

ヌードマウス可移植性ヒト腎細胞癌株に対する α -インターフェロンと抗癌剤との併用療法の効果

新潟大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 佐藤昭太郎教授)

笹 川 亨

COMBINED EFFECTS OF α -INTERFERON AND ANTICANCER DRUGS AGAINST RENAL CELL CARCINOMA

Tohru Sasagawa

From the Department of Urology, Niigata University School of Medicine

The direct antitumor effects of combined administration of α -interferon and chemotherapeutic agents against the human tumor cell line derived from renal cell carcinoma were examined in vivo as xenograft in nude mice.

The administration regimen was as follows: Human lymphoblastoid interferon (HLBI) was injected intramuscularly (1×10^6 IU/mouse/day) every day for 14 days. Peplomycin (PEP), adriamycin (ADM), or 5-fluorouracil (5-FU) was also administered at a dose of one third of their LD₅₀. We evaluated the effect 20 days after initial administration using the ratio of mean tumor weight. Combined administration of HLBI and PEP or ADM was determined effective and inhibited tumor growth more strongly than HLBI alone or control. Furthermore, the histopathological examination suggested that the effect of combined administration was cytostatic rather than cytolytic.

(Acta Urol. Jpn. 36: 1397-1401, 1990)

Key words: Interferon, Chemotherapeutic agent, Renal cell carcinoma, Nude mouse

緒 言

進行性腎細胞癌に対する有効な治療法は少なく、化学療法はほとんど無効である。近年各種免疫療法が試みられ、interferon (以下 IFN) もその有効性が注目され、現在腎細胞癌に対する有効な薬剤の1つであるが、当初予想されたほど成績は上がっておらず、IFN と抗癌剤、あるいは他の BRM (biological response modifier) との併用療法が注目されている。今回われわれは、臨床的に併用療法を行うのにあたりヌードマウスを用い、IFN と各種抗癌剤との併用療法の効果について検討した。

方 法

生後8週、体重約20gの雌のヌードマウス (BALB/cAJcl-nu) を用い、当大学動物実験施設内の無菌飼育室のクリーンラック内 (specific pathogen free) で飼育した。ヌードマウスは1個の飼育ケージ内に3から4匹とし、飼育用ケージ、飼料、飲料水は

同施設で滅菌処理したものを使用した。

当教室で継代培養しているヒト腎細胞癌由来培養細胞株 NRC-12¹⁾、KU-2²⁾ を培養プラスチックシャーレにて静置培養し、フルシートになった状態でラバークリーナーにて剝離し約 10^7 個を1匹のヌードマウス背部皮下に移植した。移殖腫瘍の長径が、1~2cm程度になった時点で、その腫瘍を摘出、2~3cm角大に細切し、ヌードマウス背部皮下へ継代移植した。2株のうち NRC-12 はヌードマウスに生着しなかったため実験には KU-2 を移植したヌードマウスの3代目の腫瘍を用いた。

簡便で短時間で判定が可能のため、ヌードマウスを用いた抗癌剤のスクリーニングテストとして広く採用されている Battele-Columbus 方式³⁾ に準じて、推定腫瘍重量、すなわち (長径) $\times$ (短径)² $\div$ 2 を算定し、その値が100~300mgに達してから薬剤の投与を開始した。コントロール群は5匹、また抗癌剤併用群はそれぞれ6匹とし、IFN として α 型の human lymphoblastoid interferon (以下 HLBI) を、腫瘍増

殖抑制効果が有意に見られるとされる 1×10^5 単位⁴⁾を14時間連日筋注した。抗癌剤として、peplomycin (以下 PEP), adriamycin (以下 ADM), 5-fluorouracil (以下 5-FU) を用い、薬剤投与後の担癌スードマウスの体重が、投与前に比べて減少率20%以内であり、しかも経過観察中に副作用による死亡が0であることを目標とし、雌マウスの腹腔内投与時 LD₅₀ (ADM については静注) のそれぞれ1/3量ずつ、すなわち ADM 4.57 mg/kg, PEP 25.7 mg/kg, 5-FU 80.7 mg/kg を、また IFN 群には生食を3日おきに計3回腹腔内投与した。20日目に相対平均腫瘍重量比 (以下 T/C) を求め、その値が42%以下の時を有効、42%を越える時には無効とした。

ここで基準とした42%とは抗癌剤投与群における腫瘍各径がコントロール群における各径の75%になった場合の推定腫瘍重量、すなわち $(0.75 \text{ 長径}) \times (0.75 \text{ 短径})^2 / 2 = (0.75)^3 \times (\text{長径}) \times (\text{短径})^2 / 2 = 0.42 \times (\text{コントロール群推定腫瘍重量})$ より導かれた数値である。

さらに、摘出腫瘍の一部を10%ホルマリンに固定後、H.E. 染色し、光顕所見による病理組織学的変化についても検討した。

結 果

無治療群の経時的腫瘍増殖に比べ、IFN 投与群では腫瘍増殖抑制が、また抗癌剤併用群ではさらに強い抑制が見られた (Fig. 1, Table 1)。IFN 単独投与群を control とした場合の T/C は 5-FU 併用群で 50.1%, PEP 併用群で 26.6%, ADM 併用群で 23.2%であり、5-FU 併用群では基準を満たさなかったが、PEP 併用群、ADM 併用群はそれぞれ有効と判定され (Fig. 2), IFN との併用による協調効果が認められた。

組織学的には、細胞の腫大、多角化、細胞質の染色性均質化、細胞質内空胞化、といった要素と比較したが、抗癌剤併用群で多少強い変化はあったが、各群間には著しい差はみられなかった。また腫瘍組織の中心部に壊死巣が散在したが、コントロール群にも見られ、抗癌剤による変化というよりは、むしろ循環障害によるものと考えられた (Fig. 3)。腫瘍の大きさは、コントロール群の経時的増殖に比べ、縮小はみられなかったものの、その増殖が抑制されていることと併せて考えると、IFN の腫瘍細胞に対する直接効果は殺細胞的变化に乏しく、細胞増殖抑制効果が主である可能性が考えられた。

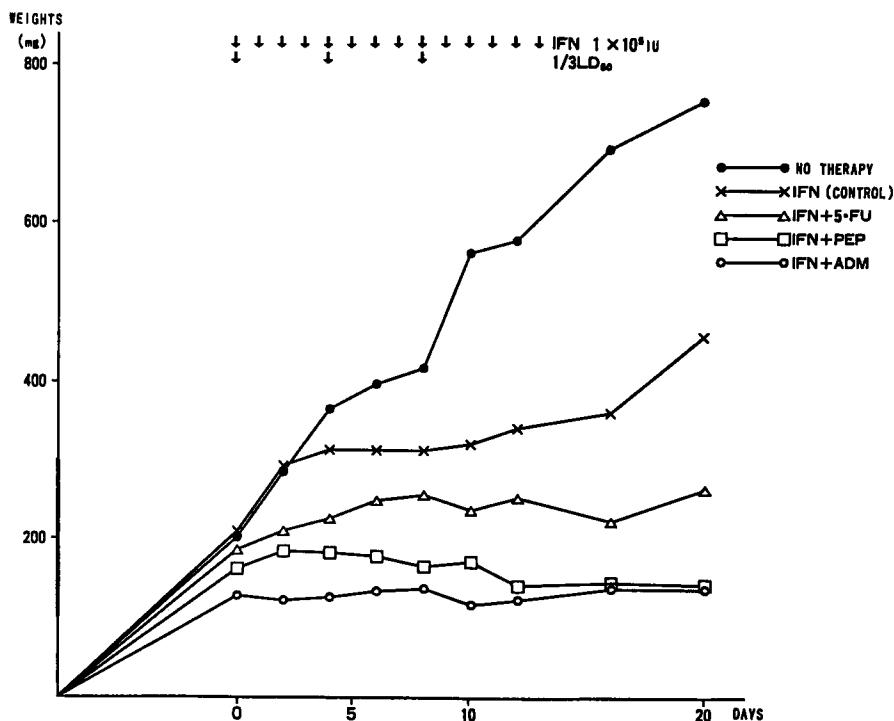


Fig. 1. The effects of interferon with chemotherapeutic agents in nude mice

Table 1. Tumor weight (mean±S.E.)

	0	2	4	6	8	10	12	16	20
No treatment	214.0 ±28.5	293.8 ±66.3	370.0 ±82.4	385.5 ±77.6	415.5 ±65.5	570.8 ±110.0	581.8 ±107.3	712.3 ±86.5	776.5 ±105.0
IFN	202.5 ±25.1	300.5 ±54.1	310.8 ±67.6	290.8 ±75.7	300.0 ±63.2	302.0 ±66.5	318.5 ±66.7	368.3 ±108.3	492.0 ±103.4
INF+PEP	149.5 ±25.3	178.2 ±27.0	177.6 ±24.8	165.3 ±21.3	149.0 ±20.5	160.3 ±29.6	137.5 ±22.2	138.3 ±29.3	130.8 ±18.3
IFN+ADM	128.0 ±25.0	106.0 ±11.0	107.5 ±11.5	103.2 ±21.1	109.8 ±24.0	96.3 ±25.9	109.2 ±24.0	124.3 ±39.6	114.3 ±39.6
INF+5-FU	197.5 ±22.6	206.3 ±22.3	221.8 ±28.0	239.4 ±33.3	253.6 ±27.6	231.4 ±30.0	240.0 ±25.1	225.8 ±28.4	246.5 ±52.2

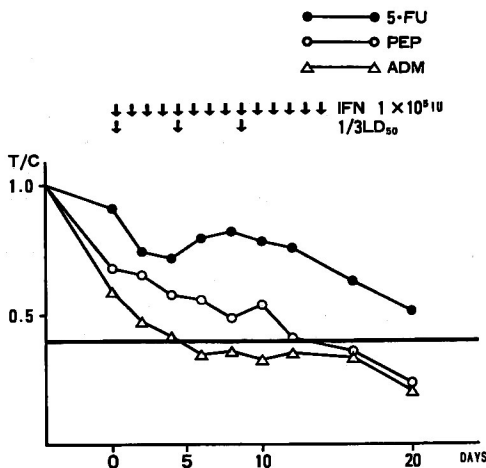
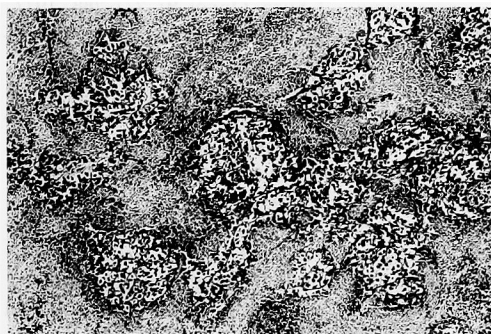


Fig. 2. The ratio of mean tumor weight


 Fig. 3. Histopathological appearance, the IFN and PEP treated group. Hematoxylin and Eosin stain. $\times 400$.

ヌードマウスの体重変化は Table 2 のごとく投与薬剤による統計学的有意差はなかったが、ADM 投与群、PEP 投与群で薬剤投与前に比べ著しい体重減少がみられた。

考 察

進行性腎細胞癌には、有効な治療法が少なく、化学

Table 2. The weights of nude mice (mean ± S.D.)

	Day 0	Day 20
No treatment	22.88±1.56	23.50±1.06
INF alone	23.50±1.27	24.25±1.52
INF+PEP	23.75±1.14	22.25±1.92
INF+ADM	22.67±1.93	21.83±1.43
INF+5-FU	23.50±0.50	24.00±0.79

療法はほとんど無効で、vinblastine (VBL) が 10~25% の有効率を示しているに過ぎない⁵⁾。当教室においても感受性試験に基づき、adriamycin, carboquone による併用療法を行い術後補助療法としては良好な成績であったが⁶⁾、進行性腎細胞癌に対する効果は上がらず、その後もヌードマウスを用いて各種抗癌剤の感受性試験を行ってきたがこれらを上まわる有効な薬剤は見つかっていない。

近年 IFN の抗腫瘍効果が報告され、単独投与により 7~31% の有効率をあげ⁷⁻¹⁰⁾、現在最も有効な薬剤の 1 つであるが、当初期待されたほどの効果は上がっていない。しかし、既存の抗癌剤との交叉耐性が少ないこともあり、各種抗癌剤や、また他の BRM との併用療法が注目されている。

IFN の効果に対する実験としては、Parker ら¹¹⁾ がマウス L 細胞の増殖抑制を報告して以来、直接作用と間接作用の両面から様々な研究が行われている。

本研究においては直接作用の面から検討したが、ここで用いたヌードマウスは先天的に胸腺が欠損しているため、T リンパ球がなくヒト腫瘍が容易に移植可能である。また IFN は種特異的に作用するため、投与されたヒト IFN はヌードマウスの免疫系を介して作用することなく、直接作用のみを検討できる。

IFN と抗癌剤との併用療法の効果についても数多くの報告があるが、腎細胞癌についてみると、BCNU¹²⁾、ADM¹³⁾、BLM、ACD¹⁴⁾、 γ -IFN¹⁵⁾ などとの併用についての報告があるが、in vivo での報告

はまだ少ない。

今回の研究においては IFN と ADM, あるいは PEP との協調効果が見られたが, その作用が相加的なのか, あるいは相乗的なのかまでは判定できなかった。またどのような機序で作用しているのかは本研究からの推測は難しいが, IFN が S 期への同調剤として働き, S 期から G2-M 期の細胞に対して強い作用を示すとされる ADM や, PEP が働いたという可能性が考えられる。しかし, 細胞回転の面ではまだ一定の結論が得られていないのが現状である。

一方, 臨床においては進行性腎細胞癌に対する IFN と抗癌剤併用療法として, VBL¹⁶⁾, ADM¹⁷⁾, BCNU¹²⁾, CPM¹⁸⁾ などの報告があるが, ADM を除き20%前後の有効率になっている。実験系において効果が認められても, 臨床的には著しい奏効率の上昇をみていないのが実状である。このように実験系と臨床との結果の差の原因として臨床での腫瘍重量, 細胞数が実験系とは著しく異なること, 実験系では単一細胞, あるいは単層細胞であるため, 各培養細胞間に薬剤感受性の差がある可能性があり, 同一の実験系に対しても, 今回用いた KU-2 を含め数多くの細胞系に対する検討が必要であると思われる。

また, 投与法や投与量による差も見逃せない。投与方法の違いによっては相加, 相乗作用の報告とは逆に拮抗作用の報告¹⁹⁾があったり, 併用時期の違いによって効果に差がでてきたりすることがある²⁰⁾。しかしこれらは薬剤に対する各細胞の感受性の差なのか, 各細胞が各種実験に適していないために出てくるものなのか, あるいは本当に投与量, 投与方法によって出現してきたものなのかは不明であり, これらに対する基礎的研究をさらにすすめるとともに, 間接効果の検討や, 臨床面からのアプローチが必要である。

今回の実験の結果を基に現在臨床的に用いてその治療効果について検討中であるが, 併用薬剤, 投与方法, 投与量などについてさらに検討していく予定である。

結 語

1) ノードマウスを用いて IFN と各種抗癌剤との併用療法の効果について検討した。

2) 移植腫瘍重量は無投与群の経時的増殖に比べ, IFN 単独投与群では増殖抑制が, また抗癌剤併用群ではさらに強い抑制がみられた。

3) Battele-Columbus 方式に準じた判定では, ADM, PEP は有効, 5-FU は無効であり, ADM, PEP は, IFN との協調効果があった。

4) 組織学的には, IFN の細胞増殖抑制効果が推測された。

5) 本実験を基に臨床での効果を検討中である。

御校閲いただいた佐藤昭太郎教授ならびに御指導頂いた渡部忠男先生に深謝致します。また薬剤の供与を快諾された住友製薬, 協和発酵工業, 日本化薬, 各社に御礼申し上げます。尚, 本論文の要旨は第76回日本泌尿器科学会において発表した。

文 献

- 1) 小松原秀一: 人腎細胞癌培養細胞株 (NRC-12) の樹立とその性状. 日泌尿会誌 69: 1535-1542, 1978
- 2) Katsuo Y, Baba S, Hata M and Tazaki H: Transplantation of human renal cell carcinoma to the nude mice: as an intermediate of in vivo and in vitro. J Urol 115: 373-376, 1976
- 3) Geran RI, Greenberg NH, MacDonald MM, Schubacher AM and Abbott BJ: Protocols for screening chemical agents and natural products against animal tumors and other biological systems (third edition). Cancer Chemother Rep 3: 1-69, 1972
- 4) 清水城, 柳原康夫, 石井清士: ノードマウス移植ヒト悪性黒色腫に対するインターフェロン- α の抗腫瘍効果. 癌と化学療法 13: 2459-2461, 1986
- 5) Hurshesky WJ and Murphy GP: Current states of the therapy of advanced renal carcinoma. J Surg Oncol 9: 277-288, 1977
- 6) 大沢哲雄: 腎癌の化療: Adriamycin と Carboquone 併用療法. 日泌尿会誌 77: 1805-1813, 1986
- 7) Marumo K, Murai M, Hayakawa M and Tazaki H: Human lymphoblastoid interferon therapy for advanced renal cell carcinoma. Urology 24: 567-571, 1984
- 8) Kirkwood JM, Harris JE, Vera R, Sandler S, Fisher DS, Khandekar J, Ernstoff MS, Gordon L, Lutes R, Bonomi P, Lytton B, Cobleigh M and Taylor SJ: A randomized study of low and high doses of leukocyte α -interferon in metastatic renal cell carcinoma: The American Cancer Society Collaborative Trial. Cancer Res 45: 863-871, 1985
- 9) Neidhart JA, Gagen MM, Young D, Tuttle R, Melink TJ, Ziccarrelli A and Kisner D: Interferon- α therapy of renal cancer. Cancer Res 44: 4140-4143, 1984
- 10) Quesada JR, Rios A, Swanson D, Trown P and Gutterman JU: Antitumor activity of recombinant-derived interferon alpha in metastatic renal cell carcinoma. J Clin Oncol 3: 1522-1528, 1985

- 11) Pauker K, Cantell K and Henle W: Quantitative study on viral interference in suspended L cells. Effect of interfering viruses and interferon on the growth rate of cells. *Virology* **17**: 324-334, 1962
- 12) Creagan ET, Kovach JS, Long HJ and Richardson RL: Phase I study of recombinant leukocyte a human interferon combined with BCNU in selected patients with advanced cancer. *J Clin Oncol* **4**: 408-413, 1986
- 13) Welandar CE, Morgan TM, Homesley HD, Trotta PP and Spiegel RJ: Combined recombinant human interferon alpha 2 and cytotoxic agents studied in a clonogenic assay. *Int J Cancer* **35**: 721-729, 1985
- 14) 早川正道, 長倉和彦, 中沢和子, 相川 厚, 丸茂健: インターフェロン (IFN) の抗腫瘍効果に関する検討 (1) 尿路悪性腫瘍由来培養細胞に対する各種 IFN の直接作用的増殖抑制効果について. *日泌尿会誌* **76**: 734-743, 1985
- 15) 大西哲朗, 飯塚典男, 鈴木正泰, 増田富士男, 町田豊平: ノードマウス可移植性腎細胞癌に対するインターフェロンの抗腫瘍効果. *日癌治* **22**: 2370-2375, 1987
- 16) Figlin RA, deKernion JB, Maldazys J and Sarna G: Treatment of renal cell carcinoma with α (human leukocyte) interferon and vinblastin in combination: a phase I~II trial. *Cancer Treat Rep* **69**: 263-267, 1985
- 17) Muss HB, Welandar C, Caponera M, Reavis K, Cruz JM, Cooper MR, Jackson DV, Richards JF, Stuart JJ, Spurr CL, White DR, Zekan PJ and Capizzi RL: Interferon and doxorubicin in renal cell carcinoma. *Cancer Treat Rep* **9**: 721-722, 1985
- 18) Waldar S, Einzig A, Dutcher JP, Ciobanu N, Landau L and Wiernik PH: Phase II trial of recombinant alpha-2b-interferon (IFN) and low dose cyclophosphamide (CY) in advanced melanoma and renal cell carcinoma (RCC). *Proc ASCO* **6**: 246, 1987
- 19) Lee SH, Chiu H and Renton KW: Modulation by a human interferon of antitumor effects of cyclophosphamide against lymphosarcoma in hamsters. *Biochem Pharmacol* **33**: 3439-3443, 1984
- 20) 今西二郎, 田中淳夫: インターフェロンの基礎. 基礎から臨床へ. *癌と化療* **11**: 53-59, 1984
(Received on February 2, 1990)
(Accepted on July 20, 1990)