培養骨肉腫細胞の matrix metalloproteinase (MMP) 活性と培養条件によるその変動について

宗像水光会総合病院整形外科

南 谷 和 仁

久留米大学整形外科

小 宮 節 郎・井 上 明 生

同 第2病理

笹 栗 靖 之・森 松 稔

Effect of Cell Culture Conditions on Secretion of Matrix Metalloproteinases from Cultured Osteosarcoma Cells

by

Kazuhito Minamitani

Department of Orthopaedic Surgery,
Munakata Suikokai General Hospital

Setsuro Komiya and Akio Inoue

Department of Orthopaedic Surgery,
Faculty of Medicine, Kurume University, Kurume Japan

Yasuyuki Sasaguri and Minoru Morimatsu

Department of Pathology, Faculty of
Medicine, Kurume University, Kurume Japan

Secretion of matrix metalloproteinase (MMP) from human osteosarcoma cells was affected by culture conditions.

Analyzing the conditioned medium using SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), the cells were shown to secrete MMP-2 with an Mr of 72 KDa. When the cells were treated with interleukin-1 (IL-1) they secreted MMP-3 with an Mr of 57 KDa. When cultured in a type I collagen-coated or a gelatin-coated dish, MMP-1 was detected in both culture mediums, although more was found the gelatin coated dish. Analysis by SDS-PAGE containing gelatin, revealed gelatinolytic activities with an Mr of 72 KDa and 66 KDa in the conditioned medium from cells in the standard dish.

When heated with IL-1, these activities covered a wide spectrum. Gelatinolytic activities were most detected in the type I collagen-coated dish. Considering the differences seen in MMPs and gelatinolytic activities, secretion of MMPs appears to be modulated by in vivo factors.

は じ め に

腫瘍細胞の局所骨破壊や遠隔転移の過程においては細胞外マトリックスを破壊する酵素が関与すると考えられており、中でも matrix metalloproteinase (MMP) が重要と考えられている。われわれが樹立

したヒト骨肉腫培養細胞においても MMP-2 および MMP-3 が産生され、強い gelatinase 活性が認められることは既に報告した²⁾。今回、その培養条件を変化させることによって、産生される MMP に差異が認められたので報告する。

方 法

当科で樹立、継代維持しているヒト骨肉腫培養細胞株は14歳女児の大腿骨に発生した骨硬化型骨肉腫に由来しているものであるが¹⁾、20~30代の培養細胞を以下の実験に使用した。この骨肉腫細胞を、通常のシャーレ、type I collagenでcoatingされたシャーレ、gelatinでcoatingされたシャーレの3種類のシャーレについて、それぞれ約 5×10^5 個の細胞群をつくり、無血清DMEM培地2ml、および、それにinterleukin-1 β (IL-1 β) 10 ng/mlを添加した培地で2日間培養(37°C, 5%CO₂)して培養上清液を得た。

この培養上清液について、SDS polyacryl-amide-gelによる電気泳動(SDS-PAGE)を施行し、nitrocellulose paperに転写した後にMMP-1 (collagenase), MMP-2 (gelatinase), MMP-3 (stromelysin) に対するモノクローナル抗体⁶⁾を使用して免疫染色を施行し、検出されるMMPについて検討した。また、0.3 mg/mlのgelatinを共重合させた substrate gelを作成し、gelatinase 活性について検討した。これは、培養上清液を電気泳動を施行した後に、10 mM CaCl₂, 5 μ M ZnCl₂を含むTris-HCl Bufferにて5日間、室温でincubationしたものであるが、gelatinase 活性はcoomassie brilliant blueで染色されないbandとして同定される。

結 果

通常のシャーレ、type I collagenでcoatingされたシャーレ、gelatinでcoatingされたシャーレの3種類のシャーレを使用して骨肉腫細胞を培養し、倒立顕微鏡で比較したものでは、形態的差異は認めなかった。

これまでの実験で、通常のシャーレの培養上清液のSDS-PAGEによるimmunoblottingでは、約72 KDにMMP-2のbandが認められ、IL-1の添加により約57 KDにMMP-3のbandが認められている²⁾。このMMPsについて、まず、IL-1非添加時の培養上清液のMMP-2を3種類のシャーレで比較してみたが、bandは同様の強さで認められた(図1)。つぎに、これをIL-1添加時の培養上清液で比較すると、約72 KDのMMP-2のbandはgelatin coatingの培養上清液において最も強く認められ、約57

KDのMMP-3のbandはgelatin coatingのシャーレ、type I collagen coatingのシャーレ、通常のシャーレの培養上清液の順で濃染するbandとして認められた(図2)。そのIL-1添加時の培養上清液のSDS-PAGEについて、MMP-1の抗体を使用して免疫染色したものでは、type I collagen coating、特にgelatin coatingの培養上清液においては、MMP-1も増強して検出された(図3)。

Gelatinase 活性をgelatinを共重合させた substrate gelで検討したものでは、通常のシャーレの培養上清液において、IL-1非添加時に約72 KDと約

図1 IL-1非添加時のMMP-2の抗体を使用したSDS-PAGE (S:通常のシャーレ, C: type I collagenでcoatingされたシャーレ, G: gelatinでcoatingされたシャーレ)。MMP-2のbandは同様に認められた。

図2 IL-1添加時のMMP-2の抗体を使用したSDS-PAGE (S, C, Gは図1と同じ)。約72 KDのMMP-2のbandはGにおいて、最も強く認められる。またMMP-3のbandは、G, C, Sの順で濃染するbandとして認められる。

図3 IL-1添加時のMMP-1の抗体を使用したSDS-PAGE (S, C, Gは図1と同じ). C, 特にGの培養上液においては, MMP-1も増強して検出された.

図4 IL-1の添加時のgelatinase活性 (S, C, Gは図1と同じ). Cにおいて最も強く幅広いgelatinase活性が確認された. また, Gにおいては約57 KD以下の幅広いgelatinase活性は確認困難であった.

66 KDに活性が認められ, IL-1添加により, 約40 KDまでの幅広いgelatinase活性が認められている²⁾. このgelatinase活性をIL-1添加時の培養上清液について3種類のシャーレで比較すると, type I collagen coatingの培養上清液においては最も強く幅広いgelatinase活性が確認されたが, gelatin coatingの培養上清液においては約57 KD以下の幅広いgelatinase活性は確認困難であった(図4).

考 察

腫瘍細胞の局所浸潤や遠隔転移においては基底膜を含めた細胞外マトリックスを破壊する酵素が重要とされ, 特にtype IV collagenを分解するMMP-2は転移能との相関性を指摘する報告が多い^{4) 5) 7)}. 当科で樹立, 継代しているヒトの悪性骨腫瘍細胞についての検討でも, 高転移性骨肉腫細胞は低転移性の細胞に比較して多量のMMPを産生し, 幅広い分子量のゼラチン分解酵素を有していることを確認しており, 悪性度との相関性を支持するものと考えている³⁾. 今回, その高転移性骨肉腫細胞を培養するシャーレを変化させることにより, 産生されるMMPやgelatinase活性にも変化が生じることが確認された. MMPの産生分泌は各種のサイトカインや成長因子により調節されており, IL-1, TNF- α (tumornecrosis factor α), TGF β (transforming growth factor β) などが知られているが, 今回の実験は骨肉腫培養細胞の産生するMMPsが細胞の培養環境によっても変動することを示すものである. このメカニズムについては不明であるが, coatingされたtype I collagenやgelatinがMMPの産生を刺激していると考えられ, 腫瘍細胞の局所浸潤, 破壊においても, その環境が破壊酵素の産生に影響している可能性が示唆される. しかし, gelatinでcoatingされたシャーレの培養上清液においてMMP-1, 2, 3のbandは最も強く認められるもgelatinase活性はさほど認められず, type I collagenでcoatingされたシャーレの培養上清液においてはMMP-1のbandはさほど認められずにgelatinase活性が最も強く認められており, 今後検討する必要があると考えている.

結 語

①骨肉腫培養細胞において産生されるMMPsは, その培養条件を変化させることによって差異が認められた.

②Gelatinでcoatingされたシャーレの培養上清液において, 最も強いMMP-2およびMMP-3の産生が確認された.

③Type I collagenでcoatingされたシャーレ, 特にGelatinでcoatingされたシャーレの培養上清液においては, IL-1添加時に, MMP-1が増強して

検出された。

④ Type I collagen で coating されたシャーレの培養上清液において、Gelatinase 活性は最も強く認められた。

(この研究の一部は科研費 02670671 による)

文 献

- 1) 小宮節郎, 南谷和仁, 笹栗靖之, 他: 当科で樹立された骨肉腫培養細胞株について. 整形外科と災害外科, 39: 594-597, 1990.
- 2) 南谷和仁, 小宮節郎, 笹栗靖之, 他: 骨肉腫細胞のコラーゲナーゼ産生能について. 整形外科と災害外科, 39: 590-593, 1990.
- 3) 南谷和仁, 小宮節郎, 笹栗靖之, 他: 悪性骨腫瘍細胞の産生するマトロプロティナーゼ. 日整会誌, 64: S 1128, 1990.
- 4) Morikawa K., walker S.M., Nakajima M. et al.: Infuence of organ environment on growth, selection, and metastasis of human colon carcinoma in nude mice. Cancer Res., 48: 6863-6871, 1988.
- 5) Nakajima M., Welch D.R., Belloni P.N. et al.: Degradation of basement membrane type collagen and lung subendothelial matrix by rat mammary adeno carcinoma cell clones of differing metastatic potentials. Cancer Res., 47: 4869-4876, 1987.
- 6) Okada Y., Nagase H., Harris ED Jr.: Ametalloproteinase from human rhumatoid synovioblasts that digests connective tissue matrix components. Purification and characterization. J. Biol. Chem., 261: 14245-14255, 1986.
- 7) Yamagata S., Ito Y., Tanaka R. et al.: Gelati-

nases of metastasic cell lines of murine colonic carcinoma as detected by substrate-gel electrophoresis. Biochem. Biophys. Res. Commun. 151: 158-162, 1988.

質 問

九州大学 岩本 幸英

①転移の研究においては、常に生体の状況を反映したモデル作製が必要である。type I collagen 上の MMP は間質に対する反応という意味で理解できるが、Gelatin に対する MMP はいかなる状況を想定して測定したのですか？

②Gelatin に出会った時よりもむしろ、type I collagen に出会った時に Gelatinase 活性が高いという事実を、生物学的にどう理解するか？

解 答

宗像水光会総合病院 南谷 和仁

①培養環境を変化させることによる MMP の変動を検討する目的で組んだ実験系であり、生体の状況と直接結びつけて考えることはできないが、Gelatin の使用も培養環境を変化させるという意味では意義のあるものと考えております。

②抗体によって検出される MMP は Gelatin に出会った時に最も強く認められていますが、type I collagen に出会った時には、抗体ではとらえられない Gelatinase 活性 (活性型 MMP?) が強く認められます。その意義に関しては今後の検討課題と考えております。