

子宮体癌細胞の浸潤能に関する諸因子の検討

札幌医科大学産婦人科学教室 (主任: 工藤隆一教授)

森 泰宏 水内 英充 佐藤賢一郎

岡村 直樹 工藤 隆一

The Factors Involved in Invasive Ability of Endometrial Carcinoma Cells

Yasuhiro MORI, Hidemitsu MIZUUCHI, Ken-ichiro SATO,

Naoki OKAMURA and Ryuichi KUDO

Department of Obstetrics and Gynecology, Sapporo Medical University,

School of Medicine, Sapporo

(Director : Prof. Ryuichi Kudo)

概要 子宮体癌細胞株 8 株を用い *in vitro* における基底膜への浸潤能を測定し, それらの浸潤能に影響を与える因子として細胞接着分子である E-cadherin の発現, 細胞外基質の破壊に関する matrix metalloproteinase (MMP) 産生能, さらに K-ras codon12 における点突然変異の有無を検討した。また, 基底膜成分上細胞培養を行い, 細胞の増殖形態に対する影響について検討し, 以下の成績を得た。

1) 細胞外 matrix に対する浸潤能を検討するために Matrigel を用いた *in vitro* invasion assay を行った。その結果, 細胞株により *in vitro* 浸潤能が異なり, 有意に高い浸潤能を示した株は未分化腺癌・腹水細胞由来の NUE-1 および転移リンパ節由来の SNG-M であった。

2) *in vitro* 浸潤能と E-cadherin 免疫染色強度との間に負の相関を認めた。 *in vitro* 浸潤能の低い細胞株では E-cadherin の発現は強く, 高い浸潤能をもつ細胞株 (NUE-1) では E-cadherin の発現は認められなかった。

3) 中～高分化型腺癌由来の株細胞では, Matrigel 上培養において細胞凝集がみられ, plastic dish 上での培養に比べ, E-cadherin の発現が増強した。

4) 細胞培養上清には 72-kD gelatinase (MMP-2) の活性が認められた。 NUE-1, SNG-M, HEC-1BE では MMP-2 の活性が他の株に比べ高く, さらに最も高い浸潤株 (NUE-1) では 92-kD gelatinase (MMP-9) の活性も認められた。

5) PCR-RFLP 法により 8 株中 4 株 (50%) において K-ras codon12 における点突然変異が検出され, 変異塩基配列が同定された。点突然変異の有無と *in vitro* 浸潤能の間に相関は認められなかった。

Synopsis The *in vitro* invasive ability, the expression of cell adhesion molecule E-cadherin, activity of matrix metalloproteinase (MMP) and K-ras point mutation were investigated in eight human endometrial carcinoma cell lines.

1) *In vitro* invasive abilities of endometrial carcinoma cell lines depend on the degree of cell differentiation and the origin of cell lines. A poorly-differentiated carcinoma cell line (NUE-1) and a cell line derived from metastatic lymph node (SNG-M) were more invasive than moderately- (HEC-1A, HEC-1BE) and well-differentiated (HEC-6, Ishikawa) cell lines.

2) Immunohistochemically, less or non-invasive cell lines expressed E-cadherin strongly, whereas a highly invasive cell line (NUE-1) expressed E-cadherin weakly.

3) When cultured on Matrigel-coated dishes, the tumor cells derived from moderately- and well-differentiated carcinoma aggregated with each other and did not invade Matrigel in the invasion assay. The aggregated cells expressed E-cadherin more strongly when cultured on Matrigel.

4) 72-kD gelatinase (MMP-2) was secreted in serum-free conditioned medium of all cell lines. In an invasive cell line (NUE-1, SNG-M), the activity of MMP-2 was stronger than in other cell lines.

And the activity of 92-kD gelatinase (MMP-9) was detected in most invasive cell line (NUE-1).

5) Point mutation of K-ras codon 12 was detected in four of eight (50%) cell lines by the PCR-RFLP method. The changes in the DNA sequence were identified, but K-ras point mutation was not correlated with *in vitro* invasiveness of the tumor cells.

Key words: Endometrial carcinoma • Invasion assay • E-cadherin • Matrix metalloproteinase • K-ras point mutation

緒 言

子宮体癌において筋層浸潤の有無とその程度は臨床病期分類, 組織型, 分化型などとともに予後に関与する最も重要な因子の一つであるといわれている。癌の浸潤は臨床的には非常に重要視されているものの, 子宮体癌における浸潤能に関してはほとんど検討されていない。著者らは子宮体癌由来の癌細胞株を用い *in vitro* における基底膜への浸潤能を測定し, 浸潤能に関与する因子として細胞接着分子 E-cadherin の発現, 細胞外基質の破壊に関与する matrix metalloproteinase (以下, MMP) 産生能を測定評価し, さらに基底膜成分上培養を行い, 細胞の増殖形態に対する影響について検討した。また, 子宮内膜癌において予後との関連が指摘されている K-ras codon12 における点突然変異の有無と浸潤能の相関についても検討した。

研究材料・研究方法

1. 細胞株

細胞株は, 各細胞株の樹立管理者の御好意により提供された細胞株 8 株を使用した(表 1)。細胞の培養は 10% fetal bovine serum (FBS) を含む Eagle's MEM (Nissui Pharmaceos Co., Ltd.) 培地で 37°C, 5%CO₂, 水蒸気飽和状態の条件下で行い, 0.05% EDTA-Trypsin 処理により剥離・継

代したが, NUE-1 のみは pipetting により容易に剥離した。

2. In Vitro Invasion Assay

in vitro における基底膜浸潤能を測定するために, Albini et al.¹⁾の方法に若干の改変を加え *in vitro* invasion assay を施行した(図 1)。Transwell chamber 内において細胞外基質類似物質である Matrigel (Collaborative Research, Ltd.) により coat された polycarbonate filter (8- μ m pore) 上に 1×10^5 個の細胞を播種し, 37°C, 5% CO₂ の条件下で培養した後, filter 上面の細胞を除去し, Matrigel を破壊し filter 下面に浸潤した細胞数を count した。filter 下層には chemoattractant として fibronectin (25 μ g/ml) 加 10% MEM を用いた。各 assay は 4~6 dishes で最低 2 回施行した。浸潤細胞は 400 倍拡大 1 視野の細胞数を計測し, 5 視野の平均値を用いた。

3. E-cadherin 免疫染色

細胞間接着因子である E-cadherin の発現は免疫組織学的に検索した。各株細胞は plastic dish 上および Matrigel-coated dish 上で培養され, ヒト E-cadherin に対する monoclonal antibody (HECD-1: Takara, Ltd.) を第一抗体として ABC 法により酵素抗体法染色を施行した。

4. 基底膜成分上培養

表 1 子宮内膜癌細胞株

細胞株	樹立管理者	組織分化度	採取部位
Ishikawa	西田博士(筑波大学)	G1	primary
SNG-M	野澤博士(慶応大学)	G2	meta(LN)
HEC-1A	蔵本博士(北里大学)	G2	primary
HEC-1BE	同上	G2	primary
HEC-50B	同上	G2	ascites
HEC-108	同上	G3	primary
HEC-6	同上	adenoacanthoma	primary
NUE-1	鈴森博士(名古屋市立大学)	undiff. adenoca.	ascites

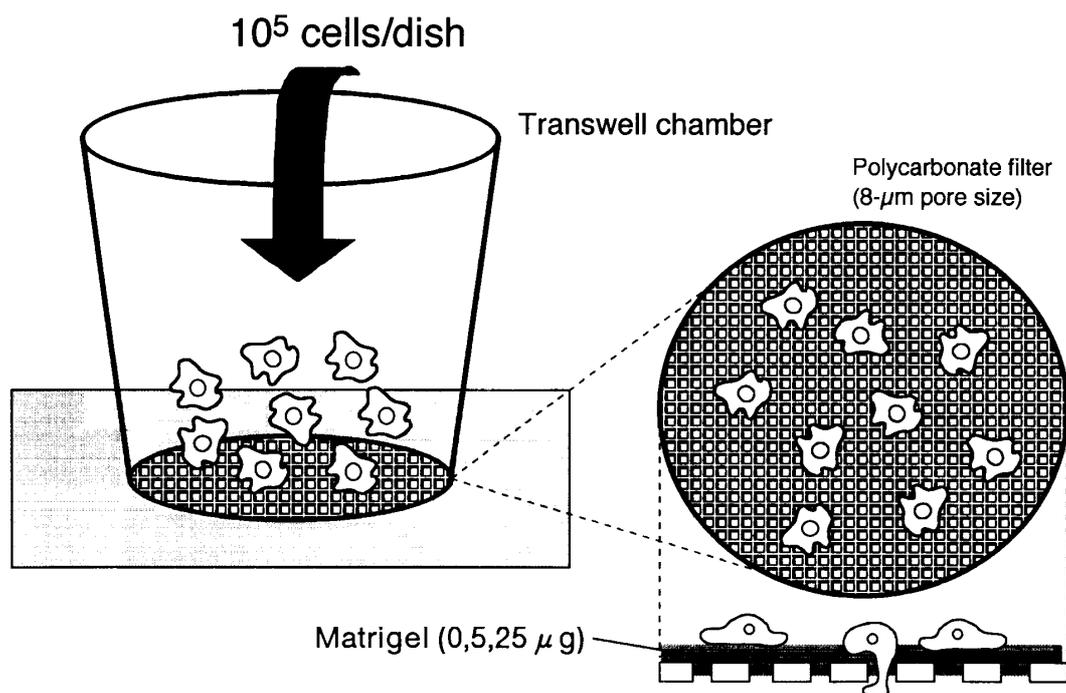


図1 In Vitro Invasion Assay

Matrigelでcoatされたdish上で7日間細胞培養を行い、ECMによる細胞への影響を位相差顕微鏡により形態観察を行い検討した。

5. MMP 産生能の検出

1×10^6 個を48時間無血清培養し、1,000rpmにて10分間遠沈し得られた上清を検体とした。MMP産生能の検出はzymography (SDS-PAGE)を用いHaussen et al.²⁾の方法に若干の改変を加え施行した。すなわち、培養上清20 μl にsample buffer (2% sodium dodecyl sulfate, 0.0625M Tris-HCl [pH=6.8], 0.00125% bromophenol blue, 10% glycerol)を3:1の割合で混合した試料をgelatine(0.5mg/ml)含有10% acrylamideにて電気泳動した。12mAで6時間泳動したのち2.5% Triton Xで1時間洗浄しSDSを除去、substrate buffer (0.05M Tris-HCl [pH=7.8], 0.004M calcium chloride, 0.1M sodium chloride, 0.05% sodium azide)にて37 $^{\circ}\text{C}$, 24時間 incubateした。0.5% Coomassie blue R-250で染色後、脱色処理され、MMP活性は染色されないbandとして検出された。

6. K-ras codon12における点突然変異の検出 phenol/chloroform法によりDNAを抽出し

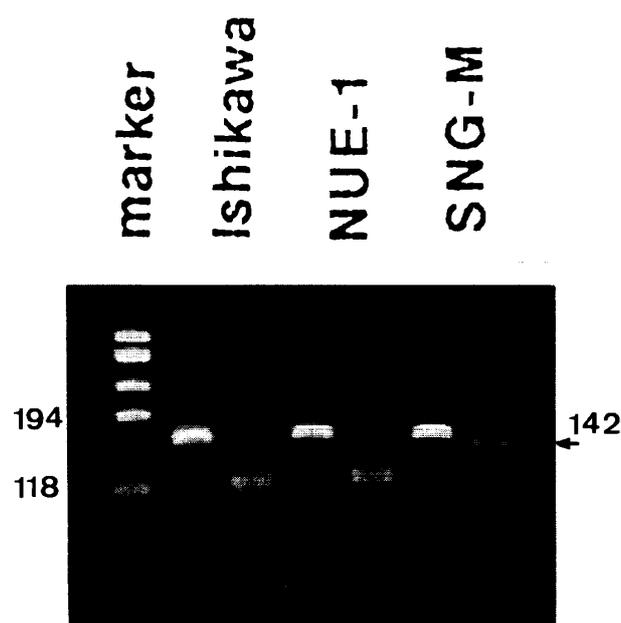


図2 K-ras codon12における点突然変異の検出
primer (5'-3' GACTGAATATAAACTTGTGG, 3'-5' CTATTGTTGGATCATATTTCG)を用いてPCRにより増幅した。PCRは、94 $^{\circ}\text{C}$ 1分、55 $^{\circ}\text{C}$ 2分、72 $^{\circ}\text{C}$ 2分30秒、35cycleの条件設定で施行した。各細胞株の左 lane は BstN1処理前、右 lane は処理後の band である。点突然変異例では codon12の GG に変異が起るため、BstN1では切断されず142bpの band が生じる。

た. Jiang et al.³⁾の polymerase chain reaction(以下, PCR)-RFLP 法を用いて K-ras codon12における点突然変異を検出した. すなわち, 目的 DNA 領域を PCR 法により増幅し, 制限酵素 BstN1処理を約9時間行った. BstN1は塩基配列 CCTGG を特異的に認識し切断する制限酵素であり, 点突然変異例では codon12の GG に変異が起るため, BstN1では切断されず DNA 断片長の差が生じる(図2). 変異陽性細胞株については dot blot hybridization 法により変異塩基配列の決定を行った.

研究成績

1. In Vitro Invasion Assay

Matrigel の濃度を $0\mu\text{g}$, $5\mu\text{g}$ および $25\mu\text{g}$ と設定することにより, 子宮体癌株の *in vitro* 浸潤能の測定が可能な条件設定を行った. この結果, 検討した子宮体癌株では株により *in vitro* における浸潤能が異なることが明らかとなった(表2). 最も高い浸潤能を示したのは未分化腺癌・腹水細胞由来の NUE-1であり, 転移リンパ節由来の SNG-M がこれに続いた. これらは, 中等度分化型腺癌由来の株 (HEC-1A, HEC-1BE) や高分化型腺癌細胞株 (HEC-6, Ishikawa) に比べ有意に高い浸潤能を認めたが, 低分化型腺癌由来の細胞株である HEC-108は高い浸潤能を示さなかった.

2. E-cadherin 免疫染色

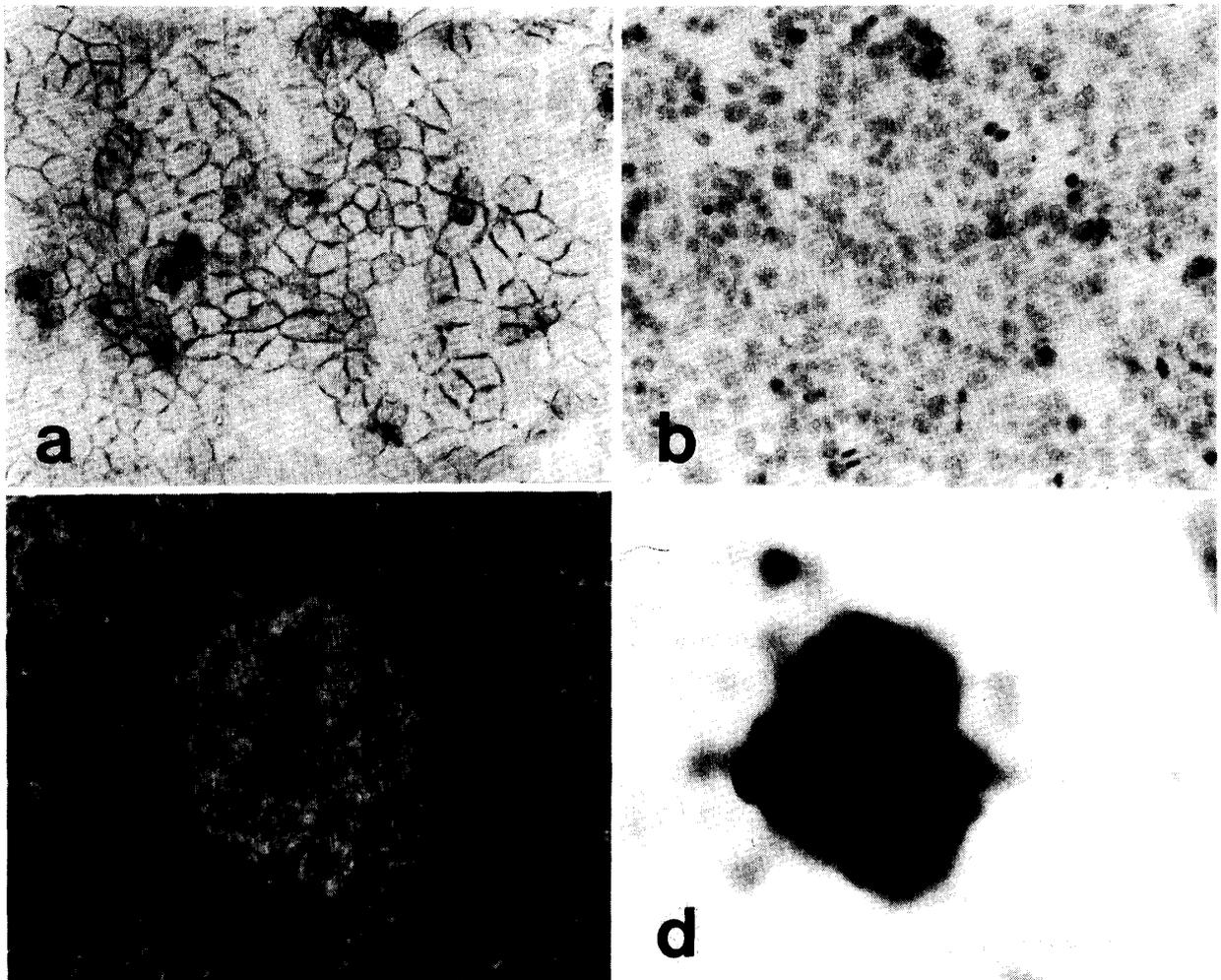


図3 E-cadherin 発現の免疫組織学的検索

- a. HEC-108は *in vitro* 浸潤能が低く, 細胞辺縁に明瞭に発現を認めた (染色強度 (+); $\times 100$).
 b. 高浸潤能の NUE-1では E-cadherin の発現は認められなかった (染色強度 (-); $\times 100$). c.
 HEC-6. Matrigel 上培養において細胞が凝集する傾向がみられた(位相差顕微鏡; $\times 400$). d. 細胞凝集部分は E-cadherin に強く染色された ($\times 400$).

免疫染色強度の判定は、全く染色されないものを(-)とし、陽性コントロールの正常子宮内膜と同等にすべての細胞において明らかに染色を認めるものを(+), 一部細胞に陽性とみられるものはこれらの中間とみなし(±)と判定した。さらに Matrigel 上培養で plastic dish 上培養に対しより強度に染色された場合に(++)と表記した。in vitro 浸潤能の低い細胞株において E-cadherin の発現は強く、細胞-細胞の接触辺縁に明瞭に発現した(図 3a)。より高い浸潤能をもつ細胞株(NUE-1)では細胞相互間の接着も緩く、E-cadherin の発現は認められなかった(図 3b)。

表 3 に示すように、in vitro 浸潤能と E-cadherin 染色強度との間に明らかな負の相関を認めた。

3. 基底膜成分(Matrigel)上培養

中等度ないし高分化型腺癌由来の株細胞では、

Matrigel で coat された dish 上での培養において細胞同志が凝集する傾向がみられ(図 3c)、これらの細胞は invasion assay においては、Matrigel に対して低い浸潤能を示した(表 3)。Matrigel 上で凝集した細胞は、Matrigel で coat されていない dish での培養に比べ、より強く E-cadherin を発現した(図 3d)。高浸潤性の株(NUE-1)は基底膜成分上培養でも樹枝状に発育し、低浸潤株で観察された特徴的な凝集細胞はみられなかった。

4. MMP 産生能の検出

検討したすべての細胞株の無血清培養上清には癌細胞から産生された 72-kD gelatinase (MMP-2)の活性が認められた(図 4)。NUE-1, SNG-M, HEC-1BE で 72-kD gelatinase の活性が他の株に比べ高く、さらに最も高浸潤性の NUE-1 では他の株ではみられなかった 92-kD gelatinase の活性も認められた。

表 2 In Vitro Invasion Assay

細胞株	浸潤細胞数/HPF		
	0 μ g Matrigel	5 μ g Matrigel	25 μ g Matrigel
NUE-1	258.6 \pm 35.1	186.3 \pm 44.2	54.6 \pm 9.8
SNG-M	230.0 \pm 34.8	123.6 \pm 36.6	38.4 \pm 7.6
HEC-1BE	86.2 \pm 14.4	33.5 \pm 11.7	0.6 \pm 0.8
HEC-50B	34.7 \pm 15.6	3.2 \pm 9.6	—
HEC-108	5.5 \pm 20.6	4.3 \pm 6.7	—
Ishikawa	20.1 \pm 3.2	2.3 \pm 1.5	—
HEC-1A	10.6 \pm 5.7	5.5 \pm 2.8	—
HEC-6	7.2 \pm 10.3	1.5 \pm 1.6	—

表 3 E-cadherin 免疫染色・Matrigel 上培養

細胞株	細胞凝集 on Matrigel-coated dish	E-cadherin 染色強度	
		on plastic dish	on Matrigel-coated dish
NUE-1	—	—	—
SNG-M	—	—	—
HEC-1BE	±	±	±
HEC-50B	±	±	±
Ishikawa	±	+	++
HEC-108	+	+	++
HEC-1A	+	+	++
HEC-6	+	+	++

E-cadherin 染色の染色強度の判定は、全く染色されないものを(-)とし、すべての細胞において明らかに染色を認めるものを(+), 一部の細胞に陽性とみられるものはこれらの中間とみなし(±)と判定した。これに加え、今回の検討では plastic dish 上培養に対し Matrigel 上培養を行い、より強度に染色された場合に(++)という表現を用いた。

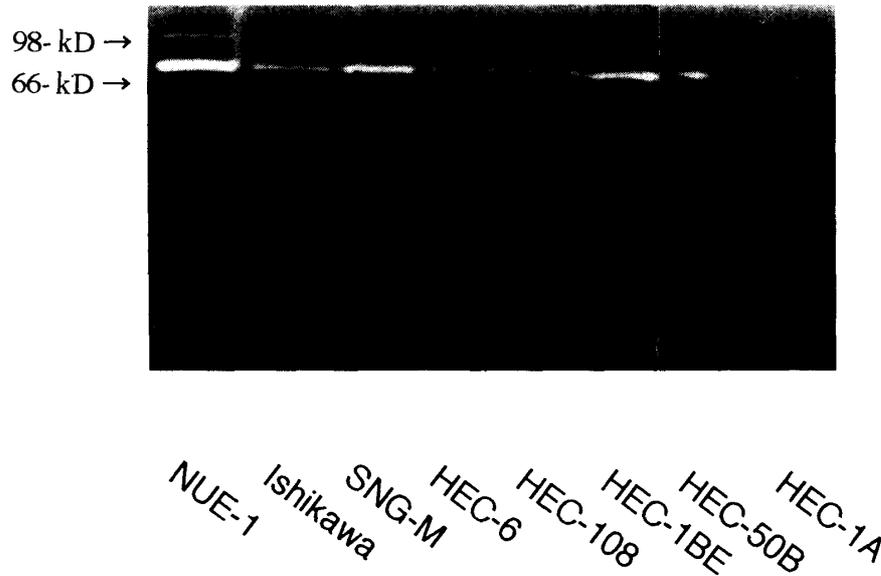


図4 無血清培養上清における MMP の活性
すべての細胞株の培養上清に MMP-2の活性が認められた。NUE-1, SNG-M, HEC-1BE において MMP-2の活性が他の細胞株に比べ高く、さらに最も高浸潤性の NUE-1 では92-kD gelatinase (MMP-9) の活性も認められた (左矢印は分子量マーカーの位置)。

表4 PCR-RFLP 法による K-ras 点突然変異の検出

細胞株	点突然変異	DNA 配列(K-ras codon12)
NUE-1	-	-
SNG-M	+	GGT(Gly)>>>> GTT(Val)
HEC-1BE	+	GGT(Gly)>>>> GAT(Asp)
Ishikawa	-	-
HEC-1A	+	GGT(Gly)>>>> GAT(Asp)
HEC-50B	-	-
HEC-108	-	-
HEC-6	+	GGT(Gly)>>>> GAT(Asp)

5. K-ras codon12における点突然変異の検出

8株中4株(50%)において K-ras codon12 における点突然変異が検出された(表4)。このうち HEC-6, HEC-1A, HEC-1BE, SNG-M の各株において突然変異が認められた。dot blot hybridization により同定された塩基配列は、SNG-M では codon12の GGT (Gly) から GTT (Val) への変異が認められ、他の3株では GGT (Gly) から GAT (Asp) の変異であることが確認された。しかし、K-ras 点突然変異の有無と in vitro 浸潤能とは明らかな相関を示さなかった。

考 案

近年の癌浸潤・転移に関する分子生物学的・細胞生物学的研究の進歩により、癌の転移は発癌過程と同様に複雑な多段階プロセスを経て成立することが知られてきた。このうち細胞外 matrix や間質への浸潤は転移の最も初期の過程の一つであり、Liotta et al.⁴⁾により細胞接着、基底膜分解、細胞移動の三つの step が不可欠であることが報告されている。子宮体癌の臨床的予後因子としては臨床期分類、組織型、組織分化度などが挙げられるが、特に筋層浸潤の有無とその程度は予後に関与する最も重要な因子の一つであるといわれている。

本研究は子宮体癌細胞株における浸潤過程に関与する諸因子の解析を目的として行われた。本研究の invasion assay は、癌細胞の浸潤過程を in vitro に再現することにより癌細胞の浸潤能を迅速に評価する実験系として1987年 Albini et al.¹⁾により確立され、現在、癌浸潤の研究において広く用いられている実験系である。Matrigel は細胞外 matrix の主たる構成成分である laminin, type IV collagen, heparan sulfate proteoglycan 等を

含む細胞外 matrix 類似物質であり, in vitro における invasion assay や器官再構築培養に用いられている。

子宮内膜細胞と細胞外 matrix に関する研究では, White et al.⁵⁾や根上⁶⁾が Matrigel 上培養で正常内膜の腺腔形成を誘導することを示し, Boyd et al.⁷⁾は内膜癌細胞ではこのような機能は失われるとしている。細胞外 matrix は癌の浸潤転移の過程で単に物理的 barrier として防御的に働くだけではなく, 細胞間あるいは細胞基質間の接着や分化・形態形成の誘導などの細胞機能に積極的に関与していると思われる。今回の検討では由来組織の分化度の低い株, 腹水由来株, 転移巣由来株に高い浸潤能を認めたが, HEC-108は低分化癌由来にもかかわらず低い浸潤能を示すなどの例外も認められた。本研究ではさらに子宮体癌の浸潤能に関与する因子として以下の因子について検討した。

E-cadherin は分子量120-kD の膜貫通性糖蛋白で Ca^{2+} の存在下に機能する細胞接着分子であるが, 多くの上皮性悪性腫瘍において E-cadherin の機能制御機構の異常が浸潤能獲得の first step であるといわれ⁸⁾, 婦人科悪性腫瘍における重要性も指摘されている⁹⁾。本研究においても子宮体癌細胞の浸潤能は, E-cadherin の発現強度と負の相関関係が認められた。前述の浸潤能の低かった低分化癌由来 HEC-108についても E-cadherin の強い発現を認め, 浸潤能における E-cadherin 発現の重要性が示唆された。さらに浸潤能の低い中等度ないし高分化型腺癌由来の細胞株においては, 細胞外 matrix (Matrigel) の存在により E-cadherin の発現が増強され, 細胞外 matrix が上皮細胞の分化誘導に関与している可能性が示唆された。一方では E-cadherin が発現しているにもかかわらず高浸潤・高転移能を呈する細胞の存在も報告されている¹⁰⁾が, E-cadherin の細胞内における結合分子の発現や機能異常による可能性もあり, 今後 α -catenin などについても検討する必要がある。

原発巣から解離した癌細胞は, 基底膜を破壊することにより間質への移動が可能となる。Bulletti

et al.¹¹⁾は免疫組織学的検討で子宮体癌細胞では正常内膜細胞および増殖症ではみられない collagenase の産生を確認した。また, Takemura et al.¹²⁾は摘出子宮体癌細胞の培養上清から, 72-kD gelatinase の活性型である64-kD gelatinase および92-kD, 220-kD の多様な gelatinase 活性を検出し, 特に92-kD/64-kD gelatinase 比が組織の悪性度に相関することを指摘している。本研究においても in vitro 浸潤能の高い NUE-1, SNG-M, および中等度浸潤性の HEC-1BE において72-kD gelatinase の活性の増強が認められた。特に最も浸潤能の高い細胞株 NUE-1においては92-kD gelatinase (MMP-9) の産生も認められ, 子宮体癌の浸潤における MMP-9産生の重要性が指摘された。

子宮体癌における浸潤能について K-ras codon12における点突然変異との関係について検討したのは著者らが初めてである。K-ras 点突然変異の発生率は10.2~34.5%と報告されているが, 子宮頸癌, 卵巣癌などに比較し高い発生率であるといわれている。Mizuuchi et al.¹³⁾は K-ras codon12における点突然変異陽性例では臨床病期にかかわらず有意に予後不良であることを指摘している。培養細胞株についての発生率は臨床例のものよりも高いといわれているが, 今回用いた細胞株でもその半数に K-ras codon12における点突然変異が認められた。K-ras 点突然変異と in vitro 浸潤能の間には明らかな相関は認められなかったが, K-ras 点突然変異が子宮体癌の悪性化のいかなる過程に関与するかは今後検討を要する課題である。

以上より, 子宮体癌細胞株における浸潤過程においては E-cadherin の発現低下と MMP-2の活性増強, さらに MMP-9の産生が重要な役割を担っていることが示唆された。

文 献

1. Albini A, Iwamoto Y, Kleinman HK, Martin GR, Aaronson SA, Kosloski JM, McEwan RN. A rapid in vitro assay for quantitating the invasive potential of tumor cells. *Cancer Res* 1987; 47: 3239-3245
2. Haussen C, Dowdle EB. Electrophoretic anal-

- ysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. *Anal Biochem* 1980; 102: 196—202
3. *Jiang W, Kahn SM, Guillem JG, Lu SH, Weinstein IB.* Rapid detection of ras oncogenes in human tumors: Application to colon, esophagus, and gastric cancer. *Oncogene* 1989; 4: 923—928
 4. *Liotta LA, Rao CN, Barsky SH.* Tumor invasion and the extracellular matrix. *Lab Invest* 1983; 49: 636—649
 5. *White TE, di Sant'Agnese A, Miller RK.* Human endometrial cells grown on an extracellular matrix form simple columnar epithelia and glands. *In Vitro Cell Dev Biol* 1990; 26: 636—642
 6. 根上 晃. 正常ヒト子宮内膜上皮細胞の in vitro における腺管形成ならびに上皮化過程の形態学的研究. *日産婦誌* 1989; 41: 1983—1990
 7. *Boyd J, Rinehart CJ, Walton LA, Siegal GP, Kaufman DG.* Ultrastructural characterization of two new human endometrial carcinoma cell lines and normal human endometrial epithelial cells cultured on extracellular matrix. *In Vitro Cell Dev Biol* 1990; 26: 701—708
 8. *Sommers CL, Thompson EW, Torri JA, Kemler R, Gelmann EP, Byers SW.* Cell adhesion molecule uvomorulin expression in human breast cancer cell lines: Relationship to morphology and invasive capacities. *Cell Growth Differ* 1991; 2: 365—372
 9. *Inoue M, Ogawa H, Miyata M, Shiozaki H, Tanizawa O.* Expression of E-cadherin in normal, benign, and malignant tissues of female genital organs. *Am J Clin Pathol* 1992; 98: 76—80
 10. *Shimoyama Y, Nagafuchi A, Fujita S, Gotoh M, Takeichi M, Tsukita S, Hirohashi S.* Cadherin dysfunction in a human cancer cell line: Possible involvement of loss of alpha-catenin expression in reduced cell-cell adhesiveness. *Cancer Res* 1992; 52: 5770—5774
 11. *Bulletti C, Jasonni VM, Polli V, Cappuccini F, Galassi A, Flamigni C.* Basement membrane in human endometrium: Possible role of proteolytic enzymes in developing hyperplasia and carcinoma. *Ann NY Acad Sci* 1991; 622: 376—382
 12. *Takemura M, Azuma C, Kimura T, Tokugawa Y, Miki M, Ono M, Saji F.* Malignant cell-specific gelatinase activity in human endometrial carcinoma. *Cancer* 1992; 70: 147—151
 13. *Mizuuchi H, Nasim S, Kudo R, Silverberg SG, Greenhouse S, Garrett CT.* Clinical implications of K-ras mutation in malignant epithelial tumors of endometrium. *Cancer Res* 1992; 42: 184—190

(No. 7481 平6・2・4受付)