組織培養におけるインドール-3-酢酸の細胞増殖効果

自 見 厚 郎¹・堀 江 昭 夫¹・八 巻 敏 雄²¹産業医科大学第一病理学教室 ²産業医科大学生物学教室

要 旨: 植物ホルモンの一つである天然オーキシンの主成分は indoleacetic acid (IAA) である。IAA は正常ヒト尿のほか消化管癌組織にも存在し、また動・植物細胞の増殖に関与する (Yamaki *et al.*, 1979)。ヒト子宮頸癌由来の HeLa 細胞に対する IAA の増殖効果とその拮抗物質 PCIB (parachlorophenoxy-iso-butyric acid) の増殖抑制効果を *in vitro* において検討して、次の結論がえられた。1) IAA に増殖効果がみられた。2) PCIB に IAA, FBS (fetal bovine serum, ウシ胎児血清) に対する拮抗作用がみられた。3) FBS 添加培地の方が細胞増殖作用は優れていた。HeLa 細胞はヒト子宮頸癌由来の安定した細胞である。IAAが胃、食道などの消化管癌などに多く含まれている事実を考え併せると、癌細胞の増殖に IAA の関与することは想像に難くないと思われる。しかし、厚い細胞壁を持つ植物細胞と持たない動物細胞に同様の増殖作用が IAA によってみられることから、その構造上の差異に関係しない共通の IAA の作用機序を考える必要がある。

(1982年5月15日 受付)

緒 言

植物ホルモンの一つである天然オーキシンの植物の成長を促す作用がある。主成分はインドール-3-酢酸 (indoleacetic acid 以下 IAA とする) である。IAA は正常ヒト尿のほか、癌組織にも存在することが報告されている (Yamaki *et al.*, 1973)。IAA が植物細胞のみでなく動物細胞の増殖にも関するとの報告が Yamaki *et al.* (1979) によってなされ注目を集めている。しかし、ヒト由来の培養細胞について詳細に検討した報告はみられないようである。

本研究では、HeLa 細胞を用い、これに対する IAA の増殖効果並びにその拮抗物質 parachlorophenoxy-iso-butyric acid (以下 PCIB とする) の増殖抑制効果を検討した。

培養材料および培養方法

1. 培 地

基本培地として Eagle's minimal essential medium (日水製薬, 以下 MEM とする) を用いた。実験目的に応じて基本培地に血清および薬物を添加し、5

種の培養液を作製した。血清としてウシ胎児血清 (fetal bovine serum, Flow Lab. 以下 FBS とする) を用い、実験群には IAA (3-indoleacetic acid, 和光純薬) を添加し、対照群にはさらに PCIB (2-p-(chlorophenoxy)-2-methyl propinoic acid, SIGMA) を用いた。それぞれ最終濃度が、FBS 10%, IAA 10^{-5} M および PCIB 10^{-3} M になるように調整した。

今回の実験に用いた培地は、実験群として 1) MEM + IAA, 対照群として、2) MEM 単独, 3) MEM + FBS, 4) MEM + IAA + PCIB および 5) MEM + FBS + PCIB の5種類である。また細胞分離用のトリプシン液は DIFCO 1:250 を Puck 液で 0.25% に希釈したものを用いた。

2. 培養細胞

ヒト子宮頸癌由来の樹立された株細胞である HeLa 細胞を用いた。HeLa 細胞は増殖培地として 10% ウシ胎児血清加 MEM を使用し、2-3日毎にトリプシン処理により継代を繰り返したものである。

3. 培養方法

実験に供する HeLa 細胞はトリプシン処理後遠心により十分に洗浄した後に、5種の培地にそれぞれ浮

遊させて、細胞数が $3-4 \times 10^5$ cells/ml になるように調整した。その 5 ml を培養用 Petri dish (Falcon, 直径 60 mm, 以下 PD とする) に分注し、それぞれ実験を 4 系列の PD を用いて行った。

PD は CO_2 incubator (5% CO_2 +95% air) 内で、37°C 下に培地交換をせず静置培養した。1, 2, 3, 5, 8 日後毎に細胞形態を倒立顕微鏡下に観察し、細胞数はコールターカウンター (Coulter Electronics) を用いて計測した。また、トリパン青染色法 (0.5%) を用いて生細胞率を計算し、コールターカウンターの計測値から増殖した生細胞数を算出した。この値をもとにして増殖曲線を描いた。

結 果

各実験の結果をまとめた増殖曲線は Fig. 1 に示す如くである。培養細胞数の増加をもって細胞増殖効果がみられたものと判定した。

1. MEM+ 10^{-5} M IAA, MEM と MEM+10% FBS を比較した。IAA を添加した培地に確かに細胞増殖はみられたが、FBS を添加した培地よりは明らかに劣っていた (実験群 1, 2, 3)。

2. MEM+ 10^{-5} M IAA と MEM+ 10^{-5} M IAA+ 10^{-3} M PCIB, MEM+10% FBS と MEM+10% FBS+ 10^{-3} M PCIB の 2 群に分けて対比検討した。両群とも PCIB を添加した培地の方が細胞増殖効果は劣っていて、FBS, IAA に対する阻害作用を有していた (1, 4 と 3, 5)。

3. FBS を添加した培地の方が、添加しない培地よりも細胞増殖率は優れていた (3, 5 と 1, 2, 4)。FBS を添加しない培地群の中では、MEM 単独の方が MEM+ 10^{-5} M IAA+ 10^{-3} M PCIB よりも増殖率が優れていた。

考 察

ジベレリン, サイトカイニン, エチレンなどと同じくオーキシンは、植物ホルモンの一つに挙げられている (柳島・増田, 1975; 倉石, 1976)。オーキシンは、植物体内に発見される IAA やその前駆体およびエステル誘導体などの天然オーキシンと、2, 4-ジクロロフェノキシ酢酸 (2, 4-D) などの合成オーキシンの 2 種類に分けられる。

IAA が天然オーキシンに属し、ほとんどの植物細

Fig. 1. Growth curve of HeLa cells

1. MEM+ 1×10^{-5} M IAA
2. MEM
3. MEM+10% FBS
4. MEM+ 1×10^{-5} M IAA+ 1×10^{-3} M PCIB
5. MEM+10% FBS+ 10^{-3} M PCIB

胞の成長と増殖の制御に関与する物質であることは、Kögl *et al.* (1934) のヒト尿中からの heteroauxin (のちの auxin) の分離成功以後の多くの研究によって確実となった。動物体内の IAA は腸管内での代謝経路と腸管内細菌叢によって生じたトリプトファン等インドール化合物が消化管から吸収されて体内 (肝臓、腎臓など) で IAA になり尿中に排泄される場合と腸管内細菌叢によって生じた IAA が吸収後排泄される場合とがある。なおヒトではインドール化合物の異常増多がみられる Hartnup 病がある (青木・岡, 1978)。しかし、Yamaki *et al.* (1973) は消化管癌患者の術前、術後の血中 IAA 値の推移および癌組織と健常周囲組織抽出物中の IAA 量から、癌患者の IAA の総てが必ずしも腸管内に由来するものではなくむしろ積極的に癌組織と何らかの関係性を有する物質であることを明らかにし、同時に癌組織抽出物が植物活性を有していることも証明した (Yamaki *et al.*, 1979)。このことは IAA に植物活性が存在するばかりでなく、ヒトを含めた動物組織に対する活性の有無を検討させる端緒となった。

Ichimura & Yamaki (1975a, b), Yamaki *et al.* (1979) の実験からニワトリ胚、カイコ卵、マス卵などの動物細胞の細胞分裂と IAA の間に密接な関係のあることが推察された。Nishirai & Yamaki (1978) はマウスの LP-3 細胞を用いて細胞分裂に IAA が重要

な役割を果たすことを明らかにした。また, Yamaki *et al.* (1979) はニワトリ胚線維芽細胞, 3T3 細胞に対して IAA が増殖効果を示すことと, 増殖に対し IAA と PCIB が拮抗すること, さらに透析した FBS による増殖効果の低下は IAA 添加により回復すること, さらにこの場合にも IAA と PCIB が拮抗することを示している。このように 1) IAA が動物由来の細胞に対して増殖効果を有すること, 2) 消化管癌組織抽出物に多く含有されること, 3) 消化管癌摘出術後に血清および尿中 IAA 値の減少の認められることから, 一般に細胞分裂のさかんな癌細胞の増殖にも関係していることが推測される。今回の実験は以上のような一連の研究経過を背景として試みられたものである。実験目的は HeLa 細胞に対する IAA の増殖効果と拮抗物質 PCIB の抑制効果の検定である。

HeLa 細胞は子宮頸癌 epidermoid carcinoma に由来する oncogenic な株細胞である。今回は, 消化管癌由来の培養細胞は用いられなかったが, 術前に血清または尿中 IAA 高値の証明された消化管癌患者の手術摘出組織から分離した細胞か, または可能ならばさらに継代, 株化した細胞を用いて IAA および PCIB の効果検定をすることは直接的な証明となり, *in vitro* での望ましい方法である。

IAA は元来, 植物細胞の増殖を制御する植物ホルモンである。しかも, その標的細胞は動物細胞と異なり厚い細胞壁を有している。それにもかかわらず, ヒト由来で oncogenic な HeLa 細胞に対しても植物細胞と同様の増殖効果を IAA が示すことから, 動物, 植物という細胞学的構造の相違に関係しない共通の作用機序を IAA が示していることを考える必要がある。

さて, 実験結果を評価してみると, 1, 2, 3 の群では, FBS 添加群が著しく増殖率がよかった。これは血清中に IAA 以外の未知の増殖促進物質が含まれて相乗的に作用していることも考えられる。そのため, IAA 単独添加では相乗作用は働かず鈍い反応しか示さないとも考えられる。植物細胞に対して増殖を促進させるには, IAA に至適濃度が存在するといわれている(渥美, 1982) ので, 血清の IAA 濃度と培地に添加した IAA 濃度の単純比較は, 上記の相乗作用を考慮に入れば不可能である。

PCIB の抑制効果は, MEM+FBS 系での PCIB 添加の有無(3, 5) および MEM+IAA 系での PCIB 添加の有無(1, 4) をみれば, 立ち上がりの悪さがグラフ上認められ, 4 の方が著明である。また 1 と 4

で 5 日後の逆転と 8 日後の再逆転がみられた。これは薬物の HeLa 細胞内代謝への影響とそれに伴うイオン濃度の変化, pH の変化などの影響も十分考えなければならない。

つぎに, IAA を増殖因子 (growth factor, 以下 GF とする) という観点から論じてみる。GF は元来, 微生物に対する増殖因子として用いられたものである。近年 GF に関する研究は無血清培地の開発や正常細胞培養とともに非常に盛んになっている。しかし, GF の作用機序については十分解明されている状況ではない。癌細胞の GF について理論的には endogenous GF と exogenous GF の 2 つに分けられている(西川・他, 1982)。2 種の GF はそれぞれ細胞表面のレセプターを介して second messenger により作用する場合と直接的に核ないし細胞内小器官に作用する場合とがあり, 生体内でのホルモンに類似した作用機序が考えられている。IAA の癌細胞内での局在性と動態の解明が待たれるところである。

IAA が 1) 食道, 胃, 盲腸等の消化管癌患者の血清および尿中に正常より高濃度に認められること, 2) 癌組織からの抽出物中にも多く含まれていること, ならびに 3) oncogenic な HeLa 細胞に対しある程度の細胞増殖効果を示すという今回の成績から考えて, IAA が癌細胞の自己増殖促進機序に何らかの役割を果たしていることは想像に難くない。しかし, ウイルスおよびウイルス以外で transform した細胞は自律性増殖が強く, どの GF に対しても感受性が鈍くなっているという報告もある(Scher *et al.*, 1978; 大野, 1979)。今回の実験で IAA が HeLa 細胞に対して細胞増殖効果を示したが, 血清よりも劣っていて, 発現が遅かったことは今後解明すべき問題を含んでいる。IAA と自律性増殖との関係を検索するのに HeLa 細胞が最適であったかどうかについても検討の余地がある。いずれにしても, IAA の作用が単なる GF としての作用であるのか, また癌の自律性増殖と何らかの関係の有しているのかということについては, 今後の研究が待たれるところである。

結 語

ヒト子宮頸癌由来の HeLa 細胞に対する IAA の増殖効果と, その拮抗物質 PCIB の増殖抑制効果について実験し, 以下の結論がえられた。

1. IAA に増殖効果がみられたが, FBS に劣った。

2. PCIB には IAA, FBS に対する拮抗作用がみられた。無添加培地では MEM 単独の方が IAA+PCIB よりも増殖率が優れていた。
3. FBS 添加培地の方が細胞増殖は優れていた。

文 献

- 青木菊磨・岡 哲康 (1978): Hartnup 病. 日本臨床, 36: 1424-1425.
- 渥美茂明 (1982): 高等植物のホルモン — その作用と生成. 組織培養, 8: 97-103.
- Ichimura, H. & Yamaki, T. (1975a): Indole-3-acetic acid in animal embryos. Sci. Paper Coll. Gen. Educ. Univ. Tokyo, 25: 43-48.
- Ichimura, H. & Yamaki, T. (1975b): Indole-3-acetic acid in chick embryo. Develop. Grow. Differentiation, 17: 275-279.
- Kögl, F., Haagen Smit, A.J. & Erxleben, H. (1934): Über ein neues Auxin ("Heteroauxin") aus Harn. XI. Mitteilung. Zeitsch. Physiol. Chem., 228: 99-103.
- 倉石 晉 (1976): オーキシシン. 植物ホルモン. 初版. 東大出版会, 東京. pp.15-51.
- 大野忠夫 (1979): 血小板由来増殖因子と線維芽細胞増殖因子. 組織培養, 5: 356-363.
- 西川克三・長尾嘉信・山田幸生 (1982): ガン細胞と増殖因子. 組織培養, 8: 39-45.
- Nishirai, N. & Yamaki, T. (1978): Increase in activity of IAA-synthesizing enzymes prior to cell division. Bot. Mag. Tokyo, 91: 93-95.
- Scher, C.D., Pledger, W.J., Martin, P. *et al.* (1978): Transforming viruses directly reduce the cellular growth requirement for a platelet derived growth factor. J. Cell. Physiol., 97: 371-380.
- Yamaki, T., Shimojo, E., Ichimura, H. *et al.* (1979): Possible role of indoleacetic acid in animal cell division and cancer growth. J. UOEH, 1: 471-485.
- Yamaki, T., Shimojo, E., Yoshizawa, K. *et al.* (1973): Auxin in cancer tissue. In: Plant Growth Substances 1973. (Science Council of Japan, Internat. Plant Growth Subst. Assoc.). Hirokawa Publ. Co., Tokyo. pp.44-51.
- 柳島直彦・増田芳雄 (1975): 植物ホルモン. 現代生物科学 5, 物質代謝とその調節 II. (佐藤 了・西塚泰美, 編). 岩波書店, 東京. pp.398-415.

Growth Responses of HeLa Cells to Indoleacetic Acid

Atsuo JIMI¹, Akio HORIE¹ and Toshio YAMAKI²

¹*Department of Pathology and Oncology, School of Medicine, University of Occupational and Environmental Health, Japan. Kitakyushu 807, Japan*

²*Department of Biology, School of Medicine, University of Occupational and Environmental Health, Japan. Kitakyushu 807, Japan*

Abstract: Indoleacetic acid (IAA) is one of the main plant hormones. It is found not only in plants, but in some mammals and their urine. Yamaki *et al.* (1979) reported the production of IAA in human cancer tissue of the alimentary canal (esophagus, stomach and cecum) and its postoperative reduction in urine. It was postulated that IAA was closely related to cancer growth. The action of IAA on animal cells in tissue culture showed that IAA was one of the regulating factors of cell multiplication and that parachlorophenoxy-

iso-butyric acid (PCIB) retarded the cell growth as an antagonist to IAA. It still is not clear whether IAA has an effect on growth of HeLa cells, an established cell line derived from human epidermoid carcinoma of the uterine cervix. To evaluate the action of IAA and PCIB for the growth of HeLa cells, five lines of media were designed: 1) Eagle's minimal essential medium (MEM) + 1×10^{-5} M IAA, 2) MEM, 3) MEM+10% fetal bovine serum (FBS), 4) MEM+ 1×10^{-5} M IAA+ 1×10^{-3} M PCIB and 5) MEM+10% FBS+ 1×10^{-3} M PCIB. The results were as follows: 1) the growth of HeLa cells was accelerated by exogeneously supplemented IAA, but less than the effect of 10% FBS, 2) PCIB had an antagonistic action to FBS and IAA for the growth of HeLa cells, and 3) serum-supplemented medium had superior effect to serum-free media on cell growth, and serum-free MEM, IAA+PCIB-added medium. Our experimental results seem to support the assumption that IAA is one of the regulating factors of cancer cell growth. Although the mechanism, by which IAA brings about this effect, remains to be elucidated, it may be common to both plant and animal cells including human cancer cells, independently of the structural differences.

Key words: auxin, growth factor, HeLa cells, indoleacetic acid (IAA), parachlorophenoxy-iso-butyric acid (PCIB).

J. UOFH, 4 (3): 327-331 (1982)