

ヒト精巣セミノーマ細胞株に対する低酸素培養の影響

藤井 智浩

腫瘍細胞の低酸素状態は血管新生因子等を介して細胞の悪性形質獲得に重要な役割を担っていることが判明している。今回、ヒト精巣セミノーマ細胞株を用い、血管新生因子を中心に、低酸素培養の影響を検討した。実験に供した細胞株には当教室で樹立したヒト精巣セミノーマ細胞株 (JKT-1) とその高転移株 (JKT-HM) を用い、低酸素培養 (1% O₂) での増殖曲線・形態・vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) 産生・血管新生因子を含む種々の遺伝子発現・アポトーシス・細胞周期について常酸素培養 (21% O₂) と比較した。両株ともに、低酸素培養下では増殖が抑制され細胞は大型の紡錘形となった。培地中への VEGF-A 産生は低酸素培養下24時間で増加、遺伝子発現では、VEGF-A, -B ならびに -D が2日目までやや発現の亢進が見られ、その後減弱を示したが、VEGF-C は発現の亢進が持続した。hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) はメッセジレベルでは変化を認めなかった。また解糖系酵素と共にストレス蛋白である Heat shock protein (HSP) 70, HSP90, cyclin-dependent kinase inhibitors である p21, p27, p15, 接着因子の CD44, vimentin の発現亢進を認めた。細胞周期の FACS による解析では G₁ 期への集積を示していたが、アポトーシスは認めなかった。結果として他臓器細胞株と同様に、ヒト精巣セミノーマ細胞株においても低酸素培養において血管新生因子の発現亢進が認められ、なかでも培養早期の VEGF-C の発現亢進は特徴的であり、本因子が、近年リンパ性転移に深く関わる因子として注目されている点を考慮すると、臨床的にセミノーマに多く認められるリンパ性転移誘導における低酸素状況の検討が今後必要であると思われる。

(平成13年12月20日受理)

Effects of Hypoxia on Human Seminoma Cell Lines

Tomohiro FUJII

Hypoxia is considered to play an important role in tumor progression through vascular endothelial growth factors (VEGF). In this study, the effects of hypoxia on human testicular seminoma cells were analyzed. A human testicular seminoma line (JKT-1) and its highly metastatic subline (JKT-HM), established at Kawasaki Medical School, were used to analyze the effects of hypoxia on these cells with regard to growth, morphological changes, production of VEGF-A, and various gene expressions including angiogenic factors, induction of apoptosis, and cell cycle perturbation. Hypoxia suppressed cell growth, caused morphological changes that transformed the cells into large and spindle-shaped cells, and enhanced VEGF-A production in both lines. In JKT-1 cells, the gene expressions of VEGF-A, -B, and -D were enhanced until day

日目に発現亢進を認めた後、消失した。しかし VEGF-C は発現亢進が強く持続していた。VEGF receptor 2 (VEGFR2/KDR) も低酸素培養にて発現が誘導されていた。Angiopoietin 2 (Ang 2), fibroblast growth factor-2 (FGF-2) に

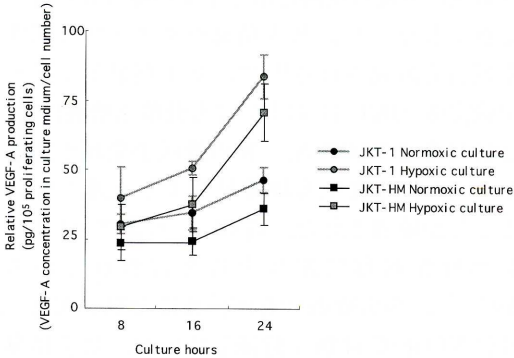


Fig. 3. VEGF-A production into culture medium from JKT-1 and JKT-HM cells in normoxic (N) and hypoxic (H) culture conditions

大きな変化は認めなかった。

ついで HIF-1 関連遺伝子群では、メッセージレベルでは大きな変化を認めなかった。

また、代謝系遺伝子および HSPs については、代謝系に關与し低酸素によって活性化する遺伝子のうち、aldorase A, glucose transporter 3, ならびに LDH-A の遺伝子発現は亢進した。また HSPs のうち、HSP27 は発現減弱、70 と 90 では反対に、亢進していた。

次に細胞周期調整遺伝子群では、p53 の発現は暫時減弱し、p21^{Cip1}, p27^{Kip1} そして p15^{ink4b/MTS2} の亢進が確認された。

なお、セミノーマ関連遺伝子のうち、placental alkaline phosphatase (PLAP) と human chorionic gonadotropin (hCG)- β の発現亢進も認められた。

最後に接着因子では、CD44 と vimentin の発

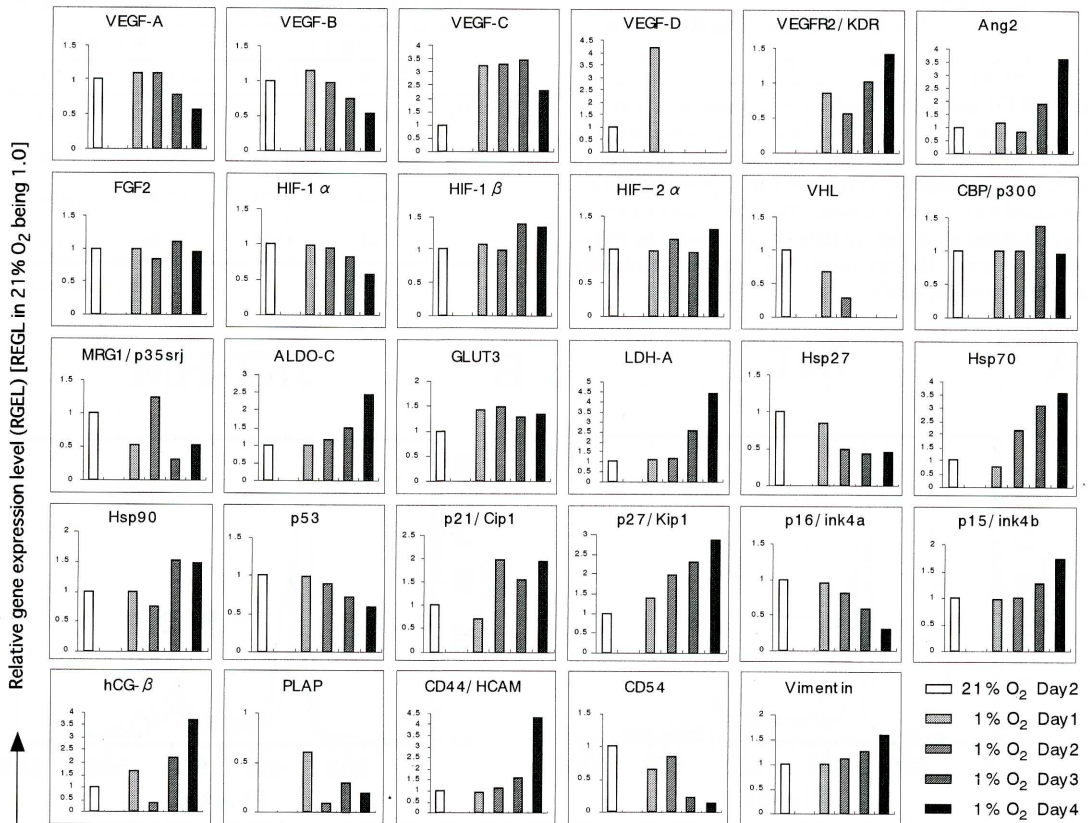


Fig. 4. Representative changes of relative expression levels of individual genes studied. The experiments were performed at least triplicately. All experiments revealed similar results.

現が暫時亢進し、CD54/ICAM1は減弱していた。

スは誘導されなかった。

膜表面 CD54/ICAM-1 の発現 (Table 2)

JKT-1, JKT-HM 共に、陽性細胞の割合は変化しなかったが、平均蛍光強度の軽度の減弱が認められた。

細胞周期およびアポトーシスの解析 (Fig. 5, Table 3)

JKT-1, JKT-HM 共に HC では G₁ 期への集積と S 期の減少が確認された。この解析で sub-G₁ 期、いわゆるアポトーシス分画の変動はなく、TUNEL 法においても HC ではアポトーシ

Table 2. Surface expression of CD44 and CD54 in JKT-1 and JKT-HM cells

		JKT-1		JKT-HM	
		21% O ₂	1% O ₂	21% O ₂	1% O ₂
CD44	Positive %	90.26	91.16	88.05	89.84
	Relative mean intensity	2.21	1.80	2.01	1.56
CD54	Positive %	80.63	81.90	80.43	72.01
	Relative mean intensity	10.84	9.86	6.57	5.60

Both JKT-1 and JKT-HM cells were cultured in 21% or 1% O₂ conditions for 2 days. Then, surface expression of CD44 and CF54 were analyzed flow cytometrically. Positive % indicates percentage of CD44 and CD54 positive fractions compared with cell only control. The relative mean intensity was calculated as intensity in cultured cells divided by that of cell only control. The experiments were performed duplicately and showed similar results.

考 察

VEGF は血管新生因子の中でも固形腫瘍の血管新生に主要な役割を果たしていることが解ってきており⁸⁾⁻¹⁰⁾、ヒト精巣セミノーマに関する報告も散見される^{11),12)}。ヒト精巣セミノーマ細胞株 (JKT-1) においても低酸素培養にて、2日目まで VEGF-A, -B の遺伝子発現が亢進し、VEGF-A 産生も培養早期より亢進していることが確認された。VEGF-C および -D もリンパ行性転移に関与すると言われている¹³⁾⁻¹⁵⁾、当実験系でも両株共に発現が亢進し、特に VEGF-C は強く持続していた。ヒト精巣

Table 3. Percentage of cells sub-G₁, G₁, S, and G₂ + M phases in JKT-1 and JKT-HM cultured in 21% or 1% O₂ condition for 2 days. The analysis was performed flow cytometrically and results were shown in Fig. 5.

	JKT-1		JKT-HM	
	21% O ₂	1% O ₂	21% O ₂	1% O ₂
Sub G ₁	1.46	2.12	1.42	1.94
G ₁	39.49	62.95	45.53	64.96
S	38.52	15.75	32.39	13.61
G ₂	21.51	19.45	21.40	19.76

(% of total cells)

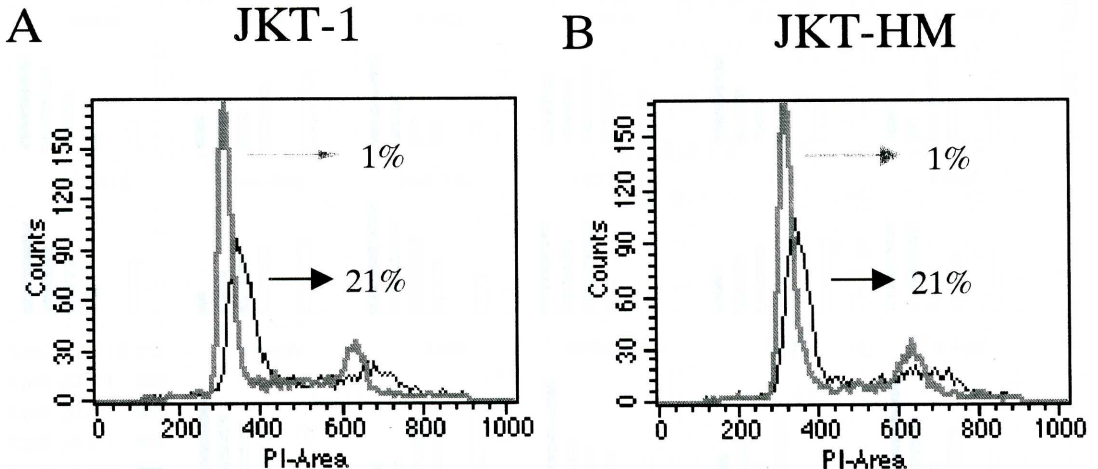


Fig. 5. Flow cytometrical analysis of cell cycle perturbation in JKT-1 (Panel A) and JKT-HM (B) cells cultured in normoxic (21%) and hypoxic (1%) conditions. The experiments were performed duplicately and showed similar results.

セミノーマはリンパ節に好発転移することが臨床的に知られており、1日の低酸素培養がこれらの強い発現亢進を惹起することは、短期間の低酸素環境において腫瘍の増殖をもたらす可能性を示唆する重要な知見と思われる。しかし、VEGF-C 遺伝子には hypoxia response element (HRE) が存在しないので、低酸素状態での主要な転写因子 HIF-1 を介さず、別のシグナル系が働いているものと思われ、今後の検討課題である。また、VEGF-A, -C および -D の受容体である VEGFR2/KDR も低酸素培養にて JKT-1 で発現が認められた。癌細胞にはこれらの受容体は通常発現しておらず、パラクリン機構にて血管新生を来すとされているが¹⁶⁾、今回の実験では低酸素培養にて誘導されてきており、オートクリン機構が働き、低酸素状態での癌細胞の悪性形質獲得に関与している可能性が示唆された。

低酸素状態にて誘導される HIF-1 に関しては、常酸素状態では、HIF-1 は産生されると瞬時にユビキチン化による変性を受けるが、低酸素状態では安定した状態となり、転写を開始していくことが解っている¹⁷⁾。今回メッセージレベルでは遺伝子発現の変化を認めなかったが、蛋白レベルで発現亢進が予測されるので、検討してみたい。

低酸素状態では、p53 を介するアポトーシスも報告されている¹⁸⁾。低酸素培養で JKT-1, JKT-HM 共に増殖が抑制されたが、今回の検討では、JKT-1, JKT-HM 共に低酸素培養にて p53 は暫時発現が減弱しており、検討した限りではアポトーシスは確認されなかったものの、p21, p27 そして p15 の発現亢進が確認され、さらに、細胞周期の解析では両株共に顕著な G₁ 期への集積と S 期の減少が認められたので、細胞増殖の抑制は低酸素状態が p27 の発現をとうして G₁ 期から S 期への移行を抑制しているものと考えられ、Gardner らの報告¹⁹⁾と一致しており、ヒト精巣セミノーマ細胞株における低酸素培養による増殖の抑制は、主として細胞周期の G₁ 期での停滞が原因であることが確認さ

れた。また、p27, p15 は共に transforming growth factor (TGF)- β により誘導されることで同定されており^{20)~22)}、これらのサイトカインの低酸素培養による変化も今後検討する必要がある。

その他の低酸素状態で誘導される遺伝子として、代謝系に関与する aldolase A, glucose transporter 3 ならびに LDH-A の遺伝子発現の検討では、すでに報告されているように³⁾亢進していた。また、低酸素というストレスとストレス蛋白である HSPs との検討も行った。HSPs のうち、アポトーシスに抑制的に関与することが知られている HSP27 と HSP70^{23), 24)}、また HIF-1 と相互作用する HSP90²⁵⁾ について検討を行ってみた。HSP27 は発現の減弱、HSP70 と HSP90 は亢進が認められ、これらも低酸素状態での悪性形質獲得への関与が考えられ、今後低酸素と HSPs の関与の検討の必要性も示唆された。

腫瘍の浸潤、転移に接着因子が関与することは解っているが、JKT-1 および JKT-HM 共に低酸素培養条件下では紡錘型の細胞となること、および低酸素状態における接着因子の報告が散見されることより^{26)~28)}、下記の接着因子についても検討した。CD44, vimentin は暫時発現亢進、CD54/ICAM1 は減弱していた。膜表面 CD54/ICAM1 の発現は両株共に、陽性細胞の割合は変化しなくても、軽度、発現強度が減弱傾向を示した。また結果は示さないが、matrix metalloproteinases (MMPs) についても MP-RT-PCR 法により検討を行ったが、大差は認められなかった。

精巣原発の胚細胞腫瘍としては、セミノーマと非セミノーマ、すなわち、胎児性癌、奇形腫、絨毛癌、卵黄囊腫瘍、混合型腫瘍などに分類され、その中でもセミノーマは未分化な組織型であり、そこから他の組織型への分化の可能性もあり、今回低酸素状態が分化傾向に影響を与えるかどうか、それらの腫瘍マーカーである、hCG- β と α fetoprotein (AFP)、セミノーマに特異的に発現しているとされる PLAP の検討も行った。PLAP, hCG- β は JKT-1 において 1

日目に亢進を認めましたが、AFPは変化を認めなかった。低酸素状態はヒト精巣セミノーマ細胞株において明らかな分化誘導は来さない様に見られた。

以上、われわれの教室で樹立したセミノーマ細胞株に対して低酸素培養条件での検討を行った。今後は検討した種々の分子群の蛋白レベルでの解析、あるいはサイトカインの動態や低酸素による変化へのサイトカインの効果等の検討へと発展させセミノーマの病態検討を行いたい。

結 語

われわれの教室で樹立したヒト精巣セミノーマ細胞株を対象として低酸素培養条件下で、細胞増殖、血管新生因子、遺伝子発現、細胞周期の解析を中心に行った。

1) 短期間(24時間)の低酸素(1% O₂)培養において、JKT-1, JKT-HM共に上清中のVEGF-Aの産生が亢進した。

2) JKT-1による低酸素培養における遺伝子発現変化の検討では以下の結果を得た。

(1) 血管新生因子のVEGFs特にVEGF-Cの

発現の亢進

(2) ストレス蛋白であるHSP70とHSP90の発現の亢進とHSP27の減弱

(3) サイクリン依存性キナーゼ抑制遺伝子であるp21^{Cip1}, p27^{Kip1}, p15^{ink4b/MTS2}の発現亢進とp53の減弱

(4) 接着因子においてCD44, vimentinの発現亢進とCD54の減弱

3) 細胞周期の解析では著明なG₁期への集積を来しており、アポトーシスは認めなかった。

謝 辞

稿を終えるにあたり、ご指導を賜りました川崎医科大学泌尿器科学教室 田中啓幹教授、実験について直接ご助言、ご指導を頂いた川崎医科大学衛生学教室 大槻剛巳助教授に謝意を表します。また、本研究の遂行に御協力頂いた衛生学教室員各位および泌尿器科学教室員各位、本研究の遂行にあたりご協力いただいた、組織培養免疫センターおよび環境生態センターの皆様にお礼申し上げます。なお、本研究の一部はプロジェクト研究費(課題番号12-114, 13-116)の援助により行われた。

文 献

- 1) Folkman J, D'Amore PA: Blood vessel formation: what is its molecular basis? *Cell* 87: 1153-1155, 1996
- 2) Dachs GU, Tozer GM: Hypoxia modulated gene expression: angiogenesis, metastasis and therapeutic exploitation. *Eur J Cancer* 36: 1649-1660, 2000
- 3) Semenza GL: Hypoxia, clonal selection, and the role of HIF-1 in tumor progression. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 35: 71-103, 2000
- 4) Huss WJ, Hanrahan CF, Barrios RJ, Simons JW, Greenberg NM: Angiogenesis and prostate cancer: Identification of a molecular progression switch. *Cancer Res* 61: 2736-2743, 2001
- 5) Kung AL, Wang S, Kleo JM, Kaelin WG, Livingston DM: Suppression of tumor growth through disruption of hypoxia-inducible transcription. *Nat Med* 6: 1335-1340, 2000
- 6) Kinugawa K, Hyoudou F, Matsuki T, Jo Y, Furukawa Y, Ueki A, Tanaka H: Establishment and Characterization of New Human Testicular Seminoma Cell Line, JKT-1. *Int J Urol* 5: 282-287, 1998
- 7) Jo Y, Kinugawa K, Matsuki T, Morioka M, Tanaka H: Analysis of the biological properties and use of comparative genomic hybridization to locate chromosomal aberrations in the human testicular seminoma cell line JKT-1 and its highly metastatic cell line JKT-HM. *BJU Int* 83: 469-475, 1998
- 8) Veikkola T, Karkkainen M, Claesson-Weish L, Alitalo K: Regulation of angiogenesis via vascular endothelial growth factor receptors. *Cancer Res* 60: 203-212, 2000

- 9) Ferrara N, Alitalo K : Clinical applications of angiogenic growth factors and their inhibitors. *Nat Med* 5 : 1359 – 1364, 1999
- 10) Yoshikazu T, Dai F, Bert O, Chieko K, Peter C, Rakesh K. J : Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Modulation by Targeting Hypoxia-inducible Factor-1 α \rightarrow Hypoxia Response Element \rightarrow VEGF Cascade Differentially Regulates Vascular Response and Growth Rate in Tumors. *Cancer Res* 60 : 6248 – 6252, 2000
- 11) Akiba S, Akiyama S, Ohi Y : Expression of vascular endothelial growth factor in patients with testicular germ cell tumors as an indicator of metastatic disease. *Cancer* 85 : 1323 – 1330, 1999
- 12) Konaka H, Koshida K, Endo Y, Uchibayashi T, Sasaki T, Namiki M : A human seminoma xenograft model with regional lymph node metastasis. *J Urol* 161 : 342 – 348, 1999
- 13) Stacker SA, Caesar C, Baldwin ME, Thornton GE, Williams RA, Prevo R, Jackson DG, Nishikawa S, Kubo H, Achen MG : VEGF-D promotes the metastatic spread of tumor cells via the lymphatics. *Nat Med* 7 : 186 – 191, 2001
- 14) Mandriota SJ, Jussila L, Jeitsch M, Compagni A, Baetens D, Prevo R, Banerji S, Huarte J, Montesano R, Jackson DG, Orci L, Alitalo K, Christofori G, Pepper MS : Vascular endothelial growth factor-C-mediated lymphangiogenesis promotes tumor metastasis. *EMBO J* 20 : 672 – 682, 2001
- 15) Karpanen T, Egeblad M, Karkkainen MJ, Kubo H, Yla-Herttuala S, Jaattela M, Alitalo K : Vascular endothelial growth factor C promotes tumor lymphangiogenesis and intralymphatic tumor growth. *Cancer Res* 61 : 1786 – 1790, 2001
- 16) Risau W : Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 386 : 671 – 674, 1997
- 17) Richard DE, Berra E, Pouyssegur J : Angiogenesis : how a tumor adapts to hypoxia. *BBRC* 266 : 718 – 722, 1999
- 18) Shen Y, White E : p53-dependent apoptosis pathways. *Adv Cancer Res* 82 : 55 – 84, 2001
- 19) Gardner LB, Li Q, Park MS, Flanagan WM, Semenza GL, Dang CV : Hypoxia inhibits G1/S transition through regulation of p27 expression. *J Biol Chem* 276 : 7919 – 7926, 2001
- 20) Reynisdottir I, Polyak K, Iavarone A, Massague J : Kip/Cip and Ink4 Cdk inhibitors cooperate to induce cell cycle arrest in response to TGF- β . *Genes Dev* 9 : 1831 – 1845, 1995
- 21) Carneiro C, Alvarez CV, Zalvide J, Vidal A, Dominguez F : TGF- β 1 actions on FRTL-5 cells provide a model for the physiological regulation of thyroid growth. *Oncogene* 16 : 1455 – 1465, 1998
- 22) Frost SJ, Simpson DJ, Farrell WE : Decreased proliferation and cell cycle arrest in neoplastic rat pituitary cells is associated with transforming growth factor- β 1-induced expression of p15/INK4B. *Mol Cell Endocrinol* 176 : 29 – 37, 2001
- 23) Jean-Marie B, Cecile D, Philippe B, Luigi R, Santos A, Susin, Chantal D-L, Sandeep G, Andre-Patrick A, Guido K, Eric S, Carmen G : Hsp27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome C. *Nature Cell Biol* 2 : 645 – 652, 2000
- 24) Helen MB, Beni BW, Kelvin C, Dick DM, Artin M, Tomomi K, Pankaj T, Richard IM, Gerald MC, Douglas RG : Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nat Cell Biol* 2 : 469 – 475, 2000
- 25) Minet E, Mottet D, Michel G, Roland I, Raes M, Remacle J, Michiels C : Hypoxia-induced activation of HIF-1 : role of HIF-1 α Hsp90 interaction. *FEBS Lett* 460 : 251 – 256, 1999
- 26) Hasan NM, Adams GE, Joiner MC, Marshall JF, Hart IR : Hypoxia facilitates tumor cell detachment by reducing expression of surface adhesion molecules and adhesion to extracellular matrices without loss of cell viability. *Br J Cancer* 77 : 1799 – 1805, 1998
- 27) Dachs GU, Tozer GM : Hypoxia modulated gene expression : angiogenesis, metastasis and therapeutic exploitation. *Eur J Cancer* 36 : 1649 – 1660, 2000
- 28) Vasir B, Reitz P, Xu G, Sharma A, Bonner-Weir S, Weir GC : Effects of diabetes and hypoxia on gene markers of angiogenesis (HGF, cMET, uPA and uPAR, TGF- α , TGF- β , bFGF and Vimentin) in cultured and transplanted rat islets. *Diabetologia* 43 : 763 – 772, 2000