

学位論文題名

Involvement of a transforming-growth-factor- β -like molecule in tumor-cell-derived inhibition of nitric-oxide synthesis in cerebral endothelial cells

(腫瘍細胞による脳血管内皮細胞の nitric oxide 合成の抑制における transforming growth factor- β 様分子の関与)

学位論文内容の要旨

〔緒言〕癌の転移において、腫瘍細胞と宿主細胞は相互にその機能に影響を及ぼしあうと考えられる。近年、Nitric Oxide(NO)は、腫瘍細胞や細菌などに対して宿主免疫細胞が産生する主要な防御因子の一つと考えられている。NO合成酵素(NOS)は3種類のアイソザイムからなるが、細胞毒性をおこす程多量のNOは、誘導型NOSにより合成される。活性化マクロファージがこの誘導型NOSを発現するのは知られているが、最近、内皮細胞もNO産生により腫瘍細胞を殺すことが報告されている。内皮細胞は、転移の際に腫瘍細胞が第一に接着する場であることから、内皮細胞からのNO産生の調節は、転移の初期において重要であると考えられる。

学位申請者は以前に、ラット脳血管内皮細胞株EC219はサイトカインの刺激により誘導型NOSを介して多量のNOを産生するが、これがラット大腸癌細胞株DHD/PRObが分泌する何らかの液性因子により有意に抑制されることを報告した(参考論文の一)。本研究では、このNO合成を抑制する因子を同定することを目的とした。

〔方法〕ラット脳微小血管内皮細胞を不死化させた細胞株EC219を用いた。ラット大腸癌細胞株DHD/K12のサブ・クローンであるDHD/PRObは、ラットに静注されると浸潤性の転移巣を形成する。一方、同株の他のサブ・クローンDHD/REGbは、転移を形成するが自然退縮する細胞である。

DHD細胞培養上清の調整 DHD細胞(PRObおよびREGb)は、血清非含有培地にて3日間培養された後、上清を採取した。実験によっては、培養上清は10kDaカット・オフ・フィルターにより約5倍に濃縮して使用した。

Nitriteの測定およびNOS活性の測定 NO産生量は、その代謝産物であるnitriteをグリース反応にて測定し、評価した。細胞抽出液中のNOS活性は、 ^3H 標識L-アルギニン(NOSの基質)から変換された ^3H 標識L-シトルリン(NOの副産物)の放射活性を測定し、評価した。

ノーザン・ブロット解析 RNAを抽出し、標識した4.1Kbの誘導型NOSのcDNAおよび1.5KbのGAPDHのcDNAとハイブリダイズさせた。

親和性クロマトグラフィー 培養上清を、コンカナヴァリンA(ConA)・セファロースおよびヘパリン・セファロースのカラムにて分画し、ConA結合物質は0.5M α -D-メチルグルシ

ドにて、ヘパリン結合物質は1M NaClにて溶出した。各分画をサイトカイン刺激下にEC219細胞に加えて、NO産生に対する影響を見た。

抗体中和 濃縮した培養上清を、50 μ g/ml抗transforming-growth-factor- β (TGF- β)抗体で前処理し、これをEC219細胞に加えてサイトカイン刺激し、NO産生を見た。

TGF- β 活性の測定 培養上清中のTGF- β 活性は、TGF- β 感受性株Mv1Luを用いたバイオアッセイにより、ヒトTGF- β_1 を標準として測定した。

[結果] EC219細胞は、tumor necrosis factor(TNF)- α とinterferon(IFN)- γ (各々100U/ml)の刺激により、有意にNO産生量を増大させた。しかしPROb上清を30%加えると、このNO産生は有意に抑制された。一方、REGb上清を同量加えても、NO産生の抑制は見られなかった。次に、各上清の熱処理を試みた。3分間煮沸したPROb上清を加えてもNO抑制は同様に認められた。また、3分間煮沸したREGb上清を加えると、NO産生は有意に抑制された。すなわち、PROb上清は熱に安定なNO抑制因子を含み、REGb上清は熱処理により活性化されるNO抑制因子を含んでいると推測された。

ノーザン・ブロット解析 TNF- α とIFN- γ 刺激により、EC219細胞の誘導型NOSのmRNAが誘導された。しかし、TNF- α ・IFN- γ とともにPROb上清を加えると、誘導型NOSのmRNA発現は著明に抑制された。

親和性クロマトグラフィー EC219細胞のNO産生は、分画されたPROb上清のうち、ConA非親和性の分画およびヘパリン非親和性の分画により、80%以上の抑制を認めた。ConAあるいはヘパリン親和性の分画は、濃縮して投与しても有意な抑制を認めなかった。

以上の結果により、PROb細胞由来のNO抑制因子は、ConA非親和性であることよりグルコシドなどの糖側鎖を有さず、ヘパリン結合蛋白ではなく、熱に安定であり、誘導型NOSのmRNAを抑制することが示された。NO産生を抑制し、しかも腫瘍細胞が産生する物質の中では、TGF- β が上記の性質に矛盾しないと考えられた。

抗体中和 5倍に濃縮したPROb上清を50 μ g/mlの抗TGF- β 抗体で1時間前処理し、TNF- α ・IFN- γ とともにEC219に加えたところ、NO産生の抑制は完全に中和された。

また、ヒトTGF- β_1 を0.5-5ng/ml加えたところ、TNF- α ・IFN- γ によるNO産生は濃度依存性に抑制された。TNF- α ・IFN- γ 刺激したEC219細胞のNO産生を刺激後1時間から40時間まで経時的に測定すると、PROb上清(50%)とTGF- β_1 (0.5ng/ml)はきわめて類似した抑制経過をとった。

NOS活性 EC219細胞のNOS活性は、TNF- α ・IFN- γ 刺激によって有意に増加し、PROb上清添加により有意に抑制された。この抑制はPROb上清を抗TGF- β 抗体で前処理すると失われた。

TGF- β 活性 PROb上清には、高濃度(1465pg/ml)のTGF- β 活性を認めた。REGb上清のTGF- β 活性は245pg/mlと低かったが、煮沸したREGb上清には有意に高濃度(1200pg/ml)のTGF- β 活性を認めた。

[考察] 誘導型NOSの発現の調節は、宿主の免疫反応にとって重要である。サイトカインの刺激によるラット脳血管内皮細胞EC219のNO産生は、ラット大腸癌細胞DHD/PRObの産生する何らかの因子により抑制されたが、この因子は、1)PROb上清によるNO産生およびNOS活性の抑制は、抗TGF- β 抗体により中和された。2)ヒトTGF- β_1 添加により、同様のNO抑制を認めた。3)NO抑制の経時変化は、PROb上清とヒトTGF- β_1 ではほぼ同様であった。4)PROb上清中のTGF- β 活性が証明された、等の結果により、TGF- β と同一か、またはTGF- β ときわめて類似した分子と言えよう。

TGF- β は通常、45kDaのlatency-associated peptide (LAP)と結合した不活性型として分泌され、活性型のTGF- β は、加熱、酸性化、蛋白分解などによってLAPから放出される。本研究において、浸潤型の腫瘍PRObは、TGF- β を産生し、これを活性化する機序を有し、EC219細胞のNO産生を抑制した。一方、退化型の株REGbは活性化の機序を持たず、NOを抑制しなかった。

今後、その他の転移性腫瘍細胞が内皮細胞のNO産生に及ぼす影響、あるいはNOによる細胞毒性を広く研究することにより、癌転移早期の宿主細胞と腫瘍細胞の相互作用が明らかになると期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 阿 部 弘
副 査 教 授 細 川 眞澄男
副 査 教 授 長 嶋 和 郎

学 位 論 文 題 名

Involvement of a transforming-growth-factor- β -like molecule in tumor-cell-derived inhibition of nitric-oxide synthesis in cerebral endothelial cells

(腫瘍細胞による脳血管内皮細胞の nitric oxide 合成の抑制に
おける transforming growth factor- β 様分子の関与)

Nitric oxide (NO) は細胞毒性を発揮するため、腫瘍細胞や細菌などに対して宿主免疫細胞が産生する主要な防御因子の一つと考えられている。癌の脳転移の際、脳血管内皮細胞は、腫瘍細胞が第一に接着する場であることから、内皮細胞からのNO産生の調節は、転移の初期における癌細胞と宿主細胞の相互作用において重要と考えられる。このため本研究は、脳血管内皮細胞のNO産生を測定し、腫瘍細胞との混合培養による内皮細胞のNO産生の変化を解析する事、および、NO産生を変化させる因子を同定する事を目的とした。

細胞は、ラット脳血管内皮細胞株EC219と、転移性脳腫瘍を想定してラット大腸癌細胞株DHD/K12(浸潤型細胞PRObおよび自然退縮型細胞REGb)を用いた。NO産生量はグリース反応にて測定、NO synthase (NOS)活性は標識L-citrullineの放射活性を測定、NOS mRNA発現はNorthern blot解析にて評価した。DHD/K12の培養上清は、serum freeにて3日間培養したものを採取した。EC219内皮細胞は、tumor necrosis factor(TNF)- α + interferon (IFN)- γ の刺激によりNOを産生した。DHD/PROb大腸癌細胞との混合培養により、EC219細胞のNO産生は有意に抑制された。またNO産生はPROb細胞の培養上清にてより著明に抑制された。すなわちEC219細胞のNO産生は、PROb細胞の産生する液性因子により抑制されられると思われた。TNF- α + IFN- γ 刺激によるNO synthase活性はカルシウム非依存性であり、inducible NO synthaseの活性と思われた。この活性は、PROb上清により有意に抑制された。またPROb細胞の産生する因子はEC219細胞のinducible NO synthaseのmRNA発現を抑制した。この因子を解析するため、まず熱処理を行った。PROb上清を3分間95℃で熱処理してもNO産生抑制効果は変わらず、PROb由来の因子は熱に安定と思われた。一方、REGb細胞の培養上清では、有意なNO抑制を認めなかった。ところがREGb上清を3分間熱処理すると、有意な抑制効果の出現を認めた。すなわちREGb細胞は、熱処理により活性化され、NO産生を抑制する因子を産生すると考えられた。次いでPROb上清をCon Aおよびheparin親和性chromatographyにて分画し、各分画のNO産生への影響を調べた。この結果PROb由

来のNO抑制因子は、Con Aにもheparinにも非親和性であった。以上の結果より、PROb由来因子は、inducible NO synthaseのmRNA発現を抑制し、熱に安定であり、糖側鎖を持たず、heparin結合蛋白ではないという特徴を持つことが分かった。文献上、inducible NO synthaseのinhibitorとして報告されている分子の中で上記の性質に矛盾しないものとして、transforming growth factor(TGF)- β が考えられた。そこで抗TGF- β 抗体にてPROb上清を前処理したところ、NO抑制効果はほぼ消失した。また、human TGF- β 1は濃度依存性にNO産生を抑制した。NO抑制の経時変化はPROb上清とhuman TGF- β 1で同様であった。腫瘍細胞のTGF- β 産生はTGF- β 感受性株を用いたbioassayにて測定したが、PROb上清には高濃度のTGF- β 活性を認めた。REGb上清のTGF- β 活性は低値であったが、熱処理により高濃度のTGF- β 活性の出現を認めた。

Inducible NO synthaseの発現の調節は、宿主の免疫反応にとって重要である。サイトカインの刺激によるラット脳血管内皮細胞EC219のNO産生は、ラット大腸癌細胞DHD/PRObの産生する因子により抑制されたが、この因子は、1)PROb上清によるNO産生およびNO synthase活性の抑制は、抗TGF- β 抗体により中和された。2)human TGF- β 1により同様の抑制を認めた。3)抑制の経時変化は、PROb上清とhuman TGF- β 1でほぼ同様であった。4)PROb上清中に高いTGF- β 活性が証明された等の結果より、TGF- β と同一か、あるいは極めて類似した分子と考えられた。TGF- β は通常、不活性型として分泌され、活性型のTGF- β は、加熱、酸性化、蛋白分解などにより遊離される。本研究において、浸潤型の腫瘍PRObは活性型TGF- β を産生し、内皮細胞のNO産生を抑制した。一方、退縮型の腫瘍REGbは、不活性型TGF- β を産生するがこれを活性化する機序を持たず、NO産生を抑制しなかった。

今後、その他の転移性腫瘍細胞が内皮細胞のNO産生に及ぼす影響、あるいはNOによる細胞毒性を広く研究することにより、癌転移早期の宿主細胞と腫瘍細胞の相互作用が明らかになると期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、また研究者として誠実かつ熱心であり、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。