

—原 著—

## 転移能の異なるヒト肺腺癌株における血管新生能の差異

鄒 大同<sup>1</sup> 渋谷 昌彦<sup>2</sup> 篠田 欣也<sup>3</sup> 日比野 俊<sup>1</sup>  
松田久仁子<sup>1</sup> 竹中 圭<sup>1</sup> 弦間 昭彦<sup>1</sup> 工藤 翔二<sup>1</sup><sup>1</sup> 日本医科大学内科学第4教室<sup>2</sup> 東京都立駒込病院呼吸器内科<sup>3</sup> 国立国際医療センター呼吸器科The Difference of Angiogenesis in Human Lung Adenocarcinoma  
Cell Lines with Different Metastatic PotencyDatong Zou<sup>1</sup>, Masahiko Shibuya<sup>2</sup>, Kinya Shinoda<sup>3</sup>, Suguru Hibino<sup>1</sup>, Kuniko Matsuda<sup>1</sup>,  
Kiyoshi Takenaka<sup>1</sup>, Akihiko Gemma<sup>1</sup> and Shoji Kudoh<sup>1</sup><sup>1</sup>Fourth Department of Internal Medicine, Nippon Medical School<sup>2</sup>Respiratory Division of Internal Medicine, Tokyo Metropolitan Komagome Hospital<sup>3</sup>Department of Pulmonology, International Medical Center of Japan**Abstract**

We investigated the ability of angiogenesis in PC9/F9 cells (from a highly metastatic human lung adenocarcinoma cell line) as compared with PC9 cells (from a low metastatic human lung adenocarcinoma cell line). In vivo tumor growth assay using BALB/c nude mice (7 mice/group), showed that the tumor volume of PC9/F9 cells on day 35 ( $230.7 \pm 31.3 \text{ mm}^3$ ) was significantly larger than that of PC9 cells ( $90.9 \pm 24.7 \text{ mm}^3$ ) ( $p < 0.001$ ). However, there was no significant difference between PC9/F9 cells and PC9 cells in an in vitro growth assay. In a dorsal air sac assay (DAS assay) using ICR mice (3 mice/group), PC9/F9 cells ( $4.7 \pm 1.2$  vessels) showed stronger neovascularization in compared with PC9 cells ( $0.3 \pm 0.4$  vessels) ( $p < 0.05$ ). In an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and Western blotting analysis there were no significant differences between PC9/F9 cells and PC9 cells in the protein expression of vascular endothelial growth factor (VEGF). There was no significant difference between the gene expression levels of PC9/F9 cells and PC9 cells on cDNA array analysis. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) activity in PC9/F9 cells was remarkably stronger than that of PC9 cells in Gelatin Zymography.

From these results, we considered that of the increased metastasis of PC9/F9 cells might be induced by augmented angiogenesis. Furthermore, we speculated that the augmented angiogenesis of the highly metastatic PC9/F9 cell line might be induced by increased MMP-2 activity.

(J Nippon Med Sch 2004; 71: 181-189)

**Key words:** human lung adenocarcinoma cell line, angiogenesis, metastasis, VEGF, MMP-2

## 緒言

癌転移の分子機構を解明するために、これまでに、多くの研究すなわち転移実験モデルの開発<sup>1</sup>, 癌細胞の接着・浸潤能, 細胞外基質蛋白分解酵素活性, 細胞運動能, integrin の発現と機能, 転移臓器特異性の機序などに関する研究がなされてきた<sup>2,3</sup>.

我々も今までにヒト肺腺癌細胞株 (PC9) から, 高率に肺転移を来す高転移株 (PC9/F9) を樹立し, その高転移能獲得の機序の一つとして, integrin の発現と機能の変化が関与していることを報告してきた<sup>4</sup>.

癌の増殖と転移において, 血管新生が極めて重要な役割を果たしていることが 1970 年代の Folkman らの研究以降, しだいに明らかになってきている<sup>5,6</sup>. 現在, 新生血管の密度と癌細胞の種類との関係<sup>7</sup>, さらには, 血管内皮細胞に特異的に働き, 内皮細胞の増殖と管腔形成を促進する血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor: VEGF) や細胞外基質分解酵素 (matrix metalloproteinase: MMP) の血管新生促進作用に関する研究が進んでいる<sup>8-10</sup>. 最近, ヒトメラノーマ高転移株<sup>11</sup>, Lewis lung carcinoma (LLC) 高転移株<sup>12</sup>, mouse fibrosarcoma 高転移株<sup>13</sup>, ヒト高転移膀胱癌株<sup>14,15</sup>, その他乳癌, 前立腺癌, 大腸癌の高転移株<sup>16-18</sup> などを用いて, 高転移株における血管新生能の増強を示した報告がなされてきたが, ヒト肺癌高転移株についての研究報告はないのが現状である.

PC9/F9 細胞は当教室でヒト肺腺癌株 PC9 から樹立され, マウスで高率の肺転移が観察された<sup>4</sup>. 今回, 我々はこの二つの細胞株の転移能と血管新生能の関連性を解明するために, in vivo, in vitro 増殖能およびマウス背部皮下法 (dorsal air sac assay: DAS 法) を用いた血管新生能の差異を調べるとともに, 各々の細胞の MMP 活性と VEGF 産生能についても検討を加えた.

## 材料と方法

### 1. 細胞

ヒト肺腺癌細胞株 PC9 は東京医科大学(東京)で樹立され, RPMI 1640 (Immuno-Biological Laboratories, Gumma, Japan) + 10% fetal calf serum (FCS) (三菱化学, 東京) で培養された. PC9 細胞 ( $5 \times 10^5$ ) を BALB/c ノードマウスに尾静脈内投与し, 肺転移を形成させた後, 転移巣の癌細胞を培養系にて増殖させ, 再度, BALB/c ノードマウス尾静脈より投与す

るという操作を 9 回繰り返した. 肺転移を有するマウスの率は 1/7 から 7/7 に, 肺転移数は 0-1 から 8-34 に, 肺転移数中央値は 0 個から 16 個になり, 高転移能を有するヒト肺腺癌細胞株 (PC9/F9) が得られた. この細胞はヒト由来であることが Alu PCR で確認された<sup>4</sup>.

### 2. 動物

BALB/c ノードマウス, 5 週齢, 雌, (Clea Japan 社) を PC9 細胞と PC9/F9 細胞の in vivo 増殖能を検討するために使用した. ICR マウス, 5 週齢, 雌, (Clea Japan 社) を PC9 細胞と PC9/F9 細胞の背部皮下法による血管新生能の測定に使用した. この 2 種類の実験動物の使用に関しては, 日本医科大学動物実験論理委員会の許可を受けた.

### 3. in vivo における PC9 細胞と PC9/F9 細胞の増殖能の比較

BALB/c ノードマウス (5 週齢・雌) を 7 匹ずつ, PC9 群と PC9/F9 群に分け, 細胞移植 3 日前に natural killer (NK) 細胞活性を減弱させる目的で抗アシアロ GM1 抗体 (ダコジャパン, 京都) を 1.6 mg/ml の濃度で 0.3 ml (0.48 mg) 尾静脈から注射した.

$5 \times 10^6$  の PC9 細胞と PC9/F9 細胞をノードマウスの背部皮下に移植後, 経時的に移植腫瘍の長径と直交する短径を計測し, 「長径  $\times$  短径<sup>2</sup>/2」の式で体積を算出した.

### 4. in vitro における PC9 細胞と PC9/F9 細胞の増殖能の比較 [3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H tetrazolium bromide assay] (MTT assay)

10% FCS 含有 RPMI1640 で PC9 細胞と PC9/F9 細胞を各々  $1 \times 10^5$ /ml に調製し, 96 well plate に 8 well ずつ 200  $\mu$ l 細胞浮遊液を入れ, CO<sub>2</sub> インキュベーター (95% air, 5% CO<sub>2</sub>, 37°C) にて培養した. 翌日から連続 5 日間, 200  $\mu$ l 細胞浮遊液に 5 mg/ml MTT (Sigma, USA) 溶液を 20  $\mu$ l 添加後, 37°C, 4 時間培養し, 2,000 rpm で 5 分間遠沈して上清を除去後, ジメチルスルホキシド (DMSO) (和光純薬, 大阪) を 100  $\mu$ l 注入し, モデル 3500 マイクロプレートリーダー (BIO-RAD 社製) を用い, 測定波長 560 nm で吸光度を測定した<sup>19</sup>.

### 5. マウス背部皮下法 (dorsal air sac assay: DAS 法) による血管新生能の測定

DAS 法の基本手技及び効果判定は Oikawa らの方

法に従った<sup>20</sup>。動物はICRマウス(5週齢・雌)3匹ずつ、細胞はPC9とPC9/F9を使用した。

ミリポアリング(外径14 mm, 内径10 mm, 高さ2 mm, ミリポア社, Billerica, Massachusetts, USA)の両面にMFセメント(ミリポア社)でフィルター(ポアサイズ0.45  $\mu\text{m}$ , ミリポア社)を貼り、風乾後、エチレンオキサイドガスで滅菌した。phosphate buffered saline (PBS, 和光純薬, 大阪)でPC9細胞とPC9/F9細胞を各々 $6.67 \times 10^6/\text{ml}$ の濃度に調製し、0.15 ml(細胞数 $1 \times 10^6$ )を注射器でチャンバーに注入後、注入口をナイロン棒で閉鎖した。細胞注入後のチャンバーはPBS液で満たしたシャーレに入れ、移植まで氷冷した。

移植当日にマウスの尾根部周辺を剃毛、ネプターールで麻酔し、尾根部より注射器で空気を8 ml皮下に注入した。尾根部より頭側1.5 cm程度のところで皮膚を1.5 cm程度に水平切開し、チャンバーを背部まで挿入した。切開創はスキンステープラーで閉じた。

チャンバー移植7日目にマウスを同じ方法で麻酔し、背部を広く切開し、皮膚を剝離した。皮膚側のチャンバー接触部分にリングと同じ形のゴムパッキンを置き、顕微鏡で観察し、長さが2 mmを超える(ゴムパッキンの厚さが2 mmなので、それを長さの基準にした)蛇行彎曲している血管を新生血管として<sup>20</sup>、その数を調べた。

#### 6. Gelatin zymographyによるMatrix metalloproteinase (MMP) の測定

PC9とPC9/F9細胞を培養した後、細胞浮遊液を2,000 rpmで10分間遠沈した後、上清液を採取し、Centriplus Centrifugal Filter Devices(ミニポア社製)を使って、4,000 rpmでその上清液を限外濾過法で20倍に濃縮した。日本BIO-RADラボラトリーズ社製READY GELS J<sup>®</sup>ゲル(gelatin濃度1 mg/ml)を使用し、sample 20  $\mu\text{l}$ にsample buffer [0.125 M Tris-HCl pH 6.8(Sigma, USA), Sodium dodecylsulfate (SDS, MERCE, Germany) 4%, グリセリン 10%, Bromophenol blue(和光純薬, 大阪) 0.004%] 20  $\mu\text{l}$ を加え、電圧200 V, 電流50 mA, 室温で40分間泳動させ、sampleの酵素蛋白質を分離した。そして、2.5% Triton X-100溶液(Sigma, USA)で30分間2回、ゆっくりと振盪しながらゲルを洗浄し、SDSを取り除いて、分画時に変性した酵素を還元した。次に50 mM Tris pH 8.0(Sigma, USA), 5 mM  $\text{CaCl}_2$ (和光純薬, 大阪)溶液で10分間洗浄し、酵素反応液[50 mM Tris pH 8.0, 0.5 mM  $\text{CaCl}_2$ ,  $10^{-6}\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$ (和光

純薬)]を入れて37°C, 16時間インキュベートし、蛋白質分解を行った後、50  $\mu\text{M}$  Tris-HCl (pH 8.0) bufferで20分間洗浄して、1% クーマジューブルー(Sigma, USA)で20分間染色し、5% 酢酸, 10% メタノールで3時間脱色した。本方法によりバックグラウンドは青く染色されるが、MMPの存在する場所はgelatinが分解されたために染色性が減弱したバンドとして検出される。Standardsはhuman proMMP-2, MMP-2 and human MMP-9 (Chemicon, USA)を使い、0.1 mg/mlの濃度で、10  $\mu\text{l}$ にsample buffer 10  $\mu\text{l}$ を加えた。

#### 7. 酵素免疫測定法(ELISA)による細胞培養液中 VEGF の測定

VEGFの測定は一次抗体抗体としてrabbit anti-human antibodyを、二次抗体としてgoat anti-rabbit antibodyを用いるCytimmune Sciences社(USA)製ACCUCYTE Human VEGFキットを使用した。PC9細胞とPC9/F9細胞を24時間培養した後、96 well plateの各々8 wellに200  $\mu\text{l}/\text{well}$ の培養上清を入れ、マニュアルに従って遂行した。最後にColor Reagentを入れて、前述したBIO-RAD 3550マイクロプレートリーダーを用いて、測定波長490 nmで吸光度を測定した。そのVEGF Standardの濃度をX軸に、測定した吸光度のO.D.値をY軸にして、standard curveを作成した。そして、PC9細胞とPC9/F9細胞培養液上清中のVEGFのO.D.値を、standard curveにより、VEGF濃度(ng/ml)に換算して比較検討した。

#### 8. Western blotting analysisによる培養細胞の VEGF の測定

PC9細胞とPC9/F9細胞をRPMI1640+10% FCSで $1 \times 10^5/\text{ml}$ の細胞濃度に調整し、酸素濃度を正常状態(19%)と低酸素状態(1%)に設定した $\text{CO}_2$ インキュベーターで2つの細胞株を24時間培養した。細胞浮遊液を遠沈後、分離された細胞をホモジナイザーで完全に破碎して、ビシンコニン酸法(BCA法)によって細胞の総蛋白濃度を測定した。その濃度を500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ に調整し、Sodium dodecylsulfate (SDS)ーポリアクリルアミドゲル(SDS-PAGE)(ポリアクリルアミド濃度12.5%)で電気泳動法を行った。一次抗体はpolyclonal goat anti-human antibody (R&D Systems, USA)を用いて、Tween-PBSで0.2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ に希釈して、転写されたニトロセルロス膜(日本BIO-RADラボラトリーズ社製)の表面に加えて、1時間室温で反応させた。二次抗体はHRP Cojugateで標識

した polyclonal donkey anti-goat antibody (Santa Cruz Biotechnology, USA) を Tween-PBS で 5000 倍に希釈して, 1 時間室温で反応させた. 化学発光には ECL+Plus キット (Amersham Pharmacia Biotech, USA) を使用して, X 線フィルムに露光した.

### 9. cDNA マクロアレイによる VEGF, PDGF $\alpha$ , PDGF $\beta$ , EGF, EGFR, FGFR-2, IL-1 $\alpha$ mRNA の解析

PC9 と PC9/F9 細胞の RNA の抽出する方法は文献 21 に準じて行い, mRNA は oligo-dT-magnetic beads (Toyobo, 大阪) を用いて抽出した. cDNA アレイは GeneNavigator™ cDNA Array System-Cancer Selected- (Toyobo, 大阪) を用いて行った. フィルター上には 177 のヒト癌関連 DNA 断片がスポットされており, スポットされた遺伝子リストは下記のホームページに掲載されている: <http://www.toyobo.co.jp/seihin/product/genenavi/genenavigator.html>. probe の作成は, reverse transcription, ReverTraAce (Toyobo, 大阪), random 9 mer (Toyobo, 大阪), 5  $\mu$ g polyA RNA を用いて行った. その cDNA probe 合成中, biotin-16-deoxyuracil triphosphate (dUTP) によりラベルした. シグナルは Imaging High Chemifluorescence Detection kit (Toyobo, 大阪) を使って検出した. Chemifluorescence substrate は Vistra ECF substrate (AttoPhos) (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) を使用した. Chemifluorescence image は FluorImage により得た. シグナル強度を Imagene (BioDiscovery, Los Angeles, CA, USA) で定量化し, E-Gene Navigator Analysis (GeneticLab, 札幌) で比較解析した. その background シグナル強度の値は陰性対照群の 3 倍とした<sup>22</sup>.

### 10. 統計解析

PC9 細胞と PC9/F9 細胞間の有意差検定には Independent-samples T test の検定を用い, 計算は統計解析ソフト SPSS 11.5 J (SPSS Illinois, USA) を使用した. 有意水準は 5% に設定し, p 値は 5% 未満を有意差ありとした.

## 結果

### 1. in vivo における PC9 細胞と PC9/F9 細胞の増殖能の検討

PC9 細胞と PC9/F9 細胞をマウス皮下に移植して

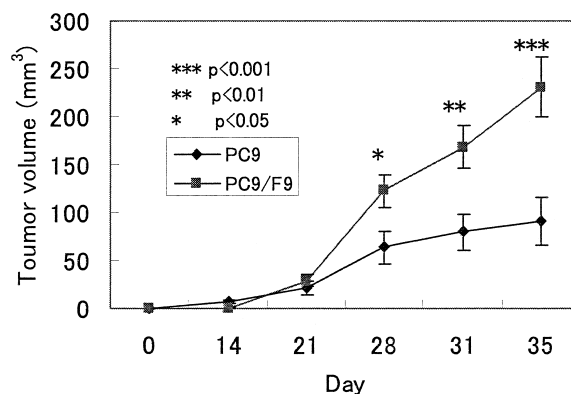


Fig. 1 In vivo tumor growth of PC9 and PC9/F9 cells. The anti-asialo GMI antibodies (0.48 mg) were injected via tail veins of BALB/c nude mice (7 mice/group) 3 days before tumor cell inoculation. PC9 and PC9/F9 cells (each  $5 \times 10^5$  cells) suspended with PBS were inoculated subcutaneously into the dorsal area of the mice. On day 7, 14, 21, 28, 31 and 35, the tumor volumes of mice were measured and calculated by the following formula: tumor volume = (length)  $\times$  (width)<sup>2</sup> / 2. The inoculated tumors of PC9/F9 cells were significantly larger than those of PC9 cells (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ )

14 日目から 35 日目まで, 経時的に腫瘍体積を測定した結果, 腫瘍移植 35 日目の PC9/F9 細胞群の体積 ( $230.7 \pm 31.3 \text{ mm}^3$ ) は PC9 細胞群 ( $90.9 \pm 24.7 \text{ mm}^3$ ) に比較して有意な増大を示した (Fig. 1).

### 2. in vitro における PC9 細胞と PC9/F9 細胞の増殖能の検討

PC9 細胞と PC/F9 細胞 ( $1 \times 10^5$ ) を CO<sub>2</sub> インキュベーターにて培養し, その増殖能を翌日から連続 5 日間, MTT assay で調べた. 翌日から 5 日間測定した O.D. 値は PC9 細胞が  $0.528 \pm 0.045$ ,  $0.663 \pm 0.220$ ,  $0.851 \pm 0.124$ ,  $1.495 \pm 0.315$ ,  $1.972 \pm 0.102$ , PC9/F9 細胞は  $0.428 \pm 0.058$ ,  $0.541 \pm 0.108$ ,  $0.650 \pm 0.162$ ,  $1.095 \pm 0.348$ ,  $1.385 \pm 0.057$  で有意差は認められなかった (Fig. 2).

### 3. マウス背部皮下法 (DAS 法) による血管新生能の検討

PC9 細胞もしくは PC9/F9 細胞 ( $1 \times 10^6$ /チャンパー) をマウス背部皮下に移入し, 7 日目にその局所の皮膚を切り取り, 顕微鏡で新生血管数を調べた結果, PC9/F9 細胞群 ( $4.7 \pm 1.2$ ) は PC9 細胞群 ( $0.3 \pm 0.4$ ) に比較して有意な新生血管数の増加を示した (Fig. 3).

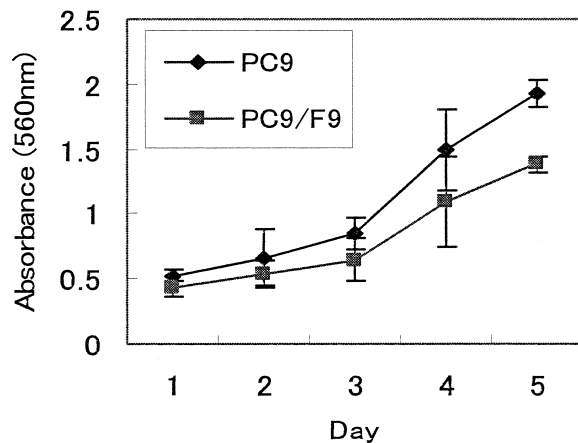


Fig. 2 In vitro growth rate of PC9 and PC9/F9 cells. PC9 and PC9/F9 cells were suspended as  $1 \times 10^5/ml$  in RPMI-1640 with 10% FCS, and 200  $\mu l$  of each cell suspension were seeded into each 8 wells of 96-well plate. Then the plates were incubated at 37°C in a 19% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. On day 1, 2, 3, 4, and 5, 20  $\mu l$  MTT solution (5  $\mu g/ml$ ) were added, then the plates were incubated for 4 h, and 200  $\mu l$  dimethyl sulfoxide (DMSO) were added. The plates were read on a Model 3550 Microplate Reader (Bio-RAD) at 560 nm. There was no significant difference in growth rate between PC9 cells and PC9/F9 cells.

#### 4. Gelatin zymography による MMP-2 活性の検討

PC9/F9 細胞の培養上清液を用いた Gelatin zymography において, MMP-2 のプロエンザイムと活性型は 68kDa, 62kDa の位置に染色されない透明なバンドとして検出されたが, PC9 細胞の培養上清液では MMP-2 のいずれも検出されなかった (Fig. 4).

#### 5. 酵素免疫測定法 (ELISA) による細胞培養上清液の VEGF 濃度の検討

PC9 細胞と PC9/F9 細胞の培養上清液の VEGF 濃度を ELISA 法で調べた結果, VEGF 濃度は PC9 細胞群で  $11.59 \pm 4.21$  ng/ml, PC9/F9 細胞群では  $11.90 \pm 1.51$  ng/ml で有意差は認められなかった (Fig. 5).

#### 6. Western blotting analysis による培養細胞中の VEGF の測定

VEGF (分子量 20kD) のバンドを画像解析ソフト NIH Image (National Institute of Health, USA. ホーム・ページ: <http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>) で解析した結果, いずれも明らかな差は認められなかった (Fig. 6).

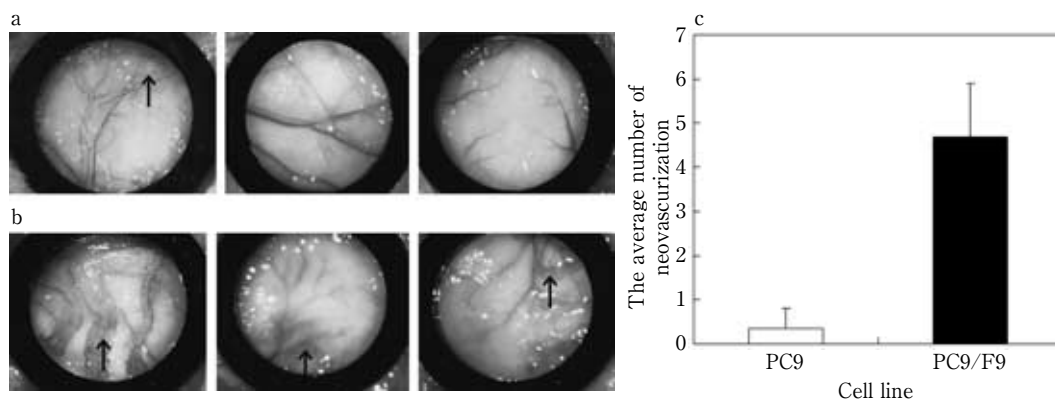


Fig. 3 Tumor-induced angiogenesis. Angiogenesis was evaluated by dorsal air sac assay in ICR mice (3 mice per group). (a) shows angiogenesis of 7 day after implantation of a chamber filled with PC9 cells. (b) exhibits angiogenesis of 7 days after implantation of PC9/F9 cells. Newly formed blood vessel was defined as blood vessel with a zigzagging character and above 2 mm in length. As shown in (c), PC9/F9 cells showed stronger neovascularization in comparison of PC9 cells ( $p < 0.05$ )

↑: neovascularization

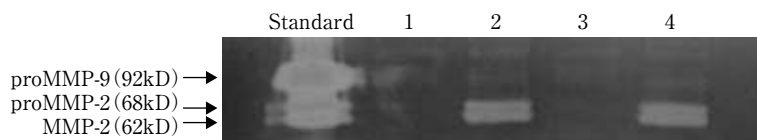


Fig. 4 Gelatinase activities of PC9 and PC9/F9 cells by Gelatin Zymography. PC9 and PC9/F9 cells were suspended in Minimum Essential Medium (MEM) without serum at a concentration of  $4.6 \times 10^5/ml$ , and cultured for 24 hours. The supernatant were concentrated 20 times with the Centriplus Centrifugal Filter Device. Using a ready gels (4% T Stacking Gel, 10% T Resolving Gel, Gelatin 1 mg/ml), electrophoresis was performed and stained with 1% Coomassie brilliant blue. MMP-2 and MMP-9 activities could be visualized in the gelatin-containing zymograms as clear bands against a blue background. MMP-2 and MMP-9 Standards were used at a concentration of 0.1 mg/ml. PC9 cells (lanes 1 and 3) and PC9/F9 cells (lanes 2 and 4) extracts were analyzed. The bands of MMP-2 showed that MMP-2 activity of PC9/F9 cells was remarkably stronger than that of PC9 cells.

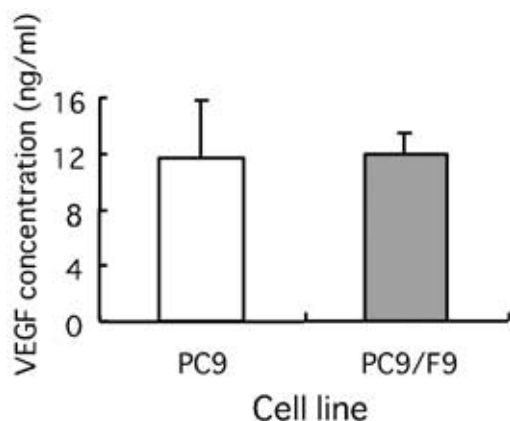


Fig. 5 VEGF concentration in supernatant of PC9 cells and PC9/F9 cells by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). PC9 cells and PC9/F9 cells were incubated in RPMI-1640 medium supplemented with 10% FCS at a concentration of  $1 \times 10^5/ml$ , for 24 hours at  $37^\circ C$  in  $5\% CO_2$ . Then,  $200 \mu l$  of the supernatant of each cell line were seeded into each 8 wells of 96-well plate. Using an ACCUCYTE human VEGF kit, VEGF activities were measured. We used rabbit anti-human antibody as primary antibody, and goat anti-rabbit antibody as secondary antibody. Streptavidin conjugated alkaline phosphatase (ALP) was used as enzyme. After chromogenic reaction, the plates were read on a Model 3550 Microplate Reader (Bio-RAD) at 490 nm. There was no significant difference in both cell lines.

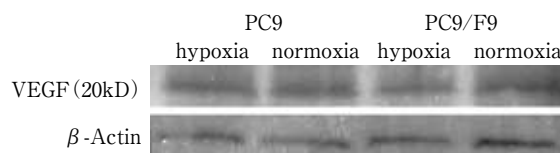


Fig. 6 Expression of VEGF by Western blotting analysis. PC9 cells and PC9/F9 cells were incubated for 24 hours at  $37^\circ C$  in  $19\% O_2$  and  $1\% O_2$ , respectively. The protein extracted from both cell lines were used as samples in a concentration of  $500 \mu g/ml$ . Electrophoresis was performed and transferred onto  $0.45 \mu m$  nitrocellulose membranes. The membranes were blocked with 5% skimmed milk/Tween-PBS. Probed with polyclonal goat anti-human antibody ( $0.2 \mu g/ml$ ) as primary antibody and used polyclonal donkey anti-goat antibody (1:5,000 dilution) as secondary antibody. ECL Plus kit was used for chemiluminescent detection. The results showed that the concentration of band of 20kD was no significant difference in both cell lines.

Table 1 Genes expression in PC9 or PC9/F9 cells on cDNA array analysis

Gene	PC9	PC9/F9
VEGF	5.6	15.6
PDGFa	2.2	5.2
PDGFb	8.1	13.3
EGF	4.8	6.3
EGFR	3.3	6.3
FGFR-2	4.6	5.3
IL-1 $\alpha$	8.1	14.1

### 7. cDNA マクロアレイによる VEGF, PDGF $\alpha$ , PDGF $\beta$ , EGF, EGFR, FGFR-2, IL-1 $\alpha$ mRNA の解析

PC9 と PC9/F9 細胞を正常酸素濃度下 (19%) で培養後、抽出した RNA から cDNA を作製し、cDNA アレイを施行した結果、その差は 3 倍にいたらず<sup>22</sup>、明らかな差は認められなかった。この結果は 3 回の施行で、再現性を確認された (Table 1)。

### 考 察

癌転移は、①癌細胞の原発巣からの遊離、②組織への浸潤、③脈管への侵入、④遠隔臓器脈管内への移動、⑤血管内皮細胞・基底膜との接着、⑥脈管外への浸潤・移動、⑦増殖、⑧血管新生などの多くのプロセスを経て形成される<sup>23</sup>。高転移細胞株は低転移細胞株に比べて、上記プロセスのうち癌細胞の血管内皮細胞や基底膜との接着、細胞外基質に対する浸潤、細胞運動などの能力が亢進していることが既に数多く報告されている<sup>14</sup>。また、腫瘍の増殖には血管新生が必要である。腫瘍径が 1~2 mm までは拡散によって腫瘍細胞の生存に必要な酸素や栄養を獲得、老廃物を排泄することができるが、これ以上の大きさになると拡散による供給が不十分であり、血管新生による酸素や栄養の供給が必要になる<sup>24</sup>。

これまでの研究によって、血管新生は①既存の血管の内皮細胞によって産生されたプロテアーゼによる基底膜の分解、②内皮細胞の遊走、③内皮細胞の増殖、④内皮細胞による管腔の形成、⑤基底膜の形成と周辺細胞による取り囲みの 5 つのステップを経て起こると考えられている。今回、我々は転移能の異なるヒト肺腺癌株における血管新生能の差異を調べるために、最初に *in vivo* と *in vitro* での PC9 細胞株と PC9/F9 細胞株の増殖能を調べた。*in vivo* においては PC9/F9 細胞は PC9 細胞より BALB/c ノードマウス皮下に移植した腫瘍の増大が有意に亢進していた。一方、*in vitro* におけるこの 2 つの細胞の増殖能には有意な差は認められなかった。この結果より、*in vivo* で PC9/F9 細胞が PC9 細胞よりも腫瘍増殖能が有意に亢進していたメカニズムの一部は PC9/F9 細胞の血管新生能が PC9 細胞よりも亢進していたことによる可能性があると考えられた。そこで、DAS 法を用いて 2 つ細胞株の血管新生能の差異を調べた結果、PC9/F9 細胞群 ( $4.7 \pm 1.2$ ) が PC9 細胞群 ( $0.3 \pm 0.4$ ) に比較して有意な新生血管数の増加を示し、血管新生能が亢進していることが証明された (Fig. 3)。

血管新生を誘導する要因として VEGF などの促進因子や、その分泌を促す低酸素環境などがある。VEGF は血管新生促進因子の中で最も重要な因子の一つである。我々は免疫酵素法 (ELISA) により PC9 細胞と PC9/F9 細胞の培養上清液中の VEGF 濃度を測定したが、二つの細胞株で有意差は認められなかった。

血管の主な生理的役割は酸素と栄養の供給であるので、組織における低酸素状態は血管新生を促進させる重要な要因である。細胞株の種類によっては低酸素培養による VEGF の産生量増加が証明されているが<sup>25,26</sup>、我々の今回の実験結果では、低酸素条件下で培養した PC9 細胞と PC9/F9 細胞の VEGF の蛋白発現量は正常酸素濃度条件下で培養された場合と比較して増加が認められなかった。

我々は今回 cDNA マクロアレイで、血管新生因子として VEGF, PDGF $\beta$ , PDGF $\alpha$ , EGF, EGFR, FGFR-2, IL-1 $\alpha$  遺伝子の発現状況を検討したが、各々の発現量が PC9 細胞と PC9/F9 細胞において明らかな差がなかったことより、PC9 細胞と PC9/F9 細胞における血管新生能の差は上述因子以外の要因によるものであることが推測された。

血管新生は血管内皮細胞が VEGF などの血管新生因子の刺激により活性化され、活性化された内皮細胞や腫瘍細胞がプロテアーゼを産生し、血管内皮細胞が基底膜などの細胞外マトリックス (extracellular matrix: ECM) を消化しながら、間質へ浸潤、遊走、増殖、さらに分化して管腔を形成するプロセスを経て成立する。プロテアーゼの中でマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) は ECM の主成分を構成しているコラーゲン、フィブロネクチン、ラミニンなどを基質とするタンパク分解酵素であり、現在までに 24 種が同定されている。MMP はプロエンザイムの形で産生され、一部切断されることにより酵素活性を獲得する。癌においては MMP の発現が強くなり、腫瘍の増殖、浸潤・転移、血管新生に関与している<sup>10</sup>。MMP の中でも、その発現が癌細胞の転移能あるいは浸潤能と相関を示すとされている MMP-2 と MMP-9 は基質中のゼラチンなどを分解する作用を持ち、血管新生への関与も強く示唆されている<sup>27,28</sup>。MMP-2 ノックアウトマウスを使った研究において、前述した DAS 法で B16-BL6 マウスメラノーマ細胞による血管新生を調べたところ、正常マウスと比べて、MMP-2 ノックアウトマウスの方は血管新生が有意に弱く、その腫瘍移植実験でも、腫瘍増殖は MMP-2 ノックアウトマウスの方が明らかに遅いことが報告されている<sup>29</sup>。また、我々も MMP inhibitor である FYK-1388 の投与によりヒ

ト線維肉腫細胞株 (HT-1080) のマウス肺転移が抑制されるのは血管新生の阻害によるものであることを明らかにしてきた<sup>30</sup>。本研究において, gelatin zymography を用いて PC9 細胞と PC9/F9 細胞培養上清液中の MMP-2 と MMP-9 活性を調べた結果, PC9/F9 細胞は PC9 細胞に比べて, MMP-2 活性が有意に高いことを示した。また, 過去に real-time RT-PCR 解析においても PC9/F9 細胞の MMP-2 mRNA の濃度は PC9 細胞より 3.47 倍高いことを報告している<sup>22</sup>。これらの結果は MMP-2 活性の増加が PC9/F9 細胞の強い血管新生及び腫瘍増殖に関与している可能性のあることを示唆するものと考えられた。

我々は以前に, PC9 細胞と PC9/F9 細胞における転移能の差は各々の細胞の ECM 蛋白 (laminin, type IV collagen, fibronectin) に対する接着能, 浸潤能などの違いによる可能性のあることを報告してきたが<sup>4</sup>, 今回は, PC9 細胞と PC9/F9 細胞転移能差異の原因の一つとして, MMP 活性の差に起因した血管新生能の違いによる可能性を示した。今後は, この PC9/F9 細胞の実験的転移モデルを用いて, MMP 阻害剤による血管新生阻害を介した転移抑制の研究を進めていくことを検討している。

## 結 論

肺腺癌細胞株 (PC9) から樹立した高転移株 (PC9/F9) を用いて, PC9 細胞の高転移能獲得に伴う血管新生能の変化について検討し, 以下の結果を得た。

- 1) in vivo 増殖能において, PC9/F9 細胞は PC9 細胞より有意に増強していた。
- 2) in vitro 増殖能は PC9 細胞と PC9/F9 細胞で有意な差は認められなかった。
- 3) DAS 法によるマウス背部皮下新生血管数において, PC9/F9 細胞は PC9 細胞に比べ有意な増加が認められた。
- 4) Gelatin zymography による MMP-2 活性は, そのプロエンザイムと活性型ともに PC9/F9 細胞の方が強かった。
- 5) 酵素免疫測定 (ELISA) 法による PC9 と PC9/F9 細胞培養液中の VEGF 産生量に有意な差は認められなかった。
- 6) 低酸素濃度と正常酸素濃度の二つの条件下で培養された PC9 細胞と PC9/F9 細胞の VEGF 発現量は Western blotting において明らかな差は示されなかった。
- 7) cDNA マクロアレイによる PC9 細胞と PC9/F9

細胞の VEGF, PDGFb, PDGF $\alpha$ , EGF, EGFR, FGFR-2, IL-1 $\alpha$  遺伝子発現解析の結果, 2つの細胞間に明らかな差は認められなかった。

以上より, PC9/F9 細胞の高転移性要因の一つとして血管新生能の亢進が考えられた。更に, PC9/F9 細胞の血管新生能亢進に関するメカニズムの一部は MMP-2 の活性が増強されたことに起因することが示唆された。

## 文 献

1. Liu J, Johnston MR: Animal models for studying cancer and evaluating novel intervention strategies. *Surg Oncol* 2002; 11: 217-227.
2. Garth LN: Cancer metastasis: tumor cell and host organ properties important in metastasis to specific secondary sites. *Biochim Biophys Acta* 1988; 948: 175-224.
3. Hofmann UB, westphal JR, van Muijen GN, Ruiter DJ: Matrix Metalloproteinases in Human Melanoma. *J Invest Dermatol* 2000; 115: 337-344.
4. Takenaka K, Shibuya M, Takeda Y, Hibino S, Gemma A, Ono Y, Kudoh S: Altered expression and function of  $\beta$ 1 integrins in a highly metastatic human lung adenocarcinoma cell line. *Int J Oncol* 2000; 17: 1187-1194.
5. Folkman J: Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971; 285: 1182-1186.
6. Hanahan D, Folkman J: Patterns and Emerging Mechanisms of the Angiogenic Switch during Tumorigenesis. *Cell* 1996; 86: 353-364.
7. 相川広一: 非小細胞肺癌組織における予後因子に関する免疫組織学的検討. *加齢医誌* 1998; 49: 13-26.
8. Siegfried G, Basak A, Cromlish JA, Benjannet S, Marcinkiewicz J, Chre'tien M, Seidah NG, Khatib AM: The secretory proprotein convertases furin, PC 5, and PC7 activate VEGF-C to induce tumorigenesis. *J Clin Invest* 2003; 111: 1723-1732.
9. Ferrara N, Davis-smyth T: The Biology of Vascular Endothelial Growth Factor. *Endocr Rev* 1997; 18: 4-19.
10. Chang C, Werb Z: The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. *Trends Biol* 2001; 11: 37-43.
11. McCarty MF, Bielenberg D, Donawho C, Bucana CD, Fidler IJ: Evidence for the causal role of endogenous interferon-alpha/beta in the regulation of angiogenesis, tumorigenicity, and metastasis of cutaneous neoplasms. *Clin Exp Metastasis* 2002; 19: 609-615.
12. Kimura Y: Carp oil or oleic acid, but not linoleic acid or linolenic acid, inhibits tumor growth and metastasis in lewis lung carcinoma-bearing mice. *J Nutr* 2002; 132: 2069-2075.
13. Huang S, Bucana CD, Van Arsdall M, Fidler IJ: Stat 1 negatively regulates angiogenesis, tumorigenicity and metastasis of tumor cells. *Oncogene* 2002; 21: 2504-2512.



14. Inoue K, Wood CG, Slaton JW, Karashima T, Sweeney P, Dinney CP: Adenoviral-mediated gene therapy of human bladder cancer with antisense interleukin-8. *Oncol Rep* 2001; 8: 955-964.
15. Izawa JI, Sweeney P, Perrotte P, Kedar D, Dong Z, Slaton JW, Karashima T, Inoue K, Benedict WF, Dinney CP: Inhibition of tumorigenicity and metastasis of human bladder cancer growing in athymic mice by interferon-beta gene therapy results partially from various antiangiogenic effects including endothelial cell apoptosis. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 1258-1270.
16. Rozic JG, Chakraborty C, Lala PK: Cyclooxygenase inhibitors retard murine mammary tumor progression by reducing tumor cell migration, invasiveness and angiogenesis. *Int J cancer* 2001; 93: 497-506.
17. Huang S, Pettaway CA, Uehara H, Bucana CD, Fidler IJ: Blockade of NF-kappaB activity in human prostate cancer cells is associated with suppression of angiogenesis, invasion, and metastasis. *Oncogene* 2001; 20: 4188-4197.
18. Takatsuka S, Yamada N, Sawada T, Ogawa Y, Maeda K, Ohira M, Ishikawa T, Nishino H, Seki S, Hirakawa Y, Chung K: Contribution of angiogenesis to the progression of colon cancer: possible inhibitory effect of angiogenesis inhibitor TNP-470 on tumor growth and hepatic metastasis. *Int J oncol* 2000; 17: 253-258.
19. Mosmann T: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. *J Immunol Method* 1983; 65: 55-63.
20. Oikawa T, Sasaki M, Inose M, Shimamura M, Kuboki H, Hirano S, Kumagai H, Ishizuka M, Takeuchi H: Effect of cytochrome c, a novel microbial product, on embryonic and tumor cell-induced angiogenic responses. *Anticancer Res* 1997; 17: 1881-1886.
21. Jiang W, Zhang YJ, Kahn SM, Hollstein MC, Santella RM, Lu SH, Harris CC, Montesano R, Weinstein IB: Altered expression of the cyclin D1 and retinoblastoma genes in human esophageal cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 9026-9030.
22. Gemma A, Takenaka K, Hosoya Y, Matsuda K, Seike M, Kurimoto F, Ono Y, Uematsu K, Takeda T, Hibino S, Yoshimura A, Shibuya M, Kudoh S: Altered expression of several genes in highly metastatic subpopulations of a human pulmonary adenocarcinoma cell line. *Eur J Cancer* 2001; 37: 1554-1561.
23. Poste G, Fidler IJ: The pathogenesis of cancer metastasis. *Nature* 1980; 283: 139-145.
24. Folkman J: How is blood vessel growth regulated in normal and neoplastic tissue? *Cancer Res* 1986; 46: 467-473.
25. Minchenko A, Bauer T, Salceda S, Caro J: Hypoxic stimulation of vascular endothelial growth factor expression in vitro and in vivo. *Lab Invest* 1994; 71: 374-379.
26. Melillo G, Sausville EA, Cloud K, Lahusen T, Varesio L, Senderowicz AM: Flavopiridol, a protein kinase inhibitor, down-regulates hypoxic induction of vascular endothelial growth factor expression in human monocytes. *Cancer Res* 1999; 59: 5433-5437.
27. Vu TH, Shipley JM, Bergers G, Berger JE, Helms JA, Hanahan D, Shapiro SD, Senior RM, Werb Z: MMP/Gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes. *Cell* 1998; 93: 411-422.
28. Forsyth PA, Wong H, Laing TD, Rewcastle NB, Morris DG, Muzik H, Leco KJ, Johnston RN, Brasher PMA, Sutherland G, Edwards DR: Gelatinase-A (MMP-2), gelatinase-B (MMP-9) and membrane type matrix metalloproteinase-1 (MT1 = MMP) are involved in different aspects of the pathophysiology of malignant gliomas. *Br J Cancer* 1999; 79: 1825-1835.
29. Itoh T, Tanioka M, Yoshida H, Yoshioka T, Nishimoto H, Itohara S: Reduced angiogenesis and tumor progression in gelatinase A-deficient mice. *Cancer Res* 1998; 58: 1048-1051.
30. Shinoda K, Shibuya M, Hibino S, Ono Y, Matsuda K, Takemura A, Zou D, Kokubo Y, Takechi A, Kudoh S: A novel matrix metalloproteinase inhibitor, FYK-1388 suppresses tumor growth, metastasis and angiogenesis by human fibrosarcoma cell line. *Int J Oncol* 2003; 28: 281-288.

(受付 : 2003 年 8 月 8 日)

(受理 : 2004 年 2 月 9 日)