

前立腺癌細胞の浸潤に及ぼす癌—間質相互作用を介した HGF の役割

大阪大学大学院医学系研究科臓器制御医学専攻器官制御外科学講座（泌尿器科学）

（主任：奥山明彦教授）

西村 憲二， 高田 晋吾*， 三浦 秀信， 辻村 晃
北村 雅哉**， 野々村祝夫， 松宮 清美， 奥山 明彦

ROLE OF HEPATOCYTE GROWTH FACTOR IN INVASION OF PROSTATE CANCER CELL LINES THROUGH TUMOR-STROMAL INTERACTION

Kenji NISHIMURA, Shingo TAKADA, Hidenobu MIURA, Akira TSUJIMURA,
Masaya KITAMURA, Norio NONOMURA, Kiyomi MATSUMIYA and Akihiko OKUYAMA

*From the Department of Specific Organ Regulation (Urology),
Osaka University Graduate School of Medicine*

We examined how prostate stromal cell-derived hepatocyte growth factor (HGF) affects invasion of prostate cancer cells through tumor-stromal interaction. The effects of HGF, various growth factors [transforming growth factor (TGF)- α , TGF- β 1, basic fibroblast growth factor, keratinocyte growth factor, and platelet-derived growth factor], and conditioned medium (CM) from prostate stromal cells (PrSC) on prostate cancer cells (LNCaP, PC-3 and DU145) were determined by collagen gel invasion assay. DU145 cells and PrSC were co-cultured for matrigel invasion chamber assay. LNCaP and PC-3 cells did not respond to any of the factors examined. Invasion of DU145 cells into the collagen gel matrix was induced by HGF and TGF- β 1, but not by any of the other factors tested. When DU145 cells were cultured in CM from PrSC or co-cultured with PrSC, the cells acquired invasive potential, and this invasion was inhibited by an antibody against HGF, but not against TGF- β 1. Induction activity of CM from cancer cells to stimulate HGF production by PrSC was studied by ELISA method and Western blotting. Native type HGF production in PrSC was enhanced by some unknown inducer(s) produced by cancer cells. In summary, PrSC-derived HGF enhanced invasive activity of the prostate cancer cell line DU145 through tumor-stromal interaction wherein DU145 cells secreted some HGF-inducer(s) for PrSC.

(Acta Urol. Jpn. 46 : 769-774, 2000)

Key words : Hepatocyte growth factor, Prostate cancer, DU145, Prostate stromal cell, Tumor-stromal interaction

緒 言

前立腺組織は腺性上皮から成る腺組織と、その周囲を取り囲むように存在する平滑筋線維や間質より成り立っている。前立腺癌は浸潤能を獲得すると周囲組織に浸潤し、潜在癌から臨床的に明らかな癌へと成長していく¹⁾。前立腺間質細胞から分泌される様々な増殖因子はパラクリン機構で前立腺癌に働きかけるため、前立腺癌の浸潤能獲得機構において上皮—間質相互作用（癌—間質相互作用）は重要な役割を果たしているといえる²⁾。HGF (hepatocyte growth factor :

肝細胞増殖因子) は当初、強力な肝再生因子として報告されたが³⁾、最近では様々な種類の細胞に対してマイトゲン、モートゲンおよびモルフォゲンの作用を有していることが知られている⁴⁾。HGF はおもに間質細胞や間葉系細胞から産生され、上皮細胞を中心とした様々な種類の細胞に作用するため上皮—間質相互作用（癌—間質相互作用）のメディエーターの1つとして考えられている。前立腺癌の増殖や進展に対するHGF やそのレセプターである c-MET に関する論文は散見され^{5,6)}、われわれも前立腺癌細胞における c-MET の発現や HGF の作用を報告したが (Table 1)⁷⁾、癌—間質相互作用における HGF の役割に関してはまだ十分に解明されていない。そこで今回われわれは前立腺癌細胞の浸潤に及ぼす癌—間質相互作用を

* 現：大阪厚生年金病院泌尿器科

** 現：国立大阪病院泌尿器科

Table 1. Relationship between c-MET expression and HGF response in human prostate cancer cell lines to androgen sensitivity

Cell line	Androgen sensitivity	c-MET expression	HGF response
LNCaP	+	-	-
PC-3	-	+	-
DU145	-	+	+

介した HGF の役割について検討した。

対象と方法

1 材料

ヒト前立腺癌細胞株として LNCaP, PC-3, DU145 を、前立腺間質細胞は正常ヒト前立腺ストローマ細胞を使用した⁸⁾ 間質細胞と各々の癌細胞からの培養上清を準備するために間質細胞を 5% 胎児牛血清 (fetal calf serum: FCS) で、癌細胞は FCS(-) で 2 日間培養し、その上清を回収、遠沈し実験開始まで 4°C で保存しておいた。間質細胞の上清は collagen gel invasion assay に、癌細胞の上清は ELISA 法と Western blotting に供した。

Recombinant human HGF, 抗 HGF 抗体は大阪大学医学部腫瘍生化学教室中村敏一教授より供与を受けた³⁾ Recombinant human transforming growth factor (TGF)- α , recombinant human TGF- β 1, recombinant bovine basic fibroblast growth factor (bFGF), recombinant human keratinocyte growth factor (KGF), recombinant human platelet-derived growth factor (PDGF) および TGF- β 1 抗体はそれぞれ購入したものを使用した⁹⁾

2. Collagen gel invasion assay

1.0×10^5 /ml の濃度の各々の癌細胞, type I collagen 溶液 (Cellmatrix, Type I-A, Nitta gelatin, Japan), 培養液 (Dulbecco's modified Eagle's medium; DMEM) および FCS を各々 1:7:1:1 の体積比で氷上で混ぜ、4-well の dish にまき、37°C で gel 化した。Gel 上に各種増殖因子の入った 5% FCS の DMEM を加え、3 日毎に同条件の medium を交換していった。12日間培養し、その細胞や細胞集塊の形態変化を位相差顕微鏡にて毎日観察した。

間質細胞の培養上清の効果を調べるため、増殖因子入りの medium の代わりに保存しておいた間質細胞の培養上清を gel 上に加えた。また DU145 に関しては HGF 抗体と TGF- β 1 抗体を別々に 10 μ g/ml の濃度で加え、3 日毎にこれも交換した。

3. Matrigel invasion chamber assay による共培養

Biocoat matrigel invasion chambers (Nippon Bioclon Dickinson, Japan) を用いて実験した。24-well

の plate 内で subconfluent になった間質細胞の medium を FCS(-) の DMEM に交換した後、matrigel が coat された内側の chamber に 5.0×10^4 /ml の濃度の DU145 を 0.5 ml 添加した。48時間共培養した後にメンブランを Diff-Quick Stain Kit (Green Cross, Japan) で染色し、matrigel を貫通した細胞数をカウントし浸潤能を評価した。また外側の medium 内に HGF と TGF- β 1 に対する抗体を別々に入れ、それらの効果も検討した。貫通した細胞はランダムに 5 視野選択してその平均を算出、これを 3 回行いコントロールに対する比率で評価した。

4. 前立腺間質細胞培養上清の HGF 濃度測定

間質細胞が 24-well plate で confluent に到達した後、PBS(-) 溶液 (phosphate-buffered saline without calcium or magnesium) で洗浄し、各種癌細胞の上清を加え培養した。24時間培養した後その medium 内の HGF 濃度を ELISA kit にて測定した。

5. Western blotting

間質細胞が 6-well plate で confluent に到達した後、PBS(-) 溶液で洗浄し、各種癌細胞の上清を加え24時間培養した。その上清を Centricon 10 concentrator (Amicon, USA) で10倍に濃縮し (volume: 200 μ l), 蛋白濃度を測定した。30 μ g の蛋白を10% acrylamide gel に電気泳動し、その後 polyvinylidene difluoride membrane (Bio-Rad, USA) にトランスファーした。ブロッキング後、1次抗体として抗 HGF 抗体、2次抗体として peroxidase labelled anti-rabbit antibody を用い、ECLTM detection kit にて signal を検出した。

6. 統計学的検討

Collagen gel invasion assay において各種増殖因子と間質細胞の上清の癌細胞の浸潤能に対する効果をみるために DU145 の細胞集塊を形態学的所見から定量した。ランダムに選んだ10カ所の写真を撮り、NIH image 1.55 を用いて各々の細胞集塊の面積 (S) と外周計 (L) を測定した。次元をそろえるために L^2/S を計算し、その平均を比較した。この L^2/S は各々の細胞集塊が円形から樹枝状に変化するにしたがい増加するので、癌細胞の浸潤能を表わしている。統計学的検討は Mann-Whitney U-test に準じて行った。

結 果

1. 各種増殖因子と前立腺間質細胞の培養上清による前立腺癌細胞浸潤の誘導

コントロールの条件下においては LNCaP の細胞集塊は平滑な表面をもつ円形を呈し、PC-3 は集塊を形成せずに分散して増殖した。また各種増殖因子や間質細胞の上清を加えた場合には LNCaP は反応せず、PC-3 はコントロールと同様に分散して増殖するため

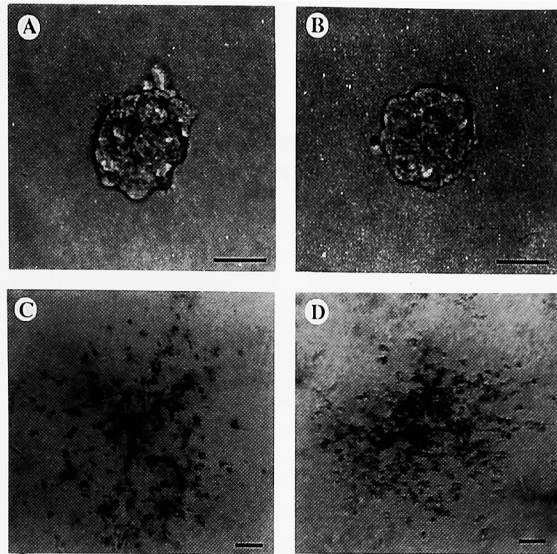


Fig. 1. Morphological effects of growth factors and conditioned medium (CM) from prostate stromal cells (PrSC) on LNCaP and PC-3 cells in collagen gel. A, B: LNCaP, C, D: PC-3, [A, C: control (DMEM only), B, D: CM from PrSC (The effects of growth factors on these cancer cells were the same as those of the CM from PrSC)]. Bars; 100 μ m.

その効果は判定できなかった (Fig. 1).

一方 DU145 の場合, コントロールでは LNCaP の場合と同様に円形の細胞集塊を形成するが, HGF または TGF- β 1 の存在下においてその集塊は collagen gel の中に樹枝状に浸潤していく像が観察された. TGF- α , bFGF, KGF および PDGF に対しては反応しなかった (Fig. 2, 3). また間質細胞の培養上清に対しても DU145 の細胞集塊は樹枝状の浸潤形態を呈した. DU145 が外因性の HGF と TGF- β 1 に反応したことから各々の抗体を別々に添加したところ, その樹枝状形態は HGF に対する抗体により完

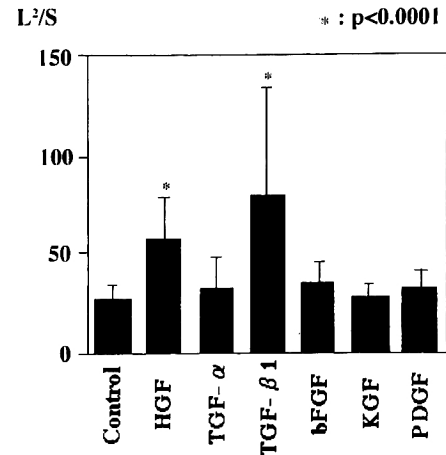


Fig. 3. Semiquantitative analysis of morphological effects of growth factors on DU145 cells in collagen gel. The data shown represent the mean and standard deviation of the evaluated clusters of ten randomly selected fields ($n=111$, control; 58, HGF; 61, TGF- α ; 55, TGF- β 1; 58, bFGF; 49, KGF; 45, PDGF). * $p<0.0001$ compared with control.

全にブロックされたが, TGF- β 1 に対する抗体ではブロックされなかった. このことより, 間質細胞の培養上清に含まれている HGF がその樹枝状変化を起しているものと思われた (Fig. 4).

2. Matrigel invasion chamber assay における共培養による相互作用の効果

DU145 と間質細胞を共培養したところ matrigel を貫通する癌細胞数は共培養しないコントロールと比べて増加した. この共培養による浸潤能の増加は HGF に対する抗体により完全にブロックされたが, TGF- β 1 に対する抗体ではブロックされなかった. このことは collagen gel invasion assay の結果と同様に間質細胞の培養上清に含まれている HGF が DU145 の浸

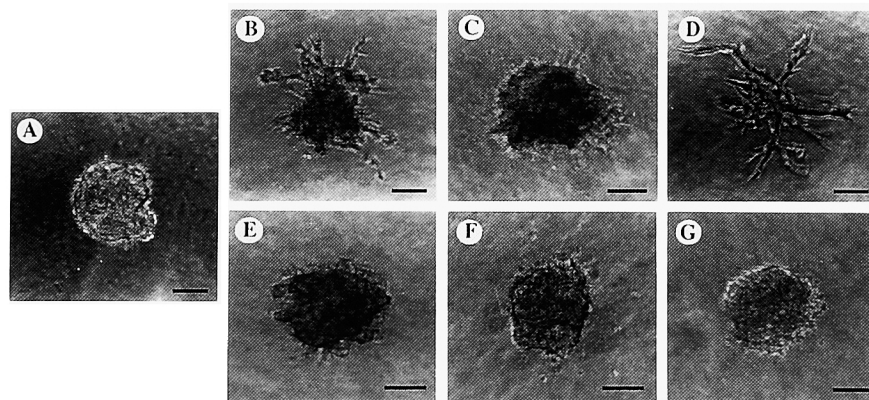


Fig. 2. Morphological effects of growth factors on DU145 cells in collagen gel. A: control (DMEM only), B: HGF, C: TGF- α , D: TGF- β 1, E: bFGF, F: KGF, G: PDGF. Growth factors were added at 10 ng/ml. Bars; 100 μ m.

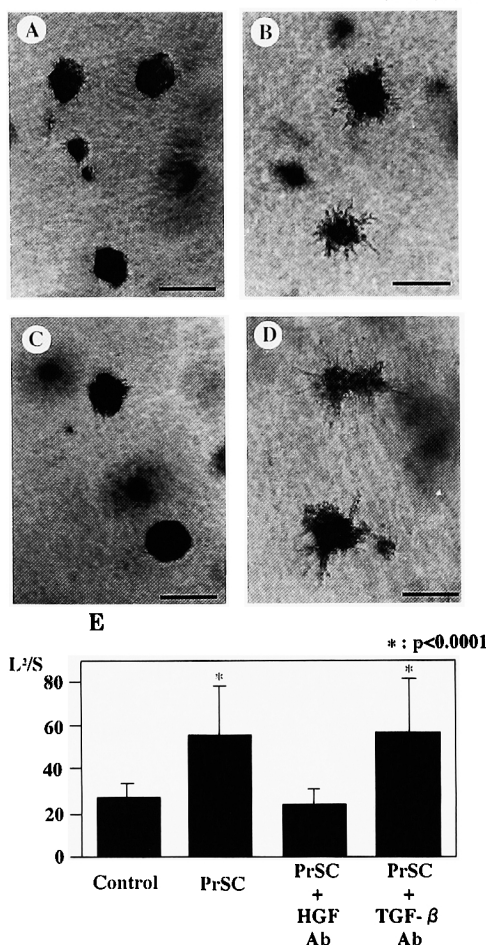


Fig. 4. Effects of CM from PrSC or antibody against HGF or TGF- β 1 in the medium on invasion of DU145 cells cultured in collagen gel. DU145 cells were cultured for 12 days in CM from PrSC only, or with addition of antibody against HGF or TGF- β 1 in the medium. A: control (DMEM only), B: PrSC, C: PrSC with HGF antibody, D: PrSC with TGF- β 1 antibody. Bars; 250 μ m. E: The L^2/S data shown represent the mean and standard deviation of the evaluated clusters of ten randomly selected fields (n=111, control; 84, PrSC; 106, PrSC with HGF antibody; 108, PrSC with TGF- β 1 antibody). * $p < 0.0001$ compared with control.

潤能増加を起しているものと思われた (Fig. 5).

3. 前立腺間質細胞の HGF 産生に対する前立腺癌細胞の培養上清の効果

間質細胞は通常でも HGF を産生しているが、癌細胞の培養上清の存在下でその産生は増加した。その効果は LNCaP に比べ PC-3 と DU145 の方が高かった (Fig. 6A)。

HGF には軽度の生物学的活性を持ち自然に存在する variant が存在していることが知られているが⁹⁾、Western blotting の結果より、間質細胞は 85 kDa の native type HGF を発現し、癌細胞の培養上清がそ

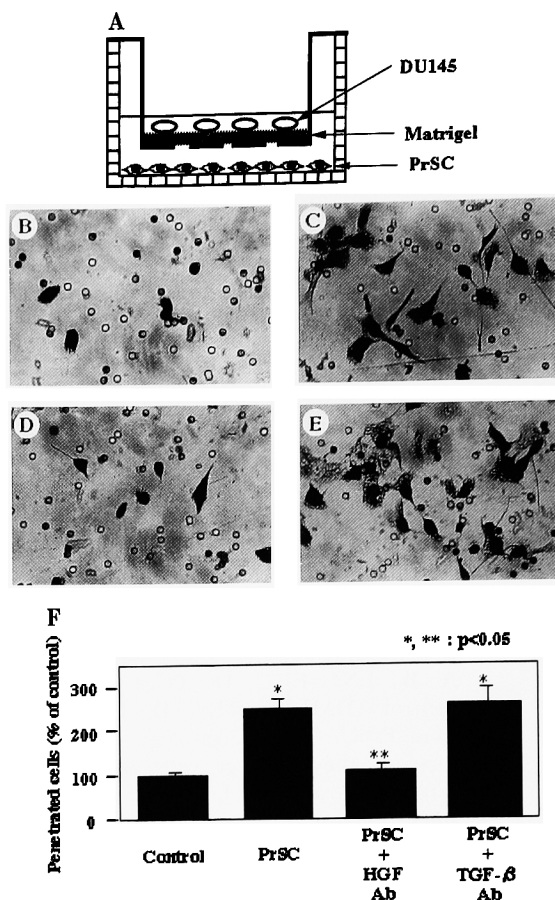


Fig. 5. In vitro invasion assay of DU145 cells co-cultured with PrSC. Cells penetrating the matrigel barrier were stained black. A: Diagram of the matrigel invasion chamber of DU145 cells co-cultured with PrSC. The membrane pore size is 8 μ m. B: control (without PrSC), C: co-culture, D: co-cultured with HGF antibody, E: co-cultured with TGF- β 1 antibody, F: Relationship between the ratio to the mean value of control and each condition. Cells penetrating the matrigel barrier were counted microscopically. * $p < 0.05$ compared with control. ** $p < 0.05$ compared with co-culture only.

の発現を促進していることが判明した (Fig. 6B)。

考 察

HGF は器官形成や組織再生において上皮-間質相互作用のメディエーターの1つとして考えられているが、最近では癌-間質相互作用を通して癌細胞の増殖や浸潤に重要な役割を果たしていることが報告されている^{10,11)}。今回われわれは外因性の HGF と TGF- β 1 が DU145 の collagen gel への浸潤能を増強したことを示した。同様の増強効果は間質細胞の培養上清を添加した場合や間質細胞と共培養した場合のいずれ

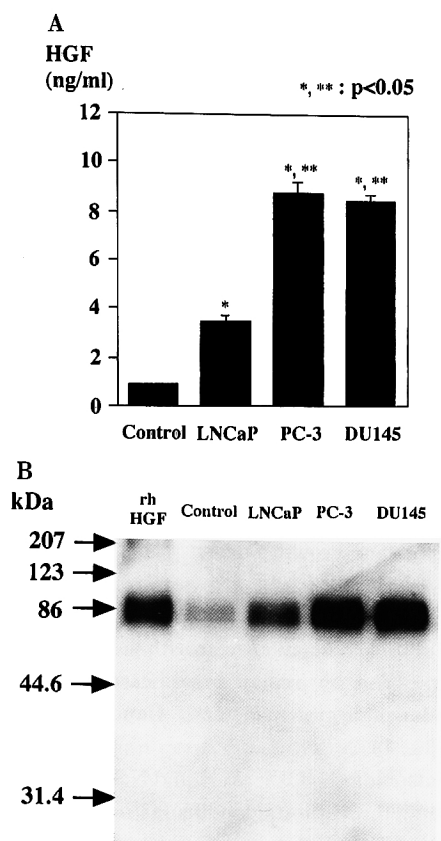


Fig. 6. A: Effects of conditioned medium (CM) from prostate cancer cells on stimulation of HGF production in PrSC. The data shown represent the mean and standard deviation of HGF concentration ($n=3$). * $p < 0.05$ compared with control. ** $p < 0.05$ compared with LNCaP. No HGF was detectable in the CM from cancer cells (data not shown). B: Effects of CM from prostate cancer cells on stimulation of native HGF (85 kDa) expression in PrSC. The first lane shows recombinant human HGF (10 ng) as an authentic sample. No bands were seen in the CM from cancer cells (data not shown).

でも観察され、この効果は HGF に対する抗体により完全にブロックされたが、TGF- β 1 に対する抗体ではブロックされなかった。TGF- β は上皮-間質相互作用のメディエーターの 1 つとして良性、悪性共に前立腺の成長に寄与していることは広い範囲で報告されており、前立腺の主要な増殖因子の 1 つとして認識されている。しかし今回のわれわれの示したデータによると DU145 の浸潤能を促進したのは間質細胞由来の HGF であり、TGF- β ではなかった。すなわちある種の前立腺癌において HGF は、唯一のものではないにしろ、少なくとも癌-間質相互作用における癌細胞の浸潤能獲得においては key factor の 1 つであることが示唆される。この HGF と線維芽細胞との

相互作用は他の癌細胞に関しても研究されているが^{10,11)}、われわれの研究は前立腺の癌細胞と前立腺の間質細胞を用いることにより in vivo での相互関係を模倣しており、より現実の状況に即した結果であるといえる。

最近、癌細胞が線維芽細胞における HGF 産生を促す inducer を分泌し、その間質由来の HGF によりこれらの癌細胞が浸潤能を獲得していくといった報告がなされている¹⁰⁻¹²⁾。インターロイキン-1, epidermal growth factor, TGF- α , bFGF, PDGF およびプロスタグランディンなどは癌細胞から分泌される HGF-inducer であることが知られている^{10,13)}。われわれは前立腺癌の培養上清が間質細胞からの成熟した native type HGF 産生を促進したことを示したが、上記の inducer のリガンドやレセプターに対する特異的な抗体では間質細胞からの HGF 産生促進をブロックできなかった (data not shown)。前立腺癌から分泌される HGF-inducer の証明や特徴づけに関しては今後の研究を待たねばならないが、前立腺癌が HGF-inducer を産生していることは癌-間質相互作用において非常に興味深いと思われる。

今回われわれは間質細胞由来の HGF が DU145 の浸潤能を高めたことを示したが、LNCaP と PC-3 は HGF-inducer を産生しているにもかかわらず間質細胞由来の HGF に反応しなかった。LNCaP には HGF のレセプターである c-MET が発現しておらず^{5,7)}、HGF の標的細胞ではないように思われる。PC-3 は c-MET を発現しているが^{5,7)}、collagen gel の中で細胞集塊を形成せず分散し、間質細胞由来の HGF に対しても形態学的に反応しなかった。PC-3 がもともと集塊を形成せず分散して増殖する特徴を持つ理由として、E-カドヘリンが関連した細胞接着経路が α -カテニン遺伝子発現の欠如により機能しなくなっている可能性が考えられている¹⁴⁾。HGF はカドヘリンを介した過程を調節することにより細胞間の分離を促進していると言われており¹⁵⁾、PC-3 が HGF に反応しないのは c-MET レセプター以後のカドヘリン-カテニン機構の欠如によるかもしれない。

間質の線維芽細胞から分泌される様々な増殖因子が、癌細胞の浸潤や転移にパラクライン機構において関連していることは以前より報告されている。口腔の線維芽細胞の培養上清から精製された chemotactic factor は口腔癌細胞の運動性を促進し¹⁶⁾、in vivo においては様々な種類の癌細胞をヌードマウスに皮下注射する際には、線維芽細胞そのものやその培養上清と共に癌細胞を注入することが腫瘍形成に必要であることがいわれている¹⁷⁾。前立腺癌細胞に関しては、ヒトの骨や前立腺の線維芽細胞が LNCaP の腫瘍形成を促進し、そのパラクライン機構に関与した増殖因子

は bFGF である可能性を示唆している¹⁸⁾ 今回、われわれは DU145 が自ら HGF-inducer を分泌して間質細胞からの HGF 産生を高め、その高められた HGF により浸潤能を獲得していることを証明した。これらのパラクライン機構モデルは、癌細胞が癌-間質相互作用を介して自らにシグナルをフィードバックさせるといったオートクライン機構に似たモデルでもあり、きわめて興味深いものと思われる。

結 語

ヒト前立腺癌細胞株である DU145 は前立腺間質細胞からの HGF 産生を促進する何らかの HGF-inducer を分泌し、その増加した間質細胞由来の HGF が DU145 の浸潤能を促進した。このような前立腺癌細胞の独特な癌-間質相互作用において、HGF が癌細胞の浸潤を制御する主要因子の 1 つである可能性が示唆された。

文 献

- 1) Pienta KJ: Etiology, epidemiology, and prevention of carcinoma of the prostate. In Campbell's Urology. Edited by Walsh PC, Retik AB, Vaughan Jr. ED, et al. 7th ed., pp. 2489-2496, WB Saunders Co, Philadelphia, 1998
- 2) Culig Z, Hobisch A, Cronauer MV, et al.: Regulation of prostatic growth and function by peptide growth factors. *Prostate* **28**: 392-405, 1996
- 3) Nakamura T, Nishizawa T, Hagiya M, et al.: Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor. *Nature* **342**: 440-443, 1989
- 4) Matsumoto K and Nakamura T: Emerging multipotent aspects of hepatocyte growth factor. *J Biochem* **119**: 591-600, 1996
- 5) Humphrey PA, Zhu X, Zarnegar R, et al.: Hepatocyte growth factor and its receptor (c-MET) in prostatic carcinoma. *Am J Pathol* **147**: 386-396, 1995
- 6) Pisters LL, Troncoso P, Zhau HE, et al.: c-met proto-oncogene expression in benign and malignant human prostate tissues. *J Urol* **154**: 293-298, 1995
- 7) Nishimura K, Kitamura M, Takada S, et al.: Regulation of invasive potential of human prostate cancer cell lines by hepatocyte growth factor. *Int J Urol* **5**: 276-281, 1998
- 8) Nishimura K, Kitamura M, Miura H, et al.: Prostate stromal cell-derived hepatocyte growth factor induces invasion of prostate cancer cell line DU145 through tumor-stromal interaction. *Prostate* **41**: 145-153, 1999
- 9) Itakura Y, Yamamoto T, Matsumoto K, et al.: Autocrine stimulation of motility in SBC-5 human lung carcinoma cells by a two-kringle variant of HGF. *Cancer Lett* **83**: 235-243, 1994
- 10) Nakamura T, Matsumoto K, Kiritoshi A, et al.: Induction of hepatocyte growth factor in fibroblasts by tumor-derived factors affects invasive growth of tumor cells: in vitro analysis of tumor-stromal interactions. *Cancer Res* **57**: 3305-3313, 1997
- 11) Matsumoto K, Date K, Shimura H, et al.: Acquisition of invasive phenotype in gallbladder cancer cells via mutual interaction of stromal fibroblasts and cancer cells as mediated by hepatocyte growth factor. *Jpn J Cancer Res* **87**: 702-710, 1996
- 12) Seslar SP, Nakamura T and Byers SW: Regulation of fibroblast hepatocyte growth factor/scatter factor expression by human breast carcinoma cell lines and peptide growth factors. *Cancer Res* **53**: 1233-1238, 1993
- 13) Matsumoto K, Okazaki H and Nakamura T: Novel function of prostaglandins as inducers of gene expression of HGF and putative mediators of tissue regeneration. *J Biochem* **117**: 458-464, 1995
- 14) Morton RA, Ewing CM, Nagafuchi A, et al.: Reduction of E-cadherin levels and deletion of the α -catenin gene in human prostate cancer cells. *Cancer Res* **53**: 3585-3590, 1993
- 15) Tannapfel A, Yasui W, Yokozaki H, et al.: Effect of hepatocyte growth factor on the expression of E- and P-cadherin in gastric carcinoma cell lines. *Virchows Archiv* **425**: 139-144, 1994
- 16) Sugiura T, Shirasuna K, Hayashido Y, et al.: Effects of human fibroblasts on invasiveness of oral cancer cells in vitro: isolation of a chemotactic factor from human fibroblasts. *Int J Cancer* **68**: 774-781, 1996
- 17) Grey AM, Schor AM, Rushton G, et al.: Purification of the migration stimulating factor produced by fetal and breast cancer patient fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 2438-2442, 1989
- 18) Gleave M, Hsieh JT, Gao C, et al.: Acceleration of human prostate cancer growth in vivo by factors produced by prostate and bone fibroblasts. *Cancer Res* **5**: 3753-3761, 1991

(Received on January 14, 2000)

(Accepted on January 25, 2000)