

胃癌腹膜播種形成過程におけるインテグリンの役割

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/2297/9249

胃癌腹膜播種形成過程におけるインテグリンの役割

金沢大学医学部医学科外科学第二講座 (主任: 宮崎逸夫教授)

八 尾 直 志

ヒト胃低分化腺癌由来の MKN-45 細胞から著者の研究室で確立した高度腹膜転移株を用い、ヒト大網を使用した体外培養システムにより、腹膜転移の機構を研究した。すなわち、MKN-45 細胞をヌードマウスの皮下に移植し、皮下に形成された腫瘍 (MKN-45-subcutaneous tumor, SC) 細胞をヌードマウスの腹腔内で継代培養することで、6代継代後は例外なく腹膜転移を起こす高度腹膜転移株となった。このうち、SC 細胞、4代継代 SC (4 generation intraperitoneally passaged SC, 4GP) 細胞と12代継代 SC (12 generation intraperitoneally passaged SC, 12GP) 細胞を使用して実験を行った。SC 細胞と12GP 細胞をヒト大網上で培養する体外培養システム (*ex vivo* co-culture system) を用い、癌細胞の大網への接着を走査電顕下で観察した。さらに、癌胎児性抗原 (carcinoembryonic antigen, CEA) 染色を行い、大網に接着した癌細胞数を数えた。また、SC, 4GP, 12GP 細胞に関する転移関連遺伝子発現を、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応法にて検索した。転移関連遺伝子としては接着因子 [インテグリン・サブユニット (integrin subunit) $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\beta 1$, 細胞間接着分子 (intercellular adhesion molecule, ICAM), リンパ活性関連抗原-1 (lymphocyte function associated antigen-1, LFA-1)], 運動因子 [*c-met*, 自己分泌型運動因子レセプター (autocrine motility factor receptor, AMF receptor)], 蛋白分解酵素とその阻害剤 [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) とそのレセプター (u-PA receptor) とそのインヒビター (plasminogen activator inhibitor, PAI), マトリックス メタロプロテアーゼ (matrix metalloproteinase, MMP)-2, MMP-9, メタロプロテアーゼ ティッシュー インヒビター (tissue inhibitor of metalloproteinase, TIMP)-1, TIMP-2], や増殖因子 [血管内皮細胞増殖因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF), *c-erbB-2*, エストロゲンレセプター (estrogen receptor)] を選び各々の遺伝子に特異的なプライマーおよびプローベを作成した。12GP 細胞と共に1時間培養した大網を走査電顕で観察すると癌細胞は中皮細胞が収縮、脱落してできた基底膜の露出部位にのみ接着していた。さらに4時間経過した大網では、中皮細胞がさらに脱落し、中皮下基底膜が広範に露出していた。癌細胞は広範に露出した基底膜と偽足様突起で結合していた。一方転移関連遺伝子のうち *c-met*, AMFレセプター, u-PA, u-PA レセプター, PAI-1, MMP-2, 9, TIMP-1, 2の発現は SC, 4GP, 12GP 細胞で差を認めなかった。また、*c-erbB-2*, VEGF, も同様に発現が見られたが、PAI-2, エストロゲンレセプター, インテグリン・サブユニット $\alpha 5$ は発現が見られなかった。しかしながら、インテグリン・サブユニット $\alpha 2$ および $\alpha 3$ mRNA は、SC 細胞に比べ、12GP 細胞で、高度な発現増加が見られた。さらに、免疫組織学的検討においても、12GP 細胞でのインテグリン・サブユニット $\alpha 3$ の発現亢進が見られた。VLA-2, 3の β 鎖であるインテグリン・サブユニット $\beta 1$ mRNA は発現していたが、SC, 4GP, 12GP 細胞間には変化は見られなかった。抗インテグリン・サブユニット $\beta 1$ 抗体は、大網への12GP 細胞の接着を著しく減少させた。これらの結果から、VLA-2 および VLA-3 が胃癌の腹膜播種形成に大きな役割をはたしていることが推察された。

Key words gastric cancer, peritoneal dissemination, integrins, VLA

腹膜播種は胃癌非治癒因子や、根治手術後の再発形成のうち、もっとも多い転移形式である。しかしながら、腹膜播種の治療成績は外科治療学の進歩や集学的治療にもかかわらず、極めて不良である¹⁾。その理由のひとつには、腹膜播種形成の機構が十分に解明されていないことがあると考えられる。腹膜播種は癌細胞が漿膜に達した後、腹腔内に離脱することから始まる。この過程には E-カドヘリンの発現の減弱が密接に関係している²⁾⁻⁵⁾。その後の腹腔内遊離癌細胞の腹膜表面への着床には、腹水吸収にかかわる特殊な構造や接着因子が関係している。

Hagiwara らは大網上のミルクスポット (milky spots) から遊離癌細胞が吸着されると報告している⁶⁾。ミルクスポットは大網、腸間膜、ダグラス窩にあり、腹水などを吸収する小さな器官である。腹膜炎等の時にはマクロファージがここから腹腔内に動員されるという免疫学的に重要な役割も担っており、漿膜下のリンパ管に接続している⁷⁾。腹腔内に遊離した癌細胞も、腹水とともにミルクスポットに吸着され、腹膜下リンパ管に侵入する⁸⁾。腹膜播種形成の過程において、ミルクスポットを通しての転移は、かなり早い時期に起こると考えられる。一

平成8年10月15日受付, 平成8年12月11日受理

Abbreviations : AMeX, acetone methylbenzoate xylene; AMF, autocrine motility factor; bp, base pair; CEA, carcinoembryonic antigen; E-MEM, Eagle's-minimum essential medium with Earl's salt; GP, generation intraperitoneally passaged; ICAM, intercellular adhesion molecule; IL-6, interleukin-6; LFA-1, lymphocyte function

Table 1. The primers and probes to detected metastasis-associated genes

Gene	Probe	Location	Fragment size (bp)
integrin $\alpha 2^a$	5'-TGACATCAGTTGTAATGCAG-3'	3093-3112	485
	5'-TGGTCTCATCAATCTCATCT-3'	3558-3577	
	5'-ACTTTCGCATCAACGTTCCAG-3'	3295-3318	
integrin $\alpha 3^a$	5'-AGTGTACATCTATCACAGTA-3'	1267-1286	687
	5'-ATCTGCAAGTTGCTCTCACA-3'	1934-1953	
	5'-GATGTGGATGAGAACTTCTA-3'	1388-1407	
integrin $\alpha 5^a$	5'-GCGCTCCACTGTACAGCTG-3'	490-509	564
	5'-CAGCCAGTCATCCAGCCCG-3'	1037-1055	
	5'-CGAGTACCTGATCAACCTGGTTC-3'	764-787	
integrin $\beta 1^a$	5'-AGTAGAGTTATTCTTCAGT-3'	1462-1481	515
	5'-ACTTCGGATCTGTACACTTA-3'	1957-1976	
	5'-AGTAAGCATCCATGT-3'	1635-1649	
ICAM ^a	5'-TGATGGGCAGTCAACAGCTA-3'	303-322	521
	5'-AGAAGGAGTCGTTGCCATAGGT-3'	802-823	
	5'-ACAAAGGTCTGGAGCTGGTA-3'	631-650	
LAF-1 α^a	5'-CCATAGCCAGATACCTGTGAGC-3'	2599-2620	459
	5'-ACGCTCCACTGGTGTGTGAT-3'	3038-3057	
	5'-GGACAACCTCAGCCACTACCATC-3'	2815-2836	
LFA-1 β^a	5'-TGACCAGTAGGATGGTGAAGA-3'	941-961	548
	5'-GATGGAGTTGTTGCTTCCG-3'	1468-1488	
	5'-GCCATCACAGTCACCTCTGG-3'	1163-1182	
<i>c-met</i> ^b	5'-AACTCTAGATGCTCAGACTTT-3'	801-821	330
	5'-AACGACTTCTCAACAAGAT-3'	1111-1130	
	5'-ACAAAGCAAGCCAGATTCTGCCGA-3'	1038-1062	
AMF receptor ^b	5'-TGGTCTTATAGTGTGGACA-3'	506-526	429
	5'-AAGGAACTCTTGGTTCGATA-3'	915-934	
	5'-TGTGGAAGCATGTAGACTGT-3'	841-860	
u-PA ^c	5'-AGAATTCACCACCATCGAGA-3'	2494-2513	474
	5'-ATCAGCTTCAACAAGTCAT-3'	4174-4193	
	5'-AGGCAGATGGTCTGTATAGT-3'	3707-3726	
u-PA receptor ^c	5'-TTACCTCGAATGCATTTCT-3'	356-375	455
	5'-TTGCACAGCCTTACCATA-3'	791-810	
	5'-TCATCAGACATGAGCTGTGA-3'	380-399	
PAI-1 ^c	5'-ATGGGATTCAAGATTGATGA-3'	379-398	452
	5'-TCAGTATAGTTGAACTTGT-3'	811-830	
	5'-AGAGAGCCAGATTCATCAAT-3'	584-606	
PAI-2 ^c	5'-TAAGCTGTTTGGTGAGAAGT-3'	9658-9677	327
	5'-TACATCATCTGTACAGGTGT-3'	14845-14866	
	5'-TAGACTTCTAGAATGTGCA-3'	10254-10273	
MMP-2 ^c	5'-CCACGTGACAAGCCCATGGGGCCCC-3'	1448-1472	480
	5'-GCAGCCTAGCCAGTCGGATTTGATG-3'	1909-1933	
	5'-TTGATGCGGTATACGAGGCCCAACA-3'	1512-1536	
MMP-9 ^c	5'-GGTCCCCCCTGCTGGCCCTTCTACGGCC-3'	1478-1531	640
	5'-GTCCTCAGGGCACTGCAGGATGTACATAGGT-3'	2111-2140	
	5'-TTCAAGGATGGGAAGTACTGGCGAT-3'	1719-1743	
TIMP-1 ^c	5'-TGCACCTGTGTCCCACCCACCCACAGACG-3'	142-171	551
	5'-GTCTCAGGGCACTGCAGGATGTACATAGGT-3'	664-693	
	5'-TTCACCAAGACCTACACTGTTGGCT-3'	487-511	
TIMP-2 ^c	5'-CCGACGCCTGCAGCTGCTGCCCGGTGCACCCG-3'	341-372	590
	5'-GGAAGCTTTTATGGGTCTCGATGTGAG-3'	913-941	
	5'-ATGGCAACCCTATCAAGAGGATCCA-3'	455-479	
<i>c-erb B-2</i> ^d	5'-GATGTATTTGATGGTGACCTGGGAATG-3'	3424-3443	183
	5'-AATATGTGAACCAGCCAGAT-3'	3587-3606	
	5'-ACCCAGCCCTACAGCGGTACAGTGAGG-3'	3488-3517	
VEGF ^d	5'-GAAGTGGTGAAGTTCATGGATGTC-3'	1153-1176	264
	5'-CGATCGTTCTGTATCAGTCTTCC-3'	1393-1416	
	5'-GAGATGAGCTTCTACAGCACAAC-3'	1712-1735	
Estrogen receptor ^d	5'-GAGGGAGAATGTTGAAACACA-3'	1142-1162	329
	5'-GCCAGGCTTTGTGGATTTGAC-3'	1450-1470	
	5'-CTAGGATCTGATTGCATTGCAC-3'	1253-1274	
β -actin ^e	5'-GAAAAATCTGGCACACACCTT-3'	245-265	592
	5'-TTGAAGGTAGTTTCGTGGAT-3'	817-836	
	5'-GACCTGGCTGGCCCGGACCTGACTGACTAC-3'	656-675	
TFR ^e	5'-ACAGACTCTACATGTAGGAT-3'	1338-1357	316
	5'-AAACCTTGAAGTTGCTGGTA-3'	1733-1752	
	5'-TATCCCTCTAGCCATTCAGT-3'	1654-1673	

bp, base pair.

a) Adhesion molecule. b) Motility factor. c) Protease and its inhibitor.

d) Growth factor. e) Positive control.

associated antigen-1; LSAB, labelled streptoabidin-biotin; MMP, matrix metalloproteinase; PAI, plasminogen activator inhibitor; RT-PCR, reverse transcription-PCR; TFR, transferrin receptor; TIMP, tissue inhibitor of metalloproteinase; u-PA, urokinase-type plasminogen activator; VEGF, vascular endothelial growth factor

方, Kiyasu らは腹膜播種形成過程における接着因子の重要性を指摘している¹⁰⁾.

そこで著者は、腹膜播種の機構を解明するために、ヒト大網と癌細胞を使った新しい体外培養システム (*ex vivo* co-culture system) を開発した。

この論文では腹膜播種における接着因子であるインテグリン・サブユニット $\alpha 2/\beta 1$ で構成された VLA-2 と、インテグリン・サブユニット $\alpha 3/\beta 1$ で構成された VLA-3 の役割について報告する。

対象および方法

I. 細胞株

ヒトの胃低分化型腺癌由来継代培養細胞株の MKN-45 細胞をマウスの皮下に移植、4 週間後に形成された皮下腫瘍細胞 (MKN-45-subcutaneous cells, SC) を腹腔内継代培養した。すなわち、MKN-45 細胞を 10% 胎児牛血清加 RPMI-1640 (日水製薬, 東京) で、37°C、5% CO₂ 含有の湿気条件下で培養し、0.02% EDTA 加 0.25% トリプシンで短時間処理後、RPMI-1640 で 2 回洗浄、この細胞浮遊液 $1 \times 10^7/0.1\text{ml}$ を生後 6~8 週の雌の BALB/c ノードマウス (日本クレア, 東京) の背側肩甲部に皮下注射した。4 週後、皮下腫瘍部を無菌的に採取し、ハサミで細切し、18G の注射針を数回通過させた後、一匹のマウスに対し腫瘍細胞片約 100mg を腹腔内に注入した。注入 4~5 週後、腹水が出現した例の腹水を採取、遠心分離して得られた癌細胞を、さらに別のマウスの腹腔内で継代培養し、腹腔内継代を継続した。本実験には継代細胞株の SC 細胞、4 代継代 SC (4 generation intraperitoneally passaged SC, 4GP) 細胞と 12 代継代 SC (12 generation intraperitoneally passaged SC, 12GP) 細胞の 3 種類の細胞株を使用した。

II. 逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (reverse transcription-PCR, RT-PCR) 法による転移関連遺伝子の増幅

SC, 4GP, 12GP 細胞から得られた全 RNA を ISOGEN (ニッポンジーン, 東京) で抽出し、-80°C にて保管した。使用時、

200 $\mu\text{g/ml}$ になるように蒸留水で希釈し、癌細胞における転移に深くかかわっていると思われる以下の転移関連遺伝子 20 種類の mRNA について RT-PCR を行った。

RT-PCR のために合成したプライマープローベは接着因子であるインテグリン・サブユニット (integrin subunit) $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\beta 1$, リンパ活性関連抗原-1 (lymphocyte function associated antigen-1, LFA-1), 細胞間接着分子 (intercellular adhesion molecule, ICAM) や運動因子である *c-met*, 自己分泌運動因子レセプター (autocrine motility factor receptor, AMF receptor) や蛋白分解酵素やその抑制物質である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) とそのレセプター (u-PA receptor) とそのインヒビター (plasminogen activator inhibitor, PAI), マトリックス メタロプロテアーゼ (matrix metalloproteinase, MMP)-2, MMP-9, メタロプロテアーゼ ティッシュ インヒビター (tissue inhibitor of metalloproteinase, TIMP)-1, TIMP-2, や増殖因子である *c-erbB-2*, 血管内皮細胞増殖因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) エストロゲンレセプター (estrogen receptor) 遺伝子である。陽性対照として β -アクチン, トランスフェリン レセプター (transferrin receptor, TFR) を用いた。それらのプライマー・プローベを表 1 に示した。RT-PCR 法は Ninomiya らの方法で行った¹¹⁾。

III. ヒト大網の癌細胞接着実験 (*ex vivo* adhesion assay) の方法

大網は早期胃癌手術時に胃とともに切除された大網の一部を、表面を傷つけないようにして無菌的に取り出し、以下の方法で SC, 12GP 細胞とともに培養した。

Earl の塩添加 Eagle 最小基礎培地 (Eagle's-minimum essential medium with Earl's salt, E-MEM) (日水製薬) で満たした 24 穴マイクロプレート ウェル (岩城硝子, 船橋) とプラスチック製のシリンダー (MA リング, サンプラテック社, 大阪) の間に 2cm 四方のヒト大網を固定した。SC, 12GP 細胞を各々 1×10^5 個含んだ細胞浮遊液 500 μl に抗 $\beta 1$ インテグリンモノ

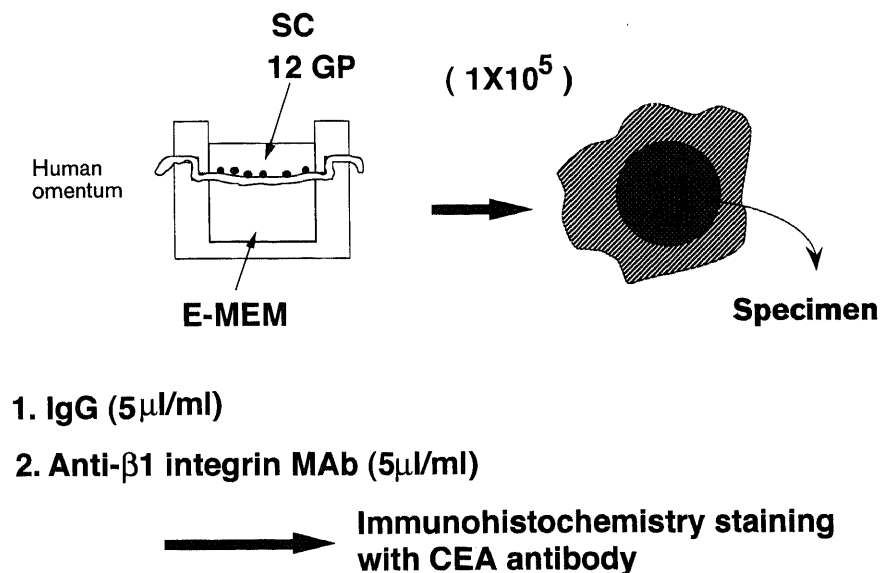


Fig. 1. Schematic illustration of *ex vivo* adhesion assay. Parts of human omentum were put between wells and cylinders. Cell suspensions of SC and 12GP were introduced into each cylinder, and filled with E-MEM medium. After incubation for one and four hr, the omental specimens were examined with a scanning electron microscopy and immunohistochemical staining.

クローナル抗体 ($5\mu\text{g/ml}$) (Immuotech, Marseille, France) を加えたものと、マウス IgG1 ($5\mu\text{g/ml}$) (Tago Camerillo, Burlingame, USA) を抗体の対照として加えたものを作成し、 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ の条件下で培養した¹³⁾ (図1)。

IV. SC 細胞と 12GP 細胞を培養した大網の光顕的、電顕的所見

4時間まで培養を行い、取り外した大網を同じ濃度の緩衝液で短時間洗浄後二つに分け、各々を 0°C の 2.5% グルタルアルデヒド液とアセトンで固定した。 0°C の 2.5% グルタルアルデヒド液で2時間固定した大網は、 1% のオスミウム液で後固定した。その後、 50% と 100% のエタノールで脱水し、イソアミールアセテートに浸した後、臨界点乾燥し、腹膜表面を電子顕微鏡 SEM-type-J-5400 (日本エレクトロニクス, 東京) で観察した¹⁴⁾。

アセトンで固定した大網は 1mm 間隔で切り出し、アメックス (acetone methylbenzoate xylene, AMeX) 法でパラフィン包埋した¹⁴⁾。

アメックス包埋標本を用い、以下の方法で、癌胎児性抗原 (carcinoembryonic antigen, CEA), インテグリン・サブユニット $\alpha 2$, $\alpha 3$ の免疫染色を各々の特異抗体で行った。各々のパラフィン標本から $5\mu\text{m}$ 切片を切り出し、脱パラフィン後、 0.1% ハイドロゲンペルオキシダーゼ (hydrogen peroxidase) 加メタノール液で15分間反応させ、内因性ペルオキシダーゼをブロックした。その後、切片を CEA (Dakopatts, Copenhagen, Denmark), 抗 $\alpha 2$ および抗 $\alpha 3$ インテグリン ラビットポリクローナル抗体 (コスモ・バイオ, 東京) で反応させた。各々の希釈倍率は $100\times$, $20\times$, $20\times$ とした。その後、標識ストレプトアビチン-ビオチン (labelled streptoavidin-biotin, LSAB) キット (Dakopatts) を用いて反応させ、 0.05M トリス緩衝液 ($\text{pH}7.6$) 100ml 中に 0.1% H_2O_2 を $35\mu\text{l}$ 加えた DAB- H_2O_2 発色液に 40mg/dl のジアミノベンチジン (Sigma, St. Louis, USA) を加えて発色させた。

細胞の接着数は、ヒト大網の $100\mu\text{m}$ あたりに接着した癌細胞数で数量化し、各々のグループで3回の実験を行った。

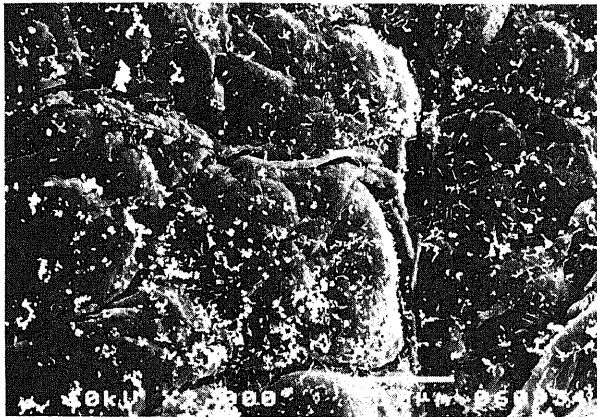


Fig. 2. Electron micrographic finding of normal mesothelial cells on the human omentum. The surface of the mesothelial cells is flat and the cell boundary of each mesothelial cell is indiscernible. $\times 2000$.

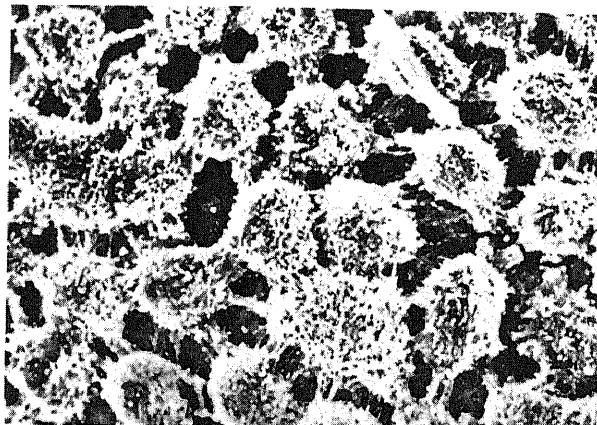
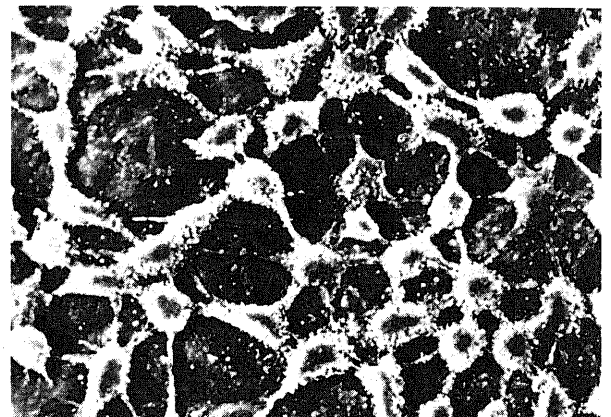
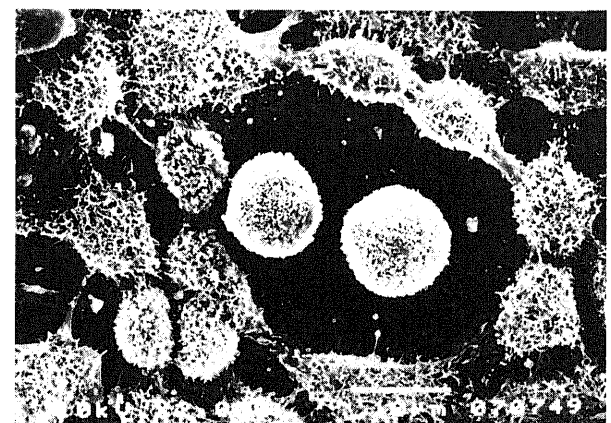


Fig. 3. Electron micrographic finding of mesothelial cells after a 1 hr-incubation. The submesothelial basement membrane become visible, but the mesothelial cells are connect to each other with fine pseudopodial protrusions. $\times 1000$.



A



B

Fig. 4. Electron micrographic finding of mesothelial cells after a 4 hr-incubation. A wide area of the submesothelial basement membrane is exposed by mesothelial cell shrinkage and/or exfoliation (A). Cancer cells adhering to the naked area of the submesothelial basement membrane. Cancer cells do not adhere to the mesothelial cells (B). $\times 500$.

成 績

1. 大網の電子顕微鏡所見

正常な大網中皮細胞は平坦で、細胞相互の境界は不明瞭であり(図2)、細胞表面の微少突起は微細で、その数も少なかった。

大網の1時間培養後では、中皮細胞は収縮して半球状になり、互いに離れ、中皮細胞下の基底膜が露出するようになっていた。(図3) また、中皮細胞は互いに細い偽足様の突起でつながっていた。4時間後には、大網からの中皮細胞の脱落のため、基底

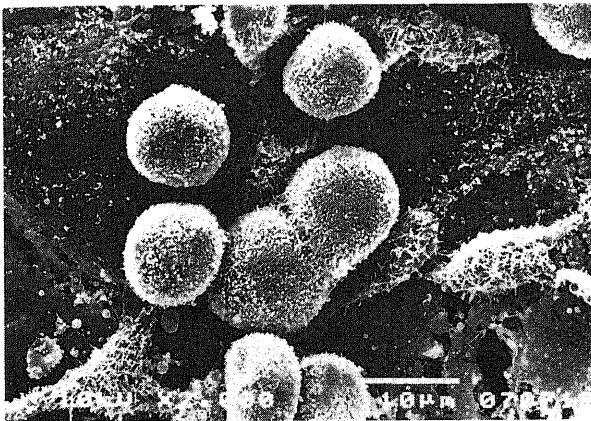


Fig. 5. Electron micrographic finding of cancer cells adhering to the submesothelial basement membrane after a 4 hr-incubation. The cancer cell surface appear rough and reveal a lot of cytoplasmic processes. ×2000.

膜が広く露出していた(図4A)。癌細胞は中皮細胞上ではなく、露出した基底膜にのみ接着し(図4B)、表面には多くの細胞突起が見られた(図5)。癌細胞接着面から長い義足様の突起が延びて基底膜に接着しているのが観察され、それらの突起は中皮

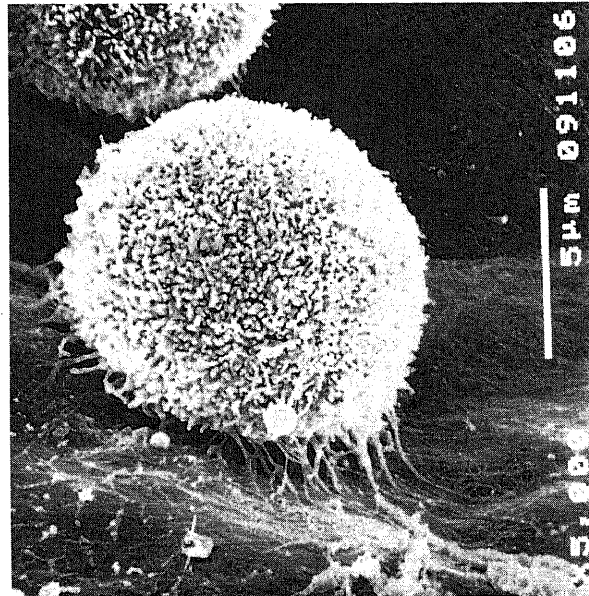


Fig. 6. Electron micrographic finding of adherent surface of cancer cells to basement membrane after a 4 hr-incubation. Elongated pseudopodial protrusions from cancer cells are observed, and tightly attach to the exposed area of the submesothelial stroma. ×5000.

Table 2. Comparison of gene expressions, examined by RT-PCR analysis, in MKN-45 and its variants

Gene	mRNA expression of metastasis-associated gene in cells		
	SC	4GP	12GP
Integrin α 2	-	+	‡
Integrin α 3	-	+	‡
Integrin α 5	-	-	-
Integrin β 1	+	+	+
LFA-1	-	-	-
ICAM	-	-	-
c-met	+	+	+
AMF receptor	+	+	+
u-PA	+	+	+
u-PA receptor	+	+	+
PAI-1	+	+	+
PAI-2	-	-	-
MMP-2	+	+	+
MMP-9	+	+	+
TIMP-1	+	+	+
TIMP-2	+	+	+
c-erbB-2	+	+	‡
VEGF	+	+	+
Estrogen receptor	-	-	-
β -actin*	+	+	+
TFR*	+	+	+

Differences of expression of metastasis-associated gene were examined by RT-PCR analysis. -, negative; +, moderately positive; ‡, strongly positive. * positive controls.

細胞の間に露出した間質に強く結合していた(図6)。

II. MKN-45-SC の腹腔内継代による転移関連遺伝子発現の変化

転移関連遺伝子発現を, SC, 4GP, 12GP 細胞で比較検討した(表2). *c-met*, AMF レセプター, u-PA, u-PA レセプター, PAI-1, MMPs, TIMPs に関しては SC, 4GP, 12GP 細胞間には発現の違いは見られなかった. 増殖因子である *c-erbB-2*, VEGF の発現は SC, 4GP, 12GP 細胞すべてに同じように認められた. インテグリン・サブユニット $\alpha 5$, LFA-1, ICAM, PAI-2, エストロゲンレセプターの発現は腹腔内の継代をかさねても終始見られなかった. しかしながら, 図7に示すようにインテグリン・サブユニット $\alpha 2$ および $\alpha 3$ は SC 細胞に比べて4代, 12代と腹腔内で継代するにしたがい, 発現が高度に増加していたがインテグリン・サブユニット $\alpha 5$ の発現は見られなかった. また, VLA2, VLA3 の共通の β 鎖であるインテグリン・サブユニット $\beta 1$ の発現は細胞間に差を認めなかった.

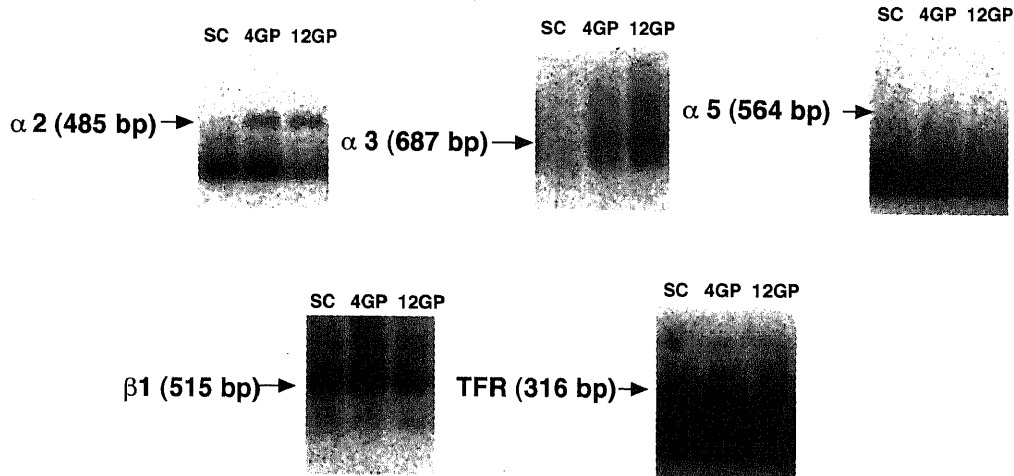


Fig. 7. Changes of the expressions of metastasis-associated genes in SC, 4GP and 12GP. Integrin $\alpha 2$, $\alpha 3$ and $\alpha 5$ subunit mRNA of SC, 4GP and 12GP were examined by RT-PCR, and Northern blot hybridization. TFR, positive control; bp, base pair

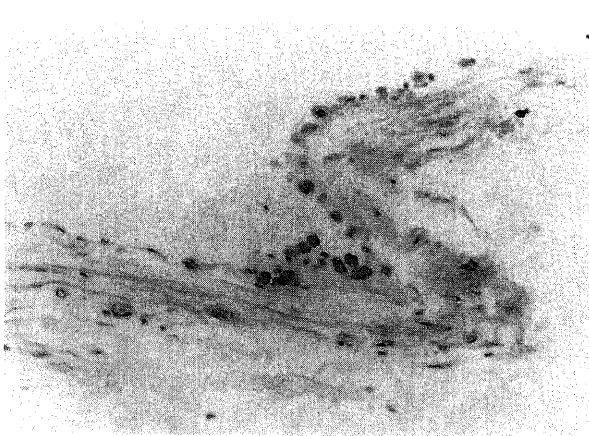


Fig. 8. Immunohistological reaction of integrin $\alpha 3$ subunit expression of 12GP after a 4 hr-incubation with human omentum. The expression of integrin $\alpha 3$ subunit is observed on the cell membrane of 12GP adhered to the omentum. These cells attach to the naked area of stroma exposed by methotrexate cell exfoliation.

III. 抗インテグリン・サブユニット $\beta 1$ モノクローナル抗体による SC 細胞と 12GP 細胞のヒト大網への接着抑制効果

図8はヒト大網と SC, 12GP 細胞を体外培養し4時間経過した標本を抗インテグリン・サブユニット $\alpha 3$ ポリクローナル抗体を用いて免疫染色したものである. 大網に接着した 12GP 細胞の細胞膜に一致してインテグリン・サブユニット $\alpha 3$ の活性が見られる. これらの細胞は大網中皮細胞どうしの間に露出した間質と結合している.

図9は同じく抗 CEA 抗体を用いた免疫染色を示す. 細胞質, 細胞膜に CEA 活性を示す. CEA 活性を有するものを癌細胞とし, 大網上に接着した細胞数を算出した.

図10に見られるように, SC 細胞と 12GP 細胞の大網への細胞接着数は, 各々 3.8 ± 4.1 個/0.1mm と 5.4 ± 3.8 個/0.1mm であった. 一方, 抗インテグリン・サブユニット $\beta 1$ 抗体処理により, 12GP 細胞の大網への接着細胞数は 2.4 ± 2.2 個/0.1mm と有

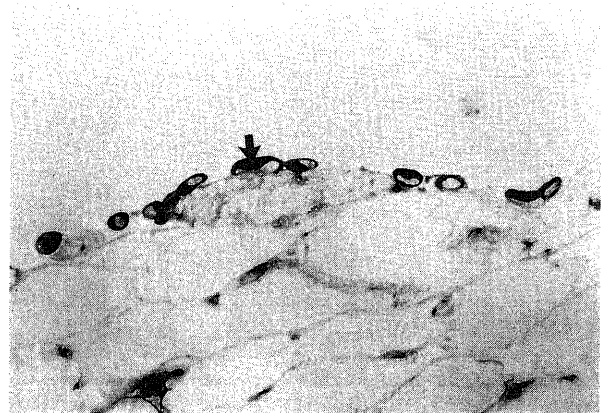


Fig. 9. Immunohistological reaction of CEA expression of 12GP after a 4 hr-incubation with human omentum. The expression of CEA is observed in the cytoplasm and the cell membrane. By counting the number of the attached cells which expressed CEA antibody on the omentum tissue, cellular adhesive activity was quantified. An arrowhead indicate the expression of CEA in the cytoplasm of cancer cell.

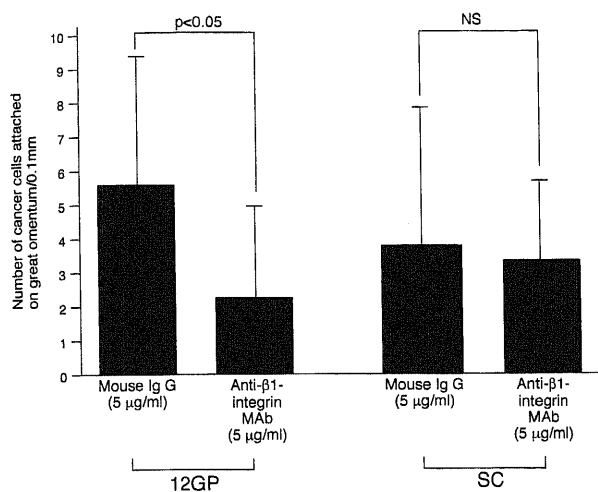


Fig. 10. Inhibition of attachment of 12GP and SC cells to human omentum by anti-integrin $\beta 1$ monoclonal antibody. Mouse IgG, antibody used for control; anti- $\beta 1$ -integrin MAb, anti-

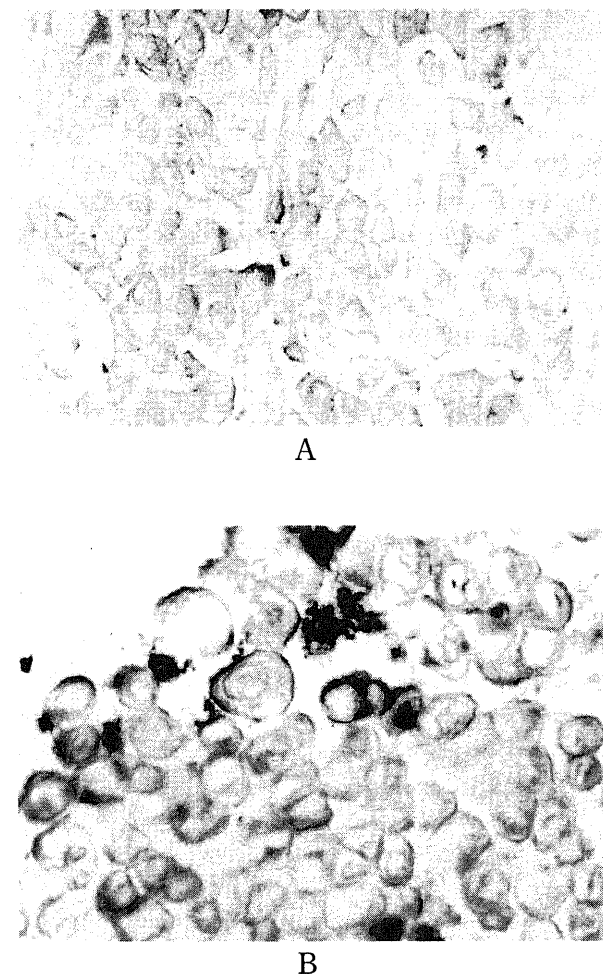


Fig. 11. Comparison of immunohistological reaction of integrin $\alpha 3$ subunit expression of SC (A) and 12GP (B) using LSAB method.

意に減少した ($P < 0.05$). SC 細胞においても接着細胞数は、抗インテグリン・サブユニット $\beta 1$ 抗体で処理したものでは 3.3 ± 2.7 個/0.1mm と減少が見られたが、統計学的有意差は見られなかった。

図11に SC 細胞 (図 11A) と 12GP 細胞 (図 11B) でのインテグリン・サブユニット $\alpha 3$ の免疫染色を示す。インテグリン・サブユニット $\alpha 3$ の発現は細胞膜上に見られた。12GP 細胞におけるインテグリン・サブユニット $\alpha 3$ の発現細胞数は、SC 細胞に比べて明らかに増加していた。

考 察

腹膜播種形成の最初の過程は、腹腔内遊離癌細胞の腹膜表面への接着と考えられる。また、近年の分子生物学の発展により、さまざまな細胞接着因子が同定されてきた。しかし、未だに腹膜播種形成にかかわる接着因子は、明らかにされていない。著者の研究室ではヒトの胃低分化型腺癌由来継代培養細胞株の MKN-45 細胞をマウスの皮下に移植して作成した SC 細胞を別のマウスの腹腔内で継代培養を繰り返し、6代以後は例外なく腹水を伴って腹膜播種をおこす高度腹膜転移株を確立した¹⁵⁾。また、大網は腹膜播種が最も早期に見られ、重要な役割を担っていると考えられている¹⁶⁾。そこで著者は、腹膜播種にかかわる接着因子の解明のため、SC 細胞、腹腔内継代培養株である 4GP、12GP 細胞とヒト大網を用いて本研究を行った。細胞同士の接着には E-カドヘリン、ICAM や LFA-1 などが関与しているとされる⁹⁾¹⁰⁾。E-カドヘリンは癌細胞同士の接着に関与し、E-カドヘリン分子の異常により細胞同士の接着が不完全になることが癌浸潤の一因となる。また、ICAM/LFA-1 はリンパ球と血管内皮との接着に関与し、リンパ球ホーミングに重要である。

本研究で大網と癌細胞との接着には大網中皮下基底膜と癌細胞との特異的接着が明らかとなった。すなわち細胞どうしではなく、細胞と間質との結合が大網と癌細胞の接着に重要であることが示唆された。基底膜構成成分に対する特異的接着因子には VLA ファミリーやその他のインテグリンファミリーがある。VLA は α 鎖 β 鎖で構成されるヘテロダイマーであり、 α 鎖には $\alpha 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, v$ があり、 β 鎖は $\beta 1$ のみである。

Kiyasu ら¹⁷⁾も、胃癌に起因する腹腔内遊離癌細胞は、中皮細胞が互いに離れ、露出した中皮下の基底膜に、選択的に接着すると報告した。本研究でも、12GP 細胞の体外培養 1 時間後、大網の中皮は半球状になり、4 時間後には互いに離れ、脱落し、結果として中皮細胞下の基底膜が露出した。同時に、培養された癌細胞は、中皮細胞ではなく、露出した中皮下の間質に選択的に接着していた。この間質の成分はコラーゲン、フィブロネクチン、ラミニン、プロテオグリカン、ビトロネクチン等であり、これらの物質はインテグリンのリガンド (ligand) であることが知られている¹⁸⁾。コラーゲンやラミニン、フィブロネクチンは、インテグリン・サブユニット $\alpha 2/\beta 1$ で構成された VLA-2 と、インテグリン・サブユニット $\alpha 3/\beta 1$ で構成された VLA-3 のリガンドである¹⁹⁾²⁰⁾。今回、RT-PCR 法によって高度腹膜転移株 12GP 細胞では、インテグリン・サブユニット $\alpha 2, \alpha 3$ をそれぞれ有する VLA-2, 3 の mRNA を多量に発現したことが示された。さらに、VLA-2 と VLA-3 の共通の $\beta 1$ サブユニットに対する抗インテグリン・サブユニット $\beta 1$ 抗体は、

12GP 細胞のヒト大網への接着を有意に阻害した。この抗体は数種類の細胞株の、細胞外マトリックス (extracellular matrix, ECM) への接着を阻害することが報告されている²⁹⁾。

これらの結果は、腹腔内継代培養の間に VLA-2 または VLA-3 を強く表現した特異的なクローンが選択されたこと、そして、VLA-2 と VLA-3 の増加が、腹膜播種の形成に大きな役割を担ったことを示している。

結果的には、中皮下組織の露出が腹膜表面への癌細胞の着床の最初の段階として、最も重要な過程であることが推察された。この腹膜中皮細胞を変形させる因子についてはいくつかの報告があり、これらの因子は中皮細胞傷害物質 (mesothelial cell injury factor) と呼ばれている。炎症によっても、中皮細胞の離解や剥脱がもたらされることはよく知られている。Kaufman らはデキストランの腹腔内注射によってもたらされる無菌的炎症ばかりでなく、腹腔内への細菌注入による腹膜炎でも同じ様な中皮細胞の変化がもたらされると報告している²⁹⁾。Kimura らは、AH100B により生じた腹水をゲルろ過で検討し、中皮細胞傷害物質が、アルブミン分画に存在することを報告している²⁹⁾。この形態学的変化は炎症によってもたらされるという結果から、いくつかのサイトカイン (cytokine) やプロテアーゼ (protease) が中皮細胞の傷害物質ではないかと推測している。肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor, HGF)、上皮増殖因子 (epidermal growth factor, EGF)、トランスフォーミング成長因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β) 等は、腺癌の腹腔内から腹膜下組織への浸潤を促進させることが動物実験で確かめられている。その機構はそれらのサイトカインによって、腹膜中皮細胞が開裂されるためであると推測されている^{27)~29)}。最近、Maruo らはインターロイキン-6 (interleukin-6, IL-6) が、血管内皮細胞どうしの細胞間隙の開裂をもたらすと報告した³⁰⁾。腹膜炎においては、腹膜中皮細胞は IL-8 の刺激で IL-6 を産生し、マクロファージと同量の IL-6 を産生することが知られている³¹⁾³²⁾。IL-6 が中皮細胞の開裂をもたらすか否かはまだ証明されていないが、何らかの炎症性サイトカインがこの過程に関与しているものと推察される。

Kiyasu らは胃癌患者での中皮細胞の変化が、腹膜播種が起こる以前の、腫瘍が漿膜浸潤をきたす時期には、すでに見られることを報告し¹⁰⁾、これらの変化が腹腔内遊離癌細胞から分泌された蛋白分解酵素によるのではないかと推測した。プロナーゼやコラゲナーゼ、トリプシンが中皮細胞を開裂させることは、動物実験で認められているが³³⁾、中皮細胞を開裂させる物質が癌細胞から出るのか、間質細胞から出るのか、今後の重要な研究課題である。

結 論

腹膜播種における中皮細胞の離解および中皮下基底膜への癌細胞の接着の機構を解明するために、ヒト大網と高度腹膜転移を起こす、ヒト胃低分化腺癌細胞株を用い、以下の知見を得た。

1. 癌細胞とともに培養された大網の中皮は、時間の経過とともに半球状に収縮し、互いに離れ、脱落し、しだいに中皮細胞下の基底膜が露出するようになった。癌細胞は中皮細胞上ではなく、選択的に露出した基底膜上に、長い義足様の突起を出して接着していた

2. 腹腔内継代前の癌細胞に比べて、高度腹膜転移株では有

意に多く大網に接着し、抗インテグリン・サブユニット $\beta 1$ 抗体により、癌細胞の大網への接着は有意に阻害された。

3. 腹腔内で継代する前に比較して 4 代、12 代と継代が進むにしたがい、インテグリン・サブユニット $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$ の発現量が増加した。

これらのことから以下のように結論した。

癌細胞自体が産生した、または、癌細胞が存在するために生じた何らかの物質が、直接または間接的に中皮細胞の変形、離解、剥脱を誘導した。また、腹膜播種の最初の段階で最も重要な役割を有する VLA-2、VLA-3 を発現する癌細胞が、腹腔内継代により選択され、より強い腹膜播種能を有する高度腹膜転移株となると推察された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、終始懇篤なる御指導と御校閲を賜りました恩師宮崎逸夫教授に深甚なる謝辞を表します。また、終始直接御指導を賜りました金沢大学第二外科米村 豊講師、御助言と御指導を賜りました金沢大学癌研究所化学療法部佐々木琢磨教授、遠藤良夫博士、金沢大学医学部微生物学講座、中村信一教授、金沢大学第二外科伏田幸夫博士ならびに金沢大学医学部電子顕微鏡部山口稔毅先生に深く感謝の意を表します。さらに、ご協力いただきました金沢大学第二外科の諸先生方に厚くお礼を申し上げます。

文 献

- 1) Yonemura Y, Sawa T, Kinoshita K, Matsuki N, Fushida S, Tanaka S, Ohoyama S, Takashima T, Kimura H, Kamata T, Fujimura T, Sugiyama K, Shima K, Miyazaki I. Neoadjuvant chemotherapy for high-grade advanced gastric cancer. *World J Surg* 17: 256-262, 1993
- 2) Yonemura Y, Fujimura T, Fushida S, Takegawa S, Kamata T, Katayama K, Kosaka T, Yamaguchi A, Miwa K, Miyazaki I. Hyperthermo-chemotherapy combined with cytoreductive surgery for the treatment of gastric cancer with peritoneal dissemination. *World J Surg* 15: 530-536, 1991
- 3) Yonemura Y, Nojima N, Kaji M, Fujimura T, Itho H, Ninomiya I, Miyazaki I, Endou Y, Sasaki T. E-cadherin and urokinase-type plasminogen activator tissue status in gastric carcinoma. *Cancer* 76: 941-953, 1995
- 4) 広野靖夫. ヒト胃癌の進展における自己分泌型運動因子受容体の発現と役割. *十全医会誌* 1: 144-153, 1996
- 5) 米村 豊. 腹膜播種(米村 豊編), 第1版, 34-70頁, ヘルス出版, 金沢, 1996
- 6) Hagiwara A, Takahashi T, Sawai K, Taniguchi H, Shimotsuma M, Okano S, Sakakura C, Tsujimoto H, Osaki K, Sasaki S, Shirasu M. Milky spots as the implantation site for malignant cells in peritoneal dissemination in mice. *Cancer Res* 75: 687-692, 1994
- 7) Shimotsuma M, Kawata M, Hagiwara A, Takahashi T. Milky spots in the human greater omentum. *Acta Anat* 136: 211-216, 1989
- 8) Walker FC. The protective function of the greater omentum. *Ann R Coll Surg Engl* 33: 282-306, 1963
- 9) Higgins GM, Bain CG. The absorption and transference of particulate material by the great omentum. *Surg Gynecol Obstet* 50: 851-860, 1930

- 10) Kiyasu Y, Kaneshima S, Koga S. Morphogenesis of peritoneal metastasis in human gastric cancer. *Cancer Res* 41: 1236-1239, 1981
- 11) Ninomiya I, Endou Y, Yonemura Y, Noguchi M, Fushida S, Nakai M, Takamura H, Harada F, Suzuki T, Miyazaki I, Sasaki T. Specific detection of *c-erbB-2* mRNA expression in gastric cancers by the polymerase chain reaction following reverse transcription. *Br J Cancer* 66: 84-87, 1992
- 12) Natali PG, Nicotra MR, Bartolazzi A, Cavaliere R, Bigotti A. Integrin expression in cutaneous malignant melanoma: Association of the $\alpha 3/\beta 1$ heterodimer with tumor progression. *Int J Cancer* 54: 68-72, 1993
- 13) Tanaka K, Iino A. Critical point drying method using dry ice. *Stain Technol* 49: 203-206, 1974
- 14) Sato Y, Mukai K, Watanabe S, Goto M, Shimosato Y. The AMEX method. *Am J Pathol* 125: 431-435, 1986
- 15) Yonemura Y, Endo Y, Yamaguchi T, Fujimura T, Obata T, Kawamura N, Nojima T, Miyazaki I, Sasaki T. Mechanisms of the formation of the peritoneal dissemination in gastric cancer. *Int J Oncol* (in press)
- 16) Takeda K, Fujii N, Sakihara H, Nakayama K, Rikiishi H, Kumagai K. Murine tumor cells metastasizing in the liver: Ability to produce hepatocyte-activating cytokines interleukin-1 and/or -6. *Jpn J Cancer Res* 82: 1299-1308, 1991
- 17) Lawrance RJ, Loizidou M, Cooper AJ, Alexander P, Taylor I. Importance of the omentum in the development of intraabdominal metastases. *Br J Surg* 78: 117-119, 1991
- 18) Ljubimov AV, Bartek J, Couchman JR, Kapuller LL, Veselov VV, Kovarik J, Perevoschikov AG, Krutovskikh VA. Distribution of individual components of basement membrane in human colon polyps and adenocarcinomas as revealed by monoclonal antibodies. *Int J Cancer* 50: 562-566, 1992
- 19) Weitzman JB, Pasqualin R, Takada Y, Hemler ME. The function and distinctive regulation of the integrin VLA-3 in cell adhesion, spreading, and hemotypic cell aggregation. *J Biol Chem* 268: 8651-8657, 1993
- 20) Dedhar S. Integrins and tumor invasion. *Bioessays* 12: 583-590, 1990
- 21) Hall PA, Coates P, Lemoine NR, Horton MA. Characterization of integrin chains in normal and neoplastic human pancreas. *J Pathol* 165: 33-41, 1991
- 22) Terpe HJ, Tajrobehkar K, Günthert U, Altmannsberger M. Expression of cell adhesion molecules alpha-2, alpha-5, and alpha-6, E-cadherin, N-CAM and CD-44 in renal cell carcinomas. *Vir Arch A Pathol Anat* 422: 219-224, 1993
- 23) Elices MJ, Urry LA, Hemler ME. Receptor functions for the integrin VLA-3: fibronectin, collagen, and laminin binding are differentially influenced by ARG-GLY-ASP peptide and by divalent cations. *J Cell Biol* 112: 169-181, 1991
- 24) Campanero MR, Arroyo AG, Pulido R, Ursa A, de Matias MS, Sanchez-Mateos P, Kassner PD, Chan BMC, Hemler ME, Corbi AL, de Landazuri MO, Sanchez-Madrid F. Functional role of $\alpha 2/\beta 1$ and $\alpha 4/\beta 1$ integrins in leukocyte intercellular adhesion induced through the common $\beta 1$ subunit. *Eur J Immunol* 22: 3111-3119, 1992
- 25) Kaufman OY, Rostovshchikov AS, Kranchev AK, Paukov VS. Responses of peritoneal mesothelial cells in rats with aseptic and bacterial peritonitis. *Bull Exp Biol Med* 94: 100-104, 1982
- 26) Kimura A, Koga S, Kudoh H, Iitsuka Y. Peritoneal mesothelial cell injury factors in rat cancerous ascites. *Cancer Res* 45: 4330-4333, 1985
- 27) Li X, Nagayasu H, Hamada J, Hosokawa M, Takeichi N. Enhancement of tumorigenicity and invasion capacity of rat mammary adenocarcinoma cells by epidermal growth factor and transforming growth factor- β . *Jpn J Cancer Res* 84: 1145-1149, 1993
- 28) Welch DR, Fabba A, Nakajima M. Transforming growth factor β stimulates mammary adenocarcinoma cell invasion and metastatic potential. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 7678-7682, 1990
- 29) Yashiro M, Chung YS, Nishimura S, Inoue T, Sowa M. Peritoneal metastatic model for human scirrhous gastric carcinoma in nude mice. *Clin Exp Metastasis* (in press)
- 30) Maruo N, Morita I, Shirao M, Murata S. IL-6 increases endothelial permeability in vitro. *Endocrinology* 131: 710-714, 1992
- 31) Kuraoka S, Campeau JD, Nakamura RM, DiZerega GS. Modulation of postsurgical macrophage function by early postsurgical polymorphonuclear leukocytes. *J Surg Res* 53: 245-250, 1992
- 32) Rogers HW, Tripp CS, Schreiber RD, Unanue ER. Endogenous IL-1 is required for neutrophil recruitment and macrophage activation during murine listeriosis. *Am Assoc Immunol* 153: 2093-2102, 1994
- 33) Murata Y. Scanning electron microscopic observations on injury of mesothelial cells caused by cancerous ascites. *J Yonago Med Ass* 41: 355-369, 1990

An Intimate Association with Integrin Expression and Formation of Peritoneal Dissemination in Gastric Cancer
Tadasi Yao Department of Surgery (II), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med Soc., 105,
745—754 (1996)

Key words gastric cancer, peritoneal dissemination, integrins, VLA

Abstract

To clarify the mechanisms of the formation of peritoneal dissemination from gastric cancer, a highly metastatic cell line was developed from human gastric cell line MKN-45. MKN-45-SC (SC) cells were produced by injection of MKN-45 cells into the dorsal subcutaneous area of nude mice. A highly metastatic cell line was established from SC cells through progressive cultivation after 6-generation intraperitoneal passages. SC, 4-generation intraperitoneally passaged SC (4GP) and 12GP cells were used in this study. SC and 12GP cells were developed with novel *ex vivo* co-culture system using the human great omentum. After co-culture, adhesion of cancer cells to the omentum was examined with a scanning electron microscope. The number of adhering cancer cells was counted, after anti-CEA antibody incubation. The differences in expression of the metastasis related genes in SC, 4GP and 12GP cells were examined by RT-PCR. Adhesion molecules (integrin $\alpha 2$, $\alpha 3$ and $\alpha 5$ subunits, LFA-1 and ICAM) motility factors (*c-met*, AMF receptor), urokinase type plasminogen activator (u-PA) and its receptor (u-PA receptor) and its inhibitors (PAI-1, PAI-2), proteases and their inhibitors (MMP-2, MMP-9, TIMP-1 and TIMP-2), growth factor (*c-erbB-2*, VEGF and estrogen receptor) genes were selected from among the metastasis-associated genes. Electron microscopic findings of omentum incubated with 12GP cells showed that cancer cells adhered only to the naked area of the submesothelial basement membrane, which was exposed by the shrinkage and exfoliation of mesothelial cells. After four-hour incubation, a wide area of the submesothelial basement membrane was exposed by mesothelial cell exfoliation. Cancer cells adhered to the basement membrane by pseudopodial protrusions from the surface of the cancer cells. On the other hand, among the metastasis-associated genes, the expression of *c-met*, AMF receptor, u-PA, u-PA receptor, PAI-1, MMPs, TIMPs, *c-erbB-2* and VEGF was generally observed in those cell lines. But integrin $\alpha 5$ subunit, LFA-1, ICAM, PAI-2 and estrogen receptors were not expressed in those cell lines. However, the expression of integrin $\alpha 2$ and $\alpha 3$ sub-units in 12GP cells was much more elevated than those in SC cells. Furthermore, stronger expressions of integrin $\alpha 2$ and $\alpha 3$ sub-units were immunohistochemically observed in 12GP cells than in SC cells. Integrin $\beta 1$ sub-unit expression did not change during the intraperitoneal passages, while anti-integrin $\beta 1$ sub-unit antibody significantly inhibited the number of 12GP cells adhering to the omentum. These results suggest that VLA-2 and VLA-3 play a major role in the formation of peritoneal dissemination from gastric cancer.