

# 皮膚線維芽細胞とガン細胞の細胞間相互作用による マトリックス分解酵素の産生

東京薬科大学

森 陽

The involvement of tumor cell-fibroblast interaction in matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) production was examined. Co-cultures of human skin fibroblasts with human MCF-7 cells of epithelial origin showed increased MMP and TIMP production when compared to cultures of the individual cells. The effect was dependent on the cellular ratio between human skin fibroblasts and MCF-7 cells. The stimulatory factors can be detected in the conditioned medium from MCF-7 cell cultures. The addition of membrane fractions prepared from MCF-7 cells to the fibroblast cultures also stimulated MMP and TIMP production. However, kinds of increased MMPs were different from kinds of MMPs induced by soluble factors released from tumor cells.

These results demonstrated that MCF-7 cells have two forms of stimulatory factor: MMP stimulatory factors that is present at outer surface of MCF-7 cells and MCF-7 cells derived factors that stimulate MMP production of fibroblasts.

## 1. 緒言

皮膚病変や皮膚障害においてサイトカインの関与が報告されているがサイトカインと組織破壊に関連する酵素との関係は必ずしも明確ではない。

著者は皮膚線維芽細胞と表皮細胞など種々の細胞間の相互作用によって皮膚線維芽細胞の産生する細胞外マトリックス分解酵素の変動を調べているうち、皮膚線維芽細胞とガン細胞の相互作用に興味ある現象を見いだした。そこで、細胞外マトリックスの分解に関与する酵素の中で特にマトリックスメタロプロテアーゼ (MMPs) に着目した。

MMPsはその基質特異性の違いから3つのグループに大別される。第1グループは、間質の主要構成成分であるI型コラーゲンを基質とする組織性コラーゲナーゼ (MMP-1) に代表されるものである。第2グループは、基底膜の構成成分であるIV型コラーゲンを分解するMMPであり、これには72kDa.IV型コラーゲナーゼ (MMP-2) および92kDa.IV型コラーゲナーゼ (MMP-9) の2種類が知られている。これら酵素は変性コラーゲンであるゼラチンに対しても強い分解活性を示すことからゼラチナーゼとも呼ばれている。第3のグループは、ストロムライシン (MMP-3) に代表されるもので前者の中間的な基質特異性を有し、プロテオグリカン、ラミニンやフィブロネクチンなども分解する。またMMP-3はproMMP-1やproMMP-9の活性化にも関与していることが知られている。一方、これらMMPs産生細胞から共に産生され1:1のモル比でMMPsを不活化する組織性メタロプロテアーゼインヒビター (TIMP) が知られている。従って今日では局所におけるMMPsとTIMPの量的

Production of matrix degrading enzymes by skin fibroblast-tumor cell interaction



Yo Mori

Tokyo College of Pharmacy

バランスの崩れが細胞外マトリックスの分解を誘起すると考えられている。

以上のことから著者は、正常ヒト乳腺上皮細胞および乳ガン細胞株 MCF-7、および BT-20 細胞を使用し、正常ヒト線維芽細胞との細胞間相互作用の面から MMP および TIMP 産生について検討を加えた。

## 2. 実験材料および実験方法

### 2.1 培養器具および試薬

細胞培養プラスチック器具は Corning 製；Eagle's minimum essential medium (MEM) は Gland Island Biochemical Co. 製；Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> free phosphate-buffered saline (PBS (-)) は日水製薬製；fetal bovine serum (FBS) は M. A. Bio-products 製；alkaline phosphatase-conjugated goat anti-(rabbit IgG) IgG, alkaline phosphatase-conjugated donkey anti-(sheep IgG) IgG, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate, Nitro Blue Tetrazolium は Sigma 製；Sephadex G-75 は Pharmacia 製；gelatin は DIFCO Laboratories Co. 製；human recombinant Transforming Growth Factor (TGF)  $\alpha$  は GIBCO BRL 製；polyclonal goat anti-(human TGF  $\alpha$ ) IgG は R&D Systems Inc. 製；human platelet TGF  $\beta$  1 はキング醸造製をそれぞれ購入し使用した。なお Sheep anti-(human proMMP-1, MMP-3 および TIMP) および Rabbit anti-(human proMMP-2) 抗体は Kansas 大学医学部 Hideaki Nagase 教授より提供を受けた。

その他の試薬は全て特級試薬を使用した。

### 2.2 細胞培養および処理方法

ヒト乳ガン細胞株 MCF-7 細胞および BT-20 細胞は防衛医科大学校 小佐野博史博士より、正常ヒト皮膚線維芽細胞はグレース株式会社中央研

究所 竹沢俊明博士よりそれぞれ提供を受けた。正常ヒト乳腺上皮細胞はクラボウより Mammary Pack Kit を購入し使用した。細胞は 5% CO<sub>2</sub>-95% air 気相下、37°C で 75cm<sup>2</sup> flask を用いて培養し、細胞が confluent になった時点で随時継代した。その際、培養液は線維芽細胞、MCF-7 細胞および BT-20 細胞については 10% (v/v) FBS/MEM を、正常ヒト乳腺上皮細胞は Mammary Pack Kit に付属していた MEGM を使用した。なお全ての実験において線維芽細胞は継代数 12-22 のものを、正常ヒト乳腺上皮細胞は継代数 9-10 のものを使用した。

混合培養は線維芽細胞が confluent になった時点で乳腺上皮細胞、MCF-7 細胞あるいは BT-20 細胞を混合し、10% (v/v) FBS/MEM で 24 h 培養した後、0.2% (w/v) LAH/MEM で洗浄、同培養液に交換した。また MCF-7 細胞培養上清、MCF-7 細胞膜画分による線維芽細胞の処理は、線維芽細胞が confluent になった時点で 0.2% (w/v) LAH/MEM で洗浄後、同培養液中で実施した。それぞれの培養上清は培養処理 48h 後に回収し、-20°C で凍結保存し試料とした。

### 2.3 MCF-7 細胞培養上清の調製

MCF-7 細胞を 75cm<sup>2</sup> flask で培養し、confluent になった時点で 0.2% (w/v) LAH/MEM で洗浄し、同培養液に交換した。48h 後に培養上清を回収、4°C、1,000rpm で 5min 遠心分離し、さらに上清を 45  $\mu$ m のシリンジフィルターにて細胞を完全に除去した。回収した上清はフィルター OM-5 membrane (岩城硝子社製) を用いて限外ろ過をし、100 倍に濃縮したものを -20°C で凍結保存し試料とした。

### 2.4 MCF-7 細胞膜画分の調製

Biswas らの方法<sup>1)</sup>に従って調製し、試料とした。

## 2.5 MMP-3およびゼラチナーゼの活性測定

培養液中の潜在型MMP-3およびゼラチナーゼの活性化は培養液に2mM APMA (50mM Tris-HCl/150mM NaCl/10mM CaCl<sub>2</sub> (pH 7.5) に溶解) を等量添加し、ゼラチナーゼ活性は5min、またMMP-3活性は30min 37°Cでそれぞれインキュベーションして実施した。MMP-3の活性測定は [<sup>3</sup>H] カルボキシメチル化トランスフェリンを基質<sup>2)</sup>とし、10 μlの基質溶液 (3mgトランスフェリン/ml、240,000dpm/mgトランスフェリン) に活性化した酵素液10 μlを加え37°Cで一定時間反応させた後、氷冷した3.3% (w/v) トリクロロ酢酸 (TCA) を200 μl加え、8,000 × gで5min遠心分離し得られた上清100 μlの放射活性を液体シンチレーションカウンターにて測定した。ゼラチナーゼ活性測定はCowston and Barrettの方法<sup>3)</sup>で調製した [<sup>14</sup>C] アセチル化Type Iコラーゲンを60°C、20minインキュベーションしゼラチン化させたものを基質とした。200 μlの基質溶液 (4mgゼラチン/ml、3,000 dpm/mgゼラチン) に活性化した酵素液100 μlを加え37°Cで一定時間反応させた後、60% (w/v) TCAを100 μl加え、8,000 × gで5min遠心分離し得られた上清100 μlの放射活性を液体シンチレーションカウンターにて測定した。なお酵素活性1 unitは上記条件下で1 minに1 μgのゼラチンを分解する酵素量とした。

## 2.6 Western blotting法

細胞培養上清に終濃度3.3%になるようTCAを加え、8,000 × gで5min遠心分離し、得られた沈殿にLaemmliの方法<sup>4)</sup>に従って調整したsample solutionを加え、7.5%から13% (w/v) アクリルアミドゲルを用いてSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) を行った後、ゲルをtransfer buffer (20mM Tris/150mM glycine/20% (v/v) methanol/0.1% (w/v) SDS) に浸したニトロセルロース膜に密着させ、セミドライ型転写装置 (マリソル社

製) を用いて200mAで1h転写させた。転写後ただちにニトロセルロース膜をドライミルク溶液 (10% (w/v) fatty-free dry milk/10mM Tris-HCl/0.9% (w/v) NaCl/0.02% (w/v) NaN<sub>3</sub> (pH 7.5)) に浸し10minのblockingを行い、ついで蒸留水およびTBS buffer (50mM Tris-HCl/200mM NaCl (pH 7.5)) にて数回洗浄した。洗浄後1% (w/v) BSA/PBS (-) で希釈した1次抗体溶液に4°Cで12h以上浸した。1次抗体結合後、blockingおよび洗浄を同様に行い1% (w/v) BSA/PBS (-) で希釈したアルカリフォスファターゼを結合した2次抗体溶液に室温で1h浸した。その後TBS bufferで数回洗浄し、基質溶液 (0.4mM Nitro Blue Tetrazolium/0.4mM 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphateを100mM Tris-HCl/100mM NaCl/5mM MgCl<sub>2</sub> (pH 8.0) に溶解) に浸し適当な時間発色させた。発色後、蒸留水およびTBS bufferですばやく洗浄しstop solution (20mM Tris-HCl/5mM EDTA (pH 8.0)) に適当な時間浸した後、ろ紙にて脱水し乾燥した。

## 2.7 Gelatin zymography

ゼラチン (1.2mg/ml) を含む7.5% (w/v) アクリルアミドゲルを用いて非還元条件下で、Laemmliの方法<sup>4)</sup>に従いSDS-PAGEを行った後、ゲル中からSDSを除去するため2.5% (v/v) Triton X-100を含むbuffer (50mM Tris-HCl/5mM CaCl<sub>2</sub>/1 μM ZnCl<sub>2</sub>/0.02% (w/v) NaN<sub>3</sub> (pH 7.5)) で1h洗浄後、37°Cで適当な時間Triton X-100を含まない上記buffer中でインキュベーションした。その後ゲルを染色液 (0.1% (w/v) Coomassie Brilliant Blue/50% (v/v) methanol/20% (v/v) acetic acid) 中、静かに浸とうしながら10min染色し、その後30% (v/v) methanol/1% (v/v) formic acidにて脱色処理を行った。

### 3. 実験結果

#### 3.1 正常乳腺上皮細胞あるいは乳ガン細胞株 (MCF-7およびBT-20細胞) と正常線維芽細胞との混合培養における MMPs および TIMP 産生の検討

正常乳腺上皮細胞あるいは2種の乳ガン細胞株 (MCF-7およびBT-20細胞) と正常線維芽細胞との混合培養における MMP および TIMP 産生をウエスタンブロット法により検討した。Fig.1に示したように線維芽細胞単独のみでも proMMP-1 [A]、proMMP-3 [B] および TIMP [C] 産生を認めた (lane 1) が、MCF-7細胞と混合培養することにより、それぞれ10倍、4.2倍、1.8倍増加した (lane 3)。しかしながら、正常乳腺上皮細胞 (lane 2) あるいはBT-20細胞 (lane 4) との混合培養ではTIMP産生はMCF-7細胞との混合培養時とほぼ同様であるが (それぞれ1.56倍および1.6倍) proMMP-1 および proMMP-3産生には顕著な変化は認められなかった。また正常乳腺上皮細胞、MCF-7細胞およびBT-20細胞それぞれ単独 (lanes 5-7) ではこれらの産生はいずれも認められなかった。

次に、proMMP-2産生についてもウエスタンブロット法およびゼラチンザイモグラフィにより検討した (Fig.2)。正常乳腺上皮細胞と線維芽細胞との混合培養 (lane 2) では、線維芽細胞単独 (lane 1) と比べ変化を認めなかった。しかしMCF-7細胞 (lane 3)、あるいはBT-20細胞 (lane 4) と線維芽細胞との混合培養ではproMMP-2産生はそれぞれ2.94倍および3.15倍の増加が認められた。また正常乳腺上皮細胞、MCF-7細胞、BT-20細胞それぞれ単独 (lanes 5-7) では、proMMP-2産生はいずれも認められなかった (Fig.1-2)。

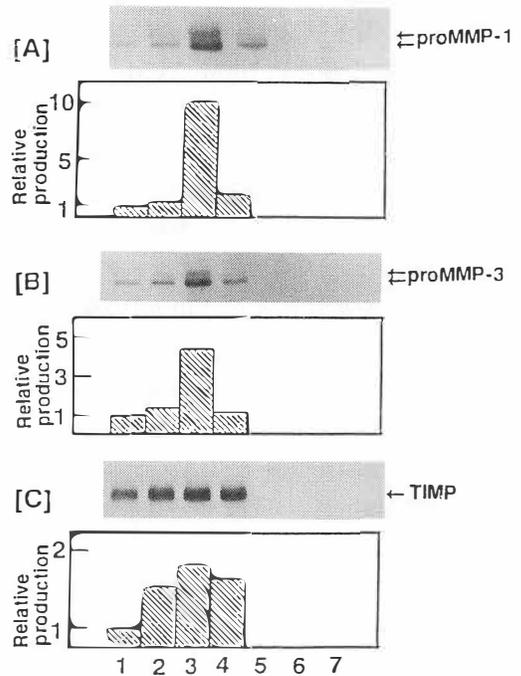


Fig.1 Production of MMPs and TIMP by human skin fibroblasts cocultured with normal or neoplastic breast cells. Confluent fibroblasts at the 18th passage were cocultured with normal or neoplastic breast cells in 10% (w/v) FBS/MEM for 24h, and then the medium was changed to 0.2% (w/v) LAH/MEM and incubated further for 48h. The harvested medium was performed to western blot with antibodies against proMMP-1 [A], proMMP-3 [B], or TIMP [C] as described in the methods. Lane 1, human skin fibroblast (HSF); lane 2, coculture of HSF and normal human mammary epithelial cells (HMEC); lane 3, coculture of HSF and MCF-7 cells; lane 4, coculture of HSF and BT-20 cells; lane 5, HMEC; lane 6, MCF-7 cells and lane 7, BT-20 cells.

#### 3.2 MCF-7細胞と正常線維芽細胞との混合培養による MMPs および TIMP 産生におよぼす MCF-7細胞数の影響

MCF-7細胞と線維芽細胞との混合培養における MMPs および TIMP 産生におよぼす MCF-7細胞の細胞数の影響を検討した。Fig.3に示され

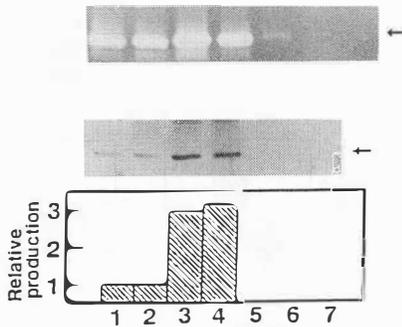


Fig.2 Production of proMMP-2 by HSF cocultured with normal or neoplastic breast cells. The conditioned medium in Fig.1 was performed to gelatin zymography or western blot with antibody against proMMP-2 as described in the methods. Lane 1, HSF ; lane 2, coculture of HSF and HMEC ; lane 3, coculture of HSF and MCF-7 cells ; lane 4, coculture of HSF and BT-20 cells ; lane 5, HMEC ; lane 6, MCF-7 cells and lane 7, BT-20 cells.

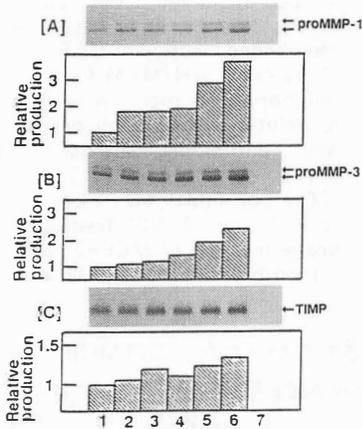


Fig.3 Production of MMPs and TIMP in coculture of HSF and MCF-7 cells. Confluent HSFs at the 17th passage were cocultured with various cell number of MCF-7 cells in 10% (w/v) FBS/MEM for 24h, and then the medium was changed to 0.2% (w/v) LAH/MEM and incubated for 48h. The harvested medium was performed to western blot with antibodies against proMMP-1 [A], proMMP-3 [B], or TIMP [C] as described in the methods. Lane 1, HSF ; lanes 2-6, HSF cocultured with MCF-7 cells (ratios of cell number of HSF : MCF-7 ; 32 : 1, 16 : 1, 8 : 1, 4 : 1 and 2 : 1, respectively) and lane 7, MCF-7 cells.

たように、線維芽細胞のみ (lane 1) と比較し、MCF-7細胞の細胞数を段階的に増やしながら混合培養する (lanes 2-6) と、MCF-7細胞の細胞数の増加に従って proMMP-1 [A]、proMMP-3 [B] および TIMP [C] 産生の増加が認められ、線維芽細胞と MCF-7細胞の細胞数比が 2 : 1 (lane 6) のときは増加率がそれぞれ 3.7 倍、2.4 倍および 1.3 倍であった。しかしながら MCF-7細胞のみ (lane 7) では、これらの産生はいずれも認められなかった (Fig.3-4)。

次に、proMMP-2産生についても同様検討した。Fig.4に示したように、混合培養における MCF-7細胞数が増えるに従って proMMP-2産生は増加し (lanes 2-6)、線維芽細胞と MCF-7細胞の細胞数比が 2 : 1 (lane 6) のとき 4.3 倍まで増加した。しかし MCF-7細胞のみ (lane 7) では、proMMP-2産生は全く認められなかった。

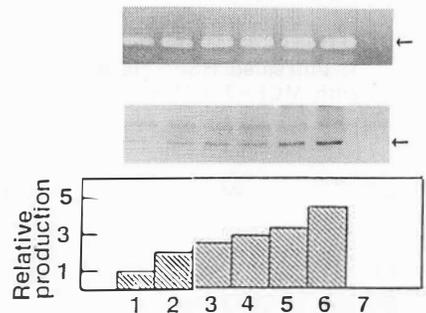


Fig.4 Production of proMMP-2 in coculture of HSF and MCF-7 cells. The conditioned medium in Fig. 3 was performed to gelatin zymography or western blot with antibody against proMMP-2 as described in the methods. Lane 1, HSF ; lanes 2-6, HSF cocultured with MCF-7 cells (ratios of cell number of HSF : MCF-7 ; 32 : 1, 16 : 1, 8 : 1, 4 : 1 and 2 : 1, respectively) and lane 7, MCF-7 cells.

### 3.3 線維芽細胞の MMPs および TIMP 産生におよぼす MCF-7細胞の培養上清の影響

Fig.5に示したように MCF-7細胞培養上清中

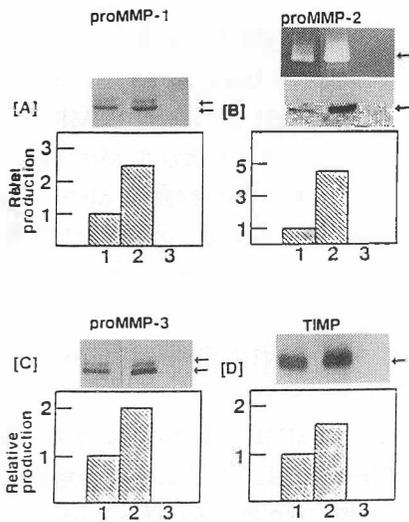


Fig.5 Effect of MCF-7 conditioned medium (MCF-7-CM) on the production of MMPs and TIMP by HSF. Confluent HSFs at the 18th passage were treated with MCF-7-CM in 0.2% (w/v) LAH/MEM for 48h, and then the harvested medium was performed to gelatin zymography or western blot with antibodies against proMMP-1 [A], proMMP-2 [B], proMMP-3 [C], or TIMP [D] as described in the methods. Lane 1, untreated HSF; lane 2, HSF treated with MCF-7-CM and lane 3, MCF-7-CM.

(lane 3) には proMMP-1 [A]、proMMP-2 [B]、proMMP-3 [C] および TIMP [D] のいずれも検出されなかったが、この培養上清を線維芽細胞に添加し培養する (lane 2) と、混合培養したときと同様 proMMP-1、proMMP-2、proMMP-3 および TIMP 産生の顕著な増加が認められた。

### 3.4 線維芽細胞の MMPs および TIMP 産生におよぼす MCF-7 細胞膜の影響

MCF-7 細胞の細胞膜画分を線維芽細胞に添加したときの MMPs および TIMP 産生を検討した (Fig.6)。MCF-7 細胞膜画分 (lane 3) には proMMP-1 [A]、proMMP-2 [B]、proMMP-3 [C] および TIMP [D] どれ

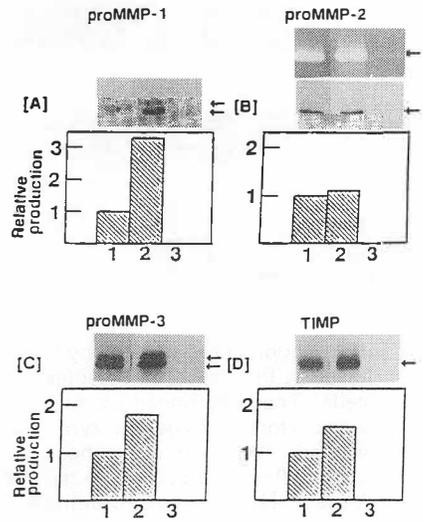


Fig.6 Effect of plasma membrane of MCF-7 cells on the production of MMPs and TIMP by HSF. A high-speed membrane ( $100,000 \times g$ ) fraction was prepared from sonicated MCF-7 cells as described in the methods. Confluent HSFs at the 19th passage were treated with membrane fraction of MCF-7 cells in 0.2% (w/v) LAH/MEM for 48h, and then the harvested medium was performed to gelatin zymography or western blot with antibodies against proMMP-1 [A], proMMP-2 [B], proMMP-3 [C], or TIMP [D], Lane 1, untreated HSF; lane 2, HSF treated with membrane fraction of MCF-7 cells and lane 3, membrane fraction of MCF-7 cells.

も検出されなかったが、この MCF-7 細胞の細胞膜画分を線維芽細胞に添加することにより proMMP-1、proMMP-3 および TIMP 産生が促進した (lane 2)。しかしながら proMMP-2 産生には変化が認められなかった ([B] lane 2)。

### 3.5 線維芽細胞のゼラチナーゼ活性におよぼす MCF-7 細胞培養上清の影響

これまで MCF-7 細胞培養上清により線維芽細胞の MMPs 産生が促進することが明らかとなったが、同時にこれらの阻害活性を有する TIMP 産生も促進することが示された。そこで実際の活性発現におよぼす影響について検討した。Fig.7

に示したようにMCF-7細胞培養上清にはゼラチナーゼ活性はほとんどないが、MCF-7細胞培養上清を線維芽細胞に添加することにより、ゼラチナーゼ活性は、3-5倍に有意に増加した。

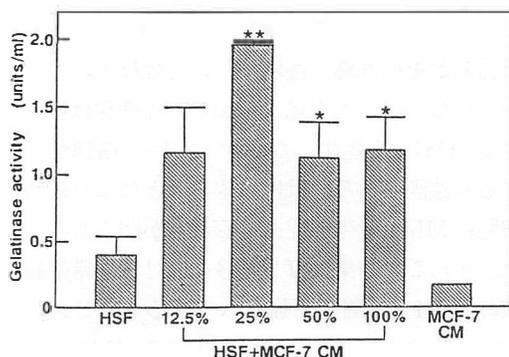


Fig.7 Effect of MCF-7-CM on the gelatinase activity produced by HSF. Confluent HSFs at the 12th passage were treated with MCF-7-CM (12.5%, 25%, 50%, and 100%, respectively) in 0.2% (w/v) LAH/MEM for 48h. The harvested medium was performed to assay for gelatinase activity as described in the methods. Results are presented as the mean  $\pm$  SD of 3 wells. \* and \*\*, significantly different from untreated HSF ( $p < 0.05$  and  $p < 0.01$ , respectively).

### 3.6 線維芽細胞の増殖におよぼすMCF-7細胞培養上清の影響

線維芽細胞の増殖におよぼすMCF-7細胞培養上清の影響を検討した。Table.1に示したようにMCF-7細胞培養上清は線維芽細胞の増殖を無血清および5%血清存在下ともに有意に増加させた。

## 4. 考察

今回、正常乳腺上皮細胞と2種の乳ガン細胞株を用い正常線維芽細胞との混合培養によるMMPs産生を検討した。MCF-7細胞との混合培養ではproMMP-1、proMMP-2およびproMMP-3産生が著しく増加した。BT-20細胞においてはproMMP-2産生は増加したが他のMMP産生ではあまり変化が認められなかった。

Table 1. Effect of MCF-7-CM on the growth of HSF in growth phase.

Treatment	Cell number ( $\times 10^{-4}$ cells/well)	
	Serum concentration (%, v/v) <sub>0</sub>	Serum concentration (%, v/v) <sub>5</sub>
Control	3.81 $\pm$ 0.17	5.85 $\pm$ 0.44
MCF-7-CM (100%)	4.90 $\pm$ 0.66 **	6.50 $\pm$ 0.43 *

HSFs at the 19th passage ( $3 \times 10^4$  cells/well) were incubated in 12 multiwellplate for 2 h, and then medium was changed to MEM or 5% (v/v) FBS/MEM containing condensed MCF-7-CM corresponding to 100% (v/v) original CM. After 48 h cultivation, cell number of HSF was counted. The data are expressed as the mean values  $\pm$  SD of 6 wells. \* and \*\*, significantly different from control ( $p < 0.05$  and  $p < 0.01$ , respectively).

一方、正常乳腺上皮細胞との混合培養ではMMP産生はほとんど影響がなかった。また正常乳腺上皮細胞や乳ガン細胞株自体にはこれらのMMP産生能は認められなかった。このことから混合培養によるMMP産生の増加は正常乳腺上皮細胞では見られず、乳ガン細胞株にのみ認められるが、細胞株によっても異なることも明らかとなった。さらにMCF-7細胞と線維芽細胞の混合培養の細胞数比を変化させたところ、MCF-7細胞の細胞数に依存してMMPs産生が増加した。混合培養において免疫蛍光法によりproMMP-1、-2および-3の産生細胞を検討したところ、proMMP-1および-3の増加は線維芽細胞の産生能の促進の結果であることが明らかとなった。(未発表データ)

この線維芽細胞<sup>5-6)</sup>のMMPs産生を促進させる因子としてMCF-7細胞から産生される液性因子によるものと、MCF-7細胞と線維芽細胞が接着することによる場合<sup>7)</sup>が考えられる。

MCF-7細胞の培養上清を線維芽細胞に添加したところ、混合培養の時と同様proMMP-1、proMMP-2、proMMP-3およびTIMP産生が促進したのに対し、MCF-7細胞の細胞膜画分添加ではproMMP-1、proMMP-3およびTIMP産生は促進するもののproMMP-2産生には変化が認められなかった。従ってMCF-7細胞の産生するMMP産生促進因子は細胞膜と液性因子とで異なることが示唆された。

一方、MMPsは、通常はこれらの産生細胞が

同時に産生すると理解されている。組織性メタロプロテアーゼインヒビター (TIMP) と 1:1 のモル比で複合体を形成することにより不活化される。proMMP-2 および proMMP-3 はそれぞれ TIMP-2 と TIMP-1 と特異的に結合し活性化を阻害する。従って局所での MMPs と TIMP との量的バランスが MMP 活性発現に重要であるとされている。

Schultz ら<sup>8)</sup> は、rTIMP-1 は腹腔内投与によりマウス B16 メラノーマの肺転移を抑制すること、Kohkha ら<sup>9)</sup> は、TIMP-1 のアンチセンス cDNA を正常マウス 3T3 細胞に発現させて TIMP-1 の産生を抑制すると浸潤性と転移能を獲得した細胞が得られることを、逆に Declerck ら<sup>10)</sup> は TIMP-2 の cDNA を導入発現させることにより転移能が低下することを報告している。これらの事実は TIMP が転移抑制遺伝子産物のひとつであることを示すと共に、MMP と TIMP 産生の量的不均衡が転移性浸潤を誘起する要因になっている可能性を示唆している。

今回線維芽細胞のゼラチナーゼ活性におよぼす MCF-7 細胞培養上清の影響を検討したところ、線維芽細胞のゼラチナーゼ活性の有意な増加を認めた。従って MCF-7 細胞の培養上清を線維芽細胞に添加することにより線維芽細胞の MMP および TIMP 産生は共に増加するが、全体として MMP 産生が TIMP に対し優位であることが明らかとなり MCF-7 細胞と正常細胞との相互作用による MMPs の増加が転移浸潤に強く関与していることが示唆された。

一方、MCF-7 細胞培養上清添加により線維芽細胞の増殖は有意に促進されることが明らかとなり、このことから線維芽細胞の MMP 産生を促進するのは MCF-7 細胞培養上清中の増殖因子である可能性が示唆された。また MCF-7 細胞培養上清をゲルろ過にて分離した場合、ゼラチナーゼおよび proMMP-3 産生促進活性は異なることが示され、また先の線維芽細胞に MCF-7 細胞培養上清あるいは細胞膜画分を添加したときの MMP 産

生促進作用の結果と併せて、線維芽細胞の MMP 産生を促進させる因子は増殖因子を含めて複数存在することが示唆された。

以上、乳ガン細胞株 MCF-7 細胞と正常線維芽細胞との細胞間相互作用について検討した。in vivo での MCF-7 細胞の転移能を検討した報告はあるがその詳細な機構についてはほとんど明らかではないが、本実験から MCF-7 細胞は自らは全く MMPs を産生しないが MCF-7 細胞が産生する液性因子あるいは接着することにより線維芽細胞は MMP 産生を促進することが明らかとなった。またこの結果はガン転移における正常細胞由来の MMPs の関与を強く示唆するものである。しかも今日までガン細胞の産生する MMP 産生促進活性が液性因子および接着の二通りで行われる例は MCF-7 細胞が最初であり、またこの MMP 産生を促進させる因子は、複数存在することが示唆された。しかしこれらの因子については同定するまでには至らず、さらに検討が必要であると考えられる。

## 引用文献

- 1) Biswas, C. and Nugent, M. A. (1987) J. Cell. Biochem., 35, 247-258
- 2) Vater, C. A., Nagase, H. and Harris, E. D. Jr. (1986) Biochem. J., 237, 853-858
- 3) Cawston, T. E. and Barrett, A. J. (1979) Anal. Biochem. 99, 340-345
- 4) Laemmli, U. K. (1970) Nature (London), 227, 680-685
- 5) Nakajima, M., Chop, A. M. (1991) Semin. Cancer Biol., 2, 115-127
- 6) Pyke, C., Ralfkiaer, E., Huhtala, P., Hurskainen, T., Dano, K. and Tryggrason, K. (1992) Cancer Res., 52, 1336-1341
- 7) Nabeshima, K., Lane, W. S. and Biswas, C., (1991) Arch. Biochem. Biophys., 285, 90-96
- 8) Shultz, R. M., Silberman, S., Persky, B., Bajkowski, A.S. and Carmichael, D.F. (1988)

Cancer Res., 48, 5539-5545

M. (1992) Cancer Res., 52, 701-708

- 9) Kohka, R., Waterhouse, P., Yagel, S., Lala, P. K., Overall, C. M., Norton, G. and Denhardt, D. T. (1989) Science, 243, 947-950
- 10) Declerck, Y. A., Perez, N., Shimada, H., Boone, T. C., Langley, K. E. and Taylor, S.

(本研究の一部は第65回日本生化学大会(1992)において中島、伊東、森によって発表された。)