

Serine proteinase inhibitor, aprotinin, efficiently inhibits destruction of bovine vascular endothelial cells by choriocarcinoma cells

メタデータ	言語: jpn 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-30 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 杉村, 基 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/992

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 139号	学位授与年月日	平成 5年 3月26日
氏名	杉村 基		
論文題目	Serine proteinase inhibitor, aprotinin, efficiently inhibits destruction of bovine vascular endothelial cells by choriocarcinoma cells (セリンプロテアーゼ阻害剤アプロチニンを用いた絨毛癌細胞による血管内皮細胞破壊の抑制)		

医学博士 杉村 基

論文題目

Serine protease inhibitor, aprotinin, efficiently inhibits destruction of bovine vascular endothelial cells by choriocarcinoma cells

(セリンプロテアーゼ阻害剤アプロチニンを用いた絨毛癌細胞による血管内皮細胞破壊の抑制)

論文の内容の要旨

〔目的〕 悪性腫瘍細胞が遠隔転移を形成するには、複数の過程を経なければならない。血行性転移の場合には、原発病巣から血管内に流入し遠隔臓器下血管内皮に接着ののち、血管内皮下間質に接触することが必須である。従来、癌培養細胞と培養血管内皮細胞を用いた *in vitro* モデルでは、腫瘍細胞は接着した血管内皮細胞間を開裂し血管外に流出することが観察されてきた。そこで、当科で樹立したヒト絨毛癌細胞株 (SMT-ccl) を用いてウシ肺動脈血管内皮細胞 (CPAE) との相互関係を検討し、血管外流出の機序解明とその抑制を目的として本研究を行った。

〔方法〕 37°C 5% CO₂ 下10%補体不活化 fetal calf serum (FCS) 加 RPMI-1640 で継代培養中のヒト絨毛癌細胞株および37°C 5% CO₂ 下20% FCS 加 MEM で24代継代培養したウシ肺動脈血管内皮細胞を用いて検討を行った。1) SMT-ccl 細胞を chamber slide 上に播種、培養し、urokinase-type plasminogen activator (uPA) 抗原の局在を免疫組織学的に検討した。一次抗体には uPA に対する単クローン抗体を用い、alkalin phosphatase anti-alkaline phosphatase 法により染色した。2) 96-well plate に SMT-ccl 細胞を播種、培養し、enzyme linked immunosorbent assay法を用いて細胞表面の uPA およびその受容体について免疫学的測定を行った。酸処理による受容体結合 uPA 除去ののち、High molecular weight-uPA (HMW-uPA) を添加、受容体を飽和した。3) 2)と同様に培養し uPA 活性を合成基質法により測定した。4) SMT-ccl 細胞を破碎し、その上清中の pro-uPA および HMW-uPA を Immunosorbentamidolytic assay法により測定した。5) aprotinin (20 μg/ml) 添加または無添加の、agarose gel における SMT-ccl 細胞のカゼイン溶解活性を測定した。6) aprotinin の SMT-ccl 細胞および CPAE 細胞における細胞増殖への影響を増殖曲線より検討した。7) 96-well plate に CPAE 細胞を播種、培養し confluent としたのち、SMT-ccl 細胞を重層培養した。Aprotinin 添加群と無添加群の 2 群に分けて検討を行い位相差顕微鏡を用いて経時的変化を観察した。更に1, 6, 12, 24時間後の CPAE 細胞の破壊された比率を、confluent の細胞と比較して求めた。well より剥離した細胞を破壊されたものとし、各々の時点における残存細胞の 3-(4,5-dimethylthiazol 2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 色素取り込みより破壊された比率を算出した。

〔結果〕 1) SMT-ccl 細胞は膜表面に uPA 抗原の局在を示した。2) 細胞膜上には受容体結合型 uPA および不飽和 uPA 受容体が存在することが確認された。3) SMT-ccl 細胞は uPA 活性を示し、4) その破

碎上清は plasmin により活性の増加を示したことから、immunoreactive uPA の75%以上は pro-uPA であることが示唆された。5) 同細胞のカゼイン溶解活性は aprotinin により抑制された。6) aprotinin は SMT-ccl 細胞および CPAE 細胞の増殖に対し促進的、または抑制的效果を示さなかった。7) aprotinin 無添加群の CPAE 細胞は重層培養後1時間で20%の、6時間後には、約80%の剥離を示し敷石状の形態を失ったのに対し、添加群では約10%の剥離に過ぎず、比較的その形態を保った。ただし、6時間以降においては添加群においても剥離は進行し、24時間後には無添加群とほぼ同過程の剥離を示した。

〔結論〕 血管内皮細胞に接着した腫瘍細胞が、内皮細胞を破壊した後内皮下間質に到達する過程を、in vitro モデルを用いて新たに見出した。またその機序は、腫瘍由来の uPA を含むセリントパク分解酵素によることを示唆し、そのタンパク分解酵素阻害剤を用いることにより血行性遠隔転移の一段階を抑制できる可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

申請者は悪性腫瘍の遠隔転移の機序を研究するためにヒト絨毛癌細胞株 (SMT-ccl) とウシ肺動脈血管内皮細胞 (CPAE) を coculture し、その際の反応を調べた。この際、血管内皮細胞は破壊されていた。この内皮細胞破壊の機序は腫瘍細胞の血管外流出 (extravasation) に関係すると考え、それに関連する因子として urokinase-type plasminogen activator (u-PA) の抗原、活性、細胞上の局在を検討した。

方法としては

- 1) SMT-ccl 細胞を chamber slide 上に播種培養した。
- 2) u-PA の局在を調べるため単クローン抗体を用いて染色した。
- 3) u-PA をタンパク ELISA で測定した。
- 4) u-PA の活性を S-2444 の分解により測定した。
- 5) u-PA により活性化されたプラスミンの活性をカゼイン法で調べた。
- 6) CPAE 細胞上に SMT-ccl 細胞を重層培養し、経時的に観察し、CPAE 細胞の破壊を MTT 色素の取り込みにより調べた。

実験の結果、SMT-ccl 細胞は細胞表面に u-PA の抗原を有し、これは u-PA 受容体に結合していることが示された。さらに、u-PA は活性を有し、プラスミノゲンをプラスミンに変換した。このプラスミンはカゼインを分解し、この分解はアプロチニンで抑制された。アプロチニン添加群では CPAE 細胞の破壊が少なく、敷石状の形態を保っていた。アプロチニン自体は SMT-ccl 細胞、CPAE 細胞のいずれかに促進的または抑制的效果を示すことはなかった。

以上の結果は、腫瘍細胞による内皮細胞破壊がセリン酵素、特に u-PA 関連の酵素によりなされている可能性を示唆した。さらにセリン酵素の作用を阻害するアプロチニンで酵素活性、内皮細胞破壊活性が抑制されたことは、タンパク分解酵素阻害剤により癌の血行性遠隔転移を抑制できる可能性を示している。

この発表に対して次のような質問が審査員より出された。

- 1) 内皮細胞の開裂はプロテアーゼインヒビタで抑制されるか
- 2) アプロチニンの内皮細胞破壊抑制の機序は
- 3) プラスミンを培養液に直接加えた際、内皮細胞破壊はおこるか
- 4) 局所のプラスミンの濃度は細胞破壊に充分か
- 5) この細胞の形態的特徴は
- 6) 転移しにくい細胞をコントロールとして用いる必要はないのか
- 7) 牛の血管内皮を用いた理由はなにか
- 8) SMT-ccl の電子顕微鏡像の特徴はなにか

以上の質問に対し、申請者は概ね適確に答え、申請者の研究は博士（医学）の学位授与にふさわしいと審査員全員で判定した。

論文審査担当者 主査 教授 高 田 明 和

副査 教授 喜 納 勇 副査 教授 馬 場 正 三

副査 助教授 植 松 俊 彦 副査 講師 前 田 真