

マウス Colon26 移植腫瘍の肺転移における 細胞外マトリックスの発現変化の検討

渡 辺 正 人

東京医科大学口腔外科学講座

(指導：千葉博茂主任教授)

【要旨】 細胞外マトリックス (ECM) のインテグリンを介した細胞内情報伝達機構は細胞の形態的および機能的変化をもたらす。そこで、腫瘍細胞の動態変化に対する細胞外マトリックスの役割を解明する目的で抗インテグリン ($\beta 1$, $\alpha 4$ および $\alpha 5$) 抗体で接着を制御したマウス Colon26 移植腫瘍細胞の自然肺転移モデルを用いて移植腫瘍組織に発現する ECM (フィブロネクチン, ラミニンおよびタイプ IV コラーゲン) を免疫組織学的に検出後, 画像解析にて各 ECM の発現を定量し, 各抗体処理群における ECM の発現量を比較検討した。移植腫瘍組織におけるフィブロネクチンの発現は対照群に比べ抗 $\alpha 4$ 群では有意に低値を示し, 対照的に抗 $\alpha 5$ 群では高値を示した。ラミニンにおいて対照群では高い傾向が認められた。タイプ IV コラーゲンにおいて抗 $\alpha 4$ 群では有意に低値を示した。さらに腫瘍体積, 転移頻度および増殖能の比較では抗 $\alpha 5$ 群より抗 $\alpha 4$ 群で高い値を示した。以上の結果より, Colon26 腫瘍細胞と ECM 成分との選択的インテグリンを仲介した特異的相互作用が腫瘍動態に変化を及ぼし, また, 腫瘍組織内の間質成分の誘導能すなわち組織再構築にも関連していると推測された。

はじめに

癌の転移が成立するためには癌細胞と基底膜や間質の成分である細胞外マトリックス (extracellular matrix; ECM と略す) との相互作用が必要不可欠と考えられている。特に代表的な ECM としてフィブロネクチン (fibronectin; FN と略す), ラミニン (laminin; LN と略す) あるいは IV 型コラーゲン (type IV collagen; IV CO と略す) などの細胞接着性糖蛋白は *in vitro* あるいは *in vivo* の研究により癌細胞の接着, 移動, 増殖, 分化に関与していることが報告されている^{1,2)}。

一方, 癌細胞膜に発現する接着因子の存在はリガンドとなる ECM と密接な関係を持ち, その ECM 接着に関わる分子群としてインテグリンファミリーが代表的存在とされている。インテグリンは 1989 年に Hynes³⁾ によりその概念が提唱されて以来, 近

年 ECM との接着について分子レベルの解析がなされている。インテグリンは α 鎖 (120–180 kd), β 鎖 (90–110 kd) からなる 2 種のサブユニットが非共有結合で会合するヘテロダイマー構造をとる。両鎖とも N 末端側の大部分が細胞外に存在し, これまでに 14 種の α 鎖と 8 種の β 鎖の存在が報告され, これらの組み合わせ (α/β) から 20 種のレセプターが知られている⁴⁾。特に ECM のレセプターとして, インテグリン $\beta 1$ サブファミリーは腫瘍進展, 転移形成と密接にかかわっている⁵⁾。 $\beta 1$ サブユニットは少なくとも 10 種の α サブユニットとヘテロダイマーを形成し, 同一のリガンドに接着特異性の異なる複数のインテグリンが対応する。FN とリガンドする $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$ を介した接着においても増殖, 転移能の変化が起こることが指摘されている^{6,7,8)}。しかしながら, 抗インテグリン抗体あるいは細胞接着部位のポリペプチドを用いた転移制御実験におい

1999 年 12 月 6 日受付, 2000 年 1 月 7 日受理

キーワード: 細胞外マトリックス, インテグリン, 肺転移モデル, Colon26 細胞, 画像解析

(別刷請求先: 〒160-0023 東京都新宿区西新宿 6-7-1 東京医科大学口腔外科学講座 渡辺正人)

て腫瘍組織上に発現する ECM を病理学的に詳細に検索した報告は少ない。癌進展過程での ECM の関与あるいはインテグリンとの関連性についてはまだ不明な点が多い。

そこで、著者は予め抗インテグリン抗体で処理した Colon26 腫瘍細胞移植によるマウスの自然肺転移実験モデルを用いて腫瘍組織上の ECM (FN, LN, IV CO) の分布、発現量を免疫組織化学的に検索し、ECM とインテグリンの関連性と癌進展、転移における ECM の意義について検討を行った。

実験材料および方法

I. 実験材料

1. 実験動物

実験動物は DBA/2 雌に BALB/c 雄を交配して得られた 5~6 週齢の雄性 CDF1 マウス [(株) 三協ラボサービス] を使用した。CDF1 マウスは温度 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 50~60%、自然採光のもとで固形飼料と水とで予備飼育後実験に供した。

2. 実験腫瘍

実験腫瘍には、BALB/c マウスの腹部皮下に継代維持された未分化癌である同系由来可移植性 Colon26 結腸癌細胞を使用した⁹⁾。

II. 実験方法

1. 腫瘍細胞の抗インテグリン抗体による処理

約 3 週間隔で継代維持された癌腫を腹部より無菌的に採取し腫瘍塊を細切した後、移植用癌細胞浮遊液とし $250 \times 10^6/\text{ml}$ に生細胞数を調整した。その後、各ラット抗マウス $\beta 1$, $\alpha 4$, $\alpha 5$ 抗体 (PHARMINGEN 社) を 4°C 、30 分間反応させ、phosphate buffered saline (PBS と略す) で 3 回遠心 (700 rpm, 3 分間) 洗浄した。

2. 移植方法および実験群

CDF1 マウス後肢の foot pad に腫瘍細胞を $5 \times 10^6/0.02 \text{ ml}/\text{匹}$ 移植し、9 日後に 10 倍希釈のネンブタール (ペントバルビタールナトリウム) を腹腔内に注入 (0.25 ml/匹) し、麻酔下で患肢を外科的に切除した。また、移植後 7, 9 日目に腫脹した範囲を患肢腫瘍の大きさとし、その長径 (a), 短径 (b) を計測して $a \times b^2 \times 0.5$ の式により腫瘍体積を算出した。さらに、移植約 42 日後にマウスを屠殺し、両側肺を摘出して肺転移の有無を確認し、結節数を測定した。なお、実験動物を移植腫瘍細胞の処理に

より抗 $\beta 1$, $\alpha 4$, $\alpha 5$ 抗体処理群 (anti- $\beta 1$, $\alpha 4$, $\alpha 5$ 群) と何ら抗体処理を施さない control 群 (Cont 群) に分け、それぞれ 20 匹 (計 80 匹) を実験に供した。

3. 免疫組織化学的染色

(1) 移植腫瘍細胞におけるインテグリンの染色

BALB/c マウスの腹部より採取された継代維持の腫瘍細胞から塗抹標本を作製し、Labelled Streptavidin Biotin (LSAB と略す) 法でインテグリンの局在を観察した。標本は風乾し 100% エタノールで 4°C 、10 分間固定後、10% 正常ウシ血清を使用し、室温で 20 分間ブロッキングし、一次抗体として各ラット抗マウス $\beta 1$, $\alpha 4$, $\alpha 5$ 抗体を使用し室温で 60 分間反応させた。その後、内因性ペルオキシダーゼ活性を阻止し (0.3% H_2O_2 メタノール溶液で 30 分間)、二次抗体 (ビオチン標識抗ラット・ラビット抗体; DAKO 社)、ペルオキシダーゼ標識 L-ストレプトアビジンを反応させ、3-3 ジアミノベンチジン (DAB- H_2O_2 溶液) で発色させた。核染色にはメチルグリーンを用いた。

(2) 移植腫瘍組織における ECM の染色

切除した患肢腫瘍を半割し新鮮凍結切片とし、以下の手法で各 ECM の組織局在を検索した。切片は 10 分間冷アセトンで固定し、0.3% H_2O_2 メタノール溶液で 4°C 、20 分間処理した。その後、10% 正常ウシ血清で 30 分間ブロッキングし、一次抗体として抗 FN, LN, IV CO 抗体 (FN, IV CO; CHEMICON 社, LN; LSL 社) を室温で 60 分間反応させ、二次抗体にビオチン標識抗ラビット・ヤギ抗体 (DAKO 社) を使用した。発色は LSAB 法を用い、ヘマトキシリンで核染色を施した。

(3) 移植腫瘍組織における Proliferating Cell

Nuclear Antigen (PCNA と略す) の染色

半割したもう一方の患肢腫瘍は 10% ホルマリンで固定後、パラフィン切片を作製し、3% H_2O_2 加蒸留水に室温で 5 分間処理した。その後、抗原性の賦活化のために 10 mM citrate buffer solution (pH 6.0) に浸漬し、マイクロウエーブオーブン中で 90°C 、5 分間 2 回の熱処理を行った。次に、抗 PCNA 抗体 (DAKO 社) を室温で 30 分間反応させた後、Enhanced Polymer One-step (EPOS と略す) 法を用いて発色させ、ヘマトキシリンで核染色した。以上の酵素抗体法に使用した各抗体の希釈倍率は Table 1 に示す。

Table 1 All kinds of antibody used for immunochemical reaction

Antibody	Dilution
1) rabbit anti mouse fibronectin (P)	1 : 1500
2) rabbit anti mouse laminin (P)	1 : 1500
3) rabbit anti mouse collagen IV (P)	1 : 2000
4) rat anti mouse CD29 [Integrin β 1 chain] (M)	1 : 20
5) rat anti mouse CD49d [Integrin α 4 chain] (M)	1 : 40
6) rat anti mouse CD49e [Integrin α 5 chain] (M)	1 : 20
7) anti PCNA (M)	1 : 2

P : Polyclonal, M : Monoclonal

Clone : 4) 9EG7, 5) 9C10, 6) 5H10-27, 7) PC10

Colon 26 tumor cells were treated with 4), 5), 6) monoclonal antibody before transplantation.

4. ECM の発現量および PCNA 陽性細胞の測定

光学顕微鏡 (Vanox-S; Olympus 社) で観察された移植腫瘍組織中 (250 倍視野) の各 ECM の発現像を 3CCD カメラ (KS-30MK II; Konica 社) を介して 8bit, 256 階調グレースケール, 262000 pixel のビットマップフォーマットの画像として取り込み, パーソナルコンピュータ (Macintosh Quadra 800; Apple 社) 上で画像解析ソフト (NIH Image) を用いて定量した. さらに, 各 ECM (FN, LN, IV CO) の発現量を各群間および各群における転移の有無で比較検討した. なお, 転移肺についても各 ECM の発現量を定量分析した.

移植腫瘍組織中の PCNA 陽性細胞は上記と同じ画像解析システムを用いて算出し, 各群間で比較検討した. すなわち, 光顕的に 500 倍視野に認められる全腫瘍細胞の総面積に対する PCNA 陽性細胞の面積比率を算出し, PCNA 陽性率を求めた.

5. 統計処理

腫瘍体積の比較は移植 9 日目の体積値を Cochran-Cox test で, 肺転移頻度の比較は Fisher's exact probability test を用いて統計学的有意差検定を行った. ECM の発現定量値および PCNA 陽性率は t 検定を用いて統計学的に処理した. なお, 以上の有意差検定にあたっては, $P < 0.05$ を有意と判定した.

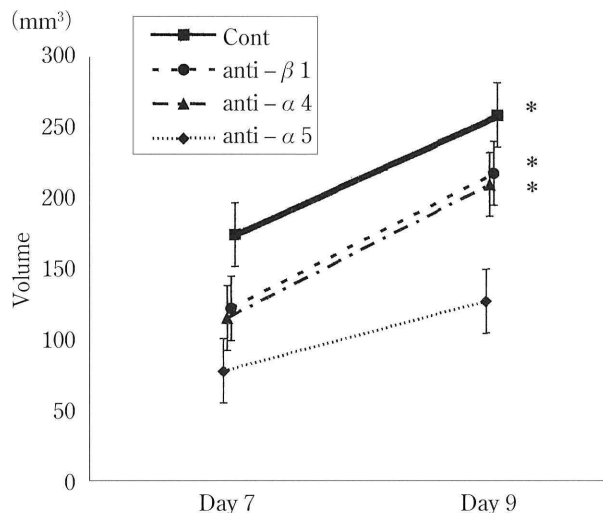


Fig. 1 Variation of tumor volume during the course. * $P < 0.05$ compare with anti- α 5. Statistical significances were determined using the Cochran-Cox test to compare the significant differences of tumor volume on day 9. Values are means \pm SD.

結 果

I. 腫瘍体積の経日的推移および肺転移頻度

移植腫瘍は移植後約 4 日目より弾性硬の小腫瘍として触知された. 切除された患肢の断面は全例に壊死は認められず, 帯灰白色の充実性腫瘍病変を示していた. Cont 群では腫瘍体積は高い値で推移し, 移植後 7, 9 日目には他群に比較して最高値 (182.77 ± 22.24 , $267.52 \pm 46.70 \text{ mm}^3$) を示した. 対照的に anti- α 5 群では増大傾向は緩徐で, 7, 9 日目はいずれも最低値 (77.79 ± 8.64 , $126.87 \pm 16.06 \text{ mm}^3$) を示した. 移植後 9 日目の腫瘍体積は Cont 群と anti- α 5 群に有意差を認め ($P < 0.05$), anti- β 1, α 4 群も anti- α 5 群に比較して有意に高値を示した ($P < 0.05$) (Fig. 1). 屠殺時に肺転移巣は径 1~8 mm 大の白色小結節として観察された. 病理解剖学的検索の結果, 他の臓器や所属リンパ節に転移巣は認められなかった. 肺転移頻度は anti- β 1, α 5 群 (25%) は Cont 群 (55%) に比較して有意に低値を示した ($P < 0.05$). anti- α 4 群の肺転移頻度 45% を示したが, anti- β 1, α 5 群とは転移頻度に有意差はなかった (Table 2).

II. Colon26 移植腫瘍細胞におけるインテグリンの発現

Colon26 移植腫瘍細胞におけるインテグリンの発

Table 2 Spontaneous lung metastatic ability on Colon 26 tumor cells pretreated with anti-integrin antibodies

Pretreatment	Incidence of lung metastasis	Number of tumour nodules
	% (number of cases)	Mean (range)
Cont	55 (11/20)	3.4 (1-7)
anti- β 1	20* (4/20)	2.5 (1-5)
anti- α 4	45 (9/20)	2.7 (1-5)
anti- α 5	20* (4/20)	2.8 (1-5)

*P < 0.05 compared with Cont. Statistical significances were determined using Fisher's exact probability test. During autopsy, on approximately day 42, all lung samples were macroscopically examined for evidence of metastasis.

現性を検討するため、継代維持された腹部腫瘍塊より塗抹標本を作製し免疫細胞学的検索を行なった。その結果、腫瘍細胞表面に β 1 (Fig. 2B), α 4 (Fig. 2C), α 5 (Fig. 2D) インテグリンの発現を認めた。

III. 移植腫瘍組織における ECM の発現

1. 各 ECM の染色所見

FN は腫瘍組織の間質に線状あるいは網状に染色された。さらに、血管基底膜および筋細胞束周囲にも FN の発現を認めた (Fig. 3A)。LN を対象とした染色例では腫瘍細胞の胞体内にその陽性像が認められた。FN と同様に血管基底膜あるいは筋細胞束周囲にも LN は染色された (Fig. 3B)。IV CO も LN と同様に血管基底膜、筋細胞束周囲に染色されたが、腫瘍細胞には明らかな陽性像は認められなかった (Fig. 3C)。

2. 各抗体処理群と ECM 発現量

FN 発現量は anti- α 5 群で最高値 ($34.23 \pm 7.40\%$, $P < 0.01$) を、anti- α 4 群で最低値 ($18.14 \pm 10.30\%$, $P < 0.005$) を示し、Cont 群 ($27.85 \pm 7.28\%$) に比較してそれぞれ有意差を認めた (Fig. 4-FN)。LN 発現量は Cont 群で最高値 ($39.97 \pm 7.40\%$) を、anti- α 4 群で最低値 ($19.28 \pm 9.18\%$) を示し、anti- α 5 群 ($34.23 \pm 7.41\%$) を除き Cont 群と他群との間には有意差を認めた ($P < 0.005$) (Fig. 4-LN)。IV CO 発現量では anti- β 1 ($22.86 \pm 7.16\%$)、 α 5 ($24.35 \pm 6.52\%$) 群は Cont 群 ($21.12 \pm 5.23\%$) より高い値を示し、逆に、anti- α 4 群 ($11.42 \pm 7.22\%$) は最低値を示し Cont 群との間に有意差を認めた ($P < 0.005$) (Fig. 4-IV CO)。

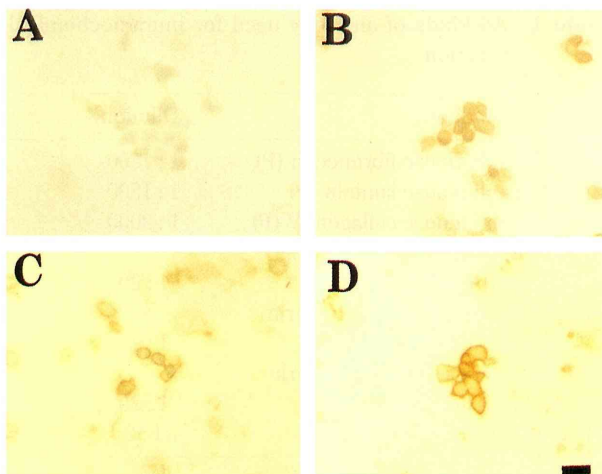


Fig. 2 Immunocytochemical detection of negative control (A), integrin β 1 chain (B), α 4 chain (C) and α 5 chain (D) in Colon 26 tumor cells before transplantation. Bar = 5 μ m

3. 肺転移と ECM 発現量

肺転移の有無に係わらず、各抗体処理群のFN発現量に有意差はなかった (Fig. 5-FN)。LN 発現量は anti- α 5 群では、肺転移を認めた方が有意に高かった ($P < 0.05$)。他の群では LN 発現量に有意差はなかった (Fig. 5-LN)。IV CO 発現量は anti- α 4 群では、肺転移を認めた方が有意に高かった ($P < 0.05$)。他の群では IV CO 発現量に有意差はなかった (Fig. 5-IV CO)。

IV. 各抗体処理群と PCNA 陽性率の関係

anti- α 5 群 ($29.13 \pm 4.61\%$) は他の群に比較して PCNA 陽性率は有意に低値を示した ($P < 0.05$, 0.001) が、Cont 群 ($32.13 \pm 3.49\%$) と anti- β 1 群 ($34.74 \pm 4.88\%$)、anti- α 4 群 ($33.25 \pm 5.43\%$) の間では有意差はなかった (Fig. 6)。

考 察

I. 腫瘍の成長、転移におけるインテグリンの役割

腫瘍細胞動態への ECM の関与を解明する際に、仲介役となるインテグリンの影響を否定することはできない。特定のインテグリンの発現と腫瘍の浸潤、転移との関連性が様々な腫瘍細胞により指摘されている^{10, 11, 12)}。本実験においても各抗体処理群間で腫瘍の成長、転移頻度および PCNA を指標とした増殖性に差異が認められた。抗インテグリン β 1 抗体によるヒト大腸癌細胞の肝転移阻害¹³⁾、抗 VLA- β 5

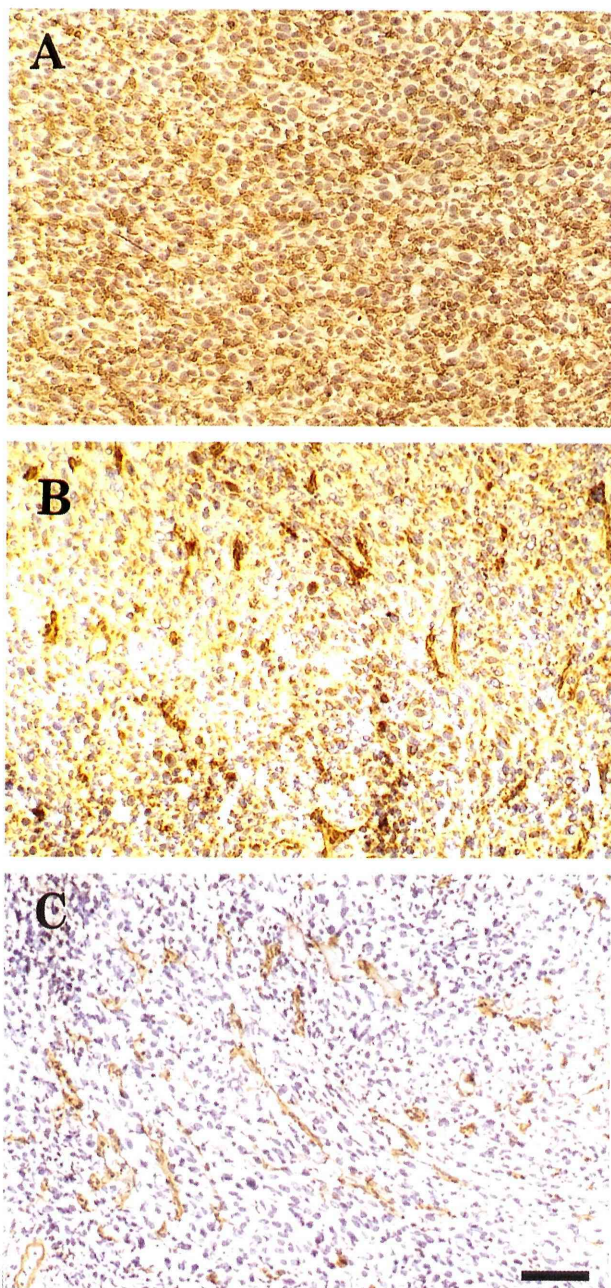


Fig. 3 Immunohistochemical detection of FN (A), LN (B) and IVCO (C) in tumor tissue of the resected foot pad on day 9. Representative examples of FN, LN and IVCO immunostaining patterns observed are shown. Bar = 20 μ m

抗体による高転移性腎癌細胞の走化抑制¹⁴⁾、あるいは抗 $\beta 1, \alpha 5$ 抗体によるメラノーマ細胞の増殖抑制¹⁵⁾が報告されている。同様に、Colon26 腫瘍細胞においても $\beta 1, \alpha 5$ インテグリンの発現が成長、転移に関与することが示唆された。特に anti- $\beta 5$ 群では腫瘍体積および増殖率ともに抑制効果が認められたが、anti- $\beta 1$ 群では両者間で対照的な結果を示した。

これは測定時での転移期を経て増殖期への移行期の現象と考えられる。 $\beta 1$ サブファミリーインテグリンの発現はECMとの相互作用により誘導される細胞内シグナル伝達機構を通じて、腫瘍の成長に影響を与えていることが指摘されている⁵⁾。特異的に抗インテグリンモノクローナル抗体で処理することにより、ECMとの相互作用から細胞内シグナリングへの一連のプロセスに変化が生じるものと考えられる。また、 α/β 鎖の組み合わせによる接着特異性も腫瘍動態を決定付ける要素となりえるかもしれない。

II. 腫瘍組織におけるECMの関与

癌組織では一般に細胞表面にFNの発現はなく、間質に発現が認められる。その多くは間質の線維芽細胞あるいは血管内皮細胞から産生されると考えられる¹⁶⁾。元来、FNは炎症による肉芽組織の生成時に間葉系細胞から産生され、組織の修復(再構築)に関与するが、癌間質反応におけるFNの発現様式もこれに類似する。しかも、癌細胞が間質組織と接することによる癌特異的生物現象、すなわち癌とFNとの相互作用が癌細胞の増殖能、転移能あるいは予後と関連することで最近注目されている。家兎VX2舌癌の実験では、腫瘍周囲に局在するFNの腫瘍増殖抑制効果^{17, 18)}が指摘されており、ヒト口腔癌¹⁹⁾あるいは乳癌²⁰⁾でも間質FNの発現と予後との関連性が報告されている。本実験でも、腫瘍増殖能や転移頻度の低い anti- $\alpha 5$ 群でFN発現量が最高値を示したことは上記の報告と一致している。ただし、同じ群内ではFN発現量に有意差は見い出せなかったが、この点に関して今後個体数を増やし検討して行きたい。以上の結果より、腫瘍組織に発現する過剰なFNは腫瘍細胞の周囲への離脱、移動、あるいは血管内皮への接着を抑制し、結果として癌転移を抑制する環境を提供するものと推測される。Humphriesら²¹⁾はFNの細胞結合部位であるArg-Gly-Asp(RGDと略す)配列を含むペプチドGRGDSによるマウスメラノーマB16-F10細胞の肺転移抑制効果を報告しており、Saikiら²²⁾はpoly(RGD)による転移抑制の結果を得ている。これらの報告でも腫瘍細胞の血管内皮細胞への着床にFNの一部のドメイン(細胞接着部位)が干渉し、腫瘍細胞上のFNレセプターがそのリガンドとの接着を阻害されることで転移抑制が生じることを指摘して

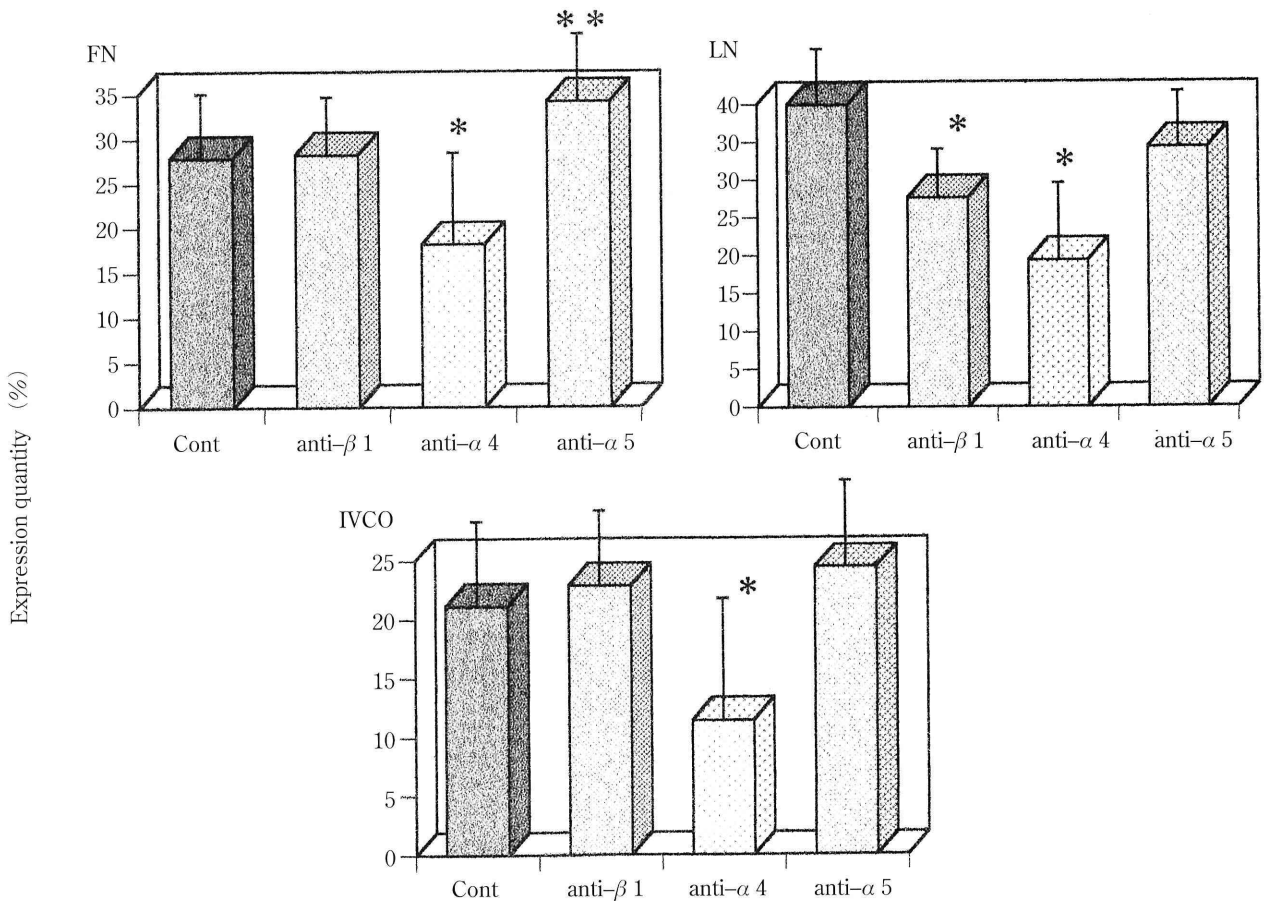


Fig. 4 FN, LN and IVCO expression quantity of primary sites in each integrin monoclonal antibody-treated group. FN, *P < 0.005, **P < 0.01 compared with Cont; LN, *P < 0.005 compared with Cont; IVCO, *P < 0.005 compared with Cont. Statistical significances were determined using Students t-test. Values are means ± SD.

いる。肺転移頻度の高い anti-α4 群では腫瘍組織中の FN 発現量は低値であったが、この現象から少量の FN では腫瘍の進展に影響を与えないものと考えられる。α5β1 インテグリンが FN 上の RGD を認識すること、α4β1 インテグリンが type III connecting segment (III CS) に特異的に接着することから、anti-α4 群と anti-α5 群の対照的な FN 発現量の相違は FN 上の異なる接着部位に依存した FN の機能的変化の違い、すなわち腫瘍進展における正あるいは負の調節を反映している可能性がある。すなわち、腫瘍細胞と FN の相互作用により ECM の分解酵素が産生された結果、FN の断片化が生じ、それが腫瘍組織中の FN 発現量に影響を及ぼしたと考えられた。

口腔癌²³⁾、胃癌²⁴⁾、および大腸癌²⁵⁾ などにおいて癌組織に発現する LN と転移能、予後の間に正の相関が指摘されている。また、マウス線維肉腫細胞

表面の LN 様分子である α-D-galactopyranosyl 残基が血管基底膜の IV CO への接着に関与すること²⁶⁾、ヒトメラノーマ (A2058) が LN と接着することにより IV 型コラゲナーゼの分泌量が増加すること²⁷⁾、マウスメラノーマ細胞が LN と接着することにより移動能が促進されるという報告²⁾ などから癌の悪性化に伴う LN の関与が示唆される。本実験でも高頻度転移群 (Cont 群) で LN の発現量が高値を示したことは上記の報告と矛盾せず、LN の転移促進能を裏付ける現象と考えられた。また、本実験では染色像の観察から、腫瘍細胞質内に LN 陽性像を認める症例が少なくなかった。細胞質内に LN が存在する成因に関して Forster ら²⁸⁾ は大腸癌の低分化型腺癌で細胞質内に LN が蓄積すると報告している。Deneker ら²⁹⁾ は LN の合成能に分化の程度による違いはないが、低分化型では LN 分子の分泌が不十分であると述べている。本実験でも未分化な組織型

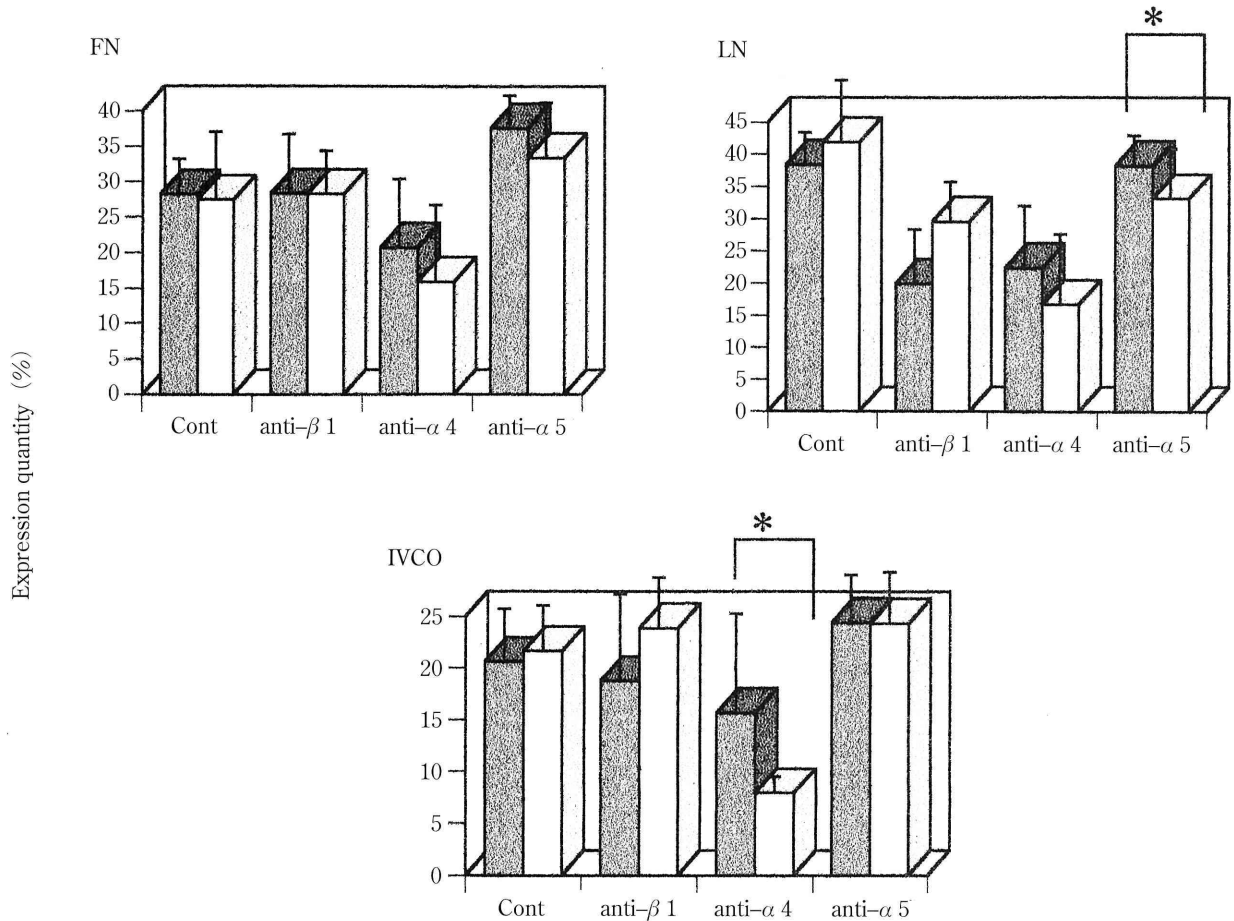


Fig. 5 Relationships between lung metastasis and expressions of FN, LN and IVCO in primary sites in each integrin monoclonal antibody-treated group. LN, * $P < 0.05$ in anti- $\alpha 5$; IVCO, * $P < 0.05$ in anti- $\alpha 4$. These statistical significances were determined using Student's t-test. Values represent expression quantity of ECM components in the presence or absence of metastasis and the mean \pm SD. ■, Metastasis; □, No metastasis

を呈する Colon26 移植腫瘍の細胞質内で LN の発現量は多く、そこには LN の分泌調整が働いているものと示唆される。LN を認識する代表的なインテグリンには $\alpha 1\beta 1^{30)}$, $\alpha 3\beta 1^{31)}$, $\alpha 6\beta 1^{32)}$ などがあり、他の ECM と同様に $\beta 1$ ファミリーが多くを占めている。anti- $\beta 1$ 群における LN 発現量の低下から考えると、LN の $\beta 1$ 鎖依存性結合が癌細胞の進展、転移に関連するものと示唆される。すなわち $\beta 1$ 鎖を有するインテグリンが ECM 構成成分とリガンドすることにより LN の分泌が促進されることが推測された。また、anti- $\alpha 4$ 群においても有意に低値を示したが LN 分子上に $\alpha 4$ サブユニットとリガンドするドメインが存在せず LN 発現と $\alpha 4$ との直接的関連は不明であり、今後両者の介在要素となるものを検討する必要がある。

本実験で腫瘍組織内の血管基底膜に IVCO の発

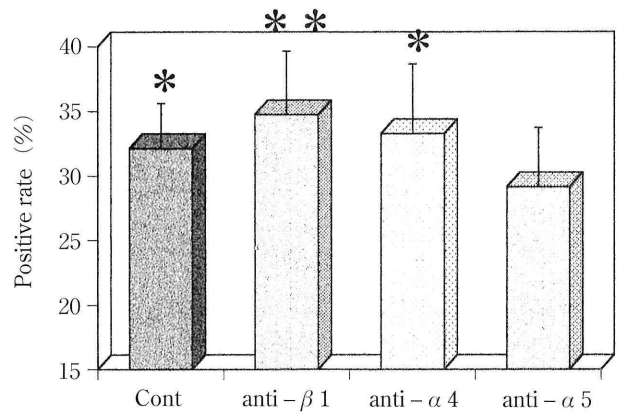


Fig. 6 Comparison of PCNA positive rate in each integrin monoclonal antibody-treated group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$ compared with anti- $\alpha 5$. Statistical significances were determined using Student's t-test. Values are means \pm SD. Tumor cells in primary sites on day 9 were measured.

現が目立って観察されたことは IV CO の発現量が腫瘍内血管の分布の程度を反映していることを意味している。なかでも、anti- $\alpha 4$ 群のみ IV CO の発現量が有意に低下した (Fig. 4) ことは、この群において腫瘍内血管の形成が抑制されているものと考えられる。 $\alpha 4\beta 1$ インテグリンは FN 以外に内皮細胞上の Ig スーパーファミリーに属する vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1 と略す) とともに特異的結合を示す³³⁾ ことから、血管形成の変化すなわち IV CO の発現量の変化には腫瘍細胞と血管内皮の仲介となる $\alpha 4\beta 1$ と VCAM-1 の結合が関連していると推察される。

結 論

1. 抗インテグリン抗体で前処理した Colon26 腫瘍細胞をマウスの下肢に移植後、その腫瘍発育、転移頻度および PCNA 陽性率を検討した。特に anti- $\alpha 5$ 群ではすべての項目で有意に低値を示したことから、インテグリン $\alpha 5$ がこの腫瘍動態に関与することが示唆された。

2. 移植腫瘍組織に発現する ECM を定量的に画像解析した結果、anti- $\alpha 5$ 群で FN 発現量は有意に高値を示した。LN 発現量は Cont 群で有意に高値を示し、IV CO 発現量は anti- $\alpha 4$ 群で有意に低値を示した。以上から ECM 成分発現量の変化は特定のインテグリンを仲介とした Colon26 腫瘍細胞の組織再構築に関連するものと推測された。

3. 本実験系は自然肺転移モデルを用いて ECM の発現変化を病理組織学的に検索したもので、ECM の生物学的特性の面から癌転移機構を解明するための基礎的な実験モデルとして有用であり、癌治療に関わる前臨床的試験に応用可能であると考えられた。

謝 辞

稿を終えるに当り御指導、御校閲を賜りました恩師千葉博茂教授に深甚なる謝意を捧げます。また、御理解と御尽力下さいました教室員各位に謝意を表わします。

本論文の要旨は、第 41 回日本口腔外科学会総会 (1996 年 11 月, 東京)、第 21 回日本頭頸部腫瘍学会 (1997 年 6 月, 福岡) において発表した。

文 献

- 1) Ruoslahti E : Fibronectin in cell adhesion and invasion. *Cancer Metastasis Rev* **3** : 43~51, 1984
- 2) McCarthy JB, Furcht LT : Laminin and fibronectin promote the haptotactic migration of B16 mouse melanoma cells in vitro. *J Cell Biol* **98** : 1481~1487, 1984
- 3) Hynes RO : Integrins : a family of cell surface receptors. *Cell* **48** : 549~554, 1987
- 4) Hynes RO : Integrins : versatility, modulation, signaling in cell adhesion. *Cell* **69** : 11~25, 1992
- 5) Juliano RL : The role of $\beta 1$ integrins in tumors. *Cancer Biology* **4** : 277~283, 1993
- 6) Qian F, Vaux DL, Weissman IL : Expression of the integrin $\alpha 6\beta 1$ on melanoma cells can inhibit the invasive stage of metastasis formation. *Cell* **77** : 335~347, 1994
- 7) 富田善彦, 片桐明善 : ヒト腎癌の転移におけるインテグリン $\alpha 4\beta 1$ (VLA-4)/VCAM-1 および E-カドヘリンの意義. *Biotherapy* **9** : 1340~1346, 1995
- 8) Schreiner CL, Fisher M, Bauer J, Juliano RL : Defective vascularization in fibronectin-receptor-deficient CHO cell tumors in nude mice. *Int J Cancer* **55** : 436~441, 1993
- 9) Corbett TH, Griswold DP, Roberts BJ, Peckham JC, Schabel FM Jr : Tumor induction relationships in development of transplantable cancers of the colon in mice for chemotherapy assays, with a note on carcinogen structure. *Cancer Res* **35** : 2434~2439, 1975
- 10) Sacchi A, Falcioni R, Piaggio G, Gianfelice MA, Perrotti N, Kennel SJ : Ligand-induced phosphorylation of a murine tumor surface protein (TSP-180) associated with metastatic phenotype. *Cancer Res* **49** : 2615~2620, 1989
- 11) Dedhar SR, Saulnier R, Nagel R, Overall CM : Specific alteration of $\alpha 3\beta 1$ and $\alpha 6\beta 4$ integrins in highly invasive and metastatic variants of human prostate carcinoma cells selected by in vitro invasion through reconstituted basement membrane. *Clin Exp Metastasis* **11** : 391~400, 1993
- 12) Harning R, Myers C, Merluzzi VJ : Monoclonal antibodies to lymphocyte function-associated antigen-1 inhibit invasion of human lymphoma and metastasis of murine lymphoma. *Clin Exp Metastasis* **11** : 337~342, 1993
- 13) Fujita S, Suzuki H, Kinoshita M, Hirohashi S : Inhibition of cell attachment, invasion and metastasis of human carcinoma cells by anti-integrin $\beta 1$ subunit antibody. *JpnJ Cancer Res* **83** : 1317~1326, 1992

- 14) Murata J, Saiki I, Yoneda J, Azuma I : Differences in chemotaxis to fibronectin in weakly and highly metastatic tumor cells. *Jpn J Cancer Res* **83** : 1327~1333, 1992
- 15) Mortarini R, Gismondi A, Santoni A, Parmiani G, Anichini A : Role of the $\alpha 5\beta 1$ integrin receptor in the proliferative response of quiescent human melanoma cells to fibronectin. *Cancer Res* **52** : 4499~4506, 1992
- 16) Stenman S, Vaheri A : Fibronectin in human solid tumors. *Int J Cancer* **27** : 427~435, 1981
- 17) 里見貴史 : 家兎 VX2 舌癌におけるフィブロネクチンの動態に関する研究. *日口外誌* **40** : 126~139, 1994
- 18) 上野弘貴, 渡辺裕之, 里見貴史, 渡辺正人, 金子忠良, 千葉博茂 : 家兎 VX2 舌癌におけるフィブロネクチンの抗腫瘍効果に関する研究. *頭頸部腫瘍* **23** : 206~211, 1997
- 19) 渡辺裕之 : 高分化型口腔扁平上皮癌におけるフィブロネクチン遺伝子の発現と予後に関する研究. *日口外誌* **40** : 1015~1030, 1994
- 20) Christensen L, Nielsen M, Andersen J, Clemmensen I : Stromal fibronectin staining pattern and metastasizing ability of human breast carcinoma. *Cancer Res* **48** : 6227~6233, 1988
- 21) Humphries MJ, Olden K, Yamada KM : A synthetic peptide from fibronectin inhibits experimental metastasis of murine melanoma cells. *Science* **233** : 467~470, 1986
- 22) Saiki I, Murata J, Matsuno K, Ogawa R, Nishi N, Tokura S, Azuma I : Anti-metastatic and anti-invasive effects of polymeric Arg-Gly-Asp (RGD) peptide, poly (RGD), and its analogues. *Jpn J Cancer Res* **81** : 660~667, 1990
- 23) Noguchi M, Kohama G, Hiratsuka H, Sekiguchi T : Clinical significance of laminin deposition and T-cell infiltration in oral cancer. *Head Neck* **15** : 125~132, 1993
- 24) Orita H, Korenaga D, Maehara Y, Baba H, Sugimachi K : Laminin distribution patterns are closely related to liver metastasis in gastric cancer. *Cancer* **71** : 1201~1206, 1993
- 25) 久保隆一, 待寺則和, 安富正幸 : 細胞外マトリックスと癌転移. *外科* **58** : 533~541, 1996
- 26) Grimstad IA, Varani J, McCoy JP : Contribution of α -D-galactopyranosyl end groups to attachment of highly and low metastatic murine fibrosarcoma cells to various substrates. *Exp Cell Res* **155** : 345~358, 1984
- 27) Turpeenniemi-Hujanen T, Thorgeirsson UP, Rao CN, Liotta LA : Laminin increases the release of type IV collagenase from malignant cells. *J Biol Chem* **261** : 1883~1889, 1986
- 28) Forster SJ, Talbot IC, Clayton DG, Critchley DR : Tumour basement membrane laminin in adenocarcinoma of rectum : an immunohistochemical study of biological and clinical significance. *Int J Cancer* **37** : 813~817, 1986
- 29) Daneker GW, Mercurio AM, Guerra L, Wolf B, Salem RR, Bagli DJ, Steele GD : Laminin expression in colorectal carcinomas varying in degree of differentiation. *Arch Surg* **122** : 1470~1474, 1987
- 30) Hall DE, Reichardt LF, Crowley E, Holley B, Moezzi H, Sonnenberg A, Damsky CH : The $\alpha 1/\beta 1$ and $\alpha 6/\beta 1$ integrin heterodimers mediate cell attachment to distinct sites on laminin. *J Cell Biol* **110** : 2175~2184, 1990
- 31) Tomaselli KJ, Hall DE, Flier LA, Gehlsen KR, Turner DC, Carbonetto S, Reichardt LF : A neuronal cell line (PC12) expresses two $\beta 1$ -class integrins- $\alpha 1\beta 1$ and $\alpha 3\beta 1$ -that recognize different neurite outgrowth-promoting domains in laminin. *Neuron* **5** : 651~662, 1990
- 32) Sonnenberg A, Gehlsen KR, Aumailley M, Timpl R : Isolation of $\alpha 6\beta 1$ integrins from platelets and adherent cells by affinity chromatography on mouse laminin fragment E8 and human laminin pepsin fragment. *Exp Cell Res* **197** : 234~244, 1991
- 33) Elices MJ, Osborn L, Takada Y, Crouse C, Luhowskyj S, Hemler ME, Lobb RR : VCAM-1 on activated endothelium interacts with the leukocyte integrin VLA-4 at a site distinct from the VLA-4/fibronectin binding site. *Cell* **60** : 577~584, 1990

Alteration of extracellular matrix expression on a lung metastatic model of Colon 26 tumor cells

Masato WATANABE

The Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Tokyo Medical University
(Director: Prof. Hiroshige CHIBA)

Summary

Extracellular matrix (ECM)-binding function of integrins expressed by various tumor cells can induce outside-in integrin signal transduction. Therefore, the characteristic of ECM function may have an influence on the change of tumor behavior. The role of the extracellular matrix components was investigated on tumor progression, including growth and metastasis, using a spontaneous lung metastasis animal model using pretreated mouse Colon 26 tumor cells with monoclonal anti-integrin ($\beta 1$, $\alpha 4$ and $\alpha 5$) antibodies. Specifically, the expression of the ECM components fibronectin, laminin and type IV collagen were examined in the primary tumor tissue using immunohistochemical technique, and their quantity estimated using image analysis in order to study the relation between ECM and tumor progression. The expression of fibronectin was significantly lower in the anti- $\alpha 4$ group ($P < 0.005$) than in the control group which was not pretreated with monoclonal antibodies and was higher in the anti- $\alpha 5$ group ($P < 0.01$). The expression of laminin was highest in the control group, however no significance could be seen statistically. However, the expression of type IV collagen was lowest in the anti- $\alpha 4$ group ($P < 0.005$). Furthermore the growth and metastatic capacity of tumor cells in the anti- $\alpha 4$ group were significantly higher than the anti- $\beta 5$ group. These data suggest that specific interactions between the Colon 26 tumor cells and the ECM components mediated by integrins may have some influence on tumor progression and that the expression quantity of ECM components may be related to the remodelling of tumor tissue.

〈Key words〉 Extracellular matrix, Integrin, Lung metastasis model, Colon26 cancer cells, Image analysis
