

子宮内膜癌細胞株における Phorbol ester の tissue-type plasminogen activator (t-PA) 分泌に与える影響

香川医科大学母子科学講座

*東京大学医学部附属病院分院産婦人科

単 莉 加藤 賢朗* 川名 尚* 神保 利春

Effect of Phorbol Ester on Tissue-type Plasminogen Activator (t-PA) Secretion in Endometrial Carcinoma Cell Line in vitro

Li SHAN, Yoshio KATO*, Takashi KAWANA*

and Tosiharu JIMBO

Department of Perinato-Gynecology, Kagawa Medical School, Kagawa

**Department of Obstetrics and Gynecology, Tokyo University Branch Hospital, Tokyo*

概要 正常子宮内膜及び子宮内膜癌細胞は PA 活性を有していることが知られているが、その調節機序に関する報告は少ない。本研究では、子宮内膜癌細胞株(KLE細胞)を用いて、t-PA分泌の調節因子について検討した。Insulin, T₃, Hydrocortisone, 8-bromo-cAMP, Retinoic acid, PDGF, IGF-I, TNF- α , basic FGF は t-PA 分泌に何らの影響を与えなかった。しかし、phorbol ester の中で最も強力な作用を有する PMA が著明に t-PA の分泌を促進したので詳細に検討した。PMA の t-PA 分泌促進作用は容量依存的であり 10^{-10} M より control に対して有意差を示し、 10^{-8} M で最大(約6倍)となった。Time course では PMA (10^{-8} M) 添加後、3時間から有意の分泌促進作用を示し、12時間後に最大となった。phorbol ester のなかではさらに生物活性を有する、PDD は 10^{-8} M より有意の t-PA 分泌促進作用を示し、 10^{-7} M で最大となった。その他の生物活性を有しない phorbol ester である 4α -PDD, phorbol (10^{-9} ~ 10^{-7} M) は t-PA 分泌に対して何らの作用を示さなかった。8-bromo-cAMP, cholera toxin は単独では t-PA 分泌に影響を与えなかったが、PMA との同時添加により PMA の t-PA の分泌促進作用を約2倍増強した。cycloheximide, Actinomycin D は PMA の t-PA 分泌促進作用を完全に抑制した。PMA の72時間までの添加実験では、PMA は KLE 細胞の形態、増殖に影響を与えなかった。

以上より、phorbol ester が、子宮内膜癌細胞において t-PA 分泌を促進し、その作用は RNA 及び蛋白質合成を介していることが示唆された。また、KLE 細胞においては phorbol ester-protein kinase C 系と cAMP-protein kinase A 系の細胞内情報伝達系には複雑な相互作用が存在すると考えられた。よって、KLE 細胞は子宮内膜細胞における PA system を解明するための有用なモデルとなりうると考えられた。

Synopsis A plasminogen activator (PA) system is involved in ovulation, implantation, tumor invasion and metastasis. In order to clarify the regulation of this PA system in endometrial cells, we examined which agent affecting cellular function altered tissue-type plasminogen activator (t-PA) secretion by endometrial carcinoma cell line (KLE cells) in vitro. Triiodothyronine, retinoic acid, insulin, 8-bromo-cAMP, PDGF, IGF-I, basic FGF or TNF- α did not alter t-PA secretion while the activator of protein kinase C, phorbol myristate acetate (PMA) stimulated t-PA secretion in a dose-dependent fashion (10^{-10} ~ 10^{-8} M). The time required to give a statistically significant increase in t-PA over control was 3 hours, and the maximal increase was seen after 24 hours of exposure. Another active phorbol ester, PDD also stimulated t-PA secretion while inactive forms of phorbol ester, 4α -PDD and phorbol did not alter it. Cholera toxin or 8-bromo-cAMP did not affect t-PA secretion, but enhanced PMA-stimulated t-PA secretion. Cycloheximide and actinomycin D completely abolished PMA-stimulated t-PA secretion.

These results suggest that (1) t-PA secretion in the endometrial carcinoma cell is modulated by

a protein kinase C system, (2) This effect is through new RNA production and protein synthesis. (3) There is a complicated relationship between protein the kinase C and protein kinase A system as to the regulation of t-PA secretion. This would be a suitable model to clarify the PA system in endometrial cells.

Key words: Phorbol ester • Tissue-type plasminogen activator (t-PA) • Endometrial carcinoma

緒 言

Plasminogen activator (PA) は serine protease の一種であり, plasminogen を plasmin に変換する。一方, plasmin は蛋白分解素であり, フィブリンを分解することによって血栓を溶解するのみならず細胞外構築を構成するさまざまな蛋白質を分解する。さまざまな正常及び悪性の細胞で PA 活性が確認されており, plasmin 活性を高めることにより排卵, 着床, 腫瘍細胞の浸潤, 転移などさまざまな生物現象に関与していると考えられている¹⁾。PA には tissue-type と urokinase-type の異なる 2 種の蛋白質が知られておりそれぞれ t-PA, u-PA と呼ばれている¹⁾。

phorbol ester は発癌 promoter として知られているが, protein kinase C (PKC) を活性化することにより細胞の分化誘導, 細胞増殖及びさまざまな物質の産生の調節などの生物作用をも有する²⁾³⁾。いくつかの細胞で, phorbol ester が PA 活性あるいは t-PA, u-PA の産生を促進すると報告されている^{1)4)5)~7)}。

正常子宮内膜及び子宮内膜癌細胞には PA 活性があり, t-PA あるいは u-PA を産生分泌することが知られている⁸⁾⁹⁾。しかし, PA 活性あるいは PA の産生の調節機序に関する報告は少ない⁹⁾¹⁰⁾。我々は, 子宮内膜癌細胞株を用いて t-PA 分泌に影響を与える因子について検討し, phorbol ester が t-PA の分泌を促進することを明らかにしたので報告する。

研究材料と方法

用いた試薬は以下のごとくである。

phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA), phorbol-12, 13-didecanoate (PDD), 4 α -phorbol-12, 13-didecanoate (4 α -PDD), phorbol, cycloheximide, Actinomycin D, 8-bromo-cAMP, Hydrocortisone, Retinoic acid は Sigma 社より購入した。basic FGF, TNF- α , PDGF, IGF-I は

TOYOBO 社より購入した。リコンビナント ヒト Insulin はシオノギ製薬より購入した。

細胞の培養

ATCC より入手した低分化の子宮内膜癌細胞株¹¹⁾ KLE 細胞を, 10%FCS (fetal calf serum) (GIBCO) • 88ng/ml Kanamycin (KM) • Ham's F12-Dulbecco's modified-Eagle's medium (DMEM) (1:1) (GIBCO) の中に単層培養し, 継代した。実験の前に温 DMEM (37°C) で細胞を洗い, 0.025% Trypsin-EDTA (GIBCO) を用いて細胞を剥離した。直径 35mm の 6 穴 multidish (Costar) に 2ml の 10%FCS • Ham's F12 • DMEM (1:1) を加え, 3 × 10⁵ 細胞/well の濃度で撒いた。

三日後, 培養液を除去し, DMEM で洗い (37°C), 新鮮な 4% FCS • Ham's F12 • DMEM (1:1) 2ml を加え, 更に試薬を添加し, 1 ~ 72 時間 incubate した。実験の最後に, 培養液を採取し, 遠心して (1,500g, 20分) 上清を測定するまで -40°C に保存した。細胞を前述のごとく, Trypsin-EDTA を用いて剥離回収し, Coulter Cell Counter (Coulter Scientific Instrument) を用いて, 細胞数を数えた。すべての実験は, triplicate culture で行った。

phorbol ester は DMSO で溶解した。実験に用いた DMSO の最大濃度は, 0.01% 以下であり, この濃度の DMSO は細胞機能に何らの影響を与えなかった。

培養液中の t-PA は ELISA 法によって測定した。この測定は, US ダイアグノ社の t-PA 測定 kit を用いた。方法は, ダイアグノ社の Instruction に従った。

細胞培養液及び細胞抽出液の t-PA 活性は, SPECTROLYSETM t-PA activity and inhibitor assay kit (American Diagnostica 社) を用いて測定した。細胞抽出液の調整は, 以下の方法によった。培養液を除去して, 細胞を PBS でよく洗った

表 1

| Treatment | | t-PA in medium (ng/10 ⁶ cells/well) M±SEM |
|-----------|-------------------------------------|--|
| EXP. 1 | Control | 27.09±2.58 |
| | PMA (10 ⁻⁸ M) | 98.61±8.31 |
| | Insulin (40mU/ml) | 27.62±0.92 |
| | T ₃ (10 ⁻⁸ M) | 25.20±1.90 |
| | T ₃ (10 ⁻⁶ M) | 26.82±1.21 |
| | Hydrocortison (10 ⁻⁶ M) | 29.22±1.35 |
| | 8-bromo-cAMP (0.1mM) | 21.43±0.66 |
| | 8-bromo-cAMP (1.0mM) | 23.10±3.75 |
| EXP. 2 | Control | 36.99±1.44 |
| | Retinoic acid (10 ⁻⁶ M) | 49.30±6.01 |
| EXP. 3 | Control | 18.50±1.10 |
| | PDGF (1ng/ml) | 14.00±2.10 |
| EXP. 4 | Control | 19.80±2.60 |
| | IGF-I (50ng/ml) | 22.70±0.46 |
| | IGF-I (500ng/ml) | 17.60±0.26 |
| | PMA (10 ⁻⁸ M) | 58.70±3.67 |

EXP. 1は24時間の incubation で ; EXP. 2~4は48時間の incubation を行った。

後, cell scraper で細胞を剥がし, 遠心分離した。得られた細胞をよく洗い, tris-buffer で resuspend した後, 超音波 homogenizer で細胞膜を破壊し, 遠心分離し, 上清を得た。

統計

統計的有意差検定は Student t-test により行った。

結 果

細胞機能を調節するさまざまな物質を添加し,

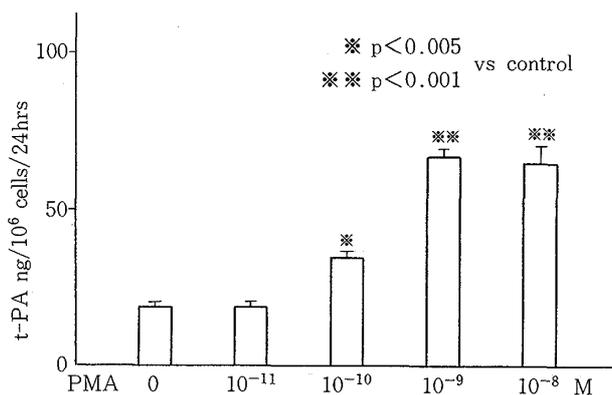


図1 Effect of different doses of PMA on t-PA secretion by KLE cells.

24時間あるいは48時間 incubate し, t-PA の分泌に与える影響について検討した。Insulin (40mU/ml), T₃ (10⁻⁸M, 10⁻⁶M), Hydrocortison (10⁻⁶M), Retinoic acid (10⁻⁶M), 8-bromo-cAMP (0.1 mM, 1.0mM), PDGF (1ng/ml), IGF-I (50ng/ml, 500ng/ml), TNF-α (0.2~200U/ml) (表には示さないが), basic FGF (0.5~500ng/ml) (表には示さないが) は t-PA の分泌に対して何らかの作用もなかった。

しかし, PMA (10⁻⁸M) が, t-PA の分泌を促進したので, PMA の t-PA 分泌促進作用につき, 詳細に検討した (表1)。

1. PMA による t-PA 分泌促進作用

KLE 細胞において PMA は t-PA の分泌を濃度依存的に促進した。図1に示すごとく PMA による t-PA 分泌促進作用は 10⁻¹⁰M より control に

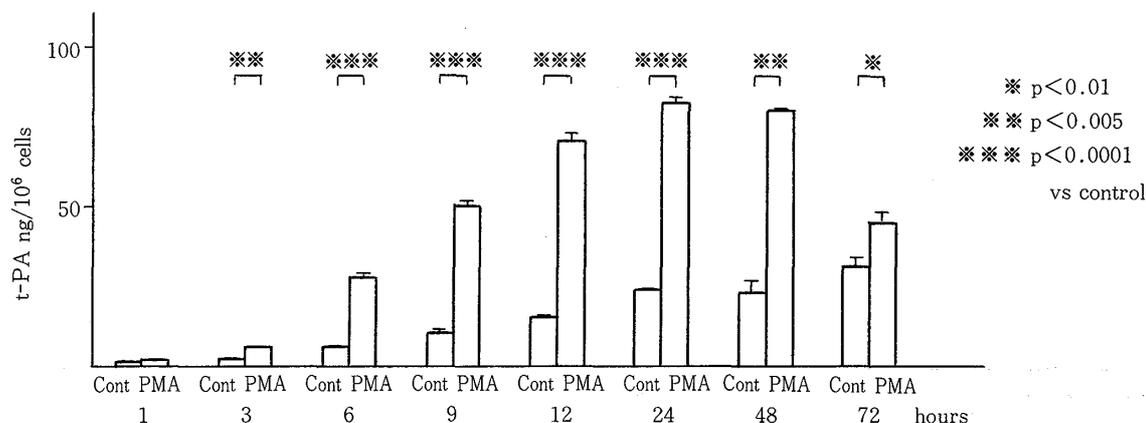


図2 Effect of PMA (10⁻⁸M) on t-PA secretion by KLE cells at different times in culture.

比べ有意差を示し(1.7~2.5倍, $p < 0.005$), 10^{-8} Mで最大となった(約6.3倍, $p < 0.001$). 図2にPMA (10^{-8} M)によるt-PA分泌促進作用のtime courseを示した. PMA添加後3時間から有意にt-PA分泌促進作用がみられ(2.5倍), 12時間後ピークになり(4.5倍), 24時間まで持続し, その後徐々に減少した. 72時間後には1.2~1.4倍のt-PA分泌増加を示した.

2. 他の phorbol ester の t-PA 分泌に与える影響

PMAと同様に, 生物活性を有する phorbol esterであるPDDは図3に示すごとく 10^{-8} Mからcontrolに対して有意にt-PA分泌を促進した. 生物活性を持たない phorbol esterである 4α -PDDと phorbol (10^{-9} ~ 10^{-7} M)は, t-PAの分泌に対して何らの作用も示さなかった. 8-bromo-cAMP及び内因性cAMP刺激物質である cholera toxinはそれ自体ではt-PAの分泌を促進しなかったが, PMAのt-PA分泌促進作用を約2倍

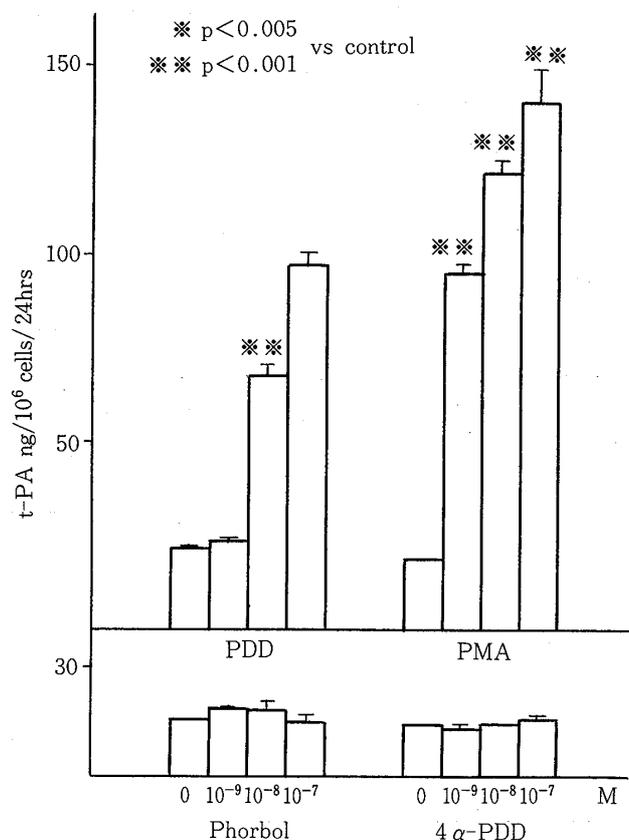


図3 Effect of different doses of PMA, PDD, 4α -PDD, Phorbol on t-PA secretion by KLE cells.

増強した(図4).

蛋白合成阻害剤である cycloheximide ($0.2\mu\text{g}/\text{ml}$)をPMAと同時に添加し, 24時間 incubate したところ, PMAのt-PA分泌促進作用は完全に阻止された(図5). また, RNA合成阻害剤である Actinomycin D ($0.1\mu\text{g}/\text{ml}$)もPMAのt-PA分泌促進作用を阻害した(図6).

3. t-PA 活性

細胞抽出液及び細胞培養液のt-PA活性は認められなかった. また, PMA添加後24時間の細胞抽出液, 細胞培養液でもt-PA活性は認められなかった.

4. 形態学的変化及び細胞増殖

PMA (10^{-8} M)添加後72時間までの incubation

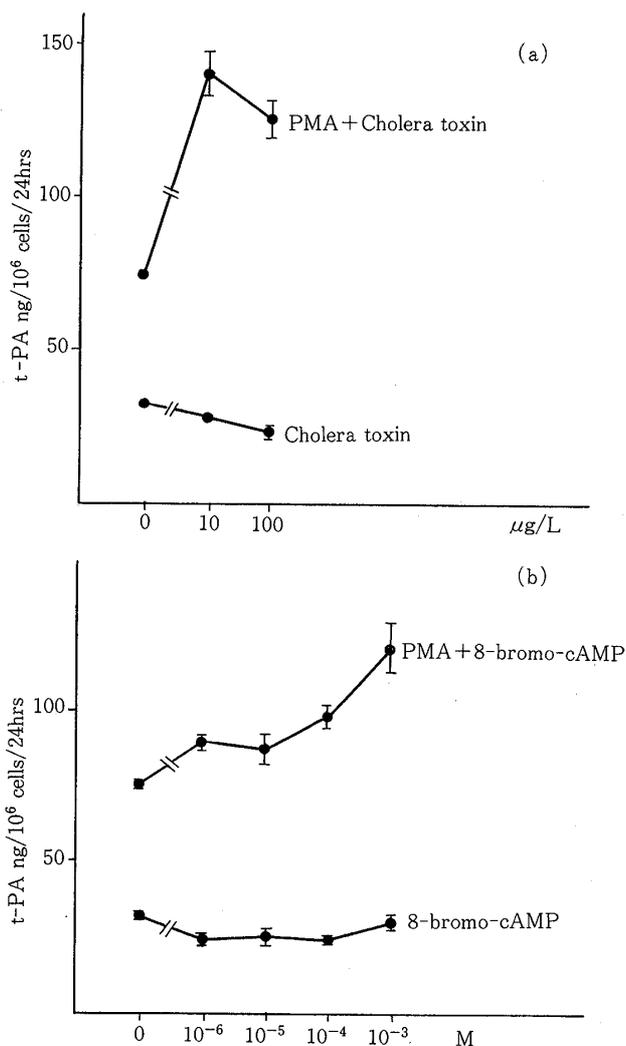


図4 Effect of different doses of cholera toxin/8-bromo-cAMP or combination with PMA (10^{-8} M) on t-PA secretion by KLE cells.

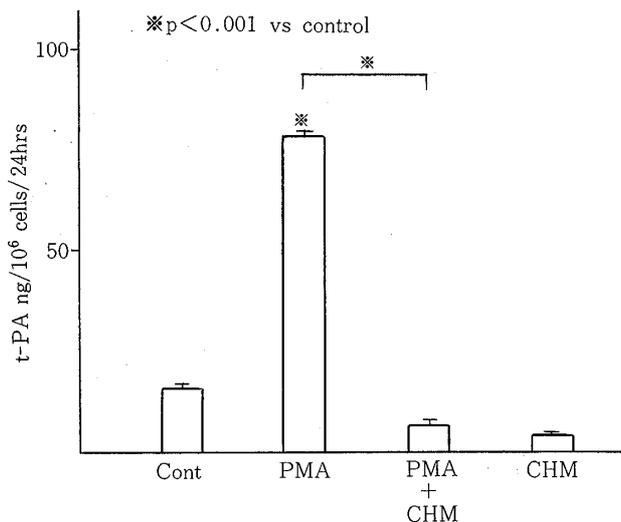


図5 Effect of PMA (10^{-8} M) alone or in combination with cycloheximide (CHM) on t-PA secretion by KLE cells.

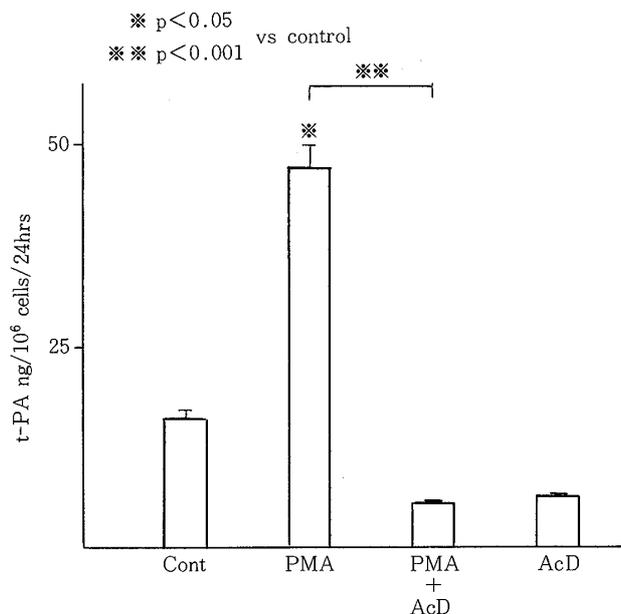


図6 Effect of PMA (10^{-8} M) alone or in combination with Actinomycin D (AcD) on t-PA secretion by KLE cells.

では PMA は KLE 細胞の形態及び細胞数を変化させなかった。

考 察

今回の我々の実験で, phorbol ester の中で生物活性を有する PDD 及び PMA が子宮内膜癌細胞株, KLE 細胞において t-PA 分泌を促進することが明らかになった。また, Actinomycin D あるいは cycloheximide の同時添加により, PMA の t-

PA 分泌促進作用が阻止されたことより, この作用は RNA と蛋白合成が関与していると考えられた。また, PKC を活性化する作用を有する PMA, PDD のみが t-PA 分泌を促進したことより, この作用は PKC を介すると考えられた。

種々の細胞で t-PA の産生あるいは PA 活性を調節するさまざまな因子が報告されている。phorbol ester はメラノーマ細胞⁶⁾, HeLa 細胞⁷⁾, 内皮細胞⁹⁾, 卵巣癌細胞⁴⁾で t-PA の産生を促進する。この作用は t-PA mRNA の増加による⁵⁾⁷⁾ことが明らかにされている。我々の phorbol ester の t-PA 分泌促進作用における容量依存性, time course の結果は上記の報告と同様であった。Waller and Schleuning⁷⁾は, HeLa 細胞において phorbol ester の t-PA 抗原量及び mRNA 増加には蛋白合成の関与が必要であることを示した。

KLE 細胞において, 同様に蛋白合成を介しているか否かについては今後検討する必要があると考えられた。

cAMP 及び cAMP を活性化するペプチドホルモンが顆粒膜細胞¹²⁾¹³⁾あるいは脳下垂体¹⁴⁾及び肝細胞¹⁵⁾において t-PA の産生・分泌を促進する。一方, ヒト fibrosarcoma 細胞では cAMP を刺激する forskolin は t-PA の分泌及び mRNA を減少する¹⁶⁾と報告されている。我々の成績では cAMP 単独では t-PA 分泌は促進されなかった。しかしながら, phorbol ester の t-PA 分泌促進作用を増強したことより, KLE 細胞における cAMP-protein kinase A pathway と PKC pathway との複雑な相互作用が存在すると考えられた。

グルココルチコイドのラット肝細胞における PA 活性の抑制¹⁵⁾, ヒト fibrosarcoma 細胞における t-PA 産生の促進¹⁶⁾, レチノール酸のマウス, テラトカルシノーマ細胞における t-PA 活性の誘導¹⁷⁾, また TNF の内皮細胞における t-PA 産生の抑制¹⁸⁾が報告されているが, 我々の今回の実験ではこれらの物質は t-PA 分泌に関し何らの作用も示さなかった。また, 甲状腺ホルモン(T_3), インスリン, IGF-I, PDGF, basic FGF も同様であった。

エストロゲンは子宮内膜細胞では u-PA の分泌

を促進し¹⁰⁾, 乳癌細胞株 MCF-7では tissue-type の PA 活性を促進すると報告されている¹⁹⁾. 我々の用いた KLE 細胞はエストロゲン受容体を有していない¹¹⁾ので検討できなかったが, 今後エストロゲン受容体を有する内膜癌細胞を用いて検討する必要があると考えられた.

EGF は子宮内膜癌細胞株 RL95-2において u-PA の PA 活性を促進すると報告されている⁹⁾. 一方, 正常子宮内膜では EGF の t-PA の分泌促進作用²⁰⁾が報告されている. 我々も KLE 細胞において EGF の t-PA 分泌促進作用を確認している(未発表データ). PA 活性は PA 及び PA inhibitor の両者のバランスによるが, 同一の細胞で, その両者を産生していることがある. 例えば, 扁平上皮癌細胞株 A431においては, t-PA とその特異的阻止物質 plasminogen activator inhibitor I (PAI-I) が同時に産生されていて, EGF はその両者の分泌を同じ程度に促進するため, 結果として PA 活性に, 変化がみられない²¹⁾と報告されている. 我々の今回の成績でも phorbol ester は t-PA 抗原量の分泌は促進したが, PA 活性は促進されなかった. さらに, KLE 細胞は PAI-I も産生・分泌していて, その分泌は phorbol ester により促進された(原稿作成中). その結果 PA 活性が変化しなかったと推測された.

結 語

以上, 我々は子宮内膜癌細胞の t-PA の分泌の調節機序に関心を持ち, phorbol ester が t-PA 分泌を促進することを明らかにした. よって, KLE 細胞は PA system の調節機序を解明するためのモデルとなりうると考えられた. また同一の細胞で PA 活性を調節する t-PA, u-PA, PAI が同時に産生されていることがあり, PA 活性はさまざまな物質により複雑に制御されている. よって, PA 活性の調節因子を検討するにはこれらのひとつひとつを解明する必要があると考えられた.

KLE 細胞を提供していただいた香川医大母子科大野正文先生, 実験を手伝っていただいた, 同, 井宮陽子さん, 論文作成に際し助言をいただいた, 同, 林 敬二先生に感謝いたします.

文 献

1. Danø K, Andreassen PA, Grøndahl-Hansen J, Kristensen P, Nielsen LS. Plasminogen activators, tissue degradation, and cancer. *Adv Cancer Res* 1985; 44: 139-266
2. Nishizuka Y. Studies and perspectives of protein kinase C. *Science* 1986; 233: 305-312
3. Nishizuka Y. The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumor promotion. *Nature* 1984; 308: 693-698
4. Band V, Karlan BY, Zurawski VR Jr, Littlefield BA. Simultaneous stimulation of urokinase and tissue-type plasminogen activators by phorbol esters in human ovarian carcinoma cells. *J Cell Physiol* 1989; 138: 106-114
5. Kooistra T, Bosma PJ, Toet K, Cohen LH, Griffioen M, van den Berg E, Le Clercq L, van Hinsbergh VWM. Role of protein kinase C and cyclic adenosine monophosphate in the regulation of tissue-type plasminogen activator, plasminogen activator inhibitor-1, and platelet-derived growth factor mRNA levels in human endothelial cells. Possible involvement of proto-oncogenes c-jun and c-fos. *Arterioscl Thromb* 1991; 11: 1042-1052
6. Opdenakker G, Ashino-Fuse H, van Damme J, Billiau A, de Somer P. Effect of 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate on the production of mRNAs for human tissue-type plasminogen activator. *Eur J Biochem* 1983; 131: 481-487
7. Waller EK, Schleuning W. Induction of fibrinolytic activity in HeLa cells by phorbol myristate acetate. *J Biol Chem* 1985; 260: 6354-6360
8. Casslen B, Astedt B. Occurrence of both urokinase and tissue plasminogen activator in the human endometrium. *Contraception* 1983; 28: 553-564
9. Sundareshan P, Misiorowski RL, Davis JR, Korc M, Hendrix MJC. Effect of epidermal growth factor on growth response, morphology, and invasive potential of human endometrial carcinoma cell line RL95-2. *Cancer Commun* 1991; 3: 149-158
10. Casslen B, Andersson A, Nilsson M, Astedt B. Hormonal regulation of plasminogen activators and of a specific activator inhibitor from endometrial tissue in culture. *Proc Soc Exp Biol Med* 1986; 182: 419-424
11. Richardson GS, Dickersin GR, Atkins L, MacLaughlin DT, Raam S, Merk LP, Bradley

- M. KLE*: a cell line with defective estrogen receptor derived from undifferentiated endometrial cancer. *Gynecol Oncol* 1984; 17: 213—230
12. *O'Connell ML, Anipari R, Strickland S*. Hormonal regulation of tissue plasminogen activator secretion and mRNA levels in rat granulosa cells. *J Biol Chem* 1987; 262: 2339—2344
 13. *Liu W, Burleigh BD, Ward DN*. Steroid and plasminogen activator production by cultured rat granulosa cells in response to hormone treatment. *Mol Cell Endocrinol* 1981; 21: 63—73
 14. *Granelli-Piperno A, Reich E*. Plasminogen activators of the pituitary gland: Enzyme characterization and hormonal modulation. *J Cell Biol* 1983; 97: 1029—1037
 15. *Gelehrter TD, Barouski-Miller PA, Coleman PL, Cwikel BJ*. Hormonal regulation of plasminogen activator in rat hepatoma cells. *Mol Cell Biochem* 1983; 53/54: 11—21
 16. *Gerog G, Riccio A, Andreasen P*. Forskolin down regulates type-1 plasminogen activator inhibitor and tissue-type plasminogen activator and their mRNAs in human fibrosarcoma cells. *Mol Cell Endocrinol* 1990; 72: 103—110
 17. *Strickland S, Mahdavi V*. The induction of differentiation in teratocarcinoma stem cell by retinoic acid. *Cell* 1978; 15: 393—403
 18. *Mawatari M, Okamura K, Matsuda T, Hamanaka R, Mizoguchi H, Higashio K, Kohno K, Kuwano M*. Tumor necrosis factor and epidermal growth factor modulate migration of human microvascular endothelial cells and production of tissue-type plasminogen activator and inhibitor. *Exp Cell Res* 1991; 192: 574—580
 19. *Dickerman HW, Martinez HL, Seeger JI, Kumar SA*. Estrogen regulation of human breast cancer cell line MCF-7 tissue plasminogen activator. *Endocrinology* 1989; 125: 492—500
 20. 武谷雄二. 子宮内膜症の生化学的特性に関する基礎ならびに臨床的研究—正常子宮内膜との対比—. *日産婦誌* 1989; 41: 971—980
 21. *George F, Pourreau-Schneider N, Arnoux D, Boutiere B, Berthois Y, Martin PM, Sampol J*. Concomitant secretion by A431 cells of tissue plasminogen activator and a specific inhibitor masks EGF modulation of tPA activity. *Thromb Haemostas* 1990; 64: 407—411
(No. 7444 平5・11・5受付)
-