

# ヒト肝癌培養細胞における $\alpha$ -フェトプロテインおよび組織ポリペプチド抗原の放出機構に関する検討

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード: human hepatoma cell lines, dexamethasone, sodium n-butyrate, AFP, TPA 作成者: 石塚, 巖 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/8546">http://hdl.handle.net/2297/8546</a>

## ヒト肝癌培養細胞における $\alpha$ -フェトプロテインおよび 組織ポリペプチド抗原の放出機構に関する検討

金沢大学医学部内科学第二講座 (主任: 竹田亮祐教授)

石 塚 巖

2種類のヒト肝癌細胞株, PLC/PRF/5, HepG2 を用いて,  $\alpha$ -フェトプロテイン ( $\alpha$ -fetoprotein, AFP) と組織ポリペプチド抗原 (tissue polypeptide antigen, TPA) の産生について調べた。TPA について, 免疫組織化学的手法を用いて, 細胞内局在を調べると, 両培養細胞株共に細胞質に明らかな網目状の染色がみられた。肝癌細胞株において TPA の存在を明らかにしたのはこれが初めてである。PLC/PRF/5 細胞株の培養液における AFP と TPA の動態をみると, 増殖期では, 培養液中の AFP は高値, TPA は逆に低値を示した。これに反し, 定常期には, AFP は低値, TPA は高値と増殖期と相反する動態を示した。この機序を明らかにするため, 分化誘導をもたらす n-酪酸ナトリウムとデキサメサゾン添加にて検討した。低濃度のデキサメサゾン ( $10^{-6} \sim 10^{-8}M$ ) 添加においては, 細胞増殖にほとんど変化はなく, 培養液中の AFP は高値を示したが, TPA は変化しなかった。高濃度のデキサメサゾン ( $1 \times 10^{-4} \sim 5 \times 10^{-4}M$ ) 添加においては, 逆に, 細胞増殖は抑制され, AFP は低値となり, TPA は高値を示した。また, n-酪酸ナトリウム添加にては, 細胞増殖は濃度依存性に抑制され, 培養液中の AFP は減少し, TPA は増加を示した。以上の結果から, AFP は細胞増殖時に増加傾向を示し, 分化機能を誘発する薬物添加によって減少するという分化機能に相反して変動する物質であるが, TPA は AFP とは逆に, 細胞増殖抑制時に増加傾向を示し, 分化機能を誘発する薬物添加によって増加するという分化機能に呼応して変動する物質であることが示唆された。

**Key words** human hepatoma cell lines, dexamethasone, sodium n-butyrate, AFP, TPA

組織ポリペプチド抗原 (tissue polypeptide antigen, TPA) は, Björklund がヒト癌組織のホモジネートにより抽出した腫瘍関連抗原<sup>1)</sup>である。彼は癌の共通抗原を検索する過程で得られた抗体が, 種々のヒト癌組織や培養細胞で吸収されるが, ヒト正常組織では吸収されないことに注目し, その対応抗原を分離精製<sup>2-4)</sup>した。しかし, TPA は分離精製法が複雑であり, また赤血球凝集阻止反応<sup>5,6)</sup>による測定が煩雑であることが障害となり一般検査法として広く普及するにいたらなかった。ところが, ラジオイムノアッセイ (radioimmunoassay, RIA) 法による TPA 測定法が開発されるに至り, TPA の臨床的有用性が再確認され<sup>7,8)</sup>, 新しい腫瘍マーカーとして注目されてきた。TPA は食道癌, 胃癌, 肝癌などのヒト癌組織<sup>9,10)</sup>, ヒト胎盤組織や HeLa 細胞, Detroit-6, Hep-2 などの癌細胞株の培養細胞上清中<sup>11)</sup>に証明され, さらに食道, 胃, 肝などの正常組織にも微量ながら存在することが報告されている。 $\alpha$ -フェトプロテイン ( $\alpha$ -fetoprotein, AFP) に関しては, 肝癌細胞株を用いて, その産生の有無をみた多数の報告があり, 薬剤添加による細胞生物学的特性を検討した報告も多い<sup>12-23)</sup>。しかし, TPA に関しては肝癌細胞増殖と TPA 合成との関係, ホルモン, 薬剤による TPA 合成への影響について基礎的に検討した報告は皆無である。今回, PLC/PRF/5<sup>24)</sup> (PLC) および HepG2<sup>25)</sup> の2種類のヒ

ト肝癌細胞株を用いて, 腫瘍マーカーである TPA の産生を明らかにした。更に, PLC を用いて, 薬剤無添加状態での肝癌細胞増殖期より定常期にかけての AFP と TPA 産生の変化, さらに, AFP の産生に変化を与えると言われているデキサメサゾン<sup>11)</sup>と n-酪酸ナトリウム<sup>12)</sup>を使用し, 増殖期における AFP および TPA 産生への影響を検討し, 肝癌細胞におけるこれら2つの物質の細胞生物学的特性を明らかにした。

### 材料および方法

#### 1. 培養肝癌細胞および培養液

Alexander ら<sup>24)</sup>により樹立されたヒト肝癌由来培養細胞 PLC (金沢大学がん研究所ウィルス学教室より供与) と Barbara ら<sup>25)</sup>により樹立された HepG2 細胞 (金沢大学がん研究所ウィルス学教室より供与) を使用した。培養液はダルベッコ変法イーグル培地 (Durbecco's modified Eagle medium, DMEM) (日本製薬, 東京) を基礎培地とし, 7%炭酸水素ナトリウム (GIBCO, グランドアイランド, アメリカ) を 0.7ml/dl, カナマイシン (大日本製薬, 大阪) 100 $\mu$ g/ml, ファンギーゾン (大日本製薬) 125 $\mu$ g/ml の濃度で添加後, 37℃非動化ウシ胎児血清 (GIBCO) を10%となるように添加して調整した。

細胞の培養は付着面積 25cm<sup>2</sup> の培養フラスコ (FALCO,

平成5年11月24日受付, 平成6年2月16日受理

Abbreviations: AFP,  $\alpha$ -fetoprotein; BMG,  $\beta_2$ -microglobulin; CA19-9, carbohydrate antigen 19-9; CEA, cartinoembryonic antigen; HCG, human chorionic gonadotropin; 5'-NPD-V, 5'-nucleotide phosphodiesterase isoenzyme-V; NSE, neuron-specific enolase; PAP, prostatic acid phosphatase; POA, pancreatic oncofetal antigen; P-III-P, procollagen III peptide; RIA, radioimmunoassay; TPA, tissue polypeptide antigen

ニュージャージ, アメリカ) を用い37°C, 5% CO<sub>2</sub> インキュベーター中にておこない, 5日毎に0.125%トリプシン(GIBCO), 0.01%エチレンジアミノ四酢酸(ethylene diamine tetraacetate, EDTA) (大日本製薬) 溶液にて細胞を剥離し, 分割比1:8にて継代培養した。

## II. 培養肝癌細胞における各種腫瘍マーカーの定量

継代培養4日目における培養液中の腫瘍マーカーおよびコントロールとして未使用の培養液中の腫瘍マーカーを測定した。検索した腫瘍マーカーは AFP, 癌胎児性抗原 (cartinoembryonic antigen, CEA), フェリチン (Ferritin), 糖鎖抗原 (carbohydrate antigen 19-9, CA 19-9), CA125, CA15-3,  $\beta_2$ -ミクログロブリン ( $\beta_2$ -microglobulin, BMG), プロコラーゲン III ペプチド (procollagen III peptide, P-III-P), TPA, ヒト絨毛性ゴナドトロピン (human chorionic gonadotropin, HCG), 前立腺性酸性フォスファターゼ (prostatic acid phosphatase, PAP), 神経特異エノラーゼ (neuron-specific enolase, NSE), 扁平上皮癌 (squamous cell carcinoma SCC), 膵癌胎児抗原 (pancreatic oncofetal antigen, POA), 5'-ヌクレオチドホスホジエステラーゼアイソザイム V (5'-nucleotide phosphodiesterase isoenzyme-V, 5'-NPD-V), デス・ガンマー・カルボキシプロトロンビン (des- $\gamma$ -carboxy prothrombin, PIVKA II) である。これら主要な腫瘍マーカー16種類は RIA 法にて測定した。

## III. TPA の免疫組織化学的染色法

肝癌培養細胞の TPA 染色法は, 一次抗体に TPA の  $\beta_1$  亜面に対する家兎血清 (Sangtec, ブローマ, スウェーデン) を用い, アビジン-ビオチン ペルオキシダーゼ 複合体 (avidin-biotin peroxidase complex, ABC) 法により免疫組織化学的に行なった。また発色には, 3,3'-ジアミノベンチジン (3,3'-diaminobenzidine, DAB) 反応を, 核染色にはヘマトキシリンを使用した。

## IV. デキサメサゾン, n-酪酸ナトリウムの添加

培養には直径 6cm の培養ディッシュ (FALCO) を用い,  $10 \times 10^4$  個の細胞を 3ml の培養液にて培養した。播種翌日より2日毎に培養液の交換を行ない, 細胞数と培養液中の細胞  $1 \times 10^4$  個当たり, 48時間に産生される AFP, TPA 濃度を RIA 法にて測定した。また, デキサメサゾン, n-酪酸ナトリウムは細胞播種24時間後より投与し, 培養細胞数はディッシュに附着した生細胞数を血球計算盤にて測定した。

各実験は3回ずつ行ない, デキサメサゾンは  $1 \times 10^{-8}$ ,  $1 \times 10^{-6}$ ,  $1 \times 10^{-4}$ ,  $3 \times 10^{-4}$ ,  $5 \times 10^{-4}$  M の5段階の濃度に調整し, n-酪酸ナトリウムは  $5 \times 10^{-5}$ ,  $1 \times 10^{-4}$ ,  $4 \times 10^{-4}$ ,  $6 \times 10^{-4}$ ,  $1 \times 10^{-3}$  M, の5段階の濃度に調整し使用した。

さらに, 増殖遅延期より増殖期, 定常期までの増殖曲線における細胞数と培養液中の AFP ならびに TPA 濃度を経時的に測定し, 対照とした薬剤無添加群での細胞数, AFP および TPA 濃度と比較した。

成績はすべて平均値土標準誤差で示した。

## 成 績

### I. 培養肝癌細胞による腫瘍マーカーの産生

AFP, TPA はコントロール培養液では検出されなかったが, PLC では各々 3710ng/ml, 1600U/l, HepG2 においても 1070ng/ml, 950U/l と著しい産生がみられた。また PLC で CEA および HCG が, HepG2 ではフェリチンおよび NSE が

Table 1. Amounts of tumor makers in culture media of PLC and HepG2 Cells

Cells cultured	Amount in culture media															
	AFP (ng/ml)	CEA (ng/ml)	Ferritin (ng/ml)	CA19-9 (U/ml)	CA125 (U/ml)	CA15-3 (U/ml)	BMG (ng/l)	P-III-P (ng/ml)	TPA (U/l)	HCG (mIU/ml)	PAP (ng/ml)	NSE (ng/ml)	SCC (ng/ml)	POA (U/ml)	5'-NPD-V (mm)	PIVKA II (ug/ml)
PLC	3710	1.0	<10	<10	<30	<5	<0.5	310	1600	5	<0.5	<2	<1	<3.1	8.4	<1
HepG2	1070	<0.5	14	<10	<30	<5	<0.5	220	950	<2	<0.5	16.5	<1	<3.1	7	<1
None	<10	<0.5	<10	<10	<30	<5	<0.5	330	<30	<2	<0.5	<2	<1	<3.1	8.0	<1

Culture media (PLC/PRF/5 Cells, HepG2 Cells) and none culture media were used as in "materials and methods". Sixteen kinds of tumor marker determined at four days after culture. AFP,  $\alpha$ -fetoprotein; CEA, cartinoembryonic antigen; CA19-9, carbohydrate antigen 19-9; BMG,  $\beta_2$ -microglobulin; P-III-P, procollagen III peptide; TPA, tissue polypeptide antigen; HCG, human chorionic gonadotropin; PAP, prostatic acid phosphatase; NSE, neuron-specific enolase; SCC, squamous cell carcinoma; POA, pancreatic oncofetal antigen; 5'-NPD-V, 5'-nucleotide phosphodiesterase isoenzyme-V; PIVKA II, des- $\gamma$ -carboxy prothrombin.

低濃度ではあるが確認された。しかし、P-III-P および 5-NPD-V の存在も認められたが、コントロールとした培養液中においても同程度か、やや低濃度に検出されたため肝癌細胞による特異的産生とは断定できなかった(表1)。

II. TPA の免疫組織化学的染色

増殖期にある PLC および HepG2 の2種類の肝癌細胞株を用いて TPA の免疫組織化学的染色を施行した(図1)。PLC においては、TPA は細胞質内に編目状に濃染された(図1-A)。また、HepG2 における TPA も、同じように編目状に染色され(図1-B)、これらの成績から両肝癌細胞株ともに TPA を産生していることが証明された。

III. 増殖期より定常期にかけての AFP および TPA 産生の変化

PLC 培養肝癌細胞を用いて、増殖期より定常期までの増殖曲線及び培養肝癌細胞の培養液中の AFP および TPA 濃度の経時的变化を検討した。培養液中の AFP 濃度は培養肝癌細胞 PLC の増殖期においては高値を示したが、定常期において低下した。また、TPA 濃度は逆に細胞増殖期においては低値を示し、定常期に著しく上昇した(図2)。

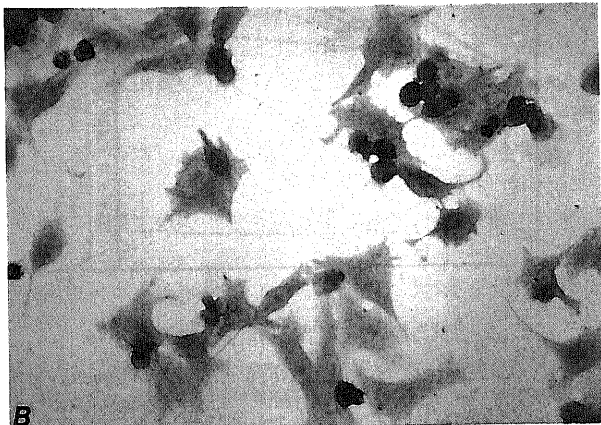
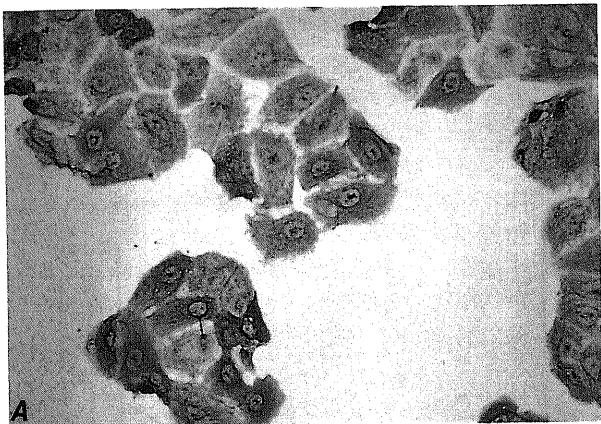


Fig. 1. Immunohistochemical staining of TPA on hepatocellular carcinoma-derived cell lines. Anti-human TPA rabbit monoclonal antibody was used for the first antibody. TPA presented stick-likely in cytoplasm. A, PLC/PRF/5 cells; B, HepG2 cells. (×200)

IV. ホルモン、薬剤添加による増殖の変化と AFP, TPA 産生への影響

1. デキサメサゾン添加

$5 \times 10^{-4}$  より  $1 \times 10^{-8}$  M までの各種濃度のデキサメサゾン培養液に添加した際の PLC 増殖の変化を検討した。デキサメサゾン添加濃度の上昇につれ肝癌細胞増殖は抑制され、

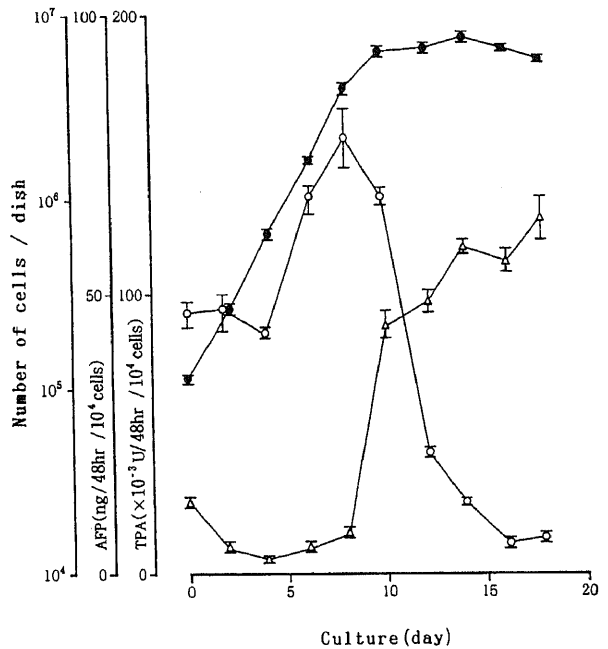


Fig. 2. Growth curve of PLC/PRF/5 cells and AFP, TPA secretion. ●, number of cells; ○, AFP; △, TPA. Each point represents the mean ± SE (n=3).

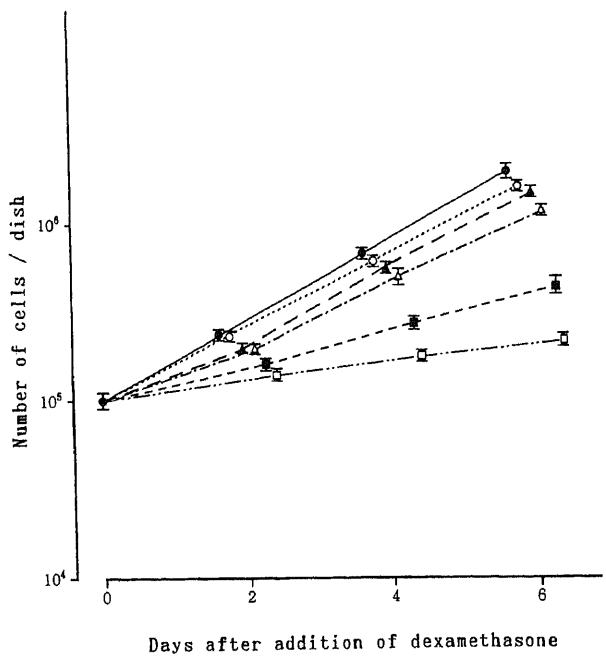


Fig. 3. Cell growth of PLC/PRF/5 cells in the presence and absence of dexamethasone. The concentration of dexamethasone: ●, absence; ○,  $1 \times 10^{-8}$  M; ▲,  $1 \times 10^{-6}$  M; △,  $1 \times 10^{-4}$  M; ■,  $3 \times 10^{-4}$ ; □,  $5 \times 10^{-4}$  M. Each point represents the mean ± SE (n=3).

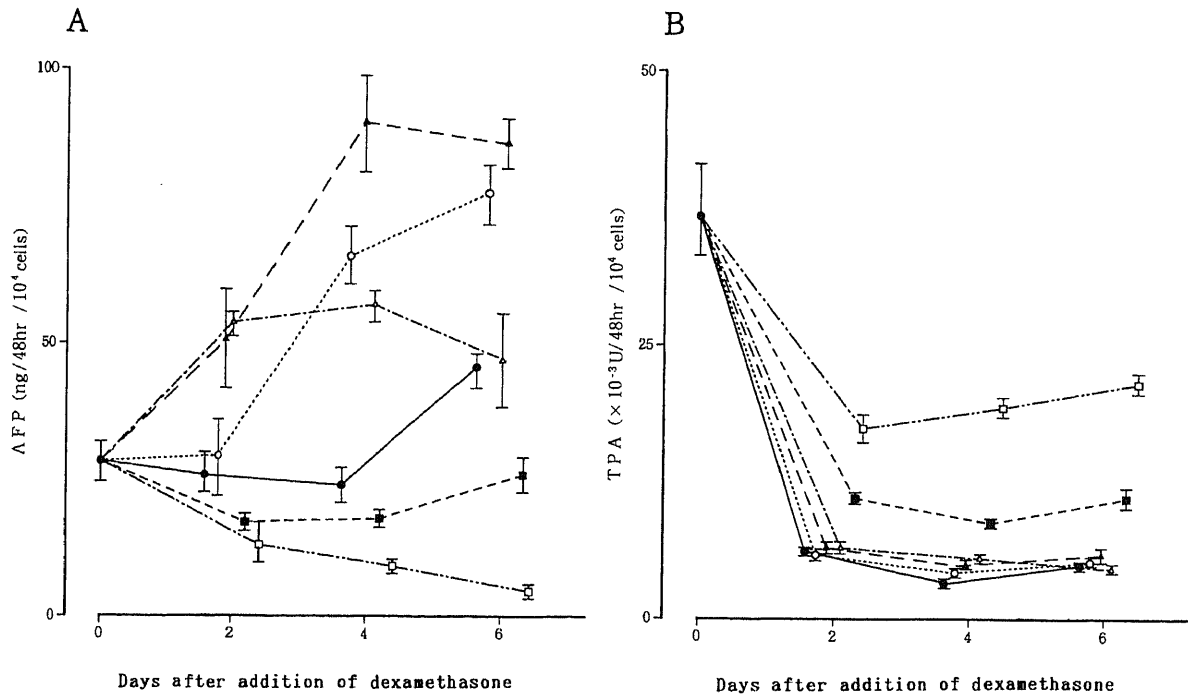


Fig. 4. AFP (A) and TPA (B) secretion from PLC/PRF/5 cells in the absence and presence of dexamethasone. The concentration of dexamethasone: ●, absence; ○, 1×10<sup>-8</sup>M; ▲, 1×10<sup>-6</sup>M; △, 1×10<sup>-4</sup>M; ■, 3×10<sup>-4</sup>M; □, 5×10<sup>-4</sup>M. AFP and TPA levels in the culture media from PLC/PRF/5 cells were measured by radioimmunoassay. Each point represents the mean±SE (n=3).

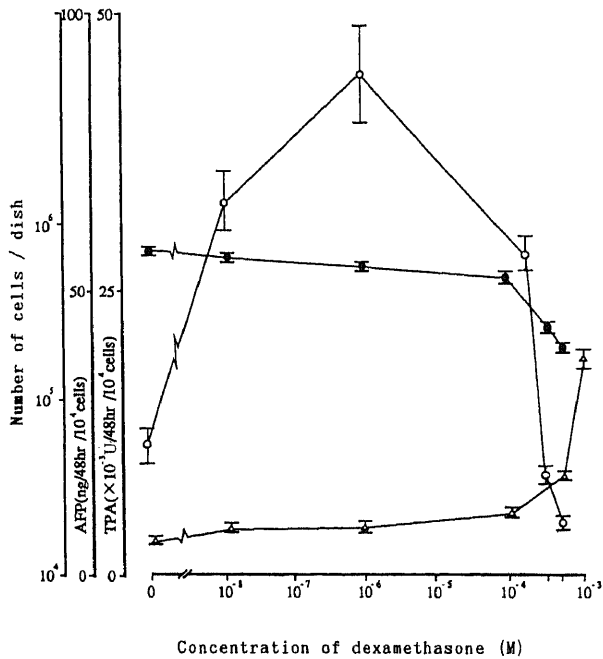


Fig. 5. Dose-response curves of cell growth, AFP and TPA secretion to dexamethasone. The cell were seeded at a density of 1×10<sup>4</sup> cells per well, and media was changed to DMEM with varying concentrations of dexamethasone. Average AFP (○) and TPA (△) secretion was calculated from the amount of AFP, TPA and the number of cells (●) present at the end of 4 day incubation. Each point represents the mean±SE (n=3).

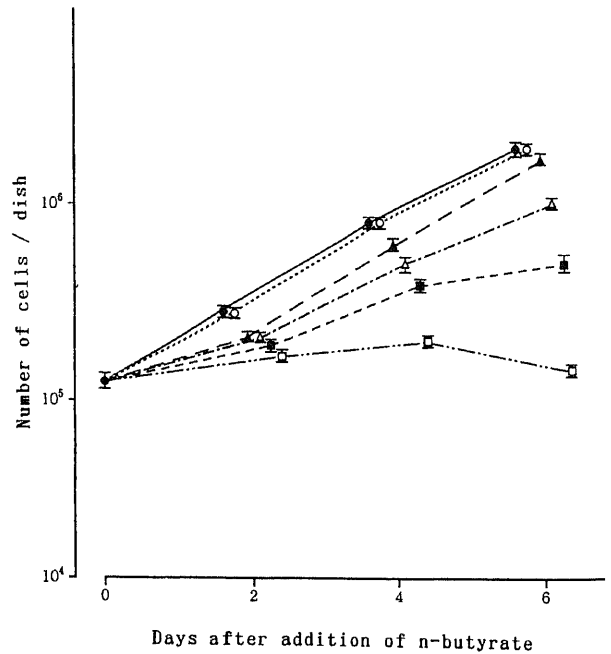


Fig. 6. Cell growth of PLC/PRF/5 cells in the absence and presence of sodium n-butyrate. The concentration of sodium n-butyrate: ●, absence; ○, 5×10<sup>-5</sup>M; ▲, 1×10<sup>-4</sup>M; △, 4×10<sup>-4</sup>M; ■, 6×10<sup>-4</sup>M; □, 1×10<sup>-3</sup>M. Each point represents the mean±SE (n=3).

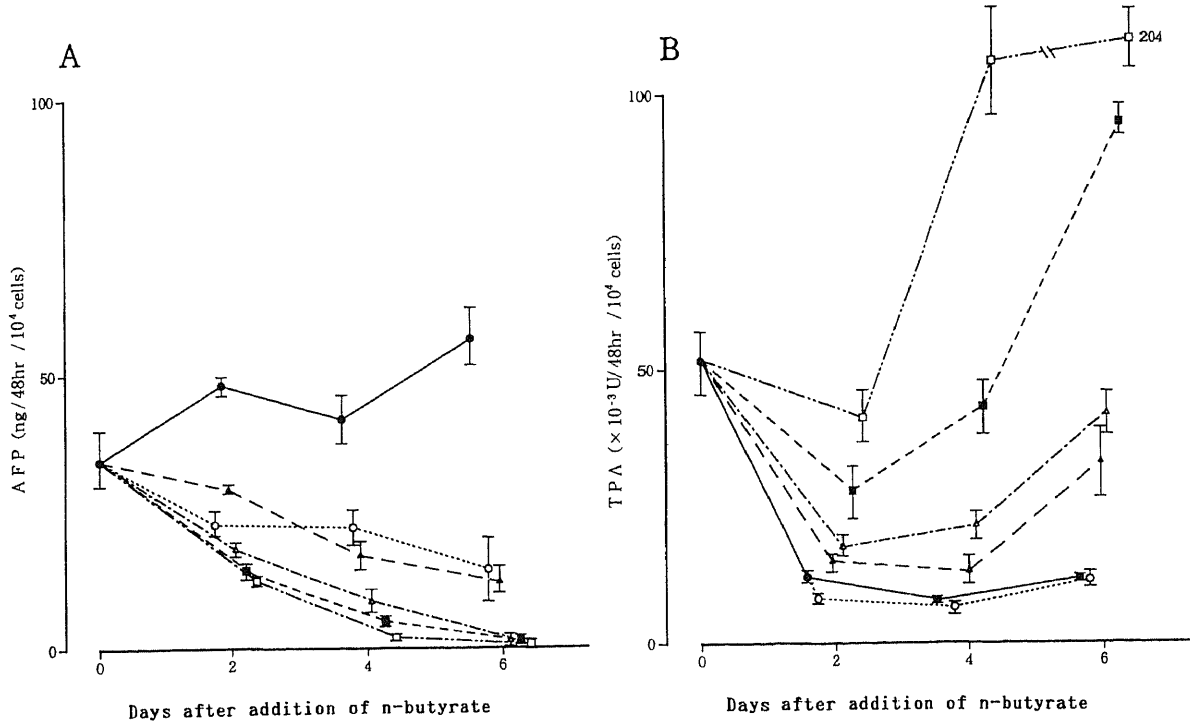


Fig. 7. AFP (A) and TPA (B) secretion from PLC/PRF/5 cells in the absence and presence of sodium n-butyrate. The concentration of sodium n-butyrate: ●, absence; ○,  $5 \times 10^{-5}$ M; ▲,  $1 \times 10^{-4}$ M; △,  $4 \times 10^{-4}$ M; ■,  $6 \times 10^{-4}$ M; □,  $1 \times 10^{-3}$ M. AFP and TPA levels in the culture media from PLC/PRF/5 cells were measured by radioimmunoassay. Each point represents the mean  $\pm$  SE (n=3).

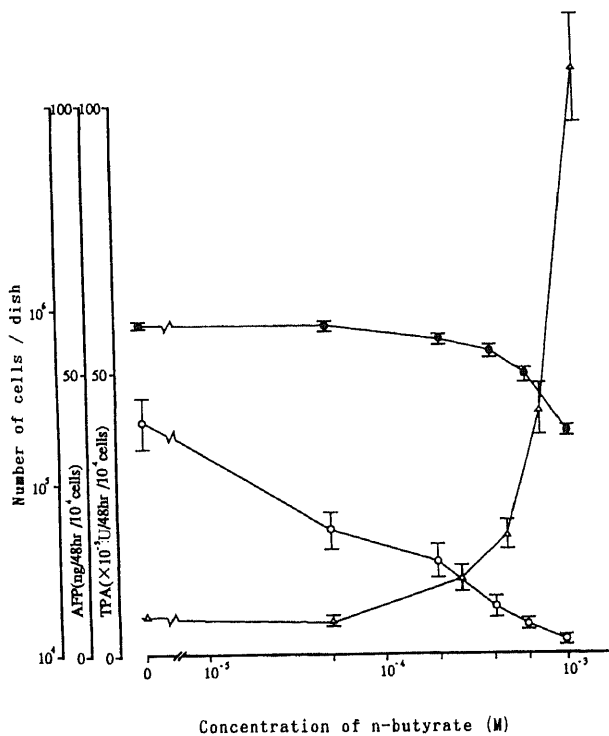


Fig. 8. Dose-response curves of cell growth, AFP and TPA secretion to sodium n-butyrate. The cell were seeded at a density of  $1 \times 10^4$  cells per well, and media was changed to DMEM with varying concentrations of sodium n-butyrate. Average AFP (○) and TPA (△) secretion was calculated from the amount of AFP, TPA and the number of cells (●) present at the end of 4 day incubation. Each point represents the mean  $\pm$  SE (n=3).

$5 \times 10^{-4}$ M 濃度下での増殖はほとんど認められなくなった (図 3).

次に、 $5 \times 10^{-4}$ より  $1 \times 10^{-5}$ M までの各種濃度デキサメサゾン添加時の肝癌細胞 PLC における AFP の培養液中への分泌を検討した。培養液中の AFP は  $1 \times 10^{-4}$ より  $1 \times 10^{-5}$ M の低濃度では増加し、 $5 \times 10^{-4}$ より  $3 \times 10^{-4}$ M までの高濃度では逆に低下した (図 4-A)。同様に、デキサメサゾン添加後 PLC 肝癌細胞培養液中の TPA 濃度の変化を経時的に測定したところ、 $1 \times 10^{-5}$ より  $1 \times 10^{-4}$ M までの低濃度では変化なく、 $3 \times 10^{-4}$ M の高濃度で初めて増加を示し、培養 6 日目にはデキサメサゾン  $5 \times 10^{-4}$ M の濃度においてコントロールの約 4 倍の増加を認めた (図 4-B)。

図 5 は各種濃度のデキサメサゾン添加後 4 日目における細胞の増殖と AFP および TPA の分泌をみた結果を示した。AFP の培養液中への分泌はデキサメサゾン  $1 \times 10^{-4}$ M までの濃度においては、濃度依存性に増加をきたし、分泌亢進状態にあったが、増殖が強く抑制されるにしたがい分泌の低下をきたし、分泌亢進状態から抑制状態へと変化していった。また、TPA は増殖が強く抑制されてから初めて分泌の増加を認めた。

## 2. n-酪酸ナトリウム添加による増殖の変化と AFP および TPA 産生への影響

肝癌細胞 PLC 培地に  $1 \times 10^{-3}$ より  $5 \times 10^{-5}$ M までの濃度の n-酪酸ナトリウムを添加し、経時的に細胞増殖を観察した。添加薬物濃度の上昇につれ増殖の抑制がみられ、 $1 \times 10^{-3}$ M において細胞増殖はほとんどみられなくなった (図 6)。

次に、肝癌細胞 PLC 培地に各種濃度の n-酪酸ナトリウムを添加した際の培養液中への AFP 分泌を経時的に測定した。培養液中の n-酪酸ナトリウムの濃度の増加に伴い AFP 産生が抑

制された(図 7-A)。同様に、各種濃度 n-酪酸ナトリウム添加後、培養液中の TPA 濃度を経時的に測定したところ、TPA は n-酪酸ナトリウム濃度の増加に伴い増加し、 $1 \times 10^{-3} \text{M}$  においては  $204 \times 10^{-3} \text{U}/48\text{hr}/10^4$  細胞と著増した(図 7-B)。

図 8 は各種濃度の n-酪酸ナトリウム添加後 4 日目における細胞の増殖と AFP および TPA の分泌をみた結果を示した。AFP の培養液中への分泌は濃度依存性に抑制され、逆に、TPA は濃度依存性に増加をきたしたが、特に増殖が強く抑制された際に急激な上昇を示した。

### 考 察

肝癌細胞培養系を用いて、AFP の産生、分泌を検討した報告は多数みられるが<sup>11)~20)</sup>、TPA に関しては、これまで報告がない。今回著者は肝癌細胞培養株において、TPA が産生、放出されていることを RIA 法ならびに免疫組織学的手法により、初めて明らかにした。

TPA は食道癌、胃癌、結腸癌、肝癌、胆道癌、膀胱癌、肺癌、乳癌、子宮癌、卵巣癌、腎癌、前立腺癌などの多くのヒト癌組織混合ホモジネートの不溶性分画から抽出・分離操作を重ねて精製されたヒト癌組織の抗原蛋白であり<sup>1)~6)26)</sup>、癌の共通抗原性の研究過程で発見され、臓器特異性がないのが特徴である。したがって、血中 TPA は消化器系以外の癌においても上昇し、急性肺炎においても一過性に上昇することが知られている<sup>27)</sup>。血中 AFP と TPA との間には相関関係があるとの報告<sup>28)</sup>があるが、これに反する報告<sup>29)</sup>もある。特に肝細胞癌においては、血中 AFP 陰性例でも TPA 陽性の症例も存在し、AFP 陰性例の肝細胞癌の診断に TPA は有用との報告<sup>3)</sup>もある。また、AFP は肝細胞が癌化することによって過剰に産生されるようになった腫瘍胎児性蛋白であるのに対して、TPA については細胞の増殖性との関連が問題にされ、細胞骨格をなす蛋白の一種と考えられている<sup>30)</sup>。

そこで、今回、著者は肝癌細胞培養系を用いて、AFP、TPA の産生、分泌動態を検討した。その結果、通常の形態培養の増殖期では、培養液中の AFP は高値、TPA は低値を示し、定常期では AFP は逆に低値、TPA は高値を示した。すなわち、AFP に関しては、従来の腫瘍マーカーと同様の動態を示すが、TPA の分泌動態はこれまでの腫瘍マーカーと異なり、むしろ細胞増殖抑制時のマーカーとして意義があるのではないかと推定された。

なお、本実験では増殖期より定常期までの増殖曲線の検討と増殖期における薬物負荷試験には PLC 細胞株が用いられた。この PLC 細胞株は単層で増殖し、コロニーを形成した後、融合した状態となり接触阻止が強くかかり、増殖が抑制され、定常期の細胞へと変化していく細胞株であった。HepG2 細胞株は小コロニーの状態より、すぐに上に盛り上がって増殖し、融合した状態にはなりにくい細胞株であるので、きれいな増殖曲線が得られない可能性があった。同様に、薬物負荷試験においても HepG2 細胞株では問題があると考えられ、本実験では PLC 細胞株について形態培養、薬物負荷試験を行った。

一般に細胞の増殖が抑制されると、その細胞の分化機能は発現されやすく、逆に、細胞は増殖状態では分化機能を失うという事実があり、このことは“増殖と分化の相反性”としてよく知られている<sup>31)</sup>。線維芽細胞の培養株において増殖休止期にコラーゲン合成が起こり、神経芽細胞腫において増殖阻止の際に

アセチルコリンエステラーゼやコリントランスフェラーゼ活性がみられるのは増殖抑制に伴う分化機能の発現と理解されている<sup>31)</sup>。田崎<sup>32)</sup>は腎細胞癌培養細胞におけるエリスロポエチン産生は、コロニーどうしが集まって融合した状態を過ぎた時期のドーム形成期に一致し、細胞分化によって起こると考えている。また、Hirohashi ら<sup>33)</sup>は、分化度の異なったヒト肝癌細胞を用いて AFP の産生を比較検討し、増殖の速い肝癌細胞は未分化の状態にあって多量の AFP を産生し、一方、増殖の遅い肝癌細胞は分化がよく、わずかの AFP しか産生しなかったことから、AFP 産生も細胞分化に左右されることを示唆している。これらの報告を考え合わせると、TPA は一般的な腫瘍マーカーである AFP と異なる動態を示し、細胞増殖抑制時に増加することより、むしろ細胞分化誘導のマーカーとしての意義をもつのではないかと推測された。

そこで、分化誘導をもたらす n-酪酸ナトリウム<sup>12)22)23)</sup>と AFP の分泌に変化を与えるデキサメサゾン<sup>15)16)18)</sup>を用いて AFP と TPA との相互関係を検討した。

その結果、低濃度デキサメサゾン負荷においては、細胞増殖には変化なく、AFP 分泌は増加したが、TPA 分泌は変化しなかった。しかし、高濃度 ( $5 \times 10^{-4} \text{M}$ ) 負荷では、増殖は抑制、AFP 分泌は低下し、TPA はコントロール値の 4 倍に上昇した。すなわち AFP に関しては同一の薬剤負荷で濃度によって逆の結果になることが明らかとなった。

これまで、AFP 産生、分泌に対するグルコルチコイドの影響に関しては、生体内の実験か、あるいは生体外の実験か、また、用いる細胞系のちがいにしても結果が一致していないが、肝癌の細胞系においては、一般に AFP 濃度の上昇が確認されている<sup>11)13)~16)34)35)</sup>。今回、認められた低濃度デキサメサゾンによる AFP 分泌の増加はこれまでの報告と同様デキサメサゾンの特異的作用と考えられる。しかし、高濃度負荷時に細胞増殖、AFP 分泌を抑制するとの報告はこれまでなく、薬剤の特異的作用以外の機序が想定される。

低濃度デキサメサゾン負荷で、TPA 分泌に変化がみられなかったのはデキサメサゾンが、TPA に対して特異的作用がないことを意味している。しかし、高濃度で増殖が強く抑制された時に、AFP 産生は低下し、TPA の産生の増加を認めた。この TPA の変化は分化機能の発現に伴う非特異的な変化ではないかと推定される。また、通常形態培養において、増殖期において低値であった TPA が定常期に産生増加を示したことは、高濃度デキサメサゾン添加で増殖が強く抑制された状態での TPA 増加と同じ現象ではないかと推測された。

n-酪酸ナトリウム添加にて、濃度依存性に細胞増殖と AFP 分泌は抑制され、逆に TPA 分泌は増加した。n-酪酸ナトリウムは結腸細菌叢の自然発酵産物であり、結腸腫瘍、赤白血病および子宮頸癌細胞系等の強力な分化誘導剤であるといわれている<sup>36)~38)</sup>。著者と同様、Nakagawa ら<sup>12)</sup>は、n-酪酸ナトリウムがヒトの PLC 培養液中の AFP を著しく減少させたが、アルブミンを逆に増加させることを確認した。今回の実験で TPA 分泌に関してはアルブミンの変化と一致した成績が得られ、アルブミンは分化機能の亢進で上昇する蛋白であることを考慮すると、TPA 産生亢進も分化機能に呼応して変動する物質であると考えられた。

n-酪酸ナトリウム添加によって、PLC 細胞には、組織学的にも腫脹、扁平化や核数減少等が認められ、また成長速度の低

下, DNA 合成の低下など, 正常細胞と近似の特性が観察された<sup>12)</sup>.

n-酪酸ナトリウムの AFP に対する作用機序としては, 本物質が肝臓の主要蛋白であるアルブミンの分泌を亢進させることから推定すると, 蛋白合成低下, または分泌過程を障害させたとは考えにくい. また, 蛋白合成阻害剤であるシクロヘキシミドの添加により, AFP, アルブミンはいずれも分泌が完全に阻害されることから, 新たな蛋白合成が介入しているのではないかと推測される<sup>12)</sup>.

一般に, 細胞の基本的な性質である分化の現象は, 腫瘍細胞においても古くから観察されていたが, 近年, 白血病細胞をはじめ各種腫瘍細胞は細胞毒性の弱いサイトカイン, ビタミン, ホルモンなどの多彩な生理活性物質や, その他の化学物質に反応して, 生体外のみでなく, 生体内においても分化機能の発現がおこり, 増殖性や腫瘍性が喪失することが明らかにされている<sup>39)~43)</sup>. また, これらの分化誘導剤を各種腫瘍細胞移植動物に投与すると延命効果が得られることも確認され<sup>39)~43)</sup>, 分化誘導剤は従来の細胞毒性抗瘤剤と本質的に異なる腫瘍細胞に対する分化誘導の機序を介して制瘤効果を発揮することが明らかとなった. したがって, 最近分化誘導療法が注目をあつめ, 臨床的にも白血病などで, その効果が確認されている<sup>39)~42)</sup>. 今回の分化誘導剤による TPA の反応を考えると腫瘍マーカーの放出に関して, 薬剤負荷による反応をみた場合, それによる特異的变化以外に, 増殖の変化に伴う分化機能の発現という非特異的な変化を考慮する必要があることが示唆された.

### 結 論

臓器特異性のない腫瘍マーカーである TPA の細胞生物学的特性を明らかにするため, ヒト培養肝癌細胞を用い, 増殖曲線の検討と増殖期における薬物負荷試験を行い, 腫瘍胎児性蛋白である AFP と比較検討し, 以下の結論を得た.

1. ヒト肝癌細胞株 (PLC/PRF/5, HepG2) は AFP および TPA を産生することを確認した.

2. 培養肝癌細胞 PLC は増殖期において培養液中に高濃度の AFP を分泌するが, TPA 濃度はむしろ低値を示した. 一方, 定常期においては, 逆に AFP 分泌が低く, TPA 濃度が高値を示した.

3. 添加デキサメサゾン濃度が低く, 細胞増殖の抑制がないか, 増殖の抑制が軽度の条件下では, 培養液中への AFP 分泌は増加するが, TPA には変化はなかった. 添加デキサメサゾン濃度が高く, 細胞増殖の抑制が強い場合, AFP 分泌は減少し, 逆に TPA 分泌は増加した.

4. 増殖期においては培養液中に添加された n-酪酸ナトリウムは濃度依存性に AFP 分泌を減少させ, 逆に TPA を増加させた.

5. 以上の結果より, AFP, TPA 等の腫瘍マーカーの放出に関して, 薬剤等の負荷による反応を理解するには, それによる特異的变化以外に, 増殖の変化に伴う分化機能の発現という細胞自体の非特異的な変化を考慮する必要があると考えられた.

### 謝 辞

稿を終るに臨み, 御指導と御校閲を賜りました恩師竹田亮祐教授に深甚の謝意を表します. また, 本研究の遂行にあたり終始御指導, 御教

示をいただきました国立療養所石川病院山田志郎院長, および前金沢大学第2内科講師上野敏男博士, 第2内科助手竹田康男博士をはじめとする, 第2内科第5研究室の諸先生方に深く感謝いたします. 併せて, 本研究の遂行に多大の御協力を頂いたがん研究所ウィルス部波田野基一教授, 田中淳之助教授に深く感謝致します.

なお, 本本文の要旨は, 第74回 (1988年), 75回 (1989年) 日本消化器病学会総会で発表した.

### 文 献

- 1) Björklund, B. & Björklund, V.: Antigenicity of pooled human malignant and normal tissues by cytoimmunological technique. Presence of an insoluble, heat-labile tumor antigen. *Int. Arch. Allergy*, **10**, 153-184 (1957).
- 2) Björklund, B., Lundblad, G. & Björklund, V.: Antigenicity of pooled human malignant and normal tissues by cytoimmunological technique. II. Nature of tumor antigen. *Int. Arch. Allergy*, **12**, 241-261 (1958).
- 3) Björklund, B., Björklund, V. & Hedlof, I.: Antigenicity of pooled human malignant and normal tissues by cytoimmunological technique. III. Distribution of tumor antigen. *J. Natl. Cancer Inst.*, **26**, 533-545 (1961).
- 4) Björklund, B., John B. G. & Ruth M. G.: Effect of horse anti-human cancer serum on malignant and normal human cells. *Int. Arch. Allergy*, **10**, 56-64 (1957).
- 5) Björklund, B.: Systemic antigenic change in human carcinoma tissues by hemagglutination techniques. *Int. Arch. Allergy*, **36**, 191-203 (1969).
- 6) Björklund, B. & Paulsson, J. E.: Studies of hemagglutination as a means for assay of malignant and normal human tissues antigens. *J. Immunol.*, **89**, 759-766 (1962).
- 7) Björklund, B., Wiklund, B., Luning, B., Anderson, K., Kallin, E. & Björklund, V.: Radioimmunoassay of TPA. A laboratory test in cancer. *Tumor Diagnostik*, **2**, 78-84 (1980).
- 8) 高橋 弘, 清水能一, 飛鳥田一朗, 小倉和雄, 川村協俊, 新井芳美, 大越英毅: 悪性腫瘍患者における TPA の臨床的有用性. *消化器と免疫*, **11**, 179-183 (1983).
- 9) Björklund, B. & Paulsson, J. E.: A human tissue polypeptide related to cancer and placenta. I. Preparation and properties. II. Assay technique. III. Clinical studies of 1483 individuals with cancer and other conditions. *In* B. Björklund (ed.), *Immunological Techniques for Detection of Cancer*, 1st ed., p133-187, Bonnier, Stockholm, 1973.
- 10) Björklund, B., Björklund, V., Lundstrom, R. & Eklund, G.: Tissue polypeptide antigen (TPA) in human cancer defense responses. *In* Friedman & Escobar (eds.), *The Reticuloendothelial System in Health and Disease. Immunologic and Pathologic Aspects*, 1st ed., p357-370, Prentice-Hall, New York, 1976.
- 11) Nakabayashi, H., Taketa, K., Yamane, T., Oda, M. & Sato, J.: Hormonal control of  $\alpha$ -fetoprotein secretion in human hepatoma cell lines proliferating in chemically defined medium. *Cancer Res.*, **45**, 6379-6383 (1985).
- 12) Nakagawa, T., Nakao, Y., Matsui, T., Koizumi, T., Matsuda, S., Maeda S. & Fujita, T.: Effects of sodium

- n-butyrate on alpha-fetoprotein and albumin secretion in the human hepatoma cell line PLC/PRF/5. *Br. J. Cancer*, **51**, 357-363 (1985).
- 13) Jeffrey R. C. & Chiu J. F.: Mechanism of the dexamethasone effect on  $\alpha$ -fetoprotein gene expression in McA-RH 8994 rat hepatoma cells. *J. Biol. Chem.*, **261**, 4663-4668 (1986).
- 14) DeNechaud, B., Becker, J. E. & Potter, V. R.: Effect of glucocorticoids on fetoprotein production by an established cell line from Morris Hepatoma 8994. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **68**, 8-15 (1976).
- 15) Becker, J. E., DeNechaud, B. & Potter, V. R.: Two new rat hepatoma cell lines for studying the unbalanced blocked ontogeny hypothesis. *In* W. H. Fishman & S. Sell (eds.), *Oncodevelopmental Gene Expression*, 1st ed., p259-270, Academic Press, New York, 1976.
- 16) Tsukada, Y., Richards, W. L., Becker, J. E., Potter, V. R. & Hirai, H.: The antagonistic effect of dexamethasone and insulin on  $\alpha$ -fetoprotein secretion by cultured H4-II-E-C3 cells derived from the Reuber H-35 hepatoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **90**, 439-446 (1979).
- 17) Freeman, A. E., Engvall, E., Hirata, K., Yoshida, Y., Kottel, R. H., Hilborn, V. & Ruoslahti, E.: Differentiation of fetal liver cells in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 3659-3663 (1981).
- 18) Schwartz, C. E., Burkhardt, A. L., Huang, D. P. & Chiu, J. F.: The effects of dexamethasone on  $\alpha$ -fetoprotein and albumin synthesis in cultured hepatoma 7777 cells. *Biosci. Rep.*, **2**, 777-784 (1982).
- 19) Chou, J. Y., Mano, T. & Feldman, M.: Inhibition of synthesis of  $\alpha$ -fetoprotein by glucocorticoids in cultured hepatoma Cells. *J. Cell Biol.*, **93**, 314-317 (1982).
- 20) Bélanger, L., Hamel, D., Dufour, D., Guillouza, A. & Chiu, J. F.: Hormonal control and putative cell cycle dependency of AFP production: further observations in vivo and in vitro. *Scand. J. Immunol.*, **8** (Suppl. 8), 239-246 (1978).
- 21) Tsukada, Y., Hibi N. & Ohkawa, K.: Hormonal regulation during secretion of  $\alpha$ -fetoprotein in hepatoma cells grown in synthetic medium. *J. Biol. Chem.*, **260**, 16316-16320 (1985).
- 22) Schut, H. A. J., Hughes, E. H. & Thorgeirsson, S. S.: Differential effects of dimethyl sulfoxide and sodium butyrate on  $\alpha$ -fetoprotein, albumin, and transferrin production by rat hepatomas in culture. *In Vitro*, **17**, 275-283 (1981).
- 23) Jeffrey R. C., Charles E. S., Fausel, E. D. & Chiu, J. F.: Effect of sodium butyrate on  $\alpha$ -Fetoprotein gene expression in rat hepatoma cells in vitro. *Cancer Res.*, **45**, 3215-3219 (1985).
- 24) Alexander J. J., Bey E. M., Geddes E. W. & Lacatsas G.: Establishment of a continuously growing cell line from primary cartinoma of the liver. *S. Afr. med. J.*, **50**, 2124-2128 (1976).
- 25) Barbara B K., Chin C. H. & David P. A.: Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. *Science*, **209**, 497-499 (1980).
- 26) Björklund, B.: Gradient elution of isoelectric precipitates from a molecular sieve carrier: A useful separation technique for biological components. *Analyt. Biochem.*, **41**, 287-290 (1971).
- 27) 高橋 弘, 出浦正倫, 亀田治男: 組織ポリペプチド抗原 (TPA). *日本臨床*, **43**, (秋季臨時増刊号), 450-454 (1985).
- 28) 田中教英, 山田伸次, 土屋実範, 江藤公喜: 肝細胞癌における血清 Tissue Polypeptide Antigen (TPA) の臨床的意義. *福岡医学雑誌*, **75**, 568-573 (1984).
- 29) 高橋 弘, 飛鳥田一朗, 亀田治男, 大越英毅: 悪性腫瘍患者における Tissue Polypeptide Antigen (TPA) の臨床的有用性の検討. *SRL 宝函*, **7**, 17-20 (1983).
- 30) Kirsch, J., Oehr, P. & Winkler, C.: Localization of tissue polypeptide antigen in interphase HeLa cells by immunofluorescence microscopy. *Tumor Diagnostik & Therapie*, **4**, 222-224 (1983).
- 31) 中井準之助: 組織培養, 第1版, 243-248頁, 朝倉書店, 東京, 1988.
- 32) 田崎 寛: 培養細胞のエリスロポエチン産生能. *Human Cell*, **1**, 375-381 (1988).
- 33) Hirohashi, S., Shimosato, Y., Kameya, T., Koide, T., Mukojima, T., Taguchi, Y. & Kageyama, K.: Production of alpha-fetoprotein and normal serum proteins by xenotransplanted human hepatomas in relation to their growth and morphology. *Cancer Res.*, **39**, 1819-1828 (1979).
- 34) Tsukada, Y., Hibi, N., Sakashita, S., Abe, K. & Hirai, H.: The differentiation of clonal rat yolk sac tumor cell lines cultivated with dibutyl-cyclic 3',5'-adenosine monophosphate. *Int. J. Cancer*, **24**, 341-348 (1979).
- 35) Freeman, A. E., Engvall, E., Hirata, K., Yoshida, Y., Kottel, R. H., Hilborn, V. & Ruoslahti, E.: Differentiation of fetal liver cells in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 3659-3663 (1981).
- 36) Tsao, D., Shi, Z., Wong, A. & Kim, Y. S.: Effect of sodium butyrate on cartinoembryonic antigen production by human colonic adenocarcinoma cells in culture. *Cancer Res.*, **43**, 1217-1222 (1983).
- 37) Leder, A. & Leder, P.: Butyric acid, a potent inducer of erythroid differentiation in cultured erythroleukemic cells. *Cell*, **5**, 319-322 (1975).
- 38) Nozawa, S., Engvall, E., Kano, S., Kurihara, S. & Fishman, W. H.: Sodium butyrate produces concordant expression of "early placental" alkaline phosphatase, pregnancy-specific beta 1-glycoprotein and human chorionic gonadotropin beta-subunit in a newly established uterine cervical cancer cell line (SKG-IIIa). *Int. J. Cancer*, **32**, 267-272 (1983).
- 39) Hozumi, M.: Fundamentals of chemotherapy of myeloid leukemia by induction of leukemia cell differentiation. *Adv. Cancer Res.*, **38**, 121-169 (1983).
- 40) 穂積本男: 総論. 癌細胞の分化誘導と制癌 (穂積本男, 高久史麿編), 第1版, 3-32頁, ソフトサイエンス社, 東京,

1985.

41) 穂積本男: 総論. 白血病の分化誘導療法—基礎から臨床へ (穂積本男, 斉藤政樹, 永田和宏編), 第1版, 1-9頁, 中外医学社, 東京, 1990.

42) 穂積本男: 白血病分化誘導療法の基礎. 臨床血液, 33, 561-572 (1992).

43) 穂積本男: 分化誘導療法の開発. 癌と化学療法, 20, 1006-1008 (1993).

**Production of  $\alpha$ -fetoprotein and Tissue Polypeptide Antigen in Human Hepatoma Cell Lines** Iwao Ishizuka, Department of Internal Medicine (II), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Jusen Med Soc., 103, 465—473 (1994)

**Key words** human hepatoma cell lines, dexamethasone, sodium n-butyrate, AFP, TPA

#### Abstract

Using 2 kinds of human liver cancer cell line, PLC/PRF/5 and HepG2, the production of  $\alpha$ -fetoprotein (AFP) and tissue polypeptide antigen (TPA) were examined. Intracellular localization of TPA by the immunohistochemical technique revealed that a distinct reticulate strain existed in the cytoplasm of both cultured cell lines. This is the first report of TPA being detected in liver cancer cell lines. Amounts of AFP and TPA in the culture media of PLC/PRF/5 cell line showed a high value of AFP and a low value of TPA at proliferative stage, whereas AFP was low and TPA high at the stationary stage. In order to clarify this phenomena, the effects of dexamethasone and sodium n-butyrate were examined. These drugs usually induce cell differentiation. A low level of dexamethasone ( $10^{-6} \sim 10^{-8}$  M) caused little change in cell proliferation, but did cause a high value of AFP in the culture medium with no change in TPA. However, a high level of dexamethasone ( $1 \times 10^{-4} \sim 5 \times 10^{-4}$  M) caused the inhibition of cell proliferation, showing low AFP and high TPA in the culture media. Sodium n-butyrate caused dose-dependent inhibition of cell proliferation, a decrease in AFP and an increase in TPA. The above results suggest that AFP is a substance to increase at the cell proliferative stage and to decrease with the addition of a drug that stimulates differential function. On the other hand, the production of TPA behaves in a reverse manner to AFP.