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

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: 大野, 賢朗
	メールアドレス:
	所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8461

金沢大学十全医学会雑誌　第102巻　第4号　526－535 (1993)

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

金沢大学医学部整形外科学講座（主任：富田　勝郎教授）
大　野　賢　朗

骨軟部悪性腫瘍細胞における肺転移細胞の性状を解明する目的で，肺転移能を有する POS-1 細胞と HT-1080 細胞からヌードマウスを用いて継代選択して高肺転移細胞を樹立した．5×10^5 個の各腫瘍細胞を尾静脈より注入して肺転移結節数を計測したところ，継代選択を重ねるにつれて肺転移結節数は著明に増加した．各腫瘍細胞と継代肺転移細胞の増殖率について，腫瘍細胞をヌードマウスの背部皮下に移植して推定腫瘍重量を算定した場合と，3-(4, 5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2, 5-ジフェニルテトラゾリウムブロマイド (3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide, MTT) 比色法を用いた増殖曲線に差は認められなかった．MTT 比色法を用いた抗癌剤感受性試験では，両継代肺転移細胞においてシスプラチンに対する感受性に一定の傾向は認められなかったが，アドリアマイシンに対する感受性には有意な耐性傾向が認められた．トランスウエルを用いた浸潤能の検討では，POS-1 細胞が継代選択を重ねるにつれ時間依存性に浸潤能を上昇させたのに対し，HT-1080 細胞では浸潤能に変化がなかった．腫瘍細胞培養液中のゼラチン分解活性は継代選択された腫瘍細胞では活性値が上昇していたが，肺転移能の上昇に対しては相関関係がなかった．またゼラチンサブストレートゲルに非還元状態で電気泳動すると，HT-1080 細胞にはマトリックスメタロプロテアーゼ 9 (matrix metalloproteinase 9, MMP-9) (92kDaゼラチナーゼ/Ⅳ型コラゲナーゼ) と MMP-2 (72kDaゼラチナーゼ/Ⅳ型コラゲナーゼ) の外に，新たに継代肺転移細胞に MMP-3 (ストロムライシン) のバンドが観察された．同じ培養液を10倍に濃縮して MMP-3 と組織由来メタロプロテアーゼインヒビター (tissue inhibitor of metalloproteinases, TIMP) を定量すると，TIMP の量はほぼ一定にもかかわらず MMP-3 の量は5～10倍にも増加した．これらの結果から，骨軟部悪性腫瘍細胞は肺転移能においては不均一な細胞集団より成り立っていると同時に，肺転移能が上昇した原因として POS-1 細胞では浸潤能の上昇が強く関与していると考えられた．しかし HT-1080 細胞ではその浸潤能に特徴的な変化が認められなかったことから，段階的な肺転移上昇と必ずしも相関しないながらも細胞外マトリックス分解能の亢進が肺転移上昇の一つの要因となっていると推定された．

Key words bone and soft-tissue sarcoma, metastatic potential, invasion, metalloproteinase, chemosensitivity

近年種々の抗がん剤の開発ならびに癌化学療法の進歩はめざましく，骨肉腫をはじめとした悪性骨軟部腫瘍の治療成績の向上にも著しいものがある．しかし肺転移により死に至る予後不良例も多く，その臨床治療成績はなお満足できるものではない．癌細胞の血行性転移は，原発巣からの細胞遊離に始まり脈管を介しての移動，特定臓器の脈管への定着，浸潤，その臓器内における増殖という複雑な過程をとる．従って癌細胞が転移を形成するためには，多くのステップをくぐりぬけなければならない．癌は転移能において不均一な細胞集団であり，この性質ゆえに治療に抵抗し，かつ悪性化の道をたどると考えられている[1]．

1969年 Rygaard および Povlsen[2] が，ヒト大腸癌組織のヌードマウス皮下への移植に成功して以来，多くの報告者によりヒト癌可移植株が作られ研究されてきた．1973年に Fidler[3,4] は，B16 メラノーマ細胞をマウス尾静脈内移植して形成された肺転移結節を継代選択 (in vivo selection) することにより高転移性細胞 (B16-F10) を分離樹立した．この方法で得られた細胞は，安定した高い転移能を有しており，かつ臓器選択性をも兼ね備えていると考えられている．しかしながら骨軟部腫瘍細胞株では同じ細胞株から高肺転移細胞を作製し，転移について比較検討した報告はない．

そこで今回著者は，骨軟部悪性腫瘍細胞を用いてヌードマウスの尾静脈に注入する実験的肺転移モデルを作成し，その転移結節から得られた細胞を用いて再度同様な操作を繰り返す継代選択を行うことにより段階的に肺転移能の増強した高頻度肺転移細胞株を作成することにした．そして親細胞と各継代肺転移細胞の増殖能，抗癌剤感受性の差異，転移能および浸潤能について検討を加えることにより肺に転移する細胞特性の解明を試

平成5年6月11日受付，平成5年7月13日受理

Abbreviations: ADM, adriamycin; APMA, p-aminophenylmercuric acetate; CDDP, cis-platinum; CI, cytotoxic index; DMSO, dimethylsulfoxide; MMP, matrix metalloproteinase; MTT, 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide; NK, natural killer; OST, osteogenic sarcoma Takase strain; PBS,

みた．

材料および方法

Ⅰ．材　料

培養細胞は，ヒト骨肉腫細胞株 (osteogenic sarcoma Takase, OST) (当教室にて樹立[5])，HOS, MNNG-HOS[6] (大日本製薬，大坂)，ヒト線維肉腫細胞株[7] (HT-1080)，神奈川県立がんセンターより供与されたマウス骨肉腫細胞株 (POS-1) を用いた．各細胞株は RPMI-1640 培地 (日水製薬，東京) に 56℃ で30分間加温し非動化した 10% 仔牛胎児血清 (Hazleton, St. Lenexa, U.S.A.) と 1% ペニシリン・ストレプトマイシン 10,000 単位 (Gibco, New York, U.S.A.) を加えた組織培養液を用いて，37℃，7−7.5%CO_2，水蒸気飽和の状態で単層培養した．実験に用いるヌードマウスは日本クレア (東京) より購入した BALB/C, nu/nu，6〜8週令の雌を用いて，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℃ に保持し，放射線滅菌した水と飼料を与えた．

Ⅱ．各腫瘍細胞における肺転移形成の検討

各細胞株を 150cm² の培養フラスコ (Becton Dickinson Labware, New Jersey, U.S.A.) で単層培養し，ほぼ細胞過密状態となった時点で 0.16M 燐酸緩衝生理食塩水 (phosphate-buffered saline, PBS) (日水製薬) で洗浄し，0.05% のトリプシン (Gibco) で細胞をはがした後，ハンクス液 (日水製薬) で2回洗って単細胞浮遊液とした．血球計算板 (トーマ，東京) で生細胞数を算定した後，1×10^6 個の細胞浮遊ハンクス液 0.2ml を作成し27ゲージの注射針を用いてヌードマウスの尾静脈内に注入した．各細胞株につき4匹づつ1週毎に屠殺し，計4週間行った．Wexler 法[8]に従って気管から18ゲージの注射針を使って染色液としてインディアインク (Pelikan, Podbielskistrasse, Germany)，蒸留水，アンモニア水 (丸石製薬，東京) を注入し，フィーケッツ液［70% アルコール，ホルムアルデヒド (和光純薬，東京)，氷酢酸 (和光純薬) を 20：2：1 の割合で混合］で固定した．肉眼的に黒色の肺実質に対して白色の転移巣が確認できたものを『肺転移あり』と判定した．

Ⅲ．ヌードマウス継代選択による高肺転移細胞の樹立と肺転移能の比較

各腫瘍細胞を 25cm² の培養フラスコ内で単層培養を行った．細胞過密状態になったところで剥離し，ハンクス液で2回洗った後十分にピペッティングを行い単細胞浮遊液とした．生細胞数を算定した後，細胞浮遊ハンクス液 0.2ml として27ゲージの注射針を用いてヌードマウスの尾静脈内に注入した．POS-1 細胞は 8×10^5 個，HT-1080 細胞は 1×10^6 個の腫瘍細胞を注入移植後ヌードマウスの体重を3日毎に測定し，4週後に10〜20% の体重減少が認められた時点で屠殺した．1個の肺転移結節を無菌的に抽出し，はさみを用いて十分に細切してからメッシュで濾過し，1000〜1500rpm，10分間遠沈し上清を吸引後，RPMI-1640 培養液でピペッティングを行い細胞浮遊液として単層培養した．3〜4代単層培養で継代してから培養細胞を 10% ジメチルスルフォキシド (dimethylsulfoxide, DMSO) (Sigma, St. Louis, U.S.A.) で凍結保存するとともに，再度培養細胞をヌードマウス尾静脈内へ注入する継代選択を行った．POS-1 細胞は9代目，HT-1080 細胞は6代目まで同様の操作を行うことにより高頻度肺転移細胞を作成した．

さらに各腫瘍細胞と上述の方法で得られた POS-1 細胞は，3，6，9代目，HT-1080 細胞は2，4，6代目の各継代肺転移細胞について 5×10^5 個の各腫瘍細胞をヌードマウスの尾静脈内に注入した．1週後に屠殺し，Wexler 法[8]に準じてⅡの方法と同様の手順で肺を固定した後，実体顕微鏡 (ニコン，東京) を用いて各肺葉表面の転移結節数を算定した．

Ⅳ．背部皮下移植による増殖能の検討

各腫瘍細胞とⅢの方法で得られた POS-1 細胞は9代目，HT-1080 細胞は6代目の各継代肺転移細胞について，5×10^6 個の腫瘍細胞を 0.2ml のハンクス液で細胞浮遊液として，ヌードマウス背部皮下に接種した．3日毎に腫瘍の長径と短径を測定し，1/2×(長径)×(短径)² で推定腫瘍重量を算定した．この推定腫瘍重量が 200mg を越えた時点で各日数との相対平均腫瘍重量比を求め，増殖曲線を作成した．

Ⅴ．3-(4, 5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2, 5-ジフェニ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 (MTT assay) による増殖能と抗癌剤感受性の検討

1．MTT 比色法による増殖能の検討

MTT 比色法は森川の方法[9]に準じて行った．Ⅳの方法で用いたものと同様の腫瘍細胞を用いて，200μl の培養液中に生細胞が 2×10^3 個となるように調整し，これを96穴平底マイクロプレート (Nunclon, Roskilde, Denmark) の各ウエルに分注した．37℃，7〜7.5% CO_2，水蒸気飽和の環境で，48時間，72時間，96時間，120時間，144時間培養を行った．培養中の培養液交換は行わなかった．培養終了後，PBS に溶解した 2mg/ml の濃度の MTT (Sigma) を 25μl ずつ各々のウエルに加えて4時間培養し，培養液を吸引後 DMSO 200μl を加え MTT ホルマザン結晶を溶解し，各ウエルの吸光度をマイクロプレートリーダー (SLT-Labinstruments, Vienna, Austria) を用いて波長 540nm にて測定した．その吸光度にもとずいて細胞増殖曲線を作成した．

2．抗癌剤感受性についての検討

Ⅲの方法で用いたものと同様の腫瘍細胞を用いて，180μl の培養液中に生細胞数が 5×10^3 個となるように調整し，これを各ウエルに分注し，同時にシスプラチン (cis-platinum, CDDP) (日本化薬，東京)，アドリアマイシン (adriamycin, ADM) (協和醗酵，東京) をそれぞれ 20μl ずつ分注した．抗癌剤の濃度は，それぞれ CDDP を 0.25, 1, 2.5, 5, 10μg/ml, ADM を 0.3, 0.6, 1, 3, 6μg/ml とした．37℃，7〜7.5% CO_2 の条件下で72時間培養し，培養中の抗癌剤の洗いだしは行わなかった．培養後 MTT を 25μl 分注し4時間後に培地を吸引，DMSO にてホルマザン結晶を溶解し吸光度を測定した．

3．抗癌剤感受性試験の判定

得られた吸光度より次式から細胞毒性指標 (cytotoxic index, CI) を求めた．

$$CI(\%)=(1-T/C)\times100$$

T：抗癌剤投与群の吸光度の平均，C：対照群の吸光度の平均

---

phosphate buffered saline；RPMI 1640, Roswell Park Memorial Institute Media 1640, SDS, sodium dodecyl sulfate；TCA, trichloroacetic acid；TIMP, tissue inhibitor of metalloproteinases

計算したCIを対数正規確率紙にプロットして50%CI値を算出して比較検討した.

Ⅵ. 浸潤能の検討

浸潤能の検討はRepeshの方法[10]に準じて行った. 各腫瘍細胞とⅢの方法で得られた継代細胞について, POS-1細胞は3代目と6代目と9代目の細胞を, HT-1080細胞は2代目と4代目と6代目を用いて単層培養を行い, ほぼ細胞過密の状態になった時点で[^{3}H]-チミジン([メチル-^{3}H]チミジン; (3μCi/ml, アマシャムジャパン, 東京)を添加して24時間標識した. あらかじめRPMI-1640培地で希釈したマトリジェル(Collaborative Research, Massachusetts, U.S.A.)をトランスウェル(Costar, Cambridge, U.S.A.)の上部チャンバー内に300μl注入し, クリーンベンチ内で30℃, 3日間乾燥させて作成した人工基底膜上に標識した細胞(5×10^5個)を, 0.2%水酸化ラクトアルブミン(Gibco)を含むRPMI-1640培地で500μlとして播いた. 下部チャンバー内には1500μlのマウス線維芽細胞株(NIH-3T3)(JCRB細胞銀行, 東京)調整培地を入れ, その培地中に侵入した腫瘍細胞を2, 6, 12, 24, 36時間後に回収した. あらかじめ未標識細胞(1×10^3個)を入れた試験管中に標識した腫瘍細胞を含む培養液をとり, 10%トリクロル酢酸(trichloroacetic acid, TCA)(和光純薬)で沈殿後遠心した. ついで, 沈殿した細胞を蒸留水で懸濁し, 超音波処理後に液体シンチレーションカウンターLSC-3100(アロカ, 東京)で測定した. 浸潤した細胞をアッセイに用いた全細胞(5×10^5個)の放射活性に対する%で表して浸潤能とした.

Ⅶ. 酵素活性の検討

各腫瘍細胞とⅢの方法で得られた各継代肺転移細胞についてPOS-1細胞は3代目, 6代目, 9代目, HT-1080細胞は2代目, 4代目, 6代目の細胞を用いて, RPMI-1640培養液でほぼ細胞過密状態となるまで培養した後, 0.2%水酸化ラクトアルブミンを含むRPMI-1640培養液(無血清培地)で4日間培養してその培養液を採取して実験に用いた. なお培養液採取後, トリプシン処理し生細胞数を算定した.

1. 酵素活性の測定

Cawstonら[11]とHarrisら[12]の方法に従ってゼラチナーゼアッセイを行った. すなわちモルモット皮膚由来のⅠ型コラーゲンを, Gisslowら[13]の方法により^{14}C-無水酢酸で標識し60℃, 30分間熱処理することにより作製した^{14}C-ゼラチンとP-アミノフェニル酢酸第二水銀(p-aminophenylmercuric acetate, APMA)(Sigma)で37℃, 24時間活性化後に酵素活性を測定した.

2. ドデシル硫酸ナトリウム(sodium dodecyl sulfate, SDS)-ゼラチンサブストレートゲル法

Hibbsら[14]の方法に従い, ゼラチン(0.2mg/ml)を含むポリアクリルアミドゲル(8%アクリルアミド(和光純薬))を作製し, 各培養液をそれぞれ非還元状態で電気泳動(4℃)した. SDSを緩衝液(50mM Tris-HCl, pH7.5/10mM $CaCl_2$/2.5% Triton X/0.02% NaN_3)で洗浄後37℃で反応した. ゲルをクーマシーブリリアントブルーR250(Sigma)で染色してゼラチン分解パターンを調べた.

3. マトリックスメタロプロテアーゼ3(matrix metalloproteinase 3, MMP-3)と組織由来メタロプロテアーゼインヒビター(tissue inhibitor of metalloproteinases, TIMP)の測定

HT-1080細胞と2代目, 4代目, 6代目の各継代肺転移細胞について, 採取した培養液1mlを分画分子量5,000の遠心濾過チューブ(日本ミリポア社, 東京)に入れ, 5,000Gにて2時間遠沈し上清100μl(10倍)に濃縮した. サンドイッチ酵素抗体法[15]によるMMP-3とTIMPの測定を富士薬品工業岩田和士博士の協力を得て行った.

Ⅸ. 統計学的検定方法

各実験の有意差検定は, 分散分析の後Dunnett法またはScheffé の多変比較法を用い, $p<0.05$を有意とした.

成 績

Ⅰ. 各培養腫瘍細胞における肺転移形成

表1に示すようにOST細胞及びHOS細胞では4週間経過

Fig. 1. Gross section of multiple pulmonary metastases of POS-1 cells in athymic mice.

Table 1. Macroscopic pulmonary metastases of bone and soft tissue sarcoma cell lines

Period after inoculation (week)	OST	HOS	MNNG−HOS	POS−1	HT−1080
1	△ △	△ △	△ △	○ ○	△ △
	△ △	△ △	△ △	○ ○	△ △
2	△ △	△ △	△ △	○ ○	○ ○
	△ △	△ △	△ △	○ ○	△ △
3	△ △	△ △	○ △	● ●	○ ○
	△ △	△ △	△ △	● ●	○ ○
4	△ △	○ △	○ △	● ●	● ●
	△ △	△ △	△ △	● ●	○ ○

△, no metastasis; ○, metastasis-positive; ●, death with metastases.

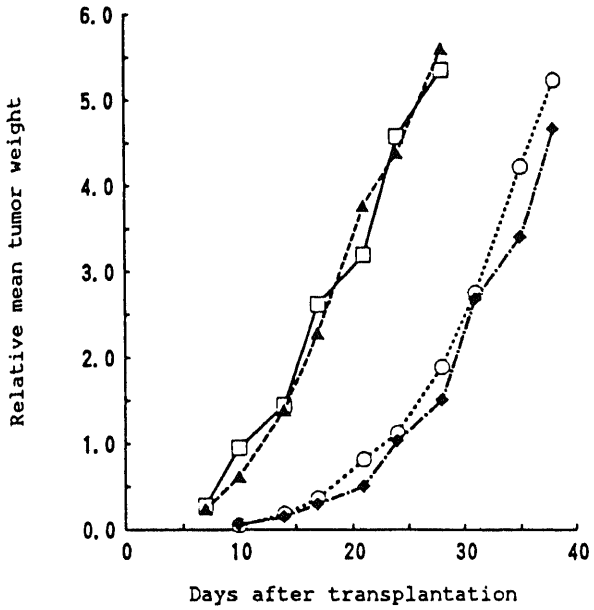

Fig. 2. Growth curve of POS-1, HT-1080 and those selected daughter cell lines transplanted subcutis of 6 week-old athymic mice (5×10^6 cells/mice). The relative mean tumor weights were calculated for the ratio between each given time and initial time. □, HT-1080; ▲, HT-1080-P6; ○, POS-1; ◆, POS-1-P9.

Table 2. Number of pulmonary metastasis resulting from intravenous injection of POS−1, HT−1080 and those selected daughter cell lines in athymic mice

Cell line	Number of metastasis (mean±SD)
POS−1	23± 6
POS−1−P3[a)]	74±19
POS−1−P6	176±29*
POS−1−P9	447±44*
HT−1080	25± 5
HT−1080−P2[a)]	80±25
HT−1080−P4	178±38*
HT−1080−P6	468±55*

*, $p<0.01$ vs POS−1, HT−1080
a) in-vivo selection passage number of pulmonary metastasis.

の時点で肉眼的な肺転移巣は認められなかった．顕微鏡所見を検討してみると，HOS 細胞では肺表面にいくつかの微小転移巣が認められたのに対し，OST 細胞では全く転移巣は確認できず，血管に閉塞した腫瘍塊のみが認められるものの腫瘍細胞は基底膜を破壊して浸潤してはいなかった．MNNG-HOS 細胞では3週目と4週目にそれぞれ1匹づつ肉眼的に肺転移巣が認められたがごく少数であった．HT-1080 細胞と POS-1 細胞では早期から豊富な肺転移巣を形成し（図1），3週および4週目ではかなり死亡してしまう確率が高くなり，死亡の1週前からは体重減少が顕著であった．

Ⅱ．高肺転移細胞の樹立と肺転移能の観察

ヌードマウス尾静脈から腫瘍細胞を注入し形成された肺転移

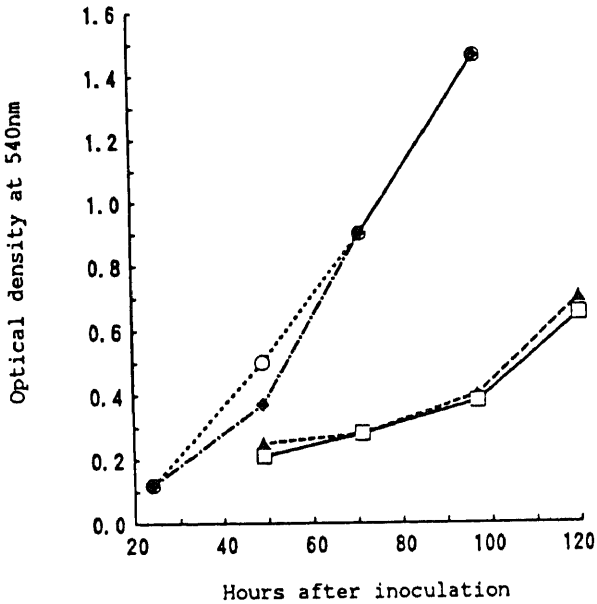

Fig. 3. Growth curve of POS-1, HT-1080 and those selected daughter cell lines in vitro. A 200 μl volume of 2×10^3 cells suspension was plated in each well of 96 well microtiter plate and incubated for 24～120 hr. After incubation, the plates were incubated for another 4 hr with a 20 μl volume of MTT solution (2 mg/ml) and counted optical density at 540 nm. □, HT-1080; ▲, HT-1080-P6; ○, POS-1; ◆, POS-1-P9.

Table 3. 50% cytotoxic concentration of anticancer drug for POS−1, HT−1080 and those selected daughter cell lines using MTT assay

Cell line	50% cytotoxic concentration of anticancer drug	
	CDDP (μg/ml, mean±SD)	ADM (μg/ml, mean±SD)
POS−1	2.1±0.3	0.54±0.04
POS−1−P3[a)]	2.4±0.2	0.75±0.11
POS−1−P6	2.2±0.2	0.83±0.03**
POS−1−P9	1.5±0.2	1.09±0.12**
HT−1080	5.0±0.8	0.71±0.06
HT−1080−P2[a)]	6.9±1.2	1.30±0.20**
HT−1080−P4	6.8±0.9	1.45±0.18*
HT−1080−P6	8.4±0.7**	1.57±0.15*

*, $p<0.01$; **, $p<0.05$ vs POS−1, HT−1080.
a) in-vivo selection passage number of pulmonary metastasis.

結節を培養し，再びヌードマウス尾静脈に注入移植する継代選択操作を繰り返すことにより POS-1 細胞は 9 代目，HT-1080 細胞は 6 代目まで継代移植して高頻度肺転移細胞を樹立した．POS-1 細胞は 0，3，6，9 代目の細胞について，HT-1080 細胞は 0，2，4，6 代目の各継代肺転移細胞についてその肺転移結節数を比較した．継代を重ねるにつれてどちらの細胞株も有意な増加を示したが (表 2)，特に HT-1080 細胞の肺転移結節数の増加率が著しかった．

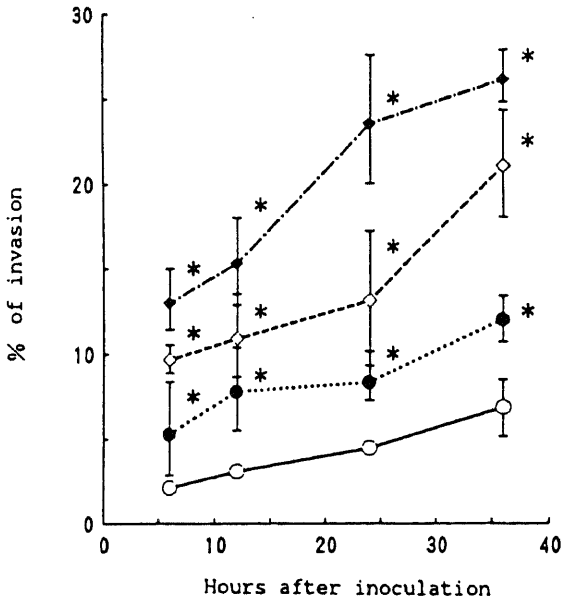

Fig. 4. Invasion assay of POS-1 and those selected daughter cell lines. A 500 μl volume of 5×10^5 cells suspension labeled with ^{3}H-thymidine was plated in upper chamber and a 1500 μl volume of NIH-3T3 cell culture medium was plated in lower chamber. Transwell plates were incubated for 6～36 hr and counted radioactivity of tumor cells invading through matrigel. ○, POS-1 ; ●, POS-1-P3 ; ◇, POS-1-P6 ; ◆, POS-1-P9. *, $p<0.01$ vs POS-1.

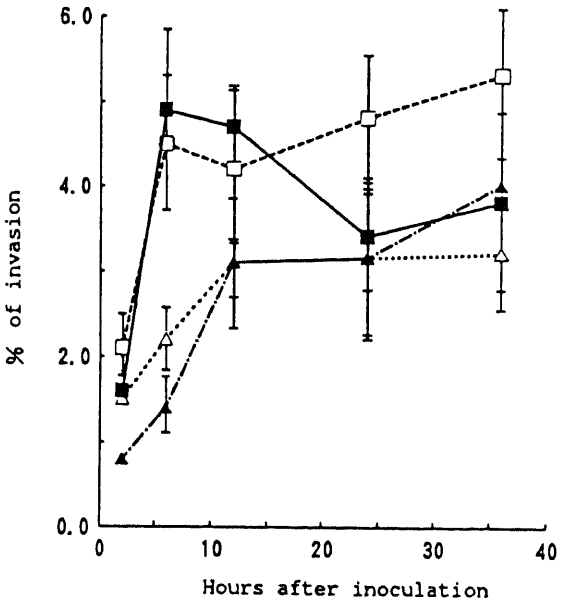

Fig. 5. Invasion assay of HT-1080 and those selected daughter cell lines. A 500 μl volume of 5×10^5 cells suspension labeled with ^{3}H-thymidine was plated in upper chamber and a 1500 μl volume of NIH-3T3 cell culture medium was plated in lower chamber. Transwell plates were incubated for 2～36 hr and counted radioactivity of tumor cells invading through matrigel. □, HT-1080 ; ■, HT-1080-P2 ; △, HT-1080-P4 ; ▲, HT-1080-P6.

Ⅲ．高肺転移細胞の増殖能についての検討

1．背部皮下移植による増殖曲線

POS-1 細胞，HT-1080 細胞ともその継代肺転移細胞との増殖速度に有意な差は認められなかった (図 2)．

2．MTT 比色法による増殖曲線

同様に試験管内での両腫瘍細胞とその継代肺転移細胞との増殖速度の有意な差は認められなかった (図 3)．

Ⅳ．抗癌剤感受性についての検討

POS-1 細胞とその継代肺転移細胞の間に，CDDP については一定の感受性変化は認められなかったものの，ADM については明らかな感受性の低下傾向がみられ，50%CI の濃度は 0.54±0.04μg/ml から 6 代目で 1.09±0.12μg/ml と有意な抗癌剤耐性が認められた (表 3)．HT-1080 細胞とその継代肺転移細胞では，CDDP について 6 代目に 50%CI の濃度が 8.4±0.7 μg/ml と感受性の低下が認められたが，一定の傾向ではなかった．ADM については明らかな感受性の低下傾向がみられ，50%CI の濃度が 0.71±0.06μg/ml から 6 代目で 1.57±0.15μg/ml と有意な抗癌剤耐性を認めた (表 3)．

Ⅴ．浸潤能の検討

POS-1 細胞については，3 代目，6 代目，9 代目と継代を重ねる毎に時間依存性にその浸潤能は段階的に上昇した (図 4)．HT-1080 細胞については，継代を重ねてもその継代肺転移細胞の浸潤能にほとんど変化はなかった (図 5)．

Ⅵ．酵素活性の検討

POS-1 細胞およびその継代 3 代目の肺転移細胞ではごく少量のゼラチン分解活性しか認めなかったものが，6 および 9 代目の肺転移細胞では有意な活性の上昇がみられた．HT-1080 細胞はすべての継代肺転移細胞においてゼラチン分解活性の著しい上昇がみられた (表 4)．各培養液を SDS-ゼラチンサブストレートゲルに非還元状態で電気泳動して比較してみると POS-1 細胞には特に変化はなかった．HT-1080 細胞とその継代肺転移細胞では分子量92000に相当する MMP-9 と分子量72000に相当する MMP-2 のバンドのほかに，新たに 2 代目と 4 代目と 6 代目の継代肺転移細胞では分子量57000に相当する

Table 4. Gelatinolytic activity of POS−1, HT−1080 and those selected daughter cell lines

Cell line	Gelatinolytic activity (U/ml/10^2 cell, mean±SD)
POS−1	1.63±0.53
POS−1−P3[a]	1.31±0.27
POS−1−P6	4.23±0.83*
POS−1−P9	3.53±0.62*
HT−1080	0.77±0.27
HT−1080−P2[a]	11.19±4.98*
HT−1080−P4	4.97±1.40*
HT−1080−P6	6.99±3.93*

*, $p<0.01$ vs POS−1, HT−1080.
a) in-vivo selection passage number of pulmonary metastasis.

MMP-3 バンドの出現を認めた (図 6). 次いで同様に採取した培養液 1ml を10倍に濃縮して TIMP と MMP-3 を測定した結果, 各継代を通して TIMP の量に変化がなかったにもかかわらず MMP-3 の量は 5～10倍の増加を示した (表 5).

考　　察

現在までに種々の骨軟部腫瘍細胞株が培養系で樹立されているが, 個々の細胞株の肺転移能やその性状解析に至っては未だ十分に行われていないのが現状である. 転移は, 原発巣からの細胞遊離に始まり, 周囲結合組織への浸潤と脈管内侵入, 脈管を介しての移動, 特定臓器脈管へ接着し浸潤増殖するという複雑な過程をたどる[1]. この過程を細胞生物学的に解明するためには, 高頻度に肺転移巣を形成するモデルを確立することが必要となってくる. これを最初に実験的に分離樹立したのは Fidler[3)4)] の実験である. 転移モデルを作成する方法としては, 腫瘍細胞を皮下や筋肉内に移植して自然に転移を発生させる方法と, 腫瘍細胞を直接血管内へ注入して実験的な転移を発生させる方法が考えられる. ヌードマウスに移植された腫瘍は, 継代を重ねても原発腫瘍の形態と機能を維持し, 染色性や抗原性も変化しないため非常に優れた実験系の一つとされている[16)17)]. しかしながらヌードマウスではナチュラルキラー (natural killer, NK) 細胞活性が高いために腫瘍は転移しにくいと言われている[18)19)]. そのために NK 活性の低い 3 週令のヌードマウスを用いたり[20)21)], 移植前に X 線を照射する試みが成されている[22)23)]. Sharkey ら[24)]はヒト悪性腫瘍106例をヌードマウス1045匹に移植して組織学的に検討を加えたところ, 転移はわずか11例 (10%), 14匹 (1.3%) にしか認められなかったとしている. まず最初に種々の骨軟部腫瘍細胞株を用いてその肺転移能について調べてみる必要があった. マウス骨肉腫細胞 (POS-1), ヒト線維肉腫細胞 (HT-1080), 各種のヒト骨肉腫細胞 (OST, HOS, MNNG-HOS) のうち肉眼的に肺転移巣を確認することができたのは, POS-1, HT-1080, MNNG-HOS 細胞の 3 種類であった. このうち限られた腫瘍細胞個数と時間で継代することができたのは POS-1 と HT-1080 細胞の 2 種類だけであったことより, 必ずしも相当量の腫瘍細胞を血管内に注入しても必然的に肺転移をおこすものではないことが確認された. 転移の臓器選択性については, 原発巣と転移臓器の解剖学的位置関係や物理的因子により左右されるという機械因子 (mechanical factor) 説や, 特定の臓器における微小環境が転移細胞の接着や増殖に適しているという腫瘍細胞と標的臓器 (seed and soil) 説で説明されている[25)26)]. 今回の実験で顕微鏡レベルでは OST 細胞が肺の血管内に塞栓は形成しているものの血管壁を浸潤することのできない所見や, HOS 細胞は顕微鏡所見で微小転移巣の形成は認められるものの増殖傾向を示さないといった所見や, MNNG-HOS 細胞が肺転移の形成はみられるものの増殖傾向を示さないといった所見から, 必ずしも単独の説のみで説明しようとしても不可能がある. 骨軟部悪性腫瘍の肺転移を考える場合, そのほとんどが血行性転移である. よって血管内に直接腫瘍細胞を静注して転移の形成されないものは, どのような系で調べても転移が形成されない可能性が強い. まず肺という臓器に確実にそして必然的に高い転移能を有する系を樹立するために腫瘍細胞をヌードマウスの尾静脈内に直接注入し, 形成された転移結節から得られた細胞を用いて再度同様な操作を繰り返すことにした. 1 個の肺転移結節は 1 個の細胞から由来した可能性があり, 再度腫瘍細胞を動物に返す過程を繰り返すことにより均一なものとなることが考えられる. 今回使用した培養細胞においてもヌードマウスの継代選択を重ねるにつれて肺転移結節数は増加し, 転移形成に要する時間も短くなることが確認された.

腫瘍細胞は通常不均一な細胞集団から構成されており[1)], 抗原性[27)], 免疫原性[28)], ホルモンレセプター[29)], 色素産性[30)], 代謝特性[31)], 増殖率[32)], 抗癌剤感受性[33)～37)]において不均一であることが報告されている. そうであれば今回の実験のようにヌードマウスを使って継代選択された高肺転移細胞でも臨床上よく問題となる抗癌剤感受性においてもかなり性質が変化している可能性が考えられる. 簡便にかつ迅速に行う抗癌剤感受性実験として

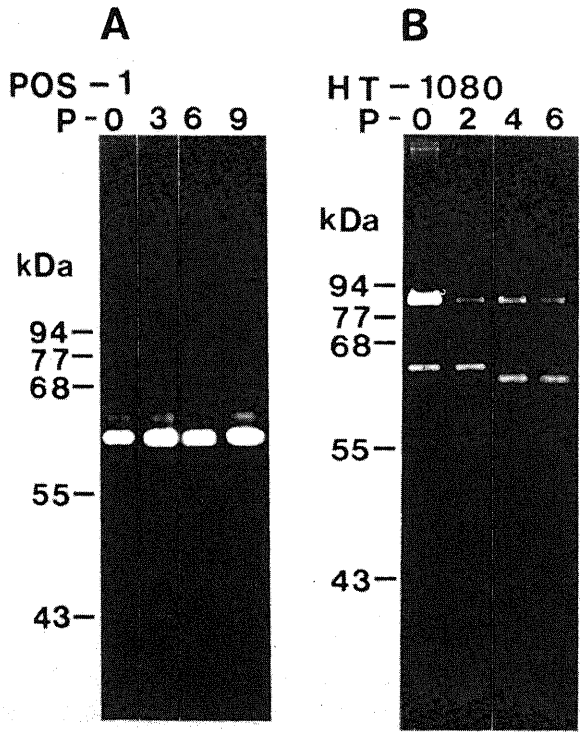

Fig. 6. Gelatin-degrading activities on SDS-gelatin substrate gel electrophoresis. (A) POS-1 and those selected daughter cell lines. (B) HT-1080 and those selected daughter cell lines. Samples from culture medium were run on a SDS-gelatin substrate gel (8% total acrylamide) under the unreducing conditions. The gel was incubated in 50 mM Tris-HCl, pH7.5/10 mM $CaCl_2$/1.0% Triton X/0.02% NaN_3 for 24 hr at 37℃ after removal of SDS and stained with Coomassie Brilliant Blue R 250.

Table 5. Expression of TIMP and MMP－3 in HT－1080 and those selected daughter cell lines using sandwich enzyme immunoassay

Cell line	TIMP (ng/ml/10^6 cell)	MMP－3 (ng/ml/10^6 cell)
HT－1080	163	58
HT－1080－P2[a)]	167	695
HT－1080－P4	194	300
HT－1080－P6	167	321

a) in-vivo selection passage number of pulmonary metastasis.

Mosmann[38] はテトラゾリウム塩の一種である MTT を用い，96穴マイクロプレートとマイクロウエルプレートリーダーで測定する MTT 比色法を報告した．これを森川[9] は骨軟部悪性腫瘍細胞においても実用的な方法として報告している．この MTT 比色法を用いての抗癌剤感受性実験の結果，肺転移能の増強とともに抗癌剤耐性に明らかな変化が認められた．しかし増殖率については，ヌードマウス背部皮下移植による生体内での腫瘍増殖曲線や MTT 比色法による試験管内での腫瘍増殖曲線にも増殖速度には明らかな差が認められなかった．この結果より肺転移結節数が増加したのは，転移過程のなかであるステップが変化したものと推察される．

試験管内での浸潤能についての検討は Albini ら[39] によって初めて導入された浸潤試験 (invasion assay) 法があるが，Repesh[10] はこれをさらに簡便な方法として確立し，マトリジェルで人工基底膜を作成し通過した腫瘍細胞を回収してその放射活性を測定する方法を行った．HT-1080 細胞では継代肺転移細胞での浸潤能に変化は見られなかったが， POS-1 細胞では3代目，6代目，9代目と継代を重ねるにつれて時間依存性に有意な増加を示した．このことは生体内での肺転移能と良く相関していたが，HT-1080 の継代肺転移細胞では浸潤能はほとんど変化なく肺転移結節数との明らかな相関は認められず，別の因子が関与していることが考えられた．

腫瘍細胞が浸潤や転移をおこすためにもう一つ重要なステップとして腫瘍細胞周囲の細胞間マトリックスや基底膜を分解する過程がある．これまでにも高転移性の腫瘍細胞からⅣ型コラゲナーゼが分泌されるとの報告は Liotta の研究[40][41] 以来数多くなされている．特にこのⅣ型コラゲナーゼ活性と転移率が相関することについては，黒色腫細胞を用いた肺転移率[40] や結腸癌細胞を用いた肝転移率[42] についての報告がある．肉腫系の培養細胞については確かに高転移性の細胞にそのコラゲナーゼ活性が高いことが報告されている[40] が，継代移植により肺転移能を高めた腫瘍細胞の肺転移率とその活性との相関については明確にされていない．本研究でゼラチン分解活性を測定したところ POS-1 継代肺転移細胞は6代目，9代目と増加し，HT-1080 継代肺転移細胞についても2代目，4代目，6代目の各継代でゼラチン分解活性の上昇を認めた．しかしながら継代を経るにつれ段階的にゼラチン分解活性が上昇するというものではなく，ある程度のゼラチン分解活性は確かに肺転移に必要であるが，必ずしも肺転移能の上昇にゼラチン分解活性は相関しないものと考えられる．細胞外マトリックス成分の分解に関与するマトリックス金属プロテアーゼ (matrix metalloproteinases, MMPs) については，現在までに少なくとも10種類の酵素が報告されており，一種の遺伝子ファミリーと考えられている[43]．これらの酵素の共同作用で生体内に存在するほとんど全ての細胞外マトリックス成分が分解されるという特徴がある[44]．とくに HT-1080 継代肺転移細胞ではゼラチンサブストレートゲルにおいて MMP-9 (92kDaゼラチナーゼ/Ⅳ型コラゲナーゼ) と MMP-2 (72kDaゼラチナーゼ/Ⅳ型コラゲナーゼ) のバンドがすべての細胞に認められたが，どちらも腫瘍細胞によって合成，分泌されることが知られている[45]~[47]．特に五之治[48] は MMP-9 が癌の浸潤や転移に伴う組織破壊に広く関与する可能性を示している．ゼラチンサブストレートゲルではその量的変動について明確な変化は認められなかったが，注目すべき結果として2代目と4代目と6代目の継代肺転移細胞に新たに MMP-3 に相当するバンドの出現が認められたことである．MMP-3[49] はストロムライシン (stromelysin)[50] とも呼ばれ，広い基質特異性を有し，基底膜構成成分のⅣ型コラーゲンやラミニン，ゼラチンおよびⅨ型コラーゲンなどを分解する[47] ことから生体内での細胞間マトリックス分解には欠くことのできない重要な役割を果たしていると考えられている．腫瘍細胞の転移能は TIMP の発現レベルにより決定される報告[51] もあることから，MMPs の活性を特異的に阻害する TIMP の量がほとんど変化しないにもかかわらず MMP-3 の分泌量が著明に増加していたことは，HT-1080 細胞の転移および浸潤能の増加にこの MMP-3 が強く関与している可能性が示唆される．しかしながらここでも肺転移結節数の上昇とには相関関係は認められず，肺転移能にはまだ外にプラスミンによるフィブリン分解活性の上昇[52]，血小板凝集活性の亢進に伴う転移能並びに細胞凝集能の上昇[53]，細胞膜構造の変化に伴う細胞接着能の変化[54]，臓器組織の化学的因子による細胞遊走性や細胞接着能の変化[42]，さらには宿主自体の免疫状態の変化[18][19] といった重要な因子並びにステップの関与している可能性があり，今後さらに検討されるべき課題と考えられる．以上より骨軟部腫瘍細胞の転移には浸潤能の増加や，細胞外マトリックス分解酵素の分泌が関与している可能性が考えられたが，今後これらの酵素活性との相関や生体内における活性化の機序をさらに解明し，さらにどの細胞において，また転移に関してどの因子が最も重要であるかを解明していく必要がある．

結　　論

骨軟部悪性腫瘍細胞株を用いてその肺転移能を調べるとともに，高肺転移細胞を樹立しその細胞特性について種々の検討を加えた結果，以下の結論を得た．

1．OST, HOS, MNNG-HOS, HT-1080, POS-1 細胞をそれぞれヌードマウスの尾静脈に注入して実験的肺転移形成を試みたが，一定の期間内で肺転移結節が形成されたのは POS-1 と HT-1080 細胞であった．

2．ヌードマウスの尾静脈から腫瘍細胞を注入してできた肺転移結節から細胞を分離培養し再度注入する継代選択を行うことにより，肺転移能は段階的に上昇し，POS-1 細胞で9代目，HT-1080 細胞で6代目に高頻度肺転移細胞を樹立することができた．

3．肺表面に形成された転移結節数を比較検討すると，POS-1 細胞は 23±6個から9代目で 447±44個に，HT-1080 細胞は 25±5個から6代目で 468±55個と段階的に肺転移結節数が増加した．

4．継代肺転移細胞と親細胞との間での増殖率は，ヌードマウス背部皮下移植による検討でも MTT 比色法による検討でも差はなかったが，抗癌剤感受性には両者の間に明らかな感受性の変化が認められ，肺転移能の上昇と共に抗癌剤の耐性も上昇した．

5．浸潤能について検討した結果，POS-1 細胞では継代を重ねるにつれて時間依存性に浸潤能は肺転移能の上昇とともに有意に上昇したが，HT-1080 細胞とその継代肺転移細胞には明らかな相関がなかった．

6．ゼラチン分解活性について検討した結果，POS-1 細胞と HT-1080 細胞の継代肺転移細胞では分解活性の著しい上昇を認めた．同様に SDS-ゼラチンサブストレートゲルに電気泳動

すると，POS-1 細胞には変化はなかったが，HT-1080 細胞には MMP-9 と MMP-2 に相当するバンドの外に継代肺転移細胞では MMP-3 のバンドが認められた．MMP-3 の定量でも TIMP の量がほぼ一定にもかかわらず著しく増加したことより，肺転移能の上昇に MMP-3 が関与している可能性を示している．しかしながら肺転移能の上昇とゼラチン分解活性には相関がなかった．

謝　　辞

稿を終えるに臨み，御指導，御校閲を賜りました恩師富田勝郎教授に深甚なる謝意を表します．また終始直接御指導，御教授を戴きました土屋弘行講師に心より感謝いたします．本研究の遂行に際し，多大の御教示と御援助を戴きました金沢大学医療技術短期大学部岡田保典助教授に心より深謝いたします．本実験結果の統計学的検討につき御指導を賜りました金沢大学医学部衛生学教室橋本和夫教授に心より感謝いたします．また本実験の遂行にあたり終始御協力下さいました金沢大学整形外科学教室腫瘍班の先生方に心よりお礼を申し上げます．

なお，本論文の要旨の一部は，第6回日本整形外科学会基礎学術集会において発表した．

文　　献

1) **Fidler, I. J.**: Tumor heterogeneity and the biology of cancer invasion and metastasis. Cancer Res., **38**, 2651-2660 (1978).

2) **Rygaard, J. & Povlsen, C. O.**: Heterotransplantation of a human malignant tumor to "nude" mice. Acta. Pathol. Microbial. Scand., **77**, 758-760 (1969).

3) **Fidler, I. J.**: Biological behavior of malignant melanoma cells correlated to their survival in vivo. Cancer Res., **35**, 218-224 (1975).

4) **Fidler, I. J.**: Selection of successive tumour lines for metastasis. Nature (New Biol.), **242**, 148-149 (1973).

5) **山崎安郎**：ヒト骨肉腫由来培養細胞株の樹立とその形態学的観察．十全医会誌，**71**, 147-162 (1965).

6) **Rhim, J. S., Putman, D. L., Arnstein, P., Huebner, R. J. & McAllister, R. M.**: Characterization of human cells transformed in vitro by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. Int. J. Cancer, **19**, 505-510 (1977).

7) **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).

8) **Wexler, H.**: Accurate identification of experimental pulmonary metastases. J. Natl. Cancer Inst., **36**, 641-645 (1966).

9) **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).

10) **Repesh, L. A.**: A new in vitro assay for quantitating tumor cell invasion. Invasion Metastasis, **9**, 192-208 (1989).

11) **Cawston, T. E. & Barrett, A. J.**: A rapid and reproducible assay for collagenase using [1-^{14}C] acetylated collagen. Anal. Biochem., **99**, 340-345 (1979).

12) **Harris, E. D. Jr. & Krane, S. M.**: An endopeptidase from rheumatoid synovial tissue culture. Biochim. Biophys. Acta, **258**, 566-576 (1972).

13) **Gisslow, M. T. & McBride, B. C.**: A rapid sensitive collagenase assay. Anal. Biochem., **68**, 70-78 (1975).

14) **Hibbs, M. S., Hasty, K. A., Seyer, J. M., Kang, A. H. & Mainardi, C. L.**: Biochemical and immunological characterization of the secreted forms of human neutrophil gelatinase. J. Biol. Chem., **260**, 2493-2500 (1985).

15) **Kodama, S., Iwata, K., Iwata, H., Yamashita, K. & Hayakawa, T.**: Rapid one-step sandowich enzyme immunoassay for tissue inhibitor of metalloproteinases. An application for rheumatoid arthritis serum and plasma. J. Immunol. Methods, **127**, 103-108 (1990).

16) **Giovanella, B. C., Yim, S. O., Stehlin, J. S. & Williams, L. J. Jr.**: Development of invasive tumors in the "nude" mouse after injection of cultured human melanoma cells. J. Natl. Cancer Inst., **48**, 1531-1533 (1972).

17) **Shimosato, Y., Kameya, T., Nagai, K., Hirohashi, S., Koide, T., Hayashi, H. & Nomura, T.**: Transplantation of human tumors in nude mice. J. Natl. Cancer Inst., **56**, 1251-1260 (1976).

18) **Hanna, N. & Fidler, I. J.**: Role of natural killer cells in the destruction of circulating tumor emboli. J. Natl. Cancer Inst., **65**, 801-809 (1980).

19) **Talmadge, J. E., Meyers, K. M., Prieur, D. J. & Starkey, J. R.**: Role of NK cells in tumour growth and metastasis in beige mice. Nature, **284**, 622-624 (1980).

20) **Hanna, N. & Fidler, I. J.**: Expression of metastatic potential of allogenic and xenogeneic neoplasms in young nude mice. Cancer Res., **41**, 438-444 (1981).

21) **Pollack, V. A. & Fidler, I. J.**: Use of young nude mice for selection of subpopulations of cells with increased metastatic potential from nonsyngeneic neoplasms. J. Natl. Cancer Inst., **69**, 137-141 (1982).

22) **Watanabe, S., Shimosato, Y., Kamaya, T., Kuroki, M., Kitahara, T., Minato, K. & Shimoyama, M.**: Leukemic distribution of a human acute lymphocytic leukemia cell line (Ichikawa Strain) in nude mice conditioned with whole-body irradiation. Cancer Res., **38**, 3494-3498 (1978).

23) **Hirata, H. & Tanaka, K.**: Fate of intravenously injected human tumor cells in the lung of nude mice following whole-body X-irradiation. Invasion Metastasis, **5**, 61-70 (1985).

24) **Sharkey, F. E. & Fogh, J.**: Metastasis of human tumors in athymic nude mice. Int. J. Cancer, **24**, 733-738 (1979).

25) **Paget, S.**: The distribution of secondary growths in cancer of the breast. Lancet, **1**, 571-573 (1883).

26) **Hart, I. R. & Fidler, I. J.**: Role of organ selectivity in the determination of metastatic patterns of B16 melanoma. Cancer Res., **40**, 2281-2287 (1980).

27) **Prehn, R. T.**: Analysis of antigenic heterogeneity within individual 3-methylcholanthrene-induced mouse sarcomas. J. Natl. Cancer Inst., **45**, 1039-1045 (1970).

28) **Killion, J. J. & Kollmorgen, G. M.**: Isolartion of

immunogenic tumour cells by cell-affinity chromatography. Nature, **259**, 674-676 (1976).

29) **Sluyser, M. & Van Nie, R.**: Estrogen receptor content and hormone-responsive growth of mouse mammary tumors. Cancer Res., **34**, 3253-3257 (1974).

30) **Gray, J. M. & Pierce, G. B. Jr.**: Relationship between growth rate and differentiation of melanoma in vivo. J. Natl. Cancer Inst., **32**, 1201-1211 (1964).

31) **Kiricuta, I., Mustea, I., Rogozan, I. & Simu, G.**: Relations between tumor and metastasis. I. Aspects of the crabtree effect. Cancer, **18**, 978-984 (1965).

32) **Schabel, F. M. Jr.**: Concepts for systemic treatment of micrometastases. Cancer, **35**, 15-24 (1975).

33) **Fuji, H. & Mihich, E.**: Selection for high immunogenicity in drug-resistant sublines of murine lymphomas demonstrated by plaque assay. Cancer Res., **35**, 946-952 (1975).

34) **Hakansson, L. & Tropé, C.**: On the presence within tumours of clones that differ in sensitivity to cytostatic drugs. Acta Pathol. Microbiol. Scand., **82**, 35-40 (1974).

35) **Heppner, G. H., Dexter, D. L., DeNucci, T., Miller, F. R. & Calabresi, P.**: Heterogeneity in drug sensitivity among tumor cell subpopulations of a single mammary tumor. Cancer Res., **38**, 3758-3763 (1978).

36) **Donelli, M. G., Colombo, T., Broggini, M. & Garattini, S.**: Differential distribution of antitumor agents in primary and secondary tumors. Cancer Treat. Rep., **61**, 1319-1324 (1977).

37) **Tsuruo, T. & Fidler, I. J.**: Differences in drug sensitivity among tumor cells from parental tumors, selected variants, and spontaneous metastases. Cancer Res., **41**, 3058-3064 (1981).

38) **Mosmann, T.**: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. J. Immunol. Methods, **65**, 55-63 (1983).

39) **Albini, A., Iwamoto, Y., Kleinman, H. K., Martin, G. R., Aaronson, S. A., Kozlowski, J. M. & McEwan, R. N.**: A rapid in vitro assay for quantitating the invasive potential of tumor cells. Cancer Res., **47**, 3239-3245 (1987).

40) **Liotta, L. A., Tryggvason, K., Garbisa, S., Hart, I., Foltz, C. M. & Shafie, S.**: Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen. Nature, **284**, 67-68 (1980).

41) **Liotta, L. A., Tryggvason, K., Garbisa, S., Gehron Robey, P. & Abe, S.**: Partial purification and characterization of a neutral protease which cleaves typeⅣ collagen. Biochemistry, **20**, 100-104 (1981).

42) **Bresalier, R. S., Hujanen, E. S., Raper, S. E., Roll, F. J., Itzkowitz, S. H., Martin, G. R. & Kim, Y. S.**: An animal model for colon cancer metastasis: Establishment and characterization of murine cell lines with enhanced liver-metastasizing ability. Cancer Res., **47**, 1398-1406 (1987).

43) **Nagase, H., Barrett, A. J. & Woessner, J. F. Jr.**: Nomenclature and glossary of the matrix metalloproteinases. Matrix, (Suppl. No.1), 421-424 (1992).

44) **岡田保典**: *Matrix metalloproteinases*: その性質と病的組織における役割. 結合組織, **22**, 189-192 (1991).

45) **Ballin, M., Gomez, D. E., Shiha, C. C. & Thorgeirsson, U. P.**: Ras oncogene mediated induction of a 92kDa metalloproteinase; strong correlation with the malignant phenotype. Biochem. Biophys. Res. Commun., **154**, 832-838 (1988).

46) **Yamagata, S., Ito, Y., Tanaka, R. & Shimizu, S.**: Gelatinases of metastatic cell lines of murine colonic carcinoma as detected by substrate-gel electrophoresis. Biochem. Biophys. Res. Commun., **151**, 158-162 (1988).

47) **Yamagata, S., Tanaka, R., Ito, Y. & Shimizu, S.**: Gelatinases of murine metastatic tumor cells. Biochem. Biophys. Res. Commun., **158**, 228-234 (1989).

48) **五之治行雄**: ヒト線維肉腫 (HT-1080) 細胞由来 Matrix metalloproteinase 9 (92kDa ゼラチナーゼ/Ⅳ型コラゲナーゼ) の性質と活性化機構. 十全医会誌, **100**, 933-947 (1991).

49) **Okada, Y., Nagase, H. & Harris, E. D. Jr.**: A metalloproteinase from human rheumatoid synovial fibroblasts that digests connective tissue matrix components. J. Biol. Chem., **261**, 14245-14255 (1986).

50) **Chin, J. R., Murphy, G. & Werb, Z.**: Stromelysin, a connective tissue-degrading metalloendopeptidase secreted by stimulated rabbit synovial fibroblasts in parallel with collagenase. J. Biol. Chem., **260**, 12367-12376 (1985).

51) **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).

52) **Jones, P. A. & DeClerck, Y. A.**: Destruction of extracellular matrices containing glycoproteins, elastin, and collagen by metastatic human cells. Cancer Res., **40**, 3222-3227 (1980).

53) **Pearlstein, E., Salk, P. L., Yogeeswaran, G. & Karpatkin, S.**: Correlation between spontaneous metastatic potential, platelet-aggregating activity of cell surface extracts, and cell surface sialylation in 10 metastatic-variant derivatives of a rat renal sarcoma cell line. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **77**, 4336-4339 (1980).

54) **Brunson, K. W., Beattie, G. & Nicolson, G. L.**: Selection and altered properties of brain-colonising metastatic melanoma. Nature, **272**, 543-545 (1978).

Characterization of Highly Pulmonary Metastasizing Cells in Bone and Soft Tissue Sarcoma

Masaaki Ohno, Department of Orthopedic Surgery, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920

J. Juzen Med Soc., **102,** 526－535 (1993)

Key words bone and soft tissue sarcoma, metastatic potential, invasion, metalloproteinase, chemosensitivity

Abstract

To clarify the character of pulmonary metastasizing tumor cells in bone and soft tissue sarcomas, highly metastasizing cell lines were established by repeating in vivo selection of pulmonary metastasizing POS-1 or HT-1080 cell lines. 5×10^5 cells of each cell line were injected into the lateral tail vein of athymic mice, followed by counting the number of metastatic nodules. With repeated in vivo selection, the number of pulmonary metastatic nodules increased noticeably. The growth rate of both highly metastasizing cell lines from POS-1 and HT-1080 cell lines was not significantly different by measuring tumor weight produced by inoculating the cells into back subcutis of athymic mice and by 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. The chemosensitivity test using MTT assay revealed that these cell lines became resistant to adriamycin following the in vivo selection, but not to cis-platinum. In the assessment of invasion potential using transwell method, POS-1 progressively increased its potential in time-dependent manner by repeating the selection, while HT-1080 showed little change. Gelatinolytic activity of the selected daughter cell lines was increased, but not proportional to the pulmonary metastasizing potential. Matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) and MMP-2 bands on SDS-gelatin substrate gel were observed in HT-1080 cells under unreducing conditions, the band of MMP-3 was observed in selected daughter cell lines of HT-1080 cells. When cultured medium with selected daughter cell lines of HT-1080 cells was concentrated by 10 times, MMP-3 increased the quantity from 5 to 10 fold in spite of no change at a concentration of tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP). These results suggest that bone and soft tissue sarcoma cell lines are heterogeneous in term of pulmonary metastasizing potential, and that the increasing invasion potential is a major cause of highly pulmonary metastasis for the POS-1 cell line. However, for the HT-1080 cell line, invasion potential is independent of pulmonary metastasis and these suggest that advanced degradation of extracellular matrix components may play an important role which is not correlated to highly pulmonary metastasis.