

—総説—

マウス白血病細胞 P388D1 由来血管内皮細胞増殖抑制因子

松永俊之^{a)*}、臼井茂之^{b)}、木方正^{b)}、平野和行^{b)}

要約:我々は、抗腫瘍グルカンとして知られるカルボキシメチル化カードラン (CMCD) がマウス腹腔マクロファージ (Mφ) やマウス白血病細胞 P388D1 に対して直接的に作用し、これらの細胞から血管内皮細胞の増殖抑制活性を誘導することを見出した。そこで、CMCD で刺激した P388D1 培養上清から血管内皮細胞増殖抑制因子 (EGSF) の精製を行い、55 及び 63 kDa の 2 種のタンパク質を得た。ここで得られた EGSF による増殖抑制作用は強力であり、かつ血管内皮細胞に特異的であった。また、本因子は Mφ や好中球の遊走能等のいくつかの機能を亢進するだけでなく、血管新生を抑制することにより腫瘍を退縮させることを明らかにした。これらのことから、Mφ から主に産生される EGSF は、抗腫瘍多糖による腫瘍退縮メカニズムにおいて重要な役割を果たすことが示唆された。

索引用語: 血管内皮細胞、増殖抑制因子、抗腫瘍グルカン、P388D1、腫瘍退縮因子、マクロファージ、好中球

Endothelium Growth Suppressing Factor Secreted from Mouse Lymphoma P388D1

Toshiyuki MATSUNAGA^{a)*}, Shigeyuki USUI^{b)}, Tadashi KIH^{b)}, Kazuyuki HIRANO^{b)}

Abstract: A carboxymethylated curdian (CMCD), antitumor glucan, was found to act directly on mouse peritoneal macrophages and mouse lymphoma P388D1 cells, and induced a growth suppressing activity for endothelial cells from these cells. The endothelium growth suppressing factor (EGSF) was purified from the conditioned medium of P388D1 cells in the presence of CMCD. The purified EGSF showed two proteins corresponding to the molecular masses of 55 and 63 kDa by silver staining on a SDS-polyacrylamide gel under reducing conditions. The growth inhibitory effect of this factor was potent and specific to endothelial cells. In addition, it is demonstrated that EGSF might act as a potent inhibitor of tumor angiogenesis as well as an activator for macrophages and neutrophils. Taken together, these findings suggest that EGSF secreted from macrophage plays an essential role in tumor regression by antitumor polysaccharide.

Keyphrases: endothelial cell, growth suppressing factor, antitumor glucan, P388D1, tumor regressing factor, macrophage, neutrophil

緒言

血管内皮細胞は通常分裂や遊走はせず、血管内腔を単膜で覆っているのみである。しかし、種々の物理的及びサイトカイン等の化学的刺激¹⁾により血管断裂部で血管拡張と透過性亢進が生じると、その結果、内皮細胞は収縮して細胞間隙が開き、血管基底膜の破壊、内皮細胞の周囲結合組織中への遊走に伴う分裂及び増殖が生じる。更に、基底膜物質を分泌し管腔形成することにより新生血管が形成される²⁾。血行性転移した癌細胞の増殖には、周辺組織から腫瘍に向かって新しい血管が伸展する血管新生 (tumor angiogenesis)³⁾が必須とされており、この血管新生時や炎症時においては、血管透過性亢進に伴い好中球や Mφ の血

管内皮細胞への接着と血管外への透過現象が認められている。Mφ から主に分泌される炎症性サイトカインとして tumor necrosis factor- α (TNF- α)⁴⁾、IL-1⁵⁾、transforming growth factor- β (TGF- β)⁶⁾などが挙げられるが、これらは血管新生過程や白血球の内皮細胞との接着や透過において重要な役割を果たすと同時に、内皮細胞に対して障害や増殖抑制を示すことが報告されている。

シジフィラン (SPG)⁷⁾、レンチナン⁸⁾やスクレログルカン⁹⁾等の分枝(1 \rightarrow 3)- β -D-グルカン類は抗腫瘍活性を示し、SPG やレンチナンは国内においてそれぞれ胃癌、子宮頸癌の治療薬として臨床的に使用されている^{10,11)}。また近年、(1 \rightarrow 3)- β -D-グルカンを化学修飾したカルボキシメチル化カードラン (CMCD)¹²⁾やカルボキシメチル化 SPG¹³⁾がマ

a) 埼玉医科大学第一生化学教室 (〒350-0495 埼玉県入間郡毛呂山町毛呂本郷 38)

The 1st department of Biochemistry, Saitama Medical School (38 Morohongo, Moroyama, Iruma-gun, Saitama 350-0495, JAPAN)

b) 岐阜薬科大学薬剤学教室 (〒502-8585 岐阜県岐阜市三田洞東 5 丁目 6-1)

Laboratory of Pharmaceutics, Gifu Pharmaceutical University (5-6-1, Mitahora-higashi, Gifu 502-8585, JAPAN)

ウス肉腫細胞 Sarcoma-180 (S-180)を移植したマウスの実験系において、より強い抗腫瘍活性を示すことや、CDを熱処理することにより *in vitro* においてマウス M ϕ から抗腫瘍活性を誘導することも報告されている¹⁴⁾。これら抗腫瘍性多糖は腫瘍細胞に対して直接的傷害活性は示さず、M ϕ 、好中球やTリンパ球などの免疫細胞の種々の機能を亢進することが報告されている¹⁵⁻¹⁷⁾。従って、その作用機序は宿主の免疫能や抵抗性を上昇させるいわゆる宿主介在性免疫機構の賦活化によることが推測されている。ところが近年になり、担癌マウスに抗腫瘍多糖体を投与すると短時間に腫瘍内の生腫瘍細胞数が急激に減少することが見出され、免疫機構の活性化のみでは説明できない作用機序の存在が示唆された。更に、抗腫瘍多糖を投与した担癌マウスの血清を別の担癌マウスに投与した場合にも、同様な腫瘍組織内の生腫瘍細胞数の減少が認められており、国元らは抗腫瘍多糖により血清中に誘導される非サイトカイン系血清因子として腫瘍退縮因子 (TRF) を報告した^{18,19)}。国元らの報告によれば、TRF は主に肝 kupffer 細胞から産生されること、また、TRF を含む血清を投与した後のマウス腫瘍内の組織学的検索により、腫瘍内血管に血栓様症状及び早期の出血が認められることが判明している^{20,21)}。また最近になって、Folkmanら²²⁾は固形腫瘍は非常に小さな場合は血管を必要としないが、ある一定以上の大きさ (1-2mm³) から急速に増殖する場合、腫瘍血管新生が必要であることを報告した。

本研究では、抗腫瘍多糖の作用機序として血管内皮細胞への抗腫瘍多糖の関わりに着目した。抗腫瘍多糖は血管内皮細胞に対して直接的には何ら影響を及ぼさなかったが、抗腫瘍多糖刺激によりマウス腹腔 M ϕ やマウス白血病細胞 P388D1 から血管内皮細胞増殖抑制活性を示す因子が分泌されることを新たに見出した。そこで、マウス白血病細胞 P388D1 を抗腫瘍多糖 CMCD で刺激することによって産生される血管内皮細胞増殖抑制因子の精製を試み、本因子の免疫細胞に対する作用及び本因子による抗腫瘍作用機序の解明を行った。

実 験

1. 実験材料

試薬及び材料：本実験に用いた CMCD (*Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes* IFO 13140 が培地中に産生する直鎖(1→3)- β -D-glucan のカルボキシメチル化体) は 和光純薬(株)より購入した。カラムクロマトグラフィー充填剤として用いた Macro-prep Ceramic Hydroxylapatite type II 及び Econo-Pac CHT II Cartridge は Bio-rad Laboratories、Q-Sepharose Fast Flow、Sephacryl S-300HR、PBE94 及び Superdex 200HR は Pharmacia LKB Biotechnology AB、Matrex gel PBA-30 は Amicon のものを用いた。また、

Anti-bovine serum albumin (BSA) agarose は Affi-Gel Hz Immunoaffinity kit (Bio-rad Laboratories) を用い、anti-BSA antibody (ICN Pharmaceuticals Inc.) を結合させて用いた。5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) Labeling and Detection Kit III は Boehringer Mannheim、Silver stain II Kit は和光純薬(株)、Endotoxin determination kit である PYRODICK は生化学工業(株)のものを用いた。試薬類では、2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium mono sodium salt (WST-1) と 1-methoxy-5-methyl-phenazinium methylsulfate (1-methoxy PMS) は和光純薬(株)のものを用いた。また、N-formyl-L-methionyl-L-leucyl-L-phenylalanine (fMLP) と 2',7-bis carboxyethyl carboxyfluorescein tetraacetoxymethyl ester (BCECF-AM) はフナコシから購入した。抗マウス IL-1 α 抗体、抗ヒト TGF- β 抗体、抗マウス TNF- α 抗体及び抗ヒト platelet factor-4 (PF4) 抗体はそれぞれ Biogenesis Ltd.、R&D Systems Inc.、Hycult bio- technology 及び Pepro Tech Inc. の製品を用いた。Anti-human von Willebrand factor (vWF) rabbit polyclonal antibody は Sigma Chemical 社、biotinylated goat anti-rabbit serum 及び peroxidase-conjugated streptavidin は Dako 社のものを用いた。また、精製に用いた培地は免疫生物研究所製の Media I 無血清培地を用いた。また、ディッシュのコートに用いた Cellgen は高研(株)から購入した。限外濾過膜は東洋濾紙(株)の UK-10、透析膜は三光純薬(株)のものを用いた。また、Centricon-10 は Bio-rad Laboratories のものを用いた。その他はナカライテスク(株)あるいは和光純薬(株)の特級試薬を用いた。水は全て精製水を使用した。

動物：実験に用いた ICR 系雌性及び ddY 系雄性マウスは日本 SLC(株)より購入した。飼育環境は温度 21 \pm 1 $^{\circ}$ C、湿度 60%の恒温恒湿飼育舎で、自由給水下に固形飼料 (ラボ MR ストック、日本農産工業) を給餌して飼育した。

細胞：マウス腹腔浸潤 M ϕ は吉田らの方法²³⁾に基づいて調製した。また、マウス腹腔好中球は Watt らの報告した方法²⁴⁾にて、マウス脾臓 T リンパ球は Julius らの方法²⁵⁾にて単離した。

2. 血管内皮細胞増殖抑制因子の精製

血清及び培養上清の採取：試薬ビン中で CMCD (101.7 mg) を 20 mM NaOH 10 mL 中に溶解し、密封後、オートクレーブ (120 $^{\circ}$ C、1 kg/cm²、20 分) 処理し、ゆっくり放冷した。その試薬ビン中に 100 mL ウシ血清 (BS, GIBCO) と Media I を加えて、1 L として用いた。

担癌マウスの血清は以下に述べる方法で調製した。すなわち、ddY 雄性マウス (4 週齢) の右鼠蹊部皮下に S-180 を 5 x 10⁶ cells/mouse で移植し、14 日後に CMCD を 100 mg/kg で *i.p.* 投与した。対照群では生理食塩水を用いた。投与 16 時間後に断首して全血採取し、30 分氷冷後、遠心分離 (10,000 x g、5 分) により血清を得た。

Mφの培養上清は次の方法で調製した。10% FBS 及び 25 mM HEPES を含む RPMI 1640 培地 (pH 7.4) 中に Mφ画分を 5×10^5 cells/mL で播種した。1 時間後浮遊細胞を洗浄除去し、再び同培地を加えて CO₂ インキュベーター中で 4 日間培養した。CMCD 添加群では、培地中に最終濃度 100 µg/mL となるように CMCD を加えた。培養液を採取し、遠心分離 (2,600 x g, 15 分) により Mφ培養上清を得た。

P388D1 培養上清は次に述べる方法で調製した。10% FBS 及び 25 mM HEPES を含む RPMI 1640 培地 (pH 7.4) 中に P388D1 を 1×10^5 cells/ml となるように播種し、4 日間培養した。CMCD 添加群では、培地中に最終濃度 100 µg/mL で CMCD を加えた。培養液を採取し、遠心分離 (2,600 x g, 15 分) により P388D1 培養上清を得た。

血管内皮細胞増殖抑制因子の精製法: 精製は全て 4°C で行った。P388D1 培養上清 (3L) は、硫酸アンモニウム (硫酸) 分画し、35-65% 飽和硫酸沈殿画分を採取した。沈殿を 50 mL の 10 mM リン酸カリウム緩衝液 ((k/k) PB) (pH 7.4) で再溶解し、同緩衝液に対して 4 日間透析した。同緩衝液で平衡化した Ceramic Hydroxylapatite カラム (2.5 cm x 40.7 cm) に透析内液を添加し、未吸着画分を同緩衝液で洗浄後、各々 2 L の 50 mM、300 mM 及び 500 mM (k/k) PB (pH 7.4) を用いて段階的に溶出を行った。得られた活性画分は 5 mM (k/k) PB (pH 7.4) で 3 日間透析後、同緩衝液で平衡化した Q-Sepharose カラム (2.5 cm x 18.3 cm) に添加した。カラムを 400 mL の 5 mM (k/k) PB (pH 7.4) で洗浄後、各々 400 mL の 50、150、300、1000 及び 2000 mM NaCl を含む 5 mM (k/k) PB (pH 7.4) を用いて段階的に溶出した。活性画分は phosphate-buffered saline (PBS、組成は 137 mM NaCl、5.4 mM KCl、3.4 mM Na₂HPO₄、4.4 mM KH₂PO₄ 及び 5.5 mM glucose) (pH 7.4) で 2 日間透析し、限外濾過濃縮した。この画分を PBS (pH 7.4) で平衡化した Sephacryl S-300HR カラム (2.5 cm x 97.0 cm) に添加し、同緩衝液を用いて溶出した。活性画分は 10 mM MgCl₂ を含む 50 mM HEPES-NaOH (pH 8.5) 緩衝液で 3 日間透析し、同緩衝液で平衡化した Matrex PBA-30 カラム (1.0 cm x 12.7 cm) に添加した。カラムを同緩衝液で洗浄後、50 mL の 10 mM MgCl₂ 及び 10 mM EDTA を含む 50 mM HEPES-NaOH (pH 8.5) 緩衝液で溶出し、引き続き 200 mL の sorbitol (0-100 mM) のグラジエントで溶出した。活性画分を 10 mM (k/k) PB (pH 7.4) で一晩透析し、同緩衝液で平衡化した CHT-II カラム (5 mL) に添加した。カラムを同緩衝液で洗浄後、100 mL の (k/k) PB (pH 7.4) (10-300 mM) のグラジエントで溶出した。活性画分を 5 mM (k/k) PB (pH 7.4) で一晩透析後、同緩衝液で平衡化した Resource-Q カラム (1 mL) に添加した。カラムを同緩衝液で洗浄した後、20 mL の NaCl (0-1000 mM) のグラジエントで溶出した。得られた活性画分を 300 mM NaCl を含む 10 mM (k/k) PB (pH 7.4) で平衡化した anti-BSA agarose カラム (0.9 cm x

3.1 cm) に添加し、同緩衝液で未吸着画分を溶出した。この未吸着画分を Centricon-10 を用いて濃縮後、10 mM (k/k) PB (pH 7.4) で 2 日間透析し、同緩衝液で平衡化した Superdex 200HR カラム (1.0 cm x 30.0 cm) に添加した。同緩衝液を用いて溶出して得られた画分は、限外濾過濃縮して使用するまで 4°C 以下で保存した。ここで得られた活性画分を血管内皮細胞増殖抑制因子 (EGSF) として実験に用いた。

血管内皮細胞増殖の測定²⁶⁾: 10% ウシ胎児血清 (FBS, GIBCO), streptomycin sulfate (100 µg/mL) (明治製菓(株)), penicillin G (100 units/mL) (明治製菓(株)) を含む Dulbecco's modified Eagle's minimum essential medium (DMEM) (pH 7.4) (日水製薬(株)) 培地に懸濁したウシ大動脈血管内皮細胞 (BAE) 50 µL を 96 穴プレート中に 1×10^4 cells/well で播種し、試料 5 µL 及び同培地 45 µL を加えて CO₂ インキュベーター中で 36 時間培養した。対照群として培地のみ (blank) と試料無添加の BAE のみ (100% control) を調製した。次に、25 mM WST-1 及び 0.2 mM 1-methoxy-PMS を含む 20 mM HEPES (pH 7.4) 10 µL を添加して 37°C にて 3 時間インキュベートした後、マイクロプレートリーダー MTP-120 (CORONA) を用いて測定波長 415 nm 及び対照波長 660 nm の吸光度を測定した。増殖抑制率 (%) は以下の式により算出した。ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) は 2% FBS、bovine brain extract (BBE) (12 µg/mL)、human epidermal growth factor (hEGF) (10 ng/mL)、hydrocortisone (1 µg/mL)、gentamycin (50 µg/mL) 及び amphotericin B (50 ng/mL) を含む血管内皮細胞基礎培地 (EBM) (pH 7.4) (宝酒造(株)) 培地中に、また、ヒト毛細血管内皮細胞 (HMVEC) は 5% FBS、BBE (12 µg/mL)、hEGF (10 ng/mL)、hydrocortisone (1 µg/mL)、gentamycin (50 µg/mL) 及び amphotericin B (50 ng/mL) を含む EBM (pH 7.4) 培地中に懸濁して BAE の場合と同様に測定した。

増殖抑制率 (%) = $(1 - (S - A) / (B - A)) \times 100$

S: 試料及び細胞を添加した well の吸光度

A: 培地のみ の吸光度

B: 細胞のみを添加した well の吸光度

また、BrdU Labeling and Detection Kit III を用いた DNA 合成能による細胞増殖の測定も行った²⁷⁾。10% FBS を含む DMEM (pH 7.4) 培地に懸濁した BAE 50 µL を 96 穴プレート中に 1×10^4 cells/well となるように播種し、試料 5 µL 及び同培地 45 µL を加えて CO₂ インキュベーター中で 12 時間培養した。対照群として培地のみ (blank) と試料無添加の BAE のみ (100% control) を調製した。次に、PBS (pH 7.4) 中に溶解した BrdU 10 µL を最終濃度 10 mM となるように加えてさらに 12 時間培養した後、10% FBS を含む RPMI 1640 (pH 7.4) で洗浄し、1.67% HCl を含む 70% エタノールを 100 µL 加えて -40°C で 1 時間放置することにより DNA を固定した。PBS で洗浄後、nuclease を加え

て 37°C にて 1 時間処理し、更に 10 mg/mL BSA を含む PBS (pH 7.4) 中に溶解した peroxidase 結合抗 BrdU 抗体 100 μ L を最終濃度 20 mU/well で加えて 37°C にて 1 時間インキュベートした。PBS で洗浄後、peroxidase 基質 2,2'-azino-di-(3-ethylbenzthiazoline sulfonate) を 100 μ L 添加し、マイクロプレートリーダー MTP-120 を用いて測定波長 415 nm 及び対照波長 492 nm の吸光度を測定した。活性単位は BrdU の DNA 中への取り込みが 50% 阻害される時の被検体の希釈倍率を munit で表わした。

蛋白質量の定量：蛋白質量は、Lowry 法及び 280nm における紫外部の吸収を日本分光 UVIDEC-340 分光光度計を用いて測定した。

電気泳動：SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) は 4% 濃縮ゲル及び 10% 分離ゲルを用い、Laemmli²⁸⁾ の方法に従って行った。泳動後、蛋白質は Silver stain II kit を用いて染色した。標準分子量マーカーとして、phosphorylase b (MW 97,400)、albumin (MW 66,200)、ovalbumin (MW 45,000)、carbonic anhydrase (MW 31,000)、trypsin inhibitor (MW 21,500) 及び lysozyme (MW 14,400) を用いた。

3. EGSF の免疫細胞に及ぼす影響

遊走活性の測定：好中球及び M ϕ の遊走能は 48 穴マイクロケモタキシスチャンパー及び pore size 5 μ m type (PFB 5) と 8 μ m type (PFB 8) の膜 (Neuro Probe) を各々使い、Boyden 法に従って測定した²⁹⁾。チャンパーの下層に試料を 25 μ L、上層には 0.1% BSA を含む M199 (pH 7.4) に 1×10^6 cells/mL となるように調製した好中球あるいは M ϕ 懸濁液を 50 μ L 注入し、CO₂ インキュベーター中で、好中球では 30 分、M ϕ では 1 時間遊走させた。T リンパ球の遊走測定には type IV collagen でコートした PFB 5 を用い、0.1% BSA を含む RPMI 1640 (pH 7.4) で 2×10^6 cells/mL に調製した T リンパ球懸濁液を 50 μ L 注入し、CO₂ インキュベーター中で 4 時間遊走させた。チャンパーの上層にはフィルターの下層面に遊走した細胞をギムザ染色し、光学顕微鏡下で遊走細胞数をカウントした。また、好中球遊走能の Checkerboard assay は、48 穴マイクロケモタキシスチャンパー及び PFB 5 フィルターを用い、Zigmond と Hirsch らの方法³⁰⁾に従って行った。

好中球の接着及び透過活性の測定³¹⁾：0.1% BSA を含む M199 (pH 7.4) 培地中に 2×10^7 cells/mL となるように調製した好中球懸濁液に、5 mM BCECF-AM を加えて 37°C にて 30 分間インキュベートして蛍光標識を行った。HBSS で 3 回遠心 (420 \times g、7 分) 洗浄後、標識された好中球は同培地中にて 1×10^7 cells/mL に懸濁して用いた。好中球の血管内皮細胞への接着は以下に述べる方法で測定した。10% FBS を含む DMEM 培地 (pH 7.4) に懸濁した BAE 90 μ L を 2×10^4 cells/well となるように 96 穴プレートに播種

し、CO₂ インキュベーター中で 2 日間培養してコンフィレントに調製した後、試料 10 μ L を加えて更に 24 時間培養を続けた。PBS により 3 回洗浄して試料を除いた後、蛍光標識した好中球懸濁液 100 μ L を加え、30 分インキュベートした。PBS で 3 回洗浄して非付着好中球を除去した後、1% Triton X-100 を加えて全ての細胞を溶解し、Cyto FluorTM 2350 蛍光マイクロプレートリーダー (Millipore) を用い、励起波長 485 nm 及び蛍光波長 530 nm で蛍光強度を測定した。

好中球の血管内皮細胞層の透過能は 24 穴トランスウェル (diameter 6.5 mm、Pore size 5 μ m) (Costar) を用いて測定した。10% FBS を含む DMEM (pH 7.4) 培地に懸濁した BAE 90 μ L をトランスウェルのカップの中に 2×10^4 cells/well となるように播種し、下層には同培地を 600 μ L 加えて CO₂ インキュベーター中で 2 日間、BAE がトランスウェルの膜上でコンフィレント状態になるまで培養した後、試料 10 μ L を上層に添加し、更に 24 時間培養を続けた。トランスウェルのカップと下層を PBS で 3 回洗浄して試料を除いた後、蛍光標識した好中球懸濁液 100 μ L をカップ中に入れ、下層には 100 nM fMLP 及び 0.1% BSA を含む M199 (pH 7.4) 培地 600 μ L を加えて 37°C にて 3 時間インキュベートした。トランスウェルのカップ及び膜上に残った好中球を PBS で 3 回洗浄して除去した後、1% Triton X-100 50 μ L でトランスウェルの膜下面に透過した好中球を溶解し、Cyto FluorTM 2350 蛍光マイクロプレートリーダーを用いて励起波長 485 nm 及び蛍光波長 530 nm で蛍光強度を測定した。

また、既知の濃度の蛍光標識した好中球を用いて検量線を作製し、測定した試料の蛍光強度より総好中球量を算出した。

一酸化窒素 (NO) 産生能の測定²³⁾：0.1% BSA を含む M199 (pH 7.4) 培地中に懸濁した M ϕ 90 μ L をプレートに 2×10^5 cells/well となるように播種し、試料 10 μ L を添加して遮光して 16 時間培養した。培養上清 50 μ L を採取し、同量の Griess 試薬を加えて混和した後、マイクロプレートリーダー MTP-120 を用いて測定波長 570 nm 及び対照波長 660 nm で吸光度を測定した。NaNO₂ を用いた検量線により産生された NO \cdot /NO₂ 量を算出した。

T リンパ球の増殖能：T リンパ球の増殖は、BrdU Labeling and Detection Kit III を用いて測定した。単離した T リンパ球を 10% FBS を含む RPMI 1640 (pH 7.4) 中に懸濁し、96 穴プレートに 2×10^5 cells/190 μ L の濃度で播種した。EGSF 10 μ L をプレートに加えて 72 時間培養した後、BrdU labeling reagent を添加してさらに 24 時間インキュベートした。T リンパ球の DNA 中に取り込まれた BrdU を peroxidase 結合抗 BrdU 抗体で検出した。

4. EGSF の腫瘍退縮活性

TRF 活性の測定 : TRF 試験は、国元らの方法¹⁸⁾に従った。ICR 雌性マウス (4 週齢) の右鼠蹊部皮下に S-180 を 5×10^6 cells/mouse 移植し、その 16 日後、試料を 0.2 mL/mouse で尾静脈より i.v.投与した。対照群では生理食塩水を投与した。試料投与 16 時間後に腫瘍を摘出し、細切した後、0.1% collagenase、0.125% trypsin 及び 0.001% DNase を含む EMEM (pH 7.4) を腫瘍重量 (g) 当たり 20 mL 加え、37°C にて 2 時間処理した。総生細胞数を計数後、スライドガラス上にメタノールを用いて細胞を固定した。細胞はギムザ染色し、光学顕微鏡下で 200 個以上を計数して、その細胞構成比を求めた。活性の単位は国元らの報告した定義²⁰⁾に従って算出した。

腫瘍組織の免疫組織化学 : ICR 雌性マウス(6 週齢)から摘出した腫瘍塊を 5 mm 角に切り、カルノア液中で 4 時間固定した。100%エタノールで脱水後、パラフィン包埋法により包埋した腫瘍塊をマイクロトームで 5 μ m 厚に薄切した。薄片をスライドガラス上に固定し、2 mg/mL の proteinase K で 37°C、15 分処理した。PBS で洗浄後、0.3% H₂O₂ を含む PBS 中で 15 分インキュベートした。PBS で 3 回洗浄後、薄片を Anti-human vWF rabbit polyclonal antibody 及び 5% BS を含む PBS 中で 30 分処理し、次いでそれぞれ biotinylated goat anti-rabbit serum 及び peroxidase-conjugated streptavidin でインキュベートした。発色には peroxidase の基質である diaminodenzidine を用い、光学顕微鏡下で観察した。

血管内皮細胞の管腔形成能の測定³²⁾ : Cellgen (0.2% Type I collagen/EMEM (pH 7.4)) 200 μ L を 48 穴プレートに注入し、1 時間インキュベートした。固化したゲル上に 1.0% FBS を含む DMEM (pH 7.4) を 200 μ L 加え、更に 1 時間インキュベートした。培地を取り除いた後、1.0% FBS を含む DMEM (pH 7.4) 中に懸濁した BAE を 1×10^5 cells/well となるように播種し、CO₂ インキュベーター中で一晩培養した。培地を除去後、再び Cellgen 200 μ L を加え、CO₂ インキュベーター中で 1 時間インキュベートして上部ゲルを固化した。その後、試料 10 μ L を添加した 1.0% FBS 含有 DMEM (pH 7.4) 200 μ L を、別に対照として試料を含まない培地 200 μ L を上部ゲル上に加えて 3 日間培養した。位相差顕微鏡で光学顕微鏡像を観察し、管腔の長さにより管腔形成能の判定を行った。

結 果

CMCD を添加したマウス腹腔 M ϕ と P388D1 の培養上清及び CMCD 投与担癌マウス血清中の血管内皮細胞増殖抑制活性 : CMCD (100 μ g/mL) 存在下にマウス腹腔 M ϕ と P388D1 を培養して調製した培養上清及び S-180 担癌マウスに 100 mg/kg の濃度で CMCD を i.p.投与して得た血清 (CMCD 血清) を Ceramic hydroxylapatite カラムクロマトグラフィー

により分画し、得られた画分について BAE 増殖抑制活性を測定した。Fig. 1 に示すように、150 mM 及び 300 mM (k/k) PB で溶出された画分において、CMCD 非存在下の対照培養上清を用いた場合に比べ BAE 増殖抑制活性がそれぞれ 4.9 及び 9.0 倍増加した。また、100 μ g/mL の CMCD 存在下に培養した P388D1 培養上清においても CMCD 非存在下の培養上清と比較して、150 mM 及び 300 mM (k/k) PB 溶出画分において BAE 増殖抑制活性の増大が認められ、活性はそれぞれ 1.9 及び 4.1 倍増加した。更に、CMCD 血清においても同様に分画して BAE 増殖抑制活性を測定した結果、150 mM 及び 300 mM (k/k) PB 溶出画分の BAE 増殖抑制活性は対照血清を用いた画分のそれぞれ 1.9 及び 2.0 倍増大した。また、CMCD 存在下の P388D1 培養上清を Ceramic hydroxylapatite カラムに添加して分画した 150 mM 及び 300 mM (k/k) PB 溶出画分を集め、BAE の DNA 合成能に及ぼす影響を BrdU Labeling and Detection Kit III を用いて検討した結果、DNA 合成能は濃度依存的に阻害され、最大 DNA 複製阻害率は 74% に達した。

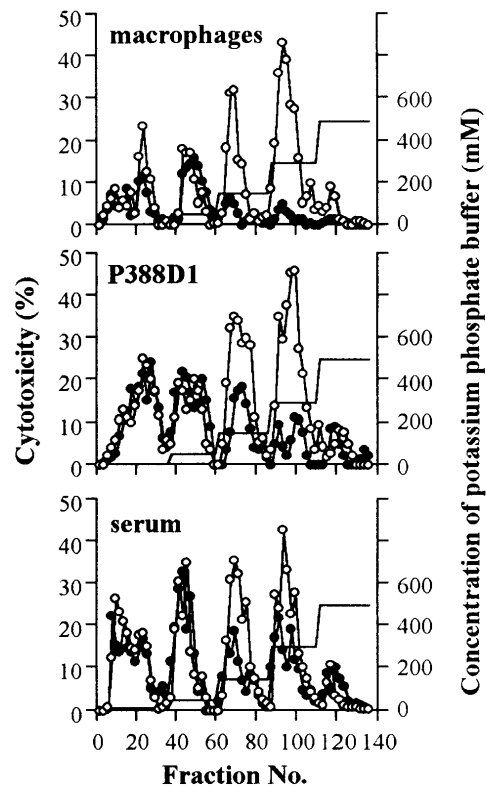


Fig. 1 Hydroxylapatite column chromatography of cytotoxic activities for BAEs

The supernatants of medium cultivated macrophages and P388D1 cells and the mouse serum treated with (open circles) or without (closed circles) CMCD were applied to a hydroxylapatite column. The cytotoxic activity of each eluted fraction was measured using WST-1.

P388D1 培養上清中の EGSF の精製 : 100 μ g/mL の CMCD 存在下に P388D1 を培養して調製した培養上清 3 L から硫酸分画及び 8 種のカラムクロマトグラフィーにより EGSF の精製を行った。Sephacryl S-300HR カラムクロマトグラ

Table 1 Purification of EGSF from the Conditioned Medium of P388D1

Step	Total activity ^{a)} (units)	Total protein (mg)	Specific activity (units/mg)	Purification (x-fold)	Recovery (%)
Conditioned medium	4910	31600	0.155	1	100
Ammonium sulfate fractionation	3700	11000	0.336	2.17	76.0
Ceramic hydroxylapatite	3010	3250	0.926	5.97	61.8
Q-Sepharose	762	380	2.01	13.0	15.6
Sephacryl S-300HR	465	165	2.82	18.2	9.55
Martex PBA-30	140	1.66	84.3	544	2.87
CHT-II	66.8	0.091	734	4740	1.37
Resource-Q	32.0	0.0092	3470	22400	0.657
Anti-BSA agarose	8.69	0.0008 ^{b)}	10860	70100	0.178
Superdex 200HR	7.11	0.0006 ^{b)}	11850	76500	0.146

a) The proliferation of BAEs was assayed using BrdU Labeling and Detection Kit III according to the manufacturer's instructions. Units of growth-suppressing activity were calculated as the reciprocal of the dilution factor of the solution containing EGSF when the growth of BAEs was inhibited 50% by EGSF. b) Protein in the fraction was estimated by densitometry of the stained band compared with known concentration of BSA after SDS-PAGE.

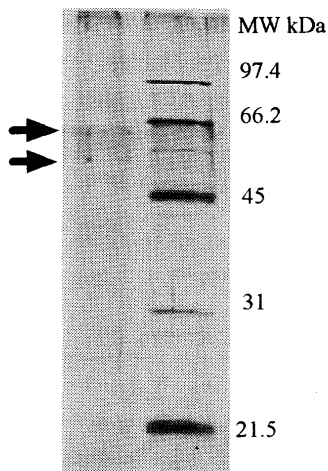


Fig. 2 SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis of EGSF

The left and right lanes show the purified EGSF and the molecular weight marker, respectively. Proteins on the gel were detected by a silver staining kit. Arrows show stained bands and these molecular weights correspond to 55 and 63 kDa.

フィーにおいて、BAE 増殖抑制活性は約 150 及び 40 kDa 付近の 2 つの分子量画分に認められた。IL-1 α ³³⁾、IL-6、TNF- α ³⁴⁾や TGF- β ^{35,36)}は M ϕ から分泌され、血管内皮細胞増殖抑制活性を示すことが知られているが、これらの分子量はいずれも数十 kDa であることが報告されている。従って、今回は高分子量活性画分中の EGSF について引き続き精製を行った。Resource-Q カラムクロマトグラフィーから得られた活性画分の純度を 10%ゲルを用いた SDS-PAGE で調べた。その結果、分子量約 67 kDa 付近にタンパク質バンドが認められたため、このタンパク質の N 末端アミノ酸配列分析を行ったところ BSA であることが判明した。従って、anti-BSA agarose ゲルカラムクロマトグラフィーにより活性画分中の BSA の除去を試みた。未吸着で溶出された画分を濃縮透析後、Superdex 200HR カラムにより分離した結果、65 kDa 付近に単一の活性ピークが検出された。そこで、再び SDS-PAGE により分析したところ、銀染色により分子量約 55 及び 63 kDa に 2 本のタンパク質バンドが検出された (Fig. 2)。この Superdex 200HR カラムより溶出した活性画分を EGSF とし、BAE

に対する増殖抑制活性を BrdU Labeling and Detection Kit III を用いて測定した。また、血管内皮細胞増殖抑制活性を有する画分中のタンパク質量は極端に少量であり、Lowry 法による測定は困難であったため、既知の濃度の BSA を用いた SDS-PAGE を行い、その銀染色のパターンのデンストメトリー解析によりタンパク質量を算出した。その結果、得られた EGSF の比活性は 11,850 units/mg、タンパク量は 630 ng であった。本精製法により EGSF は培養上清から活性回収率 0.146%、精製度 76,500 倍に精製された (Table 1)。

EGSF のエンドトキシン試験、熱処理及びタンパク分解酵素処理

PYRODICK によりエンドトキシンの有無を測定した結果、精製した EGSF 中にエンドトキシン活性は認められなかった。また、EGSF 10 ng/mL を 56°C、30 分熱処理後に BAE 増殖抑制活性を測定したところ活性は消失した。さらに、100 ng の α -chymotrypsin 及び Proteinase K で 37°C、60 分処理した後に BAE 増殖抑制活性を測定した結果、Fig. 3 に示すように各濃度において活性は減少し、タンパク分解酵素のみを加えた対照群とほぼ同程度まで活性が低下した。

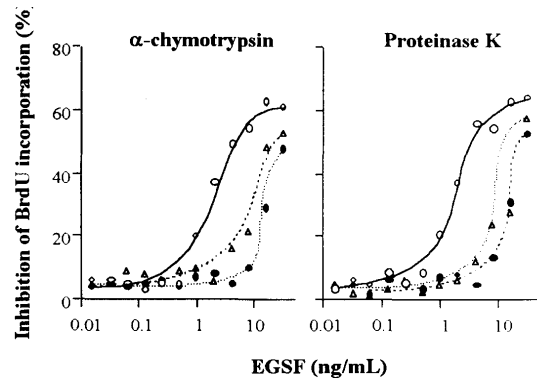


Fig. 3 Effect of Proteolytic Enzymes on the Growth Suppressing Activity of Purified EGSF

Twenty ng of EGSF was incubated in the presence (Δ) or absence (\circ) of 100 ng proteolytic enzymes, α -chymotrypsin and proteinase K, at 37°C for 60 min in 10 mM potassium phosphate buffer, pH 7.0. Proteolytic enzymes only (\bullet) were treated under the same conditions. The growth suppressing activity was assayed using BrdU Labeling and Detection Kit III.

種々抗体による EGSF 活性の阻害: EGSF 10 ng と抗 IL-1 α 、抗 TNF- α 、抗 TGF- β 及び抗 PF4 抗体のそれぞれ 100、500 及び 1000 ng を混合し、4 $^{\circ}$ C で一晩処理した後、血管内皮細胞増殖抑制活性を測定した。その結果、抗 IL-1 α 、抗 TNF- α 、抗 TGF- β 及び抗 PF4 のいずれの抗体も本活性に何ら影響を及ぼさなかった。

EGSF による血管内皮細胞増殖抑制の可逆性: BAE 培養上清中に EGSF を 10 ng/mL の濃度で添加して 0、6、12 及び 24 時間処理後、EGSF を含まない培地に交換して引き続き培養し、細胞数を計測した。その結果、Fig. 4 に示すように、EGSF で 6 及び 12 時間処理した細胞は、非処理の対照群と比較してやや遅れて BAE 増殖活性が認められ、培地交換後 72 時間後でコンフルエントに達した。それに対し、24 時間 EGSF で処理した細胞は培地交換 24 時間後にやや増殖が認められ、72 時間後にはゆるやかな細胞の増殖が見られた。

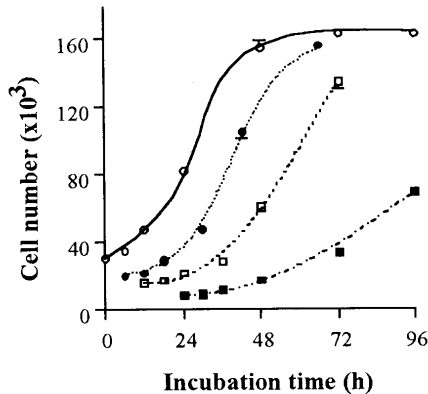


Fig. 4 Reversibility of Inhibition of BAEs Growth by EGSF
BAEs suspended in 100 μ L DMEM supplemented 10% FBS and antibiotics were seeded on a 96-well culture plate at a density of 3×10^4 cells per well. The purified EGSF was added to the incubation medium at a concentration of 10 ng/mL and the plate was incubated for 0 (\circ), 6 (\bullet), 12 (\square), and 24 h (\blacksquare) in a CO $_2$ incubator. After incubation, the medium containing the EGSF was discarded, the well was washed three times with DMEM, and then BAEs were cultivated in DMEM containing 10% FBS and antibiotics. The number of cells was determined by the trypan blue dye exclusion test after BAEs were harvested by trypsinization.

EGSF の BAE、HUVEC 及び HMVEC 増殖に及ぼす影響: BAE、HUVEC 及び HMVEC 培養上清中に EGSF を添加し、それぞれの血管内皮細胞の DNA 合成能に及ぼす影響を検討した。Fig. 5 に示すように、EGSF はこれら 3 種の血管内皮細胞全てに対し、2 ng/mL 以上の濃度において強い増殖抑制活性を示した。また、BrdU の取り込み阻害率が最大の 50% に達した時の濃度は BAE においては約 0.4 ng/mL であるのに対し、HUVEC 及び HMVEC においてはそれぞれ約 0.5、2 ng/mL であった。

EGSF の腫瘍細胞増殖能に及ぼす影響: 炎症性サイトカイン TNF- α は、腫瘍細胞に直接作用することにより壊死を引き起こすことが知られている³⁴⁾。そこで、EGSF の L929 及び S-180 細胞の増殖に対する直接的影響を検討した

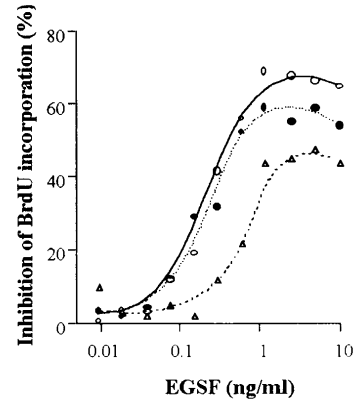


Fig. 5 Inhibition of BAE, HUVEC, and HMVEC Growth by EGSF

BAEs (\circ), HUVEC (\bullet), and HMVEC (\triangle) were incubated with purified EGSF at the concentration indicated for 12 h in DMEM and then BrdU was added to the medium for labeling. The amount of BrdU incorporated into the DNA of BAE, HUVEC, and HMVEC was measured. The result is expressed as the percentage of the DNA synthesis inhibited and each point represents the mean of triplicate samples.

結果、EGSF 濃度約 1 μ g/mL のタンパク濃度においても、PBS を用いた対照群と同様の増殖率を示した。また、U937、MM46 及び YAC-1 の増殖についても S-180 や L929 と同様に、EGSF 1 μ g/mL では何ら影響を及ぼさなかった。

2. EGSF の免疫細胞に及ぼす影響

2-1 好中球の機能に及ぼす EGSF の影響

遊走能: EGSF 及び好中球の走化性因子として知られる fMLP³⁷⁾ を用いて、好中球の遊走能に及ぼす EGSF の影響を検討した (Fig. 6)。好中球の遊走能は EGSF の濃度の増加に伴い、走化性因子特有の鐘型の曲線を示し、EGSF 約 20 ng/mL において最大の好中球遊走が認められ、PBS を用いた対照群の約 75 倍の好中球遊走数を示した。fMLP を用いて好中球遊走能を同時に測定した結果、100 nM の濃度で最大の好中球遊走が認められ、この時の遊走細胞数は EGSF 約 20 ng/mL の時の約 1.2 倍であった。

次に、EGSF による好中球の走化性を checkerboard assay により解析した。EGSF 濃度が好中球を含む上層より下層で高い濃度勾配 (positive gradient) を作製した場合におい

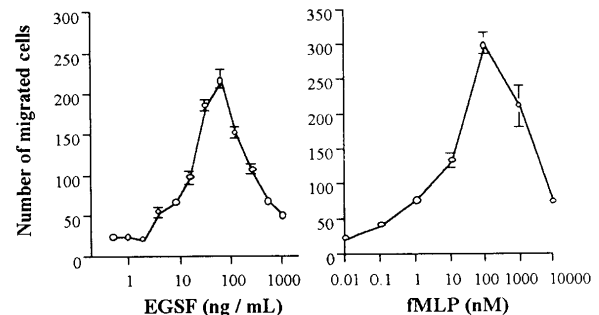


Fig. 6 Chemotactic Activity of EGSF

Chemotaxis of neutrophils and fMLP was measured at EGSF concentration indicated with a 48-well chemotaxis chamber and expressed as the number of migrated cells per visual field under a microscope with 400 x magnification. Each point represents the mean \pm S.E. of four experiments.

て濃度勾配依存的に好中球の遊走数が増加しており、いずれも下層より上層の方で EGSF 濃度が高い場合 (negative gradient) より好中球の遊走数は増大した。また、上層及び下層の EGSF 濃度が同一である濃度勾配のない場合には、EGSF 濃度の増加に伴い好中球の遊走数も増大した。**血管内皮細胞に対する接着及び透過能**：好中球の BAE への接着及び透過に及ぼす EGSF の影響を検討した。Fig. 7A に示すように EGSF 50 ng/mL 以上の濃度で加えた好中球の約 50% が BAE に接着しており、その際、PBS を用いた対照群と比較して約 5.7 倍の接着増大が認められた。好中球の BAE 層への透過能においても Fig. 7B に示すように、EGSF 100 ng/mL の濃度で加えた好中球の約 40% が単層培養の BAE 間を透過し、PBS を用いた対照群の約 2.7 倍に透過能が増大した。

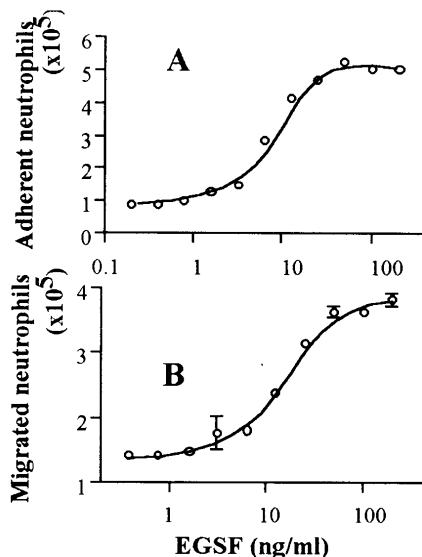


Fig. 7 Effect of EGSF on Adhesion to BAEs (A) and Transendothelial Migration (B) of Neutrophils

BAEs were treated with EGSF at a concentration indicated and BCECF-labeled neutrophils were added to the culture medium after removing EGSF. Each point represents the mean \pm S.E. of quadruplicate experiments.

2-2 M ϕ の機能に対する EGSF の影響

遊走能：Fig. 8 に示すように、約 5 ng/mL のタンパク濃度において最大の M ϕ 遊走が認められ、PBS を用いた対照群の約 7.3 倍の M ϕ 遊走を示した。

一酸化窒素 (NO) 産生能：Fig. 9 に示すように、EGSF 濃度依存的に M ϕ による NO 産生が認められ、50 ng/mL 以上の濃度で M ϕ 10⁵ cells 当たり NO₂ に換算して約 12.0 nmol の NO 産生を認めた。この NO 産生量は、M ϕ からの NO 産生を促進することが知られている acetylcholin を 10 mM の濃度で用いた時の NO 産生量とほぼ同量であった。一方、EGSF の BAE による NO 産生に関しては、用いた NO 測定法では測定限界以下であった。

2-3 T リンパ球の機能に及ぼす EGSF の影響

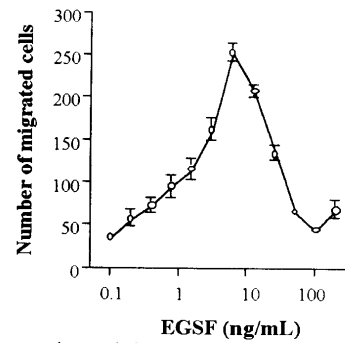


Fig. 8 Chemotactic Activity of EGSF

Chemotaxis of macrophages was measured at EGSF concentration indicated with a 48-well chemotaxis chamber and expressed as the number of migrated cells per visual field under a microscope with 400 x magnification. Each point represents the mean \pm S.E. of four experiments.

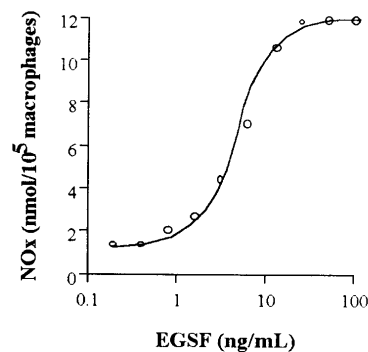


Fig. 9 Effect of EGSF on Nitrate Production by Macrophages

Each point represents the mean of triplicate samples.

遊走能：EGSF は好中球や M ϕ の諸機能を亢進することを今までに認めたため、他の免疫細胞である T リンパ球に及ぼす EGSF の影響について検討した。EGSF の T リンパ球に対する遊走活性は、好中球や M ϕ では遊走活性が認められた EGSF 400 ng/mL の濃度においてもほとんど認められなかった。

増殖能：T リンパ球培養液中に種々の濃度で EGSF を添加して 72 時間培養後、BrdU Labeling and Detection Kit III を用いて T リンパ球の増殖活性を測定した。その結果、EGSF 400 ng/mL の濃度においても T リンパ球増殖には何ら影響を認めなかった。

3. EGSF の腫瘍退縮活性

EGSF と TRF の共精製：100 μ g/mL の濃度で CMCD を添加した P388D1 培養上清 3 L から、EGSF と TRF を共精製した (Table 3)。硫安分画及び Ceramic hydroxylapatite、Q-Sepharose、Sephacryl S-300HR、Matrex PBA-30、PBE94 及び anti-BSA agarose の 6 種のカラムクロマトグラフィーにより、約 1.7 μ g の精製タンパクを得た。BAE 増殖抑制活性及び腫瘍退縮活性はそれぞれ 68,000 及び 92,700 倍精製され、活性回収率は 0.36 及び 0.50% であった。両活性の比活性比は Matrex PBA-30 カラムクロマトグラフィーの段階以降で一定値 12.2 を示した。Sephacryl S-300HR カラムクロマトグラフィーにおいて、BAE 増殖抑制活性は

Table 2 Purification of Growth Suppressing and Tumor Regressing Activities from the Conditioned Medium of P388D1

Step	Protein (mg)	Growth suppressing activity		Tumor regressing activity		Ratio of specific activities
		Total activity (units)	Specific activity (units/mg)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg)	
Conditioned medium	31700	4890	0.154	43800	1.38	1 : 8.95
Ammonium sulfate fractionation	10600	3660	0.344	32600	3.07	1 : 8.91
Ceramic hydroxylapatite	3340	2750	0.823	26500	7.94	1 : 9.64
Q-Sepharose	358	831	2.32	9070	25.3	1 : 10.9
Sephaeryl S-300HR	139	472	3.39	6070	43.7	1 : 12.9
Matrex PBA-30	1.16	154	133	1880	1620	1 : 12.2
PBE94	0.0197	66.2	3360	811	41200	1 : 12.3
Anti-BSA agarose	0.0017 ^{a)}	17.8	10470	218	128000	1 : 12.2

a) Protein in the fraction was estimated by the densitometry of the stained band compared with the known concentration of BSA after SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

分子量約 40 と 150 kDa 付近に認められたが、腫瘍退縮活性は 150 kDa 付近の高分子量画分のみ検出された。この活性画分を PBA-30 カラムに添加し分画した結果、BAE 増殖抑制活性と腫瘍退縮活性は共に 100 mM sorbitol 溶出画分のみ検出され、PBE94 カラムにおいて両活性は pH4.1 付近に溶出された。この画分中には培地由来の BSA が含まれているため、anti-BSA agarose カラムを用いて BSA を除去した。両活性は共に未吸着画分に検出され、透析・濃縮後、10%ゲルを用いた SDS-PAGE 分析に供した結果、分子量約 55 及び 63 kDa の 2 本のバンドが検出された。この精製標品を Superdex 200HR カラムクロマトグラフィーにて分画したところ、両活性は分子量約 65 kDa 付近に溶出し、その活性ピークは一致した。

In vitro 管腔形成能に及ぼす EGSF の影響 : BAE, HUVEC 及び HMVEC の in vitro 管腔形成能に及ぼす EGSF の影響をコラーゲンゲル法により検討した。Fig. 10 に示すように、EGSF を加えない対照群においては、培養 3 日後にはいずれの血管内皮細胞も管腔を形成したが、5 ng/mL の濃度で EGSF を加えた場合にはいずれの血管内皮細胞も管腔形成が阻害された。更に、管腔形成した後 5 ng/mL の濃度で EGSF を加えるといずれの場合にも 48 時間後には管腔が崩壊した。

EGSF の腫瘍退縮活性 : 精製 EGSF 標品の腫瘍退縮活性を Fig. 11 に示した。腫瘍塊中の生 S-180 細胞数は本標品の投与量依存的に減少し、マウス当たり約 15 ng 以上の EGSF 投与で最大の腫瘍退縮活性を示した。また、この時の生 S-180 細胞数は対照群の 20%に減少した。

腫瘍組織の免疫組織化学的検討 : EGSF による内皮細胞の増殖抑制がどの様に腫瘍退縮に関与しているかを調べるため、S-180 を移植して 14 日後のマウスに精製 EGSF を i.v.投与し、そのマウスから摘出した腫瘍塊を抗 human vWF 抗血清を用いて免疫組織化学的に検討した (Fig. 12)。

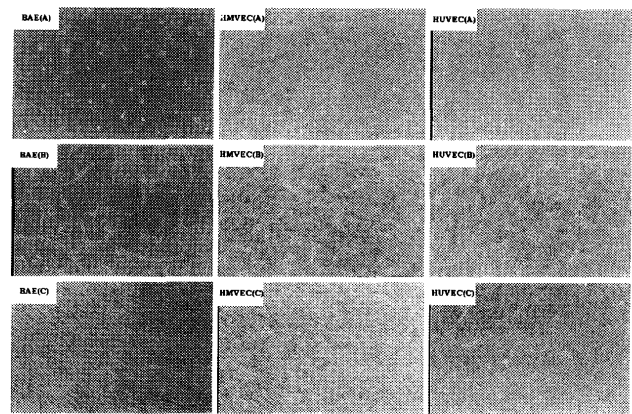


Fig. 10 Effect of EGSF on Angiogenesis in Vitro

In vitro angiogenesis was carried out according to the collagen gel method. Endothelial cells from bovine artery (BAE), human microvessel (HMVEC), and human umbilical vein (HUVEC) were plated at an initial density of 1×10^5 cells per well in the presence (A) or absence (B) of 5 ng/ml of EGSF. After the tube formation of endothelial cells was completed as shown in (B), 5 ng/ml of EGSF was added to the culture media and the plate was incubated for an additional 48 h (C). The cells were observed daily and were photographed with a phase-contrast microscope at 200 x magnification.

vWF は血管内皮細胞によって産生され血液中に放出される血液凝固に関与する因子であるため、腫瘍組織中の血管系異常の検出に用いた。EGSF 投与 24 時間以内に腫瘍組織中への出血傾向が認められ、48 時間後には出血は腫瘍組織全体に広がっていた。また、EGSF 投与 72 時間後には一部の腫瘍細胞の消失が認められた。

考 察

本研究では CMCD を添加したマウス腹腔 Mφ及びマウス白血球細胞 P388D1 の培養上清中に BAE 増殖抑制活性を新たに見出した。更に、S-180 を移植したマウスに 100 mg/kg で CMCD を静脈内投与した場合に、血清中にも同増殖抑制活性が認められた。そこで、CMCD で刺激した P388D1 培養上清から硫酸分画及び 8 種の

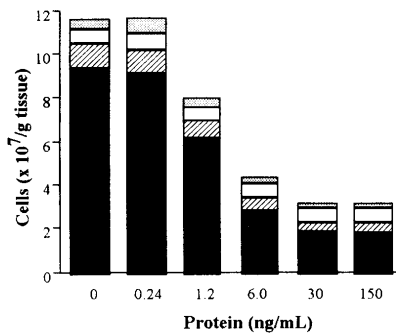
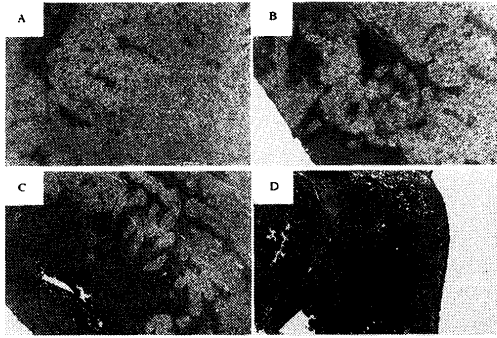


Fig. 11 Tumor Regressing Activity of EGSF

EGSF at the indicated concentrations was administered i.v. to mice bearing sarcoma 180 tumors via the tail vein and the tumor regressing activity was assayed. Viable sarcoma 180 cells (filled square), macrophages (slashed square), polymorphonuclear leukocytes (open square), and lymphocytes (dotted square) in a stained preparation were counted using a phase-contrast microscope at 1000 x magnification. Results present the mean of five animals in each group.

(40 x magnification)



(200 x magnification)

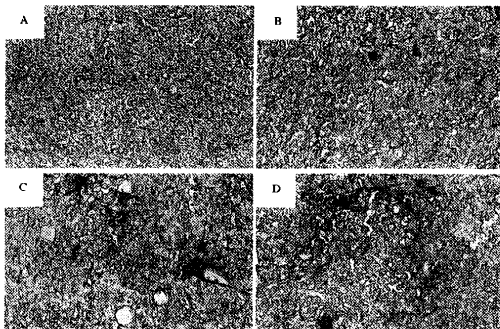


Fig. 12 Immunohistochemistry of Paraffin-Embedded Tumor Tissue of Mice Injected with EGSF

Tumor tissues were extirpated from mice bearing sarcoma 180 tumors before (A) and 24 h (B), 48 h (C), 72 h (D) after the administration of 15 ng of EGSF. Paraffin-embedded tumor tissues were sliced with a microtome and sliced sections were incubated with anti-von Willebrand factor antibody. Immunostaining was performed with diaminobenzidine as a substrate for peroxidase after biotinylated secondary antibody and streptavidin-peroxidase conjugated were reacted to the sections.

カラムクロマトグラフィーにより EGSF の精製を行った結果、精製度 76,500 倍の精製標品が得られた。SDS-PAGE 分析により、本標品には 55 及び 63 kDa の 2 本のタンパク質バンドを認めたが、得られた標品は 630 ng と微量であり、また、Concanavalin A (Con A) Sepharose カラムによるさらなる精製では活性が消失したため、これ以上の精製は不可能であった。EGSF は Superdex 200HR カラムにより 65 kDa 付近に溶出されたため、本標品に含まれる 2 種

類のタンパクのうちどちらか一方が真の EGSF であると推察された。本標品には、エンドトキシン活性は認められず、 α -chymotrypsin や Proteinase K といったタンパク質分解酵素処理や 56°C、30 分の熱処理により失活することから、タンパク性因子であることが示唆された。また、ホウ酸錯体を形成して糖と特異的に結合する Matrex PBA-30 カラムにおいて EGSF はカラム中に保持され sorbitol により溶出したことから、本因子は糖鎖を有することが示唆された。

M ϕ から産生され、血管内皮細胞増殖抑制活性を示す因子として IL-1 α 、IL-6、TNF- α 及び TGF- β が知られており、また、最近の報告によれば PF4 も血管内皮細胞に対して同様の増殖抑制活性を有することが報告されている³⁸⁾。そこで、IL-1 α 、TNF- α 、TGF- β 及び PF4 の抗体を用いて EGSF の活性阻害を検討した結果、EGSF はいずれの抗体でも増殖抑制活性は中和されなかった。すなわち、EGSF はこれらのサイトカインとは異なることが明らかとなった。

EGSF の増殖抑制活性は可逆的ではあるが、血管内皮細胞に対して作用時間が長いほど障害作用が認められた。EGSF は BAE ばかりではなく HUVEC 及び HMVEC に対しても増殖抑制活性を示したが、その活性の程度は BAE に対して最も強く、順に HMVEC、HUVEC であった。EGSF の血管内皮細胞に対する作用程度の違いは、恐らく血管内皮細胞の由来の相違によることが考えられた。しかしながら、今までに報告されている血管内皮細胞増殖抑制因子である Oncostatin M (OSM)、TGF- β 、TNF- α 、angiostatin 及び PF4 の最大増殖抑制活性の 50% を示す時の濃度は、それぞれ 0.2 ng/mL³⁹⁾、1 ng/mL⁴⁰⁾、3 ng/mL⁴⁰⁾、300 ng/mL³⁸⁾ 及び 2 μ g/mL⁴¹⁾ であることから、EGSF は強力な血管内皮細胞増殖抑制因子の 1 つであることが明らかとなった。また、EGSF は S-180、L929、U937、MM46 及び YAC-1 の増殖には何ら影響を及ぼさなかったことより、EGSF は血管内皮細胞に特異的に作用するものと考えられた。

白血球は走化性因子の濃度勾配に沿って移動し、障害及び炎症部位に集積することが知られている。また、白血球の運動には、方向性を持たずに無秩序に動き回る運動 (chemokinesis) と走化性因子の濃度勾配を認識して方向性を持って移動する動き (chemotaxis) とが考えられている⁴²⁾。今回、好中球、M ϕ 及び T リンパ球の遊走能に及ぼす EGSF の影響を検討したところ、EGSF は T リンパ球に対してはほとんど遊走活性を認めないが、好中球及び M ϕ に対しては顕著な遊走活性を示した。また、好中球を用いた checkerboard assay により、EGSF による好中球の遊走は chemotaxis であることが示された。

好中球が血管外へ遊走するためには好中球と内皮細胞間の相互作用が必須である。通常、好中球は血管内壁上をローリングしているが、種々の炎症刺激により内皮細胞に接着して間隙を透過することにより血管外に浸潤する

と考えられている^{43,44)}。本研究において、EGSFは血管内皮細胞への好中球の接着能及び内皮細胞間隙の透過能を増大させたことから、本因子が血管内皮細胞に作用して内皮細胞に対する好中球の接着性を高め、更には、内皮細胞間隙の開裂に伴い、好中球の透過を亢進して好中球の血管外遊走を促進するものと推察された。

Mφの腫瘍細胞傷害機構については現在までに多くの報告がなされており、抗腫瘍作用のエフェクター分子としては、TNF-α、IL-1α、活性酸素及び細胞傷害性プロテアーゼなどが知られている^{45,46)}。近年、Mφの抗腫瘍活性発現の際にL-Arg依存性機構によって腫瘍細胞のアコニダーゼとミトコンドリアの呼吸鎖が破壊されることが見出され^{47,48)}、このエフェクター分子が当初血管内皮細胞由来血管弛緩因子として同定されたNOラジカルであることが判明した^{49,50)}。さらに、NOは基質のL-Arg及びFAD、FMN、NADPH、tetrahydrobiopterin 4 (BH4)などの補酵素存在下⁵¹⁾にNO合成酵素(NOS)を介して、血管内皮細胞のみならずMφ、肝実質細胞や神経細胞など多様な細胞により産生されることが明らかになった⁵²⁾。一方、NOSには神経型(nNOS)、血管内皮型(eNOS)及び誘導型(iNOS)の3種のisoformの存在が現在までに知られており⁵³⁾、MφにおいてはiNOSのみが存在しNO産生を制御していることが報告されている⁵⁴⁾。ここではEGSFはMφからのNO産生を顕著に誘導したことから、EGSFによりMφ内iNOSレベルが上昇してNO産生が増大することが推測された。

次に、抗腫瘍グルカンCMCD存在下のP388D1培養上清からEGSFとTRFを共精製した。精製標品のSuperdex 200HRカラムクロマトグラフィーにおいて血管内皮細胞増殖抑制活性と腫瘍退縮活性のピークは分子量約65 kDa付近に一致して溶出したことから、EGSFは血管内皮細胞増殖抑制活性ばかりでなく腫瘍退縮活性も示すことが明らかとなった。国元らはTRFを部分精製し、その分子量は約250 kDaで糖鎖を含まないことを報告している²⁰⁾。しかし、今回得られたEGSFは分子量約65 kDaで、糖鎖中の水酸基と錯体結合を形成するPBA-30に保持され、sorbitolにて溶出されることから、国元らの報告しているTRFと本因子とは異なることが示唆された¹⁸⁾。

一次腫瘍及び悪性の二次腫瘍が2-3 mm³以上に成長するために、腫瘍血管新生が必須とされている²²⁾。従って、これらの腫瘍細胞の増殖を抑制するには腫瘍血管新生を阻害することが効果的である⁵⁵⁾。EGSFは血管内皮細胞増殖を抑制するばかりでなく、in vitroでの管腔形成能をも阻害すること、また一度形成された管腔構造はEGSFにより崩壊すること、更に、抗human vWF抗体を用いた免疫組織化学的検討により、EGSFにより腫瘍塊中に出血傾向が認められ、腫瘍組織中の一部の腫瘍細胞が消失することが観察された。これらの結果から、EGSFによる腫瘍血管新生の阻害が腫瘍退縮のメカニズムの一つであり、EGSF

は強力な抗腫瘍性因子になりうることが推察された。Boehmら⁵⁶⁾は、血管新生阻害物質エンドスタチンが薬剤耐性を誘導しないことから、非常に有効な抗癌剤であることを示唆している。EGSFは分子量の点でアンジオスタチンやエンドスタチンとは異なる因子であることが考えられたが、これらの因子の抗血管新生活性が癌治療につながる点で共通していると思われる。

抗腫瘍多糖による抗腫瘍作用は一般的にMφ、ナチュラルキラー細胞やキラーT細胞の傷害性の亢進だけでなく、IL-1やCSFなどといった抗腫瘍性サイトカインの分泌促進によっても発現することが知られている。著者は、抗腫瘍多糖の作用機序として抗腫瘍グルカンにより誘導されるEGSFが腫瘍組織中において血管新生の抑制及び腫瘍細胞の出血性壊死を引き起こし、腫瘍を退縮させることを明らかにした。

結 論

以上の成績より、EGSFは抗腫瘍多糖存在下、Mφから血清中に分泌される糖タンパク性因子であり、抗腫瘍多糖による腫瘍退縮機構の一端を担う重要な因子であることが強く示唆された。Mφから主に産生されるEGSFは血管内皮細胞の増殖を抑制するばかりでなく、好中球及びMφの遊走能を亢進することが明らかとなった。また、EGSFはTリンパ球の遊走及び増殖能には何ら影響を与えないが、好中球の血管内皮細胞に対する接着と透過及びMφからのNO産生をそれぞれ促進することから、EGSFは好中球の血管外への浸潤とMφのNOを介した腫瘍傷害機構に対する調節因子の一つであることが推察された。これらのことから、CMCDの刺激によりMφから産生されるEGSFは、好中球やMφといった免疫細胞のいくつかの機能を亢進するだけでなく、腫瘍組織の退縮にも重要な役割を果たしており、EGSFの更なる解明が今後の癌研究の一助となるだけでなく新たな癌治療薬の開発につながることを期待される。

引用文献

- 1) Ausprunk D. H., Knighton D. R., and Folkman J. *Am. J. Pathol.*, **79**, 597-610 (1975)
- 2) Folkman J. and Haudenschild C. *Nature (London)*, **288**, 551-556 (1980)
- 3) Folkman J. *Ann. Intern. Med.*, **82**, 96-100 (1975)
- 4) Frater-Schroder M., Risau W., Hallmann R., Gautschi P., and Bohren P., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 5277-5281 (1987)
- 5) Cozzolino F., Torcia M., Aldinucci D., Ziche M., Almerigogna F., Bani D., and Stern D. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 6487-6491 (1990)
- 6) Sato Y. and Rifkin D. B., *J. Cell Biol.*, **109**, 309-315 (1989)

- 7) Tabata T., Ito W., Kojima T., Kawabata S., and Misaki A. *Carbohydr. Res.*, **89**, 121-135 (1981)
- 8) Chihara G., Maeda Y., Hamura J., Sasaki T., and Fukuoka F. *Nature (London)*, **222**, 687-688 (1969)
- 9) Johnson J., Kirkwood S., Misaki A., Nelsom T. E., Scarletti J. V., and Smith F. *Chem. Ind. (London)*, 820-822 (1963)
- 10) Taguchi T., Furue H., Kimura T., Kondo T., Hattori T., Itoh I., and Ogawa N. *Gan To Kagaku Ryoho*, **12**, 366-378 (1985)
- 11) Okamura K., Suzuki M., Chihara T., Fujikawa A., Fukuda T., Goto S., Ichinohe K., Jimi S., Kasamatsu T., Kawai N., Mizoguchi K., Mori T., Nakano H., Noda K., Sekiba K., Suzuki K., Suzuki T., Takahashi K., Takeuchi K., Takeuchi S., Yajima A., and Ogawa N. *Biotherapy*, **1**, 103-107 (1989)
- 12) Sasaki T., Abiko N., Nitta K., Takasaka N., and Sugino Y. *Eur. J. Cancer*, **15**, 211-215 (1979)
- 13) Usui S., Murashima K., Sakai M., Kiho T., and Ukai S. *Biol. Pharm. Bull.*, **17**, 1165-1170 (1994)
- 14) Bogwald J. and Seljelid R. *Carbohydr. Res.*, **148**, 101-107 (1986)
- 15) Maeda Y. and Chihara G. *Int. J. Cancer*, **11**, 153-161 (1973)
- 16) Suzuki I., Itani T., Ohno N., Oikawa S., Sato K., Miyazaki T., and Yadomae T. *J. Pharmacobio-Dyn.*, **8**, 217-226 (1985)
- 17) Akiyama Y. and Hamuro J. *Tanpakushitsu Kakusan Koso*, **26**, 207-224 (1981)
- 18) Kunimoto T., Baba H., and Nitta K., *J. Biol. Resp. Modif.*, **5**, 160-167 (1986)
- 19) Baba H., Kunimoto T., and Nitta K., *Int. J. Immunopharmac.*, **8**, 569-572 (1986)
- 20) Kunimoto T., Baba H., and Nitta K., *J. Biol. Resp. Modif.*, **5**, 225-235 (1986)
- 21) Kunimoto T., Baba H., and Nitta K., "New Cytokines," ed. by Imanishi J., Kinpoudou, Kyoto, pp. 65-82 (1990)
- 22) Folkman J. *J. Natl. Cancer Inst.*, **82**, 4-6 (1990)
- 23) Yoshida I., Kiho T., Usui S., Sakushima M., and Ukai S. *Biol. Pharm. Bull.*, **19**, 114-121 (1996)
- 24) Watt S. M., Burgess A. W., and Metcalf D. *J. Cell Physiol.*, **100**, 1-22 (1979)
- 25) Julius M. H., Simpson E., and Herzenberg L. A. *Eur. J. Immunol.*, **3**, 645-649 (1973)
- 26) Ishiyama M., Shiga M., Sasamoto K., Mizoguchi M., and He P. -G. *Chem. Pharm. Bull.*, **41**, 1118-1122 (1993)
- 27) Gratzner H. G. *Science*, **218**, 474-475 (1982)
- 28) Laemmli U. K. *Nature*, **227**, 680-685 (1970)
- 29) Boyden S. *J. Exp. Med.*, **115**, 453-466 (1962)
- 30) Zigmund S. H. and Hirsch J. G. *J. Exp. Med.*, **137**, 387-410 (1973)
- 31) Watanabe M., Yagi M., Omata M., Hirasawa N., Mue S., Tsurufuji S., and Ohuchi K. *Br. J. Pharmacol.*, **102**, 239-245 (1991)
- 32) Montesano R., Orei L., and Vassalli P. *J. Cell Biol.*, **97**, 1648-1652 (1983)
- 33) Lomedico P.T., Gubler U., Hellmann C. P., Dukovich M., Giri J. G., Pan Y. E., Collier K., Semionow R., Chua A. O., and Mizel S. B., *Nature*, **312**, 458-462 (1984)
- 34) Aggarwal B. B., Kohr W. J., Hass P. E., Moffa B. t, Spencer S. A., Henzel W. J., Bringman T. S., Nedwin G. E., Goeddel D. V., and Harkins R. N. *J. Biol. Chem.*, **260**, 2345-2354 (1985)
- 35) Moses H. L., Branum E. L., Proper J. A., and Robinson R. A. *Cancer Res.*, **41**, 2842-2848 (1981)
- 36) Roberts A. B., Anzano M. A., Lamb L. C., Smith J. M., and Sporn M. B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 5339-5343 (1981)
- 37) Freer R. J., Day A. R., Radding J. A., Schiffmann E., Aswanikumar S., Showell H. J., and Becker E. L. *Biochemistry*, **19**, 2404-2410 (1980)
- 38) O'Reilly M. S., Holmgren L., Shing Y., Chen C., Rosenthal R. A., Moses M., Lane W. S., Cao Y., Sage E. H., and Folkman J. *Cell*, **79**, 315-328 (1994)
- 39) Takashima S. and Klagsbrun M. *J. Biol. Chem.*, **271**, 24901-24906 (1996)
- 40) Schweigerer L., Malerstein B., and Gospodarowics Z. D. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **143**, 997-1004 (1987)
- 41) Gupta S. K. and Singh J. P. *J. Cell Biol.*, **127**, 1121-1127 (1994)
- 42) Zigmund S. H. *J. Cell Biol.*, **77**, 269-287 (1978)
- 43) Lawrence M. B. and Springer T. A. *Cell*, **65**, 859-873 (1991)
- 44) Butcher E. C. *Cell*, **67**, 1033-1036 (1991)
- 45) Old L. J. *Cancer Res.*, **41**, 361-375 (1981)
- 46) Johnson W. J., Somers S. D., and Adams D. O. "Macrophage Activation", (ed. by Adams D. O. and Hanna M. G.), p127, Plenum Press (1984)
- 47) Palmer R. J., Ashton D. S., and Moncada S. *Nature*, **333**, 664-666 (1988)
- 48) Nathan C. *FASEB J.*, **6**, 3051-3064 (1992)
- 49) Furchgott R. F. and Zawadzki J. V. *Nature*, **288**, 373-376 (1980)
- 50) Parmer R. M. J., Ferrige A. G., and Moncada S. *Nature*, **327**, 524-526 (1987)
- 51) Lyons C. R., Orloff G. J., and Cunningham J. M. *J. Biol. Chem.*, **267**, 6370-6374 (1992)
- 52) Hibbs J. B., Taintor R. R., Vavrin Z., and Rachlin E. M. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **157**, 87-94 (1988)
- 53) Lowenstein C. J. and Snyder S. H. *Cell*, **70**, 705-707 (1992)
- 54) Geller D. A., Nussler A. K., Silvio M. D., Lowenstein C. J., Shapiro R. A., Wang S. C., Simmons R. L., and Billiar T. R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 522-526 (1993)
- 55) Millauer B., Shawver K., Plate K. H., Risau W., and Ullrich A. *Nature (London)*, **367**, 576-579 (1994)
- 56) Boehm T., Folkman J., Browder T., and O'Reilly M. S. *Nature (London)*, **390**, 404-407 (1997)

*本総説は岐阜薬科大学博士論文(甲第72号)の内容を中心にまとめたものである。