The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	担癌・炎症状態におけるマウスシステインプロテアーゼインヒビター／低分子キニノーゲンおよびラットT-キニノーゲンに関する研究
Author(s)	伊藤, 徳夫
Citation	大阪大学, 1992, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3063603
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

担癌・炎症状態におけるマウスシステインプロテアーゼインヒビター／低分子キニノーゲンおよびラットT-キニノーゲンに関する研究

伊 藤 徳 夫

担癌・炎症状態におけるマウスシステインプロテアーゼインヒビター／低分子キニノーゲンおよびラットT-キニノーゲンに関する研究

目次

緒論　研究の背景 1

本論 5

第1章　マウス癌性腹水からのシステインプロテアーゼインヒビターの精製とその生化学的性質 5

1.1　マウス血漿および癌性腹水のパパイン阻害作用 5

1.2　腹水からのシステインプロテアーゼインヒビターの精製 7

1.3　マウスシステインプロテアーゼインヒビターのプロテアーゼに対する阻害スペクトル 10

1.4　小括 12

第2章　マウスシステインプロテアーゼインヒビターはキニノーゲンであった 13

2.1　トリプシン、カリクレインによるマウスシステインプロテアーゼインヒビターからのキニン遊離 13

2.2　マウスシステインプロテアーゼインヒビターの部分アミノ酸配列の決定 16

2.3　小括 19

第3章　担癌状態および炎症におけるマウス血漿mCPI／LMWK量の変動 20

3.1　抗mCPI／LMWK抗体を用いたマウス血漿および癌性腹水のイムノブロット分析 20

3.2　癌細胞移植によるマウス血漿mCPI／LMWKの変動　22

3.3　起炎刺激によるマウス血漿mCPI／LMWKの変動　25

3.4　小括　27

第4章　ラットキニノーゲンの炎症急性期反応に対する免疫担当細胞の関与　28

4.1　アジュバントおよびLPS投与ラットにおけるキニノーゲンの炎症急性期反応　28

4.2　炎症巣浸出細胞は正常ラットにキニノーゲンの炎症急性期反応を再現する　30

4.3　小括　34

第5章　活性化免疫担当細胞による初代培養肝細胞のT-キニノーゲン産生の促進　35

5.1　炎症巣浸出細胞による初代培養肝細胞のT-キニノーゲン産生の促進　35

5.2　*in vitro* で活性化したマクロファージおよびT細胞によるT-キニノーゲン産生の促進　38

5.3　小括　41

第6章　サイトカインによる肝細胞T-キニノーゲン産生の調節　42

6.1　IL-1、IL-6、TNFの、肝細胞T-キニノーゲン産生に対する影響　43

6.2　インターフェロン(IFN)のT-キニノーゲン産生に対する影響　45

6.3　肝細胞T-キニノーゲン産生に対するサイトカイン間相互作用　47

6.4　正常ラットへのサイトカイン投与によるT-キニノーゲンの炎症急性期反応の再現　48

6.5　小括　51

第7章　免疫担当細胞由来のT-キニノーゲン産生促進因子の決定　52

7.1　活性化マクロファージ由来のT-キニノーゲン産生促進因子の決定　52

7.2　活性化T細胞由来のT-キニノーゲン産生促進因子の決定　54

7.3　小括　57

第8章　システインプロテアーゼインヒビターとしてのキニノーゲンの細胞増殖に対する影響　58

8.1　Sarcoma 180細胞、マウス胎児細胞、BALB/c 3T3細胞、SV40-3T3細胞の増殖に対するmCPI／LMWK、T-キニノーゲン、卵白シスタチンの影響　58

8.2　SV40-3T3細胞のDNA、RNA、タンパク質合成に対するmCPI／LMWKの影響　61

8.3　mCPI／LMWKのSV40-3T3細胞の細胞周期上の作用点　63

8.4　小括　67

総括　68

結論　73

謝辞　74

参考文献　75

緒論　研究の背景

キニノーゲン、その構造と機能

キニノーゲンは血圧調節や炎症反応に関与するペプチド、ブラジキニン(Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg)の前駆体タンパク質として同定された。しかしその後の研究によって、キニノーゲンは構造･機能のいずれにおいても多様な側面を持つ多機能タンパク質であるという事実が明らかになりつつある[1]。

哺乳動物のキニノーゲンはすくなくとも血漿中に2種類存在し、その分子量から高分子(HMW)および低分子(LMW)キニノーゲンとよばれる。これらキニノーゲンの構造上の特徴としては、アミノ末端から高分子および低分子キニノーゲンに共通のH鎖とよばれるシスタチン類似構造を持つ領域、ブラジキニン配列を持つ領域、高分子キニノーゲンにのみ存在するフラグメント1･2、そしてカルボキシ末端側に高分子･低分子両キニノーゲンでまったく配列が異なるL鎖とよばれる領域が存在する[1](この分類と、名称はカリクレインによる限定分解によって生じてくるフラグメントにもとづいている)ことが知られている。それぞれの領域は特徴的な機能を有している。H鎖にはシステインプロテアーゼインヒビターであるシスタチンに類似した構造が存在し、キニノーゲンはシステインプロテアーゼインヒビターとしての活性を示す(後述)。ブラジキニン配列を持つ領域はキニノーゲンがキニン前駆体タンパク質として機能するために必要であり、カリクレインなどのキニン遊離酵素によってこの領域からキニンが遊離される。高分子キニノーゲンにのみ存在するフラグメント1･2は、ヒスチジンを多く含み、コラーゲンやガラス表面と親和性を持ちその隣に位置するL鎖と共に血液凝固に関連した機能に関わる領域である。L鎖は高分子キニノーゲンにおいてはプレカリクレインや血液凝固第XII因子との結合能を持ち、これら3者の複合体が凝固の開始反応に重要である。なお、低分子キニノーゲンは高分子キニノーゲンと構造的に異なるL鎖を持っており、その機能については現在まったく知られていない。

T-キニンとT-キニノーゲン

岡本とGreenbaumはラット血漿を十分量のトリプシンで処理することにより、ブラジキニン以外に多量のキニンが遊離されることを認めた[2]。このキニンはT-キニンと命名され、その配列はIle-Ser-ブラジキニンと決定された。T-キニンの前駆タンパク質は、T-キニンのN末端部の配列から考えて従来のキニノーゲンとは異なる分子であると推定された。彼らはこのT-キニン前駆体が高分子･低分子キニノーゲンとは異なる新規のキニノーゲンであることを示し、T-キニノーゲンと命名すると共にこの分子を精製した[3]。T-キニノーゲンは既知の2種のキニノーゲンと比べた場合低分子キニノーゲンとの相同性が高く[4]、システインプロテアーゼインヒビター活性は示すが血液凝固には関係しない。また、従来知られているカリクレインはT-キニノーゲンからキニンを遊離することができないので、T-キニノーゲン特異的なキニン遊離酵素の検索にも興味がもたれる。このT-キニノーゲンの血中濃度は、急性炎症を惹起することによって数倍から十数倍にまで増加することが示された[5]。それまで、炎症時に総キニノーゲンとして測定された血中キニノーゲン濃度が顕著に増加することが報告されていた[6]が、その原因はT-キニノーゲンの増加にもとづくことが明らかにされた。その後、影山らによって、炎症時におけるラット肝臓T-キニノーゲンmRNAレベルの上昇も確認されている[7]。さらに、T-キニンが従来のキニンと同様に血中や炎症巣浸出液中で同定されており[3]、T-キニン・T-キニノーゲンの炎症における役割に興味が持たれる。ただし、このT-キニノーゲンの血中濃度上昇がどのような機構で起きるのか、この現象にはどのような意義があるのかについては不明である。

一方、ヒトにおいては卵巣腫瘍患者の腹水中に多量のT-キニンが存在することがWundererらによって確認された[8]。このヒトでのT-キニン発見はヒトT-キニノーゲンの存在を予想させるが、まだ発見の報告はされていない。ヒトT-キニノーゲンが存在するならば、この症例においては炎症時のラットの場合と同様にその体内濃度が上昇していることが予想される。

システインプロテアーゼインヒビターとしてのキニノーゲン

システインプロテアーゼインヒビターとしてのキニノーゲンに関する研究は、プロテ

アーゼインヒビターの研究グループからはじまった。大久保らは、ヒトα_2-チオールプロテイナーゼインヒビターの構造がヒト低分子キニノーゲンと同一であり、免疫化学的にも両者は区別できないと報告した[9]。システインプロテアーゼインヒビターとしての活性は、他のキニノーゲンでも確認されている[10]。キニノーゲンH鎖にはシステインプロテアーゼインヒビターであるシスタチンに類似した構造が存在し、他のシスタチン類でよく保存されているGln-Val-Val-Ala-Gly配列が存在する[11]。そして、このGln-Val-Val-Ala-Gly配列がインヒビター活性の活性中心と予想される。著者らはこの配列を有するペプチドの誘導体によってシステインプロテアーゼであるパパインやカテプシンBの活性が抑制されること、またキニノーゲンのこれらプロテアーゼに対する阻害作用がこのペプチドの共存によって修飾されることを報告している[12]。

プロテアーゼと炎症、癌

プロテアーゼは、生体反応の様々な過程に関わっている。ペプチドホルモンや機能タンパク質分子の不活性前駆体からの生成、分泌タンパク質シグナルペプチドのプロセッシング、活性型タンパク質分子の不活性化や、不要になったタンパク質の消去など、多種多様である。炎症反応においては、凝固系、線溶系、補体系などのプロテアーゼが複雑に関わっており、好中球･マクロファージ等による異物処理の過程においてもプロテアーゼが中心的役割を演じている。癌の増殖･浸潤･転移に関しても、宿主の組織や細胞外マトリックスの破壊は癌細胞由来のプロテアーゼがその原因であると考えられている[13, 14, 15]。癌に関連したプロテアーゼは、その存在そのものが宿主にとって不都合な場合がほとんどであり、炎症反応においては、過剰なプロテアーゼが組織破壊をひきおこし、治癒を遅らせることは容易に予想できるところである。癌に関連したプロテアーゼとしては、セリンプロテアーゼであるプラスミノーゲンアクチベーター[16]やメタロプロテアーゼであるコラゲナーゼ[17]が、そして最近はシステインプロテアーゼであるカテプシンB[18]やL様の酵素[19, 20, 21]が注目されている。炎症時に遊離されるリソソームプロテアーゼ[22]としては、システインプロテアーゼであるカテプシンB、H、L、セリンプロテアーゼであるカテプシンG、カルボキシプロテアーゼであるカテプシンDなどがある。

癌や炎症に関わるこれらのプロテアーゼの活性調節という視点から見ると、内因性のインヒビターが存在することは非常に重要である。従来、セリンプロテアーゼインヒビターやメタロプロテアーゼインヒビターが注目されてきたが、システインプロテアーゼインヒビターも同一観点から癌や炎症関連のプロテアーゼの制御に重要と考えられる。

本研究の出発点

本研究の出発点は、「癌細胞の増殖・転移や炎症の進行に対してプロテアーゼは促進的に機能しており、それに対抗・調節するための生体防御反応としてプロテアーゼインヒビターが産生される」という仮説にもとづいている。本論文は、上述したような観点からシステインプロテアーゼに対する内因性インヒビターに注目し、マウスシステインプロテアーゼインヒビター／低分子キニノーゲン(mCPI／LMWK)の精製と部分構造の決定、内因性のシステインプロテアーゼインヒビターとしてのキニノーゲンの担癌、炎症時における生体内レベルの変動とその機構、さらにシステインプロテアーゼインヒビターとしてのキニノーゲン濃度上昇の意義について研究したものである。

本論

第1章　マウス癌性腹水からのシステインプロテアーゼインヒビターの精製とその生化学的性質

癌に関連したシステインプロテアーゼとしては、以下のような例が知られている。ヒト乳癌細胞からカテプシンB様のプロテアーゼが高レベルに分泌されており、転移部位においてその活性が高いこと[18, 23]、B16メラノーマ細胞由来の高転移性株B16-F10とその亜株の転移能とカテプシンB活性が相関すること[24]、さらに形質転換した細胞からの主要分泌タンパク質が、カテプシンL様のシステインプロテアーゼであること[19, 20, 25]、等の報告がある。このような例からも、システインプロテアーゼが癌細胞の浸潤・転移・増殖の過程において、重要な役割を演じていると考えられる。

そこで「癌に関連したシステインプロテアーゼ活性の上昇に対する、宿主の対抗措置としてのインヒビターレベルの増加」という仮説にもとづいて、内因性のシステインプロテアーゼインヒビターをマウスで検索した。その結果、癌性腹水にシステインプロテアーゼであるパパインを阻害する活性が高濃度に含まれることを見いだし、この本体の分子を精製すると共にプロテアーゼインヒビターとしての性質を調べた。

1.1　マウス血漿および癌性腹水のパパイン阻害作用

上記の仮説にもとづいて、正常マウス血漿、担癌マウス血漿、および担癌マウス腹水を用いて、システインプロテアーゼであるパパインを阻害する活性を比較した。

1.1.1　実験材料と方法

動物および細胞

ICR系雄性マウス(日本クレア)を6～8週令で用いた。Sarcoma 180細胞(大日本製薬)は実験までICR系マウス腹腔内で継代維持した。

癌細胞の移植と血漿および腹水の採取

Sarcoma 180細胞(1 x 10^7 cells/mouse)をICR系雄性マウス腹腔内に移植した。癌細胞移植1週間後に、眼窩静脈叢より採血し血漿を得た。同時に腹腔から癌細胞を含んだ腹水を得、遠心により細胞成分を除去した。なお、正常マウス血漿も比較のために同様に採取した。

パパイン阻害活性

基質としてα-N-benzoyl-DL-arginine-2-naphthylamide·HCl (Sigma)を用いたBarrettの方法[26]によるパパイン活性測定系に検体を共存させ、一定量のパパインのみが示す活性と比較した。酵素反応は500 μl/tubeの系で行い、検体はシステインによるパパイン(Type III, Sigma)活性化のためのプレインキュベーションの段階から共存させた。なお、システインプロテアーゼインヒビターの 1 unitは、標準測定系において1分当り1 nmolの基質を処理するパパインを阻害する活性と定義した。

有意差検定

有意差検定は、Student's t test により行った。

1.1.2 実験結果および考察

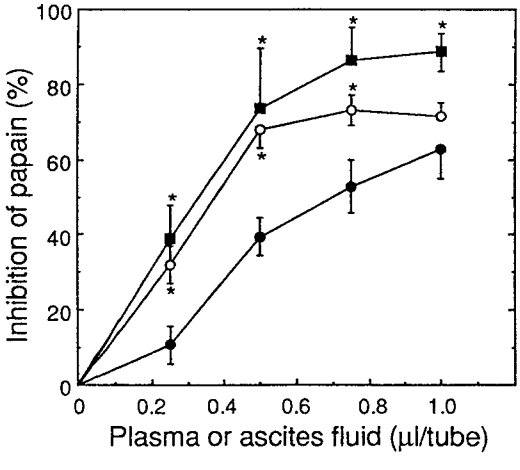


Fig. 1. Papain inhibitory activity of mouse plasma or ascites fluid. Papain activity was assayed using α-N-benzoyl-DL-arginine-2-naphthylamide as the substrate. Plasma (■) and ascites fluid (○) from tumor-bearing mouse or plasma from normal (●) were collected and assayed for its inhibitory activity of papain. Data are expressed as means ± SD of 5 or 6 mice. Significantly different from normal plasma (*, $p < 0.01$).

正常マウス血漿、担癌マウス血漿、および担癌マウス腹水の、パパイン活性に対する用量阻害曲線をFig. 1 に示した。いずれの検体も用量依存的にパパイン活性を阻害した。ただし、その阻害能力には強弱が認められ、正常マウス血漿 2.49 ± 0.32 U/ml、担癌マウス血漿 3.90 ± 0.38 U/ml、および担癌マウス腹水 3.65 ± 0.58 U/ml であった。このように担癌状態のプロテアーゼインヒビターレベルが高値を示したことは、癌に関連したプロテアーゼに対する対抗措置としてのプロテアーゼインヒビターという仮説に矛盾しない結果であった。

1.2 腹水からのシステインプロテアーゼインヒビターの精製

前節において、マウス血漿中にシステインプロテアーゼであるパパインに対する阻害活性を認めた。この阻害活性は、担癌マウス血漿では正常マウスに対して高値を示し、癌性腹水にも担癌マウス血漿に匹敵する阻害活性が認められた。この段階では、この阻害活性の本体がどのような分子であるのか、血中に存在する活性と腹水中の活性が同一の分子に由来するのか、など多くの疑問が生じた。そこでまず、収集が容易であり阻害活性が高濃度に含まれる癌性腹水を原料に、マウスシステインプロテアーゼインヒビターの精製を試みた。

1.2.1 実験材料と方法

S-carboxymethylated papain agaroseの作成

パパインをS-carboxymethyl化し活性中心をブロックしても、システインプロテアーゼインヒビターであるシスタチンとの結合能は保持されており[27]、アフィニティークロマトグラフィーのためのリガンドとして、マウス腹水からのシステインプロテアーゼインヒビターの精製に有用であることが期待された。そこでBarrettの方法[27]にもとづきS-carboxymethylated papainを作成し、これをAffi-Gel 10 (Bio-Rad)とカップリング(100 mg papain/5 ml Affi-Gel 10)した[28]。なお、Affi-Gel 10側の未反応官能基はグリシンでブロックした。

精製操作

癌性腹水は1.1.1に従って採取しこれを原料とした。以下の操作は4℃で行った。腹水(114 ml)を硫酸アンモニウムで分画し、20～60%飽和の分画を回収して0.15 M KClを含む10 mM K–リン酸緩衝液 pH 6.9 に対して透析した。この透析内液を Sephacryl S–200 (Pharmacia)でゲルろ過(0.15 M KCl, 10 mM K–リン酸緩衝液 pH 6.9を使用)した。パパイン阻害活性は、単一ピークとして回収された。活性分画は 10 mM K–リン酸緩衝液 pH 6.9 に対して透析した後、同緩衝液で平衡化したDE–52(Whatman)カラムに添加した。洗浄の後 0～0.3 M KClによる直線濃度勾配で溶出した。インヒビター活性はKCl濃度0.13 Mの位置に単一ピークとして回収された。活性分画を0.5 M KCl を含む10 mM K–リン酸緩衝液 pH 6.9で平衡化したpapain アフィニティーカラムに添加した。0.5 M KCl を含む20 mM K–リン酸緩衝液 pH 6.0で洗浄の後、50 mM Na_3PO_4 pH 12で溶出した。溶出液は直ちに0.2 M K–リン酸緩衝液pH 6.0と混合し中性域に戻した。インヒビター活性を含む分画を回収し、水に対して透析の後凍結乾燥した。

その他

ドデシル硫酸ナトリウム–ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)はゲル濃度7.5%でLaemmliの方法[29]によって行った。泳動終了後、ゲルをクマーシーブリリアントブルーG–250で染色した。

タンパク質濃度の測定はウシγ-グロブリンを標準として用い、Bradfordの方法[30]で行った。

システインプロテアーゼインヒビター活性はパパイン阻害活性として検出し、その測定は1.1.1に従った。

1.2.2 実験結果および考察

精製の結果を Table. 1 にまとめる。マウスシステインプロテアーゼインヒビターを、癌性腹水から4段階の操作で約90倍に精製した。精製したシステインプロテアーゼインヒビターの均一性は、SDS-PAGEで確認した。Fig. 2 に示すように、精製インヒビターは還元条件下分子量67,000の単一バンドを示した。なお、この分子量は非還元条件下で変

化しなかった。精製の最終段階で使用したパパイン固定化アフィニティーカラムにおいて、マウスシステインプロテアーゼインヒビターとパパインの結合は、その解離にpH 12という過酷な条件を必要とするほどに強固な結合であったため、両分子間の結合親和性は非常に高いと考えられた。また、精製過程でパパイン阻害活性を示す分画が複数に分離しなかったことより、今回精製した分子が癌性腹水中に存在するシステインプロテアーゼインヒビターの主要な分子であると考えられた。

Table 1. Purification of cysteine proteinase inhibitor from ascitic fluid of sarcoma 180 tumor-bearing mice

Step	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (unit/mg)	Yield (%)	Purification (fold)
Ascitic fluid (114ml)	8663	445	0.051	100.0	1.0
Ammonium sulfate precipitation	2550	403	0.158	90.6	3.1
Sephacryl S-200	408	244	0.598	54.8	11.7
DE-52	71	113	1.590	25.4	31.2

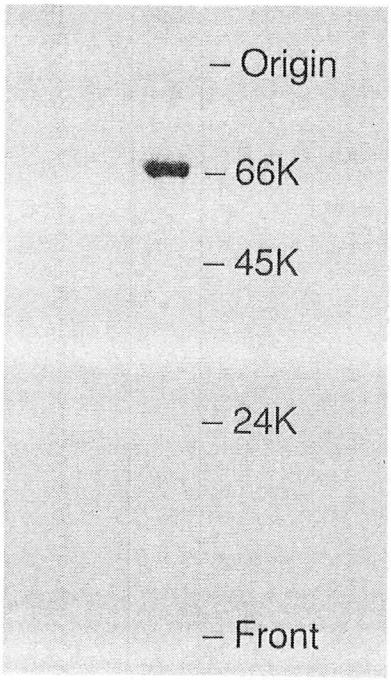


Fig. 2. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis of purified ascites cysteine proteinase inhibitor. Purified ascites cysteine proteinase inhibitor (4 μg/lane) was analyzed by sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis. Gel was stained with Coomassie brilliant blue. Bovine albumin (66K), ovalbumin (45K), and trypsinogen (25K) were used as molecular weight standerds.

1.3 マウスシステインプロテアーゼインヒビターのプロテアーゼに対する阻害スペクトル

癌性腹水から精製したマウスシステインプロテアーゼインヒビターの、種々プロテアーゼに対する阻害について比較した。プロテアーゼとして、システインプロテアーゼであるカテプシンB、L、H、カルボキシプロテアーゼであるカテプシンD、セリンプロテアーゼであるトリプシンを用いた。

1.3.1 実験材料と方法

プロテアーゼ

カテプシンB、L、Hは、BarrettとKirschkeの方法[31]によりラット肝から精製した。カテプシンDはラット肝ライソソーム分画を用いた。パパイン、カテプシンB、 L活性の測定は、基質としてZ-Phe-Arg-NMec(ペプチド研究所)を用いてBarrettとKirschkeの方法[31]により行った。カテプシンH活性の測定は、基質としてL-Leucine-2-naphthylamideを用いてBarrettと Kirschkeの方法[31]により行った。カテプシンD活性の測定は、基質として酸変性hemoglobinを用いてTakahashiとTangの方法[32]により行った。

各プロテアーゼに対するマウスシステインプロテアーゼインヒビターの*K*i値の算出

各プロテアーゼに対するマウスシステインプロテアーゼインヒビターの*K*i値は、Henderson プロット[33]により求めた。

1.3.2 実験結果および考察

種々のプロテアーゼに対するマウスシステインプロテアーゼインヒビターの*K*i値をTable 2 に示した。マウスシステインプロテアーゼインヒビターは、パパイン、カテプシンB、Lといったシステインプロテアーゼの活性に対して阻害作用を示した。システインプロテアーゼの中でも、カテプシンHに対する阻害は認められなかった。他のクラスの

プロテアーゼに対しては、まったく阻害を示さなかった。阻害するプロテアーゼに対する特異性から、このインヒビターがシステインプロテアーゼインヒビターであることを確認した。前節において、精製の最終段階で使用したパパイン固定化アフィニティーカラムからマウスシステインプロテアーゼインヒビターを溶出させるために、pH 12という過酷な条件を必要とした。本実験の結果による*Ki*値も低値であり、システインプロテアーゼに対する親和性は非常に強いと考える。

Table 2. Inhibitory effects of ascites cysteine proteinase inhibitor on various proteinases

Proteinase	*K*i (nM)
Papain	0.47
Cathepsin L (rat liver)	2.8
Cathepsin B (rat liver)	390
Cathepsin H (rat liver)	>2000
Cathepsin D (rat liver)	>2000
Trypsin	>2000

1.4 小括

「癌に関連したシステインプロテアーゼ活性の上昇に対する、宿主の対抗措置としてのシテインプロテアーゼインヒビターレベルの増加」という仮説にもとづいて、正常マウス血漿、担癌マウス血漿および担癌マウス腹水を用いて、システインプロテアーゼであるパパインを阻害する活性を検索、比較した。その結果、マウス血漿中にパパイン阻害活性を認めた。この阻害活性は担癌マウス血漿では正常マウスに対して高値を示し、癌性腹水にも担癌マウス血漿に匹敵する阻害活性が認められた。当初の仮説に矛盾しない非常に興味ある結果が得られた。そこで、この阻害活性の本体の分子について詳細に検討するために、収集が容易であり阻害活性が高濃度に含まれる癌性腹水を原料にマウスシステインプロテアーゼインヒビターの精製を試みた。その結果、マウスシステインプロテアーゼインヒビターを癌性腹水から4段階の操作で完全精製した。その分子量はSDS-PAGEにおいて67,000であった。精製したインヒビター分子のプロテアーゼインヒビターとしての性質について調べたところ、このインヒビターはパパイン、カテプシンB、Lといったシステインプロテアーゼの活性に対して阻害作用を示し、その*Ki* 値は低値であった。他のクラスのプロテアーゼに対しては阻害を示さなかったことから、本インヒビターがシステインプロテアーゼインヒビターであることを確認した。

第2章　マウスシステインプロテアーゼインヒビターはキニノーゲンであった

緒論でも述べたように、キニノーゲンにはシステインプロテアーゼインヒビターとしての性質があり、体液中から見いだされたシステインプロテアーゼインヒビターの場合には、それがキニノーゲンである可能性が十分想定できる。マウスにおいては従来どのタイプのキニノーゲンも単離されておらず、もしも著者の精製したマウスシステインプロテアーゼインヒビターがある種のキニノーゲンであるならば、キニノーゲンとしての性質を調べることにも価値があると考えた。本章では、マウスシステインプロテアーゼインヒビターがキニノーゲンであることを示し、その性質について述べる。

2.1　トリプシン、カリクレインによるマウスシステインプロテアーゼインヒビターからのキニン遊離

マウスシステインプロテアーゼインヒビターがキニノーゲンであるか否かを明らかにするために、トリプシン、カリクレイン等のキニン遊離酵素処理を行い、遊離キニンの測定を試みると共に、どのようなキニン分子であるかをクロマトグラフィー的に同定した。

2.1.1　実験材料と方法

キニン遊離酵素

トリプシン(TPCK treated, Sigma)、マウス顎下腺カリクレイン(Angelettiらの方法[34]に準じて精製)、ラット顎下腺カリクレイン(国立循環器病センター研究所、加藤博士より供与)、ブタ膵臓カリクレイン(Sigma)を用いた。

キニンの定量

^{125}I-[Tyr^{1}]-カリジンと抗ブラジキニン抗血清の組み合せによるキニンのラジオイムノアッセイ[5]によって定量した。

キニン遊離反応

精製マウスシステインプロテアーゼインヒビター1 mgを100 mMトリス塩酸pH 8.0中で種々のキニン遊離酵素と37℃で1時間反応した。反応後、沸騰水浴中で3分間加熱することによって酵素を失活させた。

キニンの同定

マウスシステインプロテアーゼインヒビターを、キニン遊離酵素と反応後(37℃、30分、酵素基質比1:50)、遊離したキニンを逆相HPLCで分画した。HPLCはTSK LS410(東洋ソーダ)を用い、0.1%トリフルオロ酢酸存在下、21%アセトニトリルを移動相として用いた。

2.1.2 実験結果および考察

トリプシンおよび種々のカリクレイン処理による、マウスシステインプロテアーゼインヒビターからのキニン遊離の結果をTable 3に示した。マウスシステインプロテアーゼインヒビターは、トリプシンおよびマウス顎下腺カリクレインによってキニンを遊離した。しかしラットおよびブタのカリクレインンイによってはまったくキニン遊離を認めなかった。同種カリクレインでのみキニンを遊離するという厳密な種特異的カリクレイン感受性が認められた。遊離したキニン量は、基質として用いたマウスシステインプロテアーゼインヒビターに対してmol比で比較する時、トリプシン処理の場合で0.9、マウス顎下腺カリクレイン処理の場合で0.86であった。従って、精製したマウスシステインプロテアーゼインヒビター1分子が、その分子内に1分子のキニンを含有していること、すなわちキニノーゲンであることが明らかとなった。

Table 3. Kinin liberation from purified ascites cysteine proteinase inhibitor by treatment with trypsin and kallikrein

Kininogenase (μg/ml)	Kinin liberation[a] (μg BK equiv./mg)
Trypsin (100)	14.2
Mouse submandibular gland kallikrein (25)	13.5
Rat submandibular gland kallikrein (25)	ND[b]
Porcine pancreatic kallikrein (25)	ND

[a]Amount of kinin liberated was expressed as μg bradykinin equivalent per mg of purified inhibitor.
[b]Not detected.

遊離するキニンを同定するために行ったHPLCによる分析結果を、Fig. 3に示した。マウスシステインプロテアーゼインヒビターからマウスカリクレイン処理によって遊離されるキニンはブラジキニンと同定された。T-キニンはまったく検出されなかった。CM-23によるクロマトグラフィーによっても、同様の結果を得ている。

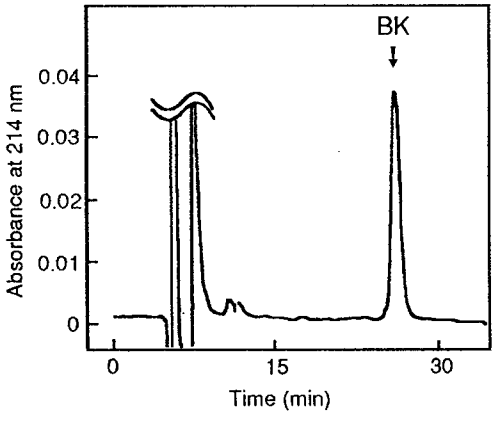


Fig. 3. Identification of the kinin liberated from ascites cysteine proteinase inhibitor. Mouse ascites cysteine proteinase inhibitor was incubated with mouse submandibular gland kallikrein (enzyme substrate weight ratio = 1/50) at 37℃ for 30 min, and the sample was analyzed by reversed-phase HPLC column (TSK LS 410). The elution was performed isocratically using 23% acetonitrile, 0.1% trifluoroacetic acid. BK, bradykinin.

2.2 マウスシステインプロテアーゼインヒビターの部分アミノ酸配列の決定

前節においてマウスシステインプロテアーゼインヒビターがキニノーゲンであることが明らかとなった。またカリクレイン感受性に強い種特異性が認められた。そこで、キニノーゲンとしての構造上の特徴を明らかにするために、部分アミノ酸配列を決定し既知の他のキニノーゲンと比較した。

2.2.1 実験材料と方法

限定分解とペプチド断片の分離

マウスシステインプロテアーゼインヒビター 5.4 mgを変性還元S-ピリジルエチル化し、室温70%ギ酸中で12時間臭化シアン分解を行った。生じた臭化シアン断片は、Vydac C-4カラム(バイオラック)を用いて0.1%トリフルオロ酢酸存在下、0～50%のアセトニトリルの直線濃度勾配で分離した。キニン含有断片は、各ピークのトリプシン処理によるキニン遊離の有無で判別した。キニン含有断片は、さらにサーモリシン(ナカライテスク)を用いて切断した。生じた断片は、Cosmosil 3C18 カラム(ナカライテスク)を用いて0.1%トリフルオロ酢酸存在下、0～50%のアセトニトリルの直線濃度勾配で分離した。

アミノ酸配列の決定

マウスシステインプロテアーゼインヒビターそのもの、臭化シアン切断後のキニン含有断片、キニン含有断片のサーモリシン分解物について、それぞれ気相シークエンサー(470A, アプライドバイオシステムス)を用いて配列を決定した。

2.2.2 実験結果および考察

切断前のマウスシステインプロテアーゼインヒビターそのものについては、アミノ末端の40残基分(第38位を除く)の部分配列(Fig. 4A)が、臭化シアン切断後のキニン含有断片

については54残基分の全配列(Fig. 4B)が決定できた。

A

```
                1         10        20        30        40
                |         |         |         |         |
mouse CPI       EE-AQEIDCNDEAVFQAVDFSLKQFNPGVKSGNQYMLHXVI
rat K          QEEDAQEMDCNDESLFQAVDTALKKYNAGLKSGNQFVLYQVT
rat T I        QEEGAQELNCNDETVFQAVDTALKKYNAELESGNQFVLYRVT
bovine K       QES-SQEIDCNDQDVFKAVDAALTKYNSENKSGNQFVLYRIT
human K        QESQSEEIDCNDKDLFKAVDAALKKYNSQNQSNNQFVLYRIT
```

B

```
                1       10        20        30        40        50
                |       |         |         |         |         |
mouse CPI       MARRPPGFSPFRSVIVWETKEGRTRLLRACEYKGRLSKAGAEPAPERQAESSQVK
rat LMWK        VIRRPPGFSPFRAPRVKKPKESTTRLLNSCEYKGRLLKAGAGPAPERQAEASTVTP
rat T I         MISRPPGFSPFRLVRVQETKEGTTRLLNSCEYKGRLSKARAGPAPDHQAEASTVTS
rat T II        MISRPPGFSPFRLVQVQETKEGTTRLLNSCEYKGRLSKAGAGPAPDHQAEASTVTP
bovine LMWK     LNKRPPGFSPERSVQVMKTEGSTTTHVKSCEYKGRPQEAGAEPAPQGEVSLPAESPQLAR
human LMWK      LMKRPPGFSPFRSSRIGEIKEETTSHLRSCEYKGRPPKAGAEPASEREVS
```

Fig. 4. Sequence comparison of the NH_2– (A) and COOH– terminal (B) portions of mouse cysteine proteinase inhibitor with those of other kininogens. A, the sequence of the NH_2–terminal portion of mouse cysteine proteinase inhibitor is compared with those of bovine [7], human [35], and rat kininogens [4]. **B**, the sequence of the COOH– terminal portion of mouse cysteine proteinase inhibitor is compared with the light chain portion of bovine [7], human [35], and rat kininogens [4]. The residues shared by all sequences are shaded.

結果は、既知の他のキニノーゲンの対応する配列と比較して示した。各キニノーゲンの間で保存されているアミノ酸を網掛けで示している。アミノ末端ドメインは、他のキニノーゲンではシステインプロテアーゼインヒビターであるシスタチンとの類似性からシスタチン様ドメインと呼ばれている。この領域の一部に相当するアミノ末端の40残基分について、ラットK–キニノーゲン(T–キニノーゲンに比較して従来のキニノーゲンはこのようによばれる)、T I–キニノーゲン(T–キニノーゲンには数個のアミノ酸残基が異なるだけの2つのタイプが知られている)、ウシおよびヒトK–キニノーゲンと比較すると、これらキニノーゲン間で保存されている配列はマウスシステインプロテアーゼインヒビターにおいてもよく保存されており、 例えば、ラットT I–キニノーゲンの配列との間に67%の一致が認められた。

臭化シアン切断後のキニン含有断片についても他のキニノーゲンと類似しており、ラット低分子キニノーゲンの配列との間に、69%の一致が認められた。この臭化シアン切断後のキニン含有断片は、そのカルボキシ末端アミノ酸がMetでないこと、および既知の他のキニノーゲンの配列との比較から、カルボキシ末端までのL鎖の全構造を含むと考えられた。ブラジキニン配列のアミノ末端側の構造に注目すると、その配列はMet-Ala-Arg-ブラジキニンとなっており、ラット低分子キニノーゲンがVal-Ile-Arg-ブラジキニンであることから、カリクレイン切断点のアミノ末端側残基はどちらもArgである。従って、前節において見いだしたマウスキニノーゲンとマウスカリクレインの間の厳密な種特異的関係は、Arg-X配列の認識だけでなく、Argの上流の配列がマウスカリクレインによる限定分解時に認識されていることにもとづくと考えられた。キニンのカルボキシ末端側に続くL鎖に相当する配列は、既知の低分子キニノーゲンと高い類似性を示し、高分子キニノーゲンに特徴的な配列を認めなかった。マウスシステインプロテアーゼインヒビターは、構造上から低分子キニノーゲンとしての特徴を持つと結論された。

2.3　小括

マウス癌性腹水から精製したシステインプロテアーゼインヒビターが、キニノーゲンとして分類されるタンパク質である可能性について検討した。マウスシステインプロテアーゼインヒビターは、トリプシンやマウスカリクレイン処理によってブラジキニンを遊離した。化学量論的にその割合は、インヒビター1分子からキニン1分子と計算された。従ってキニノーゲンであることが明らかとなった。部分アミノ酸配列を解析したところ、アミノ末端の40残基、キニン部分を含みカルボキシ末端までの54残基の1次構造が判明した。マウスシステインプロテアーゼインヒビターは1次構造上でもキニノーゲンの特徴を示し、既知の他の動物種の低分子キニノーゲンおよびラットT-キニノーゲンに類似していた。高分子キニノーゲンに特徴的な構造は認められなかった。分子量が67,000であること、さらに高分子キニノーゲン様凝固因子活性(高分子キニノーゲン欠損血漿の凝固時間遅延を回復する活性)を持たないことなど、分子量、構造、活性、から判断して、マウス低分子キニノーゲンであると結論した。以後、この分子をマウスシステインプロテアーゼインヒビター／低分子キニノーゲン(mCPI／LMWK)と称する。

ではmCPI／LMWKは、癌の進行にともなってそれ自身の生体内濃度が変化するのであろうか。プロテアーゼインヒビターレベルが上昇することにどのような意義があるのであろうか。第一の疑問については次章で検討し、第二の疑問については第9章で考察する。

第3章　担癌状態および炎症におけるマウス血漿mCPI／LMWK量の変動

第一章で示したように、Sarcoma 180 癌細胞を移植したマウスの血漿中および腹水中のシステインプロテアーゼインヒビター活性は、正常マウス血漿中のそれに比較して有意に上昇していた。血中のインヒビター活性と腹水中のインヒビター活性は、同一の分子(mCPI／LMWK)で説明できるのであろうか。mCPI／LMWKは、癌の進行にともなってそれ自身のタンパク質濃度が変化するのであろうか。また、ラットT-キニノーゲンと同じように(後述)、炎症時にもその生体内濃度が変化するのであろうか。これらの疑問点を明らかにするため、mCPI／LMWKに対する抗体を作成し、イムノブロット分析によって腹水中分子と血漿中分子を比較した。さらにラジオイムノアッセイ系を作成し、この系を用いて癌細胞移植マウス、あるいは起炎刺激を与えたマウスの、血漿中mCPI／LMWK濃度を測定した。

3.1　抗mCPI／LMWK抗体を用いたマウス血漿および癌性腹水のイムノブロット分析

mCPI／LMWKに対する抗体をウサギで作成し、イムノブロットによって正常マウス血漿、担癌マウス血漿、担癌マウス腹水につて分析した。

3.1.1　実験材料と方法

抗mCPI／LMWK抗体の作成

免疫動物としてはウサギ（日本白色種; 清水実験材料）を用いた。 mCPI／LMWKをFreundの完全アジュバント(ナカライテスク)と初回免疫の後、2週間後に完全アジュバントと共に追加免疫した。さらに2～3週間間隔でFreundの不完全アジュバント(ナカライテスク)と共に2回の追加免疫を行った。最終免疫1週間後、十分な抗体価の上昇を確認の後、耳静脈および頚動脈より全採血を行い抗血清を得た。

イムノブロット

正常ICR系マウスから得た血漿、sarcoma 180 癌細胞をICR系マウスに移植して10日後の腹水と血漿、および精製mCPI／LMWKについて分析した。血漿および腹水は200 nl/レーン、精製マウスシステインプロテアーゼインヒビターは 40 ng/レーンを、第1章に述べたようにSDS-PAGEを行った。電気泳動後のゲルはエレクトロブロット法[36]によりニトロセルロースフィルター(ザルトリウス)に転写した。このフィルター上の抗原を、ウサギ抗mCPI／LMWK抗体、パーオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギイムノグロブリン(Bio-Rad)、4-クロロ-2-ナフトールを用いて、酵素免疫化学的に検出[37]した。

3.1.2 実験結果および考察

イムノブロット分析の結果、正常マウス血漿、担癌マウス血漿、担癌マウス腹水のいずれにおいても、精製mCPI／LMWKと区別できない分子量67,000のバンドが明瞭に認められた(Fig. 5)。従って、mCPI／LMWKは同一の分子が血漿と腹水中に存在し、バンドの濃淡による量的な関係もインヒビター活性の強弱に一致していた。担癌マウスの血漿と腹水については、67,000のバンド以外に2ないし3本の非常にマイナーなバンドが認められた。この担癌状態で新たに出現するマイナーなバンドが本来の抗原の分子修飾によって生ずるのか、あるいは類似の抗原性を持つ別の分子の出現に由来するのかは不明である。

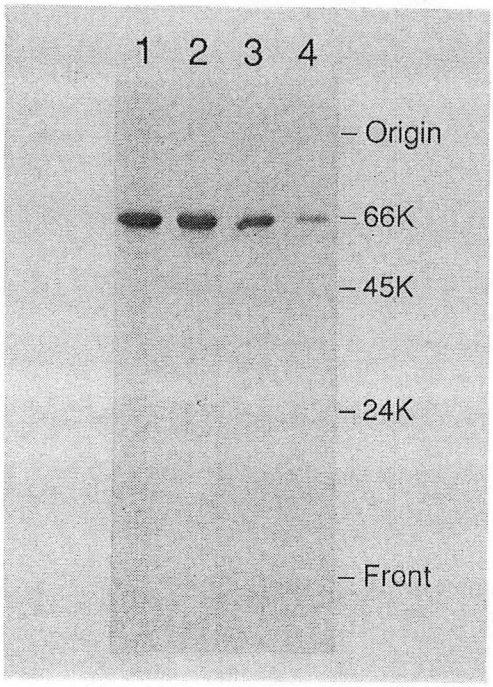


Fig. 5. Immunoblot analysis of mCPI／LMWK in plasma and ascites fluid. Plasma and ascitic fluid were collected and subjected to sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis, blotted onto nitrocellulose filter. Immunochemical detection was carried out using rabbit-anti-mCPI/LMWK as described in text. Lane 1, ascites fluid of Sarcoma 180 tumor–bearing mouse (200 nl); Lane 2, plasma of Sarcoma 180 tumor–bearing mouse (200 nl); Lane 3, plasma of normal mouse (200 nl); Lane 4, purified ascites mCPI／LMWK (40 ng).

3.2 癌細胞移植によるマウス血漿mCPI／LMWKの変動

前節において、腹水システインプロテアーゼインヒビターと同一の分子が血中にも存在することを明らかにしたので、mCPI／LMWKを直接測定可能なラジオイムノアッセイ系を作成し、sarcoma 180あるいはLewis lung carcinoma cell(3LL)を移植したマウスについて、血漿中mCPI／LMWK濃度を経時的に測定した。

3.2.1 実験材料と方法

mCPI／LMWKのラジオイムノアッセイ

mCPI／LMWKのラジオイムノアッセイ系は、著者らが作成したT-キニノーゲンのラジオイムノアッセイ系[28]に準じて行った。ただし、抗原はmCPI／LMWK、抗体としてウサギ抗mCPI／LMWK抗血清を用いた。作成したイムノアッセイ系の検量線範囲は 5～

500 ng/mlであり、マウス血清、血漿および腹水の希釈曲線が検量線と平行になることを確認した。また使用した抗体の特異性については、前節に示したイムノブロットの結果から問題ないと判断された。

癌細胞の移植

腹水癌形成のための sarcoma 180癌細胞の腹腔内への移植は、第1章と同様に行った。固形癌形成のためのsarcoma 180癌細胞の移植は、ICR系雄性マウス(日本クレア)5週令の皮下に5×10^6 cell/mouseを移植した。一方、3LL癌細胞は、6×10^6 cell/mouseを5週令C57BL/6系雄性マウス(日本クレア)の皮下に移植した。移植後経時的に眼窩静脈叢より採血し血漿を得た。各群5匹のマウスを用いて実験を行い、検体の採取は群内に最初の死亡例が出るまで行った。

有意差検定

有意差検定はStudent's t test によった。

3.2.2 実験結果および考察

Sarcoma 180 癌細胞の移植により腹水癌を形成させた場合も固形癌の場合も、さらに3LL癌細胞による固形癌形成の場合も、腫瘍の増殖にともなって血漿mCPI／LMWK濃度は上昇した(Fig. 6)。その濃度増加は癌細胞移植3日目より認められ、いずれの癌細胞を移植した場合においても移植前のレベルの約2倍にまで増加した。癌細胞を移植していない対照群では、実験期間中そのレベルは変動しなかった。なお、パパイン活性阻害で測定したシステインプロテアーゼインヒビター活性についても、mCPI／LMWKのタンパク質濃度の変動と同様のパターンで変化することを確認した。これらの結果は、担癌状態における血中システインプロテアーゼインヒビター活性の増加が、mCPI／LMWK量の増加にもとづくことを示している。またこの現象は、癌細胞の種類、増殖形態、増殖部位にかかわらず認められる現象であると考えられた。

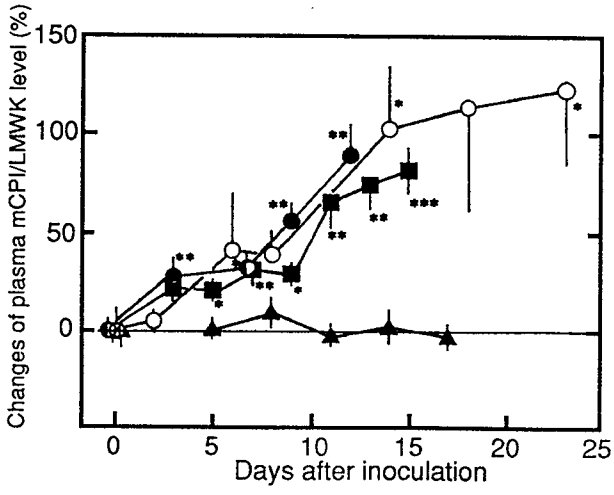


Fig. 6. Plasma levels of mCPI／LMWK in sarcoma 180 and 3LL tumor-bearing mice. Sarcoma 180 tumor cells were inoculated i.p. (10^7 cells/mouse, ●) or s.c. (5 x 10^6 cells/mouse, ○) into 5 ICR mice. 3LL tumor cells (6 x 10^6 cells/mouse, ■) were inoculated s.c. into 5 C57BL/6N mice. Plasma levels of mCPI／LMWK in tumor bearers or 5 normal ICR mice (▲) were determined by RIA. Mean mCPI／LMWK levels in plasma befor inoculations were 0.532 ± 0.025 mg/ml for ICR and 0.478 ± 0.032 mg/ml for C57BL/6N mice. Data are expressed as means ± SE. Significantly different from the values at day 0 (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$).

mCPI／LMWKの由来については、a). 宿主由来である可能性(キニノーゲンであるのでこの可能性は高いと考えられた) b). 癌細胞由来の可能性、が考えられた。ヒト転移性メラノーマからシステインプロテアーゼインヒビターが分泌される例が報告されている[38]ので、培養sarcoma 180癌細胞の細胞溶解物および培養上清について、mCPI／LMWKが検出されるか否かを検討した。その結果、いずれの検体中にもパパイン阻害活性および抗mCPI／LMWK抗体反応性物質は検出されなかった。さらにこの分子が正常マウス血中に存在すること、キニノーゲンであること、マウス初代培養肝細胞が、mCPI／LMWK抗体反応性分子を分泌すること(データは示していない)などから、この分子は宿主由来のタンパク質であり、循環血中から腹腔内に浸出したものと考えられた。

3.3 起炎刺激によるマウス血漿mCPI／LMWKの変動

前節では癌細胞移植によって血漿mCPI／LMWKの量が経時的に上昇することを示した。ラットでは炎症時にシステインプロテアーゼインヒビターであるT-キニノーゲンの濃度が上昇する(後述)。そこで、起炎刺激をあたえることによるmCPI／LMWK濃度の変動について調べた。

3.3.1 実験材料と方法

起炎刺激

起炎剤としてリポポリサッカライド(LPS, *S. typhosa*; Difco)、およびFreundの完全アジュバントを用いた。LPSは50 μg/100 μl saline/mouseを腹腔内に、アジュバントは 0.5 ml/mouseを背部皮下に、それぞれ7週令の雄性BALB/cマウスに投与した。起炎剤投与後、経時的に採血を行った。

その他

有意差検定はStudent's t testによった。

血漿の採取およびmCPI／LMWKのイムノアッセイは、前節と同様に行った。

3.3.2 実験結果および考察

LPSで起炎刺激をあたえた場合のmCPI／LMWKの血漿濃度の経時変化をFig. 7 に示した。起炎刺激後mCPI／LMWKの血漿濃度は上昇し、5日目には刺激前の2倍に増加した。アジュバントで刺激した場合も、4日目で2倍以上に増加し高いレベルが長時間持続した。これら結果より、mCPI／LMWKは炎症時にもその血中濃度の上昇する炎症急性期タンパク質としての性格を有することが明らかとなった。ラットT-キニノーゲンが炎症急性期タンパク質であること、および、ヒト癌性腹水中で高濃度のT-キニンが検出された、という報告[8]とも合わせて、システインプロテアーゼインヒビター、キニノーゲン、癌、炎症の相互の関連性を考える上で非常に興味深い。

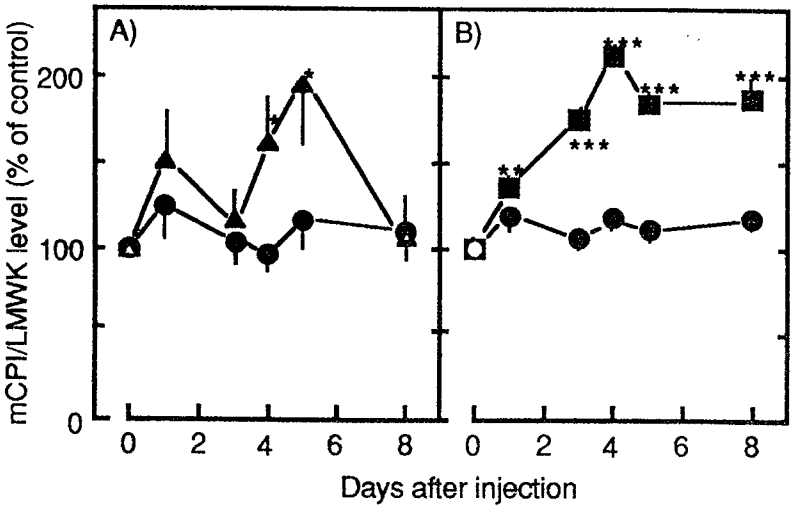


Fig. 7. Plasma levels of mCPI／LMWK following induction of inflammation. **A**, LPS was injected i.p. (50 μg/mouse) into 6 BALB/c mice. **B**, Freund's complete adjuvant was injected s.c. (0.5 ml/mouse) into 6 BALB/c mice. Plasma levels of mCPI／LMWK in inflammation-induced (▲, ■) or 6 normal BALB/c mice (●) were determined by RIA. Mean mCPI／LMWK levels in plasma before induction of inflammation were 0.568 ± 0.030 mg/ml for panel **A** and 0.445 ± 0.028 mg/ml for panel **B**. Data are expressed as means ± SE. Significantly different from the values at day 0 (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$).

3.4 小括

mCPI／LMWKに対する抗体を作成した。この抗体を用いたイムノブロット分析によって、血漿と腹水について抗原存在の有無およびその分子量を比較した。正常マウス血漿、担癌マウス血漿、担癌マウス腹水いずれにおいても分子量67,000の精製mCPI／LMWKに相当するバンドが染色された。血漿中分子と腹水中分子は分子量的にも免疫化学的にも区別できなかった。

担癌状態におけるmCPI／LMWKの量的変動について調べるために、特異的イムノアッセイ系を作成した。この系を用いて癌細胞移植後の血漿濃度の変化を調べたところ、腫瘍の増殖にともなうmCPI／LMWK濃度の増加を認めた。システインプロテアーゼインヒビター活性も同様のパターンを示したことより、担癌状態における血中および腹水中で認められたシステインプロテアーゼインヒビター活性の増加は、mCPI／LMWKの量の増加にもとづくと考えられた。mCPI／LMWKがキニノーゲンであり、ラットT-キニノーゲンが炎症急性期タンパク質であることから、mCPI／LMWKの炎症における変動を調べたところ、その血漿濃度は起炎刺激を与えることによって上昇した。従って、mCPI／LMWKも炎症急性期タンパク質としての性格を有することが判明した。癌の増殖部位で起きている現象は炎症反応としての特徴を含み、担癌状態での濃度上昇と炎症急性期反応としての濃度上昇は同じ様な意味を持つのかもしれない。

mCPI／LMWKの由来は、培養 sarcoma 180 癌細胞がmCPI／LMWKを産生しないこと、正常マウス血中に存在すること、キニノーゲンであること、マウス初代培養肝細胞が、mCPI／LMWK抗体反応性分子を分泌すること、などの証拠より、この分子は宿主由来のタンパク質であり、担癌時や炎症時にはその肝細胞での合成分泌が盛んになり、担癌状態において循環血中から腹腔内に浸出したものであると考えられた。

第4章　ラットキニノーゲンの炎症急性期反応に対する免疫担当細胞の関与

前章まで、担癌マウス腹水から見いだされたmCPI／LMWKが、担癌状態や炎症状態でその生体内濃度が上昇することを示してきた。緒論でも述べたように、炎症における血中キニノーゲン濃度の上昇はラットで既に知られている[6]。これはラットに存在する3種のキニノーゲンの内のT-キニノーゲン濃度の増加にもとづくものである[5]。血中キニノーゲンの産生臓器は肝臓であり、起炎刺激によって肝臓のT-キニノーゲンmRNA量が増加すること[7]から、T-キニノーゲンの炎症急性期反応は、炎症時に肝臓での産生速度が高まることが原因であると理解できる。しかし、一般には炎症部位は肝臓から離れて存在するため、肝細胞がなんらかの方法で炎症が起きていることを感知しなければならない。炎症部位から肝臓へのT-キニノーゲン産生を刺激するための情報伝達系の存在が必要である。炎症部位には種々の免疫担当細胞が集積し、種々のサイトカインやオータコイドを産生分泌することによって、炎症反応の進行に強く関わっている[39, 40, 41]。そこで本章では、T-キニノーゲンの炎症急性期反応を司令する炎症部位から肝臓への情報伝達系に、免疫担当細胞が介在する可能性について検討した。

4.1　アジュバントおよびLPS投与ラットにおけるキニノーゲンの炎症急性期反応

T-キニノーゲンの炎症急性期反応に対する免疫担当細胞の関与を調べる前に、起炎刺激によるラット血漿キニノーゲン量の増加と、その経時変化を確認するために、アジュバントやLPSによる起炎刺激をあたえることによる血漿キニノーゲン量増加の経時変化を調べた。

4.1.1 実験材料と方法

起炎刺激

8週令のFisher-344系雄性ラット(日本SLC)に対して、Freundの完全アジュバント(10 ml に0.1 mg結核死菌が含まれるように調製)を投与(10 ml/rat, i.p.)、あるいは7週令のSD系雄性ラット(日本SLC)に対して、LPSの生理食塩水溶液を投与(1 mg/kg, i.p.)することによって起炎刺激をあたえた。

血漿の採取

起炎刺激後、尾の先端をカミソリでわずかに切断し、ヘパリン処理ヘマトクリット管に血液を25 μl採取し、血漿を得た。

キニノーゲンの測定

キニノーゲンは、十分量のトリプシンによって遊離するキニンをラジオイムノアッセイすることにより、キニン相当量として定量した[5]。

4.1.2 実験結果および考察

アジュバント投与により血漿キニノーゲン濃度は投与後16時間から上昇し、7日目では正常レベルの10倍以上の値を示した。LPS投与ラットにおける血漿キニノーゲン濃度の上昇は、投与後8時間から認められ、48時間では正常レベルの約10倍の値を示した(Fig. 8)。このようにラットにおけるキニノーゲンの炎症急性期反応と、その経時変化を確認した。キニノーゲンの血漿濃度が十分に上昇している時期、あるいはその直前には、肝臓に対して十分強い産生刺激がかかっているものと考えられた。

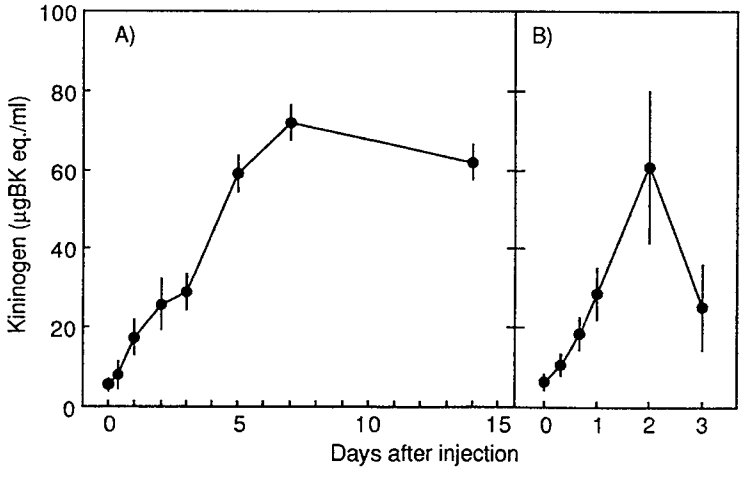


Fig. 8. Plasma kininogen levels following induction of inflammation in rat. Freund's complete adjuvant (0.1 mg *M. tuberculosis* /10 ml/rat, **A**) was injected i.p. into 5 Fisher-344 rats. LPS(1 mg/kg, **B**) was injected i.p. into 5 SD rats. Plasma levels of kininogen are expressed as μg bradykinin equivalent per ml. Data are expressed as means ± SD. Significantly different from the values at day 0 (*, $p < 0.01$; **, $p < 0.001$).

4.2 炎症巣浸出細胞は正常ラットにキニノーゲンの炎症急性期反応を再現する

前節において起炎刺激をあたえることによるラット血漿キニノーゲンレベルの上昇が確認できた。この現象はT-キニノーゲン合成臓器である肝臓における合成速度の上昇と、その結果による血中への分泌量の増加にもとづく血漿キニノーゲンレベルの上昇である、と考えられた。しかし、肝臓における合成速度は何を引金にして上昇するのか。肝細胞がこのような応答をするためには、炎症部位から肝臓へT-キニノーゲン合成を刺激する

なんらかの情報を伝達する機構が存在しなけらばならない。炎症部位には血球系細胞、免疫担当細胞が集合し、これら細胞が炎症反応の進行に種々の役割をはたしていることが知られている[39, 40, 41]。そこで、肝臓のT-キニノーゲン合成を刺激する情報伝達系に、この炎症巣に集合する血球系細胞、免疫担当細胞が関わっているか否かを知るために、以下の検討を行った。

4.2.1 実験材料と方法

活性化免疫担当細胞採取用ラットの起炎刺激

近交系であるFisher-344雄性ラット(日本クレア)8週令にFreund完全アジュバント、あるいはLPSを用いて4.1と同様に起炎刺激をあたえた。

炎症巣浸出細胞・免疫担当細胞の採取と同系正常ラットへの移入

アジュバントで起炎刺激6日後に炎症巣浸出細胞(腹腔浸出細胞)を回収した。腹腔浸出細胞の回収はYoshinagaらの方法に従った[42]。回収した細胞はHanks氏液でよく洗浄し移入実験に用いた。LPS刺激の場合、投与24時間後にMishellらの方法[43]に従って脾臓細胞懸濁液を調製した。移入は同系正常ラット(6週令雄性F344)に対して行い、ラットあたり2×10^7細胞として腹腔内に移入した。

壁付着性細胞の選択

上述の方法で得られた腹腔浸出細胞は、塗抹標本のギムザ染色の結果その70～80%がマクロファージであった。さらにマクロファージの割合を高めるために、壁付着法で選択し[44]、壁付着性細胞はリドカイン法[45]で回収した。この操作により、マクロファージの割合は94%にまで精製された。この壁付着性細胞も腹腔浸出細胞と同様に移入実験に用いた。

なお、その他の実験操作については、前節までに記載の操作法に従った。

4.2.2 実験結果および考察

アジュバント投与によって誘導した腹腔浸出細胞(炎症巣浸出細胞)の正常ラットへの

移入は、起炎刺激をあたえた場合と類似の血漿キニノーゲン濃度の上昇を引き起こし、移入48時間後に移入前の3.2倍まで上昇した(Fig. 9A)。また、腹腔浸出細胞から壁付着法で精製したマクロファージを同様に移入した場合には、移入48時間後で移入前の3倍に上昇した。精製したマクロファージでも分画前の細胞と同等な刺激能力を有していたことから、アジュバント刺激によるキニノーゲンの炎症急性期反応においては、その刺激伝達の過程でマクロファージが重要な役割を演じていると考えられた。移入に用いた細胞(腹腔浸出細胞)は、この実験の起炎方法では炎症巣浸出細胞そのものであり、炎症巣に浸出して活性化された免疫担当細胞である。

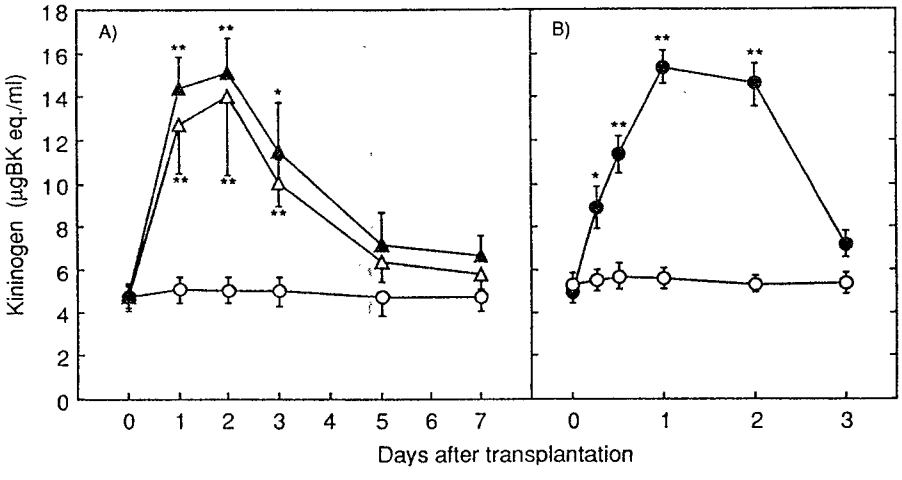


Fig. 9. Increases in plasma kininogen levels by transfer of peritoneal exudate cells (PECs) or spleen cells. PECs or spleen cells were prepared from inflammation-induced and/or normal Fisher-344 rat as described in text. **A**, PECs (▲), adherent cells of PECs (△) or medium alone (○) were injected i.p. into 5 normal recipients, respectively. **B**, Spleen cells from LPS-treated rat (●) or normal rat (○) were transfered i.p. into 5 normal recipients, respectively. Plasma levels of kininogen are expressed as μg bradykinin equivalent per ml. Data are expressed as means ± SD. Significantly different from control (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$).

LPS投与したラットから得た脾臓細胞の移入によっても血漿キニノーゲン濃度の上昇が認められ、移入24時間後で移入前の3倍に増加した(Fig. 9B)。このように全身の免疫系が活性化されるような刺激をあたえた場合、脾細胞にもキニノーゲンの炎症急性期反応を再現する能力が付与されたものと考えられた。正常ラット脾細胞を移入した対照群では、有意な変動は認められなかった。

4.3 小括

ラット血中T-キニノーゲン濃度は起炎刺激により上昇することが知られている[5]。血中キニノーゲンの産生臓器は肝臓であり、肝臓での産生速度の上昇が炎症急性期反応の原因であると考えられた。この現象が起きるためには、肝細胞がなんらかの方法で炎症が起きていることを感知しなければならず、炎症部位から肝臓へのT-キニノーゲン産生を刺激するための情報伝達系の存在が必要である。そこで、T-キニノーゲンの炎症急性期反応を司令する情報伝達系に、免疫担当細胞が介在する可能性について検討した。T-キニノーゲンの炎症急性期反応が起きるまでの過程に炎症で活性化された免疫担当細胞が主役を演じる段階があるならば、まさに炎症急性期反応が起きているラットから調製した免疫担当細胞を、無刺激の正常なラットに移入することによりT-キニノーゲンの炎症急性期反応が再現されるはずである。

上記の仮説を確かめる前に、起炎刺激によるラット血漿キニノーゲン量の増加とその経時変化を確認するために、アジュバントやLPSによる起炎刺激をあたえた時の血漿キニノーゲン量増加の経時変化を調べた。その結果、アジュバント投与により血漿キニノーゲン濃度は1～2週間目をピークとする増加を示した。LPSを投与した場合は、2日目をピークとする反応であった。この結果をもとに活性化された免疫担当細胞の採取時期を決定した。アジュバント投与後6日目、LPS投与後24時間目に、それぞれ炎症巣浸出細胞、脾臓細胞を回収し、別の同系正常ラットに移入した。その結果、どちらの細胞を移入した場合もキニノーゲンの急性期反応が再現された。以上の事実は、キニノーゲンの炎症急性期応答発現の過程で、炎症刺激によって活性化された免疫細胞が関わるステップが存在することを示している。

マウスのキニノーゲンであるmCPI／LMWKの、炎症、担癌状態における血漿濃度上昇の機序についても、ラットの場合と類似の機構を想定して免疫担当細胞の移入実験を行った。しかしラットの場合とは異なり、免疫系の関与を裏付ける結果は得られていない。

第5章　活性化免疫担当細胞による初代培養肝細胞のT-キニノーゲン産生の促進

前章において炎症巣浸出細胞や免疫担当細胞がT-キニノーゲンの炎症急性期反応が起きるまでの過程に関わっていることを示した。この機構についてはいくつかの仮説が立てられるが、著者は以下のような仮説にもとづいてその妥当性を検証した。それは、「炎症巣に集積した、あるいはその周辺に存在する活性化免疫担当細胞がなんらかの液性因子を分泌し、この因子が血流を介して肝臓に到達し肝細胞のT-キニノーゲン合成速度を高める」というものである。この仮説を確かめるためには、活性化を受けた免疫担当細胞がなんらかの液性因子を分泌し、この因子が肝細胞を直接刺激してT-キニノーゲン産生を高めることを証明しなければならない。そこで、結果の解析が容易な細胞培養系を用いて以下のような検討を行った。

5.1　炎症巣浸出細胞よる初代培養肝細胞のT-キニノーゲン産生の促進

アジュバントを投与したラットの腹腔(炎症巣)浸出細胞及びマクロファージ、あるいはLPSを投与したラットの脾臓細胞が、培養肝細胞のT-キニノーゲン産生を促進するか否かについて検討した。

5.1.1　実験方法

起炎刺激と免疫担当細胞

アジュバントとLPSによる起炎刺激は、第4章と同様に行った。

免疫担当細胞として、腹腔浸出細胞、腹腔浸出細胞マクロファージ、および脾臓細胞を使用し、その調製方法は第4章と同様に行った。

単離肝細胞の分離と初代培養

ラット肝実質細胞は、Seglenの方法[46]にもとづく市原らの改良法[47, 48]であるコラゲナーゼ (和光純薬)による*in situ*肝灌流と、低速遠心による肝実質細胞の純化により単離

した。この方法によって純度が96～98%の実質細胞が得られた。なお、実験には生存率90%以上の細胞を使用した。培養液はWilliam's medium E (Flow) に10^{-8} Mデキサメサゾン、10^{-9} Mインスリン、5%牛胎児血清(Bocknek)、40 μg/mlゲンタマイシンを加えて用いた。培地に懸濁した肝細胞は、あらかじめコラーゲンコートした組織培養用6穴マルチプレート(Corning)に 1 x 10^5 cell/cm^2の密度で播種した。培養は5% 炭酸ガス気相下37℃で行ない、培養2時間後に培地を交換し接着しなかった細胞を除去し、さらに22時間前培養した細胞について種々の条件で処理した。処理後48時間後の培養上清を検体として採取した。

なお、この培養過程において培養上清中のT-キニノーゲンが分解されないこと、肝細胞に再取り込みがないこと、分泌前の分子が細胞内に蓄積していないこと、さらに、前培養も含めての3日間の培養期間内における単位時間に分泌されるT-キニノーゲン量は1割程度の減少であることを確認した。従って、この培養期間にわたって肝細胞は機能低下もなく培養され、培養上清中で検出されるT-キニノーゲンは培養期間内に肝細胞が新たに合成したものと判断した。

肝細胞の処理

初代培養肝細胞と免疫担当細胞を、0.45 μmポア径よりなるメンブランフィルターが装着された培養チャンバーであるミリセル HA (Millipore)を介しcocultureした。すなわち、培養プレートのwell内に肝細胞を播き、前培養終了後にミリセルHAを各wellに装着した。このミリセルHAのチャンバー内に免疫担当細胞を添加し、フィルターを隔てて肝細胞と同一培地内で培養した。ミリセルHA用いることにより、肝細胞と免疫担当細胞の直接の接触なしに、かつ免疫担当細胞より分泌された液性因子はミリセルHAを介した肝細胞に対して自由に作用しうる系が作成できた。この系はフィルターチャンバーの中が炎症巣であり、培養液が血液、そして肝細胞が肝臓と考えられる *in vivo* に近いモデルである。なお、この節以後も肝細胞と他の細胞の培養はこの手法を用いた。

T-キニノーゲンの定量

肝細胞初代培養系で産生分泌されたキニノーゲンを測定する場合、培養液に添加するウシ血清由来のウシキニノーゲンの存在を考慮しなければならない。著者らは既に、T-キニノーゲンをキニンに変換せずに直接定量可能なラジオイムノアッセイ系を[28]開発

している。そこでこの系を用いてT-キニノーゲンを直接測定した。なお、このラジオイムノアッセイ系は、ラット高分子キニノーゲンと交差反応しないこと、培地中に含まれるウシのキニノーゲンともまったく反応しないこと、および肝細胞培養上清の希釈曲線が標準精製T-キニノーゲンの希釈曲線と平行になることを確認した。

なお、その他の実験操作については、前節までに記載の操作法に従った。

5.1.2 実験結果および考察

肝細胞によるT-キニノーゲンの産生量は、同一培地内で培養した炎症巣浸出細胞としての腹腔浸出細胞数に依存して増加した。このT-キニノーゲン産生促進作用は、わずか200個の細胞を肝細胞と培養することによっても認められた(Fig. 10)。同様に、炎症巣浸出マクロファージ、脾細胞も肝細胞T-キニノーゲン産生を促進した。なお、これら実験に使用した免疫担当細胞自身が、T-キニノーゲンを産生しないことは、あらかじめ確認した。

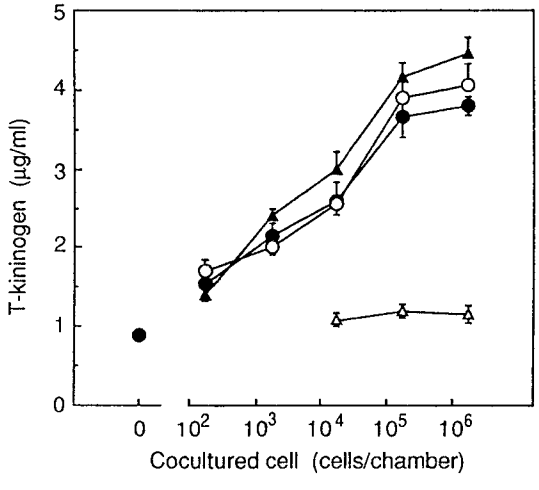


Fig. 10. T-kininogen production of rat hepatocytes cocultured with peritoneal exudate cells (PECs) or spleen cells. PECs or spleen cells were prepared from inflammation-induced (●, ○, ▲) or normal (△) Fisher-344 rat. PECs (●), adherent cells of PECs (○), or spleen cells (▲, △) were cocultured with primary cultured rat hepatocytes for 48 hr using Millicell HA. T-kininogen levels in culture supernatant were determined by RIA. Data are expressed as means ± SD of 4 cultures.

この実験で用いたcoculture系に含まれる細胞は肝細胞と免疫担当細胞のみであり、これら細胞は直接の接触をすることができない培養環境である。従って上記の結果から、起炎刺激によって*in vivo*で活性化された免疫担当細胞は、肝細胞のT-キニノーゲン産生を刺激する液性因子を遊離することが確かめられた。

5.2 *in vitro*で活性化したマクロファージおよびT細胞によるT-キニノーゲン産生の促進

前節では *in vivo*で活性化した免疫担当細胞を用い検討を行った。この結果、炎症巣浸出細胞が肝細胞を直接刺激するなんらかの液性因子を分泌することが判明した。ではここで肝細胞に対するT-キニノーゲン産生刺激液性因子を分泌する細胞として、どの細胞を想定したらよいのであろうか。第4章の細胞移入実験において、炎症巣浸出細胞からマクロファージを精製し、他のラットに移入した場合にもT-キニノーゲンの急性期反応が再現できることから、マクロファージはその候補となり得ると考えられた。また、 *in vivo*で活性化した脾臓細胞に存在した肝細胞刺激能力を、脾臓細胞中に存在するマクロファージ(脾細胞中数%の存在比)のみで説明するのには無理があり、その候補としてリンパ球をも考慮すべきであると考えられた。リンパ球の中でも特にT細胞は様々なリンフォカインを産生し、免疫応答の調節に関わっていることが知られている[49]。そこで、本章においては細胞特異的活性化剤を用いてマクロファージとT細胞を刺激することにより*in vitro*で活性化し、T-キニノーゲン産生調節因子を遊離するか否かを検討した。

5.2.1 実験方法

免疫担当細胞

腹腔浸出細胞は、十分な細胞数を得るために10 mlの3%チオグリコール酸培地を腹腔内に投与し、72時間後に採取した[50]。この方法で得られたチオグリコール酸培地誘導腹腔浸出細胞の約80%がマクロファージであった。マクロファージとしてはチオグリコール酸誘導腹腔浸出細胞から得た壁付着性細胞を用いた。また、T細胞として胸腺細胞

を用いた。

免疫担当細胞の*in vitro*活性化

細胞を4 x 10^6 cell/ml となるよう細胞数を調整し、細胞懸濁液の5 mlをシャーレに加え、T細胞の場合はConcanavalin A (2.5 μg/ml)、マクロファージの場合はLPS (5 μg/ml)によって24時間刺激した。

なお、その他の実験操作については、前節までに記載の操作法に従った。

5.2.2 実験結果および考察

LPSによって*in vitro*で活性化したラット腹腔マクロファージは、添加した細胞数に依存して培養肝細胞のT-キニノーゲン産生を促進した(Fig. 11A)。Concanavalin Aによって*in vitro*で活性化したTリンパ球も培養肝細胞のT-キニノーゲン産生を促進した(Fig. 11B)。ラット腹腔マクロファージが示した活性は、マウスのマクロファージ細胞株P388D1によっても同様に認められた(データには示さなかった)。これらの結果から、マクロファージおよびTリンパ球が、肝細胞のT-キニノーゲン産生を刺激する液性因子を分泌することが明らかとなった。前節において、炎症刺激によって*in vivo*で活性化した免疫担当細胞に備わっていた肝細胞に対する刺激能力の少なくとも一部は、マクロファージあるいはTリンパ球に由来するものと考えられた。マクロファージおよびTリンパ球から分泌される因子が、同一の分子であるか否かはまだ不明である。

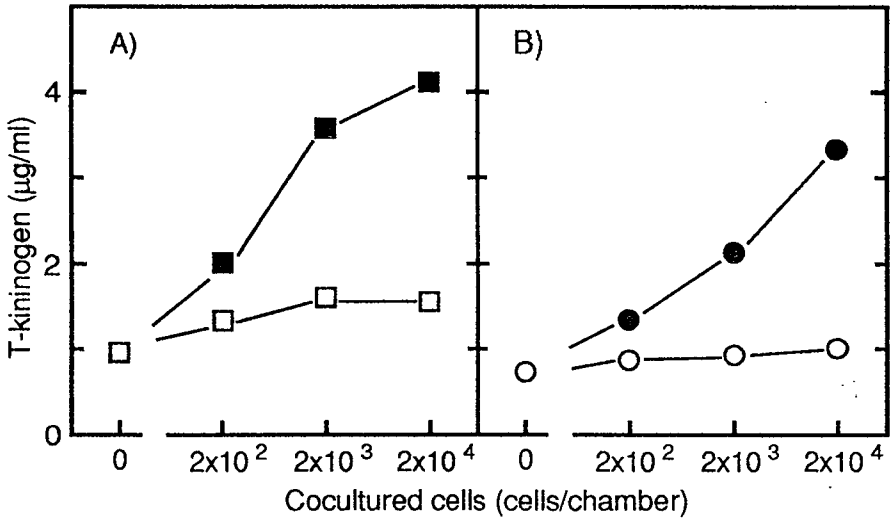


Fig. 11. T-kininogen production of rat hepatocytes cocultured with macrophages or T cells stimulated *in vitro*. Macrophages or T cells were prepared from normal Fisher-344 rat and stimulated *in vitro* as described in text. **A**, Stimulated (■) or unstimulated (□) macrophages were cocultured with primary cultured rat hepatocytes for 48 hr using Millicell HA. **B**, Stimulated (●) or unstimulated (○) T cells were cocultured with primary cultured rat hepatocytes for 48 hr using Millicell HA. T-kininogen levels in culture supernatant were determined by RIA. Data are expressed as means ± SD of 4 cultures.

5.3 小括

前章で得られた結果である「T-キニノーゲンの炎症急性期反応は、いままさに炎症急性期反応をしているラットから調製した免疫担当細胞の、正常ラットへの移入によって再現できる」にもとづき、炎症刺激によって活性化された免疫担当細胞とT-キニノーゲン産生臓器である肝臓との関係を明らかにするために、免疫担当細胞と肝細胞だけから構成される*in vitro*の細胞培養系を用いて解析した。炎症巣浸出細胞と肝細胞をメンブランフィルターを隔ててcocultureすることによりT-キニノーゲンの産生は促進された。この結果は、炎症巣浸出細胞より肝細胞のT-キニノーゲン産生を促進させる何らかの液性因子が分泌されていることを意味する。この炎症巣に浸出した細胞のほとんどはマクロファージであったが、あらかじめマクロファージを調製し*in vitro*で刺激した後に肝細胞と培養しても同様の結果が得られた。従って、炎症巣浸出細胞の中で、本液性因子を分泌している細胞の主体はマクロファージであると思われた。また、*in vitro*活性化T細胞によってもT-キニノーゲン産生の促進が認められた。炎症反応はその原因となる刺激の種類および時期によって、活性化されている、あるいは炎症部位に集積している細胞の種類は様々である。Tリンパ球が主役を演じるタイプの炎症、あるいはリンパ球の浸潤が観察される時期には、T細胞による調節系が機能していると予想される。

マウス初代培養肝細胞が、キニノーゲンであるmCPI／LMWKを産生分泌することは、第3章において既に述べた。マウス初代培養肝細胞のmCPI／LMWK産生についても、ラットの場合と同様の系を用いて検討した。しかしラットの場合とは異なり、活性化免疫担当細胞はマウス肝細胞のmCPI／LMWK産生を促進しなかった。

第6章　サイトカインによる肝細胞T-キニノーゲン産生の調節

前章において、活性化マクロファージおよび活性化T細胞が肝細胞T-キニノーゲン産生を促進する液性因子を分泌することを明らかにした。ではこの因子の実体はどのような分子であろうか。活性化マクロファージや活性化T細胞(特にヘルパーT細胞)は、様々な因子を遊離することによって免疫応答や細胞機能を調節することが知られている。これらの調節因子はサイトカインと総称され、モノカイン、リンフォカイン、インターロイキン、インターフェロンなどが含まれる。

炎症反応に関わるサイトカインは多数あると考えられ、わずかな関与も含めると、あらゆるサイトカインがなんらかの関与をしているといっても過言ではない。Koj[51]は炎症部位で活性化された何らかの細胞からホルモン様の物質が分泌され、これが血流によって肝臓に移行し、急性期タンパク質の産生を調節している、という考え方を提唱した。炎症急性期反応とサイトカインの関連については、1982年にインターロイキン-1(IL-1)に、急性期タンパク質である血清アミロイドAタンパク質の産生刺激作用があることをSipeらが報告し[52]、さらにTNFにも炎症急性期タンパク質の産生刺激作用が認められたことから、炎症急性期反応の研究者の注目はサイトカインに集まった。その後RitchieとFuller[53]は、活性化マクロファージからIL-1、TNF以外に急性期タンパク質の1つであるフィブリノーゲンの産生を促進する物質が分泌されることを示し、肝細胞刺激因子(HSF)と名付けた。しかしHSFは当時まだ精製されていなかったため、HSFに関する結果は推定の域に留まっていた。このHSFの実体は、著者のこのキニノーゲンの急性期反応機構に関する研究の進行と同時期に、次のように解明された。IFNβにはβ1とβ2(現在は、その構造と活性からIFN類には分類されていない)の二種類の存在が1986年に報告された[54]。さらに1987年になって、IFNβ2は岸本らがB-cell Stimulating Factor-2(BSF-2)として研究してきた分子と構造的に同一物質であることが明らかとなった[55]。このBSF-2が肝癌細胞のフィブリノーゲン産生促進活性を有したこと、およびBSF-2に対する抗体が部分精製段階のHSFの肝細胞刺激活性を中和したこと等から、両者は同一物質であることが明らかとされ、この分子は統一してIL-6と呼ばれることとなった[56]。

このように、IL-1、TNF以外にも急性期反応を調節する新たな分子が存在する可能性がある。そこで、肝細胞T-キニノーゲン産生の促進因子を検索するにあたり、IL-1、TNFを含めて他のサイトカイン等についても検討することとした。

6.1 IL-1、IL-6、TNFの、肝細胞T-キニノーゲン産生に対する影響

IL-1はマクロファージをはじめとする多様な細胞から産生され、2種の分子(αとβ)が知られている[57]。IL-1は免疫担当細胞活性化以外にも多様な作用[58]を有しており、下垂体細胞からのACTH分泌刺激作用、滑膜細胞からのコラゲナーゼやプロスタグランジン産生の促進作用等が知られている。肝臓に対しては、マウスの炎症急性期タンパク質であるアミロイドAタンパク質や、ヒトC反応性タンパク質等の合成促進作用が知られている。TNFαはマクロファージから産生されるサイトカインであり[59]、腫瘍細胞障害作用以外にもIL-1と類似の多様な活性[60]を有している。肝臓に対しては、炎症急性期タンパク質である補体C3等の合成促進作用[61]等が知られている。IL-6は、T-細胞、マクロファージ、線維芽細胞等の細胞から産生され、B細胞の抗体産生細胞への最終分化の誘導、造血幹細胞の増殖分化誘導、HSFとして肝細胞のフィブリノーゲン産生誘導[56]等の生物活性が知られている。

そこで、IL-1、TNF、IL-6を用いてT-キニノーゲン産生調節活性の有無について検討した。

6.1.1 実験方法

サイトカイン

ヒトリコンビナントIL-1α (2 x 10^7 U/mg, 大日本製薬より分与)、ヒトリコンビナントTNFα (3 x 10^6 U/mg, 大日本製薬より分与)、ヒトリコンビナントIL-6 (5.2x 10^6 U/mg, 大阪大学細胞工学センター、岸本教授より分与)を使用した。

肝細胞の処理

初代培養肝細胞は24穴マルチプレートで培養した。前培養終了後、培養液を種々濃度

のサイトカイン類を含む培地と交換してさらに48時間培養し、その培養上清を検体として採取した。

なお、その他の実験操作については、前節までに記載の操作法に従った。

6.1.2 実験結果および考察

Fig. 12 に示したように、IL-1、TNFともに今回行った実験の濃度範囲において、T-キニノーゲン産生に対し何ら影響を与えなかった。IL-6は添加濃度に依存してT-キニノーゲン産生を促進した。その最大作用は500 U/mlの添加で認められ、コントロールと比較して約10倍にT-キニノーゲン産生を促進した。

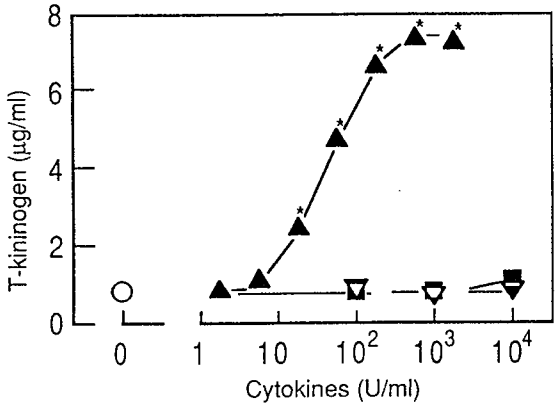


Fig. 12. Effects of IL-1, IL-6 and TNF on T-kininogen production of rat hepatocytes. Rat hepatocytes were cultured with IL-1 (▼), IL-6 (▲) or TNF (■) for 48 hr. T-kininogen levels in culture supernatant were determined by RIA. Data are expressed as means ± SD of 4 cultures. Significantly different from control (*, $p < 0.001$).

マクロファージおよびT細胞は、IL-6の産生細胞である[62]ので、第5章において活性化マクロファージおよびT細胞に認められたT-キニノーゲン産生刺激活性のすくなくとも一部は、IL-6に由来する可能性が考えられた。

6.2 インタ-フェロン(IFN)のT-キニノーゲン産生に対する影響

IFNはウイルスの干渉現象を引き起こす物質として、IssacsとLindenmann[63]により1957年に発見された。IFNは、α、β、γの3種類に分類される。IFNαはT細胞以外の多くの細胞、主にマクロファージやナチュラルキラ-細胞より産生され、βは線維芽細胞より、またγはT細胞より産生される。

前節においてIL-6にT-キニノーゲン産生刺激活性のあることを見いだしたが、既に述べたように、IL-6はIFN研究者の間ではIFNβ2としてIFNの範疇に分類されていた分子である。しかし、抗ウイルス活性を持たないことが示され[64]たため、現在ではIFNとしては取り扱われていない。ただしその産生は、IFNと類似した条件でも誘導される。そこで、抗ウイルス活性以外にも多様な生物活性を有するIFNα、IFNγ(IFNβ1はIFNαと共通のレセプターを使用することが知られており、両者はタイプI IFNとして同一のグループに分類されるので省略した)にも、肝細胞T-キニノーゲン産生刺激活性があるか否かを検討した。

6.2.1 実験方法

サイトカイン

インターフェロンとしてはラットIFN (1.9 x 10^6 U/mg, Lee Biomolecular Research Laboratories)、ヒトIFNα(2 x 10^8 U/mg, 林原生物科学研究所)、ヒトリコンビナントIFNγ (4 x 10^6 U/mg, Holland Biotechnology)を用いた。ラットにおいてはいまだ3つのタイプのIFNが単離されておらず、用いたラットIFNと称される分子が唯一入手可能であった。なお、このラットIFNは、マウスαタイプと類似した電気泳動パターンをとることがメーカーによって確認されている。また、ラットIFNが酸処理や熱処理に対して安定であり、タイプI 型 IFNとしての性質を示すことを確認した。

肝細胞の処理

上記のサイトカインを種々の濃度で前培養終了後の肝細胞に加えて、48時間の培養を行い培養上清を回収した。

なお、その他の実験操作については、前節までに記載の操作法に従った。

6.2.2 実験結果および考察

ラットIFNは濃度依存的に初代培養肝細胞のT-キニノーゲン産生を促進した。その作用は1,000 U/mlで最大に達し、無添加の場合と比較して約10倍までT-キニノーゲン産生は促進された(Fig. 13)。ヒトIFNαもラットIFNと同様にT-キニノーゲン産生を促進し、用量反応曲線もラットIFNとほぼ同一であった。一方ヒトIFNγにはT-キニノーゲン産生促進作用は全く認められなかった。ラットIFNはマウスαタイプと類似した電気泳動パターンをとることが確認されているので、αタイプであると考えられた。この想定は、ラットIFNがタイプ I 型 IFNとしての性質を示したこと、およびヒトIFNαにはT-キニノーゲン産生促進活性が認められるが、ヒトIFNγにはT-キニノーゲン産生促進活性が認められないという上記の結果とも矛盾しない。以後、ラットIFNをラットIFNαと称することにする。マクロファージはIFNαの産生細胞であるので、第5章において活性化マクロファージが示したT-キニノーゲン産生刺激活性の一部はIFNα に由来する可能性がある。

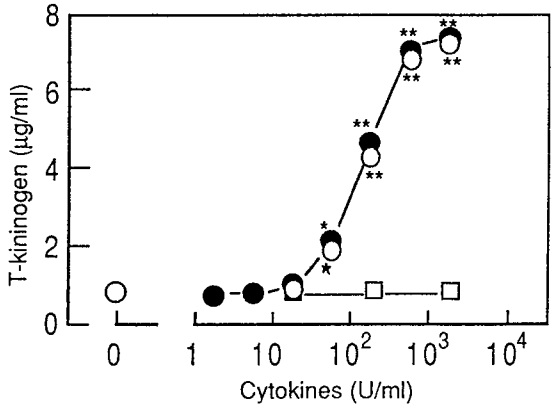


Fig. 13. Effects of interferons on T-kininogen production of rat hepatocytes. Rat hepatocytes were cultured with rat IFNα (●), human IFNα (○) or human IFNγ (□) for 48 hr. T-kininogen levels in culture supernatant were determined by RIA. Data are expressed as means ± SD of 4 cultures. Significantly different from control (*, $p < 0.01$; **, $p < 0.001$).

これまで示した因子以外に、グルココルチコイド、ミネラルコルチコイド、インスリン、PGE_1、PGE_2、PAF、EGF、TGFα、TGFβ等につき、T-キニノーゲン産生に対する影響の有無について検討したが、これらはいずれも影響を示さなかった。

6.3 肝細胞T-キニノーゲン産生に対するサイトカイン間相互作用

生体内においては、複数のサイトカインが同一の標的細胞に作用し、様々な生理作用を発現しているものと思われる。特にIFNとTNFが同一の標的細胞に作用したとき、それぞれの作用を増強しあう例[65, 66]はよく知られている。そこで、T-キニノーゲン産生を促進したサイトカインであるIL-6、IFNαの作用に対して、IL-1、TNFが影響するか否かについて検討した。

6.3.1 実験方法

肝細胞の処理

肝細胞T-キニノーゲン産生を、それぞれ数倍に促進する濃度のIL-6(100 U/ml)、あるいはラットIFNα(200 U/ml)を前培養終了後の肝細胞に添加し、そこに種々濃度のTNF、IL-1を共存させ、IL-6、IFNαのT-キニノーゲン産生刺激作用が変化するか否かを検討した。

なお、その他の実験操作については、前節までに記載の操作法に従った。

6.3.2 実験結果および考察

IL-6、ラットIFNαのT-キニノーゲン産生促進作用は、いずれもTNFの用量に依存して抑制された(Fig. 14A)。IL-6、ラットIFNαにIL-1を併用した場合には、IL-6のT-キニノーゲン産生刺激作用がIL-1の用量に依存して抑制された。しかし、ラットIFNαの刺激作用は修飾されなかった(Fig. 14B)。このように、あるサイトカインの作用発現が別のサイトカインによって増強ではなく抑制される例は少ない。IL-6、IFNαのT-キニノーゲン産生刺激作用が、TNF、IL-1に対して異なった感受性を示したことは、これらサイトカイン

の肝細胞内での情報伝達･作用機序が異なることを示している。IL-6は肝細胞のアルブミン産生を抑制することが認められている[62]が、このアルブミン産生抑制作用はTNF、IL-1によって何ら影響されないことを確認した。従って、T-キニノーゲン産生応答におけるサイトカイン間の抑制性相互作用は、サイトカインによる受容体拮抗や、受容体のダウンレギュレーションではなく、細胞内情報伝達系が修飾されているためであると考えられた。

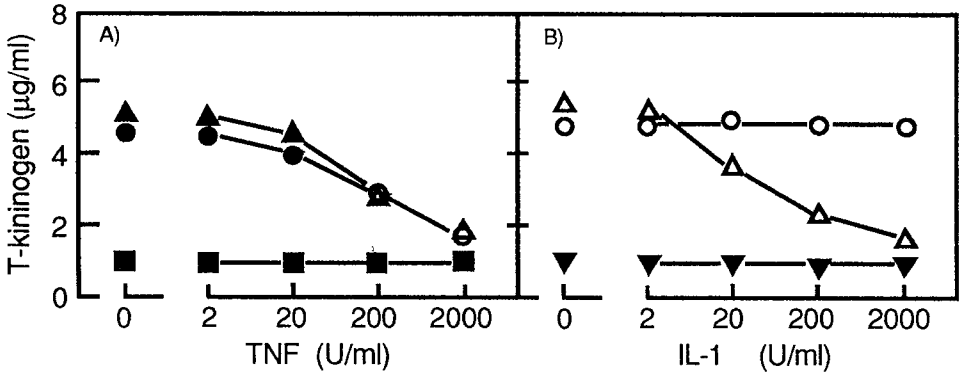


Fig. 14. Modification of cytokine-induced stimulation of T-kininogen production by IL-1 or TNF. Rat hepatocytes were stimulated by IL-6 (▲, △) or rat IFNα (●, ○) in the presence of TNF (**A**) or IL-1 (**B**) for 48 hr. T-kininogen levels in culture supernatant were determined by RIA. Data are expressed as means ± SD of 4 cultures.

6.4 正常ラットへのサイトカイン投与によるT-キニノーゲンの炎症急性期反応の再現

肝細胞T-キニノーゲン産生を促進した因子が炎症時においても機能しているならば、その生体内濃度を人為的に高めることによって血漿T-キニノーゲン濃度が上昇するはずである。そこで正常ラットにサイトカインを投与し、血漿T-キニノーゲン濃度を経時的に測定した。

6.4.1 実験方法

サイトカインの投与

サイトカイン類を10%正常ラット血清を含む無菌生理食塩水で、IL-1(40,000 U/ml)、IL-6 (10,000 U/ml)、TNF (100,000 U/ml)、ラットIFNα (2,000 U/ml)、IFNγ (12,800 U/ml) となるように調製した。この溶液0.5 mlをラット腹腔内へ投与し、経時的に尾から採血して血漿を得た。

なお、その他の実験操作については、前節までに記載の操作法に従った。

6.4.2 実験結果および考察

IL-6、ラットIFNα投与群においては、それぞれ5,000 U/rat、1,000 U/ratという低用量を投与したにもかかわらず、血漿T-キニノーゲン濃度は投与前の5倍弱にまで上昇した(Fig. 15)。第6章に示したように、IL-6、IFNαの培養肝細胞T-キニノーゲン産生に対する刺激作用は数10 U/mlから認められている。従って、これらサイトカインの投与量と肝細胞のこれらサイトカインに対する感受性から考えると、IL-6、IFNαは生体内においても肝細胞を直接刺激してT-キニノーゲン産生を促進し、結果として血漿中濃度が上昇したと理解できる。一方、培養肝細胞のT-キニノーゲン産生に対して、*in vitro*で直接の刺激作用が認められなかったサイトカインであるTNF、IFNγを投与した場合にも血漿T-キニノーゲン濃度は1.4～2倍に増加した(Fig. 15)が、これは高用量を投与したため免疫担当細胞が活性化され、2次的にIL-6、IFNαが誘導された結果と考えられた。また、IL-1を投与した場合には血漿T-キニノーゲン濃度に有意な変動は認めなかった。

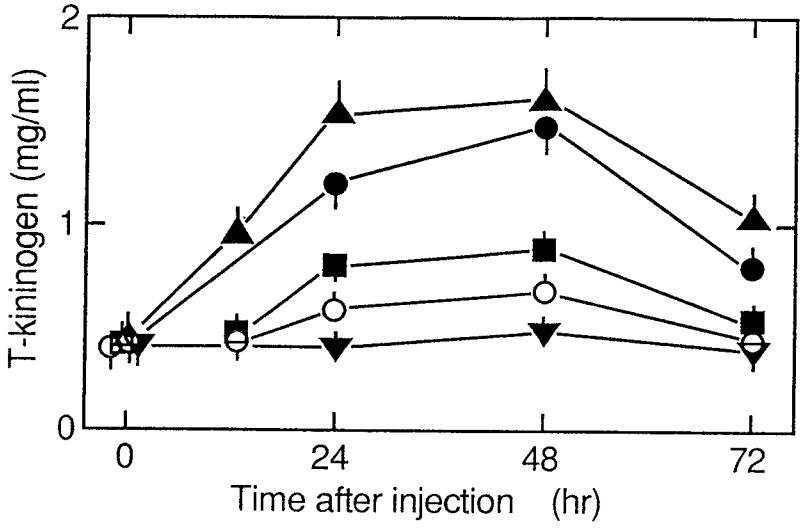


Fig. 15. Plasma levels of T-kininogen following administration of cytokine. IL-1 (20,000 U/rat, ▼), IL-6 (5,000 U/rat, ▲), TNF (50,000 U/rat, ■), rat IFNα (1,000 U/rat, ●) or human IFNγ (6,400 U/rat, ○) was administrated i.p.. T-Kininogen levels in plasma were determined by RIA. Data are expressed as means ± SD of 4 rat.

6.5 小括

前章において、活性化マクロファージおよび活性化T細胞が、肝細胞T-キニノーゲン産生を促進する液性因子を分泌することを明らかとした。この因子をサイトカインと想定し、他の急性期タンパク質の産生調節に関わることが知られているIL-1、TNFを含めて種々のサイトカインについて、その肝細胞T-キニノーゲン産生促進能の有無について検討した。その結果、IL-6とIFNαにT-キニノーゲン産生促進活性が存在することを見いだした。しかし、サイトカインのunitの定義は各々のサイトカインにより異なっている。そこで、ヒトIL-6のT-キニノーゲン産生促進作用とヒトIFNαのその作用を、最大活性の1／2の活性を発現するモル濃度で比較すると、IFNαは25 pM、一方、IL-6は220 pMと計算されIFNαの方が約10倍強い。

生体内においては複数のサイトカインが同一の標的細胞に作用し、様々な生理作用を発現しているものと思われる。そこで、T-キニノーゲン産生を促進したサイトカインであるIL-6、IFNαの作用に対して、IL-1、TNFが影響するか否かについて検討した。その結果、IL-6、ラットIFNαのT-キニノーゲン産生促進作用はTNFによって抑制されたが、IL-6のアルブミン産生抑制作用は何ら影響されなかった。IL-1はIL-6のT-キニノーゲン産生刺激作用を抑制したが、ラットIFNαの刺激作用は修飾されなかった。このサイトカイン間相互作用は更に複雑な急性期タンパク質産生調節系が生体内に存在することを予想させる。また、この修飾作用がIL-6のアルブミン産生抑制現象においては認められなかったため、サイトカインによる受容体拮抗や受容体のダウンレギュレーションではなく、細胞内情報伝達系が修飾されているためであると考えられた。

血漿T-キニノーゲン濃度は生体内へIL-6、ラットIFNαを投与することによっても上昇した。従って、IL-6、IFNαが炎症時に産生されたならば、生体内においてもT-キニノーゲン産生を調節できると予想された。一方、TNF、IFNγは、直接作用による培養肝細胞T-キニノーゲン産生刺激作用が認められないにもかかわらず、これらを投与することによって血漿T-キニノーゲン濃度が上昇した。これは高用量を投与したために2次的にIL-6やIFNαの産生が生じた結果であろうと推測された。

第7章　免疫担当細胞由来のT-キニノーゲン産生促進因子の決定

第5章において、マクロファージおよびT細胞から何らかの液性因子が分泌され、それにより肝細胞T-キニノーゲン産生が刺激されることを明らかにしたが、では各々の細胞から分泌されている因子は何であろうか。第6章において、種々のサイトカインの内でIFNαとIL-6に肝細胞T-キニノーゲン産生促進活性を認めた。また、マクロファージやT細胞はこれらサイトカインの産生細胞であることから、これら細胞より分泌されるT-キニノーゲン産生促進因子は、IFNαあるいはIL-6の可能性が高いと考えられた。そこでこの因子を明らかにしようと試みた。ラットIFNα については、このIFN活性を中和できる抗体が入手可能である。一方IL-6については、現在ヒトIL-6は得られているが、ラットにおいてはIL-6 抗体もIL-6 も得られていない。しかし、前章で明らかとなったT-キニノーゲン産生に対するサイトカイン間相互作用の性質を利用し、この細胞由来因子の決定が可能になると期待した。すなわち細胞由来因子がラットIFNαとするならば、その作用は抗ラットIFNα抗体(ラットIFNαのT-キニノーゲン産生促進作用が、抗ラットIFNα抗体により中和されることは確認した)、及びTNFで抑えられる。一方、IL-6とするならば、その作用はIL-1でもTNFでも抑えられる。この性質を利用して検討を行った。

7.1　活性化マクロファージ由来のT-キニノーゲン産生促進因子の決定

第6章で明らかにしたサイトカイン間相互作用の性質と、抗ラットIFNα抗体を利用し、活性化マクロファージから分泌されるT-キニノーゲン産生促進因子の決定を試みた。

7.1.1　実験方法

活性化マクロファージ培養上清の調製

第５章に従いマクロファージを調製し(4 x 10^6 cell/ml)、その5 mlをデイッシュ(60 mm φ)に添加しLPS 5 μg/mlで24時間刺激し、LPSを含まない培養液に交換した後さらに24時

間培養した。この培養上清を活性化マクロファージ培養上清として用いた。

肝細胞の処理

LPS活性化マクロファージ培養上清が20%含まれるように培養液を調製し、IL-1 (5,000 U/ml)、抗ラットIFNα抗体(3,000 U/mlのラットIFNα の作用が抑えられる量) あるいはTNF(5,000 U/ml) をそれぞれ添加した。このようにして調製した液を、前培養終了後の肝細胞に加えた。なお、LPSそのものが肝細胞のT-キニノーゲン産生に影響しないことは、あらかじめ確認した。

その他の実験操作については、前節までに記載の操作法に従った。

7.1.2 実験結果および考察

結果をFig. 16 に示し、活性化マクロファージ培養上清が示すT-キニノーゲン産生促進活性を100%として表示した。活性化マクロファージ培養上清中のT-キニノーゲン産生促進活性は、抗ラットIFNα抗体によってもIL-1によっても約半分に抑えられた。また、培養上清中のこの活性は抗ラットIFNα抗体とIL-1両者の共存によってほぼ完全にブロックされ、TNFによってもほぼ完全に抑えられた。従って、活性化マクロファージ培養上清中のT-キニノーゲン産生促進因子は、IFNα、IL-6両者であろうと考えられた。

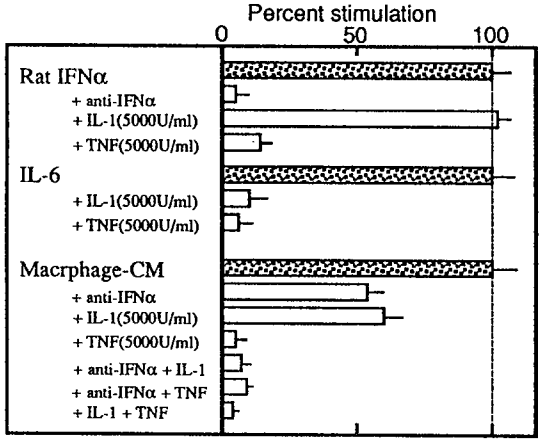


Fig. 16. Inhibition of macrophage conditioned medium-induced T-kininogen production by anti-IFN antibody, IL-1 or TNF. Rat hepatocytes were stimulated by rat IFNα (200 U/ml), IL-6 (100 U/ml) or macrophage conditioned medium (20%) in the presence or absence of anti-rat IFN antibody, IL-1 (5,000 U/ml) or TNF (5,000 U/ml). T-kininogen levels in culture supernatant were determined by RIA. Data are expressed as mean % of stimulant alone ± SD. CM, conditioned medium.

7.2 活性化T細胞由来のT-キニノーゲン産生促進因子の決定

第6章で明らかにしたサイトカイン間相互作用の性質と、抗ラットIFNα抗体を利用し、活性化T細胞から分泌されるT-キニノーゲン産生促進因子の決定を試みた。

7.2.1 実験方法

活性化T細胞培養上清の調製

第5章に従い胸腺細胞を調製し(4 x 10^6 cell/ml)、その5 ml をディッシュ(60 mm ϕ)に添加しConcanavalin A 2.5 μg/mlで24時間刺激し、Concanavalin Aを含まない培養液に交換した後さらに24 時間培養した。この培養上清を活性化T細胞培養上清として用いた。

肝細胞の処理

Concanavalin A活性化T細胞培養上清が20%含まれるように培養液を調製し、IL-1(5,000 U/ml)、抗ラットIFNα抗体(3,000 U/mlのラットIFNα の作用が抑えられる量)あるいはTNF (5,000 U/ml)をそれぞれ添加した。このように調製した液を前培養終了後の肝細胞に添加した。なお、Concanavalin Aそのものが肝細胞のT-キニノーゲン産生に影響しないことは、あらかじめ確認した。

その他の実験操作については、前節までに記載の操作法に従った。

7.2.2 実験結果および考察

結果をFig. 17に示し、活性化T細胞培養上清が示すT–キニノーゲン産生促進活性を100%として表示した。活性化T細胞培養上清中のこの刺激活性は、十分量の抗ラットIFNα抗体の共存によっても何ら影響を受けなかった。IL-1はIL-6のT–キニノーゲン産生促進活性を抑制することを第6章において明らかとしたが、培養上清中のこの活性も、IL-1によってほぼ完全に抑制された。さらに、TNFはIL-6、IFNα両者のT–キニノーゲン産生促進活性を抑制するが、同様に培養上清中の活性をほぼ完全に抑えた。従って、活性化T細胞培養上清中の因子はIL-6であろうと考えられた。

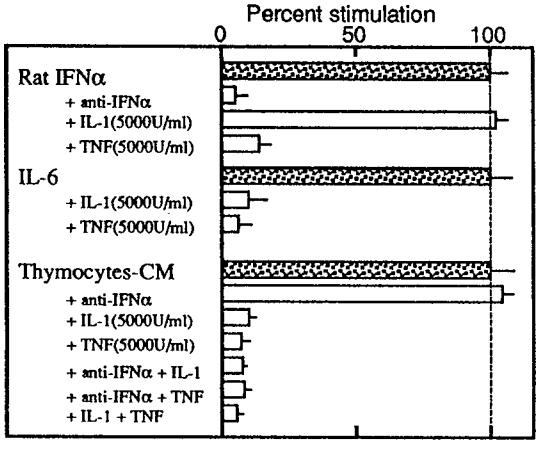


Fig. 17. Inhibition of thymocytes conditioned medium-induced T-kininogen production by IL-1 or TNF. Rat hepatocytes were stimulated by rat IFNα (200 U/ml), IL-6 (100 U/ml) or thymocytes conditioned medium (20%) in the presence or absence of anti-rat IFN antibody, IL-1 (5,000 U/ml) or TNF (5,000 U/ml). T-kininogen levels in culture supernatant were determined by RIA. Data are expressed as mean % of stimulant alone ± SD. CM, conditioned medium.

7.3 小括

第6章において明らかにしたサイトカイン間の抑制性相互作用の性質を利用して、活性化マクロファージや活性化T細胞が分泌する肝細胞T-キニノーゲン産生刺激因子が、何であるかを検討した。マクロファージ由来因子については、その活性が抗ラットIFNα抗体によってほぼ2分の1に、IL-1によってもほぼ2分の1に減少した。TNFは、このT-キニノーゲン産生刺激活性をほぼ消失させた。このようなマクロファージ由来因子の性質は、刺激活性のほぼ50%がIFNαに、残りの50%がIL-6に由来する場合に予想される結果である。T細胞由来因子については、その刺激活性がIL-1あるいはTNFによってほぼ消失し、抗ラットIFNα抗体によってまったく影響を受けなかった。このような性質は、刺激活性のほぼ100%がIL-6に由来する場合に予想される結果である。

以上の結果をまとめると、T細胞よりはIL-6が分泌され、一方、マクロファージからはIL-6、IFNα両者が分泌され、これらサイトカインが肝細胞のT-キニノーゲン産生を調節する細胞間情報伝達の最終段階のエフェクター分子として機能していると考えられた。しかし生体内のT-キニノーゲンの炎症急性期反応において、これら因子がどのような割合で寄与しているのかについての詳細は、更に検討が必要であると考えられた。

第8章　システインプロテアーゼインヒビターとしてのキニノーゲンの細胞増殖に対する影響

マウスにおいては、mCPI／LMWKの生体内濃度が、担癌状態、および炎症状態で上昇する。ラットにおいては、システインプロテアーゼインヒビターであるT-キニノーゲンの生体内濃度が炎症状態で上昇し、この現象は免疫担当細胞とそれらが産生するサイトカインによって引き起こされることを明らかにした。前章までに述べてきたこの現象(担癌状態、および炎症状態で、システインプロテアーゼインヒビターであるキニノーゲンの生体内濃度が増加する)の意義について考察するにあたり、本研究の出発点となった仮説「癌細胞の増殖･転移や炎症の進行に対して、プロテアーゼは促進的に機能しており、それに対抗･調節するための生体防御反応として、プロテアーゼインヒビターが産生される」に立ち戻り、細胞の増殖に対するシステインプロテアーゼインヒビターとしてのキニノーゲンの影響について、検討した。

8.1　Sarcoma 180 細胞、マウス胎児細胞、BALB/c 3T3細胞、SV40-3T3細胞の増殖に対する、mCPI／LMWK、T-キニノーゲン、卵白シスタチンの影響

細胞増殖に関連したプロテアーゼの作用については、従来セリンプロテアーゼを中心に研究されており[67,68]、システインプロテアーゼやその内因性インヒビターの、細胞増殖に対する直接作用に関する知見はまだ明らかにされていない。システインプロテアーゼインヒビターとしてのキニノーゲンの細胞増殖に対する影響の有無を調べるために、mCPI／LMWKに関する研究で使用したsarcoma 180細胞、正常細胞としてマウス胎児細胞、さらに、株化されてはいるが造腫瘍能は持たないBALB/c 3T3細胞と、これをウイルスで形質転換させたSV40-3T3細胞を検定細胞として用い、mCPI／LMWK、T-キニノーゲン、およびキニノーゲンではないタンパク性システインプロテアーゼインヒビターである卵白シスタチンの、細胞増殖に対する影響について検討した。

8.1.1 実験方法

細胞と培養液

Sarcoma 180癌細胞、正常細胞としてマウス胎児細胞(Meekらの方法[69]に従って妊娠13日目のICR系マウスから調製)、BALB/c 3T3細胞[70](大日本製薬)、SV40-3T3細胞[71](大日本製薬)を使用した。維持培養では3～4日おきに培地を交換し、confluentに到達したらトリプシン処理により継代した。ただしBALB/c 3T3細胞は、3～4日ごとに1～3 x 10^5 cell/60 mm ϕ dishの割合で継代した。Sarcoma 180癌細胞、マウス胎児細胞の場合は、*in vitro*に取り出してから3ないし4代継代したものを実験に使用した。培養液として、Sarcoma 180癌細胞、マウス胎児細胞の場合は、5%牛胎児血清(MAバイオプロダクツ)添加RPMI1640培地(日水製薬)、BALB/c 3T3細胞、SV40-3T3細胞の場合は5%牛胎児血清添加Dulbecco変法Eagle培地 (日水製薬)を用いた。

プロテアーゼインヒビターの処理

プロテアーゼインヒビターとして、mCPI／LMWK、T-キニノーゲン、卵白シスタチン(Barrettの方法[27]により鶏卵白より精製)を使用した。24穴マルチプレート(Corning)に2 x 10^4 cell/wellの密度で細胞を播種し、48時間の前培養をした。前培養終了後の培地をプロテアーゼインヒビターを含む培養液に交換(0.5 ml/well)の後、さらに48時間の培養を行った。

細胞増殖の測定

細胞増殖は、[^{3}H]-thymidine([^{3}H]-TdR, New England Nuclear)の酸不溶性分画への取り込みを測定することにより、その指標とした。プロテアーゼインヒビターによる48時間の処理のうち、最後の18時間を[^{3}H]-TdR(18.75 KBq/well)共存下で培養した。培養終了後、5%トリクロロ酢酸不溶性分画の放射能を、液体シンチレーションカウンター(パッカード460CD)にて測定した。結果は、プロテアーゼインヒビター無添加のコントロールに対するパーセントで表示した。

その他

有意差検定は、Student's t testにより行った。

その他の実験操作については、前節までに記載の操作法に従った。

8.1.2　実験結果および考察

4種類の細胞の増殖に対する、mCPI／LMWKの用量反応曲線を Fig. 18A に示した。mCPI／LMWKは、Sarcoma 180 細胞、BALB/c 3T3細胞、SV40-3T3細胞の[^{3}H]-TdR 取り込みを、濃度依存的に抑制した。一方マウス胎児細胞の[^{3}H]-TdR取込みは、mCPI／LMWKによって促進された。DNA量を測定することによっても、同様の作用が認められることを確認した。生体内濃度である数100 μg/ml において、mCPI／LMWKに細胞増殖抑制作用が認められたことより、生体内においても細胞増殖調節因子として機能し得ると考えられた。卵白シスタチンおよびT-キニノーゲンにもmCPI／LMWKと同様の細胞増殖抑制活性が認められた(Fig. 18B)。従って、mCPI／LMWKの細胞増殖抑制活性は、キニン前駆体としての機能ではなくシステインプロテアーゼインヒビターとしての性質に由来すると考えられた。この性質はシステインプロテアーゼインヒビター活性を有する他のキニノーゲンにも備わっていると考えられる。

増殖抑制活性発現における標的分子としては、細胞側のシステインプロテアーゼ、例えば分泌型の、あるいは膜極在性のシステインプロテアーゼが想定されるが、これに関する詳細な検討は行っていない。システインプロテアーゼと細胞増殖との関係に不明なことが多いことから、今後この観点からのアプローチにも興味がもたれる。

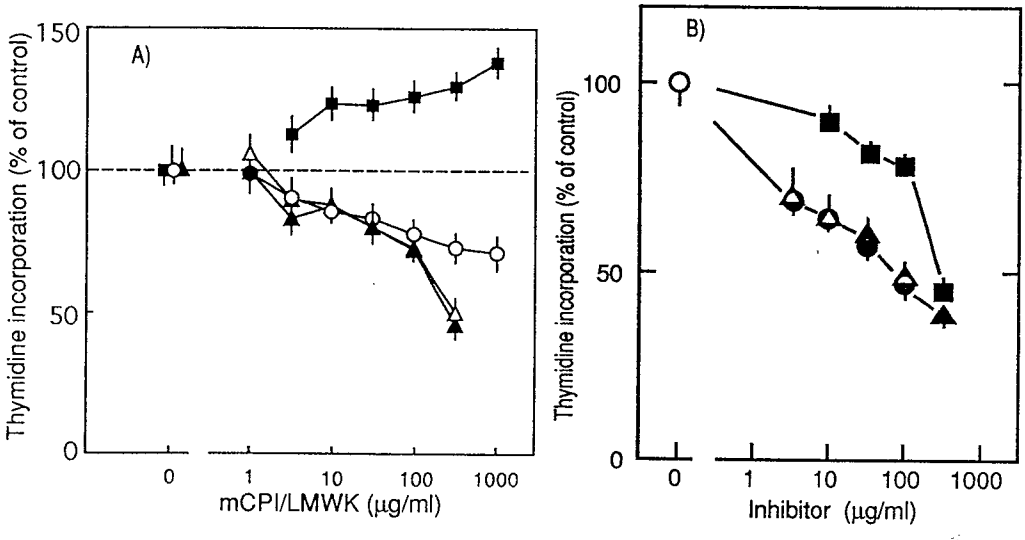


Fig. 18. Effects of mCPI/LMWK, T-kininogen and egg cystatin on cell growth. **A**, Sarcoma 180 cells (○), BALB/c 3T3 cell (△), SV40-3T3 cells (▲) and mouse embryo cells (■) were plated (2 x 10^4 cells/well). After precultured for 48 hr, cells were treated with mCPI/LMWK for 48 hr. **B**, SV40-3T3 cells were plated (2 x 10^4 cells/well). After precultured for 48 hr, cells were treated with mCPI/LMWK (■), T-kininogen (●) and egg cystatin (▲) for 48 hr. Cells were pulsed with [^{3}H]thymidine for final 18 hr of the culture. Harvested cells were subjected to determination for the relative amounts of incorporated label per well. Data are expressed as means ± SD of 4 cultures.

8.2 SV40-3T3細胞のDNA、RNA、タンパク質合成に対するmCPI／LMWKの影響

前節において、mCPI／LMWKの、細胞増殖抑制作用に対して感受性の高かった細胞であるSV40-3T3細胞を用いて、その増殖抑制作用がDNA合成の抑制にもとづくものであるかを調べるために、DNA、RNA、タンパク質合成に対する影響を比較した。

8.2.1　実験方法

SV40-3T3細胞のmCPI／LMWKによる処理

24穴プレートに1 x 10^4 cell/wellの密度で細胞を播種し、48時間の前培養をし、前培養終了後の培地をmCPI／LMWKを含む培養液に交換(0.5 ml/well)の後、さらに48時間の培養を行った。

DNA、RNA、タンパク質合成の測定

DNA、RNA、タンパク質合成測定のための放射性標識体として、それぞれ、[^{3}H]-TdR、[^{14}C]-Uridine (New England Nuclear)、[^{3}H]-Methionine(New England Nuclear)を用いた。培養最後の24時間を、^{3}Hの場合は6 x 10^6 Bq/well、^{14}Cの場合は1.2 x 10^6 Bq/well、の濃度で共存させた。^{14}Cと^{3}Hは、同時計測が可能なため、[^{14}C]-Uridineと[^{3}H]-Methionineは同一wellに添加した。培養終了後、酸不溶性分画の放射能を前節と同様に液体シンチレーションカウンターにより測定した。

なお、その他の実験操作については、前節までに記載の操作法に従った。

8.2.2　実験結果および考察

SV40-3T3細胞のRNA、タンパク質合成は、mCPI／LMWKの存在によってわずかに影響される程度であり、mCPI／LMWK 1,000 μg/mlにおいても約10%しか抑制は認められなかった(Fig. 19)。DNA合成に対する抑制のみがきわだって現れていることから、mCPI／LMWKは何らかの機序によってDNA合成を抑制することで細胞増殖を抑制したと考えられた。

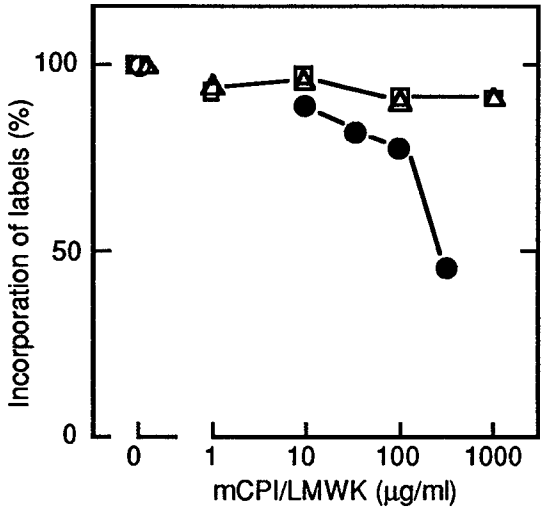


Fig. 19. Effects of mCPI/LMWK on DNA, RNA and protein synthesis of SV40-3T3 cells. SV40-3T3 cells were plated at a density of 2 x 10^4 cells/well. After precultured for 48 hr, cells were treated with mCPI/LMWK for 48 hr and pulsed with [^{3}H]-thymidine (●), [^{14}C]-uridine (▲) or [^{3}H]-methionine (■) for final 24 hr of the culture. Harvested cells were subjected to determination for the relative amounts of incorporated label per well. Data are expressed as means ± SD of 4 cultures

8.3 mCPI／LMWKのSV40-3T3細胞の細胞周期上の作用点

細胞周期は、G_0/G_1、S、G_2、M、の各期に分類されるが、これまでに知られている細胞増殖調節因子は、細胞周期上に特定の作用点を有している。そこで、mCPI／LMWKの細胞増殖抑制作用の作用機序･作用点を明らかにするために、SV40-3T3細胞を用いて、フローサイトメトリーを用いての細胞周期の解析と、ラベリングインデックスの測定による、S期細胞の存在割合の測定を行った。

8.3.1 実験方法

分析のための細胞調製

フローサイトメトリーによる細胞周期解析は、対数増殖期のSV40-3T3細胞を3×10^5 cell /60mm ϕ dishとなるように播種し48時間前培養した。この細胞をmCPI／LMWK 1 mg/mlで48時間処理した後トリプシンにより単離細胞とし、エタノール固定を行った。固定した細胞を1 mg/mlのRNase(Type I A, Sigma)でPBS中37℃30分間処理することによってRNAを分解した。このように調製した細胞をフローサイトメトリーによる細胞周期解析に使用した。なお、mCPI／LMWK無添加で同様に操作した細胞を対照とした。

ラベリングインデックスの測定[72]のためには、対数増殖期のSV40-3T3細胞を2×10^3 cell/well となるようにあらかじめガラスカバースリップを敷いた24穴プレートに播種し、72時間前培養の後mCPI／LMWK 1 mg/ml を含む培養液に交換した。24時間あるいは48時間の処理を行ない、それぞれ最後の1時間をチミジンのアナログであるブロモデオキシウリジン(BrdU, Amersham)10 μMでラベルした。培養後の細胞は、エタノール-酢酸(95:5)で固定した。このように調製した細胞を、ラベリングインデックス測定のために使用した。なお、mCPI／LMWK無添加で同様に操作した細胞を対照とした。

フローサイトメトリー

RNase処理した細胞は、PBS中0.1 μg/mlのプロピジュウムイオダイドにてDNAを染色した。細胞あたりのDNA量に対応する蛍光強度をフローサイトメーター(Epics 750, Coulter)をで測定した。結果は、Bruce Bagwellのアルゴリズムにもとづいた Multiparameter Data Acquisition and Display System(Coulter)の細胞周期解析プログラムを使用して解析した。

ラベリングインデックス

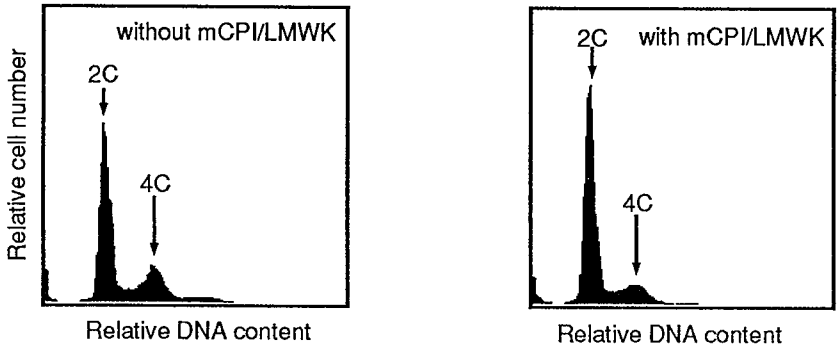
内因性パーオキシダーゼを2%過酸化水素水処理により失活させた後、DNAに取り込まれたBrdUを、モノクローナルマウス抗BrdU IgG(Amersham)、パーオキシダーゼ標識抗マウスIgGを用いて検出した[72]。発色反応後の細胞について各300個の細胞を検鏡し、核が染まっている(BrdU存在時にDNA合成を行った)細胞を計数した。観察細胞数に対する核が染まっている細胞のパーセントをラベリングインデックスとした。

なお、その他の実験操作については、前節までに記載の操作法に従った。

8.3.2 実験結果および考察

フローサイトメトリーによる細胞周期の解析結果をFig. 20に示した。ヒストグラムに示したように、mCPI／LMWK共存下で培養することによって、G_0/G_1期の細胞によって構成されるピーク(2C)が高くなり、G_2+M期の細胞によって構成されるピーク(4C)が低下した。この結果をBruce Bagwellの細胞周期解析プログラムによって解析すると、下段に示したようにmCPI／LMWK処理によって、G_0/G_1期の細胞の割合は22%増加し、S期およびG_2+M期の細胞の割合がいずれも11%減少した。この結果より、mCPI／LMWK処理によってSV40-3T3細胞の細胞周期は、G_0/G_1期からS期への移行が阻害されたと考えられた。mCPI／LMWK処理による、SV40−3T3細胞のラベリングインデックスの変化をTable 4に示した。ラベリングインデックスは、この実験系ではBrdUによる1時間のパルスラベル中にS期に位置していた細胞の割合を示す数値であるが、mCPI／LMWK処理によってこの値が約20%低下した。

これらの結果より、mCPI／LMWKの細胞増殖抑制作用の発現における細胞周期上の主要な作用点は、G_1期からS期への移行段階であることが判明した。



phase	% of total	
	without mCPI/LMWK	with mCPI/LMWK
$G_0 + G_1$	39	61
S	38	27
$G_2 + M$	23	12
CV	5.07	6.52

Fig. 20. DNA distributions obtained by flow cytometric analysis of SV40-3T3 cells. SV40-3T3 cells were plated at a density of 3 x 10^5 cells/60 mm ϕ dish. After precultured for 48 hr, cells were treated with mCPI/LMWK (1 mg/ml) for 48 hr. Flow cytometric analysis was caryied out as described in text.

Table 4. Labling index of SV40-3T3 cells cultured with or without mCPI/LMWK

Treatment with mCPI/LMWK (hr)	mCPI/LMWK	Labeled nuclei (nuclei/300 cells)	Labeling index (%)
24	–	120 ± 6	40.0 ± 1.8
	+	95 ± 8[a]	31.7 ± 2.7
48	–	121 ± 5	40.2 ± 1.7
	+	97 ± 12[b]	32.2 ± 4.1

Data are expressed as means ± SD of 4 cultures.
Significantly different from control: [a], $p < 0.001$; [b], $p < 0.01$.

8.4 小括

炎症状態あるいは担癌状態において、システインプロテアーゼインヒビターであるキニノーゲンの生体内濃度が増加することの意義について考察するために、本研究の出発点となった仮説「癌細胞の増殖・転移や炎症の進行に対してプロテアーゼは促進的に機能しており、それに対抗・調節するための生体防御反応として、プロテアーゼインヒビターが産生されるのではないか」に立ち戻り、細胞の増殖に対するシステインプロテアーゼインヒビターとしてのキニノーゲンの影響について検討した。

mCPI／LMWKはその生体内濃度において、sarcoma 180細胞、BALB/c 3T3細胞、およびSV40-3T3細胞の増殖を濃度依存的に抑制し、マウス胎児細胞の増殖を促進した。癌細胞移植によるmCPI／LMWKレベルの上昇の意義について考えるとき、上記の仮説に矛盾しない非常に興味ある結果が得られた。同様な活性はT-キニノーゲンや卵白シスタチンにも認められた。従ってmCPI／LMWKが示した細胞増殖調節活性は、システインプロテアーゼインヒビターとしての性質にもとづくと考えられた。この増殖抑制作用がDNA合成の抑制にもとづくものであるかを調べるために、DNA、RNA、タンパク質合成に対する影響を比較した。その結果、DNA合成に対する抑制のみがきわだって現れた。mCPI／LMWKの細胞増殖抑制作用の、細胞周期上の作用点についてフローサイトメトリーとラベリングインデックス測定によって検討したところ、G_1期からS期への移行が抑制されていることが明らかとなった

総括

1. マウスシステインプロテアーゼインヒビター／低分子キニノーゲンの精製と諸性質

癌に関連したシステインプロテアーゼ活性の上昇に対する、宿主の対抗措置としてのインヒビターレベルの増加、という仮説にもとづいて、正常マウス血漿、sarcoma 180担癌マウス血漿および腹水を用いて、システインプロテアーゼであるパパインを阻害する活性を検索、比較した。その結果、マウス血漿中にパパイン阻害活性を認めた。この阻害活性は担癌マウス血漿では正常マウスに対して高値を示し、癌性腹水にも担癌マウス血漿に匹敵する阻害活性が認められ、担癌宿主の生体内でシステインプロテアーゼインヒビターレベルが増加していることが確かめられた。そこで、この阻害活性の本体の分子の精製を試みた。その結果、マウスシステインプロテアーゼインヒビターを癌性腹水から4段階の操作で完全精製した。その分子量は、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動において67,000であった。精製したインヒビター分子の阻害スペクトルを調べたところ、パパイン、カテプシンB、Lといったシステインプロテアーゼの活性に対して阻害作用を示したが、他のクラスのプロテアーゼに対しては阻害を示さず、システインプロテアーゼに対する特異的な阻害作用が認められた。

マウス癌性腹水から精製したシステインプロテアーゼインヒビターが、キニノーゲンである可能性について検討した。マウスシステインプロテアーゼインヒビターは、トリプシンやマウスカリクレイン処理によってブラジキニンを遊離し、T-キニンの遊離は認められなかった。化学量論的にその割合は、インヒビター1分子からキニン1分子と計算された。部分アミノ酸配列を解析したところ、アミノ末端の40残基、キニン部分を含みカルボキシ末端までの54残基の1次構造が判明した。マウスシステインプロテアーゼインヒビターは、1次構造上でもキニノーゲンの特徴を示し、他の動物種由来の既知の低分子キニノーゲンに類似するが、高分子キニノーゲンに特徴的な構造は認められなかった。高分子キニノーゲン様活性を持たないこと、ならびに、分子量、構造、活性、から判断して、この分子はマウス低分子キニノーゲンであると結論した。以後、この分子

をマウスシステインプロテアーゼインヒビター／低分子キニノーゲン(mCPI／LMWK)と称する。

mCPI／LMWKに対する抗体を作成し、この抗体を用いたイムノブロット分析によって、血漿と腹水について抗原存在の有無およびその分子量を比較した。正常マウス血漿、担癌マウス血漿、担癌マウス腹水いずれにおいてもmCPI／LMWKに相当するバンドが染色され、血漿中分子と腹水中分子は分子量的にも免疫化学的にも区別できなかった。そこで、次に担癌状態におけるmCPI／LMWKの量的変動について調べるために、特異的イムノアッセイ系を作成した。この系を用いて癌細胞移植後の血漿濃度の変化を調べたところ、腫瘍の増殖にともなってmCPI／LMWK濃度の増加を認めた。システインプロテアーゼインヒビター活性も同様の増加パターンを示したこと、および、mCPI／LMWKが腹水中に存在する主要なシステインプロテアーゼインヒビターであったこと等より、担癌状態における血中および腹水中で認められたシステインプロテアーゼインヒビター活性の増加は、mCPI／LMWK量の増加にもとづくことを明らかにした。

一方、LMWKと構造上の類似性が高いラットT-キニノーゲンが炎症急性期タンパク質であることから、mCPI／LMWKの炎症における変動を調べたところ、その血漿濃度は、起炎刺激を与えることによって上昇した。従って、mCPI／LMWKも炎症急性期タンパク質としての性格を有することが判明した。癌の増殖部位で起きている現象は、ある面では炎症反応としての性格も合わせ持っており、担癌状態での濃度上昇と炎症急性期反応としての濃度上昇は、同じ様な意味を持つのかもしれない。また、mCPI／LMWKの由来は、培養sarcoma 180細胞がmCPI／LMWKを産生しないこと、正常マウス血中にも存在すること、キニノーゲンであること、マウス初代培養肝細胞が、mCPI／LMWK抗体反応性分子を分泌すること、などから、この分子は宿主由来のタンパク質であり、担癌時や炎症時にはその肝細胞での合成分泌が盛んになり、担癌状態において循環血中から腹腔内に浸出したものと考えられた。

2. ラットT-キニノーゲンの炎症急性期反応機序

ところで、ラットT-キニノーゲンに関しては、炎症急性期タンパク質であることは明らかにされているが、炎症急性期反応の詳細な機序は不明であった。血中キニノーゲン

の産生臓器が肝臓であるため、肝臓での産生速度の上昇がその原因であると考えられた。この現象が起きるためには、肝細胞がなんらかの方法で炎症が起きていることを感知しなければならない。すなわち炎症部位から肝臓へのT-キニノーゲン産生を刺激するための情報伝達系の存在が必要である。そこで、T-キニノーゲンの炎症急性期反応を司令する炎症部位から肝臓への情報伝達系に、免疫担当細胞が介在する可能性について検討した。T-キニノーゲンの炎症急性期反応が起きるまでの過程に、起炎刺激によって活性化された免疫担当細胞が主役を演じる段階があるならば、まさに炎症急性期反応が起きているラットから調製した免疫担当細胞を、無刺激の正常なラットに移入することで、T-キニノーゲンの炎症急性期反応が再現されるはずである。起炎刺激後、血漿キニノーゲン濃度がピークとなる直前に活性化免疫担当細胞を回収し、別の同系正常ラットに移入した。その結果、免疫担当細胞の移入によってキニノーゲンの急性期反応が再現された。

次に、免疫担当細胞と肝細胞とだけから構成される*in vitro* の細胞培養系を用いて解析した。炎症巣浸出細胞、あるいは炎症ラット脾細胞と肝細胞をメンブランフィルターを隔ててcocultureすることによってT-キニノーゲンの産生は促進された。この結果は、*in vivo*で活性化されたこれら細胞より、肝細胞のT-キニノーゲン産生を促進させる何らかの液性因子が分泌されていることを示すものである。この炎症巣に浸出した細胞のほとんどはマクロファージと同定されたが、あらかじめマクロファージを調製し*in vitro*で刺激した後に肝細胞と培養しても同様の結果が得られた。また、*in vitro*活性化T細胞にもT-キニノーゲン産生促進作用を認めた。

活性化免疫担当細胞から分泌されるT-キニノーゲン産生促進因子がサイトカインであると想定し、他の急性期タンパク質の産生調節に関わることが知られているインターロイキン-1(IL-1)、腫瘍壊死因子(TNF)を含めて、種々のサイトカインについて、その肝細胞T-キニノーゲン産生促進能の有無について検討した。その結果、IL-6とインターフェロン(IFN)αにT-キニノーゲン産生促進活性が存在することを認めた。IL-6とIFNαは、生体内へ投与した場合ににおいても、血漿T-キニノーゲン濃度の上昇作用を示した。従って、IL-6、IFNαが炎症時に産生されるならば、これらサイトカインは生体内においてもT-キニノーゲン産生を調節できるものと予想された。

生体内においては、複数のサイトカインが同一の標的細胞に作用し、お互いの作用発

現を修飾・調節しているものと思われる。そこで、T-キニノーゲン産生を促進したサイトカインであるIL-6、IFNαの作用に対して、IL-1、TNFが影響するか否かについて検討した。その結果、IL-6、IFNαのT-キニノーゲン産生促進作用は、TNFによって抑制された。IL-6のT-キニノーゲン産生刺激作用は、IL-1によって抑制されたが、IFNαの刺激作用は修飾されなかった。これらサイトカイン間の相互作用は、細胞内情報伝達系が修飾されているためであると考えられた。

次に、活性化マクロファージや活性化T細胞が分泌する肝細胞T-キニノーゲン産生刺激因子が、それぞれ何であるかを調べた。ラットのIL-6、IFNαに関しては、IFNαとそれに対する抗体のみが入手可能であった。そこで、抗ラットIFNαと、上記のサイトカイン間相互作用を利用して検討した。マクロファージ由来因子については、その活性が抗ラットIFNα抗体によってほぼ２分の１に、IL-1によってもほぼ２分の１に減少した。TNFは、このT-キニノーゲン産生刺激活性をほぼ消失させた。このような性質は、刺激活性のほぼ50%がIFNに、残りの50%がIL-6に由来する場合に予想される結果である。T細胞由来因子については、その刺激活性がIL-1あるいはTNFによってほぼ消失し、抗ラットIFNαによってまったく影響を受けなかった。このような性質は、刺激活性のほぼ100%がIL-6に由来する場合に予想される結果である。T細胞からはIL-6が分泌され、一方、マクロファージからはIL-6、IFNα両者が分泌され、肝細胞のT-キニノーゲン産生を調節する細胞間情報伝達の最終段階のエフェクター分子として機能していると考えられた。なお、mCPI／LMWKの担癌あるいは炎症時における生体内濃度の上昇については、T-キニノーゲンの場合と類似の免疫系の関与を予想させる結果は得られていない。

3. システインプロテアーゼインヒビターであるキニノーゲンの細胞増殖に対する影響

炎症状態あるいは担癌状態において、システインプロテアーゼインヒビターであるキニノーゲンの生体内濃度が増加することの意義について考察するにあたり、本研究の出発点となった仮説「癌細胞の増殖･転移や炎症の進行に対して、プロテアーゼは促進的に機能しており、それに対抗･調節するための生体防御反応として、プロテアーゼインヒビターが産生されるのではないか」に立ち戻り、細胞の増殖に対するシステインプロ

テアーゼインヒビターとしてのキニノーゲンの影響について検討した。

mCPI／LMWKはその生体内濃度において、sarcoma 180細胞、BALB/c 3T3細胞、およびSV40-3T3細胞の増殖を濃度依存的に抑制し、マウス胎児細胞の増殖を促進した。癌細胞移植によるmCPI／LMWKレベルの上昇の意義について考えるとき、非常に興味ある結果が得られた。同様な活性は、T-キニノーゲンや卵白シスタチンにも認められた。従って、mCPI／LMWKが示した細胞増殖調節活性は、システインプロテアーゼインヒビターとしての性質にもとづくと考えられた。mCPI／LMWKの細胞増殖抑制作用の、細胞周期上の作用点についてフローサイトメトリーとラベリングインデックス測定によって検討したところ、G_1期からS期への移行が抑制されていることが明らかとなった。細胞の増殖と細胞自身が産生するシステインプロテアーゼの関係、さらには細胞周期の進行とシステインプロテアーゼの関係は現在明らかでなく、細胞周期のG_1期からS期への移行に必要なシステインプロテアーゼが、mCPI／LMWKの標的分子となっている可能性が十分に考えられた。

以上、本研究で見いだしたいくつかの事実は、キニノーゲンの癌・免疫・細胞増殖との関わりを示すものであり、従来知られていなかったキニノーゲンの新たな側面を明らかにできたものと考えられた。

結論

担癌・炎症状態におけるシステインプロテアーゼインヒビターならびにキニノーゲンに関する研究の結果、以下の結論を得た。

1. マウス血漿中ならびに癌性腹水中には、システインプロテアーゼインヒビターが存在し、この分子はマウスの低分子キニノーゲン(mCPI／LMWK)である。
2. 癌や炎症の進行にともなって、mCPI／LMWKの血漿中濃度は増加する。
3. ラットT-キニノーゲンの血漿中濃度も、起炎刺激によって上昇するが、この現象には免疫担当細胞が関わっており、IL-6、IFNαをエフェクター分子とする肝細胞のT-キニノーゲン合成速度の上昇として説明できる。
4. mCPI／LMWKならびにT-キニノーゲンは、sarcoma180癌細胞、SV40-3T3細胞などの増殖を抑制し、その作用はシステインプロテアーゼインヒビターとしての作用である。
5. mCPI／LMWKの細胞増殖抑制機序は、細胞周期のG_1期からS期への移行を抑制することにもとづく。

このように、システインプロテアーゼインヒビターであるキニノーゲンは、癌・免疫・細胞増殖と密接な関わりを持ち、生体防御機構の一部を構成している分子として位置付けることができた。

謝辞

本研究の遂行と本論文をまとめる過程で、終始御指導御鞭撻を賜りました神戸学院大学薬学部教授、岡本博先生に深く感謝致します。

本論文の発表とまとめに際して御指導と御便宜を御図り下さいました、大阪大学薬学部教授、真弓忠範先生に心から感謝致します。

また、本研究の遂行は次の多くの方々の御協力なしにはなしえませんでした。IL-6を御分与いただいた大阪大学細胞工学センター岸本忠三教授、大阪大学医学部バイオメディカルセンター平野俊夫教授。IL-1、TNFを御分与いただいた大日本製薬株式会社、IFNαを御分与いただいた林原生物化学研究所。mCPI／LMWKの構造解析で御協力いただいた九州大学理学部岩永貞昭教授、徳島大学工学部末吉達也博士。肝細胞の初代培養とフローサイトメトリーによる細胞周期解析に関して御指導、御協力いただいた神戸学院大学薬学部、学部長浜尭夫先生、川野博子講師、河合裕一助手。大学院学生として実験に御協力いただいた屋山勝俊、上荷匡洋の両氏や、八田晶子元副手を始めとする神戸学院大学薬学部薬理学講座の諸氏、以上の方々に深く感謝致します。

参考文献

1. Müler-Esterl, W., Iwanaga, S., Nakanishi, S., Trends Biochem. Sci., **11**, 336-339 (1986)
2. Okamoto, H., Greenbaum, L. M., Biochem. Biophys. Res. Commun., **112**, 701-708 (1983)
3. Greenbaum, L. M., Okamoto, H., Methods Enzymol., **163**, 272-281 (1988)
4. Enjyoji, K., Kato, H., Hayashi, I., Oh-ishi, S., Iwanaga, S., J. Biol. Chem., **263**, 973-979 (1988)
5. Barlas, A., Okamoto, H., Greenbaum, L. M., Biochem. Biophys. Res. Commun., **129**, 280-286 (1985)
6. Borges, D. R., Gordon, A. H., J. Pharm. Pharmacol., **28**, 44-48 (1976)
7. Kageyama, R., Kitamura, N., Ohkubo, H., Nakanishi, S., J. Biol. Chem., **260**, 12060-12064 (1985)
8. Wunderer, G., Walter, I., Müller, E., Henschen, A., Biol. Chem. Hope-Seyler, **367**, 1231-1234 (1986)
9. Ohkubo, I., Kurachi, K., Takasawa, T., Shiokawa, H., Sasaki, M., Biochemistry, **23**, 5691-5697 (1984)
10. Sueyoshi, T., Enjyoji, K., Shimada, T., Kato, H., Iwanaga, S., Bando, Y., Kominami, E., Katunuma, N., FEBS Lett., **182**, 193-195 (1985)
11. Kitamura, N., Kitagawa, H., Fukushima, D., Takagaki, Y., Miyata, T., Nakanishi, S., J. Biol. Chem., **260**, 8610-8617 (1985)
12. Teno, N., Tsuboi, S., Itoh, N., Okamoto, H., Okada, Y., Biochem. Biophys. Res. Commun., **143**, 749-752 (1987)
13. Duffy, M. J., Eur. J. Cancer Clin. Oncol., **23**, 583-587 (1987)
14. Liotta, L. A., Cancer Res., **46**, 1-7 (1986)
15. Poole, A. R., In: Dingle, J.T., (ed.), Lysosomes in Biology and Pathology, Vol. 3, pp. 303-337, Amsterdam: North Holland-Elsevier, (1973)
16. Dano, K., Andersen, P. A., Grondahl-Hansen, J., Adv. Cancer Res., **44**, 146-157 (1985)
17. Mignatti, P., Robbing, E., Rifkin, D. B., Cell, **47**, 487-498 (1986)
18. Poole, A. R., Tiltman, K. J., Recklies, A. D., Stocker, T. A. M., Nature, **273**, 545-547 (1978)
19. Denhardt, D. T., Hamilton, R. T., Parfett, C. L. J., Edwards, D. R., Pierre, R. St.,

Waterhouse, P., Nilsen-Hamilton, Cancer Res., **46,** 4590-4593 (1986)

20. Gal, S., Gottesman, M. M., Biochem. Biophys. Res. Commun., **139,** 156-162 (1986)
21. Gal, S., Gottesman, M. M., J. Biol. Chem., **261,** 1760-1765 (1986)
22. Fritz, H., Jochum, M., Duswald, K. H., Ditter, H., Kortmann, H., Neumann, S., Lang, H., In: Tschesche, H., (ed.), Proteinases in Inflammation and Tumor Invasion, pp. 1-24, New York: Walter de Gruyter, (1986)
23. Recklies, A. D., Tiltman, K. J., Stoker, T. A. M., Poole, A. R., Cancer Res., **40**, 550-556, (1980)
24. Sloane, B. F., Dunn, J .R., Honn, K. V., Science, **212,** 1151-1153 (1981)
25. Gottesman, M. M., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **75,** 2767-2771 (1978)
26. Barrett, A. J., Anal. Biochem., **47,** 280-293 (1972)
27. Barrett, A. J., Methods Enzymol., **80**, 771-778 (1981)
28. Okamoto, H., Itoh, N., Uwani, M., Biochem. Pharmacol., **36,** 3069-3073 (1987)
29. Laemmli, U. K., Nature, **227** 680-685 (1970)
30. Bradford, M., Anal. Biochem., **72**, 248-254 (1976)
31. Barrett, A. J., Kirschke, H., Methods Enzymol., **80**, 535-561 (1981)
32. Takahashi, T., Tang, J., Methods Enzymol., **80**, 565-581 (1981)
33. Henderson, P. J. F., Biochem. J., **127**, 321-333 (1972)
34. Angeletti, M., Sbaraglia, G., De Campora, E., Frati, L., Life Sci., **12**, 297-305 (1973)
35. Kageyama, R., Kitamura, N., Ohkubo, H., Nakanishi, S., J. Biol. Chem., **262**, 2345-2351 (1987)
36. Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **76**, 4350-4354 (1979)
37. Tsang, V. C. W., Peralta, J. M., Simons, A. R., Methods Enzymol., **92**, 377-391 (1983)
38. Nishida, Y., Sumi, H., Mihara, H., Cancer Res., **44**, 3324-3329 (1984)
39. Kampschmidt, R. F., Upchurch, H. F., Pulliam, L. A., Ann. NY. Acad. Sci., **389**, 338-353 (1982)
40. Oppenheeim, J., Stadler, B. M., Siraganian, R. P., Mage, M., Mathieson, B., Fed. Proc., **41**, 257-262 (1982)
41. Bauer, J., Weber, W., Tran-Thi, T., Northoff, G., Decker, K., Gerok, W., Heinrich, P. C., FEBS Lett., **190**, 271-274 (1985)

42. Yoshinaga, M., Nakamura, S., Hayashi, H., J. Immunol., **115**, 533-538 (1975)

43. Mishell, B. B., Shiigi S. M., Chan, E. L., In: Mishell, B. B., and Shiigi, S. M., (eds.), Selected Methods in Celluler Immunology, pp. 3-27, New york: W. H. Freeman and Company, (1973)

44. Mosier, D. E., Science, **158**, 1573-1575 (1967)

45. Lewis, G. K., Kamin, R., In: Mishell, B. B., and Shiigi, S. M., (eds.), Selected Methods in Celluler Immunology, pp. 227-234, New york: W. H. Freeman and Company, (1973)

46. Seglen, P. O., Methods Cell Biol., **13**, 30-81 (1976)

47. Tanaka, K., Sato, M., Tomita, Y., Ichihara, A., J. Biochem., **84**, 937-946 (1978)

48. Ichihara, A., Nakamura, T., Tanaka, K., Tomita, Y., Aoyama, K., Kato, S., Shinno, H., Ann. NY. Acad. Sci., **349**, 77-84 (1980)

49. Yamamura, Y., Saitoh, K., Yodoi, J., Shirai, T., Immunopharmacol. Therapy, **4**, 61-81 (1986)

50. Gallily, R., Feldman, M., Immunology, **12**, 197-202 (1967)

51. Koj, A., In: Allison, ,A. C., (ed.), Strcture and Function of Plasma Proteins, pp. 73-89, Springer-Verlag, Berlin, (1974)

52. Sipe, J. D. , S. W. Vogel, M. B. Sytein, et. al., Ann. NY Acad. Sci., **389**, 137-150 (1982)

53. Ritchie, D. G., Fuller, G. M., Ann. NY. Acad. Sci., **408**, 490-502 (1983)

54. Zilberstein, A., Ruggieri, R., Korn,J.H., Revel, M., EMBO J., **5**, 2529-2533 (1986)

55. Sehgal, P. B., May, L. T., Tamm, I., Vilcek, J., Science, **235**, 731-732 (1987)

56. Andus, T., Geoger, T., Hirano, T., Northoff, H., Ganter, U., Bauer, J., Kishimoto, T., Heinrich, O. C., FEBS Lett., **221**, 18-22 (1987)

57. Mark, C., Moslay, B., Alf, L., Nature, **315**, 641-645 (1985)

58. Oppenheim, J. J., Kovacs, E. J., Matushima, K., Immunil. Today, **7**, 45-56 (1986)

59. Pennica, D., Nedwin, G. E., Hayflick, J. S., Nature, **312**, 724-729 (1986)

60. Dinarello, C. A., Cannon, J. G., Wolff, S. M., Bernheim, H. A., Beutler, B., Cerami, A., Figari, I. S., Paladino, A. Jr., O'conner, J. V., J. Exp. Med., **163**, 1433-1450 (1986)

61. Baumann, H., Jahreis, G. P., Sauder, D. N., Koj, A., J. Biol. Chem., **259**, 7331-7342 (1984)

62. Hirano, T., and Kishimoto, T., In: Spornn M. B. and Roberts A. B., (eds.), Handbook of Experimental Pharmacology: Peptide Growth Factors and Their Receptors, pp. 633-656, Springer-Verlag, Berlin, (1989)

63. Isscs, A., Lindenmann, J., Virus interference, **147**, 258-265 (1957)

64. Hirano, T., Matuda, T., Hosoi, K., Okano, A., Matui, H., Kishimoto, T., Immunol. Lett., **17**, 41-45 (1988)

65. William, T. W., Bellani, J. A., Immunol., **130**, 518-520 (1983)

66. Williamson, B. D., Carswell, E. A., Rubin, B. Y., Prendergast, J. S., Old, L. J., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **80**, 5397-5401 (1983)

67. Burger, M. M., Nature, **227**, 170-171 (1970)

68. Schnebli, H. P., Burger, M. M., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **69**, 3825-3827 (1972)

69. Meek, R. L., Bowman, P. D., Daniel, C. W., Exp. Cell Res., **107**, 277-284 (1977)

70. Aronson, S. A., Todaro, G. T., J. Cell. Physiol., **72**, 141-145 (1968)

71. Todaro, G. T., Science, **162**, 1024-1027 (1968)

72. Gratzner, H. G., Leif, R. C., Ingram, D. J., Castro, A., Exp. Cell Res., **95**, 88-94 (1975)