

ヒト正常線維芽細胞とその $^{60}\text{Co}\gamma$ 線による培養内 癌化細胞の蛋白分解酵素産生性

川崎医科大学 実験病理

西谷 耕二, 難波 正義

大久保茂樹, 木本 哲夫

(昭和60年11月27日受付)

Differential Production of Proteolytic Enzymes by Normal Human Fibroblasts and Their Counterparts Transformed by Treatment with ^{60}Co Gamma Rays

Koji Nishitani, Masayoshi Namba

Shigeki Ohkubo and Tetsuo Kimoto

Department of Pathology, Kawasaki Medical School

(Accepted on November 27, 1985)

ヒト細胞の癌化に伴う蛋白分解酵素の産生の変化を調べた。使用した細胞は、ヒト正常線維芽細胞 (KMS-6) とその細胞を $^{60}\text{Co}\gamma$ 線で照射して培養内で癌化した細胞 (KMST-6) とである。

細胞は EDTA で継代し、無血清培地で培養した。それぞれの細胞系の産生する培地中および細胞内の蛋白分解酵素量を人工基質 N- α -(tosyl)-L-arginine [^3H]methyl ester HCl (^3H -TAME) を用いて測定した。蛋白分解酵素の産生は正常細胞 (KMS-6) に比べ癌化した細胞 (KMST-6) の方が高かった。また、両細胞系において酵素産生は対数増殖期に高く定常期に近づくに従って低下した。産生された蛋白分解酵素はトリプシン様、トロンピン様酵素であった。これらの蛋白分解酵素の阻害剤を加えても KMS-6 と KMST-6 の細胞の増殖は阻害されなかった。

Production of proteolytic enzymes by human fibroblasts in the process of transformation was investigated. The cells used were normal human fibroblasts (KSM-6) and their in vitro counterparts transformed by treatment with ^{60}Co gamma rays (KMST-6). Cells seeded by treatment with EDTA were cultured in a serum free medium. Proteolytic enzymes in the culture medium of cells were assayed using a synthetic substrate, N- α -(p-tosyl)-L-arginine (^3H)methyl ester hydrochloride. The transformed cells (KMST-6) produced a larger amount of

enzymes than normal cells (KMS-6). The enzyme production in both cell lines was high in the exponential growth stage and then decreased as the cells reached confluency. The proteolytic enzymes produced by these cells were trypsin- and thrombin-like enzymes. Cell growth of KMST-6 or KMS-6 was not inhibited by the addition of protease inhibitors to the culture medium.

Key Words ① Proteolytic enzyme ② Transformation ③ Human cell line

緒 言

多くの動物の腫瘍や培養癌細胞は、それらの癌細胞の由来する正常細胞に比べプラスミノゲンアクチベーター、プラスミン、コラゲナーゼ、カテプシンなどの蛋白分解酵素を多く産生することがしばしば報告されている。これらの報告は Nicolson,¹⁾ Roblin²⁾ の総説にまとめられている。

これらの蛋白分解酵素は、癌の浸潤や転移,³⁾ 発癌のプロモーション^{4), 5)} に関与していることが示唆されている。また低濃度の蛋白分解酵素で正常細胞を処理すると、休止期の細胞が増殖を再開すること、⁶⁾⁻⁹⁾ 蛋白分解酵素阻害剤を培地に加えることにより癌細胞の増殖が抑制されること、^{10), 11)} などが報告されている。また、低濃度の蛋白分解酵素処理により正常細胞の細胞膜が癌細胞類似の表現型を示すようになるという報告もある。^{2), 16)-22)} しかし、癌細胞の産生する蛋白分解酵素の細胞生物学的意味についてはまだ不明な点が多い。

われわれはヒト胎児由来線維芽細胞株(KMS-6)とそれを⁶⁰Co γ 線で照射して培養内で癌化した細胞株(KMST-6)とを樹立した。¹²⁾ この癌化した細胞は形態変化、染色体変異、無限増殖性などの性格を示す。今回、われわれはヒト細胞の癌化に伴う蛋白分解酵素産生の変化をみるために、このヒト正常線維芽細胞株と癌化細胞株との蛋白分解酵素の産生を比較検討した。

材 料 と 方 法

1) 細胞と培養

細胞はヒト胎児由来正常線維芽細胞(KMS-6)とそれを⁶⁰Co γ 線で照射して培養内で癌化

した細胞(KMST-6)とを使用した。これらの細胞はMEM(日水製薬)に10%牛胎児血清を添加した培地を用い、F75プラスチックフラスコによる単層培養法により継代維持した。

蛋白分解酵素の産生を調べるために、0.02% EDTA で分散した細胞を維持培地に懸濁し35 mm シャーレ当り $1\sim 2 \times 10^5$ コ細胞を播き込んだ。24時間後この培地を、DMEM(日水製薬)とF12(日水製薬)とを1:1に混合したものに0.1% bovine serum albumin(BSA: Sigma, St. Louis, MO), 10 μ g/ml transferrin (Collaborative Research, Waltham, MA), 1 μ g/ml insulin(Sigma), 10 μ g/ml oleic acid(Sigma)を添加した培地に交換する。その後、3日ごとに培地を交換し、同時に細胞数と培地中、および、細胞ホモジュネート中の蛋白分解酵素活性を測定した。採取した培地は700 g, 10分間遠心後の上清を用いた。細胞ホモジュネート中の酵素活性は細胞をPBSで3回洗浄し、ラバーポリスマンで剥離し、1 mlの0.1M Tris-HCl(pH 8.0)に0.5% Triton x-100を含んだ溶液に懸濁し、4°C, 1時間静置し細胞を融解後、1000 g 5分間遠心しその上清を測定した。細胞数は0.2%トリプシン(Difco, Detroit, MI, 1:250)で分散し、0.05% crystal violetで染色後、血球計算盤で計測した。

蛋白分解酵素阻害剤の細胞の増殖に及ぼす影響を調べるために、培地に10 μ g/ml bovine pancreas trypsin inhibitor (BPTI: Sigma), 0.1 Inh. U/ml antithrombin III (AT III: Boehringer Mannheim, West Germany), 1 μ g/ml esteratin(微生物化学研究所青柳高明博士より供与)を添加して培養し、細胞数とDNA合成率とを調べた。

2) 蛋白分解活性の測定

蛋白分解活性の測定は大石らの方法¹³⁾ に準じた。50 μl の試料と 10 μl の人工基質 10 $\mu\text{Ci/ml}$ N- α -(p-tosyl)-L-arginine [^3H] methyl ester hydrochloride (^3H -TAME, specific activity 1mCi/m mole, Amersham, England) とを試験管内で混合し、37°C 30分間反応させる。反応終了後、50 μl の反応停止液 (酢酸 : 0.02M TAME : 1:1) を添加し、さらに 6 ml シンチレーションカクテルを加え 15秒振盪した。その後、700 g, 10分間遠心し、上層の ^3H -methanol を含むシンチレーションカクテル 5 ml をとり液体シンチレーションカウンター (Aloka, Model LSC-700) で測定した。

細胞の産生した蛋白分解酵素の性格を調べるために蛋白分解酵素阻害剤として 10 $\mu\text{g/ml}$ BPTI, 10 Inh.U/ml AT III, 1 $\mu\text{g/ml}$ esterase, 0.5 mM diisopropyl fluorophosphate (DFP: Sigma) を反応液に加え蛋白分解酵素活性の阻害を調べた。

3) DNA 合成測定法

DNA 合成率は ^3H -Thymidine (specific activity 5 Ci/m mole, Amersham) のとり込みで測定した。培養 3, 6 日目に 0.5 $\mu\text{Ci/ml}$ ^3H -thymidine を加え、37°C, 1時間培養した。培養後、冷却 5% trichloroacetic acid 非可溶性分画の放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した。

結 果

無血清培地に溶解したトリプシンを使用して標準曲線をとると、加えた酵素量に比例して 200 pg まで直線的に ^3H -methanol の増加が見られた (Fig. 1)。この条件で 1分間に 1 μg の TAME を分解する活性を 1 unit とすると、トリプシン 1 ng は 0.8 unit に相当する。

培地中の蛋白分解活性は KMS-6 に比べ KMST-6 の方が高かった。また、両細胞とも培地中の蛋白分解活性は、対数増殖期に高く定常期に近づくとつれて低下した (Fig. 2)。細胞が定常期に近づくと蛋白分解酵素活性が低下する

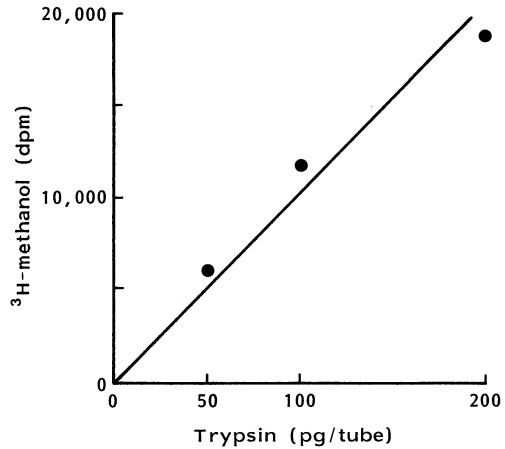


Fig. 1. Dose dependent TAME hydrolysis of trypsin (bovine pancreas trypsin, Sigma type I, 10,500 BAEE units/mg protein).

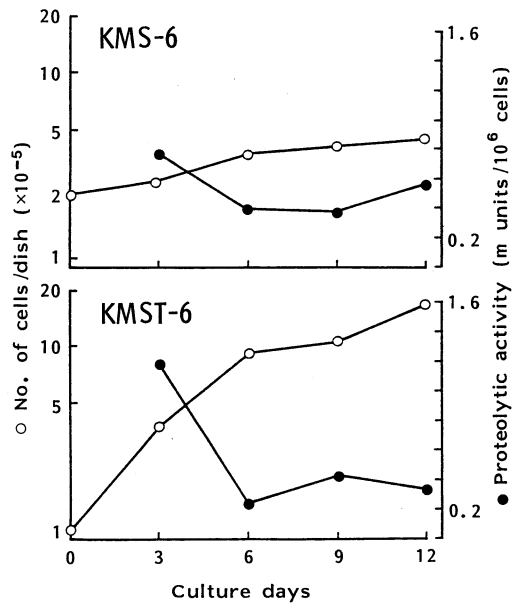


Fig. 2. Relationship between cell growth and proteolytic activity in culture medium.

原因として、この時期の培地には蛋白分解酵素活性阻害物が含まれる可能性がある。そこで KMST-6 の対数増殖期の培地を定常期の培地と等量混合して、蛋白分解活性を調べた。その結果、定常期の培地中には阻害物質は含まれていなかった (Table 1)。

Table 1. Studies on protease activities of culture media of KMST-6 cells in logarithmic growth stage and in stationary growth stage

Culture medium	Proteolytic activity (m Units/ml)
on day 3 (logarithmic stage)	0.11
on day 9 (stationary stage)	0.18
on day 3 + on day 9 (1:1)	0.15

Table 2. Proteolytic activities in cell homogenates

Cell	culture days	Proteolytic activity (m Uunits/10 ⁶ cells)
KMS-6	3	0.13
	6	0.30
KMST-6	3	0.09
	6	0.52

細胞内の蛋白分解酵素活性も KMS-6 に比べ KMST-6 の方が高かった (Table 2). このことは KMS-6 と KMST-6 との間の培地中の蛋白分解酵素量の差が, 細胞から培地中への蛋白分解酵素の放出の差ではなく, 産生量の差であることを示している.

細胞の産生する蛋白分解酵素の性格を調べる

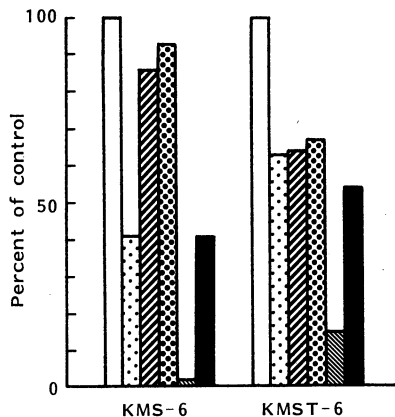


Fig. 3. Inhibition of proteolytic activity in culture medium by protease inhibitors.

□ control, ▤ BPTI (10 µg/ml), ▨ AT III (10 Inh.U/ml), ▩ esteratin (1 µg/ml), ■ BPTI (10 µg/ml) + AT III (10 Inh.U/ml) + esteratin (1 µg/ml), ■ DFP (0.5 mM)

ために, 酵素活性に及ぼす蛋白分解酵素阻害剤の影響を調べた. 産生された蛋白分解酵素は BPTI, AT III, Esteratin, DFP により部分的に阻害された.

KMST-6 細胞の産生する蛋白分解酵素がその細胞の増殖に関与しているかどうか調べるために, BPTI, AT III, Esteratin を含む培地で KMST-6 を培養し細胞の増殖率を調べた. その結果, 蛋白分解酵素阻害剤を加えても KMST-6 の増殖率に変化はなかった (Table 3).

Table 3. Effects of protease inhibitors on DNA synthesis of KMST-6 cells

Inhibitors*	³ H-Thymidine incorporation (dpm/dish)	
	on day 3	on day 6
-	33030	16281
+	29839	16959

* Ten µg/ml BPTI, 0.1 Inh.U/ml AT III, and 1 µg/ml esteratin were added together to the culture medium.

考 察

細胞が癌化すると細胞の蛋白分解酵素の産生が高まる場合が多いことがしばしば報告されている. われわれはヒト正常細胞株, および, その細胞を培養内で ⁶⁰Coγ 線照射によって癌化した細胞株とを樹立したので, この実験系において細胞の産生する蛋白分解酵素の変化をみた. その結果, KMST-6 は KMS-6 に比べ蛋白分解酵素の高い産生を示した. このわれわれの成績は, 腫瘍や培養癌細胞が正常細胞に比べ高い蛋白分解酵素をもつという多くの報告と一致する.

ヒト細胞の癌化の指標は研究者によって一致していない. 現在まで報告されている指標としては, 1) 形態変化, 2) 軟寒天内コロニー形成能, 3) 無限増殖性, 4) 造腫瘍性, などがある. われわれは細胞が染色体の異常を示し無限増殖性をもつようになった場合, 細胞が癌化したと定義している. したがって, 蛋白分解酵素の産生の上昇は細胞の無限増殖性の獲得との関連を

示している。

細胞増殖と蛋白分解酵素産生との関係を見ると、酵素産生は細胞の対数増殖期に高く定常期に近づくにつれて低下した。このことから産生された蛋白分解酵素が細胞の増殖に働いている可能性がある。そこで、この蛋白分解酵素活性をほぼ完全に抑制する濃度の阻害剤を培地に加え、KMST-6の増殖率の変化を調べた。その結果、阻害剤を加えた培地での増殖率は正常培地に比べ変らなかった。このことは培地中に産生された蛋白分解酵素が細胞の増殖を促進するように働いていないことを示している。あるいは、TAMEを基質として使用した測定法で検出されない他の蛋白分解酵素が細胞の増殖に関係しているかもしれない。

Carneyらは、^{14),15)} polystyren にコートしたトロンビンやトリプシンが細胞内に入らなくてもニワトリ線維芽細胞の増殖を促進することを報告している。また、Schnebleらは、¹⁰⁾ 培地に添加した蛋白分解酵素阻害剤 ovomucoid や trasyolol が、SV40で癌化した3T3細胞を、

Goetyらは、¹¹⁾ BPTI や Soybean trypsin inhibitor (SBTI) がハムスター癌細胞の増殖を抑制することを報告している。これらの報告は蛋白分解酵素が細胞の増殖に有効に働いていることを示していて、われわれの現在の成績と矛盾する。しかし、彼らの実験は血清を含んだ培地を使用しており、血清中の増殖因子や増殖阻害因子が働いている可能性があり、彼らの成績とわれわれの成績とを比較することはむずかしい。

正常細胞を低濃度蛋白分解酵素で処理するとレクチンによる凝集性の上昇、^{16)~19)} 細胞膜のcAMPレベルの減少や、²⁰⁾ LETS蛋白の減少、²¹⁾ 膜表面の増殖因子に対するレセプターの変化、²²⁾ などの癌細胞に類似する変化がおこることが報告されている。したがって、KMST-6の産生する蛋白分解酵素がその細胞膜を直接修飾して細胞の増殖に働いている可能性があるもので、培地中に加えた蛋白分解酵素阻害剤は細胞膜を修飾する蛋白分解酵素の作用を抑制できなかった可能性がある。

文 献

- 1) Nicolson, G. L.: Trans-membrane control of the receptors on normal and tumor cells. II. Surface changes associated with transformation and malignancy. *Biochim. Biophys. Acta* 458: 1-72, 1976
- 2) Roblin, R., Chou, I. and Black, P. H.: Proteolytic enzymes, cell surface changes, and viral transformation. *Adv. Cancer Res.* 28: 203-252, 1975
- 3) Fidler, I. J., Gersten, D. M. and Hart, I. R.: The biology of cancer invasion and metastasis. *Adv. Cancer Res.* 28: 149-225, 1978
- 4) Troll, W., Klassen, A. and Janoff, A.: Tumorigenesis in mouse skin: Inhibition by synthetic inhibitors of protein. *Science* 169: 1211-1213, 1978
- 5) Hozumi, M., Ogawa, M., Sugimura, T., Takeuchi, T. and Umezawa, H.: Inhibition of tumorigenesis in mouse skin by leupeptin, a protease inhibitor from actinomycetes. *Cancer Res.* 32: 1725-1728, 1972
- 6) Burger, M. M.: Proteolytic enzymes initiating cell division and escape from contact inhibition of growth. *Nature* 227: 170-171, 1970
- 7) Sefton, B. M. and Rubin, H.: Release from density dependent growth inhibition by proteolytic enzymes. *Nature* 227: 843-845, 1970
- 8) Carney, D. H., Glenn, K. C. and Canningham, D. D.: Conditions which affect initiation of animal cell division by trypsin and thrombin. *J. cell. Physiol.* 95: 13-22, 1978
- 9) Pohjanpelto, P.: Protease stimulate proliferation of human fibroblasts. *J. cell. Physiol.* 91:

387—392, 1977

- 10) Schnebli, H. P. and Burger, M. M.: Selective inhibition of growth of transformed cells by protease inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 69: 3825—3827, 1972
- 11) Goetz, I. E., Weinstein, C. and Roberts, E.: Effects of protease inhibitors on growth of hamster tumor cells in culture. *Cancer Res.* 32: 2469—2474, 1972
- 12) Namba, M., Nishitani, K., Hyodoh, F., Fukushima, F. and Kimoto, T.: Neoplastic transformation of human diploid fibroblasts (KMST-6) by treatment with ^{60}Co gamma rays. *Int. J. Cancer* 35: 275—280, 1985
- 13) 大石幸子: 蛋白分解酵素の高感度微量定量法—とくに serine 酵素の ^3H -TAME assay について. *医のあゆみ* 102: 616—620, 1977
- 14) Carney, D. H. and Cunningham, D. D.: Transmembrane action of thrombin initiates chick cell division. *J. supramol. Struct.* 9: 337—350, 1978
- 15) Carney, D. H. and Cunningham, D. D.: Initiation of chick cell division by trypsin action at the cell surface. *Nature* 268: 602—606, 1977
- 16) Burger, M. M.: A difference in the architecture of the surface membrane of normal and virally transformed cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 62: 994—1001, 1969
- 17) Glynn, R. D., Thrash, C. R. and Cunningham, D. D.: Maximal concanavalin A-specific agglutinability without loss of density-dependent growth control. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 70: 2676—2677, 1973
- 18) Cunningham, D. D. and Ho, T.: Effects of added proteases on concanavalin A specific agglutinability and proliferation of quiescent fibroblasts. *In Proteases and biological control*, ed. by Reich, E., Rifkin, D. B. and Shaw, E. Cold Spring Harbor Laboratory. 1975, pp. 795—806
- 19) Wilbingham, M. C. and Paston, I.: Cyclic AMP modulates microvillus formation and agglutinability in transformed and normal mouse fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 72: 1263—1267, 1975
- 20) Sheppard, J. R.: Difference in the cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate levels in normal and transformed cells. *Nature new Biol.* 236: 14—16, 1972
- 21) Hynes, R. O.: Alteration of cell surface proteins by viral transformation and by proteolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 70: 3170—3174, 1973
- 22) Kano, T. and Barham, F. W.: The relationship between the insulin-binding capacity of fat cells and the cellular response to insulin. *J. biol. Chem.* 246: 6210—6216, 1971