腫瘍細胞による血小板凝集能の特性と 凝集物質の解析

新津洋司郎* 茂木 良弘* 石垣 聖史*
坂内 清* 石井 徹* 熊井 良司*
越田 吉一* 高後 裕* 漆崎 一朗*

Characterization of the platelet aggregating activity of tumor cell line and analysis of the platelet aggregating substance obtained from them

Yoshiro NIITSU*, Yoshihiro MOKI*, Seishi ISHIGAKI*,
Kiyoshi BANNAI*, Tohru ISII*, Ryoji KUMAI*,
Yoshikazu KOSHIDA*, Yutaka KOHGO* and Ichiro URUSHIZAKI*

Key words: metastasis, human tumor cell line, platelet cound membrane
protein, platelet aggregation, platelet aggregating substance

In recent years, accumulating evidence has appeared suggestive of the fact that platelets are deeply involved in the lodging of tumor cells during the process of bloodborne metastases. One of the most significant observations inferring a role for platelets in the development of metastases is that the ability of certain tumor cells to form metastases is related to their ability to promote aggregation of host platelets.

In the present paper, attempts were made to characterize the platelet aggregating material obtained from established human cancer cell lines.

The following results were obtained

- 1) The platelet aggregating activities of tumor cells (HMT-1, M7609) were diminished by treatments with trypsin but not with collagenase or neuraminidase. Aggregating activity was preserved with a preparation of membrane from these tumor cells, although it was abolished by heating (100°C 15 min) or sonication.
- 2) The existence of divalent cation was required for the platelet aggregation induced by HMT-1 tumor cells.
- 3) By SDS PAGE (autoradiography), membrane proteins with MW of 10,000

* 札幌医科大学第四内科〔〒060 札幌中央区南1条西16丁目〕, The Fourth Department of Internal Medicine, Sapporo Medical College, Sapporo, Japan.

~20,000 daltons which specifically bound to platelets were commonly found in cells with platelet aggregating activity (HMTV-1, M 7609).

It was therefore, concluded that platelet aggregation induced by human tumor cells is evoked by direct interaction of platelets with aggregating proteins (MW 10,000~20,000 daltons) on the cell membrane.

はじめに

癌の血行転移において腫瘍血栓形成を癌細胞の着床に関与することから、血小板と腫瘍細胞とのかかわりあい注目されている¹⁾。これまでわれわれは、ヒト癌細胞培養株が血小板凝集能を有し、さらにこの凝集能は腫瘍細胞の膜成分に associate した物質であることを報告してきた^{2),3)}。今回は腫瘍細胞の血小板凝集能の特性についてさらに検討をすすめ、その凝集物質を解析したので報告する。

I. 材料および方法

腫瘍細胞として HMTV-1 (ヒト悪性黒色腫細胞株) と M 7609 (ヒト結腸癌細胞株) を用いた。腫瘍細胞の血小板凝集能は既報²⁾ に従いヘパリン加 PRP を用い血小板凝集計 NKL HE-MA-TRACER 1 (二光バイエンス) で測定した。腫瘍細胞の trypsin, collagenase および neuraminidase 処理はそれぞれ 1 mg/ml pH

8.5 で 37°C, 60 分, 1,400 unit/ml pH 7.0 で 37°C, 24 時間, 50 unit/ml pH 5.0 で 37°C, 2 時間とした。細胞膜片は腫瘍細胞を Dounce homogenizer で破壊して作製した。凝集能の 2 価イオンの影響は 0.38% クエン酸ナトリウム加 PRP を用いて検討した。細胞膜蛋白の ¹²⁵I 標識は lactoperoxidase 法⁴⁾ によった。可溶化細胞膜成分は Triton, 超音波処理と 100,000 xg 90 分遠心上清より作製した。SDS-PAGE は 5 ~22.5% gradient polyacrylamide gel を作製し定電圧 200 V で泳動した。

II. 結果および考察

HMTV-1 および M 7609 細胞の有する血小板凝集能の特性を表 1 に示す。HMTV-1 および M 7609 細胞の凝集率はそれぞれ平均 47%, 60% であったが trypsin で処理することにより凝集能は完全に失活した。しかし collagenase や neuraminidase による処理では凝集能に変化は認められなかった。またこれらの癌細胞の膜片

Table 1 Physicochemical properties of platelet aggregating material of tumor cells.

Treatment	Platelet aggregation (%)	
	HMTV-1	M-7609
Heparinized PRP	47	60
Trypsin (1 mg/ml)	0	0
Collagenase (1400 U/ml)	45	56
Neuraminidase (50 U/ml)	46	57
Membrane fragment	42	37
Heat 57°C 30 min	41	28
100°C 15 min	0	0
Sonication	0	0
Citrated PRP	0	
+ CaCl ₂ 5 mM	0	
10 mM	47	
+ MgCl ₂ 10 mM	0	
20 mM	47	

にも凝集能を認めたが100°C, 15分加熱するとそれらは完全に失活した。このことより腫瘍細胞に存在する血小板凝集物質は細胞膜に結合した非コラーゲン性の蛋白であると考えられた。また膜片を超音波破壊することにより活性が消失したことから、凝集物質の活性発現にはこれが膜に固定された状態で存在する必要があると考えられた。さらに HMV-1細胞は0.38% クエン酸ナトリウム加 PRPを用いると凝集は全く認めなかったが、10 mM CaCl₂ または 20 mM MgCl₂ を添加することにより凝集能を回復した。このことから腫瘍細胞の血小板凝集には Ca²⁺ や Mg²⁺ などの2価イオンの存在が必須と考えられる。

次に腫瘍細胞膜蛋白を¹²⁵I 標識した後可溶化し、これを血小板とインクベートして血小板と特異的に結合する膜蛋白を SDS-PAGE, Autoradiography により調べた。図1はその結果であるが No. 1, 2はそれぞれ HMV-1, M 7609 の膜蛋白のオートラジオグラムである。いずれも分子量10,000~100,000の間に多数のバンドを認めた。それに対し No. 3, 4は HMV-1, M 7609 細胞の膜蛋白のうちで血小板に結合したもののオートラジオグラムであるが、分子量1~2万の部位にバンドを認めた。このことから血小板凝集物質の本態は、分子量1~2万の膜蛋白である可能性が指摘された。

文 献

- 1) Gasic, G., Gasic, T., Galant, V., Johnson, T. and Murphy, S.: Platelet-tumor cell interactions in mice. The role of platelets in the spread of malignant disease. J. Int.

Fig. 1 Autoradiogram of SDS-PAGE of platelet aggregating substances

- 1, 2: Cell membrane proteins
- 3, 4: Cell membrane proteins specifically bound to platelets

Cancer, 11; 704~718, 1973.

- 2) 茂木良弘, 新津洋司郎, 小野寺義光, 石垣聖史, 高後裕, 漆崎一朗: ヒト癌細胞の血小板凝集と血小板由来増殖因子の腫瘍細胞におよぼす作用. 血液と脈管, 12; 604~606, 1981.
- 3) 石井 徹, 他: 悪性腫瘍細胞による血小板凝集作用とその本態に関する研究. 第40回日本癌学会総会記事, p. 362, 1981.
- 4) Hubbard, A.L. and Cohn, Z.A.: The enzymatic iodination of the red cell membrane. J. Cell Biol., 55; 390~405, 1975.