

タイプ1・プラスミノゲン・アクチベーター・インヒビター(PAI-1)遺伝子導入によるヒト線維肉腫細胞HT-1080の肺転移能の増強

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/9388

タイプ1・プラスミノゲン・アクチベーター・ インヒビター (PAI-1) 遺伝子導入による ヒト線維肉腫細胞HT-1080の 肺転移能の増強

金沢大学医学部医学科整形外科科学講座 (主任: 富田勝郎教授)

砂 山 千 明

ヒト線維肉腫細胞HT-1080にタイプ1・プラスミノゲン・アクチベーター・インヒビター (type 1-plasminogen activator inhibitor, PAI-1) のcDNAを遺伝子導入することにより, HT-1080の肺転移能に与える影響を検討した。HT-1080から限界希釈法によりクローン化されたクローン1-3CはPAI-1の発現が少なく, ノドマウスの尾静脈に接種した場合, 低い肺転移能を示す。ヒトPAI-1 cDNAを真核細胞発現ベクターであるpcDNA1neoに組み込み, PAI-1発現プラスミドpcDNA1neo-PAIを構築した。このpcDNA1neo-PAIをリポフェクション法によりクローン1-3Cに遺伝子導入した。ジュネテシ (G418) 耐性株を4週間の選択培養の後に得てクローン化し, 5種類のPAI-1高発現性の遺伝子導入株1-3C (PAI)a-eを獲得した。サザンハイブリダイゼーション法による遺伝子解析を行い, 遺伝子導入株1-3C (PAI) には内在性のPAI-1遺伝子以外に複数の外因性のPAI-1遺伝子が導入されたことを確認した。また各クローンの発現するPAI-1およびウロキナーゼタイプ・プラスミノゲン・アクチベーター (urokinase-type plasminogen activator, u-PA) の抗原量はそれぞれのモノクローナル抗体を用いたELISA法で測定した。遺伝子導入株1-3C (PAI)はクローン1-3Cに比べ3倍以上のPAI-1の発現増加を認めた。このPAI-1高発現の形質は6カ月以上安定しており持続高発現株 (stable transfectant) であると判断された。PAI-1遺伝子の導入操作により腫瘍細胞のu-PA発現量やノドマウスBALB/c-nu/nuの背部皮下における増殖能には影響はなかった。各クローンの肺転移能はノドマウスの尾静脈内に腫瘍細胞を接種し3週間後に肺に形成される転移巣を数えて評価した。PAI-1高発現性の遺伝子導入株1-3C (PAI)はクローン1-3Cに比べ肺転移数, 転移頻度ともに有意に増加した。PAI-1 cDNAを遺伝子導入することにより肺転移能の増加が確認できたことから, HT-1080において腫瘍細胞のPAI-1発現性は肺転移形成能を決定する重要な因子の1つであることが明らかにされた。

Key words type 1-plasminogen activator inhibitor, gene transfection, human fibrosarcoma cell line HT-1080, lung metastasis

骨肉腫をはじめとする骨軟部腫瘍に対する治療は, 1970年代に強力な補助化学療法が導入されてから急速な発展を遂げている。しかし骨肉腫の5年生存率は専門的に治療を行っている施設においてもいまだ50~80%である^{1)~4)}。化学療法が導入される以前は病巣の発見と同時に切断術という局所根治的手術のみを行っていたが, ほとんどの症例が肺転移をおこし死亡した。このような歴史的な事実は, 病巣が発見されたその時にはすでに画像診断で捉えることのできない微小転移巣が存在することを示している^{5)~7)}。そのため骨軟部腫瘍の治療においては原発巣の治療のみならず微小転移, つまり肺転移の阻止と征圧が最も重大な問題である。

悪性腫瘍の転移形成にはさまざまな過程があり, 転移巣の完成には種々の要因が複雑に関与している。これまで当講座では悪性腫瘍の肺転移に関して, 特に腫瘍細胞が毛細血管壁に着床し停留する局面において凝固線溶系が重要な役割を担っていることを報告してきた。Tsuchiyaら⁸⁾はヒト線維肉腫細胞HT-1080をFidler⁹⁾の方法を用いて, 血行性に形成される肺転移巣から新たな細胞株を分離培養し, 再びノドマウスに接種するという生体内継代操作を6回繰り返して, 低および高肺転移能を有する細胞系株を樹立した。これらの肺転移能はタイプ1・プラスミノゲン・アクチベーター・インヒビター (type 1-plasminogen activator inhibitor, PAI-1) の発現と強い相関関係を

平成10年11月17日受付, 平成10年12月11日受理

Abbreviations : bp, base pair; BSA, bovine serum albumin; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; FBS, fetal bovine serum; PA, plasminogen activator; PAI-1, type 1-plasminogen activator inhibitor; PBS, phosphate-buffered saline; RSV LTR, Rous sarcoma virus long terminal repeat; TAE, Tris acetate EDTA; TE, Tris EDTA; t-PA, tissue-type plasminogen activator; u-PA, urokinase-type plasminogen activator

持つことを示した。また、これら低および高転移能株間には浸潤能、接着能にはなんら相関がないことを報告した。次いで Matsuda ら¹⁰⁾¹¹⁾は HT-1080 から限界希釈法により種々の PAI-1 活性を持つクローンを樹立し、PAI-1 高発現クローンが高肺転移能を有するかどうかを検討した。これら限界希釈法で樹立した各クローンをヌードマウス尾静脈に接種し評価したところ、高い PAI-1 活性を持つクローンほど高肺転移能を持つ傾向があることを明らかにした。今回の実験では PAI-1 cDNA を PAI-1 活性の低いクローンに遺伝子導入することにより、そのクローンの肺転移形成能にどのような影響を及ぼすかを検討し考察した。

対象および方法

I. 実験動物

ヌードマウス BALB/c-nu/nu, 4~6 週齢, 雌 (日本クレア, 東京) を特定の病原体に感染されていない (specific pathogen-free) 状態で室温 25℃ に保持し放射線滅菌した水と飼料を与え飼育した。

II. 腫瘍細胞と培養法

ヒト線維肉腫細胞 HT-1080¹²⁾ (American Type Culture Collection, Rockville, USA) から Matsuda ら¹⁰⁾¹¹⁾が樹立したクローン 1-3C とクローン 26-6 を使用した。クローン 1-3C は PAI-1 活性が極めて低くかつ肺転移能も低い細胞であり、PAI-1 形質転換細胞を得るための親株として用いた。一方、クローン 26-6 は PAI-1 活性が高くかつ肺転移能も高い細胞である¹⁰⁾¹¹⁾。クローン 1-3C, 26-6, 遺伝子導入細胞の培養は、10% 非働化ウシ胎児血清 (fetal bovine serum, FBS) (Gibco BRL, New York, USA) と 1% ペニシリン・ストレプトマイシン液 (Gibco BRL) を加えたダルベッコ改良イーグル培地 (Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM) (日本製薬, 東京) を用いて 5% CO₂, 37℃ の条件下で培養フラスコ (Corning, New York, USA) 内で単層培養した。1 週間に 2 回の頻度で継代を行った。実験に用いる細胞浮遊液の調製は、細胞の対数増殖期に 0.16M リン酸緩衝生理食塩水 (phosphate-buffered saline, PBS) で 1 回洗浄し、0.1% トリプシン (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) と 0.2mM EDTA の混合液 0.5ml を加え室温で 1~2 分間静置して細胞を剥離させ、10% FBS を含む DMEM 培地を 1~2ml 加えて均一細胞懸濁液を得た。また細胞浮遊液使用にあたっては、0.3% トリパンブルー (半井化学, 京都) 色素排除試験法により、90% 以上の生細胞があることを確認した。

III. 導入プラスミドの構築

1. ヒト PAI-1 cDNA の調製

ヒト PAI-1 cDNA は、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (reverse transcription-polymerase chain reaction) で合成された後、大腸菌プラスミド pUC18 に組み込まれた状態でウィーン大学生理学研究所 Binder 教授より供与された¹³⁾。PAI-1 cDNA は鎖長 1,426 塩基対 (base pair, bp) で開始コドン (ATG) の 5' 末端側上流に 75 ヌクレオチドの、また終止コドン (TGA) の下流に 142 ヌクレオチドの非翻訳領域 (untranslated region) を持ち、PAI-1 蛋白質を構成する 403 個の全てのアミノ酸をコードしている。PAI-1 cDNA は制限酵素 *EcoRI* (宝酒造, 大津) と *XbaI* (宝酒造) で切り出し、1% 低融点アガロースゲル (和光純薬工業, 大阪: 以下特に記載のない場合は当社の製品を用いた) でベクタープラスミド pUC18 と分離した後、ゲルから抽出した。

2. pcDNA1neo ベクタープラスミドへの PAI-1 cDNA の挿入

真核細胞発現ベクター pcDNA1neo¹⁴⁾ (Invitrogen, San Diego, USA) は 6,969bp でネオマイシン耐性遺伝子 (neomycin resistance encoding gene) をコードしている。PAI-1 cDNA はサイトメガロウイルスプロモーター (cytomegalovirus immediate-early promoter/enhancer) の下流のマルチクローニングサイト内の *EcoRI* - *XbaI* サイトに挿入した (図 1A)。この発現ベクターは *EcoRI* サイトをマルチクローニングサイトの他にもう 1カ所、ラウスサルコーマウイルス末端反復配列 (Rous sarcoma virus long terminal repeat, RSV LTR) 内に持つ。まず発現ベクターを制限酵素 *EcoRI* と *XbaI* で消化し、生じた *EcoRI* 断片 (5,687bp) をアルカリホスファターゼ (BAP, 宝酒造) 処理後、フェノール・クロロホルム処理、エーテル処理、エタノール沈殿を行った (図 1B-a)。一方、ベクター消化で得た RSV LTR 断片 (1,237bp) と PAI-1 cDNA はライゲーションキット (宝酒造) を用いてライゲーション処理を行った (図 1B-b)。*EcoRI* サイトでのライゲーション産物と RSV LTR 同士または PAI-1 cDNA 同士が連結した産物を排除する目的で、ライゲーション処理後、*EcoRI* 処理を行い、次いで BAP 処理ベクターとライゲーションし pcDNA1neo-PAI を得た (図 1B-c)。これを形質転換大腸菌 MC1061/P3 (Invitrogen) に導入し、得られた形質転換プラスミドの制限酵素による DNA 解析を行い PAI-1 cDNA がサイトメガロウイルスプロモーターのセンス方向に挿入されていることを確認した。

3. pcDNA1neo-PAI の大量調整

形質転換大腸菌 MC1061/P3 を 2×TY 培地 [トリプトン 16g, 酵母エキス 10g, 塩化ナトリウム 5g, アンピシリン (半井化学) 50mg/l, pH7.6] 250ml にて 24 時間培養した。4℃, 5,000 回転/分で 10 分間遠心して集菌した。菌体を 10ml の 25% シュクロース, 50mM Tris-HCl 緩衝液 (pH7.5) に懸濁後、リゾチウム 10mg を加え緩やかに混和し 5 分間、水中に静置した。0.25M EDTA 1ml を加え 15 分間水中に静置した。0.3% トライトン (Triton X-100), 0.2M EDTA, 0.15M 塩化ナトリウム混合液を 10ml を加えさらに 30 分間水中で静置した。4℃, 30,000 回転/分で 40 分間高速遠心し上清を採り、5M 塩化ナトリウム 2.5ml, 10% SDS 0.25ml, フェノール・クロロホルム・イソアミルアルコール (25:24:1) 混合液 25ml を加えてフェノール抽出し、次いでエタノール沈殿を行った。沈殿を Tris EDTA (TE) 緩衝液 [10mM Tris-HCl pH8.0, 1mM EDTA] 3ml に溶解後、150 μg のリボスクレアーゼ A (Sigma Chemical Co.) を加え、37℃, 30 分間反応させた。塩化セシウム (Gibco BRL) 4.2g と臭化エチジウム 4 μg を加え、クイックシールチューブ (ベックマンジャパン, 東京) に注入密閉した。ベックマン VTi65 垂直ローター (ベックマンジャパン) で 20℃, 60,000 回転/分で 10 時間超遠心後、プラスミドのバンドを 21 ゲージ注射針で回収した。1.1g/ml 塩化セシウム, 0.54mg/ml 臭化エチジウムを含む TE にて 5.2ml に希釈後、再び 20℃, 65,000 回転/分で 5 時間超遠心した。プラスミドのバンドを回収しフェノール抽出、エタノール沈殿後、TE にて 1mg/ml の濃度に溶解した。

IV. PAI-1 cDNA 導入細胞

クローン 1-3C を直径 10cm の培養シャーレ (Corning) に 5×10⁵ 個まき、37℃, 24 時間培養後、上記の方法で調整した pcDNA1neo-PAI をリポフェクション法¹⁵⁾により遺伝子導入した。リポフェクション法は合成ポリカチオン脂質を成分とする遺伝子導入試薬トランスフェクタム (IBF Biotechnics,

Marlborough, USA) を用いる方法である。トランスフェクタム 10 μ l に pcDNA1neo-PAI 5 μ g を混合した後、培地に加え、37°C で4時間培養する。培地を除去し、新しい培地で24時間培養後、ジェネテシ (G418, Gibco BRL) を最終濃度 0.5mg/ml になるように加え耐性細胞を得た。これらを4週間連続選択培養した後、マイクロウェルを用いた限界希釈法¹⁰⁾によりクローン化し、安定した PAI-1 高発現を認める5種類の遺伝子導入株 1-3C (PAI) a-e を分離し実験に用いた。また同様に対照株として pcDNA1neo ベクタープラスミドのみを遺伝子導入したクローン 1-3C (neo) を得た。

V. 遺伝子解析

1. DNA の抽出

クローン 1-3C, 26-6, pcDNA1neo のみを遺伝子導入した 1-3C (neo), および pcDNA1neo-PAI を導入した5種類の遺伝子導入株 1-3C (PAI) a-e から的高分子 DNA の調製は Bowtell¹⁷⁾ の方法に従って行った。まず、直径 10cm の培養シャーレに単層培養した細胞を 5ml の冷 PBS で1回洗浄した。細胞溶解液 [6M 塩酸グアニジン (guanidium hydrochloride, 半井化学) pH7.0, 2% サルコシル酸ナトリウム (sodium sarkosyl), 2mM EDTA pH8.0, プロテイナーゼ K (proteinase K) 200 μ g] 4.6ml を培養細胞に加え水上で攪拌溶解し、15ml ポリプロピレンチューブ

(Corning) に回収した。次いで、60°C の恒温槽で2時間蛋白質分解処理を行った。室温にもどし 3M 酢酸ナトリウム (pH6.0) 0.4ml を加え静かに混合した。冷エタノール 10ml を加え十分に混合し、-20°C で一晩静置した。4°C, 3,000回転/分で15分間遠心して上清を捨て、沈殿を冷 75% エタノール 1ml で2回洗浄した。室温で数分間減圧乾燥させた後、TE 緩衝液 1ml に溶解した。得られた DNA 溶液は、分光光度計 (モデル UV160, 島津、京都) を用いて 260nm における吸光度 (OD) を測定し、1 OD を 50 μ g/ml として DNA 濃度を算出した。

2. 制限酵素処理

各クローンから抽出された DNA は制限酵素 *Bam*H I (宝酒造) で完全消化した。DNA 20 μ g に対して反応緩衝液 [最終濃度 10mM Tris-HCl pH7.5, 7mM 塩化マグネシウム, 7mM β -メルカプトエタノール (半井化学), ウシ血清アルブミン (bovine serum albumin, BSA, Sigma Chemical Co.) 10 μ g/ml] の存在下で *Bam*H I 100 単位を加え 37°C で12時間反応させた。制限酵素処理後、フェノール抽出およびエタノール沈殿を行った。得られた沈殿を冷 75% エタノールで洗浄し室温で数分間減圧乾燥させ TE 緩衝液 100 μ l に溶解した。

3. プローブの調製

ヒト PAI-1 cDNA または大腸菌プラスミド pUC19 (宝酒造) を

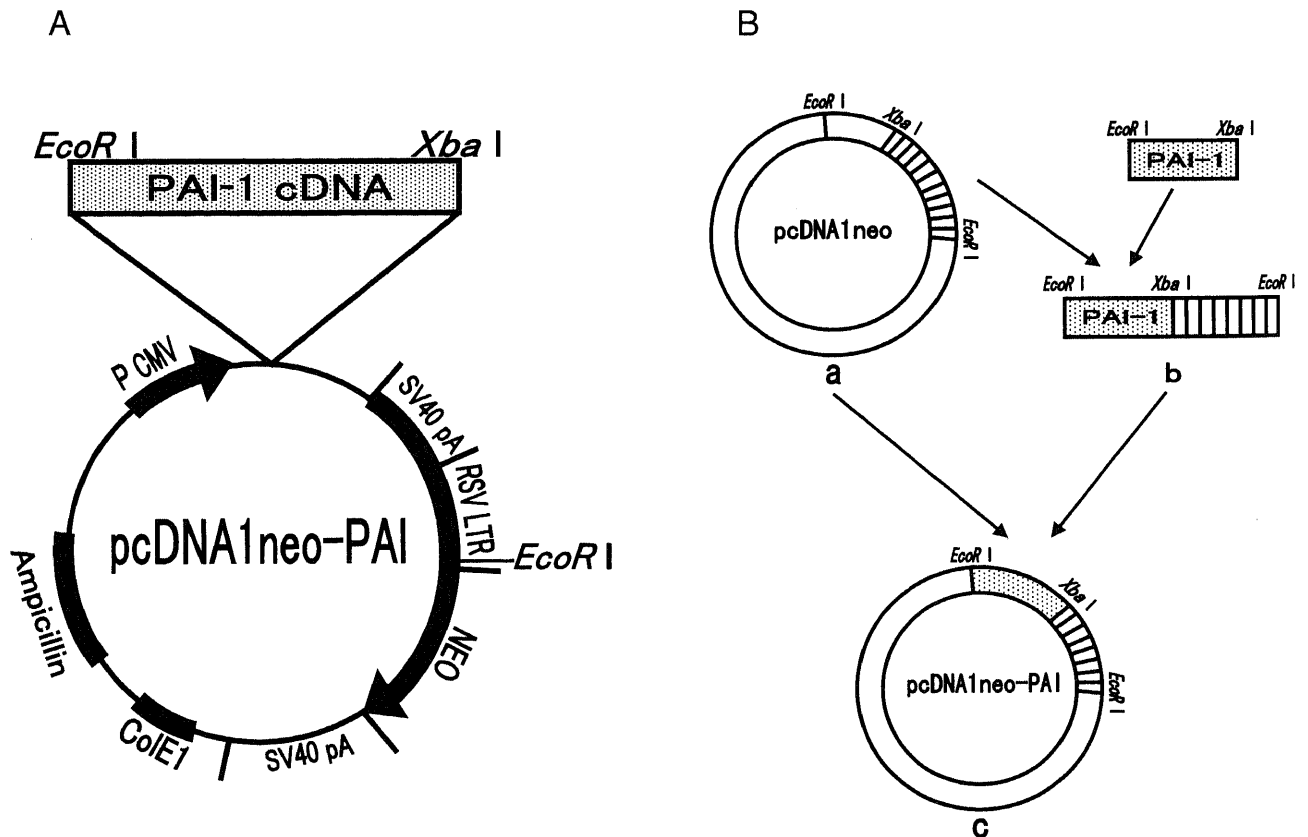


Fig. 1. The construction of pcDNA1neo-PAI (A) and the schema of molecular biological processes of pcDNA1neo-PAI (B). pcDNA1neo (6,969 bp) was digested with *Eco*R I and *Xba* I, and the resulting 1,237 bp and 5,687 bp fragments were purified by agarose gel electrophoresis (B-a). PAI-1 cDNA was isolated from the plasmid pUC18-PAI-1 as an *Eco*R I-*Xba* I fragment and purified. The 1,237 bp fragment, which contains the SV40 pA and RSV LTR regions, was ligated to PAI-1 cDNA using the *Xba* I site (B-b). pcDNA1neo-PAI plasmid was constructed by ligating the fused fragment with the dephosphorylated 5,687 bp fragment from pcDNA1neo (B-c). SV40 pA, simian virus 40 polyadenylation signal; RSV LTR, Rous sarcoma virus long terminal repeat; NEO, neomycin resistance encoding gene; ColE1, colicin E1 promoter and origin; P CMV, cytomegalovirus immediate-early promoter/enhancer.

鋳型DNAとしてプローブを作製した。ランダムプライマーDNAラベリングキット(宝酒造)と $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dCTP(アマシヤム・ジャパン, 東京)を用いて標識し, 次いでTE緩衝液で平衡化したセファデックスG50(Pharmacia, New York, USA)で未反応の基質をゲル濾過で除去した後, ハイブリダイゼーションに使用した。

4. サザンブロッティング

上記2で得た各クローンのDNAの一部(5 μg)を取り, 0.25%プロモフェノールブルー(bromophenol blue)と30%グリセロールの混合液を5 μl に加え, TE緩衝液で最終的に50 μl に調製した。各試料は1 \times Tris-酢酸-EDTA(Tris acetate EDTA, TAE) [最終濃度40mM Tris-HCl pH8.0, 20mM 酢酸ナトリウム, 2mM EDTA, 1.55% 酢酸]に0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の臭化エチジウムを含む1.2% アガロースゲルで, 1 \times TAE緩衝液を用いて定電圧100Vで3時間電気泳動した。DNAサイズマーカーとして λ DNAを制限酵素Hind IIIで消化したマーカーI(ニッポンジーン, 富山)を用いた。電気泳動後, アガロースゲルを0.25N塩酸に15分間浸した。次いで, アルカリ変性液(0.4M水酸化ナトリウム, 0.6M塩化ナトリウム)に浸し20分間ずつ2回振盪した後, 蒸留水で洗浄した。ブロッティング用緩衝液20 \times SSC(1 \times SSC=0.15M塩化ナトリウム, 0.015Mクエン酸ナトリウム)で30分間ずつ2回振盪し平衡化させた。次いでペーパータオルを用いたキャピラリー法¹⁹⁾で, 20 \times SSCを用いてナイロンメンブレフィルター(Hybond-N, Amersham, Buckinghamshire, UK)に転写した。DNA転写後のフィルターは, 5 \times SSCで洗浄し風乾後, 80 $^{\circ}\text{C}$ で2時間の真空乾燥処理を行いDNAをフィルターに固定した。

5. ハイブリダイゼーション

DNAが転写固定されたナイロンメンブレフィルターをシールドバッグ(コスモバイオ, 東京)に入れ, 5 \times SSCで浸漬した後, 10mlのプレハイブリダイゼーション緩衝液 [最終濃度5 \times SSC, 25mMリン酸水素ナトリウム pH7.0, 0.1% SDS, 0.1%フィコール(Sigma Chemical Co.), 0.1%ポリビニルピロリドン(Sigma Chemical Co.), 0.1% BSA, 0.2mg/ml熱変性サケ精子DNA(Pharmacia)]を加え, 42 $^{\circ}\text{C}$ で6時間振盪した。次いで, ハイブリダイゼーション緩衝液 [最終濃度5 \times SSC, 25mMリン酸水素ナトリウム pH7.0, 0.1% SDS, 0.1%フィコール, 0.1%ポリビニルピロリドン, 0.1% BSA, 0.2mg/ml熱変性サケ精子DNA, 50%ホルムアミド(ニッポンジーン), プローブDNA(放射性活性0.5~1.0 $\times 10^6$ cpm/ml)]に替え, 42 $^{\circ}\text{C}$ で15時間振盪した。フィルターは, 室温にて5 \times SSCで1回洗浄し, 0.1% SDSを含む1 \times SSCを用いて42 $^{\circ}\text{C}$ で15分間洗い, さらに0.1% SDSを含む0.1 \times SSCを用いて42 $^{\circ}\text{C}$ で15分間の洗いを2回繰り返した。最後にこのフィルターをコダックXARフィルム(Kodak, New York, USA)に増感板を用い-80 $^{\circ}\text{C}$ で24~48時間露光しオートラジオグラフィーを行った。

6. 制限酵素処理条件の検討

各クローンのDNAサンプルが完全に消化できていることを確認する目的で, 各DNA標本20 μg に大腸菌プラスミドpUC19 5ngを加えた別の反応系を準備し, 上記2と同様にBamHIで消化した。上記4, 5の手順でDNA 5 μg を電気泳動後, サザンブロッティングを, 次いで ^{32}P 標識pUC19を用いたハイブリダイゼーションを行い, 未消化のpUC19がないことをオートラジオグラフィーを行い確認した。フィルターの洗浄

は, 室温にて5 \times SSCで1回, 0.1% SDSを含む1 \times SSCを用いて65 $^{\circ}\text{C}$ で15分間を1回, さらに0.1% SDSを含む0.1 \times SSCを用いて65 $^{\circ}\text{C}$ で15分間を1回行った。コダックXARフィルムを用い室温で12時間のオートラジオグラフィーを行った。

VI. 腫瘍細胞の生体内増殖能

各クローンの増殖能はヌードマウス背部皮下移植によって評価した。対数増殖期のクローン1-3C, 1-3C(neo), 1-3C(PAI) a-c, および26-6の各細胞浮遊液の濃度を2.5 $\times 10^6$ 個/mlに調整し, ニードマウスの背部皮下に0.2ml(細胞数5 $\times 10^6$ 個)ずつを接種した。移植後6週までの平均腫瘍径を経時的に計測した。各クローンごとに3匹のヌードマウスを用い検討した。

VII. PAI-1およびウロキナーゼタイプ・プラスミノゲン・アクチベーター(urokinase-type plasminogen activator, u-PA)発現量

クローン1-3C, 1-3C(neo), 1-3C(PAI) a-c, および26-6の産生するPAI-1の発現量は検査培地中の各抗原量をELISA法により測定し評価した。検査培地は対数増殖期にある各腫瘍細胞1 $\times 10^6$ 個に対して無血清DMEM培地5mlを加え, 24時間培養した上清を用いた。抗ヒトPAI-1モノクローナル抗体を一次抗体とするELISAキット(Technoclone Inc., Vienna, Austria)を用いて測定した。

抗ヒトPAI-1モノクローナル抗体と1% BSAを予めコーティングしたマイクロタイタープレートに被検培地100 μl を入れ37 $^{\circ}\text{C}$ で2時間静置した。PBS-ツイーン(0.05% Tween20を含むPBS)で3回洗浄後, ペルオキシダーゼ標識抗ヒトPAI-1抗体を100 μl 加えて37 $^{\circ}\text{C}$ で60分間静置した。PBS-ツイーンで3回洗浄後, 発色基質(azinobis 3-ethyl-benz-thiazolinesulfonic acid)を100 μl 加えて室温で20分間静置し発色させ, マイクロプレートリーダー(イージーリーダー EAR340AT)(STL-Labinstrument, Vienna, Austria)を用いて波長405nmでの吸光度を測定した。

u-PAの発現量は抗ヒトu-PAモノクローナル抗体とペルオキシダーゼ標識抗u-PA抗体を用いたELISAキット(Technoclone Inc.)にてPAI-1と同様の手順で測定した。

検査培地中のPAI-1とu-PA抗原量は, 標準試薬の既知濃度と

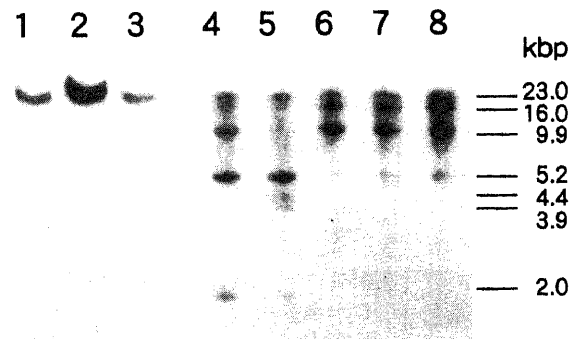


Fig. 2. Southern hybridization analysis showing the detection of PAI-1 sequences in each clone. Cellular DNAs were digested with BamHI, followed by electrophoresis on 1.2% agarose gel and Southern transfer, and hybridization with ^{32}P -labeled PAI-1 probe. Lane 1, clone 1-3C; Lane 2, clone 26-6; Lane 3, clone 1-3C(neo); Lane 4~8, clone 1-3C(PAI)a-e. Hind III-digested λ DNA was loaded as a molecular sized marker. kbp, kilobase pair.

吸光度とから求めた検量線に基づき値を得た。PAI-1 ELISA法では活性型、潜在型および結合型PAI-1抗原が、u-PA ELISA法では1本鎖および2本鎖結合型u-PA抗原が測定される。3回の測定を行いその平均を求め検討した。

VIII. 腫瘍細胞の肺転移能

各クローンの肺転移能の評価は、Wexler¹⁹⁾の方法により行った。クローン1-3C, 1-3C (neo), 1-3C (PAI) a-c, および26-6の細胞浮遊液を 2.5×10^6 個/mlに調整し、各クローンごとに10匹のヌードマウスの尾静脈内に0.2ml (細胞数 5×10^5 個) 注入した。3週間後にエーテル麻酔下に屠殺して仰臥位に固定し正中切開にて気管を露出した。気管内に黒インク (パイロット, 東京) 15ml・アンモニア水 2滴・蒸留水 85mlからなる染色液を約2ml注入した。気管を切離して肺と心臓を一塊として摘出し流水で洗浄した。70%エタノール 100ml・ホルムアルデヒド液 10ml・酢酸 5mlからなるFekete固定液²⁰⁾で24時間固定した。固定後、心臓を切離し肺表面を実体顕微鏡 ($\times 20$) で観察した。

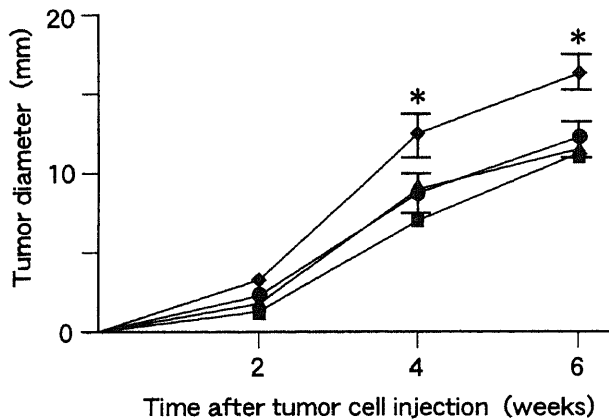


Fig. 3. Growth rates of tumor cells following subcutaneous injection in nude mice. Tumor cells (5×10^5) were injected over the lateral thorax of nude mice. Tumor diameter was measured using calipers. Each point shows the mean tumor diameter of 3 mice 2, 4 and 6 weeks after tumor cell injection. ●, clone 1-3C; ▲, clone 1-3C(neo); ■, clone 1-3C(PAI)a; ◆, clone 26-6. Statistical difference was examined by the unpaired t-test. * $p < 0.05$ versus clone 1-3C.

肺転移巣は肺表面に白くみえ、直径 $50 \mu\text{m}$ 以上のものを数えて肺転移数とした。

IX. 統計学的検討

得られた値はすべて $\bar{x} \pm \text{SD}$ で表した。群間の平均値の統計学的検討は対応のないt検定, またはMann-WhitneyのU検定を行い, 危険率が5%未満の場合を統計学的に有意差ありと判定した。

成 績

I. サザンハイブリダイゼーションによる遺伝子解析

図2はpcDNA1neo-PAI導入株1-3C(PAI)a-e (lane4~8)のゲノムDNA中に導入したPAI-1遺伝子 (exogenous PAI-1 gene) が存在していることを示した結果である。4本の主要なバンド (23, 16, 9.9, 5.2kbp) に加えて, 数本の弱いシグナル (9.6,

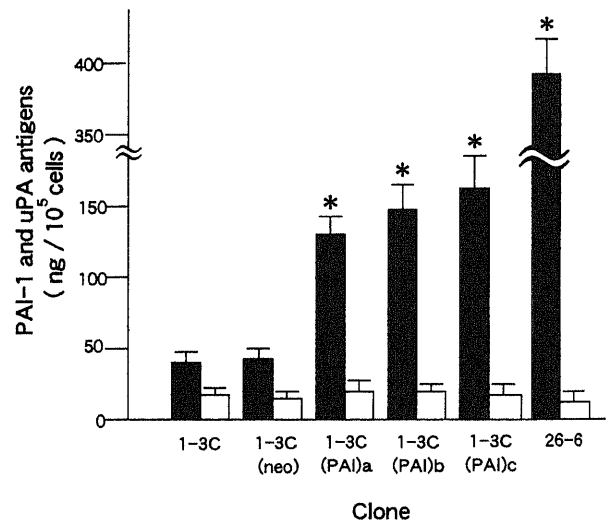


Fig. 4. Levels of PAI-1 and u-PA antigens in media conditioned for 24 hours of each monoclonal cell line using ELISA (■, PAI-1; □, u-PA). Values shown in this figure indicate $\bar{x} \pm \text{SD}$ from the 3 experiments. Statistical difference was examined by the unpaired t-test. * $p < 0.01$ versus clone 1-3C.

Table 1. Number and incidence of pulmonary metastases resulting from intravenous injection of each clone

Clone	Number of pulmonary metastases		Incidence
	$\bar{x} \pm \text{SD}$	Range	
1-3C	1.20 ± 3.16	0-10	2/10
1-3C (neo)	0	0-0	0/10
1-3C (PAI)a	$15.1 \pm 14.3^*$	0-43	8/10
1-3C (PAI)b	$9.20 \pm 11.2^*$	0-27	6/10
1-3C (PAI)c	$19.6 \pm 15.6^*$	0-46	7/10
26-6	$>200^*$	>200	10/10

The number of pulmonary metastases that formed on the lung of nude mice was counted under a dissecting microscope 3 weeks after intravenous tumor cell injection. Values regarding the number of pulmonary metastases indicate $\bar{x} \pm \text{SD}$ and ranges from 10 experiments. The incidence indicates the number of mice with pulmonary metastases/the number of mice receiving tumor cell injection. Statistical difference was examined by the Mann-Whitney U-test.

* $P < 0.05$ versus clone 1-3C.

4.4, 3.9, 2.0kbp) が確認された。これら *BamH* I断片の中、23kbpのバンドはヒト細胞が元来保有する内在性PAI-1遺伝子 (endogenous PAI-1 gene) である²¹⁾。23kbpのバンドは、遺伝子導入を行っていないクローン1-3C (lane1) とクローン26-6 (lane2) やベクタープラスミドのみを導入したクローン1-3C(neo) (lane3) でも認められた。DNAあたりで比較すると、

クローン26-6のシグナルはクローン1-3Cやクローン1-3C(neo)に比べて再現性がよく強いシグナルを与えた。

一方、他の複数のバンドの中、例えば16と9.9kbpのバンドはゲノムDNAの制限酵素消化が不十分なために生じたシグナルではない。ゲノムDNAの完全消化の確認は、同一反応系で共存させた大腸菌プラスミドpUC19の *BamH* I消化生成物

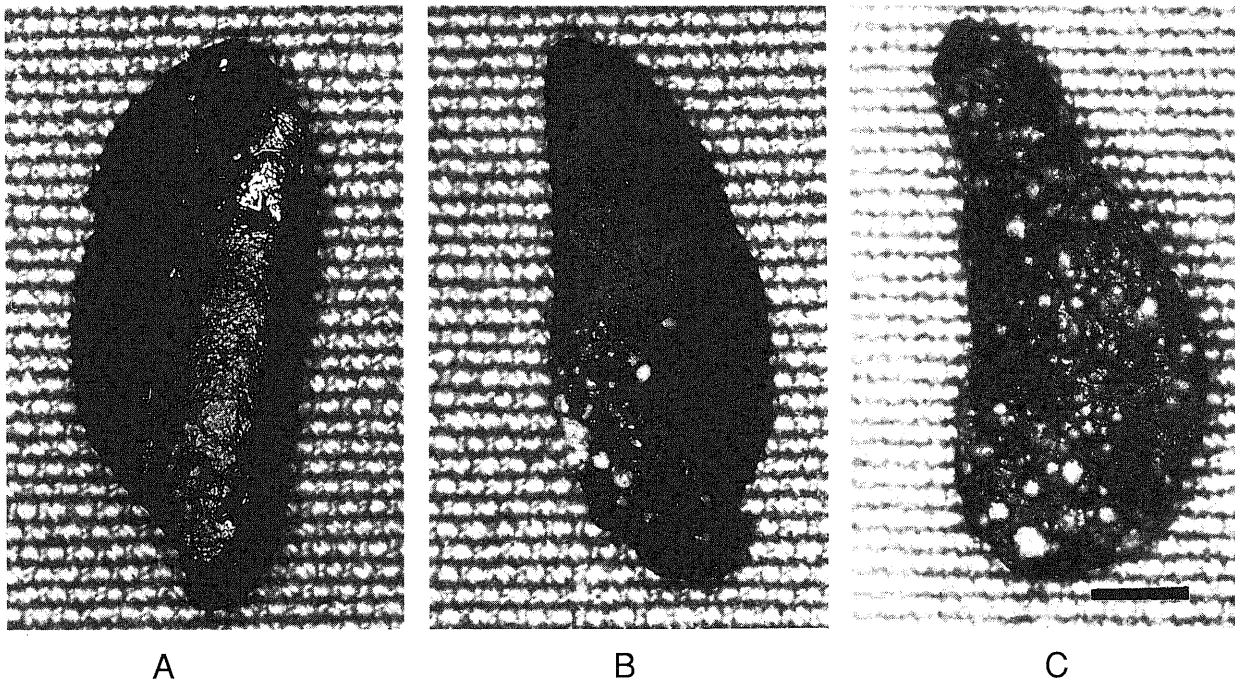


Fig. 5. Gross section of lung metastatic colonies of clone 1-3C (A), clone 1-3C(PAD)a (B) and clone 26-6 (C). Tumor cells (5×10^5) were inoculated into the tail vein of nude mice. At 3 weeks, mice were autopsied under ether anesthesia and the lungs were colored with black ink by Wexler's method¹⁹⁾. White spots on the lung are metastatic colonies. The scale bar indicates 2mm.

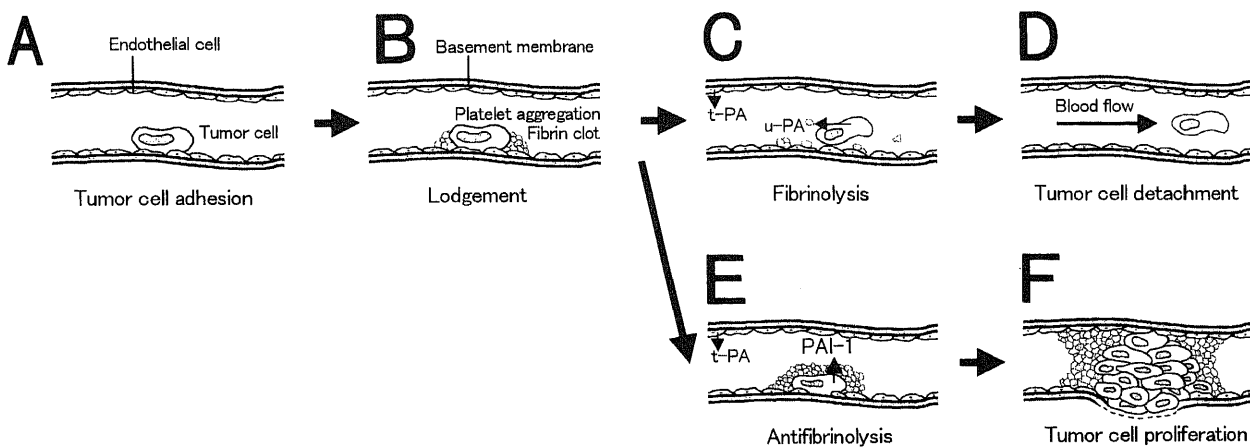


Fig. 6. The sequence of tumor cell arrest and intravascular proliferation portion of the metastatic cascade. (A) The tumor cell initially arrests with close contact of endothelial-tumor cell plasma membranes. (B) Aggregation of platelets and formation of fibrin clot occur immediately after tumor cell arrest. (C) If the tumor cell expresses high levels of u-PA, fibrinolytic activity is promoted in collaboration with t-PA secreted by endothelial cells, and the microthrombus is dissolved. (D) The tumor cell is detached and washed out by reestablishment of blood flow. (E) If the tumor cell expresses high levels of PAI-1, PAI-1 inhibits fibrinolysis caused by PAs and helps to preserve and develop stable microthrombus. (F) Endothelial cells are separated with tumor cell proliferation in the vessel, and the basement membrane is dissolved.

(2,686bp断片)をサザンブロット法で確認する仕方で、完全消化に必要な制限酵素量と反応時間を設定した。

以上のことから、ゲノムDNA中に複数の導入PAI-1遺伝子を持つクローン1-3C(PAI)a-eを得ることができた。これらの中、主に1-3C(PAI)a-cの3つのクローンを用いて以下の実験を行った。

II. 腫瘍細胞の生体内増殖能

背部皮下に接種した各クローンとも経時的に腫瘍径の増大をみた(図3)。遺伝子導入操作を受けたクローン1-3C(neo)およびクローン1-3C(PAI)a-cはクローン1-3Cと比べ腫瘍径の増大速度に有意差を示さなかった。クローン26-6は腫瘍径の増大が最も速くクローン1-3Cに比べ移植4週後から有意差を認めた。

III. PAI-1 および u-PA 発現量

図4は無血清DMEM培地で24時間培養後の検査培地中のPAI-1およびu-PA抗原量を示した結果である。PAI-1抗原量はクローン1-3Cでは平均40.6ng/10⁵個であった。対照としてpcDNA1neoベクタープラスミドのみを導入したクローン1-3C(neo)では44.4ng/10⁵個でありPAI-1発現の増加はなかった。PAI-1 cDNA導入株1-3C(PAI)a-cではクローン1-3Cに比べ有意に増加し3倍以上のPAI-1発現を認めた。この遺伝子導入株1-3C(PAI)a-cの高いPAI-1発現性は6カ月以上安定していた。PAI-1高発現性のクローン26-6では388ng/10⁵個とクローン1-3Cの約10倍であった。一方、u-PA抗原量は各クローンともに14~20ng/10⁵個の範囲で有意差はなく、PAI-1 cDNAの遺伝子導入によるu-PA発現性への影響はなかった。

IV. 腫瘍細胞の肺転移能

表1は各クローンの肺転移数と転移頻度を示した結果である。図5はWexler¹⁹⁾の方法により染色した肺転移巣の実体顕微鏡像である。転移巣は肺表面に白く結節状に認められる。クローン1-3Cを接種したヌードマウスでは10匹中2匹にのみ肺転移巣が観察された。その転移数も10個以下と少なかった(図5A)。クローン1-3C(neo)では見かけ上肺転移巣はまったく認められなかった。遺伝子導入を行った3種類のクローン1-3C(PAI)a-cでは10匹中6~8匹の頻度で肺転移巣がみられ、転移数も有意に増加していた。図5Bにクローン1-3C(PAI)aの結果を示した。クローン26-6では全例に肺転移を認め(図5C)、転移数も多く10匹中5匹は接種後3週以内に死亡した。

考 察

ヒト線維肉腫細胞HT-1080は強力な肺転移能を持っており肺転移実験によく用いられている¹²⁾。このHT-1080は均一な細胞集団ではなく、多様な性質を持つ細胞の集まりであることはあまり認識されていない。HT-1080から限界希釈法により樹立された低PAI-1活性かつ低肺転移能のクローン1-3C¹⁰⁾¹¹⁾に、今回、PAI-1 cDNAを遺伝子導入しPAI-1活性を高めることにより肺転移能にどのような影響がみられるかを検討した。遺伝子導入に用いたPAI-1 cDNAはPAI-1を構成する全てのアミノ酸をコードしており、合成されるPAI-1蛋白質も生理的な機能を有していると考えられる¹³⁾²²⁾。遺伝子導入にはリン酸カルシウム法に比べ導入頻度が高く、また導入時に細胞に与える毒性が少ないリポフェクション法¹⁵⁾を用いた。遺伝子導入の条件として導入遺伝子の濃度、接触時間、培養環境などが考えられ²³⁾、あらかじめ前実験を行い適切な条件を検討しておいた。腫瘍細胞をヌードマウスの静脈内に投与する血行性転移モデルの実験を行うた

めに一過性ではなく持続的にPAI-1を高発現する安定した株の獲得が望まれた。一般に持続高発現株(stable transfectant)の樹立は一過性高発現株(transient transfectant)を得ることよりも困難である。それは遺伝子導入された直後、ベクタープラスミドが細胞質内に取り込まれ一過性に高発現を示す時期がある。その後、それらのごく一部が核内に入り込み宿主染色体に組み込まれてはじめて安定した形質転換細胞となるためである。一過性高発現株では細胞分裂の際に導入した遺伝子を次世代に受け渡すことができないため高発現を長期に維持することができない。一方、持続高発現株は導入遺伝子が宿主染色体に組み込まれているために細胞分裂のたびに次世代に導入遺伝子が受け継がれ長期にわたり安定した遺伝子産物の発現を維持することが可能となる²³⁾。今回の実験ではジェネチシン(G418)による4週間以上の選択培養を行い、さらにクローン化し安定したPAI-1発現を認めるクローンのみを実験に用いた。PAI-1 cDNA導入株1-3C(PAI)a-cはクローン1-3Cの3倍以上のPAI-1の発現を6カ月以上安定して認め、持続高発現株と考えられた。また、いずれの遺伝子導入株も親株であるクローン1-3Cに比べてG418に対する50%増殖抑制濃度(median inhibitory concentration of G418 for cell growth)比は15~20倍であり、G418に対して高い耐性を獲得した。

PAI-1はセリンプロテアーゼ・インヒビターファミリーに属し、これまでに他のセリンプロテアーゼ・インヒビターが細胞増殖促進活性を持つことが知られている²⁴⁾。今回、PAI-1遺伝子導入株についてヌードマウス背部皮下接種法により生体内増殖能を親株と比較した。腫瘍径の増大速度には両者間に有意差はなく、PAI-1遺伝子導入による生体内増殖能に影響はないと考えられた。

PAI-1 cDNAがクローン1-3Cに導入されたことはサザンハイブリダイゼーションによる遺伝子解析で確認した。PAI-1遺伝子導入株1-3C(PAI)a-eではヒト細胞が元来保有する内在性のPAI-1遺伝子のバンド(*Bam*H I消化の場合は23kbpフラグメント²¹⁾)以外に、複数の外因性のPAI-1のバンドが認められた(図2)。外因性PAI-1のバンドの数はクローン1-3C(PAI)aで約4本、1-3C(PAI)bで約5本、1-3C(PAI)cで約2本認めたが、PAI-1発現量はいずれもクローン1-3Cの3~4倍程度の増加であり外因性PAI-1のバンドの数によるPAI-1発現量に差はなかった。導入遺伝子の形質発現は一般的に組み込まれた染色体上の位置やコピー数によって影響を受けるが²⁵⁾、PAI-1の場合はクローン間で差がみられないことから、遺伝子導入されたクローンにおいても無制限にPAI-1を発現できるのではなく、何らかの制御を受けているものと考えられた。

クローン26-6の遺伝子解析では内在性PAI-1の23kbpフラグメントが他のクローンと比べ再現性よく強く描出された(図2)。サザンブロットに用いた各クローンのDNA量は5 μ gに統一されておりクローン26-6のシグナルが強く描出された理由として、PAI-1遺伝子の存在する染色体のトリソミー(trisomy)やPAI-1遺伝子の増幅などが考えられた。クローン26-6の核型分析は行われていないが、Rasheedら¹²⁾はHT-1080には染色体異常、特に倍数体のおきやすい事実を報告している。

これまでに当講座では、PAI-1の発現レベルと転移能との間に正の相関があることを報告してきた⁹⁾¹⁰⁾¹¹⁾。今回、PAI-1遺伝子を導入して遺伝子量を増加することによって、両者の正の相関性を確認した。今日まで種々のヒト腫瘍で悪性化に伴いゲノ

ムの質的あるいは量的変化がおきる例²⁵⁾²⁶⁾が多く報告されている。ヒト肺転移をおこした症例でPAI-1遺伝子量を調べた報告はこれまでにないが、PAI-1遺伝子は第7染色体上にあり、また種々の腫瘍で第7染色体の増幅もみられている²⁷⁾。原発巣と肺転移巣でPAI-1遺伝子に何らかの変化がないか検討することは今後の課題である。

凝固線溶系が悪性腫瘍の転移形成に深く関わっていることはこれまでも示唆されてきた²⁸⁾²⁹⁾。一般に悪性腫瘍の転移の成立過程には、原発巣からの離脱と浸潤、脈管系への侵入、毛細血管への着床停留、脈管からの浸出、転移臓器への生着と増殖といった複数の段階的な過程がある。血管内の環境は腫瘍細胞にとっては苛酷であり、血流による物理的なストレスや免疫担当細胞による傷害も受けやすく、適当な臓器の毛細血管に定着して生き残れるのはごくわずかである。毛細血管に捕捉されるためにも、血流中の物理的ストレスから逃れるためにも、腫瘍細胞は塊をなす方が有利である。血小板やフィブリンとの凝集塊形成や腫瘍細胞同士の接着による集合体の形成がこの過程を促進すると考えられる³⁰⁾³¹⁾。毛細血管内で腫瘍細胞が血小板やフィブリンと凝集塊を形成する場面において凝固線溶活性は重要な因子と考えられる。このような転移の成立過程におけるPAI-1の役割はいまだ明らかではないが、プラスミノゲン-プラスミンシステムでの活性化と阻害のバランスを介して、腫瘍細胞の転移に関与している可能性がある。

最近、PAI-1やプラスミノゲン・アクチベーター(plasminogen activator, PA)が、従来の凝固線溶系の内容を越えて、悪性腫瘍の転移という観点からも関心が持たれてきた³²⁾。PAI-1は主に血管内皮細胞や血小板で産生され、血漿中のPAI-1が増加すると深部静脈血栓症、冠動脈疾患などの危険性が高まる。逆に、先天性PAI-1欠損症では線溶活性の異常亢進がみられる。一方、PAはプラスミノゲンをプラスミンへと活性化させ、線溶活性を高め凝固系の最終産物であるフィブリン塊を溶解するはたらきがある。またPAは、線溶活性とは別にプラスミンを介して潜在型のマトリックス・メタロプロテナーゼ(matrix metalloproteinase)を活性化し基底膜の構成成分であるコラーゲン、ラミニン、フィブロネクチン等を酵素的に分解するはたらきを持つ。u-PAを大量に産生する腫瘍細胞は基底膜を分解し周囲組織へ浸潤することが容易であり転移を形成しやすいと考えられている³³⁾。このような転移機序から推論して、u-PAは腫瘍の悪性度と関係づけられてきた。そのためPAI-1の腫瘍学的役割に関してはu-PAを阻害するため良好な予後因子、またはu-PAに対する単なるフィードバック的存在としての報告が多くなされてきた³⁴⁾³⁵⁾。

しかし、Foekensら³⁶⁾は乳癌における原発巣組織中のPAI-1抗原レベルがその予後と相関することを報告した。つまりPAI-1を多く発現する腫瘍ほど転移しやすく予後が悪い。しかもu-PA抗原レベルと転移とは相関がみられないことから、PAI-1を独立した予後因子であるとしている。またMarkusら³⁷⁾は大腸癌の転移組織中のu-PA活性が原発巣のそれよりも明らかに低いことを示し、u-PA活性が低く、むしろPAI-1活性が高い腫瘍細胞が高転移能を有すると報告した。腫瘍細胞の産生するこのような高いPAI-1活性の意義については、癌細胞を蛋白分解から保護するという考え³⁸⁾もあるが、我々は標的臓器の微小環境において凝固線溶系を介して腫瘍塞栓の形成を促進しているのではないかと考えている。

Crissmanら³¹⁾は遠隔転移部位の微小環境における転移形成過程を3段階に分け、それぞれに影響をあたえる因子を以下のごとく説明した。それは、腫瘍細胞と着床部位の内皮細胞との間の直接的相互作用が要因となる接着相(adhesion phase)、着床した腫瘍細胞の周辺に血小板が付着し形成された腫瘍塞栓が要因となる停留相(lodgement phase)、腫瘍細胞が内皮細胞間隙を貫通し細胞外基底膜を溶解する浸潤相(invasion phase)、の3段階である。Maloneら³⁹⁾は転移を形成した種々の悪性腫瘍において、原発巣では高い線溶活性が認められるにもかかわらず転移巣では線溶活性が低いことを示した。そして線溶活性は転移過程のうち原発巣からの浸潤や脈管系への播種という場面では重要な因子であることに間違いはないが、転移巣での接着停留相では高い線溶活性はかえって不利であり、反対に低い線溶活性あるいは線溶を強力に阻害する作用が腫瘍塞栓の形成や維持に関しては有利にはたらくと結論している。骨肉腫に代表されるように血行性肺転移をきたしやすい骨軟部腫瘍では病初期から血流中に腫瘍細胞が存在している。そのような状況下では原発巣からの離脱・浸潤、脈管系への侵入ということよりは、むしろ毛細血管壁に着床・停留し、腫瘍塞栓をいかに形成することができるかが転移成立の要因であると思われる。

この微小環境における腫瘍細胞の着床停留から腫瘍塞栓の形成、転移の成立までの過程の我々の考えを簡潔に説明する。原発巣から離脱し血管に侵入した腫瘍細胞は遠隔臓器の毛細血管に着床し停留する場面では、内皮細胞と接着(図6A)した後、その周囲に血小板凝集やフィブリン塊を形成(図6B)する。これを溶解するように血管内皮細胞から組織型プラスミノゲン・アクチベーター(tissue-type plasminogen activator, t-PA)が産生される。しかも停留している腫瘍細胞自体がu-PAを多く発現している場合(図6C)には、線溶系が亢進しプラスミンを介するフィブリン溶解作用が増強され、腫瘍塞栓が取り除かれ血流が再開し最終的に転移が形成されない(図6D)。反対に腫瘍細胞自体がPAI-1を強く発現している場合(図6E)には、内皮細胞から産生されるt-PAを阻害し局所的に線溶活性が抑制されフィブリン塊や腫瘍塞栓が溶解されにくい環境を作り出す。その結果、腫瘍細胞は着床部位に安定な腫瘍塞栓を形成し、増殖・浸潤(図6F)といった次なる転移過程へと進むことが可能となる。

勝尾⁴⁰⁾、Matsudaら⁴¹⁾⁴²⁾はHT-1080にラジオアイソトープを標識してヌードマウスの尾静脈内に投与し、腫瘍細胞の体内動向を観察した。その結果、PAI-1活性の高いクローンはPAI-1活性の低いクローンに比べより長い時間肺内に停留することを明らかにした。また、PAI-1活性の高いクローンと低いクローンの間にはu-PA産生能やマトリゲルに対する浸潤能には差がないこと、また臍帯静脈内皮細胞に対する接着能にも差がないことから腫瘍細胞のPAI-1発現による抗線溶活性が肺毛細血管での着床停留、それに続く腫瘍塞栓の形成を促進させ肺転移能を高めるとの結論を得た。さらにヘパリンおよび抗PAI-1モノクローナル抗体により腫瘍細胞の肺内停留と肺転移能が抑制されることを示し、凝固活性およびPAI-1活性が腫瘍細胞の停留、腫瘍塞栓形成に深く関連していることを裏付けた。現在、臨床的にもワーファリン、ヘパリンによる抗凝固療法は塞栓形成を抑制し悪性腫瘍の遠隔転移阻止に有効である⁴³⁾。また悪性腫瘍における血小板凝集抑制剤(アスピリン、プロスタグランジン)による転移抑制効果も検討されている^{42)~44)}。

今回の実験では、腫瘍細胞にPAI-1 cDNAを遺伝子導入するという手法を用いPAI-1発現という1つの形質のみを亢進させ、その肺転移能がどのように変化するかを検討した。PAI-1遺伝子導入により肺転移能が増強されたことから、PAI-1はこの系における肺転移能を決定する重要な因子の1つであることが明らかにされた。今後、悪性腫瘍の転移形成能あるいは予後因子という観点からも腫瘍細胞のPAI-1活性がさらに注目されるべきである。また抗PAI-1モノクローナル抗体やアンチセンスPAI-1遺伝子などを応用した悪性腫瘍の転移抑制治療の可能性も大いに期待される。

結 論

1. ヒト線維肉腫細胞HT-1080から分離された低PAI-1活性のクローン1-3CにヒトPAI-1 cDNAを遺伝子導入し、複数のPAI-1持続高発現株1-3C(PAI)を樹立した。
2. 遺伝子導入株1-3C(PAI)は遺伝子解析により外因性PAI-1遺伝子を持つことが示され、ELISA法による測定でクローン1-3Cに比べ3倍以上のPAI-1発現を認めた。
3. ノドマウス尾静脈内に腫瘍細胞を接種する方法で肺転移能を評価したところ、遺伝子導入株1-3C(PAI)はクローン1-3Cと比較して有意に肺転移能が亢進した。
4. 以上より、腫瘍細胞のPAI-1活性はHT-1080において肺転移能を増強する重要な因子であることが明らかになった。

謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導・御校閲を賜りました恩師富田勝郎教授に深甚なる謝意を表します。また終始御指導を戴きました土屋弘行講師に心より感謝いたします。また本研究に対して多大なる御教示を戴きましたウィーン大学生理医学研究所B. R. Binder教授、金沢大学癌研究所細胞制御岡田源作博士に心より感謝いたします。また本実験の遂行にあたり御協力戴きました金沢大学医学部整形外科学講座腫瘍班の先生方に厚く御礼を申し上げます。

なお本論文の要旨の一部は、第28回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会(東京)、第10回日本整形外科学会基礎学術集会(軽井沢)、第5回がん転移研究会総会(東京)において発表した。

文 献

- 1) Tsuchiya H, Tomita K. Prognosis of osteosarcoma treated by limb-salvage surgery: The ten-year intergroup study in Japan. *Jpn J Clin Oncol* 22: 347-353, 1992
- 2) Jaffe N. Weekly high dose methotrexate-citrovorum factor in osteogenic sarcoma. *Cancer* 39: 45-50, 1977
- 3) Rosen G. Preoperative (neoadjuvant) chemotherapy for osteogenic sarcoma: a ten year experience. *Orthopedics* 8: 659-664, 1985
- 4) Meyers PA, Heller G, Healey J, Huvos A, Lane J, Marcove R, Applewhite A, Vlamis V, Rosen G. Chemotherapy for nonmetastatic osteogenic sarcoma: The Memorial Sloan-Kettering experience. *J Clin Oncol* 10: 5-15, 1992
- 5) Friedman MA, Canter SK. The therapy of osteogenic sarcoma: current status and thoughts for the future. *J Surg Oncol* 4: 482-510, 1972
- 6) Goorin AM, Abelson HT, Frei E III. Osteosarcoma: fifteen years later. *N Engl J Med* 313: 1637-1643, 1985
- 7) Romsdahl MM, Lindberg RD, Martin RG. Patterns of failure after treatment of soft tissue sarcoma. *Cancer Treat Symp* 2: 251-258, 1983
- 8) Tsuchiya H, Christ G, Okajima K, Hufnagl P, Seiffert D, Ohno M, Takagi Y, Tomita K, Binder BR. Enhancement of antifibrinolytic activity and thrombogenic activity through consecutive in vivo selections of human fibrosarcoma cells (HT-1080). *Fibrinolysis* 6 (Suppl 2): 60, 1992
- 9) Fidler I. Selection of successive tumour lines for metastasis. *Nature* 242: 148-149, 1973
- 10) Matsuda E, Tsuchiya H, Katsuo S, Tomita K, Abe H, Hufnagl P, Zheng X, Binder BR. Lung metastasis formation and PAI-1 expression in human fibrosarcoma (HT-1080) clones. *Orthop Trans* 18: 593, 1994
- 11) 松田英三. ヒト線維肉腫細胞 (HT-1080) の肺転移形成過程におけるタイプ1・プラスミノゲン・アクチベーター・インヒビター (PAI-1) の役割についての考察. *十全医会誌* 105: 736-744, 1996
- 12) Rasheed S, Nelson-Rees WA, Toth EM, Arnstein P, Gardner MB. Characterization of a newly derived human sarcoma cell line (HT-1080). *Cancer* 33: 1027-1033, 1974
- 13) Christ G, Seiffert D, Hufnagl P, Gessl A, Wojta J, Binder BR. Type 1 plasminogen activator inhibitor synthesis of endothelial cells is downregulated by smooth muscle cells. *Blood* 81: 1277-1283, 1993
- 14) Spies T, DeMars R. Restored expression of major histocompatibility class I molecules by gene transfer of a putative peptide transporter. *Nature* 351: 323-324, 1991
- 15) Felgner PL, Gadex TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, Northrop JP, Ringold GM, Danielsen M. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 7413-7417, 1987
- 16) Freshney RI. *Culture of Animal Cells, A Manual of Basic Technique*, 2nd ed, p137-147, A. R. Liss, New York, 1987
- 17) Bowtell DDL. Rapid isolation of eukaryotic DNA. *Anal Biochem* 162: 463-466, 1987
- 18) Sambrook JF. *Molecular Cloning*, 2nd ed, p7-19, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989
- 19) Wexler H. Accurate identification of experimental pulmonary metastases. *J Natl Cancer Inst* 36: 641-645, 1966
- 20) Fekete E. A comparative morphological study of the mammary gland in a high and a low tumor stain of mice. *Am J Pathol* 14: 557-578, 1938
- 21) Bosma PJ, van den Berg EA, Kooistra T, Siemieniak DR, Slightom JL. Human plasminogen activator inhibitor-1 gene. *J Biol Chem* 263: 9129-9141, 1988
- 22) Pannekoek H, Veerman H, Lambers H, Diergaard P, Verweij CL, Zonneveld AJ, Mourik JA. Endothelial plasminogen activator inhibitor (PAI): a new member of the Serpin gene family. *EMBO J* 5: 2539-2544, 1986
- 23) Chen C, Okayama H. High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol Cell Biol* 7: 2745-2752, 1987
- 24) Ogawa M, Tsushima T, Ohba Y, Ogawa N, Tanaka S, Ishida M, Mori T. Stimulation of DNA synthesis in human fibroblasts by human pancreatic secretory trypsin inhibitor. *Res Commun*

- Chem Pathol Pharmacol 50: 155-158, 1985
- 25) Nardeux PC, Daya-Grosjean L, Landin RM, Andeol Y, Suarez HG. A *c-ras-ki* oncogene is activated, amplified and overexpressed in a human osteosarcoma cell line. Biochem Biophys Res Commun 146: 395-402, 1987
- 26) Kitagawa Y, Ueda M, Ando N, Shinozawa Y, Shimizu N, Abe O. Significance of *int-2/hst-1* coamplification as a prognostic factor in patients with esophageal squamous carcinoma. Cancer Res 51: 1504-1508, 1991
- 27) Joos S, Scherthan H, Speicher MR, Schlegel J, Cremer T, Lichter P. Detection of amplified DNA sequences by reverse chromosome painting using genomic tumor DNA as probe. Hum Genet 90: 584-589, 1993
- 28) Rannie JAN, Ogston D. Fibrinolytic activity in malignant disease. J Clin Pathol 28: 872-874, 1975
- 29) Markus G. The role of hemostasis and fibrinolysis in the metastatic spread of cancer. Semin Thromb Hemost 10: 61-70, 1984
- 30) Jones DS. Sequence of events in experimental metastasis of Walker 256 tumor: light, immunofluorescent and electron microscopic observations. J Natl Cancer Inst 46: 493-502, 1971
- 31) Crissman JD, Hatfield JS, Menter DG, Sloan B, Honn KV. Morphological study of the interaction of intravascular tumor cells with endothelial cells and subendothelial matrix. Cancer Res 48: 4065-4072, 1988
- 32) Kwaan HC. The plasminogen-plasmin system in malignancy. Cancer Metastasis Rev 11: 291-311, 1992
- 33) Sappino AP, Busso N, Belin D, Vassalli JD. Increase of urokinase-type plasminogen activator gene expression in human lung and breast carcinomas. Cancer Res 47: 4043-4046, 1987
- 34) Kellen JA, Mirakian A, Wong A. Single-chain urokinase-type plasminogen activator in a tumor model linked to metastatic potential. In Vivo 2: 155-158, 1988
- 35) Reilly D, Christensen L, Duch M, Nolan N, Duffy MJ, Andreassen PA. Type-1 plasminogen activator inhibitor in human breast carcinomas. Int J Cancer 50: 208-214, 1992
- 36) Foekens JA, Schmitt M, van Putten WLJ, Peters HA, Kramer MD, Janicke F, Klijn JGM. Plasminogen activator inhibitor-1 and prognosis in primary breast cancer. J Clin Oncol 12: 1648-1658, 1994
- 37) Markus G, Camiolo SM, Kohga S, Madeja JM, Mittenman A. Plasminogen activator secretion of human tumors in short-term organ culture, including a comparison of primary and metastatic colon tumors. Cancer Res 43: 5517-5525, 1983
- 38) Grondahl-Hansen J, Christensen IJ, Rosenquist C, Brunner N, Mouridsen HT, Dano K, Blichert-Toft M. High levels of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1 in cytosolic extracts of breast carcinomas are associated with poor prognosis. Cancer Res 53:2513-2521, 1993
- 39) Malone JM, Wangenstein SL, Moore WS, Keown MA. The fibrinolytic system; a key to tumor metastasis?. Ann Surg 190: 342-349, 1979
- 40) 勝尾信一. ヒト線維肉腫細胞 (HT-1080) の肺転移に及ぼすウロキナーゼタイププラスミノゲンアクチベーターおよびプラスミノゲンアクチベーターインヒビター1の影響. 十全医会誌 103: 628-638, 1994
- 41) Zacharski LR, Henderson WG, Rickles FR, Forman WB, Cornell CJ, Forcier RJ, Edwards RL, Headley E. Effect of warfarin anticoagulation on survival in carcinoma of the lung, colon, head and neck, and prostate. Final report of the VA Cooperative Study 75. Cancer 53: 2046-2052, 1984
- 42) Gasic GJ, Gasic TB, Murphy S. Antimetastatic effect of aspirin. Lancet 2: 932-935, 1972
- 43) Stringfellow DA, Fitzpatrick FA. Prostaglandin D2 controls pulmonary metastasis of malignant melanoma cells. Nature 282: 76-78, 1979
- 44) Honn KV, Cicone B, Skoff A. Prostacyclin: a potent antimetastatic agent. Science 212: 1270-1272, 1980

Transfection of Type 1-Plasminogen Activator Inhibitor cDNA Potentiates Lung Metastasis in Human Fibrosarcoma Cell Line HT-1080 Chiaki Sunayama, Department of Orthopaedic Surgery, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 — J. Juzen Med Soc., 107, 526 — 536 (1998)

Key words type 1-plasminogen activator inhibitor, gene transfection, human fibrosarcoma cell line HT-1080, lung metastasis

Abstract

The present study was performed to examine the effect of type 1-plasminogen activator inhibitor (PAI-1) on hematogenous lung metastases by transfection of PAI-1 cDNA into the human fibrosarcoma cell line HT-1080. The monoclonal cell line 1-3C was established from HT-1080 in 1994 and shows low expression of PAI-1 antigens and low metastatic potential into the lungs of BALB/c-nu/nu athymic mice. Human PAI-1 cDNA (1,426 bp) was ligated into the *EcoR* I - *Xba* I polylinker site of the mammalian expression vector pcDNA1neo. That the plasmid carried the PAI-1 cDNA in the sense orientation was confirmed by restriction enzyme analysis. The construct, pcDNA1neo-PAI, was introduced into the parental clone 1-3C by lipid-mediated DNA transfection. After 4 weeks of selection for resistance to geneticin (G418), 5 transfectant clones expressing a high level of PAI-1 antigen were isolated and used for further characterization. By employing Southern blot analysis, a 23 kbp band exhibiting authentic genomic PAI-1 DNA was confirmed in all clones analyzed, whereas the bands of exogenous PAI-1 at various sizes of the DNA fragment were found only in the transfectants. Antigen levels of PAI-1 and urokinase-type plasminogen activator (u-PA) in the conditioned media derived from each clone were measured by a sandwich ELISA using a monoclonal catching antibody and a polyclonal detecting antibody. A 3 to 4-fold increase in the expression of PAI-1 proteins was noted in the transfectant clones when compared to the parental clone 1-3C. On the other hand, the expressed levels of u-PA in these clones was not change after DNA transfection procedures. The metastatic potentials of each clone were evaluated by counting metastatic colonies formed in the lungs of BALB/c-nu/nu athymic mice 3 weeks after inoculation with the respective tumor cells into the tail vein. Transfectants with a high level of PAI-1 expression showed a significant increase in both the number and incidence of lung metastases compared to the parental clone 1-3C. These findings suggest that PAI-1 expression is a key factor regulating the metastatic potential of human tumor cells.