<短 報>

Invasion chamber を用いた培養肝細胞癌の転移と浸潤能に関する検討

岡本 毅* 東 俊宏* 木村 嘉宏* 塩田 哲也*
 佐藤 泰正* 桑原 直昭* 大澤 俊哉* 森井 和彦*
 真鍋 良二* 佐藤 二郎** 辻 孝夫*

癌細胞の浸潤能の *In vitro* 定量法として Kleinman らはマウス EHS 腫瘍から作成した再構築基底膜ゲル (MATRIGEL™, Collaborate Res., Inc.) を用いた¹⁾. この実験系での浸潤能は *In vivo* での転移能と関連することがマウスメラノーマを中心に明らかにされている²⁾. 今回、我々はこの方法を用いてヒト培養肝細胞癌株 (HuH-7, PLC/PRF/5) の転移・浸潤能を検討した.

対象と方法: 再構築基底膜ゲルで被覆したケモタキスフィルター (pore size 13 μ m) を invasion chamber にセットし, chamber 上室に癌細胞浮遊液, 下室にヒト線維芽細胞株 MRC-5 の培養上清を化学遊走刺激物質 (chemoattractant) として用いた. 培養開始24時間後にフィルターを取り出し, フィルター上面の基底膜ゲルと細胞を取り除き, フィルターをエタノール固定した後 H-E 染色し, フィルター下面の細胞を顕微鏡下に観察した. なおフィルター上面を被覆する基底膜ゲル量は正常細胞が通過できない50 μ g 以上とし, 播種癌細胞数は 2×10^5 個, 上室の癌細胞浮遊液量は0.2ml, 下室の MRC-5 培養上清量も0.2ml とした. 培養液は10%牛胎児血清含有 DME 培地を使用した. また培養上清中のタイプIVコラーゲン分解酵素活性は既報の方法で測定した³⁾.

結果: フィルター上面の再構築基底膜ゲル量を50 μ g にして24時間後に観察したが, 培養肝細胞癌細胞は再構築基底膜ゲルを通過することはできなかった. 基底膜ゲル通過能があると報告されているマウスメラノーマ株 B16²⁾は, 今回の実験で再構築基底膜ゲル100 μ g の条件でも通過能が確認された. さらに再構築基底膜ゲルを厚さ10mm として B16細胞を播種し, 5日目に垂直方向の浸潤形態を観察したところ, 再構築基底膜ゲルを溶解しながら浸潤する像が認められた. そこで肝細胞癌株浮遊液に B16培養上清を添加し, 再構築基底膜ゲル量100 μ g の条件で24時間後に観察したところ,

Fig. 1 Invasion assay of HuH-7 cells by using chemotaxis chamber with Matrigel coated filter. A: None of HuH-7 cells were observed on the underside of the chemotaxis filter (HE, $\times 200$). Fifty μ g of gel was coated on the filter, and cells were cultured for 24 hrs. B: Invasion of HuH-7 cells were recognized on the underside of the chemotaxis filter by adding 200 μ l of B16 mouse melanoma culture medium (HE, $\times 400$). A hundred μ g of the same gel was used, and cells were cultured for 24 hrs.

Table 1 Type IV collagen-degrading enzyme activity in the culture medium

Cell line	+ APMA	- APMA
B16(1)*	6.0(mU)	2.9(mU)
B16	10.5	0
HuH-7	0	0
PLC/PRF/5	1.2	0.9

1U=1 μ g collagen degraded per min per ml.

*: Selected cell line. Medium: DME+10%FCS.

APMA: 4-aminophenylmercuric acetate

ろ, フィルター下面に多数の癌細胞が観察された (Fig. 1).

各培養上清中のタイプIVコラーゲン分解酵素活性は肝細胞癌株よりも B16株において有意に高値を認め

* 岡山大学第1内科

** 岡山大学癌源病理

た。しかし、その酵素活性は APMA)4-aminophenyl-mercuric acetate) 添加により活性化される非活性型が主体であった。また、基底膜ゲルを通過した B16細胞を回収して得られた selected cell line の培養上清では活性型が一部認められた (Table 1)。

考案：今回使用した再構築基底膜ゲルはタイプIVコラーゲン、ラミニン、フィブロネクチン、硫酸ヘパリン、プロテオグリカン等の血管基底膜の主成分から構成されている。浸潤能を有する癌細胞は再構築基底ゲルを浸潤溶解し、さらに基底膜ゲル下のフィルターの孔を通り抜けてフィルター下面に到達する。基底膜への細胞浸潤は転移を形成する多段階過程において重大な過程である。この実験系は腫瘍細胞の細胞外マトリックスに対する接着、崩壊、化学誘導物質に向かう移動力を計測している。門脈浸潤を伴う肝細胞癌のタイプIVコラーゲン分解酵素活性は亢進しているといわれている。今回の我々の検討でも培養上清中のタイプ

IVコラーゲン分解酵素活性はヒト肝細胞癌株より B16株において高値を示し、基底膜ゲル浸潤能と相関した。しかし、その酵素活性は APMA 添加により活性化される非活性型が主体であった。このことより、ヒト肝細胞癌株の基底膜ゲル通過能を促進させたマウスメラノーマ B16株培養上清中にはタイプIVコラーゲン分解酵素以外の浸潤能促進因子が分泌されている可能性を示唆する。今後この因子の解析が肝細胞癌の転移機構の解析やその阻止にきわめて重要と考えられた。

索引用語：invasion chamber, 培養肝細胞癌, マウスメラノーマ株 (B16)。

文 献：1) Kleinman HK, et al: Biochemistry 25: 312—318, 1986 2) Albini A, et al: Cancer Res 47: 3239—3245, 1987 3) Nakatsukasa H, et al: Acta Med Okayama 40: 83—91, 1986

In vitro invasive potential analysis of human hepatoma cell lines

Tsuyoshi OKAMOTO*, Toshihiro HIGASHI*, Yoshihiro KIMURA*, Tetsuya SHIOTA*,
Yasumasa SATO*, Naoaki KUWAHARA*, Toshiya OSAWA*,
Jiro SATO** and Takao TSUJI*

* The First Department of Internal Medicine, Okayama University Medical School (Okayama)

** Division of Pathology, Cancer Institute, Okayama University Medical School (Okayama)