＜原 著＞

肝癌細胞の浸潤・増殖と urokinase type plasminogen activator

神山 俊哉*

要 旨：癌が浸潤・転移するには基底膜，細胞外マトリックスの破壊が重要であり，urokinase type plasminogen activator (u-PA) との関係が注目されている。ヒト肝癌細胞株 HLE, HLF, HC-4 を用い肝癌細胞の浸潤，増殖に対する u-PA の影響を実験的に検討した。u-PA の産生能はそれぞれ $603.0 \pm 7.9 \text{ ng/ml/}10^6$ 個， $356.7 \pm 10.1 \text{ ng/ml/}10^6$ 個， $0 \text{ ng/ml/}10^6$ 個であった。いずれの増殖サイクルでも HLE, HLF, HC-4 の順に細胞あたりの u-PA 産生能は高値を示した。浸潤能を Matrigel で被覆した Transwell を用い，MTT 法で測定すると，Invasion Index (%) は HLE, HLF, HC-4 ではそれぞれ $30.1 \pm 9.5\%$ ， $18.8 \pm 0.9\%$ ， $11.0 \pm 2.5\%$ であり，u-PA の産生能に相関した。HLF, HC-4 では two chain u-PA を添加したところ，低濃度 ($0.5 \mu\text{g/ml}$) から Invasion Index が上昇した。増殖能は $5.0 \mu\text{g/ml}$ の添加により HLF, HC-4 で抑制された。浸潤能に u-PA が関与していることが示唆され，u-PA 低産生性細胞株の増殖には抑制的に作用した。

索引用語： u-PA 肝癌細胞株 浸潤 増殖

はじめに

癌の転移には，基底膜，細胞外マトリックスの破壊が一つの重要なステップであり，urokinase type plasminogen activator (u-PA) との関係が注目されている¹⁾。u-PA は serine protease のひとつであり，乳癌，大腸癌など各種癌細胞から分泌され¹⁾，plasminogen を plasmin に変換し，IV型コラーゲナーゼの活性化を介して基底膜，細胞外マトリックスを破壊するとされている²⁾。

免疫組織学的染色と病理組織学的所見の比較検討から u-PA が胃癌の進展，悪性度を反映する指標となること^{3,4)}，腫瘍組織中 u-PA 活性が臨床的悪性度と相関すると報告されている^{4,5)}。また，in vitro でも培養細胞の u-PA 産生が浸潤に欠くことができない要因であるとされている⁶⁾。

u-PA は構造的に G ドメイン，K ドメイン，P ドメインの 3 個のドメイン構造からなり，G ドメインは EGF と高いホモロジーを示すためそれ自体細胞増殖作用を有することも報告されている⁷⁾。

肝細胞癌は著明に血管が増生し，高頻度に血管に浸潤する性格を持ち⁸⁾，被膜浸潤，門脈腫瘍栓を持つもの

は予後不良である⁹⁾。肝細胞癌が周囲へ浸潤発育し，血管へ侵襲する際に血中 IV 型コラーゲン濃度が上昇すること¹⁰⁾，また，肝細胞癌患者の血中 u-PA が高値を示すことが知られており¹¹⁾，プロテアーゼ，u-PA の関与が推察される。肝細胞癌の浸潤，増殖と u-PA との関係を解明する一過程として，今回，in vitro で肝癌細胞株を用いて u-PA の産生能と浸潤，増殖がいかなる関係を持つか検討した。

材料と方法

1. 肝癌細胞株の培養

肝癌細胞株としては北海道大学医学部第一外科学教室で樹立した HC-4 と理化学研究所ジーンバンクから購入した HLE, HLF を使用した。培養には 10% FCS 加 RPMI1640 を用い， 37°C ， $5\%\text{CO}_2$ で培養した。

2. 培養上清

各肝癌細胞株を 75cm^2 のフラスコ (FALCON3024) に播種，単層培養し confluent になったあと，PBS で 3 回洗浄後，無血清条件で 48 時間培養した。培養上清を採取し $1,500\text{rpm}$ ，5 分間遠沈し細胞成分を除去後測定試料とした。同時にフラスコ内の細胞をトリパンブルー染色し生細胞数を計測した。

Toshiya KAMIYAMA*

*北海道大学第 1 外科

＜受付日 1995 年 3 月 3 日＞

3. u-PA, tissue type plasminogen activator (t-PA), plasminogen activator inhibitor-1, 2 (PAI-1, 2) の測定

u-PA, PAI-1, PAI-2はBiopool社 Tint Elize Kitを用いて測定した。t-PAはBiopool社 Immurize t-PA Kitを用いた。

4. 細胞増殖に伴う培養液中u-PA, t-PA, PAI-1, PAI-2濃度の変動

24マルチウエルプレート (FALCON 3047) を用いた。酵素混合液 (DNase 20mg/l, pronase 500mg/l, collagenase 200mg/ml, Hanks 9.6g/l) でプラスチックから細胞を遊離させ、単離した後10%FCS加RPMI1640で3回洗浄した。10%FCS加RPMI1640に浮遊させ 1×10^5 個/ml に調整後、1ウエルにつき細胞浮遊液各1mlを入れた。1, 2, 3, 4, 5, 6日後にトリパンブルー染色したあと、生細胞数を計測し増殖曲線を作成した。培養上清を採取し1,500rpm, 5分間遠沈し細胞成分を除去し測定試料とした。経過中、培養液の交換は行わなかった。

5. Invasion assays

Transwell (Costar, 6.6mm diameter, 8 μ m pore size)を使用した。laminin, type IV collagen, heparan sulfate, entactinを含む可溶性細胞外マトリックス (Matrigel) を冷却した無血清のRPMI1640に20倍に希釈溶解し、蛋白濃度が30 μ g/100 μ lとなるように調整した。この希釈溶液100 μ lをTranswellのフィルター被覆し、これをクリーンベンチ内でover night させ乾燥後使用した。

TranswellのUpper Compartmentに 2×10^5 個/ml に調整した細胞浮遊液を100 μ l, Lower Compartmentにはchemoattractantとしてfibronectin 20 μ g/mlを含む10% FCS加RPMI1640を600 μ lを入れ、37°C, 5%CO₂で培養した。3日間培養後、Upper, lower両CompartmentのMediumをそれぞれ100 μ l, 500 μ lのMTT溶液(0.4% MTT, 0.1M コハク酸ナトリウム)と交換し、3時間培養した。MTT溶液を破棄した後フィルター上面の非浸潤性細胞を綿棒で拭い、これをdimethylsulfoxide, 400 μ lに溶解しA液とした。フィルター下面およびTranswell下層内に落下した浸潤性細胞もdimethylsulfoxide, 400 μ lに溶解しB液とした。10分間micro test plate shakerで攪拌し測定試料とした。吸光度はEasy Readerで波長540nmを用い決定した。Invasion Index (I.I.)はB液の吸光度をA液の吸光度とB液の吸光度の和で割り、100を掛け%

で表した。

6. 外因性u-PAのMatrigel浸潤に対する影響

TranswellのUpper Compartment内へ酵素活性を有するtwo chain u-PA (ミドリ十字)を0.5 μ g/ml, 1.0 μ g/ml, 5.0 μ g/ml, 10.0 μ g/ml添加し、浸潤能への影響をInvasion assaysで検討した。

7. 外因性u-PAの細胞増殖に対する影響

24マルチウエルプレート (FALCON 3047) の1ウエルにつき 1×10^5 個/mlの10% FBS加RPMI1640の細胞浮遊液を1mlずつ入れた。24時間培養後two chain u-PAを5.0 μ g/ml含む1% FCS加RPMI1640と含まない1% FCS加RPMI1640に培養液を交換し、1, 2, 3, 4, 5日後にそれぞれの生細胞数を計測した。

測定値は平均値 $\pm$ S.D.で表し、多群間の有意差検定には一元配置分散分析とScheffeの多重比較を用いた。 $p < 0.05$ を有意とした。

結 果

1) 肝癌細胞株のu-PA, t-PA, PAI-1, PAI-2の産生能

無血清条件下の培養液中のu-PA濃度はHLE, HLF, HC-4で、それぞれ603.0 $\pm$ 7.9ng/ml/10⁶個, 356.7 $\pm$ 10.1ng/ml/10⁶個, 0ng/ml/10⁶個であった。t-PAは1.90 $\pm$ 0.78ng/ml/10⁶個, 2.03 $\pm$ 0.38ng/ml/10⁶個, 0ng/ml/10⁶個であった。HC-4ではu-PA, t-PAのいずれも検出されなかった。PAI-1はそれぞれ2,733.0 $\pm$ 72.3ng/ml/10⁶個, 1,378.3 $\pm$ 26.4ng/ μ l/10⁶個, 24.7 $\pm$ 8.1ng/ml/10⁶個であり、PAI-2は50.6 $\pm$ 2.5ng/ml/10⁶個, 10.6 $\pm$ 0.6ng/ml/10⁶個, 0ng/ml/10⁶個であった (Fig. 1)。u-PA, t-PA, PAI-1, PAI-2のいずれも一元分散分析にて有意差を認めた ($p < 0.0001$, $p = 0.0043$, $p < 0.0001$, $p < 0.0001$)。

2) 細胞増殖に伴う培養液中u-PA, t-PA, PAI-1, PAI-2濃度の変動

HLE, HLFではu-PAの濃度は遅延期から対数増殖期にかけて上昇した。HLEは定常期以降も上昇傾向が認められた。HLFは定常期前半は上昇したが後半は有意な上昇は認められなかった。HC-4ではu-PAの産生はなかった。t-PAもHLE, HLFでは対数増殖期にかけて上昇した。定常期以後はHLEはやや上昇した後、有意に低下した。HLFは有意ではないものの低下傾向を示した。HC-4ではt-PAの産生はなかった。PAI-1はHLEは遅延期以降上昇傾向を示した。HLFは3日目、4日目は有意な上昇はなかったが、定常期

Fig. 1 Antigen concentrations of u-PA (a), t-PA (b), PAI-1 (c), and PAI-2 (d) in conditioned media of HC-4, HLF, and HLE. *: $p < 0.01$

Fig. 2 Growth curves of hepatic cancer cell lines (a) and changes of u-PA (b), t-PA (c), and PAI-1 (d) antigen concentrations. *: $p < 0.01$, #: $p < 0.05$

以後も上昇した。HC-4は測定値は低値であったが定常期以降上昇した (Fig. 2)。各測定値をその時点の生細胞数で割り細胞数あたりの産生能を検討した。HLE, HLF では u-PA, PAI-1 は対数増殖期では一定であったが、定常期以後も細胞 1×10^3 個あたりの産生能は上昇した。HC-4は PAI-1 が 6 日目に上昇した。t-PA は HLE, HLF とも 2 日目以後細胞あたりの産生能はほぼ一定であった。PAI-2 は細胞数が少なかったためいずれの細胞株も測定限界以下であった。細胞あたりの

u-PA, PAI-1 の産生能はいずれの増殖サイクルでも HLE, HLF, HC-4 の順に有意に高値を示した。t-PA は HLE, HLF とも 2 日目以降ほぼ変化がなかったが、HLE の方が有意に高い産生能を示した (Fig. 3)。

3) Invasion assays

HLE, HLF, HC-4 の Invasion Index (I.I) は $30.1 \pm 9.5\%$, $18.8 \pm 0.9\%$, $11.0 \pm 2.5\%$ であり、一元分散分析で有意差を認めた ($p = 0.015$)。特に HLE, HC-4 間で有意差があった ($p < 0.05$)。HLE, HLF, HC-4 の順

Fig. 3 Changes of antigen concentrations per 10³ cells of u-PA (a), t-PA (b), and PAI-1 (c). *: p < 0.01, #: p < 0.05

Fig. 4 Invasion of Matrigel by HC-4, HLF, and HLE. Invasion Index (%) = I.I. was determined with MTT assay. Means $\pm$ SD of triplicate points are shown. **: p < 0.05

に Matrigel への浸潤能が強い傾向であり u-PA, PAI-I 産生能に相関していた (Fig. 4)。

4) 外因性 u-PA の Matrigel 浸潤に対する影響

HLE の I.I. は添加した two chain u-PA 濃度が 0.5 μ g/ml, 1.0 μ g/ml では無添加とほぼ同等であった。5.0 μ g/ml では $35.7 \pm 5.3\%$ とやや高値であったが、10.0 μ g/ml では逆に低下し各群間には有意差はなかった。HLF の I.I. は 0.5 μ g/ml から $33.7 \pm 1.75\%$ に上昇し、一元分散分析で有意差があった (p < 0.0001)。HC-4 で 0.5 μ g/ml, 1.0 μ g/ml で $16.8 \pm 4.97\%$, $21.6 \pm 2.03\%$ に上昇し、5.0 μ g/ml, 10.0 μ g/ml では無添加のものと変わらなかったが、一元分散分析では有意差が

あった (p = 0.0253) (Fig. 5)。

5) 外因性 u-PA の細胞増殖に対する影響

HLE では 1, 2 日目までは two chain u-PA 添加群, 無添加群で細胞数の差はなかったが, 3 日目で添加群が有意に多かった。しかし, 4 日目以降はその差はなくなった。一方, HC-4, HLF とも two chain u-PA 添加群が細胞増殖が抑制された。HLF は 1 日目から有意に増殖が抑制され, HC-4 は 3 日目から増殖が抑制され始め 4 日目以降有意に抑制された (Fig. 6)。

考 察

u-PA は分子量 55kDa の糖蛋白質であり, 3 個のドメイン構造からなる。G ドメインは EGF と高いホモロジーを有し, K ドメインはフィブリン, ヘパリンに結合する¹²⁾。P ドメインは serine protease と高いホモロジーを有し, レセプター結合部位が N-末端部位のサイトであるためレセプター結合 u-PA では細胞表面に露出している¹³⁾。そのため u-PA は plasminogen を plasmin に変え, IV 型コラーゲナーゼの活性化を介して細胞外マトリックス, 基底膜を破壊し, 癌細胞が周囲組織へ浸潤するのを促進する作用⁹⁾を持つほかに, 細胞表面に露出した u-PA 自身が protease として細胞外マトリックスの破壊に関わっており¹³⁾ 癌細胞の浸潤, 転移において重要な役割を果たしていると考えられている。

u-PA は乳癌, 大腸癌, 前立腺癌, 肺癌などの多くの悪性腫瘍から分泌され¹⁾, 浸潤に関係していることから腫瘍の悪性度の指標であるとされている。また, 胃

Fig. 5 Invasion Indices of HC-4 (a) and HLF (b) were increased with the addition of two chain u-PA from the concentration of $0.5\mu\text{g/ml}$ while I.I of HLE (c) was not increased. Invasion assay was performed with Transwells. Mean $\pm$ SD of triplicate points are shown. * $p<0.01$

Fig. 6 Response of HC-4, HLF, and HLE to exogenous two chain u-PA. 1ml of cell suspension ($1 \times 10^5 \text{ cells/ml}$) was seeded in Falcon 3047 in RPMI1640 containing 10% FCS. After 24hrs incubation, the medium was changed to RPMI1640 containing 1% FCS with $5.0\mu\text{g/ml}$ two chain u-PA. *: $p<0.01$, #: $p<0.05$

癌の免疫組織学的染色と病理組織学的所見の比較検討では u-PA が癌の進展、悪性度を反映する一指標となること^{3,4)}、乳癌、大腸癌などで腫瘍組織中 u-PA 活性が臨床的悪性度と相関することが報告されている^{4,5)}。

in vitro でも培養細胞の u-PA 産生能が浸潤能と強い関連性を持つとされているため⁶⁾、今回の実験で肝

癌細胞株 HLE, HLF, HC-4 の u-PA 産生能を検討した。48時間、無血清条件で HLE, HLF は u-PA を産生し、特に HLE は高い産生能を示したが、HC-4 は産生しなかった。また、いずれの増殖サイクルでも HLE, HLF, HC-4 の順に有意に細胞あたりの u-PA 産生能は高値を示した。

in vitro で癌細胞の浸潤能を評価する方法として、これまでさまざまな方法が試みられており、羊膜、角膜、膀胱などの組織が用いられてきた¹⁴⁾。しかし、最近では Transwell を用いた Matrigel 浸潤能が in vivo の細胞の浸潤能と相関すると考えられており¹⁵⁾、今回の実験でも本法を用いた。その結果 u-PA 高産生性の HLE は最も高い Matrigel 浸潤能を示した。それに対し、低産生性の HC-4 の浸潤能は低かった。HLF の u-PA 産生能は HLE、HC-4 の中間であり、浸潤能もちょうど中間であった。一方、u-PA 低産生性の HC-4 を用いた Invasion assay で upper compartment 内に酵素活性を有する two chain u-PA を添加したところ、低濃度 (0.5 μ g/ml, 1.0 μ g/ml) でも Matrigel 浸潤能は上昇した。u-PA 高産生性の HLE は u-PA の添加により浸潤能はわずかに上昇したのに比し、HLF は低濃度から浸潤能が明らかに上昇した。これは HLE はすでに自身の産生する u-PA によって高い浸潤能を持っているためと考えられた⁶⁾。これらの結果から in vitro では u-PA の産生能は肝癌細胞の浸潤能と密接な関係があると考えられた。

また、液相の free な u-PA に比べ、レセプターに結合した u-PA は強い酵素活性を有し、plasminogen の活性化効率が高いことから¹⁶⁾、悪性細胞の基底膜、細胞外マトリックスに関与している u-PA は主にレセプター結合 u-PA と考えられ、細胞表面のレセプター数も浸潤能を規定する因子とされている^{6,17)}。このため浸潤能を評価する際、u-PA 産生能だけでなく、今後、u-PA レセプター数も検討されなければならない課題である。

u-PA は EGF と高いホモロジーを持つ G ドメインを有するため EGF ファミリーと考えられ、それ自体細胞増殖効果を持つが、その作用は低く EGF の約 28% とされている⁷⁾。これらの文献的知見から u-PA の細胞増殖効果が低いため今回の実験において明らかな増殖効果を示さなかったと考えられた。一方、腫瘍内で u-PA 産生がみられない small cell carcinoma of the lung tissue (SCCL) では細胞周囲で fibrinolysis がなく抗血栓療法が増殖抑制に有効であることが示唆されている¹⁸⁾。in vitro で u-PA 産生が低い HC-4、HLF が u-PA 添加により増殖が抑制された原因は、これらの細胞はその阻害物質である PAI-1、PAI-2 の産生能も同時に低いため、過剰な u-PA の proteolysis により増殖抑制された可能性も含めて今後さらに検討する必要があると考えられた。

t-PA、PAI-1、PAI-2 も腫瘍から産生される¹⁹⁾。胃癌では t-PA は u-PA とは異なり組織学的進行度、壁浸潤とはむしろ「負」の相関を示すと報告されている³⁾。乳癌では癌組織中の t-PA が高い方が予後が良く、再発が少ないと報告されている⁵⁾。今回の実験では、t-PA は Matrigel 浸潤能と明らかな相関を認めなかった。また、u-PA の inhibitor であるにもかかわらず PAI-1 は乳癌では癌組織中濃度とその悪性度が相関するとの報告がある²⁰⁾。今回の実験でも PAI-1 産生能と浸潤能はよく相関した。しかし、腫瘍が産生すると t-PA、PAI-1、および PAI-2 と in vitro の浸潤能との関係に関しては明確な報告はなく今後の検討が必要であると考えられた。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました内野純一教授に深甚なる謝意を捧げるとともに北海道大学第 1 外科の諸先生方に深謝いたします。

文 献

- 1) Markus G, Camiolo S, Kohga S, et al: Plasminogen activator secretion of human tumors in short-term organ culture, including as comparison of primary and metastatic colon tumors. *Cancer Res* 43: 5517—5525, 1983
- 2) Kohga S, Harvey SR, Weaven SR, et al: Localization of plasminogen activators in human colon cancers by immunoperoxidase staining. *Cancer Res* 45: 1787—1796, 1991
- 3) Maeda K, Chung Y, Sawada T, et al: Immunohistochemical analysis of plasminogen activators in gastric carcinoma. *Jpn J Gastroenterol Surg* 27: 1015—1020, 1994
- 4) Nishio N, Nakamura M, Aoki K, et al: The role of plasminogen activator for metastasis in cancer of digestive organs. *Jpn J Gastroenterol Surg* 24: 1096—1100, 1991
- 5) Shiba E, Kobayashi T, Yayoi E, et al: Measurement of plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor in breast cancer tissue: Preliminary report. *J Jpn Surg Soc* 93: 109, 1992
- 6) Hoosein N, Boyd D, Hollas W, et al: Involvement of Urokinase and its receptor in the invasiveness of human prostatic carcinoma cell lines. *Cancer Commun* 3: 255—264, 1991
- 7) Kirchheimer JC, Wojta J, Christ G, et al: Proliferation of a human epidermal tumor cell line stimulated by urokinase. *FASEB J* 1: 125—128, 1987

- 8) Edmondson HA: Tumors of the liver and intrahepatic bile duct. Armed Forces Institute of Pathology, Washinton, 1958, p32—104
- 9) 山本 宏, 山本義一, 竜 宗正, 他: 肝細胞癌切除例の残肝再発に関する検討. 日消外会誌 22: 72—78, 1989
- 10) Obata K, Iwata K, Ichida T, et al: One step sandwich enzyme immunoassay for human type IV collagen using monoclonal antibodies. Clinica Chimica Acta 181: 293—304, 1989
- 11) Kirchheimer JC, Huber K, Polterauer P, et al: Urokinase antigen in plasma of patients with liver cirrhosis and hepatoma. Thromb Haemost 54: 617—618, 1985
- 12) Haber E, Quertermous T, Matsueda GR, et al: Innovative approaches to plasminogen activator therapy. Science 243: 51—56, 1989
- 13) 高橋 敬: ウロキナーゼと受容体. 医学のあゆみ 160: 654—659, 1992
- 14) Terranova VP, Hujanen ES, Martin GR: Basement membrane and the invasive activity of metastatic tumor cells. J Natl Cancer Inst 77: 311—316, 1986
- 15) Albini A, Iwamoto Y, Kleiman HK, et al: A rapid in vitro assay for quantitating the invasive potential of tumor cells. Cancer Res 47: 3239—3245, 1987
- 16) Ellis V, Behrendt N, Danø K: Plasminogen activation by receptor-bound urokinase: A kinetic study with both cell-associated and isolated receptors. J Biol Chem 266: 12752—12758, 1991
- 17) Schlechte W, Brattain M, Boyd D: Invasion of extracellular matrix by cultured colon cancer cell lines: Dependence on urokinase receptor display. Cancer Commun 2: 173—179, 1990
- 18) Wojtukiewicz MZ, Zacharski LR, Memoli VA: Abnormal regulation of coagulation/fibrinolysis in small cell carcinoma of the lung. Cancer 65: 481—485, 1990
- 19) Laug WE, Wang K, Mundi R, et al: Clonal variation of expression of the genes coding for plasminogen activators, their inhibitors and the urokinase receptor in HT1080 sarcoma cells. Int J Cancer 52: 298—304, 1992
- 20) 芝 英一, 金 昇晋, 田口哲也, 他: 乳癌の新しい予後因子—乳癌組織中のプロテアーゼとそのインヒビター. 日癌治 29: 1141, 1994

A role of urokinase type plasminogen activator (u-PA) in invasion and growth of hepatocellular cancer cells, in vitro

Toshiya KAMIYAMA*

Urokinase type plasminogen activator (u-PA) plays a crucial role in the invasion and metastasis of cancer cells. We investigated the role of u-PA in invasion and proliferation of human hepatocellular cancer cell in vitro using human hepatocellular cancer cell lines; HLE, HLF, and HC-4. u-PA antigen concentration in the culture media of these cells were 603.0 ± 7.9 , 356.7 ± 10.1 , and $0 \text{ ng/ml}/10^6 \text{ cells}/48 \text{ hrs}$ respectively. The invasive activity of these cell lines was evaluated in vitro using Transwells, filters of which were coated with extracellular matrix (Matrigel). Invasion Index (%)=I.I was determined with MTT assay. I.Is of HLE, HLF, and HC-4 cells were 30.1 ± 9.5 , 18.8 ± 0.9 , and $11.0 \pm 2.5\%$ respectively, which linked to the secreted amount of u-PA. I.Is of HC-4 and HLF increased when two chain u-PA ($0.5 \mu\text{g/ml}$) was added. The proliferation of these cell lines was inhibited by addition of two chain u-PA ($5.0 \mu\text{g/ml}$). These data suggest that u-PA plays an important role in invasion of hepatocellular cancer cell lines, and inhibits proliferation of cell lines which have low production of u-PA.

* The First Department of Surgery, Hokkaido University School of Medicine (Sapporo)