

膵癌における肝転移メカニズム —膵癌細胞の浸潤遊走における基底膜蛋白の関与—

東北大学第1外科

網倉 克己 小針 雅男 松野 正紀

膵癌では治癒切除術後にも肝転移再発が多いため、予後の改善には肝転移形成機構を解明し、肝転移防止対策を確立することが必要である。膵癌細胞の肝細胞に対する接着および浸潤遊走における基底膜蛋白 laminin (以下 LN), fibronectin (FN) の関与について、教室で樹立した膵癌培養細胞株 6 株を用いて検討した。LN, FN 両者に対し高い接着率を示す細胞株 (PK-1, PK-45P, PK-47) が、肝細胞に対しても高い接着率を示した。また、肝転移巣由来 (PK-1, PK-45H, PK-59) あるいは高度脈管侵襲陽性例由来 (PK-47) の細胞株は LN あるいは FN により浸潤遊走能が誘導され、また肝細胞を培養した filter を介しての遊走性をも示した。蛍光抗体法により肝細胞表面に LN, FN の存在が観察された。肝転移巣形成初期においては、肝細胞表面の LN, FN を介した接着あるいは遊走性の強弱が重要な役割を果たし、これらの強い細胞が中心となり肝転移巣が形成されている可能性が示唆された。

Key words: basement membrane components, liver metastasis in pancreatic cancer, boyden chamber assay

はじめに

膵癌は切除術後 5 年生存率 12% といまだ予後不良なのが現状である。1960 年 1 月~1990 年 6 月に教室で経験した膵癌切除例 66 例中、1989 年 12 月までに死亡した症例の死因を剖検所見あるいは画像診断からみると、再発死亡例の 82% に肝転移再発を認めており、膵癌の予後の改善にはまず、肝転移機構を解明し有効な肝転移防止対策を確立することが必要である。肝転移巣形成初期においては、主病巣における癌細胞の脈管侵襲、血管内遊走、肝内細血管での着床、血管外漏出などの各段階があり、基底膜構造と癌細胞の相互作用により進んでいくといわれる¹⁾。われわれは、膵癌細胞と肝細胞との相互関係から膵癌の肝転移メカニズムの解明をするために、肝転移巣形成過程における基底膜構成蛋白の役割につき検討した。

材料及方法

1. 膵癌培養細胞株

* 第 36 回日消外会総会シンポジウム I・消化器癌転移のメカニズム

<1990 年 10 月 11 日受理> 別刷請求先: 網倉 克己
〒980 仙台市青葉区星陵町 1-1 東北大学医学部第 1 外科

Table 1 Characteristics of human pancreatic cancer cell lines

Cell lines	Clinical Origin	Histology	Operation	Liver Metastasis	Time of Death
PK-1	Liver metastasis	pap	IORT	H ₂	2M
PK-9	Primary tumor	tub ₁	TP	9M	9M
PK-45H	Liver metastasis	tub ₁	IORT	H ₂	3M
PK-45P	Primary tumor	tub ₁			
PK-47	Primary tumor	por	TP	5M	6M
PK-59	Liver metastasis	tub ₂	Hepatic lobectomy	2Y	2Y 5M

IORT: Intraoperative radiation therapy
TP: Total pancreatectomy PD: Pancrectoduodenectomy

膵癌細胞として教室で樹立したヒト膵癌培養細胞株 6 株を用いた (Table 1)。PK-1, PK-45H, PK-45P の 3 株は非切除例由来で PK-45H, PK-45P は同一症例のそれぞれ肝転移巣、原発巣由来である。PK-9, PK-47, PK-59 は切除例由来であるが 3 例とも肝転移再発例である。脈管侵襲では PK-9 は v₁, ly₁, PK-47 は v₃, ly₁ と PK-47 は高度静脈侵襲例であった。培養は 10% FCS (GIBCO) 加 RPMI-1640 (NaHCO₃, HEPES, L-glutamine, Pc-G 100U/ml, SM 100μg/ml を含む) で行い、細胞使用時 Trypsin 処理した後、AIMV (GIBCO) にて目的の濃度の細胞浮遊液として用いた。

2. 基底膜蛋白と抗基底膜蛋白抗体

基底膜蛋白として, laminin (以下 LN: E-Y laboratories), fibronectin (以下 FN: Collaborative Research Inc.) type IV collagen (以下 CIV: Bethesda Research Laboratories Life Technologies, Inc.) を使用し, 各基底膜蛋白に対する抗体として, 抗 LN 抗体 (Collaborative Research Inc.), 抗 FN 抗体 (BRL), 抗 CIV (Advance Co.) を使用した.

3. Cell attachment assay

96F multi well plate (住友ペークライト) を Tris buffer (50mM Tris/0.15M NaCl, pH 7.4) で各濃度に溶解した各種基底膜蛋白(LN, FN, CIV, control は buffer)にて 4 °C, over night, coating した. 蛋白溶解を除去した後, ^{51}Cr でラベルし $2 \times 10^5/\text{ml}$ に調整した細胞浮遊液を $100 \mu\text{l}/\text{well}$ ずつ加えた. 各 incubation time の後, 非接着細胞を吸引除去し, 接着細胞を SDS 溶液にて溶解, 溶出 ^{51}Cr を γ -counter にて測定した. 接着率は接着細胞 count/撒布細胞 count (% attachment) で表した.

4. Attachment to hepatocyte

collagenase 灌流法²⁾により BALB/c nu/nu mouse 肝細胞初代培養 plate を作成し, 膀胱培養細胞の肝細胞に対する接着能を測定した. incubate time は 2 時間とし, control として肝細胞を培養しない well を用いた.

5. 蛍光抗体法

培養肝細胞表面の基底膜蛋白の局在を蛍光抗体法にて観察した. LAB-TEK tissue culture chamber/slides (Miles Scientific Inc.) 上で肝細胞を初代培養し, 洗浄後, 抗基底膜蛋白抗体, 次いで FITC で反応させ, 封入後蛍光顕微鏡で観察した.

6. Cell migration assay

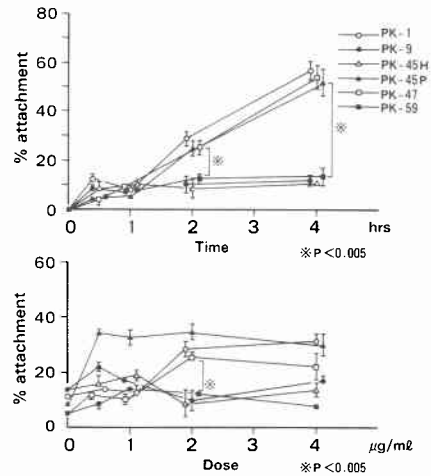
1) Chemotaxis assay

Boyden chamber (micro chemotaxis chamber with $8 \mu\text{m}$ pore size filter: Neuroprobe) を用いた assay 法³⁾にて行った. LN, FN を RPMI にて各濃度に溶解し, $25 \mu\text{l}$ ずつ lower chamber に加え, upper chamber には, AIMV で $2.5 \times 10^5/\text{ml}$ に調整した細胞浮遊液を $50 \mu\text{l}$ ずつ加えた. incubate 後, filter 上面の非遊走細胞を洗浄除去し, methanol で固定. 下面の遊走細胞を May-Giemsa 染色後検鏡し, 100倍の視野内に観察される遊走細胞を count した.

2) Haptotaxis assay

lower side を LN, FN $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ で 37°C cover night

Fig. 1 Attachment to laminin. a; Time response curve, b; Dose response curve



coating した filter を用いた (control は coating なし). filter を洗浄後風乾し, lower chamber には RPMI1640 を, upper chamber には細胞浮遊液を加え assay を行った.

3) Migration through hepatocyte

高圧ガス滅菌した後 LN あるいは FN $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ で coating した filter 上にマウス肝細胞を培養し, lower chamber には LN, FN (control は RPMI1640) を $20 \mu\text{g}/\text{ml}$, upper chamber には細胞浮遊液を加え, assay を行った.

結果は mean \pm SD で表し, 差の検定は, Student's-t 検定をもって行い, $p < 0.05$ を有意差ありと判定した.

結果

1. Cell attachment assay

LN に対する接着率をみると Fig. 1a では, 2 時間で PK-1, PK-45P, PK-47 の 3 株が, 他の 3 株に比べ有意に高い接着率を示した. Fig. 1b では $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ で, 上記 3 株の接着率は有意に高い結果であった. FN (Fig. 2) では, 4 時間で PK-1, PK-45P, PK-47 に加え, PK-59 が他の 2 株に比較し有意に高い接着率を示した. CIV では有意差はないが, やはり上記 3 株で高い接着率を示す傾向にあった. 各蛋白とも接着率の上昇は time dependent であり, dose response curve では $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以上で接着率はほぼ plateau となっている.

2. Attachment to hepatocyte

LN, FN に対し, ともに高い接着率を示す PK-1, PK-45P, PK-47 の 3 株が, 肝細胞に対しても他の 3 株

Fig. 2 Attachment to fibronectin. a; Time response curve, b; Dose response curve

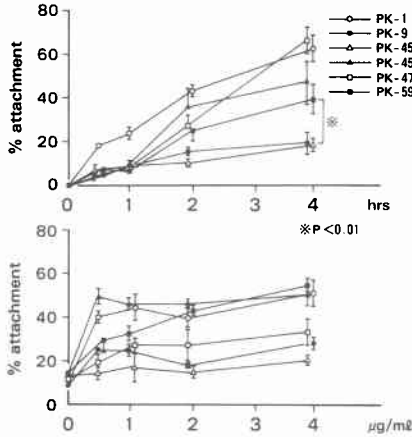
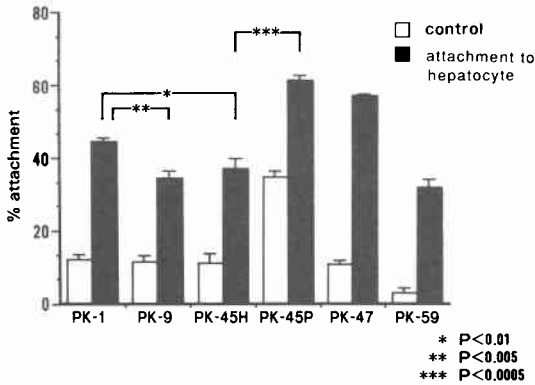


Fig. 3 Attachment to hepatocyte



に比較して有意に高い接着率を示していた。FN のみ高い接着率を示した PK-59では低い結果となっている (Fig. 3)。

3. 蛍光抗体法

FN は肝細胞膜に沿って蜂巢状に存在し(矢印), LN は一部にのみ細胞膜に沿って存在が認められた。CIV は認められなかった (Fig. 4)。

4. Cell migration assay

1) chemotaxis

LN による chemotaxis をみると, 20μg/ml で PK-1, PK-45P, PK-47, PK-59 の 4 株では control (conc.=0μg/ml) に比較し有意に chemotaxis が誘導された。またこれらは他の 2 株に比較しても有意に高い結果であった。FN による chemotaxis をみると, 30 μg/ml で PK-1, PK-45H, PK-47, PK-59 の 4 株では

Fig. 4 Immunofluorescence staining of basement membrane components on the cell surface of hepatocyte

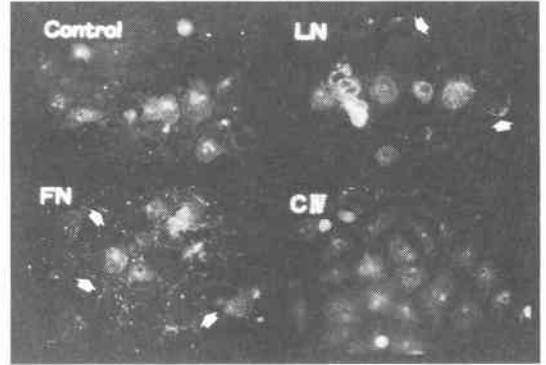
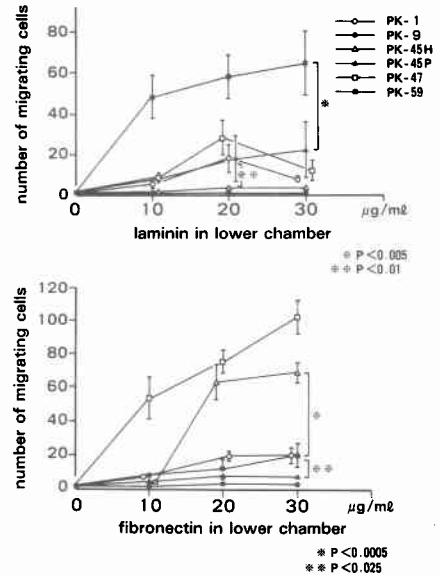


Fig. 5 Chemotaxis. a; Chemotaxis induced by laminin, b; Chemotaxis induced by fibronectin



control に比較し, 有意に高い chemotaxis が誘導された。これらは PK-9, PK-45P よりも有意に chemotaxis の誘導を示し, dose dependent に増強した (Fig. 5)。

2) haptotaxis

PK-45H, PK-45P, PK-47, PK-59 では LN, FN 両者により有意に haptotaxis が誘導されたが, PK-1 では FN のみ誘導された (Fig. 6)。

3) Migration through hepatocyte

control と比較して PK-45H は LN によって, PK-59 は FN によってのみ有意に遊走能が誘導された。

Fig. 6 Haptotaxis induced by laminin or fibronectin

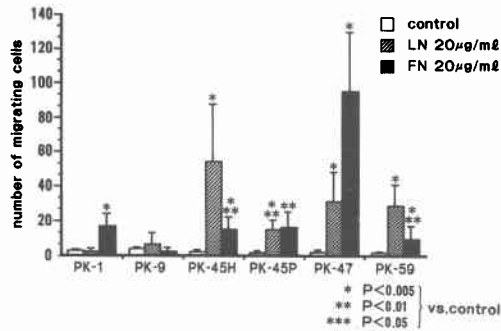
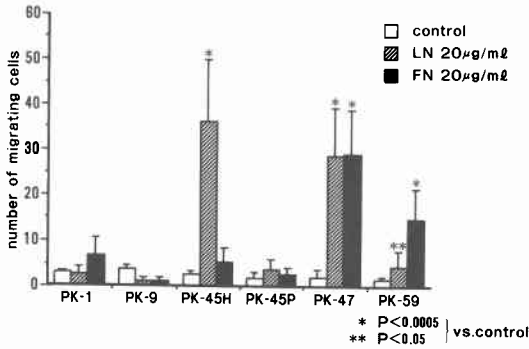


Fig. 7 Migration through hepatocyte induced by laminin or fibronectin



PK-47はLN, FN 両者によって誘導された。他の3株での誘導はみられなかった (Fig. 7)。

考 察

基底膜構成疑白の転移における役割についての研究が諸家によりなされ、種々の成果をあげている。Liottaら¹⁾の three step theory によれば、転移形成の初期には、①癌細胞の接着、②癌細胞による細胞外マトリックスの融解、③癌細胞の遊走の3段階があり、この各段階において基底膜蛋白と癌細胞の相互作用が働いているという。彼らは基底膜蛋白 plate を用いた実験からヒト乳癌細胞とLNとの接着性を示した¹⁾。また、Boyden chamber assay法を用いた検討からLNに誘導されるヒトメラノーマ細胞の遊走性について示し⁴⁾、癌の浸潤、転移におけるLNの役割について述べた。また彼らは、ヒト乳癌組織からLN receptorを描出し、LNにより誘導される癌細胞の接着、遊走能の強弱は癌細胞表面のLN receptorの数量的変化によるものであると述べた⁴⁾。また、Haberernら⁵⁾は、ヒト腺

癌細胞を用いた実験からLNに加えFN, CIVに対する接着性につき検討し、LNを介する腺癌細胞とCIVとの接着性の重要性を述べた。また、FNにおいてもRuoslahtiら⁶⁾によりreceptorの同定が進められている。

われわれは基底膜蛋白および肝細胞に対する腺癌細胞の接着率を測定したが、肝細胞表面のLN, FNを介して腺癌細胞と肝細胞の接着がなされていることを示唆する結果であった。細胞株の採取部位、組織学的分化度、予後の差による一定の傾向は得られなかったが、分化度による接着性の差をみたHaberernら⁵⁾の結果でも、組織学的分化度と基底膜蛋白との接着性に一定の傾向はなく、分化度と基底膜蛋白receptorの数量とは相関しないと説明されている。

次に遊走性についての検討であるが、高度脈管侵襲例のPK-47はLN, FN両者を介しての接着能および遊走能を持ち、LN, FN両者によって肝細胞培養filterを通して遊走能を誘導された。また、肝転移巣由来のPK-45HはLNによって、PK-59はFNによって肝細胞培養filterを通しての遊走を示した。肝転移巣形成初期においては、まず肝内微小循環において血管内皮細胞と癌細胞との接着、続いて基底膜を通しての遊走が起こり、次に類洞内あるいは肝細胞間を進展するのであるが、肝細胞培養filterを用いた実験はこの肝内進展を表すモデルであり、腺癌の肝転移巣形成初期においては、肝組織内の類洞や脈管基底膜に存在するLNあるいはFNにより誘導される強い接着、浸潤遊走能を持つ細胞が、肝内を進展して行くものと思われ、これらが中心となり肝転移巣が形成される可能性が示唆された。

文 献

- 1) Liotta LA: Tumor invasion and metastases — Role of extracellular matrix: Rhoads memorial awards lecture. *Cancer Res* 46: 1-7, 1986
- 2) 中村敏一: 幼若ラット肝細胞の分離。中村敏一著。初代培養肝細胞実験法。学会出版センター、東京、1987, p19-22
- 3) McCarthy JB, Palm SL, Furcht LT: Migration by haptotaxis of a schwann cell tumor line to the basement membrane glycoprotein laminin. *J Cell Biol* 97: 772-777, 1983
- 4) Wewer UM, Tarabozetti G, Sobel ME et al: Role of laminin receptor in tumor cell migration. *Cancer Res* 47: 5691-5698, 1987
- 5) Haberern CL, Kupchik HZ: Diversity of adhesion to basement membrane components of

human pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res*
45 : 5246—5251, 1985

invasion. *Cancer Metastasis Rev* 3 : 43—51,
1984

6) Ruoslahti E: Fibronectin in cell adhesion and

The Mechanism of Liver Metastasis in Pancreatic Cancer —The Role of Basement Membrane Components in Attachment and Migration of Human Pancreatic Cancer Cells—

Katsumi Amikura, Masao Kobari and Seiki Matsuno

The First Department of Surgery, Tohoku University, School of Medicine

The prognosis for pancreatic cancer is still poor because of high incidence of liver metastasis even after resection. We examined six human pancreatic cancer cell lines (PK-1, -9, -45H, -45P, -47, -59) for their ability to attach to a plate coated with basement membrane components and to primary cultured mouse hepatocytes. The ability of these cancer cells to migrate to the components through a micropore filter was also tested by a modified Boyden chamber assay. In the attachment assay, these cell lines (PK-1, -45P, -47) showed high levels of attachment to a plate coated with laminin or fibronectin. The same level of attachment to hepatocyte was also detected. However clinical characteristics of these cell lines did not correlate with tumor cell attachment. In the migration assay, four cell lines, PK-1, -45H, -59 (originating from liver metastases) and PK-47 (originating from a primary tumor with intense vascular invasion) showed increased migration to laminin or fibronectin. Among these cell lines, PK-45H, -47 and PK-59 showed definite migration through the filter on which hepatocytes were cultured. By immunofluorescence staining laminin and fibronectin were detected on surface of the hepatocytes. These results indicate that in pancreatic cancer laminin and fibronectin on the surface of hepatocytes can mediate tumor cell attachment and migration in the early phase of liver metastasis.

Reprint requests: Katsumi Amikura First Department of Surgery, Tohoku University School of Medicine
1-1 Seiryomachi, Aoba-ku, Sendai, 980 JAPAN
