

In Vitro におけるヒト癌細胞と線維芽細胞の 相互作用によるコラーゲン合成と増生

川崎医科大学 実験病理

(指導: 木本哲夫教授)

大久保 茂 樹

(昭和60年8月31日受付)

Collagen Synthesis and Production on Interaction between Human Cancer Cells and Fibroblasts in Vitro

Shigeki Ohkubo

Department of Pathology, Kawasaki Medical School

(Accepted on August 31, 1985)

担癌体における癌細胞と癌間質細胞による collagen 増生が最近極めて注目されている。そこで癌細胞と宿主間質細胞の相互作用を明らかにする目的で、ヒト線維芽細胞とヒト株化癌細胞（肺腺癌由来 HLC-1, 胃未分化癌由来 HGC-27, 肺中等度分化型腺癌由来 PC-3）を用い、in vitro での実験を行い検討した。両細胞を混合培養し collagen 増殖の形態学的観察および細胞増殖を検索した。他方、癌細胞培養後の conditioned medium を用いて線維芽細胞を培養し、細胞増殖ならびに collagen 合成におよぼす影響を検索した。また癌細胞自身の collagen 合成能をも測定した。

両細胞を混合培養した結果、collagen の増生を観察し、単独培養と比較して両細胞とも増殖が促進された。癌細胞培養後の conditioned medium を用いた実験では、線維芽細胞の増殖に対してほとんど影響をおよぼさなかったが、HGC-27 と PC-3 の conditioned medium は collagen 合成を促進した。更に癌細胞自身の collagen 合成能を測定した結果、HLC-1, PC-3, HGC-27 のすべての癌細胞に collagen 合成能を認め、特に HLC-1 の合成能は線維芽細胞の合成能に匹敵するほど高値であったが、合成された [³H]hydroxyproline の大部分は細胞内に局在していた。

したがって癌間質の collagen は主として線維芽細胞および癌細胞の両者によって増生され、両細胞の相互作用によって増殖促進が起こると考えられる。しかしこれらの絶対量や両者の比率は癌細胞の種類により異なり、担癌体における collagen 増生の所見はそれぞれの癌細胞により異なるものと考えられる。

In order to study the interaction between human fibroblasts and cancer cells in vitro, the biological behavior of fibroblasts was investigated using a co-culture with established cancer cells (HLC-1 derived from human lung adenocarcinoma, HGC-27 derived from human gastric undifferentiated carcinoma and PC-3 derived from human lung moderately differentiated adenocarcinoma).

When fibroblasts were co-cultured with HLC-1 cells, the growth of the fibroblasts and HLC-1 cells seemed to be stimulated by the co-culture system.

The effect of a conditioned medium of cancer cells (HGC-27 and PC-3 cells) on the growth and collagen synthesis of fibroblasts was investigated by a count of cells and the [³H] hydroxyproline assay. No enhancement of cell proliferation was seen, but collagen synthesis of fibroblasts was stimulated by the conditioned medium. Potential of collagen synthesis activity in the cancer cells themselves was also observed.

Key Words ① Fibroblasts ② Cancer cells ③ Collagen synthesis

はじめに

癌組織は本来癌細胞（癌実質）と癌間質組織から構成されている。間質組織は通常線維芽細胞を主体とする細胞成分と、collagen, proteoglycan をはじめとして fibronectin, laminin 等の糖蛋白よりなる細胞間物質（基質）で構成されている。これらの腫瘍細胞と間質細胞の相互作用のメカニズムは複雑であり、今日までほとんど解明されていない。この複雑な相互作用により各種の癌は間質結合組織を形成し、癌特有の組織像を示す。特に胃癌をはじめとする硬性癌にみられるように collagen 増生が著明で特有な組織像を呈するものや、間質は構成されてもほとんど癌細胞のみで占められている髄様癌等のあることは周知である。

他方、癌の増殖進展にともない、癌組織の周辺には多少なりとも炎症反応が見られ、リンパ球をはじめマクロファージ等が浸潤していることから、時には癌免疫反応を示唆する所見として注目されている。これらの免疫細胞と線維芽細胞との関係に着目し、これらの細胞が線維芽細胞を刺激し細胞増殖および collagen 合成を促進することが、最近注目されている。^{1)~5), 7), 8), 11)}

癌間質特に collagen の増生は古くからいわれているように、炎症反応の後にひきおこされる単なる随伴現象としての組織修復過程のひとつなのか、癌細胞が正常細胞（線維芽細胞等）に直接作用して collagen を増生させているのか、あるいは癌細胞自身が collagen を合成し

ているのか、重要な課題を提供しながらまだ十分解明されていない。

前田⁶⁾は胃癌の間質の線維化の機序は大部分の胃癌と同じであり、さらに胃潰瘍その他に認められる非特異的な創傷治癒反応における線維化の機序とも同様であると結論している。最近木本^{7)~10)}は癌の間質特に collagen 増生を重視し、ヌードマウスにヒト癌細胞を移植し、collagen 増生による抗癌機序に着目し報告した。この場合人型結核菌体多糖体 (SSM) を用いた実験で、この特質は血管系を中心に癌間質の collagen 増生を促進し、癌巣を封じ、転移を阻止することにより延命効果を発揮することを報告した。T-細胞の存在しないヌードマウスでの実験にみられるように、免疫担当細胞が介在しなくとも SSM の抗癌作用はこれら collagen 増生によっても起こり得ることを報告した。さらに木本¹¹⁾は SSM による癌治癒機転は、collagen 増生の所見から結核治癒機転に相通ずるものであることを指摘している。

癌細胞自身の collagen 産生能について切除標本を用いた研究と培養細胞を用いた研究が数多く報告されているが、統一した見解は得られていない。飯田¹²⁾は胃硬性癌を電頭オートラジオグラフィを用いて検索した結果、胃硬性癌における膠原線維産生細胞は主として線維芽細胞であり、癌細胞には膠原線維産生の可能性は考えられないと結論している。しかし Al-Adnani ¹³⁾は免疫酵素抗体法を用いて乳腺の硬性癌で癌細胞に collagen 合成能があることを示し、癌間質に見られる多量の膠原線維は反

応性に沈着したのではなく、癌細胞からの産物であると推定している。佐野ら¹⁴⁾や竹内¹⁵⁾も胃硬性癌組織の hydroxyproline を定量し、同様の結論に達している。1965年に Green, Goldberg¹⁶⁾ は in vitro で癌細胞の collagen 合成能を証明し、外胚葉性細胞や癌細胞が未分化な状態におかれると、胎生期に持っている collagen 合成能が発現すると推論している。その後このような癌細胞の collagen 合成に関する報告が数多くみられるようになった。^{17)~21)}

最近、培養細胞を使用して癌細胞と線維芽細胞の直接的な相互作用の解明を試みる研究が始められ、Naito ら²¹⁾ は線維芽細胞と癌細胞を混合培養あるいは双子培養ビンで培養し、両者の相互作用を検索した結果、胃癌細胞が線維芽細胞の collagen 合成を著しく促進することを証明した。この事実は胃癌細胞の産生するなんらかの因子が線維芽細胞の顕著な collagen 合成を誘起するであろう可能性を強く示唆している。同様に辻²²⁾ も in vitro の実験で印環細胞癌が線維芽細胞の dermatan sulfate の生合成を刺激することを明らかにしている。

今回著者は生体修復機転として抗癌性を発揮する癌間質の collagen 増生機序の一端を明らかにする目的で、木本が使用した株化癌細胞 (HLC-1, HGC-27, PC-3) を用いて in vitro での実験を試み、癌細胞の線維芽細胞の増殖ならびに collagen 合成におよぼす影響を検索した。また、癌細胞自身の collagen 合成能を測定し、in vivo での癌細胞による collagen 合成の機序および組織像と比較検討することにより、癌間質の collagen 合成および増生について、担癌体の生物学的研究の一端とした。

研究材料と方法

1. 培養細胞

線維芽細胞: 12歳男性の前頸部より採取した皮膚片を用いて培養し、4~6継代目で細胞凍結チューブに分取しすべて凍結保存した後、必要に応じて解凍し実験に使用した。培養液は Eagle's Minimum Essential Medium (MEM) (日水製薬) に牛胎仔血清 (FBS) (Gibco) を10%の割合で加えたものを用いた (**Fig. 1**)。

HLC-1: ヒト肺癌(腺癌)患者の胸水より得

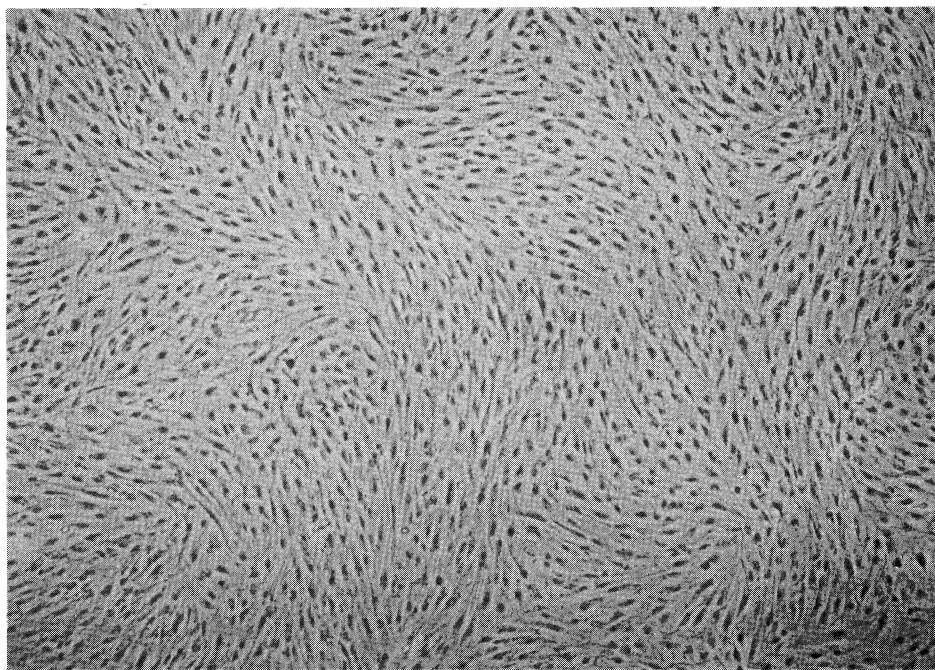


Fig. 1. Micrograph of human dermal fibroblasts in culture. $\times 40$

られた付着増殖型細胞株であり、赤木、木本²³⁾により1976年に細胞株として樹立された (Fig. 2).

HGC-27: ヒト胃癌 (未分化癌) 由来の付着増殖型細胞株で、赤木、木本²⁴⁾により1976年に転移リンパ節より分離樹立された。両細胞株とも当教室にて MEM+10% FBS で継代維持

されてきたものを使用した (Fig. 3).

PC-3: ヒト肺中等度分化型腺癌由来の付着増殖型細胞株で、免疫生物研究所より購入され当教室にて Roswell Park Memorial Institute's Medium 1640 (RPMI 1640) (日水製薬) +10% FBS で継代維持されてきたものを使用した (Fig. 4).

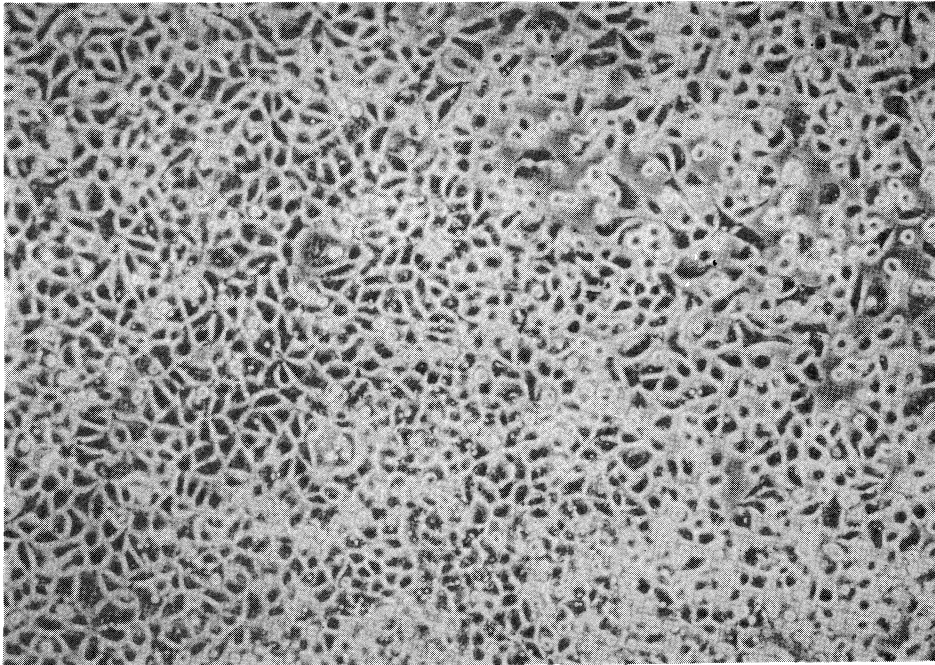


Fig. 2. Micrograph of HLC-1 cells in culture. $\times 100$

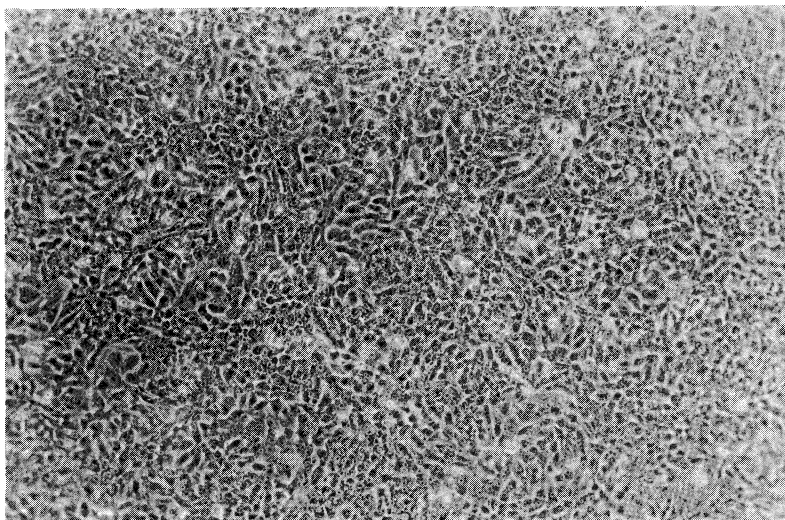


Fig. 3. Micrograph of HGC-27 cells in culture. $\times 100$

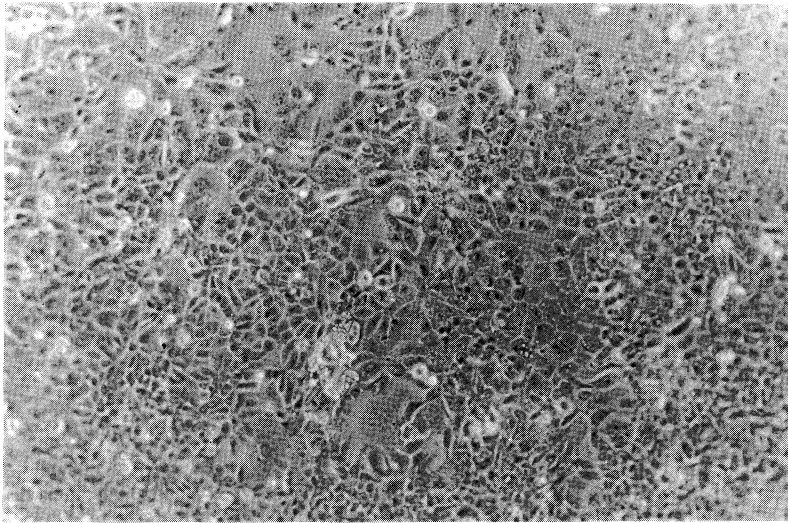


Fig. 4. Micrograph of PC-3 cells in culture. $\times 200$

2. 混合培養後の collagen 増生の形態学的観察

線維芽細胞 (10^4 cells/dish) を 5 ml の培養液とともに 60 mm plastic dish (Falcon) にまき込み、12日後 HLC-1 (10^5 cells/dish) を重層し 37°C , 5% CO_2 下で35日間培養した。培養液の交換は培養12日目までは4日ごとに、それ以降は5日間隔で行った。比較対照群として線維芽細胞および HLC-1 細胞を同条件で単独培養した。培養後 plastic dish 上の細胞層をホルマリン、エタノール液 (1:2) で固定し、渡辺の鍍銀染色を行った後、光学顕微鏡で観察した。

3. 混合培養と単独培養の細胞増殖に関する比較

5 ml の培養液を含む 60 mm plastic dish に線維芽細胞をまき込み、これらが定常期に達した後 HLC-1 (6×10^5 cells/dish) を重層し、 37°C , 5% CO_2 下で48時間培養した。両細胞の単独培養も同条件で行った。これらの細胞を 0.2% トリプシン液で処理しクリスタルバイオレット液で染色し血球計算板で細胞数を計測した。混合培養した細胞は一部を総数計測に用い、残りを線維芽細胞と HLC-1 細胞の鑑別計測に用いた。トリプシン液に浮遊した細胞を

遠沈 (1000 r. p. m. 10 min.) し、これに FBS 0.1 ml を加えスライドガラス上にスメアを作製しギムザ染色を行い、両細胞数の比率から各細胞の絶対数を算定した。

4. 癌細胞 conditioned medium の調製

25 mm² Tissue Culture Flask (Corning, USA) で単層状態の HGC-27 細胞を 5 ml の培養液で4日間培養し、この液を conditioned medium として使用した。浮遊する細胞成分を遠沈 (2000 r. p. m. 30 min) で除去した後、0.22 μm microfilter (Milipore) で濾過滅菌を行い、これを用いて線維芽細胞の collagen 合成におよぼす影響を検索した。また各種癌細胞の conditioned medium の線維芽細胞の増殖ならびに collagen 合成におよぼす影響を検索するために、HGC-27, HLC-1, PC-3 を RPMI 1640+10% FBS で3日間培養し、その conditioned medium を上記と同様の方法で実験に使用した。

5. 癌細胞培養後採取した conditioned medium の線維芽細胞増殖におよぼす影響

線維芽細胞 (10^5 cells/well) を 6 well plastic plate (Falcon) に 2 ml/well の培養液とともにまき込み2日間培養した。培養液を20倍希釈

の癌細胞 conditioned medium (HGC-27 と HLC-1 の conditioned medium を MEM+10% FBS で20倍希釈したもの) に交換し、以後この5%濃度の conditioned medium で3日ごとに培養液の交換を行い、同時に細胞数を計測した。比較対照群の培養液は未使用の RPMI 1640+10% FBS を MEM+10% FBS で20倍希釈したものを使用した。

6. 癌細胞 conditioned medium の線維芽細胞の collagen 合成におよぼす影響

6 well plastic plate に線維芽細胞を培養液 (2 ml/well) とともにまき込み、定常期に達した後、培養液を種々の濃度の HGC-27 conditioned medium に交換し、経時的に刺激した後、線維芽細胞の collagen 合成能を測定した。これらの実験から collagen 合成刺激に最適の濃度と刺激時間を決定し、各種癌細胞の conditioned medium の条件設定に応用した。

7. 各種癌細胞の collagen 合成能の測定

HLC-1, HGC-27, PC-3, 線維芽細胞をそれぞれ 10^5 個ずつ 6 well plastic plate に 2 ml/

well の培養液とともにまき込み、4日間培養後 collagen 合成能を測定した。

8. collagen 合成能の測定

collagen 合成測定前の培養液をすべて吸引し、 $5 \mu\text{Ci/ml}$ の L-[2, 3- ^3H] proline (Amersham) と $50 \mu\text{g/ml}$ の sodium ascorbate および $3, 4 \text{ mg/ml}$ の sodium α -ketoglutarate を含んだ無血清の Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (日水製薬) で24時間培養後、培養液を採取し浮遊した細胞成分を除去するために遠沈 (3000 r. p. m. 20 min.) した後、上清を蒸留水で透析した (2日間 4°C)。

wellに残った細胞は phosphate buffer saline (PBS) と 10% trichloroacetic acid 溶液 (TCA) で洗浄し、乾燥後 1N-NaOH を 2 ml 加え室温で一晩放置し細胞成分を溶解した。

溶解された細胞成分を含む NaOH 溶液と透析された培養液をネジ付試験管 (Pyrex) に移し 20% TCA 溶液を 2 ml 加えた。 4°C で一晩放置した後遠沈 (3000 r. p. m. 20 min.) し蛋白成分を沈殿させた。上清を除去した後 6N のアミノ酸分析用塩酸 (半井化学) を 2 ml 加え、

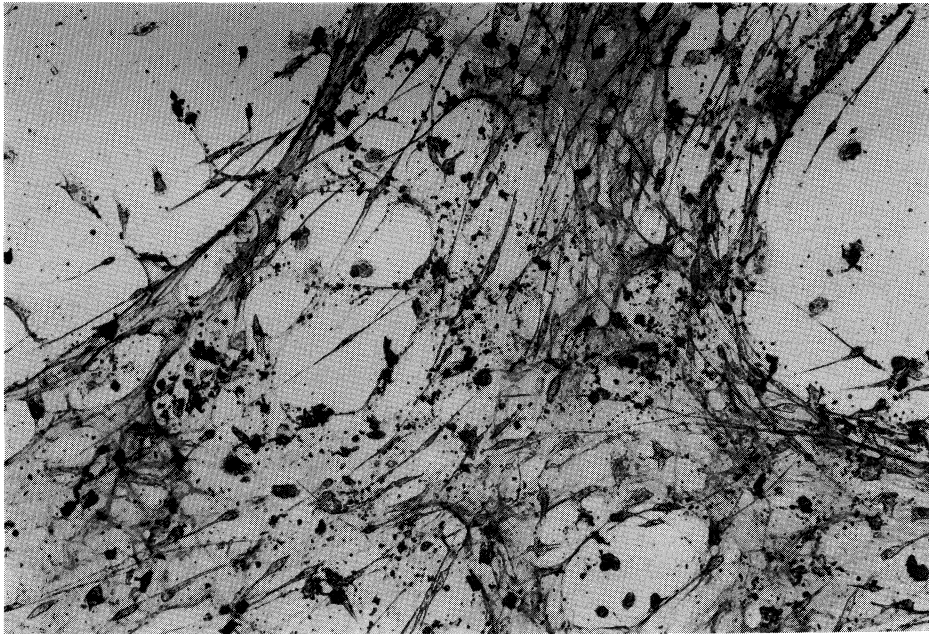


Fig. 5. Production of reticulum fiber in a co-culture of fibroblasts and HLC-1 cells. A 5 week culture. Pap stain. $\times 400$

テフロンライナー付キャップ (岩城硝子) で密栓しオートクレーブ (125°C, 1.5気圧, 6時間) で加水分解した。

加水分解された蛋白成分を含む塩酸溶液に Chacoal (Merck) と DOWEX 1×2 (室町化学) (1:1) を少量加え, 混和した後遠沈 (2000 r. p. m. 10 min.) し Humin 等の不純物を除去しロータリーエバポレーターで塩酸を除去した。

乾固した水解物を 4 ml の蒸留水で溶解し,²⁵⁾ 以後 Juva and Prokop の方法^{26)~28)} で [³H] hydroxyproline を分離し液体シンチレーションカウンター CSC-900 (Aloka) で [³H] hydroxyproline の放射活性を測定した。

実験結果

collagen 産生の形態学的観察

線維芽細胞と HLC-1 を混合培養し渡辺の鍍銀染色を行った結果, 黒褐色に染まる線維状の collagen がネットワークを形成しているのが観察された (Fig. 5). これらの所見は HLC-1 を移植されたヌードマウスが形成した癌腫の組織

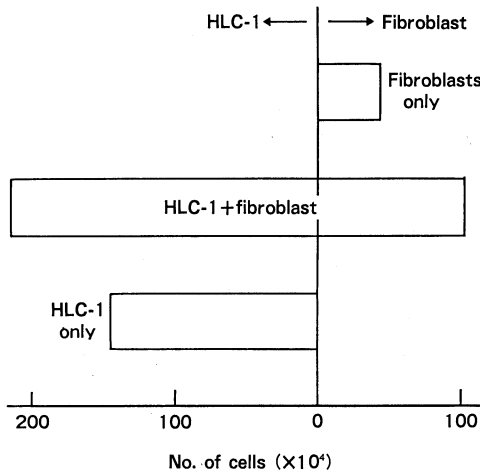


Fig. 6. Effect of the co-culture on cell proliferation of fibroblasts and HLC-1 cells. HLC-1 cells (6×10^5) were added to confluent fibroblasts in 5 ml of MEM with 10% FBS and were co-cultured for 48 hr. The cells were washed and trypsinized. Data represent the mean of duplication determination.

像^{7)~11)}の所見と類似していた。比較対照として単独培養した線維芽細胞と HLC-1 にはこのような像はみられなかった。

細胞増殖におよぼす混合培養の影響

線維芽細胞と HLC-1 を同一シャーレで培養した時, 単独培養と比較して細胞増殖に相違があるか否かを検討するために混合培養を行った。結果は培養条件が悪い (細胞密度が高い) にもかかわらず混合培養の両細胞数が線維芽細胞, HLC-1 ともに単独培養の細胞数より多かった (Fig. 6)。

癌細胞培養後の conditioned medium の線維芽細胞増殖におよぼす影響

癌細胞が培養液中に放出する代謝産物等が線維芽細胞の増殖を促進するか否かを検討するた

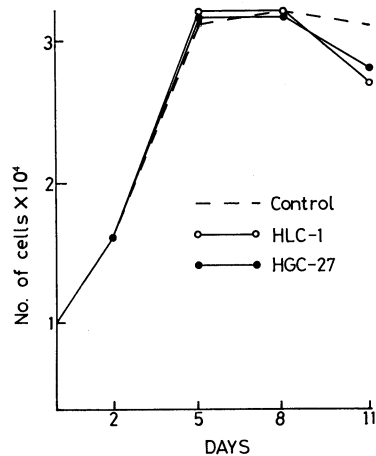


Fig. 7. Effect of the supernatant of cancer cells on growth of fibroblasts. A supernatant of cancer cells was obtained from RPMI 1640 with 10% FBS by culturing confluent cancer cells for 3 days. A 1:20 dilution of supernatant was tested for its ability to stimulate the growth of fibroblasts in MEM with 10% FBS. Fibroblasts (10^5 cells) were plated in 35 mm dishes and incubated for 2 days. Media were removed and fibroblasts were incubated in a diluted supernatants of cancer cells. Media were changed every 3 days. At 3 day intervals, cells were washed and trypsinized. Cell counts were performed with a hemocytometer. Data represent the mean of duplicate determination.

めに、癌細胞を培養して採取した conditioned medium で線維芽細胞を培養したが、比較対照群に比して細胞増殖に有意差を認めなかった。しかし定常期の初期（培養5日目）では癌細胞 conditioned medium を使用した群の方がわずかに高い傾向を示した (Fig. 7)。

癌細胞 conditioned medium の線維芽細胞 collagen 合成におよぼす影響

培養された癌細胞の放出物質が線維芽細胞の collagen 合成を促進するか否かを検討するために、HGC-27 の培養後の conditioned medium を用いて実験した。種々の濃度 (2.5%, 5%, 10%) の HGC-27 conditioned medium で線維芽細胞を4日間培養し、その直後 collagen 合成能を測定した結果、比較対照群との有意差 (T検定 $p < 0.05$) は認められなかったが、

5%濃度の conditioned medium を使用した群が高値を示す傾向があり、この傾向は別の実験でも認められた (Fig. 8)。

次に5%濃度の HGC-27 conditioned medium を用いて種々の期間 (2日間, 4日間, 6日間) 培養した後、線維芽細胞の collagen 合成能を測定した。培養液の交換は比較対照群も含めて2日間隔で行った。結果は4日間培養したものが最も高かったが、比較対照群との有意差は認められなかった (Fig. 9)。さらに長期 (8日間, 16日間, 24日間) にわたって線維芽細胞を HGC-27 の conditioned medium (5%濃度) で培養し collagen 合成能を測定した結果、16日間培養したものが最も高く、24日間培養したものは最低であった (Fig. 10)。

次に各種癌細胞 (HGC-27, HLC-1, PC-3) の

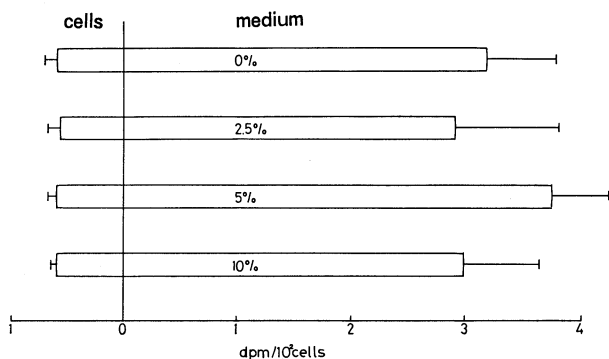


Fig. 8. Stimulation of collagen synthesis by the supernatant of HGC-27. A supernatant of HGC-27 was obtained from MEM with 10% FBS by culturing confluent HGC-27 for 4 days. Dilutions of the HGC-27 supernatant were tested for their ability to stimulate collagen synthesis by incubating them with confluent fibroblasts in MEM with 10% FBS for 4 days. Media were removed and fibroblasts were labeled with [³H] proline (5 μ Ci/ml) in serum free DMEM for 24 hr at 37°C in the presence of sodium ascorbate (50 μ g/ml) and sodium α -ketoglutarate (3.4 mg/ml). The amount of radioactivity of hydroxyproline was analyzed. Determinations were done in triplicate and each point is expressed as the mean \pm SD.

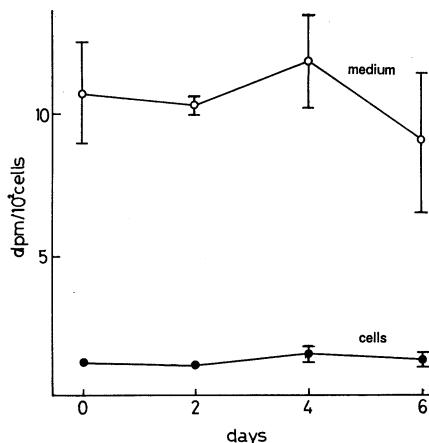


Fig. 9. Effect of the duration of short term stimulation of HGC-27 supernatant on collagen synthesis. A 1:20 dilution of supernatant was tested for its ability to stimulate collagen synthesis when incubated with confluent fibroblasts in MEM with 10% FBS for various time periods. Media were removed and fibroblasts were labeled with [³H] proline (5 μ Ci/ml) in serum free DMEM for 24 hr at 37°C in the presence of sodium ascorbate (50 μ g/ml) and sodium α -ketoglutarate (3.4 mg/ml). The amount of radioactive hydroxyproline was analyzed. Determinations were done in triplicate and each point is expressed as the mean \pm SD.

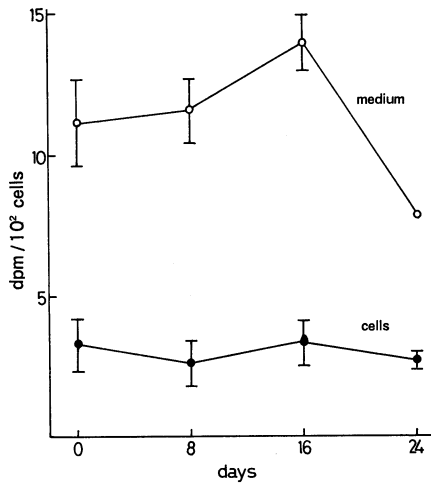


Fig. 10. Effect of the duration of long term stimulation of HGC-27 supernatant on collagen synthesis. A 1:20 dilution of supernatant was tested for its ability to stimulate collagen synthesis when incubated with confluent fibroblasts in MEM with 10%FBS for various time periods. Media were removed and fibroblasts were labeled with [³H] proline (5 μCi/ml) in serum free DMEM for 24 hr at 37°C in the presence of sodium ascorbate (50 μg/ml) and sodium α-ketoglutarate (3.4 mg/ml). The amount of radioactive hydroxyproline was analyzed. Determinations were done in triplicate and each point is expressed as the mean ± SD.

conditioned medium (5%濃度) で線維芽細胞を4日間培養し collagen 合成を測定した結果, HGC-27 と PC-3 の conditioned medium で培養したものが高値を示し, なかでも PC-3 の conditioned medium で培養したものは比較対照群より有意に高かった (T検定, $p < 0.05$) (Fig. 11).

癌細胞の collagen 合成能

各種癌細胞 (HLC-1, HGC-27, PC-3) の collagen 合成能を測定した. 同時に対数増殖期の線維芽細胞を比較対照として測定した. [³H] hydroxyproline の全体量は線維芽細胞が最大であったが, 細胞内の [³H] hydroxyproline の量は HLC-1 において最大であった. HGC-27 と PC-3 の全体量は他の2者に比して低いが,

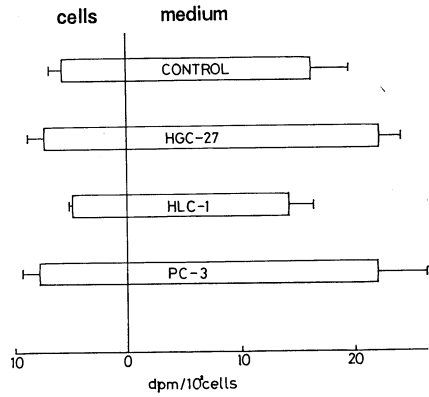


Fig. 11. Effect of supernatant of various cancer cell lines on collagen synthesis. Supernatant was obtained by culturing confluent cancer cells for 3 days in RPMI 1640 with 10%FBS. A 1:20 dilution of supernatant was tested for its ability to stimulate collagen synthesis by incubating them with confluent fibroblasts in MEM with 10%FBS for 4 days. Media were removed and fibroblasts were labeled with [³H] proline (5 μCi/ml) in serum free DMEM for 24 hr at 37°C in the presence of sodium ascorbate (50 μg/ml) and sodium α-ketoglutarate (3.4 mg/ml). The amount of radioactive hydroxyproline was analyzed. Determinations were done in triplicate and each point is expressed as the mean ± SD.

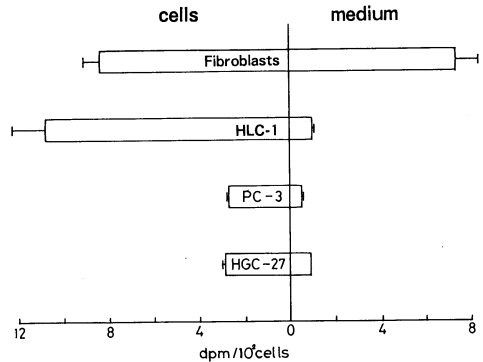


Fig. 12. The amount of radioactive hydroxyproline synthesized by cancer cell lines and fibroblasts. Cells in logarithmic growth phase were labeled with [³H] proline (5 μCi/ml) for 24 hr at 37°C in the presence of sodium ascorbate (50 μg/ml) and sodium α-ketoglutarate (3.4 mg/ml). The amount of radioactive hydroxyproline was analyzed. Determinations were done in triplicate and each point is expressed as the mean ± SD.

培養液中の [^3H]hydroxyproline の量は HLC-1 と比較して大差がなかった (Fig. 12).

線維芽細胞の培養液中の [^3H] hydroxyproline と細胞の中の [^3H] hydroxyproline の量に関して、対数増殖期のものと定常期のものを比較すると定常期の線維芽細胞の方が培養液中により多くの [^3H] hydroxyproline を含んでいた (Figs. 8, ~12).

考 察

最近、漸く癌細胞と癌間質細胞の相互作用が着目されて来たが、両細胞の相互作用は極めて複雑であるためになお未解決の点が多い。この生体内での複雑性を多少なりとも明解するために in vitro での実験を試み、著者の実験結果と今日までの報告とを比較検討した。

線維芽細胞による collagen 合成

炎症反応に基づく組織修復反応: 癌組織と正常間質組織との境界には往々にして炎症反応がみられ、時には癌組織内部にも炎症反応が波及していることがある。生体での創傷治癒過程において炎症後期に肉芽性炎として線維芽細胞が増殖し、collagen 増生を主とした組織修復が起こることは周知の事実である。癌間質の増生もこのような炎症に随伴する組織修復過程のひとつであると前田⁶⁾は結論している。他方、lymphokine 等免疫細胞の放出する物質が線維芽細胞の collagen 合成および細胞増殖を促進することを明らかにした研究がみられ、^{1), 5), 7), 8)} 免疫担当細胞が線維芽細胞の増殖ならびに collagen 合成を促進することを裏づける報告もみられるようになった。

しかし、T-細胞の存在しないヌードマウスにヒト癌細胞 (HGC-27, HLC-1) を移植した場合、angiogenesis を基盤として著明な collagen 増生が、リンパ球、マクロファージ等の mediated cell が介在しなくとも起こり得ることを木本^{7), 10)}が報告している。In vitro においても線維芽細胞と HLC-1 を混合培養した結果、collagen がネットワークを形成しながら増生しているのが観察され (Fig. 5)、炎症に

基づく組織修復のみから癌間質の collagen 増生を理解するには問題が残ると考えられる。

癌細胞による線維芽細胞の増殖および collagen 合成の促進: 線維芽細胞と HLC-1 を混合培養した後、両細胞数を算定し単独培養群と比較した結果、両細胞とも混合培養したものの増殖が亢進し、混合培養状態で相互に細胞増殖を促進したと考えられる (Fig. 2)。しかし飯田ら²⁹⁾は閉鎖培養系で KATO-III 型胃癌細胞 (印環細胞癌) を用いて同様の実験を行い、癌細胞は線維芽細胞の増殖を抑制すると報告している。この相違は使用した癌細胞の種類によるものか、あるいは実験法の相違によるものか明らかではないが、いずれにしても両細胞からの放出物質が相互に作用しあうことを示している。Delinassions ら³⁰⁾は線維芽細胞と HeLa 細胞を混合培養し [^3H] thymidin を取り込ませ、両者の間を [^3H] thymidin が移動することを報告している。細胞が相互に接触しておこる影響は、細胞間をある種の物質が移動することによって引き起こされる可能性も示唆されるが、今後検討したい。

癌細胞が放出する代謝産物の影響に関する報告によれば、癌細胞の conditioned medium は線維芽細胞の細胞増殖を高め²²⁾ collagen 合成を促進することが明らかにされている。^{21), 31)} また辻²²⁾は glycosaminoglycan の合成を促進することを報告している。著者も癌細胞 conditioned medium を用いて線維芽細胞を刺激した結果、細胞増殖には影響を認めなかったが、HGC-27 と PC-3 の conditioned medium が線維芽細胞の collagen 合成を促進すると考えられる所見を得た。

祖父江ら³²⁾は KATO-III 型胃癌細胞が chondroitin sulfate を含む extracellular matrix を合成分泌することを明らかにし、その matrix 上に植え込んだ線維芽細胞が著明に増殖することを報告している。以上の事実より癌細胞が線維芽細胞の増殖ならびに collagen 合成を直接刺激し促進することはほぼ間違いないと考えられる。

また木本^{7), 8), 10)}は炎症反応として出現する

リンパ球やマクロファージが、癌細胞—線維芽細胞の相互作用で出現した collagen 増生の促進に役立ち、ひいては癌進行や転移を阻止し得ることを重要視している。

癌細胞自身の collagen 合成

癌細胞に collagen 合成能があることは Green, Goldberg¹⁶⁾ によって 1965 年に報告されているが、それ以来培養細胞を用いて測定された研究結果が数多く報告されている。^{17)~21)} Langness¹⁷⁾ は collagen 合成のみならず prolyl hydroxylase 活性 (細胞内で合成された α -chain に含まれる proline を水酸化する酵素で, collagen 合成能の指標となる) も測定し、癌細胞や melanoma の細胞が極めて高い collagen 合成能を有することを強調している。Sakakibara¹⁸⁾ もヒト癌細胞が *in vitro* で collagen を合成することを明らかにし、ヌードマウスに移植しても collagen を産生することを認め、間質の collagen 形成に関与していると結論している。

一方、切除標本を用いた研究は Al-Adnani¹⁹⁾ によって報告され、硬性乳癌組織を免疫酵素抗体法で染色した結果、癌細胞に collagen 合成能があることを示し、間質の多量の collagen は反応性のものでなく、癌細胞自身の産物であると推定している。佐野¹⁴⁾ は患者から切除した胃硬性癌の hydroxyproline の定量を部位別に行い、また竹内¹⁵⁾ は光顕オートラジオグラフィにより、鉄のキレート剤を使用し protocollagen から procollagen への過程を抑制すれば、癌細胞にも銀粒子の集積がみられることを示し、癌細胞が collagen を産生することが胃硬性癌の成立の要因であると結論している。これに対し 飯田¹²⁾ は手術中に採取した胃硬性癌の組織片を [³H]-proline で処理し、電顕オートラジオグラフィを用いて検索した結果、胃硬性癌において膠原線維形成の主役をなすものは線維芽細胞であると反論している。永井³¹⁾ は KATO-III と MKN-28 (胃分化型腺癌) の collagen 合成能を測定し、両癌細胞に合成能を認めず、癌巣における collagen は間

質細胞由来であると結論している。

著者の実験結果からは **Figure 8** のように検索したすべての細胞に collagen 合成能があると考えられる。なかでも HLC-1 の細胞内の [³H] hydroxyproline の量は他の細胞に比して異常に高い。この細胞内の [³H] hydroxyproline の量から判断して、HLC-1 が他の癌細胞に比してより大きな collagen 合成能を有すると断定するために、さらに prolyl hydroxylase 等の定量を追加し、検討する予定である。竹内^{15), 33), 34)} は *cis*-fluoroproline のような proline 誘導体を加えると、それが取り込まれ異常な α -chain ができて水酸化されず、このようにして生成された protocollagen は、細胞外に分泌されないで細胞内に蓄積することを、オートラジオグラフィで観察している。このような観点から見れば HLC-1 には collagen 合成機構に異常があるのかも知れない。

HLC-1 と HGC-27 を移植されたヌードマウスの間質 collagen の増生は、HLC-1 よりも HGC-27 において顕著であったが、^{7)~9)} これらの collagen 増生は著者の実験結果からみて、癌細胞自身の collagen 合成よりも、癌細胞に影響された担癌生体の線維芽細胞の collagen 合成によるものと考えられる。すなわちヌードマウスの癌巣の collagen 増生源は線維芽細胞であると考えられる。この点についても木本⁸⁾ は glutaraldehyde で固定した癌細胞をヌードマウスに移植し、血管由来の間質細胞から collagen が増生することを指摘し、癌細胞膜の分子構築の変化が collagen 増生には重要であると指摘している。

今回の実験で線維芽細胞の collagen 合成が癌細胞との混合培養や相互作用により促進されること、ならびに癌細胞 (HLC-1, HGC-27, PC-3) に collagen 合成能があることが明らかになった。担癌生体の病巣では IV 型 collagen の増生が散在性にみられるが、³⁵⁾ 主として増生されるのは I 型と III 型であり、間質細胞由来の collagen が主体をなすと考えられる。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜った木本哲夫教授に謝意を捧げるとともに、難波正義助教授をはじめ御協力していただいた実験病理学教室室員各

位、ならびに組織培養免疫センターの皆様にご心よりお礼を申し上げます。

またコラーゲン合成測定法を御教授くださった皮膚科学教室旗持淳講師に深謝します。

文 献

- 1) Johnson, R. L. and Ziff, M.: Lymphokine stimulation of collagen accumulation. *J. clin. Invest.* 58: 240—252, 1976
- 2) Wahl, S. M., Wahl, L. M. and McCarthy, J. B.: Lymphocyte-mediated activation of fibroblast proliferation and collagen production. *J. Immunol.* 121: 942—946, 1978
- 3) Postlethwaite, A. E., Smith, G. N., Mainardi, C. L., Seyer, J. M. and Kang, A. E.: Characterization of a human lymphokine that stimulates fibroblasts to produce collagen. *Arthritis Rheum.* 24: s61, 1981
- 4) Korn, J. H.: Modulation of lymphocyte mitogen responses by co-cultured fibroblasts. *Cell Immunol.* 63: 374—384, 1981
- 5) Hibbs, M. S., Postlethwaite, A. E., Mainardi, C. L., Seyer, J. M. and Kang, A. H.: Alterations in collagen production in mixed mononuclear leukocyte-fibroblast cultures. *J. exp. Med.* 157: 47—59, 1983
- 6) 前田 守: 胃癌組織における fibronectin および関連血漿蛋白の分布—胃癌間質線維化形成に関する考察. *日外会誌* 85: 1454—1463, 1984
- 7) Kimoto, T.: Collagen and stromal proliferation as preventive mechanisms against cancer invasion by purified polysaccharides from human tubercle bacillus (SSM). *Cancer Detect. Prev.* 5: 301—314, 1982
- 8) 木本哲夫: 人型結核菌体抽出多糖体成分 (S. S. M.: 丸山ワクチン) の抗癌作用に関する研究—癌間質コラーゲン増殖による癌細胞「封じ込め」について. *川崎医学会誌* 10: 286—304, 1984
- 9) 木本哲夫: 人型結核菌体抽出多糖体 (S. S. M.) の癌増殖抑制に関する研究—癌細胞膜分子構築の変化に伴う間質反応とコラーゲン増殖 collagenesis. *川崎医学会誌* 10: 445—464, 1984
- 10) 木本哲夫: 人型結核菌体抽出多糖体成分 (S. S. M.: 丸山ワクチン) の抗癌作用に関する研究. *川崎医学会誌* 11: 153—177, 1985
- 11) 木本哲夫: 人型結核菌体抽出多糖体成分 (S. S. M.: Special Substance Maruyama) の抗癌作用に関する研究—末期癌剖検症例を中心とした癌の治療と結核の治療に関する病理学的考察. *川崎医学会誌* 11: 印刷中
- 12) 飯田 太: 胃硬性癌における膠原線維形成に関する電顕ラジオグラフィ的研究. *癌の臨床* 27: 37—39, 1981
- 13) Al-Adnani, M. S., Kirrane, J. A. and McGee, J. O'D.: Inappropriate production of collagen and prolyl hydroxylase by human breast cancer cells in vivo. *Br. J. Cancer* 31: 653—660, 1975
- 14) 佐野量造, 下田忠和, 竹内 正: スキルス (Linitis plastica) の組織発生に関する病理学的ならびに生化学的研究. *胃と腸* 9: 455—465, 1974
- 15) 竹内 正: 胃スキルスの生化学的研究—コラーゲン生合成の立場から—, *胃と腸* 11: 1321—1326, 1976
- 16) Green, H. and Goldberg, B.: Synthesis of collagen by mammalian cell lines of fibroblastic and nonfibroblastic origin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 53: 1360—1365, 1965
- 17) Laugness, U. and Udenfriend, S.: Collagen synthesis in nonfibroblastic cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71: 50—51, 1974

- 18) Sakakibara, K., Suzuki, T., Motoyama, T., Watanabe, H. and Nagai, Y.: Biosynthesis of an interstitial type of collagen by cloned human gastric carcinoma cells. *Cancer Res.* 42: 2019—2027, 1982
- 19) Declerck, Y. A., Bogenmann, E. and Jones, A.: Collagen synthesis by short-term explants of pediatric tumors. *Cancer Res.* 45: 1229—1238, 1985
- 20) Uchino, R., Nohara, T., Okamoto, E., Fukumoto, M. and Midorikawa, O.: Biosynthesis of various types of collagen by human hepatoma cells in vitro. *Virchows Arch. [Cell Pathol.]* 48: 229—236, 1985
- 21) Naito, Y., Kino, I., Horiuchi, K. and Fujimoto, D.: Promotion of collagen production by human fibroblasts with gastric cancer cells in vitro. *Virchows Arch. [Cell Pathol.]* 46: 145—154, 1984
- 22) 辻 克人: 胃硬性癌の線維化機序の研究: in vitro におけるヒト胃癌細胞の線維芽細胞に対する影響. *日消誌* 79: 931—939, 1982
- 23) Akagi, T. and Kimoto, T.: Establishment and Characteristics of a human lung adenocarcinoma cell line. *Gann* 67: 483—492, 1976
- 24) Akagi, T. and Kimoto, T.: Human cell line (HGC-27) derived from the metastatic lymph node of gastric cancer. *Acta Med. Okayama* 30: 215—217, 1976
- 25) Hatamochi, A., Fujiwara, K. and Ueki, H.: Effects of histamine on collagen synthesis by cultured fibroblasts derived from guinea pig skin. *Arch. Dermatol. Res.* 227: 60—64, 1985
- 26) Peterkofsky, B. and Prokop, D. J.: A method for the simultaneous measurement of the radioactivity of proline- C^{14} and hydroxyproline- C^{14} in biological materials. *Anal. Biochem.* 4: 400—406, 1962
- 27) Juva, K. and Prockop, D. J.: Modified procedure for the assay of 3H - or C^{14} -labeled hydroxyproline. *Anal. Biochem.* 15: 77—83, 1966
- 28) Berg, R. A.: *Methods in enzymology.* 82. Cunningham, L. W. and Frederiksen, D. W. eds. Academic press 1982, pp. 372—398.
- 29) 飯田 太, 永田哲士: 胃硬性癌における線維芽細胞のコラーゲン産生に及ぼす癌細胞の役割—組織培養の立場から—. *癌の臨床* 27: 1596—1600, 1981
- 30) Delinassios, J. G. and Kottaridis, S. D.: Interactions between human fibroblasts and HeLa cells in vitro. *Biol. Cell* 50: 9—16, 1984
- 31) 永井 裕, 砂田泰伸, 佐野順次郎, 小野寺敏, 新井克彦, 許斐博史, 林 利彦, 畑隆一郎, 堀 久枝, 田中 静子, 北岡久三: 胃スキルス の病態生化学的研究. *結合組織* 17: 40—44, 1985
- 32) 赤尾清剛, 祖父江三津子, 土井田誠, 築館一男, 中島伸夫, 竹内 純: 線維芽細胞の接着・増殖に対する胃癌培養細胞の細胞外マトリックスの影響. *結合組織* 17: 44—45, 1985
- 33) Takeuchi, T. and Prockop, D. J.: Biosynthesis of abnormal collagens with amino acid analogues. I. Incorporation of L-azetidine-2-carboxylic acid and cis-4-fluoro-L-proline into protocollagen and collagen. *Biochem. biophys. Acta* 175: 142—155, 1969
- 34) Takeuchi, T., Rosenbloom, J. and Prockop, D. J.: Biosynthesis of abnormal collagens with amino acid analogues. II. Inability of cartilage cells to extrude collagen polypeptides containing L-azetidine-2-carboxylic acid or cis-4-fluoro-L-proline. *Biochem. biophys. Acta* 175: 156—164, 1969
- 35) McArdle, J. P., Müller, H. K., Roff, B. T. and Murphy, W. H.: Basal lamina redevelopment in tumors metastatic to brain: An immunoperoxidase study using an antibody to type-IV collagen. *Int. J. Cancer* 34: 633—638, 1984