薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
105 (2) 194—197 (1985)

動物由来レクチンによる骨髄細胞の腫瘍細胞破壊活性の誘導

中島由紀,^a 奥富隆文,^a 名取俊二,^b 山崎正利,^a 水野伝一^a

帝京大学薬学部,^a 東京大学薬学部^b

Animal Lectin-Dependent Bone Marrow Cell-Mediated Cytolysis

YUKI NAKAJIMA,^{*,a} TAKAFUMI OKUTOMI,^a SYUNJI NATORI,^b

MASATOSHI YAMAZAKI,^a and DEN'ICHI MIZUNO^a

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Teikyo University,^a Sagamiko-cho, Tsukui-gun,
Kanagawa, 199-01, Japan and Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokyo
University,^b Hongo, 7-3-1, Bunkyo-ku, Tokyo, 113, Japan

(Received July, 13, 1984)

To know the role of animal lectins, we examined their participation in tumor recognition and rejection in cooperation with phagocytic cell cascade. We report here that *Sarcophaga peregrina* lectin induced in the hemolymph of larvae on injury can lyse MM46 tumor cells in cooperation with bone marrow cells. Carbohydrate moieties on cell membranes were recognized in cytolytic process. We had already reported the inhibition of tumor development *in vivo* by this lectin. This may be due to a phagocytic cell cascade reaction in which *S. peregrina* lectin can lyse tumor cells in cooperation with immature bone marrow cells, polymorphonuclear leukocytes and finally with macrophages.

Keywords—bone marrow cell; animal lectin; tumor lysis; carbohydrate moiety

序

異物排除や腫瘍細胞の排除に関与する細胞として知られてきたマクロファージ (Mφ), 多形核白血球; polymorphonuclear leukocyte (PMN), ナチュラルキラー細胞, リンパ球などは, 骨髄にその分化成熟の源を持つ細胞である. 我々もこれまでに, 食細胞系に属する Mφ,¹⁾ PMN²⁾ について抗腫瘍抗体及び細胞凝集素である植物レクチンの介在による腫瘍細胞破壊反応を明らかにしてきた. そしてさらに, このような抗腫瘍反応の出現が, 未熟な細胞の多く存在すると考えられる骨髄細胞のレベルにまでさかのぼれることを明らかにした.³⁾

さて一方, 近年動物の体内にもレクチンの存在することが明らかにされ, その役割について様々な検討が行われている.⁴⁾ しかしながら腫瘍の認識排除にどのように関与するかは知られていない. したがって我々は, これらの動物レクチンの骨髄細胞から末梢の食細胞に広く腫瘍傷害性を付与するメディエーターとしての活性について検討した.

その結果, 昆虫の幼虫から得られたレクチンが骨髄細胞や末梢の Mφ, PMN と共同して腫瘍細胞を破壊することを見い出した. 動物での異物や腫瘍排除におけるレクチンの役割について考察したい.

実　験　の　部

実験材料並びに方法

実験動物 近交系 C3H/He マウス (8—9 週齢雄) を静岡実験動物より購入して用いた.

癌細胞 C3H/He マウス乳癌由来 MM46 腫瘍細胞を腹水型で継代移植したものを用いた.

骨髄細胞 C3H/He マウスの大腿骨骨髄より細胞を得, ナイロンメッシュを通した後, 300 g, 5 分間遠心で 2 回洗滌して用いた.⁵⁾

レクチン *Sarcophaga peregrina* レクチンは以下のように調製し, 精製したものを用いた.⁵⁾ センチクバエ 3 齢幼虫の体表に傷をつけた後, 体液を得た. これをセファロース 4B カラムにかけ, 吸着分画をガラクトー

スで溶出させ、透析によりガラクトースを除いた。この標品は電気泳動において均一であり、ヒツジ赤血球凝集活性を示し、この活性はガラクトースまたはラクトース存在下では完全に阻害された。ドジョウ卵より得られた loach egg レクチンは、東北薬科大学榊原房夫、川内広明両博士からいただいたものを、⁶⁾ フジツボの一種 *Balanus balanoides* から分離したレクチンは、北里大学 (水産) 神谷久男博士よりいただいたものを使用した。⁷⁾ *Limulus polyhemus* (カブトガニの一種)、*Helix aspersa*, *Helix pomatia* (カタツムリの一種) より得られたレクチンは、E-Y Laboratories (San Mateo, Calif, U.S.A.) より購入した。

レクチン依存骨髄細胞による腫瘍細胞破壊反応 (Lectin Dependent Bone Marrow Cell Mediated Cytolysis)
骨髄細胞による腫瘍細胞破壊活性は以下のように測定した。大腿骨より得た骨髄細胞 (2×10^6) に ^{51}Cr で標識した MM46 腫瘍細胞 (5×10^3) を加え、レクチン存在又は非存在下で fetal calf serum 5% を含む RPMI 1640 培地 200 μl 中、 37°C 5% CO_2 の条件で培養した。16 時間後上清に遊離された ^{51}Cr のカウントを測定し、破壊の度合とした。破壊活性は以下の式で表した。

$$\% \text{ cytolysis} = \frac{\text{experimental counts} - \text{control counts}}{\text{maximum releasable counts} - \text{control counts}} \times 100$$

また maximum releasable counts は、 ^{51}Cr で標識された腫瘍細胞を 3 回凍結融解し、上清に遊離されたカウントを用いた。Control counts としては、レクチン非存在の系を用いた。

結 果

I. 動物レクチンによる腫瘍細胞破壊反応

我々はすでに骨髄細胞が、抗腫瘍抗体及び植物レクチンである小麦胚芽レクチンを介して腫瘍細胞破壊を示すことを明らかにしてきた。⁸⁾ そこで、動物レクチンにおいても、このような腫瘍細胞破壊反応を誘導するようなレクチンが存在するか否かを検討した。Table I は、種々の動物レクチンに依存した骨髄細胞の腫瘍細胞破壊活性を比較したものである。*Sarcophaga peregrina* レクチンにおいて、腫瘍細胞破壊活性が認められた。

次に、*Sarcophaga peregrina* レクチンについて、レクチンの濃度と骨髄細胞の腫瘍細胞破壊反応の強度について検討した。Fig. 1 で示されるように、腫瘍細胞破壊反応はレクチンの濃度に依存して増強された。

TABLE I. Animal Lectin-Dependent Bone Marrow Cell-Mediated Tumor Lysis

Lectin		Sugar specificity	Cytolysis (%)
Loach egg	(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	Rhamnose	-6 ± 3
<i>Limulus polyhemus</i>	(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	Sialic acid	-13.4 ± 3.4
<i>Helix aspersa</i>	(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)		-11.3 ± 0.4
<i>Helix pomatia</i>	(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	N-Acetyl galactosamine	0.4 ± 0.1
<i>Sarcophaga peregrina</i>	(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	Galactose	$5.6 \pm 0.6^{a)}$
<i>Balanus balanoides</i>	(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	Galactose, galacturonic acid	0.9 ± 1.5

Bone marrow cells (2×10^6 cells) and ^{51}Cr -labeled MM46 tumor cells (5×10^3 cells) were cultured with various animals lectins. Statistically significant difference as compared to the control (a) $p < 0.05$.

II. *S. peregrina* レクチン依存腫瘍細胞破壊反応の解析

細胞凝集素であるレクチンは、細胞膜表面上の糖鎖を認識することにより、細胞を凝集させることが知られている。そこで、*S. peregrina* レクチンによる腫瘍細胞破壊反応においても、細胞膜表面の糖鎖の認識が必要であるのか否かを検討した。Fig. 2 は単糖による腫瘍細胞破壊反応の阻害を検討したものである。%inhibition は、阻害糖の存在しない系の腫瘍細胞破壊活性を 100% とした際の各実験群の相対値を示している。結果は、*S. peregrina* レクチン依存腫瘍細胞破壊反応は、レクチンの認識糖である D-ガラクトースにより特異的に阻害され、他の糖では阻害されなかった。このことから、*S. peregrina* レクチン依存腫瘍細胞破壊反応には、細胞膜表面上の糖が重要な働きをしていることが示唆された。

考 察

ここでは、動物レクチン依存の腫瘍細胞破壊反応を検討し、*S. peregrina* レクチンによって骨髄細胞が腫瘍細胞

Fig. 1. *S. peregrina* Lectin-Dependent Bone Marrow Cell-Mediated Tumor Lysis

Bone marrow cells (2×10^6 cells) and ^{51}Cr -labeled tumor cells (5×10^3 cells) were cultured with various concentrations of *S. peregrina* lectin.

Fig. 2. Effects of Sugars on Lectin-Dependent Bone Marrow Cell-Mediated Cytolysis

Various sugars (50 mM) were added to the mixture of bone marrow cells (2×10^6 cells) and ^{51}Cr -labeled tumor cells (5×10^3 cells) with *S. peregrina* lectin (100 $\mu\text{g/ml}$).

TABLE II. Animal Lectin-Dependent Cellular Cytotoxicity

Mediator	Lectin-dependent cellular cytotoxicity by		
	Bone marrow cells	Polymorphonuclear leukocytes	Macrophages
Animal lectins			
<i>S. peregrina</i>	+	+	+
<i>B. balanoides</i>	—	—	(+)
Loach egg	—	—	(+)
<i>H. aspersa</i>	—	—	—
<i>H. pomatia</i>	—	—	—

a) Grade: +, positive reaction; (+), partly positive reaction; —, negative reaction.

胞に対して破壊活性を示すことを明らかにした。即ち、レクチンなどの適当なメディエーターを介在させることにより、成熟した食細胞ばかりでなく、未熟な細胞においても十分な腫瘍細胞破壊を引き起こすことができることが示され、腫瘍細胞破壊活性は、未熟な細胞から成熟した細胞まで広く存在することが考えられた。

近年になってレクチンは植物に限らず、海綿などの下等動物から哺乳類に至る動物にも見い出され、その生物学的な役割が注目されている。⁴⁾ 一定の特異性を持ったレクチンを介する細胞同志の接着や細胞と物質の接着は、次に組織形成、分化や捕食などいろいろな機能に展開していくと考えられる。我々は、動物由来のレクチンが、異物や腫瘍排除に関与していることを考えて、種々の動物レクチンについて、骨髄細胞、PMN,⁸⁾ Mφ⁹⁾ 媒介の腫瘍細胞破壊反応を検討した。Table II にこれまでのデータをまとめてみたが、*S. peregrina* レクチンは、いずれの細胞とも共同して有効であり、さらに *in vivo* でも治療効果を持つことも分かっている。⁸⁾ このことは、生体内においてこのようなレクチンが存在すれば、未熟な細胞から成熟した細胞までの一連の細胞が腫瘍細胞を破壊することができ、腫瘍の排除も可能であることを示している。*S. peregrina* レクチンは、ハエの幼虫に傷をつけた時、あるいは変態時に体液中に誘導産生されるレクチンで、同じこのレクチンが、一面では外からの異物の排除に当り、他面では自己の中での不要な組織の破壊とその組成物の変態への利用に当たる。⁵⁾ このような状態では、レクチンを介して食細胞系の活動が活発になっていることが想像される。

これを系統発生で考えれば、進化の過程のうち抗体の生じない動物ではこのような機構が存在していることになり、これを個体発生で考えれば、高等動物においても、特異的な抗体が出現する以前での異物や腫瘍の排除には、このようなレクチンを介しての食細胞系関与の機構があるのではないだろうか。実際、腫瘍細胞を認識する

レクチンの存在も報告されており,¹⁰⁾ 今後はこうした特異性のより低いレベルでの腫瘍排除機構についても考えていくべきと考えている。

謝辞 貴重なレクチンを分与して下さった東北薬科大学 榊原房夫, 川内広明両博士, 北里大学水産学部 神谷久男博士に深謝致します。

引用文献

- 1) M. Yamazaki, "Macrophage-Mediated Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity," ed. by Hillel S. Koren, Marcel Dekker, Inc., New York and Basel, 1983, p. 185; M. Kurisu, M. Yamazaki, D. Mizuno, *Cancer Res.*, **40**, 3798 (1980).
- 2) S. Tsunawaki, H. Oshima, D. Mizuno, M. Yamazaki, *Gann*, **74**, 258 (1983); S. Tsunawaki, M. Ikenami, D. Mizuno, M. Yamazaki, *ibid.*, **74**, 265 (1983); 池並通裕, 山崎正利, 薬誌, **103**, 1298 (1983).
- 3) Y. Nakajima-M., T. Okutomi, S. Abe, D. Mizuno, M. Yamazaki, *Jpn. J. Exp. Med.*, **53**, 227 (1983).
- 4) S. H. Barondes, *Ann. Rev. Biochem.*, **50**, 207 (1981).
- 5) H. Komano, D. Mizuno, S. Natori, *J. Biol. Chem.*, **255**, 2919 (1980); D. Mizuno, H. Komano, S. Natori, "Self-Defense Mechanisms," ed. by D. Mizuno, Z. A. Cohn, K. Takeya, N. Ishida, University of Tokyo Press, Tokyo, 1982, p. 15; 名取俊二, "生体防御の機構," 初版, 水野伝一, 武谷健二, 石田名香雄編, 東京大学出版会, 東京, 1980, p. 41.
- 6) 榊原房夫, 高柳義一, 川内広明, 薬誌, **101**, 918 (1981).
- 7) K. Ogata, K. Muramoto, M. Yamazaki, H. Kamiya, *Bull. Japan Soc. Sci. Fish.*, **49**, 1371 (1983).
- 8) M. Yamazaki, M. Ikenami, H. Komano, S. Tsunawaki, H. Kamiya, S. Natori, D. Mizuno, *Gann*, **74**, 576 (1983).
- 9) H. Nakajima, H. Komano, M. Esumi-Kurisu, S. Abe, M. Yamazaki, S. Natori, D. Mizuno, *Gann*, **73**, 627 (1982); M. Yamazaki, M. Esumi-Kurisu, D. Mizuno, K. Ogata, H. Kamiya, *ibid.*, **74**, 405 (1983); M. Yamazaki, T. Okutomi, F. Sakakibara, H. Kawauchi, D. Mizuno, *J. Leukocyte Biol.*, **35**, 241 (1984).
- 10) 江川滉二, 谷野隆江, "生体防御の機構," 初版, 水野伝一, 武谷健二, 石田名香雄編, 東京大学出版会, 東京, p. 353.