

Ⅲ ヒト肺腺癌培養細胞株におけるマトリックス メタロプロテアーゼ(MMP)関連遺伝子発現の解析

Ⅲ.1 はじめに

癌の増殖・転移は1.原発巣の局所増殖および浸潤、2.脈管内侵襲、血行性移動またはリンパ行性移動、3.転移先での脈管外侵入、4.組織内浸潤・増殖という多段階の過程を経て成立する。しかしいづれにせよ癌細胞の浸潤・転移の第1歩は強固な細胞外基質の構造を破壊・分解することにある。

本研究第Ⅱ章においてヒト肺腺癌培養細胞株の生物学的特性を肺内での腫瘍形成率という点で3群に分類することができた。それぞれの群の培養細胞株には肺内腫瘍形成に関して共通する因子、例えば増殖や肺胞壁への接着・浸潤に関する物質が存在することが示唆される。肺癌細胞が肺胞壁に浸潤・増殖していくために必要なこの共通因子の解明のひとつとして肺癌細胞が肺胞壁に浸潤・増殖していくために必要な細胞外基質の構成成分であるⅣ型コラーゲンの分解酵素であるマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)に着目した。

細胞外基質の構成成分であるⅣ型コラーゲン分解酵素であるMMPの発現・活性化は乳腺、前立腺、胃・大腸、膵臓などの各種癌の浸潤・転移に深く関与していることが報告されてきた(45-47)。LiottaらによりⅣ型コラーゲナーゼ活性が基底膜浸潤能を有する癌細胞から発見され、さまざまな癌細胞においてその活性と転移性との間に高い相関性が認められている(48)。癌組織や癌細胞で発現されるMMPの種類は多彩であるが、Ⅳ型コラーゲナーゼ活性をもつ酵素として分子量が72kDのMMP-2および92kDのMMP-9が存在する。MMP-2はさまざまなヒト悪性腫瘍においてその発現が増強されていると報告されている(45, 49)。MMP-2および9は正常組織においてわずかに潜在型が発現しているだけであるが、癌組織において発現量

が著しく上昇し、活性型に変換されているという報告がある(50, 51)。癌組織におけるMMP-2および9の発現は癌細胞自身によるものと癌間質細胞(癌組織中の線維芽細胞やマクロファージ)によるものに大別される。癌間質細胞によるMMPの発現は組織修復反応や炎症反応に伴うものであり、癌細胞の基底膜浸潤も助長していると考えられているが、癌細胞の浸潤・転移には癌細胞自身の能動的なMMP発現と基底膜破壊が不可欠と考えられている。

III. 2 目的

肺腺癌培養細胞株の違いによる肺内腫瘍形成率の差にMMPの発現の有無が関連しているかどうかを明らかにすることを目的とした。本研究第2章においてヒト肺腺癌培養細胞株の同所性移植の結果から肺内の腫瘍形成率に差異を認めた9株(高形成率株2株、低形成率株5株、無形成株2株)のうち、高形成率株1株(A549培養細胞株)、低形成率株3株(PC-14培養細胞株・NCI-H322培養細胞株・NCI-H23培養細胞株)、無形成株1株(RERF-LC-KJ培養細胞株)について、癌細胞の浸潤・転移に関与するMMP関連遺伝子(各種癌における浸潤・転移に関与するとされているMMP-2、MMP-9とそれらの各活性化因子として知られているMT1-MMP、uPAおよび各阻害因子として知られているTIMP-2、TIMP-1)のノザンプロット法を用いたmRNAの発現解析を行い、腫瘍形成率、転移率とMMP関連遺伝子発現との関連を検討した。

III. 3 材料と方法

III. 3. 1 細胞培養

ヒト肺腺癌培養細胞の同所性移植実験において認めた高形成率株A549培養細胞株、低形成率株PC-14、NCI-H322およびNCI-H23各培養細胞株、無形成株RERF-LC-KJ培養細胞株の5培養細胞株について検討した。培養条件は同所性移植実験に準じた。

III. 3. 1. 2 ノザンブロット法

1. RNAの抽出：

それぞれの培養細胞がコンフルエントになった段階でTRIzol (Gibco BRL, Rockvill, MD, USA)を用いて全RNAの抽出を行い、濃度を測定した。

2. ヒトMT1-MMP, uPA, TIMP-2, TIMP-1, MMP-2およびMMP-9 cDNAプローブの作製：

ヒトMT1-MMP, uPA, TIMP-2, TIMP-1, MMP-2およびMMP-9 cDNAプローブは以下のプライマー配列を用いてPCR反応を用いて作製し、PCR生成物を $[\gamma\text{-}^{32}\text{p}]\text{dATP}$ (3000 Ci/mmol, Amersham Life Science Inc., Cleveland, OH, USA)により5'末端標識法で作製した。またコントロールとしてハウスキーピングジーンであるelongation factor (EF)を用いた。

MMP-2:

5' -catcaagggcattcaggag-3' および

5' -ttgctccagttaaaqggcggc-3'

MMP-9:

5' -gcgctcatgtaccctatgtacc-3' および

5' -cgatggcgtcgaagatgttcacg-3'

MT1-MMP:

5' -cacattaaggagctgggc-3' および

5' -cctcctcgtccacctcaat-3'

UPA:

5' -agaattcaccaccatcgaga-3' および

5' -atcagcttcacaacagtcac-3'

TIMP-2:

5' -ctggacgcttgaggaaaagaag-3' および

5' -tgcttatgggtcctcgatgac-3'

TIMP-1:

5' -cttccacaggtcccacaacc-3' および

5' -cagccctggctcccgaggc-3'

EF:

5' -ctggcttcactgctcag-3' および

5' -ctgagaagctctcaacacac-3'

3. 電気泳動:

20 μ gの全RNAを2.2 Mホルムアミドを加えた1%アガロースゲル上で電気泳動した。

4. ブロッキング:

電気泳動後のゲルから室温・16時間の条件でナイロンメンブレン上へRNAをブロッキングした。

5. ハイブリダイゼーション:

5'末端標識法で作製したヒトMMP-2、MMP-9、MT1-MMP、uPA、TIMP-2およびTIMP-1の各cDNAプローブをRNAをブロッキングしたナイロンメンブレンと42℃・16時間インキュベートし、ハイブリダイゼーションさせた。

6. 解析：

ハイブリダイゼーションさせたメンブレンを洗浄後、X線フィルムと-80℃下で16時間反応させた後、X線フィルムを現像し解析した。

III.4 結果(表4・図42)

5つのヒト肺腺癌培養細胞株におけるMMP関連遺伝子6分子のmRNA発現解析をノザンブロット法で行った結果を図42に示した。

レーン1：高形成率株A549培養細胞株、
レーン2：低形成率株PC-14培養細胞株、
レーン3：低形成率株NCI-H322培養細胞株、
レーン4：低形成率株NCI-H23培養細胞株、
レーン5：無形成株RERF-LC-KJ培養細胞株
である。

1. MMP-2：

高形成率株A549培養細胞株、低形成率株PC-14およびNCI-H322各培養細胞株において発現が認められたが、低形成率株NCI-H23培養細胞株と無形成株RERF-LC-KJ培養細胞株では発現が認められなかった。

2. MMP-9：

無形成株RERF-LC-KJ培養細胞株を除く4株において少量ではあるが発現が認められた。

3. MT1-MMP：

全例で発現が認められたが、無形成株RERF-LC-KJ培養細胞株では発現が他の培養細胞株よりも弱かった。

4. uPA：

全例で発現が認められ、特に高形成率株A549培養細胞株、低形成率株PC-14で強く発現を認めた。

5. TIMP-2：

低形成率株 PC-14 および NCI-H322 培養細胞株で発現を少量認めた。

6. TIMP-1 :

高形成率株 A549 培養細胞株、低形成率株 PC-14 および NCI-H23 各培養細胞株で発現を認めた。

III. 5 考察

MMPは細胞基底膜や間質結合組織を構成する細胞外マトリックスを分解する酵素であり、癌の浸潤・転移に関与していることが知られている。実際に各種癌の転移能とMMP活性には正の相関があるという報告がある(52)。癌組織や癌細胞で発現されるMMPの種類は多彩であるが、MMP-2、MMP-9は、正常組織においてわずかに潜在型が発現しているだけだが、癌組織において発現量が著しく上昇し、特異的に活性型に変換されているという報告がある(50, 51, 53)。肺癌においてはZuckerらは非小細胞肺癌培養細胞株の培養上清中のMMP-2、MMP-9、TIMP-1、TIMP-2の濃度と各培養細胞株の*in vitro*での増殖・浸潤・転移能との関連を検討し、浸潤・転移能の高い培養細胞株において、MMP-2の発現が高かったと報告している(54)。

本研究ではMMP-9、MT1-MMP、TIMP-1およびTIMP-2とマウス肺内の腫瘍形成率や転移率と関連は認められなかったが、MMP-2に関してはA549培養細胞株、PC-14培養細胞株とNCI-H322培養細胞株において発現が認められた。A549培養細胞株はマウス肺内に腫瘍を高率に形成し、またリンパ節転移を認めた培養細胞株である。PC-14培養細胞株は低形成率群であるがリンパ節転移を認めた培養細胞株である。NCI-H322培養細胞株は低形成率群だが肺内に多発性に腫瘍を形成した培養細胞株であり、これら3株はその他の低形成率群や無形成群の培養細胞株とは明らかにその性格を異にしている。臓器特異的(同所的)に腫瘍細胞を移植することつまり臓器に特異的な環境(微小環境)下での移植が腫瘍細胞の増殖や進展に必要であり、ヒト腎癌由来の培養細胞株やヒト大腸癌由来の培養細胞株において皮下移植と比較して同所性に移植した場合高率に他臓器への転移をおこし(27, 55)、一次腫瘍の組織におけるMMP-2の産生が皮下移植の腫瘍組織よりも増加したとい

う報告 (27, 56)や培養細胞にそれぞれの由来臓器の線維芽細胞の培養上清を加えることにより培養細胞におけるMMP-2の産生が増加したという報告もあり(56, 57)、微小環境における腫瘍細胞の増殖・浸潤・転移にMMP-2の発現が関係していることが考えられている。一方uPAについてはA549培養細胞株とPC-14培養細胞株に発現が高いことがわかった。これらの培養細胞株は他の培養細胞株と異なって肺内リンパ節転移をおこす特殊な培養細胞株であり、uPAも肺内リンパ節転移機構に関与している可能性を示していると考えられた。

本研究の結果よりMMP-2やuPAが肺腺癌培養細胞の肺内における腫瘍形成やリンパ節転移に関与している可能性があることやin vivoにおける肺腺癌培養細胞の浸潤・転移においてもこれらの分子が関与している可能性があると考えられた。もちろんMMPおよびMMP関連遺伝子以外にも数多くの浸潤・転移関連遺伝子が知られているが、今回用いた実験モデルを用いて特徴ある培養細胞株を選別あるいは樹立していけば多くの因子についての解析が可能になると考えられる。

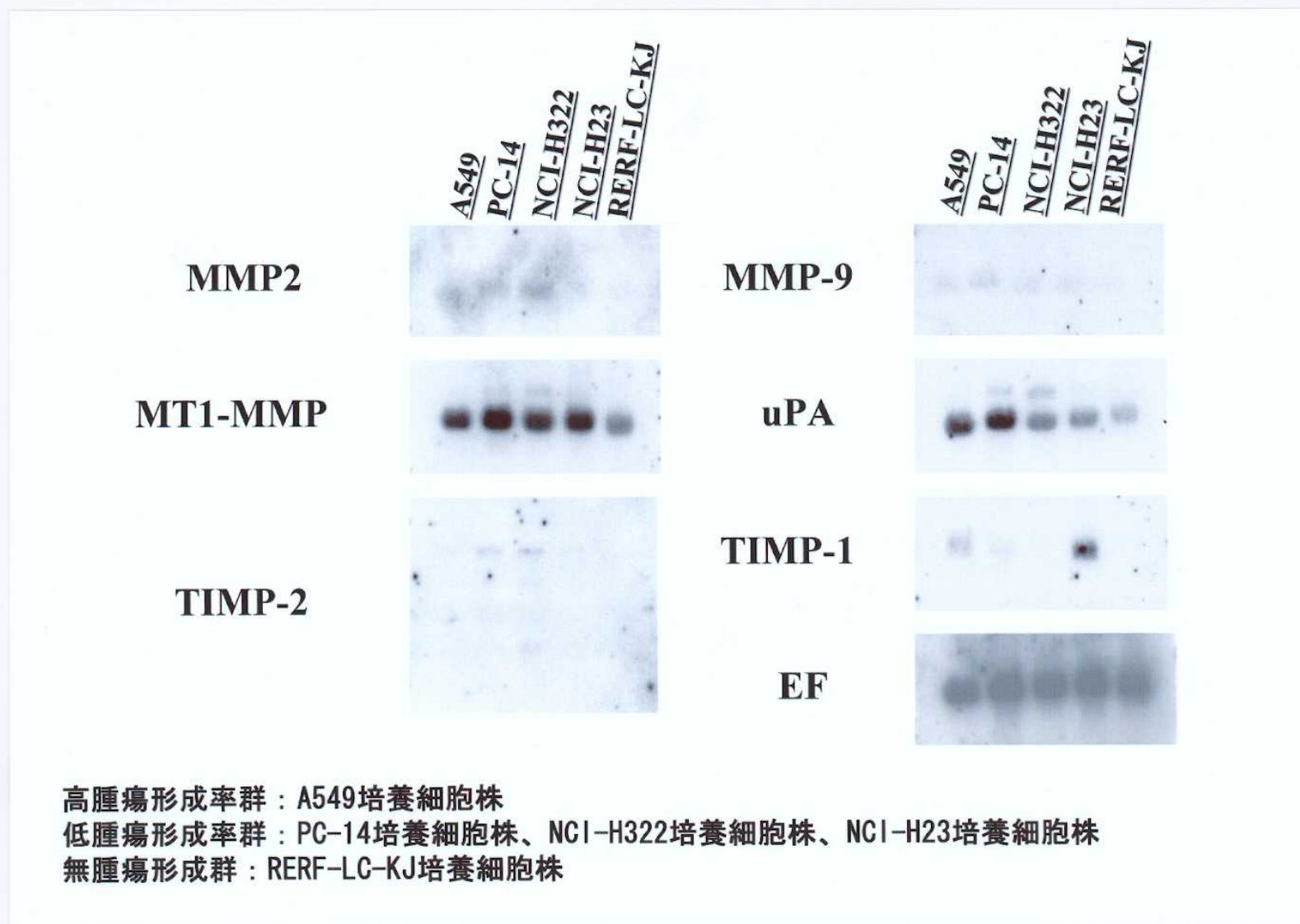


図 42. ノザンブロット法を用いたヒト肺腺癌培養細胞株における MMP 関連遺伝子の発現

表4. ヒト肺腺癌培養細胞株における MMP 関連遺伝子発現のノザンブロット法による検討

	A549	PC-14	NCI-H322	NCI-H23	RERF-LC-KJ
MMP-2	++	++	++	-	-
MMP-9	+	+	+	+	-
MT1-MMP	+++	+++	+++	+++	++
uPA	+++	+++	++	++	++
TIMP-2	-	+	+	-	-
TIMP-1	+	+	-	++	-

+++ : 強発現、++ : 中等度発現、+ : 弱発現