

## ヒト培養腎細胞のプラスミノゲンアクチベーター 産生におよぼすインターフェロンの影響

川崎医科大学 実験病理学

唐 井 万 智 子

(昭和61年4月21日受付)

### Effects of Interferons on Production of Plasminogen Activator by Human Renal Cells

Machiko Karai

Department of Pathology, Kawasaki Medical School

(Accepted on April 21, 1986)

ヒト培養細胞のプラスミノゲンアクチベーター (PA) の産生におよぼすインターフェロン (IFN) の影響を調べた。実験には主にヒト腎癌細胞株 ACHN を用い、この細胞で得られた成績を確認するために、ヒト膀胱癌細胞株 EJ, ヒト線維芽細胞を培養内で Co-60ガンマ線を照射して発癌させた KMST-6 を用いた。IFN は  $\beta$ -IFN,  $\gamma$ -IFN を使用した。細胞の増殖期と PA 産生との関係を見ると、対数増殖期の細胞が定常期に達した細胞より PA を多く産生した。したがって、この対数増殖期の細胞の PA 産生に対する IFN の影響を調べた。細胞を IFN で 48-72 時間処理した後の、培地中および細胞中 PA を測定した。その結果、 $\beta$ -IFN は PA 産生を約 1.5 倍高めた。しかし、 $\gamma$ -IFN は、PA の産生に影響を与えなかった。一方、この PA 産生に及ぼす影響を調べた濃度の  $\beta$ -および  $\gamma$ -IFN は、細胞の増殖を約 40% 抑制した。PA (urokinase type) は正常なヒト腎細胞で産生されている。この PA 産生が腎細胞の分化機能に関係したものであれば、IFN の作用の一つとして細胞の分化機能の発現を調節している可能性もある。

The effects of interferons ( $\beta$ -IFN and  $\gamma$ -IFN) on the production of plasminogen activator (PA) by cultured human cells were examined. We used the following cells in the present experiments: ACHN (human renal cancer cells), EJ (human bladder cancer cells), and KMST-6 (human fibroblasts transformed immortally in culture by Co-60-gamma rays). The cells produced more PA at the exponential stage of cell growth than at the stationary growth stage. Therefore we used the exponentially growing cells to study the effect of  $\beta$ -IFN or  $\gamma$ -IFN on the PA production of cells. Our results showed that the cells treated with  $\beta$ -IFN for 48 hr or 72 hr produced 1.5 times as much PA as the untreated control cells. On the other hand,  $\gamma$ -IFN had no effect on PA production. It is

well known that normal kidney cells yield PA. If the production of PA is related to one of the differentiated functions of cells, one of the biological roles of IFN may regulate cell differentiation.

Key Words ① Plasminogen activator ② Interferon ③ Cultured human cells

## はじめに

Interferon (IFN) は抗ウイルス作用をもつ物質として、1957年 Issacs, Lindenmann<sup>1)</sup> により発見された。その後、免疫賦活作用や細胞増殖抑制作用、そして最近では癌細胞の増殖抑制にも用いられている。その他、次のような多彩な生物学的作用をもつことがつぎつぎと報告されている。すなわち、IFN が細胞の 2'-5' synthetase, protein kinase の合成を高めることや、<sup>2), 3)</sup> その他のある種類の蛋白の合成を亢進することも報告されている。また、免疫に関する抗原である HLA-DR,<sup>4)</sup> HLA-A2 の mRNA,<sup>5)</sup> surface tumor-associated antigen<sup>6)</sup> なども IFN により誘導されるので、IFN が免疫系にも作用していることは確実である。その他、fibroblast, macrophage 等では PA,<sup>7)</sup> prostaglandin E,<sup>8)</sup> colony stimulating factor<sup>9)</sup> などの IFN による産生の上昇も報告されている。また、まだ明確には同定されていないが、分子量 68,000 の蛋白<sup>10)</sup> やある種の mRNA<sup>11)</sup> の合成も高まる。その他、IFN が細胞を分化させる働きも報告されている。<sup>12)</sup> しかし、IFN の示すこのような多彩な作用発現機序はまだ十分解明されていない。

したがって、本研究では IFN の他の細胞生物学的作用を知るために、ヒト培養癌細胞の plasminogen activator (PA) 産生におよぼす影響について調べたので、その結果を報告する。

## 材料と実験方法

### 1) 材 料

細胞はヒト腎癌細胞株 ACHN,<sup>13)</sup> ヒト膀胱癌細胞株 EJ,<sup>14)</sup> ヒト胎児線維芽細胞を培養内で Co-60 ガンマー線で発癌させた KMST-6<sup>15)</sup>

を用いた。使用した培地は無血清合成培地 DFB-TIO<sub>2</sub> を用いた。その理由は、血清中に PA の activators や inhibitors が存在する可能性があるためである。合成培地の組成は Dulbecco's modified Eagle's medium (日本製薬) と Ham's F12 (日本製薬) を 1:1 に混ぜ、10 µg/ml transferrin (Collaborative Res.), 1 µg/ml insulin (Sigma), 5 µg/ml oleic acid (Sigma), 0.1% bovine serum albumin fraction V (Sigma) を添加したものである。この培地で細胞は、10% ウシ胎児血清を含む培地とほぼ同程度の増殖を示した。

### 2) 実験方法

#### 1. 細胞培養および IFN 処理

細胞を直径 35 mm のプラスチックシャーレにまきこみ、翌日無血清合成培地に換える。同時に IFN を添加する。そして、一定期間の培養後に培地中に産生された PA、あるいは、その細胞内の PA を測定した。

IFN はヒト線維芽細胞で生産された β 型 (β-IFN, 持田製薬)、組み換え β 型 (R-β-IFN, 協和醸酵)、組み換え γ 型 (γ-IFN, 日本ロッシュ) を用いた。

#### 2. PA の測定

urokinase type の PA 活性は、fibrin agar plate 法と photometric assay との 2 方法で測定した。fibrin agar plate 法は培地中の PA により plasminogen が plasmin に活性化され、plate (第一化学薬品) に含まれている fibrin が溶解される原理を利用している。この方法は specificity は高いが、しかし、sensitivity は低いので定量には photometric assay を用いた。この方法は plasminogen (ミドリ十字) が培地中の PA により plasmin に活性化される原理を利用している。すなわち、活性化された plasmin によって基質 H-D-Val-Leu-Lys-p-

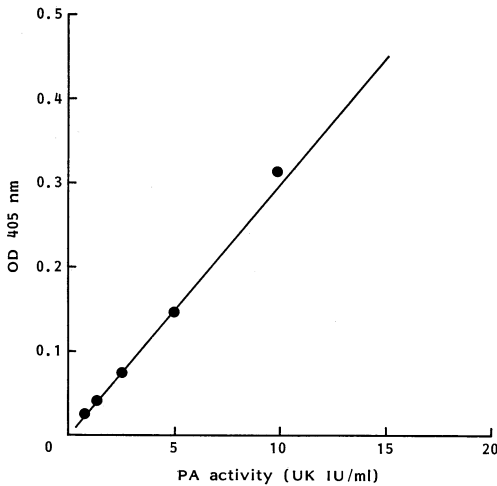


Fig. 1. Standard curve of urokinase

nitroaniline (s-251, Kabi Vitrum) から遊離する p-nitroaniline を波長405nm で測定する方法である。既知濃度の urokinase (ミドリ十字) を用いて標準曲線を求め、この標準曲線から sample 中の PA 活性を求めた (Fig. 1). tissue type の PA 活性は、Chmielewska らの方法<sup>16)</sup> で測定した。

### 3. 細胞の DNA, RNA, 蛋白合成

細胞を  $0.5 \mu\text{Ci/ml}$   $^3\text{H}$ -thymidine (82 Ci/mmol, Amersham),  $1 \mu\text{Ci/ml}$   $^3\text{H}$ -uridine (25 Ci/mmol, Amersham),  $0.5 \mu\text{Ci/ml}$   $^3\text{H}$ -leucine (60 Ci/mmol, Amersham) で30分間、または、実験によっては60分間標識し、冷5% TCA 不溶性分画を液体シンチレーションカウンターで測定した。また、培地にそれぞれ  $1 \mu\text{g/ml}$  actinomycin D (ACD, Sigma),  $0.1 \mu\text{g/ml}$  cycloheximide (CHX, Sigma) を加え、RNA の合成阻害と蛋白合成阻害を調べた。

## 結 果

### 1) 細胞の増殖曲線と PA 活性

まず、細胞増殖とそれぞれの増殖時期の PA 産生との関係を培養ヒト腎癌細胞 (ACHN) を用いて調べた (Fig. 2A). まきこんだ細胞の増殖は約10日で plateau に達する。PA の産

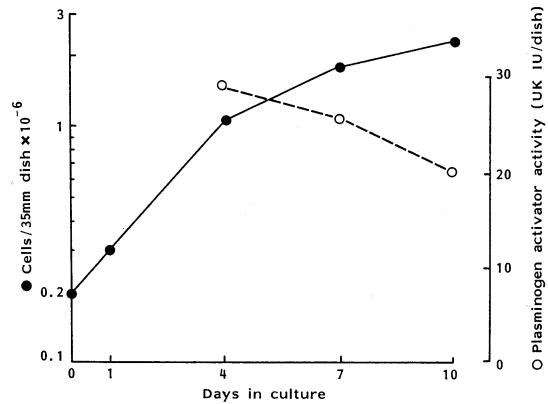


Fig. 2A. Relation of cell growth and PA production of human renal carcinoma cells (ACHN)

生を細胞数あたりで見ると対数増殖期に最も高く、plateau 期には低下する。さらに詳しく24時間毎の培地を用いて PA の産生を調べると、培養開始後48時間から72時間で最高になった (Fig. 2B). これらの結果より、以下の実験では、培養48時間から72時間の培地あるいは細胞を用いた。

### 2) 癌細胞 ACHN の細胞増殖におよぼす IFN の影響

ヒト腎癌細胞株 ACHN に  $\beta$ -IFN, あるいは  $\gamma$ -IFN を種々の濃度で加え、増殖抑制効果と PA の産生との関係を調べた。  $\beta$ -IFN では、10,000 IU/ml, 20,000 IU/ml の濃度で細胞の増殖は約40-50%低下した (Fig. 3A).  $\gamma$ -IFN では、  $\beta$ -IFN に比べ低濃度の250 IU/ml, 500 IU/ml で同様の細胞増殖抑制効果が得られた (Fig. 3B).

### 3) ヒト癌細胞の PA 産生におよぼす IFN の影響

$\beta$ -IFN は ACHN 細胞の増殖を抑制するが、しかし、培地中の PA の産生を上昇させることがわかった (Table 1). 一方、  $\gamma$ -IFN は、  $\beta$ -IFN と同程度の増殖抑制を示す濃度で、細胞の PA の産生にはほとんど影響をおよぼさない。この結果は、  $\beta$ -IFN と  $\gamma$ -IFN とは、作用機序が異なることを示している。  $\beta$ -IFN が

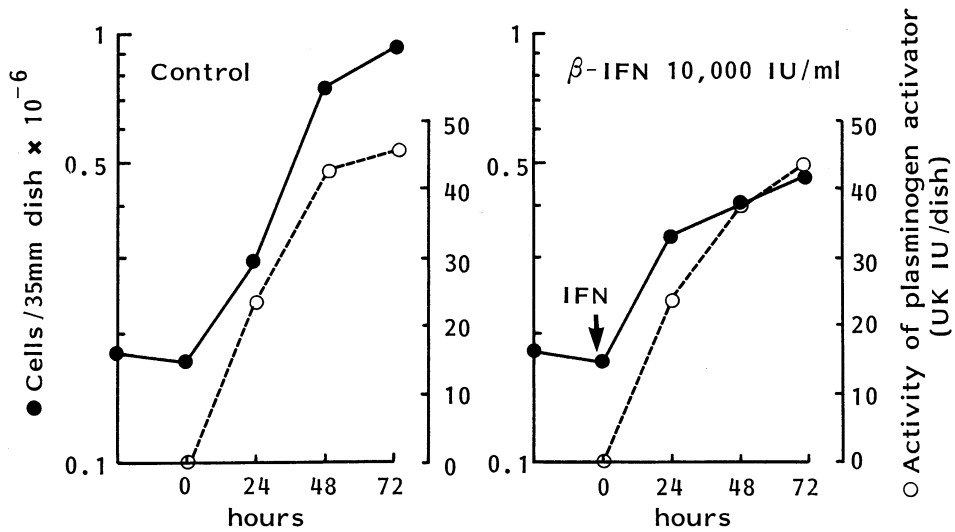


Fig. 2B. Time course of PA production in control and interferon-treated cultures of human renal carcinoma cells (ACHN)

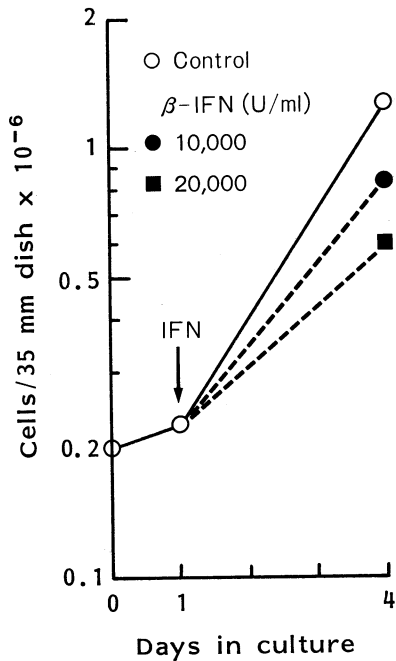


Fig. 3A. Effects of  $\beta$ -interferon on cell growth of human renal carcinoma cells (ACHN)

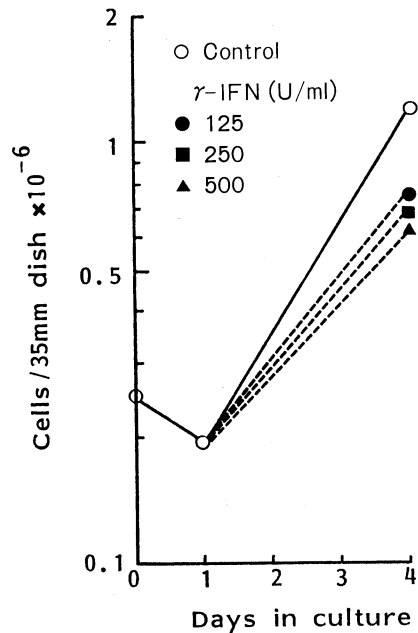


Fig. 3B. Effects of  $\gamma$ -interferon on cell growth of human renal carcinoma cells (ACHN)

PA 産生を上昇させる現象が、その他の培養ヒト細胞でも認められるかどうかをさらに調べた。ヒト膀胱癌細胞株 EJ, ヒト胎児線維芽細胞

を培養内で Co-60 ガンマー線で発癌させた KMST-6 細胞に  $\beta$ -IFN を作用させると、ACHN 細胞の場合と同じように PA の産生は

**Table 1.** Effects of interferon on production of PA

	Interferon (type, unit/ml)	Cell growth (% of control)	PA activity* (% of control)
ACHN	0	100	100
	$\beta$ 5,000	53.8	136
	10,000	56.2	133
	20,000	46.0	163
ACHN	0	100	100
	$\gamma$ 500	55.8	102
	1,000	55.0	110
	2,000	50.0	107
EJ	0	100	100
	$\beta$ 5,000	77.7	158
	10,000	80.9	168
	20,000	56.8	400
KMST-6	0	100	100
	$\beta$ 5,000	50.4	186
	10,000	52.6	192
	20,000	42.4	232

\* PA activity was determined as the amount of PA produced/ $10^5$  cells.

**Table 2A.** Effects of interferon- $\beta$  on syntheses of DNA, RNA, protein, and plasminogen activator of human renal carcinoma cells (ACHN)

IFN- $\beta$ * (unit/ml)	DNA (cpm/dish)	RNA (cpm/dish)	Protein (cpm/dish)	PA activity (UK IU/ml/dish)
0	101,100 (100)**	10,030 (100)	543,400 (100)	24.1 (100)
10,000	58,300 (57.7)	4,130 (41.1)	325,600 (59.9)	20.5 (85.1)
20,000	47,300 (46.8)	3,230 (32.2)	301,200 (55.4)	20.6 (85.5)

\* The cells were treated with interferon- $\beta$  for 3 days.

\*\* The number in the parentheses indicates % of control.

**Table 2B.** Effects of interferon- $\beta$  on syntheses of DNA, RNA, protein, and plasminogen activator of human renal carcinoma cells (ACHN)

IFN- $\beta$ * (unit/ml)	DNA (cpm/ $10^6$ cells)	RNA (cpm/ $10^6$ cells)	Protein (cpm/ $10^6$ cells)	PA activity (UK IU/ $10^6$ cells)
0	166,100 (100)**	7,900 (100)	436,400 (100)	35 (100)
10,000	136,100 (81.9)	4,980 (63.0)	477,100 (109)	62 (177)
20,000	157,000 (94.6)	5,380 (68.1)	347,100 (85.8)	50 (143)

\* The cells were treated with interferon- $\beta$  for 3 days.

\*\* The number in the parentheses indicates % of control.

**Table 3.** Effects of cycloheximide and actinomycin D on PA production of human renal carcinoma cells (ACHN) treated with  $\beta$ -interferon

	Inhibitors	PA activity/dish		PA activity/10 <sup>6</sup> cells	
		(% of control)		(% of control)	
		Control	$\beta$ -IFN	Control	$\beta$ -IFN
Medium	—	100	82.2	100	156.7
	CHX (0.1 $\mu$ g/ml)	33.9	25.0	50.4	47.1
	ACD (1 $\mu$ g/ml)	11.3	8.5	33.8	29.0
Cell lysate	—	100	74.0	100	150.2
	ACD (1 $\mu$ g/ml)	1.6	1.6	4.7	5.3

The cells were exposed to inhibitors or  $\beta$ -interferon (10,000IU/ml) for 48 hr. The cell lysate was prepared by the procedure described by Jones et al. (Cell 6: 242—245, 1975).

CHX: cycloheximide, ACD: actinomycin D, IFN: interferon

上昇した。

また、ヒト melanoma cell (SK-MEL-28) の tissue type の PA 産生も  $\beta$ -IFN,  $\gamma$ -IFN で高まった (実験結果は省略)。

#### 4) IFN の作用機序

IFN が細胞の PA 産生にどのように作用しているかをみるために、細胞の DNA, RNA, 蛋白合成におよぼす  $\beta$ -IFN の影響をみた。IFN 処理後、シャーレ当たりの DNA, RNA, 蛋白合成は約 40—50% 低下したが、PA 産生量は約 20% しか減少しなかった (Table 2A)。一方、IFN 処理後の DNA, RNA, 蛋白合成を生存細胞数でみると RNA 合成だけが低下し、DNA, 蛋白合成の低下は認められず、PA の産生は上昇していた (Table 2B)。 $\beta$ -IFN により PA の産生の上昇する上に述べた現象は培養中に ACD か CHX を加えておくと消失した。また、細胞内の PA 活性も ACD 処理で同程度の減少を示した (Table 3)。

## 考 察

最近、IFN が抗ウイルス作用以外に抗腫瘍細胞増殖作用、免疫系の賦活作用など多面的な作用を持つことが知られてきた。そして、臨床的に悪性腫瘍の治療にも IFN は使われ始めた。しかし、IFN の示す多彩な作用機序がどのような機構によるのかは現在もまだ明確ではない。

IFN により細胞の種々の物質産生の誘導、あるいは抑制が報告されている。本研究で得られた PA の IFN による産生誘導も興味ある現象である。

PA は健常人の血中、組織、尿中等に存在し、不活性な proenzyme である plasminogen を活性型線維素溶解酵素 plasmin に変換する。PA は腎細胞以外にも多くのヒト由来の培養細胞で産生され、また、悪性腫瘍由来の細胞が特に高い PA を産生することが知られている。癌化した細胞が高い PA 産生を示すことは、癌細胞の浸潤性増殖、転移などの一原因となっている可能性がある。しかし、転移とは明らかな関係がないとする報告もある。<sup>17)~21)</sup>

IFN の作用機序の一つとして細胞の蛋白合成の抑制がある。その機序は IFN の処理により細胞の 2'-5' synthetase, protein kinase の合成が高まり、蛋白合成阻害が起こると考えられている。<sup>2), 3)</sup> これは IFN の抗ウイルス、抗細胞増殖作用を説明する最も有力な根拠である。しかし一方では、IFN がある種類の蛋白の合成を亢進することも報告されている。すなわち、免疫に関する抗原である HLA-DR,<sup>4)</sup> HLA-A2 の mRNA,<sup>5)</sup> surface tumor-associated antigen<sup>6)</sup> などを IFN が誘導する。この事実は、IFN が免疫系にも深く関与していることを示している。また、fibroblast, macrophage 等では PA<sup>7)</sup> の他に prostaglandin E,<sup>8)</sup> colony

stimulating factor<sup>9)</sup>などの産生をIFNが上昇させることなども報告されている。そのほか、まだ明確には同定されていないが、分子量68,000の蛋白<sup>10)</sup>やある種の mRNA<sup>11)</sup>の合成が高まるとの報告もある。その他、IFNが細胞を分化させる<sup>12)</sup>働きを示す場合もあることが報告されている。上述したIFNにより誘導された未同定の蛋白は、細胞の分化に関与している可能性もある。

この実験で調べたPAは正常な腎細胞で産生

されている。このPA産生が腎細胞の分化機能に関与したものであれば、本研究の成績はIFNは細胞の分化機能の発現の調節に関与している可能性を示している。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲いただいた川崎医科大学実験病理学教室木本哲夫教授、難波正義助教授、ならびに腎臓内科学教室大沢源吾教授に謝意を捧げます。また、御援助いただいた兵藤文則助手、西谷耕二助手、福島不二子技術員に心より感謝いたします。

## 文 献

- 1) Issacs, A. and Lindenmann, J.: Virus interference. I. The interferon. Proc. R. Soc. Lond. [Biol] 147: 258—267, 1957
- 2) Havanessian, A. G., Meurs, E., Aujean, O., Vaquero, C., Stefanos, S. and Falcoff, E.: Antiviral response and induction of specific proteins in cells treated with immune T (Type II) interferon analogous to that from viral interferon (Type I)-treated cells. Virology 104: 195—204, 1980
- 3) Kerr, I. M. and Brown, R. E.: pppA2' p5' A2' p5' A: An inhibitor of protein synthesis synthesized with an enzyme fraction from interferon-treated cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 75: 256—260, 1978
- 4) Steeg, P. S., Moore, R. N., Johnson, H. M. and Oppenheim, J. J.: Regulation of murine macrophage Ia antigen expression by a lymphocyte with immune interferon activity. J. exp. Med. 156: 1780—1793, 1982
- 5) Dani, Ch., Mechti, N., Piechanczyk, M., Lebleu, B., Jeanteur, Ph. and Blanchard, J. M.: Increased rate of degradation of c-myc mRNA in interferon-treated Daudi cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 82: 4896—4899, 1985
- 6) Greiner, J. W., Hand, P. H., Noguchi, P., Fisher, P. B., Peska, S. and Schlom, J.: Enhanced expression of surface tumor-associated antigens on human breast and colon tumor cells after recombinant human leukocyte  $\alpha$ -interferon treatment. Cancer Res. 44: 3208—3214, 1984
- 7) Hovi, T., Saksela, O. and Vaheri, A.: Increased secretion of plasminogen activator by human macrophages after exposure to leukocyte interferon. FEBS Lett. 129: 233—236, 1981
- 8) Yaron, M., Yaron, I., Gurari-Rotman, D., Revel, M., Lindner, H. R. and Zor, U.: Stimulation of prostaglandin E production in cultured human fibroblasts by poly (I) · poly (C) and human interferon. Nature 267: 457—459, 1977
- 9) Schlick, E., Hartung, K. and Chirigos, M. A.: Comparison of in vitro and in vivo modulation of myelopoiesis by biological response modifiers. Cancer Immunol. Immunother. 18: 226—232, 1984
- 10) Laurent, A. G., Krust, B., Garable, J., Svab, J. and Havanessian, A. G.: Monoclonal antibodies to an interferon-induced Mr 68,000 protein and their use for the detection of double-stranded RNA-dependent protein kinase in human cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 81: 6733—6737, 1984

- 11) Launer, A. C., Joinak, G., Cheng, Y. S. E., Korant, B., Knight, E. and Darnell, J. E., Jr.: Transcriptional induction of two genes in human cells by  $\beta$  interferon. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 81: 6733—6737, 1984
- 12) Harris, P. and Ralph, P.: Human leukemic models of myelomonocytic development: A review on the HL-60 and U937 cell lines. J. Leukocyte Biol. 37: 407—422, 1985
- 13) Chang, Y. C., Hogan, T. F. and Borden, E. C.: Preliminary characterization of ACHN, a human renal adenocarcinoma cell line, growth inhibited by human interferons (INF)  $\alpha$  and  $\beta$ . Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 14: 4, 1983
- 14) Marshall, C. J., Franks, L. M. and Carbonell, A. W.: Markers of neoplastic transformation in epithelial cell lines derived from human carcinomas. JNCI 58: 1743—1751, 1977
- 15) Namba, M., Nishitani, K., Hyodoh, F. and Kimoto, T.: Neoplastic transformation of human diploid fibroblasts (KMST-6) by treatment with  $^{60}\text{Co}$ -gamma rays. Int. J. Cancer 35: 275—280, 1985
- 16) Chmielewska, J., Ranby, M. and Wiman, B.: Evidence for a rapid inhibitor to tissue plasminogen activator in plasma. Thromb. Res. 31: 429—436, 1983
- 17) Evers, J. L., Patel, J., Madeja, J. M., Schneider, S. L., Hobika, G. H., Camilo, S. M. and Markes, G.: Plasminogen activator activity and composition in human breast cancer. Cancer Res. 42: 219—226, 1982
- 18) Pauli, B. U., Schwarts, D. E., Thonar, E. J. M. and Kuettner, K. E.: Tumor invasion and host extracellular matrix. Cancer Metastasis Rev. 21: 129—152, 1983
- 19) Kohga, S., Harvey, S., Weaver, R. M. and Markus, G.: Localization of plasminogen activators in human colon cancer by immunoperoxidase staining. Cancer Res. 45: 1787—1796, 1985
- 20) Kirchheimer, J. C., Pfluger, H., Hienert, G. and Binder, B. R.: Increased urokinase activity to antigen ratio in human renal cell carcinoma. Int. J. Cancer 35: 737—741, 1985
- 21) Eisenbach, L., Segal, S. and Feldman, M.: Proteolytic enzymes in tumor metastasis. I. Plasminogen activator in clones of Lewis lung carcinoma and T10 sarcoma. JNCI 74: 77—85, 1985