

所属 (主指導教官)	細胞構造学講座 (塩坂 貞夫 教授)		
氏名	谷 直之	提出	平成13年1月7日
題目	細胞外環境におけるプロテアーゼおよび接着分子に関する病理学的研究		

要旨

細胞接着および細胞移動は、胚における形態形成、炎症反応、創傷治癒、腫瘍の浸潤、転移、および組織構造の維持といった様々な生命現象に関与することが知られている。このような多様な機能は、インテグリンをはじめとする接着分子、プロテアーゼとそのインヒビター、および細胞外マトリックス蛋白質間の相互作用によってもたらされる。特に、正常および癌細胞の接着や移動といった現象には、インテグリンを介した細胞外マトリックス蛋白質への接着による足場の確保とプロテアーゼによるマトリックス蛋白質の分解が重要であることが明らかにされている。以上の観点から本研究では、当研究室においてマウス脳からクローニングされた新規セリンプロテアーゼ、ニューロプシンおよび癌転移過程におけるインテグリンの役割に関して以下の2つの研究テーマに沿って実験を行った。

1 ニューロプシンにより切断されたフィブロネクチンの細胞接着、遊走に対する影響

マウス脳からクローニングされた新規セリンプロテアーゼ、ニューロプシンは、フィブロネクチンを効果的に切断する分泌型蛋白質である。フィブロネクチン切断によるマトリックス中の微小環境を変化させることにより、細胞接着や遊走に影響を及ぼしている可能性が考えられた。Chinese hamster ovary (CHO) 細胞に特定のインテグリンをトランスフェクトした細胞を用いて、フィブロネクチンに対する接着性や遊走性に及ぼすニューロプシンの影響を検討した。フィブロネクチンに対する接着実験では、インテグリン  $\alpha 5 \beta 1$  を発現させた  $\alpha 5 B 2$  細胞において、ニューロプシンにより切断されたフィブロネクチンに対する接着性が、未切断のフィブロネクチンを用いた場合と比較して、30%程度減少した。一方、フィブロネクチンに対する遊走実験 (Boyden chamber chemotaxis assay) では、フィブロネクチンによって誘導される  $\alpha 5 B 2$  細胞の遊走性の亢進は、ニューロプシン処理により切断されたフィブロネクチンを用いた場合においても変化しなかった。また、フィブロネクチン以外のコラーゲンやラミニンを用いた場合、およびインテグリン  $\alpha 2 \beta 1$  を発現する  $\alpha 2 B 2$  細胞を用いた場合においても、ニューロプシン処理による影響は認められなかった。これらの結果から、ニューロプシンはフィブロネクチンを切断し、細胞の接着性を減弱させることによって細胞とマトリックス間の微小環境を制御している可能性が示唆された。

細胞外環境におけるプロテアーゼおよび接着分子に  
関する病理学的研究

谷 直之  
奈良先端科学技術大学院大学  
バイオサイエンス研究科 細胞構造学講座  
(塩坂 貞夫 教授)

平成13年 1月 7日提出

1 ニューロプシンにより切断されたフィブロネクチンの細胞接着、遊走に対する影響

## 序文

細胞接着および細胞移動は、胚における形態形成、炎症反応、創傷治癒、腫瘍の浸潤、転移、および組織構造の維持といった様々な生命現象に関与することが知られている (1, 2). このような多様な機能は、インテグリンをはじめとする接着分子、プロテアーゼとそのインヒビター、および細胞外マトリックス蛋白質間の相互作用によってもたらされる (3, 4, 5, 6, 7).

当研究室でマウス脳からクローニングされたニューロプシンは、セリンプロテアーゼファミリーに属する新規プロテアーゼであり、記憶や学習といった神経の可塑的变化に関わると考えられている脳の海馬錐体細胞に発現が認められる (8, 9, 10, 11, 12, 13, 14). 脳以外では発達期のマウスで、心臓、肺、胸腺、皮膚、食道、胃など様々な臓器においてニューロプシンの発現が認められるが、成熟したマウスでは皮膚や妊娠子宮に主な発現が認められる (15, 16). ニューロプシンの生物学的な機能を解析するために、バキュロウイルス/昆虫細胞系を用いて組換え型ニューロプシンが作成された. この組換え型ニューロプシンは不活性型の前駆体として産生されるが、エンドプロテアーゼであるプロテアーゼ 1 を作用させることにより容易に活性化することができる. 活性型ニューロプシンは、フィブロネクチンのアミノ末端とカルボキシル末端を効率的に切断する (17). フィブロネクチンは、細胞接着や細胞移動を介した多くの重要な生物現象に関与していることが報告されている (18, 19, 20, 21, 22). これらの事実から、ニューロプシンはフィブロネクチンを切断することによって、細胞と細胞外マトリックス間の微小環境を制御している可能性があると考えられた. この仮説に基づき、本研究では *in vitro* の実験系を用いて、ニューロプシンによるフィブロネクチンの切断が、細胞の接着性や遊走性に与える影響を調べた.

## 材料と方法

### 細胞と培養条件

Chinese hamster ovary 由来の fibrosarcoma である CHO-K1 細胞 (ATCC, VA, USA) から選抜された変異体、およびこの変異体に遺伝子導入した細胞を使用して実験を行った。CHO-B2 細胞は、インテグリン  $\alpha 5 \beta 1$  を発現している CHO-K1 細胞から選抜された  $\alpha 5$  欠失変異体である (23)。SR $\alpha$  promoter (24) の下流に連結された ヒト  $\alpha 5$  cDNA をインサートにもつ pBJ-1 ベクターを、CHO-B2 細胞にトランスフェクトして  $\alpha 5 \beta 2$  細胞を作製した。 $\alpha 5$  発現細胞は、フローサイトメトリーによるソーティングとジェネチシン (G418, SIGMA-JAPAN) 耐性を指標に選抜した。 $\alpha 5 \beta 2$  細胞は、フィブロネクチン受容体であるインテグリン  $\alpha 5 \beta 1$  を過剰発現する。同様にヒト  $\alpha 2$  cDNA を SR $\alpha$  promoter の下流に連結したインサートを組み込んだ pBJ-1 ベクターを、CHO-B2 細胞にトランスフェクトして  $\alpha 2 \beta 2$  細胞を作製した。 $\alpha 2 \beta 2$  細胞は、コラーゲンおよびラミニンに対する受容体であるインテグリン  $\alpha 2 \beta 1$  を過剰発現する。細胞は、10% 牛胎児血清 (FBS, 大日本製薬)、50 units/ml ペニシリン-50  $\mu\text{g/ml}$  ストレプトマイシン (GIBCO, NY, USA) を含むダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM, 日本製薬) を用いて、10%  $\text{CO}_2$  存在下で維持した。

### エンドプロテアーゼによる組換え型プロ・ニューロプシンの活性化

本研究室の清水ら (17) によって確立された方法に従って活性化された組換え型ニューロプシンを使用して、実験を行った。すなわちプロテアーゼ 1 (EC 3.4.21.50) を固相化した Sepharose 4B を用いて、プロ・ニューロプシンのアミノ末端プロセッシングを行うことによって活性化したものである。

### 接着実験

ニューロプシンによるフィブロネクチンの切断が、細胞の接着性に影響を与えるかどうかを検討するために、接着実験を行った。96 ウェルプラスチックプレート (Coster, MA, USA) を、PBS に 10  $\mu\text{g/ml}$  の濃度で懸濁したフィブロネクチンにより 37  $^{\circ}\text{C}$ 、2 時間処理しコートした。ネガティブコントロールとして、ラミニン (IWAKI) および IV 型コラーゲン (IWAKI) を使用した。プレートにコートした基質に対して、1  $\mu\text{g/ml}$  の活性型または不活性型のニューロプシンを 37  $^{\circ}\text{C}$ 、8 時間作用させた。ニューロプシン処理後、プレートを 3% BSA で 37  $^{\circ}\text{C}$ 、1 時間処理し、細胞の基質に対する非特異的接着を防いだ。0.1% BSA

を含む無血清 DMEM に懸濁した  $5 \times 10^4$  個の細胞 (CHO-B2(mock)、 $\alpha 5B2$ 、または  $\alpha 2B2$ ) を、各ウェルに加え  $37^\circ\text{C}$  で 3 時間インキュベートした。培養液を除いた後、0.04 % クリスタルバイオレット溶液  $100 \mu\text{l}$  を各ウェルに加え、室温で 10 分間インキュベートした。ウェルを PBS で 3 回洗浄し、 $20 \mu\text{l}$  のジメチルスルホキシドを加えた後、室温で 10 分間インキュベートした。 $80 \mu\text{l}$  の DW を加えて、 $550 \text{ nm}$  の吸光度を測定した。

### 遊走実験

ニューロプシンによるフィブロネクチンの切断が、細胞の遊走性に影響を与えるかどうかを検討するために、multiwell Boyden chambers (Neuro Probe, MD, USA) を使用してケモタキシスアッセイを行った。ポアサイズ  $8 \mu\text{m}$  のポリカーボネートメンブレン (Neuro Probe) を  $10 \mu\text{g/ml}$  のフィブロネクチン、ラミニン、または IV 型コラーゲンを懸濁した PBS に室温で 30 分間浸漬することによって各基質をコートした。メンブレンを風乾した後、48 ウェルチャンバーにセットした。ケモアトラクタントとして 0.1 % BSA 含有無血清 DMEM に懸濁した  $10 \mu\text{g/ml}$  のフィブロネクチン、ラミニン、または IV 型コラーゲンをチャンバー下層に加えた。また各基質に対して  $1 \mu\text{g/ml}$  の活性型または不活性型ニューロプシンを予め  $37^\circ\text{C}$  で 8 時間作用させたものを、同様にケモアトラクタントとして使用した。上記の無血清 DMEM に懸濁した  $1.5 \times 10^4$  個の細胞をチャンバー上層に加え、5 %  $\text{CO}_2$   $37^\circ\text{C}$  で 3 時間インキュベートした。メンブレンを 10 % ホルマリンで固定した後、ヘマトキシリンで染色した。メンブレンの上面に残っている細胞を綿棒で拭き取った後、メンブレンの下面に抜けた細胞の数を計測した。

### 統計解析

統計的処理には、Kruskal-Wallis ANOVA を用いた。 $P < 0.05$  を統計的に有意と見なした。

## 結果

ニューロプシンにより切断されたフィブロネクチンの細胞接着に対する影響

フィブロネクチンに対する細胞の接着性を調べた結果を、Fig. 1a に示した。インテグリン  $\alpha 5$  欠変異体である CHO-B2 細胞は、フィブロネクチン受容体である  $\alpha 5\beta 1$  を発現していないため、フィブロネクチンに対して接着性を示さなかった。コラーゲンおよびラミニンに対する接着性を、各々 Fig. 1b、1c に示した。CHO-B2 細胞は、コラーゲンおよびラミニンに対しても、接着性を示さなかった。CHO-B2 細胞のフィブロネクチン、コラーゲン、およびラミニンに対する接着性は、これらの基質を予め活性型または不活性型ニューロプシンで処理した場合においても、変化しなかった。インテグリン  $\alpha 2\beta 1$  を過剰発現する  $\alpha 2B2$  細胞はコラーゲン、ラミニンに対して接着性を示したが、フィブロネクチンに対しては接着性を示さなかった。また、コラーゲン、ラミニンの活性型ニューロプシンによる処理は、 $\alpha 2B2$  細胞の接着性に影響しなかった (Fig. 1b, c)。この結果は、活性型ニューロプシンがコラーゲンおよびラミニンを切断しないことと矛盾しない。一方、活性型ニューロプシンで前処理されたフィブロネクチンに対する  $\alpha 5B2$  細胞の接着性は、不活性型ニューロプシンによって処理されたフィブロネクチンを用いた場合と比較して、細胞数で約 30 パーセント減少していた ( $p < 0.01$ , Fig. 1a)。1  $\mu\text{g/ml}$  のフィブロネクチンを用いた実験においても、データを示していないが同様の結果が得られた。

ニューロプシンにより切断されたフィブロネクチンの細胞遊走性に対する影響

活性型ニューロプシンにより切断されたフィブロネクチンが、細胞の遊走性を誘導するかどうかを調べるために、フィブロネクチン、コラーゲン、またはラミニンを用いて行った Boyden chamber chemotaxis assay の結果を Fig. 2 に示した。CHO-B2 細胞はフィブロネクチン、コラーゲン、またはラミニンのいずれの基質に対しても、遊走性の亢進を示さなかった (Fig. 2a-c)。コラーゲンまたはラミニンに対する  $\alpha 2B2$  細胞の遊走性は、フィブロネクチンを用いた場合より顕著に増加した (Fig. 2a-c)。 $\alpha 2B2$  細胞のコラーゲン、ラミニンに対する遊走性の亢進は、活性型または不活性型ニューロプシンによりこれらの基質を前処理した場合においても、変化しなかった。このことは、ニューロプシンがコラーゲン、ラミニンを切断しないことと矛盾しない。 $\alpha 5B2$  細胞の遊走性は、コラーゲンおよびラミニンに対してではなく、未切断のフィブロネクチンに対してのみ亢進した (Fig. 2a)。さらに、 $\alpha 5B2$  細胞のフィブロネクチンに対する

遊走性の亢進は、活性型ニューロプシンによりフィブロネクチンを前処理した場合においても変化しなかった (Fig. 2a).

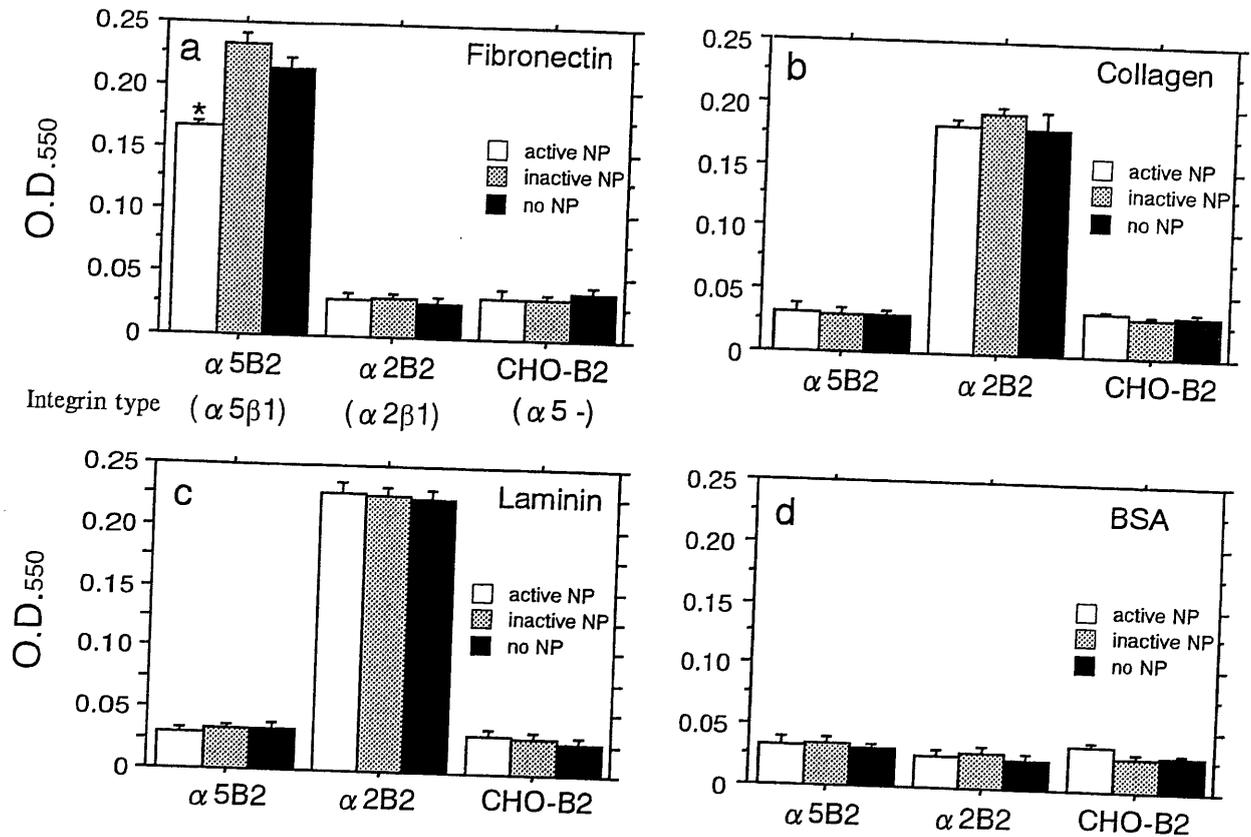


Figure 1. Effect of neuropsin treatment on cell adhesion to extracellular matrices. 96-well plastic plates were coated with 10  $\mu\text{g/ml}$  fibronectin, collagen, or laminin. The coated protein was treated with or without neuropsin (active or inactive type) for 8 hours at 37  $^{\circ}\text{C}$ .  $5 \times 10^4$  cells in medium containing 0.1% BSA were added to the well and incubated for 3 hours at 37  $^{\circ}\text{C}$ . Cells binding to the coated protein were stained with crystal violet and optical density were measured at 550 nm. Results are shown as mean  $\pm$  SEM,  $n = 3$ . a,  $\alpha 5$  B2 cells effectively bound to fibronectin with inactive neuropsin or without neuropsin but not to collagen or laminin. Neuropsin treatment for fibronectin reduced cell adhesion of  $\alpha 5$  B2 cells by 30% compared to that of no neuropsin treatment (\*  $p < 0.01$ ). b, Adhesion activity of  $\alpha 2$  B2 cells which effectively bound to collagen did not change with neuropsin treatment. c, Neuropsin treatment had no effect on adhesion activity of  $\alpha 2$  B2 cells which effectively bound to laminin. d, There was no difference in non-specific binding of the cells to the plastic plate and neuropsin treatment had no effect on base line of O.D. measurement.

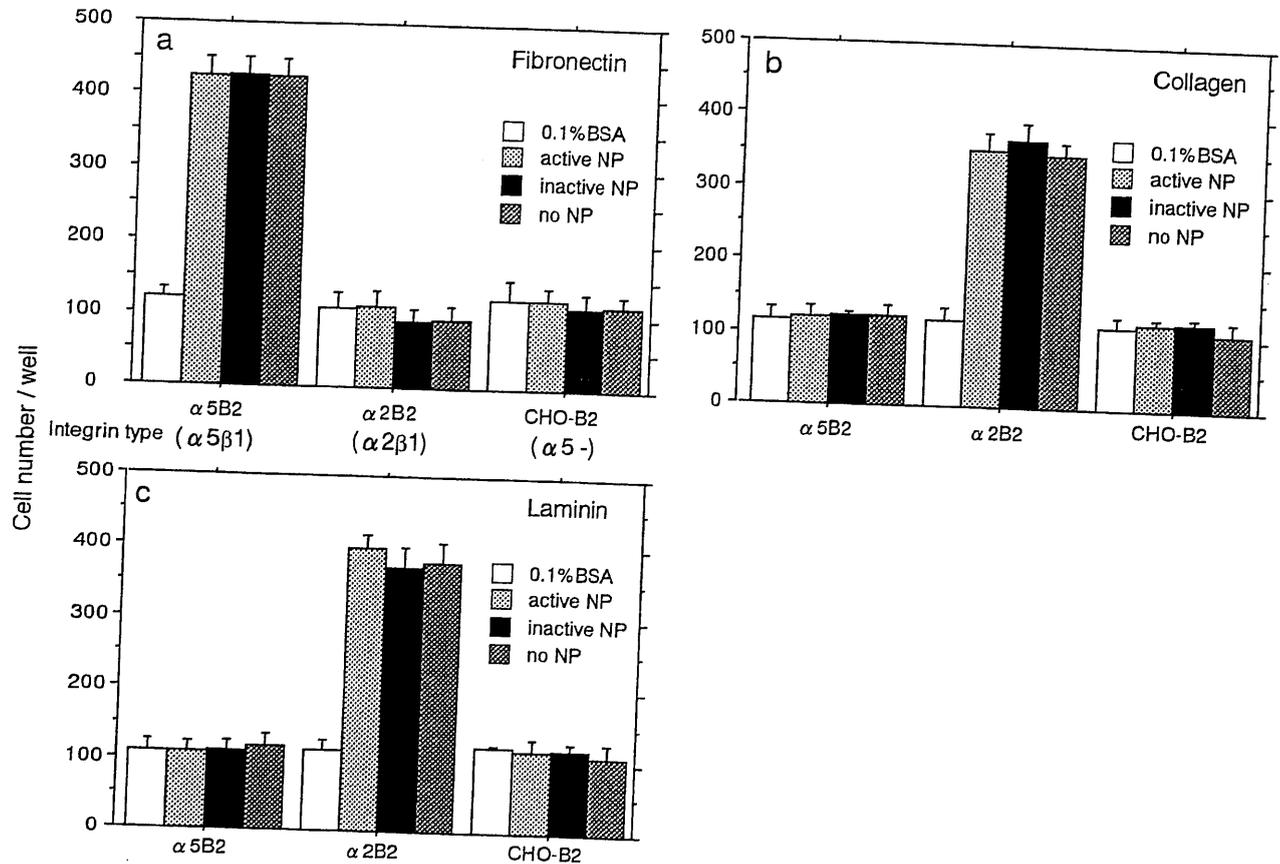


Figure 2. Effect of neuropsin on cell migration.

Effects of neuropsin on cell motility to fibronectin, collagen, or laminin were evaluated by Boyden chamber chemotaxis assay. Medium containing 10  $\mu\text{g/ml}$  fibronectin, collagen, or laminin was added to the lower chamber and  $1.5 \times 10^4$  cells dissolved with medium were put onto the upper chamber. The chamber was incubated for 3 hours at 37  $^\circ\text{C}$  and the number of the cell was counted which had migrated to the lower side of the filter. Results are shown as mean  $\pm$  SEM,  $n = 3$ . a,  $\alpha 5B2$  cells showed high migration activity to fibronectin with inactive neuropsin or without neuropsin treatment. High migration of  $\alpha 5B2$  cells to fibronectin was not affected by neuropsin treatment. b,  $\alpha 2B2$  cells showed high chemotaxis activity to collagen. Neuropsin treatment for collagen did not affect cell motility of  $\alpha 2B2$  cells. c,  $\alpha 2B2$  cells effectively migrated to laminin and the high motility to laminin was not affected by neuropsin treatment.

## 考察

ニューロプシンによるフィブロネクチンの切断が、細胞接着や細胞遊走に対してどのような影響を与えるのかを細胞レベルで検討した結果、細胞の遊走性には影響せず、細胞接着を減少させることが明らかとなった。

接着実験において、インテグリン  $\alpha 5 \beta 1$  を発現していない CHO-B2 細胞は、フィブロネクチンだけでなく、コラーゲン、ラミニンに対しても接着性を示さなかった。CHO-K1 細胞が内在性に発現しているインテグリンの種類について、スクリプス研究所の高田義一先生によって、抗体による発現の検討や接着実験による細胞の基質に対する接着性の面から検討された。その結果、CHO-K1 細胞はインテグリン  $\alpha 5 \beta 1$  を主に発現している細胞であることが明らかにされた（未発表）。このことは、CHO-K1 細胞の  $\alpha 5$  欠失変異体である CHO-B2 細胞が、フィブロネクチンだけでなくコラーゲンやラミニンに対しても接着性を示さないという結果と一致する。活性型ニューロプシンを作用させたフィブロネクチンに対する  $\alpha 5 \beta 2$  細胞の接着能は、不活性型ニューロプシン、およびニューロプシン未処理の場合と比較して、有意に減少した。フィブロネクチンは生体内では二量体を形成して存在しており、インテグリン、コラーゲンおよびヘパリンなどの様々なマトリックス中の分子と結合している（25）。これは、ニューロプシンがフィブロネクチンの両端を切断することによって、細胞とフィブロネクチンの接着性だけでなくその他の細胞外マトリックスとの接着性を変化させる可能性があることを示唆する。

フィブロネクチンの発現が脳内において記憶や学習に重要と考えられている海馬に局在し、神経活動依存的に増加するという報告がある（26）。一方、ニューロプシン mRNA の発現は、in situ hybridization において海馬に限局した強い陽性シグナルとして認められる（8, 27）。また、キンドリング刺激によってニューロプシン mRNA の発現が増大することも知られている（28）。このように、フィブロネクチンとニューロプシンの発現が共に海馬に認められ、神経活動に依存して発現量が協調的に変化することは、これらの分子が神経の可塑的变化に関与している可能性を強く示唆する。さらに、1 つの可能性として、神経の可塑的变化の際に、本研究において見られたような細胞のマトリックス蛋白質に対する接着性の減弱という現象が、神経細胞においても同様に生じている可能性は十分に考えられる。

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、御指導頂いた塩坂貞夫教授、吉田成孝助教授、加藤啓子助手、松本-宮井-和政助手、ならびに松浦成昭教授（大阪大学医学部）に深謝致します。

## 引用文献

1. Gumbiner, B.M. 1996. Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell* 84, 345-357.
2. Lauffenburger, D.A., and Horwitz, A.F. 1996. Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell* 84, 359-369.
3. Regen, C.M., and Horwitz, A.F. Dynamics of  $\beta 1$  integrin-mediated adhesive contact in motile fibroblasts. *J. Cell Biol.* 119, 1347-1359.
4. Seeds, N.W., Siconolfi, L.B., and Haffke, S.P. 1997. Neuronal extracellular proteases facilitate cell migration, axonal growth, and pathfinding. *Cell Tissue Res.* 290, 367-370.
5. Stetler-Stevenson, W.G., Aznavoorian, S., and Liotta, L.A. 1993. Tumor cell interactions with the extracellular matrix during invasion and metastasis. *Annu. Rev. Cell Biol.* 9, 541-573.
6. Pepper, M.S., Montesano, R., Mandriota, S.J., Orci, L., and Vassalli, J.D. 1996. Angiogenesis: a paradigm for balanced extracellular proteolysis during cell migration and morphogenesis. *Enzyme Protein.* 49, 138-162.
7. Matrisian, L.M., and Hogan, B.L. 1996. Growth factor-regulated proteases and extracellular matrix remodeling during mammalian development. *Curr. Top. Dev. Biol.* 24, 219-259.
8. Chen, Z.L., Yoshida, S., Kato, K., Momota, Y., Suzuki, J., Tanaka, T., Ito, J., Nishino, H., Aimoto, S., Kiyama, H., and Shiosaka, S. 1995. Expression and activity-dependent changes of a novel limbic serine protease gene in the hippocampus. *J. Neurosci.* 15, 5088-5097.
9. Suzuki, J., Yoshida, S., Chen, Z.L., Momota, Y., Kato, K., Hirata, A., and Shiosaka, S. 1995. Ontogeny of neuropsin mRNA expression in the mouse brain. *Neurosci. Res.* 23, 345-351.

10. Kirkwood, A., Dudek, S.M., Gold, J.T., Aizenman, C.T., and Bear, M.F. 1993. Common forms of synaptic plasticity in vitro. *Science* 260, 1518-1521.
11. Schuman, E.M., and Madison D.M. 1994. Locally distributed synaptic potentiation in the hippocampus. *Science* 263, 532-536.
12. Dudek, S.M., and Bear, M.F. 1992. Homosynaptic long-term depression in area CA1 of hippocampus and effects of N-methyl-D aspartate receptor blockade. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 4363-4367.
13. Mulkey, R.M., and Malenka, R.C. 1992. Mechanisms underlying induction of homosynaptic long-term depression in area CA-1 of the hippocampus. *Neuron* 9, 967-975.
14. Mcnamara, O. 1988. Pursuit of the mechanisms of kindling. *Trends. Neurosci.* 11, 33-36.
15. Chen, Z.L., Momota, Y., Kato, K., Taniguchi, M., Inoue, N., Shiosaka, S., and Yoshida, S. 1998. Expression of neuropsin mRNA in the mouse embryo and the pregnant uterus. *J. Histochem. Cytochem.* 46, 313-320.
16. Inoue, N., Kuwae, K., Ishida-Yamamoto, A., Iizuka, H., Shibata, M., Yoshida, S., Kato, K., and Shiosaka, S. 1998. Expression of neuropsin in the keratinizing epithelial tissue-immunohistochemical analysis of wild-type and nude mice. *J. Invest. Dermatol.* 110, 923-931.
17. Shimizu, C., Yoshida, S., Shibata, M., Kato, K., Momota, Y., Matsumoto, K., Shiosaka, T., Midorikawa, R., Kamachi, T., Kawabe, A., and Shiosaka, S. 1998. Characterization of recombinant and brain neuropsin, a plasticity-related serine protease. *J. Biol. Chem.* 273, 11189-11196.
18. Watt, F.L., and Hodivala, K.J. Cell adhesion. Fibronectin and integrin knockouts come unstuck. *Curr. Biol.* 4, 270-272.
19. George, E.L., Baldwin, H.S., and Hynes, R.O. 1997. Fibronectin are essential for heart and blood vessel morphogenesis but are dispensable for initial specification of

- precursor cells. *Blood* 90, 3073-3081.
20. Hynes, R.O. 1990. *Fibronectins*. Springer Series in Molecular Biology ( Edited by Rich A. ), Springer, New York, pp. 1-538.
21. Zhang, Z., Vouri, K., and Ruoslahti, E. 1995. The alpha5beta1 integrin supports survival of cells on fibronectin and up-regulated Bcl-2 expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 6161-6165.
22. French-Constant, C. 1995. Alternative splicing of fibronectin-many different proteins but few different function. *Exp. Cell Res.* 221, 261-271.
23. Schreiner, C. L., Bauer, J. S., Danilov, Y. N., Hussein, S., Sczekan, M. M., and Juliano, R. L. 1989. Isolation and characterization of Chinese hamster ovary cell variants deficient in the expression of fibronectin receptor. *J. Cell. Biol.* 109, 3157-3167.
24. Takebe, Y., Seiki, M., Fujisawa, J-I., Hoy, P., Yokota, K., Arai, K-I., Yoshida, M., and Arai, N. 1988. SRa promoter: an efficient and versatile mammalian cDNA expression system composed of the simian virus 40 early promoter and the R-U5 segment of human T-cell leukemia virus type 1 long terminal repeat. *Mol. Cell. Biol.* 8, 466-472.
25. Mosher, D.F., and Furcht, L.T. 1981. Fibronectin: review of its structure and possible functions. *J. Invest. Dermatol.* 77, 175-180.
26. Hoffman, K.B., Pinkstaff, J.K., Gall, C.M., and Lynch, G. 1988. Seizure induced synthesis of fibronectin is rapid and age dependent: implications for long-term potentiation and sprouting. *Brain Res.* 812, 209-215.
27. Scoville, W.B., and Milner, B. 1957. Loss of memory after bilateral hippocampal lesions. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.* 20, 11-21.
28. Okabe, A., Momota, Y., Yoshida, S., Hirata, A., Ito, J., Nishio, H., and Shiosaka, S. 1996. Kindling induces neuropsin mRNA in the brain. *Brain Res.* 728, 116-120.

## 2 腫瘍細胞におけるインテグリン $\alpha 5$ 発現量の 腎転移率に対する影響

## 序論

医療技術が発展した今日においても、癌はなお治療困難な疾患の 1 つである。治療を困難にしている最大の要因は、癌の転移性にある。原発巣は外科的に切除することが可能であるが、術後数年以上経過した後に発見される転移による再発が、最終的な死因となる場合が少なくない。転移には、血行性転移、リンパ行性転移、播種性転移の 3 種類がある。リンパ行性転移および播種性転移は、原発巣の位置から転移部位が予測できるため、ある程度まで治療可能と思われる。一方、血行性転移は、原発巣を手術で完全にに取り除いた場合でも、すでに血管に侵入した癌細胞があれば生じうる現象であり、癌の治療を困難にしている大きな要因の 1 つである。従って、血行性転移のメカニズムを分子レベルで明らかにし抗転移薬の開発を目指すことが、患者の延命および QOL の向上という観点から期待されてきた。

臨床の現場では、以前から腫瘍の転移には原発巣の部位によって転移しやすい臓器があることがよく知られており、転移の臓器特異性と呼ばれている。この現象を説明する 2 つの理論が提唱されてきた。イギリスの乳癌外科医であった Paget が 1889 年に 1 つの理論を提唱した。植物の種は様々な土壌に植えることができるが、発育、成長に適した環境が整った条件においてのみ成長することができる。癌の転移においても、同様に癌の転移に適した微小環境を備えた臓器にのみ転移するという考え方である。これは、seed and soil theory と呼ばれている(1)。一方、1928 年に Ewing が、癌の転移は血流の方向によって規定されるという考え方を提唱した。これは、mechanical theory(2) と呼ばれている。現在では、血流と微小環境の相互作用の結果、転移が成立すると考えられている。腫瘍の転移は、原発巣からの細胞の離脱、細胞外マトリックス中の浸潤、血管内への侵入、免疫細胞による攻撃の回避、血管壁への接着と血管外への浸潤、および転移部位における増殖という複数の複雑な過程を経て成立することが知られている。研究手法の発達により、seed and soil theory に関わる分子が具体的に明らかにされてきた。その 1 つとして、接着分子の関与を示唆する研究結果が報告された。B16-F10 メラノーマ細胞と細網細胞肉腫細胞の *in vitro* および *ex vivo* における接着性が、*in vivo* における転移の臓器特異性と一致するという報告(3, 4)、また特定の臓器に対して選択的転移能をもつ癌細胞は、その臓器由来の血管内皮細胞に強く接着するという報告(5, 6)がある。また、特定の臓器由来の内皮細胞に特異的に発現する接着分子が存在することも報告されている。Lu-ECAM-1 と呼ばれる接着分子は、肺由来の血管内皮細胞のみに発

現する(7). これらのことから、各臓器内の血管内皮細胞または細胞外マトリックス中に、癌の転移臓器を規定する分子または蛋白質が存在する可能性が示唆される。従って、接着分子は癌細胞と血管内皮、または癌細胞と細胞外マトリックスの相互作用を媒介する重要な機能を担っていると考えられる。

インテグリンは、 $\alpha$  および  $\beta$  サブユニットからなる膜貫通型の糖蛋白質であり、細胞-細胞外マトリックスおよび細胞-細胞間接着に関与している接着分子である(8).  $\alpha$  と  $\beta$  の組み合わせによって、細胞外マトリックス蛋白質に対するリガンド選択性が規定されている(9). 転移形成を導く腫瘍の進展におけるインテグリンの役割を明らかにする目的で、現在までに癌患者由来の正常細胞と癌細胞、原発巣と転移巣間におけるインテグリンの発現量の差異が、PCR、*in situ* hybridization、または免疫組織学的手法を用いて検討されてきた。

形質転換細胞におけるインテグリンの発現量と分布の変化は、形質転換細胞の表現形に対して様々な影響を与えることが知られている。例えば、 $\alpha 5\beta 1$  インテグリンは、少なくともメラノーマ、骨肉腫、および神経膠芽腫細胞の浸潤に重要であり、 $\alpha V\beta 3$  インテグリンの発現は、腫瘍の浸潤能の亢進に重要であるという報告がある(10). 細胞表面におけるフィブロネクチン受容体の分布が、培養ヒト正常細胞の悪性形質転換において変化する(11). 幾つかの齧歯類細胞のサルコーマウイルスによる形質転換において、 $\alpha 3\beta 1$  発現レベルが一定であるのに対して、 $\alpha 5\beta 1$  は細胞表面から消失する(12). メラノーマ細胞において、 $\alpha 2\beta 1$ 、 $\alpha 3\beta 1$ 、および  $\alpha 6\beta 1$  インテグリンの発現量が、悪性度に関連して変化する(13, 14, 15, 16). 乳癌細胞においては、 $\alpha 2\beta 1$ 、 $\alpha 5\beta 1$ 、 $\alpha 6\beta 4$  インテグリンが悪性形質転換に重要である(17, 18, 19, 20). 正常膵臓における腺細胞や膵管上皮細胞では幾つかのインテグリンの低発現または未発現が認められるが、膵臓癌細胞株では、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$ 、 $\alpha 6$ 、 $\beta 1$ 、 $\beta 4$ 、および  $\beta 5$  の発現量の増大が認められる(21). 以上のように、腫瘍細胞の悪性形質転換といった表現形の変化において、インテグリン発現がどのように変動するかという問題に関して多くの報告がある。これらのヒト組織または癌細胞株を用いた研究は、癌細胞の表現形の変化に伴ったインテグリン発現の変動をありのままに観察することができるという利点をもつ一方で、複数のインテグリン分子の発現が変動した場合、細胞の表現形変化に対してどのインテグリン分子の発現変化が最も重要であったのかを同定し難いという問題があった。

また、これとは別の戦略として、インテグリンの発現を遺伝子の改変により変化させた癌細胞やマウスを用いて、腫瘍原性や転移性に対するインテグリン発現の影響を調べる研究も行われている。インテグリン  $\alpha 2$  サブユニットをコ

ードする cDNA を横紋筋肉腫細胞にトランスフェクトした細胞を用いて、ヌードマウスにおいて実験転移を行うと、血行性転移が増大する(22).  $\alpha 4$  cDNA をトランスフェクトした CHO 細胞を用いてヌードマウスにおいて実験転移を行うと、骨転移が生じる. また、この骨転移は、癌細胞上の  $\alpha 4\beta 1$  と骨髄ストローマ細胞上の VCAM-1 との相互作用によって生じると推測されている(23). CHO-K1 細胞は、インテグリンの中でも主に  $\alpha 5\beta 1$  を発現している細胞であるため(未発表)、外来性に発現させたインテグリン分子が、内在性のインテグリンと干渉しにくいという利点を持っている. 今回我々は、 $\alpha 5\beta 1$  を様々なレベルで発現する CHO 細胞のトランスフェクタントを作成し、ヌードマウスによる自然転移実験を行った. 実験に際して、特に腫瘍細胞における  $\alpha 5\beta 1$  の発現量の変化にともない、特定臓器への転移率がどのように変動するかという点に着目した.

## 材料と方法

### 細胞と培養条件

Chinese hamster ovary 由来の fibrosarcoma である CHO-K1 細胞を、親株として使用した(ATCC, VA, USA). CHO-B2 細胞は、インテグリン  $\alpha 5\beta 1$  を発現している CHO-K1 細胞から選抜された  $\alpha 5$  欠失変異体である(24). SR $\alpha$  promoter (25) の下流に連結された ヒト $\alpha 5$  cDNA をインサートにもつ pBJ-1 ベクターを用いて、トランスフェクタントを作製した.  $\alpha 5$  発現細胞は、フローサイトメトリーによるソーティングとジェネチシン(G418, SIGMA-JAPAN)耐性を指標に選抜した.  $\alpha 5B2$  細胞は、 $\alpha 5/pBJ-1$  ベクターを CHO-B2 細胞にトランスフェクトしたものである.  $\alpha 5CHO$  細胞は、 $\alpha 5/pBJ-1$  ベクターを CHO-K1 細胞にトランスフェクトしたものである.  $\alpha 5B2F187A$  細胞は、フィブロネクチンに対する接着に重要である  $\alpha 5$  鎖の 187 番目のフェニルアラニンをアラニンに置換した変異をもつ  $\alpha 5$  cDNA を導入したトランスフェクタントである. 細胞は、10 % 牛胎児血清 (FBS, 大日本製薬)、50 units/ml ペニシリン-50  $\mu\text{g/ml}$  ストレプトマイシン (GIBCO, NY, USA) を含むダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM, 日本製薬) を用いて、10 %  $\text{CO}_2$  存在下で維持した.

### フローサイトメトリー解析

1 % FBS、0.03 % アジ化ナトリウムを含む DMEM に懸濁した細胞に、抗ヒト/ハムスター  $\alpha 5$  モノクローナル抗体(KH72)を 4 °C で 30 分反応させた. 上記の DMEM で細胞を洗浄した後、FITC 標識抗マウス IgG 抗体 (DAKO, Copenhagen, Denmark) を 4 °C で 30 分反応させた. 再度、細胞を洗浄した後、DMEM に懸濁し FACSCalibur (BD Biosciences, CA, USA) を用いて解析した.

### 免疫沈降とイムノブロット

細胞表面蛋白質を EZ-Link Sulfo-NHS-Biotin (PIERCE, IL, USA) キットのプロトコールに従って、ビオチン化した. 蛋白質を可溶化バッファー (10 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 % Triton, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, および 1 mg/ml Pepstatine A) に溶解した. 溶解物に抗  $\alpha 5$  モノクローナル抗体 (KH72) 80 倍希釈を 4 °C で 4 時間作用させた後、proteinG-sepharose (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) を 4 °C で 4 時間作用させた. ビーズを可溶化バッファーで 3 回洗浄し、サンプルバッファーに懸濁した後 100 °C で 5

分間加熱した。サンプルを SDS-7.5 % ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、ニトロセルロースメンブレンに転写した。メンブレンを 5 % スキムミルクに 4 °C で一晩浸漬した後、horseradish peroxidase 標識ストレプトアビジン (DAKO, Copenhagen, Denmark) 3000 倍希釈を室温で 4 時間作用させた。メンブレンを 3 回洗浄した後、陽性シグナルを ECL キット (Amersham, Uppsala, Sweden) を用いて検出した。

#### ヌードマウスを用いた自然転移モデル

ヌードマウス (BALB/cAnNCrj-nu/nu, 4 週齢, メス) 1 匹あたり、 $1 \times 10^6$  個の細胞をマウスの背側皮下に接種した。1 週間に 2 回の割合で皮下に形成された原発巣の長径、短径、および高さを測定し、(長径) x (短径) x (高さ) x 0.52 式を用いて体積を算出した。腫瘍からの出血によるマウスの死亡を避けるために、原発巣の体積が 2500 から 3500 mm<sup>3</sup> に達した時点で、原発巣を切除した。接種後 7 から 8 週経過した時点で、マウスを屠殺し転移臓器を検索した。また、接種後 5 日経過したマウスに GRGDS または GRGES ペプチドを 20 mg/kg の濃度で 1 日おきに接種し、転移抑制実験を行った。

#### 組織学的解析

解剖したマウスから肺と腎臓を摘出し、10 % ホルマリンで固定した。組織をパラフィン包埋した後、6 μm 厚の切片を作成した。この切片をヘマトキシリン・エオジンによって染色し、顕微鏡下で転移の有無を検索した。

#### 接着実験

10 μg/ml の濃度で PBS に懸濁したフィブロネクチンを、96 ウェルプラスチックプレートの各ウェルに加え、37 °C、2 時間インキュベートすることによってコートした。フィブロネクチン溶液を吸引後、3 % BSA を加え 1 時間インキュベートし、細胞の基質に対する非特異的接着を阻害した。ネガティブコントロールとして、3 % BSA を使用した。BSA 溶液を吸引後、0.1 % BSA 含有無血清 DMEM に懸濁した細胞を、1 ウェルあたり  $5 \times 10^4$  個加え、37 °C で 1 時間インキュベートした。DMEM を除去した後、0.04 % クリスタルバイオレット溶液を加え、室温で 10 分間インキュベートした。各ウェルを PBS で 3 回洗浄した後、tritonX-100 を加え、細胞内に取り込まれたクリスタルバイオレットを培養液中に溶出させた。DW で溶液を希釈した後、550 nm の吸光度を測定した。

### 細胞伸展実験 ( Cell Spreading Assay )

10  $\mu\text{g/ml}$  のフィブロネクチンを用いて上記と同様の方法でコートした 96 ウェルプラスチックプレートに、0.1 % BSA 含有無血清 DMEM に懸濁した細胞を 1 ウェルあたり  $5 \times 10^3$  個加え、37  $^{\circ}\text{C}$  で 3 時間インキュベートした。顕微鏡下でスライドフィルムに撮影した画像をコンピューターに取り込み、NIH image ( National Institutes of Health, MD, USA ) 画像解析ソフトウェアを用いて、細胞接着により伸展した面積を算出した。3 % BSA を用いてコートした場合を、ネガティブコントロールとした。

### 遊走実験

可溶性フィブロネクチンに対する細胞の遊走能を、multiwell Boyden chambers ( Neuro Probe, MD, USA ) を用いて評価した。ポリカーボネートメンブレン ( pore size 8  $\mu\text{m}$  ) を 10  $\mu\text{g/ml}$  の濃度で PBS に懸濁したフィブロネクチン溶液中に室温で 30 分間浸漬した後、風乾した。メンブレンをチャンバーにセットした後、チャンバーの下層にケモアトラクタントとして、10  $\mu\text{g/ml}$  のフィブロネクチンを懸濁した 0.1 % BSA 含有無血清 DMEM を加えた。フィブロネクチンを含まない 0.1 % BSA 無血清 DMEM で満たしたウェルを、ネガティブコントロールとして使用した。チャンバーの上層には同様の無血清 DMEM に懸濁した細胞を、1 ウェルあたり  $2 \times 10^4$  個加えた。チャンバーを 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5 %  $\text{CO}_2$  下で 3 時間インキュベートした後、メンブレンの上面に残った細胞を綿棒で除去した。メンブレンをホルマリンで固定し、ヘマトキシリン染色を行った。メンブレンの下面へ抜けた細胞数を、顕微鏡下で計測した。

### 組織を用いた接着実験

細胞の腎組織に対する接着性を検討するために、Stamper-Woodruff assay を行った(24)。マウスから摘出した腎臓を、迅速に液体窒素で凍結し、1 回の実験において同じ腎臓から作成した 10 mm 厚の連続切片を、スライドグラスにマウントしたものを使用した。ベクターをトランスフェクトした CHO-B2 および  $\alpha 5\text{B}2$  細胞  $10^6$  個を、1 ml の 10 % FBS 含有 DMEM に懸濁し、1 mM BCECF-AM DMSO 溶液 ( Wako Pure Chemical Industries, Ltd. ) 3  $\mu\text{l}$  を加え、室温で 30 分インキュベートし細胞を蛍光標識した。過剰な BCECF を PBS で洗浄し、細胞を 10 mM HEPES ( pH 7.4 ) に懸濁した。1  $\times 10^6$  細胞/ml HEPES の濃度で懸濁した細胞に対し、200  $\mu\text{g/ml}$  の GRGDS または GRGES ペプチドを

予め 4 °C、30 分作用させた。細胞懸濁液 100  $\mu$ l を、ワックスペンで囲んだ組織切片上加え、低回転 (60 rpm) の遠心下で室温、30 分間インキュベートした。結合しなかった細胞を PBS で洗浄した後、3 % グルタルアルデヒドで固定した。組織切片を propidium iodide によって核染色し、PBS で洗浄した。切片を風乾し、糸球体に結合している細胞数を共焦点レーザー顕微鏡 (LSM-GB200, OLYMPUS) を用いて計測した。

#### 統計解析

ヌードマウスによる転移実験において、細胞間の転移率の有意差を検定するために  $\chi^2$  検定を用いた。接着実験における統計解析には、Kruskal-Wallis ANOVA を用いた。  $P < 0.05$  を有意とみなした。

## 結果

### 各 CHO 細胞における $\alpha 5$ の発現量

CHO-K1 細胞、 $\alpha 5$  欠失変異体および、 $\alpha 5$  トランスフェクタントにおける  $\alpha 5$  の発現量を、フローサイトメトリーを用いて解析した(Fig. 1, a).  $\alpha 5$  サブユニットと結合することが知られている  $\beta 1$  サブユニットは  $\beta 1$  のみであるため、フローサイトメトリーを用いて調べた  $\alpha 5$  の発現量を、 $\alpha 5\beta 1$  の発現量とみなすことができる. CHO-K1 細胞に  $\alpha 5$  cDNA をトランスフェクトした  $\alpha 5$ CHO 細胞が、最も高い  $\alpha 5\beta 1$  の発現量を示した. CHO-B2 細胞に  $\alpha 5$  cDNA をトランスフェクトした  $\alpha 5$ B2 細胞は、内在性のレベルで  $\alpha 5$  を発現している CHO-K1 細胞よりも高い発現量を示した.  $\alpha 5$  欠失変異体である CHO-B2 細胞は、 $\alpha 5$  を発現していないことが確認できた.  $\alpha 5$  分子内にアミノ酸置換をもつ  $\alpha 5$ B2F187A 細胞は、 $\alpha 5$ B2 細胞とほぼ同じレベルの  $\alpha 5$  発現量を示した. 外来性の  $\alpha 5$  サブユニットが CHO 細胞に内在性の  $\beta 1$  と細胞膜上で結合しているかどうかを調べるために、ビオチン化した細胞表面蛋白質に対して抗  $\alpha 5$  モノクローナル抗体を用いて免疫沈降を行った. 沈降した蛋白質を SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動した結果、CHO-B2 以外の細胞で 150 kD ( $\alpha 5$ ) と 100 kD ( $\beta 1$ ) のバンドを検出した(Fig. 1, b).  $\alpha 5$  欠失変異体である CHO-B2 細胞では、100 kD ( $\beta 1$ ) のバンドは認められなかった. これは、外来性の ヒト  $\alpha 5$  サブユニットが  $\beta 1$  と細胞膜上で特異的に結合していることを意味する.

### *in vivo* における原発巣の増殖と *in vitro* における細胞増殖

細胞をヌードマウスに皮下接種した後、腫瘍のサイズを 1 週間に 2 回計測した(Fig. 2, a). 原発巣の増殖速度に関しては、以前に報告されたとおり CHO 細胞における  $\alpha 5$  の発現量と逆相関性を示した(27). すなわち、 $\alpha 5$  の発現量が高いほど、腫瘍の増殖性は遅くなった.  $\alpha 5\beta 1$  の発現量が最も高い  $\alpha 5$ CHO 細胞は、原発巣自体を形成しなかった. これは、遅い増殖性を示す細胞は、Tリンパ球以外の好中球やナチュラルキラー細胞の攻撃により細胞死に至る細胞の割合が、増殖細胞の割合よりも優位になるためではないかと考えられる. 一方、*in vitro* において細胞増殖性を検討した結果、 $\alpha 5$  の発現が高い細胞ほど増殖性が遅くなるという *in vivo* と同じ結果が得られた(未発表).

ヌードマウスにおける自然転移モデルを用いた転移臓器の検索および転移率の

## 変化

腫瘍細胞における  $\alpha 5$  の発現量が転移臓器や転移率にどのように影響するかを明らかにするために、ヌードマウスにおける自然転移モデルを用いて各 CHO 細胞の転移臓器および転移率を調べた (Table 1). 肺転移は  $\alpha 5$  CHO 細胞以外のすべての細胞を接種したマウスにおいて高頻度に見られ、CHO-K1(mock) 細胞で 100 %、 $\alpha 5$  欠失変異体である CHO-B2(mock) 細胞で 90.4 %、 $\alpha 5$  トランスフェクタントである  $\alpha 5$ B2 細胞で 89.4 % であった. このように、本実験系における肺転移率は、 $\alpha 5$  の発現量の変化に関連して変動していないことから、CHO 細胞に発現している  $\alpha 5\beta 1$  とフィブロネクチンの相互作用の結果生じた可能性よりも、毛細血管へ細胞が物理的に捕捉されたために生じた可能性が高いと考えられる. 副腎とリンパ節への転移率は、いずれの細胞においても 0 から 30 % という低頻度であった. これらの部位への転移率は、各 CHO 細胞間における  $\alpha 5$  の発現量の変化とは無関係であった. 一方、腎臓への転移率は  $\alpha 5$  の発現量の変化と一定の規則性が認められた.  $\alpha 5$  を発現していない CHO-B2 細胞と  $\alpha 5$  分子内にアミノ酸置換をもつ  $\alpha 5$ B2F187A 細胞を接種したヌードマウスでは、腎転移は認められなかった.  $\alpha 5\beta 1$  を内在性に発現している CHO-K1 細胞を接種したヌードマウスでは、22.7 % から 27.7 % の割合で腎臓に転移が認められた. CHO-K1 細胞より  $\alpha 5$  の発現量が高い  $\alpha 5$ B2 細胞を接種したヌードマウスでは、30 から 50 % の高頻度で腎臓への転移が観察された. 最も  $\alpha 5$  の発現量が高く最も遅い増殖性を示す  $\alpha 5$  CHO 細胞を接種したマウスでは、原発の皮下腫瘍自体が形成されなかったため、転移も生じなかった. これらの結果は、ヌードマウスにおいて見られた腎転移が、腫瘍細胞に発現している  $\alpha 5\beta 1$  と腎臓内に存在するフィブロネクチンとの相互作用によって生じた可能性を示唆する. さらに、 $\alpha 5$ B2 細胞をマウスへ皮下接種した後、尾静脈からの定期的なペプチド投与を伴う転移抑制実験を行った. GRGDS ペプチド投与群における腎転移率は 10 % であったのに対して、コントロールである GRGES ペプチド投与群における腎転移率は 42.1 % であり、GRGDS ペプチド投与により有意に腎転移形成が抑制された ( $p < 0.05$ ). また、GRGDS ペプチド投与は、腎臓以外の臓器への転移率に対して影響を与えなかった. これらのことから、 $\alpha 5$ B2 細胞に発現している  $\alpha 5\beta 1$  と腎臓内のフィブロネクチンとの接着が、腎転移形成に重要な役割を果たしていると考えられた.

## ヌードマウスにおける腎転移の解剖学、組織学的所見

腎転移を形成したヌードマウスを、肉眼解剖した状態を Fig. 3, a に示した.

矢頭は  $\alpha 5\beta 2$  細胞を接種したヌードマウスの右側腎臓に形成された転移巣を示している。さらに、写真のマウスには、右側副腎への転移も認められる。腎臓内へ侵入した細胞が、最初に腎臓のどの部位に留まって転移巣を形成し始めるのかを明らかにするために、腎臓から作成した組織切片をヘマトキシリン・エオジンで染色し、微小転移の形成部位を検索した。腎転移が認められたすべてのヌードマウスにおいて、腎転移は腎臓の皮質領域に形成されていた(Fig. 3, b 矢頭)。さらに、皮質領域の微小転移を検索した結果、発見できた微小転移はすべて糸球体に認められた。このことから、本実験で見られた腎転移は、CHO 細胞に発現している  $\alpha 5\beta 1$  と腎臓の糸球体内に存在するフィブロネクチンの接着によって生じた可能性が高いと考えられた。

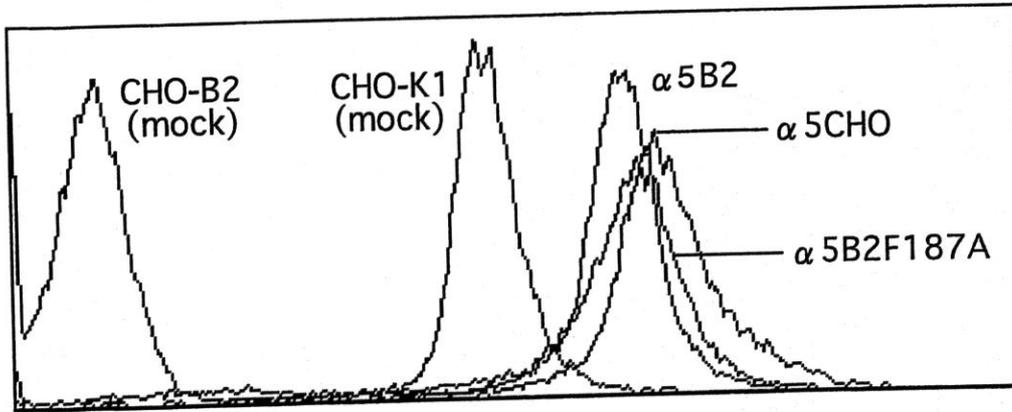
#### CHO 細胞のフィブロネクチンに対する接着能および遊走能

ヌードマウスにおいて見られた腎転移の成立過程において、各細胞がフィブロネクチンに対して示す接着性と遊走性のどちらが重要な要素であったのかを推測するために、*in vitro* の系を用いて細胞のフィブロネクチンに対する接着能と遊走能を評価した。フィブロネクチンをコートした 96 ウェルプラスチックプレートを使用して接着実験を行った結果、 $\alpha 5\beta 1$  を発現していない CHO-B2 細胞と  $\alpha 5$  分子内にアミノ酸置換をもつ  $\alpha 5\beta 2F187A$  細胞がフィブロネクチンに対して接着性を示さなかった。その他の細胞では  $\alpha 5\beta 1$  の発現量の増大に比例して、接着能の亢進が見られた(Fig. 4, a)。細胞伸展実験においても、 $\alpha 5\beta 1$  の発現量の増大に比例して、細胞のフィブロネクチンに対する接着面積が増大するという同様の結果が得られた(Fig. 4, b)。原発巣から離脱した腫瘍細胞が侵入する血管の血清中には、 $300 \mu\text{g/ml}$  という高濃度の可溶性フィブロネクチンが存在することが知られている(28)。各 CHO 細胞が可溶性フィブロネクチンに対して示すケモタキシス能を評価することによって、腫瘍細胞における  $\alpha 5\beta 1$  の発現量が細胞の血管侵入に及ぼす影響をある程度推測できると考え、細胞遊走実験を行った。その結果、細胞の接着、伸展実験の場合と異なり、内在性の  $\alpha 5\beta 1$  を発現する CHO-K1 細胞が、フィブロネクチンに対して最も高い遊走性を示した(Fig. 4, c)。このことは、基質上での細胞の移動速度は、前方での基質に対する細胞接着を伴うフィロポディア、ラメリポディアの伸展と、後方での基質からの脱着という相反する 2 つの出来事の相互作用によって規定されるという報告と一致する(29, 30, 31)。腎転移率は、原発巣を形成しない  $\alpha 5\text{CHO}$  細胞以外の細胞において、CHO 細胞のフィブロネクチンに対する遊走能の変化より、むしろ接着能の変化に比例して変動していることが明らかとなった。

### $\alpha 5\beta 2$ 細胞の腎臓組織切片に対する接着と GRGDS ペプチドによる接着阻害

腎転移が、主に CHO 細胞上の  $\alpha 5\beta 1$  と糸球体内のフィブロネクチンとの相互作用によって生じたものであるのかどうかを検討するために、液体窒素により凍結した腎臓から作成した切片を用いて接着実験を行った。実験の結果、皮質領域内において糸球体に対する腫瘍細胞の接着以外に尿細管に対する接着も認められた。動物を用いた転移実験では見られなかった尿細管に対する接着が生じた原因は、腫瘍の転移過程における接着が、本来血管を經由した細胞によって起こる現象であるのに対して、本実験では組織上に直接細胞を播いたことに帰因すると考えられる。従って、糸球体に接着した  $\alpha 5\beta 2$  細胞の数のみを計測することによって、細胞の接着性を評価した。共焦点レーザー顕微鏡下で撮影した腎組織上における細胞接着の様子を、Fig. 5, A に示した。また、糸球体 1 個あたりの接着細胞数を、Fig. 5, B に示した。実験の結果、 $\alpha 5\beta 1$  を発現していない CHO-B2 細胞が糸球体に対する接着性を示さなかったのに対して、 $\alpha 5\beta 1$  を発現する  $\alpha 5\beta 2$  細胞は有意に接着性の亢進を示した。また、 $\alpha 5\beta 2$  細胞の糸球体に対する接着は、ネガティブコントロールである GRGES ペプチド添加によって変化しなかったが、GRGDS ペプチド添加によって有意に抑制された ( $p < 0.0001$ )。これらの結果から、マウスによる転移実験において認められた糸球体の微小転移は、腫瘍細胞が発現している  $\alpha 5\beta 1$  と糸球体内のフィブロネクチンとの相互作用の結果生じたものであることが強く示唆された。

a



b

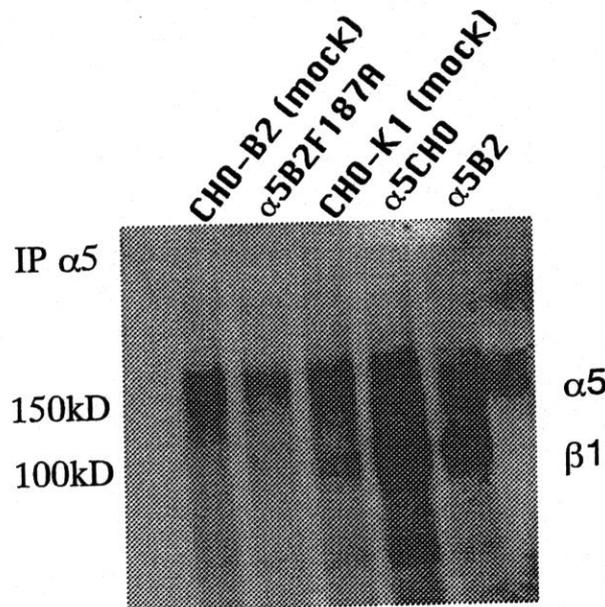


Fig. 1. a, Flowcytometric analysis of  $\alpha 5$  expression on CHO. Human and chinese hamster  $\alpha 5$  was detected by mAb KH72 on each CHO cell. CHO-K1 cells expressed  $\alpha 5$  at endogenous level and CHO-B2,  $\alpha 5$  defective mutant, did not express  $\alpha 5$ . Among three transfectants of  $\alpha 5B2$ ,  $\alpha 5B2F187A$ , and  $\alpha 5CHO$ ,  $\alpha 5$  CHO cells showed the highest expression of  $\alpha 5$ . b, Immunoprecipitation of surface biotinylated cell lysates with mAb KH72. In four CHO cells ( $\alpha 5B2F187A$ , CHO-K1,  $\alpha 5CHO$ , and  $\alpha 5B2$ ) except CHO-B2,  $\beta 1$  subunits were co-precipitated with  $\alpha 5$  whereas in CHO-B2 cells,  $\alpha 5$  defective mutants,  $\beta 1$  subunits were not seen.

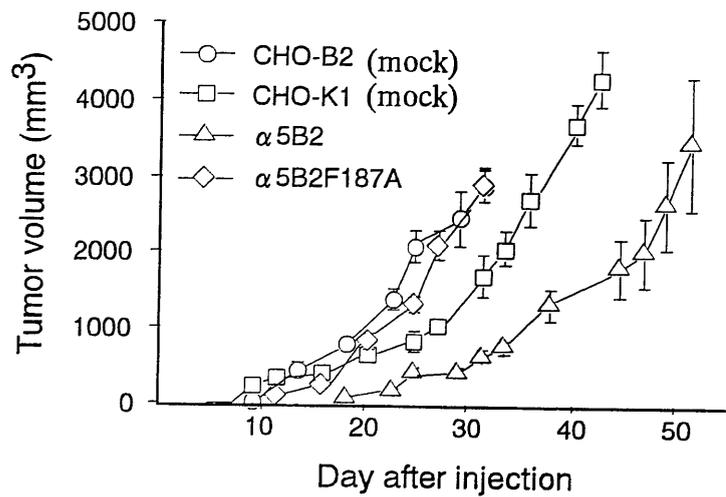


Fig. 2 Growth of primary tumor in nude mice. Each growth curve shows primary tumor volume of nude mice inoculated subcutaneously with CHO cells. The growth of tumor volume was reversely correlated with  $\alpha 5$  expression level on CHO cells. In nude mice inoculated with  $\alpha 5$ CHO cells, no primary tumor was observed. Each value shows the mean  $\pm$  S.E. (n=8).

Table 1 Metastasis formation of CHO and their transfectants inoculated subcutaneously into nude mice

Cells and treatments	No. of mice analysed	% Lung	% Kidney	% Adrenal	% Lymph node
CHO-B2 ( mock )	21	90.4	0	19	9.5
CHO-K1 ( mock )	22	100	22.7 *	27.2	13.6
α5B2	19	89.4	47.3 ***	21	10.5
α5CHO	10	—	—	—	—
α5B2F187A	13	100	0	15.3	23
CHO-B2	23	91.3	0	21.7	8.6
CHO-K1	18	88.8	27.7 *	27.7	11.1
α5B2 clone1	10	100	30 *	20	10
α5B2 clone2	10	90	50 **	30	0
α5B2 + GRGDS	20	90	10 *	20	10
α5B2 + GRGES	19	100	42.1	21	10.5

NS

Mice were sacrificed 7 to 8 weeks after inoculation. In metastasis inhibition experiment using GRGDS or GRGES peptide, 20 mg/kg peptide had been administered to mouse every other day since 5 days after inoculation. Since α5CHO did not develop primary tumor, metastasis site were not formed. The  $\chi^2$  analysis shows that there is a significant difference compared with the metastasis rate of CHO-B2 (\* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001). The values of α5B2+GRGDS treatments were assessed in the  $\chi^2$  analysis compared with that of α5B2+GRGES treatments.

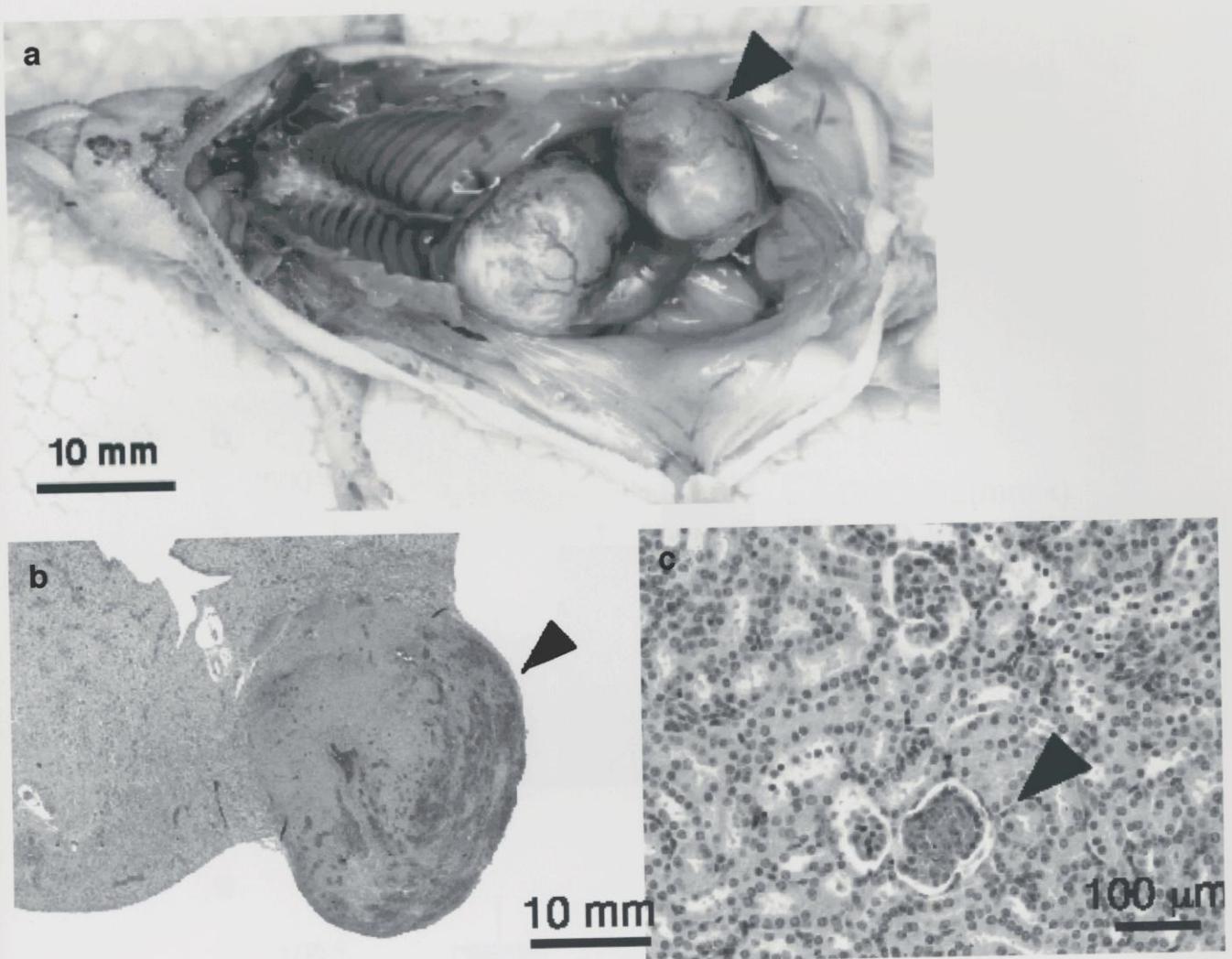


Fig. 3 Macroscopic and microscopic findings of the kidney metastasis shown in nude mouse inoculated with  $\alpha 5B2$  cells. a, A nude mouse with the kidney metastasis caused by  $\alpha 5B2$  inoculation. An arrowhead shows the metastasis site in the right kidney, this mouse also had the adrenal metastasis. b, Hematoxylin-and-eosin(HE)-stained section of tumor (arrowhead) in the kidney. All kidney metastases were found in the kidney cortex region. c, HE stained section of micrometastasis(arrowhead) developed in the kidney glomerulus. The lower glomerulus formed a micrometastasis site caused by  $\alpha 5B2$  whereas the upper glomerulus was normal.

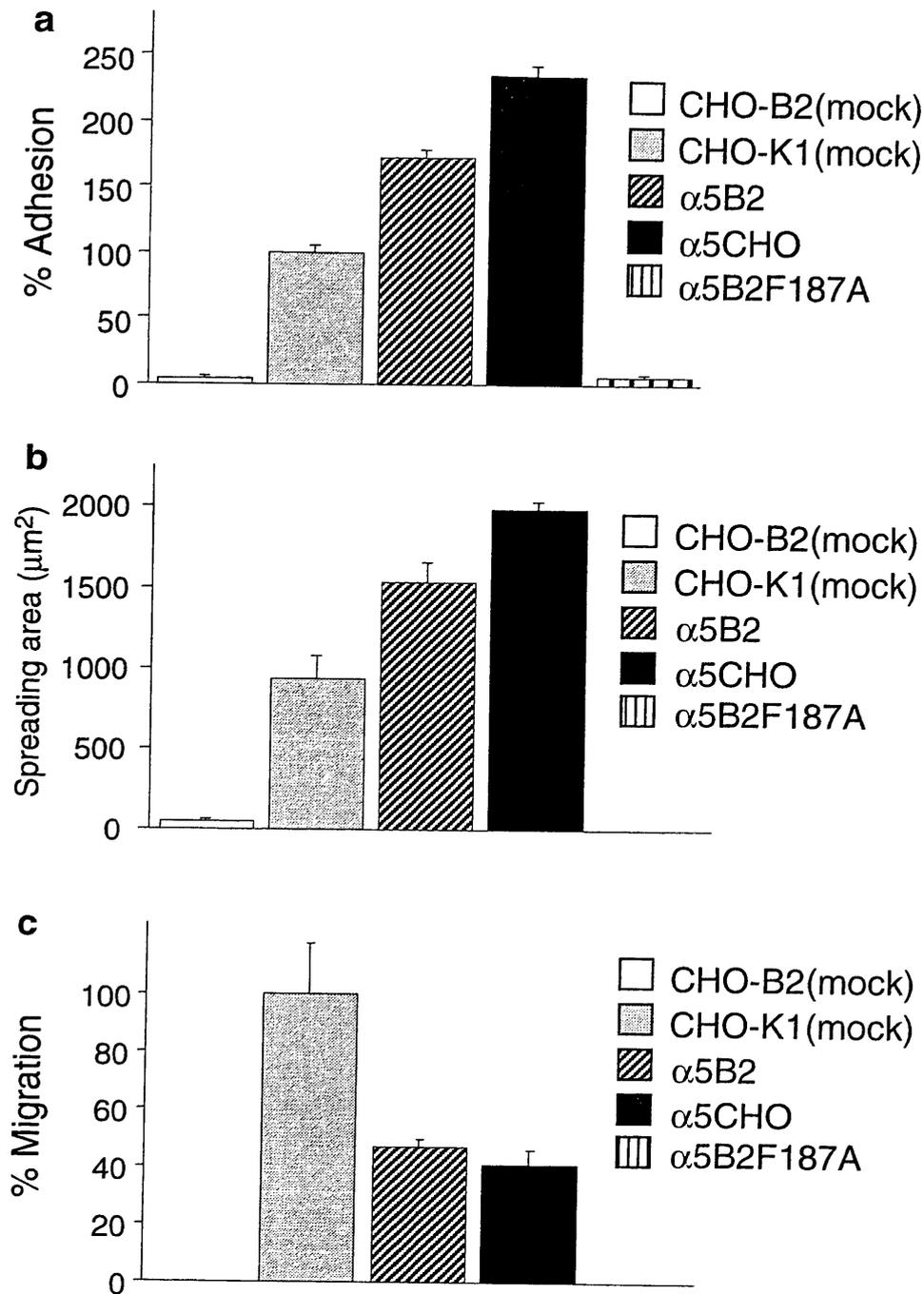


Fig. 4. Adhesion and migration of CHO cells to fibronectin. a, Adhesion assays demonstrating adhesion activities to fibronectin of each CHO cell depended on  $\alpha$ 5 expression level.  $5 \times 10^4$  cells/well in serum-free DMEM containing 0.1 % BSA were plated on fibronectin(10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) and incubated for 1 hr at 37  $^\circ\text{C}$ . Cells binding to fibronectin which were stained with crystal violet were assessed by measuring optical density at 550 nm. Results are expressed as the percentage compared with CHO-K1(mock). Each value is the mean  $\pm$  S.E. of triplicate data representative for three independent experiments. b, Spreading assay quantifying increased binding area in cell adhesion to fibronectin compared with cell spreading on BSA. Each cell in serum free DMEM containing 0.1 % BSA were plated on fibronectin(10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) and incubated for 3 hr at 37  $^\circ\text{C}$ . Each value is the mean  $\pm$  S.E. of 20 cells randomly selected. The same results were obtained in two independent experiments. c, Boyden chamber assay evaluating migration activity of each CHO to soluble fibronectin. Chamber with  $10^5$  cells/well in the upper chamber and 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  fibronectin in the lower chamber was incubated for 3 hr at 37  $^\circ\text{C}$  in 10 %  $\text{CO}_2$ . The number of cells migrating to the lower side of the filter was assessed as percentage compared with CHO-K1 (mock). Each value is the mean  $\pm$  S.E. of triplicate data representative for three independent experiments.

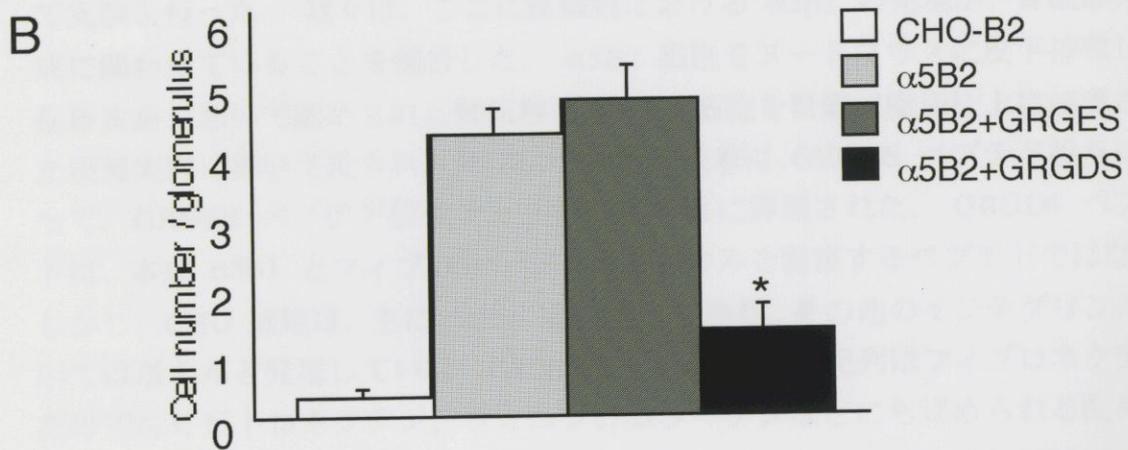
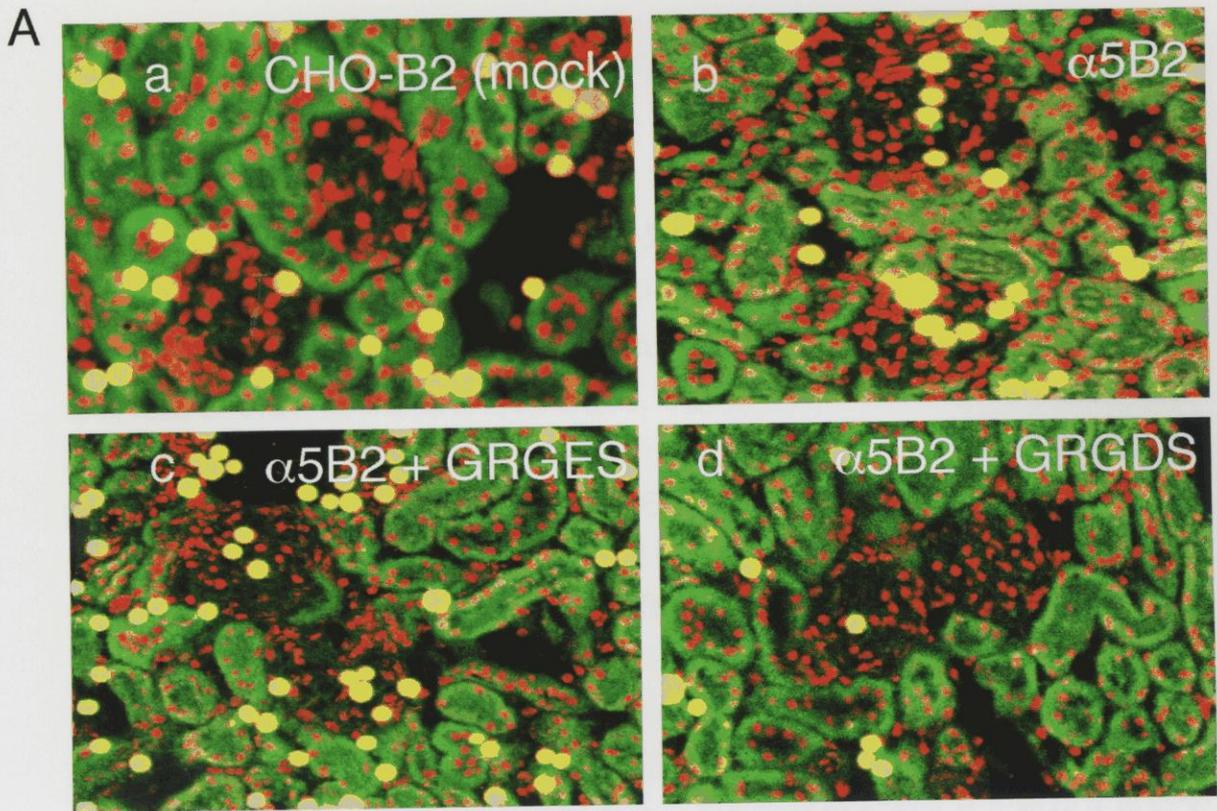


Fig. 5 Effects of GRGDS peptide on adhesion of  $\alpha 5B2$  cells to the glomerulus in the kidney section. a. Laser microscopic appearance of adhesion assay on the kidney section.  $10^5$  cells/section were incubated for 30 min with gentle rotation. a, CHO-B2 cells (yellow spots),  $\alpha 5$  defective mutant, slightly adhered to the glomerulus (red spots). b,  $\alpha 5B2$  cells which were  $\alpha 5$  transfectants effectively adhered to the glomerulus. c, Adhesion of  $\alpha 5B2$  cells to the glomerulus were not changed by administration of 200  $\mu\text{g/ml}$  GRGES peptide. d, Adhesion of  $\alpha 5B2$  cells to the glomerulus was inhibited by administration of 200  $\mu\text{g/ml}$  GRGDS peptide. B. Cell number per glomerulus ( $n=20$ ). Note that adhesion of  $\alpha 5B2$  cells with GRGDS treatment to the glomerulus was significantly inhibited as compared with GRGES treatment (\*  $p < 0.0001$ ).

## 考察

本研究において、我々は  $\alpha 5\beta 1$  インテグリンを様々なレベルで発現する CHO 細胞を作成し、癌細胞における  $\alpha 5\beta 1$  の発現と転移の臓器特異性の関係を調べた。これまでも、癌細胞に発現する  $\alpha 5\beta 1$  の腫瘍原性または転移性に対する影響に関しては、幾つか報告されてきた。癌細胞上の  $\alpha 5\beta 1$  の発現量は、腫瘍原性と逆相関性を示す(27, 32)。さらに、p53 をノックアウトすることにより腫瘍を自然発生させたマウスにおいて、さらに  $\alpha 5$  を欠失またはフィブロネクチンを欠失させても、腫瘍原性および転移性に変化は認められない(33)。しかしながら、 $\alpha 5$  を癌細胞に過剰発現させた場合に、転移性がどのように変化するのかという点に関しては未だに不明であった。さらに過去の報告から、癌細胞における  $\alpha 5\beta 1$  の発現によって、癌細胞の表現形は正常様に近づくため、癌の転移過程においてもおそらく  $\alpha 5\beta 1$  発現の影響は少ないであろうと考えられてきた。従って本研究では、特に  $\alpha 5\beta 1$  を様々なレベルで過剰発現させた細胞を用いて転移実験を行った場合に、転移率がどのように変化するのかという点に着目して実験を行った。我々は、ここに癌細胞における  $\alpha 5\beta 1$  の発現が、腎転移の形成に関わっていることを報告した。 $\alpha 5\beta 2$  細胞をヌードマウスに皮下接種した転移実験において認められた腎転移と、 $\alpha 5\beta 2$  細胞を腎臓組織切片上に接着させた接着実験において見られた糸球体への細胞接着は、GRGDS ペプチド投与によって、GRGES ペプチド投与時と比較して有意に抑制された。GRGDS ペプチドは、本来  $\alpha 5\beta 1$  とフィブロネクチンの接着のみを阻害するペプチドではない。しかし、CHO 細胞は、主に  $\alpha 5\beta 1$  を発現しており、その他のインテグリンについてはほとんど発現していない(未発表)。また、RGD 配列はフィブロネクチンだけでなくピトロネクチン、ラミニン、コラーゲンなどにも認められる配列であるが、これらのマトリックス蛋白質の中で  $\alpha 5\beta 1$  のリガンドとしてはフィブロネクチンのみであることが知られている。従って、本実験において GRGDS ペプチドは、フィブロネクチンと CHO 細胞上の  $\alpha 5\beta 1$  の接着を特異的に阻害したと考えられる。また、血流の点から考えると、腎臓には心臓から全身へ向かって流れる血液量の 25% が流入するため(34)、血液中に入り込んだ癌細胞の多くが、腎臓内の糸球体に存在する毛細血管と相互作用すると思われる。このことは、ヌードマウスで見られた腎転移が、糸球体毛細血管へ物理的に捕捉されることによって生じた可能性があることを示唆する。しかしながら、本実験で使用した CHO-B2 細胞は、 $\alpha 5\beta 1$  インテグリンを発現しておらず、ヌードマ

ウスにおいて腎転移を形成しなかった。このことから、糸球体に認められた微小転移は、主に癌細胞に発現する  $\alpha 5\beta 1$  と糸球体中に存在するフィブロネクチンとの接着によって生じたことが推測できる。

自然転移実験において、 $\alpha 5\beta 1$  を発現していない CHO-B2(mock) 細胞と、最も高い発現レベルを示す  $\alpha 5$ CHO 細胞を接種したヌードマウスでは、腎転移の形成が認められなかった。一方、2 番目に高い発現量を示す  $\alpha 5$ B2 細胞を接種したマウスで 40%、内在性の  $\alpha 5\beta 1$  のみを発現する CHO-K1 細胞で 25% の割合で腎転移の形成が認められた(Table 1)。このことから、癌細胞が転移巣を形成するのに適したインテグリンの発現量が存在することが示唆された。原発巣では、 $\alpha 5\beta 1$  の発現量が低い癌細胞が、より早い増殖性を示すため、 $\alpha 5\beta 1$  の発現量が低いことは転移巣の形成にも優位に働くように見える。しかしながら、一旦癌細胞が血管内へ侵入すると、 $\alpha 5\beta 1$  の発現量がより高い癌細胞の方が、フィブロネクチンに対して容易に接着するため、転移巣を形成しやすいのではないかと考えられる。これらの現象の相互作用の結果、癌細胞における  $\alpha 5\beta 1$  の発現量と腎転移率の関係が、二相性を示したのかもしれない。これらのことから、将来的に臨床において、RGD 関連ペプチドや低分子化合物を用いてインテグリンをターゲットとした抗転移治療が行われる場合、癌細胞の細胞外マトリックスに対する接着を完全に阻害することが重要であると考えられる。不十分な接着阻害では、癌の転移を促進する可能性もあり得る。

癌細胞は、腎臓の糸球体中のフィブロネクチンとどのようにして相互作用するのであろうか。糸球体の血管基底膜に限らず、一般的に基底膜中のマトリックス蛋白質のうち主要なものは、コラーゲン、ラミニンでありフィブロネクチンは大量には存在しない(35)。従って、 $\alpha 5\beta 1$  を発現する CHO 細胞が、転移形成過程において糸球体の血管基底膜に直接接着することには困難があると思われる。糸球体の毛細血管は、一般的な血管と異なり特徴的な構造をしている。一般的な血管では、1 本の血管の外周を 1 枚の基底膜が覆っているのに対して、糸球体中の血管では複数の血管を束ねるように 1 枚の基底膜が存在している(36)。また、基底膜によって束ねられた血管の中心部にはメサンギウムと呼ばれる細胞が存在し、周囲にフィブロネクチンを豊富に含むマトリックス蛋白質を産生していることが知られている(37)。従って、糸球体の血管内に存在する癌細胞は、基底膜を浸潤することなく、内皮細胞のみを通過するだけでメサンギウム細胞が産生するフィブロネクチンと容易に接触することができると考えられる。一方、肺、副腎、およびリンパ節への転移率は、CHO 細胞における  $\alpha 5$  発現量の変化とは無関係であるように見える。これらの臓器では、毛細血管ま

たはリンパ管への癌細胞の物理的な捕捉に加えて、癌細胞が発現する  $\alpha 5\beta 1$  以外のインテグリンまたはインテグリン以外の分子の関与によって、転移が成立しているのかもしれない。

結論として、我々は本研究において癌細胞が発現する  $\alpha 5\beta 1$  の発現量の差異によって、腎転移率が二相性の変化を示すことを見いだした。臨床において、腎転移は現在、癌患者に生じる転移において必ずしも頻繁に見られる転移ではない。しかしながら、現在比較的頻繁に見られる骨や肝臓、肺、脳といった腎臓以外の臓器に対する転移の抑制、および治療成績の向上によって、将来的には腎転移を抑制する必要性が高くなる可能性は十分にあり得ると考える。

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、御指導頂いた大阪大学医学部の松浦成昭教授、東山繁樹助教授、河口直正助手、大岡嘉治助手ならびに奈良先端科学技術大学院大学の塩坂貞夫教授に深謝致します。

## 引用文献

1. Paget, S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. *Lancet*, 1: 571-573, 1898.
2. Ewing, J. A treatise on tumors. Third edition. Philadelphia : W. B. Saunders, 1928.
3. Nicolson, G. L., and Winkelhake, J. L. Organ specificity of blood-borne tumour metastasis determined by cell adhesion? *Nature*, 255: 230-232, 1975.
4. Netland, P. A., and Zetter, B. R. Organ-specific adhesion of metastatic tumor cells in vitro. *Science*, 224: 1113-1115, 1984.
5. Nicolson, G. L. Organ specificity of tumor metastasis: role of preferential adhesion, invasion and growth of malignant cells at specific secondary sites. *Cancer Metastasis Rev.*, 7: 143-188, 1988.
6. Pauli, B. U., and Lee, C. L. Organ preference of metastasis: the role of organ-specifically modulated endothelial cells. *Lab. Invest.*, 58: 379-387, 1988.
7. Zhu, D., Cheng, C. F., and Pauli, B. U. Mediation of lung metastasis of murine melanomas by a lung-specific endothelial cell adhesion molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 9568-9572, 1991.
8. Hynes, R. O. Integrins: versatility, modulation and signaling in cell adhesion. *Cell*, 69: 11-25, 1992.
9. Albelda, S. M., and Buck, C. A. Integrins and other cell adhesion molecules. *FASEB. J.*, 4: 2868-2880, 1990.
10. Ruoslahti, E. Control of cell motility and tumor invasion by extracellular matrix interactions. *Br. J. Cancer*, 66: 239-242. 1992.
11. Akiyama, S. K., Larjava, H., and Yamada, K. M. Differences in the biosyntheses and localization of the fibronectin receptor in normal and transformed cultured human cells. *Cancer Res.*, 50: 1601-1607, 1990.

12. Heino, J. Integrin-type extracellular matrix receptors in cancer and inflammation. *Ann. Med.*, 25: 335-342, 1993.
13. Chen, F. A., Repasky, E. A., and Bankert, R. B. Human lung tumor-associated antigen identified as an extracellular matrix adhesion molecule. *J. Exp. Med.*, 173: 1111-1116, 1991.
14. Moretti, S., Martini, L., Berti, E., Pinzi, C., and Giannotti, B. Adhesion molecule profile and malignancy of melanocytic lesions. *Melanoma Res.*, 4: 235-239, 1993.
15. Natali, P. G., Nicotra, M. R., Bartolazzi, a., Cavaliere, R., and Bigotti, A. Integrin expression in cutaneous malignant melanoma: association of the  $\alpha 3\beta 1$  heterodimer with tumor progression. *Int. J. Cancer*, 54: 68-72, 1993.
16. Natali, P. G., Nicotra, M. R., Cavaliere, R., Giannarelli, D., and Bigotti, A. Tumor progression in human malignant melanoma is associated with changes in  $\alpha 6\beta 1$  laminin receptor.
17. Natali, P.G., Nicotra, M.R., Botti, C., Mottolese, M., Bigotti, A., and Segatto, O. Change in expression of  $\alpha 6\beta 4$  integrin heterodimer in primary and metastatic breast cancer. *Br. J. Cancer*, 66: 318-322, 1992.
18. Pignatelli, M., Handy, A.M., and Stamp, G. W. Low expression of  $\beta 1$ ,  $\alpha 2$  and  $\alpha 3$  subunits of VLA integrins in malignant mammary tumors. *J. Pathol.*, 165: 25-32, 1991.
19. Zutter, M. M., Krigman, H.R., and Santoro, S. S. Altered integrin expression in adenocarcinoma of the breast: Analysis by in situ hybridization. *Am. J. Pathol.*, 142: 1439-1448, 1993.
20. Weaver, V. M., Petersen, O. W. Wang, F., Larabell, C. A., Briand, P., Damsky, C., Bissell, M. J. Reversion of the malignant phenotype of human breast cells in three-dimensional culture and in vivo by integrin blocking antibodies. *J. Cell. Biol.*, 137: 231-245, 1997.