

腫瘍細胞における Tumor Necrosis Factor(TNF) Receptor の解析

根 田 寛

札幌医科大学内科学第4講座 主任 漆崎一朗 教授

Analysis of the Tumor Necrosis Factor(TNF) Receptor of Various Tumor Cells

Hiroshi NEDA

Department of Internal Medicine (Section 4), Sapporo Medical College

(Chief : Prof. I. Urushizaki)

The existence of TNF receptors on TNF sensitive tumor cells was elucidated by specific binding assay using radioiodinated human recombinant TNF (^{125}I -TNF).

A close correlation ($r=0.855$) was shown between the receptor number and the susceptibility of tumor cells against TNF.

The cytotoxic activity of TNF was quenched by anti TNF monoclonal antibody (IV3-E), which inhibits the specific binding of TNF to its receptor, indicating that the formation of TNF-receptor complex is a required process for its cytotoxic action.

We further extended our investigation to identify the TNF receptor on the KYM cell membrane by cross-linking the ^{125}I -TNF with the presumed receptor site using disuccinimidyl suberate (DSS). Four radioactive bands with a molecular weight of 145K, 50K, 35K and 17K daltons were observed on SDS-PAGE. The latter three bands corresponded to the trimer, dimer, monomer of TNF, respectively.

The 145K dalton band represented TNF-receptor complex because it was eliminated by the addition of excess cold TNF or IV3-E antibody.

A radioactive peak with 145K dalton was also confirmed by gel filtration chromatography.

Since the molecular size of native TNF as estimated by gel filtration was 50K dalton consisting of three identical peptides, the molecular weight of the TNF receptor itself was calculated to be 95K dalton.

(Received January 13, 1987 and accepted January 26, 1987)

Key words: TNF, ^{125}I -labelled TNF, Receptor, Binding assay, Affinity cross-linking

1 緒 言

Tumor necrosis factor(TNF) は macrophage 由来^{1,2)}の anti cancer cytokine で、腫瘍細胞に対し *in vivo*^{3,4)}及び *in vitro*⁵⁾で高い抗腫瘍性を発揮することが知られている。

近年、ヒト⁶⁻⁹⁾、マウス¹⁰⁾、家兎¹¹⁾の各 TNF-cDNA が相次いでクローニングされ、量産可能となったヒト recombinant TNF を用いて臨床治験 (phase I-II study)も既に開始されており、それにともない、抗腫瘍性のみならず、多岐にわたる生物活性¹²⁻¹⁸⁾が明らかにされつつある。

しかしながら、TNFの細胞傷害性の作用機序については、いまだに不明な点が多く、その標的細胞認識機構が何によって規定されているかも明らかにされていない。

そこで、本研究では、各種腫瘍細胞株及び実際に癌患者より得た腫瘍細胞を対象とし、 ^{125}I 標識ヒト recombinant TNFを用いた binding assayにより TNF receptor 数の測定をおこない、TNF感受性との相関について検討した。

また、各種抗ヒト recombinant TNF モノクローナル抗体を用いて、腫瘍細胞傷害性機序における TNF receptor の意義について検討した。

さらに、 ^{125}I 標識ヒト recombinant TNF を用い、ヒト筋肉腫由来 KYM 細胞の膜蛋白に対する affinity cross-linking をおこない、TNF receptor の同定を試みたので報告する。

2 材料と方法

2.1 実験材料

ヒト recombinant TNF (以下 TNF) は旭化成工業株式会社より提供を受けた。TNF 活性は 2・3 に述べる細胞傷害性試験で L-M 細胞に対し 50% cytotoxicity を示す濃度を 1 unit (U) とした。

細胞培養に用いた培養液は Eagle's minimal essential medium (Eagle MEM, ニッスイ), PPMI-1640 medium (GIBCO) 及び DM-160 medium (KYOKUTO Pharmaceutical co.) の 3 種であり、牛胎児血清 (FBS) は Flow laboratories 社 (CAT. No.29・101・54 North Ryde, N. S. W., Australia) より購入し、56°C, 30 分非働化後使用した。

Isopaque は鳥居薬品, glutaraldehyde, o-phenylene diamine はキンダ化学, bovine serum albumin (BSA) は片山化学, polyethyleneglycol (M. W. 3000) は Sigma 社よりそれぞれ購入した。

Cross-linker として disuccinimidyl suberate (DSS, Pierce 社) を用いた。

Ficoll, Percoll, Sephacryl S-300 superfine, electrophoresis calibration kit 及び gel filtration calibration kit は Pharmacia 社より購入した。

^3H -TdR (specific activity 21.0 Ci/mmol) および ^{125}I 標識 TNF 作製のための Bolton and Hunter reagent (4000 Ci/mmol) は Amersham International plc. (Buckinghamshire, England) より購入した。

2.2 細胞培養

研究対象として用いた 9 種のヒト腫瘍細胞株と癌患者から得た腫瘍細胞 2 種及びマウスの腫瘍細胞株 3 種を Table 1 に示した。KYM-R 及び L-R 細胞はそれぞれ KYM, L-M 細胞を徐々に濃度を増した TNF 存在下 (1 U/ml → 5×10^5 U/ml) で培養を繰り返しクローニングした TNF 抵抗株である。

これらはすべて Table 1 に示した諸施設より恵を受け、当研究室で継代した。癌患者から得た腫瘍細胞は急性骨髄性白血病 (AML) 細胞, 胃癌細胞の 2 種であり、それぞれ末梢血及び腹水から Kedar ら¹⁹⁾, Sykes ら²⁰⁾ の方法に従い、Ficoll-isopaque または Percoll discontinuous density gradient で分離した。

HL-60, KM-3, RPMI4788, K562, REH, HMV-1,

HeLa, B-16 細胞及び癌患者から得た腫瘍細胞の培養は培養液として 10% FBS, ペニシリン 100 unit/ml, カナマイシン 100 mg/l を含む RPMI-1640 を, L-M, L-R 細胞の培養は 10% FBS 加 Eagle MEM を, KYM, KYM-R 細胞の培養は 20% FBS, ペニシリン 100 unit/ml, カナマイシン 100 mg/l を含む DM-160 を用い、組織培養フラスコ (Falcon 社, 3024) 中で、37°C, 5% CO₂ の条件でおこなった。培養液は最低 3~5 日に 1 回交換し、細胞の生存率は随時 trypan blue dye exclusion 法により光学顕微鏡下で確認した。

なお、このうち HL-60, KM-3, K562, REH 及びヒト急性骨髄性白血病患者から得た腫瘍細胞は浮遊細胞であるが、他の細胞はすべて培養フラスコに対する付着性を有していた。

2.3 細胞傷害性の測定法

TNF の細胞傷害性の測定は付着性細胞については dye-uptake 法²¹⁾, 浮遊細胞については ^3H -TdR uptake 阻害法²²⁾ でおこなった。

Dye-uptake 法では標的細胞を 1×10^5 個/ml に調整し、その 100 μl を 96 well 培養プレート (住友ベークライト社, MS-3096F) に各濃度の TNF 溶液 100 μl とともに加え、48 時間培養した。

培養終了後、25% glutaraldehyde 溶液 20 μl を加え 15 分間固定、水洗、乾燥し、0.05% methylene blue 溶液で染色した。その後、0.33 N HCl 溶液 200 μl を加え ELISA analyzer (SLT-LABINSTRUMENTS 社, EAR400) を用い、波長 665 nm で吸光度を測定した。% cytotoxicity の計算には次式を用いた。

$$\% \text{cytotoxicity} = \left(1 - \frac{\text{TNF 処理細胞の } A_{665}}{\text{TNF 非処理細胞の } A_{665}} \right) \times 100 (\%)$$

^3H -TdR uptake 阻害法を dye-uptake 法と同様の条件で 42 時間培養後、 ^3H -TdR 1 μCi を加えさらに 6 時間 pulse label をおこなった (合計 48 時間)。その後細胞をハーベスター (LABO MASH 社) でグラスフィルター上に回収し、液体シンチレーションカウンター (Beckman 社, LS-250) でその放射活性を測定した。% cytotoxicity は dye-uptake 法と同様に TNF 非処理細胞に対する比率で算出した。

各細胞の TNF 感受性は、同時に測定した L-M 細胞の % cytotoxicity に対する比率としてあらわした。

2.4 TNF receptor 数の解析

2.4.1 ^{125}I 標識 TNF の作製

^{125}I 標識 TNF の作製は、Bolton and Hunter reagent を用いて、Bolton ら²³⁾ の方法に準じておこなった。得られた ^{125}I 標識 TNF の比活性は 2.7×10^5 cpm/

μg であった。

2.4.2 binding assay

細胞表面の TNF receptor の binding assay は付着性細胞については、まず細胞を 12 well 培養プレート (Coster 社, Tissue Culture Cluster) の各 well に $4\sim 5 \times 10^5$ 個ずつ加え、24 時間培養した。培養終了後、0.1% BSA 加 medium で 3 回洗浄して得られた 5×10^5 個の細胞を ^{125}I 標識 TNF 及び $3.7 \mu\text{M}$ の非標識 TNF とともに 4°C 、1 時間インキュベートした。

その後、1% FBS 加 medium で 3 回洗浄し 0.5 M NaOH で溶出される細胞表面に結合した放射活性を γ -counter (Compugamma 社, LKB-1282) で測定した。

浮遊細胞については Eppendorf tube に各細胞を 5×10^5 個ずつ加え、細胞の洗浄を $2,000 \text{ g}$ 5 分遠心、吸引を繰り返しておこなった以外、他の操作は付着性細胞に準じた。

2.4.3 Scatchard plot analysis

細胞 1 個あたりの receptor 数、及び結合定数は Scatchard plot analysis²⁴⁾ により求めた。

2.5 抗ヒト TNF モノクローナル抗体の作製と enzyme linked immuno sorbent assay (ELISA 法)

2.5.1 抗ヒト TNF モノクローナル抗体 (IV3-E, IV3-F) の作製

Balb/c マウス (雌, 6 週齢) 皮内に、TNF $1 \times 10^5 \text{ U}/0.5 \text{ ml}$ と Freund's complete adjuvant 0.5 ml を混じて作製した emulsion 0.2 ml を 2 週間隔で 3 回免疫し、その 1 週後に部分採血をおこない、抗 TNF マウス抗血清を得た。さらに初回免疫 8 週後に TNF $1 \times 10^5 \text{ U}/0.5 \text{ ml}$ を腹腔内投与した。最終免疫後 3 日目に脾臓を摘出し、分離した脾細胞 1×10^8 個と Balb/c マウス由来骨髄腫細胞株 P3/×63-Ag8U1, 2×10^7 個を Köhler and Milstein²⁵⁾ の方法に準じて poly-ethyleneglycol を用い細胞融合させた。ついで、10% FBS 加 HAT medium ($1 \times 10^{-4} \text{ M hypoxanthine}$, $4 \times 10^{-7} \text{ M aminopterin}$, $1.6 \times 10^{-5} \text{ M thymidine}$ を含んだ RPMI-1640) に浮遊させ、12 well 培養プレート (Nunc 社) に分注し、14 日間培養した。その後、3 日間隔で 10% FBS 加 HT medium ($1 \times 10^{-4} \text{ M hypoxanthine}$, $1.6 \times 10^{-5} \text{ M thymidine}$ を含んだ RPMI-1640) を用いて培養液交換を繰り返し、ハイブリドーマの増殖が認められた well の培養上清中の抗 TNF 抗体の有無を、後述する ELISA 法でスクリーニングをおこない、限界希釈法によりクローニングし、抗ヒト TNF モノクローナル抗体 (IV3-E, IV3-F) を産

生するハイブリドーマクローンを樹立した。

2.5.2 ELISA

TNF の固相化は、96 well マイクロプレート (Dynatech 社, Immulon II) の各 well に、phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4) で $1 \times 10^4 \text{ U/ml}$ に調整した TNF を $50 \mu\text{l}$ ずつ加え、 4°C overnight 放置しておこなった。PBS, pH 7.4, 0.05% Triton X-100 (洗浄液) $200 \mu\text{l}$ で 3 回洗浄後、IV3-E, IV3-F のハイブリドーマ上清、negative control 液 (10% FBS 加 RPMI-1640 medium) 及び positive control (抗 TNF マウス抗血清) を各 well に $50 \mu\text{l}$ ずつ加え、室温で 1 時間反応させた。

その後、洗浄液で 3 回洗浄し、horse radish peroxidase 標識抗マウス IgG 抗体 (ヤギ, Cappel Laboratories 社, 1,000 倍希釈) を $100 \mu\text{l}$ ずつ加え、室温で 1 時間反応させた。上述の洗浄液を用いて 3 回洗浄後、基質溶液 ($14 \text{ mM o-phenylene diamine}$, $3 \text{ mM H}_2\text{O}_2$, $50 \text{ mM citric acid}$, $100 \text{ mM phosphate buffer}$, pH 5.0) を $150 \mu\text{l}$ ずつ加え、室温で 30 分反応させ、反応停止液として $4.5 \text{ M H}_2\text{SO}_4$ 溶液を $50 \mu\text{l}$ ずつ加え、492 nm の吸光度を測定した。

2.6 細胞膜蛋白の分離

KYM 細胞の細胞膜を Thomら²⁶⁾ の方法に準じて分離した。

KYM 細胞 5×10^8 個を harvesting solution ($0.05 \text{ M boric acid}$, 0.15 M NaCl , 1 mM MgCl_2 , 1 mM CaCl_2 , pH 7.2) 40 ml で 3 回 800 g 5 分遠心、吸引を繰り返すことにより洗浄後、extraction solution ($0.02 \text{ M boric acid}$, 0.2 mM EDTA , pH 10.2) を 20 ml 加え、10 分間水冷下で vortex mixer (TAIYO BUSSAN) を用い攪拌した。その後、 0.5 M boric acid , pH 10.2 を 1.6 ml 加え、更に 5 分間攪拌し、nylon gauze (average mesh size $900 \mu\text{m}$) で濾過後、 2°C 、 450 g 10 分間遠心し、その上清をさらに 2°C 、 $1,200 \text{ g}$ 30 分間遠心した。その沈殿物を PBS, pH 7.4, 2.5 ml で溶解し、35% sucrose 加 PBS, pH 7.4, 10 ml に重層後、 2°C 、 $24,000 \text{ g}$ 1 時間遠心 (日立社製, SCR2013B 遠心機) し、遠心チューブの中央に層状になった膜蛋白分画を分離した。この膜蛋白分画をさらに PBS, pH 7.4, 5 ml に溶解し、 2°C 、 $100,000 \text{ g}$ 10 分間遠心し、その沈殿物を KYM 細胞の細胞膜蛋白とした。

2.7 Affinity cross-linking

^{125}I 標識 TNF と KYM 細胞膜蛋白の affinity cross-linking は Kasuga ら²⁷⁾ の方法に準じ、一部改変してお

こなつた。

細胞膜蛋白を1% BSA を含んだ assay buffer (100 mM Hepes, 120 mM NaCl, 1.2 mM MgSO₄, 2.5 mM KCl, 1 mM EDTA, 10 mM glucose, 1.5 mM sodium acetate, pH 7.8) で 2 mg/ml に調整したのち、この 100 μ l を ¹²⁵I 標識 TNF 100 μ l と 4°C, 2 時間 インキュベート後、assay buffer 600 μ l を加え、4°C, 10,000 g 5 分間遠心した。その沈殿物にあらかじめ dimethylsulfoxide で調整した DSS 溶液を 1 mg/ml の膜蛋白 200 μ l に最終濃度 1 mM となるよう加え、4°C, 15 分間 インキュベートした。その後、PBS, pH 7.4, 1.5 ml を加え、4°C, 10,000 g 5 分間の遠心、吸引を 3 回繰り返して得られた沈殿物にさらに 100 μ l の PBS, pH 7.4, 1% Triton X-100, 0.1% BSA, 5 mM EDTA, 1 mM PMSF を加え、細胞膜蛋白を可溶化した。

2.8 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

SDS-PAGE は大略 Maizel²⁸⁾ の方法に従つた。

2.7 で affinity cross-linking し可溶化した KYM 細胞膜蛋白 10 μ l を等量の SDS sample buffer (0.125 M Tris-HCl, pH 6.8, 2% β -mercapto ethanol, 2% SDS, 10% glycerol) と混和し、100°C, 3 分間の熱処理をおこない試料とした。

Running gel は 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8, 3.75 ml, 30% acrylamide-0.8% BIS 混合液 9.99 ml, 10% SDS 0.3 ml, TEMED 0.02 ml, 10% ammonium persulfate 0.1 ml, 蒸留水 16.12 ml 計 30.3 ml より、10×14×0.1 cm の slab gel plate 内で化学重合させ作製した。Running gel が重合した後、spacer gel を重層し、同 gel に comb で試料溝を作製した。Spacer gel の作製のため 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8 1.25 ml, 30% acrylamide-0.8% BIS 混合液 1.0 ml, 10% SDS 0.1 ml, TEMED 0.005 ml, 10% ammonium persulfate 0.1 ml, 蒸留水 7.6 ml の計 10.0 ml を化学重合させた。

泳動は、試料を試料溝に添加したのち、0.025 M Tris, 0.192 M glycine, 0.1% SDS, pH 8.4 を泳動用 buffer として用い、150 V, 4 時間おこなつた。

泳動終了後、染色は 0.5% Coomassie brilliant blue R-250 溶液で 1 時間おこない、ついで 10% acetic acid, 10% methanol 溶液で脱色した。分子量は同時に泳動した electrophoresis calibration kit (phosphorylase-b: 94K, BSA: 67K, ovalbumin: 43K, carbonic anhydrase: 30K, soybean trypsin inhibi-

tor: 20.1 K, α -lactalbumin: 14.4 K) をマーカー蛋白として算出した。

脱色したゲルは乾燥後、kodax X-Omat AR フィルムを用い、autoradiography をおこなつた。

2.9 ゲル濾過法

2.9.1 Sephacryl S-300 column chromatography

Affinity cross-linking 後の ¹²⁵I 標識 TNF-receptor complex を、あらかじめ elution buffer (PBS, pH 7.4, 1% Triton X-100) で平衡化した Sephacryl S-300 column (1.5×52 cm) に添加し、流速 7.5 ml/時、分画 volume 1.5 ml でゲル濾過し、各分画の放射活性を測定した。

各分画の molecular size は gel filtration calibration kit (BSA: 67K, ovalbumin: 43K, chymotrypsinogen A: 25K, ribonuclease A: 13.7 K) をマーカー蛋白として算出した。

2.9.2 High performance liquid chromatography (HPLC)

Native TNF のゲル濾過は、TNF をあらかじめ PBS, pH 7.4 で平衡化した東洋ソーダ社製高速液体クロマトグラフィー用 HLC 803A column に添加し、流速 0.5 ml/分、分画 volume 0.5 ml でゲル濾過し、各分画の A₂₈₀ 及び KYM 細胞に対する細胞傷害性を測定した。

各分画の molecular size は 2.9.1 に準じて算出した。

3 結 果

3.1 L-M 細胞表面への ¹²⁵I 標識 TNF 結合量の経時的变化

0.4 nM の ¹²⁵I 標識 TNF を 7×10⁵ 個の L-M 細胞と 37°C 及び 4°C で インキュベートし、経時的に細胞に結合した TNF 量を、放射活性より算出した。37°C では、細胞表面への TNF 結合量は、インキュベーション開始 30~60 分で増加し、7×10⁵ 個の細胞あたり 7.2 fmole の TNF が結合したが、90~120 分でその減少 (down regulation) が認められた (Fig. 1A)。

一方、4°C では、インキュベーション開始後 30~60 分で結合 TNF 量はプラトーに達し、7×10⁵ 個の細胞あたり 6.9 fmole の TNF が結合した (Fig. 1B)。

以上の結果より、TNF の binding assay は、4°C, 60 分の条件下でおこなうこととした。

3.2 L-M 細胞表面への ¹²⁵I 標識 TNF 結合の特異性

L-M 細胞に対する TNF 結合の特異性について、¹²⁵I 標識 TNF に対する非標識 TNF, マウス albumin 及び

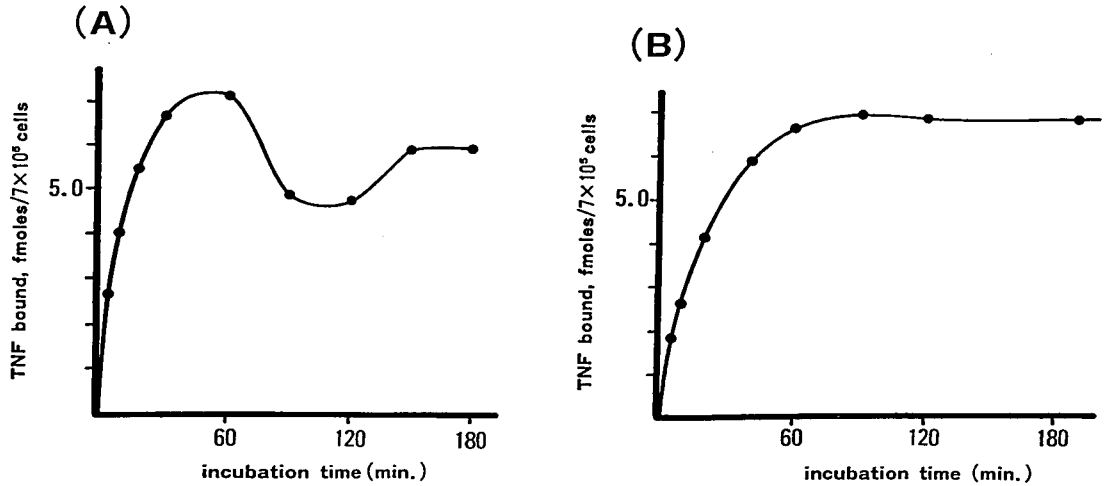


Fig. 1 Time course for ¹²⁵I-TNF binding to the surface of L-M cells at 37°C (A) and 4°C (B).

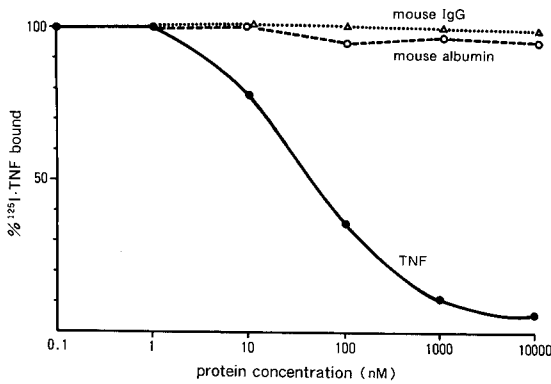


Fig. 2 Specificity of TNF receptors on L-M cells.

マウス IgG の競合作用を検討した。 ¹²⁵I 標識 TNF に対して、albumin, IgG の添加では結合の抑制がなく、非標識 TNF の添加でのみ結合の抑制が認められた (Fig. 2)。

3.3 TNF 高感受性 L-M 細胞及び TNF 抵抗性 L-R 細胞の binding assay

まず、TNF 高感受性株である L-M 細胞及びその TNF 抵抗株である L-R 細胞を用い、binding assay をおこなった。

各細胞にそれぞれ 0.02~5 nM までの ¹²⁵I 標識 TNF 及び 3.7 μM の非標識 TNF を加えて得た total binding 並びに non specific binding curve を Fig. 3

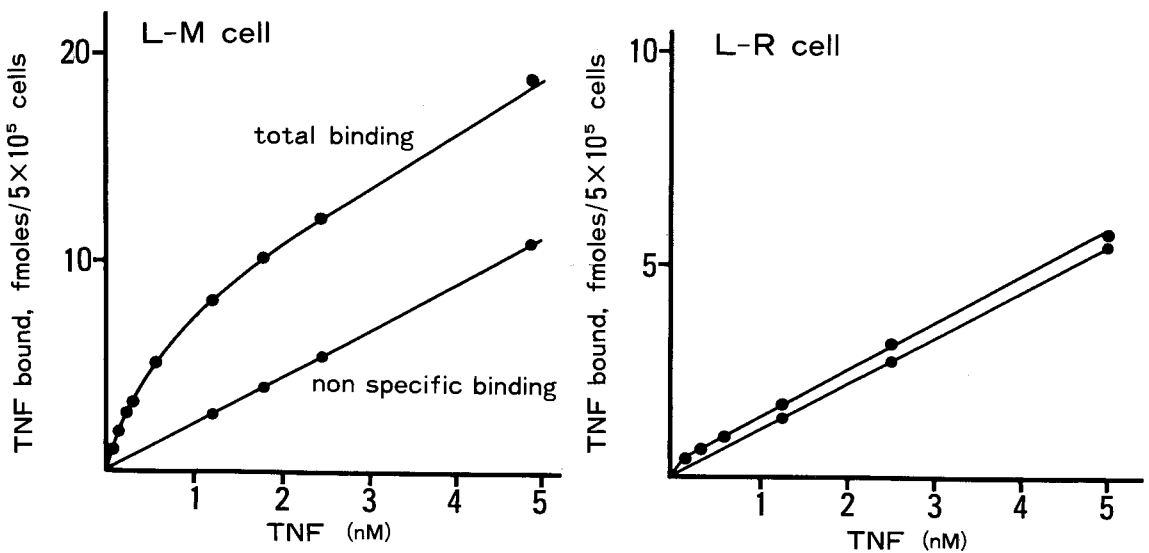


Fig. 3 Binding curve of TNF to L-M cells and L-R cells.

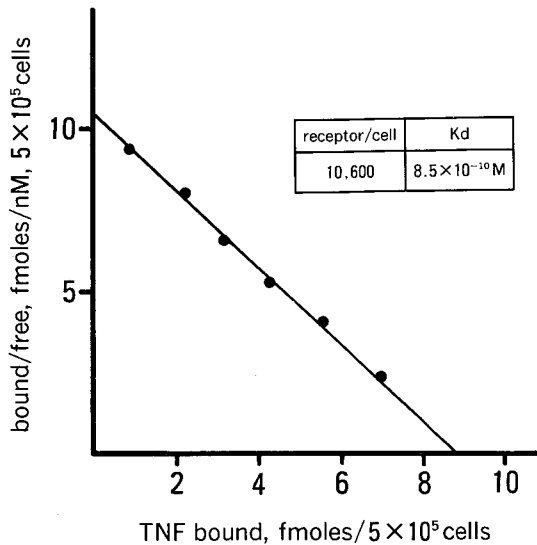


Fig. 4 Scatchard plot analysis of TNF binding to L-M cells.

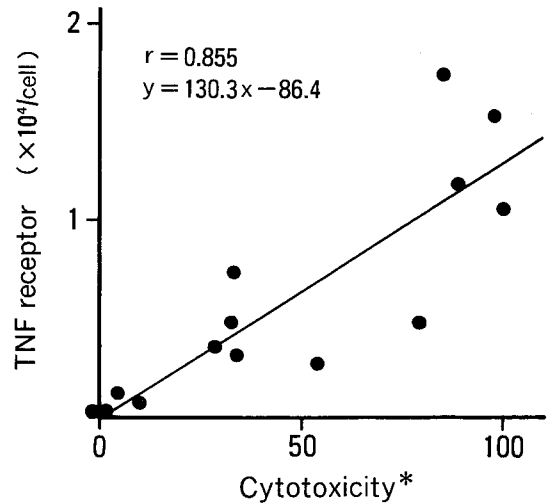


Fig. 5 Correlation between the receptor number and the sensitivity of the tumor cells.

*: Cytotoxicity means relative cytotoxicity against the cytotoxicity of L-M cell determined by inhibition of ^3H -TdR uptake or dye-uptake assay.

Table 1 TNF receptors on the surface of various tumor cells.

Cell lines or cells		TNF receptor		cytotoxicity *
		number/cell	Kd($\times 10^{-10}\text{M}$)	
Human				
KYM ^{a)}	myosarcoma	15,300	4.0	98.0
HL-60 ^{b)}	Acute promyelocytic leukemia(APL)	11,800	2.4	88.6
KM-3 ^{c)}	Acute lymphoblastic leukemia(ALL)	17,400	3.3	85.3
RPM14788 ^{d)}	colon cancer	2,700	7.1	54.2
K562 ^{e)}	Chronic myelocytic leukemia(CML)	7,200	3.2	32.7
REH ^{c)}	Acute lymphoblastic leukemia(ALL)	3,600	2.1	28.4
HMV-1 ^{c)}	melanoma	800	6.3	9.8
HeLa ^{f)}	uterine cervix cancer	1,200	4.8	4.8
KYM-R	TNF resistant cell line	n.d.**		n.d.
M. Y.	M 37 Acute myelocytic leukemia(AML)	3,200	7.6	34.2
S. F	F 57 gastric cancer	4,700	5.9	32.6
Mouse				
L-M ^{g)}	tumorigenic fibroblast	10,600	8.5	100.0
B-16 ^{c)}	melanoma	4,700	6.0	79.4
L-R	TNF resistant cell line	n.d.		n.d.

* relative cytotoxicity against the cytotoxicity of L-M cell determined by inhibition of ^3H -TdR uptake or dye-uptake assay

** n.d.: not detectable

Cells were kindly provided by

^{a)} Dr. M. Sekiguchi Dept. Path. Can. Res. Inst., Tokyo University

^{b)} Dr. M. Sato Dept. Int. Hematol. Med., Jichi Medical College

^{c)} Dr. K. Kikuchi Dept. Path., Sapporo Medical College

^{d)} The Fujisawa Pharmaceutical Co., Central Institute

^{e)} The Mochida Pharmaceutical Co., Institute

^{f)} Dr. K. Fujinaga Dept. Can. Res. Inst., Sapporo Medical College

^{g)} The Asahi Chemical Industry, Institute

に示した。

L-M 細胞では、両者に明らかな差異がみられ specific binding curve が得られたが、一方、L-R 細胞では両者に差異がみられず、特異的結合は認められなかった。

L-M 細胞表面の TNF receptor 数を Scatchard plot analysis で解析したところ、細胞 1 個あたりの receptor 数は 1.06×10^4 個で解離定数は $8.5 \times 10^{-10} M$ であった (Fig. 4)。

3.4 各種腫瘍細胞の TNF receptor 数と TNF 感受性

そこで、各種ヒト、マウス腫瘍細胞 12 株及び癌患者から得た腫瘍細胞 2 種を対象とし、TNF receptor 数の測定をおこない、細胞傷害性との相関について検討した (Table 1)。

各細胞の receptor 数は、最高はヒト急性リンパ性白血病 (ALL) 由来 KM-3 細胞の 17,400 個から測定不能のものまで広い範囲にわたり、胃癌及び急性骨髄性白血病 (AML) 患者から直接得た腫瘍細胞ではそれぞれ 4,700 個、3,200 個の receptor の存在が確認された。解離定数 (kd 値) はいずれも $10^{-10} M$ オーダーで差異は認められなかった。

また、細胞あたりの receptor 数と TNF 感受性には高い相関 ($r=0.855$) が認められた (Fig. 5)。

3.5 抗ヒト recombinant TNF モノクローナル抗体 (IV3-E, IV3-F) が TNF の細胞傷害性に与える影響

3.5.1 IV3-E, IV3-F 抗体と TNF の結合性

IV3-E 及び IV3-F 抗体と TNF の結合性について、固相化 TNF と抗ヒト TNF マウス抗血清を用い、

o-phenylene diamine 標識抗マウス IgG 抗体 (ヤギ) を 2 次抗体とした ELISA 法で測定した。

IV3-E, IV3-F 抗体の固相化 TNF に対する結合量 (A_{492}) はそれぞれ 1.220, 1.015 と negative control の 0.436 に比べて高く、positive control である抗ヒト TNF マウス抗血清と同等の値であったことから、両者が TNF と結合性を有することが確認された (Table 2)。

3.5.2 IV3-E, IV3-F 抗体が TNF と receptor の結合に与える影響

IV3-E 抗体共存 ($32 \mu g/ml$) 及び IV3-F 抗体共存 ($32 \mu g/ml$) 下で、 ^{125}I 標識 TNF を用い、KYM 細胞に対する binding assay をおこない、両抗体が TNF と receptor の結合に与える影響を検討した。

^{125}I 標識 TNF に対して、IV3-F 抗体共存下では結合の抑制がみられなかったのに対し、IV3-E 抗体共存下で TNF と receptor の特異的結合は完全に阻害された (Fig. 6)。

Table 2 Specific binding of anti-human recombinant TNF monoclonal antibody (IV3-E, IV3-F) to TNF measured by enzyme linked immunosorbent assay.

sample	Absorbance(492 nm)
IV3-E	1.220
IV3-F	1.015
Negative control ^{a)}	0.436
Positive control ^{b)}	1.196

^{a)} 10%FBS-RPMI1640 medium

^{b)} Anti human TNF anti serum (1,000times diluted with PBS pH7.4)

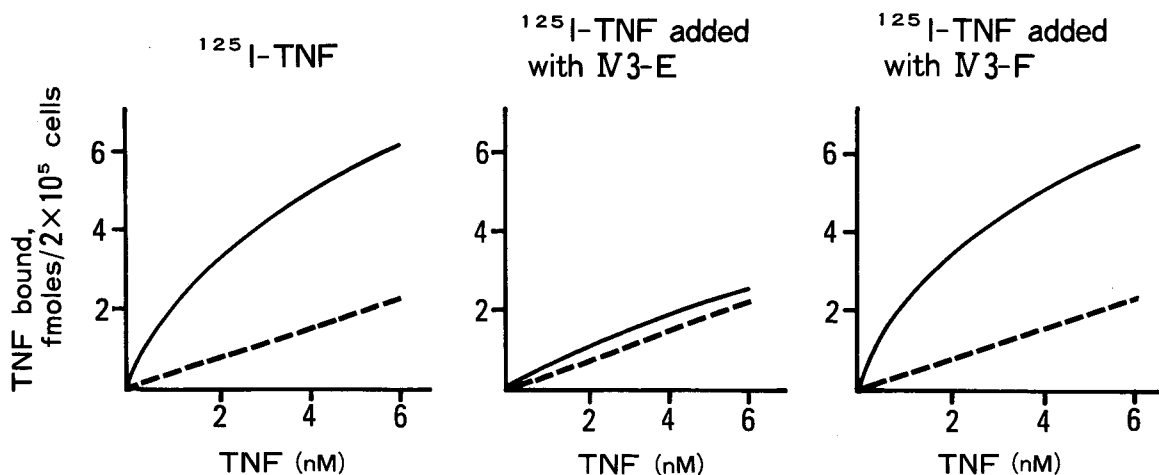


Fig. 6 Effects of anti-human recombinant TNF monoclonal antibody (IV3-E, IV3-F) on binding of ^{125}I -TNF to KYM cells. The solid lines indicate total TNF binding and the dotted lines indicate non specific binding.

3.5.3 IV3-E, IV3-F 抗体が TNF の細胞傷害性に与える影響

IV3-E 抗体及び IV3-F 抗体が TNF の細胞傷害性に与える影響を, KYM 細胞を標的細胞とした細胞傷害性試験で調べた. 100 U/ml の TNF 添加により対照とした TNF 単独群及び IV3-F 抗体処理 (32 μ g/ml) 群ではほぼ 100% の cytotoxicity が認められたのに対し, IV3-E 抗体処理 (32 μ g/ml) 群では TNF の細胞傷害性が完全に抑制された (Fig. 7).

3.6 Affinity cross-linking による 125 I 標識 TNF-receptor complex の分析

3.6.1 SDS-PAGE

KYM 細胞膜蛋白と 125 I 標識 TNF を affinity cross-linking したのち, SDS-PAGE 後 autoradiography で解析した.

膜蛋白に 125 I 標識 TNF を加えると, 145K, 50K, 35K, 17K に band が認められた (Fig. 8b).

このうち 50K, 35K, 17K の 3 本の band は 125 I 標識 TNF のみを cross-link した場合にも認められた (Fig. 8a) ために, TNF そのものの trimer, dimer, monomer と考えられた.

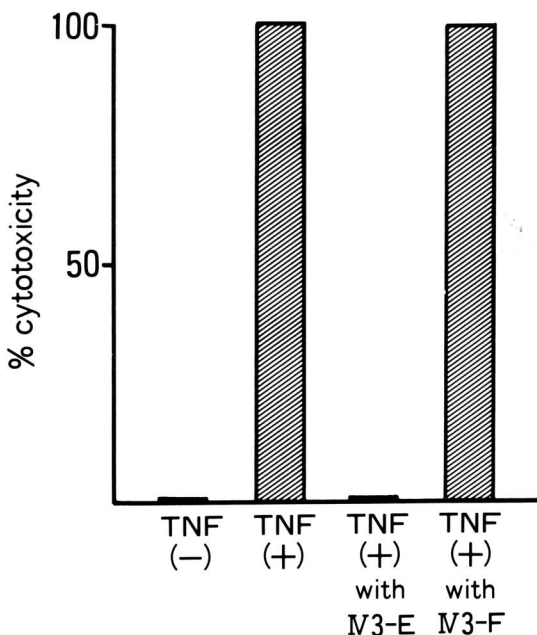


Fig. 7 Effects of anti-human recombinant TNF monoclonal antibody (IV3-E, IV3-F) on cytotoxic activity of TNF(100U/ml) against KYM cells.

一方, 145K の band は 3,000 倍過剰の非標識 TNF をあらかじめ加えることにより消失した (Fig. 8c).

そこで, TNF の receptor への結合を阻害する IV3-E 抗体を用い, 145K の band の特異性を調べた. 145K の band は, IV3-E 抗体をあらかじめ加えることにより消失したことから, 125 I 標識 TNF-receptor complex を反映しているものと推定された (Fig. 9).

3.6.2 ゲル濾過法

さらに, この 125 I 標識 TNF-receptor complex の molecular size を Sephacryl S-300 column を用いたゲル濾過法で検討した. その結果, void volume とは別に SDS-PAGE と同様に 145K の部位に放射活性のピークが認められた (Fig. 10).

3.7 Native TNF のゲル濾過 profile

Native TNF を高速液体クロマトグラフィーで分離し, その各分画について A_{280} 及び KYM 細胞を標的細胞として細胞傷害性の測定をおこなった. Fig. 11 に示すように TNF は一峰性のピークとして分画され, マーカー蛋白と比較すると molecular size 50K に活性ピークが認められた.

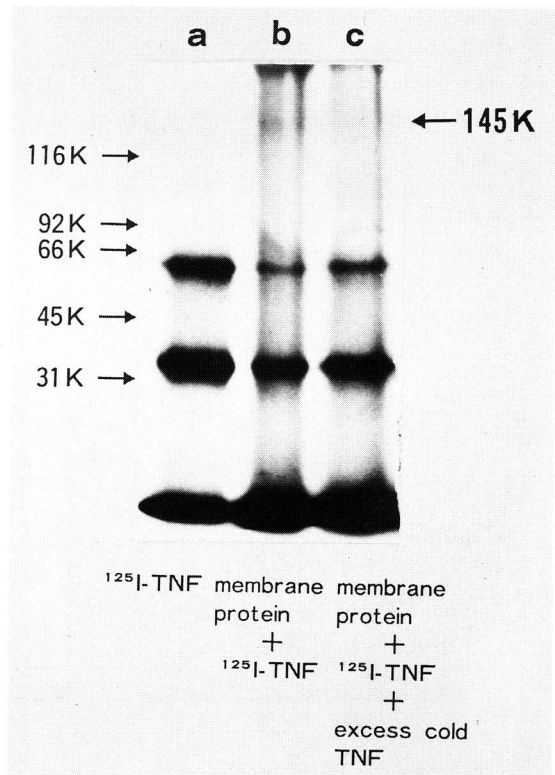


Fig. 8 Autoradiogram showing the affinity cross-linking of 125 I-TNF to membrane protein from KYM cells with or without excess cold TNF.

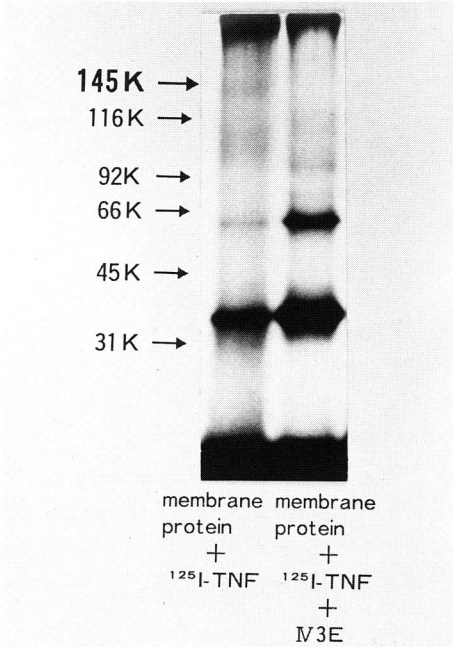


Fig. 9 Autoradiogram showing the affinity cross-linking of ¹²⁵I-TNF to membrane protein from KYM cells with or without anti-human recombinant TNF monoclonal antibody (IV3-E).

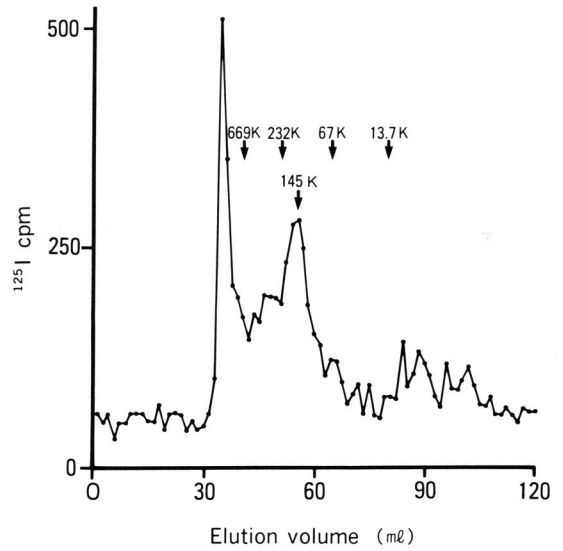


Fig. 10 Elution pattern of ¹²⁵I-TNF receptor complex on Sephacryl S-300 column.

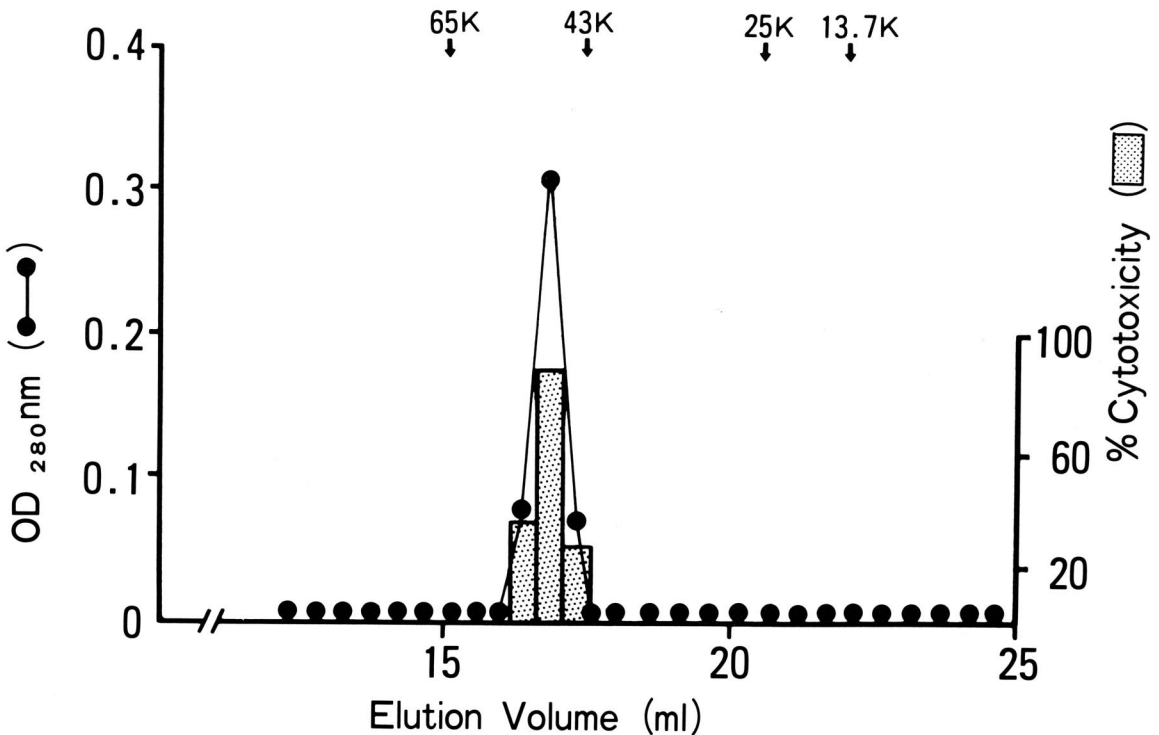


Fig. 11 Elution pattern of native TNF on HPLC column chromatography.

4 考 察

TNF に対する腫瘍細胞の感受性 spectrum については、これまで各種培養細胞を用いて検討されており、TNF は種のバリエーションを越えて、ヒト、マウスの腫瘍細胞に細胞傷害性を発揮するが、その感受性は腫瘍細胞の種類によって異なることが知られている⁵⁾。この TNF に対する感受性の違いは、樹立細胞に限らず癌患者から直接得た腫瘍細胞においても確認されており、その origin あるいは組織型によって一定の傾向がみられない²⁹⁾。

これまで、このような TNF に対する感受性を規定するものとしては、1) TNF を高感受性細胞で吸収すると、その上清中の TNF 活性が低下する³⁰⁾ こと、2) micro-injection により直接細胞質あるいは核内に TNF を注入しても cytotoxicity がみられない³⁰⁾ こと、また 3) 腫瘍細胞をあらかじめ protease 処理すると TNF に対する感受性が一時的に消失する³⁰⁾ ことから、間接的に TNF receptor の存在が想定されてきた。

しかし、ごく最近まで精製された TNF が得られなかったため、上述のような数々の傍証にもかかわらず、TNF receptor の存在はこれまで推論の域を出なかった。

そこで、本研究では、ヒト recombinant TNF を用い、まず各種ヒト腫瘍細胞株 9 種、癌患者から得た腫瘍細胞 2 種及びマウス腫瘍細胞株 3 種を対象とし、binding assay をおこない、TNF receptor 数と TNF 感受性との相関について検討した。

その結果、TNF 感受性の腫瘍細胞には TNF receptor が存在し、その数はヒト急性リンパ性白血病由来 KM-3 細胞の 17,400 個からヒト黒色腫由来 HMV-1 細胞の 800 個まで広く分布することが明らかとなった。また胃癌及び急性骨髄性白血病患者から直接得た腫瘍細胞でもそれぞれ 4,700 個、3,200 個の receptor が確認された。

これら receptor の解離定数はいずれも 10^{-10} M オーダーで差異はみられなかったが、receptor 数と細胞傷害性の間には高い相関 ($r=0.855$) が認められた。

なお、TNF 抵抗株である L-R 細胞及び KYM-R 細胞には TNF receptor は存在しなかった。

したがって TNF receptor の多寡が、腫瘍細胞の TNF に対する感受性を規定する因子の一つであることが示唆された。

そこで次に、TNF と receptor の結合を阻害する IV3-E 及び TNF と receptor の結合を阻害しない IV3-F の 2 種類の抗ヒト TNF モノクローナル抗体を

用い、TNF のヒト筋肉腫由来 KYM 細胞に対する細胞傷害性に与える影響について検討した。その結果、TNF 単独群及び IV3-F 抗体処理群ではほぼ 100% の cytotoxicity が認められたのに対し、IV3-E 抗体処理群では TNF の細胞傷害性が完全に抑制されていた。このことは、TNF が細胞傷害作用を発揮するうえで、TNF が腫瘍細胞表面の receptor と結合することが必須の過程であることを示唆している。

一方、TNF receptor 自体の性状についても、報告が少なく、Kull ら³¹⁾ がマウスの部分精製 TNF を用い、L-M 細胞における TNF receptor の同定を試み、その molecular size を 80 または 65K と報告しているにすぎない。

そこで次に、¹²⁵I 標識ヒト recombinant TNF を用い、KYM 細胞の膜蛋白に対して affinity cross-linking したのち、SDS-PAGE, autoradiography 及びゲル濾過をおこない、TNF receptor の同定を試みた。

膜蛋白に ¹²⁵I 標識 TNF を加えると、TNF の trimer, dimer, monomer に相当する 50K, 35K, 17K 以外に 145K に band が認められた。

この 145K の band は、過剰の非標識 TNF あるいは TNF の receptor への結合を阻害する IV3-E 抗体の存在下で消失することから、TNF と TNF receptor の complex であることが示唆された。

またこの TNF-receptor complex は、Sephacryl S-300 column chromatography においても 145K にその放射活性のピークとして認められた。

そこで、receptor に結合している TNF の molecular size を調べる目的で、native TNF を高速液体クロマトグラフィーで分析した。TNF は molecular size 50K の部位に一峰性のピークとして分画され、native な TNF は trimer として存在していることが確認された。

なお、TNF 自体を cross-link した際に、trimer 以外に dimer, monomer の band を認めた理由は cross-linking が不十分なためと推測された。

以上の結果より、非標識 TNF あるいは TNF の receptor への結合を阻害するモノクローナル抗体 (IV3-E) の存在下で消失した 145K の band は TNF trimer と receptor の complex であり、TNF trimer の molecular size が SDS-PAGE 上 50K であることから、TNF receptor の molecular size は 95K と算出された。

したがって、上述の Kull ら³¹⁾ が報告した 80 または 65K とは明らかな差異が認められたが、このような異

なった結果が得られた理由としては、彼等の使用した TNF が crude な部分精製品であったことや対象とした腫瘍細胞が違っていたこと以外に、Kull が自ら述べているとおり、SDS-PAGE, autoradiography の条件が悪かったこと、及び receptor に結合した TNF の分子量を決定できなかったことに起因していると考えられた。

以上、TNF が腫瘍細胞傷害作用を発揮するためには TNF receptor (monomeric size 95K) の存在が必須であり、腫瘍細胞の TNF 感受性に receptor 数がきわめて密接に関係していることを明らかにした。

5 結 論

各種腫瘍細胞株及び癌患者より得た腫瘍細胞を対象とし、¹²⁵I 標識 TNF を用いた binding assay で TNF receptor 数の測定をおこない、TNF 感受性との相関を検討した。さらに ¹²⁵I 標識 TNF とヒト筋肉腫由来 KYM 細胞膜蛋白を affinity cross-linking したのち、SDS-PAGE 及びゲル濾過法で解析し、TNF receptor の同定を試み、以下の結果を得た。

(1) 細胞表面への ¹²⁵I 標識 TNF 結合量は、37°C ではインキュベーション開始 30~60 分で増加したが、90~120 分でその減少 (down regulation) が認められた。一方、4°C ではインキュベーション開始後 30~60 分でプラットに達した。

(2) TNF 感受性の腫瘍細胞には TNF receptor が存在し、receptor 数と細胞傷害性の間には高い相関 ($r=0.855$) が認められた。

(3) 一方、TNF 抵抗株である L-R 及び KYM-R 細胞には TNF receptor は存在しなかった。

以上の結果より、TNF receptor の多寡が腫瘍細胞の TNF に対する感受性を規定する重要な因子の一つであることが示唆された。

(4) TNF の KYM 細胞に対する細胞傷害性は、TNF と receptor の結合を阻害する抗ヒト TNF モノクローナル抗体 (IV3-E) により完全に抑制された。

すなわち、TNF が receptor と結合することは、TNF が細胞傷害性を発揮するうえで、必須の過程であることが示唆された。

(5) KYM 細胞膜蛋白に ¹²⁵I 標識 TNF を加えると TNF そのものの trimer, dimer, monomer である 50K, 35K, 17K 以外に 145K に band が認められた。この 145K の band は過剰の非標識 TNF 及び IV3-E 抗体で処理すると消失することから、TNF-receptor complex であると考えられた。

(6) また、native TNF の molecular size を高速液体クロマトグラフィーで検討したところ、trimer (50K) としてのみ存在していた。

以上の結果から、TNF receptor の molecular size は 95K (145K と 50K の差) であることが示唆された。

稿を終えるにあたり、御指導並びに御校閲下さった本学内科学第 4 講座、漆崎一朗教授、新津洋司助教授に深謝いたします。また研究に際して御指導をいただいた本学内科学第 4 講座、渡辺直樹講師及び御協力いただきました教職員各位に感謝いたします。

文 献

1. Carswell, E. A., Old, L. J., Kassel, R. L., Green, S., Fiore, N. and Williamson, B.: An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**, 3666-3670 (1975).
2. Matthews, N.: Tumor necrosis factor from the rabbit. II. Production by monocytes. *Br. J. Cancer* **38**, 310-315 (1978).
3. Helson, L., Helson, C. and Green, S.: Effects of murine tumor necrosis factor on heterotransplanted human tumors. *Exp. Cell Biol.* **47**, 53-60 (1979).
4. Watanabe, N., Niitsu, Y., Sone, H., Neda, H., Yamauchi, N. and Urushizaki, I.: Inhibitory effect of tumor necrosis serum on the metastasis of B-16 mouse melanoma cells. *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)* **76**, 989-994 (1985).
5. 新津洋司郎, 渡辺直樹, 漆崎一朗: 抗腫瘍性体液因子からみた癌の免疫療法—特に Tumor Necrosis Factor (TNF) について—. *日本臨免学会誌* **6**, 417-425 (1981).
6. Shiral, T., Yamaguchi, H., Ito, H., Todd, C. W. and Wellace, R. B.: Cloning and expression in *Escherichia coli* of the gene for human tumor necrosis factor. *Nature* **313**, 803-806 (1985).
7. Penica, D., Nedwin, G. E., Hayflick, J. S., Seeburg, P. H., Derynck, R., Palladino, M. A., Kohr, W. J., Aggarwal, B. B. and Coeddel, D. U.: Human tumor necrosis factor: Precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. *Nature* **312**, 724-729 (1984).
8. Wang, A. M., Creasey, A. A., Lander, M. B., Lin, L. S., Strickler, J., Van Arsdell, J. N., Yamamoto, R. and Mark, D. F.: Molecular cloning of the complementary DNA for human tumor necrosis factor. *Science* **228**, 149-154 (1985).

9. 宗村庚修, 中野勝二, 阿部守一: 遺伝子組換えヒト TNF の抗腫瘍活性. 癌と化学療法 **12**, 160-162 (1985).
10. Fransen, L., Mueller, R., Marmenout, A., Tavernier, J., Van der Heyden, J., Kawashima, E., Chollet, A., Tizard, R., Van Heuverswyn, H., Van Vliet, A., Ruysshaert, M. R. and Fiers, W.: Molecular cloning of mouse tumor necrosis factor cDNA and its eukaryotic expression. Nucleic Acids Res. **13**, 4417-4429 (1985).
11. Ito, H., Yamamoto, S., Kuroda, S., Sakamoto, H., Kajihara, J., Kiyota, T., Hayashi, H., Kato, M. and Seko, M.: Molecular cloning and expression in Escherichia coli of the cDNA coding for rabbit tumor necrosis factor. DNA **5**, 149-156 (1986).
12. Beutler, B. A., Milsark, I. W. and Cerami, A.: Cachectin/tumor necrosis factor: production, distribution, and metabolic fate *in vivo*. J. Immunol. **135**, 3972-3977 (1985).
13. Kirstein, M. and Baglioni, C.: Tumor necrosis factor induces synthesis of two proteins in human fibroblasts. J. Biol. Chem. **261**, 9565-9567 (1986).
14. Gamble, J. R., Harlan, J. M., Klebanoff, S. J. and Vadas, M. A.: Stimulation of the adherence of neutrophils to umbilical vein endothelium by human recombinant tumor necrosis factor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **82**, 8667-8671 (1985).
15. Stolpen, A. H., Guinan, A. E. C., Fiers, W. and Rober, J. S.: Recombinant tumor necrosis factor and immune interferon act singly and in combination to recognize human vascular endothelial cell monolayers. Am. J. Pathol. **123**, 16-24 (1986).
16. Nawroth, P. P. and Stern, D. M.: Modulation of endothelial cell hemostatic properties by tumor necrosis factor. J. Exp. Med. **163**, 740-745 (1986).
17. Kunkel, S. L., Wiggins, R. C., Chensue, S. W. and Larrick, J.: Regulation of macrophage tumor necrosis factor production by Prostaglandin E₂. Biochem. Biophys. Res. Commun. **137**, 404-410 (1986).
18. Brondy, V. C., Kaushansky, K., Segal, G. M., Harlan, J. M. and Adamson, J. W.: Tumor necrosis factor type α stimulates human endothelial cells to produce granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **83**, 7467-7471 (1986).
19. Kedar, E., Ikejiri, B. L., Bonnard, G. D. and Herberman, R. B.: A rapid technique for isolation of viable tumor cells from solid tumors: use of the tumor cells for induction and measurement of cell-mediated cytotoxic responses. Eur. J. Cancer Clin. Oncol. **18**, 991-1000 (1982).
20. Sykes, J. A., Whitescarver, J., Briggs, J. and Anson, J. H.: Separation of tumor cells from fibroblasts with use of discontinuous density gradients. J. Natl. Cancer Inst. **44**, 855-862 (1970).
21. Yamazaki, S., Onishi, E., Enami, K., Natori, K., Kohase, M., Sakamoto, H., Tanouchi, M. and Hayashi, H.: Proposal of standardized methods and reference for assaying recombinant human tumor necrosis factor. Jpn. J. Med. Sci. Biol. **39**, 105-118 (1986).
22. Matthews, N. and Watkins, J. F.: Tumor necrosis factor from the rabbit. I. Mode of action, specificity and physicochemical properties. Br. J. Cancer **38**, 302-309 (1978).
23. Bolton, A. E. and Hunter, W. M.: The labeling of proteins to high specific radioactivities by conjugating to a ¹²⁵I-containing acylating agent: application to the radioimmunoassay. Biochem. J. **133**, 529-538 (1973).
24. Scatchard, G.: The attractions of proteins for small molecules and ions. Ann. N. Y. Acad. Sci. **51**, 660-672 (1949).
25. Köhler, G. and Milstein, C.: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature **256**, 495-497 (1975).
26. Thom, D., Powell, A. J., Loud, C. W. and Rees, D. A.: Rapid isolation of plasma membranes in high yield from cultured fibroblasts. Biochem. J. **168**, 187-194 (1977).
27. Kasuga, M., Van Obberghen, E., Yamada, K. M. and Harrison, L. C.: Autoantibodies against the insulin receptor recognize the insulin binding subunits of an oligomeric receptor. Diabetes **30**, 354-357 (1981).
28. Maizel, J. V. Jr.: Polyacrylamide gel electrophoresis of viral proteins. Methods Virol. **5**, 179-246 (1973).
29. Watanabe, N., Niitsu, Y., Neda, H., Sone, H., Yamauchi, N., Umetsu, T. and Urushizaki, I.: Antitumor effect of tumor necrosis factor against various primarily cultured cancer cells. Jpn. J. Cancer Res. (Gann) **76**, 1115-1119 (1985).
30. Niitsu, Y., Watanabe, N., Sone, H., Neda, H., Yamauchi, N. and Urushizaki, I.: Mechanism of the cytotoxic effect of tumor necrosis factor. Jpn. J. Cancer Res. (Gann) **76**, 1193-1197 (1985).
31. Kull, F. C. JR., Jacobs, S. and Cuatrecasas, P.:

Cellular receptor for ^{125}I -labeled tumor necrosis factor: specific binding, affinity labeling and relationship to sensitivity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 5756-5760 (1985).

別刷請求先:

(〒 060) 札幌市中央区南 1 条西 16 丁目

札幌医科大学内科第 4 講座 根田 寛