日消外会誌　33（4）：554～559，2000年

特集 9

膵臓癌の浸潤転移機構の解析：癌細胞解離因子の解析

熊本大学第 2 外科
江上　寛　林　尚子　栗崎　貴
甲斐　幹男　高井　英二　多森　靖洋
赤木　純児　廣田　昌彦　小川　道雄

膵臓癌の転移機構を明らかにする目的で，BOP 誘導実験膵癌組織から樹立した高転移株（PC-1・0）培養上清中に存在する癌細胞解離因子（DF）分離精製し，その本態と膵癌の浸潤転移機構との関連について解析を行った．DF の精製を進め構成アミノ酸解析を行った結果，DF は新しいタイプの metalloprotease あるいはムチン様の構造をもつ Fc binding protein であることが示唆された．生物学的活性を解析した結果，DF には癌細胞コロニーを濃度依存的に解離し，細胞運動能を増強させ，さらに，fibronectin に対する接着能を選択的に増強し，MATRIBGEL に対する細胞浸潤能を増強する作用が存在した．本研究の結果から，DF は膵臓癌の浸潤転移機構と密接に関連した生物学的特性を有する新しい因子であることが示唆された．

はじめに

近年の診断，治療法の進歩にも関わらず膵癌の予後は依然として不良である．この予後を不良とする大きな要因として肝転移の問題がある．膵癌の予後の改善にはこの肝転移機構の解明が不可欠であると考えられる．N-nitrosobis（2-oxopropyl）amine（BOP）によってシリアンゴールデンハムスターに誘導される実験膵癌は組織学的，生物学的，免疫学的に唯一ヒト膵癌と近似しており，膵癌の基礎研究に有用なモデルである[1]．私たちは，BOP 実験膵癌組織から同種ハムスター膵組織内へ移植可能であり，移植後の浸潤性，肝転移率の異なる二つの細胞株，高転移株（PC-1・0），低転移株（PC-1）を樹立し[1)~3)]，膵癌の浸潤，肝転移機構の研究モデルを作成した．さらに高転移株（PC-1・0）培養上清中に低転移株（PC-1）の細胞コロニーを解離させる因子（癌細胞解離因子，DF）が存在することを見い出した[4)5)]．癌細胞の細胞集団（コロニー）からの解離という現象は癌の転移機構の初期段階として極めて重要な意義を持つと考え，この因子の精製と生物学的特性の解析を行っている．

本稿ではこれまで明らかにしてきた DF の本態と生物学的活性，とくに膵癌の浸潤転移機構との関連についてまとめた．

細胞株の形態学的特性

二つの細胞株を同種ハムスター膵組織内に移植後に形成される腫瘍の組織形態は，両細胞株とも同様に中分化～高分化型の duct/ductular adenocarcinoma であった[4]．しかし，腫瘍先進部における浸潤形態は大きく異なっており，PC-1腫瘍は expansive な増殖をし，浸潤傾向が弱いのに対し，PC-1・0腫瘍は invasive で周囲臓器への強い浸潤傾向を有し，高率に肝転移を来した[4]．In vitro において二つの細胞株は全く異なった形態を示した．

PC-1・0はコロニーを形成せず，主として single cell として増殖するのに対し，PC-1細胞は細胞間が強固に接合し，常にコロニー形成して島状に増殖した（**Fig. 1**）[6]．この PC-1細胞に PC-1・0細胞の培養上清を添加すると，島状の細胞コロニーは濃度依存的に解離し，樹枝状の形態をとり single cell となって増殖する現象が認められた（**Fig. 2**）[6]．さらにこの現象はハムスター膵癌細胞のみでなくヒト膵癌細胞においても同様に認められ，PC-1・0培養上清中に癌細胞コロニーを解離させる DF が存在することが明らかとなった[5)6)]．この解離活性を基に DF の分離精製を行った．

＊第54回日消外会総会シンポ 5・消化器癌転移能の分子生物学的側面（肝胆膵）

＜1999年12月22日受理＞別刷請求先：江上　寛
〒860-8556　熊本市本荘1―1　熊本大学医学部第 2 外科

DF の分離精製と構成アミノ酸微量解析

PC-1・0培養上清中に存在する癌細胞解離活性は，これまでに解離作用を有することが報告されている他の growth factor や scatter factor とは異なり heparin 親和性がなく，hydroxylapatite に強い親和性を有する蛋白であった[5)6)]．この性格の相違を利用して PC-1・0の無血清培養上清から heparin column を用いて heparin 親和性蛋白を除去した後，hydroxylapatite column を用いて解離活性物質を濃縮し回収した．さらに anion exchange, gel filtration column を用いて細胞解離活性を分離した．さらに部分精製した因子を免疫源として DF の細胞解離活性を完全に block する中和抗体（polyclonal，mouse IgG）を作成した．この中和抗体を用いて Western blot を行った結果，分子量約50kD 前後に２本の major band が検出された．Western blot によって同定される この２本の band を切り出し，蛋白の構成アミノ酸配列の解析を行った．その結果，新しいタイプの metalloprotease あるいはムチン様の構造をもつ Fc binding protein が DF の候補として検出された（**Fig. 3**）．現在，この蛋白にターゲットを絞っ

Fig. 1　Growth morphology of PC-1 (left) and PC-1・0 cells（right）[6)]. PC-1 cells always form islandlike structure, wheras PC-1・0 cells grow mainly single cells. (original magnification×100).

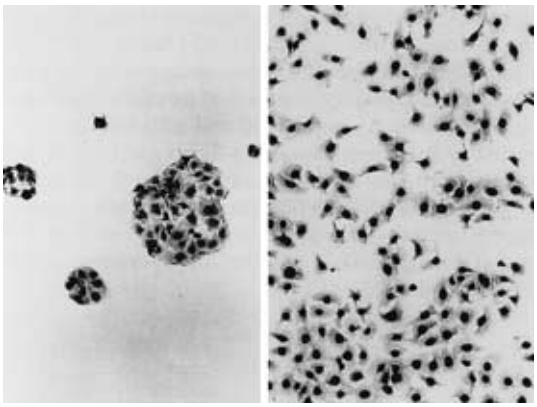
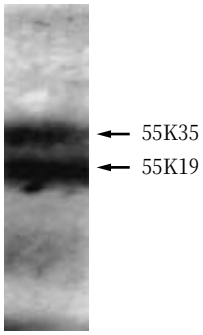


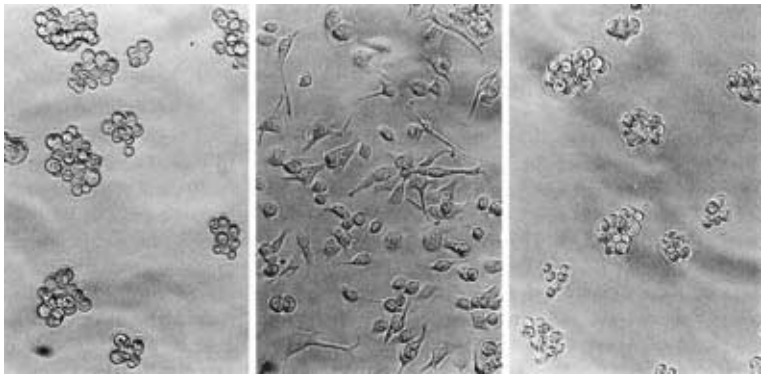
Fig. 3　Immunoblotting analysis of partialy purified DF using the polyclonal anti-DF antibody and amino acid sequencing of candidate proteins.

Immunoblotting



55K35：IDLTYTFLSATQS（T)MN(K)‥Metalloprotease (pseudomonas).
55K19：IYVSVTAEG (R) NMVLQT‥IgGFc binding protein（Human）

Fig. 2　Effect of DF on morphology of PC-1 cells[6)]. PC-1 cells trypsinized and harvested were incubated without DF（left), with DF（middle). PC-1 cell were dissociated. Addition of the polyclonal anti-DF antibody completely inhibited the cell dissociation（right). (original magnification×100).

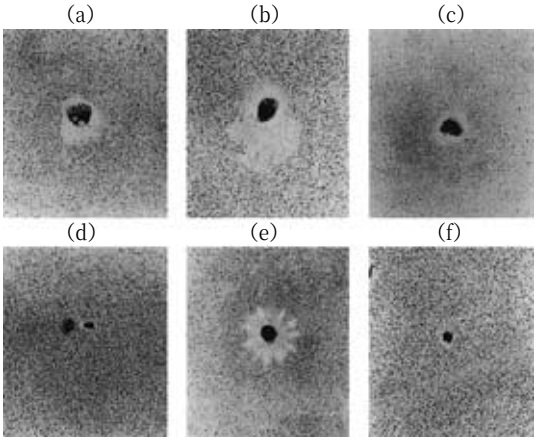


て遺伝子クローニングを行っている．

DF の生物学的活性

部分精製した DF の生物学的活性と浸潤，転移機構との関連について検討を行った．

Fig. 4　Effect of DF on phagokinetic motility of PC-1・0 cells（a, b, c）and PC-1 cells（d, e, f）[6]. Cells were plated on gold particle-coated coverslips without（a, d）or with（b, c, e, f）100U/ml of DF. The addition of the polyclonal anti-DF antibody inhibited the enhancement of cell motility induced by DF（c, f）.（original magnification×100）.



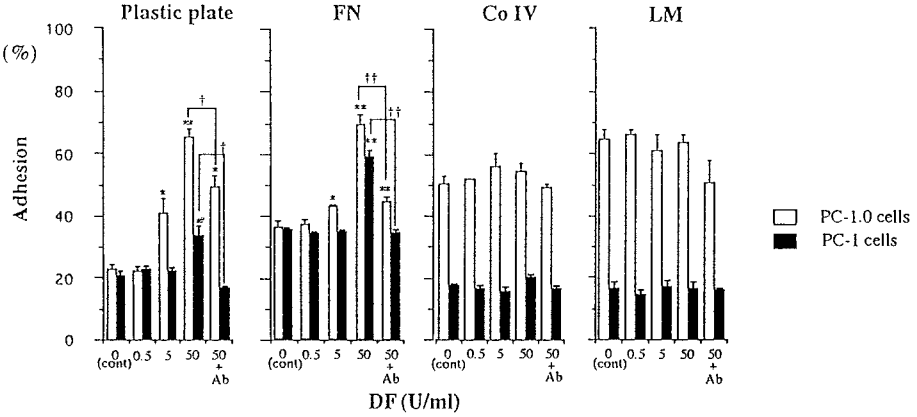
細胞運動誘導作用：金コロイド法を用いて DF の細胞運動誘導作用について解析した．PC-1・0細胞は無刺激下においても細胞運動能を有するのに対し，PC-1細胞は殆ど細胞運動を示さなかった．DF を添加すると両細胞株ともに細胞運動能が有意に増強した（**Fig. 4**）[6]．

細胞外マトリックスに対する接着能誘導作用：続いて，細胞外マトリックス分子である laminin，type IV collagen，fibronectin に対する細胞接着能変化を検索した．PC-1・0細胞は laminin, type IV collagen に強い接着能を有しているのに対し，PC-1細胞はほとんど 3 種のマトリックス分子に対する接着能を示さなかった．この PC-1細胞に DF を添加すると PC-1細胞の fibronectin に対する接着能が選択的に増加した（**Fig. 5**）[6]．

細胞浸潤能誘導作用：さらに Boyden chamber 法を用いてマトリゲルに対する浸潤能の変化を解析した結果，DF 添加により PC-1細胞の浸潤能が有意に増強した（**Fig. 6**）[6]．

以上の結果から，DF には癌細胞を解離させるのみでなく，細胞運動能を増強させ，細胞外マトリックス分子とくに fibronectin への接着能を亢進させ，さらに細胞浸潤能を亢進させる作用が存在することが明らかとなった．

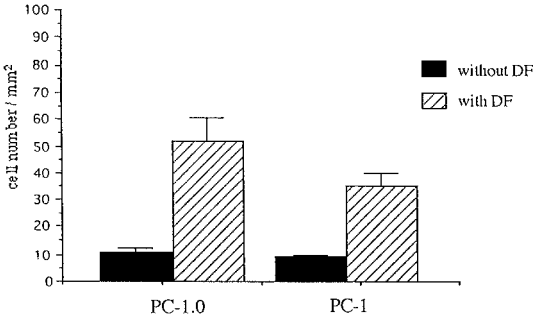
Fig. 5　Effect of DF on cell adhesion to several extracellular matrix molecules[6]. Cells were plated in a precoated cuture plate with fibronectin（FN）, laminin（LM）and type IV collagen（Co IV）, without or with DF（0.5, 5, 50U/ml）. After 30 minutes, adherent cell numbers were expressed an the percentage of optical density for total seeded cells using MTT assay. Date are expressed as mean percentage+standard error from four replicate wells. *p<0.05；**p<0.01 compared with control；p<0.05；p<0.01 compared with addition of antibody by Student's t test.



DFの刺激伝達経路

Time lapse videoを用いて細胞運動能の変化を計時的に測定し，DFの刺激伝達系路について解析した．高転移株PC-1・0は最高値で低転移株PC-1の約6倍の細胞運動能を示した．このPC-1細胞にDFを添加すると細胞運動能は経時的に増加し，PC-1・0と同等のレベルに達した[7]．同時にNothern blot analysisを用いて既知のoncogeneの発現変化を検索した．その結果，PC-1細胞のc-fos oncogeneの発現が一過性に増強し，この変化はPC-1細胞における細胞運動の経時的変化とよく相関した(**Fig. 7**)[7]．この細胞運動の増強作用はstaurosporine，cyclic AMP antagonistあるいはc-fos antisense oligonucleotideによって有意に抑制され，DFによるPC-1細胞の細胞運動の増強にcyclic AMP dependentのprotein kinaseが関与し，c-fos oncogeneが介在していることが考えられた[7]．これらの結果から，DFはいわゆる酵素作用などによって直接的に細胞間接合を解離させるのではなく，癌細胞内の刺激伝達経路を介して細胞機能に一連の変化を誘導する因子として作用することが示唆された．

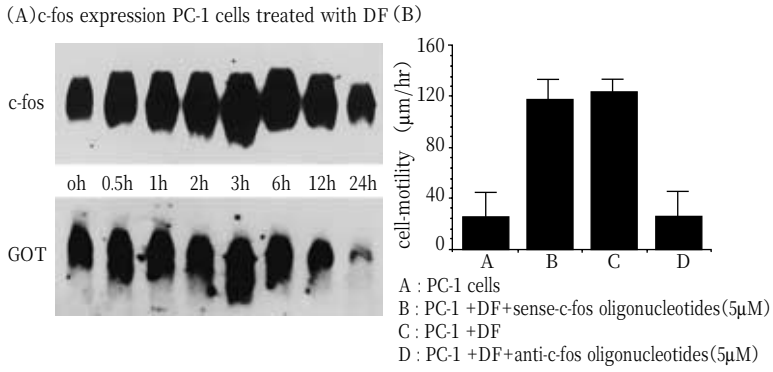
Fig. 6 Effect of DF on chemoinvasion of PC-1 and PC-1・0 cells[6]. Cells were incubated in the invasion chambers with or without DF (500U/ml). Data are expressed as mean±standard error.



まとめ

癌の転移は複数のステップを経て成立すると考えられ，癌細胞に由来するものや宿主側に由来する多くの因子が明らかになってきている．癌転移の初期段階として，癌細胞はまず原発巣の細胞集団から解離し，細胞運動能を増強させ，細膨外マトリックスに接着し，基底膜を含む間質成分を破壊し浸潤する必要がある．この転移の初期段階に関与する因子として，scatter factorやEGF, aFGF, bFGF, TGF-βなどのgrowth factor, あるいはある種のサイトカイン等，細胞の解離や運動能に関連した因子があげられる[8)~11)]．細胞接着分子や細胞外マトリックス分子もまたこの時期に重要な働きをしていることが指摘されている[12)13)]．本研究の結果は膵癌細胞がautocrineにDFを産生し，その作用によって癌細胞が原発巣から遊離し運動能を亢進さ

Fig. 7 (A) Time course analysis of c-fos mRNA expression in DF treated PC-1 cells. Nothern blot analysis was performed on 10μg of total RNA using a human c-fos cDNA probe or a mouse GOT cDNA probe as control. Total RNA was extracted from PC-1 cells 0, 0.5, 1, 2, 3, 6, 12 and 24h after adding DF[7]. (B) Effects of anti-c-fos oligonucleotides on enhancement of cell motility of PC-1 cell[7]. The cell motility at 3 h after adding DF was quantiated by time lapse video microscopy. Data are expressed as mean±standard erro. *p<0.05 compared to cell motility of DF treated PC-1 cells by Student's t test.



せ，周囲に浸潤し，転移を引き起こすという機構の存在を示しており，本因子の生物活性が癌の転移機構の初期段階と密接に関連していることを示唆している．DF 蛋白は生化学的な性格あるいは構成アミノ酸解析の結果からも，これまでに報告されている他の因子とは異なっており，膵癌の転移機構に密接に関連した新しい物質である可能性がある．

本因子の解析は膵臓癌の肝転移機構の解明のみならず膵癌の浸潤，転移を予防する新しい治療法開発の糸口となりえるものであると考えている．

文　献

1) Egami H, Takiyama Y, Cano H et al：Establishment of a hamster pancreatic ductal carcinoma cell line (PC-1) producing blood group-related antigens. Carcinogenesis **10**：861—869, 1989
2) Egami H, Tomioka T, Tempero M et al：Development of intrapancreatic transplantable model of pancreatic duct adenocarcinoma in Syrian golden hamsters. Am J Pathol **138**：557—561, 1991
3) Pour PM, Egami H, Takiyama Y：Patterns of growth and metastases of induced pancreatic cancer in relation to the prognosis and its clinical implications. Gastroenterology **100**：529—536, 1991
4) 江上　寛, 柴田雄司, 箕田誠司ほか：膵臓癌の肝転移機構の解析：癌細胞解離因子の産生. 膵臓　**7**：592—596, 1992
5) Hirota M, Egami H, Corra S et al：Production of scatter factor-like activity by a nitrosamine-induced pancreatic cancer cell line. Carcinogenesis **14**：259—264, 1993
6) Kurizaki T, Egami H, Ogawa M et al：Characterization of cancer cell dissociation factor in a highly invasive pancreatic cancer cell line. Cancer **75**：1554—1561, 1995
7) Akagi J, Egami H, Kurizaki T et al：Signal transduction pathway of the induction of cell motility in hamster pancreatic ductal adenocarcinoma cells. Invasion Metastasis **17**：16—25, 1997
8) Stocker M, Gherardi E, Perryman M et al：Scatter factor is a fibroblast-derived modulator of Epithelial cell motility. Nature **327**：239—242, 1987
9) Valles AM, Boyer B, Badet J et al：Acidic fibroblast growth factor is a modulator of epithelial plasticity in a rat bladder carcinoma cell line. Proc Natl Acad Sci USA **87**：1124—1128, 1990
10) Clinkers M, Mckanna J, Cohen S：Rapid induction of morphological changes in human carcinoma cells A-431 by epidermal growth factors. J Cell Biol **83**：260—265, 1979
11) Roubin R, Deagstini-Bazin H, Hirsh MR et al：Modulation of NCAM expression by transforming growth factor-beta, serum and autocrine factors. J Cell Biol **111**：674—684, 1979
12) Griffin JD, Spertini O, Ernst TJ et al：Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and other cytokines regulate surface expression on the leukocytes adhesion molecule-1 on human neutrophils, monocytes and their precursors. J Immunol **145**：576—584, 1990
13) Terranova VP, Williams JE, Liotta LA et al：Modulation of the metastatic activity of melanoma cells by lamin and fibronectin. Science **226**：982—985, 1984

Study of the Mechanism of Invasion and Metastasis in Pancreatic Cancer：Analysis of Cancer Cell Dissociation Factor

Hiroshi Egami, Naoko Hayashi, Takashi Kurizaki, Mikio Kai, Eiji Takai,
Yasuhiro Tamori, Junji Akagi, Masahiko Hirota and Michio Ogawa
Department of Surgery II, Kumamoto University Medical School

Pancreatic cancer has the worst prognosis of any neoplasm, one reason being that it has an extremely high potential for invasion and metastasis. Two pancreatic cancer cell lines, the highly invasive and metastatic cell line PC-1・0 and the weakly invasive and rarely metastatic cell line PC-1, were established from a pancreatic ductal carcinoma induced by N-nitrosobis（2-oxopropyl）amine in a Syrian golden hamster. A soluble proteinous factor called dissociation factor（DF), which can induce dissociation of cancer cell colonies was found in PC-1・0-cell conditioned medium. DF has been partially purified, and analysis of its amino acid sequence revealed that DF is a protein with an amino acid sequence similar to that of 1）a new type of metalloproteinase, or 2) Fc binding protein with mucin-like structure, with an approximate molecular weight of 50kD. Study of its biological activity showed that partially purified DF can induce not only cancer cell dissociation, but cell motility, selective cell adhesion to fibronectin, and chemoinvasion in vitro. Based on the results of this study, DF seems likely to have a role in cancer cell invasion and metastasis in pancreatic cancer.

Key words：cancer cell dissociation factor（DF), metastasis, pancreatic cancer

〔Jpn J Gastroenterol Surg 33：554—559, 2000〕

Reprint requests：Hiroshi Egami　Department of Surgery II, Kumamoto University Medical School
Honjo 1-1-1, Kumamoto, 860-8556 JAPAN