

ヒト線維肉腫細胞(HT-1080)の肺転移に及ぼすウロキナーゼタイププラスミノゲンアクチベーターおよびプラスミノゲンアクチベーターインヒビター1の影響

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: 勝尾, 信一 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8561

ヒト線維肉腫細胞 (HT-1080) の肺転移に及ぼす ウロキナーゼタイププラスミノゲンアクチベーターおよび プラスミノゲンアクチベーターインヒビター1の影響

金沢大学医学部整形外科科学講座 (主任: 富田勝郎教授)

勝 尾 信 一

腫瘍細胞をヌードマウスの尾静脈内に投与することによって得られる血行性肺転移において、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, uPA)、抗 uPA 抗体、プラスミノゲンアクチベーターインヒビター1 (plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1) と抗 PAI-1 抗体の及ぼす影響を検討した。転移能の低いヒト線維肉腫細胞株 HT-1080 と HT-1080 を Fidler の方法で選択して得られた転移能の高いヒト線維肉腫細胞亜型の HP-4 を使用した。これらの薬剤の殺細胞効果を 3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニールテトラゾリウムブロマイド (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT) 比色法を用いて測定した。Wexler の方法を用いた肺転移形成と、腫瘍細胞注射に引き続いて起こる腫瘍細胞塞栓数を指標として、これらの薬剤の影響を測定した。uPA と高濃度の PAI-1 は HT-1080 と HP-4 に殺細胞効果を示した。抗 uPA 抗体と抗 PAI-1 抗体はいずれにも殺細胞効果を示さなかった。HT-1080 による肺転移はいずれの薬剤の影響も受けなかった。HP-4 による肺転移は uPA と抗 uPA 抗体の投与によって増加した。PAI-1 は HP-4 による肺転移を僅かに増加させ、抗 PAI-1 抗体は減少させた。どの薬剤も注射後24, 48, 72時間の肺内 HT-1080 細胞数に影響を与えなかったが、肺内の HP-4 細胞数は PAI-1 が増加させ uPA と抗 PAI-1 抗体は減少させた。これらの薬剤が HT-1080 の肺転移能には影響を与えず HP-4 のそれには与えたという結果は、線溶系が血行性肺転移形成に重要な役割を果たしていることを意味している。uPA の効果は、uPA がおそらく腫瘍細胞の浸潤能を増加させることにより肺転移形成を刺激していることを示唆する。PAI-1 と抗 PAI-1 抗体の HP-4 に対する効果は、PAI-1 が腫瘍細胞の肺内血管への着床を刺激し、抗 PAI-1 抗体が腫瘍細胞の肺内血管への着床を阻害することにより転移能の高い腫瘍細胞の肺転移を抑制できるということを示唆した。

Key words pulmonary metastasis, fibrinolysis, urokinase-type plasminogen activator, plasminogen activator inhibitor-1

骨軟部悪性腫瘍の診断・治療に対する進歩には目を見張るものがあり、その予後もかなり改善してきている。特に原発巣に対しては種々の化学療法・放射線療法・手術療法等の進歩により、局所根治率は著明に改善してきている。しかし初診時に既に肺転移があったり、経過中に肺転移の出現する症例が多々あり、これらの予後は極めて不良である。経過中の肺転移出現の理由として、微小転移の存在が挙げられる。即ち原発巣が悪性腫瘍と診断された時点で既に、画像では捉えられないほどの微小な転移が存在しているという考え方である。したがって転移巣が画像で捉えられる以前の細胞レベルでの転移の予防が現在の課題である。さて転移には血行性・リンパ行性・経管腔性・播種性があり、血行性転移の中にも原発局所での増殖・間質への遊離と血管内侵入・血中での移動・標的臓器血管内着床・血管外逸出・転移局所での増殖という過程¹⁾があり、それぞれの過程に多くの因子が関与している。また転移を起こすひとつの

腫瘍内にある性質の異なる腫瘍細胞が混在しており、転移能の高い細胞が転移を起こすと報告されている²⁻⁴⁾。一方1975年に Rennie ら⁵⁾が担癌生体と組織線溶系の関係を報告して以来、悪性腫瘍と組織線溶系の関係が注目されるようになり、1980年代に入り悪性腫瘍の浸潤や転移形成と組織線溶系との関係が報告されるようになってきた⁶⁾。臨床材料を用いて Sappino ら⁷⁾が肺転移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, uPA) の関係、前田ら⁸⁾が肺転移とプラスミノゲンアクチベーターインヒビター1 (plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1) の関係を報告し、また実験系においても Kellen ら⁹⁾が肺転移と uPA, Quax ら¹⁰⁾が肺転移と PAI-1 の関係を報告し、最近では Ossowski ら¹¹⁾が抗 uPA 抗体を用いて肺転移抑制の試みも行っている。そこで今回、当教室の大野¹²⁾がヒト線維肉腫細胞株を元に樹立した高頻度肺転移細胞株を用いてその uPA・PAI-1 を

平成6年5月2日受付, 平成6年6月14日受理

Abbreviations: CI, cytotoxic index; ¹²⁵IUDR, ¹²⁵I-iodo-2'-deoxyuridine; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; OD, optical density; PA, plasminogen activator; PAI, plasminogen activator inhibitor; PBS, phosphate-buffered saline; tPA, tissue-type plasminogen activator; T, Tween 20; uPA, urokinase-type plasminogen activator

測定し、さらに肺転移形成における uPA・PAI-1 の役割を検討すると共に、uPA・PAI-1 もしくはそれらの抗体で肺転移抑制が可能かどうかを検討した。

対象および方法

I. 実験動物

本研究における動物実験ではヌードマウス BALB/c nu/nu 雌 (日本チャールスリバー, 厚木) を用いて、特定の病原体に感染されていない (specific pathogen-free) 状態で、室内温度 25°C に保持し、放射線滅菌した水と飼料を与えた。3~4 週齢で購入し 5 週齢 (体重 18~20g) で実験を開始した。

II. 腫瘍細胞の性状

1. 腫瘍細胞と培養法

本研究にはヒト線維肉腫細胞株 HT-1080¹⁹⁾ [American Type Culture Collection (ATCC), Rockvill, MD, USA から購入] を使用した。またこの HT-1080 細胞株から Fidler の方法¹⁰⁾ によって選択した HT-1080-P-4 (HP-4) 細胞株を使用した。即ち HT-1080 細胞浮遊液をヌードマウス尾静脈内に投与して肺転移を作らせ、その肺転移巣を摘出して培養系に戻し、また再びその細胞浮遊液を投与すると言う操作を 4 回繰り返して得られた細胞株である。これらの細胞は 10% 非働化ウシ胎児血清 (fetal bovine serum, FBS) (Gibco, New York, USA) と 1% ペニシリン・ストレプトマイシン液 (Gibco) を加えた RPMI1640 培地 (日本製薬, 東京) を用いて、5% CO₂ 濃度、37°C で培養した。実験に用いる細胞浮遊液は、細胞の対数増殖期に 50% トリプシン・エチレンジアミン 4 酢酸液 (trypsin-ethylenediamine tetraacetic acid) (Gibco) で細胞を剥離した後、ハンクス液 (日本製薬) を用いて希釈して作製した。また細胞浮遊液使用にあたっては、トリパンブルー色素排除試験法により、90% 以上の生細胞があることを確認した。

2. 腫瘍細胞の肺転移能の測定

まず腫瘍細胞を尾静脈内投与した時の肺転移数を Wexler の方法¹⁰⁾ を用いて測定した。2.5×10⁶ 個/ml の HT-1080 および HP-4 細胞浮遊液を作成し、これを無麻酔下のヌードマウス尾静脈内に 0.2ml (細胞数 5×10⁶ 個) 注入した。11 日目にヌードマウスを屠殺し、屠殺したヌードマウスを仰臥位に固定し、正中切開にて気管を露出した。気管内に、インク (製図用, パイロット, 東京) 15ml・蒸留水 85ml・アンモニア水 (丸石製薬, 大阪) 2 滴からなる染色液を約 2ml ゆっくり注入した。気管を切離して肺を心臓ごと一塊に摘出し、流水中に 5 分間つけて余分な染色液を洗い流した。次に 70% アルコール 100ml・ホルムアルデヒド液 (和光純薬工業, 大阪) 10ml・酢酸 (和光純薬工業) 5ml からなる固定液¹⁰⁾ で 24 時間固定した。固定後心臓を切離し、肺を 5 葉に分割して、全葉の表面を実体顕微鏡 (×20) で観察した。肺表面に白く抜けて見える肺転移巣のうち、直径 50μm 以上のものを数えて肺転移数とした。

次に腫瘍細胞を尾静脈内投与した時の肺内腫瘍細胞数を Fidler の方法¹⁷⁾ を用いて経時的に測定した。HT-1080 細胞および HP-4 細胞培養中の対数増殖期に ¹²⁵I-ヨード-2'-デオキシウリジン (¹²⁵I-iodo-2'-deoxyuridine, ¹²⁵IUDR) (Du Pont, DE, USA) を培養液に加え、1μCi/ml となるようにして、24 時間培養した。その後 1×10⁶ 個/ml の細胞浮遊液を作成し、0.2ml (細胞数 2×10⁶ 個) の放射活性をオートウエルカウンター ARC-605 (アロカ, 東京) で測定した。また同濃度の細胞浮遊液 0.2ml (細胞

数 2×10⁶ 個) を無麻酔下のヌードマウス尾静脈内に投与して 1・2・4・8・12・24・48・72 時間後に屠殺し、心腔内穿刺により脱血した後に肺を摘出した。摘出した肺を 70% エタノール (和光純薬工業) に 72 時間漬けて酸可溶性の ¹²⁵I を洗い流し、細胞の DNA 内のみ ¹²⁵I が残存するようにし、摘出した肺の放射活性をオートウエルカウンター ARC-605 で測定した。そして放射活性より肺内の細胞数を換算した。

3. 組織学的観察

2.5×10⁶ 個/ml の HT-1080 および HP-4 細胞浮遊液を作成し、これを無麻酔下のヌードマウス尾静脈内に 0.2ml (細胞数 5×10⁶ 個) 注入して 24・48・72・168 時間後に屠殺し肺を摘出した。摘出した肺を 10% ホルムアルデヒド液 (和光純薬工業) で 3 日間固定した。固定した肺はパラフィン包埋し、4μm の厚さの切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行って、光学顕微鏡で観察した。更に同様に作製した薄切標本の内、腫瘍細胞投与後 72 時間のものに、抗 PAI-1 抗体 (Biopool, Umea, Sweden) を用いたアビジンビオチンペルオキシダーゼ複合体 (avidin-biotin-complex immunoperoxidase, ABC) 法による免疫組織化学染色を行って光学顕微鏡で観察した。

4. 腫瘍細胞の産生する uPA および PAI-1 の測定

HT-1080 細胞および HP-4 細胞の産生する uPA および PAI-1 を抗 uPA 抗体 (Technoclone, Vienna, Austria) および抗 PAI-1 抗体 (Technoclone) を用いて、エンザイム免疫アッセイ (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) で測定した。腫瘍細胞 1×10⁶ 個に対し培養液を 5ml 加え、24 時間培養した後の培養液を使用した。培養液 0.1ml を 96 穴プレート (Nunc, Roskilde, Denmark) に分注し、37°C で 2 時間放置した。液を廃棄して 0.5% ツイーン 20 (Tween 20, T) (和光純薬工業) を含むリン酸緩衝液 (phosphate-buffered saline, PBS) 液 (日本製薬) (PBS-T) で洗浄した後に、ペルオキシダーゼ標識抗 uPA 抗体もしくは抗 PAI-1 抗体を PBS-T で希釈して 0.1ml ずつ分注し、37°C で 2 時間放置した。液を廃棄して PBS-T で洗浄した後に、2'-アジノ-ビス (3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸) (2'-2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) 液 (和光純薬工業) に 30% 過酸化水素水 (和光純薬工業) 1μl を加えた基質溶液を 0.1ml ずつ分注して、室温で遮光し 60 分放置した。0.32% 硫酸水 (和光純薬工業) を 0.1ml ずつ分注して反応を停止させ、各ウエルの波長 405nm での吸光度をマイクロプレートリーダー (イージーリーダー EAR340AT) (SLT-Labinstrument, Vienna, Austria) を用いて測定した。希釈した濃度と吸光度の関係をプロットし、培養液中の uPA および PAI-1 活性を換算した。

III. 組織線溶系の肺転移に及ぼす影響

1. 薬剤

薬剤は uPA としてウロキナーゼ 6 万 (ミドリ十字, 大阪) を、抗 uPA 抗体として抗ヒト低分子量ウロキナーゼ (anti human low molecular weight urokinase) (Biopool) を使用した。PAI-1 は HT-1080 細胞由来の PAI-1 抗原 (PAI-1 antigen) (Biopool) を使用し、抗 PAI-1 抗体も HT-1080 細胞由来の抗ヒト PAI-1 (anti human PAI-1) (Biopool) を使用した。いずれも使用直前に蒸留水で溶解し、それぞれの濃度に調整した。

2. 腫瘍細胞に対する各薬剤の殺細胞効果の測定

腫瘍細胞に対する各薬剤の殺細胞効果を検討するため、生細

胞内の脱水素酵素の還元能を指標とする 3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニールテトラゾリウムブロマイド (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT) 比色法¹⁸⁾¹⁹⁾を用いた。まず各腫瘍細胞の 5.6×10^4 個/ml 浮遊液を作製し、これを96穴マイクロウェルプレート (Nunc) の各ウェルに $180 \mu\text{l}$ (細胞数 1×10^4 個) ずつ分注した。同時に各薬剤を $20 \mu\text{l}$ 加え、5% CO_2 濃度、 37°C で3日間培養した。2mg/ml の MTT (Sigma, St. Louis, MO, USA) を $25 \mu\text{l}$ 加えた後、さらに4時間培養した。培養後培地を吸引し、ジメチルスルフォキシド (dimethyl sulfoxide, DMSO) (Sigma) $200 \mu\text{l}$ を加えて、生細胞内で生成された MTT ホルマゼン結晶を溶解した。マイクロプレートミキサー-MPM-1 (岩城硝子, 東京) で溶解した結晶を均等に拡散させ、各ウェルの波長 540nm での吸光度 (optical density, OD) をマイクロプレートリーダー (イージーリーダー-EAR340AT) (SLT-Labinstrument) を用いて測定した。各薬剤の投与濃度は、uPA 300,000・30,000・3,000 単位/ml, 抗 uPA 抗体 10,000・1,000・100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, PAI-1 50,000・5,000・500ng/ml, 抗 PAI-1 抗体 10,000・1,000・100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ とした。得られた OD より、 $(1-T/C) \times 100$ (T, 薬剤投与時の OD の平均; C, 対照群の OD の平均) にて殺細胞指標 (cytotoxic index, CI) を計算した。CI が50以上の場合殺細胞効果ありと判断し、50未満の場合殺細胞効果なしと判断した。

3. 腫瘍細胞投与による肺転移数に対する各薬剤の効果の測定

ヌードマウスの尾静脈内に各薬剤を投与した際の、肺転移数に及ぼす影響を測定した。 1.5×10^5 個/ml の HT-1080 細胞および 1×10^5 個/ml の HP-4 細胞浮遊液を作成し、これを無麻酔下のヌードマウス尾静脈内に 0.2ml (3×10^5 個の HT-1080 細胞および 2×10^5 個の HP-4 細胞) 注入した。腫瘍細胞投与後 $1 \cdot 25 \cdot 49$ 時間に反対側の尾静脈より uPA・PAI-1 およびそれぞれの抗体を投与した。各薬剤の投与量は、uPA 3,000 単位・抗 uPA 抗体 $100 \mu\text{g}$ ・PAI-1 500ng・抗 PAI-1 抗体 $100 \mu\text{g}$ とし、いずれも投与量が 0.2ml となるように調整して投与した。コントロールには蒸留水を 0.2ml 投与した。腫瘍細胞投与後11日目にヌードマウスを屠殺し、肺転移数を測定した。肺転移数の測定法は II. 2 と同様に行った。

4. 腫瘍細胞投与後の肺内細胞数に対する各薬剤の効果の測定

ヌードマウスの尾静脈内に各薬剤を投与した際の、肺内腫瘍

細胞数に及ぼす影響を測定した。II. 2 と同様に ^{125}I UDR でラベルした腫瘍細胞 2×10^5 個をヌードマウスの尾静脈内に投与した。腫瘍細胞投与後 $1 \cdot 25 \cdot 49$ 時間に反対側の尾静脈より uPA・PAI-1 および抗 PAI-1 抗体を投与した。各薬剤の投与量は、uPA 3,000 単位・PAI-1 500ng・抗 PAI-1 抗体 $100 \mu\text{g}$ とし、いずれも投与量が 0.2ml となるように調整して投与した。コントロールには蒸留水を 0.2ml 投与した。腫瘍細胞投与後 $24 \cdot 48 \cdot 72$ 時間でヌードマウスを屠殺し、II. 2 と同様に肺の放射活性を測定し、細胞数を換算した。

IV. 統計学的検討法

結果は Student の t 検定により統計学的処理を行い、 $p < 0.05$ を有意とした。

成 績

I. 腫瘍細胞の転移能

1. 腫瘍細胞投与後の肺転移数の測定

HT-1080 細胞投与後の肺転移数は平均 60.0 ± 30.5 個 (平均値 \pm 標準偏差, $n=5$), HP-4 細胞投与後の肺転移数は平均 228.0 ± 73.3 個 ($n=5$) であり、有意に ($p < 0.001$) 肺転移数の増加が認められた (図 1)。

2. 腫瘍細胞投与後の肺内腫瘍細胞数の測定

HT-1080 細胞投与後の肺内腫瘍細胞数は投与後1時間では $174,143.8$ 個あったが、8時間後までは直線的に減少し、その後も減少スピードは落ちたものの順調に減少し72時間後には 217.5 個となった。HP-4 細胞投与後の肺内腫瘍細胞数は1時間後では $133,033.0$ 個あり、4時間後で $75,921.2$ 個とまで減少したが、8時間後には $93,539.8$ 個と一旦増加し、その後再び減少し、72時間では $6,273.2$ 個となった。HT-1080 細胞と HP-4 細胞を比較すると、1時間後から12時間後までは HT-1080 細胞の方が多いが、24時間後では逆転して HP-4 細胞が多くなり、その後は HP-4 細胞の方が多いまだだった (図 2)。

II. 腫瘍細胞投与後の肺の組織学的観察

HT-1080 細胞投与後24時間では腫瘍細胞はほとんど見つからなかった。48時間では腫瘍細胞が1個で存在していたが、細胞はまだ血管内に留まっており血管外への浸潤は見られなかった。72時間では腫瘍細胞が2~3個に増殖し血管外へ浸潤していた。168時間では数個から数十個の細胞からなる転移巣を形成していた (図 3)。HP-4 細胞投与後24時間では腫瘍細胞が1個で血管内に存在していたが、48時間では腫瘍細胞が血管外に

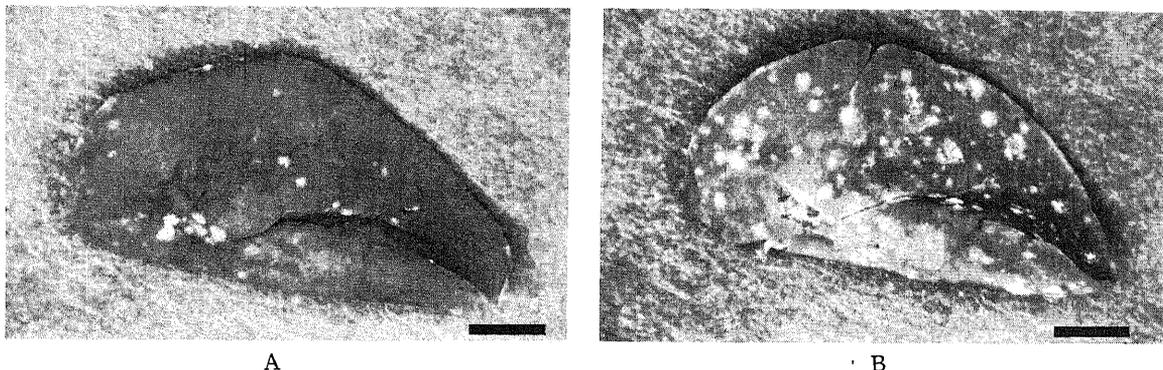


Fig. 1. Gross section of pulmonary metastases of HT-1080 cells (A) and HP-4 cells (B). Tumor cells (5×10^5) were inoculated into the tail veins of athymic mice. On the 11 th day, mice were autopsied and the lungs were colored with black ink. White spot on the lung is metastasis. Bars=2 mm.

浸潤していた。72時間では細胞が10個前後に増殖し、168時間では数十個の細胞からなる転移巣を形成していた(図4)。いずれの時間でも視野内に見られる腫瘍細胞数はHP-4の方が著しく多かった。

腫瘍細胞投与後72時間の肺の免疫組織化学染色では、抗PAI-1抗体陽性反応は腫瘍細胞の増殖している部位とは無関係に肺内各所の血管内皮細胞に存在し、腫瘍細胞そのものには存在しなかった(図5)。またHT-1080細胞投与後とHP-4細胞投与後を比較すると、HP-4細胞投与後の肺の方が抗PAI-1抗体陽性反応を示す血管内皮細胞が多く見られた。

Ⅲ. 腫瘍細胞の uPA および PAI-1 の測定

uPA はHT-1080細胞培養液で $136.0 \pm 13.3 \text{ ng}/1 \times 10^5$ 個細胞 ($n=10$) だったのがHP-4細胞培養液では $47.8 \pm 6.4 \text{ ng}/1 \times 10^5$ 個細胞 ($n=10$) と有意に ($p < 0.001$) 減少していた。一方PAI-1はHT-1080細胞培養液で $601.2 \pm 35.4 \text{ ng}/1 \times 10^5$ 個細胞 ($n=10$) だったのが、HP-4細胞培養液では $1,710.4 \pm 55.6 \text{ ng}/1 \times 10^5$ 個細胞 ($n=10$) と有意に ($p < 0.001$) 増加していた。

Ⅳ. 腫瘍細胞に対する各薬剤の殺細胞効果の測定

uPAは300,000・30,000単位/mlでHT-1080細胞・HP-4細胞のいずれに対してもCIが50以上と殺細胞効果を示したが、

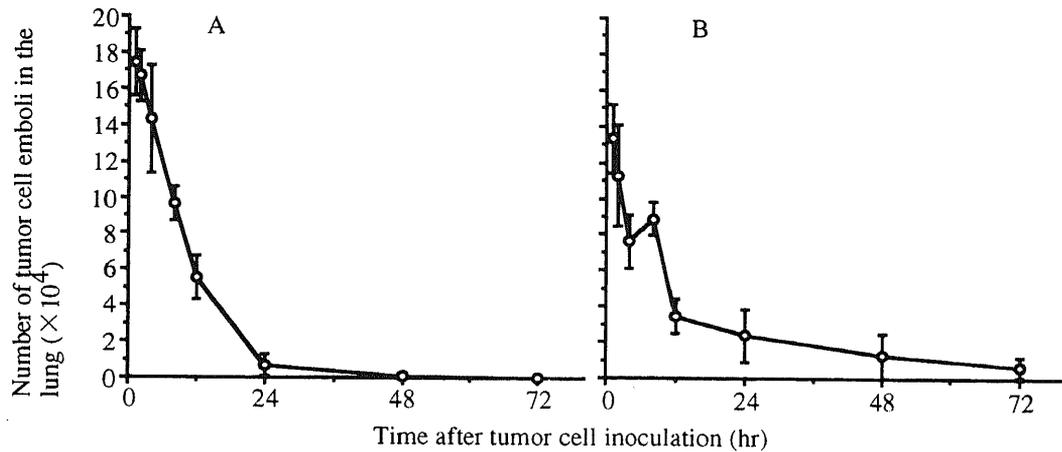


Fig. 2. Sequential tumor cell emboli in the lung of HT-1080 (A) and HP-4 cells (B). Tumor cells (2×10^5) labeled by ^{125}I -deoxyuridine were inoculated into the tail veins of athymic mice. At 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48 and 72 hr after inoculation, mice were autopsied and the lung radioisotope levels were counted, then the numbers of tumor cell emboli in the lung was calculated. Vertical bars indicate mean \pm SD ($n=5$).

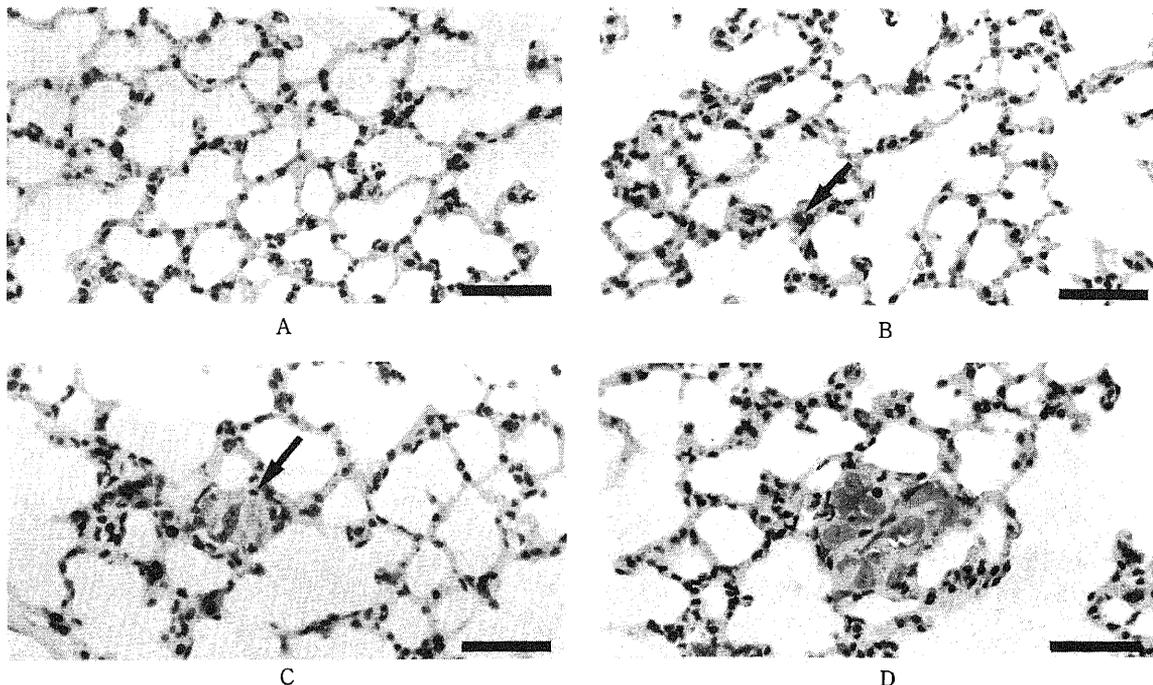


Fig. 3. Photomicrographs of pulmonary metastases of HT-1080 cells. HT-1080 cells (5×10^5) were inoculated into the tail veins of athymic mice. At 24, 48, 72 and 168 hr after the inoculation, the mice were autopsied and the lung were stained by hematoxylin-eosin. At 24 hr (A), tumor cell was not seen. At 48 hr (B), single tumor cell (arrow) was seen in the vessel. At 72 hr (C), tumor cell grew to about ten cells and infiltrated to extracapillary space (arrow). At 168 hr (D), metastases consisted of several tens of tumor cells are completed. Bars = 20 μm .

3,000単位/ml では CI 50未満で殺細胞効果を示さなかった。抗 uPA 抗体はいずれの濃度でも CI 50未満で殺細胞効果を示さなかった。PAI-1 は 50,000ng/ml で HT-1080 細胞・HP-4 細胞のいずれに対しても CI が 50以上と殺細胞効果を示したが、5,000・500ng/ml では CI 50未満で殺細胞効果を示さなかった。

抗 PAI-1 抗体はいずれの濃度でも CI 50未満で殺細胞効果を示さなかった (表 1)。

V. 腫瘍細胞投与による肺転移数に対する uPA・PAI-1 およびそれぞれの抗体の及ぼす効果の測定

HT-1080 細胞投与による肺転移数は uPA 投与でコントロー

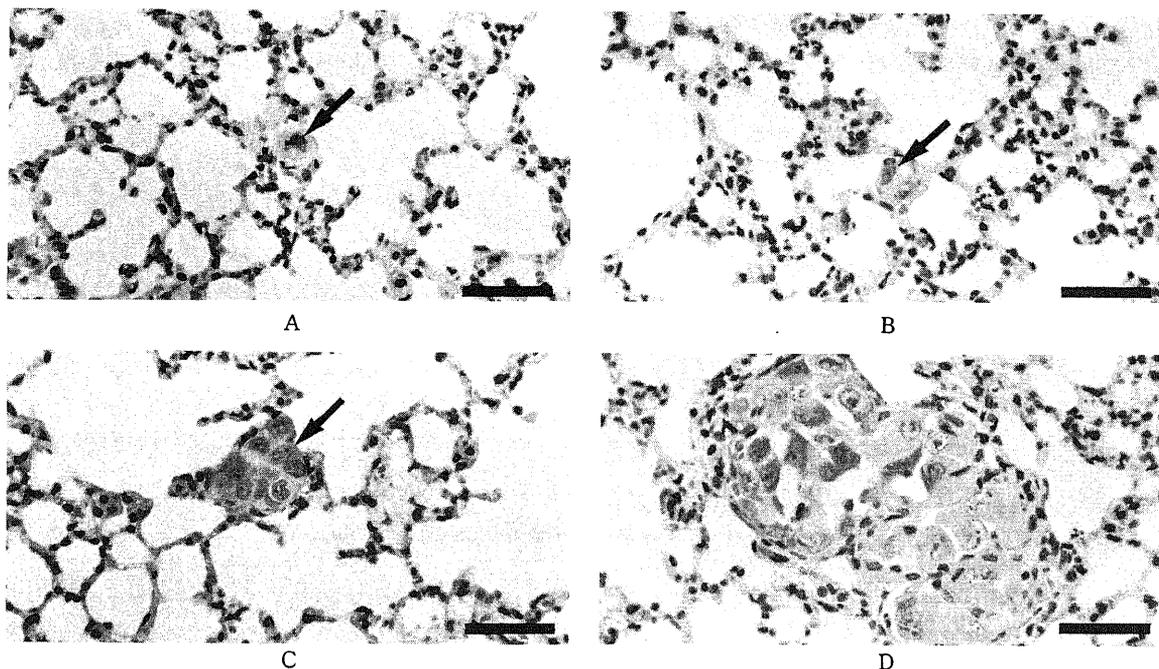


Fig. 4. Photomicrographs of pulmonary metastases of HP-4 cells. HP-4 cells (5×10^6) were inoculated into the tail veins of athymic mice. At 24, 48, 72 and 168 hr after the inoculation, the mice were autopsied and the lungs were stained by hematoxylin-eosin. At 24 hr (A), single tumor cell (arrow) was seen in the vessel. At 48 hr (B), single tumor cell (arrow) infiltrated to extracapillary space. At 72 hr (C), tumor cell grew to 2 or 3 cells (arrow). At 168 hr (D), metastases consisting of scores of tumor cells were completed. Bars=20 μ m.

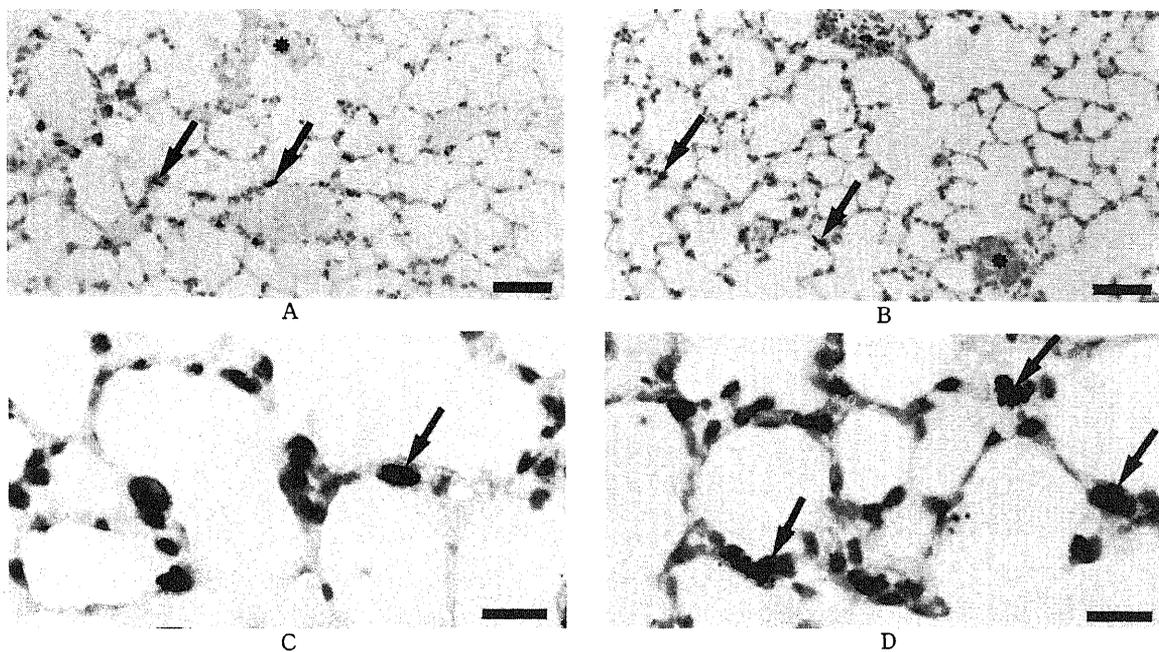


Fig. 5. Photomicrographs of pulmonary metastases of HT-1080 (A and C) and HP-4 (B and D) cells. Tumor cells (5×10^6) were inoculated into the tail veins of athymic mice. At 72 hr after inoculation, the mice were autopsied and the lungs were immunostained by anti-PAI-1 antibody. Immunopositive cells (arrows) were endothelial cells. Tumor cells (*) were not stained by anti-PAI-1 antibody. Bars in A and B indicate 50 μ m; bars in C and D indicate 10 μ m.

Table 1. Cytocidal effect of uPA, PAI-1 and their antibodies on HT-1080 and HP-4 using an MTT assay

Drug	Concentration ^{a)}	Cytotoxic index (CI) on tumor cell of	
		HT-1080	HP-4
uPA	3,000	6.6	-8.2
	30,000	90.0*	55.6*
	300,000	93.6*	97.3*
uPA-Ab	100	14.0	-0.6
	1,000	-0.6	-5.7
	10,000	19.7	17.3
PAI-1	500	15.6	-1.9
	5,000	-0.1	1.7
	50,000	92.9*	97.1*
PAI-1-Ab	100	14.7	-1.0
	1,000	5.1	-7.1
	10,000	23.5	33.5

The optical density (OD) was measured and the cytotoxic index (CI) was calculated as follows: $CI = (1 - T/C) \times 100$ (T, OD of the experiment; C, OD of the control).

^{a)} uPA, IU/ml; uPA-Ab and PAI-1-Ab, $\mu\text{g/ml}$; PAI-1, ng/ml.

* cytotoxic effect-positive (CI>50).

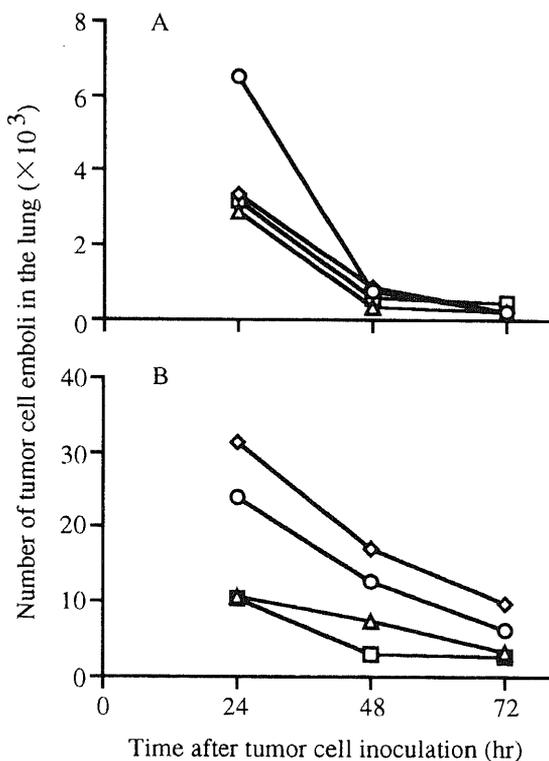


Fig. 6. Effect of uPA, PAI-1 and those antibodies in the sequential tumor cell emboli in the lung of HT-1080 (A) and HP-4 (B) cells. 2×10^5 tumor cells labeled by ^{125}I -deoxyuridine were inoculated into the tail veins of athymic mice. At 1, 25 and 49 hr after inoculation, 3,000 IU of uPA, 500 ng of PAI-1 or 100 mg of anti-PAI-1 antibody (PAI-1-Ab) were injected into the tail veins. At 24, 48 and 72 hr after inoculation, the mice were autopsied and the lung radioisotope levels were counted, then the numbers of tumor cell emboli in the lung were calculated (n=5). \circ , control; \square , uPA 3,000 IU; \diamond , PAI-1 500 ng; \triangle , PAI-1-Ab 100 mg.

ルに比べて $116.3 \pm 48.1\%$ (n=8), 抗 uPA 抗体投与で $140.1 \pm 75.3\%$ (n=8) と増加していた。PAI-1 投与では $112.4 \pm 99.3\%$ (n=8) と増加していたが, 抗 PAI-1 抗体投与では $93.9 \pm 43.1\%$ (n=8) と減少していた。HP-4 細胞投与による肺転移数は uPA 投与で $160.0 \pm 47.5\%$ (n=8), 抗 uPA 抗体投与で $246.8 \pm 118.8\%$ (n=8) と有意に (いずれも $p < 0.01$) 増加していた。PAI-1 投与で $160.1 \pm 85.0\%$ (n=8) と増加していたが, 抗 PAI-1 抗体投与で $60.9 \pm 27.7\%$ (n=8) と有意に ($p < 0.05$) 減少していた。

VI. 腫瘍細胞投与による肺内腫瘍細胞数に対する uPA・PAI-1 および抗 PAI-1 抗体の及ぼす効果の測定

HT-1080 細胞投与後の肺内腫瘍細胞数は, uPA 投与により 24・48時間後でコントロールに比べて減少していたが, 72時間では増減はなかった。PAI-1 投与では24時間後では減少していたが, 48・72時間では増減はなかった。抗 PAI-1 抗体でも24時間後では減少していたが, 48・72時間では増減はなかった。HP-4 細胞投与後の肺内腫瘍細胞数は, uPA 投与ではすべての時間で減少していた。PAI-1 投与ではすべての時間で増加し, 抗 PAI-1 抗体投与ではすべての時間で減少していた (図6)。

考 察

組織線溶系は, 血漿および血清中に存在するプラスミノゲンがプラスミノゲンアクチベーター(plasminogen activator, PA) により活性化されてプラスミンになり, このプラスミンがフィブリン塊を溶解するという過程からなっている。PA は生化学的に分子量約70,000のティッシュタイププラスミノゲンアクチベーター(tissue-type plasminogen activator, tPA) と分子量約55,000の uPA に分けられる。uPA にはプラスミンを介してコラーゲナーゼの活性化を起こし, 基底膜の構成成分であるラミニンやIV型コラーゲンの分解を起こす働きもある¹⁾。プラスミンの阻害物質として $\alpha 2$ プラスミンインヒビターがあり,

PA の阻害物質として PAI がある。この PAI は現在までに 4 種類が報告されている²⁰⁾。PAI-1 はエンドセリアルセルタイプ (endothelial cell type) と呼ばれ、分子量約 50kd の糖蛋白²¹⁾ で、健康人の血中に存在している。そのほとんどは内皮細胞で産生されている²²⁾ が、その他にもヒト肝細胞²³⁾・肝癌細胞株^{23,24)}・顆粒膜細胞²⁵⁾・SV-40 ウイルス由来ヒト肺線維芽細胞²⁶⁾・MJZJ メラノーマ細胞株²⁷⁾・血管平滑筋細胞²⁸⁾・血小板²⁹⁾での産生が報告されている。PAI-1 には活性型と非活性型が証明されており²⁰⁾、tPA は活性型 PAI-1 と反応する³⁰⁾が、uPA との関係は報告されていない。内皮細胞で産生された PAI-1 が細胞表面あるいは細胞間に存在するビトロネクチンと結合した状態で活性型として存在し、解離すると非活性型になると報告されている³¹⁾。また生体内での半減期も証明されていないが、37°C で約 2 時間血漿とインキュベートすることにより活性は二分の一に減少し、動物実験ではウサギで約 7 分^{32,33)}、ラットで約 3.5 分³⁴⁾と報告されている。PAI-2 は胎盤タイプ (placental type) と呼ばれ、妊婦血漿中や胎盤内に証明されている²⁰⁾。PAI-3 はプロテインCインヒビター (protein C inhibitor) と呼ばれ肝臓において合成される分子量 50kd の糖蛋白である。正常人の血漿中の PA 阻害は、主に PAI-1 と PAI-3 が働いているとされている²⁰⁾。4 つめの PAI はプロテアーゼネキシン (protease nexin) と呼ばれ、線維芽細胞・心筋・腎上皮細胞で合成されているが、血漿中では検出されない。

癌と組織線溶系の関係については、1975年に Rennie ら⁵⁾が担癌生体と組織線溶系の関係を報告し、1980年代に入ると悪性腫瘍の浸潤や転移形成と組織線溶系の関係^{6,7)}が報告され、盛んに研究が行われるようになった。臨床材料において、癌組織内における uPA^{8,9)}あるいは PAI-1 の局在が証明され、uPA に関して乳癌¹⁰⁾・膀胱癌¹¹⁾の生存率との関係、乳癌¹²⁾・肺癌¹³⁾・前立腺癌¹⁴⁾・子宮癌¹⁵⁾・胃癌¹⁶⁾の転移との関係、乳癌¹⁷⁾の癌浸潤との関係が報告され、PAI-1 に関して悪性腫瘍¹⁸⁾の再発との関係、悪性腫瘍¹⁹⁾・胃癌²⁰⁾の転移との関係が報告され、uPA あるいは PAI-1 の高いものは予後が悪いことが臨床的に証明されている。実験的研究においても、癌細胞の浸潤と uPA の関係^{40)~49)}、癌細胞の接着と PAI-1 の関係^{51,52)}、肺転移と uPA^{53)~55)}あるいは PAI-1⁵⁶⁾の関係が数多く報告されている。

肺転移の抑制実験については、ヘパリンを用いた肺転移抑制実験が報告されている^{55)~58)}が、ヘパリンの血小板凝集阻害能以外の作用によるという報告⁵⁹⁾もある。抗 uPA 抗体を投与することによって肺転移を抑制する試みも行われている¹¹⁾が、抑制できないという報告⁴⁰⁾もある。PAI-1 を介しての直接的な殺細胞効果を証明した報告はされている⁶⁰⁾が、肺転移抑制は試みられていない。HT-1080 細胞を用いた研究では uPA あるいは PAI-1 がこの細胞に存在すること^{51,61)}が報告され、さらに HT-1080 細胞のクローンによって uPA・PAI-1 の活性の異なることも証明されている⁶²⁾。当教室において HT-1080 細胞の組織型として高頻度肺転移株 HP-4 を得る方法が樹立された¹²⁾ので、本研究ではこの uPA および PAI-1 を測定し、肺転移過程における uPA および PAI-1 の関与を検討すると共に uPA および PAI-1 を介する肺転移抑制実験を行った。

まず HT-1080 細胞および HP-4 細胞の肺転移能を検討すると共に、その転移能の差が転移形成におけるどの段階で起こっているのか検討した。今回用いた肺転移モデルは尾静脈内に腫瘍細胞を注入して行う人工肺転移モデルであり、肺転移を起こ

す過程のうち原発局所での増殖・間質への遊離と血管内侵入に関しては検討できない。従って今回の実験で肺転移能に差があれば、肺転移を起こす過程のうち血中での移動・肺内血管着床・血管外逸出・肺内での増殖のうちいずれかあるいはいくつかの差によるものとなる。さて腫瘍細胞投与後11日目の肺転移数は有意に HP-4 細胞投与後が多く、経時的に見ると細胞投与後24時間で既に肺内腫瘍細胞数は HP-4 細胞が多かった。従って両細胞の肺転移能の差は腫瘍細胞投与後24時間で既に現われている。組織学的に見ると、両細胞とも腫瘍細胞投与後24時間ではまだ血管外に浸潤しておらず、両細胞の肺転移能の差は肺内血管着床の時点で現われていると考えられる。また免疫組織化学染色の結果では、HT-1080 細胞投与後より HP-4 細胞投与後の方が PAI-1 の存在する血管内皮細胞が多く存在しており、この差が両細胞間の肺転移能の違いを反映していると考えられる。従ってこの血管内皮細胞に存在する PAI-1 が腫瘍細胞の肺内血管への着床に関与していることが示唆される。

また両細胞培養液中の uPA・PAI-1 を測定したところ、HP-4 細胞の方が uPA が低く PAI-1 が高いという結果になった。肺転移能の高い細胞の方が uPA が低いというのは、転移形成早期に PAI-1 が必要と言う報告¹⁰⁾を裏付けるものである。その一方で転移能の高い細胞の方が分泌する uPA が多いと言う報告⁹⁾もある。

uPA・PAI-1 およびそれぞれの抗体投与の肺転移数および肺内腫瘍細胞数に及ぼす影響を見ると、HT-1080 細胞投与による肺転移数より HP-4 細胞投与による肺転移数に著明に影響が現われ、組織線溶系が肺転移形成に重要な役割を果たしていることを示唆している。

uPA および抗 uPA 抗体を生体に投与した時の結果について以下に考察する。uPA を投与することにより72時間までの肺内腫瘍細胞数はコントロールに比べて減少しているのに、肺転移数は増加した。しかも uPA は高濃度で殺細胞効果を持っていた。以上の結果より、uPA は組織線溶系を亢進させ腫瘍細胞が肺内血管に着床することを阻止するが、一旦接着した腫瘍細胞に対してはその浸潤能を亢進させ、最終的に肺転移を増強しているものと考えられる。しかし抗 uPA 抗体を投与しても肺転移は抑制できずむしろ増加した。腫瘍細胞は細胞内に uPA を持っており、抗 uPA 抗体の影響が腫瘍細胞内にまでは及ばず、また組織線溶系を抑制することにより腫瘍細胞の肺内血管への着床を促進することになり、その結果肺転移が著明に増強したと考えられる。

次に PAI-1 および抗 PAI-1 抗体を生体に投与した時の結果について考察する。PAI-1 を投与することで腫瘍細胞投与直後よりコントロールに比べて肺内腫瘍細胞数は増加し、肺転移は増加していた。しかも PAI-1 は高濃度で殺細胞効果を持っていた。以上の結果より、PAI-1 は組織線溶系を抑制することによりフィブリン分解を抑制して腫瘍細胞の肺内血管への着床を促進させると共に、PAI-1 が血管内皮細胞を刺激して血管内皮細胞の PAI-1 を増加させ、血管内皮細胞が腫瘍細胞と接着しやすくなる状態になり、最終的に肺転移を促進していると考えられる。そこで抗 PAI-1 抗体を投与したところ、抗 PAI-1 抗体そのものには殺細胞効果を持っていないにも関わらず、肺内腫瘍細胞数も減少し肺転移数も減少した。したがって抗 PAI-1 抗体は肺転移形成における肺内血管への着床という過程を阻害することにより肺転移を抑制したと考えられる。

今回の実験では肺転移形成における組織線溶系の果たす役割を解明し、抗 PAI-1 抗体で肺転移を抑制できた。この肺転移の抑制は腫瘍細胞の肺内血管への着床という過程を阻害することでなされたわけであり、今回用いたヒト線維肉腫細胞株にだけ特異的に起こったということではなく、他の悪性腫瘍の肺転移に対しても同様の効果が期待できるものと考えられる。

結 論

ヒト線維肉腫細胞株 HT-1080 細胞およびその組織型型の HP-4 細胞によるヌードマウスの人工肺転移モデルを用いて、肺転移形成における組織線溶系の関与を検討し、さらに組織線溶系を介した肺転移抑制を試みて次の結論を得た。

1. HT-1080 細胞より HP-4 細胞の方が高い肺転移能を有しており、その差は肺内血管着床能力の違いであった。
2. 腫瘍細胞投与後の肺の免疫染色を行ったところ、腫瘍細胞自身に PAI-1 は認められず、血管内皮細胞に PAI-1 が認められた。
3. HT-1080 細胞に比べて肺転移能の高い HP-4 細胞の方が産生する uPA 量が少なく、PAI-1 量は多かった。
4. uPA および PAI-1 はいずれも高濃度で HT-1080 細胞・HP-4 細胞のいずれに対しても殺細胞効果を示したが、抗 uPA 抗体および抗 PAI-1 抗体はいずれの細胞に対しても殺細胞効果を示さなかった。
5. 腫瘍細胞投与後に uPA・PAI-1 およびそれぞれの抗体を投与したところ、その影響は HT-1080 細胞よりも HP-4 細胞投与後の方が大きく現われた。
6. 腫瘍細胞投与後に uPA を投与したところ、細胞投与後数日間の肺内腫瘍細胞数は減少したが、肺転移数はコントロールに比べて HT-1080 細胞投与後で 116.3%、HP-4 細胞投与後で 160.0% と増加した。
7. 腫瘍細胞投与後に抗 uPA 抗体を投与したところ、肺転移数はコントロールに比べて HT-1080 細胞投与後で 140.1%、HP-4 細胞投与後で 246.8% と増加した。
8. 腫瘍細胞投与後に PAI-1 を投与したところ、細胞投与後数日間の肺内腫瘍細胞数は増加し、肺転移数もコントロールに比べて HT-1080 細胞投与後で 112.4%、HP-4 細胞投与後で 160.1% と増加した。
9. 腫瘍細胞投与後に抗 PAI-1 抗体を投与したところ、細胞投与後数日間の肺内腫瘍細胞数は減少し、肺転移数もコントロールに比べて HT-1080 細胞投与後で 93.9%、HP-4 細胞投与後で 60.9% と減少した。
10. uPA は腫瘍細胞の浸潤能を高めるが、組織線溶系亢進による肺内血管着床阻害作用も持ち合わせており、抗 uPA 抗体を投与することによって肺転移を抑制することはできなかった。
11. PAI-1 は腫瘍細胞の肺内血管着床を促進し、抗 PAI-1 抗体を投与することによって肺転移を抑制することができた。他の悪性腫瘍の肺転移に対しても同様の効果が期待できると思われる。

謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導・御校閲を賜りました恩師富田勝郎教授に深甚なる謝意を表します。また終始御指導を戴きました土屋弘行講師に心より感謝致します。本研究の開始にあたり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 教授に心より感謝致します。

す。また本実験の遂行にあたり終始御協力戴きました金沢大学整形外科教室腫瘍班の先生方に厚くお礼を申し上げます。

なお本論文の要旨の一部は、7th International Symposium on Limb Salvage (Singapore), 第 8 回日本整形外科学会基礎学術集会 (松本), 第 3 回がん転移研究会 (大阪) において発表した。

文 献

- 1) 山村 学, 山本政勝: 転移性腫瘍と線溶系の亢進. 癌と化学療法, 16, 1246-1254 (1989).
- 2) Talmadge, J. E. & Fidler, I. J.: Enhanced metastatic potential of tumor cells harvested from spontaneous metastases of heterogeneous murine tumors. J. Natl. Cancer Inst., 69, 975-980 (1982).
- 3) Talmadge, J. E., Benedict, K., Madsen, J. & Fidler, I. J.: Development of biological diversity and susceptibility to chemotherapy in murine cancer metastases. Cancer Res., 44, 3801-3805 (1984).
- 4) Fidler, I. J.: Tumor heterogeneity and the biology of cancer invasion and metastasis. Cancer Res., 38, 2651-2660 (1978).
- 5) Rennie, J. A. N. & Ogston, D.: Fibrinolytic activity in malignant disease. J. Clin. Pathol., 28, 872-874 (1975).
- 6) Markus, G.: The role of hemostasis and fibrinolysis in the metastatic spread of cancer. Semin. Thromb. Hemostasis, 10, 61-70 (1984).
- 7) Sappino, A. P., Busso, N., Belin, D. & Vassalli, J. D.: Increase of urokinase-type plasminogen activator gene expression in human lung and breast carcinomas. Cancer Res., 47, 4043-4046, (1987).
- 8) 前田義久, 相馬正幸, 笠倉新平: 悪性腫瘍の進展と血中 PAI-1 レベルに関する研究. 臨床血液, 32, 927-930 (1991).
- 9) Kellen, J. A., Mirakian, A. & Wong, A.: Single-chain urokinase-type plasminogen activator in a tumor model linked to metastatic potential. in vivo, 2, 155-158 (1988).
- 10) Quax, P. H. A., van Muijen, G. N. P., Weening-Verhoeff, E. J. D., Lund, L. R., Danf, K., Ruiter, D. J. & Verheijen, J. H.: Metastatic behavior of human melanoma cell lines in nude mice correlates with urokinase-type plasminogen activator, its type-1 inhibitor, and urokinase-mediated matrix degradation. J. Cell Biol., 115, 191-199 (1991).
- 11) Ossowski, L. & Reich, E.: Antibodies to plasminogen activator inhibit human tumor metastasis. Cell, 35, 611-619 (1983).
- 12) 大野賢朗: 骨軟部悪性腫瘍細胞における高肺転移能の獲得とその性状変化に関する研究. 十全医会誌, 102, 526-535 (1993).
- 13) Rasheed, S., Nelson-Rees, W. A., Toth, E. M., Arnstein, P. & Gardner, M. B.: Characterization of a newly derived human sarcoma cell line (HT-1080). Cancer, 33, 1027-1033 (1974).
- 14) Fidler, I. J.: Selection of successive tumour lines for metastasis. Nature (New Biol.), 242, 148-149 (1973).
- 15) Wexler, H.: Accurate identification of experimental pulmonary metastases. J. Natl. Cancer Inst., 36, 641-645

- (1966).
- 16) **Fekete, E.**: A comparative morphological study of the mammary gland in a high and a low tumor strain of mice. *Am. J. Path.*, **14**, 557-578 (1938).
 - 17) **Fidler, I. J.**: Metastasis: Quantitative analysis of distribution and fate of tumor emboli labeled with ¹²⁵I-5-iodo-2'-deoxyuridine. *J. Natl. Cancer Inst.*, **45**, 773-782 (1970).
 - 18) **森川精二**: 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide 比色法を用いた骨軟部悪性腫瘍に対する抗癌剤感受性試験の研究. *十全医会誌*, **100**, 757-771 (1991).
 - 19) **Carmichael, J., Mitchell, J. B., DeGraff, W. G., Gamson, J., Gazdar, A. F., Johnson, B. E., Glatstein, E. & Minna, J. D.**: Chemosensitivity testing of human lung cancer cell lines using the MTT assay. *Br. J. Cancer*, **57**, 540-547 (1988).
 - 20) **平原敬三, 松石哲郎, 寺尾俊彦**: Plasminogen activator inhibitors (PAI). *産婦血液*, **13**, 93-104 (1989).
 - 21) **van Mourik, J. A., Lawrence, D. A. & Loskutoff, D. J.**: Purification of an inhibitor of plasminogen activator (antiactivator) synthesized by endothelial cells. *J. Biol. Chem.*, **259**, 14914-14921 (1984).
 - 22) **Hessel, L. W. & Kluft, C.**: Advances in clinical fibrinolysis. *Clin. Haematol.*, **15**, 443-463 (1986).
 - 23) **Sprengers, E. D., Princen, H. M. G., Kooistra, T. & van Hinsbergh, V. M. N.**: Inhibition of plasminogen activator by conditioned medium on human hepatocytes and hepatoma cell line HepG-2. *J. Lab. Clin. Med.*, **105**, 751-758 (1985).
 - 24) **Coleman, P. L., Barouski, P. A. & Gelehiter, T. D.**: The dexamethasone-induced inhibitor of fibrinolytic activity in hepatoma cells. A cellular product which specifically inhibits plasminogen activation. *J. Biol. Chem.*, **257**, 4280-4284 (1982).
 - 25) **Ny, T., Bjersing, L., Hsuek, A. J. W. & Loskutoff, D. J.**: Cultured granuloma cells produce two plasminogen activators and an antiactivator, each regulated differently by gonadotropins. *Endocrinology*, **116**, 1666-1668 (1985).
 - 26) **Schleef, R. R., Sinha, M. & Loskutoff, D. J.**: Immunoradiometric assay to measure the binding of a specific inhibitor to tissue type plasminogen activator. *J. Lab. Clin. Med.*, **106**, 408-415 (1985).
 - 27) **Wagner, O., Korninger, C., Speiser, W., Schwaiger, N., Beckmann, R. & Binder, B. R.**: Isolation and characterization of a fast-acting PA-inhibitor from a human melanoma cell line. *Thromb. Haemost.*, **54**, 48 (1985).
 - 28) **Lang, W. E.**: Vascular smooth muscle cells inhibit plasminogen activators secreted by endothelial cells. *Thromb. Haemost.*, **20**, 165-169 (1985).
 - 29) **Sprengers, E. D., Verheijen, J. H., van Hinsbergh, V. W. M. & Emeis, J. E.**: Evidence for the presence of two different fibrinolytic inhibitors human endothelial cell conditioned medium. *Biochim. Biophys. Acta*, **801**, 163-170 (1984).
 - 30) **山田純一**: 各種病態における血中プラスミノゲンアクチベーターインヒビターの動態. *お茶の水医学雑誌*, **39**, 47-61 (1991).
 - 31) **Declerck, P. J. & Mol, M. D.**: Purification and characterization of a plasminogen activator inhibitor 1 binding protein from human plasma. *J. Biol. Chem.*, **263**, 15454-15461 (1988).
 - 32) **Mayer, E. J., Fujita, T., Gardell, S. J., Shebuski, R. R. & Reilly, C. F.**: The pharmacokinetics of plasminogen activator inhibitor-1 in the rabbit. *Blood*, **76**, 1514-1520 (1990).
 - 33) **Colucci, M., Parama, J. A. & Collen, D.**: Generation in plasma of a fast-acting inhibitor of plasminogen activator in response to endotoxin stimulation. *J. Clin. Invest.*, **75**, 818-824 (1985).
 - 34) **Emeis, J. J.**: Fast hepatic clearance of plasminogen activator inhibitor. *Thromb. Haemost.*, **54**, 230 (1985).
 - 35) **Kwaan, H. C.**: The plasminogen-plasmin system in malignancy. *Cancer Metastasis Rev.*, **11**, 291-311 (1992).
 - 36) **Oka, T., Ishida, T., Nishino, T. & Sugimachi, K.**: Immunohistochemical evidence of urokinase-type plasminogen activator in primary and metastatic tumors of pulmonary adenocarcinoma. *Cancer Res.*, **51**, 3522-3525 (1991).
 - 37) **Kohga, S., Harvey, S. R., Weaver, R. M. & Markus, G.**: Localization of plasminogen activators in human colon cancer by immunoperoxidase staining. *Cancer Res.*, **45**, 1787-1796 (1985).
 - 38) **Foekens, J. A., Schmitt, M., van Putten, W. L. J., Peters, H. A., Bontenbal, M., Janicke, F. & Klijn, J. G. M.**: Prognostic value of urokinase-type plasminogen activator in 671 primary breast cancer patients. *Cancer Res.*, **52**, 6101-6105 (1992).
 - 39) **Hasui, Y., Marutsuka, K., Suzumiya, J., Kitada, S., Osada, Y. & Sumiyoshi, A.**: The content of urokinase-type plasminogen activator antigen as a prognostic factor in urinary bladder cancer. *Int. J. Cancer*, **50**, 871-873 (1992).
 - 40) **Hienert, G., Kirchheimer, J. C., Pfluger, H. & Binder, B. R.**: Urokinase-type plasminogen activator as a marker for the formation of distant metastases in prostatic carcinomas. *J. Urol.*, **140**, 1466-1469 (1988).
 - 41) **Sugimura, M., Kobayashi, H., Kanayama, M. & Terao, T.**: Clinical significance of urokinase-type plasminogen activator (uPA) in invasive cervical cancer of the uterus. *Gynecol. Oncol.*, **46**, 330-336 (1992).
 - 42) **西野暢彦, 中村昌樹, 青木克憲, 今野弘之, 馬場正三, 高田明和**: 消化器癌転移における plasminogen activator の役割. *日消外会誌*, **24**, 1096-1100 (1991).
 - 43) **前田義久, 相馬正幸, 笠倉新平**: 悪性腫瘍の進展と血中 PAI-1 レベルに関する研究. *臨床血液*, **32**, 927-930 (1991).
 - 44) **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 tissue. *Thromb. Res.*, **65**, 709-719 (1992).
 - 45) **Testa, J. E. & Quigley, J. P.**: The role of urokinase-

type plasminogen activator in aggressive tumor cell behavior. *Cancer Metastasis Rev.*, **9**, 353-367 (1990).

- 46) Ossowski, L., Russo-Payne, H. & Wilson, E. L.: Inhibition of urokinase-type plasminogen activator by antibodies: The effect on dissemination of a human tumor in the nude mouse. *Cancer Res.*, **51**, 274-281 (1991).
- 47) Ossowski, L.: Invasion of connective tissue by human carcinoma cell lines: Requirement for urokinase, urokinase receptor, and interstitial collagenase. *Cancer Res.*, **52**, 6754-6760 (1992).
- 48) Kobayashi, H., Ohi, H., Sugimura, M., Shinohara, H., Fujii, T. & Terao, T.: Inhibition of in vitro ovarian cancer cell invasion by modulation of urokinase-type plasminogen activator and cathepsin B. *Cancer Res.*, **52**, 3610-3614 (1992).
- 49) Takahashi, K., Kwann, H. C., Ikeo, K. & Koh, E.: Phosphorylation of a surface receptor bound urokinase-type plasminogen activator in a human metastatic carcinomatous cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **182**, 1466-1472 (1992).
- 50) Ciambone, G. J. & McKeown-Longo, P. J.: Plasminogen activator inhibitor type 1 stabilizes vitronectin-dependent adhesions in HT-1080 cells. *J. Cell Biol.*, **111**, 2183-2195 (1990).
- 51) Cajot, J. F., Bamat, J., Bergonzelli, G. E., Kruithof, E. K. O., Medcalf, R. L. & Testuz, J.: Plasminogen-activator inhibitor type 1 is a potent natural inhibitor of extracellular matrix degradation by fibrosarcoma and colon carcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 6939-6943 (1990).
- 52) Joffe, E. B. D. K., Alonso, D. F. & Puricelli, L.: Soluble factors released by the target organ enhance the urokinase-type plasminogen activator activity of metastatic tumor cells. *Clin. Exp. Metastasis*, **9**, 51-56 (1991).
- 53) Marutsuka, K., Suzumiya, J., Kataoka, H., Komada, N., Koono, M. & Sumiyoshi, A.: Correlation between

urokinase-type plasminogen activator production and the metastatic ability of human rectal cancer cells. *Invasion Metastasis*, **11**, 181-191 (1991).

- 54) Yu, H. & Schultz, R. M.: Relationship between secreted urokinase plasminogen activator activity and metastatic potential in murine B16 cells transfected with human urokinase sense and antisense genes. *Cancer Res.*, **50**, 7623-7633 (1990).
- 55) 入村達郎, 中島元夫, Nicolson, G. L.: 血管壁と転移性癌細胞. *血管*, **8**, 77-84 (1985).
- 56) Lee, A. E., Rogers, L. A., Jeffery, R. E. & Longroft, J. M.: Comparison of metastatic cell lines derived from a murine mammary tumour, and reduction of metastasis by heparin. *Clin. Exp. Metastasis*, **6**, 164-174 (1988).
- 57) Sakamoto, N., Tanaka, N. G., Tohba, A., Osada, Y. & Ogawa, H.: Inhibitory effects of heparin plus cortisone acetate on endothelial cell growth both in tumor masses. *J. Natl. Cancer Inst.*, **78**, 581-585 (1987).
- 58) 田利清信, 辻井俊彦, 米瀬淳二, 児島真一, 佐竹一郎, 志佐 瑞: 持続ヘパリン静注による手術後の癌転移予防効果の検討. *医学のあゆみ*, **148**, 59-60 (1989).
- 59) 済木育夫, 村田 純, 東 一郎, 蔦 康宏, 三浦嘉晃, 戸倉清一: 硫酸化キチン誘導体によるガン細胞の転移阻止. *Polymer Preprints Japan*, **39**, 3155-3157 (1990).
- 60) Jankun, J.: Antitumor activity of the type 1 plasminogen activator inhibitor and cytotoxic conjugate in vitro. *Cancer Res.*, **52**, 5829-5832 (1992).
- 61) Lindahl, T. & Wiman, B.: Purification of high and low molecular weight plasminogen activator inhibitor 1 from fibrosarcoma cell-line HT-1080 conditioned medium. *Biochim. Biophys. Acta*, **994**, 253-257 (1989).
- 62) Laug, W. E., Wang, K., Mundi, R., Rideout, III., W., Kruithof, E. K. O. & Bogenmann, E.: Clonal variation of expression of the genes coding for plasminogen activators, their inhibitors and the urokinase receptor in HT1080 sarcoma cells. *Int. J. Cancer*, **52**, 298-304 (1992).

Effects of Urokinase-type Plasminogen Activator and Plasminogen Activator Inhibitor-1 on Pulmonary Metastases of Human Fibrosarcoma HT-1080 Shinichi Katsuo, Department of Orthopaedic Surgery, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med Soc., 103, 628—638 (1994)

Key words pulmonary metastasis, fibrinolysis, urokinase-type plasminogen activator, plasminogen activator inhibitor-1

Abstract

We examined the effects of urokinase-type plasminogen activator (uPA), anti-uPA antibody (uPA-Ab), plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) and anti-PAI-1 antibody (PAI-1-Ab) on hematogeneous pulmonary metastases formation after tumor cell injection into the tail veins of athymic mice. We used human fibrosarcoma (HT-1080) with low metastatic potential, and a subpopulation of human fibrosarcoma (HP-4) with high metastatic potential which was selected from the HT-1080 by Fidler's method. We measured the cytotoxic effects of these drugs using 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay in vitro. We examined the effects of these drugs on pulmonary metastases formation according to Wexler's method and the number of tumor cell emboli in the lung subsequent to an injection of tumor cells. uPA and high density PAI-1 had cytotoxic effects on HT-1080 and HP-4. uPA-Ab and PAI-1-Ab had no cytotoxic effects on either. Pulmonary metastases from HT-1080 were not affected by any of the tested drugs. Pulmonary metastases from HP-4 increased with uPA and uPA-Ab injections. PAI-1 slightly increased pulmonary metastases from HP-4, and PAI-1-Ab decreased it. While none of the drugs altered the number of HT-1080 cells in the lung at 24, 48 and 72 hours after the injection, PAI-1 increased the number of HP-4 cells in the lung, whereas, uPA and PAI-1-Ab decreased it. The result, that these drugs did not affect the metastatic potential of HT-1080 but only that of HP-4, means that fibrinolysis plays an important role in hematogenous pulmonary metastases formation. The effects of uPA suggest that uPA facilitates pulmonary metastasis formation probably due to an increase in the invasive ability of tumor cells. The effects of PAI-1 and PAI-1-Ab on HP-4 cells suggest that PAI-1 may facilitate tumor cell lodgement in vessels and PAI-1-Ab seems to be able to inhibit pulmonary metastases of tumor cells with high metastatic potential by inhibition of tumor cell lodgement in vessels.