

学 位 論 文 題 名

肝癌細胞の浸潤・増殖と
urokinase type plasminogen activator

学位論文内容の要旨

I 緒 言

癌の転移が成立するには、いくつかの段階があるが、基底膜、細胞外マトリックスの破壊は一つのステップとされている。この過程でurokinase type plasminogen activator(u-PA)が関与していることが注目されている。u-PAはplasminogenをplasminに変換し、IV型コラーゲナーゼの活性化を介して基底膜、細胞外マトリックスを破壊するとされている。またu-PAのGドメインはEGFと高いホモロジーを示すためそれ自体細胞増殖作用を有することも報告されている。

肝細胞癌は著明に血管が増生し、高頻度に血管に浸潤する性格をもっている。また肝細胞癌患者の血中u-PAが高値を示すことが知られており、肝細胞癌の転移にu-PAの関与が推測される。そこで著者はin vitroで肝癌細胞を用いてu-PAの産生能と浸潤、増殖がいかなる関係を持つか検討した。

II 研究 方 法

1. 肝癌細胞株の培養

肝癌細胞株として北大医学部第一外科で樹立したHC-4と理化学研究所ジーンバンクから購入したHLE、HLFを使用した。培養液には10%FCS加RPMI1640を用い、37℃、5%CO₂で培養した。

2. 培養上清

各肝癌細胞株をフラスコに播種、単層培養しconfluentになったあと、PBSで3回洗浄後、無血清条件で48時間培養した。培養上清を遠沈し測定試料とした。同時にフラスコ内の細胞をトリパンブルー染色し、生細胞数を算定した。

3. u-PA、t-PA、PAI-1、2の測定

u-PA、PAI-1、PAI-2はTint Elize Kit(Biopool社製)を用いて測定した。t-PAはImmuri ze t-PA Kit(Biopool社製)を用いた。

4. Invasion assays

Transwell(Coster, 6.6mm diameter, 8μm pore size)を使用した。可溶性細胞外マトリ

ックス(Matrigel)を冷却した無血清のRPMI1640に希釈溶解し、蛋白濃度を $30\mu\text{g}/100\mu\text{l}$ に調整した。この希釈溶液 $100\mu\text{l}$ をTranswellのフィルターに被覆し使用した。

Transwellの上槽に 2×10^5 個/mlに調整した細胞浮遊液を $100\mu\text{l}$ 、下槽にはfibronectin $20\mu\text{g}/\text{ml}$ を含む10%FCS加RPMI1640を $600\mu\text{l}$ を加え、 37°C 、5% CO_2 で培養した。3日間培養後、上下の両槽の培養液をMTT溶液と交換し、3時間培養した。フィルター上面の非浸潤性細胞、フィルター下面およびTranswell下槽内に落下した浸潤性細胞をdimethylsulfoxideに溶解した。吸光度はEasy Readerで波長 540nm を用い測定した。Invasion Index(I.I)は、浸潤性細胞の吸光度を浸潤性細胞と非浸潤性細胞の吸光度の和で割り、100を掛けたものとし%で表した。

6. 検討項目

1) 無血清条件下の各細胞株のu-PA、t-PA、PAI-1、PAI-2産生能

2) 細胞増殖に伴う培養液中u-PA、t-PA、PAI-1、PAI-2濃度の変動

10%FCS加RPMI1640に浮遊させ、 1×10^5 個/mlに調整後1ウェルにつき細胞浮遊液各 1ml を入れた。1、2、3、4、5、6日後に生細胞数を算定し、増殖曲線を作成した。培養上清を測定試料とした。

3) 各細胞株のin vitroにおける浸潤能

4) 外因性u-PAの浸潤に対する影響

Transwellの上槽内へ酵素活性を有するtwo chain u-PA(ミドリ十字)を $0.5\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $1.0\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $5.0\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $10.0\mu\text{g}/\text{ml}$ 添加し、I.Iを測定した。

5) 外因性u-PAの細胞増殖に対する影響

各穴に 1×10^5 個/mlの10%FBS加RPMI1640の細胞浮遊液を 1ml ずつ入れ、24時間培養後two chain u-PAを $5.0\mu\text{g}/\text{ml}$ 含む1%FCS加RPMI1640と含まないものに交換し、1、2、3、4、5日後に生細胞数を算定した。

測定値は平均値 $\pm$ S.D.で表し、多群間の有意差検定には一元配置分散分析とScheffeの多重比較を用い、 $p<0.05$ を有意とした。

III 結 果

1. u-PA濃度はHLE、HLF、HC-4で、それぞれ $603.0\pm 7.9\text{ng}/\text{ml}/106$ 個、 $356.7\pm 10.1\text{ng}/\text{ml}/106$ 個、 $0\text{ng}/\text{ml}/106$ 個であった。t-PAは $1.90\pm 0.78\text{ng}/\text{ml}/106$ 個、 $2.03\pm 0.38\text{ng}/\text{ml}/106$ 個、 $0\text{ng}/\text{ml}/106$ 個であった。PAI-1はそれぞれ $2733.0\pm 72.3\text{ng}/\text{ml}/106$ 個、 $1378.3\pm 26.4\text{ng}/\text{ml}/106$ 個、 $24.7\pm 8.1\text{ng}/\text{ml}/106$ 個であり、PAI-2は $50.6\pm 2.5\text{ng}/\text{ml}/106$ 個、 $10.6\pm 0.6\text{ng}/\text{ml}/106$ 個、 $0\text{ng}/\text{ml}/106$ 個であった。u-PA、t-PA、PAI-1、PAI-2のいずれも一元分散分析で有意差を認めた。 $(P<0.0001, P=0.0043, P<0.0001, P<0.0001)$

2. いずれの増殖サイクルでもHLE、HLF、HC-4の順に有意に細胞あたりのu-PA、PAI-1産生能は高値を示した。

3. HLE、HLF、HC-4のI.Iは $30.1\pm 9.5\%$ 、 $18.8\pm 0.9\%$ 、 $11.0\pm 2.5\%$ であり、一元分散分析で有意差を認めた($p=0.015$)。Matrigelへの浸潤能はu-PA、PAI-1産生能に相関した。

4. HLEのI.Iはtwo chain u-PAの添加で変化しなかった。HLF、HC-4のI.Iは添加濃度が $0.5\mu\text{g}/\text{ml}$ から上昇し、一元分散分析で有意差があった($p<0.0001, P=0.0253$)

5. HLEは3日後のみ添加群が有意に多かった($P<0.05$)。HLFは1日後から有意に増殖が

抑制され、HC-4は3日後から増殖が抑制され始め、4日以降有意に抑制された。

IV 考 察

u-PAはplasmin、IV型コラーゲナーゼを介するほかに、癌細胞表面に露出したu-PA自身がproteaseとして細胞外マトリックスの破壊に関わっていると考えられている。

肝細胞癌での検討ではu-PA高産生性のHLEがもっとも高いMatrigel浸潤能を示したが、低産生性のHC-4の浸潤能は低かった。HLFのu-PA産生能はHLE、HC-4の間であり、浸潤能も中間であった。u-PA低産生性のHC-4を用いたInvasion assayでtwo chain u-PAを添加したところ、低濃度でもMatrigel浸潤能は上昇した。u-PA高産生性のHLEはu-PA添加により浸潤能はわずかに上昇したのに比し、HLFは低濃度から浸潤能が明らかに上昇した。これはHLEはすでに自身の産生するu-PAによって高い浸潤能を持っているためと考えられた。これらの結果からin vitroではu-PA産生能は肝癌細胞の浸潤能と密接な関係があることが明らかになった。

u-PAの細胞増殖効果はEGFの約28%にすぎないことから、今回の実験では明かな増殖効果を示さなかったものと考えられた。u-PA産生が低いHC-4、HLFがu-PAの添加により増殖が抑制された。その原因として、これらの細胞ではその阻害物質であるPAI-1、PAI-2の産生能が同様に低く、過剰なu-PAのproteolysisによって増殖が抑制された可能性もあり今後さらに検討する必要がある。

V 結 語

肝癌細胞についてin vitroにおけるu-PA産生能と、浸潤能を検討し以下のことが判明した。

1. 細胞あたりのu-PA産生能はHLE、HLF、HC-4の順に高値であった。
2. In vitro浸潤能はHLE、HLF、HC-4の順に高く、浸潤能はu-PA産生能の準に一致しておりu-PAが関与していることが示唆された。
3. two chain u-PA添加によりu-PA低産生性細胞株の増殖は抑制された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 内 野 純 一

副 査 教 授 葛 巻 暹

副 査 教 授 上 出 利 光

学 位 論 文 題 名

肝癌細胞の浸潤・増殖と

urokinase type plasminogen activator

urokinase type plasminogen activator(u-PA)はplasminogenをplasminに変換し、IV型コラーゲナーゼの活性化を介して基底膜、細胞外マトリックスを破壊するとされている。またu-PAのGドメインはEGFと高いホモロジーを示すためそれ自体細胞増殖作用を有することも報告されている。一方、肝細胞癌患者の血中u-PAが高値を示すことが知られており、肝細胞癌の転移にu-PAの関与が推測される。

本研究ではin vitroで肝癌細胞を用いてu-PAの産生能と浸潤、増殖がいかなる関係を持つか検討した。

研究方法

1) 肝癌細胞株の培養

肝癌細胞株として北大第一外科で樹立したHC-4と理化学研究所ジーンバンクから購入したHLE、HLFを使用した。培養液には10%FCS加RPMI1640を用い、37℃、5%CO₂で培養した。

2) 培養上清

各細胞株をフラスコに播種、単層培養しconfluentになったあと、PBSで3回洗浄後、無血清条件で48時間培養した。培養上清を遠沈し測定試料とした。同時にフラスコ内の生細胞数を算定した。

3) u-PA、t-PA、PAI-1、2の測定

u-PA、PAI-1、PAI-2はTint Elize Kit(Biopool社製)を用いて測定した。t-PAはImmurize t-PA Kit(Biopool社製)を用いた。

5) Invasion assays

Transwell(Coster, 6.6mm diameter, 8 μ m pore size)を使用した。可溶性細胞外マトリックス(Matrigel)を冷却した無血清のRPMI1640に希釈溶解し、蛋白濃度を30 μ g/100 μ lに調整した。この希釈溶液100 μ lをTranswellのフィルターに被覆し使用した。

Transwellの上槽upper compartmentに 2×10^5 個/mlに調整した細胞浮遊液を100 μ l、下槽にはfibronectin 20 μ g/mlを含む10%FCS加RPMI1640を600 μ lを加え、37℃、5%CO₂で培養した。3日間培養後、上下の両槽の培養液をMTT溶液と交換し、3時間培養した。フィルター上面の非浸潤性細胞、フィルター下面およびTranswell下槽内に落下した浸潤性細胞をdimethylsulfoxideに溶解した。吸光度はEasy Readerで波長540nmを用い測定した。Invasion Index(I.I)は、浸潤性細胞の吸光度を浸潤性細胞と非浸潤性細胞の吸光度の和で割り、100を掛けたものとし%で表した。

検討項目

1) 各細胞株のu-PA、t-PA、PAI-1、PAI-2産生能

2) 細胞増殖に伴う培養液中u-PA、t-PA、PAI-1、PAI-2濃度の変動

10%FCS加RPMI1640に浮遊させ、 1×10^5 個/mlに調整後1ウエルにつき細胞浮遊液各1mlを入れた。1、2、3、4、5、6日後に生細胞数を算定し、増殖曲線を作成した。培養上清を測定試料とした。

3) 各細胞株のin vitroにおける浸潤能

4) 外因性u-PAの浸潤に対する影響

Transwellの上槽内へ酵素活性を有するtwo chain u-PAを0.5 μ g/ml, 1.0 μ g/ml, 5.0 μ g/ml, 10.0 μ g/ml添加し、I.Iを測定した。

5) 外因性u-PAの細胞増殖に対する影響

各穴に 1×10^5 個/mlの10%FBS加RPMI1640の細胞浮遊液を1mlずつ入れ、24時間培養後two chain u-PAを5.0 μ g/ml含む1%FCS加RPMI1640と含まないものに交換し、1、2、3、4、5日後に生細胞数を算定した。

研究結果

1) u-PA濃度はHLE, HLF, HC-4で、それぞれ 603.0 ± 7.9 ng/ml/ 10^6 個、 356.7 ± 10.1 ng/ml/ 10^6 個、0ng/ml/ 10^6 個であった。t-PAは 1.90 ± 0.7

8ng/ml/ 10^6 個、 2.03 ± 0.38 ng/ml/ 10^6 個、0ng/ml/ 10^6 個であった。PAI-1はそれぞれ 2733.0 ± 72.3 ng/ml/ 10^6 個、 1378.3 ± 26.4 ng/ml/ 10^6 個、 24.7 ± 8.1 ng/ml/ 10^6 個であり、PAI-2は 50.6 ± 2.5 ng/ml/ 10^6 個、 10.6 ± 0.6 ng/ml/ 10^6 個、0ng/ml/ 10^6 個であった。u-PA、t-PA、PAI-1、PAI-2のいずれも一元分散分析で有意差を認めた。 $(P < 0.0001, P = 0.0043, P < 0.0001, P < 0.0001)$

2) いずれの増殖期でもHLE、HLF、HC-4の順に有意に細胞あたりのu-PA、PAI-1産生能は高値を示した。

3) HLE、HLF、HC-4のI.Iは $30.1 \pm 9.5\%$ 、 $18.8 \pm 0.9\%$ 、 $11.0 \pm 2.5\%$ であり、一元分散分析で有意差を認めた $(p = 0.015)$ 。Matrigelへの浸潤能はu-PA、PAI-1産生能に相関した。

4) HLEのI.Iはtwo chain u-PAの添加で変化しなかった。HLF、HC-4のI.Iは添加濃度が $0.5 \mu\text{g/ml}$ から上昇し、一元分散分析で有意差があった $(p < 0.0001, P = 0.0253)$

5) HLEは3日後のみ添加群が有意に多かった $(P < 0.05)$ 。HLF、HC-4は増殖が有意に抑制された。

以上より、浸潤能はHLE、HLF、HC-4の順に高く、u-PA産生能に相関しており、u-PAの添加により浸潤能が上昇したことからu-PAが肝癌細胞の浸潤に関与していることが示唆され、さらにu-PA産生能が低い細胞株はu-PA添加により増殖が抑制されることが示唆された。

審査にあたり、葛巻教授よりinhibitorであるPAI-1, PAI-2と浸潤能との関係について、上出教授より各細胞株のu-PA receptorの発現状況について、などの質疑があったが申請者は概ね妥当な回答を行った。

本研究では、u-PAは肝癌細胞株でも産生され、肝癌細胞の浸潤能に関与していること、u-PA低産生性細胞株の増殖はu-PAにより抑制されることを示唆した点で意義があり、博士（医学）の授与に値するものとする。