原 著

血小板中に存在する腫瘍細胞増殖因子について

新津洋司郎* 越田 吉一* 小野寺義光* 茂木 良弘*
石垣 聖史* 古川 勝久* 高後 裕* 漆崎 一朗*

Growth promoting factors of human platelet for tumor cells

Yoshiro NIITSU*, Yoshikazu KOSHIDA*, Yoshimitsu ONODERA*,
Yoshihiro MOGI*, Seiji ISHIGAKI*, Katsuhisa KOGAWA*,
Yutaka KOHGO and Ichiro URUSHIZAKI*

Key words: Platelet derived growth factor (PDGF), acidic factor,
tumor cell growth, purification, characterization

Three growth factors (acidic, neutral and basic) were partially purified from platelet lysate by DE 52 cellulose chromatography. The basic factor was proved to be identical to PDGF hitherto reported. The growth promoting activity of these three factors for various cell lines was studied in vitro.

Basic factor (PDGF) promoted growth of fibroblast (Swiss 3 T 3, SV 3 T 3) as has been described previously, but had relatively less activity of growth promotion to malignant tumor cell lines (K 562, HeLa and RPMI 4788).

On contrast, acidic factor strongly stimulated the proliferation of tumor cells and, to less extent, of fibroblasts.

Malignant cells (K 562) were synchronized to pre S phase by addition of excess of thymidine and hydroxyurea, and thus synchronized cells were also proved to be more sensitive to acidic factor than to PDGF, indicating that the sensitivity is not related to cell cycle.

* 札幌医科大学第四内科〔〒060 札幌市中央区南1条西16丁目〕, Department of Internal Medicine (Section 4), Sapporo Medical College, Sapporo, Japan. [1984年6月13日受付, 1984年8月20日受理]

はじめに

血小板由来増殖因子¹⁾²⁾ (PDGF, platelet derived growth factor) は血栓形式時に流血中に放出される細胞増殖因子で病態生理上血管壁の損傷治癒過程, 動脈硬化, 各種臓器の線維化, 腫瘍細胞の転移促進に関与することが知られている³⁾⁴⁾.

ところで従来報告されてきた PDGF は塩基性の等電点をもち, その標的細胞は線維芽細胞などの間葉系細胞とされている. しかし, われわれはこれとまったく等電点の異なる細胞増殖因子を血小板中に見出し, その標的として, むしろ腫瘍細胞に特異性が強いことを知ったので報告する.

I. 方 法

1. 培養細胞

線維芽細胞由来株として BALB/c 3T3, Swiss 3T3, SV 3T3 を用いた. ヒト腫瘍細胞として K 562 (ヒト白血病), HeLa (子宮癌), RPMI 4788 (大腸癌) を用いた. 線維芽細胞は培養液として 10% ウシ胎児血清 (FCS) を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM),

腫瘍細胞は 10% FCS を含む RPMI 1640 を用いた.

2. 血小板 lysate の抽出法および PDGF の精製⁵⁾⁶⁾

正常人より得られた血小板血漿を 4,000 rpm 15 分遠心後, pellet の赤血球を低浸透圧破壊し血小板を 0.1% EDTA を含む PBS にて 3 回洗浄した. その後, 血小板 lysate は sonicator にて 4°C 50 watt 15 分超音波破碎し, 引き続いて超遠心 (100,000 g 1 時間) を行なうことにより作製し, thymidine phosphorylase 活性を除く目的で 100°C 3 分熱処理して使用した. PDGF を精製する目的で DE 52 cellulose によるイオン交換 column chromatography を行ない (0.02 M sodium phosphate buffer, PH 7.2), その素通り分画と 0.5 M NaCl 塩濃度勾配により溶出される吸着分画を得た. さらにカラム等電点電気泳動 (PH 2-12) にて分析し, この増殖活性を示す peak を Bio-Gel P-100 にて分画した.

3. 細胞増殖活性の測定法

1×10^5 個の線維芽細胞または腫瘍細胞を 1% FCS を含む DMEM あるいは RPMI 1640 を用いて, マイクロプレート中で 37°C 5%CO₂

Fig. 1 DE 52 cellulose chromatogram of platelet lysate. Growth promoting activity (●—●) is represented by ³H-thymidine incorporation using BALB/c 3T3 for target cell.

Fig. 2 Ion exchange chromatogram of platelet-derived growth factors. Growth promoting activity (●—●) is represented as relative incorporation of ^3H -thymidine.

Table 1 Target cell specificity of three active peaks

Cell lines	Origin	Growth factors in platelet lysate		
		acidic	neutral	basic
Swiss 3T3	mouse fibroblast	++	+	+
SV 3T3	SV40 transformed mouse fibroblast	+	+	++
K 562	Human leukemia	++	+	+
HeLa	Human uterus ca.	++	—	—
RPMI 4788	Human colon ca.	++	+	+

にてあらかじめ24時間培養を行った。その後FCS無添加培養液に交換し、終濃度が血小板lysateの80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に相当する部分精製PDGFを加え37°C 5% CO_2 の条件にて3-72時間培養し、3時間後の ^3H -thymidineの取り込みを測定した。

4. 細胞周期同調法

腫瘍細胞の同調培養は既報に従い、thymidineおよびhydroxyureaの二重処理法によりpre S期に同調させ行なった⁷⁾。

II. 結 果

血小板lysateをDE 52 cellulose chromatographyにより分画し、その各分画についてBALB/c 3T3を標的細胞として増殖促進活性を調べた結果をFig. 1に示した。素通り分画および吸着分画から合計3つの活性peakを得た。さらにこれらのpeakを集めカラム等電点電気泳動にて分析したところ、それぞれpI 3.1-3.5 (acidic peak), pI 6.5-7.0 (neutral peak), pI 9.2

Fig. 3 BioGel P-100 chromatogram of three kinds of PDGFs separated by ion exchange chromatogram. a: acidic, b: neutral, c: basic

-10.5 (basic peak) に活性を示した (Fig. 2). さらにそれぞれの活性 peak を Bio-Gel P-100 chromatography にて分画したところ分子量はいずれも約3万であった (Fig. 3 a, b, c). neutral peak においては void volume にも増殖活性を示す分画が得られた. カラム等電点電気泳動

のそれぞれの peak について各種培養細胞を標的とし, 増殖促進活性を検討した (Table 1). basic peak は線維芽細胞である Swiss 3T3, SV 3T3 を強く増殖させたが, 腫瘍細胞株である K 562, HeLa, RPMI 4788 に対しては活性がきわめて弱かった. 他方 acidic peak はむ

Table 2 Physicochemical properties of acidic, neutral and basic peak
(BALB/c 3T3 for target cells)

Treatment	Remaining activity (% of control)		
	acidic	neutral	basic
100°C 5 min	88	93	100
30 min	101	—	—
pH 3	92	94	80
pH 10	76	86	99
Freeze & thawing 3 times	102	—	101
6 times	86	—	—
Trypsin digestion (1 mg/mL)	69	56	72

しろ反対に、腫瘍細胞を強く増殖させ、線維芽細胞に対しては basic peak に比べ増殖活性が弱かった。neutral peak は線維芽細胞、腫瘍細胞両者に弱い増殖活性を示した。そこで、acidic peak と basic peak の cell cycle phase におよぼす影響について比較検討した (Fig. 4)。K 562 細胞を pre S 期に同調させ、acidic および basic peak を plus 投与し、増殖活性すなわち経時的 ^3H -thymidine の取り込みを調べたところ、その ^3H -thymidine の取り込み pattern に差がなく、S 期の peak は 3-6 時間と同一であった。次に acidic peak の物理化学的性状について neutral, basic peak と比較検討した (Table 2)。この 3 種の血小板由来増殖因子は熱・酸・アルカリ処理、凍結融解に対してきわめて安定であり、ともに 1 mg/mL の濃度の trypsin 処理により約 40 % の失活をみとめた。

III. 考 察

Ross⁸⁾, Antoniades¹⁾, Heldin²⁾ らにより報告されている PDGF は線維芽細胞、血管内皮細胞などを増殖させる因子として知られている。これは塩基性の等電点 (pI 10.3) をもち、その分子量の違いから Type I (m. w. 31,000) と Type II (m. w. 28,000) の 2 つの分子種が報告されている⁹⁾。これらは共通の抗原性を有し、細胞増殖活性にも差異を認めず、最近の報告では、前者は後者が glycosylation を受けたものとされている。今回われわれはこれらと物理化学的性状ならびに標的細胞特異性において異なる 2 つの新しい血小板由来増殖因子を見出した。それは 0.02 M sodium phosphate, PH 7.4

Fig. 4 Effect of acidic and basic peak to K 562 cell cycle phase.

の条件で DE 52 イオン交換カラムに吸着する物質であり、等電点電気泳動にて、pI 6.5-7.0 (neutral peak), pI 3.1-3.5 (acidic peak) を示し明らかに従来より報告されている PDGF と異なっていた。一方、DE 52 カラムクロマトグラフィーにて素通りする分画、すなわち basic peak は等電点、分子量および線維芽細胞に対して、強い増殖活性を示すことから諸家のいう PDGF と同一のものと考えられた¹⁰⁾。これらの因子の標的細胞特異性については basic peak

が線維芽細胞由来株を強く増殖させたのに対して acidic peak は間葉系さらには上皮性由来の人腫瘍細胞に対してきわめて強い増殖活性を示した。ところで PDGF は cell cycle phase の G₀-G₁ 期に作用し増殖活性を示すことが知られている¹¹⁾。そこで acidic peak について標的細胞を K 562 とし cell cycle におよぼす影響を basic peak との比較において検討したところ cell cycle を特に速めるものではなかった。したがって、この acidic peak は basic peak (PDGF) に比べてより多くの腫瘍細胞を S 期へ導入すると考えられる。近年、増殖因子のあるものが腫瘍細胞により産出され、その腫瘍自身に作用する (Todaro の autocrine 説) ことが報告され¹²⁾、しかも増殖因子のいくつかは oncogene product と分子構造上きわめて類似していることが知られてきた¹³⁾。PDGF についてもそのアミノ酸構成が c-sis oncogene product である p28^{sis} と homology のあることが明らかにされ¹⁴⁾、細胞の腫瘍化 (または transformation) および腫瘍の自己増殖に重要な役割を担っていることが伺われる。しかし、PDGF は間葉系腫瘍の増殖のみをうながし、上皮性細胞には作用しないとされている。われわれの acidic peak は間葉系腫瘍に限らず、他の K 562 (ヒト白血病)、HeLa (ヒト子宮癌)、RPMI 4788 (ヒト大腸癌) 由来腫瘍細胞をも増殖させるという性質から、きわめて興味深い因子であると考えられる。

ところで acidic peak は分子量約 3 万、heat stable (100°C 30分) であり、3 回の凍結融解後も活性の低下を認めず、物理化学的性状は、塩基性 PDGF と類似していた。最近 Heldin¹⁵⁾ らが CM セルロースカラムを素通りする酸性の等電点をもつ血小板由来増殖因子を報告し、これは抗 PDGF 抗体と交叉免疫性を示さないことから、血小板中には PDGF とまったく異なった種類の増殖因子が存在することを示唆した。また Child¹⁶⁾ らは血清中に腫瘍細胞を増殖させる因子 (transforming growth factor) を見出しそれらが血小板由来であろうと推定している。

今後われわれの acidic peak とこれらの gro-

wth factor との異同について、より詳細な検討を加える予定である。

文 献

- 1) Antoniades, H.N., Scher, C.D. and Stiles, C.D.: Purification of human platelet-derived growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **76**: 1809~1813, 1979.
- 2) Heldin, C.-H., Westermark, B. and Waster-son, A.: Platelet-derived growth factor: Purification and partial characterization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **76**: 3722~3726, 1979.
- 3) Harker, L.A., Ross, R., Slichter, S.J. and Scott, C.R.: Homocystine-induced arteriosclerosis: The role of endothelial cell injury and platelet response in its genesis. *J. Clin. Invest.*, **58**: 731~741, 1976.
- 4) Ross, R. and Glemset, J.A.: The patogenesis of arteriosclerosis. (part 1 and 2), *N. Engl. J. Med.*, **295**: 369~377, 420~425, 1976.
- 5) 新津洋司郎, 茂木良弘, 石垣聖史, 高後 裕, 石井 徹, 漆崎一朗: 血小板由来増殖因子による癌細胞増殖作用の特性 —線維芽細胞との比較—. *血液と脈管*, **13**: 309~313, 1982.
- 6) 新津洋司郎, 茂木良弘, 越田吉一, 石垣聖史, 石井 徹, 熊井良司, 高後 裕, 漆崎一朗: 血小板由来の細胞増殖因子の特性と腫瘍細胞の増殖におよぼす作用. *血液と脈管*, **14**: 481~484, 1983.
- 7) 日本組織培養学会編: 組織培養の技術. p. 62-66, 朝倉書店, 1982.
- 8) Ross, R., Glemset, J., Kariya, B. and Harker, L.: A platelet-dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **71**: 1207~1210, 1974.
- 9) Deuel, T.F., Huang, J.S., Proffitt, R.T., Baenziger, J.U., Chang, D. and Kennedy, B.B.: Purification and resolution into active protein fractions. *J. Biol. Chem.*, **256**: 8896~8899, 1981.
- 10) Heldin, C. -H., Westermark, B. and Westerson, A.: Specific receptor for platelet derived growth factor on cells derived from

- connective tissue and glia. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **78**; 3664~3668, 1981.
- 11) Scher, C.D., Shepard, R.C., Antoniades, H. N. and Stiles, C.D. : Platelet-derived growth factor and the regulation of the mammalian fibroblast cell cycle. Biochem. Biophys. Acta, **560**; 217~241, 1979.
- 12) Sporn, M.B. and Todaro, G.J. : Autocrine secretion and malignant transformation of cells. N. Engl. J. Med., **303**; 878~880, 1980.
- 13) Gaubin, G., Goldman, D.F., Luce, J., Nerman, P.E. and Cooper, G.M. : Molecular cloning and nucleotide sequence of a transforming gene detected by transfection of chicken B-cell lymphoma DNA. Nature, **302**; 114~119, 1983.
- 14) Waterfield, M.D., Scrace, G.T., Whittle, N., Stroobant, P., Johnsson, A., Wasteson, A., Westermark, B., Heldin, C.H., Huang, J.S. and Deuel, T.F. : Platelet-derived growth factor is structurally related to the putative transforming protein p28^{sis} of simian sarcoma virus. Nature, **304**; 35~39, 1983.
- 15) Heldin, C.-H., Wasteson, A. and Westermark, B. : Partial purification and characterization of platelet factors stimulating the multiplication of normal human glial cells. Exp. Cell. Res., **109**; 429~437, 1977.
- 16) Child, C.B., Proper, J.A., Tucker, R.F. and Moses, H.L. : Serum contains a platelet-derived transforming growth factor. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **79**; 5312~5316, 1982.

●日常診療の落とし穴と安全性を示す！

小児の医療事故と救急処置

編集 日本大学小児科教授 馬場一雄 専門医50氏分担執筆
B5判 337頁 図52 表120 定価9,800円(〒350円)

日常の診療業務はいたるところに落とし穴の掘られている原野を進むようなものである。どんなに気をつけて歩いても、落とし穴に落ち込まないですむ保証はない。しかし、どこに落とし穴が隠されているか予め知っているのと知らないのとでは、安全の程度が全く異なる。本書は、小児の日常診療の場に隠されている落とし穴の位置と迂回路を示す羅針盤である。

●内容：〔医療事故〕1.医療事故と医事紛争，2.医療過誤の実態と責任の所在，3.突然死の実態，4.最近における医事紛争の問題点と小児科領域における診療事故死，5.小児救急患者の実態，6.過敏性体質，7.臨床検査に伴う事故とその対策(その1)，8.臨床検査に伴う事故とその対策(その2)，9.注射に伴う事故とその対策，10.輸血に伴う事故とその対策，11.輸液に伴う事故とその対策，12.交換輸血に伴う事故とその対策，13.麻酔に伴う事故とその対策，14.小児外科手術に伴う事故とその対策，15.放射線照射に伴う障害とその対策，16.看護に伴う事故とその対策，〔救急処置〕1.急発症状と応急対策，2.救急疾患と緊急治療，3.救急医療。