

ヒト腎細胞癌培養株細胞に対する遺伝子組み換え ヒトTNFの抗腫瘍活性および遺伝子組み換えヒト γ -Interferon, Doxorubicin, Cis-platinum との併用効果

神戸大学医学部泌尿器科学教室（主任：守殿貞夫教授）

郷 司 和 男
浜 見 学
守 殿 貞 夫

ANTI-NEOPLASTIC ACTIVITY OF A HUMAN RECOMBINANT
TUMOR NECROSIS FACTOR (HU-REC-TNF) ALONE OR IN
COMBINATION WITH HUMAN RECOMBINANT γ -INTERFERON,
DOXORUBICIN OR CIS-PLATINUM ON THE HUMAN
RENAL CELL CARCINOMA LINE

Kazuo GONJI, Gaku HAMAMI
and Sadao KAMIDONO

*From the Department of Urology, Kobe University School of Medicine
(Director: Prof. S. Kamidono)*

The inhibitory effect of human-recombinant tumor necrosis factor (Hu-rec-TNF) alone or in combination with human recombinant γ -interferon (rec γ -IFN), doxorubicin (ADM) or cis-platinum (CDDP) was studied for two human renal cell carcinoma lines (KO-RCC-1 and RCC-nu-1 cells). Hu-rec-TNF inhibited the cell growth of KO-RCC-1 cells in a dose- and time-dependent manner. The inhibitory effect was seen 48 hours after the treatment with Hu-rec-TNF alone. The effect of Hu-rec-TNF was cytotoxic in our experiment. On the other hand, Hu-rec-TNF did not inhibit the cell growth of RCC-nu-1 cells. There were sensitive and resistant cells in renal cell carcinoma. In KO-RCC-1 cells, Hu-rec-TNF enhanced the inhibitory effect of rec γ -IFN, ADM or CDDP. On the other hand, Hu-rec-TNF did not enhance the inhibitory effect of rec γ -IFN, ADM or CDDP in RCC-nu-1 cells. In our experiment, the combined treatment with Hu-rec-TNF and rec γ -IFN, ADM or CDDP was useful in human renal cell carcinoma which was sensitive for Hu-rec-TNF.

Key words: Human recombinant TNF, Renal cell carcinoma

はじめに

近年、新しい制癌剤として注目をあびている腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor) は1975年 Sloon-Kettering 癌研究所の Carswell ら¹⁾により発見された。すなわち BCG に感染したマウスに2週間後

endotoxin を静注し得られた血清を皮下移植担癌マウスに投与すると腫瘍壊死を引き起こし、またこの血清はある種の癌培養細胞に対し細胞障害性を示すが、正常細胞には影響を与えないとした¹⁻⁴⁾。また、種を越えて細胞障害性を有することでも知られている。最近遺伝子工学的手技によりヒト recombinant-TNF

Table 1. Drugs and Concentration used

		Drugs	Concentration		
Treatment with drug alone		Hu-rec-TNF (U/ml)	10	100	1000
		Rec γ -IFN (U/ml)	10	100	1000
		Doxorubicin (ADM, μ g/ml)	0.0004	0.004	0.04
		Cis-platinum (CDDP, μ g/ml)	0.002	0.02	0.2
Treatment with Hu-rec-TNF (100U/ml) and drug	Hu-rec-TNF + (100U/ml)	Rec γ -IFN (U/ml)	10	100	1000
		Doxorubicin (ADM, μ g/ml)	0.0004	0.004	0.04
		Cis-platinum (CDDP, μ g/ml)	0.002	0.02	0.2

(Hu-rec-TNF) の大量生産が可能となり、その抗腫瘍効果が *in vivo*^{5,9)} および *in vitro*⁷⁻⁹⁾ の実験系で検討されている。今回、われわれは現在のところ有効な化学療法剤のないヒト腎細胞癌に対し Hu-rec-TNF の抗腫瘍効果を *in vitro* で検討するとともに、ヒト recombinant γ -interferon (rec γ -IFN), doxorubicin (ADM) および cis-platinum (CDDP) との併用効果を検討した。

材料と方法

細胞：ヒト腎細胞癌由来培養株、KO-RCC-1¹⁰⁾ および RCC-nu-1¹¹⁾ 細胞を用いた。KO-RCC-1 細胞は当教室の岡田らにより株化され、他方 RCC-nu-1 細胞は金沢がん研究所沢口博士より分与を受けたものとともに原腫瘍は組織学的に淡明細胞を主体とする腎細胞癌である。

薬剤：ヒト recombinant tumor necrosis factor (Hu-rec-TNF, PT-050) は大日本製薬(株)より入手した。力価は 10⁵単位/ml (1単位は L-M 細胞の50%を障害する量)である。他方ヒト recombinant γ -interferon (rec γ -IFN) および doxorubicin は協和発酵(株)より、cis-platinum (CDDP) はブリストル・マイヤーズ(株)より供与された。各薬剤濃度を Table 1 に示す。

細胞培養：これら細胞は、10% fetal bovine serum (FBS), penicillin G 100 U/ml, および streptomycin 100 μ g/ml を添加した Dulbecco's modified eagle 培地 (c-DME, 日本製薬) で 37°C, 5% CO₂ incubator 内で培養維持し 4~5 日ごとに、

0.1% trypsin 処理にて継代した。

感受性試験

1) Cell growth inhibition test: 対数増殖期にある細胞を 0.1% trypsin 処理にて単離細胞浮遊液を得、細胞濃度を 1×10⁴/ml に調整し 24 well plate (falcon plastic corp, oxford, CA) に 1.0 ml ずつ播種し、37°C, 5% CO₂ incubator 内で静置培養した。24時間後、培地を捨て各薬剤を含む、c-DME 培地を加えた (Table 1)。コントロールは薬剤を含まない c-DME とした。薬剤添加後、24, 48, 72 および 96 時間後に付着細胞を 0.1% trypsin 処理にて剝離し tripan blue 染色を施し非青染細胞を数えた。細胞障害性は、コントロールの非青染細胞数に対する比で表した。

2) *In vitro* clonogenic assay

Salmon ら^{12,13)} の double-layer-soft agar system を用い行なった。すなわち下層は、McCoy's 5A 培地 (Grand Island Biological Co) に、5% horse serum (HS), 10% FBS, 2.2% sodium pyruvate, 21 mg/ml serine, 200 mM glutamine, 100 U/ml penicillin G, および 100 μ g/ml streptomycin を添加した enriched McCoy's 5A 培地でありさらに使用直前に 3% tryptic soy broth (Grand Island Biological Co.), 0.6 mg/ml asparagine および 0.3 mg/ml DEAE-dextran (Parnacia Fine Chemicals Piscataway, NJ.) を添加した最終濃度 0.5% の agar (Difco Detroit, MI.) である。上層は、CMRL-1066 培地 (Grand Island Biological Co.) に、15% HS, 100 U/ml penicillin G, 100 μ g/ml stre-

ptomycin, 2 mM glutamine, 4 mM calcium chloride および 3 U/ml insulin を添加した enriched CMRL-1066 培地ですさらに使用直前に 0.6 mg/ml asparagine, 0.5 mg/ml DEAE-dextran, 50 μ M 2-mercaptoethanol および 3×10^3 個/dish の細胞と薬剤を添加した最終濃度 0.3% の agar である。これらを 37°C, 5% CO₂ incubator 内で培養し, 21 日後 40 個以上の細胞より成る独立した細胞塊をコロニーとして数え, 各 dish ごとにコロニー数を算出しコントロールのコロニー数との比で薬剤効果を表した。なお本実験は, 1 薬剤 1 濃度につき 35 mm petri dish 3 dish ずつ行ない, 少なくとも 3 度繰り返し施行した。

結 果

A) Cell growth inhibition test

a) 各薬剤単剤の抗腫瘍効果：Hu-rec-TNF は KO-RCC-1 細胞の増殖を濃度依存性に抑制し, 薬剤作用 96 時間後に 100 U/ml および 1,000 U/ml で各 50 $\pm$ 10%, 40 $\pm$ 8% に抑制した。他方, RCC-nu-1 細胞に対し殆ど細胞増殖を抑制しなかった (Fig. 1, 2)。また Hu-rec-TNF の細胞増殖抑制効果は薬剤作用 48 時間以後に見られた (Fig. 3)。rec γ -IFN は KO-RCC-1 細胞の増殖を濃度依存性に抑制し, 100 U/ml および 1,000 U/ml で薬剤作用 96 時間後, 各 60

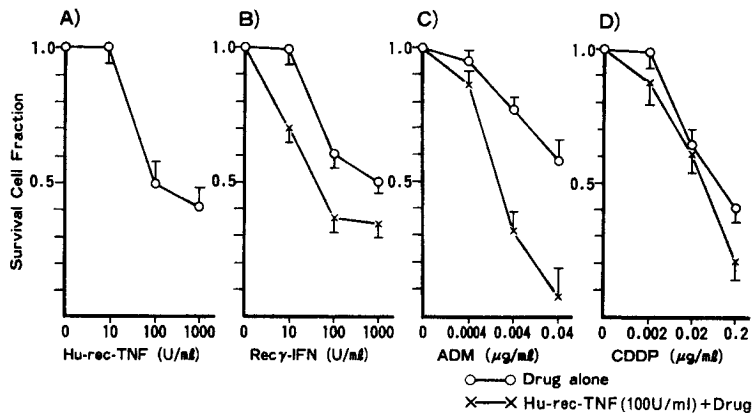


Fig. 1. Inhibitory effect of cell growth in KO-RCC-1 cells after 96 hr drug treatment. 4 種の薬剤とともに濃度依存性に細胞増殖を抑制した。Hu-rec-TNF はこれら薬剤の細胞増殖抑制効果を増強した。Each value presents mean $\pm$ S.E.

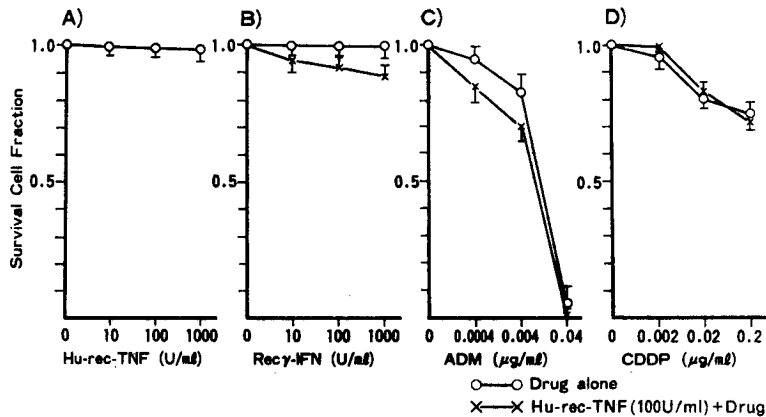


Fig. 2. Inhibitory effect of cell growth in RCC-nu-1 cells after 96 hr treatment. Hu-rec-TNF および rec γ -IFN は細胞増殖殆どを抑制しなかった。ADM および CDDP は濃度依存性に細胞増殖を抑制した。Hu-rec-TNF は, これら薬剤の細胞増殖抑制効果を増強しなかった。Each value presents mean $\pm$ S.E.

±5%および48±6%に抑制した。他方, RCC-nu-1細胞では細胞増殖抑制効果はみられなかった (Fig. 1, 2)。ADM および CDDP はともに KO-RCC-1 および RCC-nu-1 細胞の増殖を濃度依存性に抑制した (Fig. 1, 2)。

b) Hu-rec-TNF の他薬剤との併用効果: KO-RCC-1 細胞に対し Hu-rec-TNF (100 U/ml) は rec γ -IFN, ADM および CDDP の細胞増殖抑制効果を増強し, その程度は rec γ -IFN (1,000 U/ml), ADM (0.04 μ g/ml) および CDDP (0.2 μ g/ml) との併用で各30±6%, 5±8%および20±6%に抑制した (Fig. 1)。他方, RCC-nu-1 細胞に対して増強作用はみられなかった (Fig. 2)。

B) *In vitro* clonogenic assay

a) 各薬剤単剤のコロニー形成抑制効果: Hu-rec-TNF は, KO-RCC-1 細胞のコロニー形成を濃度依存性に抑制し, Hu-rec-TNF 10 U/ml, 100 U/ml および 1,000 U/ml で各42±8%, 34±6%および0±8%に抑制した (Fig. 4)。他方, RCC-nu-1 細胞のコロニー形成抑制効果はみられなかった (Fig. 5)。rec γ -IFN は KO-RCC-1 細胞のコロニー形成を濃度依存性に抑制し, 10 U/ml, 100 U/ml および 1,000 U/ml で各95±8%, 72±5%および58±8%に抑制した (Fig. 4)。他方, RCC-nu-1 細胞のコロニー形成抑制効果は見られなかった (Fig. 5)。ADM および CDDP はともに KO-RCC-1 細胞および RCC-nu-1 細胞コロニー形成を濃度依存性に抑制した (Fig. 4, 5)。

b) Hu-rec-TNF の他薬剤との併用効果: KO-

RCC-1 細胞に対し Hu-rec-TNF (100 U/ml) は rec γ -IFN, ADM および CDDP のコロニー形成抑制効果を増強し, rec γ -IFN (1,000 U/ml), ADM (0.04 μ g/ml) および CDDP (0.2 μ g/ml) との併用で各2±6%, 25±5%および22±8%に抑制した (Fig. 4)。他方, RCC-nu-1 細胞では, Hu-rec-TNF は rec γ -IFN, ADM および CDDP のコロニー形

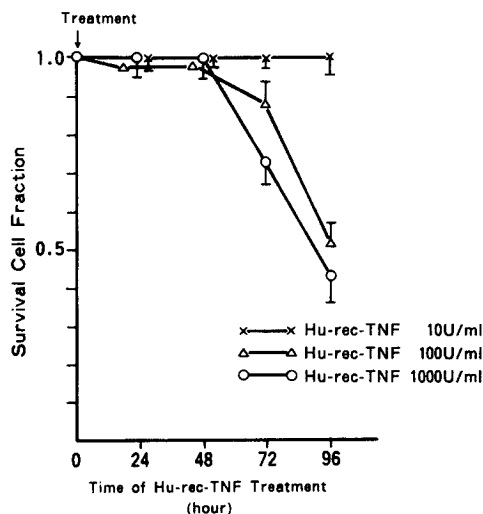


Fig. 3. Inhibitory effect of cell growth in KO-RCC-1 cells. Hu-rec-TNF の細胞増殖抑制効果は薬剤作用48時間後にあらわれ, 本剤が濃度および時間依存性に細胞増殖を抑制することが示唆された。Each value presents mean±S.E.

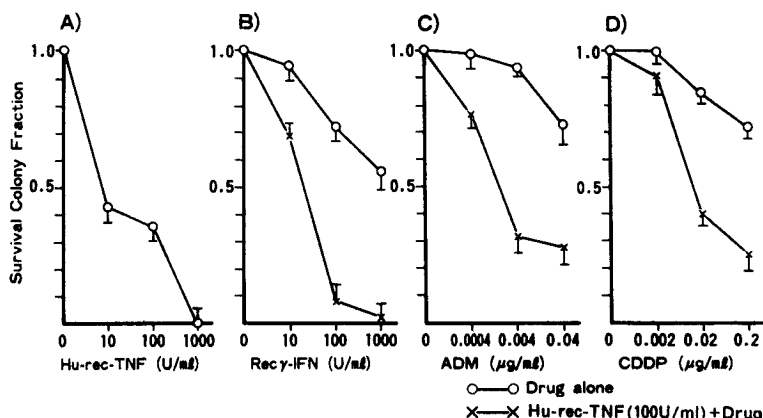


Fig. 4. Inhibitory effect of colony formation in KO-RCC-1 cells. 4種の薬剤は濃度依存性にコロニー形成を抑制した。Hu-rec-TNF はこれら薬剤のコロニー形成抑制効果を増強した。Each value presents mean±S.E.

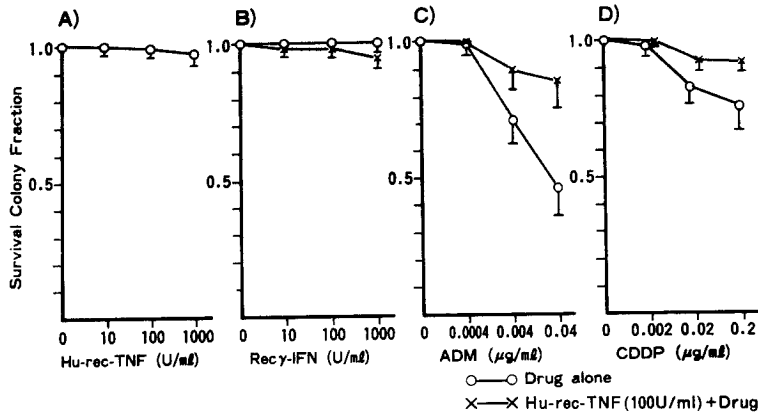


Fig. 5. Inhibitory effect of colony formation in RCC-nu-1 cells. Hu-rec-TNF および rec γ -IFN は殆どコロニー形成を抑制しなかった。ADM および CDDP は濃度依存性にコロニー形成を抑制した。Hu-rec-TNF はこれら薬剤のコロニー形成抑制効果を増強しなかった。Each value presents mean $\pm$ S.E.

成抑制効果を殆ど増強しなかった (Fig. 5).

考 察

1975年, Carswell ら¹⁾により発見された TNF は、種を越え腫瘍細胞の増殖を特異的に抑制する物質として注目をあびてきた¹⁻⁴⁾。近年、遺伝子工学の発達により、ヒト遺伝子組換え型 TNF の大量生産が可能となり^{3,4)}、ヒト悪性腫瘍に対する抗腫瘍効果が、*in vivo*^{5,6)} および *in vitro*⁷⁻⁹⁾ で検討されている。しかし、現在有効な化学療法剤のない腎細胞癌にたいする本剤の抗腫瘍効果を検討した報告は少なく^{8,9)}、他剤との併用効果は報告されていない。

TNF の作用機序について Ruff ら¹⁴⁾は濃度、時間および温度依存性に細胞障害を示すとした。われわれの実験でも TNF に感受性を有する KO-RCC-1 細胞では濃度および時間依存性に細胞増殖抑制効果が示された。しかし、RCC-nu-1 細胞では、濃度および時間にかかわらず細胞増殖抑制効果は認められなかった。渡辺ら¹⁵⁾は、TNF が細胞障害作用を発揮するのは TNF が細胞膜表面の TNF receptor と結合するためとし、細胞膜表面の TNF receptor の数を Scatchard plot 解析により調べ、TNF receptor 数と TNF 感受性の間に相関関係のあることを示した。また彼らは TNF は receptor と結合することにより細胞質内へ取り込まれ、リソゾーム膜を障害し、腫瘍細胞を破壊するとした。われわれの実験では細胞膜表面の receptor 数の測定は行っていないが、同一の組織型である KO-RCC-1 と RCC-nu-1 で TNF 感受性および非感受性と異なること、および TNF

作用後細胞増殖抑制効果が示されるのに48時間を有することなどから、TNF が細胞膜を一義的に破壊するのではなく TNF receptor の存在が示唆された。

TNF は、*in vivo*^{1,9)} および *in vitro*¹⁵⁾ の実験系で正常細胞に対し障害性を示さない。渡辺ら¹⁵⁾は正常細胞の TNF receptor 数を調べ、正常ヒト線維芽細胞および PHA 刺激リンパ球にも TNF receptor が存在しているがこれら細胞は TNF により全く障害されないとしている。彼らはこの説明として推測の域を出ないが、TNF-receptor complex が細胞内に取り込まれるだけでは細胞を死にいたらせることはできず、更に細胞内の cytotoxic system を介しはじめてその作用が示され、正常細胞にはこの cytotoxic system に対する何らかの rescue system が存在するため TNF の作用を打ち消しているとしている。

TNF と他薬剤との併用効果につき検討されている。渡辺ら¹⁵⁾は、3種のヒト腫瘍細胞株に対し TNF とヒト rec γ -IFN の併用で相乗効果が認められたことを報告し、これは rec γ -IFN が TNF receptor の数を増加させるとした。榎本ら¹⁶⁾はヒト悪性神経膠細胞株に対し Hu-rec-TNF とヒト IFN- β の併用で細胞増殖抑制効果は増大したと述べているが、その作用機序については検討していない。その他 TNF は actinomycin-D, mitomycin C および cyclophosphamide との併用により *in vivo*¹⁵⁾ および *in vitro*⁶⁾ でその作用が増強されることが報告されている。折田ら¹⁷⁾は、これら薬剤の作用増強機序は TNF により障害を受けた細胞の修復の過程に必要な物質の合成がこれら薬剤により阻止されたためとしている。また、

非感受性の細胞を actinomycin-D や cyclophosphamide で処理すると TNF に感受性となり、これは TNF receptor が増加したことよるとしている。われわれの実験では、Hu-rec-TNF は TNF 感受性株である KO-RCC-1 細胞に対し rec γ -IFN, ADM および CDDP の細胞増殖抑制効果を増強し、他方非感受性株である RCC-nu-1 細胞では、rec γ -IFN, ADM および CDDP の細胞増殖抑制効果を増強しなかった。

Beutler ら¹²⁾ は、ヒト TNF がマウス cachectin と類似した構造を有していることから両者を同一視する報告があるが諸家らの動物を用いた実験において cachexia を認めておらず今後の検討が必要である。

今回の結果からは、Hu-rec-TNF がすべての腎細胞癌に有用とはいえない。しかし、Hu-rec-TNF に感受性を有する本腫瘍に対し Hu-rec-TNF と rec γ -IFN, ADM および CDDP の併用は、薬剤の抗腫瘍効果を増強するのみならずこれら薬剤の個々の使用量を減し副作用軽減の意味で有用と成りえる可能性が示唆された。

なお、本論文の要旨は第45回日本癌学会（1986年、札幌）において発表した。

文 献

- 1) Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N and Williamson B : An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 72: 3666~3670, 1975
- 2) Helson L, Green S, Carswell EA and Old LJ : Effect of tumor necrosis factor on cultured human neoplasma cells. *Nature* 258: 731~732, 1975
- 3) Shirai T, Yamaguchi H, Ito H, Todd CW and Wallace RB : Cloning and expression in *Escherichia coli* of the gene for human tumor necrosis factor. *Nature* 313 : 803~806, 1985
- 4) Pennica D, Nedwin GE, Hayflick JS, Seeburg PH, Derynck R, Palladino MA, Kohr WJ, Aggarwal BB and Goeddel DV : Human tumor necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. *Nature* 312: 724~729, 1984
- 5) Helson L, Helson CD and Green S: Effects of murine tumor necrosis factor on heterotransplanted human tumors. *Exp Cell Biol* 49: 53~60, 1979
- 6) 原中勝征・里見信子・桜井明子・国井乙彦：腫瘍壊死因子の研究展望。日本臨床 40 : 1872~1879, 1982
- 7) Haranaka K, Satomi N and Sakurai A : Antitumor activity of murine tumor necrosis factor (TNF) against transplanted murine tumors and heterotransplanted human tumor in nude mice. *Int J Cancer* 34: 263~267, 1984
- 8) Watanabe N, Niitsu Y, Neda H, Sone H, Yamauchi N, Umetsu T and Urushizawa I: Antitumor effect of tumor necrosis factor against various primary cultured human cancer cells. *Jpn J Cancer Res (Gann)* 76: 1115~1119, 1985
- 9) Haranaka K and Satomi N : Cytotoxic activity of tumor necrosis factor (TNF) on human cancer cell *in vitro*. *Jap J Exp Med* 51: 191~194, 1981
- 10) 岡田泰長・郷司和男・守殿貞夫・立脇 紀：人腎細胞癌由来株 KO-RCC-1 の樹立とその性状。日泌尿会誌 77 : 780~785, 1986
- 11) 沢口 潔・高橋 豊・秋本龍一・磨伊正義・波多野基一・田中淳之・大野真介：ヒト腎癌細胞株の樹立と化学療法感受性。日本癌学会総会記事 43: 214, 1984
- 12) Hamburger AW and Salmon SE : Primary bioassay of human tumor stem cells. *Science (Wash. DC)* 197: 461~463, 1977
- 13) Hamburger AW and Salmon SE : Primary bioassay of human myeloma stem cells. *J Clin Invest* 60: 846~854, 1977
- 14) Ruff MR and Gifford GE : Rabbit tumor necrosis factor : Mechanism of action. *Infect Immun* 31: 380~385, 1981
- 15) 渡辺直樹・新津洋司郎：Tumor Necrosis Factor (TNF) の作用機序と抗腫瘍性。癌と化学療法 13 : 1322~1328, 1986
- 16) 榎本一己・吉田 紀・影山直樹・上田龍三・加藤武俊・太田和雄：ヒト悪性神経膠腫細胞株に対する遺伝子組換えヒト TNF の抗腫瘍活性および HuIFN- β との併用効果。癌と化学療法 13 : 1953~1961, 1986

- 17) 折田薫三：TNF の作用機序. 癌と化学療法 11: 1373~1386, 1984
- 18) Beutler B, Greenwald D, Hulmes JD, Chang M, Pan Y-C E, Mathison J, Ulevitch R and Cerami A : Identity of tumour necrosis factor and the macrophage-secreted factor cachectin. Nature 316: 552~554, 1985
(1986年11月13日迅速掲載受付)