日消外会誌　29（4）：884～887，1996年

特集6

細胞接着ドメインによる肝転移抑制に関する研究

東京女子医科大学第2外科
斎藤　登　三橋　牧　林　達弘
永田　仁　亀岡　信悟　浜野　恭一
東京農工大学農学部生物化学研究室
春宮　覚　藤本　大三郎

癌の浸潤・転移の過程での細胞接着分子の役割に着目し，マウス肝転移モデルにおいて細胞接着ドメイン投与を行い，癌細胞との接着相互作用を制御することにより，癌転移の抑制を検討した．colon 26/TC-1の1×10³個をCDF1マウスの前腸間膜静脈より注入し肝転移モデルを作製した．細胞接着ドメインはヒト血漿よりフィブロネクチンを抽出単離し，RGDを含むドメインのみを部分精製した．フィブロネクチン投与群，フィブロネクチン接着ドメイン投与群，コントロール群を設定し，4週後に犠牲死させ肝転移結節数を検討した．コントロール群に比べフィブロネクチン投与群は促進され，フィブロネクチン接着ドメイン投与群は10μg/mlで約50%の抑制効果が認められた．転移抑制物質として接着ドメインは癌転移過程で癌細胞表面のレセプター上で本来の接着分子との競合による接着阻害により，有効な抗接着療法の1つとなる可能性が示唆された．

Key words: cell-binding domain, prevention of liver metastasis, fibronectin

はじめに

癌の浸潤や転移の抑制をはかることは永遠の課題であり，手術的治療法がほぼ確立した今日では分子生物学的手法の発達により癌の進展機序の検索が多くなされている．われわれはこれまでラミニンなどの接着分子を肝転移予知因子の面から研究し報告してきた[1]が，最近浸潤や転移の過程での細胞接着分子の役割に着目し検討を開始した．これはマウス肝転移モデルにおいて転移抑制物質として細胞接着ドメイン投与行い，癌細胞と細胞外マトリックスおよび癌細胞間の接着相互作用を阻害することにより癌転移の抑制効果をみるものである．将来臨床的には抗接着療法に向けての基礎を確立することにつながると考えられ，その現況を報告する．

対象および方法

1．肝転移モデル

1）実験動物

5週齢の雄CDF-1マウスを購入（(株)日本クレアより）し，本学実験動物中央施設にて各実験群20匹ずつSPF条件下に飼育した．

2）転移作成法

癌細胞はマウス由来大腸癌株colon 26/TC-1（協和発酵工業（株）より供与）を用いた．マウス腹腔内にpentobarbital sodium（50μg/g per body）を投与し麻酔した．正中切開にて関腹し，30G針にて前腸間膜静脈より1×10³個/50μl注入し，止血確認後一層縫合にて閉腹した．

2．細胞接着ドメインの精製

1）フィブロネクチンの性状

フィブロネクチンはヒトから海綿動物まで広く動物に存在が確認され，ヒトではおもに血液中に存在し，細胞外マトリックスにも認められる糖蛋白質である[2]．ヒト血漿では100ml中に約30mgの濃度で存在し，230kDaのA鎖と220kDaのB鎖がカルボキシル末端でジスルフィド結合している構造をなす．そのうち75kDaのドメイン4が細胞接着活性を担うとされているRGD(アルギニン，グリシンおよびアスパラギン酸）配列を含んである[3][4]（**Fig. 1**）．

2）フィブロネクチン細胞接着ドメインの精製

＊第46回日消外会総会シンポ1・消化器癌転移の機序と対策

＜1995年11月15日受理＞別刷請求先：斎藤　登
〒162　新宿区河田町8－1　東京女子医科大学第2外科

Fig. 1 Functional domain structure of fibronectin[3]
RGD is an amino acid arrangement that is related to the cell-binding activity of domain 4.

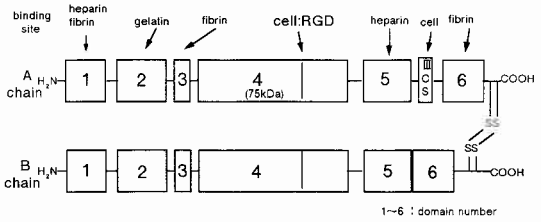
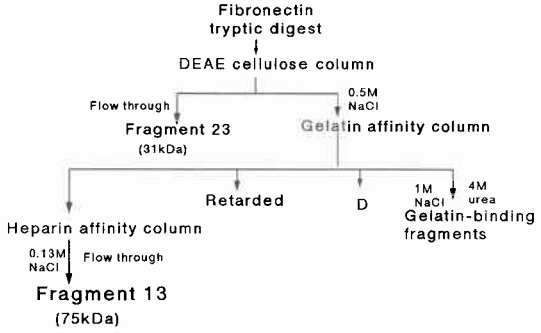


Fig. 2 Purification strategy for tryptic fragments of fibronectin[5]



ヒト血漿よりフィブロネクチンを単離し，これをセルロースカラムなどを通すゼラチン・アフィニティ・クロマトグラフィ法にて酵素処理を行い，この部分精製法にて75kDa の Fragment 13という接着ドメインが得られた[5](**Fig. 2**)．この後に純度は SDS ポリアクリルアミド電気泳動にて検定した．

3．転移抑制実験

1）投与法

マウス肝転移モデルで大腸癌株 colon 26/TC-1注入と同時に転移抑制物質としてフィブロネクチンの細胞接着ドメインを1，10，100μg/ml の3濃度にわけ腹腔内投与した．

2）投与群の設定

①コントロール群，②フィブロネクチン投与群，および③フィブロネクチン接着ドメイン投与群の3群を設定し，各群20匹で実験を行った．

3）転移抑制効果の検討

癌細胞注入移植および接着ドメイン投与後4週目に犠牲死させ，肝表面転移結節数を検討した．これにより抑制物質投与群とコントロール群での転移結節数を比較検討し，転移抑制率の評価を行った．

Table 1 The effect of fibronectin fragments on liver metastasis formation
mouse model : after 4 weeks (each group : n=20)

fragments	concentration (μg/ml)	liver metastases nodule	percent change
colon 26/TC-1 alone (cotrol)		4 ±1	
fibronectin	1	5 ± 0.3	30% increase
	10	7 ± 1	100% increase
	100	13 ± 2	200% increase
fibronectin domain	1	4 ± 0.6	no change
	10	2 ± 0.3	50% decrease
	100	3 ± 0.2	20% decrease

結　果

1．コントロール群

colon 26/TC-1注入のみの群で肝転移結節数は平均4 ± 1個であった．

2．フィブロネクチン投与群

投与濃度1μg/ml で 5 ±0.3個，10μg/ml で 7 ± 1個，100μg/ml で13± 2 個という結果であり，それぞれ濃度依存的に30%，100%，200%の転移促進効果を示した．

3．フィブロネクチン接着ドメイン投与群

1μg/ml では 4 ±0.6個とコントロール群とほぼ同様な結果であったが，10μg/ml では 2 ±0.3個と50%の転移抑制効果を認めた．100μg/ml では 3 ±0.2個と20%の抑制効果であり，濃度依存的な傾向は示さなかった（**Table 1**）．

4．肝転移結節の実例

Fig. 3 左はコントロール群の標本である．**Fig. 3** 中はフィブロネクチン投与群で，コントロール群に比べ転移結節数は増加している像である．一方，**Fig. 3** 右はフィブロネクチン接着ドメイン投与群で，コントロール群に比べ転移結節数は減少している像である．

考　察

癌の浸潤や転移の過程はおおよそ，(1) 原発巣からの遊離と組織内浸潤，(2) 脈管内侵入，(3) 脈管内移動，(4) 転移先での着床，(5) 脈管外脱出，(6) 転移先での増殖などに分けられ，接着分子[6]の関与はどの段階でも重要であると考えられる[7][8]．われわれは癌細胞が基底膜や内皮細胞に接着し，これを破壊していく段階での抑制を試みた．基底膜はタイプIVコラーゲンが骨格をなし，ラミニン，フィブロネクチンやビトロネクチンなどが合わさった構造をなす（**Fig. 4**）．例えばラミニンやフィブロネクチンがそのレセプターであ

Fig. 3　left : Liver metastasis for the control group, middle : Liver metantasis for the fibronectin group, right : Liver metastasis for the fibronectin domain group

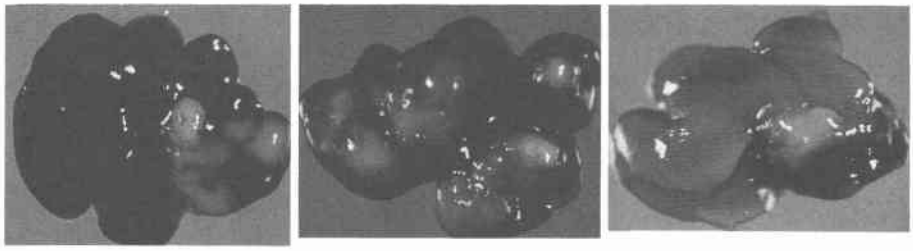


Fig. 4　Tumor cell and extracellular matrix (ECM)

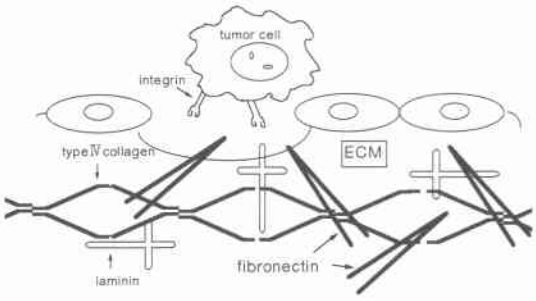


Table 2　The effect of laminin fragments on pulmonary metastasis formation[12]
mouse model : after 3 weeks BL6 melanoma cell : 0.5×10^5 (each group : n=10)

fragments	concentration (μg/ml)	percent change
laminin	1	100% increase
	10	300% increase
	100	400% increase
laminin α fragment	10	280% increase
	100	400% increase
laminin C, fragment	1	no change
	10	50% decrease
	100	90% decrease

るインテグリンに接着すると，タイプⅣコラーゲンの分解酵素であるコラゲナーゼなどが分泌される．これにより基底膜は破壊され癌細胞の浸潤が始まるのである[9)~11)]．よってこのレセプターに接着する段階で接着ドメインを投与し，レセプター上で本来の接着分子と競合させ阻害させようという理論である．

本研究では接着分子そのものであるフィブロネクチンを投与するとコントロール群に比べ促進傾向を示した．これは接着分子本体が癌細胞と結合して膜を通りやすくなるためではないかと考えられた．一方，これに対しフィブロネクチンの接着ドメイン投与では約50%の抑制効果を示した．この機序としては細胞膜上のレセプターに競争的に結合するためで，レセプターは一杯になるが活性が不十分で膜を通るなどの動きができないためではないかと考えられた．抑制率でみるとドメイン投与濃度100μg/ml の群が10μg/ml の群より抑制効果がやや劣るが，肝転移結節数では大きな差異はない．さらに投与実験例数を増やし，またこの両者の間の濃度群も設定し検討しているが，有意な差は認められていない．ただし，このような実験系ではフィブロネクチンは存在状態によって性質や活性が大きく変わってしまうことがあり，今後も注意深く検討を行っていくことが肝要である．

接着ドメインによる転移抑制研究は Liotta ら[12)]によりラミニンを用いて報告されている．**Table 2** に示すごとくラミニン本体の構造は十字型をしており，その端にヘパリンやコラーゲンとの結合ドメインがある．ラミニン本体や結合ドメインを持った T 字型断片は転移促進作用を示した．一方，分解産物である T 字型断片のみは著明な転移阻害効果を示した．われわれの結果もフィブロネクチンにおいてほぼ同様な傾向を認めたことより転移抑制法としての意義は再確認されたと考えられた．

将来の臨床応用の際には低分子化をはかることで抗原性が少なく低毒性で生理活性を有すると考えられる転移抑制物質と期待される．しかし，いつどの段階で投与するのか，どういう転移に対して抑制をはかるのかなど諸論あり考え方の分かれることが多い．他の転移抑制療法の進展や推移とともに一定の方向に熟成させていく必要がある．今後ヒト大腸癌の浸潤や転移を反映すると考えられるマウス自然肝転移モデルにおいて，ラミニンやビトロネクチンなど他の細胞接着ドメインと併用することにより有効な抗接着療法の１つと

なる可能性が示唆された．

文　献

1) 斎藤　登：大腸癌肝転移予知因子としてのラミニンの血清学的および組織学的研究．日本大腸肛門病会誌 **44**：898—905，1990
2) 林　正男：フィブロネクチン，ラミニン，ビトロネクチン．藤本大三郎 編：細胞外マトリックスのバイオサイエンスとバイオテクノロジー．アイピーシー，東京，1990, p111—118
3) Yamada KM: Fibronectin. Edited by Mosher DF. Academic Press, New York, 1988, p47—121
4) Sekiguchi K, Anthony MK, Hirohashi S et al: Human tissue fibronectin: Expression of different isotypes in the adult and fetal tissues. Biochem Biophys Res Commun **141**：1012—1017，1986
5) Hayashi M, Yamada KM: Domain structure of the carboxyl-terminal half of human plasma fibronectin. J Biol Chem **258**：3332—3340，1983
6) 宮坂昌之 監修：接着分子ハンドブック．秀潤社，東京，1994
7) 済木育夫：癌細胞の転移と接着分子．宮坂昌之 編：接着分子．メジカルビュー社，東京，1991, p78—91
8) 伊勢村護：フィブロネクチンと転移．鶴尾　隆 編．肝転移の分子機構．メジカルビュー社，東京，1993, p66—75
9) Liotta LA, Rao NC, Barsky SH et al: The laminin receptor and basement mennbrane dissolution: Role in tumour metastasis. Ciba Found Sympo **108**：146—162，1984
10) Forster SJ, Talbot IC: Laminin and fibronectin in rectal adenocartinoma: Relationship to tumor grade, stage and metastasis. Br J Cancer **50**：51—61，1984
11) Stallmach A, Lampe BV, Matthes H et al: Diminished expression of integrin adhesion molecules on human colonic epitherial cells during the benign to malign tumour transformation. Gut **33**：342—346，1992
12) Barsky SH, Rao NC, Williams JE et al: Laminin molecular domains which alter metastasis in a murine model. J Clin Invest **74**：849—858，1984

Prevention of Liver Metastasis by Cell-binding Domain

Noboru Saito, Maki Mitsuhashi, Tatsuhiro Hayashi, Hitoshi Nagata,
Shingo Kameoka and Kyoichi Hamano
Department of Surgery II Tokyo Women's Medical College
Satoru Harumiya and Daisaburo Fujimoto
Department of Applied Biological Science, Faculty of Agriculture,
Tokyo University of Agriculture and Technology

In order to determine the role of cell adhesion molecules in the process of cancer invasion and metastasis, we administered the cell-binding domain to a mouse liver metastasis model, and assessed the prevention of cancer metastasis resulting from inhibition of adhesive interaction with cancer cells. A liver metastasis model was created by injecting 1×10^3 colon 26/TC-1 cells into the anterior mesenteric vein of CDF1 mice. The cell-binding domain was obtained by extracting and purifying fibronectin from human plasma, and partially purifying only the domain which includes RGD. A fibronectin-treated group, a fibronectin binding domain-treated group, and a control group were established. The animals were sacrificed four weeks later, and the metastatic liver nodules were counted. The results showed that metastasis was more advanced in the fibronectin group than in the control group, and about 50% inhibition was observed in the fibronectin binding domain-treated group (10 μ of fibronection per ml). These findings suggest that, as a metastasis-inhibiting substance, the binding domain may become an effective means of anti-adhesion therapy by competing with native adhesion molecules on the cancer cell surface during the metastatic process, and blocking adhesion.

Reprint requests: Noboru Saito Department of Surgery II, Tokyo Women's Medical College
8-1 Kawada-chou, Shinjyuku-ku, Tokyo, 162 JAPAN