

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

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/2297/9248

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

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)

松 田 英 三

ヒト線維肉腫細胞 (HT-1080) から限界希釈法によって種々のタイプ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) レベルを発現するクローンを作製した。それらをヌードマウスの尾静脈に接種後、肺の表面に形成される肺転移コロニーの数を測定することによって各クローンの肺転移能を評価し、同細胞における PAI-1 と肺転移能との関係について考察した。線溶系の各因子の抗原レベルの測定は、ELISA によって行い、安定した PAI-1 と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) の発現を呈した4つのクローンを実験に用いた。各クローンの組織因子 (tissue factor, TF) 活性は、細胞表面にプロトロンビン複合体を加えることによって活性化されるプロトロンビン複合体中の活性型第X因子が特異的に分解する合成基質を測定することにより評価した。各クローンの PAI-1 と u-PA の mRNA レベルは、抗原レベルと一致していた。腫瘍細胞をヌードマウスの尾静脈へ接種して3週間後に形成された肺転移コロニーの数の測定により評価された肺転移能は、各クローン間に有意な差が認められ、高 PAI-1 および TF 活性を発現するクローンほど高肺転移能を有していた。高転移型クローンは低転移型と比べ、内皮細胞への接着能に関しては差異が認められなかったが、腫瘍細胞が肺内の血管壁に接着後は、高転移型クローンの方が接着部位により長く停留し続けることが分かった。停留に引き続く、細胞外基底膜への浸潤能に関しては、クローン間において差がなかった。接着部位に停留するために決定的な要因であるとされる腫瘍周囲の血栓形成を阻止する目的で、ヘパリンを腫瘍細胞接種後にヌードマウスに投与したところ、PAI-1, TF 共に低レベルで低転移型のクローンでは、薬剤の効果は有意ではなかったが、高 PAI-1 および TF 活性を発現する高転移型クローンを接種したマウスでは、静注後、48時間の時点で肺内に停留する腫瘍細胞数は著減し、肺転移コロニーの数も低下した。PAI-1 活性を抑制するモノクローナル抗体の投与によってもヘパリンと同様な効果が認められた。この結果、この細胞系において腫瘍細胞の PAI-1 および TF 活性は、その肺転移能の決定的な要因であることが明らかとなり、両因子の抑制によりこの細胞系の肺転移形成が抑制できることが示された。

Key words human fibrosarcoma (HT-1080), lung metastasis, plasminogen activator, tissue factor, type 1-plasminogen activator inhibitor

腫瘍細胞が、原発巣より血行性に転移する際、個々の腫瘍細胞の持つ血液凝固活性および線溶活性がそれらの遠隔転移能と密接な関連を持つことは、諸家により報告されている。その多くの報告で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) や u-PA 受容体 (u-PA receptor, u-PAR) 等により惹起される高線溶活性が、転移のプロセスにおいて重要な要因であるとしているが、Tsuchiya らはヒト線維肉腫細胞 (HT-1080) をヌードマウスの生体内で継代することにより低および高転移能を有する細胞亜系株 (HT-1080-P2, P4, P6) を選択し、それらの肺転移能はむしろ線溶活性を抑制するタイプ1・プラスミノゲン・アクチベーター・インヒビター (type 1-plasminogen activator inhibitor, PAI-1) ならびに組織因子 (tissue factor, TF) と強い相関関係を

持つことを報告した¹⁾。今回の実験では、まず複数株の HT-1080 のクローンを作成し、しかる後 PAI-1 レベルによるスクリーニングを行ない、それらの PAI-1 レベルおよび TF レベルが肺転移能と相関するか否かを考察した。さらに肺転移形成における PAI-1 と TF の役割を検討すると共に、両レベルの抑制により肺転移抑制が可能かどうかを検討した。

材料および方法

1. 腫瘍細胞と培養法

本研究にはヒト線維肉腫細胞株 HT-1080 [American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, USA から購入] を使用した。またこの HT-1080 細胞株からクローンを限定希釈法 (マイクロウェル法)²⁾により作製し使用した。すなわち、5個/ml に

平成8年9月20日受付, 平成8年11月29日受理

Abbreviations: BSA, bovine serum albumin; FCS, fetal calf serum; GAPDH, glyceraldehyde phosphate dehydrogenase; HUVEC, human umbilical vein endothelial cell; mAb, monoclonal antibody; NK, natural killer; PA, plasminogen activator; PAI-1, type 1-plasminogen activator inhibitor; PBS, phosphate-buffered saline; PCI, protein C

希釈した細胞浮遊液を96ウェル・プレート (Coster, Cambridge, UK) にて1ウェルあたり50 μ l, 37°Cの恒温器 (5% CO₂) で静置培養し, 2週間後, 正円形のコロニーを一つだけ形成したウェルを顕微鏡下で確認後分離した。ただしこの操作では, 得られた細胞株がクローンであることを直接確認できないため, クローンである確率を高めるために同じ操作を, 分離されたクローンに対し2回繰り返した。クローンは10回継代され, その間 PAI-1 および u-PA の抗原レベルの測定を繰り返し, 安定した発現をすることを確かめた。10回の継代の間に, 安定した抗原レベルを示さなかった細胞株に対してはレベルが安定するまでクローンの分離動作を繰り返した。最終的に4つの細胞株 (1-3B, 1-3C, 23-4B', 26-6) が安定したクローンであることを確認し, 実験に使用した。抗原レベルの値は4回目の継代から16回目の継代まで, 計5回の ELISA (Technoclone Inc., Vienna, Austria) による測定で得た値の平均と標準偏差をとった。

これらの細胞は10%非働化牛胎児血清 (fetal calf serum, FCS, HyClone, Utah, USA) と1%ペニシリン・ストレプトマイシン液 (Gibco, New York, USA) を含有する RPMI1640 培地 (Sigma, St. Louis, USA) を用い, 37°Cの恒温器 (5% CO₂) で培養した。

II. PA および PAI-1 抗原レベルの測定

腫瘍細胞の持つ組織プラスミノゲン・アクチベーター (tissue-type plasminogen activator, t-PA), u-PA および PAI-1 レベルの評価は, 検査培地中の各抗原レベルを ELISA によって測定することにより行なった。検査培地は無血清 RPMI 培地を増殖期の腫瘍細胞存在下で24時間培養した後に回収し, 低速遠沈 (2000g, 4°C, 5分) により細胞片等を除去したものである。検査培地は測定に用いられるまで-70°Cで保存した。ELISA の検出限度は, t-PA および u-PA では1ng/ml 未満, PAI-1 で3ng/ml 未満であり, t-PA ELISA では, 遊離型および結合型 t-PA が測定され, u-PA ELISA では, 1本鎖および2本鎖結合型 u-PA が, PAI-1 ELISA では, 活性型および潜在型 PAI-1 と, 結合型 PAI-1 が測定される。

III. TF 活性の測定

細胞表面の TF 活性は, Schoerer らの方法に改良を加えて行なった³⁾。簡潔に記載すると, 24ウェル・プレート (Coster) 上に培養した腫瘍細胞を燐酸緩衝生理食塩水 (phosphate-buffered saline, PBS) (pH7.4) にて洗浄後, プロトロンビン複合体 (CaCl₂ 含有第II/VII/IX/X凝固因子複合体, Sigma) を加え, 37°Cにて15分培養した後に, EDTA 含有 Tris 緩衝液にて反応を終了させた。反応後, TF とプロトロンビン複合体の反応によって生じた活性型第X因子を, それによって特異的に分解される合成基質 S-2222 (KABI Diagnostica, Stockholm, Sweden) の吸光度から測定した。2ml の蒸留水によって溶解した1パイアルの組織トロンボプラスチン (Sigma) を1U/ml の TF 活性とみなして標準曲線を作成し, 各腫瘍細胞の TF 活性を定量化した。

IV. mRNA の解析

全 RNA は, フェノール・クロロホルム抽出法により抽出し⁴⁾, 各 mRNA レベルはノーザン・ブロッティングにより視覚化し

た。簡潔に記載すると, 全 RNA を6%ホルムアルデヒド含有1.2%アガロース・ゲルにて電気泳動後, 非荷電型ナイロン, デュラロン UV (Stratagene, La Jolla, USA), に10×SSC を媒介として毛管転写させ, しかる後, 紫外線クロスリンカー (Stratagene) を用いて RNA プロットをナイロンに固定した。ヒト PAI-1, ヒト u-PA, ヒト u-PA 受容体 (u-PA receptor, u-PAR), ラット GAPDH (glyceraldehyde phosphate dehydrogenase) の cDNA は, ウィーン大学生理医学研究所 B. R. Binder 教授より供与されたものを使用した。これらの cDNA をランダムプライマー DNA ラベリングキット (Amersham, Buckinghamshire, UK) を用いて ³²P-dCTP (Du Pont, Boston, USA) で標識し, プローブを作成した。RNA を固定したナイロンを57°Cで1時間, プレハイブリダイゼーションした後, 各 cDNA プローブを含有したハイブリダイゼーション緩衝液にて, 57°Cで一晩ハイブリダイゼーションを行ない, その後ナイロンを5% SDS, 0.2×SSC によって57°Cで10分間洗浄し, 乾燥後, XAR フィルムに露出した⁵⁾。現像したフィルムを密度計 (Hirschmann, Ebersloft, Germany) にてスキャンし, ラット GAPDH メッセージを対照として, mRNA レベルの定量化を行なった。

V. PAI-1 および u-PA 抗体を用いた免疫組織染色

腫瘍細胞の発現する PAI-1 および u-PA を視覚化するためにアビジン・ビオチン・ペルオキシダーゼ複合体 (avidin-biotin-complex immunoperoxidase, ABC) 法を用いて免疫組織染色を行った⁶⁾。各クローンの細胞浮遊液をカバー・スリップ上にメタノール・アセトン (1:1) 混合液により固定後 (-20°C, 2分), PBS により洗浄し, 1%牛胎児血清アルブミン (bovine serum albumin, BSA) 含有 PBS をスライド上に加え37°Cで30分培養した。その後, 抗ヒト PAI-1 マウス IgG あるいは抗ヒト u-PA マウス IgG (Technoclone Inc.) を加え37°Cで1時間培養した。対照実験として, 非特異的に結合する抗ヒトプロテインCインヒビター (protein C inhibitor, PCI) マウス IgG (Technoclone Inc.) を PAI-1 および u-PA 抗体の代わりに使用した。予め HT-1080 が PCI を分泌しないことは, PCI モノクローナル抗体を利用した ELISA により確かめた。抗体と反応させた後, 前回と同様に洗浄し, 抗マウス IgG ビオチン化ロバ IgG (Amersham) を加え, 37°Cにて培養する。1時間後, 再度洗浄し, ストレプタビジン・ビオチン化過酸化酵素複合体 (Amersham) を加え37°Cで1時間培養した後, 結合した過酸化酵素の存在は, 0.05% 3, 3'-ジアミノベンズアミジン・テトラハイドロクロライド (Sigma) と0.01%過酸化水素水含有 0.05M Tris 緩衝液の混合液を加えることにより, 視覚化した。

VI. 肺転移コロニー形成能の測定

各クローンの肺転移能の評価は, Wexler の方法に従った⁷⁾。3×10⁵個の腫瘍細胞を含有する0.2mlの細胞浮遊液をヌードマウス (BALB/c nu/nu, 5~6週齢, 以降で使用されるマウスも同じ) の尾静脈内に接種し, 3週間後に剖検し肺を摘出して, 気管内に黒インク (パイロット, 東京) 15ml, 蒸留水 85ml, アンモニア水 (Sigma) 2滴からなる染色液を約2ml ゆっくり注入後, Fekete 固定液 (70%アルコール 100ml, 37%ホルムアルデヒド液 (Sigma) 10ml, 酢酸 (Sigma) 5ml) によって固定し, 実

体顕微鏡 (×20) にて、形成されたコロニーを観察した。コロニーは肺表面に白く抜けて見え、直径 50 μ m 以上のものを数えて肺転移数とした。肺転移数の測定には各クローンあたり 6～9 匹のマウスを使用し、それらの平均および標準偏差をとった。

VII. 接着能及び浸潤能の測定

腫瘍細胞のヒト臍帯静脈内皮細胞 (human umbilical vein endothelial cell, HUVEC) への接着能は Dejana⁸⁾ の方法により評価した。⁵¹Cr ([⁵¹Cr]-Sodium chromium, Du Pont) によって標識された腫瘍細胞を無血清培地中に浮遊させ、HUVEC が飽和状態となっている 24 ウェル・プレート上で、通常の培養条件で培養した。30 分後、培地を回収し 1% BSA 含有 PBS にて 2 回洗浄し、しかる後 1M 水酸化ナトリウム-0.5% SDS にて、腫瘍細胞の接着した HUVEC を溶解した。回収培地、洗浄液、HUVEC 溶解液の合計によって得られた全放射能に対する

HUVEC 溶解液中の放射能の百分率で接着能を表した。接着能の値は 3 回の実験の平均および標準偏差をとった。

基底膜への腫瘍細胞の浸潤能の評価は Repesh⁹⁾ の方法に従った。簡潔に記載すると、¹²⁵I ([¹²⁵I]-iodo-2'-deoxyuridine, Du Pont) によって標識された腫瘍細胞を、10% FBS 含有培地中に浮遊させ、合成基底膜であるマトリゲル (Collaborative Research, Bedford, USA) によってコートされたトランスウェル・チャンバー・プレート (Coster) の上部チャンバーで、通常の培養条件で培養した。72 時間後、合成基底膜を貫通した下部チャンバーの培養液中の腫瘍細胞およびトリプシンによって分離させた膜下部に付着していた腫瘍細胞をガンマ・カウントし、全放射能との百分率により浸潤能を表した (浸潤能 (%)) = 下部チャンバーの培養液中および膜下部に付着していた腫瘍細胞 (cps) × 100 / 全放射能 (cps)。浸潤能の値は 3 回の実験の平均および標準偏差をとった。

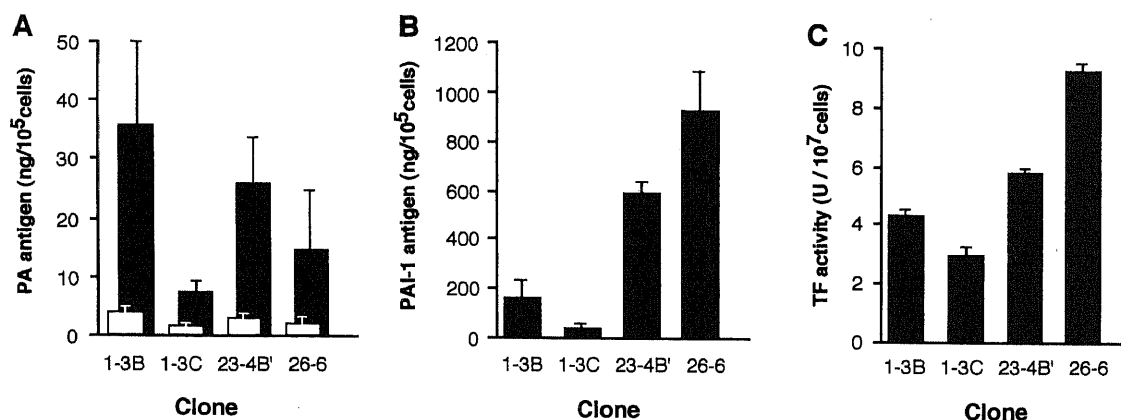


Fig. 1. Levels of PA antigens (A) and PAI-1 antigen (B) in media conditioned for 24 h and TF activity (C) on cell surface of 4 different HT-1080 clones. PA antigens (□, t-PA; ■, u-PA) and PAI-1 were evaluated by measuring antigen levels in media conditioned for 24 h using ELISA. Values shown in this figure indicate averages and standard deviations of repeated antigen measurements between the 4th and 16th passages of the monoclonal cell lines. TF activity on the cell surface was evaluated by measuring prothrombin complex formation and chromogenic substrate conversion. Values shown in this figure indicate means and standard deviations from the three experiments.

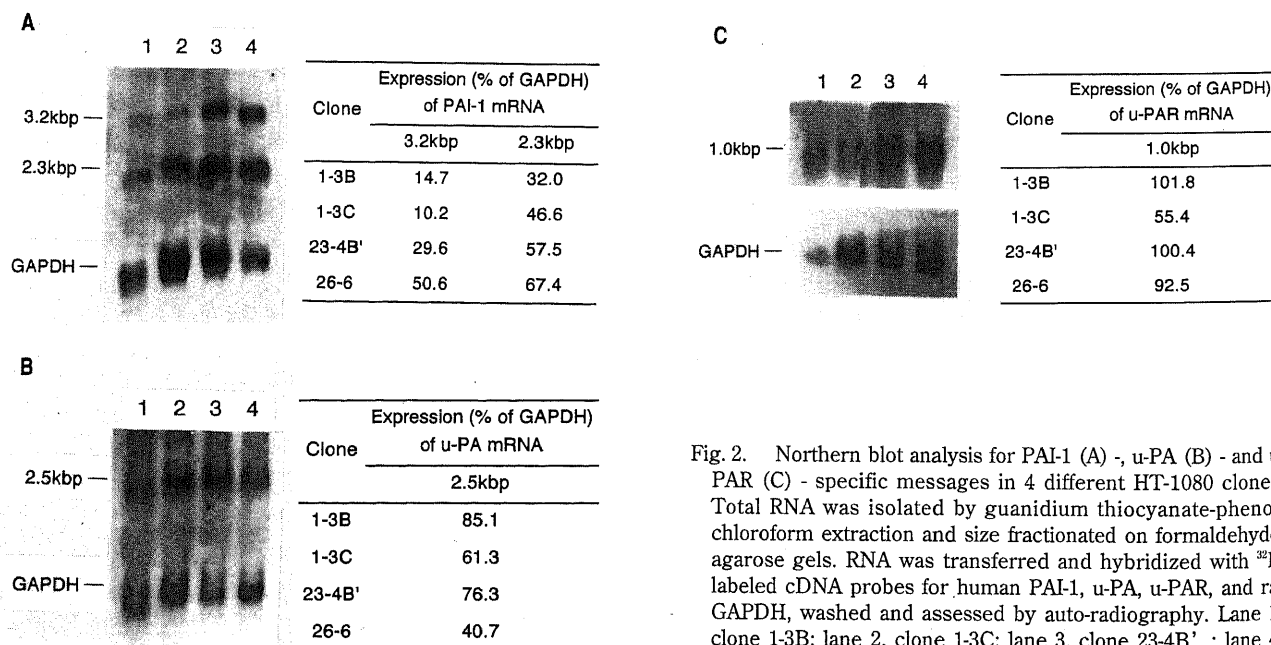


Fig. 2. Northern blot analysis for PAI-1 (A) -, u-PA (B) - and u-PAR (C) - specific messages in 4 different HT-1080 clones. Total RNA was isolated by guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction and size fractionated on formaldehyde-agarose gels. RNA was transferred and hybridized with ³²P-labeled cDNA probes for human PAI-1, u-PA, u-PAR, and rat GAPDH, washed and assessed by auto-radiography. Lane 1, clone 1-3B; lane 2, clone 1-3C; lane 3, clone 23-4B'; lane 4, clone 26-6.

Ⅶ. ノードマウスの循環内に移行した腫瘍細胞の経時的観察
ノードマウスに静注後の腫瘍細胞の循環内での動向を Fidler
らの方法により観察した¹⁰⁾. ^{125}I [^{125}I]-iodo-2'-deoxyuridine, Du
Pont) によって放射能標識された腫瘍細胞をノードマウスの尾
静脈に静注後, それぞれ10分, 90分, 6時間, 24時間, 48時間

で剖検し, 肺, 肝臓を摘出し, 臓器を70%エタノールによって
3日間洗浄し, 酸可溶性の ^{125}I を洗い流した後, 細胞内に取り
込まれている放射活性のみをカウントした. 静注した腫瘍細胞
の全放射活性中の, 摘出臓器の放射活性の百分率を腫瘍細胞の
標的臓器への着床率として評価した.

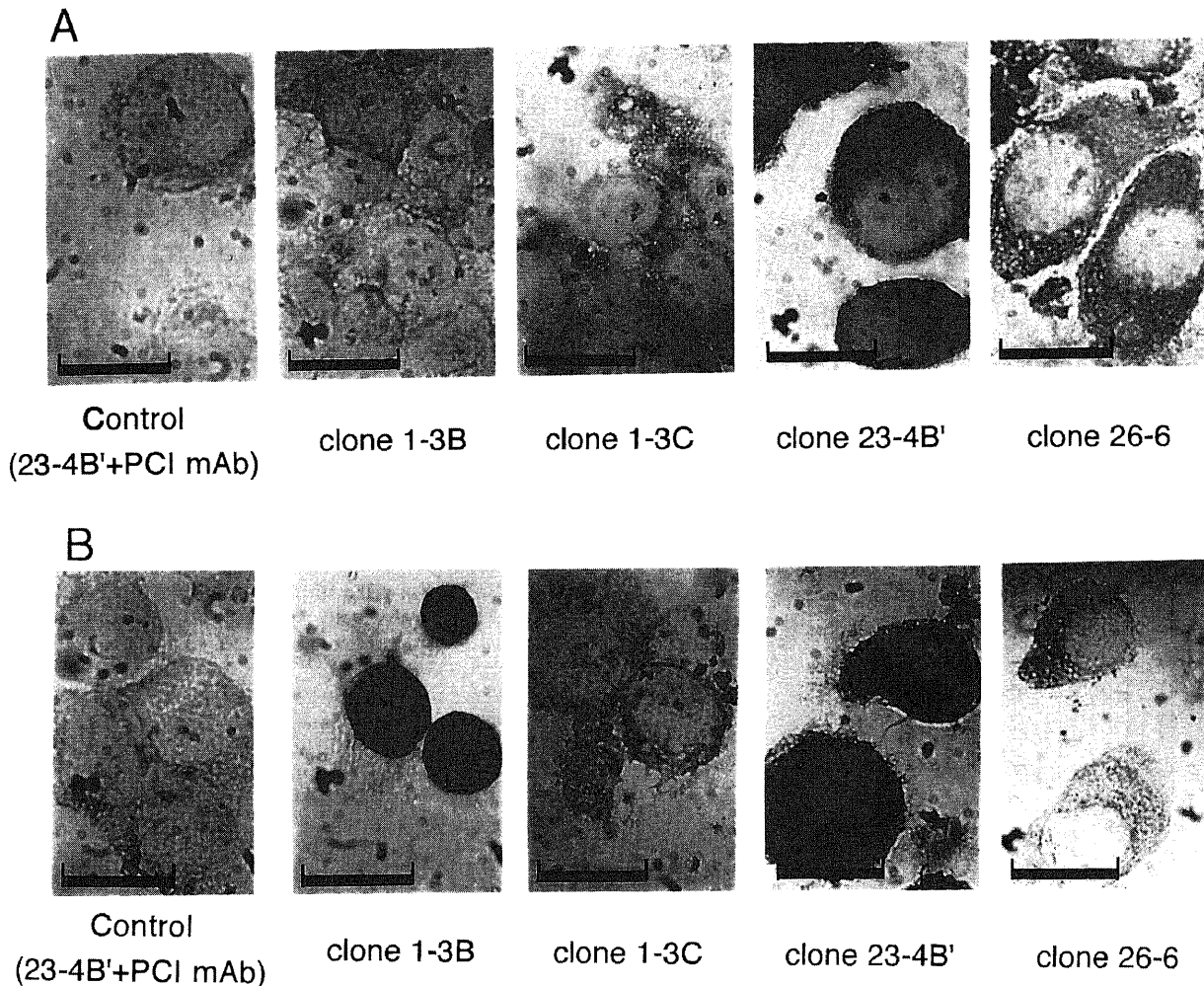


Fig. 3. Photomicrographs of 4 different HT-1080 clones immunostained using anti-PAI-1 monoclonal antibody (A) and anti-u-PA monoclonal antibody (B). Suspended tumor cells were fixed on glass slides using methanol-acetone and incubated with either mouse monoclonal IgG against human PAI-1 or u-PA. In control experiment, the cells were incubated with anti-PCI monoclonal antibody (PCI mAb). The presence of bound antibodies were visualized using the avidin-biotin complex method. Scale bars, $10\mu\text{m}$.

Table 1. Endothelial cell adhesion, invasive potential and number of pulmonary colonies resulting from intravenous injection of HT-1080 clones

Clone	Adhesiveness to EC (%)	Invasive potential through Matrigel® (%)	Number of pulmonary colonies 3 weeks after injection (colonies/lung)
1-3B	64.1 ± 1.0	27.6 ± 3.6	4.38 ± 8.40
1-3C	71.1 ± 3.5	23.5 ± 0.8	12.5 ± 12.1
23-4B'	65.9 ± 2.1	27.9 ± 4.4	$226 \pm 142^*$
26-6	72.3 ± 1.5	22.0 ± 1.6	$556 \pm 272^*$

Adhesiveness of [^{51}Cr]-labeled tumor cells to HUVECs was evaluated by a monolayer adhesion assay. Invasive potential of [^{125}I]-labeled tumor cells was tested using Matrigel® coated artificial membranes. Number of pulmonary colonies formed on nude mouse lung was counted under dissecting microscope ($\times 20$). Statistical difference was proved by unpaired t-test (* $p < 0.001$ versus both clone 1-3B and 1-3C). Values regarding adhesiveness and invasive potential indicate means and standard deviations from the three experiments. Values regarding number of pulmonary colonies indicate means and standard deviations from the nine experiments.

Ⅱ. 肺転移形成に及ぼすヘパリンによる凝固活性の抑制と抗ヒトPAI-1モノクローナル抗体によるPAI-1活性の抑制の効果

ヌードマウスに対し、腫瘍細胞の静注に伴ってヘパリン (Roche, Basel, Swiss) もしくは抗ヒト PAI-1 モノクローナル抗体, 5PAI12 (Technoclon Inc.), の投与を行い、腫瘍細胞の肺毛細血管床への着床 (静注48時間後) およびその後の肺転移巣形成 (11日後) に対する効果を判定した。事前に 5PAI12 の PAI-1 活性に対する抑制効果は、ELISA により確認した (データ表示せず)。ヘパリン (50ユニット) は、ネズミ腹腔内に腫瘍細胞の静注後直後と6時間後に投与し、5PAI12 (180 μ g) は、腫瘍細胞の静注後、直ちに静注した。

成績

Ⅰ. HT-1080 クローンの作製

HT-1080 の親株から4つのクローンが樹立された。クローン 1-3B は、高い u-PA レベルと、低い PAI-1 レベルを示し、クローン 1-3C は、u-PA, PAI-1 共に低い抗原レベルを発現した。クローン 23-4B' は、両者共に高い抗原レベルを示し、クローン 26-6 は、低い u-PA レベルと、高い PAI-1 レベルを示した (図 1)。t-PA 抗原レベルはいずれのクローンにおいても、u-PA レベルより低く、両プラスミノゲン・アクチベーター (plasminogen activator, PA) 中の t-PA の占める割合は、約10%であった。TF レベルの発現に関しては、クローン 26-6 が最も高くクローン 1-3C が最も低く、PAI-1 レベルとの間に正相関が認められた ($r=0.975$)。

Ⅱ. 各モノクローナル細胞株の mRNA レベルの発現

PAI-1 のメッセージは3.2および2.3kbp の2カ所にバンドを形成し (図 2A), 高い抗原レベルを発現したクローン 23-4B' および 26-6 は、高い mRNA レベルを示した。各クローン間の PAI-1 レベルの差が主に 3.2kbp のバンドに表れていることが顕

著であり、PAI-1 の発現に関して抗原レベルと mRNA レベルが一致することを認めた。u-PA のメッセージは、2.5kbp の部位にバンドを形成し、クローン 1-3B および 23-4B' においてその発現が比較的高く、PAI-1 と同様、抗原レベルとの間に正相関が確認された (図 2B)。u-PAR は 1.0kbp の部位に発現が認められ、クローン 1-3C のみ他の3つのクローンより、その発現が

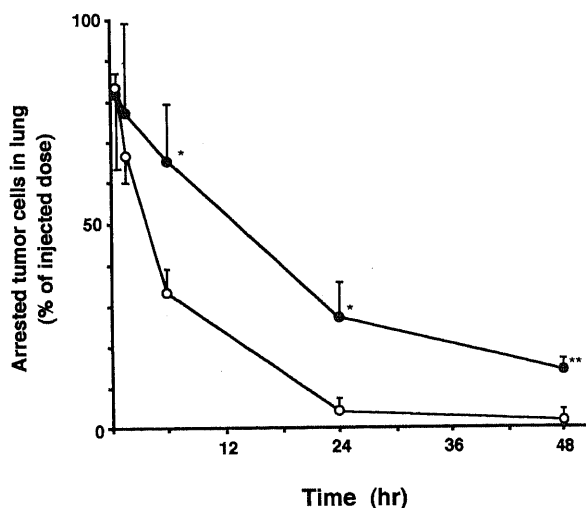


Fig. 4. Arrested tumor cells (clones 1-3C and 26-6) in nude mice lungs after tail vein injection. Tumor cells (3×10^5) labeled by [125 I]-deoxyuridine were inoculated into the tail veins of nude mice. Mice were autopsied at 10 min, 90 min, 6 h, 24 h and 48 h after inoculation. Their lungs were collected and washed in 70% ethanol for 3 days before gamma-counting. Lung radioactivity was expressed as the percentage of total radioactivity. ○, clone 1-3C; ●, clone 26-6. Statistical difference was proved by unpaired t-test (* $p < 0.05$ versus clone 1-3C, ** $p < 0.01$ versus clone 1-3C). Vertical bars indicate $\bar{x} \pm SD$ ($n=5$).

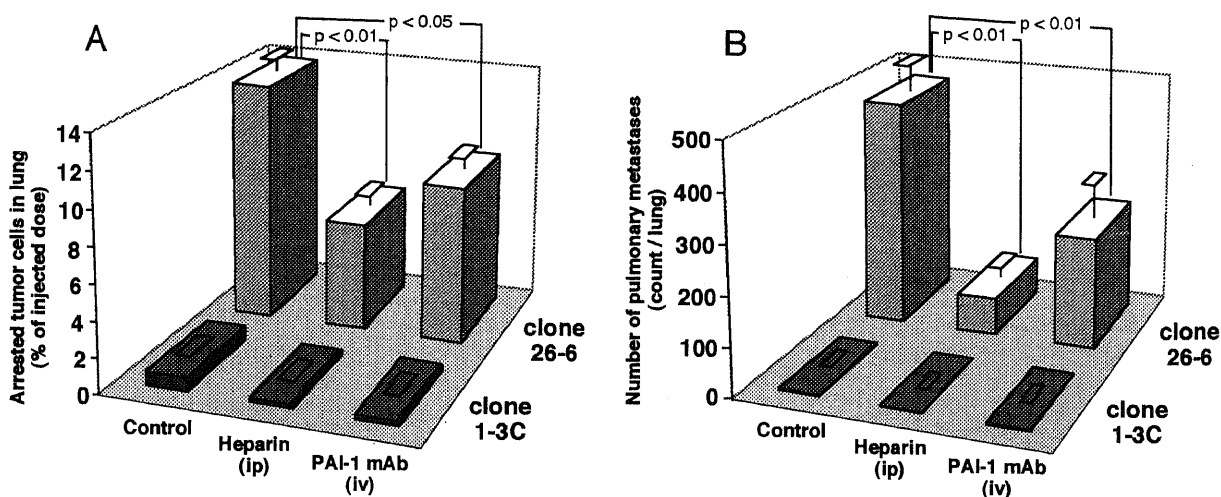


Fig. 5. Effect of heparin and anti-PAI-1 monoclonal antibody (PAI-1mAb) on the retention of tumor cells in nude mice lungs (A) and on lung metastasis formation (B). Mice were treated with either saline as control or heparin or recombinant PAI-1 mAb. The effect of each pretreatment was tested on both their initial arrests in the lung vasculature (using [125 I]-labeled tumor cells) and their abilities to form lung metastases (using a lung colonization assay). Heparin (50 units) was injected intraperitoneally (ip) at 0 min and 6 h after tumor cell injection. PAI-1 mAb (180 μ g) were injected intravenously (iv) immediately after tumor cell injection. Nude mice injected with [125 I]-labeled tumor cells were sacrificed at 48 h after tumor cell injection and tumor cells arrested in the lungs were evaluated by gamma-counting. Mice were autopsied for a colonization assay at 11 days after tumor cell injection, and pulmonary colonies formed on the lungs were counted under a dissecting microscope. Statistical difference was proved by unpaired t-test. Vertical bars indicate $\bar{x} \pm SD$ ($n=5$).

低く、他の3つのクローンの間に差はなかった(図2C)。クローン1-3Cは他のPAI-1およびu-PAにおいてもmRNAレベルが低かった。

Ⅲ. 免疫組織染色

PAI-1抗体を結合させた場合は、クローン23-4B'および26-6において、より濃厚な染色が観察され(図3A)、一方、u-PA抗体を用いた場合は、クローン1-3Bと23-4B'で、より濃厚な染色が見られた(図3B)。各クローンの免疫組織染色の結果は、抗原レベルおよびmRNAレベルと矛盾しなかった。

Ⅳ. 各クローンの肺転移コロニー形成能

腫瘍細胞をヌードマウスの尾静脈に接種後に形成される肺転移コロニーの数は、4つのクローンの間に明らかな有意差が認められた(表1)。クローン1-3Bおよび1-3Cが接種された際は、肺表面上には、極めて僅かなコロニーしか形成されなかったが、クローン23-4B'の静注後は著明に多数のコロニーが観察され、クローン26-6では、さらに多数のコロニーが形成された。各クローンの肺転移コロニー形成能と、PAI-1レベルおよびTFレベルとの間に強い正の相関が認められた(それぞれ $r=0.97$, $r=0.98$)。いずれのクローンも肝転移コロニーは形成しなかった。

Ⅴ. 各クローンの接着能および浸潤能

各クローンの持つ内皮細胞への接着能は、64%から73%を示し、クローン間に有意差は認められなかった(表1)。合成基底膜(マトリゲル)への浸潤能に関しても4つのクローンは、20%から32%の間で有意差のない値を示した。

Ⅵ. 腫瘍細胞接種後の肺内腫瘍細胞数の経時的観察

実験には、特にPAI-1、TFそして肺転移能に如実な差が認められた2つのクローン1-3Cとクローン26-6が用いられた。静注後10分でほとんどの腫瘍細胞が肺の毛細血管床に着床し(80

～100%)、90分後まではクローン1-3Cと26-6の間には有意差は見られなかったが、6時間後の計測でクローン26-6の方が、より多く肺血管内に停留し($p<0.05$)、48時間後、その差は一層明らかとなった($p<0.01$)。肝内の腫瘍細胞数も同時に測定されたが、この腫瘍細胞は肝内にほとんど停留しないようであった(図4)。

Ⅶ. 肺転移形成に及ぼすヘパリンによる凝固活性の抑制と抗ヒトPAI-1モノクローナル抗体によるPAI-1活性の抑制の効果

クローン1-3Cを接種したマウスでは、ヘパリンの腹腔内投与および抗PAI-1抗体の静脈内投与の効果は対照の生食水処置と比べて、有意ではなかったが、クローン26-6では、ヘパリンの腹腔内投与により静注48時間後に肺血管中に観測された¹²⁵I-腫瘍細胞の数は生食水処置マウスのものと比べて有意な減少が認められた($p<0.01$) (図5A)。さらに腫瘍細胞静注後11日目の肺転移コロニーの形成数もヘパリン投与群の方が有意に少なかった($p<0.01$) (図5B)。抗PAI-1抗体の静脈内投与によっても、クローン26-6を接種したマウスでは静注48時間後に肺内に観測された腫瘍細胞の数および細胞静注後に形成される肺転移コロニーの数の両方の減少が認められた(それぞれ $p<0.05$, $p<0.01$)。

考 察

癌の病態において凝固系および線溶系が深く関わっていることは、癌患者における血栓症の合併率が高いことから、前世紀より注目されていた¹⁾。しかし、実際にそれらが癌の悪性度によどのような役割を果たしているのかが解明され始めたのは腫瘍細胞レベルでの凝固系及び線溶系のパラメーターの測定が可能になった10数年前からである。そもそも線溶系は凝固系が活性

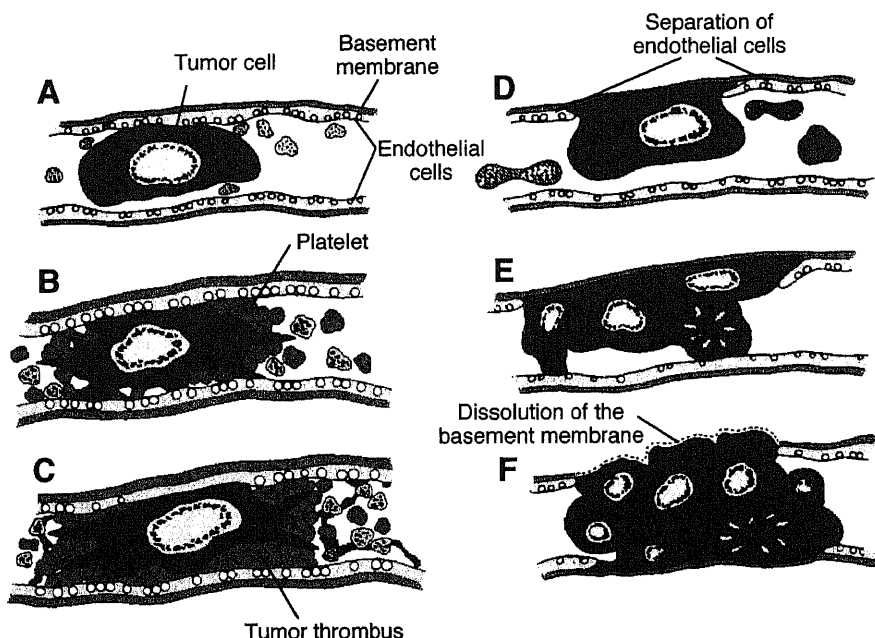


Fig. 6. The proposed sequence of the arrest and extravasation portion in the metastatic cascade. (A) Adhesion phase. A tumor cell is initially arrested by close contact with endothelial-tumor cell plasma membrane. (B) Lodgement phase I. Activation and aggregation of platelets occur immediately after the tumor cell arrest. (C) Lodgement phase II. A platelet thrombus is developed in association with arrested tumor cell. (D) Invasion phase I. Endothelial cells are separated with tumor cell lodgement to basement membrane. (E) Invasion phase II. Tumor cells proliferate in the vessel. (F) Invasion phase III. Basement membrane is dissolved.

化された末の最終生産物であるフィブリン塊を PA がプラスミノーゲンを活性化し溶解するシステムである。PA には他にプラスミンを介して血中に存在する潜在性のメタロプロテナーゼ(コラゲナーゼ, ゲラチナーゼ, ストロメリジン)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, エラスチン, ビトロネクチン等を分解する働きもある。ゆえに PA を大量に生産する腫瘍細胞は基底膜を高能率に分解できるため周囲組織へ浸潤することが容易であり, その結果, 遠隔転移を形成しやすい。PA には t-PA と u-PA の 2 つのタイプがあるが, 臨床上, 悪性度と関連が深いのは u-PA レベルの方であり, これは, u-PA の前駆体が, その抑制体である PAI-1 に抑制されないこと, t-PA には u-PAR のような細胞表面の受容体がないことなどが要因として考えられる。比較的作用機序の解明されている u-PA に対し, PAI-1 の方は, 腫瘍学での分野での役割は, 未だ解明されていない。むしろ臨床的悪性度と関連の高い u-PA を抑制するため良好な予後との関連について触れている報告の方が多いが, 近年になって, PAI-1 と腫瘍の悪性度との関連に, 徐々に注目が集められてきている。Jänicke らと Reilly らは, 乳癌患者の切除組織中の u-PA・PAI-1 抗原レベルの高さと臨床的悪性度が相関することを指摘しているが, PAI-1 の上昇は u-PA の上昇に対するフィードバック機構ではないかと結論している¹²⁾¹³⁾。一方, 乳癌の予後¹⁴⁾¹⁵⁾や胃癌の遠隔リンパ節転移を起こす頻度が¹⁶⁾¹⁷⁾, 癌の組織中の PAI-1 の抗原レベルと相関する一方で, u-PA のレベルとは相関が見られなかったという, PAI-1 を u-PA とは独立した, 手術後の再発率および予後の悪さの指標とする報告も少なくない。Markus らの, 転移腫瘍組織の u-PA 活性が原発巣のそれより明らかに低いという報告も, PAI-1 が高レベルの腫瘍細胞が, 遠隔転移を形成しやすいことを示唆している¹⁸⁾。これら, PAI-1 が本来 u-PA を抑制する蛋白であるにもかかわらず, 臨床的悪性度と関連しているというデータは, 未だ明らかにされていない PAI-1 の遠隔転移形成における機能的役割について, いくつかの仮説を生んでいる。Kristensen や Pyke らは, Lewis 肺癌組織中の u-PA と PAI-1 抗原および mRNA レベルを観察した結果, 腫瘍組織の破壊が見られない組織では u-PA と PAI-1 の両者を含有することに対し, 組織破壊が著しい部位は u-PA のみを含有することから, PAI-1 が u-PA を介した蛋白質の溶解を抑制することにより, 腫瘍細胞を守っている可能性を主張している¹⁹⁾²⁰⁾。腫瘍細胞の持つ脈管形成能は, 遠隔転移能と強く相関するが²¹⁾, Montesano らの, 腫瘍細胞が転移部位にて脈管形成をする際に PAI-1 が重要であるという報告からも, 新たな PAI-1 の遠隔転移形成における機能的役割が示唆されている²²⁾。

一方凝固系もまた癌の悪性度に大きく関与している。腫瘍細胞周囲で凝固系が活性化すると, 速やかに細胞周囲に血小板とフィブリン塊によってなる腫瘍塞栓が形成され, それは種々の接着因子を有するため, 内皮細胞への接着能を上昇させる。また, より大きな腫瘍塞栓の形成は, 細胞の接着後, 血流による剪断力から細胞を保護する¹¹⁾。Gorelik は, 腫瘍塞栓の存在がナチュラル・キラー細胞 (natural killer cell, NK cell) 等の腫瘍細胞に対する細胞毒性を減少させる事実から, 腫瘍塞栓は, NK 細胞等の宿主防御機構による循環内からの排除から腫瘍細胞を保護していると報告している²³⁾。臨床的にもワーファリン等による塞栓の発現抑制が遠隔転移阻止に有効であることは既に報告されており²⁴⁾, 多くの施設にて臨床応用されている²⁵⁾。

TF は, 凝固反応の引き金となる糖蛋白で多くの細胞中に存在し, 腫瘍細胞の表面にも認められるが, Mueller らは高転移型と低転移型のメラノーマ細胞を用いて, それぞれの TF 活性を比較したところ, 前者は後者の1000倍以上の発現を示すことを示し, さらに同高転移型メラノーマ細胞の TF 活性をモノクローナル抗体によって抑制した結果, 腫瘍細胞の肺毛細血管床での停留を短縮すると同時に肺転移コロニー形成能をも抑制することができたと報告し, 転移形成過程における TF の重要性を主張した²⁶⁾。

我々が作成したそれぞれ異なる PAI-1, u-PA, TF レベルを発現する, 4 つの HT-1080 モノクローナル細胞の肺転移能を評価したところ, 高い PAI-1 レベルおよび TF レベルを発現したクローン (クローン 23-4B', 26-6) ほど高い肺転移能を示す傾向があり, u-PA のレベルは肺転移能とは相関しなかった。次に我々は各クローンの転移能に影響を与える種々の要因について更に検討を行った。Crissman らは, 静注後, 循環内に移行した腫瘍細胞の動向を電子顕微鏡を用いて形態学的に観察し, 腫瘍細胞が遠隔転移巣を形成する過程をおおまかに 3 段階に分割し, それぞれに影響する因子を以下の如く報告した (図 6)²⁷⁾。それは 1) 腫瘍細胞と着床部位の内皮細胞の細胞膜間の直接の相互作用だけが要因となる接着相, 2) 着床した腫瘍細胞の周囲に血小板が付着して形成された腫瘍塞栓の有無が要因となる停留相, そして 3) 腫瘍細胞の持つ基底膜への浸潤能が要因となる, 内皮細胞間隙の貫通, 細胞外基底膜の溶解, そして貫通からなる浸潤相, 以上の 3 段階である。高転移能を持つクローン 26-6 と, 低転移能を持つクローン 1-3C について比較検討したところ, 1) の接着相での活動性の指標となる内皮細胞への接着能, および 3) の浸潤相での指標となる基底膜への浸潤能は, 両者の間で差異が見られなかった (表 1)。2) の停留相は, 時間的には接着がほぼ終了する静注 30 分後から浸潤相が始まる前の静注後約 48~72 時間後までであると Crissman らは報告している。停留相での HT-1080 クローンの動向を観察するために, 腫瘍細胞を [¹²⁵I] によってラベルし, マウスに静注後 48 時間観察したところ, クローン 26-6 はクローン 1-3C と比較し, 6 時間後以降で有意に多くの細胞が肺血管内に停留することが観察された (図 4)。この結果から, 両クローン間の転移能の差が, 2) の停留相での活動性, つまり転移部位での着床後の細胞周囲の血栓形成によっていることが示唆された。このことを検証するために, 腫瘍細胞周囲の血栓を溶解することにより, 腫瘍細胞の肺血管内への停留が阻害されるか否か実験を行った。腫瘍細胞を静注したマウスに, ヘパリンを腹腔内投与したところ, クローン 26-6 を静注したマウスでは, 対照群と比較しヘパリン投与群では, 腫瘍細胞静注 48 時間後に肺血管内に停留する細胞数が激減した (図 5a)。さらに肺に形成される転移コロニー数にも減少が認められた (図 5b)。腫瘍細胞を静注したマウスに PAI-1 モノクローナル抗体を静脈内投与した場合も, クローン 26-6 の静注 48 時間後に肺血管内に停留する腫瘍細胞数は減少し, 細胞静注 11 日後の肺転移コロニー形成数も減少した。PAI-1 モノクローナル抗体が腫瘍細胞の PAI-1 活性を抑制し, 腫瘍細胞周囲に血栓が形成されにくくなり, 腫瘍細胞の転移部位での停留が抑制された為と考えられる。以上の結果から, HT-1080 が転移巣を形成する過程では細胞周囲の血栓形成が重要な因子であり, その形成には凝固活性と PAI-1 活性が相互的に作用していることが明らかになった。

今回の実験で、昨今注目を集めている腫瘍細胞の PAI-1 活性と悪性度の関係の中で特に PAI-1 と肺転移形成に注目し、その直接の因果関係について考察した。これまで明らかでなかった腫瘍学での PAI-1 の役割は、腫瘍塞栓が PA によって活性化されたプラスミンによって溶解されることを防ぎ、その形成を維持することにより、内皮細胞への着床後の停留を促すことにあると結論した。また PAI-1 活性を抑制するモノクローナル抗体の投与により、ヌードマウスの肺転移形成を抑制することができ、新たな転移抑制療法の可能性が示唆された。

結 論

1. ヒト線維肉腫細胞 (HT-1080) から、4つの、種々の PAI-1 活性を持ったクローンを分離した。各クローンの PAI-1 の発現と TF の発現との間に正の関連が見られた。
2. ヌードマウスの尾静脈へ腫瘍細胞を接種後に肺表面上に形成される転移性コロニーの数で腫瘍細胞の肺転移能を評価したところ、各クローン間において有意な差が認められた。そして肺転移能は腫瘍細胞が発現する PAI-1 活性および TF 活性と強く相関していた。
3. 各 HT-1080 クローン細胞の有する接着能および浸潤能と肺転移能の間には相関関係はなかった。
4. ヌードマウスの体循環内に移行後、48時間の腫瘍細胞の動向を観察したところ、ほとんどの腫瘍細胞が、静注後数分で肺内へと移行した。その後肺内の細胞数は徐々に減少したが、高転移能を持つクローン 26-6 は、低転移能を持つクローン 1-3C に比べより長い時間、肺内に停留した。
5. 3, 4 から各 HT-1080 クローン細胞間に認められる転移能の差は血管内皮細胞に接着後、基底膜に浸潤するまでの間、着床部位に停留し続ける能力によることがわかった。
6. ヘパリンによる凝固活性の抑制および PAI-1 モノクローナル抗体による抗線溶活性の抑制の両者ともにクローン 26-6 の肺内の停留と肺転移能を抑制しえたことから、PAI-1 活性と凝固活性の両因子ともにこの細胞系の肺転移形成能を決定する因子にな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たる謝意を表します。また終始直接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。本研究に対し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 教授に心より感謝いたします。

なお本論文の要旨の一部は、14th Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis (New York), Molecular & Cellular Biology of Plasminogen Activator Meeting (Cold Spring Harbor), 40th Annual Meeting of Orthopaedic Research Society (New Orleans), 12th International Congress of Fibrinolysis (Leuven), 14th International Cancer Congress (New Delhi), 8th International Symposium on Limb Salvage (Florence), 第32回日本癌治療学会総会 (岡山), 第4回がん転移研究会 (東京) において発表した。

文 献

- 1) 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
- 2) Freshney RI. *Culture of Animal Cells, A Manual of Basic Technique*, 2nd ed, p137-147, A. R. Liss, New York, 1987
- 3) Schoerer AE, Rick PD, Swaim WR, Moldow CE. Structural features of endotoxin required for stimulation of endothelial cell tissue factor production; exposure of preformed tissue factor after oxidant-mediated endothelial cell injury. *J Lab Clin Med* 106: 38-42, 1985
- 4) Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-159, 1987
- 5) Virca GD, Northemann W, Shiels BR, Widera G, Broome S. Simplified northern blot hybridization using 5% sodium dodecyl sulfate. *Biotechniques* 8: 370-371, 1990
- 6) Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques. *J Histochem Cytochem* 29: 577-580, 1981
- 7) Wexler H. Accurate identification of experimental pulmonary metastases. *Natl Cancer Inst* 36: 641-645, 1966
- 8) Dejana E, Bertocci F, Bortolami MC, Regonesi A, Tonta A, Breviario F, Giavazzi R. Interleukin 1 promotes tumor cell adhesion to cultured human endothelial cells. *J Clin Invest* 82: 1466-1470, 1988
- 9) Repesh LA. A new in vitro assay for quantitating tumor cell invasion. *Inv Metastas* 9: 192-208, 1989
- 10) Fidler I. Metastasis: quantitative analysis of distribution and fate of tumor emboli labeled with 125 I-5 iodo-2'-deoxyuridine. *J Natl Cancer Inst* 45: 773-779, 1970
- 11) Kwaan CK. The plasminogen-plasmin system in malignancy. *Cancer Metastasis Rev* 11: 291-311, 1992
- 12) Jänicke F, Schmitt M, Graeff H. Clinical relevance of the urokinase-type and tissue-type plasminogen activators and of their type 1 inhibitor in breast cancer. *Semin Thromb Haemost* 17: 303-312, 1991
- 13) Reilly D, Christensen L, Duch M, Nolan N, Duffy MJ, Andreasen PA. Type-1 plasminogen activator inhibitor in human breast carcinomas. *Int J Cancer* 50: 208-214, 1992
- 14) Hansen JG, Christensen IJ, Rosenquist C, Bruenner N, Mouridsen HT, Dano K, Blichert-Toft M. High level of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1 in cytosolic extract of breast carcinomas are associated with poor prognosis. *Cancer Res* 53: 2513-2521, 1993
- 15) Foekens JA, Schmitt M, van Putten WLJ, Peters HA, Kramer MD, Jänicke F, Klijn JGM. Plasminogen activator inhibitor-1 and prognosis in primary breast cancer. *J Clin Oncol* 12: 1648-1658, 1994
- 16) Nakamura M, Konno H, Tanaka T, Maruo Y, Nishino N, Aoki K, Baba S, Sakaguchi S, Takada Y, Takada A. Possible role of plasminogen activator inhibitor 2 in the prevention of the metastasis of gastric cancer tissues. *Thromb Res* 65: 709-719, 1992
- 17) Nekarda H, Schmitt M, Ulm K, Wenninger A, Vogelsang H, Becker K, Roder DR, Fink U, Siewert JR. Prognostic impact of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1 in completely resected gastric cancer. *Cancer Res* 54: 2900-2907, 1994

1994

- 18) 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
- 19) Kristensen P, Pyke C, Lund LR, Andreasen PA, Dano K. Plasminogen activator inhibitor-type 1 in Lewis lung carcinoma. *Histochemistry* 93: 559-566, 1990
- 20) Pyke C, Kristensen P, Ralfkiaer E, Eriksen J, Dano K. The plasminogen activation system in human colon cancer: messenger RNA for the inhibitor PAI-1 is located in endothelial cells in the tumor stroma. *Cancer Res* 51: 4067-4071, 1991
- 21) Weidner NM, Semple JP, Welsh WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis - correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 324: 1-8, 1991
- 22) Montesano R, Pepper MS, Mohlestein U, Risau W, Wagner EF, Orci L. Increased proteolytic activity is responsible for the aberrant morphogenetic behavior of endothelial cells expressing the middle T-oncogene. *Cell* 62: 435-445, 1990
- 23) Gorelik E. Protective effect of fibrin on tumor metastasis.

Fibrinolysis 6 (Suppl 1): 35-38, 1992

- 24) 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
- 25) Chahinian AP, Propert KJ, Ware JH, Zimmer B, Perry MC, Hirsh V, Skarin A, Kopel S. A randomized trial of anticoagulation with warfarin and of alternating chemotherapy in extensive small-cell lung cancer by the Cancer and Leukemia Group B. *J Clin Oncol* 7: 993-1002, 1989
- 26) Mueller BM, Reisfield RA, Edgington TS, Ruf W. Expression of tissue factor by melanoma cells promotes efficient hematogenous metastasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 11832-11836, 1992
- 27) Crissman JD, Hatfield JS, Menter DG, Sloane B, Honn KV. Morphological study of the interaction of intravascular tumor cells with endothelial cells and subendothelial matrix. *Cancer Res* 48: 4065-4072, 1988

Role of Type 1 Plasminogen Activator Inhibitor (PAI-1) in Metastasis Formation of Human Fibrosarcoma (HT-1080) Eizo Matsuda, Department of Orthopaedic Surgery, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920-J. *Juzen Med Soc.*, **105**, 736-744 (1996)

Key words human fibrosarcoma (HT-1080), lung metastasis, plasminogen activator, tissue factor, type 1-plasminogen activator inhibitor

Abstract

Monoclonal cell lines from human fibrosarcoma (HT-1080) parental cell line were established using the limited dilution method, and were subsequently screened for levels of type 1-plasminogen activator inhibitor (PAI-1) antigen. Metastatic potentials were evaluated by counting metastatic colonies formed on nude mice lungs after tumor cell inoculation, and the correlation between PAI-1 levels and metastatic potentials was investigated. Each fibrinolytic parameter was measured using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Four monoclonal cell lines exhibiting stable levels of PAI-1 and urokinase-type plasminogen activator (u-PA) were used for the present study. Their tissue factor (TF) activity was evaluated on the cell surface by measuring prothrombin complex formation and chromogenic substrate conversion. mRNA levels of PAI-1 and u-PA were found to be consistent with antigen levels. There was a highly significant difference in metastatic potentials as evaluated by counting metastatic colonies in nude mice lungs at 3 weeks after the tail vein injection of the respective tumor cells. Metastatic potentials significantly correlated with PAI-1 and TF levels. A clone with higher metastatic potential was not superior to one with lower metastatic potential, with regard to adhesiveness to endothelial cells. However, as compared with other clones, the clone with higher metastatic potential could stay in the lung longer after attachment. Regarding invasive potential into the extracellular matrix subsequent to the tumor cell's lodgement, no significant difference was observed between clones. To dissolve tumor thrombus (which is thought to be essential for the tumor cell's lodgement), nude mice were treated with heparin after tumor cell inoculation. No statistical effect was seen in mice inoculated with tumor cells exhibiting low PAI-1 and low TF. On the other hand, the tumor cells' lodgement in the lung 48 h after inoculation was significantly inhibited and the number of pulmonary metastatic colonies was reduced in tumor cells with high PAI-1 and high TF. Similar results were seen when mice were treated with anti-PAI-1 monoclonal antibody which inhibits PAI-1 activity. Our data indicate that both PAI-1 expression and TF expression are crucial to metastatic potential of this tumor cell line and that inhibition of either PAI-1 or TF activity can prohibit formation of lung metastases.