

# Matalloproteinases from Cultured Human Osteogenic Sarcoma (OST) Cells

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/8050">http://hdl.handle.net/2297/8050</a>

## IV型コラーゲンとゼラチンの分解能をもつヒト骨肉腫培養細胞 (OST 株) 由来金属依存性蛋白分解酵素

金沢大学医学部整形外科学講座 (主任: 野村 進教授)

清水 宏 和

(昭和63年6月2日受付)

骨肉腫の浸潤、転移に関するメカニズムを明らかにするためには、骨肉腫細胞から分泌される細胞間マトリックス分解酵素を研究することが重要である。本研究では、ヒト骨肉腫培養細胞 (Osteogenic Sarcoma Takase, OST 株) の転移能と、これに由来する蛋白分解酵素の性質について検討した。OST 細胞をヌードマウス腹腔内に移植すると、異所性の骨誘導とリンパ節転移および肺動脈枝内の腫瘍塞栓が観察された。OST 細胞は培養液中にゼラチンとIV型コラーゲンを分解する分子量 75,000 の蛋白分解酵素を分泌することがサブストレートゲルによって示された。この酵素活性は ethylenediamine tetraacetic acid により阻害されたが、phenylmethan sulfonyl fluoride, N-ethylmaleimide および pepstatin A では阻害されず、金属依存性蛋白分解酵素に属することが明らかとなった。しかし、本酵素活性は  $^{14}\text{C}$ -コラーゲン、 $^{14}\text{C}$ -ゼラチン、 $^3\text{H}$ -カルボキシメチル化トランスフェリンを基質としたアッセイでは認められず、また tissue inhibitor of metalloproteinases を除去した後も検出されなかった。このデータは、本酵素が潜在型酵素として分泌されている可能性を示唆している。トリプシン、キモトリプシン、プラスミンなどの各セリンプロテイナーゼ、p-aminophenylmercuric acetate, 尿素, チオシアン化ナトリウムおよびヨウ化カリウム処理では本酵素は活性化されなかったが、sodium dodecyl sulfate (SDS) 処理によってまれに活性化された。SDS による活性化に伴い、分子量 75,000 の酵素活性だけでなく分子量 45,000 のゼラチン及びIV型コラーゲン分解活性がサブストレートゲル上観察された。ヌードマウス腹壁に浸潤した OST 細胞腫瘍結節のホモジネートや、腹水中で増殖した OST 細胞の培養液中には分子量 94,000 と 75,000 のゼラチン及びIV型コラーゲン分解酵素活性が検出された。これらはいずれも金属依存性蛋白分解酵素であり、後者は OST 細胞培養液中のそれと同一であると考えられた。以上の結果より、OST 細胞は骨肉腫細胞としての性質を有することが明らかとなり、本腫瘍細胞に由来するIV型コラーゲンとゼラチンを分解する金属依存性蛋白分解酵素が骨肉腫細胞の局所浸潤や転移形成に重要な役割を果たすと推定された。

**Key words** osteogenic sarcoma cell, metastasis, metalloproteinase, type IV collagen degradation

悪性腫瘍を最も特徴づける性質は、腫瘍細胞が周囲組織や脈管へ浸潤性に発育することであり、その結果として他臓器への直接浸潤や播種ならびに転移巣の形成をきたすことはよく知られた事実である。このような浸潤性発育には、周囲組織や脈管に存在する細胞間マトリックス構成成分の分解、破壊が必須である。実際、腫瘍細胞は細胞間マトリックス構成成分を分解す

る種々の酵素活性を有することが報告されている。それらには、I~III型コラーゲンを分解するコラゲナーゼ<sup>1)~4)</sup>をはじめIV型コラーゲン分解酵素<sup>5)~9)</sup>、V型コラーゲン分解酵素<sup>10)</sup>、フィブロネクチン分解酵素<sup>11)</sup>、プロテオグリカン分解酵素<sup>12)</sup>、エラスチン分解酵素<sup>13)</sup>、ヘパリン分解酵素<sup>14)</sup>などが知られている。また、これらの酵素活性の上昇と癌細胞の転移との間に強い相関があ

Abbreviations:  $\text{NH}_2\text{-ph-Hg-Ac}$ , p-aminophenylmercuric acetate;  $^3\text{H}$ -Cm-Tf, carboxymethylated transferrin; EDTA, ethylenediamine tetraacetic acid; H-E, hematoxylin-eosin; MMP-3, matrix metalloproteinase-3; N-EM, N-ethylmaleimide; OST, Osteogenic Sarcoma

ると報告されている<sup>21,51,420</sup>。しかし、これらの研究はほとんどが上皮性悪性腫瘍である癌腫や、悪性黒色腫、線維肉腫およびリンパ腫由来の細胞を用いて行われており、骨肉腫細胞についてはこれまでほとんど報告がなく、骨肉腫の浸潤や転移機構については全く解明されていない。

本研究では、金沢大学医学部整形外科教室で樹立化したヒト骨肉腫由来 Osteogenic Sarcoma Takase (OST) 株を用いて、本腫瘍細胞が転移能を有する骨肉腫細胞であることをヌードマウスを用いて証明し、その転移に関与する可能性をもつIV型コラーゲンとゼラチンを分解する酵素活性について検討した。

### 材料および方法

#### I. ヒト骨肉腫培養細胞 (OST 株) の培養と培養液の調整

OST 細胞は、15歳女子の大腿骨に発生した骨肉腫より分離、樹立化された細胞株で、金沢大学整形外科教室で1964年以来今日まで継代培養が続けられている<sup>21</sup>。OST 細胞は15%牛胎児血清 (GIBCO Lab., U.S.A.) を含む RPMI-1640 培養液中で継代培養した。OST 細胞がコンフルエントに達する直前にハンクス液にて3回洗浄し、0.2%水酸化ラクトアルブミンを含む RPMI-1640 培養液 (無血清培養液) にて4日間培養し OST 細胞調整培地とした。この調整培地を硫酸沈殿法 (25~60%飽和度) により約25倍濃縮して実験に使用した。

#### II. OST 細胞のヌードマウス腹腔内への移植

継代培養された OST 細胞浮遊液 ( $1 \times 10^7$  個/ml) を4週齢の雄 BALB/c ヌードマウス (nu/nu) 腹腔内に1匹あたり1mlを注入した。移植4週後にマウスを屠殺し、腹水と腫瘍結節を採取した。腹水を細胞診で観察するとともに腹水中に浮遊している細胞を牛胎児血清を含む RPMI-1640 培養液中で培養した。細胞がコンフルエントに達した時点でトリプシンにより剥離し1~3代まで継代した。継代第1~3代の各細胞を無血清培地で4日間培養後その培養液を採取し実験に用いた。さらに、腹壁に形成された腫瘍結節を緩衝液 (50 mM Tris-HCl, pH 7.4/0.15 M NaCl/10 mM CaCl<sub>2</sub>/0.02% NaN<sub>3</sub>) で十分洗浄後、0.05% Brij 35 を含む同緩衝液と混和してフロン製ホモジナイザーでホモジネートを作製した。ホモジネート上清より硫酸沈殿法 (25~60%飽和度) により蛋白を得、同緩衝液に

透析した。また、腫瘍結節の一部とヌードマウスの全臓器をホルマリンで固定後パラフィン包埋し、H-E染色標本で観察した。

#### III. 酵素活性の測定

OST 細胞調整培地につきトランスフェリン分解活性、ゼラチナーゼおよびコラーゲナーゼ活性を測定した。トランスフェリン分解活性は Okada らの方法<sup>22</sup>に従い [<sup>3</sup>H] 標識カルボキシメチル化トランスフェリン (carboxymethylated transferrin, [<sup>3</sup>H] Cm-Tf) を基質として、37°Cで反応後、3.3%トリクロロ酢酸に可溶性のトランスフェリン分解産物の放射活性を測定した。ゼラチナーゼとコラーゲナーゼ活性はそれぞれ Cawston ら<sup>23</sup>と Harris ら<sup>24</sup>の方法に従って測定した。モルモット皮膚よりI型コラーゲンを精製し、Gisslow らの方法<sup>25</sup>により<sup>14</sup>C-無水酢酸 (Amersham) で標識し放射性コラーゲンを作製した。<sup>14</sup>C-ゼラチンは<sup>14</sup>C-コラーゲンを60°C, 30分間熱処理することにより作製した。

#### IV. OST 細胞由来酵素の活性化

##### 1. p-aminophenylmercuric acetate (NH<sub>2</sub>-Ph-Hg-Ac) による活性化

OST 細胞調整培地を1 mM NH<sub>2</sub>-Ph-Hg-Ac とともに37°C, 30分~2時間インキュベート後トランスフェリン分解活性、ゼラチナーゼおよびコラーゲナーゼ活性を測定した。

##### 2. セリンプロテイナーゼによる活性化

OST 細胞調整培地を0.1~100 μg/ml のトリプシンと22°Cで5分~12時間反応後、5倍量のトリプシンインヒビターで反応を止め、トランスフェリン分解活性、ゼラチナーゼおよびコラーゲナーゼ活性を測定した。また、同様の方法でキモトリプシン (0.1~100 μg/ml)、プラスミン (0.1~50 μg/ml)、および隣エラストラーゼ (1~100 μg/ml) の各セリンプロテイナーゼによる活性化を検討した。キモトリプシンでは22°Cで、プラスミンと隣エラストラーゼでは37°Cでそれぞれ反応後、diisoprophyl fluorophosphate (3 mM/ml) にて反応を止め、各活性を測定した。

##### 3. sodium dodecyl sulfate (SDS), 尿素およびカオトロピックイオンによる活性化

OST 細胞調整培地を0.1% SDS の存在下で22°C, 1~24時間反応した後に、0.1% Triton X を含む緩衝液 (50 mM Tris-HCl, pH 7.4/0.15 M NaCl/10 mM CaCl<sub>2</sub>/0.02% NaN<sub>3</sub>) に透析して SDS を除去した。ま

Takase; pep. A, pepstatin A; PMSF, phenylmethan sulfonyl fluoride; RPMI-1640, Roswell Park Memorial Institute Media-1640; SDS, sodium dodecyl sulfate; TIMP, tissue inhibitor of metalloproteinases.

た, 同様に同培地を 8M 尿素, 3M チオシアン化ナトリウム, 5M ヨウ化カリウムの存在下で 22°C, 4 時間反応後, 0.05% Brij 35 を含む同緩衝液に透析した. これらの試料につきトランスフェリン分解活性, ゼラチナーゼおよびコラゲナーゼ活性を測定した.

#### V. SDS-ゼラチンサブストレートゲル

Hibbs らの方法<sup>26)</sup>に従い, ゼラチン (0.5 mg/ml) を含むポリアクリルアミドゲル (10% アクリルアミド) を作製した. OST 細胞調整培地, SDS 処理後の同培養液, ヌードマウス腹壁腫瘍結節のホモジネート, および腹水中の OST 細胞継代第 1~3 代細胞培養液をそれぞれ非還元状態で 4°C で電気泳動した. ゲルを緩衝液 (50 mM Tris-HCl, pH 7.5/1 μM ZnCl<sub>2</sub>/10 mM CaCl<sub>2</sub>/2.5% Triton X/0.02% NaN<sub>3</sub>) で洗浄後 37°C で反応し, ゼラチンの分解パターンを調べた. ゼラチンサブストレートゲルでは, SDS 処理や電気泳動中に活性化が生じるため, 活性化処理は不要であった.

上記材料のゼラチン分解能に対して阻害試験を行った. すなわち, 試料をゼラチンサブストレートゲルに電気泳動後上記緩衝液で洗浄し, 2 mM phenylmethane sulfonyl fluoride (PMSF), 15 mM ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), 5 mM N-ethylmaleimide (N-EM) および 0.5 mM pepstatin A (pep. A) の各種プロテイナーゼ阻害剤を含む緩衝液中で反応させた.

#### VI. SDS-IV型コラーゲンサブストレートゲル

IV型コラーゲン (新田ゼラチン, Cellmatrix Type IV) を 0.5 mg/ml の濃度で含む 10% ポリアクリルアミドゲルを作製した. ゼラチンサブストレートゲルと同様の方法で, 試料を 4°C で電気泳動後 33°C で反応させ IV型コラーゲンの分解パターンを調べた. また, ゼラチンサブストレートゲルと同様の方法で阻害試験を行った.

#### VII. OST 細胞由来蛋白分解酵素活性とインヒビターの部分精製

OST 細胞調整培地 (200 ml) を硫酸沈殿法 (25~60% 飽和度) で 7 ml に濃縮し, さらに限外濾過装置 (アミコン社, U.S.A.) で 2 ml に濃縮した. この試料の 1.5 ml を緩衝液 (50 mM Tris-HCl, pH 7.5/0.15M NaCl/10 mM CaCl<sub>2</sub>/0.05% Brij 35/0.02% NaN<sub>3</sub>) で平衡化した Ultrogel AcA44 カラム (1.5×115 cm) にかけて, 培養液中の蛋白質を分子量の大きさにより分離した. 各フラクションについてコラゲナーゼ, ゼラチナーゼおよびトランスフェリン分解酵素活性を測定した. さらに, 同フラクションにつきヒト慢性関節リウマチ滑膜細胞由来 matrix metalloproteinase 3 (MMP-3)<sup>22)</sup> 活性に対する阻害活性を検

討した. すなわち, 一定量の活性型 MMP-3 (10 μl) と各フラクションからの試料 (10 μl) を 22°C で 30 分間反応後トランスフェリンアッセイを行った.

#### VIII. MMP-3 と tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) の Western blot 法による検討

OST 細胞調整培地を 10% ポリアクリルアミドゲルに SDS/PAGE 後ニトロセルロース膜に転写し, 抗 MMP-3 抗体<sup>27)</sup> (金沢大学医療技術短期大学部, 岡田保典博士より供与) 及び抗 TIMP 抗体<sup>28)</sup> (愛知学院大学歯学部, 早川太郎教授より供与) と反応後, アビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ複合体 (ABC) 法により検討した.

### 成 績

#### I. ヌードマウス腹腔内への OST 細胞移植

OST 細胞はヌードマウスの腹腔内で著明に増殖し, 移植後 4 週では腹水貯留により腹部は著しく膨隆を示した. また, 大網や脾周囲, 後腹膜, 腹壁に多数の腫瘍結節を形成した. 腹水浮遊細胞を細胞診で観察すると, 大型異型核をもつ OST 腫瘍細胞のほか多数の好中球やリンパ球, およびマクロファージ様細胞が認め

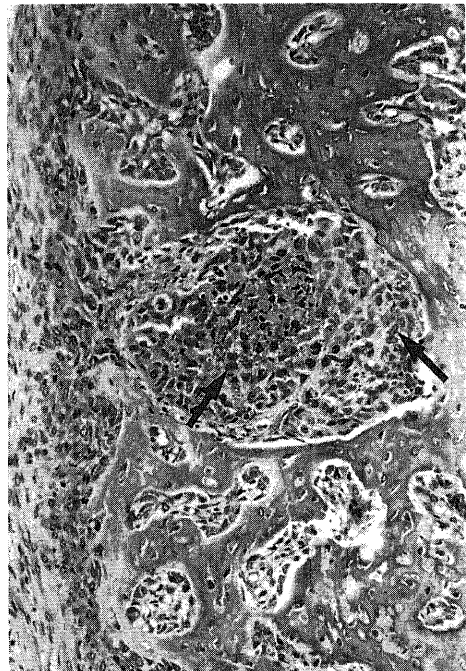


Fig. 1. Ectopic bone induced in the abdominal wall of an athymic nude mouse by the OST cells (arrows). H-E stain. ×130.

られた。しかし、腹水細胞を培養すると継代第1代以降は多角形を示す OST 腫瘍細胞のみから構成されるようになった。OST 腫瘍細胞は多角形の胞体と大型異型核をもちしばしば核分裂像を示し、索状ないし胞巣状の細胞集団を形成して腹壁筋層内へ浸潤性に発育していた。腫瘍細胞の浸潤した筋肉及び筋膜組織中には反応性の軟骨及び骨組織の形成がしばしば観察された(図-1)。しかし、OST 腫瘍細胞自身による明らかな

類骨や骨形成像は認められなかった。腹膜では OST 腫瘍細胞は腹腔面へ突出した結節を形成し、中皮細胞はしばしば剥離消失していた。さらに、腫瘍細胞は肝被膜から肝実質への浸潤をも示した。腹膜で増殖した OST 腫瘍細胞は腹膜の門脈枝内へ浸潤し、肝中心静脈内と肺動脈枝内に腫瘍塞栓を形成していた(図-2)。また、大網や後腹膜及び縦隔内のリンパ節中に OST 細胞の転移巣が観察された(図-3)。

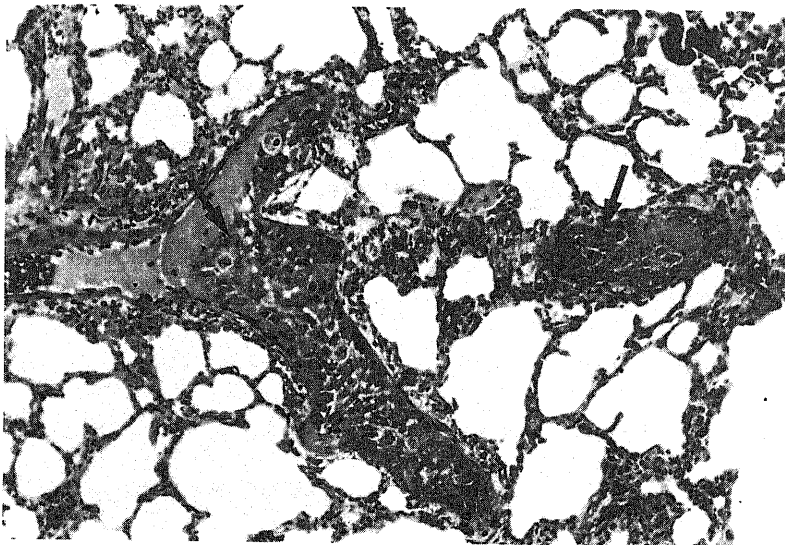


Fig. 2. Tumor emboli composed of the OST cells (arrows) in the branches of a pulmonary artery of a nude mouse. H-E stain.  $\times 150$ .

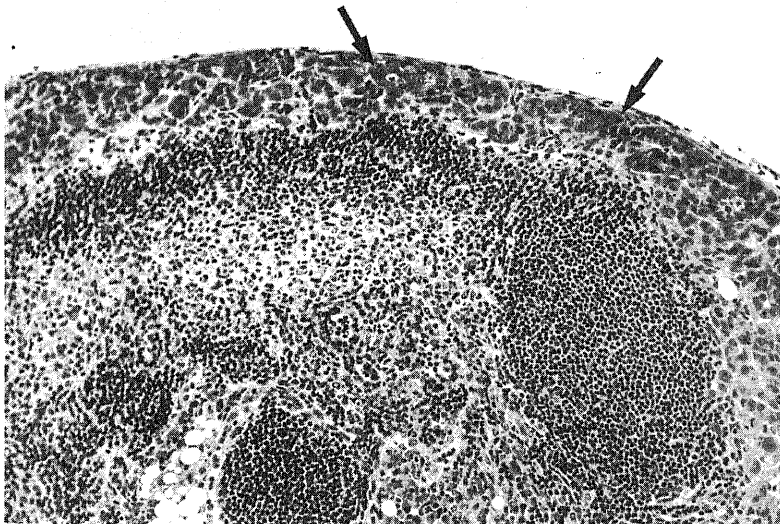


Fig. 3. Metastasis of the OST cells (arrows) to a lymph node in the mediastinum of a nude mouse. H-E stain.  $\times 150$ .

## II. 培養 OST 細胞由来蛋白分解酵素

### 1. コラゲナーゼ, ゼラチナーゼ, トランスフェリン分解酵素活性のアッセイによる検出

OST 細胞培養液中には, 未処理状態でコラゲナーゼ, ゼラチナーゼ, トランスフェリン分解酵素活性は検出されなかった. 種々の金属依存性蛋白分解酵素の活性化に用いられる,  $\text{NH}_2\text{-Ph-Hg-Ac}$  の存在下でアッセイを行ってもこれらの酵素活性は認められなかった. また, トリプシン, キモトリプシン, プラスミン, 糜エラスターゼの各セリンプロテイナーゼ処理による活性化でも OST 細胞培養液中に酵素活性はみられなかった.

SDS, 尿素, ヨウ化カリウム, チオシアン化ナトリウム

処理による活性化では 0.1% SDS で 3~4 時間処理した場合にのみトランスフェリン分解酵素活性が検出された. しかし, コラゲナーゼとゼラチナーゼ分解酵素活性はみられなかった. SDS 処理による活性化の頻度は約 20% で, その活性化の程度も 0.2~1.8 単位/ml と一定しなかった.

### 2. SDS-ゼラチンサブストレートゲルによる検討

OST 細胞培養液を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, 分子量 75,000 の部位にゼラチン分解酵素活性を示すバンドが認められた (図-4A). 一方, SDS 処理によりトランスフェリン分解酵素活性の出現を認めた材料では上記のバンドのほか, 45,000 の位置に低分子のバンドも観察された (図-4B). 両試料につき, 各種プロテイナーゼに対する阻害剤の存在下でゲルを反応させると, これらのゼラチン分解酵素活性は EDTA によってのみ阻害された (図-5A).

### 3. SDS-IV型コラーゲンサブストレートゲルによる検討

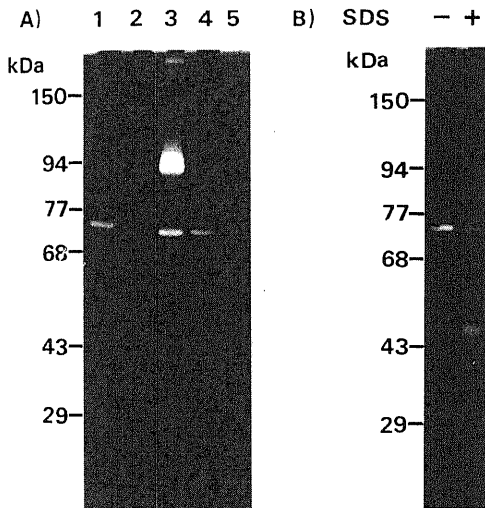


Fig. 4. Visualization of gelatin-degrading activities on SDS-gelatin substrate gel electrophoresis. (A). Samples from culture medium of the OST cells (lane 1), homogenate of abdominal OST tumor nodules (lane 2), culture media from the first (lane 3), second (lane 4) and third generation (lane 5) of passage of the ascitic OST cells were run on a SDS-gelatin substrate gel (10% total acrylamide) under the unreduced conditions at 4°C. After electrophoresis, the gel was washed, incubated in 50 mM Tris-HCl, pH 7.5/1  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$ /10 mM  $\text{CaCl}_2$ /2.5% Triton X/0.02%  $\text{NaN}_3$  for 8h at 37°C and stained with Coomassie Brilliant blue R250. (B). OST culture media treated with (+) or without (-) 0.1% SDS for 4h at 22°C were subjected to a SDS-gelatin substrate gel (10% total acrylamide). After the removal of SDS by dialysis against 50 mM Tris-HCl, pH 7.5/0.15 M NaCl/10 mM  $\text{CaCl}_2$ /1% Triton X/0.02%  $\text{NaN}_3$ , gelatinolytic activity was visualized according to the method described above.

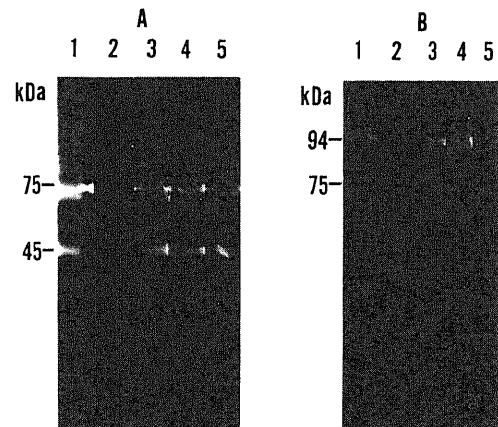


Fig. 5. Inhibition studies of gelatinolytic activities in the OST culture medium treated with SDS (A) and those in culture medium of the ascitic OST cells of the first-passage generation (B). The samples were electrophoresed on SDS-gelatin substrate gels (10% total acrylamide) under the unreduced conditions at 4°C. The gel was, then sliced into strips of each lane, washed in 50 mM Tris-HCl, pH 7.5/1  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$ /10 mM  $\text{CaCl}_2$ /2.5% Triton X/0.02%  $\text{NaN}_3$  and incubated with the washing buffer (lane 1), the buffer containing 15 mM ethylenediamine tetraacetic acid (lane 2), 2 mM phenylmethan sulfonyl fluoride (lane 3), 5 mM N-ethylmaleimide (lane 4), or 0.5 mM pepstatin A (lane 5) for 8h at 37°C. The strips were stained with Coomassie Brilliant blue R250.

OST 細胞培養液をIV型コラーゲンサブストレートゲル上に電気泳動すると、分子量 75,000 の部位にIV型コラーゲン分解酵素活性を示すバンドがみられ、SDS 処理した同培養液では分子量 75,000 と 45,000 のバンドが認められた (図-6A)。これらのIV型コラーゲン分解活性の分子量はゼラチンサブストレートゲルのそれに一致した。また、これらの活性は EDTA によって完全に阻害された。

#### 4. OST 細胞由来蛋白分解酵素活性とインヒビターの部分精製

OST 細胞培養液を Ultrogel AcA44 カラム (1.5×115 cm) にかき、培養液中の蛋白質を分子量の大きさにより分離したクロマトグラムを図-7A に示す。コ

ラゲナーゼ、ゼラチナーゼ、トランスフェリン分解酵素活性は、NH<sub>2</sub>-Ph-Hg-Ac 存在及び非存在下において全く検出されなかったが、SDS-ゼラチンサブストレートゲル上フラクション 47 付近にピークをもつゼラチン分解酵素活性が認められた (図-7B)。一方、ヒト慢性関節リウマチ滑膜細胞由来 matrix metalloproteinase 3 活性に対する阻害活性を検討した所、図-7A の如くフラクション 62~80 に阻害活性が認められた。

#### 5. MMP-3 と TIMP の Western blot 法による検討

ニトロセルロース膜上に転写された OST 細胞培養液中の蛋白のうち、分子量 28,000 のバンドが抗

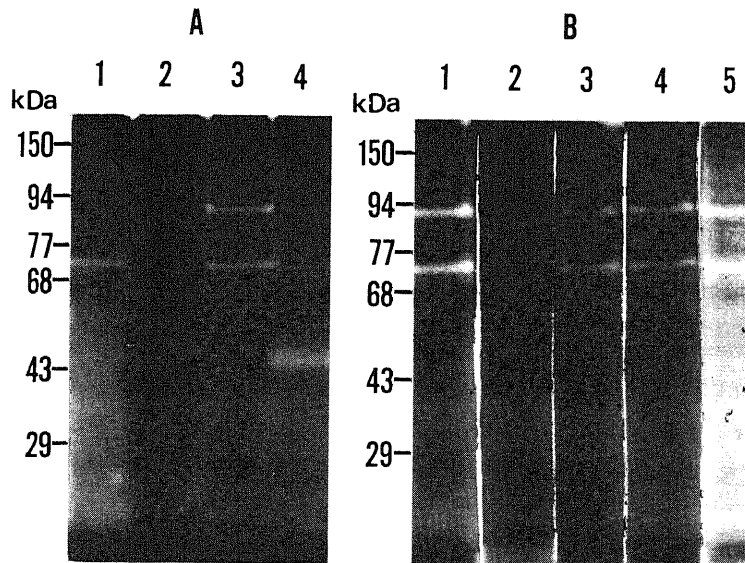


Fig. 6. Visualization of type IV collagen-degrading activities on a SDS-type IV collagen substrate gel electrophoresis (A) and inhibition studies of the activities in culture medium of the ascitic OST cells in the first-passage generation (B).

(A) samples from culture medium of the OST cells (lane 1), homogenate of abdominal OST tumor nodules (lane 2), culture medium of the first passage-generation of ascitic OST-cells (lane 3) and the OST culture medium activated with SDS (lane 4) were run on a SDS-type IV collagen substrate gel (10% total acrylamide) under the unreduced condition at 4°C. Type IV collagen-degrading activities were visualized by the incubation for 18h at 33°C according to the method described in Fig. 4. (B) Culture medium of the ascitic OST cells was electrophoresed on a SDS-type IV collagen substrate gel (10% total acrylamide) under the unreduced conditions at 4°C. According to the method described in Fig. 5., the gel was sliced into strips of each lane, incubated for 18h at 33°C with the buffer (lane 1), the buffer containing 15 mM ethylenediamine tetraacetic acid (lane 2), 2 mM phenylmethan sulfonyl fluoride (lane 3), 5 mM N-ethylmaleimide (lane 4), or 0.5 mM pepstatin A (lane 5) and finally stained with Coomassie Brilliant blue R250.

TIMP 抗体によって認識された (図-8)。しかし, 抗 MMP-3 抗体によって認識される蛋白バンドは検出されなかった。

III. ヌードマウス移植 OST 細胞由来蛋白分解酵素

ヌードマウス腹壁の腫瘍塊ホモジネートと, 腹水中に浮遊した OST 細胞の継代第 1 代細胞培養液をゼラチンサブストレートゲルと IV 型コラーゲンサブスト

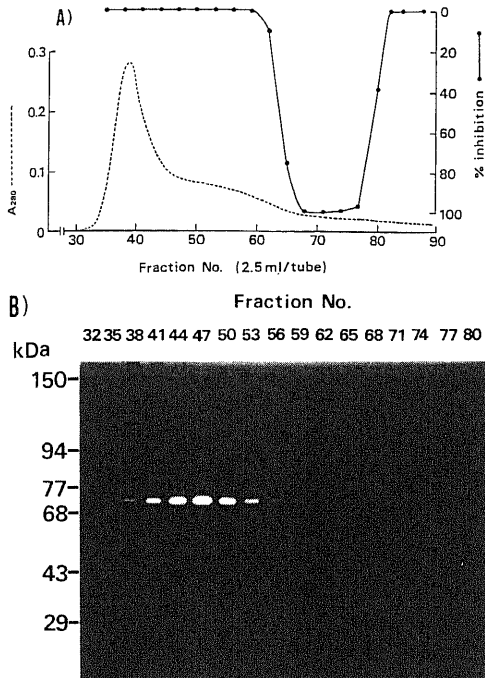


Fig. 7. Ultrogel AcA44 chromatography and SDS-gelatin substrate gel electrophoresis of the column fractions. (A) Culture medium of OST cells (200 ml) was concentrated to 2 ml by the ammonium sulfate precipitation (25~60% saturation) and by an Amicon Diaflo apparatus fitted with a YM-10 membrane. The sample (1.5 ml) was then applied to an Ultrogel AcA44 column (1.5×115 cm) equilibrated with 50 mM Tris-HCl, pH 7.5/0.15 M NaCl/10 mM CaCl<sub>2</sub>/0.05% Brij35/0.02% NaN<sub>3</sub>. The column eluate was monitored for the absorbance at 280 nm (.....) and inhibitory activity against matrix metalloproteinase 3 (•). No enzymatic activities were detected in the assays using <sup>14</sup>C-collagen, <sup>14</sup>C-gelatin and [<sup>3</sup>H]carboxymethylated transferrin substrates. (B) The samples from Ultrogel AcA44 column fractions (fraction # 32~80, 25 μl each) were subjected to a SDS-gelatin substrate gel (10% total acrylamide) under the unreduced conditions. Gelatinolytic activity was visualized according to the method described in Fig. 4.

レートゲルに電気泳動すると, 図-4A と図-6A に示すように OST 細胞培養液でみられた分子量 75,000 のバンド以外により高分子の 94,000 のバンドが新たに観察された。しかし分子量 94,000 のゼラチン及び IV 型コラーゲン分解酵素活性は継代 2 代では低下し, 継代 3 代ではほとんど認められなくなった (図-4A)。図-5B と図-6B に示すように, これらの IV 型コラーゲンとゼラチンを分解する酵素活性は EDTA によってのみ阻害され, 他の阻害剤では影響をうけなかった。

考 察

OST 細胞はヒト骨肉腫より分離, 樹立化された細胞株で, 動物に異種移植すると宿主動物の線維性組織中に骨誘導能を有するのみならず, 腫瘍性類骨や骨形成をきたすと報告されている<sup>29)</sup>。本研究においても, ヌードマウス腹壁中に浸潤した OST 腫瘍細胞は明らかな骨誘導能をもつことが確かめられた。骨肉腫による骨

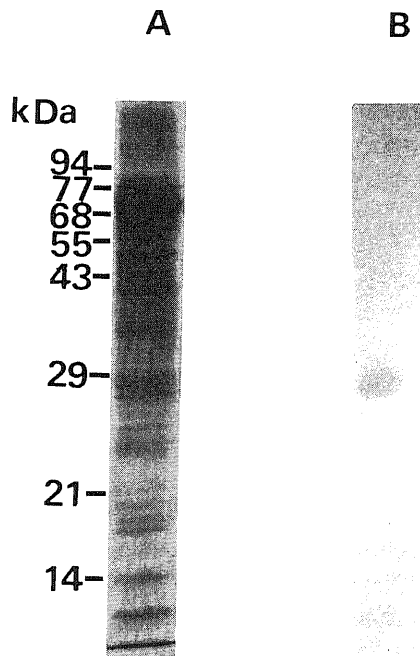


Fig. 8. Western blotting. Concentrated culture medium of the OST cells by ammonium sulfate precipitation (25~60% saturation) was electrophoresed on a 12.5% SDS (reducing) gel (A). Another sample was electrophoresed and transferred to nitrocellulose membrane, and tissue inhibitor of metalloproteinases was visualised using a monoclonal mouse anti-TIMP IgG and a biotinylated anti-mouse IgG antibody followed by an avidin-biotin-peroxidase complex method (B).



誘導能は腫瘍細胞の骨芽細胞への分化度を示すと考えられていることから<sup>30)</sup>、本腫瘍細胞は少くとも骨芽細胞の機能の一部を保持する細胞株であると考えられる。さらに、腹腔内に播種した OST 細胞は脈管内侵入をきたし、肺動脈枝内の腫瘍塞栓とリンパ節転移を形成することが本実験において示された。これらの所見は、OST 細胞が骨肉腫細胞であることを示している。

悪性腫瘍細胞が浸潤、転移をきたすためには、腫瘍細胞周囲の細胞間マトリックスや血管周囲基底膜の分解が必須であり、これまで悪性腫瘍に由来する種々の酵素が報告されている。それらには I～III型コラーゲンを分解するコラゲナーゼ<sup>11-14)</sup>をはじめ IV型コラーゲン分解酵素<sup>51-9)</sup>、V型コラーゲン分解酵素<sup>10)</sup>、フィブロネクチン分解酵素<sup>11)</sup>、プロテオグリカン分解酵素<sup>12)</sup>、エラスチン分解酵素<sup>13)</sup>、プラスミノゲンアクチベーター<sup>18)19)31)</sup>及びヘパリン分解酵素<sup>14)</sup>などが含まれ、いずれも細胞間マトリックス構成成分の分解能をもつ点で共通している。これらの酵素のほとんどはプロテイナーゼで、システインプロテイナーゼ、セリンプロテイナーゼ、および金属依存性蛋白分解酵素のいずれかに属しており、癌細胞由来のアスパラギン酸プロテイナーゼ<sup>32)</sup>の報告はきわめて少なくその基質についても明らかにされていない。

本研究では、培養 OST 細胞が IV型コラーゲンとゼラチンを分解する酵素活性を分泌することが明らかとなった。IV型コラーゲンとゼラチンを用いたサブストレートゲル上その酵素の分子量はいずれも 75,000 であり EDTA により失活することから、同一の酵素が IV型コラーゲンとゼラチンを分解すると考えられる。各種阻害剤のうち EDTA によるのみその活性が阻害されることは、この酵素が金属依存性蛋白分解酵素に属することを示している。しかし、本酵素活性は <sup>14</sup>C-コラーゲン、<sup>14</sup>C-ゼラチン、<sup>3</sup>H]Cm-Tf を基質としたアッセイでは全く検出されなかった。その理由として、本酵素に対する阻害物質である tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)<sup>33)</sup>が培養液中に共存する可能性が第一に考えられる。実際、OST 細胞培養液のゲル濾過分画分に金属依存性蛋白分解酵素である MMP-3 に対する阻害活性がみられることや、Western blot 法で抗 TIMP 抗体と反応する分子量 28,000 の蛋白が検出されることは OST 細胞が TIMP を培養液中に分泌していることを示している。しかし、ゲル濾過により TIMP を除去しても活性が検出できないことは他の可能性、すなわち活性化の障害を強く示唆している。種々の金属依存性蛋白分解酵素の活性化には、トリプシンなどのセリンプロテイナーゼによる活性化と NH<sub>2</sub>-Ph-Hg-Ac などの水銀化合物

による自己活性化の 2 つの機序が知られている<sup>34)35)</sup>。本研究では、この 2 つの方法によっても活性は全く検出されず、酵素を SDS 処理した場合にのみ不完全ながらトランスフェリン分解活性が検出されたにすぎない。SDS による本酵素の活性化機序は明らかではないが、おそらく酵素蛋白に付着した SDS が透析で除去される際にそのコンフォメーションに変化を生じ自己活性化をきたすと想像される。また、サブストレートゲルにおいて確実に活性が検出されるのも、電気泳動そのものや試料を SDS を含む緩衝液と反応することにより自己活性化をきたすためと推定される。これまで悪性黒色腫細胞由来のコラゲナーゼや線維肉腫由来の IV型コラーゲン分解酵素に関しては、腫瘍細胞によって分泌されたプラスミノゲンアクチベーターがプラスミノゲンを活性化し、さらにプラスミンがこれら潜在型のコラゲナーゼを活性化するという仮説が提唱されている<sup>7)31)</sup>。しかし、本酵素はプラスミンでは活性化されないことからそのようなカスケード反応による活性化は考えにくく in vivo における OST 細胞由来酵素の活性化機序については全く不明である。

ヌードマウス内で増殖した OST 細胞の腫瘍塊ホモジネートと腹水中の腫瘍細胞培養液に、高分子の酵素活性 (分子量 94,000) が新たに検出されたことはきわめて興味深い所見である。この酵素も IV型コラーゲンとゼラチンを分解する金属依存性蛋白分解酵素であることはその分子量と阻害剤に対する反応から明らかである。Vaes ら<sup>36)</sup>はマクロファージ由来の液性因子が Lewis 肺癌細胞を刺激し IV型コラーゲンを分解する金属依存性蛋白分解酵素を分泌させると報告している。また、V2 癌細胞株や<sup>37)</sup>悪性黒色腫細胞<sup>38)</sup>によるカテプシン B の分泌が何らかの液性因子によって調節されることが報告されている。本実験においても OST 細胞の浸潤、増殖した腹膜と腹水中には好中球やマクロファージ及びリンパ球などの著明な炎症性細胞浸潤がみられた。これらの細胞から放出された種々の因子によって OST 細胞が刺激をうけ、この高分子の IV型コラーゲン分解酵素の合成が誘導されることは可能なことである。また、腹水中の OST 細胞を継代すると本酵素の分泌がみられなくなることはこの考えを支持している。

IV型コラーゲンを分解する金属依存性蛋白分解酵素として、これまで少くとも 4 種類の酵素が報告されている。これらのうち悪性黒色腫細胞由来で IV型コラーゲン、ゼラチン及び I 型コラーゲンを分解する酵素<sup>39)</sup>は分子量が 59,000 であることや、細胞外に分泌されないことから、OST 細胞由来酵素とは異なると考えられる。MMP-3<sup>22)</sup>は stromelysin<sup>40)</sup>ともよばれ、H-ras 癌

伝子によって形質転換された線維芽細胞や実験的マウス扁平上皮癌細胞より分泌される“transin”という酵素に一致する<sup>41)42)</sup>。しかし、OST細胞由来酵素とは、その分子量と活性化機序が異なることや、Western blot法で抗MMP-3抗体と反応する蛋白が培養液中にみられないことから両者は異なる酵素と考えられる。一方、培養液中に分泌されるOST細胞由来酵素(分子量75,000)は、IV型コラーゲンとゼラチンを分解する基質特異性や分子量が類似していることから、IV型コラーゲナーゼ<sup>9)</sup>やゼラチナーゼ<sup>43)44)</sup>にきわめて似ていると考えられる。しかし、これらの酵素がNH<sub>2</sub>-Ph-Hg-Acやトリプシンで活性化されるのに対し、OST細胞由来酵素は全く活性化されないことは大きな相違点である。これらの酵素とOST細胞由来酵素との異同については現在のところ不明で、将来これら酵素に対する抗体を用いた免疫学的交叉性やアミノ酸配列の決定により明らかになるものと考えられる。

癌細胞の転移能と種々の酵素活性との間に正の相関関係があることが多くの研究者によって指摘されている<sup>3)5)14)~20)</sup>。しかし、一方でこれら酵素活性と転移能との間に相関関係がないという報告<sup>36)45)</sup>や、多種類の酵素活性との関連はあるものの特別な酵素活性とは相関しないという報告もみられる<sup>46)</sup>。これらの矛盾したデータは、すでに指摘されているように<sup>47)</sup>個々の癌細胞は生物学的に著しい多様性をもつことに基づくと考えられる。また、このことは癌細胞の転移機構は個々の癌細胞について検討されねばならないことを示唆している。骨肉腫細胞の転移機序に関しては全く不明で、骨肉腫細胞由来の酵素についてもラット骨肉腫細胞がコラーゲナーゼを分泌するという以外に報告はみられない<sup>4)48)</sup>。本研究では、OST骨肉腫細胞がIV型コラーゲン分解酵素を培養液中に分泌するだけでなく、腹壁や腹腔中に浸潤、増殖した腫瘍細胞がその酵素に加えて分子量の異なるIV型コラーゲン分解酵素を分泌することが明らかとなった。IV型コラーゲンは血管基底膜の主要構成成分であることから、これらの酵素は骨肉腫細胞が血管内侵入をする際に重要な役割を果たす可能性があると考えられる。今後OST細胞の転移とこれら酵素活性との相関やin vivoにおける活性化機序を解明することが重要な課題と考えられる。

## 結 論

ヒト骨肉腫由来培養細胞(OST株)を用いて、腫瘍細胞としての性質と本腫瘍細胞が分泌する酵素活性について検討し、以下の結果を得た。

1. ノードマウスに移植したOST細胞は、宿主動物に骨誘導とリンパ節転移及び肺動脈枝内腫瘍塞栓を

形成し、ヒト骨肉腫細胞としての性質を維持していることが実証された。

2. OST細胞はIV型コラーゲンとゼラチンを分解する分子量75,000の金属依存性蛋白分解酵素を培養液中に分泌するのみならず、特異抗体と反応するTIMPを分泌することが示された。

3. 本酵素は、トリプシン、キモトリプシン、プラスミン、睪エラスターゼの各セリンプロテイナーゼ、NH<sub>2</sub>-Ph-Hg-Ac、尿素、チオシアン化ナトリウム及びヨウ化カリウムでは活性化されないが、SDS処理によってまれに活性化された。SDSによる活性化に伴い分子量45,000の低分子酵素活性がサブストレートゲル上検出された。

4. ノードマウス腹壁や腹水中で増殖したOST細胞は、分子量75,000の酵素に加えて分子量94,000を示すIV型コラーゲンとゼラチンを分解する金属依存性蛋白分解酵素を分泌した。

以上のデータより、OST細胞は骨肉腫細胞としての性質を有することが明らかとなり、腫瘍の局所浸潤や転移形成に本腫瘍細胞に由来するIV型コラーゲンとゼラチンを分解する金属依存性蛋白分解酵素が重要な役割を果たすと推定された。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました恩師野村進教授に深甚なる謝意を表します。また、終始御指導御協力を戴きました富田勝郎助教授と、本研究を直接御指導、御教示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謝意を表します。さらに、本稿の御校閲を賜りました金沢大学医学部第一病理学教室中西功夫教授ならびに第一病理学教室教室員の方々的心より感謝致します。

## 文 献

- 1) Dresden, M. H., Heilman, S. A. & Schmidt, J. D.: Collagenolytic enzymes in human neoplasms. *Cancer Res.*, **32**, 993-996 (1972).
- 2) Harris, E. D., Jr., Faulkner, C. S. & Wood, S., Jr.: Collagenase in carcinoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **48**, 1247-1253 (1972).
- 3) Tarin, D., Hoyt, B. J. & Evans, D. J.: Correlation of collagenase secretion with metastatic-colonization potential in naturally occurring murine mammary tumors. *Br. J. Cancer*, **46**, 266-278 (1982).
- 4) Otsuka, K., Sodek, J. & Limeback, H.: Synthesis of collagenase and collagenase inhibitors by osteoblast-like cells in culture. *Eur. J. Biochem.*, **145**, 123-129 (1984).

- 5) **Liotta, L. A., Tryggvason, K., Garbisha, S., Hart, I., Foltz, C. M. & Shafie, S.**: Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen. *Nature*, **284**, 67-68 (1980).
- 6) **Liotta, L. A., Tryggvason, K., Garbisha, S., Gehron, P., Robey, G. & Shigeto, A.**: Partial purification and characterization of a neutral protease which cleaves type IV collagen. *Biochemistry*, **20**, 100-104 (1981).
- 7) **Salo, T., Liotta, L. A., Keski-Oja, J., Turpeenniemi-Hujanen, T. & Tryggvason, K.**: Secretion of basement membrane collagen degrading enzyme and plasminogen activator by transformed cells - role in metastasis. *Int. J. Cancer*, **30**, 669-673 (1983).
- 8) **Barsky, S. H., Togo, S., Garbisa, S. & Liotta, L. A.**: Type IV collagenase immunoreactivity in invasive breast carcinoma. *Lancet*, **1**, 296-297 (1983).
- 9) **Salo, T., Liotta, L. A. & Tryggvason, K.**: Purification and characterization of a murine basement membrane collagen degrading enzyme secreted by metastatic tumor cells. *J. Biol. Chem.*, **258**, 3058-3063 (1983).
- 10) **Liotta, L. A., Lanzer, W. L. & Garbisa, S.**: Identification of a type V collagenolytic enzyme. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **98**, 184-190 (1981).
- 11) **Chen, W-T., Olden, K., Bernard, B. A. & Chu, F-F.**: Expression of transformation-associated protease(s) that degrade fibronectin at cell contact sites. *J. Cell Biol.*, **98**, 1546-1555 (1984).
- 12) **Mikuni-Takagaki, Y. & Gross, J.**: Cartilage-degrading neutral proteinase secreted by Yoshida sarcoma cells. *J. Biol. Chem.*, **259**, 6739-6747 (1984).
- 13) **Kao, R. T., Wong, M. & Stern, R.**: Elastin degradation by proteases from cultured human breast cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **105**, 383-389 (1982).
- 14) **Nakajima, M., Irimura, T., DiFerrante, D., DiFerrante, N. & Nicolson, G. L.**: Heparan sulfate degradation correlates with tumor invasive and metastatic properties of B16 melanoma sublines. *Science*, **220**, 611-613 (1983).
- 15) **Woolley, D. E.**: Collagenolytic mechanisms in tumor cell invasion. *Cancer Metastasis Rev.*, **3**, 361-372 (1984).
- 16) **Sloane, B. F., Dunn, J. R. & Honn, K. V.**: Lysosomal cathepsin B: correlation with metastatic potential. *Science*, **212**, 1151-1153 (1981).
- 17) **Sloane, B. F. & Honn, K. V.**: Cysteine proteinases and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.*, **3**, 249-263 (1984).
- 18) **Wang, B. S., McLoughlin, G. A., Richie, J. P. & Mannick, J. A.**: Correlation of the production of plasminogen activator with tumor metastasis in B16 mouse melanoma cell lines. *Cancer Res.*, **40**, 288-292 (1980).
- 19) **Carlsen, S. A., Ramshaw, I. A. & Warrington, R. C.**: Involvement of plasminogen activator production with tumor metastasis in a rat model. *Cancer Res.*, **44**, 3012-3916 (1984).
- 20) **Bosman, H. B., Bieber, G. F., Brown, A. E., Case, K. R., Gersten, D. M., Kimmerer, T. W. & Lione, A.**: Biochemical parameters correlated with tumour cell implantation. *Nature*, **246**, 487-489 (1973).
- 21) **山崎安朗**: ヒト骨肉腫由来細胞株の樹立とその形態学的観察. *十全医会誌*, **71**, 147-162 (1964).
- 22) **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).
- 23) **Cawston, T. E. & Barrett, A. J.**: A rapid and reproducible assay for collagenase using [ $^{14}\text{C}$ ] acetylated collagen. *Anal. Biochem.*, **99**, 340-345 (1979).
- 24) **Harris, E. D., Jr. & Krane, S. M.**: An endopeptidase from rheumatoid synovial tissue culture. *Biochem. Biophys. Acta*, **258**, 566-576 (1972).
- 25) **Gisslow, M. T. & McBride, B. C.**: A rapid sensitive collagenase assay. *Anal. Biochem.*, **68**, 70-78 (1975).
- 26) **Hibbs, M. S., Hasty, K. A., Seyer, J. M., Kang, A. K. & Mainardi, C. L.**: Biochemical and immunological characterization of the secreted forms of human neutrophil gelatinase. *J. Biol. Chem.*, **260**, 2493-2500 (1985).
- 27) **竹内尚人**: 慢性関節リウマチ滑膜組織における matrix metalloproteinase 3 の免疫組織化学的局在. *十全医会誌*, **97**, 149-161 (1988).
- 28) **Kodama, S., Kishi, J., Obata, K., Iwata, K. & Hayakawa, T.**: Monoclonal antibodies to bovine collagenase inhibitor. *Collagen Rel. Res.*, **7**, 341-350

(1987).

- 29) 高瀬武平, 山崎安朗, 真鍋昌平, 三秋 宏, 森 紀喜: ヒト骨肉腫由来培養株化細胞の異種移植に関する実験的研究. 癌の臨床, 17, 134-141 (1971).
- 30) Yoshikawa, H., Takaoka, K., Masuhara, K., Ono, K. & Sakamoto, Y.: Prognostic significance of bone morphogenetic activity in osteosarcoma tissue. *Cancer*, 61, 569-573 (1988).
- 31) Mignatti, P., Robbins, E. & Rifkin, D. B.: Tumor invasion through the human amniotic membrane: requirement for a proteinase cascade. *Cell*, 47, 487-498 (1986).
- 32) Yamaguchi, N. & Kawai, K.: Acid protease secreted from human pancreatic carcinoma cell line HPC-YT into serum-free chemically defined medium. *Cancer Res.*, 46, 5355-5359 (1986).
- 33) Cawston, T. E., Galloway, W. A., Mercer, E., Murphy, G. & Reynolds, J. J.: Purification of rabbit bone inhibitor of collagenase. *Biochem. J.*, 195, 159-165 (1981).
- 34) Stricklin, G. P., Jeffrey, J. J., Roswit, W. T. & Eisen, A. Z.: Human skin fibroblast procollagenase: mechanisms of activation by organomercurials and trypsin. *Biochemistry*, 22, 61-68 (1983).
- 35) Okada, Y., Harris, E. D., Jr. & Nagase, H.: The precursor of a metalloendopeptidase from human rheumatoid synovial fibroblasts. Purification and mechanisms of activation by endopeptidases and 4-aminophenylmercuric acetate. *Biochem. J.* (in press).
- 36) Vaes, G., Henry, N., van Lamsweerde, A. L. & Eeckhout, Y.: Metastatic ability of Lewis carcinoma cells and extracellular proteolysis. Interactions between tumour cells and host macrophages in the degradation of type I and type IV collagens, p357-371. *In* H. Tschesche (ed.), *Proteinases in Inflammation and Tumor Invasion*, Review Articles, Walter de Gruyter Co., Berlin. New York, 1986.
- 37) Baici, A., Gyger-Marazzi, M. & Sträuli, P.: Extracellular cysteine proteinase and collagenase activities as a consequence of tumor-host interaction in the rabbit V2 carcinoma. *Invasion Metastasis*, 4, 13-27 (1984).
- 38) Sloane, B. F., Honn, K. V., Sadler, J. G., Turner, W. A., Kimpson, J. J. & Taylor, J. D.: Cathepsin B activity in B16 melanoma cells: A possible marker for metastatic potential. *Cancer Res.*, 42, 980-986 (1982).
- 39) Zucker, S., Turpeenniemi-Hujanen, T., Romamurthy, N., Wieman, J., Lysik, R., Gorevic, P., Liotta, L. A. & Simon, S. R.: Purification and characterization of a connective-tissue-degrading metalloproteinase from the cytosol of metastatic melanoma cells. *Biochem. J.*, 245, 429-437 (1987).
- 40) 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).
- 41) Matrisian, L. M., Glaichenhaus, N., Gesnel, M-C. & Breathach, R.: Epidermal growth factor and oncogenes induced transcription of the same cellular mRNA in rat fibroblasts. *EMBO J.*, 4, 1435-1440 (1985).
- 42) Matrisian, L. M., Bowden, G. T., Krieg, P., Fürstenberger, G., Briand, J-P., Leroy, P. & Breathnach, R.: The mRNA coding for the secreted protease transin is expressed more abundantly in malignant than in benign tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 9413-9417 (1986).
- 43) Murphy, G., McAlpine, C. G., Poll, C. T. & Reynolds, J. J.: Purification and characterization of a bone metalloproteinase that degrades gelatin and type IV and type V collagen. *Biochim. Biophys. Acta*, 831, 49-58 (1985).
- 44) 安井 厚: 慢性関節リウマチ滑膜細胞由来 matrix metalloproteinase 2 (ゼラチナーゼ) の性質と活性化機構. 十全医会誌, (投稿中).
- 45) Teale, D. M., Rese, R. C., Thorgeirsson, U. P. & Liotta, L. A.: Type IV collagenase activity of a primary HSV-2-induced hamster fibrosarcoma and its in vivo metastases and in vitro clones. *Cancer*, 60, 1263-1268 (1987).
- 46) Lowe, F. C. & Issacs, J. T.: Biochemical methods for predicting metastatic ability of prostate cancer utilizing the Dunning R-3327 rat prostatic adenocarcinoma system as a model. *Cancer Res.*, 44, 744-752 (1984).
- 47) Zucker, S., Beck, G., Distefans, J. F. & Lysik, R. M.: Role for different cell proteinases in cancer invasion and cytolysis. *Br. J. Cancer*, 52, 223-232 (1985).

48) Overall, C. M. & Sodek, J.: Initial characterization of a neutral metalloproteinase, active on native 3/4-collagen fragments, synthesiz-

ed by ROS 17/2.8 osteoblastic cells, periodontal fibroblasts, and identified in gingival crevicular fluid. *J. Dent. Res.*, **66**, 1271-1282 (1987).

**Metalloproteinases from Cultured Human Osteogenic Sarcoma (OST) Cells**  
Hirokazu Shimizu, Department of Orthopaedic Surgery, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med. Soc., **97**, 715—726 (1988)

**Key words:** osteogenic sarcoma cell, metastasis, metalloproteinase, type IV collagen degradation

#### Abstract

In order to elucidate mechanisms of invasion and metastasis in osteosarcoma, it would be important to study extracellular matrix-degrading enzymes derived from osteogenic sarcoma cells. In the present study, the metastatic ability of cultured human osteogenic sarcoma (Osteogenic Sarcoma Takase; OST) cells was examined and properties of proteinases produced by the sarcoma cells were characterized. The OST cells induced ectopic new bone formation and developed metastases to lymph nodes and lungs (tumor emboli in branches of pulmonary arteries) when implanted into abdominal cavities of athymic nude mice. It was revealed by gelatin and type IV collagen-substrate gel electrophoresis that the OST cells secrete a proteinase with molecular weight (Mr) of 75,000 capable of degrading both gelatin and type IV collagen to the culture medium. The proteinase activity was inhibited by ethylenediamine tetraacetic acid, but not by phenylmethan sulfonyl fluoride, N-ethylmaleimide or pepstatin A, indicating that it belongs to a class of metalloproteinases. The activity was, however, not detected in assays using <sup>14</sup>C-collagen, <sup>14</sup>C-gelatin or [<sup>3</sup>H]-carboxymethylated transferrin substrate, even after the removal of tissue inhibitor of metalloproteinases. This suggests that the proteinase is present in a latent form. This enzyme was not activated with serine proteinases including trypsin,  $\alpha$ -chymotrypsin and plasmin, nor with p-aminophenylmercuric acetate, urea, sodium thiocyanate or potassium iodide, but it was found to be activated with sodium dodecyl sulfate in limited circumstances. The sample activated with SDS showed a lower molecular weight form with Mr of 45,000 as well as a Mr of 75,000 enzyme on gelatin and type IV collagen substrate gels. The type IV collagen and gelatin-degrading activities were also found on the SDS-substrate gel electrophoresis in homogenates of OST tumor nodules involving mouse abdominal walls and culture media of the ascitic OST cells. These resulted from metalloproteinases with Mr of 94,000 and 75,000, the latter of which is thought to be the same as that detected in the culture medium of the OST cells. These data suggest that OST cells possess characteristics of osteogenic sarcoma cells and that the type IV collagen and gelatin-degrading metalloproteinases produced by these cells could be involved in the mechanisms for invasion and metastasis of the osteosarcoma.