

ヒト癌細胞培養株による血小板凝集に関する研究

茂木良弘

札幌医科大学内科学第4講座 (主任 漆崎一朗 教授)

Studies on Platelet Aggregation Induced by Human Cultured Carcinoma Cell Lines

Yoshihiro MOKI

*Department of Internal Medicine (Section 4), Sapporo Medical College
(Chief : Prof. I. Urushizaki)*

In recent years, accumulating evidence has appeared suggestive of the fact that platelets are deeply involved in the lodging of tumor cells during the process of blood-borne metastases. One of the most significant observations inferring a role for platelets in the development of metastases is that the ability of certain tumor cells to form metastases is related to their ability to promote aggregation of host platelets.

However, the mechanism of this platelet aggregation and the properties of the platelet aggregating materials of tumor cells have not been well elucidated. With regards to human cell lines in particular, no investigations have yet been made; most previously reported data having been based on animal experiments.

Thus, in the present paper, attempts were made to clarify the mechanism of platelet aggregation and to characterize the platelet aggregating material employing established human cancer cell lines. The following results were obtained:

- 1) Eleven out of the nineteen human cancer cell lines investigated showed platelet aggregating activity, with the aggregation being particularly evident in M 7609 (colon cancer), HMV-1 (melanoma), PC-10 (lung cancer) and HeLa (uterine cancer).
- 2) The platelet aggregation pattern induced by these tumor cells was that of typical secondary aggregation with irreversibility.
- 3) The degree of platelet aggregation by HMV-1 tumor cells increased as the cell count increased and reached a plateau at a cell count above $5 \times 10^5 / \text{ml PRP}$. The lag time of aggregation, on the other hand, decreased as the tumor cell count increased. The degree of aggregation also increased as the platelet count increased.
- 4) The existence of divalent cation was required for the platelet aggregation induced by HMV-1 tumor cells.
- 5) The platelet aggregations induced by tumor cells (HMV-1, PC-10, 3LL) were not suppressed by specific thrombin inhibitor (MD-805).
- 6) The platelet aggregating activities of tumor cells (HMV-1, M 7609) were diminished by treatments with trypsin but not with collagenase or neuraminidase. Aggregating activity was preserved with a preparation of membrane from these tumor cells, although it was abolished by heating

Abbreviations:

FCS	: Fetal calf serum	PPP	: Platelet-poor plasma
PBS	: Phosphate buffered saline	PMSF	: Phenylmethylsulfonyl fluoride
PRP	: Platelet-rich plasma	SDS PAGE	: Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide slab gel electrophoresis

(100°C 15 min) or sonication.

7) HGC-25 cells which did not possess aggregating activity attained the ability to aggregate the platelet by fusing with cell membrane from HMV-1 (platelet aggregating cell).

8) By SDS PAGE (autoradiography), membrane proteins with MW of 20,000 daltons which specifically bound to platelets were commonly found in cells with platelet aggregating activity (HMV-1, M 7609), but were absent in platelet non-aggregating cells (HGC-25).

It was, therefore, concluded that platelet aggregation induced by human tumor cells does not require the coexistence of thrombin, but is evoked by direct interaction of platelets with aggregating proteins (MW 20,000 daltons) on the cell membrane.

(Received January 17, 1983 and accepted March 22, 1983)

Key words: Metastasis, Human tumor cell line, Platelet bound membrane protein, Platelet aggregation, Cell fusion

1 緒 言

癌の転移は癌細胞の原発巣からの遊離に始まり、血管またはリンパ管への侵入、転移巣での定着、増殖という一連の過程を経てはじめて成立する¹⁾。その間、癌細胞はさまざまな生体側因子と邂逅し、相互作用を営みながらある時は排除され、またある場合にはむしろ転移に有利な条件を獲得する²⁾。

血行性転移においては、各種免疫担当細胞、血小板、凝固線溶系などの血液成分が癌細胞に作用する生体側の主要な因子として知られているが、中でも血小板は腫瘍血栓形成すなわち微小転移形成の第1段階に関与するものとして古くからその重要性が認識されていた^{3,4)}。

Gasic *et al.*⁵⁾は血小板減少症のマウスに腹水癌細胞を静注したところ、肺転移が有意に減少していることを見出し、逆に血小板を輸注することにより肺転移が増すことを明らかにした。加えて彼らは、*in vitro*において腫瘍細胞が血小板を凝集させることを認め、腫瘍の血小板凝集能が*in vivo*での転移能と平行することを明示した⁶⁾。同様な報告はその後、Pealstein *et al.*⁷⁾、Hara *et al.*⁸⁾により重ねられ、さらに最近ではGasper⁹⁾、Honn *et al.*¹⁰⁾により各種抗血小板剤の実験的転移抑制効果が報告されている。

しかし一方、腫瘍細胞自身の有する凝集物質の本態や、凝集作用の機序についてはこれまで十分な検討がなされておらず、不明な点が少なくない。ことに凝集物質については、それを抽出もしくは同定した報告がまったくなく、凝集の惹起が腫瘍と血小板との直接結合によるのか、あるいは共存する血漿成分(トロンビンなど)を介するものかなど解明すべき問題が残されている。本研究ではこれまで検討されたことのないヒ

ト癌細胞培養株を用いて、血小板凝集作用の特性と凝集物質の分析をおこない知見を得たので報告する。

2 実験材料および方法

2.1 各種腫瘍細胞培養株とその培養

研究対象として用いた19種のヒト癌細胞培養株とChang liver cellおよびマウス癌細胞培養株1種をTable 1に示した。それらの由来する組織は、PC-1, PC-9, PC-10, PC-15, K7610がいずれもヒト肺癌、M 7609, S 7512, RPMI 4788はヒト結腸癌、KATO-III, OKAJIMA, MKN-7, MKN-28はヒト胃癌、KPK-13はヒト腎癌、HMV-1はヒト黒色腫、IMRはヒト神経芽細胞腫、RajiはBurkittリンパ腫、K 562はヒト慢性骨髄性白血病細胞、HGC-25はヒト肝癌、3LLはマウス肺癌、およびChang Liver cellはヒト肝細胞由来培養株である。このうちKATO-IIIとK562を除くすべての細胞に培養フラスコに対する付着性を有していた。これらはすべてTable 1に示した諸施設より恵予を受け、当研究室で継代したものである。

培養は、培養液として10%牛胎児血清(FCS, GIBCO, 56°C30分間非働化後使用)ペニシリン100 unit/ml, ストレプトマイシン100 mg/mlを含むRPMI 1640を用い、組織培養フラスコ(Falcon社, 3013, 25 cm²)中で、37°C5%CO₂の条件下でおこなった。培養液は最低3~5日に1回交換し、細胞の生存率は随時trypan blue dye exclusion法により光学顕微鏡下で確認した。

2.2 培養腫瘍細胞膜片の作製

培養腫瘍細胞膜片の作製の概要をFig. 1に示した。すなわち培養フラスコ中で十分に増殖した細胞を、培養上清を除去したのち、付着細胞の場合にはラバーポ

Table 1 Platelet aggregating activity of various human tumor cell lines.

Tumor	Origin	Histology	Cell	Platelet aggregation	
				Lag (min)	%
M 7609 ^{a)}	colon	poorly diff. adenoca.	4.8×10^5	1.5	57
S 7512 ^{a)}	rectum	carinoma simplex	1.2×10^6	—	0
K 7610 ^{a)}	lung	adenoca.	4.0×10^5	1.0	27
PC-1 ^{c)}	lung	squamous cell ca.	2.0×10^5	2.0	13
PC-9 ^{b)}	lung	well diff. adenoca.	1.0×10^6	—	0
PC-10 ^{c)}	lung	squamous cell ca.	2.0×10^5	2.0	50
PC-15 ^{c)}	lung	ca.	1.0×10^6	—	0
KATO-III ^{b)}	stomach	signet ring cell ca.	2.2×10^6	—	0
OKAJIMA ^{b)}	stomach	poorly diff. adenoca.	4.0×10^5	0.7	5
MKN-7 ^{b)}	stomach	well diff. adenoca.	1.6×10^5	—	0
MKN-28 ^{b)}	stomach	well diff. adenoca.	4.0×10^6	0.5	14
KPK-13 ^{b)}	kidney	renal cell ca.	4.2×10^5	—	0
HMV-1 ^{d)}		melanoma	1.0×10^5	2.0	55
RPMI 4788 ^{e)}	colon	adenoca.	5.0×10^5	2.5	32
IMR ^{d)}	nerve	neuroblastoma	3.0×10^5	1.5	35
Raji ^{f)}		Burkitt lymphoma	3.5×10^5	4.0	28
K 562 ^{c)}		CML (blast)	5.0×10^5	1.0	20
HGC-25 ^{e)}	pancreas	poorly diff. adenoca.	2.0×10^5	—	0
HeLa ^{g)}	uterus	ca.	2.9×10^5	3.5	50
CLC ^{f)}	liver	Chang liver cell	3.8×10^6	—	0
3LL ^{h)}	lung	Lewis lung ca.	2.4×10^5	2.0	30

Cells were kindly provided by

- a) Dr. S. Machida. Dept. Surg., Hirosaki University
- b) Dr. K. Tanaka. Dept. Path., Kyushu University
- c) The Mochida. Pharmaceutical Co., Institute
- d) Dr. K. Kikuchi. Dept. Path., Sapporo Medical College
- e) The Fujisawa Pharmaceutical Co., Central Institute
- f) The Dainippon Pharmaceutical Co., Tissue Culture Center
- g) Dr. K. Fujinaga. Dept. Can. Res. Inst., Sapporo Medical College
- h) The Daiichi Pharmaceutical Co., Institute

リースマンを用いて剥離し、また浮遊細胞の場合にはそのまま phosphate buffered saline (PBS, pH7.4) で3回洗浄後、 1×10^8 /ml に調整した。次いで 1×10^8 個の細胞を低張液 0.5 mM ZnCl₂ 5 ml に浮遊し、Dounce homogenizer で50回のピストン運動により細胞を破壊し、1000×g, 15秒遠心した。ペレットに0.5 mM ZnCl₂ 5 ml を加え、再度 Dounce homogenizer で100回のピストン運動をおこない、1000×g, 15秒遠心して得た上清を、先の遠心で得られた上清とともに再度 1000×g 15秒遠心した。この上清をさらに 2100×g 10分遠心して得たペレットを細胞膜片として用いた。

2.3 血小板凝集能の測定

ヘパリン 10 unit/ml を加えた正常人血液を室温で 160×g, 10分間遠心してその上清を Platelet-rich plasma (PRP) とし PRP を採った残りの血液をさらに 2000×g, 10分間遠心した上清を platelet-poor plasma (PPP) とした。PRP は血小板数を $3 \sim 4 \times 10^4$ /mm³ となるように PPP で調整した。

各種腫瘍細胞の血小板凝集能は、血小板凝集計 NKK HEMATRACER 1 (二光バイエンス社) により測定した。その方法は、まずヘパリン加 PRP と PPP を 0.2 ml/ずつキューベットにとり、0% と 100% 透過度の位

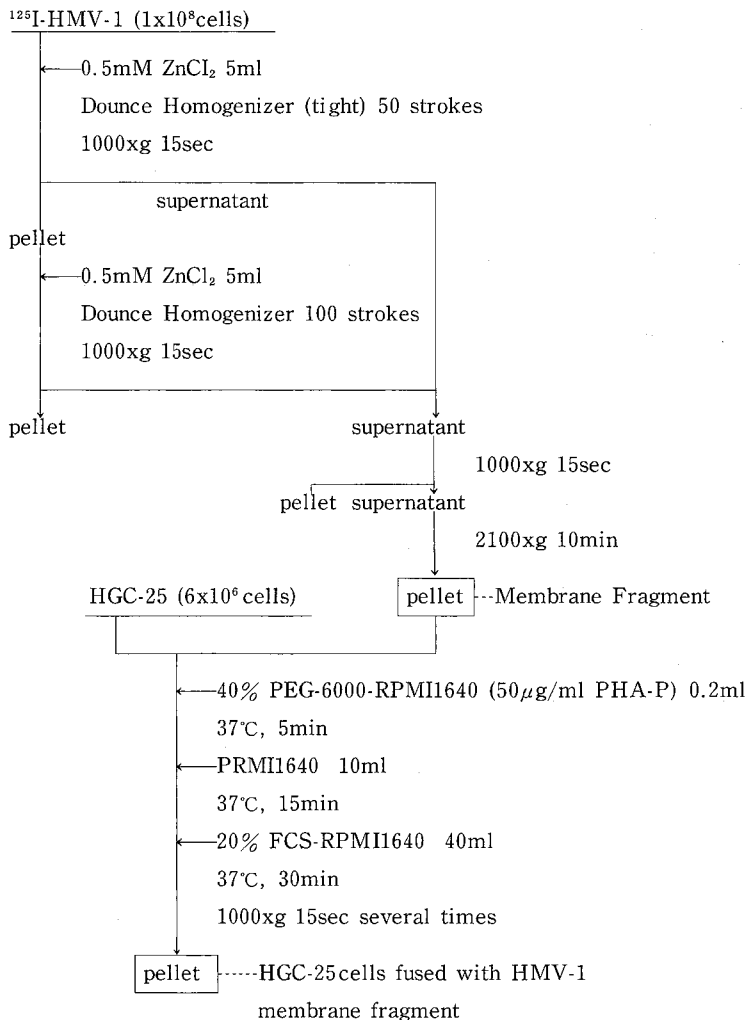


Fig. 1 Scheme of the methodological steps for the fusion of membrane fragments from HMV-1 cells with HGC-25 cells.

置を設定したのち、PRPを37°Cで5分間加温し、小さくはん子を入れて回転させながら、腫瘍細胞浮遊液0.01~0.02 mlを加えて、血小板凝集曲線を記録した。凝集率はPRP、PPPの透光度の幅をA、凝集曲線の振幅をBとすると、 $B/A \times 100(\%)$ で表わした。血小板凝集能の測定は採血後4時間以内に終了した。

腫瘍細胞 HMV-1 による血小板凝集作用に対する2価イオンの影響は、0.38%クエン酸ナトリウムを含むPRPに5 mM および10 mMの CaCl_2 あるいは10 mM および20 mMの MgCl_2 を加えて1分間インキュベート後、HMV-1細胞 $1 \times 10^5/10 \mu\text{l}$ を加えて血小板凝集能

を測定することにより検討した。

腫瘍細胞の血小板凝集作用に対するトロンビンの関与は、トロンビンの特異的阻害剤であるMD-805(三菱化成)を $5 \times 10^{-6}\text{M}$ 、 $1 \times 10^{-4}\text{M}$ 、 $2 \times 10^{-4}\text{M}$ の各濃度でヘパリン加PRPに加え、これに腫瘍細胞 HMV-1、PC-10、3LLをそれぞれ $4 \times 10^5/10 \mu\text{l}$ 、 $2 \times 10^5/10 \mu\text{l}$ 、 $2.4 \times 10^5/10 \mu\text{l}$ 加えて血小板凝集能を測定し検討した。対照として、MD-805を $5 \times 10^{-6}\text{M}$ 、 $5 \times 10^{-6}\text{M}$ の濃度でヘパリン加PRPに添加し、これにトロンビン20 unit/mlを加えて血小板凝集能を測定した。

2.4 培養腫瘍細胞のトリプシン、コラゲナーゼ、ノイラミニダーゼ処理

HMV-1 および M7609 細胞浮遊液 $2 \times 10^5/10 \mu\text{l}$ をトリプシン (DIFCO 社) 1 mg/ml と pH 8.5 で 37°C 、60 分間またはコラゲナーゼ (EC 3. 4. 24. 3, specific activity 1415 unit/mg protein; purified from *Clostridium histoliticum* Type VII, Sigma 社) 1400 unit/ml と pH 7.0 で 37°C 、24 時間、またはノイラミニダーゼ (specific activity, 0.85 unit/mg protein; purified from *Clostridium perfringens* Type V, Sigma 社) 50 unit/ml と pH 5.0 で 37°C 、2 時間それぞれインキュベートした後、PBS で充分洗浄して反応を停止した。

2.5 腫瘍細胞膜片の加熱ならびに超音波処理

2.2 の方法によって作製した HMV-1 および M 7609 の細胞膜片それぞれ $920 \mu\text{g/ml}$ 、 $240 \mu\text{g/ml}$ を小ガラス試験管にとり (約 1 ml) 水浴中にて 100°C 15 分、または 56°C 30 分の加熱処理をおこなった。また同試料を Falcon tube (Falcon 社, 2063) にとり SONIKATOR MODEL W 225 R (和研薬) で 30 ワット、1 分間超音波処理した。

2.6 ^{125}I による細胞膜蛋白の標識

Hubbard and Cohn¹¹⁾の方法にしたがい H_2O_2 の存在下で lactoperoxidase による細胞表面蛋白の ^{125}I 標識をおこなった。対象とした細胞は、血小板凝集能を有する HMV-1, M 7609 と血小板凝集能を認めない HGC-25 である。方法の概略は Fig. 2 に示したが、まず HMV-1, M 7609 および HGC-25 細胞 2.4×10^6 個を 5 mM の glucose を含む PBS 2 ml に浮遊させ、lactoperoxidase (Sigma 社) $20 \mu\text{g/ml}$ と glucose oxidase (Sigma 社) 0.1 unit/ml を添加し、さらに Na^{125}I (第一ラジオアイソトープ研究所) 1 mCi を加えて混和し、室温で 10 分間インキュベートした。次いでこれらの細胞を 2 mM の phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) (Sigma 社) を含んだ PBI (NaI 20.5 g , KCl 0.2 g , $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{ H}_2\text{O}$ 2.9 g , KH_2PO_4 0.2 g , H_2O 1000 ml) で 3 回洗浄し、標識反応を停止した。

2.7 細胞膜片融合法

血小板凝集能を有する HMV-1 細胞の膜片を Poste and Nicolson¹²⁾の方法にしたがい、血小板非凝集性の HGC-25 細胞に融合した (Fig 1)。まず ^{125}I で標識した 1×10^6 個の HMV-1 細胞を常法にしたがって細胞膜片とし、HGC-25 細胞 6×10^6 個とともに 40% ポリエチレングリコール (#6000, キンダ化学) と PHA-P (DIFCO

社) $50 \mu\text{g/ml}$ を含んだ RPMI-1640 medium 0.2 ml に浮遊させ、マイクロビペットで十分混和した後、 37°C 、5% CO_2 インキュベーター内に 5 分間静置した。これに 37°C に加温した RPMI 1640 をビペットで 1 滴ずつ計 10 ml を加え、 37°C 、5% CO_2 インキュベーター内に 15 分間静置した。次に 37°C に加温した 20% FCS を含んだ RPMI 1640 40 ml を加え、再び 37°C 5% CO_2 インキュベーター内に 30 分間静置した。最後に RPMI 1640 40 ml で $1000 \times \text{g}$ 、15 秒遠心を数回くり返し、ペレットを 5 ml の RPMI 1640 に浮遊して膜片を融合した細胞を得た。

2.8 ^{125}I 標識膜成分の可溶化とその血小板への吸着

まず ^{125}I 標識した細胞 (HMV-1, M7609, HGC-25) を 1% Triton X-100 と 2 mM の RMSF を含む PBS 2 ml に浮遊させ、SONIKATOR MODEL W 225 R で 40 ワット、15 分間超音波破碎した。この溶液を $100,000 \times \text{g}$ 、90 分間遠心し、上清に Bio-Beads SM-2 (20-50 mesh, Bio Rad) 3.3 g を加え、 4°C で 12 時間かくはんして Triton X-100 を吸着除去した。上清を 1 ml マイクロシリンジ ($26 \text{ G} \times 1/2$, $0.45 \times 13 \text{ mm}$, TERUMO) にとり、これを PBS で透析した後、Immersible CX-10 (Milipore 社) で 1.2 ml に濃縮し、プロスタサイクリン誘導体である TEI 5178 (帝人) $0.1 \mu\text{g/ml}$ を加え可溶性細胞膜成分とした (Fig. 2)。

次に、正常人血液 20 ml より作製した PRP に、TEI 5178 $0.1 \mu\text{g/ml}$ を加え、 $2100 \times \text{g}$ 、10 分間遠心し、ペレットを再び $0.1 \mu\text{g/ml}$ の TEI 5178 を含む PBS で 3 回洗浄して洗浄血小板を得た。この洗浄血小板を、前述の可溶性細胞膜成分溶液に浮遊させてゆっくり 1 分間かくはんした後、 37°C 5% CO_2 インキュベーター内に 30 分間静置した。最後に同溶液を $2100 \times \text{g}$ 、10 分間遠心し、ペレットを $0.1 \mu\text{g/ml}$ の TEI 5178 を含む PBS で 3 回洗浄して腫瘍細胞膜成分の血小板への吸着操作を終了した。

2.9 SDS-gradient polyacrylamide slab gel 電気泳動法

SDS gradient slab gel 電気泳動 (SDS PAGE) は大略 O'Farrell¹³⁾の方法に従った。5-22.5% gradient acrylamide gel は two-chambered gradient mixer (和科盛商会) を用い、dense solution: 1.5 M Tris-HCl (pH 8.8) 5 ml 、30% acrylamide 0.8% Bis-7.5% glycerol 混合液 15 ml 、10% TEMED 0.1 ml 、20% SDS 0.1 ml 、10% ammonium persulfate 0.04 ml 、計 20 ml 、less dense solution: 1.5 M Tris-HCl (pH 8.8) 5 ml 、10% TEMED 0.1 ml 、

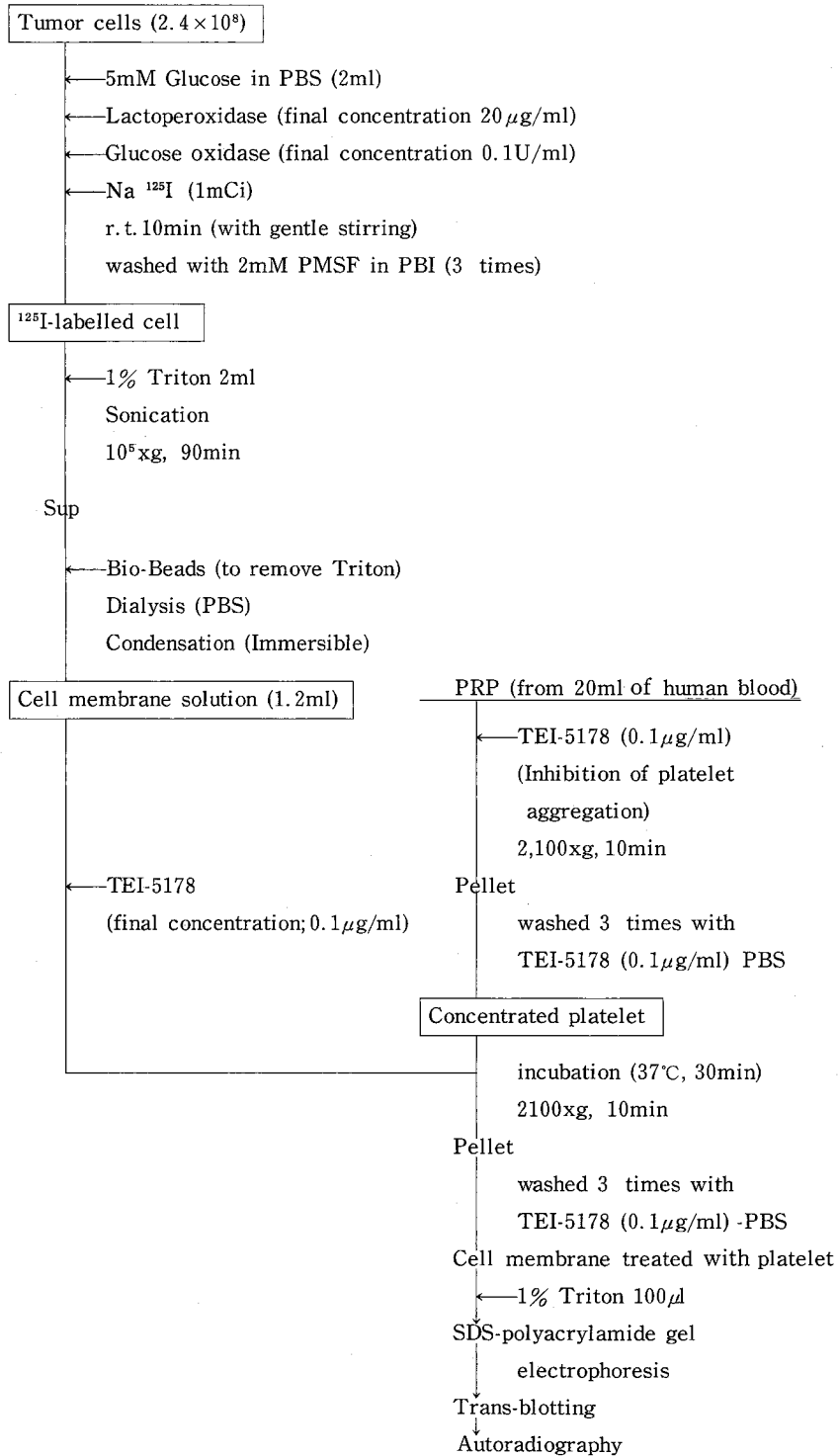


Fig. 2 Summary of the procedure used for identification of platelet aggregating substance on tumor cell membrane.

20% SDS 0.1 ml, 10% ammonium persulfate 0.035 ml, 蒸留水 15 ml, 計 20 ml より 13×13×0.1 cm の slab gel plate 内で化学重合して作製した。gradient gel が重合した後, spacer gel を重合し, 同 gel に coomb で試料溝を作製した。spacer gel の組成は, 0.5 M Tris-HCl-buffer (pH 6.8) 2.5 ml, 30% acrylamide-0.8% Bis 混合液 1.5 ml, 10% TEMED 0.1 ml, 20% SDS 0.05 ml, 10% ammonium persulfate 0.03 ml, 蒸留水 6 ml を化学重合した。

試料は, ^{125}I で標識した細胞 (HMV-1, M7609, HGC-25) および 2・8 の項で得た血小板浮遊液 (腫瘍細胞膜成分を結合していると思われる血小板) を 2100×g 10 分遠心して得たペレットに, 1% Triton 溶液 100 μl を加え可溶化することにより作成した。これらの放射活性を一定 ($1\times 10^4\text{cpm}$) にして試料用 buffer (10% glycerol, 1.5% β -mercaptoethanol, 2.3% SDS, 0.0625 M Tris-HCl (pH 6.8)) と等量に混合した後, 100°C で 5 分間加熱した。泳動用 buffer は 0.025 M Trisma base, 0.192 M glycine, 0.1% SDS 溶液 (pH 8.4) を用い, Slab gel 電気泳動装置 (和科盛商会) にて, brome phenol blue を marker dye として, 定電圧 200 V で泳動を開始, marker dye が gel から出て 30 分後に泳動を停止した。

2・10 Trans-blot electrophoretic blotting

Trans-blotting は Towbin *et al.*¹⁹⁾ の方法に準じて施行した。すなわち SDS-gradient slab gel 電気泳動後, ただちに gel を装置より取り出し, Bio Rad 社製 Trans-blotting apparatus に固定し, transfer buffer として 0.025 M Sodium phosphate buffer, pH 6.5 を用い, 12 V, 0.2 mA で 24 時間泳動し, gel 内の蛋白を blotting paper の Nitrocellulose 膜 (Bio Rad 社) へ転写した。

2・11 オートラジオグラフィー

Trans-blotting を終了後, blotting paper をラップフィルムで包被し, Kodak NS-5T に密着させ, -70°C deep freezer で 2 週間感光させた。感光を終了した blotting paper はボンソー-3 R 液 (トリクロル酢酸 6 g, ボンソー-3 R 0.8 g, H₂O 100 ml) に 10 分間浸して染色し, 次いで 2% 酢酸で脱色し, 乾燥させた。

3 結 果

3・1 ヒト培養腫瘍細胞の血小板凝集能

各種培養腫瘍細胞, 21 種の血小板凝集能を Table 1 に示した。このうち, 明らかな血小板凝集能を認めたヒト癌細胞培養株は, 結腸癌由来 M 7609, RPMI

4788, 肺癌由来 K 7610, PC-1, PC-10, 胃癌由来 MKN-28, 黒色腫由来 HMV-1, 神経芽細胞腫由来 IMR, 白血病細胞由来 K 562, Burkitt リンパ腫由来 Raji, 子宮癌由来 HeLa の計 11 種であった。それらの凝集率はそれぞれ, 57%, 32%, 27%, 13%, 50%, 14%, 55%, 35%, 20%, 28%, 50% であった。この中で 50% 以上の高い凝集率を示したのは, M 7609, PC-10, HMV-1, HeLa 細胞であった。しかし直腸癌由来 S 7512, 肺癌由来 PC-9, PC-15, 胃癌由来 KATO-III, OKAJIMA, MKN-7, 腎癌由来 KPK-13, 膵癌由来 HGC-25 など 8 種のヒト癌細胞培養株には血小板凝集能はみられなかった。高転移性腫瘍として知られるマウスの Lewis lung carcinoma を対照として検討したところ, 血小板凝集率は 30% であった。また非悪性腫瘍細胞の Chang liver cell では血小板凝集能は認められなかった。

一般に血小板凝集の惹起に必要な細胞数は, PRP 0.2 ml 中で $1\sim 5\times 10^5$ 個で, 凝集の出現までには 0.5~4 分のラグタイムを要した。このうち代表的な HMV-1 と M 7609 の血小板凝集パターンを Fig. 3 に示した。いずれも 1.5~2 分のラグタイムに引きつづき, 解離傾向をほとんど認めない 2 次凝集の出現をみた。

3・2 腫瘍細胞による血小板凝集の特性の検討

3・2・1 血小板凝集における腫瘍細胞数ならびにラグタイムとの相関

Fig. 4 右は黒色腫由来細胞 HMV-1 による血小板凝集率と細胞数およびラグタイムとの関係を検討したものである。細胞数が増加するのに従い凝集能も増し, $1\times 10^5/0.2\text{ ml}$ PRP 以上ではプラトニーに達した。一方ラグタイムは細胞数が増加するにともない短縮する傾向がみられ $3\times 10^5/0.2\text{ ml}$ PRP 以上ではプラトニーに達した。

3・2・2 血小板凝集能と PRP 中の血小板数との相関

血小板数と凝集率との関係を HMV-1 細胞を用いて検討した (Fig. 4 左)。やはり血小板数が増加するにしたがい凝集率も高くなり, 血小板数 $25\times 10^4/\text{mm}^3$ 以上では約 45% の凝集率でプラトニーに達した。

3・2・3 血小板凝集作用に対する 2 価イオンの影響

HMV-1 細胞を用い, 血小板凝集作用に対する 2 価イオンの影響を調べた。Fig. 3 に示したごとく HMV-1 はヘパリン 10 unit/ml を含む PRP を用いると血小板凝集を認めるのに対し, Fig. 5 に示すように 0.38% クエン酸ナトリウムを含む PRP では, 凝集を全く認めなかった。そこで 0.38% クエン酸ナトリウム加 PRP に Ca^{2+} (Fig. 5 左) または Mg^{2+} (Fig. 5 右) を種々の濃

度で加え凝集能を検討したところ、CaCl₂濃度 10 mM、MgCl₂濃度 20 mM で典型的な凝集を回復した。なお対照として同 PRP に CaCl₂ 10 mM または MgCl₂ 20 mM を添加したものでは凝集はみられなかった。

3・2・4 血小板凝集作用におけるトロンビンの関与
 各種癌細胞 (HMV-1, PC-10, 3LL) の血小板凝集におけるトロンビンの関与を調べるために、トロンビンの特異的阻害剤である MD 805 の血小板凝集能におよぼす効果を検討した (Fig. 6)。PRP に各種濃度の MD-805 を添加し、これに HMV-1, PC-10 または 3LL をそれぞれ $4 \times 10^5 / 10 \mu\text{l}$, $2 \times 10^5 / 10 \mu\text{l}$, $2.4 \times 10^5 / 10 \mu\text{l}$ 加え血小板凝集能を調べたところ、いずれの濃度においても凝集の抑制は認められなかった。一方、対照として各種濃度の MD-805 を添加した PRP にトロンビン 20

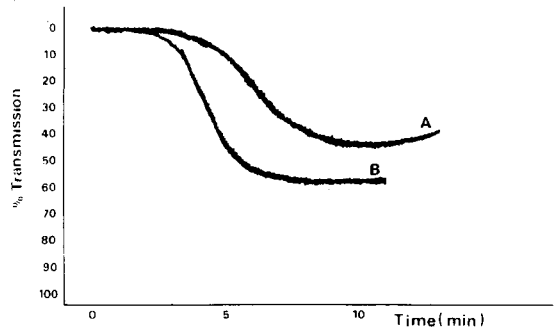


Fig. 3 Typical platelet aggregation pattern induced by human tumor cells
 A: HMV-1
 B: M 7609

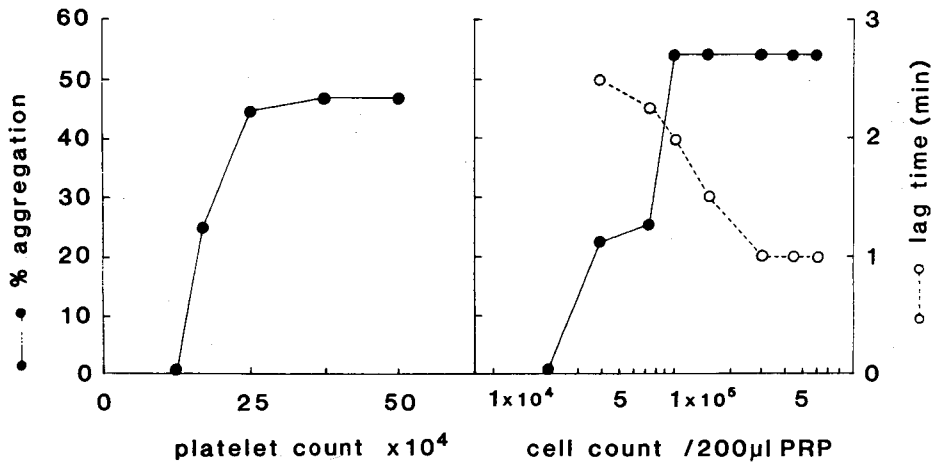
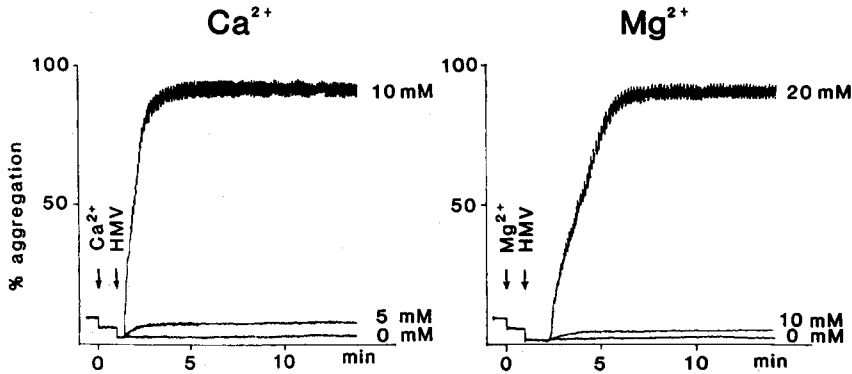


Fig. 4 Effects of concentration of platelet (left) or tumor cells (right) on platelet aggregation.



Platelet Rich Plasma (PRP) : containing 0.38% sodium citrate

Fig. 5 Effect of divalent cations on platelet aggregation induced by HMV-1 cells.

unit/ml を加えたところ、 $5 \times 10^{-6} \text{M}$ でトロンビン凝集は完全に失われた。

3.3 血小板凝集物質の物理化学的性質の分析

HMV-1 ならびに M 7609 細胞の有する血小板凝集物質の物理化学的性質を分析した結果を Table 2 に示した。HMV-1 および M 7609 細胞の血小板凝集率は、それぞれ 47%、60% であったが、トリプシン 1 mg/ml、pH 8.5 で 37°C 60 分処理することによりそれらは完全に失活した。しかしコラゲナーゼ (1400 unit/ml, pH 7.0 で 37°C, 24 時間)、ノイラミニダーゼ (50 unit/ml, pH 5.0 で 37°C, 2 時間) による処理では血小板凝集能に変化が認められなかった。また 2.2 の方法に準じて HMV-1 および M 7609 細胞 2×10^6 個から得た細胞膜片にも凝集率がそれぞれ 42%、37% と腫瘍細胞とはほぼ同程度の血小板凝集能を認めた。この細胞膜片を 30 ワット 1 分間超音波破碎すると凝集能は失活した。また膜片を 56°C 30 分熱処理しても凝集能は HMV-1、M 7609 でそれぞれ 41%、28% と保たれたが、100°C 15 分加熱すると凝集能は完全に失活した。

3.4 HMV-1 の細胞膜片を融合した HGC-25 細胞の血小板凝集作用

血小板凝集能を有する HMV-1 細胞の膜片を血小板凝集能のない HGC-25 細胞に融合することにより、凝集能の移行が可能かどうかを検討した。

3.4.1 融合膜片ならびに融合細胞の回収率

HGC-25 細胞に融合した HMV-1 細胞の膜片の回収率は、 ^{125}I 標識膜片を用いて算出したところ 2.5% であった。また 6×10^6 の HGC-25 細胞から最終的に 3×10^6 の膜片融合細胞が得られた (回収率 50%)。

Table 2 Physicochemical properties of platelet aggregating material of tumor cells.

Treatment	Platelet aggregation (%)	
	HMV-1	M-7609
No treatment	47	60
Trypsin (1 mg/ml)	0	0
Collagenase (1400 U/ml)	45	56
Neuraminidase (50 U/ml)	46	57
Membrane fragment*	42	37
Heat	56°C 30 min	41
	100°C 15 min	0
Sonication**	0	0

* Membrane fragments were obtained by homogenizing the cell suspension (in hypotonic solution) with Dounce homogenizer and subsequent centrifugation.

** Sonicitation of membrane fragments was performed in water by W-225 R Sonicator (Heat System-Ultrasonics, Inc.) for 1 min with a power of 30W.

3.4.2 位相差顕微鏡による検討

HMV-1 の膜片を融合した HGC-25 細胞の形態とその血小板との相互作用を位相差顕微鏡により検討した。Fig. 7-a は膜片を融合していない HGC-25 細胞を PRP に加え、37°C で反応させたものであるが、血小板凝集は全くみられなかった。Fig. 7-b は HGC-25 細胞に HMV-1 細胞の膜片を融合させたものであるが、細胞の周囲に膜片が結合しているのが観察される。この細胞を PRP に加え、37°C で反応させたものが Fig. 7-c である。融合した膜片を中心に血小板が集合し、凝集塊の

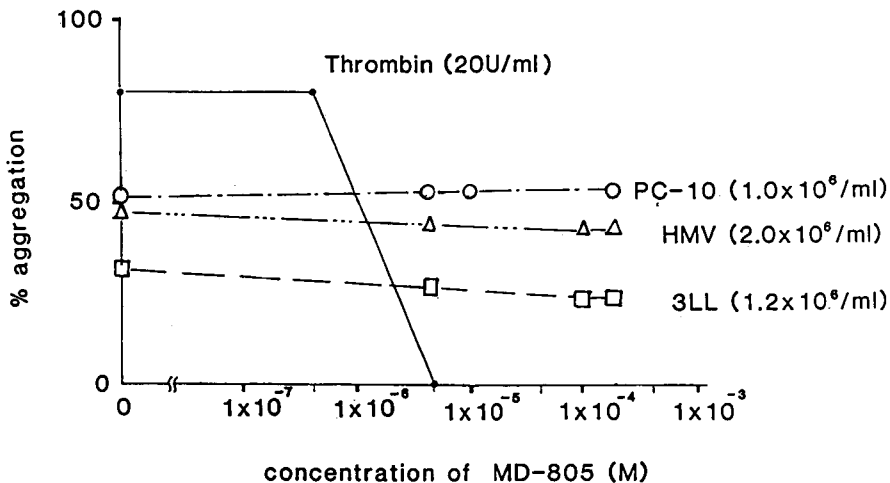


Fig. 6 Effect of specific thrombin inhibitor (MD-805) on platelet aggregation induced by tumor cells (HMV-1, PC-10, 3LL).

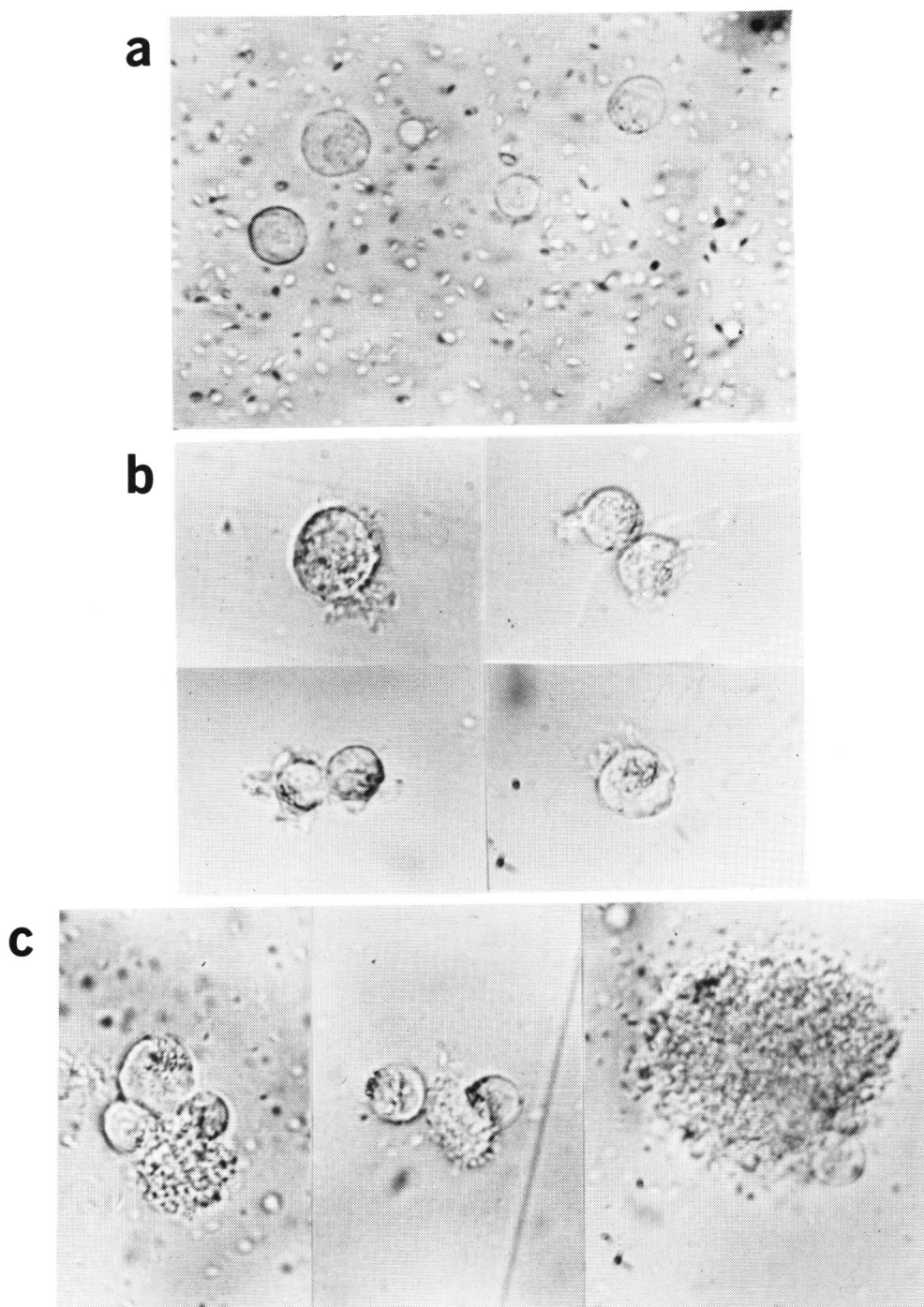


Fig. 7 Appearance of HGC-25 cells fused with HMV-1 cell membrane fragments revealed by phase-contrast micrography. $\times 400$.

a: HGC-25 with platelets

b: HGC-25 fused with HMV-1 cell membrane fragments

c: b+platelets

形成が認められた。

3.4.3 血小板凝集計による検討

HWV-1 細胞の膜片を融合した HGC-25 細胞の凝集能を血小板凝集計で検討した(Fig. 8)。PRP 200 μ l に HGC-25 細胞 2×10^5 を加えても血小板凝集は全くみられないのに対し、HMV-1 細胞膜片を融合した HGC-25 細胞 2×10^5 を加えたときには、明らかな二次凝集が認められた。その凝集率は 35% であった。

3.5 血小板に結合した腫瘍細胞膜蛋白の SDS PAGE パターン

血小板と特異的に反応するヒト腫瘍細胞の膜蛋白を同定すべく、 125 I で標識した可溶性細胞膜成分を血小板とインキュベートし、SDS PAGE, オートラジオグラフィで検討した。

Fig. 9 にその結果を示すが、No 1, 2, 3 はそれぞれ HMV-1, M 7609, HGC-25 細胞の全膜蛋白のオートラジオグラムである。いずれも分子量 5,000~100,000 の間に多数のバンドを認めたが、それぞれが固有の標識膜蛋白を有していた。それに対し、No 4, 5, 6 はそれぞれ HMV-1, M 7609, HGC-25 細胞の膜蛋白のうちで血小板に結合したもののオートラジオグラムである。血小板凝集能を有する HMV-1 および M 7609 細胞には、分子量約 2 万の部位に 2 本のバンドを認めた。一方、血小板凝集能を有しない HGC-25 細胞にはバン

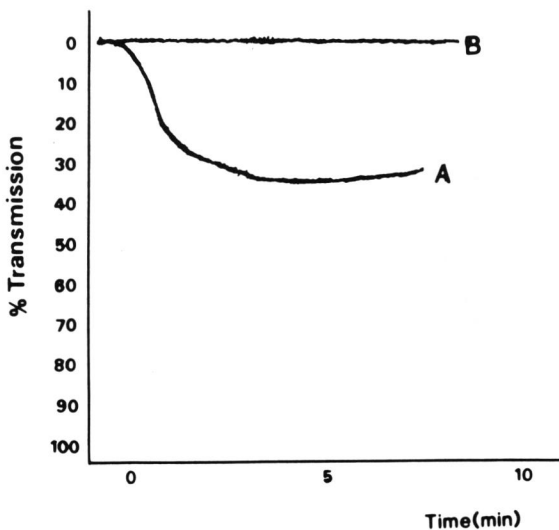


Fig. 8 Platelet aggregation induced by HGC-25 cells fused with HMV-1 membrane fragments and HGC-25 cells.

A: HGC-25 cells fused with HMV-1 membrane fragments
B: HGC-25 cells

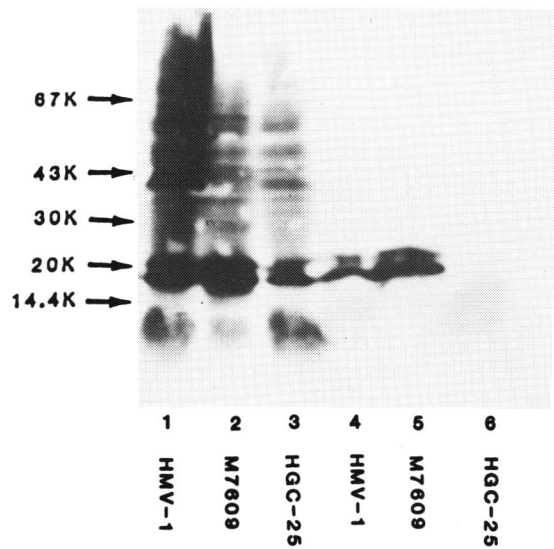


Fig. 9 Autoradiogram of SDS-PAGE of platelet aggregating substances

1, 2, 3: Cell membrane proteins
4, 5, 6: Cell membrane proteins specifically bound to platelets

ドが認められなかった。

4 考 察

癌の血行性転移においては、腫瘍血栓の形成が細胞の定着に不可欠な要因の一つとなっている。すなわち血中に遊離した細胞は腫瘍血栓を形成している狭小な末梢血管床に捕捉されるか¹⁵⁾あるいは血管内皮と直接接合して定着する¹⁶⁾が、後者の場合にも多くは癌細胞の囲りに二次的な血栓が形成され、定着をより強固なものとする。

血小板は一般に、血栓形成の第1段階で働く因子であるから、当然腫瘍の定着の場においても重要な役割りを演じていると考えられる。

このような癌の転移と血小板とのかかわり合いを動物実験モデルで最初に実証したのは1962年 Gasic and Gasic⁵⁾であった。彼らはノイラミニダーゼ処理マウスに腹水癌細胞(TA 3)を静注し、対照マウスと比較したところ、肺への転移が有意に減少していることを見いだした。続いて彼らは、それがノイラミニダーゼ処理による血小板減少の結果であることを明らかにし、逆に、血小板を輸注することにより転移が増強されることを示した³⁾。同じ頃、Jones *et al.*¹⁷⁾ Waren and Vales¹⁸⁾は Walker 256 腫瘍をラットに静注すると、その直後に末梢血の血小板が激減すること、さらに転移

局所で腫瘍細胞が血小板と凝集塊を作っていることを観察し、両者の間に何らかの直接的な相互作用が存在することを予想した。

転移における血小板の意義をより明解にしたのは、種々の抗血小板剤による転移抑制の試みであった。Gasper⁹⁾は pyrimido-pyrimidine 誘導体 RA 233 および VK 744 をそれぞれラットに投与し、直後に Waker 256 腫瘍を静注して肺の転移巣を調べたところ、対照群に比べ有意に転移巣が減少していた。同様な報告は、cyclooxygenase 阻害剤であるアスピリン⁶⁾、phosphodiesterase 阻害剤の pentoxifyllin^{9,19)}、adenylcyclase 活性を高めるプロスタグランディンの I₂¹⁰⁾ および D₂²⁰⁾ についてもなされている。

ところで、腫瘍細胞と血小板との直接的相互作用を *in vitro* で最初に証明したのはやはり Gasic *et al.*⁶⁾ であった。彼らは、31 種のマウスの腫瘍細胞を調べ、そのうち 15 種に血小板を凝集させる能力があることを示した。しかもその凝集の強さは、*in vivo* での転移能と平行していた。同様な報告は、その後 SV40 でトランスフォームしたマウスの線維芽細胞 3T3⁷⁾、ポリオーマウィルスでトランスフォームしたラットの腎癌細胞 PW 20²¹⁾ などで確認された。

腫瘍細胞の持つ血小板凝集物質については Pealstein *et al.*⁷⁾、Hara *et al.*⁹⁾ により SV40 でトランスフォームした 3T3 細胞、マウス腎癌細胞 (RAG)、マウス神経芽細胞腫 (Neuro-2a) で詳細な検討がなされた。彼らは、ノイラミナーゼ、トリプシン、ホスフォリパーゼ-A₂、超音波破碎、非イオン性表面活性剤で処理すると血小板凝集能が失活することから、凝集物質の本態は sialolipoprotein であろうと推測している。しかしこれまで報告された血小板凝集能ならびに凝集物質の研究は、すべてマウスおよびラットの腫瘍細胞を対象としたものであり、しかも凝集物質を具体的に同定した報告は皆無である。

そこで本研究では、ヒト癌細胞培養株について、その血小板凝集能の特性と凝集物質の分析をおこなった。

まずヒト癌細胞に血小板凝集能が存在するか否かを検討した。結果は Table 1 に示すように、ヒト癌細胞培養株 19 種中 11 種に血小板凝集能を認めた。ただしその凝集の程度と由来臓器、組織型との間には明確な関係が認められなかった。また凝集の特徴は不可逆性で、ラグタイムを有し、2 価のイオンを必須とするものであり、既報^{7,9)}の動物癌細胞のそれに類似していた。

ところで、このような癌細胞による血小板凝集作用の本質的な機序については、これまで必ずしも意見の

一致をみていない。Gasic *et al.*²²⁾、Hara *et al.*⁹⁾ は、癌細胞 (おそらくは細胞膜) に由来する物質が、直接血小板を凝集するとして報告したが、最近 Pealstein *et al.*²³⁾ は、癌細胞が PRP 中に共存する血漿成分に作用してまずトロンビンを生成し、そのトロンピンが 2 次的に凝集をおこすと主張している。本研究では、トロンピンの特異的な阻害剤である MD-805 を用いて検討したところ、2 種のヒト癌細胞 HMV-1、PC-10 およびマウス癌細胞 3LL は、いずれも凝集の抑制が認められなかった。すなわち腫瘍がトロンピンを介して血小板を凝集させる可能性は否定的であった。そこで次に、腫瘍細胞に存在する凝集物質について検討を加えた。対象とした細胞は、最も顕著な凝集能を有しているヒト黒色腫細胞 HMV-1 およびヒト大腸癌細胞 M7609 である。その結果いずれの細胞でも、トリプシンにより凝集能が失われ、コラゲナーゼ、ノイラミナーゼでは凝集能に変化が認められなかった。また、細胞を Dounce homogenizer で破碎し、得られた細胞膜片について凝集能を調べたところ、生細胞と同程度の凝集活性を認めた。しかしそれを 100°C 15 分加熱または超音波処理すると、凝集活性は完全に消失した。すなわち、凝集物質は、細胞膜に結合した非コラーゲン性の蛋白であると考えられた。なお、コラゲナーゼ処理を特におこなった理由は、コラーゲンが血小板の 2 次凝集をおこす代表的な蛋白であり、生体内に最も広く認められる物質の一つであるからである。

凝集物質が非コラーゲン性の蛋白であることは、すでに Gasic *et al.*⁶⁾ が指摘しているところだが、ノイラミナーゼ処理によっても凝集が失活しなかった点は、ラットまたはマウスを用いた諸家の報告と相反する^{7,9)}。その理由としては、凝集物質の不均一性、ことに種属を越えた場合の不均一性が最も考えやすい。また細胞膜を超音波破碎することにより、活性が失われた事実は、凝集物質が活性を発揮するためには、膜に固定された状態で存在する必要があることを示唆している。

最近、Poste and Nicolson¹²⁾ は高転移性腫瘍の細胞膜を低転移性腫瘍細胞に融合し、高転移性腫瘍細胞に変換させることに成功した。そこで著者は、腫瘍細胞膜の持つ血小板凝集能について同様な検討をおこなった。凝集能を全く持たないヒト膵癌細胞 HGC-25 に凝集活性の強いヒト黒色腫細胞 HMV-1 の細胞膜片をポリエチレングライコールで融合させたところ、血小板凝集計では明らかな二次凝集を認め、位相差顕微鏡による検討では、膜片の結合した部分を中心に血小板の凝集塊を観察した。この結果は単に膜の融合により凝

集能の移行が可能であることを示すのみならず、将来的にこの融合細胞を用いることにより、血小板凝集能と転移性との関係を *in vivo* で直接調べることができることになる。すなわち、血小板凝集能を獲得した融合細胞が *in vivo* で高転移性を示し、さらに抗血小板剤でその転移が抑制されるならば、転移における血小板の関与を直接的に証明できることになる。

このようにヒト癌細胞膜に血小板凝集蛋白が存在することは疑いのない事実と思われるが、それを確証するためには、さらに物質としてとらえることが肝要である。

凝集蛋白が血漿成分の介在なしに血小板を凝集させるためには、まず血小板との結合が不可欠なはずである。そこで¹²⁵Iで標識した腫瘍細胞(HMV-1, M7609, HGC-25)の可溶性膜蛋白を血小板とインキュベートし、SDS PAGE (オートラジオグラフィ)で検討したところ、血小板凝集能を持つ HMV-1, M7609 細胞では分子量 2 万の部位に 2 本の明瞭なバンドを認めた。また血小板凝集能のない HGC-25 ではそのバンドを認めなかった。したがってこれらのバンドは、血小板凝集細胞に特異的で、血小板に結合する膜蛋白ということになる。

これまで凝集物質についてはその存在が想定されていたながらも、具体的に同定した報告はみられない。本研究では、それをある程度明確にすることができたものとする。しかし最終的な結論を得るためには、この物質を実際に抽出し、凝集能を調べるという課題がなお今後に残されている。

以上、ヒト癌細胞膜表面に存在する血小板凝集物質の性状について調べた。転移が血小板と深いかわり合いを持っていることが明らかにされつつある今日、癌細胞の血小板凝集物質の特性を明確に把握することは、転移の機序を知るのみならず、その予防・治療にもつながる重要な問題と考える。

5 結 論

ヒト癌細胞による血小板凝集の特性を、2 価イオンの要求性やトロンビンの関与などについて検討するとともに、凝集物質の性状を各種物理化学的処理ならびに SDS PAGE により解析をおこない以下の結果を得た。

1) ヒト癌細胞培養株 19 種のうち 11 種に明らかな血小板凝集能を認めた。このうち、M7609, HMV-1, PC-10, HeLa 細胞は特に強い凝集能を持っていた。

2) 腫瘍細胞による血小板凝集は一定のラグタイムを有する不可逆性の二次凝集のパターンを示した。

3) 腫瘍細胞 (HMV-1) による血小板凝集能と細胞数とは正の相関を示したが $1 \times 10^5 / 200 \mu\text{l}$ PRP 以上ではプラトーに達した。一方ラグタイムと細胞数とは負の相関を示したが、 $3 \times 10^5 / 200 \mu\text{l}$ PRP 以上ではプラトーに達した。また PRP 中の血小板数と凝集能は正の相関を示したが $25 \times 10^4 / \text{mm}^3$ 以上ではプラトーに達した。

4) 腫瘍細胞と (HMV-1) による血小板凝集の発現には Ca^{2+} または Mg^{2+} などの 2 価イオンを必要とした。

5) 腫瘍細胞 (HMV-1, PC-10, 3LL) の血小板凝集能は抗トロンビン剤 MD-805 により抑制されなかった。

6) 腫瘍細胞 (HMV-1, M 7609) の血小板凝集能はトリプシン処理により失活したが、コラゲナーゼおよびノイラミナーゼ処理では失活しなかった。また細胞膜片にも凝集能がみられたが、これらは 100°C 15 分熱処理、超音波処理により失活した。

7) 血小板凝集能のない HGC-25 細胞に凝集能を有する HMV-1 細胞の膜片を融合することにより、凝集能を移行させることが可能であった。

8) 血小板と特異的に結合する腫瘍細胞 (HMV-1, M 7609) の膜蛋白は SDS PAGE (オートラジオグラフィ) 上分子量約 2 万のバンドとして認められた。

以上より、ヒト癌細胞による血小板凝集はトロンビンやコラゲン凝集とは異なるものであり、凝集物質の本態は分子量約 2 万の膜蛋白である可能性が指摘された。

稿を終えるにあたり、御指導ならびに御校閲を賜った漆崎一朗教授、新津洋司郎助教授に深謝いたします。また御協力いただきました当講座の諸先生に感謝いたします。

なお本研究は文部省癌特 I 「宿主調整による微小転移の形成と抑制」にかんする研究班の助成により行なわれた。

文 献

1. Leonard Weiss: A Pathobiologic Overview of Metastasis. *Semin. Oncol.* 4, 5-17 (1977).
2. Fidler, I. J., Gerstes, D. M and Hart, I. R.: The Biology of Cancer Invasion and Metastasis. *Adv. Cancer Res.* 28, 149-250 (1978).
3. Gasic, G. J., Gasic, T. B. and Stewart, C. C.: Antimetastatic effects associated with platelet reduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 61, 46-52 (1968).

4. Hagmar, B.: Experimental Tumor Metastasis and Blood Coagulation. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Section A* **78**(Suppl. **211**), 1-38 (1970).
5. Gasic, G. J. and Gasic, T. B.: Removal of sialic acid from the cell coat in tumor cells and vascular endothelium, and its effects on metastasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **48**, 1172-1177 (1962).
6. Gasic, G. J., Gasic, T. B., Galant, V., Johnson, T. and Murphy, S.: Platelet-tumor cell interactions in mice. The role of platelets in the spread of malignant disease. *Int. J. Cancer* **11**, 704-718 (1973).
7. Peaelstein, E., Cooper, L. B. and Karpatkin, S.: Extraction and characterization of a platelet-aggregating material from SV40 transformed mouse 3T3 fibroblasts. *J. Lab. Clin. Med.* **93**, 332-344 (1979).
8. Hara, Y., Steiner, M. and Baldini, M. G.: Characterization of the platelet aggregating activity of tumor cells. *Cancer Res.* **40**, 1217-1222 (1980).
9. Gasper, H.: Stickness of platelets and tumor cells influenced by drugs. *Thromb. Diath. Haemorrh.* **42** (Suppl.), 291-303 (1970).
10. Honn, K. V., Cicone, B. and Skoff, A.: Prostacyclin: A potent antimetastatic agent. *Science* **212**, 1270-1272 (1981).
11. Hubbard, A. L. and Cohn, Z. A.: The enzymatic iodination of the red cell membrane. *J. Cell Biol.* **55**, 390-405 (1975).
12. Poste G. and Nicolson G. L.: Arrest and metastasis of bloodborne tumor cells are modified by fusion of plasma membrane vesicles from highly metastatic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 399-403 (1980).
13. O'Farrel, P. H.: High resolution two dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* **250**, 4007-4021 (1975).
14. Towin, H., Staehelin, T. and Gordon, J.: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 4350-4355 (1979).
15. Romsdahl, M. D., Chu, E. W., Hume, R. and Smith, R. R.: The time of metastasis and release of circulating tumor cells as determined in an experimental system. *Cancer* **14**, 883-888 (1961).
16. Chew, E. C., Josephson, R. L. and Wallace, A. C.: Morphologic aspects of the arrest of circulating cancer cells. In: Weiss, L.: *Fundamental Aspects of Metastasis*. 121-150, North Holland, Amsterdam (1976).
17. Jones, D. S., Wallace, A. C. and Fraser, E. E.: Sequence of events in experimental metastasis of walker 256 tumor: Light immunofluorescent and electron microscopic observations. *J. Natl. Cancer Inst.* **46**, 493-504 (1971).
18. Warren B. A. and Vales, O.: The adhesion of thromboplastic tumors emboli to vessel walls *in vivo*. *Br. J. Exp. Pathol.* **53**, 301-313 (1972).
19. Gordon, S., Witul, M. and Cohen, H.: Studies on platelet aggregation inhibitors. *in vivo*. VIII. Effects of Pentoxifyllin on spontaneous tumor metastasis. *J. Med.* **10**, 435-441 (1979).
20. Stingfellow, D. A. and Fitzpatrick, F. A.: Prostaglandin D₂ controls pulmonary metastasis of malignant melanoma cells. *Nature* **282**, 76-78 (1979).
21. Pearlstein, E., Salk, P. L., Yogeeswaran, G. and Karpatkin, S.: Correlation between spontaneous metastatic potential, platelet aggregating activity of cell surface extracts, and cell surface sialylation in 10 metastatic-variant derivatives of a rat renal sarcoma cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 4336-4399 (1980).
22. Gasic, G. J., Gasic, T. B. and Jimenez, S. A.: Platelet aggregating material in mouse tumor cells. Removal and regeneration. *Lab. Invest.* **36**, 413-419 (1977).
23. Pearlstein, E., Ambrogio, C., Gasic, G. and Karpatkin, S.: Inhibition of the Platelet-aggregating activity of two human adenocarcinomas of the colon and an anaplastic murine tumor with a specific thrombin inhibitor dawylargininn N-(3-ethyl-1, 5-pentanediy) amide. *Cancer Res.* **41**, 4535-4539 (1981).

別刷請求先:

(〒060) 札幌市中央区南1条西16丁目

札幌医科大学内科学第4講座 茂木良弘