

学 位 論 文 題 名

IFN- β inhibits liver metastases from murine colon 26 carcinoma and its highly metastatic variant

(インターフェロン β によるマウス colon 26 細胞および
高転移株の肝転移抑制)

学位論文内容の要旨

【緒言】我々はマウス 大腸癌細胞である colon 26 (CT26) およびその高肝転移株 (L5) を用いて大腸癌肝転移の抑制実験を行ってきた。一方、インターフェロン (以下 IFN) の抗腫瘍効果は広く知られており白血病、腎癌、前立腺癌などに臨床応用されている。その作用機序として NK cell などの免疫細胞刺激や血管新生抑制などの報告はあるが、いまだ明らかにはされていない。また IFN- α/β において IFN- β の抗腫瘍効果の方が IFN- α より強いという報告や血管投与できる IFN- β 方が IFN- α より大腸癌肝転移に対しての動注療法に応用できる可能性などを考慮して、本実験では IFN- β を使用した。

【材料および方法】(材料) ①腫瘍細胞：マウス大腸癌細胞 colon 26 およびその高肝転移株 (L5) ②遺伝子組み換えマウス IFN- β (方法) ①腫瘍増殖実験：CT26 および L5(5×10^4 cells)を 25ml フラスコで培養し、day 1, day 3, day 5, day 7 に生細胞数をトリパンブルーで測定した。②MTS アッセイ：CT26 および L5(1.5×10^3 cells)を IFN- β の濃度を変えて 96 穴マイクロプレートで 72hr 培養。MTS 試薬を加え、マイクロプレートリーダーで測定し、IC₅₀ を算出した。③腫瘍増殖抑制実験：CT26 (5×10^4 cells)を 25ml フラスコで培養し、IFN- β を濃度 (1×10^2 , 1×10^3 , 1×10^4 IU/ml) と投与回数 (1 回, 2 回, 4 回) を変えた。day 1, day 3, day 5, day 7 に生細胞数をトリパンブルーで測定した。④肝転移抑制実験：CT26 あるいは L5(1×10^4 cells)を Balb/c マウスの門脈から注入し、肝転移モデルを作製。CT26 肝転移マウスに day1 から隔日 7 回、IFN- β を 1×10^5 IU 腹腔内投与した。また、L5 肝転移マウスには、IFN- β を投与スケジュール (隔日 7 回、連日 7 回) と投与開始時期 (day3, day7) を変えて投与し、day14 に犠牲死、肝転移個数を測定した。⑤肝転移モデル生存率実験：CT26 肝転移モデルには IFN- β 1×10^3 , 1×10^5 IU を隔日投与。L5 肝転移モデルには IFN- β 1×10^5 IU を隔日あるいは連日投与を行い、生存期間を観察した。⑥血管新生実験：Balb/c マウスの背部皮下に CT26 を 1.5×10^7 個充填した Millipore chamber を移植、5 日目の新生血管増生像を MCID にて撮影し NIH image analyzer にて解析した。IFN 群は、IFN- β 1×10^5 IU を連日 5 日間、腹腔内投与した。

【結果】①腫瘍増殖自験：CT26 の高肝転移株である L5 の増殖が CT26 より早かった。②MTS アッセイ：CT26 および L5 の IFN- β に対する IC₅₀ はそれぞれ 600 IU/ml と 300 IU/ml であり、L5 の IFN- β に対する感受性が高かった。③腫瘍増殖抑制実験：IFN- β は CT26 の増殖を 1×10^3 IU/ml 以上の濃度で dose-dependent に抑制した。さらに、1 回より 2 回さらに 4 回で強く増殖を抑制し、time-dependent の効果も示した。④肝転移モデル実験：IFN- β は CT26 の肝転移を抑制した。また、L5 の肝転移実験では隔日より連日投与（いずれも 7 回投与）が強く抑制した。IFN- β を day3 開始では L5 の肝転移を抑制したが、day7 投与開始では肝転移の抑制はみられなかった。⑤肝転移モデル生存率実験：CT26 肝転移モデルにおいて IFN- β 1×10^3 、 1×10^5 IU で control に比較して生存期間が長い傾向がみられたが有意差はなかった。L5 肝転移モデルにおいて IFN- β 隔日投与では有意差はなかったが連日投与で生存率を有意に延長した。⑥血管新生実験：negative control に比較して、positive control である CT26 はマウス皮下に新生血管を増加した。IFN- β は、CT26 による血管新生を抑制した。また、iNOS の inhibitor である aminoguanidine は IFN- β の血管新生抑制を打ち消した。

【考察】IFN- β は、in vitro において、dose-dependent および time-dependent に CT26 の増殖を抑制し、これは cell cycle の抑制効果であることが報告されている。In vivo として CT26 の肝転移モデルを作成し、IFN- β による肝転移抑制の実験を行った。IFN- β の肝転移抑制は IFN- β 1×10^3 IU より 1×10^5 IU で強く抑制がみられ dose-dependent を示し、また隔日投与より連日投与で抑制効果が強く、time-dependent な効果も示した。L5 肝転移モデルにおいて IFN- β 投与開始を day3 より day7 と遅らせることにより肝転移抑制効果が減弱すること、また IFN- β 隔日投与では有意差がなかったが、連日投与で生存率を延長させることが判明した。さらに、別な作用機序について検討するため IFN- β の血管新生抑制に対する実験を行った。dorsal air sac assay で IFN- β は、dose-dependent に CT26 による血管新生を抑制した。IFN による血管新生抑制効果の機序として、bFGF あるいは VEGF の抑制が報告されているが、否定的な意見もある。本実験では、iNOS inhibitor である aminoguanidine による IFN- β の効果抑制により、IFN- β の抗腫瘍効果がマクロファージによる iNOS を介した血管新生抑制効果であることが示された。以上のことより、IFN- β は抗癌剤併用などによる大腸癌肝転移の新たな治療戦略としての可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 浅 香 正 博

副 査 教 授 秋 田 弘 俊

副 査 教 授 藤 堂 省

学 位 論 文 題 名

IFN- β inhibits liver metastases from murine colon 26 carcinoma and its highly metastatic variant

(インターフェロン β によるマウス colon 26 細胞および
高転移株の肝転移抑制)

我々はマウス 大腸癌細胞である colon 26 (CT26) およびその高肝転移株 (L5) を用いて大腸癌肝転移の抑制実験を行ってきた。一方、インターフェロン (以下 IFN) の抗腫瘍効果は広く知られているがその作用機序はいまだ明らかではない。そこで、IFN β が、大腸肝転移に有効か、またその作用機序を明らかにするため本研究をおこなった

腫瘍細胞としてマウス大腸癌細胞 colon 26 およびその高肝転移株 (L5)、遺伝子組み換えマウス IFN-B を用いた。MTS アッセイでは、CT26 および L5 の IFN- β に対する IC₅₀ はそれぞれ 600 IU/ml と 300 IU/ml であり、L5 の IFN- β に対する感受性が高かった。腫瘍増殖抑制実験では、IFN- β は CT26 の増殖を 1×10^3 IU/ml 以上の濃度で直接的に dose-dependent に抑制し、また添加回数を増やすことで強く抑制、time-dependent の効果も示した。肝転移モデル実験では、IFN- β は CT26 の肝転移を dose-dependent に抑制した。また、L5 の肝転移実験では隔日より連日投与 (いずれも 7 回投与) が強く抑制し、time-dependent な効果を示した。IFN- β は day7 投与開始では肝転移の抑制はみられず、転移初期の投与が必要であることが示唆された。しかし、L5 肝転移モデルにおいて IFN- β を長期に投与することで、生存率を有意に延長した。つまり、転移初期の抑制だけでなく、長期的に投与することで別な作用機序で肝転移を抑制することが示唆された。この作用機序について検討するため、IFN- β の血管新生抑制に対する実験を行った。dorsal air sac assay で IFN- β は、dose-dependent に CT26 による血管新生を抑制した。IFN による血管新生抑制の機序として、bFGF あるいは VEGF の抑制が報告されているが、否定的な意見もある。IFN- β の血管新生抑制は iNOS inhibitor である aminoguanidine の投与で、完全に消失した。IFN- β の抗腫瘍効果がマクロファージによる iNOS を介した血管新生抑制効果であることが示された。以上のことより、IFN- β は直接的な抗腫瘍効果と血管新生抑制効果を有し、抗癌剤との併用による大腸癌肝転移の新たな治療戦略となりうる可能性が示唆された。

公開発表後、副査の秋田教授より 1) IFN の in vitro での細胞増殖抑制の機序、2) 肝転移モデルにおいての転移 step のどの段階を抑制したかについての質問があった。それに対して、1) cyclinD, cyclinE を抑制することによる細胞周期の停止である、2) 転移初期には NK cell を活性化していると考えられるが、生存率が延長したことより、血管新生抑制がその機

序である、などの回答があった。また、主査の浅香教授から 1) 高肝転移株についての確認、2) IFN- α と IFN β で抗腫瘍効果を比較したのか、3) 血管新生としては VEGF が一般的であるが、IFN β により VEGF はどう変化したかについての質問があった。それに対して、1) CT26 による肝転移巣を細胞培養するを 5 回繰り返した、2) 実験では比較していないが、文献的には IFN β の抗腫瘍効果が強い、3) *in vitro* で、IFN β は CT26 の産生する VEGF 濃度を変化させなかった、などの回答があった。藤堂教授からは 1) IFN β の大腸癌肝転移について臨床応用するとしたら、どのような時期に使用できるかの質問があった。それに対して、1) 肝転移に対する肝切除前の neoadjuvant あるいは、切除不能大腸癌に対する抗癌剤との併用使用との回答があり、藤堂教授からは peri-operative な臨床応用を考えているとの感想があり、最期に主査の浅香教授から、大腸癌肝転移の治療に抗癌剤と IFN α (peg-IFN) の併用で臨床的に有用であると、ご自身の教室での治療成果を述べられた。

この論文は、IFN β の肝転移抑制の機序が血管新生抑制であり、また IFN による活性マクロファージと NO 産生による細胞障害がその一機序であることを示した論文であり、IFN β と抗癌剤併用は臨床的にも大腸癌肝転移の治療効果が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。