

ヒト膵癌細胞の浸潤、転移能における遊走刺激因子の関与

大阪市立大学医学部第1外科

澤田 鉄二 鄭 容錫 曾我部豊志 山田 靖哉
有本 裕一 八代 正和 山下 好人 高塚 聡
奥野 匡宥 曾和 融生

癌の浸潤、転移は多方面よりの検討がなされており、特に近年細胞遊走刺激因子の関与が注目されている。今回2種のヒト膵癌細胞株 SW1990および PANC-1を用い遊走能と肝転移能との関連、さらに培養上澄中における遊走刺激因子産生の可能性について検討を行った。SW1990, PANC-1の Transwell chamber を用いた MTT 法による浸潤、遊走能はそれぞれ22.6, 7.3%および33.3, 13.6%であり、SW1990が強い浸潤、遊走能を示し、in vivo における肝転移能との相関が認められた。さらに SW1990無血清培養上澄添加にて PANC-1の遊走能は濃度依存性に増強し、SW1990より遊走刺激因子産生の可能性が示唆された。SW1990培養上澄添加にて PANC-1は仮足を伸長した線維芽細胞様形態変化を示し、また無処理群ではヌードマウス脾内注射にて肝転移は認めなかったが、処理群では類洞内への微小肝転移形成を認め、同因子が浸潤、転移に関与する重要な一因であることが示唆された。

Key words: cellular motility, motility factor, pancreatic cancer, invasion and metastasis

はじめに

癌の浸潤、転移は複雑な過程を経て形成されるが、これら各過程における接着分子を介した細胞接着、細胞外マトリックス分解酵素あるいは血管新生などの関与が報告され、その詳細が解明されつつある。さらに細胞遊走能の浸潤、転移過程における関与も判明しつつあり、近年細胞遊走能を変化させる種々のサイトカイン (motility factor) の存在が報告され^{1)~6)}、浸潤および転移に重要な役割を示す一因であると注目されている。消化器癌のなかでも膵癌は早期診断が困難であり、手術を含め有効な治療法がなく極めて予後不良である。膵癌については、その生物学的特性と浸潤、転移能との関連についての解析の報告は少なく、いまだ不明瞭な点が多い。今回ヒト膵癌細胞を用い、膵癌の細胞学的特性と浸潤、転移能との関連を明らかにする目的で、特に motility factor を介した遊走能の関与について検討を行った。

材料および方法

1. 細胞および培養法

実験に用いた細胞は、ヒト膵癌細胞株；SW1990 (高/中分化型腺癌)、PANC-1 (低分化型腺

癌)、CAPAN-2およびヒト大腸癌細胞株；HM-7(LS-174Tの高転移株)、SW480, LOVO(いずれも ATCC およびカリフォルニア大学サンフランシスコ校 Kim 教授より供与) で、10%牛胎児血清を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), 2mM L-グルタミン、ペニシリン、ストレプトマイシンにて5%CO₂, 37°C条件下で培養を行った。

2. Invasion および motility assay 法

Transwell double Chamber (8.0μm pore size, Costar Corp.) を用い、invasion assay については filter を DMEM にて1mg/ml に希釈した Matrigel (Collaborative Res. Inc.), 100μg/filter にて coating し、motility assay については接着の目的のみで20μg/filter にて coating を行った後、1.5×10⁵cells/filter/200μl の細胞を upper chamber に散布、37°C, 48時間培養を行った。フィルター下面に浸潤、遊走した細胞数の評価は Schlechte ら⁷⁾の方法に準じて MTT 法にて行い、全細胞数に対する割合、% of invasion (以下%IV) および motility (以下%MT) を算出し検討した。

3. in vivo 肝転移能の検討

SW1990および PANC-1細胞をトリプシン処理した後、DMEM にて7.5×10⁶cells/ml の細胞浮遊液を調整し、6週、雌 Balb/c ヌードマウスをエーテル麻酔下に左側腹部を切開し開腹、脾臓内に27G 針を用い7.5×

<1994年7月6日受理>別刷請求先：澤田 鉄二

〒545 大阪市阿倍野区旭町1-5-7 大阪市立大学医学部第1外科

10⁵cells/0.1ml の細胞を注射後、摘脾を行った。5週間後にヌードマウスを犠牲死させ、肝における転移結節数を測定、liver colonization assay⁸⁾にて検討した。また PANC-1細胞については SW1990細胞培養上清添加にて72時間処理を行った群 (n=4) と無処理群 (n=4) での比較検討を行った。

4. Conditioned medium 調整法

10%FCS-DMEM にてほぼ confluent まで培養した細胞を DEME にて洗浄後 DMEM 中にて24時間培養、培養上清を採取、conditioned medium (以下、C.M.) とした。細胞数を測定した後、Centricon-10 (Amicon) にて濃縮し50μl 中に 1×10⁶個あたりの C.M.となるよう調整し、-40°Cにて凍結保存した。

5. SW1990 C.M.による PANC-1細胞特性変化

Invasion および motility assay 系において培養液中に SW1990 C.M.を125μl/ml の濃度に添加した際の PANC-1の%IV,%MT の変化を無添加(control)群と比較検討した。Motility assay については、SW1990 C.M. の各濃度別添加による変化また C.M. を100°C、15分間加熱処理後添加での変化および Transwell への C.M. 添加部別 (upper, lower chamber あるいは両方) での PANC-1細胞の%MT の変化を検討した。

また SW1990 C.M. を1.2×48.0cm のカラムを用い Bio-Gel P200にてゲル濾過 (溶出液: PBS, 流速1ml/min) し、採取した各 fraction 添加による PANC-1細胞の%MT の変化を検討し、さらに PANC-1細胞の培養液中に SW1990C.M. を添加し48時間培養後の細胞形態上の変化を位相差顕微鏡にて観察した。

6. 統計学的処理

成績は Mean±SD で表し、統計学的処理については Student's t-test 検定を用い、p<0.05をもって有意差ありと判定した。

結 果

ヒト膵癌細胞株 SW1990および PANC-1の浸潤、遊走能を比較した結果、invasion assay では SW1990が 22.6%IV, PANC-1が7.3%IV であり、motility assay ではおのおの33.3%MT および13.6%MT と SW1990が強い浸潤能、特に強い遊走能を示した。肝転移能の検討では SW1990において 9/10 (90%) のヌードマウスに肝転移を認めたのに対し (colony 数7.5±4.1), PANC-1では全く肝転移は認められず (0/7), 浸潤、遊走能との相関が認められた (Table 1)。

SW1990より調整した C.M. を PANC-1細胞に添加した際の浸潤、遊走能におよぼす影響を検討した結果、

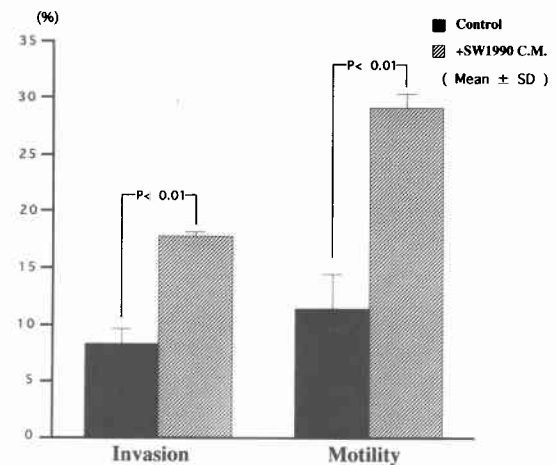
Table 1 Difference between SW 1990 and PANC-1 in invasive, metastatic ability

Cell line	% of invasion	% of motility	Liver metastasis in nude mouse
SW1990	22.6±1.7	33.3±3.2	9/10(90%)
PANC-1	7.3±1.3	13.6±1.0	0/7 (0%)

Data shows mean±SD

*p<0.01

Fig. 1 Stimulation of PANC-1 cell's invasion and motility by SW1990 C.M..



invasion では control の8.3%IV に対し添加群では 17.8%IV と約 2 倍の、また motility では control の 11.4%MT に対し29.1%MT と約 3 倍の増強を認め、いずれも SW1990 C.M. 添加群において無添加群に対し有意差 (p<0.01) が認められた (Fig. 1)。

つぎに SW1990 C.M. を種々の濃度に希釈 (種々の細胞数当たりの C.M.) し、PANC-1の添加、motility の変化を検討した結果、SW1990 C.M. による遊走能増強効果は極微量より認められ、また濃度依存性の増強効果を示した (Fig. 2)。SW1990 C.M. を100°C、15分間加熱処理した後 PANC-1に添加したところ遊走能増強効果は約40%に減弱し、また C.M. 添加による PANC-1の増殖への影響を検討した結果では増殖能には変化は全く認められなかった。さらに Motility assay において PANC-1への SW1990 C.M. の添加を Transwell double chamber の upper chamber のみ、lower chamber のみ、および両方に添加した場合を比較検討したところ、いずれにおいても control に対し強い遊走能増強が認められた (p<0.01) (Fig. 3)。

Fig. 2 Dose-dependent motility stimulation of PANC-1 cells by SW1990 C.M..

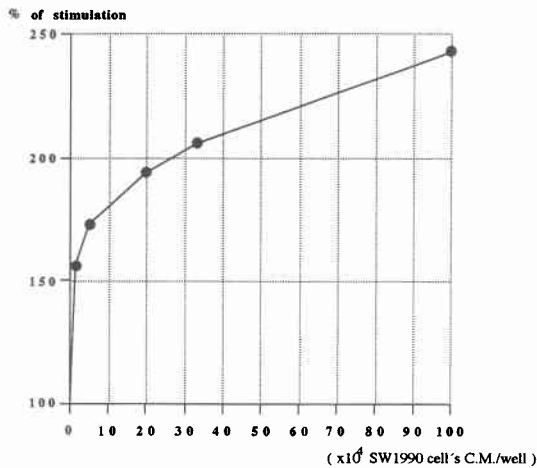
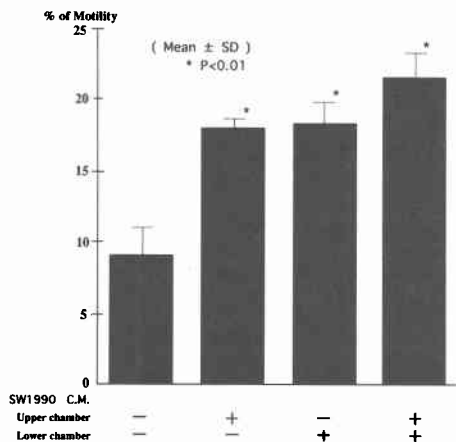


Fig. 3 Chemokinetic and chemotactic response to PANC-1 cells of SW1990 C.M..



種々の細胞での SW1990 C.M. 添加による遊走能増強効果を検討した結果では、SW1990細胞自体においても若干であるが autocrine に増強効果が認められ (SW1990については20hr 培養で検討)、他の膵癌細胞株 Capan-2に対しては効果は認められなかった。ヒト大腸癌細胞株では HM-7, SW480については効果は示さないものの、LOVO では PANC-1同様に遊走能増強効果が認められた (Fig. 4).

SW1990 C.M. を Bio Gel P-200にてゲル濾過し各 fraction における PANC-1の遊走能増強効果を検討した結果、増強効果は fraction No. 50を中心とした single peak を示し、分子量マーカーから分子量約

Fig. 4 Motility stimulation effect in various cancer cells (pancreatic and colon cancer) by SW1990 C.M..

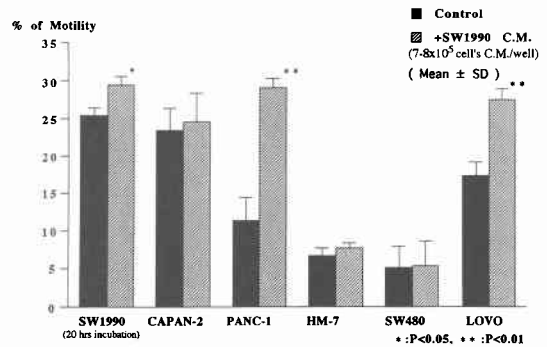
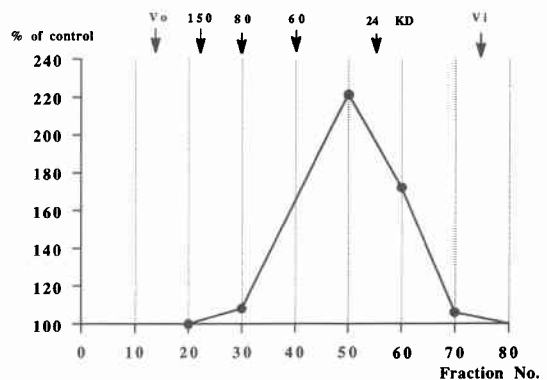


Fig. 5 Purification of motility factor in SW1990 C.M. by chromatography on Bio-Gel P-200.



24~60KD の範囲であることが判明した (Fig. 5).

SW1990 C.M. 添加による PANC-1の細胞形態におよぼす影響を位相差顕微鏡で検討したところ、添加後約48時間よりとどころ長い仮足を伸らし線維芽細胞様の形態変化を示し、また細胞の overlap も認められた (Fig. 6). なおこの変化は C.M. 除去により可逆性であった。

最後に SW1990 C.M. 添加による肝転移能への影響を検討した。PANC-1細胞を SW1990 C.M. 添加にて72時間培養した後ヌードマウス脾内注射し5週後に犠牲死させた結果、無添加群 (n=4) では肝転移は全く認められなかったのに対し、添加群 (n=4) では肉眼的肝転移結節はみられないが、4匹中3匹 (75%) のヌードマウス肝類洞内に micro metastasis を認めた (Fig. 7).

Fig. 6 Effect of SW1990 C.M. on the morphological appearance of PANC-1 cell.
left: control, right: +SW1990 C.M. ($\times 100$)

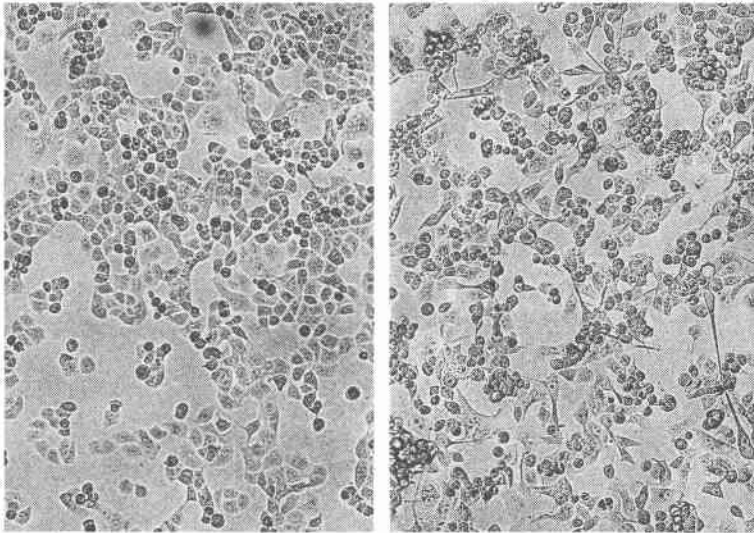
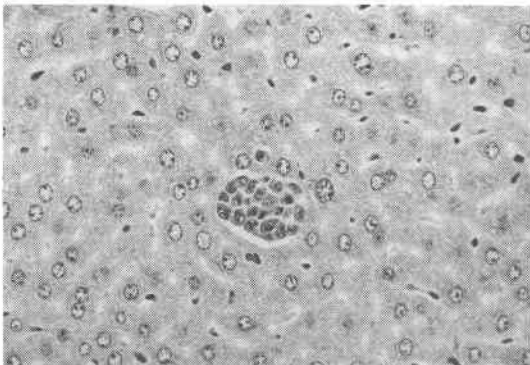


Fig. 7 Micro metastasis in the liver of nude mouse 5 weeks after splenic injection of PANC-1 cells treated by SW1990 C.M. ($\times 200$).



考 察

癌の転移に関する研究は近年さまざまな観点よりの検討が行われ、その詳細が解明されつつある^{9)~11)}。癌の血行性転移は、腫瘍細胞の原発巣よりの遊離から始まり、基底膜を破っての周囲組織への浸潤、血管内への侵入そして遠隔臓器での特異的な接着、生着および増殖により成立し、これらの各過程は転移形成に必要不可欠であると考えられる。この過程の中でも最も積極的な過程は浸潤であるが、これら全過程において細胞の移動すなわち運動性は必須の要素であり、近年特

に細胞遊走能と浸潤、転移との関連が注目されている。

今回ヒト膵癌細胞を用いた細胞学的特性と浸潤、転移能との関連、特に遊走能の関与についての検討から、*in vitro*における膵癌細胞株 SW1990の強い遊走性が、高浸潤性および *in vivo*における高肝転移能に相関することが判明し、遊走能が浸潤、転移において重要な役割を果たす一因であることが示唆された。

細胞の遊走は細胞骨格あるいは接着といった構造的要素によっても規定されるが、増殖因子あるいは最近注目されている遊走性を変化させるサイトカイン (motility factor) によっても総合的に制御されている。

今回高遊走能を示す膵癌細胞 SW1990の培養上清を比較的低遊走能を示す PANC-1細胞に添加したところ、その遊走性を増強することが判明し、SW1990細胞がなんらかの遊走性を変化させる因子を産生している可能性が示唆された。この因子は今回の検討から濃度依存性に極微量から遊走能増強効果を示し、またある特定の細胞に対してのみ効果を示すことからレセプターを介したサイトカインとしての作用を有する因子であると考えられた。さらに遊走能増強作用が加熱処理にて減弱することより、この因子はその構造にペプチドを有し、またゲル濾過の結果から約24~60kDの範囲の分子量であると推測された。

Motility factor の単離は Yoshida ら¹²⁾によって初

めて試みられて以来、現在までに3種類の factor の分離、精製が報告され、その存在が明らかとなっている。Autocrine motility factor (以下、AMF) は Liotta ら¹⁾によって高転移性メラノーマ細胞 A2058より単離された自己分泌性の因子で細胞表面上の gp78をレセプターとしその分子量は55kD (非還元)、60kD (還元)であり、これまでラット乳癌細胞、ヒト線維肉腫細胞 HT1080、マウスメラノーマ細胞 B16からも同様の分子の産生が報告されている²⁾³⁾。Migration stimulating factor (以下、MSF) は、Schor ら⁴⁾によって報告された線維芽細胞より産生される因子で autocrine に作用し分子量は非還元で70kDである。あと1つは Stoker ら⁵⁾によって単離された Scatter factor (以下、SF) で、SDS-PAGE で非還元下で62kD、還元下で57および30kDの2つのバンドを示す塩基性蛋白で肝細胞増殖因子 (HGF) と同一分子であることが報告されており、c-met 蛋白がそのレセプターであることが判明している^{6)13)~15)}。これらの motility factor は増殖にはほとんど影響を与えず主に遊走能を変化させる因子であるが、これまで判明している増殖因子 (EGF, TGF- β , FGF, IGF-I, PDGF) などにも遊走能増強効果が認められることが報告され¹⁶⁾¹⁷⁾、このほかサイトカイン (TNF- α) にも同様の作用が報告されている¹⁸⁾。

今回報告した SW1990細胞より産生されている遊走能増強因子は、増殖能には影響を示さず、また分子量の点からも既知の増殖因子とは異なり、いわゆる motility factor の1つであると推測される。またその作用がおもに paracrine に強く認められること、さらに chemotaxis にも作用するが chemokinetics が強い点から AMF とも異なった分子である可能性が考えられる。細胞形態の変化からは SF (HGF) との類似性が示唆されるが、濃縮培養上清中には HGF の産生は測定されず、また分子量の点から MSF とも異なった分子であり、全く新しい motility factor である可能性が示唆される。

上皮系腫瘍細胞とくに消化器癌細胞よりの motility factor の産生の報告はこれまでほとんどなく、今回のヒト膵癌細胞株より産生が認められたことは、消化器癌 (膵癌) の浸潤、転移における遊走能の関与の解明に非常に有用であると思われる。また今回の in vitro での遊走能増強効果を反映して、PANC-1細胞を SW1990 C.M. にて処理したところ in vivo での micro metastasis が認められたことから、motility factor を介した遊走能増強が肝転移にも大きく関与しているこ

とが示唆された。現在同因子を分離精製中であり、今後他の motility factor との関連の詳細な検討、同因子を免疫原とした抗体の作製さらに遊走能阻害による浸潤、転移の抑制の可能性について検討を進めて行きたい。

なお、本論文の要旨は第43回日本消化器外科学会総会において発表した。

文 献

- 1) Liotta LA, Mandler R, Murano G et al: Tumor cell autocrine motility factor. Proc Natl Acad Sci USA 83: 3302-3306, 1986
- 2) Silletti S, Watanabe H, Hogan V et al: Purification of B16-F1 melanoma autocrine motility factor and its receptor. Cancer Res 51: 3507-3511, 1991
- 3) Watanabe H, Carmi P, Hogan V et al: Purification of human tumor cell autocrine motility factor and molecular cloning of its receptor. J Biol Chem 266: 13442-13448, 1991
- 4) Schor SL, Schor AM, Grey AM et al: Foetal and cancer patient fibroblasts produce an autocrine migration-stimulating factor not made by normal adult cells. J Cell Sci 90: 391-399, 1988
- 5) Stoker M, Perryman M: An epithelial scatter factor released by embryofibroblasts. J Cell Sci 77: 209-223, 1985
- 6) Stoker M, Gherardi E, Perryman M et al: Scatter factor is a fibroblast-derived modulator of epithelial cell mobility. Nature 327: 239-242, 1987
- 7) Schlechte W, Brattain M, Boyd D: Invasion of extracellular matrix by cultured colon cancer cells: Dependence on urokinase receptor display. Cancer Commun 2: 173-179, 1990
- 8) Kozlowski JM, Fidler IJ, Campbell D et al: Metastatic behavior of human tumor cell lines grown in the nude mouse. Cancer Res 44: 3522-3529, 1984
- 9) Nicolson GL, Irimura T, Gonzalez R et al: The role of fibronectin in adhesion of metastatic melanoma cells to endothelial cells and their basal lamina. Exp Cell Res 135: 461-465, 1981
- 10) Sawada T, Ho JJJ, Sogabe T et al: Biphasic effect of cell surface sialic acids on pancreatic cancer cell adhesiveness. Biochem Biophys Res Commun 195: 1096-1103, 1993
- 11) Volk T, Geiger B, Raz A: Motility and adhesive properties of high- and lowmetastatic murine neoplastic cells. Cancer Res 44:

- 811—824, 1984
- 12) Yoshida K, Ozaki T, Ushijima K et al: Studies on the mechanisms of invasion in cancer. I. Isolation and purification of a factor chemotactic for cancer cells. *Int J Cancer* **6**: 123—132, 1970
- 13) Nakamura T, Nishizawa M, Hagiya M et al: Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor. *Nature* **332**: 376—378, 1989
- 14) Weidner KM, Behrens J, Vandekerckhove J et al: Scatter factor: Molecular characteristics and effect on the invasiveness of epithelial cells. *J Cell Biol* **111**: 2097—2108, 1990
- 15) Gherardi E, Gray J, Stoker M et al: Purification of scatter factor, a fibroblast-derived basic protein that modulates epithelial interactions and movement. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 5844—5848, 1989
- 16) Rosen EM, Goldberg ID: Invited review: Protein factors which regulate cell motility. *In Vitro Cell Dev Biol* **25**: 1079—1087, 1989
- 17) Mooradian DL, McCarthy JB, Komanduri KV et al: Effects of transforming growth factor- β 1 on human pulmonary adenocarcinoma cell adhesion, motility, and invasion in vitro. *J Natl Cancer Inst* **84**: 523—527, 1992
- 18) Rosen EM, Goldberg ID, Liu D et al: Tumor necrosis factor stimulates epithelial tumor cell motility. *Cancer Res* **51**: 5315—5321, 1991

Role of Motility Factor Released by SW1990 Pancreatic Cancer Cell in Invasion and Metastasis

Tetsuji Sawada, Yong-Suk Chung, Toyoshi Sogabe, Nobuya Yamada, Yuichi Arimoto,
Masakazu Yashiro, Yoshito Yamashita, Satoshi Takatsuka,
Masahiro Okuno and Michio Sowa

The First Department of Surgery, Osaka City University, Medical School

In this study, two pancreatic cancer cell lines, SW1990 and PANC-1, were examined for the relationship between cellular motility and metastatic potential in the intrasplenic injection model, and the role of the motility factor released by SW1990 cells in invasion and metastasis was investigated. When the in vitro invasion and motility of SW1990 and PANC-1 cells were measured by the MTT method using a Trans well chamber, the percentages of cell invasion were 22.6% and 7.3% respectively, and those of motility were 33.3% and 13.6%. The high motility of SW1990 was correlated with its in vivo metastatic potential. As the motility of PANC-1 cells could be increased 2—3 times by treatment with SW1990 serum free spent medium in a dose dependent fashion, SW1990 cells may have the ability to produce motility factor. Incubation of PANC-1 cells with SW1990 medium resulted in the formation of thin processes and a fibroblast-like morphology, and also induced micro-metastasis in liver by splenic injection. These findings suggested that this motility factor may play an important role in pancreatic cancer invasion and metastasis.

Reprint requests: Tetsuji Sawada The First Department of Surgery, Osaka, City University, Medical School
1-5-7 Asahimachi, Abeno-ku, Osaka, 545 JAPAN