転移の分子機構： 基底膜成分による腫瘍細胞の運動能促進

九州大学整形外科教室

岩 本 幸 英・中 馬 広 一
奥 山 清 隆・田 仲 和 宏
小 田 義 直・杉 岡 洋 一

九州大学生体防御医学研究所細胞学部門

谷 口 俊一郎

Basement Membrane Components Facilitate the Locomotion of Human Fibrosarcoma Cells

by

Yukihide Iwamoto, Hirokazu Chuman, Kiyotaka Okuyama,
Kazuhiro Tanaka, Yoshinao Oda and Yoichi Sugioka

Department of Orthopaedic Surgery,
Faculty of Medicine, Kyusyu University, Fukuoka

Shun'ichiro Taniguchi

Department of Experimental Cell Research,
Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University, Fukuoka

Observations on malignant tumors both in vivo and in vitro suggest that basement membrane represent critical barriers against the metastasis of tumor cells. In the present study, we have investigated the effect of basement membrane components on the locomotion of HT1080 human fibrosarcoma cells. Basement membrane extracts facilitated the locomotive activity of HT1080 cells both in the chemotaxis and cell motility assays. These results suggest that while the basement membrane works against the metastasis of tumor cells, it may also facilitate the metastatic potential of tumor cells.

Key words: basement membrane(基底膜), invasion(浸潤), locomotion(運動), human fibrosarcoma cells (ヒト線維肉腫細胞)

はじめに

悪性骨軟部腫瘍患者の死因の多くは遠隔転移であり、将来的に生命的予後を改善するためには新しい遠隔転移のコントロールの方法を見出す必要がある。そのためには、何が転移を規定している因子か、という転移の分子機構を解明することが必要である。悪性腫瘍の転移は、原発巣からの遊離、血管内への侵入、

血中での免疫細胞や血流による殺細胞効果に対する抵抗、血中から標的臓器内への侵入、増殖といった多段階のステップをへて完成される。われわれは、原発巣から血管内への侵入、血中から標的臓器実質方向への侵入の二段階で、転移する悪性腫瘍細胞はバリエーである内皮細胞下の基底膜を浸潤、貫通することが必須であることに目を向け、基底膜浸潤の分子機構に関する研究を行なっている。この基底膜浸潤はさらに、1)

腫瘍細胞の基底膜内糖蛋白 laminin への接着, 2) 腫瘍細胞からの type IV collagenase 放出による基底膜の酵素的破壊, 3) 転移の標的臓器の実質方向への腫瘍細胞の基底膜内の運動, という3つのプロセスに細分することができる²⁾。

今回われわれは, バリヤーである基底膜の構成成分が悪性腫瘍細胞の基底膜浸潤に必要な1つの形質である運動能を促進するという実験結果を得たので, 報告する。

材料および方法

Matrigel および Laminin の調整

基底膜成分より成る細胞外基質を多量に産生することが知られているマウス EHS tumor を材料として, 基底膜抽出物 (matrigel) を作製した³⁾。この matrigel の中には, 基底膜の構成成分である type IV collagen, laminin, HS-proteoglycan, entactin が含まれていることが証明されている。基底膜内の糖蛋白である laminin も同様に, EHS tumor より分離, 精製した⁴⁾。

細胞

ヒト線維肉腫の転移巣より分離樹立された細胞株である HT1080 cell⁵⁾, およびヒト線維芽細胞株 MRC-5⁶⁾は American Type Culture Collection より購入した。各々の細胞は, 5% CO₂下で, 10% fetal calf serum (FCS) を含む Dulbecco's minimal essential medium (DMEM) 中で培養し, 実験に供した。

In vitro invasion assay (図1)

この in vitro invasion assay は, われわれが基底膜浸潤の分子機構の解明のために考案, 開発したものである⁷⁾⁸⁾。polycarbonate filter (13 μm pore size, Nucleopore, Pleasanton, CA, USA) を 50 μg の matrigel でコートし, Boyden chamber にセットする。NIH 3T3 cell より得られた conditioned medium 0.2 ml を chamber の下室に chemoattractant として, HT1080 cell あるいは MRC-5 cell を 0.1% BSA を含む DMEM 中に浮遊させたもの (3 × 10⁵ cells/ml) を 0.8 ml, chamber の上室に入れ, 5% CO₂, 37°C の条件でインキュベーターの中で加温する。基底膜浸潤をもつ細胞は, フィルターにコートした基底膜を浸潤, 貫通し, フィルターの pore (穴) を通り抜け, フィルター裏面に到達するので, これを HE 染色すると, 鏡視下で, 浸潤を完了した細胞数をカウントすることにより, 浸潤能を定量化することが可能である。

Chemotaxis assay

polycarbonate filter (8 μm pore size, Nucleopore, Pleasanton, CA, USA) を type IV collagen (10 μg/filter) でコートし, Boyden chamber にセット, chamber の上室に細胞浮遊液 (3 × 10⁵ cells/ml, DMEM + 0.1% BSA 中) を 0.8 ml, 下室に種々の濃度の matrigel あるいは laminin を 0.1% BSA を含む DMEM に溶解したものを入れ, 37°C, 5% CO₂ の条件で5時間加温し, フィルター裏面に到達した細胞数をカウントした。この方法は, ある物質により惹起される運動性を測定するために, 普遍的に用いられる方法である⁹⁾。

Cell motility assay

cell motility を Tatsuka らの方法により測定した¹⁰⁾。HT1080 cell 10⁵個を matrigel (1.2 mg/dish), あるいは laminin (1.2 mg/dish) をコートした 8-well tissue culture dish (Falcon 社製) にまき, 10% FCS を含む DMEM 培養液にて培養した。12時間後, 運動能の測定を開始した。浜松ホトニクス の画像解析装置を用い, 細胞の顕微鏡画像の差 (ずれ) を 20 秒毎に求めた。更に5分間における細胞像のずれの和 (運動の軌跡及び細胞形態変化に対応) をコンピューター処理により, 輝度 (明るく輝く部分) として TV モニター上に抽出させると共に定量化した。定量化にあたっては, 細胞1個あたりの運動能の指標として, motility index¹⁰⁾を求めた。

Type IV collagenase assay

type IV collagenase の測定は, 本来 type I col-

図1 再構成基底膜 (matrigel) を用いた in vitro invasion assay.

Boyden chamber に matrigel をコートした有孔フィルターをセットし, 上室に細胞浮遊液, 下室に NIH3T3 cell の conditioned medium を入れ, 37°C で5時間加温する。基底膜浸潤能を有する細胞は, 基底膜を破り, フィルターの穴を通り抜け, フィルターの下面に到達するので, これを染色し, 鏡視下で細胞数を数えることにより, 浸潤能を定量化する。

図2 Chemotaxis assayの結果
HT1080 cell は, matrigel に対し, chemotactic response を示した。

図3 Cell motility assayの結果
HT1080 cell は, 何もコートしていない dish 上 (A) に比べ, matrigel をコートした dish 上 (B) では, 強い運動能を示した。明るく輝いている部分が, 細胞が動いた部分とその程度。

lagenase 測定のために開発された solid phase radioassay¹¹⁾を応用した。EHS tumor から分離, 精製した type IV collagen を Bolton-Hunter 法を用いて ¹²⁵I でラベルし, プレート (microtiter plate, Dynatech, USA) にコートする。次に, 先に述べた invasion assay の終了時点で Boyden chamber の上室より上清を静かに採取し, ¹²⁵I-labelled type IV collagen がコートしてあるプレートに添加し, 24 時間, 37°C でインキュベーターの中で加温した。破壊され遊出してきた ¹²⁵I-labelled type IV collagen の放射活性をシンチレーションカウンターで測定した。

結 果

In vitro invasion assay および Type IV collagenase assay

in vitro invasion assay および type IV collagenase assay の結果を表 1 に示した。ヒト線維肉腫の転移巣から確立された (即ちヒトで転移したことが証明済の) HT1080 cell は, 5 時間後には基底膜を多数, 浸潤, 貫通しており, 強い基底膜浸潤能が証明された。一方, 正常細胞であるヒト線維芽細胞 MRC-5 は全く浸潤しなかった。また, MRC-5 に比べ HT1080 cell は, 著しく強い type IV collagenase assay を示した。

Chemotaxis assay

HT1080 cell は, matrigel に対し, 100 μg/ml の濃度を頂点とする典型的なベル型のカーブを示し, matrigel に対し chemotactic response を示すことが証明された (図 2)。さらに, matrigel 中にも含まれている基底膜内の糖蛋白 laminin に対しても, 同様の 100 μg/ml を頂点とする chemotactic response を示し, matrigel による運動能の促進現象の本体は laminin であることが示唆された。HT1080 cell の matrigel および laminin に対する chemotactic response は, 更に checker board analysis⁹⁾を行なって, 再確認した。

Cell motility assay

TV モニターに抽出された assay の結果を図 3 に示した。輝度が運動及び形態変動の部位及び程度を示す。HT1080 cell は, 何も, コートしていない dish (対照群) 上ではほとんど運動を示さなかったが, matrigel 上では強い運動を示した。laminin をコートした dish 上でも同様に強い運動を示し, matrigel 中の laminin が運動能促進の主役だと考えられた。chemotaxis assay の結果同様, MRC-5 は matrigel および laminin に対しほとんど反応を示さなかった。さらに 1 個の細胞あたりの運動の軌跡を定量化した値である motility index を求め¹⁰⁾, matrigel, laminin による運動能促進を確認したところ, motility index は, 対象群 931, matrigel 群 1704, laminin 群 3042 であり matrigel, laminin で運動能が亢進していた。

考 察

基底膜は, 上皮細胞あるいは内皮細胞と間質の間, あるいは神経, 筋, 脂肪細胞の周囲に存在する薄いシ

表1 In Vitro Invasion Assay および Type IV Collagenase Assay の結果

	No. of Cells Invaded Field (200×) (Mean±SE, n=8)	Type IV Collagenase Activity (cpm×10 ³) (Mean±SE, n=8)
HT1080	28±2	9.6±0.2
MRC-5	0	1.2±0.1

ートであり、本来は高分子物質の通過に対するフィルター、胚発生における筋、末梢神経、上皮細胞の接着、増殖、分化促進などの機能をもっている。主な構成要素は、type IV collagen, laminin, fibronectin, heparan sulfate proteoglycan, nidogen であり、構築の軸である type IV collagen がネットワークを形成し、そこに他の構成要素が接着して、密なコード構造を形成している¹⁾²⁾。生体内の内皮細胞下にも、この基底膜が存在し腫瘍細胞の転移に対するバリエーになっている¹⁾²⁾。すなわち腫瘍細胞が転移しようとする時、原発巣から血管内への侵入、および転移の標的臓器の毛細血管に到達し、実質内へ侵入する時の2回のプロセスで内皮細胞下の基底膜を浸潤、貫通しなければならない。この基底膜浸潤という現象の転移における重要性は転移能のある悪性腫瘍細胞のみが基底膜を破壊することが病理学的に確認されている事実、また in vitro で基底膜浸潤を完成した悪性腫瘍細胞集団は、マウスに移植するときわめて高い転移能を示すという事実³⁾により裏付けられている。われわれは、将来の悪性骨軟部腫瘍の転移の撲滅のためにこの基底膜浸潤の分子機構の解明に焦点をしばった研究を進めてきた。まず実験モデルの作製が必要だと考え、Boyden chamber にバリエーである再構成基底膜をセットした in vitro invasion assay を開発した⁴⁾⁵⁾。この assay の結果は in vivo における転移能ときわめて強い相関を示し、基底膜浸潤能が腫瘍細胞の転移能を規定する大きな因子であることが再確認された⁶⁾⁷⁾。今回の検討結果でもヒト線維肉腫細胞 (HT1080 cell) は強い浸潤能を示したが、正常細胞であるヒト線維芽細胞 (MRC-5) は全く浸潤能を示さなかった (表1) さらに、invasion assay が終了した時点で Boyden chamber から上清を採取し type IV collagenase 活性を測定すると、HT1080 cell は MRC-5 に比べ著しい type IV collagenase 活性を示し、基底膜の構築の軸

である type IV collagen を破壊するための酵素の活性が細胞の基底膜浸潤能を規定している1つの因子だということが示唆された (表1)。この実験事実だけをみると、あたかもハンマーで壁をたたき壊すように悪性腫瘍細胞が基底膜を一方向的に破壊しているかのように思える。しかし、近年、生化学的解析の結果から、悪性腫瘍細胞が基底膜内の糖蛋白 laminin に接着すると type IV collagenase 活性が著明に増加することが示された¹²⁾。この事実はバリエーであるはずの基底膜側の成分からの働きかけにより、基底膜の破壊に必要な形質が誘導されることを示している。

今回のわれわれの検索の目的はさらにバリエーである基底膜の構成成分が悪性腫瘍細胞の基底膜内での運動能を誘導し得るか否かを調べることにあった。その結果、chemotaxis および cell motility assay のいずれにおいても、基底膜抽出物である matrigel によりヒト線維肉腫細胞 HT1080 cell の運動能が促進された。また、matrigel 内にも含まれている基底膜内糖蛋白 laminin 単独でも十分な効果があったので、laminin が運動能促進の本体だと考えられた。この結果から、ヒト線維肉腫細胞 HT1080 cell は転移のバリエーである基底膜内の laminin に遭遇した時に基底膜内浸潤に必要な形質である運動能を誘発されることが示唆された。

laminin との接着により、先に述べた type IV collagenase 活性および運動能が誘導されるという事実からは laminin との接着が悪性腫瘍細胞の基底膜浸潤能発現のシグナルになっている可能性が示唆される。よって、laminin との接着を防止してやれば基底膜浸潤能の誘導が防止できる可能性がある、われわれはすでに、腫瘍細胞の laminin receptor を塞ぐことにより、腫瘍細胞と laminin との接着を抑制することのできるペプチド YIGSR により、マウス悪性黒色腫およびヒト線維肉腫細胞の in vitro で基底膜浸潤と in

vivo での転移が抑制されることを報告したが¹³⁾¹⁴⁾, これは YIGSR による laminin への接着防止により基底膜浸潤能発現のシグナルがブロックされ, type IV collagenase 放出, 運動能も抑制された結果である可能性がある。

悪性腫瘍の転移の撲滅のためには, まず転移の分子機構を解明することが急務であるが多くの場合, 腫瘍細胞のみに目を向けた研究が行なわれている。しかし, 今回のわれわれの検索結果からは腫瘍細胞だけでなく転移の過程で腫瘍細胞が遭遇する基質に目を向けた研究を忘れてはならないと考えられた。

要 約

転移のバリエーションである基底膜の構成成分が悪性腫瘍細胞の基底膜浸潤に必要な形質である運動能を促進するという実験結果を得た。

文 献

- 1) 岩本幸英: がん骨転移の基礎, 整形外科 MOOK 63, 転移性骨腫瘍, pp 1-10, 福間久俊編, 東京, 金原出版, 1992.
- 2) 岩本幸英: 癌-転移と基底膜, 実験医学, 5 : 965-970, 1987.
- 3) Iwamoto, Y. et al.: Co-injection with basement membrane extracts facilitates the transplantability of human tumors obtained at surgery in nude mice. Med. Sci. Res. 20 : 663-664, 1992.
- 4) Timpl, R. H. et al.: Laminin-a glycoprotein from basement membranes. J. Biol. Chem. 254 : 9933-9937, 1979.
- 5) Rasheed, S. et al.: Characterization of a newly derived human sarcoma cell line (HT-1080). Cancer (Phila) 33 : 1027-1033, 1974.
- 6) Jacobs, G. P. et al.: Characteristics of a human diploid cell designated MRC-5. Nature (Lond) 227 : 168-170, 1970.
- 7) 岩本幸英: Basement membrane matrigel を用いた in vitro invasion assay の開発. 医学のあゆみ 132 : 757-762, 1988.
- 8) Albini, A. et al.: A rapid in vitro assay for quantitating the invasive potential of the tumor cells. Cancer Res. 47 : 3239-3245, 1987.
- 9) Iwamoto, Y. et al.: A synthetic pentapeptide from the B1 chain of laminin promotes for B16F10 melanoma cell migration. J. Cell Physiology. 134 : 287-291, 1988.
- 10) Tatsuka, M., Jinno, S. and Kakunaga, T.: quantitative measurement of cell motility associated with transformed phenotype. J. Cancer Res. 80 : 408-412, 1989.
- 11) Manzel, J. and Borth, W.: Influence of plasma fibronectin on collagen cleavage by collagenase. Collagen Relat. Res. 3 : 217-230, 1983.
- 12) Turpeeniemi-Hujanen, T. et al.: A laminin increases the release of type IV collagenase from malignant cells. J. Biol. Chem. 261 : 1883-1889, 1986.
- 13) Iwamoto Y., et al.: YIGSR, a synthetic laminin pentapeptide, inhibits experimental metastasis formation. Science 238 : 1132-1134, 1987.
- 14) Iwamoto, Y. and Sugioka, Y.: An in vitro invasion assay using a reconstituted basement membrane to study the invasiveness of tumor cells. Transactions of the 38th Annual Meeting of Orthopaedic Research Society, P443, 1992.