

消化器癌の浸潤転移における間葉系細胞の重要性

—細胞外マトリックス破壊からみて

慶應義塾大学外科, 同 病理*, 国立栃木病院外科**

大谷 吉秀 桜井 嘉彦** 五十嵐直喜
横山 剛義 木全 大 亀山 香織*
久保田哲朗 熊井浩一郎 北島 政樹

消化器癌の進展過程でのマトリックス分解酵素 (matrix metalloproteinase: MMP) による細胞外マトリックス (extracellular matrix: ECM) 破壊における間葉系細胞の役割について検討した。I型, III型コラーゲンを分解する MMP-1は癌先進部組織で高い酵素活性を示した。MMP-1産生細胞の同定を目的に *in situ* hybridization を行った結果, 癌巣周囲の線維芽細胞や顆粒球に MMP-1 mRNA の発現を認めた。ヒト胃粘膜由来線維芽細胞の培養液にヒト胃癌細胞株 MKN-74の培養上清を添加すると, 単独培養に比べ高い MMP-1産生を認めた ($p < 0.05$)。また, ヒト胃癌細胞株 TMK-1の腹腔内投与によるヌードマウス腹腔播種モデルでは, 癌細胞を線維芽細胞の培養上清とともに投与することで結節数の有意な増加を認めた ($p < 0.01$)。以上より, 消化器癌による ECM 破壊に間葉系細胞が重要な役割を演じていることが確認された。

Key words: stromal cells, invasion and metastasis of gastrointestinal carcinoma, matrix metalloproteinase

はじめに

消化器癌の浸潤転移の際に癌細胞の周囲を取り巻く細胞外マトリックス (extracellular matrix: ECM) の破壊をとまう¹⁾。代表的な ECM はコラーゲン, プロテオグリカン, ラミニンなどであるが, なかでもコラーゲンは蛋白分解酵素による非特異的な分解を受けにくく, その分解には特異的分解酵素 (matrix metalloproteinase: MMP) が必要とされる²⁾³⁾。消化器癌のなかでも胃癌, 大腸癌における MMP の発現を詳細に検討し, 癌の浸潤転移における間葉系細胞のかかわりを明らかにする。

方法

1) 胃癌組織における MMP-1酵素活性の測定

消化器癌の進展過程での MMP の関与を確認する目的で, 胃癌組織中の MMP-1活性を測定した。手術が

行われた23例の癌先進部組織を用いた。胃切除後ただちに組織を数 mm 角に切除し, 細切後 -70°C で保存した。酵素活性の測定は組織ホモジェネートを用いてすでに報告した方法⁴⁾に従って行った。反応の基質となる I 型コラーゲンは家兎皮膚から抽出し³H で標識した。

2) MMP-1 cDNA プローブを用いた *in situ* ハイブリダイゼーション

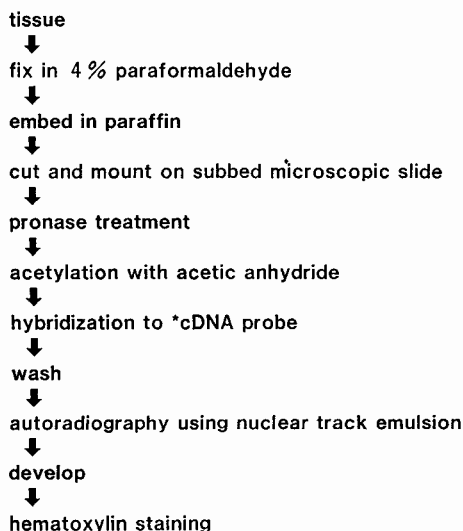
MMP を産生している細胞を同定する目的で *in situ* ハイブリダイゼーションを行った。

手術で得られた胃癌組織20例, 大腸癌組織5例を用いて, Hayashi ら⁵⁾の方法に従い Fig. 1 の手順で実施した。プローブはヒト線維芽細胞の cDNA ライブラリーから樹立した1.7kb の MMP-1 cDNA⁶⁾を oligo-labelling 法により³⁵S でラベルして用いた。ハイブリダイゼーションの条件は 45°C , 16時間とし, 洗浄の後オートラジオグラフィーを行った⁷⁾。現像後, 細胞の形態を認識する目的でヘマトキシリン染色を施行した。

3) 癌細胞の培養上清による線維芽細胞の MMP 産生の変化

* 第50回日本消外会総会シンポ2・癌細胞と間質との相互関係からみた転移, 浸潤の諸問題
<1997年12月3日受理>別刷請求先: 大谷 吉秀
〒160-8582 東京都新宿区信濃町35 慶應義塾大学医学部外科

Fig. 1 Flow chart of *in situ* hybridization



In situ ハイブリダイゼーションの結果をふまえ、癌細胞の間葉系細胞への影響を観察する目的で *in vitro* での実験を行った。胃癌細胞はヒト胃癌株 MKN-74 (高分化型腺癌) を用いた。線維芽細胞は手術で得られた胃の正常粘膜から Dayer ら⁹⁾の方法で樹立した。継代5代目までの細胞を使用した。それぞれ80% confluent になった時点で無血清培地に変更し、さらに72時間培養した。その上清中の MMP-1濃度を ELISA キット (Amersham 社製) で測定した。混合培養においては、MKN-74を無血清培地で培養した上清0.5ml を線維芽細胞の培養液 (2ml) 中に添加し、72時間後に MMP 濃度を測定した。

4) ノードマウス腹膜播種モデルを用いた転移実験

BALB/c nu/nu 雄にヒト胃癌株 TMK-1 (低分化型腺癌) 5×10^5 /PBS 1ml を腹腔内投与し、5週後にマウスを犠死させ、腹膜播種結節数を測定した。ヒト胃癌細胞の腹膜播種転移形成に対する間葉系細胞の影響を知る目的で、ヒト胃粘膜由来の線維芽細胞を無血清培地で72時間培養した上清0.5ml と TMK-1細胞 5×10^5 /PBS 0.5ml を混合し、ノードマウス腹腔内に接種、5週後に結節数を測定した。

5) 統計学的検討

2群間の平均値の差は Student's t 検定により検定した。 $p < 0.05$ をもって統計学的に有意と判定した。

結 果

1) MMP-1酵素活性の測定

胃癌先進部組織での MMP-1の酵素活性は $12.3 \pm$

$1.2 \mu\text{g/collagen degraded/hr/mg protein}$ ($n=23$), 癌病巣から離れた非癌部胃粘膜では $10.4 \pm 0.9 \mu\text{g/collagen degraded/hr/mg protein}$ ($n=23$) であった。癌先進部組織で有意に高い MMP-1酵素活性が認められた ($p < 0.05$)。

2) MMP-1 cDNA プロブを用いた *in situ* hybridization

MMP-1 mRNA は胃癌20例、大腸癌5例のいずれにおいても認められた。MMP-1 mRNA の発現は癌細胞そのものより癌巣周囲の線維芽細胞や顆粒球に認められた (Fig. 2)。また、組織学的分化度が異なる部分が同一組織内に混在する場合は、より分化度の高い部分に強い発現が認められる傾向にあった。

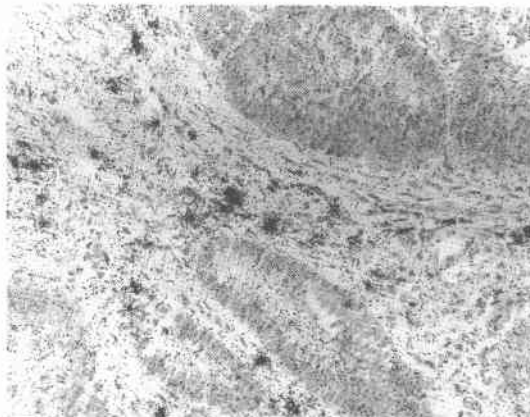
3) 癌細胞と線維芽細胞の混合培養

ELISA による MMP-1蛋白濃度測定の結果、MKN-74単独培養ではほとんど産生されなかった。線維芽細胞の単独培養では 0.04 ± 0.01 (OD at 450nm/ 10^4 cells) であった。一方、MKN-74の培養上清を線維芽細胞の培養液に加えられた群では 0.25 ± 0.01 (OD at 450nm/ 10^4 cells) と高値を示し、線維芽細胞単独群に比べ MMP-1の産生が増加した ($p < 0.05$)。

4) ノードマウス腹膜播種転移モデル

腹膜播種結節数は TMK-1単独接種では 54.6 ± 8.8 個 ($n=5$) であったが、TMK-1に線維芽細胞の培養液を添加後接種した群では 102.6 ± 11.2 個 ($N=5$) と有意に結節数の増加を認めた ($p < 0.01$) (Fig. 3, Table

Fig. 2 *In situ* hybridization of rectal carcinoma MMP-1 mRNA is expressed in the stromal cells, including fibroblasts, macrophages, and various inflammatory cells. However, signal were not found within cancer cells. (240 \times , original magnification).



1).

考 察

1) 消化器癌の進展における間葉系細胞の重要性

今回の検討から、消化器癌の浸潤に伴う ECM 破壊には、癌巣周囲の間葉系細胞が重要な役割を演じている可能性が示された。代表的な蛋白分解酵素である MMP-1 については癌細胞では産生されておらず、線維芽細胞や炎症性細胞がその役割を担っているものと思われる。癌巣内の MMP が線維芽細胞や顆粒球から産生される状況は、これまでも大腸癌⁹⁾、卵巣癌¹⁰⁾、乳癌¹¹⁾などで報告されている。また、ヌードマウス腹膜播種モデルでは、線維芽細胞の培養液中に含まれる物質が癌細胞に何らかの変化をもたらす転移結節数が増加したと推定されるが、これは MMP の産生増加のみならず、癌細胞表面の接着分子の変化や癌細胞の増殖能に変化が生じた可能性も示唆される¹²⁾。癌細胞を取り巻く間葉系細胞や ECM が癌細胞の生物学的悪性度に影響する可能性についてはこれまでも報告されている^{13)~15)}。Yashiro ら¹⁶⁾はスキルス胃癌由来の癌細胞株を線維芽細胞とともにヌードマウスに移植すると、癌細胞単独の移植に比べ増殖が盛んになるとの報告している。

癌巣内および癌巣周囲の間葉系細胞での MMP 産生刺激には多くの増殖因子やサイトカインが関与して

いると思われる¹⁷⁾。Interleukin-1 と tumor necrosis factor α は MMP-1 を upregulate することが知られている¹⁸⁾。また、McDonnell ら¹⁹⁾は epidermal growth factor が *c-fos* や *c-jun* の誘導を介して MMP-3 の遺伝子発現を switch on することを明らかにしている。一方、transforming growth factor β ²⁰⁾、interferon γ ²¹⁾ は MMP-1 の遺伝子発現を抑制する。

2) 消化管を形成する ECM と MMP

消化管壁を形成する細胞外マトリックスの主要成分はコラーゲン線維であり、これまで16種類のコラーゲン分子と30種類を越える構成ペプチドの遺伝子が同定されている²²⁾。3本のコラーゲン分子が約3.3残基で1回転しながらコラーゲン特有のトリプルヘリックスを形成している。コラーゲン分子の表面には疎水性アミノ酸が露出しており、この影響でコラーゲンは水に溶けにくく、蛋白分解酵素による非特異的な分解を受けにくいとされている。一方、コラーゲンを分解する蛋白分解酵素である MMP はこれまで15種類が同定されている (Table 2)。消化管を構成するコラーゲンの多くは I 型および III 型コラーゲンであり²³⁾、これらを特異的に分解できる MMP-1 は消化器癌の局所進展に重要と考えられる。今回の検討でも、正常胃粘膜の MMP-1 活性に比べ胃癌先進部組織中の活性が高値を示した。癌の局所進展に伴う ECM の分解という観点から、矛盾しない結果と思われた。

3) 消化器癌転移予防策としての MMP 阻害剤—その展望

MMP が酵素として ECM の破壊に至るまでには、癌細胞やマクロファージでのサイトカインや増殖因子の産生に始まり、各細胞間での相互作用、細胞内での MMP 遺伝子発現の調節、さらに産生された MMP の細胞外への分泌、細胞外での移動、酵素としての活性

Fig. 3 Peritoneal dissemination nodules of TMK-1 5weeks after ip injection

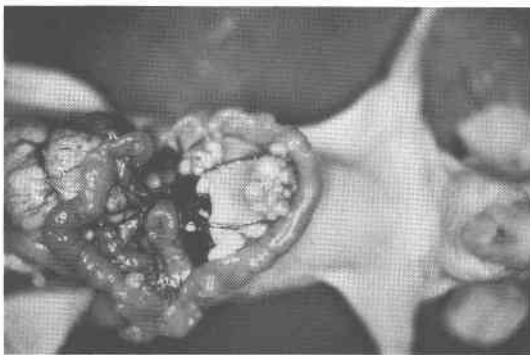


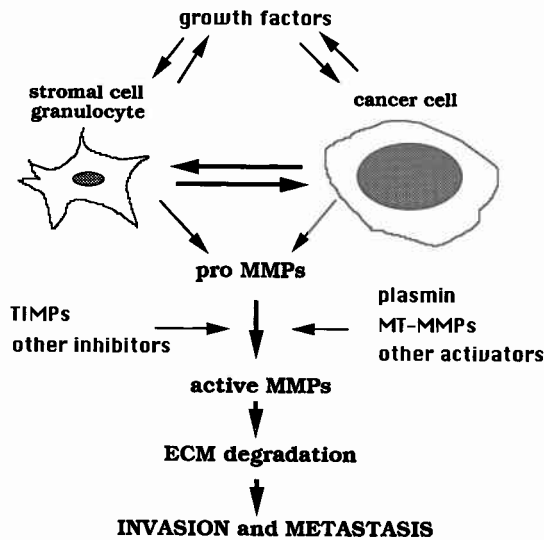
Table 1 Number of peritoneal dissemination nodules developed in nude mice.

cells	nodules	
TMK-1	54.6 ± 8.8] p < 0.01
TMK-1 + fibroblast C.M.	102.6 ± 11.2	

Table 2 Classification of MMP family

Collagenase group	MMP-1 MMP-8 MMP-13	interstitial collagenase neutrophil collagenase collagenase 3
Gelatinase group	MMP-2 MMP-9	gelatinase A gelatinase B
Stromelysin group	MMP-3 MMP-10	stromelysin 1 stromelysin 2
membrane type MMP	MMP-14 MMP-15 MMP-16 MMP-17	MT1-MMP MT2-MMP MT3-MMP MT4-MMP
Others	MMP-7 MMP-11 MMP-12 MMP-18	matrilysin stromelysin 3 metalloelastase

Fig. 4 Steps of MMP production and ECM degradation



化、インヒビターの影響、ターゲットとなる基質への接着など多くの段階で調節機構が働いている (Fig. 4)。このどこかの段階で抑制をかけられれば消化器癌の進展を阻止することも可能となる。MMPがECMに作用する最終段階においてその活性阻害作用をもつマトリスタチン誘導体が、現在、欧米で臨床試験の段階に入っている²⁴⁾。マトリスタチンは放線菌が産生する物質で特異的にMMP阻害作用が認められる²⁵⁾。今後、本邦でも臨床応用に向けた基礎研究²⁶⁾が求められる。

文 献

- 1) Liotta LA, Rao CN, Barsky SH: Tumor invasion and the extracellular matrix. *Lab Invest* 49: 636-649, 1983
- 2) Okada Y, Nagase H, Harris ED Jr: A metalloproteinase from human rheumatoid synovial fibroblasts that digests connective tissue matrix components. *J Biol Chem* 261: 14245-14255, 1986
- 3) 岡崎 勲, 丸山勝也, 大谷吉秀: 細胞外マトリックスと疾患—後天性疾患. 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, p257-277
- 4) Kubochi K, Otani Y, Maruyama K et al: Development of direct measurement assay for collagenase against type I and IV collagens in tissue homogenate and its application in stomach and lung cancers. Edited by Tschesche H.

Proteinases inflammation and tumor invasion. Walter de Gruiter & Co, Berlin-New York, 1986, p337-356

- 5) Hayashi M, Ninomiya Y, Parsons J et al: Differential localization of mRNAs of collagen types I and II in chick fibroblasts, chondrocytes, and corneal cells by *in situ* hybridization using cDNA probes. *J Cell Biol* 102: 2302-2309, 1996
- 6) Saus J, Quinones S, Otani Y et al: The complete primary structure of human matrix metalloproteinase-3—identity with stromelysin. *J Biol Chem* 263: 6742-6745, 1988
- 7) 大谷吉秀, 林 正人, Harris ED Jr ほか: ヒト collagenase cDNA probe を用いた *in situ* hybridization の試み. *最新医* 45: 2050-2052, 1990
- 8) Dayer JM, Krane SM, Russel RGG et al: Production of collagenase and prostaglandins by isolated adherent rheumatoid synovial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 73: 945-949, 1976
- 9) Poulson R, Pignatelli M, Stetler-Stevenson WG et al: Stromal expression of 72 kda type IV collagenase (MMP-2) and TIMP-2 mRNAs in colorectal neoplasia. *Am J Patol* 141: 389-396, 1992
- 10) Autio-Harmainen H, Karttunen T, Hurskainen T et al: Expression of 72 kilodalton type IV collagenase (gelatinase A) in benign and malignant ovarian tumors. *Lab Invest* 69: 312-321, 1993
- 11) Basset P, Bellocq JP, Wolf C et al: A novel metalloproteinase gene specially expressed in stromal cells of breast carcinomas. *Nature* 348: 699-704, 1990
- 12) 大谷吉秀, 桜井嘉彦, 北島政樹 ほか: 癌組織マトリックスと接着分子. *G.I. Res* 2: 195-205, 1994
- 13) Stetler-Stevenson WG, Aznavoorian S, Liotta LA: Tumor cell interaction with the extracellular matrix during invasion and metastasis. *Annu Rev Cell Biol* 9: 541-573, 1993
- 14) Ito A, Nakajima Y, Sasaguri Y et al: Co-culture of human breast adenocarcinoma MCF-7 cells and human dermal fibroblasts enhances the production of matrix metalloproteinases 1, 2 and 3 in fibroblasts. *Br J Cancer* 71: 1039-1045, 1995
- 15) Iwazawa T, Shiozaki H, Doki Y et al: Primary human fibroblasts induce diverse tumor invasiveness: involvement of HGF as an important paracrine factor. *Jpn J Cancer Res* 87: 1134-1142, 1996
- 16) Yashiro M, Chung Y, Sowa M: Role of orthotopic fibroblasts in the development of scirr-

- ous gastric carcinoma. *Jpn J Cancer Res* 85 : 883-886, 1994
- 17) Otani Y, Okazaki I, Arai M et al: Gene expression of interstitial collagenase (matrix metalloproteinase 1) in gastrointestinal tract cancers. *J Gastroenterol* 29 : 391-397, 1994
- 18) Quinones S, Saus J, Otani Y et al: Transcriptional regulation of human stromelysin. *J Biol Chem* 264 : 8339-8344, 1989
- 19) McDonnell SE, Kerr LD, Matrisian LM: Epidermal growth factor stimulation of stromelysin mRNA in rat fibroblasts requires induction of proto-oncogenes *c-fos* and activation of protein kinase C. *Mol Cell Biol* 10 : 4284-4293, 1990
- 20) Overall CM, Wrana JL, Sodek J: Independent regulation of collagenase, 72 kDa progelatinase, and metalloproteinase inhibit expression in human fibroblasts by transforming growth factor- β . *J Biol Chem* 264 : 1860-1869, 1989
- 21) Shapiro SD, Campbell EJ, Kobayashi DK et al: Immune modulation of metalloproteinase production in human macrophages: selective pretranslational suppression of interstitial collagenase and stromelysin biosynthesis by interferon-gamma. *J Clin Invest* 86 : 1204-1210, 1990
- 22) 今村保忠, 林 利彦: 細胞外マトリックスの機能と形態. *Biomed Perspec* 2 : 46-51, 1993
- 23) 大谷吉秀, 桜井嘉彦, 亀山香織ほか: 胃壁とマトリックス. *消化性潰瘍-臨床と基礎* 15 : 39-46, 1996
- 24) Parsons SL, Watson SA, Griffin NR et al: A phase I/II study of the oral matrix metalloproteinase inhibitor, marimastat, in patients with inoperable gastric cancer. Abstract of Digest Disease Week 1997, p A618
- 25) Tamaki K, Tanzawa K, Kurihara S et al: Synthesis and structure-activity relationship of gelatinase inhibitors derived from matlystatins. *Chem Pharm Bull* 43 : 1883-1893, 1995
- 26) 五十嵐直喜, 大谷吉秀, 久保田哲朗ほか: 胃癌腹膜播種モデルにおけるマトリックス分解酵素阻害剤 (R-94138) の抗腫瘍効果. *日外会誌* 98 : 794, 1997

Important Role of Stromal Cells in the Spreading of Gastrointestinal Tract Carcinomas —From the Aspect of Breakdown of Extracellular Matrix—

Yoshihide Otani, Yoshihiko Sakurai**, Naoki Igarashi, Takeyoshi Yokoyama, Masaru Kimata, Kaori Kameyama*, Tetsuro Kubota, Koichiro Kumai and Masaki Kitajima

Departments of Surgery and Pathology*, School of Medicine, Keio University
Department of Surgery**, National Tochigi Hospital

We have investigated the role of stromal cells in the invasion and metastasis of gastrointestinal tract carcinomas. The extracellular matrix is degraded by a carcinoma during its spread, which is known to be caused by matrix metalloproteinases (MMPs). We observed the gene expression of MMP-1 by *in situ* hybridization in gastric and colorectal carcinomas and found that MMP-1 mRNA was expressed in the stromal cells and some inflammatory cells. A human gastric carcinoma cell line, MKN74, was co-cultured with human fibroblasts, resulting greater MMP-1 production than in the simple culture. Another gastric carcinoma cell line, TMK-1, was injected intraperitoneally into BALB/c nu/nu mice along with the conditioned medium of a human fibroblast culture. Five weeks after the injection the mice were sacrificed and the nodules resulting from peritoneal dissemination were counted. The carcinoma cells with fibroblast-conditioned medium formed more nodules than the carcinoma cells without it ($p < 0.05$). On the basis of these observations, we can speculate that the stromal cells play important roles during invasion and metastasis and also that the stromal cells affect the degree of malignancy of the tumor.

Reprint requests: Yoshihide Otani Department of Surgery, School of Medicine, Keio University
35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo, 160-8582 JAPAN