

Suppression Mechanisms of Carcinogenesis in the Interferon Gene Family

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8537

インターフェロンシステムによる発癌抑制機構の検討

金沢大学医学部泌尿器科学講座 (主任代理: 大川光央助教授)

長谷川 徹

各種ヒト癌培養細胞株, 臨床腎細胞癌および胃癌組織におけるインターフェロン (interferon, IFN) 遺伝子の欠失の有無を調べ, 癌抑制遺伝子としての意義について検討した. さらにヒト癌培養細胞株におけるインターフェロンの転写調節因子 (interferon regulatory factor, IRF) とインターフェロンに対する特異的受容体 (interferon receptor, IFR) の mRNA レベルでの発現を解析し, IFN に関わる発癌抑制機構について検討した. ヒト癌培養細胞30株, 臨床腎細胞癌組織63例 (63検体) および胃癌組織26例 (26検体) に対して, IFN- α 2, IFN- β および IFN- γ の各遺伝子に特異的なプライマーを用いてポリメラーゼ連鎖反応を行った. 胃癌細胞株 KATO III と NKPS の2株を除くすべての細胞株および臨床癌組織において, 各 IFN 遺伝子が検出された. KATO III と NKPS においては, IFN- α 2 および IFN- β 遺伝子の増幅 DNA 断片が認められず, それら遺伝子の完全欠失が示唆された. さらに, KATO III と NKPS を含む11株のヒト癌培養細胞における2種類の IRF, すなわち IFN 転写活性化因子 IRF-1 および転写抑制因子 IRF-2 の mRNA の発現を, 逆転写反応-ポリメラーゼ連鎖反応法により解析した. mRNA の発現の程度は個々の細胞株により異なっていたが, 11株中4株において IRF-1 の遺伝子発現が認められなかった. 一方, IRF-2 遺伝子はすべての株において発現が認められた. IRF-1 を発現していなかった NPC-TY861 および SQ-K, 低レベルの発現が認められた HT-1080 および高レベルの発現が認められた T24 について, IFN による IRF-1 の遺伝子誘導を調べた. その結果, IFN- α 2a, IFN- γ の単独, または IFN- α 2a と IFN- γ の併用処理により, IRF-1 の発現誘導が認められる細胞株と認められない細胞株とがあった. 前者においては, IFR の mRNA の発現が認められたのに加え, 3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムブロマイド (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT) 比色法による試験管内感受性試験を行った結果, IFN に対して感受性を示した. 一方, 後者は IFR が全く発現しておらず, IFN に対しても低感受性を示した. 以上の結果より, IFN による癌細胞の増殖抑制には IRF-1 の発現誘導が重要であり, その前段階として, IFN と IFR との結合, およびそれに続くシグナル伝達機構が関与していると考えられた.

Key words interferon, interferon regulatory factor, interferon receptor, tumor suppressor gene

インターフェロン (interferon, IFN) 遺伝子は, 癌抑制遺伝子として種々の細胞の癌化に関与している可能性が示唆されている¹⁾. すなわち, IFN の持つ細胞増殖抑制活性や免疫機構の賦活作用²⁾が発癌抑制機構に関与すると考えられている. 脳腫瘍, 急性リンパ性白血病や肺癌の制限酵素切断遺伝子多型性 (restriction fragment length polymorphism, RFLP) 分析³⁻⁵⁾では, IFN- α および IFN- β の遺伝子群が存在する第9染色体短腕の染色体欠失が報告されている. 一方, IFN 遺伝子の発現誘導には, インターフェロン転写調節因子 (interferon regulatory factor, IRF) が深く関与している⁶⁾. 今日までに, 2種類の IRF (IRF-1, IRF-2) が同定されており, 最近, IRF-1 が癌抑制遺伝子として機能している事を示す報告もみられる⁷⁾. また, IFN が細胞増殖抑制活性や免疫調節作用などの生理活性を発揮するためには, IFN と細胞表面に存在する受容体 (interferon receptor, IFR) との結合が必要であり⁸⁾, IFR が IFN の発癌抑制機構に関与する可能性が示唆される.

本研究では, IFN による発癌抑制機構を明らかにするために, ヒト癌樹立培養細胞株, 臨床的に得られた腎細胞癌および胃癌組織における, IFN 遺伝子の欠失の有無を調べ, 癌抑制遺伝子としての意義について検討した. また, IRF-1, IRF-2, IFR の mRNA レベルでの遺伝子発現を解析するとともに, 各種癌細胞株の外因性 IFN に対する試験管内 (*in vitro*) 感受性を調べ, インターフェロンシステムにおける発癌抑制機構について検討した.

材料および方法

1. 腫瘍細胞と培養

IFN 遺伝子および IFN 関連遺伝子の発現を解析するために, 30種のヒト癌細胞株を実験に用いた. その内訳は, 胃癌および骨肉腫各7株, 肺癌5株, 腎細胞癌4株, 頭頸部癌3株, 膀胱癌2株, 大腸癌および線維肉腫各1株であった. 腎細胞癌4株 (ACHN, KU-2, NRC-12, OUR-10) は住友製薬 (株) 研究所 (大

平成5年12月17日受付, 平成6年1月31日受理

Abbreviations: dNTP, deoxynucleoside triphosphate; IFN, interferon; IFR, interferon receptor; IR, inhibition ratio; IRF, interferon regulatory factor; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; OD₅₄₀, optical density at 540 nm; PCR, polymerase chain reaction; RFLP, restriction fragment length polymorphism; RT-PCR, reverse transcriptase-polymerase chain reaction

阪)より, 肺癌5株(PC-6, PC-8, PC-9, PC-13, QG-56)は国立九州がんセンター麻生博史博士, 胃癌2株(NAKAJIMA, ST-KM)および頭頸部癌2株(NPC-TY861, SQ-K)は神奈川県がんセンター矢野間俊介博士, 胃癌2株(KKLS, NKPS)は金沢大学がん研究所外科部磨伊正義教授, 胃癌1株(MKN-28)は福島医科大学鈴木利光博士, 胃癌1株(NUGC-4)はJCRB細胞バンク(東京)より供与された. 膀胱癌1株(KK-47)は当教室にて樹立されたもので, この他, 膀胱癌1株(T24), 胃癌1株(KATO III), 大腸癌1株(COLO 320), 頭頸部癌1株(HEp-2), 骨肉腫7株(HOS, KHOS-312H, MG-63, MNNG/HOS, Saos-2, SK-ES-1, U-2OS)および線維肉腫1株(HT-1080)は, アメリカンタイプカルチャーコレクション(American Type Culture Collection, Rockville, USA)より入手した. 細胞は10% (v/v) 非働化ウシ胎児血清(GIBCO, Grand Island, USA)と0.3mg/mlのグルタミン(日本製薬, 東京)を含むRPMI-1640培地(ニプロ, 大阪)中で, CO₂濃度5%, 37℃の条件下で培養した.

II. DNA, RNA の抽出

1990年12月から1992年12月までに金沢大学医学部付属病院泌尿器科および関連病院泌尿器科にて, 63症例より手術にて得られた臨床腎細胞癌組織63検体を, 摘出直後-80℃以下に保存し, 以下の実験に用いた. 26症例の臨床胃癌組織26検体のゲノムDNAは, 金沢大学医学部付属病院第2外科より供与された.

ヒト培養癌細胞(約10⁶個)および臨床癌組織(約0.5g)から, フェノールクロロホルム法⁹⁾によりゲノムDNAを抽出し, 100μg/mlに調整し, -80℃で保存した.

RNAはChomczynskiら¹⁰⁾の方法に基づいて開発された, ISOGEN(ニッポンジーン, 東京)を用いて抽出, 精製した. すなわち, ヒト培養癌細胞10⁶個, あるいは臨床組織約0.1g当たり1mlのISOGENを加え攪拌し, 室温で5分間放置後, クロロホルムを0.2ml加え激しく振盪させた. 室温で3分間放置後, 4℃, 12,000rpmにおいて10分間遠心し, 上清を回収しソプロパノールを0.5ml加え, 室温で5分間放置した. さらに, 4℃, 12,000rpmにおいて10分間遠心し, RNAを沈殿として得た. 沈殿は75%エタノールで洗い, 減圧乾燥した後に200μg/mlに調整し, -80℃で保存した.

III. プライマーの作製

ポリメラーゼ連鎖反応(polymerase chain reaction, PCR)法および逆転写反応-ポリメラーゼ連鎖反応(reverse transcriptase-PCR, RT-PCR)法に用いるプライマーとして, IFN-α2, IFN-β, IFN-γ, ヒトβグロビン(human β-globin), IRF-1, IRF-2, IFRおよびヒトβ-アクチン(human β-actin)の遺伝子配列¹¹⁾⁻¹⁸⁾より, 表1に示す塩基配列のオリゴヌクレオチドを, DNA合成装置PCRメイト(Applied Biosystems, CA, USA)により合成した. これらにより特異的に増幅されるDNA断片の長さはそれぞれ, IFN-α2が404塩基対(base pair, bp)(プライマー1-2), 707bp(プライマー3-4), IFN-βが170bp, IFN-γが84bp, ヒトβグロビンは576bp, IRF-1が278bp, IRF-2が278bp, ヒトβ-アクチンが592bpであった.

IV. PCR 法

PCRは, 調整したゲノムDNA 0.5μg, PCR反応緩衝液[10mM Tris-HCl (pH8.3), 50mM 塩化カリウム, 1.5mM 塩化マグネシウム], デオキシヌクレオチド三リン酸(deoxynucleotide triphosphate, dNTP)各200mM, TaqDNAポリメラーゼ

Table 1. Synthetic oligonucleotides used

Gene ^{a)}	5' primer	3' primer	Sequence region	(Ref.) ^{b)}
IFN-α2 (primer 1-2)	GACTTTGGATTCCAGGAGGAGTTTGGG	ACCAAGTTTCAATCCCTACT	-34-673	(11)
IFN-α2 (primer 3-4)	TCAACCAAGTCTAGCAGCAT	ATCGTGTCAATGGTCAATAGCA	172-575	(11)
IFN-β	GGCACAAACAGGTAGTAGGCG	GCCACAAGGAGCTTCTGACAC	-40-130	(12)
IFN-γ	AGTGATGGCTGAACTGTCCG	CTGGGATGCTCTTCGACCTC	4647-4731	(13)
Human β-globin	AGAGCCATCTATTGCTTACA	TATGACATGAACCTTAACCAT	11377-11952	(14)
IFN-1	ATTCACACAGGCCGATACAA	AGTCCATCAGAGAAAGGTATCA	375-652	(15)
IFN-2	ATCCATACAGGAAGCATCA	ATCACTACTCCATTAATA	276-557	(16)
IFR	ATCATAGATGACAACTTAT	ATAAGTAGTCTCTGGTGAGA	196-672	(17)
Human β-actin	GAAAACTCTGGCACCCACCTT	TTTGAAGGTAGTTTCGTGGAT	1299-2425	(18)

The priming oligonucleotide at the 5' end of the gene of interest is called the 5' primer, and that at the 3' end of the gene is designated the 3' primer.

a.) IFN, interferon; IRF, interferon regulatory factor; IFR, interferon receptor.

b) Reference.

(Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, USA) 2.5単位, IFN- β では 0.25 μ M, その他は 0.5 μ M の 5'側および 3'側の各プライマーを含む反応液 (全量 100 μ l) 中で行った. 加熱による反応液の蒸散を防ぐため, 100 μ l のミネラルオイル (Sigma, St. Louis, USA) を重層した. 反応には DNA Thermal Cycler (Perkin-Elmer Cetus) を使用し, 熱変性 94 $^{\circ}$ C, 1分間, アニーリング 55 $^{\circ}$ C, 2分間, DNA の伸長を 72 $^{\circ}$ C, 1分間とし, これを 1 サイクルとして, 25 サイクル繰り返した¹⁹⁾.

V. PCR 産物の検出

PCR により増幅された DNA 断片 (PCR 産物) は, 0.5 μ g/ml エチジウムブロマイドを含む泳動緩衝液 (40mM Tris-HCl, 20mM 酢酸ナトリウム, 1mM エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム, pH7.2) 中, 定電圧 100V において 1% アガロースゲル (宝酒造, 京都) で電気泳動を行った. 泳動後, 紫外線照射器 (UV トランスイルミネーター) (フナコシ, 東京) 上でゲルをポラロイドカメラを用いて撮影した.

VI. RT-PCR 法

試料全 RNA 1 μ l に, 50pmol の 3'側プライマーを加え, 68 $^{\circ}$ C, 15分間の加熱処理後, 氷冷した. 逆転写反応は, 逆転写反応緩衝液 [50mM Tris-HCl (pH8.3), 40mM 塩化カリウム, 8mM 塩化マグネシウム], dNTP 各 500 μ M, 5mM ジチオトトレイトール (ナカライテスク, 京都), リボスクレアーゼ阻害剤 (Promega, Madison, USA) 20単位, 225 μ l/ml 牛血清アルブミン (フナコシ), および逆転写酵素 (AMV-reverse transcriptase) (Life Science, St. Percersburg, USA) 2単位を含む反応液 (全量 20 μ l) を, 42 $^{\circ}$ C で 60分間加温して行った²⁰⁾. 反応終了後, 95 $^{\circ}$ C で 5分間加熱して逆転写酵素を失活させた.

逆転写反応後の PCR は, 以上のごとく合成した cDNA 溶液, PCR 反応緩衝液 [8mM Tris-HCl (pH8.3), 40mM 塩化カリウム, 1.2mM 塩化マグネシウム], dNTP 各 200 μ M, TaqDNA ポリメラーゼ 2.5単位, 0.5 μ M の 5'側プライマーおよび 0.25 μ M の 3'側プライマーを含む反応液 (全量 100 μ l) 中で行っ

た. 以下, PCR の反応条件と増幅された DNA 断片の検出は, 前述の PCR 法と同様に行った.

VII. 培養細胞に対する外因性 IFN 処理

遺伝子組み換え型インターフェロン- α 2a (IFN- α 2a) (日本ロシュ, 東京) および IFN- γ (塩野義, 大阪) を, 培養液中に 1×10^6 単位/ml となるように溶解した. この IFN を含む培養液中, CO₂ 濃度 5%, 37 $^{\circ}$ C の条件下でヒト癌細胞株の 2時間培養した. 培養後前述の方法で全 RNA を抽出し, IRF-1 の発現を RT-PCR 法により検出した.

VIII. 外因性 IFN のヒト癌培養細胞に対する試験管内感受性試験

試験管内における IFN の感受性試験は, Carmichael ら²¹⁾ の方法に準じ, 生細胞の脱水素酵素の還元能を指標とする 3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムブロマイド (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenylterazolium bromide, MTT) 法を用いて行った. ヒト癌培養細胞を 1×10^4 個/ml に調整し, 試験管内にこの細胞懸濁液を 0.9ml 分注し, 同時に IFN 希釈液を 0.1ml 加え, 37 $^{\circ}$ C 恒温水槽において 5分間振盪した. その後 96穴培養プレート (Nunc, Illinois, USA) に 1穴当たり 200 μ l ずつ分注し, CO₂ 濃度 5%, 37 $^{\circ}$ C の条件下で 72時間培養した. IFN は, 最終濃度が 1×10^2 , 1×10^3 , 1×10^4 および 1×10^5 単位/ml になるように調整した. リン酸緩衝液 (和光, 大阪) にて 5mg/ml に調整した MTT 試薬 (Sigma) を 1穴当たり 25 μ l 加え, さらに 4時間培養した. 上清を吸引除去し, ジメチルスルホキシド (和光) を 200 μ l 加え, 生成した MTT フォルマザンを溶解した. 各試料は Immunoreader NJ-2000 (日本インターメッド, 東京) を用いて, 波長 540nm における吸光度 (optical density at 540nm, OD₅₄₀) を測定した. 増殖抑制率 (inhibition ratio, IR) に基づく効果判定は, 対照群の吸光度を 100% とした場合の IFN 処理群の吸光度を対照群と比較することにより行った. 増殖抑制率の算出方法を次式に示す.

$$IR (\%) = (1 - T/C) \times 100$$

T: 薬剤投与群の平均 OD₅₄₀ 値

C: 対照群の平均 OD₅₄₀ 値

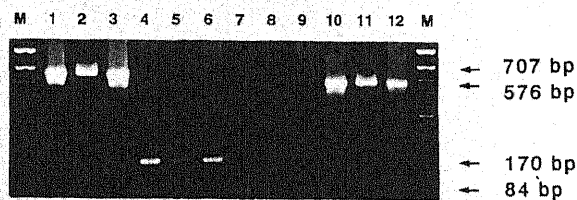


Fig. 1. Detection of interferon (IFN)- α 2, IFN- β , IFN- γ and human β -globin gene amplification by polymerase chain reaction (PCR). Twenty-five cycles of PCR were performed on 0.5 μ g aliquots of genomic DNA isolated from normal kidney (lanes 1, 4, 7 and 10), from renal cell carcinoma (lanes 2, 5, 8 and 11) and from renal cell carcinoma cell line OUR-10 (lanes 3, 6, 9 and 12). Amplimers were provided for PCR-amplification of IFN- α 2 (lanes 1 to 3), IFN- β (lanes 4 to 6), IFN- γ (lanes 7 to 9) and human β -globin gene fragments (lanes 10 to 12). For IFN- α 2, the primers 3 and 4 were used. The sizes of the PCR amplified fragments are indicated on the right. The products obtained using IFN- α 2, IFN- β , IFN- γ and human β -globin primers were stained as the 707, 170, 84 and 576 bp fragments, respectively. M, Hinc II digest of Φ X 174 DNA (molecular mass marker).

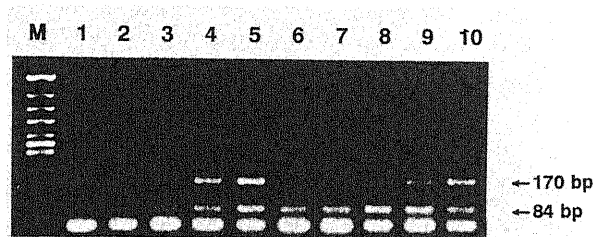


Fig. 2. PCR of serially diluted DNA samples. Solution of genomic DNA (50 μ g/ml) isolated from renal cell carcinoma cell line OUR-10 was diluted with solution of genomic DNA (50 μ g/ml) from chick liver (lanes 1, 2, 3, 4 and 5) or gastric cancer cell line NKPS (lanes 6, 7, 8, 9 and 10) and amplified by PCR. The products obtained using IFN- β and IFN- γ primers were stained as the 170 and 84 bp fragments respectively. Dilution of genomic DNA from OUR-10 cells: lanes 2 and 7, 2^{-3} ; lanes 3 and 8, 2^{-2} ; lanes 4 and 9, 2^{-1} ; lanes 5 and 10, 2^{-0} ; lanes 1 and 6, no genomic DNA from OUR-10 cells. M, Hinc II digest of Φ X 174 DNA (molecular mass marker).

得られた結果は Student の t 検定により統計学的処理を行い、危険率が 5% 以下である場合を有意差ありとした。

成 績

1. PCR 法による各種ヒト癌細胞株における IFN 遺伝子異常の解析

正常腎組織、臨床腎細胞癌組織、腎細胞癌細胞株 (OUR-10) の DNA 0.5 μ g を鋳型として、IFN- α 2, IFN- β , IFN- γ および DNA 増幅反応の対照として用いたヒト β -グロビンの各遺伝子に特異的なプライマー (IFN- α 2 の場合にはプライマー 3-4) を用いて PCR を行った。その結果、目的鎖長の DNA 断片が、いずれも明瞭な単一のバンド (IFN- α 2, 707bp; IFN- β , 170bp; IFN- γ , 84bp; ヒト β -グロビン, 576bp) として検出された (図 1)。また、反応液中に IFN- α 2 とヒト β -グロビン、または IFN- β と IFN- γ に対するプライマーを混合して加え同時に増幅しても、互いに影響なく目的の DNA 断片が得られた。さらに、段階希釈した鋳型 DNA に対して PCR を行い、対立遺伝子の欠失に対する検出感度を検討した。鋳型 DNA の調製には、OUR-10、受精鶏卵の胚の肝および後に述べる如く IFN- α 2 と IFN- β の両遺伝子が完全欠失していた NKPS の DNA 溶液を用いた。OUR-10 の DNA 溶液 (50 μ g/ml) を、鶏卵肝の DNA 溶液 (50 μ g/ml) または NKPS の DNA 溶液 (50 μ g/ml) で 2 倍ずつ段階希釈して調製した DNA 溶液 (全 DNA 量 0.5 μ g) を用いて PCR による増幅を施行した。その結

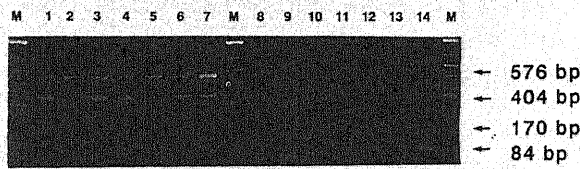


Fig. 3. Detection of IFN- α 2, IFN- β , IFN- γ and human β -globin gene amplification by PCR. Twenty-five cycles of PCR were performed on 0.5 μ l aliquots of genomic DNA isolated from 7 gastric cancer cell lines. Amplimers were provided for PCR-amplification of IFN- α 2 and human β -globin in the left half of the panel, and IFN- β and IFN- γ in the right half of the panel. For IFN- α 2, the primers 1 and 2 were used. The sizes of the PCR amplified fragments are indicated on the right. Lanes 1 and 8, KKLS; lanes 2 and 9 KATO III; lanes 3 and 10, NUGC-4; lanes 4 and 11, ST-KM; lanes 5 and 12, NKPS; lanes 6 and 13, NAKAJIMA; lanes 7 and 14, MKN-28 cell line. M, Hinc II digest of Φ X 174 DNA (molecular mass marker).

果、2 倍の鋳型 DNA 量の差が、バンド強度の差として検出され、PCR 法により対立遺伝子の欠失が検出可能であることが示された (図 2)。

図 3 には、ヒト胃癌細胞株 7 種について、PCR により特異的遺伝子配列の増幅を行った結果を示す。ヒト β -グロビン遺伝子の増幅 DNA 断片は、すべての細胞株において検出されたが、KATO III および NKPS の 2 株においては、IFN- α 2 および IFN- β 遺伝子の増幅 DNA 断片 (IFN- α 2 の場合にはプライマー 1-2, 404bp) が認められず、それら遺伝子の完全欠失が示唆された。IFN- γ 遺伝子の増幅 DNA 断片は、いずれの細胞株にも検出された。これら胃癌細胞株の他、腎細胞癌 4 株、膀胱癌 2 株、肺癌 5 株、大腸癌 1 株、頭頸部癌 1 株、骨肉腫 7 株および線維肉腫 1 株について、同様に PCR により遺伝子欠失を調べたが、いずれの IFN 遺伝子も欠失していなかった。さらに、臨床腎細胞癌組織 63 例、臨床胃癌組織 26 例についても解析した。ただし、臨床胃癌組織の DNA は、大部分がホルマリン固定標本から抽出したため、DNA の断片化を来していた。したがって、404 または 707bp と比較的大きな領域を増幅する IFN- α 2 遺伝子の PCR による解析は行えなかった。臨床腎細胞癌組織では、IFN- α 2, IFN- β および IFN- γ 遺伝子の増幅 DNA 断片がいずれも検出されたが、臨床胃癌組織 26 例中 3 例 (11.6%) にお

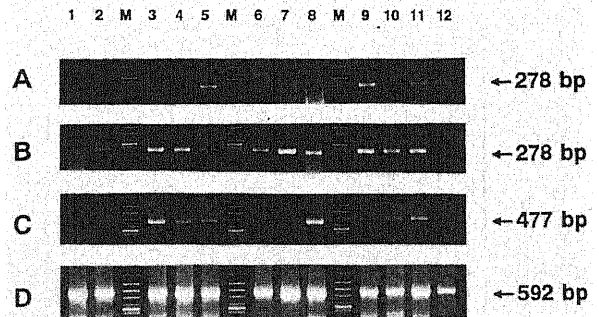


Fig. 4. Detection of interferon regulatory factor (IRF)-1 (A), IRF-2 (B), interferon receptor (C) and human β -actin (D) mRNA by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). Eleven cell lines (lanes 1 to 11) and placenta (lane 12) RNA were reverse transcribed and amplified (25 cycles) using IRF-1, IRF-2, IRF receptor and human β -actin primers. The sizes of the RT-PCR amplified fragments are indicated on the right. Lane 1, MNNG/HOS; lane 2, HT-1080; lane 3, OUR-10; lane 4, NPC-12; lane 5, T24; lane 6, SQ-K; lane 7, NPC-TY861; lane 8, HEP-2; lane 9, KATO III; lane 10, KKLS; lane 11, NKPS cell line; lane 12, normal human placenta tissue. M, Hinc II digest of Φ X 174 DNA (molecular mass marker).

Table 2. Frequency of loss of IFN- α 2, IFN- β , and IFN- γ genes on renal cell carcinoma and gastric cancer samples

Cancer	Number of samples tested	Number of samples showing negative PCR for gene fragments of		
		IFN- α 2	IFN- β	IFN- γ
Renal cell carcinoma	63	0	0	0
Gastric cancer	26	NT ^{a)}	3	0

a) not tested.

いて、IFN- β 遺伝子の増幅 DNA 断片が認められなかった (表 2).

II. RT-PCR 法による各種ヒト癌細胞株における IRF-1, IRF-2 遺伝子発現

IFN- $\alpha 2$ および IFN- β 遺伝子の増幅 DNA 断片が認められなかった KATO III と NKPS を含む 11 株のヒト癌細胞株および成熟ヒト胎盤より全 RNA を抽出し、IRF-1, IRF-2 の mRNA レベルにおける遺伝子発現を RT-PCR 法を用いて検出した (図 4). IRF-1 は細胞株種によって発現の程度が異なっており、11 株中 4 株 (HEp-2, MNNG/HOS, NPC-TY861 および SQ-K) においてその発現が認められなかった. IRF-2 の遺伝子発現も細胞株種により発現の程度は異なっていたが、すべての細胞株において発現が認められ、各 IFN 遺伝子の異常や IRF-1 の遺伝子発現との間に関連性は見いだせなかった.

また、PCR で得られた各遺伝子の増幅 DNA 断片の塩基配列をダイデオキシン法²⁰⁾により解析し、目的とする mRNA の塩基配列に相補的な cDNA を増幅していることを確認した.

III. 外因性 IFN 処理による培養細胞株における IRF-1 の遺伝子発現の誘導

mRNA レベルで IRF-1 を発現していなかった NPC-TY861

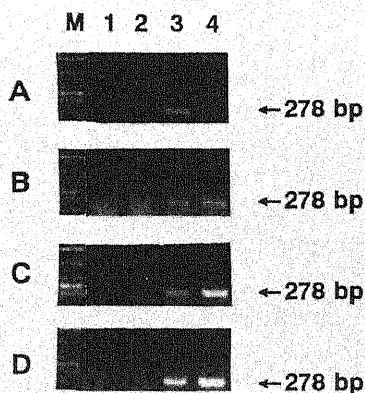


Fig. 5. Effect of IFNs on IRF-1 mRNA expression. Total RNA was isolated from 4 cell lines (lanes 1 to 4) treated with IFN- $\alpha 2a$ (1×10^3 U/ml) (B), IFN- γ (1×10^3 U/ml) (C), or a combination of IFN- $\alpha 2a$ (1×10^3 U/ml) and IFN- γ (1×10^3 U/ml) (D). After reverse transcription, the complementary DNA was amplified using IRF-1 primers. A, not treated. Lane 1, SQ-K; lane 2, NPC-TY861; lane 3, T24; lane 4, HT-1080 cell line. M, Hinc II digest of Φ X 174 DNA (molecular mass marker).

および SQ-K, 低レベルの発現が認められた HT-1080 および高レベルの発現が認められた T24 について、IFN- $\alpha 2a$, IFN- γ の単独処理、または IFN- $\alpha 2a$ と IFN- γ を併用処理し、IRF-1 の遺伝子発現を RT-PCR 法により解析した. HT-1080 および T24 においては、IFN- $\alpha 2a$, IFN- γ いずれの処理によっても IRF-1 の遺伝子発現が亢進しており、IFN- $\alpha 2a$ と IFN- γ を併用することによりさらに発現量が増加していた. 一方、NPC-TY861 および SQ-K においては、いずれの処理によっても、IRF-1 遺伝子の発現誘導は認められなかった (図 5).

IV. RT-PCR 法による各種ヒト癌細胞株における IFR 遺伝子の発現

IRF-1 および IRF-2 の遺伝子発現を解析した 11 株のヒト癌細胞株および成熟ヒト胎盤について、RT-PCR 法を用いて IFR の mRNA レベルにおける遺伝子発現を解析した (図 4). その結果、細胞株種によって発現の程度が異なっていたが、NPC-TY861 および SQ-K においては発現は全く認められなかった.

V. 外因性 IFN による試験管内感受性試験

IFN による発現誘導を調べたヒト癌細胞株 4 株 (HT-1080, T24, NPC-TY861 および SQ-K) について、MTT 法により IFN に対する試験管内感受性試験を施行した (表 3). IFN- $\alpha 2a$ 濃度が 1×10^3 単位/ml 以下の場合、いずれの細胞株においても明らかな感受性は認められなかった. IFN- $\alpha 2a$ 濃度が 1×10^4 単位/ml の時、HT-1080 株では MTT 法における OD_{540} 値が 96.3 ± 23.1 (平均値 \pm 標準偏差) であり、IFN- $\alpha 2a$ 非存在下における値に比し有意 ($p < 0.01$) に低く、増殖抑制率 61.6% と感受性を有していた. IFN- $\alpha 2a$ 濃度が 1×10^5 単位/ml の時、HT-1080 および T24 の 2 株が各々 71.6%, 52.2% の増殖抑制率を示し、感受性を有していた. すなわち、 OD_{540} 値は HT-1080 では 70.7 ± 6.65 , T24 では 112 ± 5.56 であり、IFN- $\alpha 2a$ 非存在下における値 (各々 250 ± 45.4 , 238 ± 19.9) に比し有意 ($p < 0.01$) に低値であった.

考 察

ウイルス増殖抑制活性を示す蛋白質として発見された IFN は、現在哺乳類においては、抗原性、産生細胞、産生様式、分子構造、酸安定性などの違いにより、 α , β , γ , ω の 4 種類に分類されている. これらは上記活性に加えて細胞増殖抑制活性など多様な生物活性を持つサイトカインのひとつとして、生体防御機構と恒常性維持に重要な役割を果たしている²¹⁾. 臨床

Table 3. Effect of IFN- $\alpha 2a$ on the growth of cancer cells *in vitro*

Concentration of IFN- $\alpha 2a$ in culture medium (unit/ml)	Tumor cell line							
	HT-1080 (6) ^{a)}		T24 (6)		NPC-TY 861 (6)		SQ-K (6)	
	Cell viability ^{b)} (mean \pm SD, OD_{540})	IR (%) ^{c)}	Cell viability (mean \pm SD, OD_{540})	IR (%)	Cell viability (mean \pm SD, OD_{540})	IR (%)	Cell viability (mean \pm SD, OD_{540})	IR (%)
10^3	$70.7 \pm 6.65^*$	71.6	$112 \pm 5.56^*$	52.2	558 ± 61.9	-14.6	379 ± 36.2	4.5
10^4	$96.3 \pm 23.1^*$	61.6	168 ± 21.6	29.1	621 ± 118	-26.0	360 ± 11.6	9.3
10^5	186 ± 50.9	25.6	165 ± 52.8	30.8	620 ± 78.5	-26.0	385 ± 31.9	3.0
10^6	206 ± 50.8	17.2	193 ± 42.2	18.1	594 ± 97.3	-20.7	356 ± 30.8	10.6
0	250 ± 45.4		238 ± 19.9		492 ± 73.2		395 ± 47.2	

a) Number of dishes.

b) Tumor cells were incubated at the different concentrations of IFN- $\alpha 2a$ for 72hr at 37°C. Then, cell viability was estimated by 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay, in which optical density at 540 nm (OD_{540}) was measured.

c) Inhibition ratio (IR) (%) = $\{1 - (OD_{540} \text{ of treated group}) / (OD_{540} \text{ of control group})\} \times 100$.

* $P < 0.01$ vs. control group by Student's t-test.

的には IFN は、肝炎などのウイルス性疾患のほか、腎細胞癌²⁴、脳腫瘍²⁵、悪性黒色腫²⁶などの治療でその有効性が認められている。近年の遺伝子工学の発達に伴って、各種 IFN 遺伝子の塩基配列が決定され、従来の天然型ではなく遺伝子組み換え型の IFN 製剤が開発され、臨床応用されている²⁷。

一方、IFN 遺伝子は、癌抑制遺伝子として種々の細胞の癌化に関与している可能性が示唆されている¹¹。IFN- α および β の遺伝子群の存在する第 9 染色体短腕の RFLP 解析で、James ら³ は、脳腫瘍 34 症例中 6 例、また Grander ら⁴ は、急性リンパ性白血病 37 例中 6 例に、染色体の完全欠失またはヘテロ接合性の欠失が認められたと報告している。腎細胞癌においても、0~13%と低頻度ではあるが第 9 染色体短腕に對立遺伝子の欠失が認められている^{28,29}。しかし Olopade ら³ は、肺癌由来細胞株を用いた研究で、IFN の遺伝子群のセントロメア寄り、4 メガ塩基以内に存在するメチルチオアデノシンホスホリラーゼ (methylthioadenosine phosphorylase, MTAP) に着目し、IFN 遺伝子そのものではなく、その近傍に癌抑制遺伝子が存在する可能性を報告している。このように、IFN 遺伝子の癌抑制遺伝子としての機能は未だ明らかになっていないといえない。本研究では、ヒト癌培養細胞ならびに臨床腎細胞癌組織における IFN 遺伝子の異常の有無を PCR 法を用いて調べ、IFN 遺伝子の癌抑制遺伝子としての意義について検討した。

PCR 法による IFN の對立遺伝子異常の解析はすでに Neubauer ら³⁰ によって行われている。今回行った PCR の反応条件は、彼らの方法をもとに、對立遺伝子異常の解析ができる条件下で行った。しかし、2 株の癌細胞株において IFN- $\alpha 2$ および IFN- β の完全欠失が認められた以外は、明らかな異常は認められなかった。

癌抑制遺伝子の遺伝子産物には、Rb 蛋白や p53 蛋白のように細胞周期に関与するものと、腫瘍増殖因子- $\beta 1$ やインターロイキン-6 の様に細胞増殖を抑制する働きをもつものがある³¹。IFN の場合、癌化過程にある細胞自身の産生する IFN が、直接効果として増殖を自己抑制すると共に、免疫系の活性化を惹起することにより、さらなる悪性転換を阻止しているものと予想される。すなわち、癌抑制遺伝子としての機能面において、IFN は Rb 遺伝子あるいは p53 遺伝子などとは異なっており、對立遺伝子の異常が直接癌化に関与する可能性は低いと考えられる。従って、IFN- $\alpha 2$ 、IFN- β のバンドの完全欠失が認められた KATO III や NKPS においては、IFN による自己増殖抑制作用の欠如が、発癌機構に関与している可能性があると考えられた。一方、完全欠失の認められなかったその他の癌細胞株や臨床腎細胞癌においては、少なくとも IFN 遺伝子そのものの遺伝子産物に異常はないものと考えられ、IFN 遺伝子が癌抑制遺伝子として発癌機構に関与している可能性は低いと考えられた。

IFN は通常、細胞から常に産生されているのではなく、外界からの刺激、例えばウイルス感染や種々のサイトカインによって一過性に発現誘導される³²。IRF は、IFN- α 、IFN- β および多くの IFN 誘導遺伝子の転写開始点より約 100 塩基対上流の DNA 配列 (プロモーター) に特異的に結合し、これらの遺伝子の発現調節を行っている³³。谷口ら³⁴ は 2 種類の IRF を同定し、それぞれ IRF-1、IRF-2 と名付けた。両者は互いに拮抗して上述のプロモーターに結合し、IRF-1 は転写活性化因子、IRF-2 は転写抑制因子として、IFN 遺伝子の発現調節において

相反する役割を担っていることが明らかになっている³⁵。また、IRF 遺伝子自身の発現は、ウイルス感染によって誘導され、さらに IFN 処理によっても誘導される³⁶。IRF-1 蛋白の半減期がわずか 30 分程で不安定であるのに対し、IRF-2 は 8 時間と非常に安定な蛋白である³⁷。すなわち、定常状態では相対的に IRF-2 が優位になっているが、ウイルス感染や IFN 処理により一過性に IRF-1 が優位になり、急激な IFN の産生亢進を引き起こすという、細胞増殖制御機構が存在するとされている³²。IRF-1 は、ヒトにおいては第 5 染色体長腕に位置しており³⁷、興味深いことに、この IRF-1 が癌抑制遺伝子として機能していることを示す報告もみられる⁷。本研究においては、検討した癌細胞株 11 株のうち、HEp-2、HT-1080、NPC-TY861 および SQ-K において IRF-1 の遺伝子発現が認められなかった。

mRNA レベルで IRF-1 を発現していなかった NPC-TY861 および SQ-K、低レベルの発現が認められた HT-1080 および高レベルの発現が認められた T24 について、IRF-1 の遺伝子発現が IFN によって誘導されるかどうかを検討した。その結果、HT-1080 および T24 では明らかな発現量の増加が認められたが、NPC-TY861 および SQ-K では全く発現していなかった。IFN により IRF-1 の遺伝子発現が誘導された HT-1080 および T24 においては、IFN- $\alpha 2a$ に対して感受性を示したことから、IRF-1 の発現誘導を介する細胞増殖制御機構が維持されていることが推察された。一方、NPC-TY861 および SQ-K では、IRF-1 の遺伝子発現が誘導されないことに加え、IFN- $\alpha 2a$ に対して感受性を示さなかったことから、このような制御機構が正常に作動していないと考えられた。

IFN が細胞増殖抑制活性、免疫調節作用などの生理活性を発揮するためには、細胞表面に存在する受容体との結合が必須と考えられている⁹。IFN- α および IFN- β はそれぞれ共通の IFR を介して作用するこの受容体はヒトでは第 21 染色体に存在している³⁸。ヒト癌細胞株における mRNA レベルでの発現を PT-PCR 法により検討したところ、NPC-TY861 と SQ-K の 2 株においては、IFR の遺伝子発現は全く認められなかった。以上の結果より、IFN が IRF の発現を誘導し、また IFN が細胞増殖抑制作用を発揮するためには、その前段階として、IFN と IFR との結合、およびそれに続く様々なシグナル伝達機構が関与していると考えられた。

IFN の遺伝子の発癌抑制機構においては、IFN 遺伝子そのものの異常とともに、受容体を介した IRF-1 の発現誘導が重要であり、その機構解明のためには、IFN、IRF および IFR の遺伝子発現を総合的に解析し、それらの機能発現の意義についてさらに検討を加える必要がある。また、IFN が治療薬として癌細胞に直接的な抗腫瘍効果を発揮する際には、IFR が機能することが必要となる。RT-PCR 法による遺伝子発現の解析は、少量の臨床検体にも適用可能であり、今後、IFN による癌治療において予め感受性を予測するうえで、IFR の遺伝子発現は有用な指標になると考える。

結 論

ヒト癌樹立培養細胞株、臨床的に得られた腎細胞癌および胃癌組織における、IFN 遺伝子の欠失の有無、ならびに IRF-1、IRF-2、IFR の mRNA レベルでの遺伝子発現を解析し、癌抑制遺伝子としての意義について検討し、次の結果を得た。

1. ヒト癌細胞株における PCR 法を用いた IFN 遺伝子の欠

失の有無に関する検討で、KATO III と NKPS において、IFN- $\alpha 2$ および IFN- β の増幅 DNA が認められず、それら遺伝子の完全欠失が示唆された。すなわち、IFN による自己増殖抑制作用の欠如が、発癌機構に関与している可能性が考えられた。

2. RT-PCR 法を用いた検討で、IFN の転写活性化因子である IRF-1 は、調べた11株中4株においてその遺伝子発現が認められず、IRF-1 が癌抑制遺伝子として機能している可能性が示唆された。

3. HT-1080 および T24 においては、IFN 処理により IRF-1 の遺伝子発現が誘導された。また MTT 法による試験管内感受性試験において IFN に対して感受性を示した。

4. 一方、NPC-TY861 および SQ-K においては、同様の処理によって IRF-1 の発現誘導が認められず、IFN の mRNA レベルでの発現も全く認められなかった。さらに MTT 法においても IFN- $\alpha 2a$ に対して低感受性であった。

以上の結果から、IFN の発癌抑制には IRF-1 の発現誘導が重要であり、その前段階として、IFN と IFR との結合、およびそれに続く様々なシグナル伝達機構が関与していると考えられた。

謝 辞

稿を終えるに望み、御懇篤なる御指導と御校閲を賜りました金沢大学医学部泌尿器科学教室大川光央助教授ならびに金沢大学がん研究所化学療法部佐々木琢磨教授に深甚の謝意を捧げます。また、本研究の開始にあたり御指導戴きました本学泌尿器科学教室久住治男名誉教授に深く感謝の意を表します。また、本研究の遂行に際し、御協力を頂きました打林忠雄講師、国見一人博士、および終始直接御指導ご鞭撻くださいました金沢大学がん研究所化学療法部遠藤良夫博士に心より深謝いたします。さらに、多大なる御助言と御協力を賜りました金沢大学医学部第2外科学教室の皆様、金沢大学医学部泌尿器科学教室諸兄、同関連病院泌尿器科諸先生、ならびに金沢大学がん研究所化学療法部の皆様、厚く御礼申し上げます。

なお、本論文の一部は第81回日本泌尿器科学会総会(1993年京都)において発表した。

文 献

- 1) Ferrantini, M., Proietti, E., Santodonato, L., Gabriele, L., Peretti, M., Plavec, I., Meyer, F., Kaido, T., Gresser, I. & Belardelli, F.: α 1-Interferon gene transfer into metastatic friend leukemia cells abrogated tumorigenicity in immunocompetent mice: antitumor therapy by means of interferon-producing cells. *Cancer Res.*, 53, 1107-1112 (1993).
- 2) 小倉浩美: インターフェロンはなぜ効くのかー抗腫瘍作用. *臨床医*, 19, 1466-1470(1993).
- 3) James, C. D., He, J., Carlbom, E., Nordenskjold, M., Cavenee, W. K. & Collins, V. P.: Chromosome 9 deletion mapping reveals interferon α and interferon β -1 gene deletions in human glioma tumors. *Cancer Res.*, 51, 1684-1688 (1991).
- 4) Grander, B. P., Heyman, M., Brøndum-Nielsen, K., Liu, Y., Lundgren, E., Söderhall, S. & Einhorn, S.: Interferon system in primary acute lymphocytic leukemia cells with or without deletions of the α/β -interferon genes. *Blood*, 79, 2079-2083 (1992).

- 5) Olopade, O. I., Buchhagen, D. L., Malik, K., Serman, J., Nobori, T., Bader, S., Nau, M., M., Gazdar, A. F., Minna, J. D. & Diaz, M. O.: Homozygous loss of the interferon genes defines the critical region on 9p that is deleted in lung cancers. *Cancer Res.*, 53, 2410-2415 (1993).
- 6) Fujita, T., Kimura, Y., Miyamoto, M., Barsoumian, E. L. & Tamiguchi, T.: Induction of endogenous IFN- α and IFN- β gene by a regulatory transcription factor, IRF-1. *Nature*, 337, 270-272 (1989).
- 7) Harada, H., Kitagawa, M., Tanaka, N., Yamamoto, H., Harada, K., Ishihara, M. & Taniguchi, T.: Anticarcinogenic and oncogenic potentials of interferon regulatory factors-1 and -2. *Science*, 259, 971-974 (1993).
- 8) Aguet, M.: High-affinity binding of 125I-labelled mouse interferon to a specific cell surface receptor. *Nature*, 284, 459-461 (1980).
- 9) Davis, L. G., Dibner, M. D. & battey, J. F.: *Basic Methods in Molecular Biology*, 1st ed., p42-43, Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York, 1986.
- 10) Chomczynski, P. & Sacchi, N.: Single-stip method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, 162, 156-159 (1987).
- 11) Lawn, R. M., Gross, M., Houck, C. M., Franke, A. E., Gray, P. W. & Goeddel, D. V.: DNA sequence of a major human leukocyte interferon gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 5435-5439 (1981).
- 12) Lawn, R. M., Adelman, J., Franke, A. E., Houck, C. M., Gross, M., Najarian, R. & Goeddel, D. V.: Human fibroblast interferon gene lacks introns. *Nucleic Acids Res.*, 9, 1045-1052 (1981).
- 13) Gray, P. W. & Goeddel, D. V.: Structure of the human immune interferon gene. *Nature*, 298, 859-861 (1982).
- 14) Poncz, M., Schwartz, E., Ballantine, M. & Surrey, S.: Nucleotide sequence analysis of the δ β -globin gene region in humans. *J. Biol. Chem.*, 258, 11599-11609 (1983).
- 15) Naruyama, M., Fujita, T. & Taniguchi, T.: Sequence of a cDNA coding for human IRF-1. *Nucleic Acids Res.*, 17, 3292-3292 (1989).
- 16) Itoh, S., Harada, H., Fujita, T., Mimura, T. & Taniguchi, T.: Sequence of a cDNA coding for human IRF-1. *Nucleic Acids Res.*, 17, 8372-8372 (1989).
- 17) Uzè, G., Lutfalla, G. & Gresser, I.: Genetic transfer of a functional human interferon α receptor into mouse cells: Cloning and Expression of Its cDNA. *Cell*, 60, 225-234 (1990).
- 18) Ng, S., Gunning, P., Eddy, R., Ponte, P., Leavitt, J., Shows, T. & Keddes, L.: Evolution of the functional human β -actin gene and its multi-pseudogene family: conservation of noncoding regions and chromosomal dispersion of pseudogenes. *Mol. Cell. Biol.*, 5, 2720-2732 (1985).
- 19) Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. & Erlich, H. A.: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a

- thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**, 487-491 (1988).
- 20) Conboy, J. G., Chan, J., Mohandas, N. & Kan, Y. W.: Multiple protein 4.1 isoforms produced by alternative splicing in human erythroid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 9062-9265 (1988).
- 21) Carmicheal, J., DeGraff, W. G., Gazdar, A. F., Minna, J. D. & Mitchell, J. B.: Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.*, **47**, 936-942 (1987).
- 22) Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R.: DNA sequencing with chain terminating inhibitions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 5463-5467 (1977).
- 23) 今西二郎: インターフェロンはどのような物質か. *臨床医*, **19**, 1454-1458 (1993).
- 24) 丸茂 健, 早川正道, 村井 勝, 田崎 寛: 進行腎細胞癌に対するヒト α 型インターフェロンの抗腫瘍効果とその免疫学的検討. *日泌尿会誌*, **76**, 965-973 (1985).
- 25) 永井正勝, 新井紀元: 悪性脳腫瘍に対するインターフェロン治療の現状を将来. *脳外*, **10**, 463-476 (1982).
- 26) 石原和之: 皮膚科領域でのインターフェロン療法. *治療学*, **27**, 73-76 (1993).
- 27) 種村茂二: インターフェロンと遺伝子工学. *臨床成人病*, **18**, 13-17 (1988).
- 28) Morita, R., Ishikawa, J., Tsutsumi, M., Hikiji, K., Tsukada, Y., Kamidono, S., Maeda, S. & Nakamura, Y.: Allelotype of renal cell carcinoma. *Cancer Res.*, **51**, 820-823 (1991).
- 29) 国見一人, 打林忠雄, 久住治男: 泌尿器科悪性腫瘍における癌抑制遺伝子の不活化-制限酵素多型性分析による検討-. *日泌尿会誌*, **82**, 1930-1938 (1991).
- 30) Neubauer, A., Neubauer, B. & Liu, E.: Polymerase chain reaction based assay to detect allelic loss in human DNA: loss of β -interferon gene in chronic myelogenous leukemia. *Nucleic Acids Res.*, **18**, 993-998 (1990).
- 31) 畑中正一: がん抑制遺伝子概論. *Oncologia*, **24**, 5-12 (1991).
- 32) 原田久士: 転写調節因子 interferon regulatory factor による遺伝発現と細胞増殖制御. *臨床医*, **19**, 1534-1538 (1993).
- 33) Miyamoto, M., Fujita, T., Kimura, Y., Maruyama, M., Harada, H., Sudo, Y., Miyata, T. & Taniguchi, T.: Regulated expression of a gene encoding a nuclear factor, IRF-1, that specifically binds to IFN- β gene regulatory elements. *Cell*, **54**, 903-913 (1988).
- 34) 谷口維紹: サイトカインと細胞応答機構- IFN 系における遺伝子の制御-. *臨床血液*, **32**, 301-306 (1991).
- 35) Harada, H., Fujita, A., Miyama, T. & Taniguchi, T.: Structurally similar but functionally distinct factors, IRF-1 and IRF-2, bind to the same regulatory elements of IFN and IFN-inducible genes. *Cell*, **58**, 729-739 (1989).
- 36) Fujita, T., Reis, L. F. L., Watanabe, N., Kimura, Y., Taniguchi, T. & Vilcek, J.: Induction of the transcription factor IRF-1 and interferon- β mRNAs by cytokines and activators of second-messenger pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 9936-9940 (1989).
- 37) Willman, C. L., Sever, C. E., Pallavicini, M. G., Harada, H., Tanaka, N., Slovak, M. L., Yamamoto, H., Harada, K., Meeker, T. C., List, A. F. & Taniguchi, T.: Deletion of IRF-1, Mapping to chromosome 5q31. 1, in human leukemia and preleukemic myelodysplasia. *Science*, **259**, 968-971 (1993).
- 38) Raziuddin, A., Sarkar, F. H., Dutkowski, R., Shulman, L., Ruddle, F. H. & Gupta, S. L.: Receptors for human α and β interferon but not for γ interferon are specified by human chromosome 21. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 5504-5508 (1984).

Suppression Mechanisms of Carcinogenesis in the Interferon Gene Family Toru Hasegawa, Department of Urology, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med Soc., **103**, 348—356 (1994)

Key words interferon, interferon regulatory factor, interferon receptor, tumor suppresser gene

Abstract

The presence/absence of interferon (IFN) gene deletion in human cancer cultured cell lines, the clinical renal cell and gastric carcinoma tissues was investigated, and the significance of this gene as a tumor suppresser gene was discussed. Additionally, in the human cancer cultured cell lines the expression at the mRNA level of interferon regulatory factor (IRF) and receptors specific for interferon (interferon receptor, IFR) were analyzed, and the carcinogenesis suppressive mechanisms involving IFN was studied. The polymerase chain reaction using primers specific for each of the IFN- α 2, IFN- β and IFN- γ genes was performed in 30 human cancer cultured cell lines, 63 clinical renal cell carcinoma tissues, and 26 gastric carcinoma tissues. With the exception of the 2 gastric carcinoma cell lines, KATO III and NKPS, each IFN gene was detected in all of the cell lines and clinical carcinoma tissues. In KATO III and NKPS, amplified DNA fragments of IFN- α 2 and IFN- β were not found, suggesting deletions of these genes. In addition, the expression of IRF-1, and IRF-2 mRNA in 11 human cancer cultured cell lines including KATO III and NKPS was analyzed using the reverse transcriptase-polymerase chain reaction. The level of mRNA expression varied in the individual cell lines, while no expression of the IRF-1 gene was found in 4 of the 11 cell lines. On the other hand, expression of the IRF-2 gene was noted in all of the cell lines. The induction of the IRF-1 gene by IFN was studied in NPC-TY861 and SQ-K not expressing IRF-1, and HT-1080 and T24 with low and high level expression respectively. By treatment with IFN- α 2a or IFN- γ alone or in combination, IRF-1 expression was induced in some cell lines but not in others. In the former, in addition to the finding of expression of IFR mRNA, in vitro sensitivity tests were performed using 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide, MTT assay, the results of which showed sensitivity to IFN. In contrast, in the latter, there was no expression of IFR, and only low sensitivity to IFN was found. These results suggest that the induction of IRF-1 expression is important in the inhibition of cancer cell proliferation by IFN, and that the binding of IFN to IFR at an earlier stage and subsequent signal transmitting mechanisms are involved.