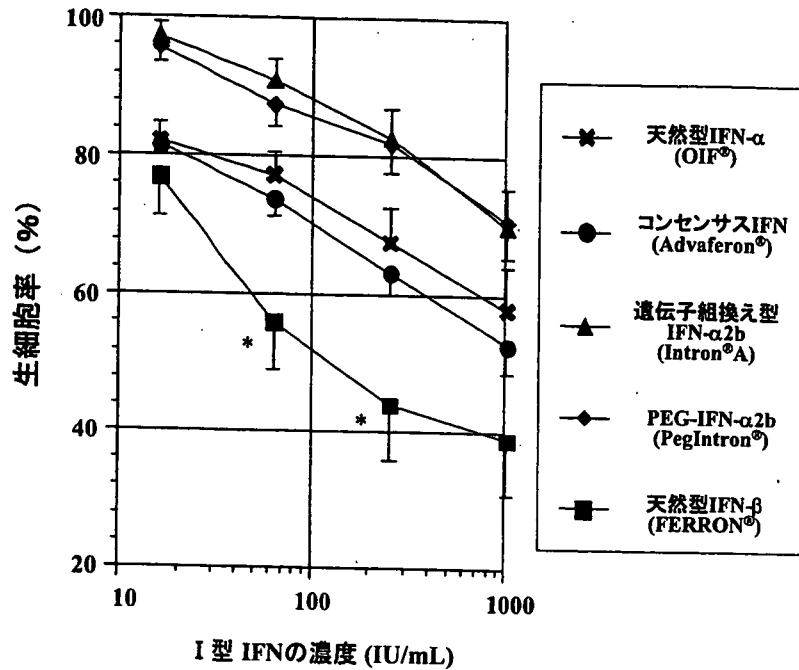


Figure 2. 4 種類の IFN- α 製剤 (ヒト天然型 IFN- α , コンセンサス IFN, IFN- α 2b, PEG-IFN- α 2b) と 1 種類の天然型 IFN- β 製剤の肝癌細胞株に対する増殖抑制作用. 13 種類の肝癌細胞株を 4 ~ 1024 IU/mL の各種 IFN 製剤添加培地で 96 時間培養し, IFN 非添加培養 (コントロール) と比較した生細胞数の割合 (%) を算出した後, IFN 製剤毎に 13 株の生細胞率の平均値を算出しプロットしたものを図に示す. IFN- β の平均値がいずれの測定時間でも他の IFN に比べ有意に ($P < 0.05$) 低い値を示し, 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.

肝組織における IFNAR-2 鎖の発現を検討すると, 発現はみられず, 非腫瘍性の肝組織における IFNAR-2 鎖の発現とウイルス感染による炎症との関連性が示唆された. 癌部では 69 例中 53 例 (77%) に発現が認められた¹²⁾. Kondo ら²¹⁾ の検討では, 91 例中 59 例 (61%) に肝細胞癌部での発現を認めており, 肝細胞癌の分化度と IFNAR-2 鎖の発現の間に有意な相関性を認めている. われわれの検討では, 肝細胞癌の分化度・被膜侵襲・門脈侵襲・肝内転移などの病理学的なパラメーターと IFNAR-2 鎖の発現との間に関連性は認めなかった. Ota ら²²⁾ によると, 食道, 胃, 大腸, 胆管および膵臓の癌組織における IFNAR-2 の発現率は, 20~45% 程度であり, 肝癌では, 比較的高頻度に IFNAR-2 鎖を発現していることが明らかとなった.

II 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

リンパ芽球 BALL-1 細胞由来の天然型 IFN- α (1024U/mL, OIF®) を前述の 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 (Figure 1A)¹¹⁾. また, 1~1024U/mL の濃度において, 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 (Figure 1B). IFN- α の増殖抑制作用に対する感受性と細胞株の分化度との間に関連性は認めなかった. また, 細胞表面の IFNAR-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, ある程度以上 IFNAR-2 鎖の発現がある細胞株では, IFNAR-2 鎖の発現量とは関連性なく, 種々のレベルで増殖抑制作用を認めたが, IFNAR-2 鎖の発現が極端に低い細胞は, 増殖抑制作用は乏しかった¹¹⁾. 臨床的にも, 門脈腫

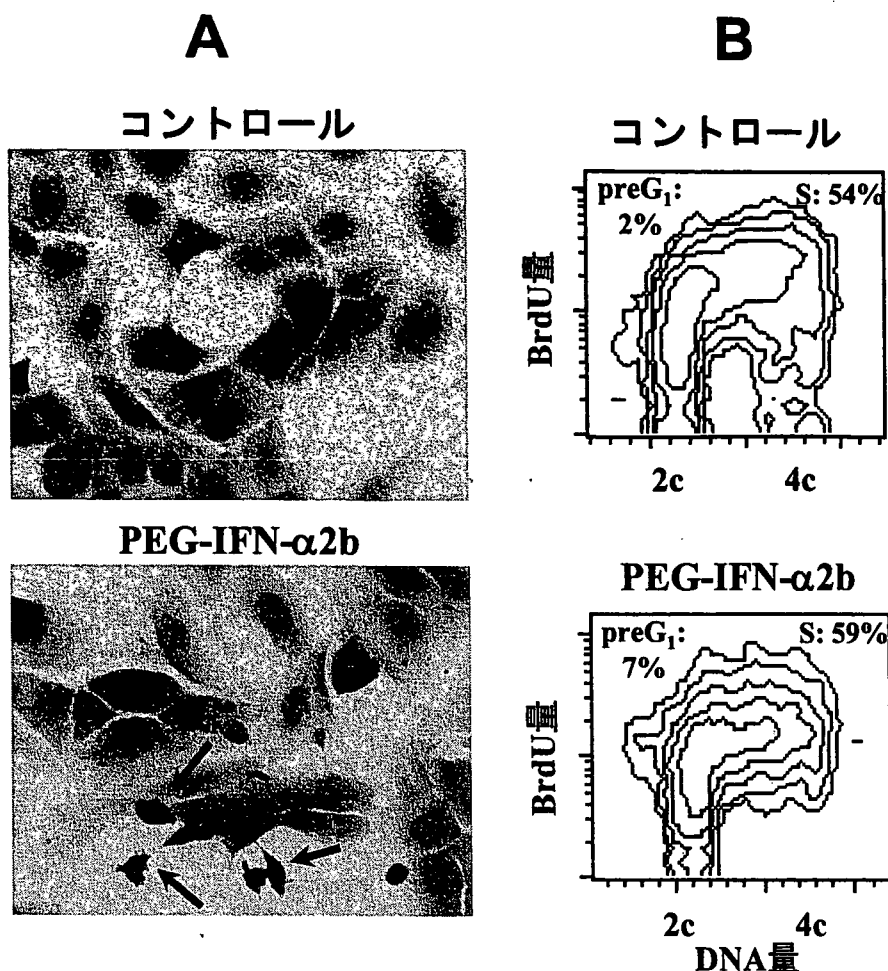


Figure 3. A:ヒト天然型 PEG-IFN- α 2b 添加あるいは非添加培地で72時間培養後の肝癌細胞株 HAK-B の細胞像 (上:PEG-IFN- α 2b 非添加培養, 200 倍;下:1000 IU/mL PEG-IFN- α 2b 添加培養, 200 倍, ヘマトキシリン・エオジン染色). B:PEG-IFN- α 2b 添加あるいは非添加培地で72時間培養後の肝癌細胞株 HAK-1B の細胞周期の解析結果 (上:PEG-IFN- α 2b 非添加培養;下:1000 IU/mL PEG-IFN- α 2b 添加培養). PEG-IFN- α 2b 添加培養細胞で, アポトーシス集団を示す preG₁期の細胞集団の増加と S 期の細胞集団の増加を認める.

瘍栓をとまなうような高度進行肝細胞癌症例に対する IFN- α 全身投与併用 5-FU 肝動注化学療法の有効性と肝癌細胞の IFNAR-2 鎖の発現が有意に関連しており, IFNAR-2 鎖の発現がない症例は, 有意に生存率が低かったと Ota ら²³⁾は報告している.

III 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 種類の活性強度の異なるサブタイプ遺伝子 (α 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 13, 14, 16, 17, 21) や 28 種類の分子種が報告されている. 各サブタイプ分子が構造的

に極めて類似しており, サブタイプ間でアミノ酸レベルは 80% のホモロジーがある. 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タイプ間で差があると報告されている²⁴⁾. 天然型 IFN- α は, 複数のサブタイプから構成されるのが特徴であり, 上記実験に使用した天然型 IFN- α の成分は, 約 75% が α 2 で, 残り 25% が α 8 で構成されている. 肝癌細胞においても, IFN- α サブタイプの種類によって増殖抑制作用が異なるかどうかを明らかにするため, 5 種類のリコンビナ

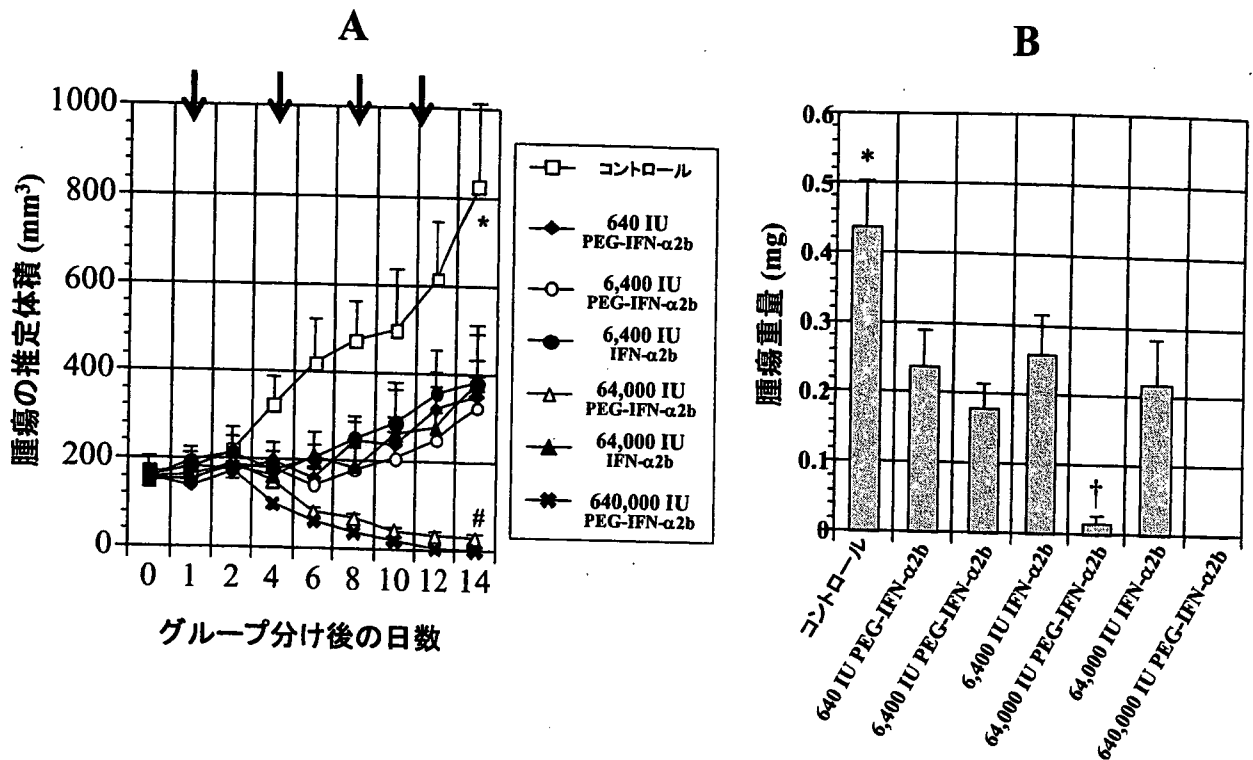


Figure 4. PEG-IFN- α 2b と IFN- α 2b の *in vivo* における抗腫瘍効果の比較. ノードマウス皮下にヒト肝癌腫瘍を作成し, 640, 6400, 64000, 640000 IU の PEG-IFN- α 2b, 6400 IU, 64000 IU の IFN- α 2b あるいは培養液 (コントロール) を1週間に2回, 合計4回ノードマウスの皮下に接種し (矢印), 腫瘍体積の経時的変化 (A) および15日目に切除された腫瘍重量 (B) を示す. IFN を投与されたマウスの腫瘍の体積・重量は, コントロールに比べ有意 ($*P < 0.05 \sim 0.001$) に低値であった. 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 ($\dagger P < 0.01$, vs 64000 IU IFN- α 2b). 640 IU PEG-IFN- α 2b のノ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の 1/3 の量に相当する. 値は, 平均値 \pm 標準誤差を示す.

ント IFN- α 1, 2, 5, 8, 10 を使用し, その増殖抑制作用を検討した. 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 α 5 と α 8 に高感受性を示す細胞株が多いことが判明した¹⁵⁾. サブタイプ別の増殖抑制効果を13株の平均値で比較すると, α 5 が終始効果が最も強く, 次いで α 8, α 10, α 2, α 1 の順であった. α 5 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. サブタイプに関する *in vitro* の実験結果は, 多くの肝癌症例に対してより強い発癌抑制作用や抗腫瘍作用を誘導するには, α 5 や α 8 を多く含有する IFN- α の使用が有用である可能性を示唆している.

IV IFN- α 製剤および IFN- β 製剤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

現在日本において臨床的に使用されている IFN 製剤は, 天然型と遺伝子組換え型に大きく二分される. 天然型の I 型 IFN 製剤としては, 上記実験で使用したリンパ芽球 BALL-1 細胞由来の IFN- α (OIF[®]) や線維芽細胞由来の IFN- β (FER-RO[®]) がある. 遺伝子組換え型の IFN としては, IFN- α 2b (Intron[®]A), コンセンサス配列を基に人工的に合成されたコンセンサス IFN (rIFN- α Con1, Advaferon[®]), 遺伝子組換え型 IFN- α 2b あるいは IFN- α 2a にポリエチレングリコール (PEG) を結合させた PEG-IFN- α 2b (PegIntron[®]) や PEG-IFN- α 2a (PEGASYS[®]) がある. これらの IFN の中から PEG-IFN- α 2a を除く, 4 種類の IFN- α 製剤と, 1 種類の IFN- β 製剤を用

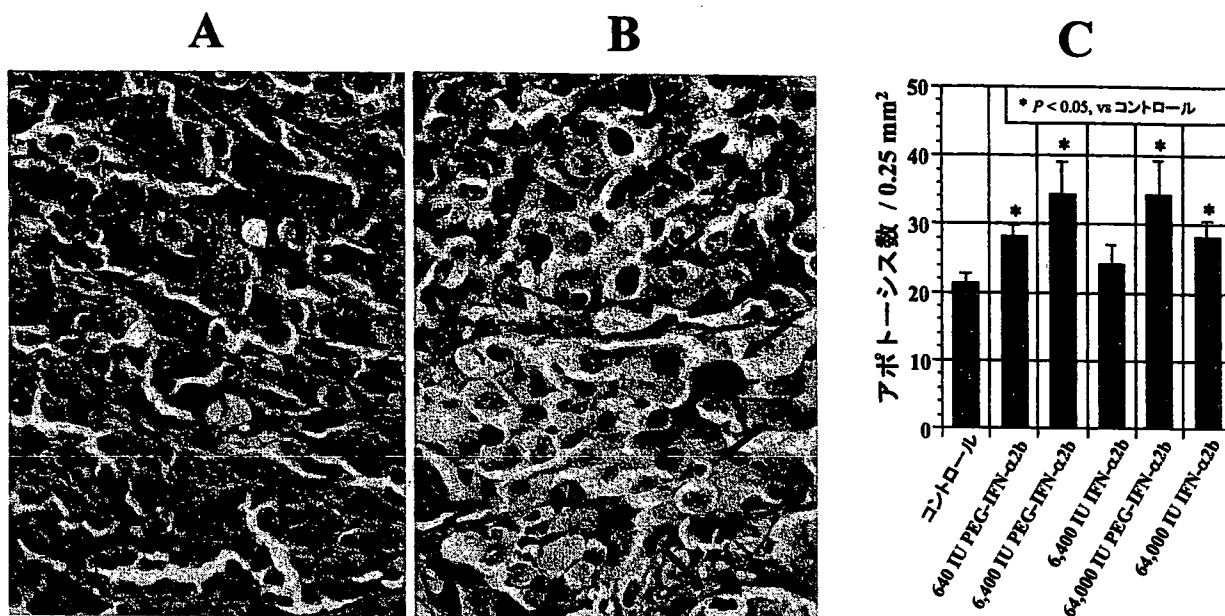


Figure 5. PEG-IFN- α 2bあるいはIFN- α 2bのヌードマウス皮下移植ヒト肝癌腫瘍組織に対する作用。ヌードマウス皮下にヒト肝癌腫瘍を作成し、640, 6400, 64000, 640000 IUのPEG-IFN- α 2b, 6400 IU, 64000 IUのIFN- α 2bあるいは培養液(コントロール)を1週間に2回、合計4回ヌードマウスの皮下に接種し、15日目に切除した腫瘍からHE染色標本作製し、腫瘍細胞のアポトーシスを測定した。A, Bに、腫瘍の組織像(200倍、ヘマトキシリン・エオジン染色)を示す。コントロール(A)に比べ、6400 IU PEG-IFN- α 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、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。640000 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。

いて13種類の肝癌細胞株に対する増殖抑制作用について比較検討を行った。IFNの製剤別の増殖抑制作用を13株の増殖抑制作用の平均値と比較すると、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(Figure 2)。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みられた。IFN- β がIFN- α よりもより強い増殖抑制作用を示す理由として、IFN- β はレセプターとの安定性や結合性が高いということや、他のレセプター成分やシグナル伝達系の存在の関与が推察されている^{25)~27)}。IFN- α 2b製剤の増殖抑制作用が比較的低いという結果は、上記の5種類のIFN- α 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。このようにI型IFN製剤の種類により増殖抑制効果が異なることが明らかとなった。

各種IFN製剤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(Figure 3A)。アポトーシス誘導は、使用したIFN製剤の種類、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¹¹⁾¹³⁾¹⁶⁾¹⁸⁾。肝癌細胞株のIFN誘導性アポトーシスでは、caspase-9, caspase-8, caspase-7, caspase-3の活性化とともに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¹⁹⁾。ミトコンドリア系以外に、TRAILやTRAIL-R1, -R2などのデスリガンド-デスレセプターを介した経路の関与も報告されており²⁰⁾、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 (Figure 3B)^{11,16)}。

V IFN- α 製剤および IFN- β 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-1B²⁹⁾ をヌードマウスの皮下に接種し、約1週間後5~10mmの腫瘍径の腫瘍が形成された時点から、各種 IFN 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。天然型 IFN- α 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) (4000IU/mouse, 2.0×10^5 IU/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。コンセンサス IFN は、臨床量の約1.4倍量 (0.01 μ g/mouse, 0.5 μ g/kg), その10倍量, 100倍量を同様に投与し、天然型 IFN- β は、臨床量の約半量 (1000IU/mouse, 5.0×10^4 IU/kg), その10倍量, 100倍量を腹腔内に投与し同様に検討した。その結果、14日目の腫瘍体積は、最小量の IFN 投与により IFN を投与しなかったマウス (コントロール) に比べ、天然型 IFN- α で30%前後 (未発表データ), コンセンサス IFN- β で40%前後¹³⁾, 天然型 IFN- β で15%前後¹⁸⁾ 減少した。このように、臨床量前後の IFN 製剤の投与は、*in vivo* において肝癌細胞の増殖を抑制した。臨床量の140倍のコンセンサス IFN を投与されたマウスでは、腫瘍がほぼ消失した¹³⁾。IFN を投与されたマウスの腫瘍組織では、IFN の濃度依存性に肝癌細胞のアポトーシス数の増加を認めた。コンセンサス IFN を投与されたマウスの腫瘍では、腫瘍内血管の減少も認められた。

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 (640IU/mouse, 3.2×10^4 IU/kg), その10倍量, 100倍量, 1000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%前後の腫瘍の体積および重量の減少が認められた (Figure 4)¹⁶⁾。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 (Figure 5)。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 (Figure 5)¹⁶⁾。 *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。

VI IFN の持続接触による IFNAR の発現の変化と増殖抑制作用

IFN の持続投与により、IFNAR の発現が低下することが実験的あるいは臨床的に報告されている。Nakajima ら³⁰⁾ は、B型慢性肝炎の患者に2~4週間 IFN を投与すると、患者の末梢血単核球上の IFN レセプター数が約50%減少するが、その一方で、2', 5'-オリゴ (A) シンテターゼ活性は、5倍増加することを報告している。この結果は、IFN レセプターの発現低下は、必ずしも IFN の作用低下とは、結びつかないことを示唆している。われわれは、肝癌細胞株 (HAK-1B) と IFN を持続接触させて、IFNAR-2 鎖の発現の変化と IFN による増殖抑制作用との関連性について検討を行った。PEG-IFN- α 2b 接触開始3時間後に、IFNAR-2 鎖の発現は非接触細胞に比べ有意に低下し、48時間目には、逆に有意に発現上昇し、96時間目以降は、発現が経時的に低下した。一方、細胞数は、PEG-IFN- α 2b 接触初期より時間依存性に持続的に減少し続けた¹⁶⁾。同様に、*in vivo* の実験において PEG-IFN- α 2b を投与されたマウスの腫瘍では、コントロールや同じ活性の IFN- α 2b 投与マウスに比べ腫瘍の IFNAR-2 鎖の発現は低下していたが、腫瘍はより縮小していた¹⁶⁾。こ

これらの結果から、少なくとも検討した肝癌細胞株では、IFNの持続接触によりIFNAR-2鎖の発現は低下するが、より有効な増殖抑制効果が導かれることが示された。IFN- α による効果が持続する理由として残ったレセプターの結合性が上昇するという報告もあるが、逆の報告もあり、この点に関しては更に検討が必要であろう。

VII PEG-IFN- α の肝癌細胞の α -fetoprotein (AFP)産生に及ぼす作用

臨床的に明らかな肝細胞癌の発生は認めないが、血清AFPが持続的に高値を呈する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と報告されている³¹⁾。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値の低下はみられないのに対し、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³²⁾。このIFNによるAFP低下の機序は解明されていないが、AFPが肝癌細胞由来とすれば以下の2つの可能性が考えられる。1つ目は、不顕性なAFP産生性の肝癌細胞が存在し、IFNが直接的にそれらの細胞に対し抗腫瘍作用を示し、細胞が減少あるいは消失した結果AFPも低下するという可能性で、2つ目は、1つ目同様不顕性なAFP産生性の肝癌細胞が存在するが、IFNが細胞に作用してAFPの産生を機能的に抑制する可能性である。ホルモンや増殖因子によるAFPの発現制御に関しては、dexamethasoneが、promoter領域のglucocorticoid responsive elementを介してAFP発現を増加させることや、逆に、上皮成長因子、transforming growth factor- β 1、肝細胞増殖因子などがAFP発現を低下させることが報告されている^{33)~36)}。AFP産生性の肝癌細胞株KIM-1を使用して、PEG-IFN- α 2bのAFP発現に対する作用を蛋白およびmRNAレベルで検討した結果、PEG-IFN- α 2bとの接触8日目まではAFPの蛋白およびmRNAの発現を種々の程度に上昇させることが判明した¹⁷⁾。したがって、IFN投与によるAFP減少の機序としては、上記の1つ目の可能性がより考えられる。

おわりに

以上より、ヒトの肝癌細胞がIFNARを比較的高頻度に発現していること、IFNは、*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が、その増殖抑制作用はIFN製剤により異なること、*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。これらの結果は、IFN投与による肝発癌・再発抑制機序の1つとしてIFNによる直接的抗腫瘍作用も関与している可能性を示唆している。PEG化IFN製剤は、従来のIFN製剤よりも優れたウイルス駆除作用を示すが、発癌予防にもより優れた作用が期待される。

文 献

- 1) Pestka S, Langer JA, Zoon KC, et al: Interferons and their actions. *Ann Rev Biochem* 56:727-777: 1987
- 2) 東 匡伸: IFNレセプター。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—, 第1版, 岸田綱太郎, 他編, ライフ・サイエンス, 東京, 66-79:1998
- 3) Gutterman JU: Cytokine therapeutics: lessons from interferon α . *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 1198-1205:1994
- 4) 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 hepatocellular carcinoma development. *J Infect Chemother* 9: 333-340: 2003
- 5) 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
- 6) Nishiguchi S, Kuroki T, Nakatani S, et al: Randomised trial of effects of interferon- α on incidence of hepatocellular carcinoma in chronic active hepatitis C with cirrhosis. *Lancet* 346: 1051-1055: 1995
- 7) Kubo S, Nishiguchi S, Hirohashi K, et al: Effects of long-term postoperative interferon- α therapy on intrahepatic recurrence after resection of hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. A randomized, controlled trial. *Ann Intern*

- Med 134;963-967:2001
- 8) 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
 - 9) 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
 - 10) Sakon M, Nagano H, Dono K, et al: Combined intraarterial 5-fluorouracil and subcutaneous interferon- α therapy for advanced hepatocellular carcinoma with tumor thrombi in the major portal branches. *Cancer* 94; 435-442: 2002
 - 11) 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
 - 12) Takayama A, Yano H, Ogasawara S, et al: Expression of Hu-IFN- α R2 chain of Type I interferon receptor in human hepatocellular carcinoma and non-cancerous tissues. *Int J Mol Med* 6; 621-627: 2000
 - 13) Hisaka T, Yano H, Ogasawara S, et al: Interferon- α Con1 suppresses proliferation of liver cancer cell lines *in vitro* and *in vivo*. *J Hepatol* 41; 782-789: 2004
 - 14) Yano H, Ogasawara S, Momosaki S, et al: Expression and activation of apoptosis-related molecules involved in interferon- α -mediated apoptosis in human liver cancer cells. *Int J Oncol* 26; 1645-1652: 2005
 - 15) Yano H, Yanai Y, Momosaki S, et al: Growth inhibitory effects of interferon- α subtypes vary according to human liver cancer cell lines. *J Gastroenterol Hepatol* 21; 1720-1725: 2006
 - 16) Yano H, Ogasawara S, Momosaki S, et al: Growth inhibitory effects of pegylated IFN α -2b on human liver cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *Liver Int* 26; 964-975: 2006
 - 17) Yano H, Basaki Y, Oie S, et al: Effects of IFN- α on α -fetoprotein expressions in hepatocellular carcinoma cells. *J Interferon Cytokine Res* 27; 231-238: 2007
 - 18) Ogasawara S, Yano H, Momosaki S, et al: Growth inhibitory effects of IFN- α on human liver cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *J Interferon Cytokine Res* 2007 (in press)
 - 19) Domanski P, Witte M, Kellum M, et al: Cloning and expression of a long form of the β subunit of the interferon $\alpha\beta$ receptor that is required for signaling. *J Biol Chem* 270; 21606-21611: 1995
 - 20) 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* 14; 5100-5108: 1995
 - 21) Kondo M, Nagano H, Sakon M, et al: Expression of interferon α/β receptor in human hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol* 17; 83-88: 2000
 - 22) Ota H, Nagano H, Doki Y, et al: Expression of type I interferon receptor as a predictor of clinical response to interferon- α therapy of gastrointestinal cancers. *Oncol Rep* 16; 249-255: 2006
 - 23) Ota H, Nagano H, Sakon M, et al: Treatment of hepatocellular carcinoma with major portal vein thrombosis by combined therapy with subcutaneous interferon- α and intra-arterial 5-fluorouracil; role of type I interferon receptor expression. *Br J Cancer* 93; 557-564: 2005
 - 24) 大塚浩史, 山岡 隆: IFN- α および β (ω 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—, 第1版, 岸田綱太郎, 他編, ライフ・サイエンス, 東京, 66-79: 1998
 - 25) Domanski P, Nadeau OW, Platanias LC, et al: Differential use of the β L subunit of the type I interferon (IFN) receptor determines signaling specificity for IFN α 2 and IFN β . *J Biol Chem* 273; 3144-3147: 1998
 - 26) Ruzicka FJ, Jach ME, Borden EC: Binding of recombinant-produced interferon β ser to human lymphoblastoid cells. Evidence for two binding domains. *J Biol Chem* 262; 16142-16149: 1987
 - 27) Russell-Harde D, Wagner TC, Perez HD, et al: Formation of a uniquely stable type I interferon receptor complex by interferon β is dependent upon particular interactions between interferon β and its receptor and independent of tyrosine phosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun* 255; 539-544: 1999
 - 28) Oshima K, Yanase N, Ibukiyama C, et al: Involvement of TRAIL/TRAIL-R interaction in IFN- α -induced apoptosis of Daudi B lymphoma cells. *Cytokine* 14; 193-201: 2001
 - 29) 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
 - 30) Nakajima S, Kuroki T, Shintani M, et al: Changes in interferon receptors on peripheral blood mono-

- nuclear cells from patients with chronic hepatitis B being treated with interferon. *Hepatology* 12; 1261-1265 : 1990
- 31) Ikeda K, Saitoh S, Koida I, et al : A multivariate analysis of risk factors for hepatocellular carcinoma : a prospective observation of 795 patients with viral and alcoholic cirrhosis. *Hepatology* 18; 47-53 : 1993
- 32) 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
- 33) Nakao K, Nakata K, Mitsuoka S, et al : Transforming growth factor β 1 differentially regulates α -fetoprotein and albumin in HuH-7 human hepatoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 174 ; 1294-1299 : 1991
- 34) Hatano M, Nakata K, Nakao K, et al : Hepatocyte growth factor down-regulates the α -fetoprotein gene expression in PLC/PRF/5 human hepatoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 189 ; 385-391 : 1992
- 35) Nakata K, Motomura M, Nakabayashi H, et al : A possible mechanism of inverse developmental regulation of α -fetoprotein and albumin genes. Studies with epidermal growth factor and phorbol ester. *J Biol Chem* 267 ; 1331-1334 : 1992
- 36) Nakabayashi H, Watanabe K, Saito A, et al : Transcriptional regulation of α -fetoprotein expression by dexamethasone in human hepatoma cells. *J Biol Chem* 264 ; 266-271 : 1989

(論文受領, 平成 19 年 3 月 23 日)
受理, 平成 19 年 4 月 16 日)