

エリスロポエチン産生細胞(Hep G2 細胞)に対する Fas 抗原の影響

柳澤尚紀

Investigation of the influence of Fas antigen on Hep G 2 cells, an erythropoietin producing cell line

Naoki YANAGISAWA

Fourth Department of Internal Medicine, Teikyo University School of Medicine, Kawasaki, Japan

We have already reported that serum levels of soluble Fas (sFas) and Fas-positive mononuclear cells increased concomitantly with deterioration in renal function and the increases were statistically significant.

Moreover, the severity of renal anemia in renal failure patients was significantly correlated with serum levels of sFas. Therefore, we investigated whether or not Fas and Fas ligand (FasL) influenced the production of erythropoietin (EPO). Hep G2 cells, an EPO productive human hepatocellular carcinoma cell line, were cultured in MEM medium with 10% of FCS containing 1, 10 or 100 ng/ml of sFas, or sFasL. The EPO concentrations of the supernatants were measured by the ELISA method, Annexin V positive cells were calculated by flow cytometry, H^3 leucine uptake was measured by a liquid scintillation counter, an MTT assay was performed using the light absorption method, fragmented nuclei were stained by the TUNEL method and DNA laddering was observed by agarose gel electrophoresis. Their characteristics evaluated at 0, 24, 48 and 72 hrs. Both EPO production and H^3 leucine uptake were suppressed in culture with sFas or sFasL, dose-dependently and declines in MTT activities accompanied these changes at 24 hrs. In addition, nuclear fragmentation and DNA laddering were found to be stimulated in culture with sFas or sFasL at 48 hrs. These data suggest that sFas induced apoptosis and had a cytotoxic effect on Hep G2 cells.

In conclusion, hyper-sFas-emia observed in chronic renal failure may regulate the production of EPO, which indicates that sFas acts as a uremic toxin.

Jpn J Nephrol 2003 ; 45 : 673-680.

Key words : Hep G2 cell, soluble Fas, apoptosis, renal anemia, chronic renal failure

はじめに

Apoptosis¹⁾は壊死と異なりプログラムされた細胞の死であり、生物界の多岐にわたって観察、確認されてきた。ヒトの各種疾患でも、その成因や病状の進展に関与する大きな因子の一つであることが証明されている。これまでに、apoptosis 関連因子は数多く発見されており、その促進因子としては Fas, Fas ligand (FasL), Bax, TNF α などがあり、一方、抑制因子としては soluble Fas (sFas), bcl-2, p-53 などがある²⁻⁴⁾。

われわれは、腎疾患患者の末梢血中の apoptosis 関連因子の役割について検討を行ってきた。その結果、腎機能の低下に伴い末梢血核球の Fas および FasL の発現が増強するとともに、末梢血中の sFas が著しく増加することを報告してきた⁵⁾。特に血中 sFas は、維持透析患者でも長期間高値を持続していることより、何らかの生物学的活性を發揮している可能性が推測された。そこで、慢性腎不全患者にほぼ必発の合併症である腎性貧血への影響について検討を行った。腎性貧血の機序はエリスロポエチン (EPO) 産生能の廃絶ではなく、相対的欠乏により赤血球の産生が

低下した状態であり⁶⁾、EPO の産生・作用過程に何らかの抑制因子や促進因子が関与している可能性は十分に想定される。一般的に、赤血球の産生は EPO の造血促進因子の apoptosis によっても制御されている⁶⁾。われわれは慢性腎不全患者の血中 sFas 濃度は赤血球数と相関することもこれまで報告してきた⁷⁾。

以上のことより、腎性貧血の成因の一つに apoptosis が関与していると考え、主に、Fas-FasL 系を介した関与を培養細胞系で検討した。

培養細胞は EPO 産生能を有する Hep G2 細胞であるが、この細胞はヒト肝細胞癌の cell line であり、EPO 産生能のほかにアルブミンや AFP を産生するなどの特性を有している^{8,9)}。この Hep G2 細胞を培養し、sFas や sFasL で刺激することによる影響を検討し、腎性貧血の成因の一つとしての sFas と sFasL の関与を明らかにすることを試みた。

方 法

1. 細胞培養

EPO 産生能を持つ、ヒト肝細胞由来の Hep G2 細胞(理化学研究所, 筑波)を使用し、DMEM 培地(日水製薬, 東京)に FCS(コスモバイオ, 東京)を 10% 添加し、これを基礎培地とした。5%CO₂, 37°C の条件下で培養し、confluent になるまで培養を続け、実験に供した。

2. sFas ならびに sFasL

sFas は、Baculovirus Expression Vector System により sf9 細胞に発現させた膜貫通ドメインの欠如している Recombinant Soluble Human Fas(Pharmingen, CA)を使用した。

添加濃度は、非添加群をコントロールとし、sFas の添加濃度を健常人の血中濃度である 1 ng/ml、透析患者の血中濃度に近似した 10 ng/ml、薬理的な濃度として 100 ng/ml を設定した。しかしながら、今回の実験は予備実験も含め数度に分けて行っており、すでに同一品番の試薬が入手困難となっているものもあり、一部の検討で添加濃度が異なっている。

一方、sFasL はヒト胎児腎由来の細胞外領域に対応している可溶性 Human Fas Ligand(UPSTATE Biolog Inc, NY)を使用した。

3. EPO 産生の検討

はじめに無刺激下における Hep G2 細胞の EPO 産生能を検討した。Hep G2 細胞を 24 well culture plate で con-

fluent になるまで培養した後、無刺激下で 12, 24, 48, 72 時間培養後に培養上清中の EPO 濃度を測定した。次に、sFas を 1, 10, 100 ng/ml の各濃度で、sFasL を 10, 100 ng/ml の各濃度で添加した DMEM 培地 2 ml に置き換え、同様に 12, 24, 48, 72 時間後の培養上清を採取した。EPO 濃度は、EIA キット(イムノエリット EPO 東洋紡, 大阪)を用いて測定した。

4. Leucin uptake による蛋白合成能の検討

Hep G2 細胞を 96 well culture plate で confluent になるまで培養した後、sFas ないし sFasL を 1, 10, 100 ng/ml の各濃度で添加した 10% FCS 含有 DMEM 培地 200 μ l に置き換え、各 well に L-[4, 5]-³H leucin(Amersham Pharmacia Biotech, NJ)を 0.5 μ Ci/well ずつ加え、さらに培養を行い、24, 48, 72 時間後に leucin の uptake を液体シンチレーションカウンター(LSC 3500 Aloka, 東京)で 3 分間測定した。

5. Annexin V による陽性細胞の検討

Hep G2 細胞を 24 well culture plate で confluent になるまで培養した後、sFas を 1, 10, 100 ng/ml の各濃度で添加した 10% FCS 含有 DMEM 培地 2 ml に置き換え、24, 48, 72 時間培養後の Hep G2 細胞 3,000 個のうちの Annexin V (MBL CO., LTD, 名古屋)陽性率を FACS(Cyto Ace 150 日本分光, 東京)で算定した。

6. MTT (3-(4, 5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2, 5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) assay による生細胞数の検討

Hep G2 細胞を 96 well culture plate で confluent になるまで培養した後、sFas ないし sFasL を 1, 10, 100 ng/ml の各濃度で添加し、24, 48, 72 時間培養後に MTT-cell Growth Assay Kit(CHEMICON International Inc, CA)を用い、560 nm で吸光度を測定し、生細胞数の検討¹⁰⁾を行った。

7. アガロースゲル電気泳動法による DNA laddering の検討

Hep G2 細胞を 6 well culture plate で confluent になるまで培養した後、sFas ないし sFasL を 0.5, 2.0, 10.0 ng/ml の濃度に添加した 10% FCS 含有 DMEM 培地 6 ml に置き換え、さらに 48 時間培養を続けた。これを、0.25% トリプシンで単離し、1 ml チューブに移し、TE Lysis buffer で細胞を溶解して DNA を抽出した。その後、2% アガロースゲルを用い、100 v で 35 分間電気泳動を行った。

8. TUNEL 法による apoptosis 陽性細胞の検出

Hep G2 細胞を 24 well culture plate で confluent になる

まで培養した後、sFasないしsFasLを10 ng/ml、100 ng/mlの各濃度で添加した10% FCS含有DMEM培地に置き換え、さらに48、72時間培養を続けた。0.25%トリプシンで単離し、チューブに細胞を回収した後にApoptosis *in situ* Detection Kit(和光純薬、大阪)を用いてTUNEL染色を行い、スライドグラス上に10 μ l滴下し封入した。染色した各プレパラート上で細胞300個のうちのTUNEL陽性細胞を数え、百分率で表した。

9. 統計処理

統計はすべて平均値±標準誤差で表した。統計処理はStatView ver 5.0(SAS Institute Inc, NC)を使用し、Bertlett検定を行い、分散が異なることを確認したうえでBonferoni/Dunn検定を行い $p < 0.05$ を有意とした。

結果

1. Hep G2細胞のEPO産生能

Hep G2細胞を無刺激下で培養を行った結果、EPO産生量は12時間後で 2.8 ± 0.37 mIU/ml、24時間後で 6.4 ± 0.88 mIU/ml、48時間後で 13.6 ± 1.3 mIU/ml、72時間後では 15.5 ± 2.45 mIU/mlと経時的に有意に増加していることが判明した(Fig. 1)。

次に、この培養系にsFasを添加した検討では、添加12時間後では、sFas 100 ng/mlの高濃度添加群でのみEPO産生に抑制がみられた。しかし、添加後24~72時間までは、低濃度のsFas添加でも、EPO産生は有意に抑制され、sFasの濃度依存性も認められた(Fig. 2)。sFasL添加群での検討では、EPO産生は有意に抑制されたが、sFasLの濃度依存性はみられなかった(Fig. 3)。

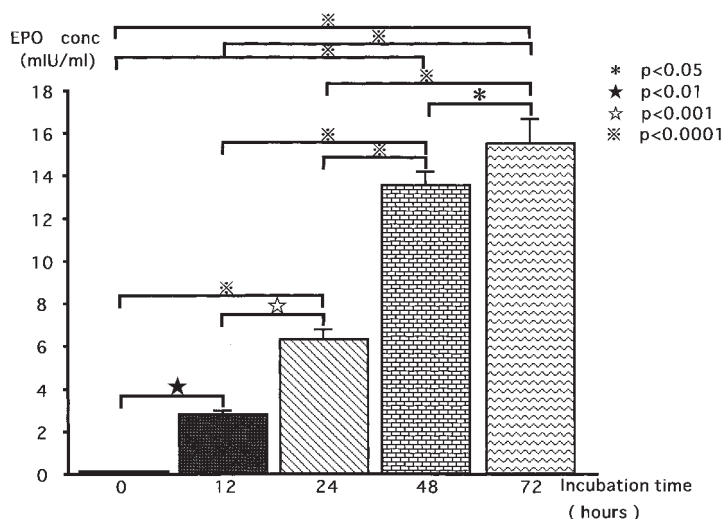


Fig. 1. EPO production ability of Hep G2 cells (n=6)

2. Hep G2細胞のapoptosisの検討

A. Leucin uptake

sFas添加では、24時間後と48時間後の時点でsFas 10 ng/mlの添加で無添加群との間で有意な抑制がみられた(Fig. 4)。このことはsFas添加によりHep G2細胞の蛋白合成能が抑制されることを示している。

一方、sFasL添加群ではsFasLを1、10 ng/ml添加して検討してみたが、無添加群と比べ有意差は認めなかった。

B. Annexin V染色

Leucin uptakeの結果を踏まえてAnnexin V染色によるapoptotic cellの検出を試みた。Annexin V陽性細胞率は24時間後の時点でsFas 1 ng/ml添加で $1.7 \pm 0.4\%$ 、10 ng/ml添加で $2.5 \pm 0.9\%$ であった。Leucin uptakeの結果と完全に平行な結果は得られなかったが、sFasを添加す

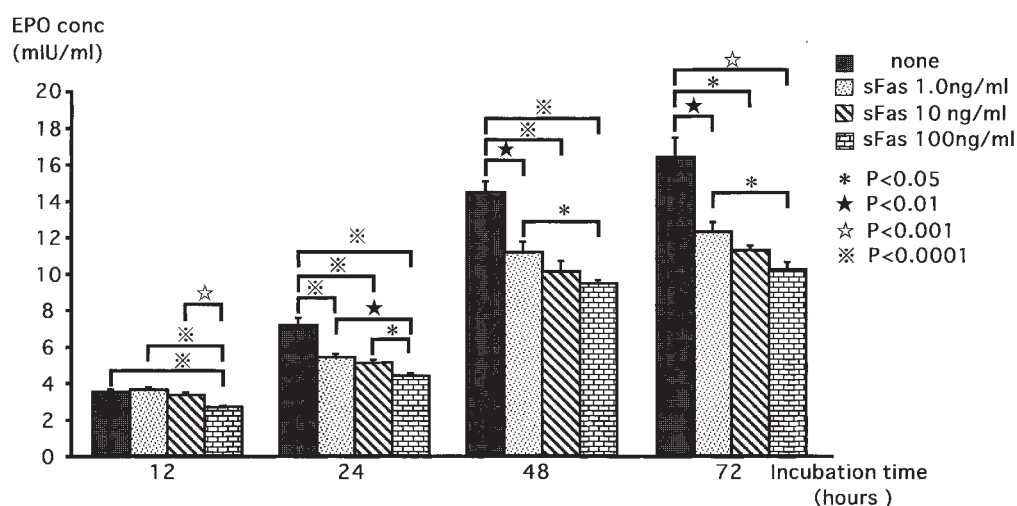


Fig. 2. Comparison of EPO production after stimulation with sFas (n=5)

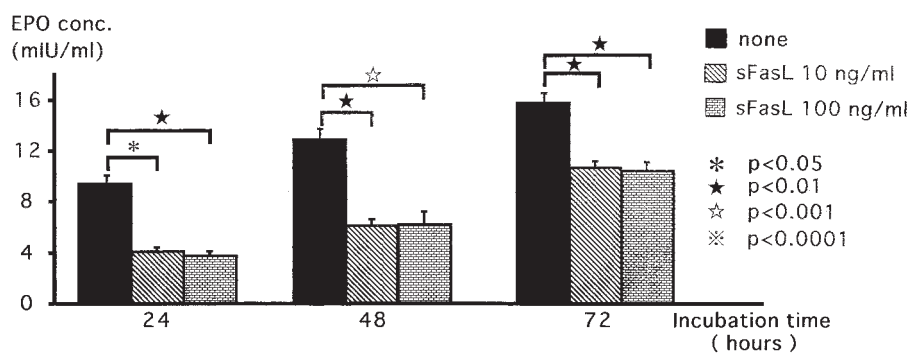


Fig. 3. Comparison of EPO production after stimulation with sFasL (n=5)

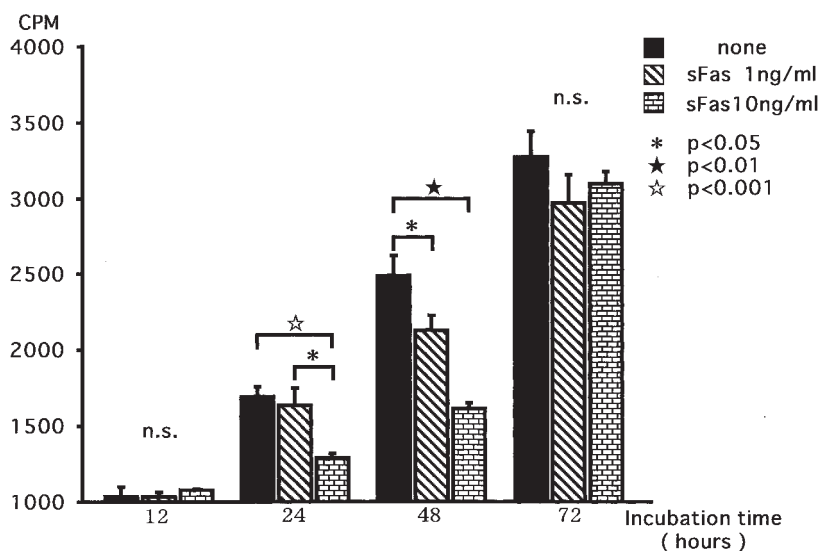


Fig. 4. Comparison of leucine uptake after stimulation with sFas (n=6)

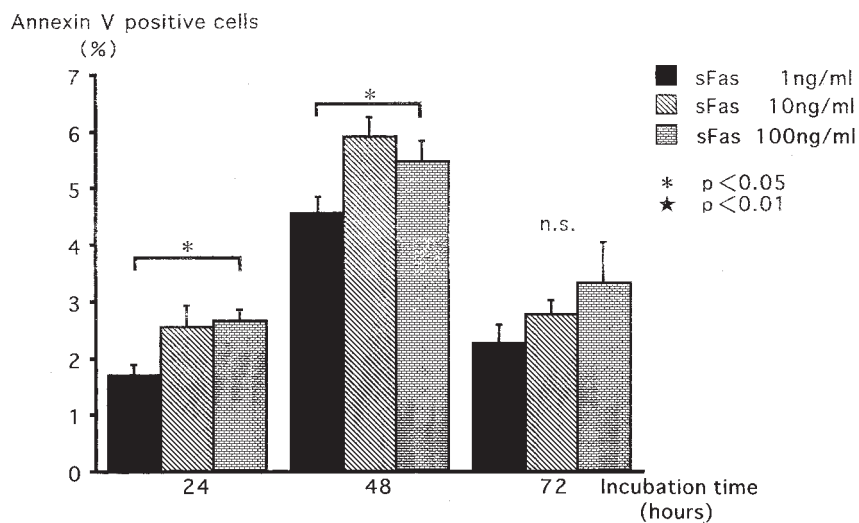


Fig. 5. Comparison of the percentage of Annexin V positive cells after stimulation with sFas (n=5)

ること Hep G2 細胞の apoptotic cell の出現頻度は有意に増加することが判明した (Fig. 5)。一方、sFasL 添加で

は、Hep G2 細胞の apoptotic cell の出現頻度は濃度依存的な増加を認めなかった (Fig. 6)。

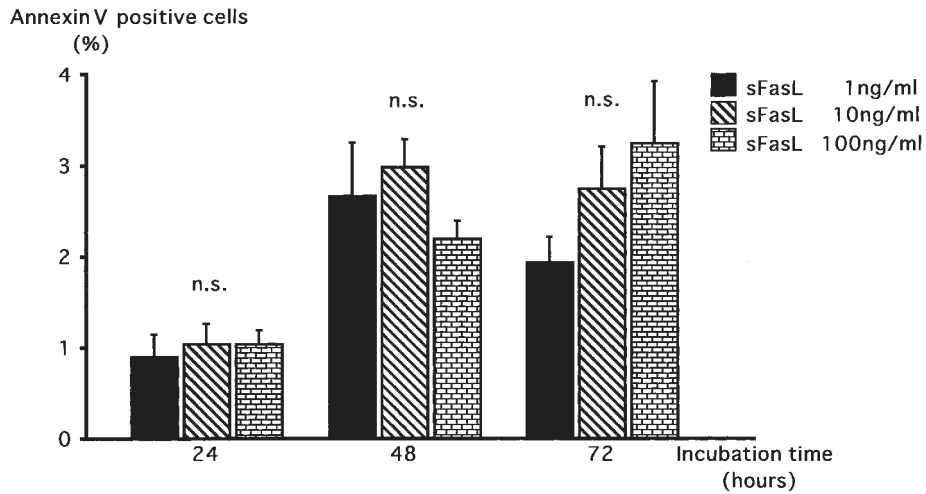


Fig. 6. Comparison of the percentage of Annexin V positive cells after stimulation with sFasL (n=5)

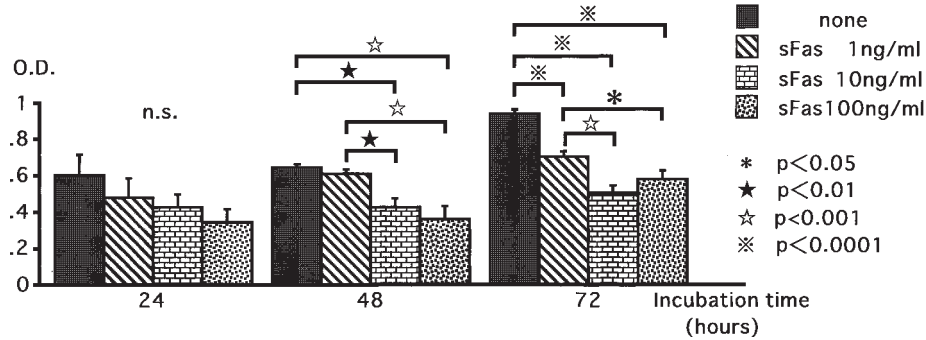


Fig. 7. Comparison of the number of live cells by MTT assay after stimulation with sFas (n=5)

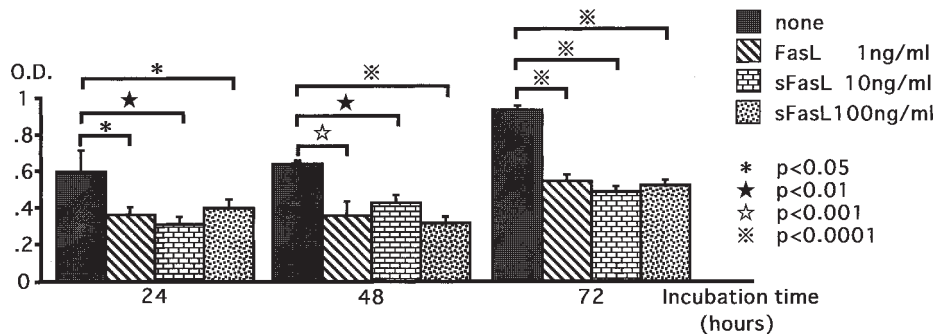


Fig. 8. Comparison of the number of live cells by MTT assay after stimulation with sFasL (n=5)

C. MTT assay

sFas 添加 48, 72 時間後には、濃度依存的に生細胞数の減少が認められていた (Fig. 7)。一方、sFasL 添加でも、濃度依存性は認められなかったものの有意な生細胞の減少が認められた (Fig. 8)。

D. アガロースゲル電気泳動法

無添加では確認し得なかったが、sFas ないし sFasL を

添加することで DNA laddering が認められた (Fig. 9)。

E. TUNEL 法

TUNEL 陽性細胞を Fig. 10 に示す。TUNEL 染色陽性率は無添加群に比較して sFas および sFasL 添加により陽性細胞が有意に、添加濃度依存的に増加していた (Fig. 11)。

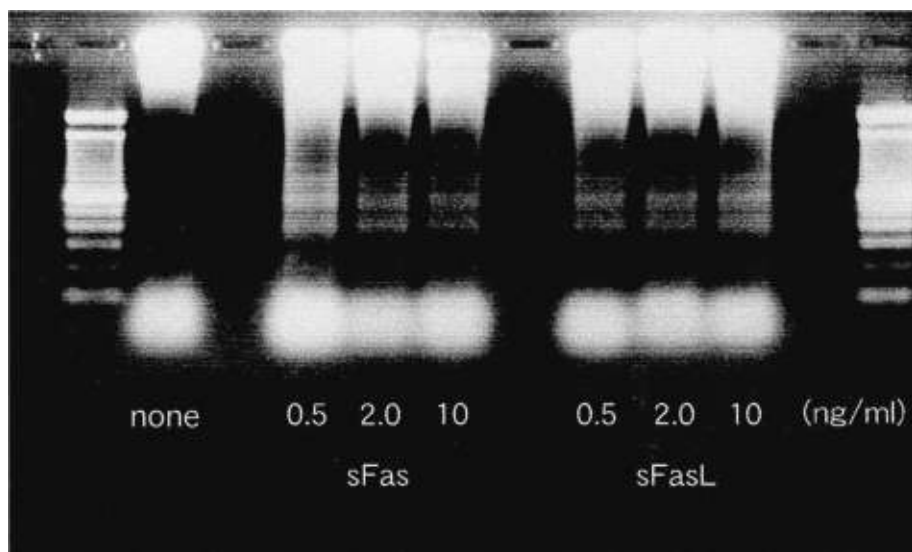


Fig. 9. Agarose gel electrophoresis shows DNA laddering by sFas and sFasL

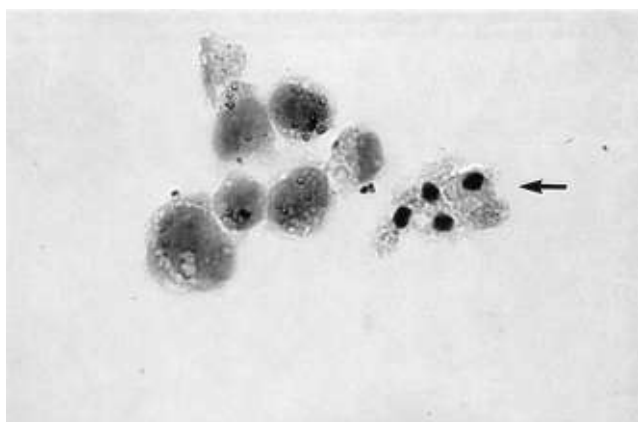


Fig. 10. TUNEL positive Hep G2 cells

考 察

今回の実験結果により、腎不全状態で亢進している Fas-FasL 系が腎性貧血の病因となっている可能性が強く示唆された。さらに興味深いことは、従来より apoptosis を誘導するとされていた sFasL のみならず、apoptosis を抑制するとされていた sFas も逆に apoptosis を誘導し、腎性貧血の成因に関与していることが判明したことである。そして、それはヒト肝細胞癌由来の Hep G2 細胞を用い、先に述べたように、非添加群をコントロールとし、sFas の添加濃度を、健常人の血中濃度である 1 ng/ml、透析患者の血中濃度に近似した 10 ng/ml、薬理的な濃度として 100 ng/ml と設定した培養細胞系で得られた。このことは、Fas が FasL に比し著明に増加している腎不全状態

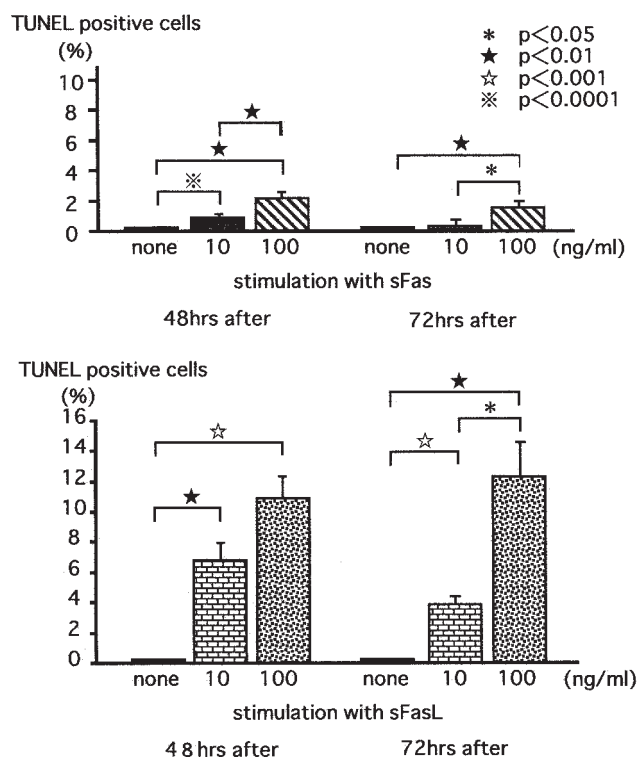


Fig. 11. Comparison of the percentage of TUNEL positive cells after stimulation with sFas or sFasL (n=300)

では、Fas が新しい尿毒症性毒素として働く可能性を強く示唆していることになる。

Fas-FasL 系を介する apoptosis の亢進は種々の疾患¹¹⁻¹³⁾で病因的意義が明らかになりつつある。腎疾患においても増殖細胞の制御や硬化性疾患の進展に関与しているとされ

ている¹⁴⁻¹⁷⁾。腎不全においても、末梢血単核球を用いた検討で、Fas-FasLを介するapoptosisが亢進していることをわれわれは見出し報告した⁹⁾。これら諸疾患の病態では、apoptosisを誘導する因子はまず第一にsFasLであると報告されてきた。今回のsFasL添加実験の結果でも、Annexin Vやアガロースゲル電気泳動法、TUNEL染色でそれは示されている。

しかしながら、腎不全におけるFas-FasL系の特徴としては、sFasLが正常人の血中濃度より僅かに増加し1 ng/m/程度であるのに比べ、sFasは10 ng/m/と正常人の数倍にも達し、FasLとは不釣り合いに著明に増加していることである⁹⁾。腎不全における高sFas血症の原因としては、sFasの分子量が約40KDであり、腎機能の低下と血中sFas濃度が相関を示すことから、腎機能低下に伴うsFasの蓄積がまず考えられる。しかし、健常人だけでなく腎不全患者の尿中においてもsFasは検出されず(未発表)、単なる排泄低下では腎不全患者の高sFas血症は説明がつかない。次いで考えられるのは、sFasの腎臓での代謝の抑制、あるいはsFas産生の亢進である。腎不全患者の末梢血単核球では、血中濃度と同様にFas陽性細胞も腎機能の低下とともに著明に増加しており⁹⁾、腎不全における高sFas血症の成因は、Fas抗原の増加が関与していると考えられた。

そこで、われわれはまず臨床的にsFas濃度と関連する病態の検討を行った。その結果、腎不全患者における腎性貧血においてはヘマトクリット値と血中sFas濃度との間に負の相関関係があることを見出した⁷⁾が、腎性貧血の程度と血中sFas濃度は腎機能と相関することが示されており、単に腎不全の程度を示す2つの指標が相関したと考えることもできる。

今回、われわれはヒト肝細胞癌由来でFas感受性を有するHep G2細胞¹⁸⁾を用いた。ただ、Hep G2細胞は癌細胞であるため増殖速度はきわめて速く、Fas感受性はあるもののapoptosisが非癌細胞より起こりにくい状況であった。例えばFig. 7で示したMTT assayでは経時的に生細胞数は増加しており、sFas添加による細胞減少を上回っていると考えられた。また、Fig. 6に示したように、Annexin V陽性細胞の頻度が48時間後に比べて72時間後ではむしろ低下を示しているのは、apoptosisの発現速度に比し細胞増殖速度が上回っていたためと考えられた。

EPO産生量はsFas添加濃度依存的に抑制された。この機構としては、先に述べたようにsFasがHep G2細胞にapoptosisを誘導した可能性と、細胞毒性を示した可能性

が考えられる。事実、MTT assayでの添加濃度依存的な吸光度の低下やleucin uptakeの抑制が認められたことから、sFasがHep G2細胞に対して毒性を有し、EPO産生を抑制したことが示唆された。さらにAnnexin V陽性細胞が増加していることから、Fas-FasL系を介したapoptosisが関与してEPO産生が低下していることも考えられた。

次に、sFasによる直接的なapoptosis誘導の証明のために、アガロースゲル電気泳動法とTUNEL法による検討を行った。前者ではDNAの断片化を示すladderingを証明し、また後者ではクロマチンの濃縮を示す陽性細胞がsFasL添加群のみならず、腎不全患者の血中濃度程度のsFas添加でも認められ、その陽性率は添加濃度依存的に増加した。このことにより、腎不全状態で認められる高濃度のsFasがapoptosisを誘導し、EPO産生を抑制していることが示唆された。

アガロースゲル電気泳動法でDNA ladderingを認め、また、TUNEL染色によるクロマチンの濃縮している陽性細胞の存在によりapoptosisの確定診断は得られ、さらに、TUNEL染色陽性率は濃度依存性を示していた。しかし、他の検討では濃度依存性は認められなかった。

しかしながら、無添加群との間では明らかなEPO産生の抑制がみられ、同様に生細胞数の減少も認めていることから、sFasLがHep G2細胞に影響を与えたことは明らかであり、sFasLの添加濃度をもっと低く設定すれば濃度依存性を示した可能性がある。

これまでの考えの一つに、sFasはapoptosisを回避する作用を示すとされている²⁾ことから、腎不全状態における高sFas血症はFas抗原陽性細胞のapoptosisを抑制している可能性もある。一方、Silvestrisらは、HIV感染においても腎不全状態と同様に高sFas血症が存在し、HIVに感染したT-cellの細胞培養系にsFasを添加培養することによりapoptosisを促進させること、sFasがapoptosisを誘導することを報告した¹⁹⁾。腎不全状態では前述したように、高sFas血症それ自体がapoptosisを誘導しEPO産生を低下させ、腎性貧血の病因の一つとなっている。

腎性貧血では、今回われわれが示したように、高sFas血症の存在下でapoptosisによりEPO産生が抑制されれば貧血の改善が困難となり、腎不全に特徴的である高sFas血症が腎性貧血に対して病因的意義を呈していると言わざるを得ない。

最近われわれは、ヒト臍帯静脈由来血管内皮細胞やヒト滑膜由来線維芽細胞と同様にsFas添加培養を行い、apoptosisが誘導されるかどうかの検討を行ったところ、

添加濃度依存的に Annexin V 陽性率の増加が認められたことを報告した²⁰⁾。すなわち、sFas 添加によりこれらの細胞でも Hep G2 細胞同様に apoptosis が誘導されていることを示した。

腎不全で持続的に認められる高 Fas 血症が、EPO 産生系のみならず白血球、血小板、血管内皮細胞などに尿毒症性毒素として作用している可能性があり、現在、継続検出中である。これらが明らかにされれば、sFas が尿毒症性毒素の一つとして作用している可能性が示唆されることになる。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究を行うに際して終始直接ご指導いただきました佐藤昌志助教授、中島 豊講師に深く感謝いたします。また、中央実験室小沼貴子氏の技術的補佐を心より感謝いたします。また、技術面におきましてご指導、ご助言を賜りました新潟大学医学部附属腎研究施設機能制御学分野 追手 巍教授、森岡哲夫助教授、ならびに同教室の皆様方に深く感謝いたします。

本研究の一部は第 43 回、第 44 回日本腎臓学会学術総会で発表した。

文 献

- Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972 ; 26 : 239-257.
- Cheng J, Zhou T, Liu C, Shapiro JP, Brauer MJ, Kiefer MC, Barr PJ, Mountz JD. Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of Fas molecule. *Science* 1994 ; 263 : 1759-1762.
- Kundson CM, Korsmeyer SJ. Bcl-2 and Bax function independently to regulate cell death. *Nature Gene* 1997 ; 16 : 358-363.
- Yonish-Rouach E, Resnitzky D, Lotem J, Sachs L, Kimchi A, Oren M. Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature* 1991 ; 352 : 345-347.
- Sato M, Konuma T, Yanagisawa N, Haizuka H, Asakura H, Nakashima Y. Fas-Fas ligand system in the peripheral blood of patients with renal diseases. *Nephron* 2000 ; 85 : 107-113.
- Koury MJ, Bondurant MC. Erythropoietin retards DNA breakdown and prevents programmed death in erythroid progenitor cells. *Science* 1990 ; 248 : 378-381.
- 柳澤尚紀, 灰塚尚敏, 朝倉裕士, 中島 豊, 佐藤昌志. 腎疾患患者血清中の可溶性 Fas(sFas) と可溶性 Fas ligand (sFasL) の臨床的意義. *日腎会誌* 1999 ; 41 : 255.
- Goldberg MA, Glass GA, Cunningham JM, Bunn HF. The regulated expression of erythropoietin by two human hepatoma cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987 ; 25 : 7972-7976.
- Bouma ME, Rogier E, Verthier N, Labarre C, Feldmann G. Further cellular investigation of the human hepatoblastoma-derived cell line Hep G2: morphology and immunocytochemical studies of hepatic-secreted proteins. *In Vitro Cell Dev Biol* 1989 ; 25 : 267-275.
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983 ; 65 : 55-63.
- Ohsako S, Hara M, Harigai M. Expression and function of Fas antigen and bcl-2 in human systemic lupus erythematosus lymphocytes. *Clin Immunol Immunopathol* 1994 ; 73 : 109-114.
- Kamihira S, Yamada Y, Tomonaga M, Sugahara K, Tsuruda K. Discrepant expression of membrane and soluble isoform of Fas(CD95/APO-1) in adult T-cell leukemia: soluble Fas isoform is an independent risk factor for prognosis. *Br J Haematol* 1999 ; 107 : 851-860.
- Kerr JF, Cooksley WG, Searle J, Halliday JW, Haalliday WJ, Holder L, Roberts I, Burnett W, Powell LW. The nature of piecemeal necrosis in chronic acute hepatitis. *Lancet* 1979 ; 2 : 827-828.
- Shimizu A, Kitamura H, Masuda Y, Ishizaki M, Sugisaki Y, Yamanaka N. Apoptosis in the repair process of experimental proliferative glomerulonephritis. *Kidney Int* 1995 ; 47 : 114-121.
- Sugiyama H, Kasihara U, Makino H, Yamasaki Y, Ota Z. Apoptosis in glomerular sclerosis. *Kidney Int* 1996 ; 49 : 103-111.
- Bonventre JV. Mechanisms of ischemic acute renal failure. *Kidney Int* 1993 ; 43 : 1160-1178.
- Woo D. Apoptosis and loss of renal tissue in polycystic kidney diseases. *N Engl J Med* 1995 ; 169 : 1747-1756.
- Castaneda F, Kinne RK. Apoptosis induced in Hep G2 cells by short exposure to millimolar concentrations of ethanol involves the Fas-receptor pathway. *J Cancer Res Clin Oncol* 2001 ; 127 : 418-424.
- Silvestris F, Cafforio P, Tucci M, Del Prate A, Dammacco F. VEINCTR-N, an immunogenic epitope of Fas, and soluble Fas enhance T-cell apoptosis *in vitro*. II. Functional analysis and possible implications in HIV-1 disease. *Molecular Medicine* 2000 ; 6 : 509-526.
- Matsumoto J, Yanagisawa N, Konuma T, Haizuka H, Nakashima Y, Sato M. Increased Fas antigen in uremia accelerates adhesion of mononuclear cells to endothelial and synovial cell via stimulated hyaluronan production. *Am J Kidney Dis* 2001 ; 38 : 854-857.