報 文

[Nippon Nōgeikagaku Kaishi Vol. 65, No. 8, pp. 1207~1211, 1991]

プロテオースペプトンで刺激したヒト胎児肺由来
繊維芽細胞 IMR-90 による組織型プラスミノゲ
ンアクチベーターの生産

鈴木 明, 板垣康治, 満田伸二郎, 東尾侃二
(雪印乳業株式会社生物科学研究所)

平成 2 年 7 月 23 日 受 理

Production of Tissue Plasminogen Activator (t-PA) by Human Embryonic Lung
Diploid Fibroblast IMR-90 Cells Stimulated by Proteose Peptone

Akira SUZUKI, Yasuharu ITAGAKI, Shinjiro MITSUDA and Kanji HIGASHIO
Research Institute of Life Science, Snow Brand Milk Products Co.,
519 Shimoishibashi, Ishibashi-machi, Shimotsuga-gun, Tochigi 329-05

We selected out proteose peptone (p.peptone) from various agents as a potent inducer for production of tissue plasminogen activator (t-PA) by human embryonic fibroblast IMR-90 cells. The optimum concentration of p.peptone was 1%. P.peptone increased both cell-associated (intracellular) and extracellular t-PAs. The t-PA production induced by p.peptone was completely inhibited by actinomycin D and cycloheximide. Thus p.peptone caused an increase in *de novo* synthesis of t-PA. When the confluent cells were cultured by increasing the ratio of the volume of induction medium-to-cell number, negative feedback seemed to be minimized and thereby t-PA production enhanced.
(Received July 23, 1990)

は じ め に

われわれは、胎児肺由来正常二倍体繊維芽細胞 IMR-90 が生産する組織型プラスミノゲンアクチベーター (t-PA) について、その精製法を確立し、酵素学的諸性質を明らかにした⁽¹⁾。さらに IMR-90 細胞の t-PA 生産を誘導する物質およびその誘導機構についても検討してきた⁽²⁻⁴⁾。さらに⁽⁵⁾プロテオースペプトンの刺激によって IMR-90 細胞による t-PA 生産が強く誘導されることを見出し、今回その t-PA 生産について検討したので、その結果を報告する。

方 法

1. 材料 ヒト胎児肺由来正常二倍体繊維芽細胞 IMR-90 (CCL-186) は American Type Culture Collec-

tion (ATCC) から入手した。牛胎児血清 (FCS), ダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) は Gibco 製を用いた。25 cm² T フラスコは Falcon 製, 誘導剤として用いたプロテオースペプトン, ネオペプトン, カジトン, トリプトン, ソイトン, カザミノ酸, 酵母抽出物, バクトペプトン, ラクトアルブミン加水分解物, トリプトケースリン酸培養液は Difco 製を使用した。フィブリンプレートの作製にはフィブリノーゲン, Kabi 社, トロンビン, 持田製薬, 低融点アガロース, 半井化学製を用いた。

2. 実験方法 IMR-90 細胞を T フラスコ (25 cm²) 当たり 1×10^5 細胞になるように接種し, 10% FCS を添加した DMEM (5 ml) で, コンフルエントになるまで, 37°C CO₂ インキュベーター内で培養した。コンフルエントになった細胞は, 0.15 M NaCl を含む 0.01

M リン酸緩衝液, pH 7.4 (PBS) 5 ml で2回洗浄後, 種類の物質を添加した無血清 DMEM で培養し, t-PA の生産を行った. 細胞外 t-PA 量の測定には培養上清, また細胞内 t-PA 量の測定には PBS でよく洗浄 (3回以上) した細胞を 0.5% トリドン X-100 で融解してサンプルとした. サンプル中の t-PA 活性は WHO t-PA をスタンダードとして, フィブリンプレート法⁽⁶⁾で測定した. なお細胞の生存率は, 細胞をトリパンブルーで染色後生細胞数を数えた.

結 果

1. IMR-90 細胞における t-PA の生産

Table I に示すように, 試験した種々の物質のなかでプロテオースペプトンとネオペプトンが IMR-90 細胞による t-PA 生産を強く誘導した. 無血清 DMEM に 0.25~2.0% のプロテオースペプトンあるいは, ネオペプトンの添加により培養上清中の t-PA 活性は, Fig. 1 に示すように, 0.25~1.0% の間で濃度依存的に有意な増加を示した. なお 1% プロテオースペプトン添加区の t-PA 活性は対照 (DMEM のみ) に比較して, 培養

Fig. 1. Effect of Proteose Peptone (P. Peptone) and Neopeptone on Tissue Plasminogen Activator (t-PA) Production by IMR-90 Cells. IMR-90 cells were incubated in media containing 1.8 mM Ca^{2+} and various concentrations of p. peptone (○) or neopeptone (●) at 37°C for 7 days. After incubation, t-PA activity in the medium was measured. Values shown are mean of triplicate incubations. t-PA activity in the absence of an additive was subtracted.

7日目で約 18 倍の高値を示した (Table I). またプロテオースペプトンはオートクレーブ処理によっても t-PA の生産誘導効果はかわらず, メンブランフィルターによって分子量 30,000 でカットしたところ, 分子量 30,000 以下の分画に t-PA の生産誘導活性があった. さらにプロテオースペプトンをセファデックス G-25 スーパーファインを用いたカラムで分画し, 各分画の t-PA の生産誘導活性を検討したが, 各分画それぞれに t-PA の生産誘導活性が観察され, 活性成分を特定できなかった.

2. プロテオースペプトンの処理による細胞外, 細胞内 t-PA の動態

IMR-90 細胞が生産する細胞外, 細胞内 t-PA 活性がプロテオースペプトンの処理によってどのように変化するか, 培養上清中 (細胞外), 細胞をトリドン X-100 で融かしたサンプル中 (細胞内) の t-PA 活性を経時的に測定した. Fig. 2 に示すように細胞外, 細胞内 t-PA 活性は対照に比較して有意に高く, また経時的に上昇した. また細胞外と細胞内の t-PA 活性を培養 9 日目で比較すると, 細胞外は 25×10^3 IU, 細胞内は 125 IU であり, 細胞外のほうが約 200 倍高値を示した.

Table I. Effects of Various Stimulators on Tissue Plasminogen Activator (t-PA) Production by IMR-90 Cells

Stimulators	t-PA activity (IU/ml)	
	Day 5	Day 7
Control (no addition)	5.5	7.0
Lactalbumin hydrolysate A*	58.0	58.0
Lactalbumin hydrolysate B*	78.0	94.0
Casitone	64.0	78.0
Tryptone	58.0	58.0
Soytone	55.0	52.0
Tryptocase phosphate broth	78.0	78.0
Casamino acid	58.0	51.0
Yeast extract	22.0	64.0
Proteose peptone	116.0	126.0
Bactopeptone	44.0	44.0
Neopeptone	78.0	116.0

IMR-90 cells were incubated for 7 days in medium containing 1.8 mM Ca^{2+} and 1% (w/v) various stimulator.

* A and B were different lots.

Fig. 2. Time Course of Intracellular and Extracellular t-PAs Produced by IMR-90 Cells. IMR-90 cells were incubated in the medium containing 1.8mM Ca^{2+} (●) or 1.8mM Ca^{2+} and 1% p-peptone (○) at 37°C. t-PA activities in cell extract and medium were measured after 1~9 day incubation. The amount of t-PA was expressed as activity per total cell numbers. Values shown are mean of triplicate incubations.

3. プロテオースペプトンの処理による t-PA 生産に及ぼす RNA 合成阻害剤 (アクチノマイシンD)、蛋白合成阻害剤 (サイクロヘキシミド) の影響

Fig. 3 に示すように、プロテオースペプトン処理により誘導される t-PA 生産は、RNA・蛋白両合成阻害剤の処理によってほぼ完全に抑えられた。

4. プロテオースペプトンの処理による t-PA 生産に及ぼすトロンビンの影響

1% プロテオースペプトンとともに 1.0 U/ml トロンビンを添加することによって、プロテオースペプトンが誘導する t-PA 生産へのトロンビンの影響をみた。Fig. 4 に示すように、プロテオースペプトン処理による t-PA 生産はトロンビンの添加によって、約 3~4 倍に増強された。またトロンビン単独添加においても、対照 (DMEM のみ) に比べてわずかな t-PA 生産の誘導が観察された。

5. プロテオースペプトンが誘導する t-PA 生産と誘導培地容量との関係

細胞数 1.2×10^6 を含む T フラスコに誘導培地をそれぞれ、5, 10, 20, 40, 60 ml 加え、おのおの細胞密度

Fig. 3. Effects of Actinomycin D and Cycloheximide on t-PA Production Induced by P. Peptone. IMR-90 cells were incubated for 3 days in medium containing 1% p-peptone, 1.8mM Ca^{2+} and actinomycin D (○, 0.1 ▲, 1.0 μg/ml △) or cycloheximide (○, 0.1 ■, 1.0 μg/ml □). t-PA activity in the medium was measured daily. Values shown are mean of triplicate incubations.

($2.4 \times 10^5 \sim 2 \times 10^4$ cells/ml) と t-PA 生産について検討した。その結果、Fig. 5 に示すように、t-PA 生産はプロテオースペプトン処理時の誘導培地容量が少なくなる (高細胞密度) につれて、頂値に達するまでの時間が速かった。しかし各培地容量において誘導される t-PA 量 (頂値) は誘導培地容量が多くなる (低細胞密度) につれて高値を示した。さらに低細胞密度培養の場合、誘導 8 日目の t-PA 値は 4 日目に比較して、上昇の傾向を示すが、高細胞密度培養では、逆に低下する傾向を示した。なお培養期間中の生細胞数に変化はなかった。

考 察

IMR-90 細胞から生産されるプラスミノゲンアクチベーターの約 90% は t-PA (残りはウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベーター, u-PA) である⁽¹⁾。Kadouri ら⁽⁷⁾は、ラクトアルブミン加水分解物が IMR-90 細胞による t-PA 生産を強く誘導することを報告した。われわれは、さらに誘導効果の高い誘導物質を探索し、プロテオースペプトン、ネオペプトンに強い誘導効果がある

Fig. 4. Effects of Thrombin on t-PA Production Induced by P. Peptone. IMR-90 cells were incubated in the medium containing 1.8mM Ca^{2+} , thrombin or/and p. peptone as indicated at 37°C for 7 days, then t-PA activity in the medium was measured. Values shown are mean of triplicate incubations.

ことを見出した⁽⁸⁾。ラクトアルブミン加水分解物、ネオペプトン、プロテオースペプトンによる t-PA の生産誘導効果を比較したところ、プロテオースペプトンは、製造ロットによる差が少なく、しかも誘導効果も強かった。細胞内の t-PA 含量はプロテオースペプトンの処理により、細胞外 t-PA と同様に時間の経過とともに増量した。また全細胞数当りの細胞外、細胞内の t-PA 量を比較すると、細胞外 t-PA 量のほうが約 200 倍高く、これらのことより、プロテオースペプトン処理によって、合成された t-PA はすみやかに細胞外に分泌されると思われる。プロテオースペプトン処理による t-PA の生産誘導は、RNA 合成阻害剤、蛋白合成阻害剤の処理によって抑制された。以上の結果から、プロテオースペプトンは IMR-90 細胞による t-PA の *de novo* 合成を促進していることが示唆された。一方、トロンビンはヒト血管内皮細胞において、t-PA の生産と放出を刺激することが知られている⁽⁹⁾。そこで IMR-90 細胞における t-PA 生産へのトロンビンの効果を検討した。

IMR-90 細胞において、トロンビン 1.0 U/ml の処理

Fig. 5. Effects of Volumes of Induction Medium on t-PA Production Induced by P. Peptone. IMR-90 cells (1.2×10^6 cells/bottle) were incubated for 8 days in various volumes of induction medium (5 ml (▲), 10 ml (□), 20 ml (●), 40 ml (△), or 60 ml (○)) containing 1% p. peptone and 1.8mM Ca^{2+} . At the time indicated, t-PA activity in the medium was measured. Values shown are mean of triplicate incubations.

は血管内皮細胞にみられるような著明な誘導効果は示さなかった。このことは、t-PA の生産を考えたとき、細胞の種類によって刺激の種類も異なることを意味する。しかし、プロテオースペプトン処理の系にトロンビンを加えると、プロテオースペプトンによる t-PA 生産は約 3~4 倍に増強された。このトロンビンの相乗効果は Low らにより報告⁽¹⁰⁾されたヒト繊維芽細胞でのセリンプロテアーゼの調節機構において、セリンプロテアーゼを t-PA に置き換えることによって説明がなされるかも知れない。すなわち、プロテオースペプトンの刺激により生産、分泌された t-PA は、細胞外に分泌されたセリンプロテアーゼ阻害因子ネクシンによって不活性化され、細胞表面に存在するネクシンレセプターを介してレセプターエンドサイトシスによって細胞内に取り込まれる。この系に t-PA と同じセリンプロテアーゼであるトロンビンを加えると、ネクシンと t-PA との結合がトロンビンによって競合的に阻害されるため⁽¹¹⁾、t-PA の取り込み量が抑えられ、その結果、活性を持った遊離の t-

PAが増えると考えられる。t-PA生産のフィードバックコントロールに関して、プロテオースペプトン処理したIMR-90細胞によるt-PA生産と誘導時の培地容量との関係について検討した。各培地容量でのt-PAの生産性は、本実験条件下において、短時間(24時間以内)の誘導では、高細胞密度培養、逆に長時間では、低細胞密度培養のほうが生産効率が高い結果が得られた。したがって、高細胞密度培養において、t-PA生産を行う場合、短時間(t-PAの生産速度が対数期)で灌流させる方法が効率的である。IMR-90細胞によるt-PAの生産と同じように哺乳動物細胞によるt-PAの生産は、t-PAの細胞外濃度によって制御される、いわゆるネガティブフィードバックコントロールの関与が知られている⁽¹²⁾。したがって、細胞培養によりt-PAの生産を行う場合、t-PA生産に対するネガティブフィードバックコントロールを最小限にする方法を考慮しなければならない。われわれの行った細胞数に対する誘導時の培地量を多くする方法もその1つである。その他に培地系をつねに灌流させ、t-PAを含む培地を部分的に取り出し、新たな培地で置換させる方法⁽⁶⁾、さらに誘導されたt-PAを培地から特異的に、たとえば、t-PAに対するモノクローナル抗体で連続的に取り除いてリサイクルさせる方法⁽¹³⁾などがある。またt-PA生産能は細胞の加齢とともに高くなることが知られている⁽¹⁴⁾。以上のことから細胞培養によるt-PAの生産は培養系の規模、無菌操作の容易さ、細胞の種類、誘導効果の高い誘導剤、細胞の加齢、細胞の長期維持、ランニングコスト等を考えたうえで、ネガティブフィードバックコントロールを最小限にする方法を選択すべきである。また細胞の状態(平面以外の担体)に増殖させた場合など)において、t-PAの生産性が大きく異なることが観察されることがあるので、Tフラスコからスケールアップを考えるときにはそのことを念頭に入れておく必要がある。

要 約

(1) IMR-90細胞におけるt-PA生産は1%プロテオースペプトンの刺激によって強く誘導され、しかもプロテオースペプトンの製造ロット差も少なかった。

(2) プロテオースペプトンの刺激はIMR-90細胞によるt-PA *de novo* 合成を促進し、合成されたt-PA

はすみやかに細胞外に分泌された。

(3) IMR-90細胞によるt-PA生産を考えたとき、高細胞密度培養では短時間(t-PA生産の対数期、すなわちネガティブフィードバックによる制御がかからない時点)での灌流方式が、効率的であると考えられる。一方低細胞密度培養ではネガティブフィードバックによる制御が弱い、すなわち、生産の制御が働くまでに時間を要し、しかもt-PAの最高到達値も高くなることから、本実験下(培養8日目)で比較すると、高細胞密度培養よりはるかに、生産性が高かった。

- (1) Y. Itagaki, Y. Yasuda, T. Morinaga, S. Mitsuda and K. Higashio : *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 1225 (1991).
- (2) A. Suzuki, Y. Itagaki, S. Mitsuda, K. Higashio and G. Kawanishi : *Cellular Signaling*, **3**, 99 (1991).
- (3) A. Suzuki, Y. Itagaki, S. Mitsuda and K. Higashio : *Thromb. Res.*, 投稿中.
- (4) A. Suzuki, Y. Itagaki, S. Mitsuda and K. Higashio : *Eur. J. Pharmacol.*, 投稿中.
- (5) Y. Itagaki, A. Suzuki, T. Morinaga and K. Higashio : *Thromb. Haemost.*, **58**, 433 (1987).
- (6) N. A. Marsch and C. L. Arocha-Pinango : *Tromb. Diath. Haemorph.*, **28**, 75 (1972).
- (7) A. Kadouri and Z. Bohak : *Bio/technology*, **1**, 354 (1983).
- (8) T. Morinaga, Y. Itagaki, A. Suzuki and K. Higashio : *Thromb. Haemost.*, **58**, 433 (1987).
- (9) E. G. Levin, J. Anderson, L. A. Harker and O. U. Marzec : *J. Clin. Invest.*, **74**, 1988 (1984).
- (10) D. A. Low, J. B. Baker, W. C. Koonce and D. D. Cunningham : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 2340 (1981).
- (11) E. W. Howard and D. J. Knauer : *J. Cell. Physiol.*, **131**, 276 (1987).
- (12) A. Kadouri and Z. Bohak : "Advances in Biotechnological Processes Production of Plasminogen Activator by Cells in Culture," Vol.5, Alan R. Liss Inc, New York, 1985, p.275.
- (13) 公開特許公報 平成1-235592, 細胞培養による組織プラスミノゲン活性化因子の製造法.
- (14) S. Mitsuda, Y. Matsuda, N. Kobayashi, E. Kumazawa, K. Higashio and G. Kawanishi : 雪印乳業研究所報告, Vol.88, 1989, p.21.