

マウス・ルイス肺癌細胞の転移・浸潤におけるヘパラン硫酸 およびシンデカン-2 の役割

吉 富 泰 央

(平成 16 年 9 月 13 日提出)

要 旨

細胞膜貫通型のプロテオグリカンであるシンデカンはそのヘパラン硫酸鎖を介して様々な増殖因子と結合し細胞内シグナル伝達系を調節したり、また、細胞外マトリックスの受容体として機能して細胞接着に関与することが明らかにされている。

本研究室ではこれまでに、マウス・ルイス肺癌から自然転移能の違いに基づいてクローニングした転移能の異なる株細胞を樹立しており、これらの細胞の示す一次腫瘍組織形成において異なった細胞外マトリックス依存性を示すことを明らかにしている。低転移性 P29 細胞は強い間質誘導を示し、誘導した間質細胞の形成するフィブロネクチンを主成分とする間質型細胞外マトリックス依存的な腫瘍組織形成を示す。それに対して、高転移性 H11 細胞は自らが形成する腫瘍基底膜依存的な腫瘍組織形成を示す。また、この細胞外マトリックス依存性の違いを反映して、これらの細胞は培養下で異なったフィブロネクチン接着応答性を示す。すなわち、P29 細胞はフィブロネクチン接着依存的にアクチンストレスファイバーを形成するのに対して、H11 細胞はアクチン繊維が細胞辺縁に局在した皮質型アクチンを形成する。これまでの研究においてこの違いが細胞表層シンデカン-2 の発現量の違いに依存していることを明らかにしている。

本研究において転移能とシンデカン-2 発現量との間に逆相関の関係があることを見出した。そこで、この逆相関の背後にある因果関係を明らかにするため (1) シンデカン-2 強制発現細胞を樹立し、シンデカン-2 分子の機能としてのシグナル伝達の観点からがん転移の機構を解析した。(2) 細胞表層のヘパラン硫酸鎖を介した細胞接着の観点からがん転移の抑制を試みた。その結果、(1) シンデカン-2 強制発現細胞は転移が大きく抑制された。転移の過程に関与することが明らかにされているマトリックス・メタロプロテアーゼ (MMP) の関与を解析したところ、MMP-2 は転移能の高低に拘らず同程度発現していたのに対して、高転移性細胞培養系においては MMP-2 の高い活性化がみられ、シンデカン-2 を強制発現することによってその活性化が抑制された。さらに、シンデカン-2 を介した MMP-2 の活性化抑制はシンデカン-2 のヘパラン硫酸鎖に依存した現象であることも明らかになった。また、これらの細胞の形成する一次腫瘍組織形成にも違いがみられ、シンデカン-2 強制発現 H11-SN2 細胞は低転移性 P29 細胞と同様の間質誘導能を獲得し、腫瘍血管形成も高転移腫瘍の示す類洞様血管形成から低転移性腫瘍の示す毛細血管形成へと変化した。これらの一次腫瘍組織形成の違いは転移能の違いに深く関係していることを示唆している。(2) ヘパリンおよび抗凝固活性を低下させた化学修飾ヘパリンをがん細胞移植時に体液中に投与することにより転移を大きく抑制することに成功した。この転移抑制は抗凝固活性の結果ではなく、癌細胞の表層に存在するヘパラン硫酸を介した癌細胞の基底膜への接着を投与ヘパリンにより競合的に阻害した結果であることが示唆された。

本研究ではまた、ルイス肺癌細胞による皮下腫瘍の作成に際して、転移能の高低に拘らず個体の死亡時期がほぼ同じであることに着目し、その原因を検討した。その結果、低転移性株細胞は腫瘍の周縁組織への浸潤性が非常に強いことを見出した。浸潤能の強さに一致して、低転移性 P29 細胞および、H11-SN2 細胞は特異的に MMP-3 を発現しており、その発現はシンデカン-2 の発現と正の相関性のあることを明らかにした。MMP-3 が浸潤に直接的に関与しているかどうかは明らかにし得なかったが、この発見は、癌細胞の結合組織への浸潤が細胞外マト

リックス融解酵素 MMP-3 により仲介されていることを強く示唆するものである。

これらの結果はまた、他の腫瘍系で考えられているのとは異なり、転移能の高い細胞は必ずしも高い浸潤能をもつとは限らないことを示している。少なくともルイス肺癌の転移モデルにおいては、癌細胞の浸潤と転移は独立した細胞活性であり、別々のシグナルカスケードの結果であると考えられた。さらにルイス肺癌においては、転移と浸潤はともにシンデカン-2を介した細胞動態であり、異なるMMPによって担われていることが強く示唆された。

キーワード：転移，浸潤，ヘパラン硫酸，シンデカン，マトリックス・メタロプロテアーゼ

目 次

1. 緒論
2. 結果
 - 2.1 マウス・ルイス肺癌由来の転移能の異なる株細胞におけるシンデカン-2 発現量と転移能
 - 2.2 転移能の異なる株細胞の一次腫瘍組織形成
 - 2.3 ルイス肺癌細胞の発現するマトリックス・メタロプロテアーゼ (MMPs)
 - 2.4 化学修飾ヘパリン投与による実験転移能の抑制
 - 2.5 シンデカン-2 高発現性細胞の示す腫瘍周縁組織への浸潤能
3. 考察
 - 3.1 シンデカン-2 発現量と転移
 - 3.2 シンデカン-2 による MMP-2 活性化の抑制
 - 3.3 ヘパリンによる転移抑制
 - 3.4 シンデカン-2 高発現による一次腫瘍組織形成への影響
 - 3.5 シンデカン-2 発現と浸潤能
 - 3.6 ルイス肺癌細胞における転移能と浸潤能

1. 緒 論

がんの遠隔組織への転移は、腫瘍細胞の原発巣からの遊離と浸潤、リンパ管や血管といった脈管への侵入、脈管内移動、標的組織内毛細血管の内皮細胞表層への接着、定着と増殖、それに引き続き組織内への侵入、定着と増殖により成立すると考えられている [1-4] (図 1)。これらの諸過程に関わる分子の機能を明らかにすることは、がん転移抑制の方法を開発する上で重要である。個体発生にともなう形態形成や創傷治癒において細胞と細胞外マトリックスとの相互作用が中心的役割を果たすことが多くの研究によって示されており、細胞外マトリックスは多

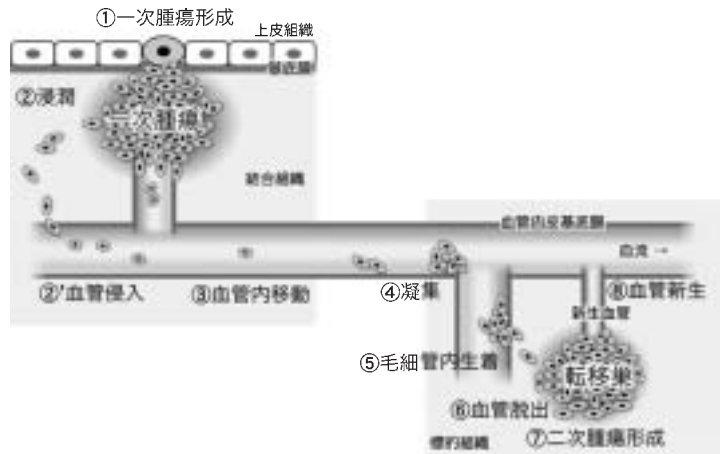


図1 癌の血行性転移の模式図

腫瘍細胞は転移が成立するまでの各段階で様々な細胞外マトリックスや細胞に対して接着，脱着をおこない，また，ある場合には細胞外マトリックスの分解を伴い移動する．(1) 腫瘍化した細胞は増殖し，腫瘍組織を形成する．(2) 腫瘍細胞のあるものは腫瘍組織から遊離し結合組織に浸潤する．(2)' また，ある細胞は血管内に侵入する．(3) 血流中を移動する．(4) 血管内では細胞凝集塊を形成する(4)標的組織内の毛細血管内に定着し増殖する．(5) 血管から標的組織内へ脱出する．(6) 標的組織内で腫瘍組織を形成する．(7) 腫瘍組織維持のため腫瘍血管形成が誘導される．(参考文献 [11] より改変)

細胞体制の構築に際して細胞の足場として細胞増殖，分化，移動などの調節的な役割を担っている [5-9]．一方，腫瘍組織の形成においてもそれは例外ではなく，がん細胞とそれを取り巻く細胞外マトリックスとの相互作用が，がんの悪性化に関連する重要な働きを担っていることが明らかにされつつある [1-3, 10]．経験を積んだ病理医は腫瘍組織像から，がんの悪性度を適確に判断し得る．このことから，浸潤性・転移性という腫瘍細胞の悪性度は腫瘍組織像に反映されていると考えられる．

本研究室では癌細胞と，それを取り囲む細胞外マトリックスの相互作用の視点から浸潤・転移の機構を明らかにすることを目的に研究が進められてきた [4, 10, 11]．本研究室では，これまでにマウス・ルイス肺癌 3LL から自然転移能に基づいてクローン化した転移能の異なる株細胞（低転移性株細胞；P29，中転移性株細胞；LM12-3，高転移性株細胞；H11）を用いて，細胞外マトリックスを中心にして腫瘍組織形成についての研究が行われてきた [12-15]．その結果，転移能の異なる株細胞は，生体内での腫瘍組織形成において全く異なる細胞外マトリックス依存性を示すことが明らかにされている．即ち，高転移性 H11 株細胞をマウス皮下に移植し，腫瘍組織を作らせた場合，その株細胞は高い基底膜形成能を示し，それを足場にした組織形成を示す．それに対して，低転移性 P29 株細胞は基底膜成分を合成しているにもかかわらず，基底膜形成能を持たず，それに代わって強い間質誘導性を示し，誘導された宿主組織由来の間質細胞の形成するフィブロネクチンを主成分とする間質型マトリックスを足場とした組織形成を示す．

H11 細胞の形成する腫瘍組織内でフィブロネクチンが存在する部位は、腫瘍血管内皮基底膜のみであった。

これらの転移能の異なる株細胞は、生体内での組織形成における細胞外マトリックス依存性の違いを反映して、培養下でフィブロネクチン基質への接着において異なる細胞応答性を示すことが明らかにされている [16]。即ち、P29 株細胞は、アクチンストレスファイバーを形成して伸展するのに対して、H11 株細胞はアクチン繊維が細胞辺縁部に局在した皮質型アクチンを形成する。引き続き研究において、この細胞応答性の違いが、両細胞間における細胞表層ヘパラン硫酸プロテオグリカンの一員であるシンデカン-2 の発現レベルの違いによるものであることを、それを強制発現させたクローン性株細胞を用いることにより明らかにされている [17] (図 2)。即ち、P29 株細胞においてはインテグリン $\alpha 5 \beta 1$ とシンデカン-2 とを介してフィブロネクチン基質に結合し、アクチンストレスファイバー形成が誘導されるのに対して、H11 株細胞においてはシンデカン-2 の発現レベルが閾値より低いいためインテグリン $\alpha 5 \beta 1$ のみを介して接着し、皮質型アクチン形成が誘導されることが明らかにされている。

真核生物におけるシンデカンファミリーはシンデカン-1 から -4 までクローニングされている [18, 19]。最初に同定されたシンデカン-1 は最もよく研究されており、細胞外マトリックス成分

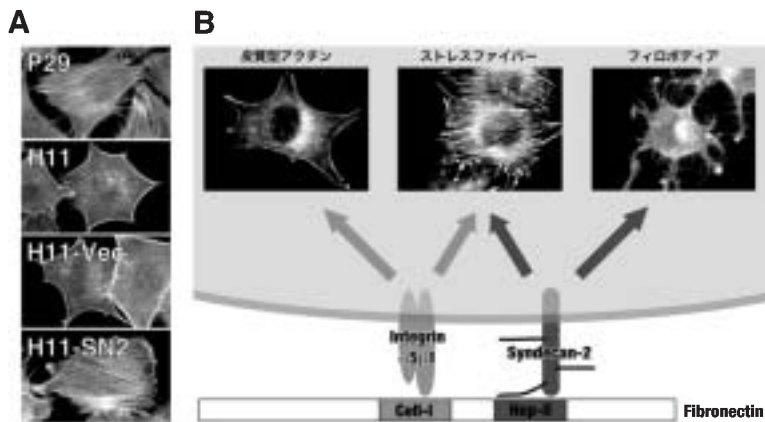


図 2 マウス・ルイス肺癌由来の株細胞におけるフィブロネクチン接着依存的アクチン細胞骨格形成とインテグリン $\alpha 5 \beta 1$ およびシンデカン-2 を介したフィブロネクチン結合シグナルの伝達

A: フィブロネクチン基質への接着に際して低転移性 P29 株細胞がアクチンストレスファイバーを形成するのに対して、高転移性 H11 細胞は皮質型アクチンを形成する。この違いは、これらの細胞のフィブロネクチン受容体として作用するシンデカン-2 の発現量の違いに基づいており、H11 細胞にシンデカン-2 を強制発現させた H11-SN2 細胞はアクチンストレスファイバー形成を示す。それに対して、ベクターのみを導入した H11-Vec 細胞は、H11 細胞と同様、皮質型アクチンの形成を示す。B: 細胞がインテグリン $\alpha 5 \beta 1$ を介してフィブロネクチンの Cell-I ドメインに結合した場合、皮質型アクチンを形成する。シンデカン-2 のみで Hep-II ドメインに結合した場合、糸状仮足形成を示す。両受容体を介してフィブロネクチンに接着した場合には細胞内にアクチンストレスファイバーを形成する。以上のようにルイス肺癌細胞のアクチン細胞骨格形成へのシグナル伝達はシンデカン-2 の発現レベルに依存している。(参考文献 [17] より改変)

[19] およびヘパリン結合性の増殖因子に対する共受容体として高親和性受容体と協調的に働くことが示されている [18–23] . シンデカン-1 は主に上皮細胞で発現されており, がんの悪性を抑制する活性のあることが示されている [24, 25] . シンデカン-4 は幅広い組織で発現されており, インテグリン $\alpha 5\beta 1$ と共にフィブロネクチン基質への接着を介したストレスファイバー形成に関与していることが明らかにされている [26–30] . Couchman らにより, シンデカン-4 を介したシグナル伝達においてシンデカン-4 細胞質部位の可変ドメイン (V ドメイン) にホスファチジルイノシトール三リン酸 (PIP₂) が結合し, それに PKC α が結合し, 活性化されることが報告されている [31–33] . また, PKC がシンデカン-2 の細胞内ドメインのセリンをリン酸化することも明らかにされている [34] . しかし, シンデカン-4 のノックアウトマウス由来の繊維芽細胞でもフィブロネクチン基質接着依存的にストレスファイバーを形成することが報告されており [35] , Couchman らの報告と矛盾する . 我々はルイス肺癌細胞のフィブロネクチン基質接着に際して, シンデカン-2 がストレスファイバー形成に必須であり, シンデカン-4 はシンデカン-2 の上流で作用していることを種々の接着基質および抗体を用いた解析から明らかにしている [36] .

これまでの研究で, 転移能の異なる株細胞の示す細胞外マトリックス接着応答性の違いが細胞表層のシンデカン-2 発現量に依存した現象であることを明らかにしてきたことから, 本研究では, 癌の浸潤・転移および組織形成におけるシンデカン-2 の役割を, そのヘパラン硫酸鎖に注目して機構的に明らかにすることを目的とした . まず, シンデカン-2 発現量と転移能との間に存在する関係を明らかにし, シンデカン-2cDNA を導入し強制発現させた細胞を用いて転移におけるシンデカン-2 の役割について解析を行なった . 次に, 過ヨウ素酸酸化により抗凝固活性を低下させたヘパリンを用い, 細胞表層のヘパラン硫酸の機能と競合させたときのがん転移に及ぼす影響について解析した . 最後に, ルイス肺癌細胞の示す腫瘍周縁組織への浸潤性とシンデカン-2 との関係を明らかにし, それを仲介している分子について解析を行った [37] .

2. 結 果

2.1 マウス・ルイス肺癌由来の転移能の異なる株細胞におけるシンデカン-2 発現量と転移能

本研究室のこれまでの研究で, マウス・ルイス肺癌から自然転移能の違いに基づいてクローニングした株細胞が樹立されている (表 1) . これらの株細胞を用いたこれまでの研究において, 転移能の異なる株細胞は皮下での腫瘍組織形成において, 全く異なる細胞外マトリックス依存性を示すことが示されている [12–14] . それを反映して, 培養下において転移能の異なる株細胞はフィブロネクチン基質に対して異なった接着応答性を示すことが明らかにされている [15–17] . さらに, これらの細胞のフィブロネクチン基質に対する接着応答性の違いが細胞膜型プロテオグリカンであるシンデカン-2 の発現量の違いに依存していることも明らかにされている [16, 17] . そこで, これらの転移能の異なる株細胞における細胞表層ヘパラン硫酸プロテオグリカンの発

表 1 マウス・ルイス肺癌由来の株細胞の示す転移能

株細胞	移植部位	移植細胞数 ($\times 10^5$)	転移動物数	転移結節数	
				範囲	平均
P29	i.v.	1.0	3/7	0-1	0.4
LM12-3	i.v.	1.0	7/7	19-92	47.9
H11	i.v.	1.0	7/7	467-744	516.2
P29	s.c.	2.0	0/8	0	0
LM12-3	s.c.	2.0	7/7	0-14	4.5
H11	s.c.	2.0	7/7	23-56	35.2

C57BL/6 オス, 6 週齢マウスの尾静脈内 (i.v.) あるいは下腹部皮下 (s.c.) に各細胞を移植し, 16 日後 (i.v. の場合) あるいは 4 週間後 (s.c. の場合) に屠殺して肺を摘出し, プアンドゥボスク溶液で固定後, 実体顕微鏡下で肺に形成された転移結節数を計測した。

現に焦点を絞り解析を行った。

2.1.1 ルイス肺癌細胞におけるシンデカンファミリーの発現と転移能

まず, ルイス肺癌から自然転移能の差に基づいてクローニングした 3 つの株細胞, 即ち, 低転移性 P29, 中転移性 LM12-3 および高転移性 H11 株細胞におけるシンデカンファミリーの細胞表面発現を, 各シンデカン特異抗体 [38] を用いて FACS により検討した (図 3A)。3 つの株細胞内でシンデカン-1, -2, -3, -4 いずれの発現も確認された。シンデカン-3 の発現レベルは極端に低いものの, シンデカン-1, -3, -4 の発現量は転移能の違いに関わらず, 3 つの株細胞間に有意な違いは観察されなかった。シンデカン-2 のみの発現が転移能と逆相関を示した。この

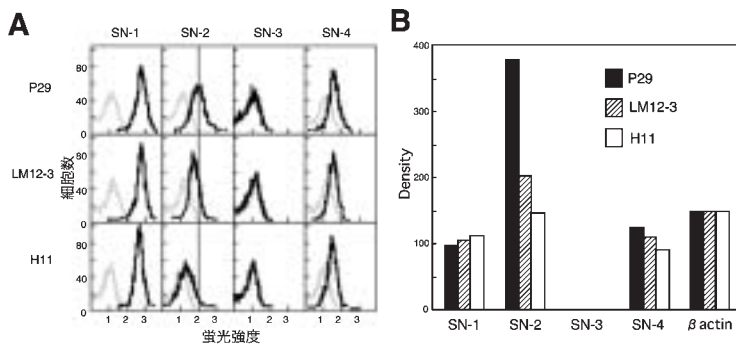


図 3 転移能の異なる株細胞におけるシンデカンファミリーの細胞表面発現および mRNA の発現量
 A: 低転移性 P29 細胞, 中転移性 LM12-3 細胞, 高転移性 H11 細胞の細胞表面シンデカンファミリーの発現を, シンデカン-1, -2, -3 および -4 各々に特異的な抗体 SN1, SN2, SN3 および SN4Ab を用いてフローサイトメーターで測定した。これらの結果は, 転移能とシンデカン-2 の発現の間に逆相関のあることを示した。灰色線は非免疫血清を用いた対照を示す。B: 各細胞より抽出したポリ (A)+RNA を用いてノーザンブロット法によりシンデカンファミリーの発現量を検出した後, デンシトメーターで定量化し, β アクチンの発現量に対する各シンデカンの発現量を比較した。

発現量の差はノーザンプロットによる mRNA の発現でも確認された (図 3B)。

そこでこの逆相関の背後に因果関係があるか否かを検討するため、シンデカン-2 低発現性の高転移性 H11 株細胞にシンデカン-2 遺伝子を導入し、得られた高発現クローン H11-SN2 細胞を用いて転移能を解析した。

2.1.2 高転移性 H11 細胞におけるシンデカン-2 強制発現と、その及ぼす他の細胞表層ヘパラン硫酸プロテオグリカンの発現への影響

シンデカン-2 全長を強制発現させた細胞 (H11-SN2 細胞) [17] のシンデカン-2 mRNA 発現量をノーザンプロットにより解析した結果、親株の H11 細胞およびベクターのみを導入した H11-Vec 細胞と比較してシンデカン-2 の発現量が有意に増加しており、シンデカン-2 高発現性で低転移性の P29 細胞と同程度のシンデカン-2 mRNA の発現が観察された (図 4A)。なお、サイズの異なる 3 種のシンデカン-2 mRNA のバンドが観察されたが、これは 3' 末端のポリアデニル酸のサイズの違いによるものであることが示されている [39]。同様に各細胞から調製したプロテオグリカン試料をヘパリチナーゼ消化し、生成する不飽和二糖特異的な 3G10 抗体を用いて、ウェスタンプロットを行い、各細胞のヘパラン硫酸プロテオグリカン発現量を比較した。その結果、ノーザンプロットの結果と一致して、H11-SN2 細胞でのシンデカン-2 の発現の増加が観察された (図 4B)。またシンデカン-2 の強制発現化は他のシンデカンの発現に影響を及ぼさないことが示された (図 4B)。また、シンデカン-2 タンパク芯に対する抗体、SN2Ab による免疫沈降試料の SDS-PAGE 後の 3G10 抗体によるウェスタンプロットでも同様にシンデカン-2 発現量の増加が確認された (図 4C)。次に、これらの細胞の細胞表層に発現するシンデカン-1, -2, および-4 の発現量を FACS 解析により比較した。その結果、H11-SN2 細胞の細胞表層におけるシンデカン-2 の発現量の増加が観察された (図 4D)。このシンデカン-2 強制発現化は、その他のシンデカンの発現には影響を及ぼしておらず、この結果は前述の 3G10 によるウェスタンプロットの結果 (図 4B) ともよい一致を示した。

2.1.3 シンデカン-2 強制発現による転移の抑制

シンデカン-2 高発現性で低転移性の P29 細胞と、P29 細胞と同程度のシンデカン-2 発現量を示す H11-SN2 細胞の転移能を比較解析した。P29, H11, H11-Vec, H11-SN2 細胞をマウス尾静脈から移植し 16 日後に屠殺した後、肺を摘出し、肺における転移結節の数を計測した (図 5 および表 2)。P29 細胞移植マウスの肺にはほとんど転移結節が認められなかったのに対して、H11 細胞移植マウスの肺においては多くの腫瘍結節が認められた。H11-Vec 細胞移植マウスの肺転移結節数は親株の H11 細胞移植マウスのそれと同程度であったが、H11-SN2 細胞移植マウスの肺には転移結節はほとんど認められなかった。一方、皮下移植を介した肺への転移能では、肺に形成された腫瘍結節数は静脈移植を介した場合と比べ大きく異なるもののシンデカン-2 の高発

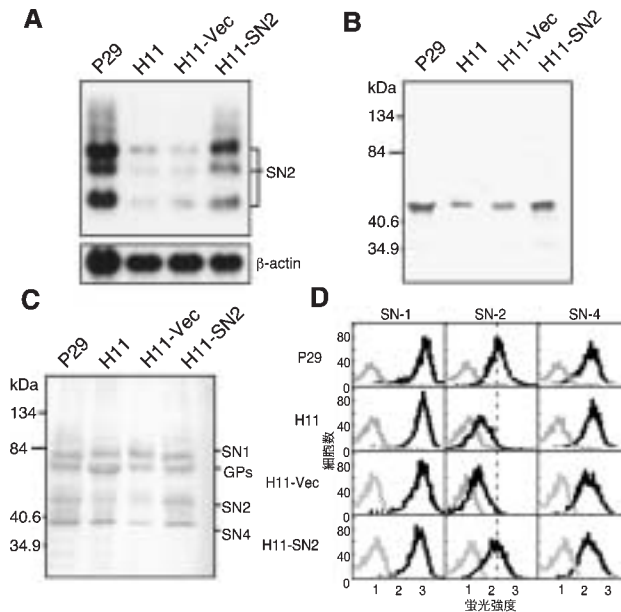


図4 シンデカン高発現細胞の他のシンデカン発現に及ぼす影響

A: 各細胞より抽出したポリ(A)+RNA (2 μ g/レーン)を用いてノーザンブロット法によりシンデカン-2の発現量を比較した。プローブにはシンデカン-2全コード領域を含むcDNAを用いた。B: 各細胞から抽出した細胞膜型プロテオグリカン画分を、ヘパリチナーゼI, IIおよびコンドロイチナーゼABCで消化し、得られたタンパク芯をSDS-PAGEにより分離し、F69-3G10抗体を用いたウエスタンブロットにより細胞膜型プロテオグリカンを検出した。C: 各細胞抽出液から抗シンデカン-2抗体を用いて免疫沈降した画分を、ヘパリチナーゼI, IIおよびコンドロイチナーゼABCで消化した後SDS-PAGEにより分離し、F69-3G10抗体を用いたウエスタンブロットによりシンデカン-2を検出した。D: 各細胞の細胞表層シンデカンファミリーの発現を、各シンデカンのタンパク芯に対する特異抗体を用いてフローサイトメーターで測定した。灰色線は非免疫血清を用いた対照を示す。これらの結果は、シンデカン-2の高発現は他のシンデカンの発現に影響を及ぼさないことを示している。

現化により転移能は著しく抑制され、低転移性P29株細胞に近い転移能にまで抑制された(表2)。この結果はマウス・ルイス肺癌由来の細胞においてシンデカン-2を人為的に高発現にすることによって肺への転移が大きく抑制されたことを示している。

2.2 転移能の異なる株細胞の一次腫瘍組織形成

シンデカン-2強制発現による転移の抑制機構を明らかにする目的で、次に、一次腫瘍の組織形成に注目し、その解析を行った。これまでの研究において、転移能の異なる二つの株細胞は全く異なった一次腫瘍組織形成を示すことが明らかにされている[12, 14, 17]。すなわち、高転移性H11細胞移植により形成させた一次腫瘍は腫瘍基底膜依存的な腫瘍組織形成を示すのに対して低転移性P29細胞を移植して形成させた一次腫瘍では強い間質誘導を示し、誘導された間質細胞の形成するフィブロネクチンに富んだ間質型細胞外マトリックス依存的な腫瘍組織形成

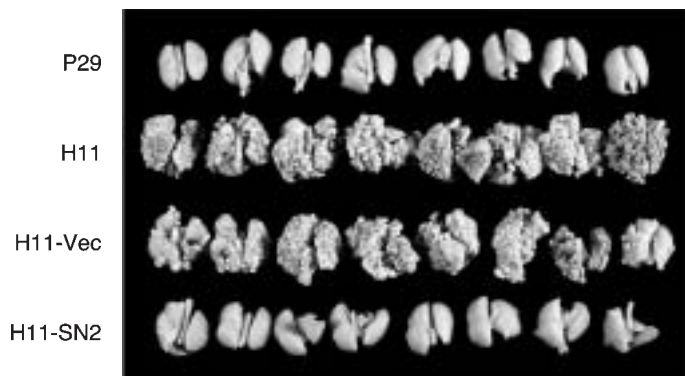


図5 シンデカン-2 低発現性の高転移性H11細胞におけるシンデカン-2 高発現化の転移能への影響
P29 細胞, H11 細胞, H11 細胞にベクターのみを導入した H11-Vec 細胞, H11 細胞にシンデカン-2cDNA を導入し, 強制発現させた H11-SN2 細胞 (2×10^5 細胞) をそれぞれマウス尾静脈に移植し, 16 日後に屠殺して肺を摘出し, ブアン・ドゥボスク固定液中で固定した後撮影した。

表2 シンデカン-2 強制発現細胞の示す転移能

株細胞	移植部位	移植細胞数 ($\times 10^5$)	転移動物数	転移結節数	
				範囲	平均
P29	i.v.	2.0	6/8	0-9	2.9
H11	i.v.	2.0	8/8	661-1311	977.9
H11-Vec	i.v.	2.0	8/8	235-1405	688.3
H11-SN2	i.v.	2.0	8/8	0-23	6.8
P29	s.c.	2.0	3/8	0-3	0.6
H11	s.c.	2.0	7/7	3-69	29.7
H11-Vec	s.c.	2.0	7/7	4-79	32.1
H11-SN2	s.c.	2.0	1/8	0-1	0.1

i.v.: 尾静脈内移植, s.c.: 皮下移植, 測定は表1と同様におこなった

を示すことが明らかにされている。Barsky らは間質誘導が腫瘍細胞の浸潤・転移に対して自然障壁として作用していることを報告している [40]。そこで, シンデカン-2 の強制発現による転移抑制が間質誘導と相関するか否かを検討した。

2.2.1 転移能の異なる株細胞およびシンデカン-2 強制発現細胞の示す間質誘導能

P29 細胞の形成する一次腫瘍は上で述べた通り, 強い間質誘導を示すのに対して, 高転移性 H11 細胞の形成する一次腫瘍においては, 間質誘導がほとんど観察されず, フィブロネクチンの局在は腫瘍血管の基底膜に限定されていた (図 6A)。また, 高転移性 H11 細胞の形成する一次腫瘍はラミニンの染色により腫瘍基底膜に依存した腫瘍組織形成を示すことが明らかにされている (図示せず)。ベクターのみを導入した H11-Vec 細胞は親株の H11 細胞と同様に間質誘

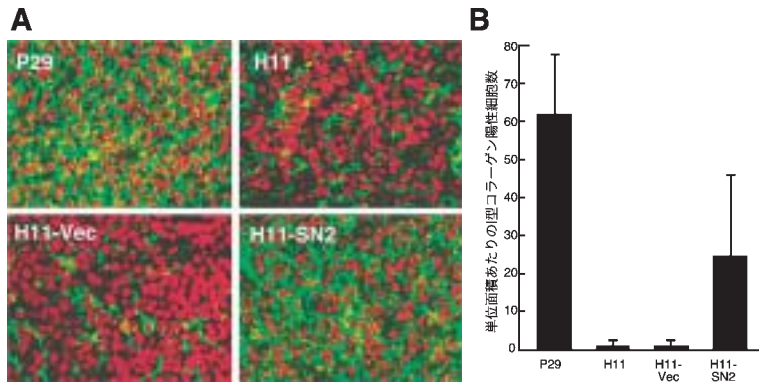


図 6 シンデカン-2 強制発現による一次腫瘍組織形成への影響

A: P29, H11, H11-Vec および H11-SN2 細胞をマウス皮下に移植して作らせた一次腫瘍の組織切片を抗フィブロネクチン抗体 (緑色) で染色した。強い間質誘導能を示す P29 細胞が、誘導された宿主間質細胞の形成するフィブロネクチンに富んだ間質型細胞外マトリックスに取り囲まれていた。それに対して間質誘導能をもたない H11 細胞の形成する腫瘍組織内でフィブロネクチンの局在するのは血管内皮基底膜のみであった。ベクターのみを導入した H11-Vec 細胞が親株の細胞と同様に間質誘導を示さないのに対してシンデカン-2 を強制発現した H11-SN2 細胞は強い間質誘導を示し、腫瘍細胞は誘導された間質細胞の形成するフィブロネクチンに富んだ間質型細胞外マトリックスにより取り囲まれていた。核はヨウ化プロビジウムで対比染色した。B: 宿主由来の間質細胞である I 型コラーゲン陽性細胞を、抗 I 型コラーゲン抗体で染色し、単位面積あたりの I 型コラーゲン陽性細胞数を計測した。

導能を示さないのに対して、シンデカン-2 を強制発現させた H11-SN2 細胞の形成する一次腫瘍では低転移性 P29 細胞と酷似した強い間質誘導能を示した (図 6A)。また、腫瘍組織中に誘導された間質細胞数を比較するため、それぞれの一次腫瘍を I 型コラーゲンに対する抗体を用いて染色し単位面積あたりの I 型コラーゲン陽性細胞数を計測した。その結果、フィブロネクチン染色の結果と一致して、H11 腫瘍より P29 腫瘍内において遥に多くの間質細胞の存在が観察された。一方、シンデカン-2 を強制発現させた H11-SN2 細胞によって形成された腫瘍組織内においては P29 細胞と同様に多くの間質細胞が観察された (図 6B)。

2.2.2 転移能の異なる株細胞の形成する腫瘍組織における血管新生

つぎに、血行性転移に大きく影響すると考えられている腫瘍組織内における血管新生について検討した。一次腫瘍を血管内皮細胞の特異的標識として多用されている CD31 抗体により染色した。その結果、転移能の異なる腫瘍組織間で全く異なる腫瘍血管形成が観察された (図 7A)。すなわち、P29 腫瘍に誘導された新生血管は典型的な毛細血管構造を示しているのに対して、H11 腫瘍における新生血管は血管基底膜構造が不連続な類洞様の血管構造を示した。H11-Vec 腫瘍内に形成された新生血管は H11 腫瘍内の新生血管と同様、類洞様血管を形成した。それに対して、シンデカン-2 強制発現性の H11-SN2 腫瘍組織内においては P29 組織内で形成される血管に類似した血管構造を示した。また、各腫瘍の有する血管新生能を定量化するため、新生

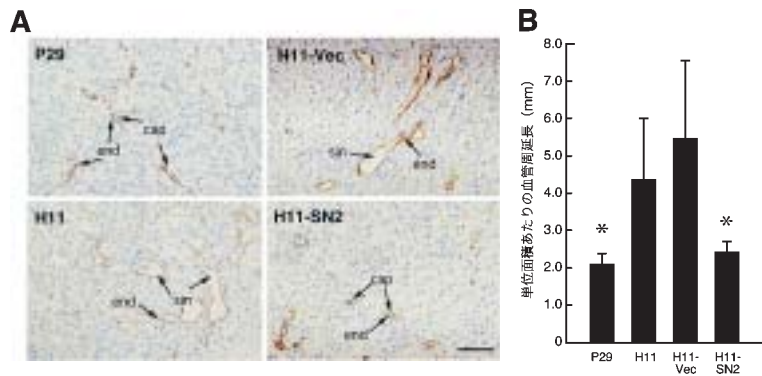


図7 転移能の異なる株細胞およびシンデカン-2 強制発現細胞の形成する腫瘍における新生血管の構造と血管新生能

A: P29, H11, H11-Vec および H11-SN2 細胞をマウス皮下に移植して作成した一次腫瘍組織切片を抗 CD31 抗体で染色した (茶色). 核をヘマトキシリンで対比染色した (青色). P29 腫瘍組織内に形成された腫瘍血管の内皮細胞 (end) は毛細血管 (cap) を形成し, H11 腫瘍組織における腫瘍血管は類洞様構造 (sin) を形成した. H11-Vec 腫瘍内に形成された血管の構造は, H11 腫瘍組織内のそれに酷似し, H11-SN2 腫瘍組織内に形成された血管は P29 腫瘍組織内の血管の構造に酷似していた. スケールは $100\mu\text{m}$. B: 単位面積中に存在する血管の総周長を画像解析で求め, 血管形成能を測定した. 高転移性 H11 および H11-Vec 腫瘍組織の方が低転移性 P29 および H11-SN2 腫瘍組織より有意に高い値を示した. * $P < 0.05$ (対 H11)

血管の総周辺長を画像解析により求めた (図 7B). その結果, 転移能の高い腫瘍 (H11 および H11-Vec 腫瘍) の方が, 低転移腫瘍 (P29 および H11-SN2 腫瘍) に比べ有意に高い血管新生能を有することが明らかとなった.

2.3 ルイス肺癌細胞の発現するマトリックス・メタロプロテアーゼ (MMPs)

腫瘍細胞の浸潤転移は明らかに腫瘍細胞の場所的移動を伴う生物現象である. この細胞移動に対してそれを取り囲む細胞外マトリックスが自然障壁となっていることが仮定され, それを分解する酵素としてマトリックス・メタロプロテアーゼ (MPs) の研究が活発に展開されている [41]. これまでに MMP 遺伝子はヒトで 24 種類報告されており, 一次構造と基質特異性の違いによりコラゲナーゼ群, ゼラチナーゼ群, ストロメライシン群, および膜貫通領域をもった細胞膜貫通型 MMP 群に大別される (図 8A). Liotta らは基底膜構成成分である IV 型コラーゲン分解活性が癌の転移能を位置づける一つの指標であると提唱してきた [42]. 癌細胞が産生する IV 型コラーゲン分解酵素としてはゼラチナーゼが主要であることから, 本研究で観察されたシンデカン-2 を介した転移抑制に, ルイス肺癌細胞の産生するゼラチナーゼの関与の有無を検討した.

2.3.1 シンデカン-2 強制発現細胞の示す MMP-2 活性化

上記の実験で樹立した高・低転移性株細胞の産生している MMPs を検討するため, 各々の細

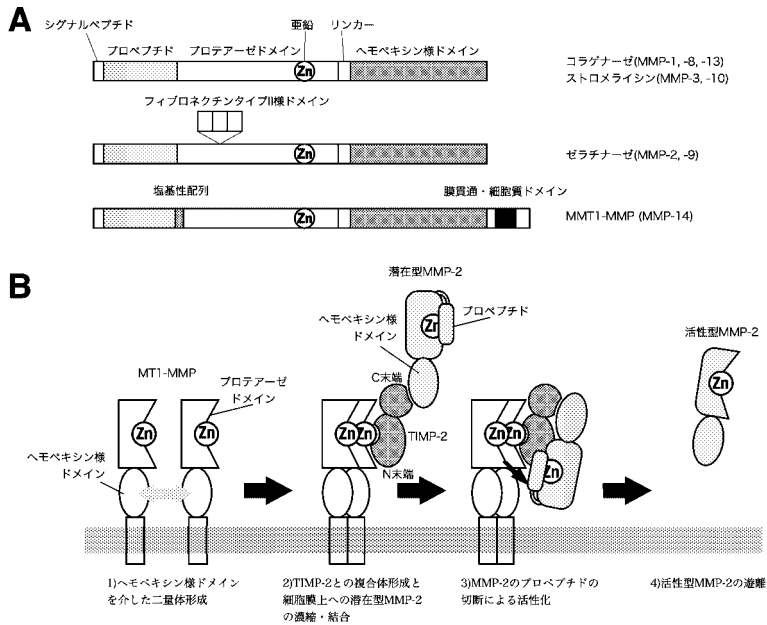


図8 マトリックス・メタロプロテアーゼ (MMPs) の構造と MMP-2 の細胞膜表面での活性化機序
 A: マトリックス・メタロプロテアーゼ (MMPs) は共通したドメイン構造を有しており N 末端から、シグナルペプチド、酵素の潜在性を保つためのプロペプチド、酵素の触媒部位のプロテアーゼドメイン、ヘモベキシン様ドメイン、それらを繋ぐリンカーが存在する。ゼラチナーゼにはコラーゲンとの結合に必要な3つのフィブロネクチン II 型ドメインの挿入がある。膜型 MMP-1 (MT1-MMP) は C 末端側に膜貫通ドメインと細胞質ドメインを持つ。B: MMP-2 の細胞膜表面での活性化の機序は 1) MT1-MMP のヘモベキシン様ドメインを介した二量体形成、2) TIMP-2 との複合体形成と細胞膜上への潜在型 MMP-2 の濃縮・結合、3) MMP-2 のプロペプチドの切断による活性化、4) 活性型 MMP-2 の遊離

胞のならし培地 (conditioned media, 以下 CM と略) を酵素源として用い、ゼラチンを基質としてザイモグラフィーによりゼラチナーゼ群の発現および活性化の解析を行った。MMP は不活性の潜在型酵素として分泌され、細胞外マトリックス分解活性を発揮するには活性化の過程を経る。潜在型 MMP-2 (72 kDa) は細胞外に分泌された後に、活性化酵素により潜在型 MMP-2 のプロペプチドの Asn37-Leu38 間が切断されて中間型 MMP-2 (68 kDa) になり、その後、自己触媒により活性型 MMP-2 (62 kDa) となる (図 8B)。低転移性 P29 細胞の CM 中には 72 kDa の潜在型 MMP-2 バンドが主要バンドとして検出されるのに対して、高転移性 H11 細胞の CM 中には 72 kDa の潜在型、68 kDa の中間型および 62 kDa の活性型 MMP-2 のバンドが検出された (図 9)。H11-Vec 細胞の CM からは、H11 細胞 CM と同様、潜在型、中間型および活性型 MMP-2 の 3 本のバンドが検出された。それに対して、シンデカン-2 を強制発現させた H11-SN2 細胞由来の試料においては P29 細胞由来の試料と同様、潜在型 MMP-2 が主要成分であり、中間型、活性型 MMP-2 は殆ど検出されなかった。この結果をデンストメーターで定量化し、潜在型 MMP-2

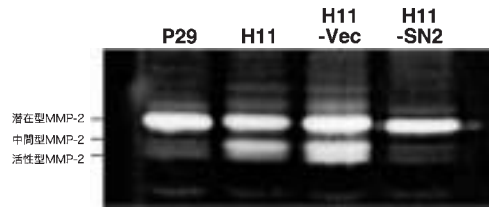


図9 ルイス肺癌細胞の産生するゼラチナーゼとその動態

P29 細胞, H11 細胞, H11-Vec 細胞および H11-SN2 細胞を, 方法の項に示した方法で CM を調製し, ゼラチンを基質としたザイモグラフィーによりルイス肺癌細胞の産生する MMP の分子種とその動態を検討した結果, すべての細胞が潜在型 MMP-2 に相当する分子量を持つ位置 (72 kDa) に泳動する MMP を産生していた. 更には, 高転移性 H11 および H1-Vec 細胞の CM 中には中間型及び活性型 MMP-2 に相当する位置に泳動するゼラチン分解バンドを検出した.

の量に対する中間型および活性型 MMP-2 の割合を比較した結果, 親株の H11 細胞と比べて, H11-Vec 細胞は同程度の活性化を示したのに対して, シンデカン-2 強制発現 H11-SN2 細胞の示す活性化は 80% の減少を示した (表 3). この結果はシンデカン-2 強制発現による転移の抑制実験の結果とよい一致を示している.

2.3.2 シンデカン-2 高発現の MMP-2 活性化分子群の発現に及ぼす影響

シンデカン-2 高発現性細胞の培養系における MMP-2 活性化の抑制機構を解析するにあたって, まず, MMP-2 活性化に関与する分子群の発現に差異がないかどうかを解析した. これまで細胞膜上での MMP-2 活性化の機構については多くの報告がなされている [45-51]. それによれば潜在型 MMP-2 は膜貫通型マトリックス・メタロプロテアーゼである MT1-MMP と tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) 複合体を受容体として細胞膜表面に結合し, TIMP-2 と結合していない MT1-MMP が潜在型 MMP-2 を切断して中間型 MMP-2 を生成する. 次に自己触媒的に中間型 MMP-2 を切断して活性型 MMP-2 を生成し, 細胞外に遊離させる (図 8B). そこで, MMP-2 活性化に関与するこれらの分子群, すなわち MMP-2, MT1-MMP および TIMP-2 の mRNA レベルでの発現量を 4 つの株細胞間で比較した. ノーザンプロットの結果, MMP-2, MT1-MMP および TIMP-2 の発現はシンデカン-2 の発現の高低に関わらず 4 つの株細胞間で有

表 3 シンデカン-2 強制発現による MMP-2 活性化抑制

	P29	H11	H11-Vec	H11-SN2
活性化 (%) *	22.1	80.9	93.1	16.5
対 H11 (%) **	—	100	115	20

* 活性化 (%) は, Isnard らの方法 [44] に従って計算し, MMP-2 活性化 (%) = 中間型バンド + 活性型バンド / 潜在型バンド × 100 で計算した.

** H11 細胞に対する各細胞の活性化の割合を示した.

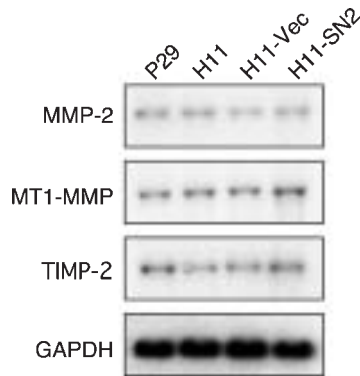


図 10 転移能の異なる株細胞におけるMMP-2活性化に関与する分子群の発現
P29 細胞, H11 細胞, H11-Vec 細胞および H11-SN2 細胞から抽出したポリ (A)+RNA を用いてノーザンブロット法により MMP-2, MT1-MMP, TIMP-2 mRNA の発現量を比較した。細胞で恒常的に発現している GAPDH の発現を対照として用いた。

意な違いは見いだされなかった (図 10)。そこで次にシンデカン-2 が MMP-2 活性化過程へ関与している可能性について考えた。

2.3.3 MMP-2 活性化過程におけるシンデカン-2 ヘパラン硫酸鎖の関与

シンデカン分子の機能として、その分子の持つヘパラン硫酸鎖を介して増殖因子、あるいは細胞外マトリックス成分に結合し、その結合シグナルを直接あるいは間接に細胞内に伝達することが明らかにされている [21-23]。MMP-2 の持つヘモペキシンドメインはヘパリン結合性を示すことがいくつかの報告で明らかにされている [47, 52, 53]。また、MMP-2 はヘパリンと結合することにより Asn80-Tyr81 の間の自己消化の活性が亢進することも明らかにされている [52]。従って、本研究で示したシンデカン-2 の高発現により MMP-2 の活性化が抑制される現象にはシンデカン-2 ヘパラン硫酸鎖の関与の可能性が考えられた。そこで、シンデカン-2 タンパク芯のグリコサミノグリカン鎖付加部位のセリン残基をアラニンに変異させた変異体を強制発現させた H11-SN2ΔGAG 細胞の MMP-2 活性化、さらにはヘパリチナーゼ I により細胞表層のヘパラン硫酸鎖を除去した場合の MMP-2 活性化をゼラチンゼイモグラフィにより調べた (図 11)。まず P29 細胞をヘパリチナーゼ I 消化することにより細胞表層からヘパラン硫酸鎖が除かれていることを抗不飽和ヘパラン硫酸抗体 10E4 を用いた FACS 分析により確認した (図 11A)。また、SN2Ab 抗体を用いた FACS 分析により、H11-SN2ΔGAG 細胞膜表層におけるシンデカン-2 タンパク芯の発現が P29 細胞と同程度であることも確認した (図 11B)。これらの細胞から調製した CM を用いたゼラチンゼイモグラフィの結果を図 11C に示した。H11-SN2ΔGAG 細胞の培養系ではヘパラン硫酸鎖を持つ H11-SN2 細胞の培養系と比較して高い MMP-2 の活性化が観察され、これらのバンドを定量化した結果、H11-SN2 細胞による活性化の割合は、H11 細胞

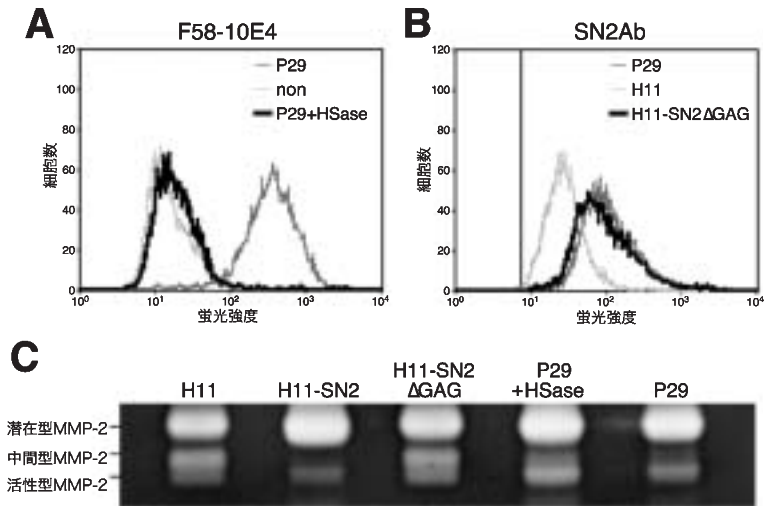


図 11 MMP-2 活性化における細胞表層ヘパラン硫酸鎖およびシンデカン-2 ヘパラン硫酸鎖に対する依存性
 A: 未処理 (P29) あるいは 0.1 U/ml のヘパリチナーゼ I で消化 (P29+HSase) した P29 細胞をヘパラン硫酸鎖を特異的に認識する F58-10E4 抗体で反応し, FITC-標識二次抗体で標識した後フローサイトメーターで蛍光強度を測定した. 非免疫 IgG を一次抗体として用いた結果を対照とした (non). B: グリコサミノグリカン鎖を持たないシンデカン-2 を高発現する H11-SN2ΔGAG 細胞を, 対照として P29 細胞および H11 細胞を用い, シンデカン-2 特異的 SN2Ab と反応し, FITC-標識二次抗体で標識した後フローサイトメーターで蛍光強度を測定した. 縦実線は非免疫 IgG を一次抗体として用いた対照の蛍光強度のピークの位置を示す. C: H11 細胞, H11-SN2 細胞, H11-SN2ΔGAG 細胞, ヘパリチナーゼ処理した P29 細胞 (P29+HSase) および未処理の P29 細胞 (P29) の培養系から調製した CM を用いてゼラチンザイモグラフィーにより MMP-2 活性化を解析した.

のそれと比較して 50%減少していた. これに対し, H11-SN2ΔGAG 細胞による活性化は H11 細胞のそれと比較して 4%の減少しか示さず, H11 細胞とほぼ同じ程度の活性化を示した (表 4). これはヘパラン硫酸鎖を持たないシンデカン-2 分子を強制発現させても MMP-2 の活性化に対して抑制的には作用し得ないこと, すなわち MMP-2 活性化の抑制はシンデカン-2 のヘパラン硫酸鎖を介した現象であることを強く示唆している. また, シンデカン-2 高発現性の P29 細胞をヘパリチナーゼ I 共存下で培養して得た CM を用いたザイモグラフィーの結果では酵素を加えないコントロールと比較して有意に MMP-2 の活性化が亢進されていた (図 11C). デンシトメトリーの結果では, 未処理の P29 細胞と比較してヘパリチナーゼ I 消化することにより MMP-2 の活性化の割合が 41%増加していた (表 4). この結果は先の H11-SN2ΔGAG 細胞の結果とよい一致を示している.

2.4 化学修飾ヘパリン投与による実験転移能の抑制

ここまでの研究において, ルイス肺癌細胞の転移には細胞表層のヘパラン硫酸プロテオグリカンのシンデカン-2 が関与しており, その抑制にはシンデカン-2 ヘパラン硫酸側鎖を介した

表 4 細胞表層ヘパラン硫酸およびシンデカン-2 ヘパラン硫酸側鎖による MMP-2 活性化抑制

	H11	H11-SN2	H11-SN2ΔGAG	P29+HSase	P29
活性化 (%)	68.2	34.8	65.8	55.3	39.3
対 H11 (%)*	100	50	96		
対 P29 (%)**				141	100

* H11 細胞に対する各細胞の活性化の割合, ** P29 細胞に対する各細胞の活性化の割合

MMP-2 活性化の抑制が関与することを示唆する結果を得た。一方、細胞表層ヘパラン硫酸鎖と転移に関連した研究は古くから多くの研究がなされており、また、実験転移においてヘパリンにより転移が抑制されることがいくつか報告されている [54, 55]。しかしながら、ヘパリンによってどのような機構で転移が抑制されているのかは明らかにされていない。この転移抑制効果はシンデカンのような細胞表層ヘパラン硫酸鎖の機能を外から加えたヘパリンが競合的に阻害した結果である可能性が考えられた。ヘパリンはまた、アンチスロンピン III と結合することにより非常に強い抗凝固活性を示し、出血による個体死が問題となる。ヘパリンを過ヨウ素酸酸化し水素化ホウ酸ナトリウムで還元して得られる化学修飾ヘパリンはアンチスロンピン III に対する結合性が低下し、抗凝固活性を殆ど示さない。そこでこの化学修飾ヘパリンを用いて、ルイス肺癌細胞の転移を抑制し得るか否かを検討した。

2.4.1 ヘパリンおよび化学修飾ヘパリンの抗凝固活性

ヘパリンを過ヨウ素酸酸化後、水素化ホウ酸ナトリウムで還元することにより低抗凝固性のヘパリン (Low anti-coagulant: LAC ヘパリン) が得られる。この化学修飾されたヘパリンが持つ抗凝固活性を表 5 に示した。LAC ヘパリンを混合したヒト血漿のプロトロンビン時間 (PT) はコントロールのレベルにまで減少した。また、LAC ヘパリンを混合したヒト血漿の活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT) もヘパリンと比較して有意に減少したが、生理食塩水を用いた対照あるいはコンドロイチン硫酸 A と比較してわずかに高い値を示した。従って、以下の実験ではこの化合物を低抗凝固ヘパリン (LAC ヘパリン) と表記して用いた。ヘパリンの皮下および静脈への注入に際して起こる血腫形成や出血による個体死は、LAC ヘパリンの注入時には観察されなかった。

2.4.2 癌転移に対する LAC ヘパリン投与の影響

H11 細胞を尾静脈に移植する 10 分前に 1.0 mg の LAC ヘパリンを静脈へ投与することにより、未処理の対照群と比較して H11 細胞の肺への転移が有意に抑制されたが、コンドロイチン硫酸投与マウスでは肺への転移の抑制は観察されなかった (図 12A)。LAC ヘパリンの投与量依存的

表5 化学修飾ヘパリンの示す凝固時間

	凝固時間 (秒)		出血
	PT	APTT	
control	10.6	10.8	-
LMW-HP	18.3	200<	+
HP	80.0<	200<	++
LAC-HP	9.8	118.6	-
CSA	10.6	46.0	-

外因性凝固時間 (PT) および内因性凝固時間 (APTT) の正常値はそれぞれ 10-13, 25-40 . 測定は愛知県がんセンター検査課に依頼した .

に, H11 細胞の肺への転移は抑制された (図 12B). 癌細胞の移植と同時に LAC ヘパリンを投与した時に転移が最も大きく抑制され, 癌移植 10 分前に LAC ヘパリンを投与しても有意な抑制効果が観察された. しかし, 移植 1 時間前や 1 時間後に LAC ヘパリンを投与しても転移抑制は殆ど観察されなかった (図 12C). このことから以後の実験は癌細胞移植 10 分前に LAC ヘパリンを投与した. また, LAC ヘパリンを皮下や腹腔内に投与しても尾静脈投与時と同様に, 有意な転移抑制効果が観察された (図 12D). ヘパリン, 低分子ヘパリン (LMW) あるいはヘパリン硫酸 (HS) を 1 mg/ml で尾静脈に投与しても LAC ヘパリン投与時と同様に有意な転移抑制が観察された. コンドロイチン硫酸 (CS) の投与では有意な転移抑制は観察されなかった (図 13A). また, LAC ヘパリンによる転移抑制効果を, 癌細胞の種類をかえて検討した. その結果, LAC ヘパリンによる転移抑制効果は H11 細胞のみならず, マウスメラノーマ B16F10 細胞, マウス

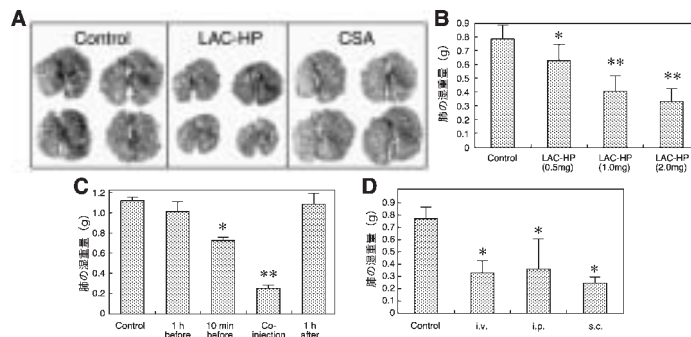


図 12 H11 株細胞の肺転移に対する LAC ヘパリンの影響

A: LAC ヘパリン (LAC-HP) あるいはコンドロイチン硫酸 (CSA) を尾静脈投与後, 1×10^6 個の H11 細胞を尾静脈移植した. 対照実験 (Control) においてはグリコサミノグリカン試料の代わりに生理食塩水のみを投与した. B: LAC ヘパリンを 0.5, 1.0, 2.0 mg / マウスの量で尾静脈に投与し, 10 分後に H11 細胞を尾静脈内に移植した. C: H11 細胞の尾静脈移植前・後の異なった時間に LAC ヘパリンを尾静脈から投与した. D: LAC ヘパリンを 1 mg / マウスの量で尾静脈 (i.v.), 腹腔内 (i.p.) あるいは皮下 (s.c.) に投与し, 10 分後 H11 細胞を尾静脈移植した. それぞれ移植 14 日後にマウスを屠殺して開腹し, 肺を摘出して全肺の湿重量を測定した. 数値は平均 \pm 標準偏差で示した. * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$ (対照)

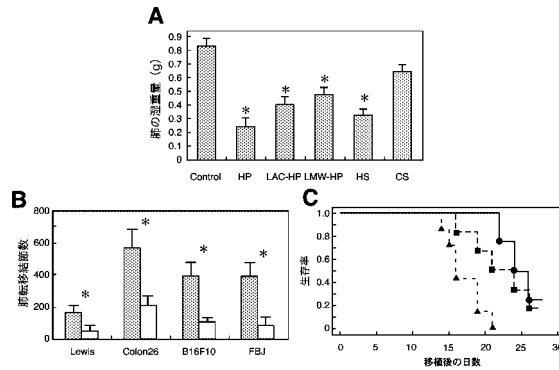


図 13 種々のヘパリン様物質の癌転移性および生存に及ぼす影響

A: 種々のヘパリン様物質の高転移性 H11 細胞の肺転移への影響. 各々のヘパリン様物質をヘパリン (HP), LAC ヘパリン (LAC-HP), 低分子ヘパリン (LMW-HP), ヘパリン硫酸 (HS) あるいはコンドロイチン硫酸 A(CSA) を 1mg / マウスで尾静脈投与し, 10 分後に 11 細胞 (1×10^6 細胞 / $200 \mu\text{l}$) を尾静脈に移植した. B: LAC ヘパリン (1mg / マウス) を尾静脈投与 10 分後に種々の腫瘍細胞 (Lewis; H11 細胞, B16F10; マウスメラノーマ由来高転移性細胞, colon26; マウス大腸癌由来高転移性細胞, マウス骨肉腫由来 FB1 細胞) を尾静脈に移植した. 対照 (control) は各々の腫瘍細胞を移植 10 分後, LAC ヘパリンの代わりに生理食塩水を投与した. それぞれ 14 日後にマウスを屠殺し, 肺を摘出して湿重量を測定した. 数値は平均 \pm 標準偏差で示した. * $p < 0.001$ (対対照) C: LAC ヘパリン (□) およびヘパリン (○) (各々 1mg / マウス), 対照として生理食塩水 (△) を尾静脈に注入し, 10 分後に H11 細胞を尾静脈に移植した. 生存率は Kaplan-Meier の方法により解析し, log-rank テストで有意差を求めた. 対照対 LAC ヘパリン ($p < 0.05$), 対照対ヘパリン ($p < 0.01$) である.

癌腫 colon26 細胞およびマウス骨肉腫 FB1 細胞においても同様に観察された (図 13B).

2.4.3 担癌マウスにおける LAC ヘパリンによる延命効果

ヘパリンおよび LAC ヘパリンを投与したマウスにおいては肺への転移が抑制されたのに加えて, 未処理の腫瘍移植マウスと比較して, ヘパリンおよび LAC ヘパリン投与により生存率が有意に延長された (対照対ヘパリン $p < 0.01$, 対照対 LAC ヘパリン $p < 0.05$) (図 13C).

2.4.4 H11 細胞の細胞表面ヘパリン硫酸鎖の FACS 分析

ヘパリン硫酸に対する単クローン抗体, F58-10E4 は H11 細胞表面と強く反応し, ヘパリチナーゼ I 消化によりその反応性は消失し, 細胞表面におけるヘパリン硫酸鎖の存在が示された (図 14A). このことは不飽和のヘパリン硫酸鎖を認識する単クローン抗体, F69-3G10 の反応性がヘパリチナーゼ I 消化後に増加することからも確認された (図 14B).

2.4.5 培養下における H11 細胞の増殖, 接着, 浸潤に及ぼす LAC ヘパリンの作用

ヘパリンおよび LAC ヘパリンは癌細胞の細胞増殖に対して有意な影響を及ぼさなかった (図 15A). マトリゲルに対する細胞接着性は, ヘパリンおよび LAC ヘパリンにより有意に抑制さ

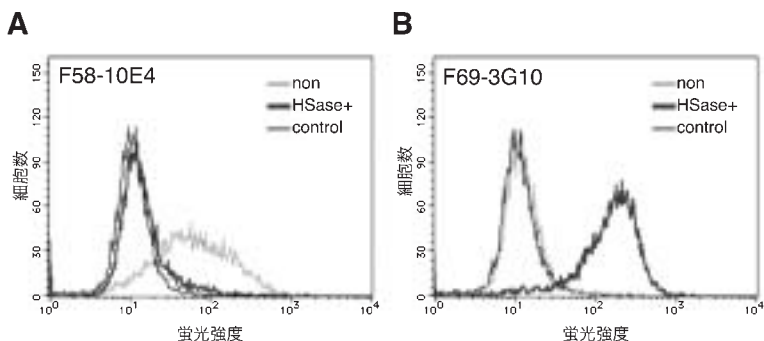


図 14 H11 細胞における細胞表面ヘパラン硫酸の発現

A: ヘパリチナーゼ I 処理あるいは未処理の H11 細胞を、ヘパラン硫酸特異的 F58-10E4 抗体と、あるいは B: 非還元末端に不飽和グルクロン酸残基をもつヘパラン硫酸鎖に特異的な F69-3G10 抗体と反応させ、洗浄後 FITC-標識二次抗体と反応後、フローサイトメーターで蛍光強度を測定した。淡灰色線は未処理 (non)、濃灰色線はヘパリチナーゼ I 消化した細胞 (HSase+)、黒色線はコントロールの非免疫 IgG を一次抗体に用いた細胞 (control) の蛍光強度を示した。

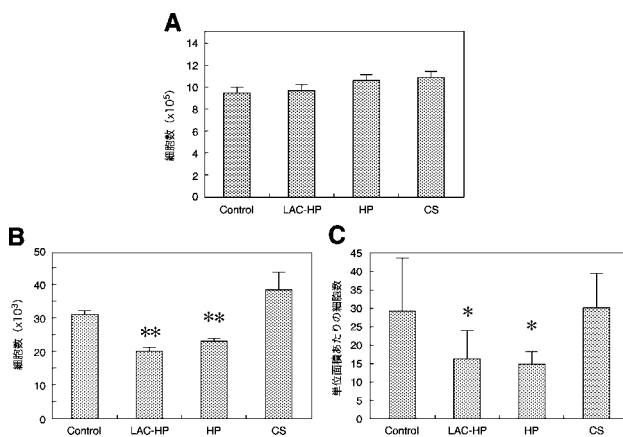


図 15 培養下における H11 細胞の増殖，接着，および浸潤性に及ぼす LAC ヘパリンの影響

A: LAC ヘパリン存在，非存在下で 1×10^5 個の H11 細胞を 35 mm プラスチック皿に播種し，10%FCS/DMEM 中で培養した。4 日後に細胞数を計測した。なお，どの培養条件下でも 4 日目に対数増殖期にあった。B: マトリゲルを被覆した 24 穴プレートに細胞懸濁液を加え 37 で 1 時間保温した。その後，PBS で洗浄して非接着細胞を除き，接着した細胞数を計測した。数値は 4 測点の平均 \pm 標準偏差で示した。*** $p < 0.01$ (対対照) C: ボイデンチャンバーを用いて浸潤能の解析をおこなった。数値は，3 回測定した結果の平均 \pm 標準偏差で示した。* $p < 0.05$ (対対照)

れた ($p < 0.01$) (図 15B)。また，マトリゲルを被覆したボイデンチャンバーを用いて計測した浸潤性もヘパリンおよび LAC ヘパリンにより有意に抑制された ($p < 0.05$) (図 15C)。

2.4.6 H11 細胞の肺での定着と保持における LAC ヘパリンの影響

lacZ 遺伝子を導入した H11 細胞である 4A1-1 細胞を静脈へ移植し、1 日後に肺切片を X-Gal 染色して顕微鏡下で観察した結果、肺へ定着した腫瘍細胞は青色の結節として同定された。生理食塩水のみを投与した対照マウスの肺においては X-Gal 陽性の微小転移結節が多数観察された (図 16A および D)。一方、LAC ヘパリン投与マウスの肺に形成された X-Gal 陽性の微小転移結節数は対照マウスの肺における転移結節と比較して大きく減少しており、その減少は濃度依存的であった (図 16B および D)。しかしながらコンドロイチン硫酸 A を投与したマウスでは結節数の減少は観察されなかった (図 16C および D)。

2.5 シンデカン-2 高発現性細胞の示す腫瘍周縁組織への浸潤能

ルイス肺癌細胞は転移能の高低に関わらず、移植後の個体の死亡時期がほぼ同じである。高転移性 H11 細胞の移植による個体死の主要な原因は転移によると考えられる。しかし、低転移性 P29 細胞移植後の死亡時期が、H11 細胞移植後とほぼ同じであること理由は不明である。そこで、P29 腫瘍細胞の皮下移植による一次腫瘍形成に伴う腫瘍周縁組織への浸潤性について検討を行った。

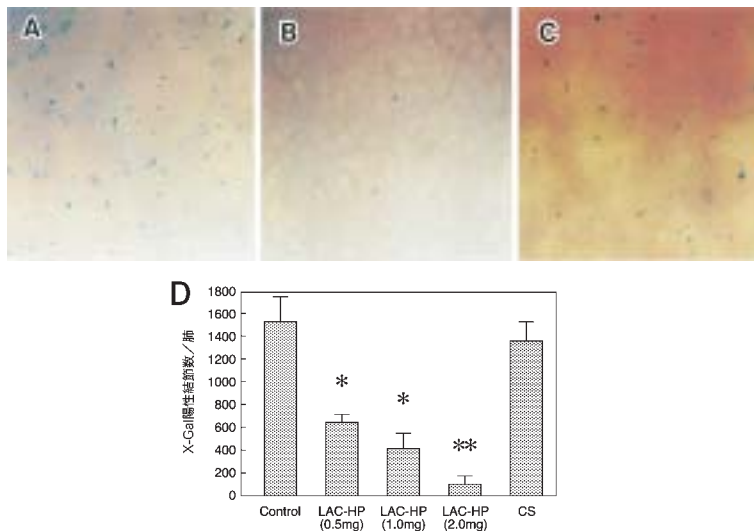


図 16 *LacZ* 遺伝子導入 H11 細胞の肺への定着と維持に対する LAC ヘパリンの影響
LAC ヘパリンを 1.0 mg / マウス (B)、コンドロイチン硫酸 A を 1.0 mg / マウス (C)、および対照として生理食塩水 (A) を尾静脈に投与し、10 分後に *LacZ* 遺伝子導入 H11 株細胞、4A1-1 細胞を尾静脈に移植した。1 日後に屠殺し、肺を摘出して X-Gal で染色した。染色された微小結節を実体顕微鏡下で観察し、転移結節数を計測した。生理食塩水 (A)、LAC ヘパリン (B)、およびコンドロイチン硫酸 A (C) をそれぞれ投与したマウスの肺に定着した細胞を示した。また、肺に定着した X-Gal 陽性結節数は LAC ヘパリン濃度依存的 (0.5, 1.0 および 2.0 mg / マウス) を示した (D)。数値は平均値 ± 標準偏差で示した。*p < 0.001, **p < 0.0001

2.5.1 一次腫瘍組織における骨格筋組織への浸潤

皮下移植により形成した一次腫瘍を摘出する際、P29 皮下腫瘍とそれに接する筋肉組織との間に著しい癒着が観察されたのに対して、H11 腫瘍ではそれが全く見られなかった。この違いを組織学的に検討するため、腫瘍塊と筋肉組織が接している部分のパラフィン包埋切片を作製し、ヘマトキシリン・エオシンで染色して、組織像を観察した(図 17)。その結果、筋肉組織への癒着が見られる P29 腫瘍細胞は、筋繊維束の間に存在する結合組織へ強い浸潤と活発な増殖を示し、腫瘍固有間質を形成しているのが観察された(図 17A, B, C)。それとは対照的に、H11 腫瘍においては腫瘍と筋肉組織とは明確に分離しており、腫瘍の周縁組織への浸潤は全く見られなかった(図 17D, E, F)。シンデカン-2 を強制発現した H11-SN2 細胞の皮下移植で作成した

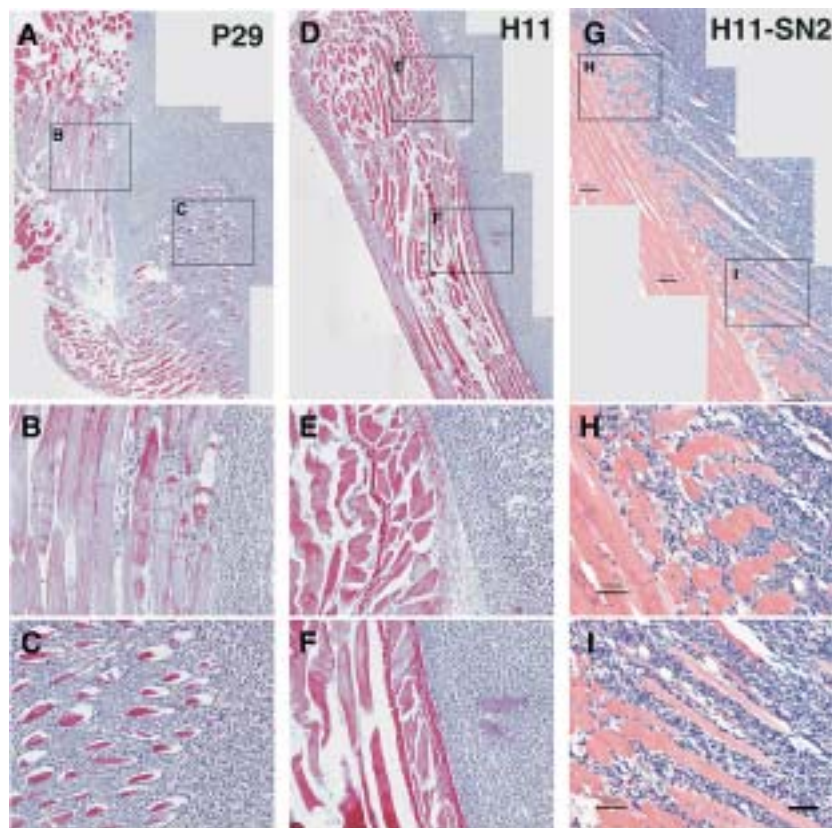


図 17 一次腫瘍組織における P29 細胞およびシンデカン-2 強制発現細胞の示す浸潤性
P29 細胞 (A, B, C), H11 細胞 (D, E, F) および H11-SN2 細胞 (G, H, I) をそれぞれマウスの皮下に移植し、4 週間後に屠殺し、一次腫瘍組織を摘出した。境界部分の切片を作成し、ヘマトキシリン/エオシンで染色した。B と C, E と F, H と I はそれぞれ A, D, G の強拡大の写真を示した。スケールは 50 μm 。

一次腫瘍においても P29 腫瘍と同様に筋繊維束間への強い浸潤が観察された (図 17G, H, I).

2.5.2 浸潤能の異なる株細胞培養下におけるフィブロネクチンに対する走化性と接触移動

フィブロネクチンに対する走化性および接触移動性は、ともに生体内での浸潤能の強さを反映して P29 細胞の方が H11 細胞よりも有意に高い値を示した (図 18).

2.5.3 フィブロネクチン基質上における細胞移動

培養皿をフィブロネクチンで被覆し、転移能の異なる株細胞を飽和密度で播種し、一時間放置し単層培養系を作成し、直線状に細胞を剥離した。7 時間培養後に線幅の修復度を測定し、細

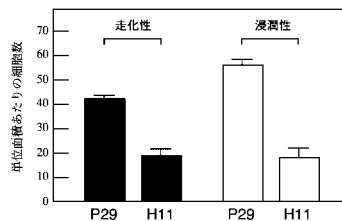


図 18 転移能の異なる株細胞のフィブロネクチンに対する走化性および接触遊走
走化性の解析にはポイデンチャンパーの下層に 10 μ g/ml のフィブロネクチンを加え、また、接触遊走の測定においてはフィルターの上に 50 μ g/ml の濃度でフィブロネクチンを被覆し、P29 細胞あるいは H11 細胞を 0.2% BSA/PBS に懸濁してチャンパー上層に添加し、7 時間の培養後、上部に残った細胞を除き、下部に移動した単位面積あたりの細胞数を計測した。数値は平均値 \pm 誤差で示した。

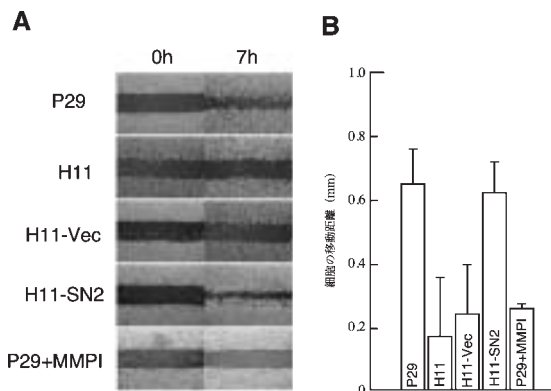


図 19 転移能の異なる株細胞のフィブロネクチン基質上での細胞の移動度
DMEM 中に 3×10^5 個の P29, H11, H11-Vec および H11-SN2 細胞を懸濁し、それぞれフィブロネクチンを被覆した 24 穴プレートに播種し、1 時間放置後に細胞層を直線状に剥離した後、7 時間培養を継続した (A)。細胞移動における MMP の関与を検討するため、移動速度の速い P29 細胞培養系に MMP 阻害剤 phosphoramidon を 10 μ M の濃度で添加し、移動度に対する効果を測定した。剥離した直後と 7 時間培養後のそれぞれの幅を測定し、細胞の移動距離を求めた (B)。数値は平均値 \pm 誤差を示した。

細胞の移動距離を求めた(図19)。培養下および生体内での浸潤能を反映して、P29細胞はH11細胞と比べ非常に高い移動度を示した(図19A)。さらにはシンデカン-2強制発現H11-SN2細胞もP29細胞と同程度の高い移動度を示した(図19A)。この結果を定量化した結果、P29細胞およびH11-SN2細胞はH11およびH11-Vec細胞と比較して約3倍の移動距離を示した(図19B)。注目すべきは、MMP阻害剤による移動度の阻害であり(図19, P29+MMPI)、この細胞移動には細胞外マトリックスの分解酵素であるMMPが関与していることが示唆された。また、H11細胞の細胞移動もMMP阻害剤により抑制されたが、その抑制率はP29細胞の方が高かった(図示せず)。

2.5.4 シンデカン-2高発現性低転移性細胞におけるMMP-3の発現

シンデカン-2高発現性の低転移性P29細胞およびH11-SN2細胞のフィブロネクチン基質上での細胞移動にMMPが関与していることが示唆された。本研究で明らかにしたMMP-2の活性化は転移能と陽の相関性を示し、高転移性のH11およびH11-Vec細胞で高い活性化を示した。従って、低転移性細胞の示す強い浸潤能と速い細胞移動能は異なったMMPによって仲介されている可能性が考えられた。しかしながら、ゼラチンザイモグラフィーの結果においては低転移細胞に共通した高いゼラチン分解バンドは検出されなかった。そこで、低転移性細胞特異的に発現されているMMP(s)を、カゼインザイモグラフィーを用いて検索した。転移能の異なる株細胞をFCSを含まないDMEM中で培養することによって得られたCMを酵素源としてカゼインザイモグラフィーを行った。その結果、興味深いことに、低転移性細胞のCMに共通して

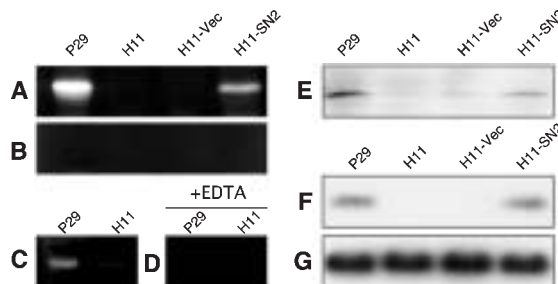


図20 浸潤能の高い細胞が示すMMP-3の発現

P29細胞, H11細胞, H11-Vec細胞およびH11-SN2細胞から、方法の項に示した方法でCMを調製し、カゼインを基質としたザイモグラフィーによりルイス肺癌細胞の産生するマトリックス・メタロプロテアーゼを検出した結果、57kDaのカゼイン分解バンドが検出された(A)。このバンドはEDTA存在下では検出されなかった(B)。P29およびH11腫瘍由来のCMを用いたカゼインザイモグラフィーにおいても、培養系と一致した位置に分解バンドが検出され(C)、このバンドはEDTA存在下で検出されなかった(D)。また、P29細胞, H11細胞, H11-Vec細胞およびH11-SN2細胞由来のCMを、MMP-3抗体を用いたウェスタンブロットでMMP-3タンパク質の発現を比較した(E)。また、P29細胞, H11細胞, H11-Vec細胞およびH11-SN2細胞から抽出したポリ(A)+RNAを用いてノーザンブロット法によりMMP3のmRNA発現量を比較した(F)。対照にはGAPDHを用いた(G)。

MMP-3 の分子量 (57 kDa) と一致した泳動度を持つ位置にカゼイン分解バンドが観察された (図 20A). この分解活性は EDTA により阻害された (図 20B). そこで, P29 および H11 細胞を皮下移植して作らせた一次腫瘍において実際浸潤している組織中での MMP-3 様酵素の存在を検索した. その結果, 各々の細胞系の CM を用いて得られた結果と同じ結果が得られた (図 20C). 本酵素活性は同様に EDTA により阻害された (図 20D). 次に, 本酵素の分子種を同定するため, MMP-3 特異抗体を用いてウエスタンブロットを行った結果, 低転移性株細胞特異的に観察された 57 kDa の活性バンドは MMP-3 抗体と反応性を示し (図 20E), MMP-3 と同定された. 最後にこの MMP-3 mRNA 発現をノーザンブロット法で解析した. ゼイモグラフィーの結果からも予測されるように, 低転移性細胞に共通して MMP-3 mRNA 発現が観察され, 高転移性 H11 および H11-Vec 細胞においてはその mRNA 発現は検出されなかった (図 20F, G). これらの結果は, シンデカン-2 高発現性の低転移性細胞の示す腫瘍周縁組織への強い浸潤性は MMP-3 により仲介されていることを強く示唆するものである.

2.5.5 シンデカン-2 発現量と MMP-3 発現量の比較

上の実験結果は, シンデカン-2 の発現と MMP-3 の発現の間には正の相関性があることを示唆している. すなわち, MMP-3 の発現は転移能と逆相関を示し, 浸潤性とは正の相関を示すことが示唆された. そこで, 中転移性 LM12-3 細胞を加えた 3 つの株細胞に加え, シンデカン-2 強制発現 H11-SN2 細胞間でシンデカン-2 と MMP-3 発現量の関係を RT-PCR により比較した. その結果, シンデカン-2 を中程度発現している LM12-3 細胞では MMP-3 も中程度の発現量を示し, シンデカン-2 発現の高低は MMP-3 発現の高低とよい一致を示した (図 21).

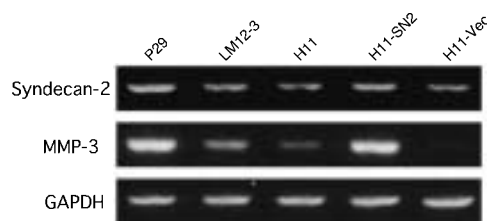


図 21 シンデカン-2 発現量と MMP-3 発現量の相関性

P29 細胞, LM12-3 細胞, H11 細胞, H11-Vec 細胞および H11-SN2 細胞から抽出したポリ (A)+RNA を用いて RT-PCR によりシンデカン-2 および MMP-3 の mRNA 発現量を半定量的に比較した. 細胞で恒常的に発現している GAPDH の発現量を対照として用いた.

3. 考 察

癌の転移は腫瘍細胞の原発巣からの遊離とリンパ管や血管といった脈管への侵入，脈管内移動，標的組織内毛細管の内皮細胞表層への接着，定着と増殖，それに引き続き組織内への侵入，定着と増殖により成立すると考えられている [1-4]．これらの諸過程に関わる分子の機能を明らかにすることは，癌の抑制法を開発する上で重要である．一方，癌の浸潤もまた癌の悪性度を決定づける重要な要素である．これら，癌の転移，浸潤という現象には腫瘍とそれを取り巻く細胞外マトリックスとの相互作用が重要な役割を果たしていることが明らかにされている [1-3, 10, 11]．

3.1 シンデカン-2 発現量と転移

本研究室でのこれまでの研究において，マウス・ルイス肺癌から自然転移能の違いに基づいてクローニングした株細胞を樹立し，転移能に細胞表層へパラン硫酸鎖がどのように関与しているかを解析する良いモデル系が確立されている．これまでの研究において，ルイス肺癌由来の転移能の異なる株細胞がフィブロネクチン基質への接着に際して全く異なったアクチン細胞骨格形成を示し，これらの接着応答性の違いは細胞表層に存在するヘパラン硫酸プロテオグリカンであるシンデカン-2 の発現量の違いに依存していることが明らかにされている [16, 17]．しかし，シンデカン-2 の癌転移への関与の様式および作用の機構についての研究は立ち遅れている．そこで，まず，転移能の異なる 3 つの株細胞を用い，転移能と細胞表層シンデカンの発現量との間に一定の関係が存在するかどうかを解析した．その結果，ルイス肺癌はシンデカンファミリーすべてのファミリーメンバーを発現していたが，そのうちシンデカン-2 のみの発現量と転移能との間に逆相関の関係が存在することが明らかとなった．それ以外のシンデカンは，転移能の高・低に関わらず発現レベルに有意な差は観察されなかった．この実験結果に基づき，上記の逆相関の背後に因果関係があるか否かを明らかにするため，シンデカン-2 低発現性の高転移性 H11 細胞にシンデカン-2 cDNA を導入し強制発現させたクローン性の安定高発現株 H11-SN2 細胞を用い，転移能を測定したところ，シンデカン-2 を高発現させることにより転移が大きく抑制された．つまりルイス肺癌においてはシンデカン-2 発現量のみを人為的に変化させることにより転移能を自由にコントロールすることが可能となった．

3.2 シンデカン-2 による MMP-2 活性化の抑制

細胞表層でのシンデカン-2 分子の強制発現が転移抑制に対してどのように関わっているのか，その機構に興味を持たれた．転移が成立するためには，癌細胞の一次腫瘍からの遊離，血管内侵入，転移先での血管外侵出など，癌細胞が乗り越えなければならない生物構造的障壁が多く存在する．これらの構造的障壁となっている細胞外マトリックスを分解し，癌の悪性化への関与が明らかにされている分子としてマトリックス・メタロプロテアーゼ (MMP) がある．これまで

に、がん細胞株あるいは組織切片の解析などから癌に関連する MMP として、MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-9, MMP-10, MMP-11, MMP-13 それに加えて MT1-MMP の存在が報告されてきた [41]。しかしながらどの MMP が癌の浸潤、転移に作用しているかは推測の域を出ていなかった。がん転移の過程として提唱されているモデル (図 1) で脈管への侵入、標的組織での脈管から標的組織への侵入など、基底膜破壊が重要なステップであると考えられてきた。基底膜の主要な構成成分である IV 型コラーゲンは基底膜の密な網目構造を形成している。このような理由からこれまでに IV 型コラーゲン分解活性が癌細胞の悪性度を特徴づける一つの指標であるとして考えられている [42]。がん細胞が産生する IV 型コラーゲン分解酵素としては MMP-2, MMP-9 が主要であり、これらのがん組織での発現や局在が数多く報告されている [56]。本研究において転移能の異なる細胞で、転移能と一致した MMP-2 の著しい活性化が認められた。すなわち、高転移性 H11 細胞において高い MMP-2 の活性化を示した。注目すべきはシンデカン-2 を強制発現させ、転移を抑制した細胞では MMP-2 活性化が抑制されていたことである。これはシンデカン-2 により MMP-2 活性化が抑制され、その結果として転移が抑制されたことを示唆している。

MMP-2 の活性化機構は試験管内で MT1-MMP の触媒部位を用いた実験により明らかにされている [57]。即ち、MT1-MMP が潜在型 MMP-2 プロペプチドの Asn37 と Leu38 との間を加水分解し、それによって生じた中間型 MMP-2 は自己触媒的に Asn80 と Tyr81 の間が加水分解され活性型 MMP-2 となる。Sato らは膜貫通型の MT1-MMP が細胞膜上で潜在型 MMP-2 を活性化することを明らかにした [45] (図 8B)。まず、細胞表層に発現した MT1-MMP は阻害分子である TIMP-2 と複合体を形成し、その酵素活性が阻害をうける。TIMP-2 の C 末端ドメインは MMP-2 のヘモペキシンドメインと親和性があるため、細胞膜表面に MT1-MMP, TIMP-2, MMP-2 の 3 者複合体が形成される。この複合体は MMP-2 を膜表面に濃縮するための受容体として機能する [58] とともに潜在型 MMP-2 の活性化に必須であり、この複合体構成分子間の相互作用を阻害すると活性化はおこらない。また、MT1-MMP は TIMP により酵素活性が阻害されているので潜在型 MMP-2 を分解し、活性化することができない。このため、TIMP-2 を結合していない遊離の MT1-MMP が MMP-2 を活性化するというモデルが考えられ、それを支持する結果が多く報告されている [46-51]。しかし、遊離の MT1-MMP が上記 3 者複合体の近傍にどのように存在し、それによって MMP-2 の活性化がどのように調節されているのかは明らかになっていない。最近、MT1-MMP がヘモペキシンドメインを介してホモ二量体を形成することが明らかにされ、そのヘモペキシンドメインを欠損すると MMP-2 を活性化できないことからホモ二量体形成が、TIMP-2 非結合性の MT1-MMP を上記 3 者複合体の近傍に保つ役割を担っていることが推論されている [59]。本研究において、転移能の異なる株細胞 P29 細胞, H11 細胞およびシンデカン-2 を強制発現した H11-SN2 細胞間で、これら MMP-2 の活性化に寄与する分子群の発現量に有意な差は見いだされなかった。そこで本研究では、MMP-2 の活性化抑制がシンデカ

ン-2分子のどのような機能に基づくものかを検討した。

シンデカン-2 低発現性の高転移性 H11 株細胞にグリコサミノグリカン鎖を持たない変異シンデカン-2 を強制発現させても MMP-2 活性化の抑制は観察されず、また、シンデカン-2 高発現性の低転移性 P29 細胞から細胞表層のヘパラン硫酸鎖を酵素的に除いた培養系においては親細胞と比べ MMP-2 酵素の有意な活性化の亢進が見られた。この結果は MMP-2 活性化抑制にシンデカン-2 のヘパラン硫酸鎖が関与していることを強く示唆するものである。MMP-2 のヘモペキシンドメインはヘパリンに結合性をもつことが示されているが [47, 52, 53], MMP-2 は、試験管内で、ヘパリン共存下において MMP-2 の自己触媒的な活性化が 8 倍高くなることが報告されている [52]。上記の我々の得た結果では MMP-2 活性化の高いのはシンデカン-2 の発現の低い H11 細胞であり、この報告と一見矛盾するが、次に示す“抑制モデル”と“競合モデル”の 2 つの可能性が考えられる。一つ目の“抑制モデル”は、シンデカン-2 のヘパラン硫酸によって直接 MMP-2 活性化が抑制されているという考えで、Crabbe らは一方で、試験管内におけるヘパリンによる MMP-2 の活性化の促進において、高濃度のヘパリン存在下では MMP-2 は活性化されないことも報告している。すなわち、その理由として適度なヘパリン (50–200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 存在下では潜在型 MMP-2 と、その活性化分子との間にヘパリンが梁のように入り、お互いをそのヘパリン結合性のヘモペキシンドメインによって結合し、活性化する。また、高濃度のヘパリン (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上) 存在下では、過剰なヘパリンがこの結合を競合的に阻害する可能性があるとした [52]。これらのことを考え合わせると、細胞膜表層に存在するシンデカン-2 のヘパラン硫酸鎖は H11 細胞よりも P29 細胞で高濃度であるため、MMP-2 活性化を抑制したと考えることができる。2 つ目の“競合モデル”は、MT1-MMP, TIMP-2, MMP-2 の 3 者の活性化複合体 (図 8B) が MMP-2 活性化の高い H11 細胞において有意に多く形成されていたことから (図示せず)、シンデカン-2 のヘパラン硫酸鎖が MMP-2 の活性化複合体への結合に対して抑制的に働いているという考えである。すなわち、潜在型 MMP-2 活性化受容体 (MT1-MMP-TIMP2 二量体) とシンデカン-2 のヘパラン硫酸側鎖は共に MMP-2 のヘモペキシンドメインに結合することから、これら二者受容体間で潜在型 MMP-2 の結合における競合が起こり、MT1-MMP に対する基質濃度が調節されていることが考えられる (図 22)。この“競合モデル”では、シンデカン-2 が潜在型 MMP-2 の受容体として機能している必要があるが、最近これを裏付ける結果が得られた。細胞表層のヘパラン硫酸をヘパリチナーゼ I で消化すると加えた酵素量に応じて潜在型 MMP-2 が細胞表層から遊離する (図示せず) ことが示された。すなわち、細胞表層のヘパラン硫酸鎖によって潜在型 MMP-2 が細胞膜上に保持されていることが明らかとなった。このような“競合モデル”の考えが正しいならば、ヘパラン硫酸鎖に結合した潜在型 MMP-2 は MT1-MMP の基質になり得ないような機構が存在しなければならないが、本研究ではそれを明らかにすることはできなかった。ルイス肺癌細胞に見られた MMP-2 活性化におけるシンデカン-2 ヘパラン硫酸の特異的機能が、その化学構造に基づくものか、それともシンデカン-2 の膜上における

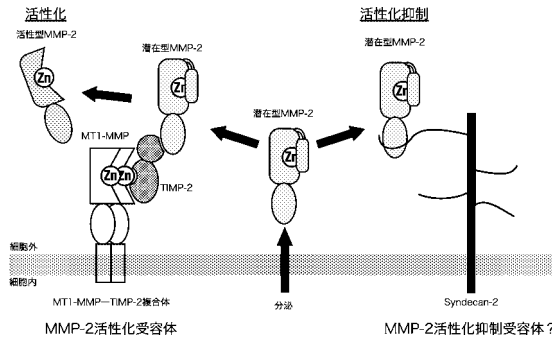


図 22 シンデカン-2 を介した MMP-2 活性化の抑制機構の可能性

細胞から分泌された潜在型 MMP-2 が MT1-MMP-TIMP-2 複合体に結合した結果 MT1-MMP により潜在領域が切断され活性化される。シンデカン-2 高発現細胞では分泌された潜在型 MMP-2 がシンデカン-2 のヘパラン硫酸鎖を介して結合することにより MT1-MMP-TIMP 複合体への結合を競合した結果、MMP-2 の活性化が抑制されたのではないかと考えられる。すなわち、MT1-MMP-TIMP-2 複合体が MMP-2 の活性化受容体として機能しているのに対してシンデカン-2 は MMP-2 の活性化抑制受容体として機能している可能性が考えられる。

局在に基づくものなのか興味を持たれる。いずれにしても、MMP-2 活性化制御におけるシンデカン-2 のヘパラン硫酸鎖の役割については、今後さらに詳しく解析していく必要がある。

3.3 ヘパリンによる転移抑制

ここまで細胞表面ヘパラン硫酸プロテオグリカンであるシンデカン-2 が MMP-2 活性化やがん転移に重要な役割を担っていることを示してきた。一方で、これまでに動物を用いた生体実験で、ヘパリンががんを抑制することがいくつか報告されている [54,55]。しかし、どのような機構で転移を抑制するのかはまだ十分には明らかにされていない。本研究においてもこれらの実験結果と一致してヘパリン様物質がルイス肺癌の肺への転移を大きく抑制することを示した。ヘパリンは高い硫酸化度を有するため、ヘパラン硫酸の機能をすべて持ち合わせていると考えられている。細胞接着に着目して癌転移を考えると、ヘパリンによる癌転移抑制は、細胞表面に存在するヘパラン硫酸鎖の有する接着機能を投与したヘパリンが競合的に阻害した結果ではないかと考えられた。ヘパリンはまた、抗凝固活性をもつため、ヘパリン投与時に強い出血を伴い、それによる個体死を引き起こす。そこで、化学修飾シアンチトロンピン III 結合能を低下させたヘパリン (LAC ヘパリン) を作製して転移実験に用いた。LAC ヘパリンもヘパリンと同様、転移抑制能を保持しており、癌腫、肉腫、メラノーマを含む種々の癌細胞の転移を抑制した。この実験結果はまた、ヘパリンによる転移抑制はその抗凝固活性に基づく現象ではなく、他の生物活性によるものであることを示唆している。本研究で、LAC ヘパリンが培養下におけるマトリゲルへの癌細胞の接着を抑制するとともに、生体内においては *lacZ* 遺伝子導入ルイス肺癌細胞を用いることにより、LAC ヘパリンが標的組織への定着を抑制することを明らかにした。

Karasawa らは化学修飾したコンドロイチン硫酸 (CS-PE) がマトリゲルへの細胞接着と肺組織内での接着を阻害し、ひいては転移を抑制することを報告している [60]。本研究で用いた LAC ヘパリンもまた、フィブロネクチン、ラミニン、コラーゲンあるいはテネイシンといったヘパリン結合性の細胞外マトリックス成分のヘパリン結合ドメインに結合している可能性が考えられる。従って、LAC ヘパリンによる癌転移の抑制は、癌細胞表層に存在するヘパラン硫酸を介した細胞外マトリックスへの細胞接着を競合的に阻害した結果であると考えられる。また、化学修飾ヘパリンはヘパラナーゼの阻害剤として作用することも明らかにされており [61]、さらには化学修飾ヘパリンが腫瘍の血管新生を抑制することも明らかにされている [62]。これらの作用もまた癌の転移機構に大きな影響を及ぼす。本研究で示した LAC ヘパリンによる癌転移の抑制はこれらの作用を統合した結果であるとも考えられる。

さて、上記の、細胞表層ヘパラン硫酸鎖の機能を LAC ヘパリンで競合的に阻害し、転移を抑制した結果と、シンデカン-2 の強制発現により転移を抑制した結果は相反する現象のように見える。つまり、LAC ヘパリンが細胞表層のヘパラン硫酸と競合するならば細胞表層のヘパラン硫酸鎖が少ないほうが転移先での定着に不利である筈である。しかし、転移能の異なる細胞系においてシンデカン-2 発現量の低い細胞の方が高い転移能を示した。この不一致は、癌細胞の血管内皮基底膜への定着、侵入に MMP-2 が関与することを仮定すれば、前述の MMP-2 活性化における“競合モデル”で説明することができる。すなわち、シンデカン-2 高発現性細胞では過剰なシンデカン-2 が潜在型 MMP-2 の活性化受容体への結合を競合阻害するならば、外から加えたヘパリンも細胞表層のシンデカン-2 のヘパラン硫酸と同様に潜在型 MMP-2 の活性化受容体への結合を阻害している可能性が考えられる。しかしながら、ヘパリンによって MMP-2 の活性が抑制されるのかどうかは今後の問題として残された。

3.4 シンデカン-2 高発現による一次腫瘍組織形成への影響

これまでの研究において転移能の異なる株細胞の形成する一次腫瘍の組織形成は P29 腫瘍が強い間質誘導を示し、誘導した間質細胞の形成するフィブロネクチンに取り囲まれた腫瘍組織形成を示し、H11 腫瘍はまったく間質誘導を示さず、それにかわって、腫瘍基底膜依存的な腫瘍組織形成を示すことが明らかにされている。シンデカン-2 を強制発現させた H11-SN2 細胞は間質誘導能を獲得した。この一次腫瘍組織形成の劇的な変化に一致して、一次腫瘍内に形成された腫瘍血管の構造的違いが血管内皮細胞の組織染色により明らかとなった。すなわち、低転移性 P29 細胞移植によって作らせた腫瘍組織内には典型的な毛細管様血管が形成されたのに対して、高転移性 H11 腫瘍組織内には肝臓の組織で見られる類洞様構造をもつ血管が形成された。肝臓に見られる類洞は肝臓の物質交換の場に存在し、不完全な基底膜構造を介して大きな物質の通過をも可能にしている [63]。P29 と H11 細胞に見られた新生血管の構造的差異は、転移能の違いのもう一つの原因となっていると考えられた。すなわち、転移の最初の段階におい

て高転移性 H11 細胞は類洞を介して血管内に容易に侵入することが考えられる。肝臓組織において、肝硬変により肝臓の繊維化が進むと物質交換が著しく障害され血管形態も類洞から毛細血管へと変化し、血管内皮基底膜が形成される [63, 64]。肝臓の繊維化を腫瘍組織の間質誘導と同じ立場で考えると、我々の結果と非常によく合う。さらに、肝硬変が進んだ組織では MMP-2 活性化が減少することも明らかにされている [65]。このことも間質誘導能の高い P29 細胞において MMP-2 活性化が低いことと一致する。しかしながら、シンデカン-2 高発現が隣接する血管内皮細胞にどのように働きかけて類洞形成を毛細管形成に変換するのは今のところ明らかではない。

3.5 シンデカン-2 発現と浸潤能

癌の悪性度に関連したもう一つの現象に浸潤がある。低転移性でシンデカン-2 発現量の高い P29 細胞は高い浸潤性を示し、H11 細胞は全く浸潤性を示さなかった。この浸潤活性と一致して MMP-3 の発現が変化しており、シンデカン-2 発現の高低と MMP-3 発現の高低は完全な一致を示した。現在のところ MMP-3 が浸潤に直接関係するかどうかは明らかではないが、MMP の阻害剤によって P29 細胞の運動能が阻害されたことから、何らかの MMP が関与していることは明らかである。また、MMP-3 は IL-1 や TNF- α などのサイトカインや EGF, PDGF, bFGF などの増殖因子によってその発現が制御されることが知られている [66]。我々はこれまでに P29, H11 および H11-SN2 細胞の CM を用いた繊維芽細胞の増殖解析や増殖因子の各種中和抗体を用いた解析により P29 細胞が PDGF 様の増殖因子を分泌し、H11 細胞の CM よりも繊維芽細胞を増殖させる活性が高いこと、また、シンデカン-2 を強制発現させた細胞の CM も高い増殖活性を示すことを明らかにしている（図示せず）。このことから PDGF 様の増殖因子のシグナルが MMP-3 の転写因子に働きかけ、MMP-3 の発現を促進する原因となっている可能性が考えられる。

3.6 ルイス肺癌細胞における転移能と浸潤能

癌の浸潤性と転移性はともに癌の悪性度を決定づける重要な現象であるが、殆どの癌では、浸潤能が高いほど転移能が高く、往々にしてこれら 2 つの現象は同じ細胞活性で説明されている。しかし、ルイス肺癌由来の細胞において血行性転移能の高い細胞は必ずしも高い浸潤性を示さず、それらを別々の細胞活性として有する細胞をクローンとして分離されたことを示すことに成功した。このことから少なくともマウス・ルイス肺癌由来の細胞において癌の転移と浸潤は必ずしも連結した細胞活性ではないことが明らかとなった。さらに、各々の活性はともにシンデカン-2 を介した細胞動態であり、異なった MMP によって仲介された現象であることを示唆する結果が得られた。

参 考 文 献

- [1] Fidler IJ. Selection of successive tumour lines for metastasis. *Nat New Biol*, Vol. 242, No. 118, pp. 148–149, 1973.
- [2] Liotta LA, Tryggvason K, Garbisa S, Hart I, Foltz CM, and Shafie S. Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen. *Nature*, Vol. 284, No. 5751, pp. 67–68, 1980.
- [3] Nicolson G and L. Cancer metastasis: tumor cell and host organ properties important in metastasis to specific secondary sites. *Biochim Biophys Acta*, Vol. 948, No. 2, pp. 175–224, 1988.
- [4] 岡山實, 草野由理, 小栗佳代子. がん転移と細胞接着分子. 現代化学, Vol. 308, pp. 51–57, 1996.
- [5] Grobstein C and Cohen J. Collagenase: effect on the morphogenesis of embryonic salivary epithelium *in vitro*. *Science*, Vol. 150, No. 696, pp. 626–628, 1965.
- [6] Spooner BS, Thompson-Pletscher HA, Stokes B, and Bassett K. Extracellular matrix involvement in epithelial branching morphogenesis and developmental biology, a comprehensive synthesis. In Steingberg H., editor, *The Cell Surface in Development and Cancer*, pp. 225–260. Plenum Press, 1986.
- [7] Ekblom M, Klein G, Mugrauer G, Fecker L, Deutzmann R, Timpl R, and Ekblom P. Transient and locally restricted expression of laminin A chain mRNA by developing epithelial cells during kidney organogenesis. *Cell*, Vol. 60, No. 2, pp. 337–346, 1990.
- [8] Prieto AL, Jones FS, Cunningham BA, Crossin KL, and Edelman GM. Localization during development of alternatively spliced forms of cytotoxin mRNA by *in situ* hybridization. *J Cell Biol*, Vol. 111, No. 2, pp. 685–698, 1990.
- [9] Hay E. Collagen and other matrix glycoproteins in embryogenesis. In *Cell Biology of Extracellular Matrix*, pp. 419–455. Plenum Press, 1991.
- [10] 小栗佳代子, 岡山實. 細胞外機能的マトリックス. 永井克孝, 箱守仙一郎, 木幡陽 (編), 細胞社会のグリコバイオロジー, pp. 151–175. 講談社サイエンティフィック, 1993.
- [11] 岡山實. 腫瘍の組織形成と転移. 京都産業大学論集 自然科学系 II 第 6 号, Vol. 28, No. 4, pp. 1–95, 1997.
- [12] Nakanishi H, Takenaga K, Oguri K, Yoshida A, and Okayama M. Morphological characteristics of tumours formed by Lewis lung carcinoma-derived cloned cell lines with different metastatic potentials: structural differences in their basement membranes formed *in vivo*. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*, Vol. 420, No. 2, pp. 163–170, 1992.
- [13] Nakanishi H, Oguri K, Yoshida K, Itano N, Takenaga K, Kazama T, Yoshida A, and Okayama M. Structural differences between heparan sulphates of proteoglycan involved in the formation of basement membranes *in vivo* by Lewis-lung-carcinoma-derived cloned cells with different metastatic potentials. *Biochem J*, Vol. 288 (Pt 1), pp. 215–224, 1992.
- [14] Nakanishi H, Oguri K, Takenaga K, Hosoda S, and Okayama M. Differential fibrotic stromal responses of host tissue to low- and high-metastatic cloned Lewis lung carcinoma cells. *Lab Invest*, Vol. 70, No. 3, pp. 324–332, 1994.
- [15] Itano N, Oguri K, Nakanishi H, and Okayama M. Membrane-intercalated proteoglycan of a stroma-inducing clone from Lewis lung carcinoma binds to fibronectin via its heparan sulfate chains. *J*

- Biochem (Tokyo)*, Vol. 114, No. 6, pp. 862–873, 1993.
- [16] Kusano Y, Oguri K, Nagayasu Y, Munesue S, Ishihara M, Saiki I, Yonekura H, Yamamoto H, and Okayama M. Participation of syndecan 2 in the induction of stress fiber formation in cooperation with integrin $\alpha 5\beta 1$: structural characteristics of heparan sulfate chains with avidity to COOH-terminal heparin-binding domain of fibronectin. *Exp Cell Res*, Vol. 256, No. 2, pp. 434–444, 2000.
- [17] Munesue S, Kusano Y, Oguri K, Itano N, Yoshitomi Y, Nakanishi H, Yamashina I, and Okayama M. The role of syndecan-2 in regulation of actin-cytoskeletal organization of Lewis lung carcinoma-derived metastatic clones. *Biochem J*, Vol. 363(Pt2), pp. 201–209, 2002.
- [18] Bernfield M, Kokenyesi R, Kato M, Hinkes MT, Spring J, Gallo RL, and Lose EJ. Biology of the syndecans: a family of transmembrane heparan sulfate proteoglycans. *Annu Rev Cell Biol*, Vol. 8, pp. 365–393, 1992.
- [19] Carey DJ. Syndecans: multifunctional cell-surface co-receptors. *Biochem J*, Vol. 327 (Pt1), pp. 1–16, 1997.
- [20] Jalkanen M, Elenius K, and Salmivirta M. Syndecan—a cell surface proteoglycan that selectively binds extracellular effector molecules. *Adv Exp Med Biol*, Vol. 313, pp. 79–85, 1992.
- [21] Maccarana M, Casu B, and Lindahl U. Minimal sequence in heparin/heparan sulfate required for binding of basic fibroblast growth factor. *J Biol Chem*, Vol. 268, No. 32, pp. 23898–23905, 1993.
- [22] Guimond S, Maccarana M, Olwin BB, Lindahl U, and Rapraeger AC. Activating and inhibitory heparin sequences for FGF-2 (basic FGF) and distinct requirements for FGF-1 and FGF-2 and FGF-4. *J Biol Chem*, Vol. 268, No. 32, pp. 23906–23914, 1993.
- [23] McKeehan WL, Wang F, and Kan M. The heparan sulfate-fibroblast growth factor family: diversity of structure and function. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, Vol. 59, pp. 135–176, 1998.
- [24] Sanderson RD and Liebersbach BF. Syndecans as anti-invasive molecules on the surface of tumor cells. *Trends Glycosci and Glycotechnol.*, Vol. 107, pp. 513–524, 1995.
- [25] Dhodapkar MV, Kelly T, Theus A, Athota AB, Barlogie B, and Sanderson RD. Elevated levels of shed syndecan-1 correlate with tumor mass and decreased matrix metalloproteinase-9 activity in the serum of patients with multiple myeloma. *Br and J and Hematol.*, Vol. 99, pp. 368–371, 1997.
- [26] Woods A, Couchman JR, Johansson S, and Hook M. Adhesion and cytoskeletal organisation of fibroblasts in response to fibronectin fragments. *EMBO J*, Vol. 5, No. 4, pp. 665–670, 1986.
- [27] Woods A, McCarthy JB, Furcht LT, and Couchman JR. A synthetic peptide from the COOH-terminal heparin-binding domain of fibronectin promotes focal adhesion formation. *Mol Biol Cell*, Vol. 4, No. 6, pp. 605–613, 1993.
- [28] Woods A and Couchman JR. Syndecan 4 heparan sulfate proteoglycan is a selectively enriched and widespread focal adhesion component. *Mol Biol Cell*, Vol. 5, No. 2, pp. 183–192, 1994.
- [29] Saoncella S, Echtermeyer F, Denhez F, Nowlen JK, Mosher DF, Robinson SD, Hynes RO, and Goetinck PF. Syndecan-4 signals cooperatively with integrins in a rho-dependent manner in the assembly of focal adhesions and actin stress fibers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 96, No. 6, pp. 2805–2810, 1999.
- [30] Echtermeyer F, Baciu PC, Saoncella S, Ge Y, and Goetinck PF. Syndecan-4 core protein is sufficient for the assembly of focal adhesions and actin stress fibers. *J Cell Sci*, Vol. 112 (Pt 20), pp. 3433–3441, 1999.

- [31] Oh ES, Woods A, and Couchman JR. Syndecan-4 proteoglycan regulates the distribution and activity of protein kinase C. *J Biol Chem*, Vol. 272, No. 13, pp. 8133–8136, 1997.
- [32] Oh ES, Woods A, and Couchman JR. Multimerization of the cytoplasmic domain of syndecan-4 is required for its ability to activate protein kinase C. *J Biol Chem*, Vol. 272, No. 18, pp. 11805–11811, 1997.
- [33] Lim ST, Longley RL, Couchman JR, and Woods A. Direct binding of syndecan-4 cytoplasmic domain to the catalytic domain of protein kinase C alpha (PKC α) increases focal adhesion localization of PKC α . *J Biol Chem*, Vol. 278, No. 16, pp. 13795–13802, 2003.
- [34] Oh ES, Couchman JR, and Woods A. Serine phosphorylation of syndecan-2 proteoglycan cytoplasmic domain. *Arch Biochem Biophys*, Vol. 344, No. 1, pp. 67–74, 1997.
- [35] Ishiguro K, Kadomatsu K, Kojima T, Muramatsu H, Tsuzuki S, Nakamura E, Kusugami K, Saito H, and Muramatsu T. Syndecan-4 deficiency impairs focal adhesion formation only under restricted conditions. *J Biol Chem*, Vol. 275, No. 8, pp. 5249–5252, 2000.
- [36] Kusano Y, Yoshitomi Y, Munesue S, Okayama M, and Oguri K. Cooperation of syndecan-2 and syndecan-4 among cell surface heparan sulfate proteoglycans in the actin cytoskeletal organization of Lewis lung carcinoma cells. *J Biochem*, Vol. 135, pp. 129–137, 2004.
- [37] 吉富泰央, 棟居聖一, 小山芳江, 岡山實. シンデカン-2 強制発現による腫瘍の組織形成と転移, 浸潤能の変化. 京都産業大学先端科学研究所所報, Vol. 2, pp. 91–102, 2003.
- [38] 棟居聖一. 細胞膜型ヘパラン硫酸プロテオグリカン, シンデカン-2 によるアクチン細胞骨格形成の制御. 博士論文, 京都産業大学, 2002.
- [39] David G, Bai XM, Van der Schueren B, Marynen P, Cassiman JJ, and Van den Berghe H. Spatial and temporal changes in the expression of fibroglycan (syndecan-2) during mouse embryonic development. *Development*, Vol. 119, No. 3, pp. 841–854, 1993.
- [40] Barsky SH and Gopalakrishna R. Increased invasion and spontaneous metastasis of BL6 melanoma with inhibition of the desmoplastic response in C57 BL/6 mice. *Cancer Res*, Vol. 47, No. 6, pp. 1663–1667, 1987.
- [41] Fingleton B and Matrisian LM. Matrix metalloproteinases in cancer. In Clendeninn NJ and Appelt K., editors, *Matrix Metalloproteinase Inhibitors in Cancer Therapy*, pp. 85–112. Humana Press, 2001.
- [42] Liotta LA, Thorgeirsson UP, and Garbisa S. Role of collagenases in tumor cell invasion. *Cancer Metastasis Rev*, Vol. 1, No. 4, pp. 277–288, 1982.
- [43] 伊藤義文. がんの浸潤・転移と細胞運動. 竹縄忠臣 (編), 細胞骨格と細胞運動. シュプリンガー・フェアラーク. 2002.
- [44] Isnard N, Robert L, and Renard G. Effect of sulfated GAGs on the expression and activation of MMP-2 and MMP-9 in corneal and dermal explant cultures. *Cell Biol Int*, Vol. 27, No. 9, pp. 779–784, 2003.
- [45] Sato H, Takino T, Okada Y, Cao J, Shinagawa A, Yamamoto E, and Seiki M. A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells. *Nature*, Vol. 370, pp. 61–65, 1994.
- [46] Werb Z. Ecm and cell surface proteolysis: regulating cellular ecology. *Cell*, Vol. 91, No. 4, pp. 439–442, 1997.
- [47] Butler GS, Butler MJ, Atkinson SJ, Will H, Tamura T, van Westrum SS, Crabbe T, Clements J,

- d'Ortho MP, and Murphy G. The TIMP2 membrane type 1 metalloproteinase "receptor" regulates the concentration and efficient activation of progelatinase A and a kinetic study. *J Biol Chem*, Vol. 273, No. 2, pp. 871–880, 1998.
- [48] Kinoshita T, Sato H, Okada A, Ohuchi E, Imai K, Okada Y, and Seiki M. TIMP-2 promotes activation of progelatinase A by membrane-type 1 matrix metalloproteinase immobilized on agarose beads. *J Biol Chem*, Vol. 273, No. 26, pp. 16098–16103, 1998.
- [49] Seiki M. Membrane-type matrix metalloproteinases. *APMIS*, Vol. 107, No. 1, pp. 137–143, 1999.
- [50] Nagase H and Woessner JF Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem*, Vol. 274, No. 31, pp. 21491–21494, 1999.
- [51] Sternlicht MD and Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol*, Vol. 17, pp. 463–516, 2001.
- [52] Crabbe T, Ioannou C, and Docherty AJ. Human progelatinase A can be activated by autolysis at a rate that is concentration-dependent and enhanced by heparin bound to the C-terminal domain. *Eur J Biochem*, Vol. 218, No. 2, pp. 431–438, 1993.
- [53] Crabbe T, O'Connell JP, Smith BJ, and Docherty AJ. Reciprocated matrix metalloproteinase activation: a process performed by interstitial collagenase and progelatinase A. *Biochemistry*, Vol. 33, No. 48, pp. 14419–14425, 1994.
- [54] Engelberg H. Actions of heparin that may affect the malignant process. *Cancer*, Vol. 85, No. 2, pp. 257–272, 1999.
- [55] Amirkhosravi A, Mousa SA, Amaya M, and Francis JL. Antimetastatic effect of tinzaparin and a low-molecular-weight heparin. *J Thromb Haemost*, Vol. 1, No. 9, p. Jun.72, 2003.
- [56] Stetler-Stevenson WG, Aznavoorian S, and Liotta LA. Tumor cell interactions with the extracellular matrix during invasion and metastasis. *Annu Rev Cell Biol*, Vol. 9, pp. 541–573, 1993.
- [57] Will H, Atkinson SJ, Butler GS, Smith B, and Murphy G. The soluble catalytic domain of membrane type 1 matrix metalloproteinase cleaves the propeptide of progelatinase A and initiates autolytic activation and regulation by TIMP-2 and TIMP-3. *J Biol Chem*, Vol. 271, No. 29, pp. 17119–17123, 1996.
- [58] Strongin AY, Collier I, Bannikov G, Marmer BL, Grant GA, and Goldberg GI. Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase and isolation of the activated form of the membrane metalloprotease. *J Biol Chem*, Vol. 270, No. 10, pp. 5331–5338, 1995.
- [59] Itoh Y, Takamura A, Ito N, Maru Y, Sato H, Suenaga N, Aoki T, and Seiki M. Homophilic complex formation of MT1-MMP facilitates proMMP-2 activation on the cell surface and promotes tumor cell invasion. *EMBO J*, Vol. 20, No. 17, pp. 4782–4793, 2001.
- [60] Karasawa K, Sugiura N, Hori Y, Suzuki S, Onaya J, Sakurai K, and Kimata K. Inhibition of experimental metastasis and cell adhesion of murine melanoma cells by chondroitin sulfate-derivatized lipid and a neoproteoglycan with anti-cell adhesion activity. *Clin Exp Metastasis*, Vol. 15, No. 2, pp. 83–93, 1997.
- [61] Lapierre F, Holme K, Lam L, Tressler RJ, Storm N, Wee J, Stack RJ, Castellot J, and Tyrrell DJ. Chemical modifications of heparin that diminish its anticoagulant but preserve its heparanase-inhibitory and angiostatic and anti-tumor and anti-metastatic properties. *Glycobiology*, Vol. 6, No. 3, pp. 355–366, 1996.

- [62] Ono K, Ishihara M, Ishikawa K, Ozeki Y, Deguchi H, Sato M, Hashimoto H, Saito Y, Yura H, Kurita A, and Maehara T. Periodate-treated and non-anticoagulant heparin-carrying polystyrene (NAC-HCPS) affects angiogenesis and inhibits subcutaneous induced tumour growth and metastasis to the lung. *Br J Cancer*, Vol. 86, No. 11, pp. 1803–1812, 2002.
- [63] 土屋雅春, 岡崎勲, 織田雅也, 塚田信広, 藺田巖. 肝硬変における微小循環. 肝胆膵, Vol. 12, pp. 733–743, 1987.
- [64] Maruyama K, Okazaki I, Takagi T, and Ishii H. Formation and degradation of basement membrane collagen. *Alcohol Alcohol Suppl*, Vol. 1, pp. 369–374, 1991.
- [65] Takahara T, Furui K, Funaki J, Nakayama Y, Itoh H, Miyabayashi C, Sato H, Seiki M, Ooshima A, and Watanabe A. Increased expression of matrix metalloproteinase-II in experimental liver fibrosis in rats. *Hepatology*, Vol. 21, No. 3, pp. 787–795, 1995.
- [66] 岡田保典. 細胞外マトリックス物質の分解調節. 小出輝, 林利彦(編), 細胞外マトリックス, pp. 215–230. 愛智出版. 2000.

The Role of Syndecan-2 and Heparan Sulfate in Metastasis and Invasion of Mouse Lewis Lung Carcinoma Cells

Yasuo YOSHITOMI

Abstract

Syndecans, a family of transmembrane heparan sulfate proteoglycans that are implicated in the signal transduction of a variety of growth factors via their heparan sulfate side chains, participate in cell adhesion by acting as extracellular matrix (ECM) receptors.

We have previously demonstrated that the *in vitro* selection of different metastatic clones from Lewis lung carcinoma cells resulted in the selection of clones exhibiting distinctly different ECM-dependent tumorigenesis. The low-metastatic P29 clone with stroma-inducing capacity shows tumorigenesis dependent on the fibronectin-rich interstitial-type matrix formed by the induced stromal cells, whereas the highly metastatic LM66-H11 clone, lacking such a capacity, shows tumorigenesis dependent on the basement membranes formed by tumor cells themselves. These differences are reflected in the actin cytoskeletal organization of cells which adhere to the fibronectin substratum *in vitro*. P29 cells form actin stress fibers, whereas LM66-H11 cells form cortex actin. We have shown that these differences depend on the expression level of syndecan-2.

In this study, we observed an inverse correlation between the metastatic potential and expression level of syndecan-2 in Lewis lung carcinoma cells. In order to clarify the causal relationships underlying this correlation, we investigated (1) whether signaling via syndecan-2 would participate in metastasis of the tumor cells, and (2) whether tumor-cell adhesion to endothelial basement membrane via its heparan sulfate would correlate with metastasis. The following results were obtained. (1) Overexpression of syndecan-2 in high-metastatic H11 cells with a low level of syndecan-2-expression (H11-SN2 cells) caused a significant suppression of tumor metastasis. Analyses of matrix metalloproteinases (MMPs), which are known to be involved directly in metastasis, showed that Lewis lung carcinoma-derived clones expressed only MMP-2 as a major species among those of the MMP family at a similar level regardless of their metastatic potential. However, it was observed that MMP-2 was activated only in highly metastatic H11 cells, but not in low-metastatic P29 cells. Interestingly, this activation was suppressed by an overexpression of syndecan-2 in H11 cells, suggesting that syndecan-2 exerts a regulatory function in the activation of MMP-2. Moreover, we found that the suppression of MMP-2 activation by syndecan-2 may be mediated by its heparan sulfate chains. In addition to their role in regulating the enzyme, syndecan-2-overexpressing H11-SN2 cells exhibited stromal induction and increased the formation of capillary blood vessels in its primary tumor, strongly suggesting that the tumor architectures associated with the expression levels of syndecan-2 are involved in the regulation of metastatic potential. (2) Heparin and chemically modified heparin with reduced anticoagulant activity strongly suppressed experimental lung metastases of various tumor cells, suggesting that the suppression of tumor metastases by heparinoids was not due to their anticoagulant activity, but rather to their competition with cell-surface heparan sulfate in tumor-cell

adhesion and invasion to basement membrane.

Although there was a significant difference in metastatic potential between P29 and H11 cells, the survival time of mice injected with these tumor cells was similar. Thus, we next examined the reasons for this, and found that both P29 and H11-SN2 cells with low-metastatic potential exhibited strong invasiveness into peripheral connective tissues. In association with this phenotype, P29 and H11-SN2 cells expressed MMP-3, the expression of which positively correlated with the expression levels of syndecan-2. Although this finding did not provide direct evidence to confirm whether MMP-3 is involved in the invasion, it strongly suggests that the invasiveness of low-metastatic cells into the surrounding connective tissues might be attributed to the dissolution of ECM by MMP-3.

In this study, we demonstrated that a metastatic potential is not necessarily associated with an invasive capacity. Based on this observation, we propose here that, at least in the metastatic models of mouse Lewis lung carcinoma, the invasive activity of the tumor cells appears to be attributable to a potential independent of their metastasis, and that these individual processes might be mediated by different MMPs. We also propose that the activities of these MMPs are regulated by syndecan-2.

Keywords: metastasis, invasion, heparan sulfate, syndecan, matrix metalloproteinases