

膜型マトリックスメタロプロテアーゼ-1(MT-MMP-1)) cDNA導入による癌細胞の転移,浸潤の促進

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: 常塚, 宣男 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/9204

膜型マトリックスメタロプロテアーゼ-1 (MT-MMP-1) cDNA 導入による癌細胞の転移, 浸潤の促進

金沢大学がん研究所ウイルス部 (主任: 清木元治教授)

常 塚 宣 男

膜型マトリックスメタロプロテアーゼ-1 (membrane type-matrix metalloproteinase-1, MT-MMP-1) は 72kDa-IV 型コラゲナーゼ (matrix metalloproteinase-2, MMP-2) の活性化因子であり, 細胞の試験管内 (in vitro) での基底膜浸潤を促進することが知られ, 転移, 浸潤を増強する因子として注目されている. 本研究では生体内 (in vivo) における MT-MMP-1 の発現およびその抑制が癌細胞の浸潤, 転移に及ぼす影響をマウスを用いた転移実験モデルで検討した. 実験には MMP-2, MT-MMP-1 の発現が共に認められる HT1080 線維肉腫細胞株とノーザンブロット法で両者共に発現が検出されない Madison109 肺癌細胞株を用いた. MT-MMP-1 遺伝子をセンス或いはアンチセンスに発現する細胞の肺への生着率を比較する目的で, それぞれの発現プラスミドをトランスフェクション法で導入し, 一過性に遺伝子を発現している細胞をマウス尾静脈から移植した. 移植後5日目の総肺 DNA を採取して各導入プラスミドに特有な遺伝子配列を PCR 法にて増幅し, サザンブロット法にて増幅 DNA を定量して比較した. その結果, MT-MMP-1 導入細胞は対照として用いたベクタープラスミド導入細胞に比して肺生着率が有意に高いことが確認された. また, Madison109 細胞ではアンチセンス-MT-MMP-1 導入細胞と対照間に差は認められなかったが, HT1080 細胞では, アンチセンス-MT-MMP-1 導入細胞の生着率の低下が認められた. さらに MT-MMP-1 の機能を調べるために Madison109 細胞に上記遺伝子を導入し, 実験的転移による転移結節数の計測および皮下移植後腫瘍容積の計測を行った. その結果, 癌細胞移植後10日目の肺転移結節数は MT-MMP-1 導入細胞群が対照群, アンチセンス-MT-MMP-1 導入細胞群に比し約2倍と有意に増加し, 皮下腫瘍容積も MT-MMP-1 導入細胞が移植後早期に限ってではあるが, 他群に比し有意に増加が認められた. 以上の結果により, 遺伝子導入により一過性に発現させた MT-MMP-1 が活性化 MMP-2 を通じて癌細胞の実験的転移能, 浸潤能を亢進させること, また, 癌細胞の種類によってはその抑制が実験的転移の抑制に繋がり得ることが示された.

Key words cancer metastasis, membrane-type matrix metalloproteinase-1 (MT-MMP-1), antisense, transient transfection, PCR

癌の悪性度を規定する因子の一つに転移がある. 転移は臨床
上, 癌の治療を困難にしている最大の因子であり, この因子の
解明, 克服こそ癌攻略における重要課題であるといえる. 転移
は生体内で様々な過程を経て成立する複雑な現象であるため,
その研究は困難とされてきた. しかし最近の分子生物学の進歩
と相俟って, 転移成立に関与する重要因子が報告されつつあ
る. マトリックスメタロプロテアーゼ (matrix metalloprotei-
nases, MMPs) ファミリーと呼ばれる酵素群¹⁾もその一つであ
る.

癌細胞が周辺組織へと浸潤する際の物理的障壁となるのは細胞
外マトリックス (extracellular matrix, ECM), 特にその一形
態である基底膜である. 基底膜はIV型コラーゲンを骨格構造と
し, ラミニン, ヘパラン硫酸もしくはプロテオグリカン硫酸を
機能分子として含み, ECM の中でも強固な構造を形成してい

る²⁾. よって, 癌細胞が浸潤, 転移するためにはIV型コラーゲ
ンの分解能が重要であると考えられている³⁻⁷⁾.

IV型コラゲナーゼの一つである 72kDa-IV 型コラゲナーゼ
(MMP-2) を含む全ての MMPs は酵素活性を持たない潜在型酵
素として細胞より分泌される. 膜型マトリックスメタロプロテ
アーゼ-1 (membrane type-MMP-1, MT-MMP-1)^{8,9)} は MMP-2
を特異的に膜表面で活性化する最初の膜型 MMP として同定
された. この酵素は他の分泌型 MMPs には存在しない細胞膜
貫通ドメインをカルボキシル基末端部に持ち, 現在までに報告
されている3種類の MT-MMPs (MT-MMP-1, MT-MMP-2¹⁰⁾,
MT-MMP-3¹¹⁾) の中で MMP-2 の活性化能が最も高いと考えら
れている. 活性化された MMP-2 は基底膜のIV型コラーゲンの
みならず間質のI型コラーゲンやゼラチンを分解する. また,
潜在型 MMP-9 も活性化 MMP-2 によって活性化される¹²⁾との

平成7年12月15日受付, 平成8年2月9日受理

Abbreviations: AS-MT-MMP-1, antisense membrane type matrix metalloproteinase-1; BES, N, N-bis (2-hydroxyethyl)-2-amino-ethanesulfonic acid; BBS, BES buffered saline; bp, base pair; BPB, bromophenol blue; BSA, bovine serum albumin; DEAE, diethylaminoethyl cellulose; DEPC, diethyl pyrocarbonate; DMEM, Dulbecco modified Eagle's medium; ECM, extracellular matrix; FCS, fetal calf serum; MMPs,

報告もあり、MMP-2の活性化で加速度的に組織破壊が進行し、癌が浸潤、転移する可能性が示唆される。この一連の反応の鍵を握るのが潜在型MMP-2を活性化するMT-MMP-1であると考えられる。MT-MMP-1は肺癌、胃癌、乳癌などの組織に於て、癌細胞での過剰発現が見出されており、また、その発現量と潜在型MMP-2の活性化との相関が報告されている¹³¹⁴。よって、臨床的にもMT-MMP-1は癌転移、浸潤に重要な酵素であると考えられ、その抑制は転移、浸潤を抑制する鍵になる可能性を持つ。

本研究では癌細胞のMT-MMP-1、アンチセンスMT-MMP-1遺伝子の発現が生体内(in vivo)で浸潤、転移に与える影響をマウス実験転移モデルを用いて検討した。

対象および方法

I. 細胞培養

1. 使用細胞とその培養条件

使用した培養細胞はヒト線維肉腫由来HT1080細胞、マウス肺癌細胞Madison109細胞(金沢大学放射線科、高仲博士より供与)である。以上の細胞は全て10%牛胎仔血清(fetal calf serum, FCS, Hyclone, Utah, USA), 0.2mg/mlカナマイシン(和光, 大阪: 以下特に記載の無い場合は当社の製品を用いた)を含むダルベッコ変法イーグル培地(Dulbecco modified Eagle's medium, DMEM)(日水, 東京)にて37°C, 5% CO₂存在下で培養した。

II. ノーザンブロッティング法

1. 培養細胞全RNAの抽出

直径15cmの細胞培養用ディッシュ(FALCON, New Jersey, USA)にて細胞がほぼ一面に増殖した時点で、培養上清を除去し、10mlのD液(4Mグアニジンチオシアネート, 25mMクエン酸ナトリウム, 0.1M 2-メルカプトエタノール, 0.5% N-ラウロイルサルコシン酸ナトリウム)を加えて十分に懸濁した。懸濁した材料に、1/10容量の2M酢酸ナトリウム, pH4.0, 1容量の水飽和フェノール, 1/5容量のクロロホルム-イソアミルアルコール49:1を順次加え、添加ごとに混和した。15分氷冷した後、フェノール抽出を行い水層(上層)に等量のイソプロパノールを加え、よく混和して-20°Cで1時間放置した。4°C, 10,000回転/分(rpm), 20分遠心して上清を捨てた後、RNAの沈澱を0.5mlのD液で十分溶解して等量のイソプロパノールを加えて前述のようにRNAを沈澱させた。RNAの沈澱をジエチルピロカルボネート(diethyl pyrocarbonate, DEPC)処理蒸留水にて溶解し、フェノール抽出、エタノール沈澱を行った。RNAの沈澱をDEPC処理蒸留水で溶解し、分光光度計(モデルUV160, 島津, 京都)を用い、260nmの吸光度(OD)を測定し、1ODを40μg/mlとして全RNA濃度を測定した。

2. mRNAの抽出

90μlの全RNAに対して10μlの割合で5M NaClを加え、これを6mgのオリゴ-dTセルロース(フナコシ, 東京)と混合し室温で1時間緩やかに振盪してmRNAをセルロースに吸着させた。次に遠心して得られた沈澱を0.1% SDSに懸濁し、37°Cで5分間反応させ、吸着しているmRNAを溶出させた。最

後に遠心してセルロースを除き、mRNAを含む上清を回収した。

3. ノーザンブロッティング法¹⁵

1検体につき全RNA 20μgに相当するmRNAを用い、50%ホルムアミド(ナカライテスク, 京都), 17.5%のホルムアルデヒドを含む2%モルホリノープロパンスルホン酸(morpholinopropanesulfonic acid, MOPS), pH7.0に溶解し、55°Cで15分間反応させた後、1.0%アガロースゲルにて2%MOPS中で電気泳動を行った。泳動終了後のゲルをハイボンDNメンブラン(Amersham, Buckinghamshire, UK)に転写した。転写後のメンブランをUVストラターリンカー1800(フナコシ)を用いて波長254nmの紫外線1200マイクロジュールを照射し、RNAをメンブランに固定した。

4. プローブの作成

マウスおよびヒトのMMP-2およびMT-MMP-1のcDNAを含むプラスミドよりプローブを作製した。マウスMMP-2プローブは制限酵素(制限酵素は全て宝酒造を使用した)BamHIで切り出される0.6キロ塩基対(kilobase pairs, kbp)のcDNA断片、ヒトMMP-2はEcoRI, BamHIで切り出される1.6kbpのcDNA断片、マウスMT-MMP-1はEcoRIで切り出される1.2kbpのcDNA断片、ヒトMT-MMP-1はEcoRI, BamHIで切り出される1.5kbpのcDNA断片を使用した。これらのDNAをそれぞれ50ngずつマルチプライム・ラベリング・キット(アマシャム・ジャパン, 東京)を用いて[α-³²P]dCTP(アマシャム・ジャパン)で標識し、2.0-5.0cpm/μgの非活性を持つプローブを得た。

5. ハイブリダイゼーション

紫外線固定後のメンブランをラピッド・ハイブリダイゼーション・バッファー(rapid hybridization buffer, R-hb)(アマシャム・ジャパン)と共にプラスチックバッグに入れ、65°Cで2時間加熱し、プレハイブリダイゼーションを行った。次にこのプレハイブリダイゼーション液を捨て、ハイブリダイゼーション液(R-hb 2.0ml)に95°C, 5分加熱後氷上で冷却した20mg/ml変性サケ精子DNA(ペーリンガーマンハイム山之内, 東京)100μlおよび標識後プローブを加え63°Cで3時間反応させた。反応後のメンブランは2倍濃度SSCにて室温10分間4回洗浄し、0.1倍濃度SSC-0.1%SDSを含む溶液にて54°Cで20分間の洗浄を3回施行した。洗浄後、室温下6-18時間のオートラジオグラフィを試行した。検出されるmRNAの大きさの評価はアガロース電気泳動の際に、HindIIIで切断し[α-³²P]dCTPにて標識したフェージDNA約100ngを標準として同時に泳動しその位置から計算した。

III. 培養細胞におけるMT-MMP-1, アンチセンスMT-MMP-1(antisense-MT-MMP-1, AS-MT-MMP-1)の発現

1. MT-MMP-1, AS-MT-MMP-1発現ベクターの構築

発現ベクターはpSG-5(東洋紡, およびpLXEN¹⁶(国立がんセンター研究所ウイルス部, 赤城剛博士より供与))を使用した。pLXENはピコルナウイルスのインターナリポゾームエントリーサイト(IRES)を利用して、一本のmRNAから二つのタン

matrix metalloproteinases; MOPS, 3-N-Morpholinopropanesulfonic acid; MT-MMP-1, membrane type matrix metalloproteinase-1; NK, natural killer; PBS, phosphate-buffered saline; R-hb, rapid hybridization buffer; SPF, specific pathogen free; TE, Tris EDTA; U, unit

パクを読ませるバインストロニックなレトロウイルスベクターである。これらの発現ベクターに EcoRI で切り出される 3.4kbp のヒト-MT-MMP-1cDNA を EcoRI サイトにて 5' 方向から 3' 方向に組み込み、MT-MMP-1 発現プラスミド (pSG-MT-MMP-1, pLXEN-MT-MMP-1) を作製した。

AS-MT-MMP-1 発現プラスミド (pSG-AS-MT-MMP-1, pLXEN-AS-MT-MMP-1) も同様に MT-MMP-1 を 3' 方向から 5' 方向に組み込み作製した (図 1)。

2. プラスミドの大量調製

Ⅲ-1. で得られたプラスミドで形質転換された大腸菌 HB101 株を 2×YT 培地 [トリプトン 16g, イーストエキストラクト 10g, 塩化ナトリウム (NaCl) 5g, アンピシリン 50mg/l, pH7.6] 250ml にて 37°C, 12時間培養した。培養終了後、遠心にて集菌し、沈澱を [50mM Tris-HCl, 10mM EDTA, 100μg/ml RNase (Boehringer, Mannheim, Germany), pH8.0] 10ml で懸濁した。懸濁液にアルカリ溶液 [200mM 水酸化ナトリウム (NaOH), 1% SDS] 10ml を加えて室温で 5分間放置して細胞質を溶解した。この混合液に 3M 酢酸カリウム, pH5.5, を 10ml 加え、10分氷冷して液を中性化し、遠心して沈澱を除去した後、上清に 10mg/ml RNase を 150μl 加え、37°C, 30分間 RNA を消化した後、QIAGEN-tip 20 (QIAGEN, Chatsworth, USA) カラムに重層した。プラスミドが吸着したカラムを 1M NaCl, 50mM MOPS, 15% エタノール, pH7.0 にて 2回洗浄後、1.25M NaCl, 50mM Tris-HCl, 15% エタノール, pH8.5 にてプラスミドを溶出した。プラスミド溶出液に等量のイソプロ

パノールを加えて良く混和し、15,000rpm, 30分遠心してプラスミドを沈澱させた。プラスミドの沈澱を Tris EDTA (TE) (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH8.0) で 1mg/ml の濃度に溶解した。

3. 培養細胞への遺伝子導入

培養細胞 (Madison-109 細胞, HT1080 細胞) を 35mm プラスチックディッシュ (FALCON) に約 1.0×10^6 個/ml の濃度で 5%FCS 加 DMEM 2ml にて 37°C, 24時間培養後、Chen らのリン酸カルシウム法変法¹⁷⁾ にて遺伝子導入を行った。即ち、ヒト MMP-2 発現プラスミド (pSG-5-MMP-2) DNA 0.2μg と共に MT-MMP-1, AS-MT-MMP-1 発現プラスミド DNA および発現ベクター DNA 計 2.0μg (総計 2.2μg) を 0.25M 塩化カルシウム (CaCl₂) 60μl に混和し、その混合液に 2倍濃度 N, N-ビス-(2-ヒドロキシエチル)-2-アミノ-エタンスルホン酸 [N, N-bis(2-hydroxyethyl)-2-amino-ethanesulfonic acid, BES] 緩衝液 (BES-buffered saline, BBS) (280mM NaCl, 50mM BES, 2.8mM リン酸水素二ナトリウム, pH7.9.) 62.5μl を加え、37°C で 10分間、次に室温で 10分間静置した後、上記培養細胞に加え CO₂ 濃度 3% の条件下にて 37°C, 24時間培養した。培養後、ハンクス液 (Hanks balanced salt solution) にて 2回洗浄し、5% FCS 加 DMEM 2ml で 37°C, 24時間培養した。

4. ゼラチンゼイモグラフィ¹⁸⁾

培養細胞を 35mm プラスチックディッシュ (FALCON) に約 1.0×10^6 個/ml の濃度で 5%FCS 加 DMEM 2ml にて 37°C, 24時間培養、その後培養液を除去し、ハンクス液にて 2回洗浄し、無血清 DMEM, もしくは 10% FCS 加 DMEM を 1ml 加え、24時間培養後の培養上清を試料とした。試料を試料溶解液 [50mM Tris-HCl, pH6.5, 10% グリセロール, 2% SDS, 0.1% ブロモフェノールブルー (bromophenol blue, BPB)] と等量混和し、37°C で 30分加温した後、0.1% ゼラチンを含む 10% ポリアクリルアミドゲルで SDS-PAGE を行った。泳動終了後、ゲルを 2.5% トライトン ×100 にて 30分間室温で 2回洗浄し、反応液 [50mM Tris-HCl, pH7.5, 150mM NaCl, 10mM CaCl₂, 0.02% アジ化ナトリウム (NaN₃)] にて 37°C, 24時間反応させた。反応後、ゲルを染色液 [30% エタノール, 10% 酢酸, 0.3% コーマスブリリアントブルー G-250 (Sigma Chemical, St. Louis, USA)] にて室温で 5時間染色し、30% エタノール, 10% 酢酸にて脱色してゼラチン分解能を観察した。

Ⅳ. 検量線の作成

1. DNA の抽出

マウスより摘出した肺は 4ml の細碎緩衝液 (0.1M NaCl, 0.2M ショ糖, 0.01M EDTA, 0.3M Tris-HCl pH8.0) 中で細碎した。細碎物に 250ml の 10%SDS を加え攪拌し、65°C の温浴中に 30分間加温した。さらに 600μl の 8M 酢酸ナトリウムを加え攪拌後、60分間氷冷した。氷冷後、4°C, 11,000rpm において 20分間遠心し、水層を新たなチューブに回収した。クロロホルム 4ml を加え攪拌後、3,000rpm において 15分間遠心し、DNA を抽出した。分取した水層にクロロホルム 4ml, TE 緩衝液・飽和フェノール 4ml を加え攪拌後、3,000rpm において 15分間遠心し、DNA を抽出した。再度クロロホルム 4ml を加え、抽出後、分取した水層に 8ml のエタノールを加え、3,000rpm において 15分間遠心し、DNA の沈澱物を得た。この沈澱物を 80% エタノールで洗浄し、減圧乾燥した後、2ml の TE 緩衝液に溶解した。この DNA 溶液に 10mg/ml RNase

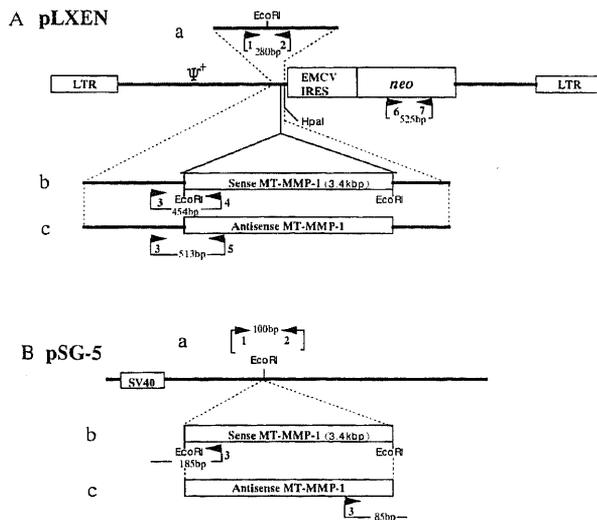


Fig. 1. Construction of vectors expressing MT-MMP-1 and antisense MT-MMP-1 and location of the oligonucleotide primers and probe for PCR amplification in the expression vectors. (A) pLXEN vector. (B) pSG-5 vector. MT-MMP-1 cDNA (b) or antisense MT-MMP-1 (c) were inserted into those vectors. Control plasmids (a) expressed nothing. Primers for PCR amplification were specific for each plasmids. Numbering with the arrow show the location of the oligonucleotide primers for PCR, the numbers between arrows are sizes of products by PCR. LTR, long terminal repeat; IRES, internal ribosome site; EMCV, encephalomyocarditis virus; *neo*, neomycine resistance encoding gene (which confers resistance to G418); SV40, simian virus 40 early region promoter; ψ^+ , extended retroviral packaging signal.

4 μ l を加え、37 $^{\circ}$ C、30 分間反応させた後、3M 酢酸ナトリウム 200 μ l を加え、TE 緩衝液・飽和フェノール・クロロホルム 1:1 2ml にて 1 回 (3,000rpm, 15 分間)、クロロホルム 2ml にて 1 回 (3,000rpm, 10 分間) 抽出を行った。分取した水層に 5ml のエタノールを加え、3,000rpm, 15 分間遠心しエタノール沈澱を行った。得られた DNA は 80% エタノールにて洗浄し、減圧乾燥させた後、TE 緩衝液にて溶解した。分光光度計を用い、DNA 溶液の 260nm の OD を測定し、1OD を 50 μ g/ml として DNA 濃度を測定した。

2. 鋳型 DNA の調整

マウス正常肺 DNA 溶液に MT-MMP-1 導入 pSG5, pLXEN 発現ベクターを 10^{-1} ~ 10^{-12} μ g までの 10 段階希釈量をそれぞれ加え、総 DNA 量を 1 μ g としたものを鋳型 DNA とした。

3. PCR 法

N-2. で調整した試料 1 μ g を鋳型とし、PCR 法にて各遺伝子導入プラスミドの増幅を行った。特異的遺伝子配列の増幅に用いるプライマーとして、各プラスミドに特異的な 17-20bp のオリゴヌクレオチドを作製した (図 1, 表 1)。これらプライマーは特異性を持たせる意味で遺伝子導入プラスミドのベクター側と導入 cDNA 側とでそれぞれ作製した。また、pLXEN においてはネオマイシン耐性遺伝子 (*neo*) の一部を増幅するプライマーも作製した。プライマーは全て DNA 合成機 (Model 391 DNA Synthesizer, ABI ジャパン, 東京) にて作製し、260nm の吸光度を測定して 20 μ M に調製したものを使用した。

PCR 法には Taq DNA ポリメラーゼ (Promega, Madison, USA) を用いた。一検体 50 μ l にて熱変性を 93 $^{\circ}$ C で 1 分、アニーリング反応を 55 $^{\circ}$ C で 1 分、伸長反応を 72 $^{\circ}$ C で 1 分行い、これを 1 サイクルとして 24 サイクル繰り返した。反応終了後、72 $^{\circ}$ C で 10 分間の処理を加えた。

4. DNA プロットング法

PCR 法により得られた試料に 5 μ l の 3M 酢酸ナトリウム (pH5.2) および 200 μ l のエタノールを加え、15,000rpm にて 20 分間遠心し DNA を沈澱させた。DNA を 80% エタノールにて洗浄し、減圧乾燥した後、0.06% キシレンアルコール、0.06% BPB、および 6.7% グリセロールを含む TE 緩衝液に溶解し、最終的に 15 μ l に調整した。各試料は 0.5mg/ml のエチジウムブロマイドを含む 1.5% アガロースゲル上で泳動用緩衝液 (4mM Tris,

2mM 酢酸ナトリウム 0.1mM EDTA, pH7.2) を用い、定電圧 100V にて電気泳動した。泳動終了後のゲルはアルカリ変性液 (0.2N NaOH, 0.6M NaCl) に浸し、30 分間室温にて緩やかに振盪した後、中和溶液 [0.24M Tris-HCl (pH7.5), 0.6M NaCl] に浸し 30 分間室温にて緩やかに振盪し、中和反応させた。この中和反応を 2 度繰り返した後、20 倍濃度 SSC を使用し、ハイボンド N メンブランに転写した。転写後のメンブランは UV ストラターリンカー 1800 にて紫外線を照射し、DNA をメンブランに固定した。各プラスミドを検出するプローブはジエチルアミノエチルセルロース (diethylaminoethyl cellulose, DEAE) 法により作成した。すなわち、各プラスミドを鋳型として各 PCR プライマーにより増幅された DNA を 1 倍濃度 TAE 緩衝液 (0.04M 酢酸 Tris, 0.001M EDTA) 中で DE81 紙 (Whatman, Maidstone, England) に吸着させた後、紙を 0.5ml エッペンドルフチューブに移し、2M NaCl 中に浸した。68 $^{\circ}$ C で 15 分間、加温した後、エッペンドルフチューブの底部に穴を開け、1.5ml エッペンドルフチューブに入れ、8,000rpm, 5 分間遠心し、増幅された DNA 溶液を得た。この溶液に飽和フェノール・クロロホルム・イソアミルアルコール 25:24:1 を加えて、攪拌した後、上層を採取し、最終濃度 0.2M NaCl, 2 倍量のエタノールを加え、80 $^{\circ}$ C で 15 分間冷却後、15,000rpm, 15 分間遠心しエタノール沈澱を行った。得られた沈澱物は 80% エタノールで洗浄し、減圧乾燥後、TE 緩衝液に溶解した。

5. ハイブリダイゼーション

ハイブリダイゼーションは前述した II-5 と同様に施行した。なお、検出される断片の大きさの評価はアガロース電気泳動の際に、HindIII で切断し [α - 32 P] dCTP にて標識した λ DNA 約 100ng および HaeIII で切断し [α - 32 P] dCTP にて標識した puc19 プラスミド DNA 約 100ng を標準として同時に泳

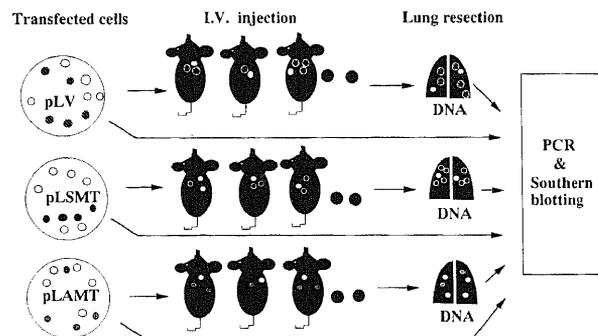


Fig. 2. Schematic illustration of the experimental pulmonary metastasis assay (1). Each groups of 1×10^6 Madison 109 cells or 1×10^7 HT1080 cells transfected with expression vectors (pLXEN only, pLV; MT-MMP expression vector, pLSMT; antisense MT-MMP-1 expression vector, pLAMT) were inoculated into the tail veins of mice (Balb/c for Madison 109 cells, Balb/c nu/nu for HT1080 cells.). Mice were injected intravenously with anti-asialo GM1 (200 μ g) at 2 days before and 1 days after tumor inoculation to abolish natural killer activity. The DNA extracted (1 μ g) from lungs at 5 days after tumor inoculation was amplified by PCR with Neo' primers. The intensity of radioactivity in reaction products hybridized by Southern blotting was analyzed using a Fujix Bioimage analyzer and the replaced DNA (\log_{10} DNA) was computed by the calibration curve of *neo*'.

Table 1. Sequences of the primers for amplification in expression vectors pLXEN and pSG-5

Primer	Sequence
pLXEN	1 5'>TTGTACACCCTAACCTCCG <3'
	2 5'>CACAAACGCACACCCGGCCTT <3'
	3 5'>ATTAGGGCCAGACTGTTACC <3'
	4 5'>CTTTGTCTTCGGTAGGCACT <3'
	5 5'>TGCTGGCAGTTCGGCTAGAT <3'
	6 5'>CTGTGCTCGACGTTGCTCACT <3'
	7 5'>CCGCTCAGAAGAACTCGTC <3'
pSG-5	1 5'>ATTATGCTGAGTGATATCCC <3'
	2 5'>TGTGATGCTATTGCTTTATT <3'
	3 5'>TGTGATGCTATTGCTTTATT <3'

動しその位置から計算した。

6. 検量線の作成

IV-2 で得た鋳型 DNA を前記の条件で PCR 法を試行し、得られたサンプルを DNA ブロットング法、ハイブリダイゼーションを行った後、バイオイメージアナライザーを用いて、一定面積における放射活性の測定を行い、数値化した。プラスミド DNA 量と放射活性値より検量線を得た。

V. 実験的転移アッセイ

1. 実験動物

マウスは Balb/c, 6 週齢, 雌を, ノードマウスは 5 週齢, 雌の Balb/c (nu/nu) (日本 SLC) を使用した。マウスは無病原体飼育条件下 (specific pathogen free, SPF) で滅菌飼料, 滅菌水道水が自由に摂取できるようにして飼育し実験に用いた。尚, 移植癌細胞は Balb/c に対しては Madison109 細胞を, Balb/c (nu/nu) に対して HT1080 細胞を用いた。

2. 培養細胞へのプラスミドの導入

培養細胞は 150mm プラスチックディッシュ (FALCON) に培養後, III-3 と同様に遺伝子導入を行った。各ディッシュに MT-MMP-1, AS-MT-MMP-1 発現プラスミド DNA および発現ベクター DNA 3.7 μ g を 0.25M 塩化カルシウム 110 μ l に混和し, その混合液に 2 \times BBS 115 μ l を加え, 37 $^{\circ}$ C で 10 分間, 次に室温で 10 分間静置した後, この 10 倍量を上記培養細胞 1 ディッシュにつき加え, CO₂ 濃度 3% の条件下にて 37 $^{\circ}$ C, 24 時間培養した。培養後, ハンクス液にて 3 回洗浄し, 5% FCS 加 DMEM 2ml で 37 $^{\circ}$ C, 24 時間培養し, 実験に用いた。

3. 実験的転移アッセイ (1)

Madison109 細胞では, 各プラスミド (発現ベクターのみ, MT-MMP-1 または AS-MT-MMP-1 発現プラスミド) 導入後, 1 \times 10⁶ 個/0.2ml の癌細胞を無麻酔下に Balb/c マウスの尾静脈内に移植し, 移植後 5 日目に肺を摘出し DNA を抽出した。HT1080 細胞では 1 \times 10⁷ 個/0.2ml をノードマウスに静脈内移植した。この際, ノードマウスでのナチュラルキラー細胞 (natural killer cell, NK cell) 活性の抑制を目的にウサギ抗アシアロ GM1 血清 (和光) 200 μ g を移植前 2 日目および移植後 1 日目に静脈内注射した。細胞肺 DNA 1 μ g を鋳型とし, *neo*^r プライマーにて前記の方法で PCR 反応を施行した。得られた増幅 DNA をサザンブロットングにより標識し, その放射活性 (R_{lung}) を求め, 検量線に基づき PCR 産物 DNA 量 [P_{lung} (μ g)] を求めた (図 2)。尚, 培養時の導入効率の比較を行うために, 静脈内移植前の培養細胞を一部回収し, 同様に DNA 1 μ g を PCR 後にサザンブロットングし, その放射活性 (R_{cut}) より同様にプラスミドの PCR 産物 DNA 量 [P_{cut} (μ g)] を求めた。肺定着率を次式で求め, 各導入プラスミド群間で比較した。

$$\text{肺定着率} = P_{\text{lung}} \times \text{肺 DNA 総量} / P_{\text{cut}} \times \text{移植細胞 DNA 総量}$$

P_{lung} = 遺伝子導入培養細胞 DNA (1 μ g) 中に検出される補正プラスミド DNA 量, P_{cut} = 肺組織 DNA (1 μ g) 中に検出される補正プラスミド DNA 量

4. 肺転移コロニー数の測定

肺転移数の計測は Wexler の方法¹⁹⁾ を用いた。5 \times 10⁵ 個/0.2ml の癌細胞を尾静脈内に移植後, 10 日目にマウスを屠殺し, 仰臥位に固定した。頸部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 \cdot 蒸留水 85ml \cdot アンモニア水 (丸石製薬, 大阪) 2 滴からなる染色液を約 2ml を緩徐に注

入した。気管を切断し, 胸隔内臓器を一塊に摘出し, 水中に 5 分間浸した。次に Fekete's 溶液 (70% アルコール 100ml, ホルムアルデヒド 10ml, 酢酸 5ml) に 24 時間浸し, 臓器を固定した。固定後, 肺を切離し, 5 葉に分離し, 肺表面を実体顕微鏡 (20 倍) にて観察し転移コロニー数 (直径 50 μ m 以上) を測定した。

5. 皮下移植における腫瘍径の計測

各プラスミド導入 Madison109 細胞 5 \times 10⁵ 個/0.2ml を無麻酔下にマウス背部皮下に移植し, 経時的に腫瘍径の計測を試み次式にプロットし²⁰⁾, グラフ化した。なお, リン酸カルシウム法で導入した MT-MMP-1 遺伝子の経時的効果を確認するために, MT-MMP-1 を癌細胞に導入してから 5 日経過した細胞群においても同様の実験を施行した。

$$\text{腫瘍容積 (Tumor volume) (mm}^3\text{)} =$$

$$\text{腫瘍長径 (length) (mm)} \times [\text{腫瘍短径 (width) (mm)}]^2 / 2$$

6. 実験的転移アッセイ (2)

リン酸カルシウム法にて各プラスミドを導入した各培養癌細胞をそれぞれ 1 \times 10⁷ 個/0.2ml に調整した。その後, その調整した各プラスミド導入細胞 (発現ベクターのみ, MT-MMP-1 または AS-MT-MMP-1 発現プラスミド) を等量混合後, 0.3ml を尾静脈内移植した。移植後のアッセイは前述した実験的転移アッセイ (1) と同様に行った。ノードマウスに対してはウサギ抗アシアロ GM1 血清を同様に使用した (図 3)。

VI. 免疫組織染色法

各プラスミド導入癌細胞のマウス尾静脈内移植後, 7 日目に肺を摘出した。肺を 4% パラホルムアルデヒドで 4 $^{\circ}$ C, 16 時間固定し, パラフィン包埋した。6 μ m のパラフィン切片を作成し, 脱パラフィン後, メタノール -0.3% 過酸化水素水による内因性ペルオキシダーゼのブロックと 0.15M リン酸緩衝液

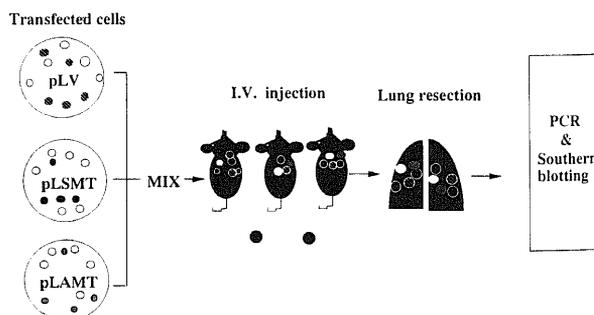


Fig. 3. Schematic illustration of the experimental pulmonary metastasis assay (2). 5 \times 10⁵ cancer cells transfected expression vectors (pLXEN only, pLV; MT-MMP expression vector, pLSMT; antisense MT-MMP-1 expression vector; pLAMT) were mixed each other, and total 1.5 \times 10⁷ cancer cells were inoculated into the tail veins of mice. The DNA extracted (1 μ g) from lungs at 5 days after tumor inoculation was amplified by PCR with specific primers for each plasmids. The intensity of radioactivity in reaction products hybridized by Southern blotting was analyzed using a Fujix Bioimage analyzer and the replaced DNA (log₁₀ DNA) was computed by the each calibration curve in the same way of Fig. 5. Mice were injected intravenously with anti-asialo GM1 (200 μ g) at 2 days before and 1 days after tumor inoculation to abolish natural killer activity.

(phosphate-buffered saline, PBS) (pH7.2)-3% 牛血清アルブミン (bovine serum albumin, BSA) による非特異的反応のブロックの後、ビオチン化抗 MT-MMP 抗体 (113-5B7: 合成ペプチド CDGNFDTVAMLRGEM, 残基 310-333, MT-MMP⁹, 富士薬品工業, 高岡) または抗 MMP-2 抗体²¹⁾ (75-7F7, 富士薬品工業) を 5 μ g/ml 含む PBS-0.1% BSA にて60分間室温で反応させた。次いで、抗ビオチンマウス IgG 抗体 (Cappel, West Chester, USA) で30分間、室温で反応後、ピアス イミュノピュア メタル エンハンスト DAB サブストレイト (PIERCE immunopure metal enhanced DAB substrate) キット (Cappel, West Chester) で発色させた。また、陰性対照として500倍に希釈した正常マウス IgG を1次抗体のかわりに使用し、同様の方法で反応を行った。

Ⅶ. 統計処理法

得られた成績は、全て $\bar{x} \pm SD$ で示した。多群間の差の検定には ANOVA 法の後、Scheffer's F 検定を用い、危険率 (level of significance) $p < 0.05$ を統計学的有意差ありとした。

成 績

1. 腫瘍細胞における MMP-2, MT-MMP-1 の発現

実験にあたり使用する腫瘍細胞株の MMP-2 および MT-MMP-1 の発現の有無をノーザンブロット法およびゼラチンゼイモグラフィーにより検討した。

1. ノーザンブロット法

ヒト由来線維肉腫細胞株である HT1080 細胞および Balb/c マウス由来肺癌細胞株である Madison109 細胞から総 RNA を抽出し、MMP-2 および MT-MMP-1 遺伝子の発現をノーザンブロットハイブリダイゼーション法にて検討した。なお、HT1080 細胞はヒト由来、Madison109 細胞はマウス由来であ

り、それぞれマウスおよびヒト由来の遺伝子をプローブとして用いた。ヒト MT-MMP-1 cDNA とマウス MT-MMP-1 cDNA とは94%の、ヒト MMP-2 とマウス MMP-2 とは92%のホモロジーを有する。その結果、プローブの種類に関わらず HT1080 細胞は MMP-2, MT-MMP-1 共に mRNA の発現が認められたが、Madison109 細胞にはいずれの発現も認められなかった。マウスプローブを用いた結果を図 4A に示した。

2. ゼラチンゼイモグラフィー

次に、ゼラチンゼイモグラフィー¹⁸⁾にて培養 HT1080 細胞、Madison109 細胞の産生する MMP-2 および MT-MMP-1 の発現を検討した (図 4B)。ゼラチンゼイモグラフィーは酵素活性をポリアクリルアミドゲル電気泳動後のゲル中でのゼラチン分解能により検出する方法であり、潜在型 MMP-2 は 68kDa、活性化中間体は 64kDa、活性型は 62kDa のバンドとして現われる。試料とする培養液は潜在型 MMP-2 を含有しない DMEM もしくは潜在型 MMP-2 を含有する FCS を含む DMEM にて実験を施行した。MMP-2 および MT-MMP-1 の mRNA 発現と一致して、潜在型 MMP-2 ならびに活性化型、活性化中間型 MMP-2 に相当するバンドが HT1080 細胞の培養上清で認められた。Madison109 細胞自身による MMP-2 の産生は培養上清中に認められなかった。また、培養液を 10%FCS 加 DMEM とした場合でも対照である FCS のみを含む試料と同様に Madison109 細胞による培養液中の潜在型 MMP-2 の活性化は起こらなかった。以上により、培養 HT1080 細胞は自ら MMP-2, MT-MMP-1 を共に発現しているが、Madison109 細胞では両酵素の発現がほとんどないことがゼラチンゼイモグラフィーでも示された。

Ⅱ. センス MT-MMP-1 遺伝子発現による潜在型 MMP-2 活性化およびアンチセンス遺伝子発現による抑制

MT-MMP-1 遺伝子を発現するためにマウス白血病ウイルスの LTR を持つプラスミド pLXEN と SV40 初期遺伝子プロモーターを持つプラスミド pSG5 をベクターとして用いて、プ

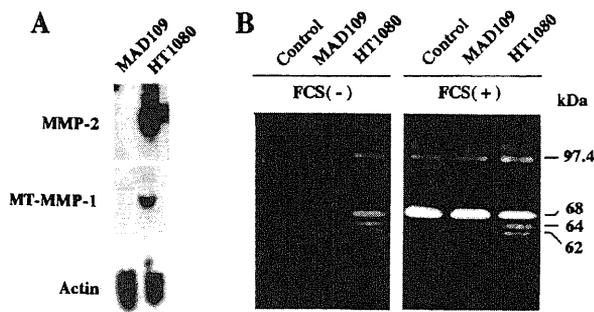


Fig. 4. Expression of MMP-2 and MT-MMP-1 gene in cultured Madison 109 cells and HT 1080 cells. (A) Northern blot analysis. RNA samples (20 μ g) obtained from the cultured cells were electrophoresed and transferred to membrane. Northern blots were performed with ³²P-labeled cDNA probes of mouse MMP-2 (MMP-2) and mouse MT-MMP-1 (MT-MMP-1) and actin. The sizes of MMP-2 and MT-MMP-1 mRNA were 3.1 and 4.5 kbp transcripts. The same findings were given with human probes (data not shown). (B) Gelatin zymography. Cells were cultured in serum free DMEM [FCS (-)] or DMEM containing 10% fetal calf serum [FCS (+)] for 24 h. Conditioned medium (15 μ l) were mixed with SDS electrophoresis sample buffer and separated in a 10% polyacrylamide gel containing 1 mg/ml gelatin. After gelatin digestion as described "Materials and Methods", the gel was stained with 0.1% Coomassie brilliant blue R-250.

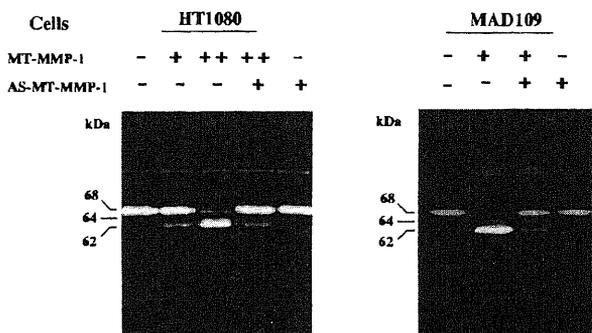


Fig. 5. Gelatin zymography of cultured medium to certify the effects of constructive expression vectors. Gelatin zymography was performed as described. HT1080 cells or Madison 109 cells were transfected with MMP-2 plasmids (0.2 μ g) to express latent MMP-2 enough by themselves, and they were cotransfected with MT-MMP-1 plasmids (MT-MMP-1; +, 0.2 μ g), antisense MT-MMP-1 (AS-MT-MMP-1; +, 1.6 μ g) and vector plasmids. Transfectants were cultured in serum free medium for 24 h. Conditioned media were collected and analyzed by gelatin zymography. Constructed vectors with pLXEN were used for HT1080 and pSG-5 for Madison 109.

ロモーターの下流に MT-MMP-1 遺伝子をセンスあるいはアンチセンスの方向に組み込んだ。各作成プラスミドを導入した HT-1080 細胞および Madison109 細胞の培養上清を用いてゼラチンゼイモグラフィを施行し、各プラスミドの潜在型 MMP-2 活性化への影響を調べた。なお、細胞には MMP-2 発現プラスミドと構築したプラスミドとを同時に形質導入することでそれぞれの遺伝子を発現させた (図 5)。

1. MT-MMP-1 遺伝子導入による潜在型 MMP-2 活性化

HT1080 細胞で MT-MMP-1 遺伝子をセンスの方向に発現させることにより、潜在型 MMP-2 (68kDa) の活性化中間体 (64kDa) と活性化型 (62kDa) への変換が促進された。また、導入するプラスミド量に依存して活性化型への変換が増加した。ベクタープラスミドの相異による効果の違いは認められなかった。また、Madison109 細胞でも同様に MT-MMP-1 による潜在型

MMP-2 の活性化が観察された。なお、MT-MMP-1 遺伝子の導入をしなかった対照群においては、HT1080 細胞では活性化中間体のバンドがわずかながら検出されたが、Madison109 細胞では活性化中間体および活性化型のバンドは検出できなかった。これは HT1080 細胞における内在性 MT-MMP-1 の発現によると考えられ、図 4 の結果と一致する。以上の結果より、MT-MMP-1 遺伝子をセンスに発現するプラスミド (pSG-5-MT-MMP-1, pLXEN-MT-MMP-1) を細胞導入することにより、潜在型 MMP-2 の活性化が誘導されることが確認された。

2. AS-MT-MMP 遺伝子導入細胞による潜在型 MMP-2 活性化の抑制

HT1080 細胞および Madison109 細胞に MT-MMP-1 遺伝子発現プラスミドを導入すると潜在型 MMP-2 の活性化が起こる。そこにアンチセンスの方向で MT-MMP-1 遺伝子を導入す

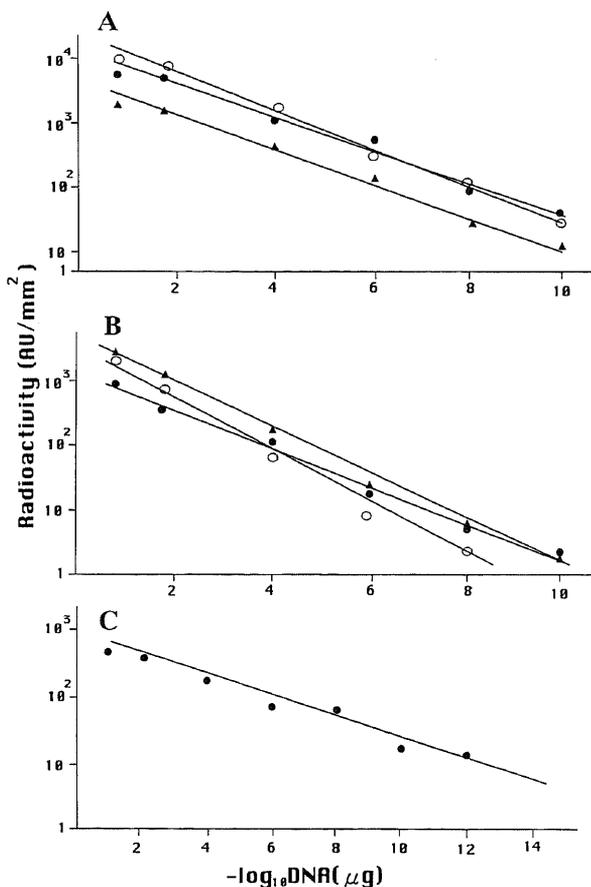


Fig. 6. Calibration curves of PCR products from plasmid DNA. PCR products were from serial dilutions of each plasmids DNA in the mouse lung DNA, could not be detected at only mouse lung DNA (control). Plots of the radioactivities hybridized to PCR products of each plasmid DNA against DNA concentrations with each specific primers. Radioactivities in the PCR products hybridized with ^{32}P -labeled probe were analyzed using a Fuji Bioimage analyzer. Radioactivity was described in arbitrary units (AU) per mm^2 . The genes of PCR amplification are shown in Fig. 2. Probes of PCR. (A) pLXEN vector, ●; MT-MMP-1 expression pLXEN, ○; antisense MT-MMP-1 expression pLXEN, ▲. (B) pSG-5 vector, ●; MT-MMP-1 expression pSG-5, ○; antisense MT-MMP-1 expression pSG-5, ▲. (C) *neo*-resistant gene (*neo*^r) of pLXEN.

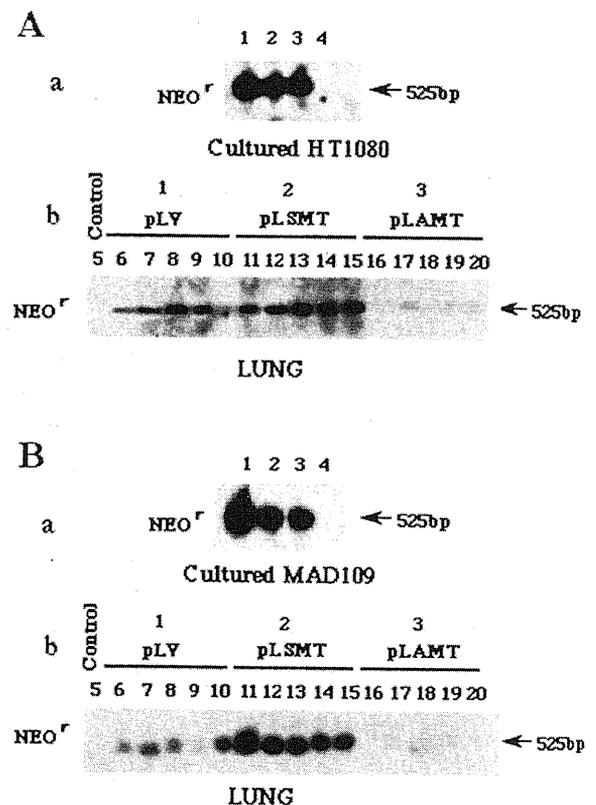


Fig. 7. Detection of the transfected gene in the cultured cells DNA or murine lung DNA after inoculations of the transfected cells. The DNA was extracted from the cultured cells transfected with plasmids or murine lung after inoculations of transfected cells, as described in Fig. 5. The DNA extracted (1 μg) was amplified by PCR with *Neo*^r primers, then the amplified DNA was hybridized to the probe of *neo*^r by Southern blotting. (A) HT1080 cells. (B) Madison 109 cells. (a) Cultured cells transfected with the expression vectors. (b) Murine lungs at 5 days after cells inoculations ($n=5$). Cancer cells were transfected with only pLXEN vectors (pLV; a/1, b/6-10), MT-MMP expression vectors (pLSMT; a/2, b/11-15) or antisense MT-MMP-1 expression vectors (pLAMT; a/3, b/16-20). a/4 was the amplified DNA of the cultured cells without transfection and b/5 was the amplified DNA of the murine lungs without inoculations of cancer cells (control).

ることにより、活性化を抑制することが可能かを培養上清中の MMP-2 をゼラチンザイモグラフィで検出することにより検討した。図 5 に示すように AS-MT-MMP-1 が MT-MMP-1 発現による潜在型 MMP-2 の活性化を抑制することが示された。

Ⅲ. 発現ベクターの検出方法と検量線

実験的肺転移単での微量な遺伝子導入細胞を検出するためには細胞に導入したプラスミド DNA を PCR で増幅して検出する方法が有効と考え、その定量性を検討して検量線を作製した。マウスの肺 DNA を用いて段階希釈した各プラスミド DNA をテンプレートとして、図 2 に示したプライマーを用いた PCR により、予想される大きさ (pSG-5, 100bp; pSG-MT-MMP-1, 185bp; pSG-AS-MT-MMP-1, 85bp; pLXEN, 280bp; pLXEN-MT-MMP-1, 454bp; pSG-AS-MT-MMP-1, 513bp; *neo*^r, 525bp) の塩基対の DNA 断片がサザンブロッティング法で単一バンドとして検出できた。また、対照としてマウス肺 DNA をテンプレートとした場合、予想される PCR 産物は得られなかった。サザンブロッティング法で得たバンドの放射活性をバイオイメージアナライザーにて計測し、その対数値をグラフ上にプロットすると $10^{-2}\mu\text{g}$ 以下で、ほぼ直線状の検量線を得た (図 6)。

Ⅳ. 形質転換腫瘍細胞の転移、浸潤に与える影響

これまでに様々な腫瘍細胞株へ MT-MMP-1 発現プラスミドを導入し、導入遺伝子を高レベルで発現している細胞を選択的

に得ようとした。しかし、対照に用いた遺伝子の導入細胞は容易に得ることが可能であるが、MT-MMP-1 遺伝子導入細胞を得ることは成功していない。したがって、MT-MMP-1 発現細胞の高発現細胞を長期安定して培養することが困難であることを考え、トランジェントトランスフェクション (transient transfection) 法による MT-MMP-1 の一過性発現が細胞の転移、浸潤能に与える影響を測定する実験を試みた。一般にリン酸カルシウム法による遺伝子導入では、受容細胞の 10% 弱にプラスミドが取り込まれ、40-50 時間をピークとする一過性の導入遺伝子の発現が認められる。Madison109 細胞および HT1080 細胞に導入した MT-MMP-1 遺伝子の発現も培養条件下で同様の時間経過で発現することを確認し実験に用いた。

1. 実験的肺転移アッセイ (1) による MT-MMP-1 の転移への影響

センスあるいはアンチセンス MT-MMP-1 遺伝子をリン酸カルシウム法により導入した Madison109 細胞および HT1080 細胞を遺伝子導入細胞の選別を行うことなく 24 時間後に回収し、マウスの尾静脈に接種した。5 日後にマウスより肺を摘出し、全 DNA を抽出し、肺に生着した細胞が保持している導入遺伝子を PCR 法で定量した。この方法により MT-MMP-1 遺伝子をセンスあるいはアンチセンスに発現している細胞がその対照となるベクタープラスミドのみを導入した細胞に比し、肺への生着にどのような優位性を持つかを検討した。実験に用いたマウ

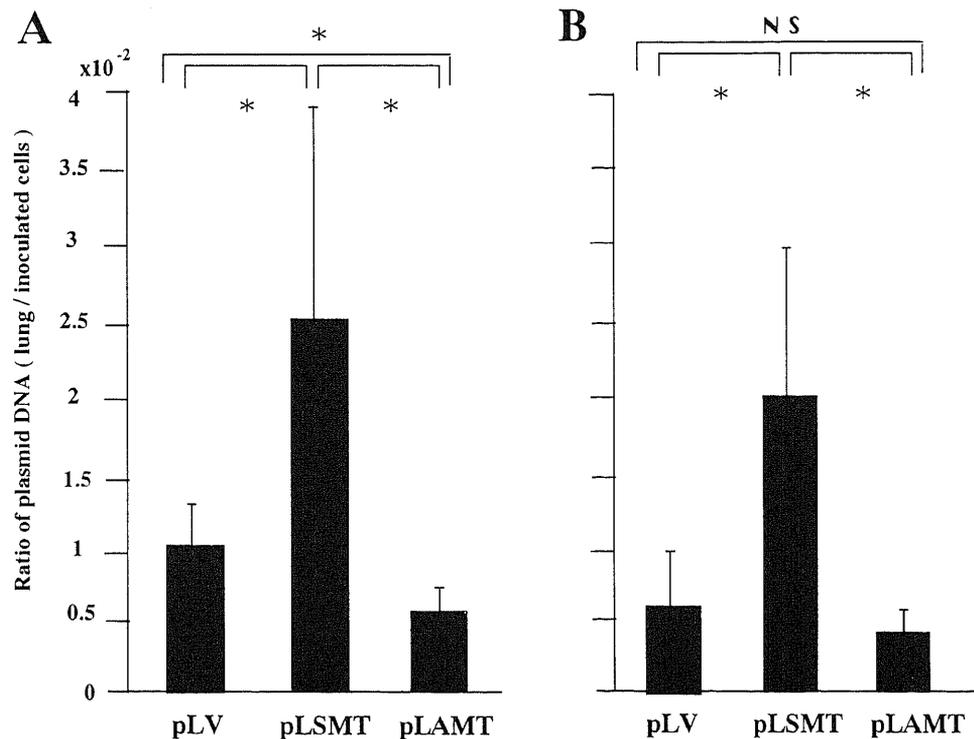


Fig. 8. Comparison of the ratio of plasmid DNA detected in the murine lungs and that in the cultured cells. Cancer cells were transfected with pLXEN vectors only (pLV), MT-MMP expression vectors (pLSMT) or antisense MT-MMP-1 expression vectors (pLAMT). The intensity of radioactivities of PCR products from the extracted DNA ($1\mu\text{g}$) of the cultured cells transfected with each of plasmids for inoculation and the lungs DNA at 5 days after inoculations shown in Fig. 6 were analyzed using a Fujix Bioimage analyzer. The amounts of DNA (\log_{10} DNA) were replaced to plasmids DNA by the calibration curve of *neo*^r. And these replaced DNA of the lungs and cultured cells were revised by amounts of those total DNA, the ratio of these total plasmid DNA in the lungs to that of the inoculated cells was calculated. (A) HT1080 cells. (B) Madison 109 cells. Values are $\bar{x} \pm \text{SD}$. Significant differences at $p < 0.05$ are indicated (*). NS, not significant.

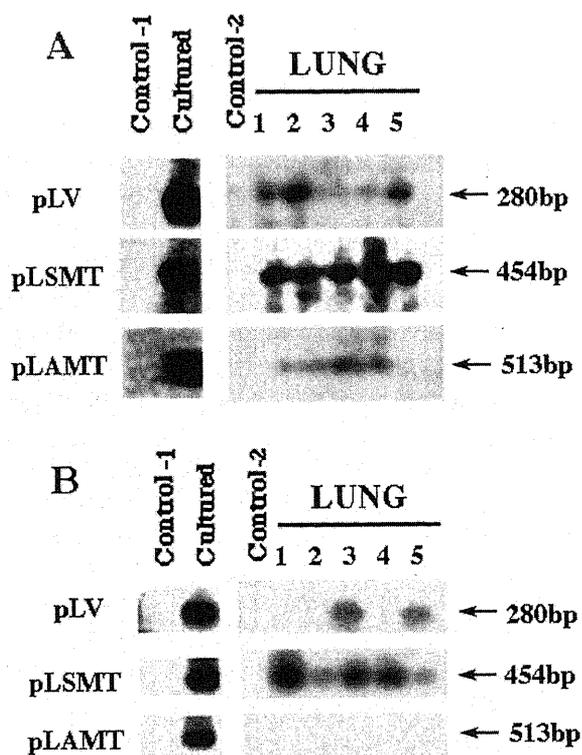


Fig. 9. Detection of the transfected gene in the cultured cells DNA or murine lung DNA after inoculations of the mixed transfected cells. Cancer cells were transfected with only pLXEN vectors (pLV), MT-MMP expression vectors (pLSMT) or antisense MT-MMP-1 expression vectors (pLAMT), and each 5×10^6 cells were mixed. The DNA was extracted from the cultured cells transfected with the plasmids or murine lung after inoculation of total 1.5×10^7 transfected cells as described Fig. 3. The DNA (1 μ g) was amplified by PCR with the specific primers for each plasmids, then the amplified DNA was hybridized by Southern blotting. (A) HT1080 cells. (B) Madison 109 cells. Control-1 was the amplified DNA of cultured cells without transfections and Control-2 was the amplified DNA of the murine lung without inoculations of cancer cells.

スに HT1080 細胞に対しては抗アシアロ GM1 抗体投与により NK 細胞活性を抑制した Balb/c (nu/nu) マウスを Madison109 細胞に対しては Balb/c マウスを用いた。

各遺伝子を導入した HT1080 細胞および Madison109 細胞において遺伝子導入細胞を静脈内に移植して 5 日後の肺から図 7 (A/b, B/b) に示すように導入遺伝子のベクター部分に由来する neo 耐性遺伝子が検出できた。検量線から肺内のプラスミド量に変換して、移植細胞からの肺生着率を算出し、比較したところ、HT1080 細胞では MT 群が対照群に比し 2.6 倍、また、対照群は AS 群に比し 2.4 倍と有意に ($p < 0.05$) 高値を示した (図 8A)。Madison109 細胞 (図 8B) では MT 群が対照群に比し 3.3 倍と有意に ($p < 0.05$) 高い値を示したが、対照群と AS 群との間には有意差は無かった。本実験で用いたベクターによる差は観察されず、pLXEN の例を図に示した。

2. 実験的肺転移アッセイ (2) による MT-MMP-1 の転移への影響

前項の実験ではそれぞれの遺伝子導入細胞を別々のマウスに移植しているために、個々のマウス間で結果のばらつきが大きい可能性がある。そこで、それぞれの遺伝子をトランスフェクションした細胞をあらかじめ混合し、マウスに移植することでセンスおよびアンチセンス導入細胞の肺生着の度合を同一個体の中で比較した。その結果、実験的肺転移アッセイ (1) の結果と同様に、HT1080 細胞では MT 群が対照群に比し 2.5 倍、また対照群は AS 群に比し 3.6 倍と有意に ($p < 0.05$) 検出量が多かった (図 9, 10A)。Madison109 細胞では MT 群が対照群に比し 3.1 倍と有意に ($p < 0.05$) 生着率が高かったが、対照群と AS 群との間に生着率の有意差は無かった (図 9, 10B)。

3. MT-MMP-1 遺伝子導入による肺転移結節数への影響

実験的転移アッセイでは MT-MMP-1 の肺生着への影響を検討したが、本実験では、その効果が生着した癌細胞が増殖して肺転移結節を形成する過程にまで影響を及ぼし得るかを Madison109 細胞を用いて観察した。MT-MMP-1 遺伝子のセンスあるいはアンチセンス発現プラスミドおよびその対照となるベクタープラスミドを Madison109 細胞に導入し、それぞれ 5×10^5 個/0.2ml をマウス尾静脈に移植した。発現プラスミドは pSG-5 および pLXEN の 2 種類を用いた。予備実験では

Table 2. Effect of MT-MMP-1 on pulmonary nodules of mice inoculated i.v. with Madison109 cells

Transfectants	Lung colonies			Significance ^e	
	Incidence ^b	Metastatic potential ^c	Range ^d		
PSG-5	Vector only	13/13	69 ± 10	15-136	
	Sense MT-MMP-1	13/13	116 ± 15	62-220	$p < 0.05$
	Antisense MT-MMP-1	13/13	78 ± 10	28-148	NS
Plxen	Vector only	9/9	58 ± 10	13-109	
	Sense MT-MMP-1	9/9	124 ± 19	40-225	$p < 0.05$
	Antisense MT-MMP-1	9/9	69 ± 11	15-115	NS

^a Tumor cells transfected with vectors were injected intravenously (i.v.) at 5×10^5 in Balb/c mice. Tumor formation was then monitored.

^b Data represent the tumors formed per number of injections during 2 separate experiments. In all mice tumors were detected within 10 days.

^c Mean number of nodules ± SD.

^d Minimal—Maximal numbers of detected colonies.

^e Significance of the difference between vector only as control and sense or antisense MT-MMP-1 transfectants as detected by Scheffer's F test. NS, not significant.

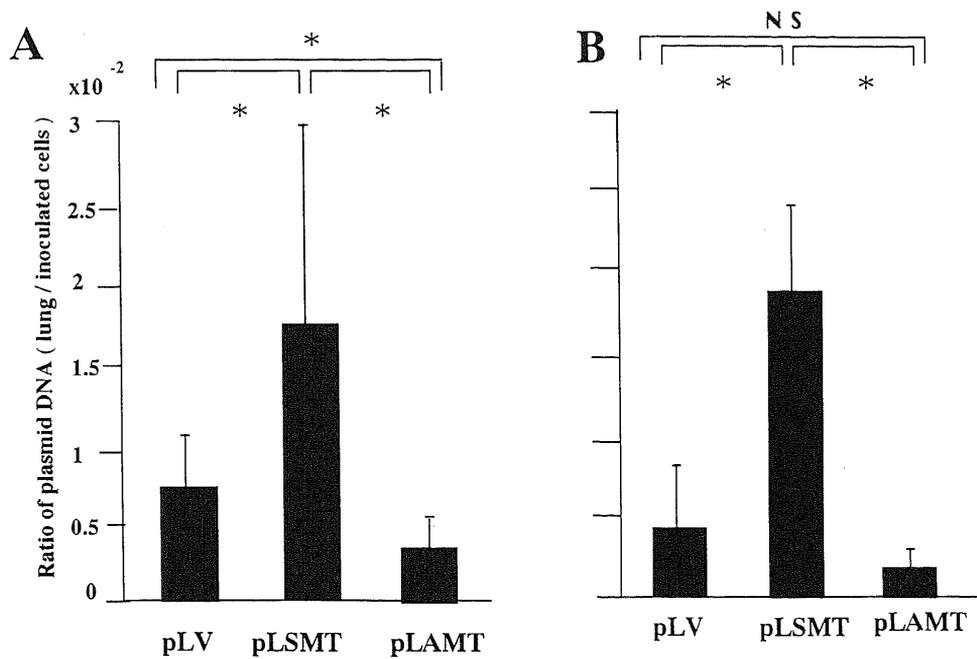


Fig. 10. Comparison of the ratio of plasmids detected in the murine lungs and that in the cultured cells. Cancer cells were transfected with only pLXEN vectors (pLV), MT-MMP expression vectors (pLSMT) or antisense MT-MMP-1 expression vectors (pLAMT), then each 5×10^6 cells were mixed. The intensity of radioactivities of PCR products shown in Fig. 9 were analyzed using a Fujix Bioimage analyzer and the replaced plasmid DNA (\log_{10} DNA) was computed by the each calibration curves. And, the ratio of these total plasmid DNA in the lungs to that of the inoculated cells transfected with each plasmids was calculated. (A) HT1080 cells. (B) Madison 109 cells. Values are $\bar{x} \pm SD$. Significant differences at $p < 0.05$ are indicated (*). NS, not significant.

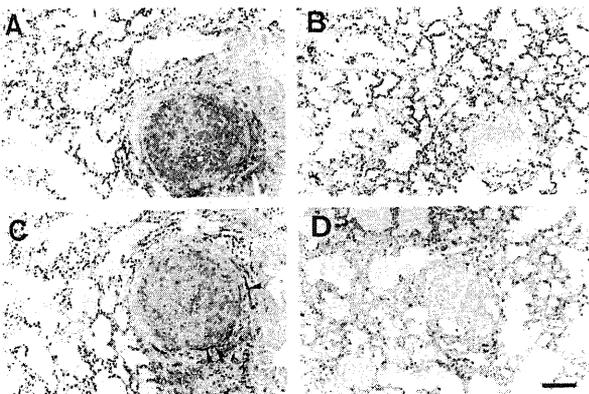


Fig. 11. Immunological detections of MMP-2 and MT-MMP-1 produced by tumor cells transfected with plasmids at the metastatic sites and fibroblasts in the lungs. The lungs of mice after the intravenous inoculation of Madison 109 cells transfected with MT-MMP-1 expression plasmids (A, C) and vector only (B) were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 16 h at 4°C. After ethanol dehydration, the lungs were embedded in paraffin. Sections of 6 μm thick were deparaffinized, immersed with 0.3% H_2O_2 in methanol and washed with PBS. The sections were incubated with 3% BSA in PBS, washed then immersed in 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ biotinylated monoclonal antibody (anti MT-MMP-1 antibody 113-5B7, A and B; anti MMP-2 antibody 75-7F7, C; non-immune mouse IgG, D) for 60 min at room temperature. After washing the samples were incubated with peroxidase conjugated anti-biotin antibody and stained with immunopure, metal enhanced DAB substrate kit. Arrows indicated the peripheral fibroblasts of the cancer cell nest stained with anti MT-MMP-1 antibody. Scale bar, 100 μm .

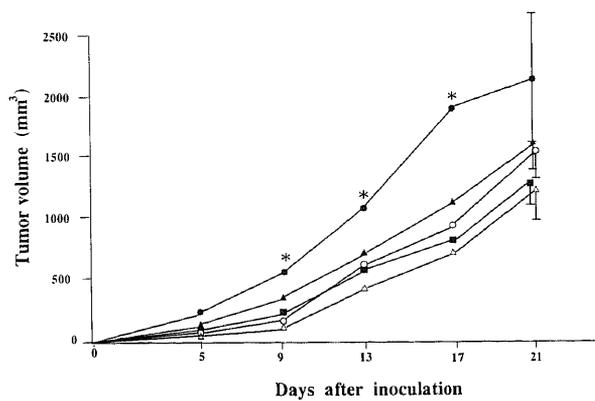


Fig. 12. Growth curves of Madison 109 cells transfected with the plasmids. 1×10^6 cancer cells were injected subcutaneously into the flank of each mouse. Cells transfected with the expression vectors: vectors only, \circ ; MT-MMP-1 expression vectors, \bullet ; antisense MT-MMP-1 expression vectors, \triangle ; the cells without transfection, \blacksquare ; the cells have cultured for 5 days since transfection with MT-MMP-1 expression vectors to weaken the transient expression, \blacktriangle . Values are means for 15 mice from each group. The significances differences from the controls treated with the vectors only are $p < 0.05$ (*).

Madison109 細胞は移植後 5 日目に肺に転移結節の形成が肉眼的に確認でき始め、14 日目には肺転移巣が密着し重なり合うことが確認された。よって、転移結節数の計測は移植後 10 日目に行った。また、形成される転移結節は白色調であるため、黒インクを含有する染色液を気管内より注入後、脱色してコントラストを増した状態で計測した。その結果、使用したベクターの種類に関わらず、対照群に比べて 1.7-2.1 倍と MT 群に有意に ($p < 0.05$) 転移結節が多く認められた。また、AS 群と対照群との間に有意差は認められなかった (表 2)。

4. Madison109 細胞肺転移結節の免疫組織染色

各遺伝子導入細胞を Balb/c マウスに静脈内移植して 7 日目の肺転移結節における MT-MMP-1 および MMP-2 の発現を免疫組織染色にて観察した。MT-MMP-1 遺伝子導入細胞を移植したマウス肺では検出可能な転移巣のうち約 2 割に染色が認められ、癌細胞の細胞質が抗 MMP-2 抗体、抗 MT-MMP 抗体にて染色した。抗 MT-MMP 抗体にて染色された転移巣内の癌細胞は、ほぼ全て染色されていたが、特に転移巣の外側部で濃染した。また抗 MT-MMP 抗体にて染色された転移巣の周囲の線維芽細胞は抗 MMP-2 抗体によっても強く染色された。これらの MT-MMP-1 陽性の結節は陰性の結節と比較してサイズが大きい傾向を示した。対照プラスミドおよび AS-MT-MMP-1 遺伝子導入腫瘍細胞の全ての転移巣は抗 MT-MMP 抗体にて染色されなかった。この時、肺胞壁に存在する線維芽細胞は抗 MMP-2 抗体にて染色されたが、MT-MMP-1 遺伝子導入細胞転移巣周囲のそれに比し弱染であった (図 11)。

5. MT-MMP-1 遺伝子導入による皮下腫瘍増殖への影響

MT-MMP-1 遺伝子のセンスあるいはアンチセンス発現プラスミドおよびその対照となるベクタープラスミドを導入した Madison109 細胞を、それぞれ 5×10^5 個/0.2ml をマウス背部皮下に移植し、その容積を経時的に計測することで、MT-MMP-1 の発現が腫瘍の増殖能に与える影響を検討した。対照には非プラスミド導入細胞および、MT-MMP-1 遺伝子導入後 5 日間培養して一過性の導入遺伝子の発現が減弱した後に回収した細胞群についても検討した。その結果、MT 群は対照群に比べ、移植後早期の 9, 13, 17 日目まで有意に腫瘍容積の増加が認められた。また AS 群は全経過を通じて対照群と有意差が無かった。また、MT-MMP-1 遺伝子の導入後、5 日培養し皮下に移植した細胞群は対照群に比べやや腫瘍体積が大きい傾向は認められたものの有意差は無かった (図 12)。

考 察

マウス実験転移モデルにおいて MT-MMP-1 遺伝子をセンスに発現する細胞がアンチセンスに発現する細胞および対照として用いたベクタープラスミド導入細胞に非して有意に肺生着率が高い結果となった。また、HT1080 細胞では、AS-MT-MMP-1 遺伝子発現細胞は対照に比し有意に肺生着率が低下していた。これらの結果から、癌細胞が MT-MMP-1 遺伝子を高発現することにより自らの肺生着率を増加させることが解かった。また、MT-MMP-1 遺伝子を高発現させた細胞の皮下増殖率の増加および実験転移後の肉眼的肺結節形成数の増加より、この肺生着率を亢進させた原因として MT-MMP-1 による潜在型 MMP-2 の活性化の促進により IV 型コラーゲンの分解能が上昇したことが考えられた。アンチセンス遺伝子の発現が HT1080 細胞の肺生着率を抑制することから癌細胞の種類に

よっては MT-MMP-1 活性を制御することで転移が抑制できる可能性が示された。これらは、生体内での MT-MMP-1 の発現が癌細胞の転移、浸潤能を促進する重要因子であることを示している。

生体内での癌細胞の転移成立には多くの複雑なステップを経て成立する。本研究で用いた実験転移モデルは、癌細胞を尾静脈より移植するモデル²⁰⁾であるため、血行性転移全過程の中で癌細胞が脈管内に侵入した後の過程である血流運搬、定着、血管外脱出、増殖の過程のみを検討している。なかでも MMPs が関与すると考えられるのは血管外脱出での基底膜浸潤による血管外脱出と増殖のステップである。また、本研究で用いた実験転移アッセイの特徴として、癌細胞に導入した遺伝子の発現が一過性であるトランジェントトランスフェクション (transient transfection) 法¹⁶⁾を用いた事が挙げられる。持続発現クローンをを用いずにこの方法を用いた理由は、クローン化による特別なクローンの選択を避けること、一過性ではあるが強力な遺伝子発現細胞を容易に得ることができ、MT-MMP-1 持続高発現系の樹立が困難であったことが挙げられる。また、本アッセイは微量な癌細胞の転移効率を実験転移後の肺内細胞内の導入プラスミド遺伝子に特徴的な DNA を PCR で増幅し、サザンブロットング法により分析する方法をとった。

トランジェントトランスフェクション法では導入プラスミドが癌細胞の染色体 DNA に安定に取り込まれる以前にその効果を判定するため、細胞の増殖に伴ってプラスミドコピー数が増加する可能性はない。したがって癌細胞の肺への生着率を細胞の増殖に影響されことなく観察することができる。肺内での癌細胞中のプラスミドを検出するため考慮に入れた事項として、1) 細胞への遺伝子導入効率 2) 癌細胞の脈管内移植時から癌細胞が脈管外侵入時までの過程における癌細胞の生存率 3) 癌細胞転移後の肺採取時期などがある。1) では遺伝子導入効率を可能なかぎり上昇させるための前実験として導入の際にリン酸カルシウム濃度、培養液に加えるプラスミド DNA 量、BSS の pH などの最適条件の検討は必要であった。本アッセイの Chen-Okayama 法¹⁷⁾による高効率トランスフェクション法にて遺伝子導入を行なった結果、肺内遺伝子の検出は可能であったが、より効率の高い遺伝子導入法により肺内検出量が増加する可能性がある。また、2) の癌細胞の血中生存率についての以前の報告では、原発巣から循環血中に侵入した癌細胞は 90%以上が 24 時間から 48 時間以内に変性、壊死に陥ると考えられており²³⁻²⁵⁾、その要因として NK 細胞、細胞障害性 T 細胞、リポ蛋白質、補体などの血液毒^{26,27)}血管内皮細胞、血球との間に起こる、摩擦、衝突などの物理的障害²⁸⁾、足場喪失²⁹⁾などが考えられている。特にヌードマウスは T 細胞による細胞性免疫機能の欠如により、NK 活性が正常マウスよりも高く、肺における腫瘍排除能力が高い³⁰⁾ため血行性転移を起しにくいモデルとされる。このため、NK 活性の抑制を目的としてサイクロフォスファミド (cyclophosphamide, CPA)^{31,32)}、インターフェロン (interferon, INF)³³⁾、プロスタグランジン E³⁴⁾、17 β -エストラジオール³⁵⁾等が用いられる。本研究では癌細胞の脈管内移植時から脈管外侵入時までの過程で癌細胞の生存率を高めるために、ウサギ抗アシアロ GM1 血清³⁶⁻³⁸⁾を使用し、血中での NK 細胞の活性を抑制し癌細胞への攻撃を減弱させた。ウサギ抗アシアロ GM1 血清はウシ脳組織より抽出、精製した NK 細胞の膜表面に存在する糖脂質であるアシアロ GM1 を抗原とし

て得られた抗血清であり、マウスおよびラットの NK 細胞、マクロファージの一部、ならびにマウス胎児胸腺細胞の一部と反応して癌細胞の移植を容易にする。ヌードマウスへの3日毎のこの抗血清の投与により、NK 活性の阻害を維持することが確認されている⁴⁰。前実験でこの血清を使用した結果、投与群は非投与群に比べて、MT-MMP-1 遺伝子導入 HT1080 細胞の静脈内移植後5日目における肺内プラスミド DNA の検出量が 10^2 – 10^3 倍増加した。次に3)での肺の採取時期は癌細胞移植後5日目とした。血管内に移植した癌細胞は肺毛細血管、細静脈壁に定着し血管外脱出を開始する⁴¹。一般にはその開始時期は血管内脱出後24時間程度とされているが、Walker256 細胞や AH130 細胞では血管内移植後6時間には肺内毛細血管に定着するといわれており^{42,43}、血管外脱出から肺血管内への定着はかなり早い時期に起ると考えられる。また、定着した癌細胞が転移巣を形成するためには、血管内より基底膜を破壊し、可能な限り素早く血管外脱出を行う必要がある。Filder²³の実験によると¹²⁵I-5-イオド-2'-デオキシウリジンで標識した B16 メラノーマ細胞をマウス静脈内に移植した結果、99%の腫瘍細胞が死滅し、また、死細胞を移植した場合は移植後8時間で肺内腫瘍細胞は消失するとしている。種類にもよるが、癌細胞は肺血管内へ一旦定着しても血管外脱出が行われないと、前述した血液毒、物理的障害などにより早期に死滅することが予想される。本アッセイでの移植後5日目の肺採取は、血管外脱出が行われていない癌細胞を観察している可能性は極めて低いと考えられる。

今回使用した癌細胞株はヒト線維肉腫由来 HT1080 細胞²⁷およびマウス肺癌細胞由来 Madison109 細胞⁴⁴⁻⁴⁶である。これらの細胞の共通の特徴はともに実験転移モデル、自然転移モデルで強力な肺転移能を有することである。また、相反する特徴として、研究目的とする酵素である MT-MMP-1、MMP-2 の発現性が異なる点が挙げられる。HT1080 細胞は両酵素の発現があり、Madison109 細胞ではノーザンブロット法、ゼラチンゼイモグラフィでその発現を認めなかった。これらの細胞に対する AS-MT-MMP-1 の転移抑制効果は HT1080 細胞では認められたが Madison109 細胞では明らかではなかった。この結果は Madison109 細胞の転移に関わる細胞外マトリックス分解が MT-MMP-1 に非依存性であることを示しており、ノーザンブロットでの MT-MMP-1 発現量の低さとも一致する。また、HT1080 細胞での抑制も十分ではなく(対照に比し58.0%の肺生着率低下)、この細胞の転移には MT-MMP-1 依存性の細胞外マトリックスの分解及び、非依存性の分解の相方が関与している可能性がある。

肺転移結節を免疫染色法で調べると癌細胞の中で MT-MMP-1 を発現している Madison109 細胞は MMP-2 に対しても同時に陽性であった。また、その周囲の線維芽細胞にも MT-MMP-1、MMP-2 の強い発現が観察された。MMP-2 は癌組織の線維芽細胞で生産され、潜在型として放出されることが知られている^{37,38}。また、Madison109 細胞自身は MMP-2 を発現していない。このことから癌細胞に人為的に導入した MT-MMP-1 遺伝子の発現が周囲の線維芽細胞由来の MMP-2 を癌細胞表面へと誘引したと考えられた。すなわち、MT-MMP-1 が潜在型 MMP-2 を活性化するだけでなく細胞表面に保持するための受容体機能も持つ可能性が示唆された。

MT-MMP-1 遺伝子を発現している一部の肺の転移結節では

全体の細胞に均一の遺伝子発現が認められた。これらの結節では導入遺伝子が宿主染色体に組み込まれた持続遺伝子発現細胞(stable transfectant)である可能性が考えられる。試験管内(in vitro)では長期安定な遺伝子発現細胞を得ることが出来なかったが、それは実験に用いた細胞の問題であるよりも、試験管内での培養と生体内の環境の違いが原因であると考えられる。試験管内での MT-MMP-1 持続発現細胞株の樹立が困難である理由の一つとして、MT-MMP-1 の発現により細胞膜表面で添加血清中に混在する潜在型 MMP-2 の活性化が起こり、周辺の基底膜成分を分解することによって、自らの足場を失うことで細胞増殖が阻害される可能性が考えられる。一方、生体内では周辺の ECM は豊富に存在し、ECM の破壊が癌細胞の浸潤と増殖を助長するが、足場を完全に失うことにはならない。実際、試験管内で培養できるのは MT-MMP-1 の発現レベルの低い細胞だけであり、株化細胞では MT-MMP-1 の発現が低いか、もしくは無い細胞が選別されている可能性がある。このことが Madison109 細胞に見られるように株化された癌細胞株の転移浸潤能が MT-MMP-1 に非依存性である現象の一因かもしれない。

以上の結果から、MT-MMP-1 の MMP-2 の活性化が癌の浸潤および実験的転移能を亢進させることが示された。また、AS-MT-MMP-1 が実験的転移能を抑制した事実から、MT-MMP-1 の発現を転写レベルで抑制するためにアンチセンスオリゴヌクレオチド(antisense-oligonucleotides, AS-ON-Ds)^{47,48}や、ウイルス⁴⁹⁻⁵¹によって AS-MT-MMP-1 遺伝子を癌細胞へ導入するなどの手法で、ある種の癌の転移、浸潤が制御できる可能性があると考えられる。

結 論

ヒト線維肉腫 HT1080 細胞およびマウス肺癌細胞 Madison109 細胞に MT-MMP-1 および AS-MT-MMP-1 の遺伝子を発現させた後、マウスに移植して転移、増殖能に与える影響を実験転移アッセイおよび病理学的手法にて検討し、以下の結果を得た。

1. HT1080 細胞、Madison109 細胞は両者共に肺への高転移能を有するが、前者のみに MMP-2、MT-MMP-1 の発現が認められた。

2. 実験転移モデルにおいて2種類の細胞で MT-MMP-1 遺伝子導入群(MT 群)は発現ベクターのみの導入細胞群(対照群)に比べて、有意に肺生着率が高かった。Madison109 細胞に AS-MT-MMP-1 遺伝子を導入した群(AS 群)と対照群との間に差は認められなかった。一方、HT1080 細胞では対照群に比べ AS 群は肺生着率が有意に少なかった。

3. Madison109 細胞の実験的肺転移における腫瘍移植後10日目の肺転移結節数は MT 群が対照群、AS 群に比し約2倍と有意に多かった。

4. 肺転移結節を形成している癌細胞の中で MT-MMP-1 を発現している Madison109 細胞は MMP-2 に対する免疫染色が陽性であった。また、その周囲の線維芽細胞にも MT-MMP-1、MMP-2 の強い発現が観察された。

5. マウス皮下移植後、遺伝子導入 Madison109 細胞の容積を径時的に計測した結果、9, 13, 17 日目において MT 群が対照群、AS 群に比し容積の増加が認められたが、それ以降に差は認められなかった。

以上の結果から、遺伝子導入により一過性に発現させた MT-MMP-1 が活性化 MMP-2 を通じて癌細胞の実験的転移能、浸潤能および増殖性を亢進させることが明らかとなった。このことから、MT-MMP-1 および MMP-2 が癌の増殖、転移抑制の標的となり得る可能性が示された。

謝 辞

稿を終えるに臨み、懇篤な御指導と御校閲を賜りました恩師清水元治教授に深甚なる謝意を表します。また、本教室での研究の志に多大な御協力と御鞭撻を賜りました金沢大学第一外科学教室渡辺洋宇教授に深く感謝いたします。さらに終始直接の御指導を賜りました佐藤博士、喜納宏昭博士をはじめ金沢大学がん研究所ウイルス部教室各位に深謝致します。

なお、本論文の要旨の一部は、第54回日本癌学会総会（1995年、京都）において発表した。

文 献

- 1) **Matrisian, L. M.**: Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling. *Trends Genet.*, **6**, 121-125 (1990).
- 2) **Frederick Woessner, J. Jr.**: Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J.*, **5**, 2145-2154 (1991).
- 3) **Stetler-Stevenson, W. G., Aznavoorian, S. & Liotta, L. A.**: Tumor cell interactions with the extracellular matrix during invasion and metastasis. *Annu. Rev. Cell Biol.*, **9**, 541-73 (1993).
- 4) **Tryggvason, K., Hoyhtya, M. & Pyke, C.**: Type IV collagenases in invasive tumors. *Breast Cancer Res. Treat.*, **24**, 209-18 (1993).
- 5) **Amberger, V. R., Paganetti, P. A., Seulberger, H., Eldering, J. A. & Schwab, M. E.**: Characterization of a membrane-bound metalloendoproteinase of rat C6 glioblastoma cells. *Cancer Res.*, **54**, 4017-4025 (1994).
- 6) **Stetler-Stevenson, W. G., Liotta, L. A. & Kleiner, D. E. Jr.**: Extracellular matrix 6: Role of matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *FASEB J.*, **7**, 1434-1441 (1993).
- 7) **Khokha, R., Waterhouse, P. Yagel, S., Lala, P. K., Overall, C. M., Norton, G. & Denhardt, D. T.**: Antisense RNA-induced reduction in murine TIMP levels confers oncogenicity on Swiss 3T3 cells. *Science*, **243**, 947-950 (1989).
- 8) **Takino, T., Sato, H., Yamamoto, E. & Seiki, M.**: Cloning of a human gene potentially encoding a novel matrix metalloproteinase having a C-terminal transmembrane domain. *Gene*, **15**, 293-298 (1995).
- 9) **Sato, H., Takino, T., Okada, Y., Cao, J., Shinagawa, A., Yamamoto, E. & Seiki, M.**: A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumor cells. *Nature*, **370**, 61-65 (1994).
- 10) **Will, B.**: A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumor cells. *Eur. J. Biochem.*, **231**, 602-608 (1995).
- 11) **Takino, T., Sato, H., Shinagawa, A. & Seiki, M.**: Identificat of the second membrane-type matrix metalloproteinase (MT-MMP-2) gene from a human placenta cDNA library. *J. Biol. Chem.*, **270**, 23013-23020 (1995).
- 12) **Fridman, R., Toth, M., Pena, D. & Mobashery, S.**: Activation of progelatinase B (MMP-9) by gelatinase A (MMP-2). *Cancer Res.*, **55**, 2548-2555 (1995).
- 13) **Okada, A., Bellocq, J. P., Rouyer, N., Chenard, M. P., Rio, M. C., Chambon, P. & Basset, P.**: Membrane-type matrix metalloproteinase (MT-MMP) gene is expressed in stromal cells of human colon, breast, and head and neck carcinomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 2730-2734 (1995).
- 14) **Nomura, H., Sato, H., Seiki, M., Mai, M. & Okada, Y.**: Expression of membrane-type matrix metalloproteinase in human gastric carcinomas. *Cancer Res.*, **55**, 3263-3266 (1995).
- 15) **Sato, H., Kida, Y., Endo, Y., Mai, M., Sasaki, T. & Seiki, M.**: Expression of genes encoding type IV collagen-degrading metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases in various human tumor cells. *Oncogene*, **7**, 77-83 (1992).
- 16) **Akagi, T., Nyunoya, H. & Shimotohno, K.**: Murine retroviral vectors expressing the tax1 gene of human T-cell leukemia virus type 1. *Gene*, **106**, 255-259 (1991).
- 17) **Chen, C. & Okayama, H.**: High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol. Cell Biol.*, **7**, 2745-2752 (1987).
- 18) **Brown, P. D., Kleiner, D. E., Unsworth, E. J. & Stetler-Stevenson, W. G.**: Cellular activation of the 72kDa type IV procollagenase/TIMP-2 complex. *Kidney Int.*, **43**, 163-170 (1993).
- 19) **Wexler, H.**: Accurate identification of experimental pulmonary metastasis. *J. Natl. Cancer Inst.*, **36**, 641-645 (1966).
- 20) **Geran, R. I., Greenberg N. H., Macdonald, M. M., Schmacher, A. M. & Abbott, B. J.**: *Protocols or Screening Chemical Agents and Natural Products against Animal Tumors and Other Biological Systems*, 3rd ed., p1-103, Cancer Chem. Rep., Mayland, 1972.
- 21) **Fujimoto, N., Mouri, N., Twata, K., Ohuchi, E., Okada, Y. & Hayakawa, T.**: A one-step sandwich enzyme immunoassay for human matrix metalloproteinase 2 (72-kDa gelatinase/type IV collagenase) using monoclonal antibodies. *Clinica Chimica Acta*, **221**, 91-103 (1993).
- 22) **Glaves, D.**: Role of polymorphonuclear leukocytes in the pulmonary clearance of arrested cancer cells. *Invasion Metastasis*, **3**, 160-173 (1983).
- 23) **Filder, I. J.**: Quantitative analysis of distribution and fate of tumor embori labeled with I-5-iodo-2'-deoxyuridine. *J. Natl. Cancer Inst.*, **45**, 773-782 (1970).
- 24) **Reid, G. H. & Gibbins, J. R.**: Fate of cultured cells after injection into the circulation of syngeneic animals. *Cancer Res.*, **39**, 4724-4731 (1979).
- 25) **Iwasaki, T.**: Histological and experimental observations

- on the destruction of tumor cells in the blood vessels. *J. Pathol. Bacteriol.*, **20**, 85-105 (1915).
- 26) Hannna, N.: The role of natural killer cells in the control of tumor growth and metastasis. *Biochem. Biophys. Acta*, **780**, 213-226 (1985).
- 27) Glaves, D.: Intravascular death of disseminated cancer cells mediated by superoxide anion. *Invasion Metastasis*, **6**, 101-111 (1986).
- 28) Weiss, L., Dimitrov, D. S. & Angelova, M.: The hemodynamic destruction of intravascular cancer cells in relation to myocardial metastasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 5737-5741 (1985).
- 29) Folkman, J. & Moscona, A.: Role of cell shape in growth control. *Nature*, **273**, 345-349 (1978).
- 30) Goreik, E., Wiltrout, R. H., Okumura, K., Habu, S. & Herberman, R. B.: Role of NK cells in the control of metastatic spread and growth of tumor cells in mice. *Int. J. Cancer*, **30**, 107-112 (1982).
- 31) Vollmer, T. L. & Conley, F. K.: Effect of cyclophosphamide on survival of mice and incidence of metastatic tumor following intravenous and intracardial inoculation of tumor cells. *Cancer Res.*, **44**, 3902-3906 (1984).
- 32) Riccardi, C., Barlozzari, T., Santoni, A., Herberman, R. B. & Cesarini, C.: Transfer to cyclo of natural killer (NK) cells and *in vivo* natural reactivity against tumors. *J. Immunol.*, **126**, 1284-1289 (1981).
- 33) Nolibe, D., Aumatire, E. & Thang, M. N.: In vivo augmentation of rat lung natural killer cells activity and inhibition of experimental metastasis by double-stranded polynucleotides. *Cancer Res.*, **45**, 4774-4778 (1985).
- 34) Fulton, A. M. & Hepner, G. H.: Relationships of prostagrandin E and natural killer sensitivity to metastatic potential in murine mammary adenocarcinomas. *Cancer Res.*, **45**, 4779-4784 (1985).
- 35) Seaman, W. E., Blackman, M. A., Gindhart, T. D., Roubinian, J. R., Loeb, J. M. & Talal, N.: β -Estradiol reduces natural killer cells in mice. *J. Immunol.*, **121**, 2193-2198 (1978).
- 36) Bezault, J., Bhimani, R., Wiprovnick, J. & Furmanski, P.: Human lactoferin inhibits growth of solid tumors and development of experimental metastasis in mice. *Cancer Res.*, **54**, 2310-2312 (1994).
- 37) McKnight, A. J., Zimmer, G. J., Fogelman, I., Wolf, S. F. & Abbas, A. K.: Effect of IL-12 on helper T cell-dependent immune response *in vivo*. *J. Immunol.*, **152**, 2172-2179 (1994).
- 38) Liunggren, G., Liunggren, H. & Dalianis, T.: T cell subsets involved in immunity against polyoma virus-induced tumors. *Virology*, **198**, 714-716 (1994).
- 39) Marizio, P. D., Puddu, P., Conti, L., Belardelli, F. & Gessani, S.: Interferon γ upregulates its own gene expression in mouse peritoneal macrophages. *J. Exp. Med.*, **179**, 1731-1736 (1994).
- 40) Habu, S., Fukui, H., Simamura, K., Kasai, M., Nagai, Y., Okumura, K. & Tamaoki, N.: *In vivo* effects of anti-asialo GM1. Reduction of NK activity and enhancement of transplanted tumor growth in nude mice. *J. Immunol.*, **127**, 34-38 (1981).
- 41) Poste, G. & Fidler, I. J.: The pathogenesis of cancer metastasis. *Nature*, **283**, 139-146 (1980).
- 42) Sindelar W. F., Tralka, T. S. & Ketcham, A. S.: Electron microscopic observations on formations of pulmonary metastases. *J. Surg. Res.*, **18**, 137-161 (1975).
- 43) Kinjo, M.: Lodgement and extravasation of tumor cells in blood-borne metastasis. An electron microscopic study. *Br. J. Cancer*, **38**, 293-301 (1978).
- 44) Rose, W. C.: Evaluation of Madison 109 lung carcinoma as a model for screening antitumor drugs. *Cancer Treat Rep.*, **65**, 299-312 (1981).
- 45) Marks, T. A.: Characterization and responsiveness of the Madison 109 lung carcinoma to various antitumor agents. *Cancer Treat Rep.*, **61**, 1459-1470 (1977).
- 46) Schultz, R. M., Papamatheakis, J. D., Luetzeler, J., Ruiz, P. & Chirigos, M. A.: Macrophage involvement in the protective effect of pyran copolymer against the Madison lung carcinoma (M109). *Cancer Res.*, **37**, 358-364 (1977).
- 47) Volkmann, S., Dannull, J. & Moelling, K.: The polypurine tract, PPT, of HIV as target for antisense and triple-helix-forming oligonucleotides. *Biochimie*, **75**, 1-2 (1993).
- 48) Persaud, S. J. & Jones, P. M.: Antisense oligonucleotide inhibition of gene expression. *J. Mol. Endocrinol.*, **12**, 127-130 (1994).
- 49) Davidson, B. L., Allen, E. D., Kozarsky, K. F., Wilson, J. M. & Roessler, B. J.: A model system for *in vivo* gene transfer into the central nervous system using an adenoviral vector. *Nature Genet.*, **3**, 219-223 (1991).
- 50) Ferry, N., Duplessis, O., Houssin, D., Danos, O. & Heard, J. M.: Retroviral-mediated gene transfer into hepatocytes *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 8377-8381 (1991).
- 51) Yee, J. K., Miyanojara, A., LaPorte, P., Bouuic, K., Burns, J. C. & Friedmann, T.: A general method for the generation of high titer, pantropic retroviral vectors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 9564-9568 (1994).

Acceleration of Invasion and Metastasis in Cancer Cells Transfected with MT-MMP cDNA Yoshio Tsunozuka,
Department of Molecular Virology and Oncology, Cancer Research Institute, School of Medicine, Kanazawa University,
Kanazawa 920—J. J. J. Med. Soc., **105**, 272—286 (1996)

Key words cancer metastasis, membrane-type matrix metalloproteinase-1 (MT-MMP-1), antisense, transient transfection, PCR

Abstract

Membrane-type matrix metalloproteinase-1 (MT-MMP-1) is the activator of inactive pro-matrilysin A (latent MMP-2) that is one of the matrix metalloproteinases (MMPs) responsible for the dissolution of extracellular matrix (ECM). It was known that overexpression of MT-MMP-1 stimulates invasion of cells *in vitro*. Therefore MT-MMP-1 is believed to be crucial for invasion and metastasis of cancer cells *in vivo*. In the present study, I investigated the effect of transient expression of MT-MMP-1 in cancer cells and the inhibition of that to invasion and metastasis *in vivo* with experimental metastasis assays using mice. HT1080 fibrosarcoma cells expressing both MT-MMP-1 and MMP-2 mRNA and Madison109 lung cancer cells with the expressions of neither genes, were transfected with the expression plasmids for MT-MMP-1, antisense MT-MMP-1 (AS-MT-MMP-1) or only vector plasmids (control). Each transfectants were injected into the tail veins of mice, and the DNA were extracted from the cultured transfectants and the mice's lungs at 5 days after transplantation. DNA extracted; 1 mg were amplified by PCR and detected by Southern blot analysis. The ratios of detected plasmids in total lungs / injected transfectants were given by a bioimage analyzer and calibration curves of radioactivities. The results of the experimental metastasis assay that the ratio of MT-MMP-1 transfectants (MT-transfectants) was significantly ($p < 0.05$) higher than the control in both cells. And the AS-MT-MMP-1 transfectants (AS-transfectants) ratio was significantly ($p < 0.05$) lower than the control in HT1080 cells, but there was no difference in the Madison109 cells. In another studies to the transfectants of Madison 109 cells, the measurements of nodule numbers on the lung surface at 10 days after tumor transplantation and volumes of subcutaneous tumors were performed. As a result, the mean numbers of lung nodules by MT-transfectants was more than the control, and the expressions of MT-MMP-1 significantly ($p < 0.05$) enhanced the s.c. growth volumes compared to the control during the early periods after transplantation of their transfectants. These results mean that MT-MMP-1 accelerates the potential of experimental metastasis and invasion by activated MMP-2 *in vivo*, the inhibition of the function of MT-MMP-1 can control invasion and metastasis of some cancers.