

## 第4章 IFN- $\beta$ の細胞周期に及ぼす影響及び放射線増感作用

### 4-1 はじめに

Interferon (IFN)はいろいろな種類の細胞に対し、抗ウイルス作用、抗増殖作用などの生物学的効果を示すことが知られている(Pestka et al., 1987)。IFNはその分泌細胞あるいは抗原性の違いから主に2つのタイプに分類されている。タイプ1 IFNの1種である IFN- $\beta$ は悪性脳腫瘍に対する化学療法剤あるいは Biological Response Modifier の一つとして重要な位置を占めており、その抗腫瘍効果は成人及び小児悪性神経膠腫、あるいは再発した悪性神経膠腫において確認されている (Yung et al., 1991; Yoshida et al., 1994; Packer et al., 1996; Fine et al, 1997)。

IFN- $\beta$ はまた、ある種の悪性腫瘍に対し放射線増感効果を示すことが報告されている。この効果は腫瘍特異性があり (Angioli et al., 1993; Schmidberger et al, 1999) 放射線増感剤としての IFN- $\beta$ の悪性脳腫瘍に対する効果はまだ不明な点が多い。そこで、ヒト神経膠芽腫細胞に対する IFN- $\beta$ の放射線増感作用について、特に IFN- $\beta$ 処理後の細胞周期の変化に着目し研究を行った。

### 4-2 材料及び方法

#### 4-2-1 培養細胞及び培養条件

本研究においては4種類のヒト神経膠芽腫細胞のp53 野生株 A172 と U87MG、p53 変異株 TK1, U373MG を用いた。培養条件は第2、3章と同様であるが、培地としては Dulbecco's Minimal Essential Medium (DMEM)を使用した。

#### 4-2-2 IFN- $\beta$ および抗体

IFN- $\beta$ は human recombinant IFN- $\beta$  (商品名 Betaseron (BERLEX)) を用いた。1ml あたり  $10^5$  単位になるように phosphate-buffered saline (PBS)に溶解し、使用するまで-20℃にて保存した。インターフェロンレセプターに対する1次抗体 IFN $\alpha$ R, IFN $\alpha$ / $\beta$ R 及び2次抗体は、すべて Santa Cruz Biotechnology 社のものを使用した。

#### 4-2-3 IFN- $\beta$ 処理、ガンマ線照射およびコロニー形成法

5 x 10<sup>5</sup> 個の細胞を 100 mm 培養皿に播種し、48 時間培養後 IFN- $\beta$ を 1000 U/ml あるいは 3000 U/ml 含む培地と交換し、更に 24 時間培養した。その直後に第 2 章で述べたのと同様にコロニー形成法を行った。生存曲線は Linear- Quadratic (LQ) model を用いて解析し、2 Gy での生存率 (SF2)、および $\alpha$ 、 $\beta$ 値を求めた。

#### 4-2-4 Flow cytometry による細胞周期の解析

各検体に対しガンマ線を 8 Gy1 回照射後 24 時間培養、その後細胞を 75%エタノールにて 16~18 時間固定した。固定後遠心し細胞を集め、室温にて 30 分間 1 mg/ml RNase A 処理し、その後 20  $\mu$ g/ml の濃度の PIにて核を染色し、FACS Calibur (Bekton & Dickinson)を用いて細胞周期の解析を行った。各細胞周期の分布率は ModFit LT software (B&D)にて算出した。なお、A172, U87MG に対しては、ガンマ線照射後 24 時間では G2/M block の有無の判断が困難であったため、30, 36, 48 時間まで培養時間を延長した。

#### 4-2-5 ウェスタンブロット法による IFN- $\beta$ receptor の同定

対数増殖期にある細胞に細胞融解バッファー(50mM Tris pH8.0, 120mM NaCl, 0.5% NP40 and 10 $\mu$ g/ml phenylmethanesulfonyl fluoride)を加えスクレイパーにてマイクロチューブに集め 4 $^{\circ}$ Cにて 15 分間振盪融解後 12000G にて 10 分間遠心し蛋白抽出液を得た。これを別のチューブに移し Bradford assay にて蛋白質量の定量を行った。各細胞株あたり 50 $\mu$ g のタンパク質を 10% SDS-PAGE にて分離し、ニトロセルロース膜に転移した。転移終了後ニトロセルロース膜を 4%スキムミルクを含む 0.1% Tween 20, Tris- buffered saline (TBST)で室温、2 時間ブロッキングし、その後 0.5  $\mu$ g/ml の濃度の 1 次抗体 (IFN $\alpha$ R, IFN $\alpha$ / $\beta$ R)と 4 $^{\circ}$ Cにて一晩反応させた。その後ニトロセルロース膜を室温で 15 分 x 4 回 TBST で洗浄後室温で 2.5 時間 50 ng/ml の濃度の 2 次抗体と反応させ再び同様に洗浄した。バンドの検出には ECL detection kit (Amersham)を用いた。

#### 4-2-6 統計学的検定

IFN- $\beta$ の放射線増感作用の有無は、各細胞株の生存曲線を LQ model でカーブフィットした後、2 Gyにおける生存率をスチューデントの t 検定を用いて統計学的検定を行った。IFN- $\beta$ 処理の有無による各細胞周期における細胞分布の変化も同様に検定した。

#### 4-3 結果

コロニー形成法による生存曲線を図 10 に示した。SF2 は IFN- $\beta$ 未処理の U87MG, U373MG, A172 および TK1 でそれぞれ 0.60, 0.68, 0.49, 0.62 であった。IFN- $\beta$  1000 U/ml で 24 時間前処理した群の SF2 はそれぞれ 0.42, 0.41, 0.39, 0.80 であった。IFN- $\beta$ は、U87MG, U373MG に対しては統計学的に有意に放射線増感作用を示したが、A172, TK1 に対しては増感作用を示さなかった。A172, TK1 に対し、IFN- $\beta$ の濃度を 3000 U/ml まで増加しても SF2 はそれぞれ 0.45, 0.75 と、この濃度でも増感作用はなお認められなかった。

LQ model により得られた  $\alpha$  値は、表 2 に示すごとく放射線増感作用を示した U87MG と U373MG では IFN- $\beta$ 処理後上昇する傾向があった。次に、各細胞株における放射線増感作用の差と IFN- $\beta$ 処理後の細胞周期の変化との関係を調べるためにフローサイトメトリーを用い DNA histogram の解析を行った。IFN- $\beta$ とともに 24 時間培養することにより、すべての細胞株で統計学的に有意な S 期の細胞分布増加が認められた。また、放射線照射 24 時間後に U373MG 及び TK1 は著明な G2/M block を示したが、IFN- $\beta$ 処理後放射線照射された検体では G2/M block よりも S-phase block の方が強く認められた (図 12)。

IFN- $\beta$ はそれに特異的なレセプターに結合することにより様々な生物学的効果を発揮する事が知られている。そこで、各細胞株間で IFN レセプター蛋白の発現に差があるかどうかを調べるために、IFN レセプターに対する抗体を用いウェスタンブロットを行った。図 13 に示すとおり、各細胞株間で IFN レセプターの発現には差は認められなかった。

#### 4-4 考察

悪性腫瘍に対する IFN- $\beta$ の放射線増感作用についてはいくつかの報告があるが、その機序に関しては不明な点が多い (Chang et al., 1987; Angioli et al., 1993; Schmidberger et al., 1999)。Chang らは、ACHN 細胞を放射線照射前に様々な種類の IFN とともに 24 時間培養するとこれらの細胞は G2/M 期に蓄積し、これが放射線増感作用をもたらす一因であると結論している (Chang et al., 1987)。また、他の報告では、IFN- $\beta$ 処理された細胞では放射線照射後の生存曲線の $\alpha$ 値の上昇が認められ、重致死的損傷の蓄積あるいは修復不全が IFN- $\beta$ による放射線増感作用の一つの原因であるとされている (Schmidberger et al., 1999)。本研究においても、IFN- $\beta$ 処理により若干の放射線増強作用が認められた U87MG および U373MG では生存曲線の $\alpha$ 値の上昇が認められた。しかし、これらの細胞株では IFN- $\beta$ 処理後 G2/M 期への細胞の集積は認められなかった。その代わりに、A172, TK1, U373MG, U87MG すべての細胞株では、IFN- $\beta$ 処理後 S 期への細胞の集積が認められた。IFN- $\alpha$ や IFN- $\beta$ は様々な種類の細胞に対して細胞増殖の制御因子の一つとして作用する。Lundblad らは、IFN- $\beta$ はヒト神経膠芽腫細胞株 U251MG に対しこれらの細胞を S 期に蓄積させることによりその増殖抑制作用を示したと報告している (Lundblad et al., 1981)。Qin らもまた、様々なヒト腫瘍細胞に対する IFN- $\beta$ の同様な効果を認め、この効果は特に G1 checkpoint の制御がうまく働かない細胞株 (p53 変異株) に特に認められたと報告している (Qin et al., 1997)。我々の結果でも、p53 変異株である TK1 と U373MG においてより強い S 期での細胞周期停止が認められた。これらの細胞株では放射線照射後の G1 block は認められなかった。P53 は G1 checkpoint に関し重要な役割を担っており、その機能不全は G1 checkpoint の制御不全をもたらす (Levine A et al., 1997; Shackelford R et al., 1999)。これが TK1 と U373MG における S-phase block の理由の一つであろう。

IFN は細胞表面のレセプターに結合することによりその生物学的効果を発揮

することが知られている。IFN- $\beta$ はIFN- $\alpha$ と同じレセプターに結合するが、このレセプターは2つの chain から成っていると考えられている (Russell- Harde D et al., 1999; Constantinescu SN et al., 1994; Croze E et al., 1996)。本研究では、IFN- $\beta$ の放射線増感作用とレセプター蛋白の発現との間に何らかの関係があるかどうかを見るために各細胞株のレセプター蛋白の Western blotting を行った。今回は1次抗体として、米国 Santa Cruz 社より販売されている抗 IFN $\alpha$ R および抗 IFN $\alpha$ / $\beta$ R 抗体を用いた。Western blotting の結果、両レセプターとも従来報告されているよりも軽い分子量で検出された (Novick et al., 1994; Uze et al., 1990)。この原因は不明であるが、一つの可能性としては glycosylation の違いが考えられる (Ling et al., 1995)。また、その発現量は各細胞株間で大きな違いは認められなかった。したがって、今回使用した4種類の細胞株に対するIFN- $\beta$ の放射線増感作用の差とIFNレセプター蛋白の発現量との間には関連性は認められなかった。IFN- $\beta$ がレセプターに結合した後のシグナル伝達や遺伝子発現の誘導等に何らかの違いがある可能性もあるが、これは今後の課題である。

結論として、IFN- $\beta$ の放射線増感作用は細胞株特異性であり、各々の細胞株のレセプター蛋白の発現量との関連は見いだせなかった。IFN- $\beta$ 処理により、細胞周期の進行は特にS期で阻害され、この傾向はp53変異株でより顕著であった。IFN- $\beta$ の放射線増感作用及び細胞周期に及ぼす影響 (S-phase block) の機序に関しては今後さらに検討する必要がある。