

厚生省がん克服戦略研究事業
分担研究報告書

分野 1 がん細胞における悪性形質獲得の分子機構の把握およびその制御
機構の解明 (主任研究者 横田 淳)

分担研究課題 プログラム細胞死の制御機構に関する研究

分担研究者 口野 嘉幸 国立がんセンター研究所生物物理部長

研究要旨： c-Myc依存性アポトーシスの生理的意義を明らかにする目的でカスパーゼカスケードの上流域でのシグナル伝達機構の解析を行った。その結果紫外線照射や抗癌剤処理によって細胞内のストレスキナーゼカスケードが活性化され、活性化されたJNKがc-MycのN末端から62番目と71番目のセリン残基を選択的にリン酸化し、c-Mycの安定化に貢献していることを突き止めた。これとは別にヒトの細胞にアポトーシス以外にもう一つ細胞死誘導プログラムが存在するのを見い出した。アポトーシスが核の形態変化を特徴とし、一群のシステインプロテアーゼ（カスパーゼ）によって細胞死の実行が制御されているのに対し、今回われわれが見い出した細胞死は細胞質での空胞形成を主体とするもので、カスパーゼ非依存的な機構で制御されている。これらの発見は、細胞のがん化におけるプログラム細胞死の役割や、がん細胞における悪性形質獲得の分子機構を知る上で非常に重要で意義深い。

A. 研究目的

アポトーシスを含むプログラム細胞死は、生体（細胞）の恒常性維持に重要な役割を果たしており、その制御異常はがんを含めた様々な疾患の発生原因となっている。またプログラム細胞死に対する耐性能の獲得が細胞のがん化やがん細胞の転移のプロセスと密接な関係にあることもわかってきた。このようなことからプログラム細胞死に関する研究はがん細胞における悪性形質獲得の分子機構を理解していく上で非常に重要であるといえる。そこで本研究ではわれわれが独自に開発した実験系を用いてアポトーシスを中心にプログラム細胞死の分子機構を明らかにし、そこからえられる情報をもとに細胞のがん化におけるプログラム細胞死の役割を明らかにするとともに、プログラム細胞死を標的とした新たながんの治療法を開発していくことを主な目的とした。

B. 研究方法

1. 遺伝子導入細胞の樹立：Rat-1細胞に、CMVプロモーターに接続し、恒常的発現を期待できるようにしたc-myc遺伝子を、またヒトグリオーマ

細胞にtet-off systemの制御下で発現の誘導を期待できる野生型H-ras, 活性型rasV12, 優性抑制型rasN17遺伝子をそれぞれ導入し、導入された遺伝子を発現する細胞株を樹立した。

2. アポトーシスの判定はアクリジンオレンジ染色法、TUNEL法および顕微鏡による細胞形態観察などの手法を用いて行った。

3. 細胞死はトルイジンブルーを用いたdye-exclusion assayを行って判定した。

(倫理面への配慮)

本研究は現在のところネズミやヒトの培養細胞を中心に行われているので特に倫理面への配慮は必要ないと思われるが、今後ヒトの癌組織での細胞死制御因子の発現状況を検索する必要性がでてくる。その際には共同研究を予定している施設の責任者、とくに担当医師や病理の先生方と充分協議を行い、臓器片の使用等に際して倫理面での問題が生じないよう最善を尽くす。

C. 研究結果

1. アポトーシス制御機構：c-Myc依存性アポトーシスのシグナル伝達機構の全体像を分子レベル

で理解するとともに、その生理的意義を知る目的で、紫外線照射や抗癌剤処理などの細胞外刺激によって励起されるアポトーシスシグナルの伝達機構の解析を行った。その結果次の点が明らかとなった。(a). 紫外線照射などによってストレスキナーゼカスケードAsk-JNKが活性化され、活性化されたJNKによってc-MycのN末端から62番目と71番目のセリン残基が選択的にリン酸化されることを突き止めた。(b). これらセリン残基のリン酸化によってc-Mycの安定性が増し、その結果としてc-Mycの機能昂進が図られていることを見出した。

2. 非アポトーシス性プログラム細胞死について次の点が明らかとなった。(a). がん遺伝子H-rasの発現によってヒトのがん細胞にアポトーシスとは細胞形態学的特徴を異にした細胞死が誘導されることを見出した。この細胞死では核やミトコンドリアでの顕著な形態変化は認められず、代わりに細胞質においてリソソーム由来の空胞の形成が顕著に認められた。(b). H-Ras依存性のこの細胞死はz-VAD-fmkやz-Asp-CH₂-DCBなどのカスパーゼ阻害剤や、アポトーシス抑制因子Bcl-2の高発現によっても阻害されなかった。(c). H-Rasの下流のエフェクター分子であるPI3Kの阻害剤やautophagyの阻害剤である3-methyladenineによって細胞死誘導が抑制された。(d). H-Rasの発現によって細胞死が誘導された細胞ではTUNEL分析が陰性であった。

D. 考察

これまでc-Mycにアポトーシス誘導能が存在することは知られていたが、その生理的意義については未だ明らかではない。この点を明らかにするためには生理的条件下でのc-Myc依存性アポトーシスのシグナル伝達機構を明らかにする必要がある。そこで本研究では紫外線照射や抗癌剤処理によって誘導されるアポトーシスへのc-Mycの関わり方について検討した。その結果紫外線照射や抗癌剤処理によって細胞内のストレスキナーゼカスケードが活性化され、活性化されたJNKがc-MycのN末端から62番目と71番目のセリン残基を特異的にリン酸化し、c-Mycの安定性とその機能昂進をもたらすことがわかった。これらの研究成果はこれまでにわれわれが明らかにしたカスパーゼカスケードより下流のシグナル伝達機構に関する情報と相俟って、がんの発生や進展におけるc-Myc依存性アポトーシスの役割を考えていく上で非常に重要で意義深い。また今回これまでc-Myc依存性アポトーシスなどに対して抑制因子として機能すると考えられていたがん遺伝子産物H-Rasに、

カスパーゼ非依存的非アポトーシス性細胞死を誘導する能力が備わっていることを示したことは、ヒト細胞に分子機構を異にする2種類の細胞死プログラムの存在を示すもので、世界的な感心を呼んでいる。これらの研究成果はまた細胞のがん化やがん細胞における悪性形質獲得の分子機構の解明を図っていく上で多くの情報をもたらすと同時に、未だ不明な点が多いアルツハイマーやパーキンソンなどの神経変性疾患をはじめとした多くの疾患の発生原因の究明に貢献できると思われる。またとくに非アポトーシス性細胞死誘導プログラムの発見は、アポトーシス耐性を獲得している多くのヒトがんに対する新たな治療法の開発に利用できるものとして期待されている。

E. 結論

c-Myc依存性アポトーシスにおけるカスパーゼカスケードの上流域でのシグナル伝達機構が解明されたことで、c-Myc依存性アポトーシスのシグナル伝達系の全容を理解できるようになった。またヒト細胞にアポトーシスとは異なった分子機構で制御される細胞死プログラムが存在していることが明らかとなった。この発見はアポトーシスに関する研究と相俟って、がん細胞における悪性形質獲得の分子機構の把握に大きく貢献できるものと確信している。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Noguchi, K., Yamana, H., Kitanaka, C., Mochizuki, T., Kokubu, A. and Kuchino, Y. Differential Role of the JNK and p38 MAPK Pathway in c-Myc- and s-Myc-Mediated Apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 267: 221-227 (2000)
2. Narita, Y., Asai, A., Kuchino, Y. and Kirino, T. Actinomycin D and staurosporine, potent apoptosis inducers in vitro, are potentially effective chemotherapeutic agents against glioblastoma multiforme. *J. Cancer Chemother. Pharmacol.* 45: 149-156 (2000)
3. Liang, A., Bruenen-Nieweler, C., Muramatsu, T., Kuchino, Y., Beier, H. and Heckmann, K. The ciliate *Euplotes octocarinatus* expresses two polypeptide

stop codon recognition by eRF1: a wobble hypothesis for peptide anticodons. FEBS Lett., 488: 105-109 (2001)

5. Noguchi, K., Kokubu, A., Kitanaka, C., Ichijo, H. and Kuchino, Y. ASK1-signaling promotes c-Myc protein stability during apoptosis. Biochem. Biophys. Res. Commun., 281: 1313-1320 (2001)

6. 野嘉幸: プログラム細胞死と疾患. 和光純薬時報, 68: 22-23 (2000)

7. 野嘉幸: Mycファミリー. Apoptosis Watch for Cancer Chemotherapy, 2(4): 13 (2000)

8. 北中千史, 野嘉幸: カスパーゼ非依存的細胞死—アポトーシスとは異なるプログラム細胞死の存在. Molecular Medicine, 37: 408-418 (2000)

9. 野嘉幸: アポトーシス. がん看護, 南江堂, 5: 222-23 (2000)

10. 野嘉幸: 紫外線とアポトーシス. 生物の光障害とその防御機構 (市橋正光・佐々木政子編), 共立出版(株), pp.166-176 (2000)

学会発表

1. Noguchi, Y., Kitanaka, C. and Kuchino, Y. Regulation of c-Myc through Phosphorylation at Ser-62 and -71 by c-Jun N-Terminal Kinase, がん重点特定領域研究 第4回「先端がん」若手カンファレンス(茅野), 2000年1月28-31日

2. Noguchi, K., Kitanaka, C. and Kuchino, Y. Sensitization of c-Myc-mediated apoptotic signal by JNK pathway through phosphorylation of c-Myc at Ser-62 and Ser-71, AACR Spedal Conference: "Programmed Cell Death Regulation", Nevada, USA, Feb. 27-March 2, 2000

3. 村松知成, Heckmann, K., 野嘉幸, 真核生物eRF1による終止コドン認識機構, 第2回RNA学会(東京) 2000年7月31日-8月2日

4. 松岡洋一郎, 深町勝巳, 鳥山一馬場弘晴, 北中千史, 野嘉幸, 津田洋幸. ヒトc-Ha-rasトランスジェニックラット由来腫瘍細胞に高発現するRasの標的候補遺伝子RNLR-3の単離と機能解析, 第15回発癌病理研究会(穂高), 2000年8月29-31日

5. 村松知成, 渡部暁, 野嘉幸. ATP依存性プロテアーゼLonの活性化機構, 文部省特定領域研究(A)「シンクロトロン放射光による生物マシーナ

リーの構造生物学」第3回ワークショップ(札幌), 2000年8月17-19日

6. 北中千史, 野嘉幸. Rasシグナル伝達因子により制御される非アポトーシス性プログラム細胞死の神経芽腫の自然退縮における役割, 第59回日本癌学会総会(横浜), 2000年10月4-6日

7. 櫻田香, 北中千史, 野嘉幸. 神経芽腫細胞にみられるカスパーゼ非依存的アポトーシス, 第59回日本癌学会総会(横浜), 2000年10月4-6日

8. 野口耕司, 北中千史, 野嘉幸. ASK1によるc-Myc依存性アポトーシスの制御機構, 第59回日本癌学会総会(横浜), 2000年10月4-6日

9. 野嘉幸, 野口耕司, 北中千史. ストレスシグナルとMyc依存性細胞死, シンポジウム「Mycネットワークの新展開」, 第73回日本生化学会大会(横浜), 2000年10月11-14日

10. 村松知成, Klaus Heckmann, 野嘉幸. 真核生物eRF1による終止コドン認識機構, 第73回日本生化学会大会(横浜), 2000年10月11-14日

11. 渡部暁, 村松知成, 野嘉幸. 高度好熱菌ATP依存性プロテアーゼLonの機能解析, 第73回日本生化学会大会(横浜), 2000年10月11-14日

12. 藤田英明, 藤田裕規, 大嶋康弘, 北中千史, 野嘉幸, 山本章嗣, 姫野勝. ヒト・グリオーマ細胞におけるH-ras(V12)発現による液胞化・細胞死へのリソソーム・エンドソームの関与について, 第73回日本生化学会大会(横浜), 2000年10月11-14日

13. Kuchino, Y., Kitanaka, C. Characterization and pathophysiological significance of caspase-independent programmed cell death regulated by Ras, ISPO Meeting, Geneva, Switzerland, October 28-31, 2000

14. 北中千史, 加藤啓輔, 井尻理恵子, 田中祐吉, 野嘉幸. Rasシグナル伝達因子により制御される非アポトーシス性プログラム細胞死の神経芽腫の自然退縮における役割, 第23回日本分子生物学会大会(神戸), 2000年12月13-16日

15. 村松知成, Heckmann, K., 野嘉幸, 真核生物eRF1による終止コドン認識機構, 第23回日本分子生物学会大会(神戸), 2000年12月13-16日

16. 砂山潤, 北中千史, 野嘉幸. アポトーシス促進性Bcl-2ファミリー蛋白質Hrkに結合する細胞性因子の単離とその機能解析, 第23回

分子生物学会大会(神戸), 2000年12月13-16日

17. 渡部暁, 村松知成, 田之倉優, 口野嘉幸, 高度好熱菌Lonプロテアーゼドメインの大量発現系の構築, 第23回日本分子生物学会大会(神戸), 2000年12月13-16日

18. 富山新太, 北中千史, 鮫島寛次, 口野嘉幸, c-MycによるERストレス依存性アポトーシスの活性化, 第23回日本分子生物学会大会(神戸) 2000年12月13-16日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

ヒト糖鎖合成酵素GalNAcTをコードする遺伝子に関する特許を申請する予定

転移・浸潤に関わる接着因子の解析

分担研究者 神奈木 玲児 愛知県がんセンター・研究所分子病態学部・部長

研究要旨:癌の血行性転移においては、接着分子セレクチンを介する細胞接着が重要な役割を演じる。我々は今年度、セレクチンの新しいリガンド、シアリル6-スルホLe^xが大腸癌組織において非癌上皮細胞に選択的に発現し、癌で消退する事を見出した。癌に選択的に発現するリガンドであるシアリルLe^xと対照的な分布である。さらに非癌上皮細胞のシアリル6-スルホLe^xにはセレクチンとの接着能を抑制するカルシウム依存性のフィードバック機序が働くのに対し、癌細胞のシアリルLe^xはその抑制機構を欠くことが判明した。

A.研究目的

浸潤・転移における細胞接着分子の役割を、セレクチン及びインデグリン系分子、並びにそれらの特異的リガンド分子との分子間相互作用に焦点をあて解析する。これらの解析により、浸潤・転移の早期検出と有効な防止法を可能としたい。また、悪性細胞における細胞接着分子の異常発現を導く分子機構を解析する。本年度は特に、我々が最近見出した新しいセレクチンのリガンドであるシアリル6-スルホLe^x糖鎖に焦点を当てて解析を進めた。

B.研究方法

細胞接着分子セレクチンの新規な糖鎖リガンドであるシアリル6-スルホLe^xに対する特異抗体を作成し、大腸癌症例について癌組織および周囲非癌組織での発現を検索し比較検討した。また、従来から癌で増加することが知られる通常のシアリルLe^xの分布を並行して検索し、シアリル6-スルホLe^xの分布と対比した。さらに詳細に解析するために、シアル酸を持たない6-スルホLe^xに対しても特異抗体を作成し、大腸癌症例組織について同様の検索を行った。

次に、シアリル6-スルホLe^xの発現を導く機序を明らかにするために、培養細胞に候補である糖転移酵素遺伝子を強制導入し、この糖鎖の合成に関与する糖転移酵素遺伝子の同定を試みた。また、細胞の刺激に伴うシアリル6-スルホLe^x発現の変化および異化代謝の過程を、ヒト培養大腸癌細胞株をカルシウムイオンフォアであるイオノマイシンで刺激して解析した。この刺激により生じる異化代謝産物の構造を同定した。異化代謝産物のうち、中間代謝

産物として同定されたデ-N-アセチルシアリル6-スルホLe^x、および最終代謝産物として同定されたサイクリックシアリル6-スルホLe^xに対して特異抗体を作成し、これらの代謝産物の大腸癌症例組織における発現を解析した。

また、これらの糖鎖の重要な担体であるムチンのコアタンパク質MUC1に対する患者の自己細胞障害性T細胞応答を、自己腫瘍細胞をターゲットとして解析した。自己腫瘍細胞におけるMUC1の発現と、細胞障害性T細胞応答の程度との間の相関を調査した。また、MUC1を発現しない腫瘍細胞を持つ患者について、その腫瘍細胞にMUC1遺伝子を強制導入して発現させ、細胞障害性T細胞の応答がどのように変化するかを解析した。研究に使用する臨床材料は、材料を得る各施設での倫理委員会を経たものを用いた。

C.研究結果

大腸癌凍結切片におけるシアリル6-スルホLe^xの発現を特異抗体G152で検索した所、大腸癌23症例の検討で、シアリル6-スルホLe^xは、癌組織より非癌粘膜組織に有意に強く発現していた(p<0.001)。一方、通常のシアリルLe^xは、CSLEX-1およびSNH-3のいずれの抗体でも、癌組織に有意に発現しており(p=0.007, p=0.02)、シアリル6-スルホLe^xの分布と対照的であった。シアル酸を持たない6-スルホLe^xに対する特異抗体(AG223)を用いて検索した所、これもシアリル6-スルホLe^xと同じく癌組織より非癌粘膜組織に有意に強く発現していた(p<0.001)。一方、通常のLe^xは、癌組織と非癌粘膜組織との間に有意差を認めなかった。

内因性の酸基転移酵素を有する細胞にフコ

ース転移酵素遺伝子を強制導入した所、フコース転移酵素のアイソザイムのVIあるいはVIIの遺伝子導入によってシアリル6-スルホLe^xの発現が誘導され、アイソザイムのIVあるいはVIの導入によってシアリル酸を持たない6-スルホLe^xの発現が誘導された。大腸などの上皮系細胞にはIII、IV、VIのアイソザイムが発現されているので、大腸においてはフコース転移酵素VIが主要なシアリル6-スルホLe^x合成酵素と推定された。

培養大腸癌細胞株のシアリル6-スルホLe^xの発現はイオノマイシン刺激後数分以内に低下し、かわりに代謝産物(サイクリックシアリル6-スルホLe^x)の発現が誘導された。この代謝産物サイクリックシアリル6-スルホLe^xは、細胞接着分子セレクチンとの結合性を失っていた。低濃度のイオノマイシン刺激ではこの変化は可逆的な傾向があったが、高濃度では不可逆的であった。異化代謝産物のうち、中間代謝産物デ-N-アセチルシアリル6-スルホLe^xおよび最終代謝産物サイクリックシアリル6-スルホLe^xに対する特異抗体を用いて大腸癌症例組織における発現を解析した所、いずれも癌組織より非癌粘膜組織に有意に発現していた(p<0.001)。デ-N-アセチルシアリル6-スルホLe^xの発現は最も弱く、これがすみやかに回転する中間代謝産物であることを示唆した。以上から、この異化代謝系は、非癌粘膜組織で活発に働いているセレクチンとの接着を抑制する機構である事が判明した。

また、乳癌細胞のムチンMUC1に対する患者自己の細胞障害性T細胞応答は、自己樹状細胞の存在によっていちじるしく増強することを認めた。しかし実際の乳癌患者においては、抗原であるMUC1の癌細胞での発現低下によって細胞障害性T細胞の攻撃から癌細胞がエスケープしている例が少なくない事を見出した

D. 考察

大腸では癌化に伴うスルホムチンの減少が古くから知られている。今回、観察された癌化に伴う6-硫酸化の低下は、この古典的観察について、その分子機構をさらに一步立ち入って明確にしたものであると考えられる。大腸癌組織でのシアリル6-スルホLe^xの消退とシアリルLe^xの出現は、癌化にともなう6-硫酸化の低下が原因と考えられ、今後、この原因遺伝子を

同定する必要がある。候補としては、6-硫酸基転移酵素や、活性化硫酸基すなわちPAPSの合成酵素やトランスポーターの変化などが考えられる。また、癌細胞におけるセレクチン接着能のフィードバック抑制機序の欠如は、癌細胞と血管内皮との接着の亢進を引きおこし、血行性転移を促進すると考えられ、このフィードバックの分子機構を解明する。とくに、このフィードバック機構において特徴的なサイクリックシアリル酸の形成機構を解析する。

MUC1をターゲットとした免疫治療の可能性については、今後、樹状細胞のprecursorの特異マーカーを見出し、患者末梢血中からの自己樹状細胞の効率よい回収を可能にする必要がある。また、樹状細胞のホーミング機構を解析し、腫瘍巣への選択的リクルート法を探る予定である。

E. 結論

セレクチンの糖鎖リガンドは、既に広く腫瘍マーカー検査に応用されており、多数の患者がこの検査を受けている。検査項目としては、CA19-9、Span-1、KMO1、SLXといった検査がこれに該当する。これらは、当初は患者体内での腫瘍の有無を調べることを目的として導入された検査であった。しかし、最近これらの糖鎖がセレクチンと結合能をもち、がんの転移と深く関連する分子であることがつぎつぎと判明し、これらの糖鎖を強く発現する癌細胞を持つ患者は、予後が不良であることが臨床統計から判明している。今回の結果は、癌細胞のセレクチンへの接着の異常亢進が、癌化にともなう硫酸化の低下によって引き起こされている可能性を示しており、正常細胞において硫酸化糖鎖が通常もっている細胞接着調節機能が、癌化によって失われることがその大きな要因と考えられる。

F. 健康危険情報

現在のところ、特記すべきものはない。ただし我々の今回の結果は、硫酸化の欠失あるいは低下が、大腸癌の進行において重要な意義を持つ事を示唆している。大腸粘膜における硫酸化の変化は炎症性大腸疾患においても認められ、硫酸化の低下をきたす要因の疫学的情報につながる所見が今後得られる可能性がある。

G.研究発表

1.論文発表

1. Izawa, M., Kumamoto, K., Mitsuoka, C., Kanamori, A., Ohmori, K., Ishida, H., Nakamura, S., Kurata-Miura, K., Sasaki, K., Nishi, T. and Kannagi, R.: Expression of sialyl 6-sulfo Lewis x is inversely correlated with conventional sialyl Lewis x expression in human colorectal cancer. *Cancer Res.* **60**: 1410-1416, 2000.
2. Ohmori, K., Kanda, K., Mitsuoka, C., Kanamori, A., Kurata-Miura, K., Sasaki, K., Nishi, T., Tamatani, T. and Kannagi, R.: P- and E-Selectins recognize sialyl 6-sulfo Lewis X, the recently-identified L-selectin ligand. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **278**: 90-96, 2000.
3. Kannagi, R.: Sphingolipid metabolism and cell signaling - monoclonal anti-glycosphingolipid antibodies. *Methods Enzymol.*, **312**: 160-179, 2000.
4. Kontani, K., Taguchi, O., Narita, T., Hiraiwa, N., Sawai, S., Hanaoka, J., Ichinose, M., Tezuka, N., Inoue, S., Fujino, S. and Kannagi, R.: Autologous dendritic cells or cells expressing both B7-1 and MUC1 can rescue tumor-specific cytotoxic T lymphocytes from MUC1-mediated apoptotic cell death. *J. Leukocyte Biol.* **68**: 225-232, 2000.
5. Futamura, N., Nakamura, S., Tatematsu, M., Yamamura, Y., Kannagi, R. and Hirose, H.: Clinicopathologic significance of sialyl Le^x expression in advanced gastric carcinoma. *Br. J. Cancer* **83**: 1681-1687, 2000.
6. Kannagi, R.: Transcriptional regulation of expression of carbohydrate ligands for cell adhesion molecules in the selectin family. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **491**: 267-278, 2001.
7. Sekine, M., Taya, C., Kikkawa, Y., Yonekawa, H., Takenaka, M., Matsuoka, Y., Imai, E., Izawa, M., Kannagi, R. and Suzuki, A.: Regulation of mouse kidney tubular epithelial cell-specific expression of core 2 GlcNAc transferase. *Eur. J. Biochem.* **268**:1129-1135, 2001.

8. Kontani, K., Taguchi, O., Narita, T., Izawa, M., Hiraiwa, N., Zenita, K., Takeuchi, T., Murai, H., Miura, S. and Kannagi, R.: Modulation of MUC1 mucin as an escape mechanism of breast cancer cells from autologous cytotoxic T-lymphocytes. *Br. J. Cancer* in press.
9. Ohmori, K., Mitsuoka, C., Kanamori, A., Adachi, K., Kameyama, A., Nonoyama, S. and Kannagi, R.: Novel anti-CD15 antibodies with distinct specificity towards Lewis X determinants carried by mucin core carbohydrates. In Mason, D.Y. (ed.): *Leukocyte Typing VII*. Oxford, Oxford University Press, in press.
10. Kannagi, R.: Fucosyltransferase VI. In Taniguchi, N. (ed.): *Handbook of Glycosyltransferases and Their Related Genes*. Springer-Verlag, in press.

2.学会発表

1. Kannagi, R.: Carbohydrate ligands for selectins on leukocytes and endothelial cells: Roles of sulfation and sialylation. (Invited Speaker). Gordon Research Conferences 2000, "Glycolipid and Sphingolipid Biology", Chaired by Guido Tettamanti and Alfred H. Merrill, Il Ciocco, Barga, Italy, May 14-19, 2000.
2. 神奈木玲児、金森審子: セレクチンの硫酸化糖鎖リガンドとその生理的意義. 第21回日本糖質学会年会特別シンポジウム, 「硫酸化糖鎖研究の新展開—その多彩な構造と機能を探る」(木全弘治、大平敦彦、木曾 真、神奈木玲児 座長) 名古屋, 7月27-29日, 2000.
3. 金森審子、神奈木玲児: シアル酸の分子内修飾によるセレクチンのリガンド活性の調節機構. 第73回日本生化学会大会シンポジウム, 「糖鎖による細胞間コミュニケーション」(神奈木玲児、村松 喬 司会) 横浜, 10月11-14日, 2000.
4. 金森審子、後藤嘉子、手塚克成、玉谷卓也、内村健治、村松喬、神奈木玲児: セレクチンのリガンドとしてのコアタンパク質要求性. 第59回日本癌学会総会, 横浜, 10月4日-6日, 第59回日本癌学会総会記

- 事, pp. 133-134, 2000.
5. 井澤峯子、金森審子、光岡ちか子、田口修、石田廣次、中村榮男、神奈木玲児: ヒトおよびラットにおけるリンパ節高血管内皮細静脈のL-セレクチンリガンドの分子種について. 第59回日本癌学会総会, 横浜, 10月4日-6日, 第59回日本癌学会総会記事, pp. 133, 2000.
 6. 隈元謙介、井澤峯子、光岡ちか子、竹之下誠一、神奈木玲児: セレクチンの糖鎖リガンドの硫酸化修飾とその生理的意義—大腸癌における検討. 第59回日本癌学会総会, 横浜, 10月4日-6日, 第59回日本癌学会総会記事, pp. 134, 2000.
 7. 大森勝之、光岡ちか子、井澤峯子、金森審子、丁 剛、隈元謙介、神奈木玲児: Tリンパ球の健常人体内における再循環を媒介するセレクチンリガンド—炎症性応答におけるリガンドとの機能分担について. 第59回日本癌学会総会, 横浜, 10月4日-6日, 第59回日本癌学会総会記事, pp. 134, 2000.
 8. 丁 剛、隈元謙介、神奈木玲児、田口 修、河田 了、中井 茂、久 育男: 癌細胞の血管内皮細胞への接着におけるサイトカイン・ケモカインの関与—扁平上皮癌細胞における検討. 第59回日本癌学会総会, 横浜, 10月4日-6日, 第59回日本癌学会総会記事, pp. 135, 2000.
 9. 隈元謙介、井澤峯子、光岡ちか子、竹之下誠一、神奈木玲児: 大腸癌における糖鎖6-硫酸基転移酵素の発現と生理的意義. 第20回日本分子腫瘍マーカー研究会, 横浜, 10月3日, 第20回日本分子腫瘍マーカー研究会講演予稿集, pp. 60-61, 2000.
 10. Ohmori K, Tei K, Kumamoto K, Imai T, Yoshie O, Hasegawa H, Matsushima K, Kannagi R: Site-specific recruitment of human helper T cells by synergistic action of sulfated ligand for selectins and chemokines. The 5th Joint Conference of the American Association for Research and the Japanese Cancer Association "Molecular Biology and New Therapeutic Strategies: Cancer Research in the 21st Century" (Chaired by Cavenee, WK and Hirohashi, S), Maui Marriott Resort, Maui, Hawaii, February 12-16, Abstract, pp. A-62, 2001.
 11. Kumamoto K, Izawa M, Mitsuoka C, Takenoshita S, Kannagi R: Significant alteration of carbohydrate 6-sulfotransferases in colon cancer and modulation by histone deacetylase inhibitors. The 5th Joint Conference of the American Association for Research and the Japanese Cancer Association "Molecular Biology and New Therapeutic Strategies: Cancer Research in the 21st Century" (Chaired by Cavenee, WK and Hirohashi, S), Maui Marriott Resort, Maui, Hawaii, February 12-16, Abstract, pp. B-2, 2001.
- H.知的財産権の出願・登録状況
特になし。

厚生省科学研究費補助金（がん克服戦略研究事業）
分担研究報告書

転移・浸潤に関わるプロテアーゼと細胞外マトリックス分子の解析

分担研究者 宮崎 香 横浜市立大学木原生物学研究所・教授

要旨 がんの浸潤・転移におけるマトリックスプロテアーゼの役割を明らかにするために、プロテアーゼの細胞膜や細胞外マトリックス成分への作用とその影響を調べた。1) マトリライシン (MMP-7) はがん細胞表面に結合し、その結果細胞の凝集性と動物体内での転移性を上昇させることが判明した。2) ラミニン5 (LN5) は細胞の接着と運動を強く促進するマトリックス蛋白質である。LN5の構成サブユニットである $\alpha 3$ 鎖と $\gamma 2$ 鎖がプロテアーゼによる切断を受け、LN5の細胞運動促進活性を大きく変化させることが判明した。これらのプロテアーゼの作用ががんの浸潤・転移に重要な意味をもつと考えられる。

A. 研究目的

近年、がんの浸潤・転移におけるマトリックス分解性プロテアーゼの重要性が広く認識されている。しかし、個々のプロテアーゼの具体的な作用機構に関しては不明な点が多い。最近のいくつかの研究結果から、これらのプロテアーゼが障害物としての細胞外マトリックスを排除するだけでなく、より積極的に細胞機能を調節している可能性が考えられる。そこで本研究では、プロテアーゼの細胞膜や細胞外マトリックス成分への作用とその影響を調べた。

B. 研究方法

1) 最小のMMPであるマトリライシン (MMP-7) が大腸がんで高率に高発現すること、マトリライシンのアンチセンスオリゴヌクレオチドがヌードマウスでの大腸がん細胞の肝転移を効果的に抑制することなどを明らかにしてきた。本研究ではマトリライシンの転移促進機構

を明らかにするために、マトリライシンとヒト大腸がん細胞との相互作用を調べた。このために、大腸菌を用いて組み換え型マトリライシンを大量に調製した。このマトリライシンを数種のヒト大腸がん細胞に作用させた後、細胞へのマトリライシンの結合、細胞形態の変化、およびヌードマウスにおける脾臓から肝臓への転移性の変化を調べた。細胞へのマトリライシンの結合は、種々の時間でのインキュベーションの後細胞膜分画を調製し、そこに存在するマトリライシンを免疫プロットングで分析ることによって調べた。さらにマトリライシンを処理していない膜分画を界面活性剤や尿素で可溶化し、マトリライシン結合カラムに流してマトリライシン受容体の同定を試みた。

2) ラミニン-5 (LN5) の3つのサブユニット ($\alpha 3$, $\beta 3$, $\gamma 2$)のうち、 $\alpha 3$ と $\gamma 2$ 鎖が分泌後プロテアーゼによって限定分解されるこ

とが報告されている。 $\alpha 3$ 鎖の切断部位を決定するために、LN5産生細胞の培養液上清から切断断片を精製し、そのN末端配列および細胞接着活性と運動活性を測定した。 $\gamma 2$ 鎖のプロセッシングに関しては、非切断型のLN5に対して組み換え型MT1-MMPやMMPインヒビターを作用させ、 $\gamma 2$ 鎖の切断と生理活性の変化を調べた。

C. 研究結果

がんの浸潤・転移におけるプロテアーゼの役割を明らかにするために、マトリックスプロテアーゼの細胞外マトリックス (ECM) 蛋白質や細胞表面蛋白質への作用を調べた。

1) これまでに、MMPの一種であるマトリライシン (MMP-7) が大腸がんの肝転移に重要であることを明らかにしてきた。マトリライシンの転移促進機構を調べる過程で、大腸がん細胞に外部から精製マトリライシンを処理すると、細胞が浮遊しながら大きな凝集体を形成することを見いだした。また、このようにマトリライシンを処理したヒト大腸がん細胞をヌードマウスの脾臓に注射すると、未処理の細胞に比べて肝臓への転移能が顕著に亢進することが明らかになった。さらに、マトリライシンによる細胞凝集の促進はマトリライシンの細胞膜への結合によるものであることが判明した。これらの現象には活性型のマトリライシンが必要であり、MMPインヒビターはそれらを阻害した。現在、細胞膜上のマトリライシン受容体の同定とマトリライシンによって切断される細胞表面蛋白質の同定を試みている。

2) ラミニン-5 (LN5) は $\alpha 3$ 、 $\beta 3$ 及び $\gamma 2$ 鎖からなる重要な基底膜型細胞接着分子の一種で、強い細

胞接着活性と細胞運動促進活性を示す。またLN5の $\alpha 3$ と $\gamma 2$ 鎖がプロテアーゼによって限定分解され、その生理活性が変化することが報告されている。本研究において、LN5産生ヒトがん細胞では、分泌されたLN5の $\alpha 3$ 鎖のC末端部分に存在するG3とG4ドメインの境界で内在性プロテアーゼによる切断を受けること、また切断されたG4-G5断片がLN5から遊離し、切断型LN5と協調的に細胞運動を促進することを見いだした。インテグリン中和抗体やヘパリンを作用させた結果から、LN5本体はインテグリンに結合するのに対して、G4-G5断片は細胞表面のヘパラン硫酸プロテオグリカンに結合することが示唆された。一方、LN5の $\gamma 2$ 鎖のN末端部分がMT1-MMPによって限定分解されると、その細胞運動促進活性が上昇することを見いだした。TIMP-2や合成MMPインヒビターは $\gamma 2$ 鎖の切断とラミニン5の細胞運動促進活性を抑制した。

D. 考察

活性型のマトリライシンががん細胞の細胞膜に結合すると、細胞の凝集性と動物体内での転移性が上昇することが明らかになった。マトリライシンの受容体はまだ同定されていないが、カベオラのような特殊な膜構造にマトリライシンが結合することが示唆された。細胞凝集能の上昇は、マトリライシンが直接細胞間接着因子として機能する結果、あるいはマトリライシンがある種の細胞内シグナルを誘導する結果起こると考えられる。いずれにしてもこの細胞凝集の上昇は、血管内でのがん細胞の着床効率を高め、転移を増大させると推測される。このような作用機構はこれまでにどのMMPでも知られてい

ない。今後細胞膜上の受容体や標的蛋白質を同定することが、マトリライシンを標的とする抗転移剤の開発にも役立つと考えられる。

一方、LN5の $\alpha 3$ と $\gamma 2$ 鎖がMT1-MMPや他のプロテアーゼによって特異的なプロセッシングを受け、細胞運動促進活性を変化させることが明らかになった。がん細胞はIV型コラーゲンなどを分解しながら基底膜を浸潤する。この際、LN5の $\gamma 2$ 鎖が限定分解されることにより、その活性が細胞接着促進型から細胞運動促進型に変化する。このような変化はがん細胞の運動性を刺激し、浸潤を促進すると考えられる。このような機構も、マトリライシンの作用機構と同様に、マトリックスポロテアーゼの新しい転移促進機構である。今後これらをさらに検証する必要がある。

E. 結論

活性型マトリライシンを大腸がん細胞に作用させると細胞膜表面に結合し、その結果細胞の凝集性と動物体内での転移性が上昇した。従って、がん細胞自信が産生するマトリライシンの転移促進作用は少なくとも部分的には、マトリライシンが細胞膜に結合することによって起こる細胞形質の変化、すなわち細胞の凝集性の増加によるものと考えられる。これらの現象の分子機構についてはさらに検討する必要がある。

ヒトがん細胞が分泌するLN5は $\alpha 3$ 鎖のC末端部分に存在するG3とG4ドメインの境界で内在性プロテアーゼによる切断を受けること、また切断されたG4-G5断片がLN5から遊離し、切断型LN5と協調的に細胞運動を促進することを見いだした。一方、LN5の $\gamma 2$ 鎖のN末端部分がMT1-MMPによって限定分解されると、そ

の細胞運動促進活性が上昇することが明らかになった。これらの結果から、プロテアーゼによるプロセッシングによってLN5の機能変換が起こることが明らかになった。

F. 健康危険情報
特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ichikawa, Y., Koshikawa, N., Hasegawa, S., Ishikawa, T., Momiyama, N., Kunizaki, C., Takahashi, M., Moriwaki, Y., Akiyama, H., Yamaoka, H., Yanoma, S., Tsuburaya, A., Nagashima, Y., Shimada, H. and Miyazaki, K.: Marked increase of trypsin(ogen) in serum of linitis plastica (gastric cancer, Borrmann 4) patients. *Clin. Cancer Res.*, 6: 1385-1388 (2000).
- 2) Miyata, S., Koshikawa, N., Yasumitsu, H. and Miyazaki, K.: Trypsin stimulates integrin $\alpha 5 \beta 1$ -dependent adhesion to fibronectin and proliferation of human gastric carcinoma cells through activation of proteinase-activated receptor-2. *J. Biol. Chem.*, 275: 4592-4598 (2000).
- 3) Koshikawa, N., Giannelli, G., Cirulli, V., Miyazaki, K., and Quaranta, V.: Role of cell surface metalloproteinase MT1-MMP in epithelial cell migration over laminin-5. *J. Cell Biol.*, 148: 615-624 (2000).
- 4) Kishibe, J., Yamada, S., Okada, Y., Sato, J., Ito, A., Miyazaki, K., and Sugahara, K.: Structural Requirements of Heparan Sulfate

for the Binding to the Tumor-derived Adhesion Factor/Angiomodulin That Induces Cord-like Structures to ECV-304 Human Carcinoma Cells. *J. Biol. Chem.* 275: 15321-15329 (2000).

5) Kato, Y., Frankenre, F., Noel, A., Sakai, N., Nagashima, Y., Koshika, S., Miyazaki, K., Foidart, J.-M.: High production of SPARC/osteonectin/BM-40 in mouse metastatic B16 melanoma cell lines. *Pathol. Oncol. Res.*, 6: 24-26 (2000).

6) Ebihara, N., Mizushima, H., Miyazaki, K., Watanabe, Y., Ikawa, S., Nakayasu, K., and Kanai, A.: The functions of exogenous and endogenous laminin-5 on corneal epithelial cells. *Exp. Eye Res.*, 71: 69-79 (2000).

7) Hirosaki, T., Mizushima, H., Tsubota, Y., Moriyama, K., and Miyazaki, K. Structural requirement of carboxyl-terminal globular domains of laminin $\alpha 3$ chain for promotion of rapid cell adhesion and migration by laminin-5. *J. Biol. Chem.*, 275: 22495-22502 (2000).

8) Watanabe, K., Takahashi, H., Habu, Y., Kamiya-Kubushiro, N., Kamiya, S., Nakamura, H., Yajima, H., Ishii, T., Katayama, T., Miyazaki, K., and Fukai, F. Interaction with heparin and matrix metalloproteinase-2 cleavage expose a cryptic anti-adhesive site of fibronectin. *Biochemistry*, 39:7138-7144 (2000).

9) Tsubota, Y., Mizushima, H., Hirosaki, T., Higashi, S.,

Yasumitsu, H. and Miyazaki, K. Isolation and activity of proteolytic fragment of laminin-5 $\alpha 3$ chain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 278: 614-620 (2000).

10) Kagesato, Y., Mizushima, H., Koshikawa, N., Kitamura, H., Hayashi, H., Ogawa, N., Tsukuda, M. and Miyazaki, K. Sole expression of laminin $\gamma 2$ chain in invading tumor cells and its association with stromal fibrosis in lung adenocarcinomas. *Jpn. J. Cancer Res.*, 92: 184-192 (2001).

11) Adachi, Y., Itoh, F., Yamamoto, H., Arimura, Y., Kikkawa-Okabe, Y., Miyazaki, K., Carbone, D. P., and Imai, K.: Expression of angiomodulin (TAF/Mac 25) in invading tumor cells and blood vessels correlates with tumor progression and poor prognosis in human colorectal cancers. *Int. Cancer Res.*, in press (2001).

3. 学会発表

1) 陰里ゆうみ、坪田芳明、佃守、宮崎香：ラミニン5上での癌細胞の運動能を決定するインテグリン分子の分析。第59回日本癌学会総会（横浜）、2000年10月、総会記事、1548.

2) 坪田芳明、水島寛人、東昌市、宮崎香：ラミニン-5の細胞運動促進活性における $\alpha 3$ 鎖Gドメインのプロテアーゼ切断の意義。第59回日本癌学会総会（横浜）、2000年10月、総会記事、1593.

3) 金明寿、宇田川香織、宮城悦子、仲沢経夫、平原史樹、安光英太郎、宮崎香、長嶋洋治、青木一郎、原田昌興、宮城洋平：セリンプロテアー

- ゼインヒビターPP5/TFP1-2による絨毛癌細胞の浸潤能抑制. 第59回日本癌学会総会(横浜)、2000年10月、総会記事、2531.
- 4)加藤靖正、佃守、馬場優、宮崎香：酸性PHによるgelatinaseB誘導におけるacidicshpingo-myelinaseの関与. 第59回日本癌学会総会(横浜)、2000年10月、総会記事、2537.
- 5) 宮崎香：腫瘍血管新生におけるマトリックスプロテアーゼの発現とその機能. 第59回日本癌学会総会(横浜)、2000年10月、総会記事、1008.
- 6) 坪田芳明、廣瀬智己、水島寛人、東昌市、宮崎香：ラミニン-5の細胞運動促進活性における $\alpha 3$ 鎖Gドメインのプロテアーゼ. 第73回日本生化学会大会(横浜)、2000年10月、総会記事、1P-532.
- 7) 小川崇、坪田芳明、宮崎香：ラミニン-5 $\gamma 2$ 鎖のプロテアーゼによるプロセッシングの意義. 第73回日本生化学会大会(横浜)、2000年10月、総会記事、1P-533.
- 8)廣瀬智己、森山佳谷乃、水島寛人、宮崎香：ラミニン5とラミニン6の生理活性の比較. 第73回日本生化学会大会(横浜)、2000年10月、総会記事、1P-534.
- 9) 東昌市、宮崎香： β アミロイド前駆体蛋白質のプロセッシングに伴うゼラチナーゼA阻害活性の消失. 第73回日本生化学会大会(横浜)、2000年10月、総会記事、3P-460.
- 10) 来生知、東昌市、安光英太郎、藤田浄秀、宮崎香：マトリライシン(MMP-7)
- 11) の癌細胞膜表面への結合と転移に及ぼす影響. 第73回日本生化学会大会(横浜)、2000年10月、総会記事、3P-461.
- 12) 松浦成昭、松浦順子、村上智美、谷直之、太田一郎、吉増達也、斑目旬、
- 13) 土岐富士緒、東山繁樹、宮崎香：脳転移におけるインテグリン $\alpha 3 \beta 1$ の意義. 第9回がん転移研究会総会(大阪)、2000年6月、総会記事、1A12.
- 14) 陰里ゆうみ、越川直彦、水島寛人、北村均、佃守、宮崎香：末梢型肺腺
- 15) 癌の浸潤先進部位におけるラミニン $\gamma 2$ 鎖の単独発現. 第9回がん転移研究会総会(大阪)、2000年6月、総会記事、2B8.
- 16) 来生知、東昌市、越川直彦、安光英太郎、藤田浄秀、宮崎香：マトリライシン(MMP-7)大腸癌細胞膜表面への結合と肝転移に及ぼす影響. 第9回がん転移研究会総会(大阪)、2000年6月、総会記事、2B14.
- 17) 宮崎香：細胞接着分子の構造、機能、および応用-ラミニン5を例として. よこはまNMR構造生物学研究会、2000年12月.
- 18) 宮崎香：マトリックスプロテアーゼと血管病態. 第四回関西血管医学研究会、2000年12月.

H. 知的財産権の出願・登録状況なし。

厚生省科学研究費補助金（厚生省がん克服戦略事業）
分担研究報告書

「分野2：がん細胞における悪性形質獲得の分子機構の把握およびその制御機構の解明」班
分担する研究項目：臨床像を反映した転移モデルの作製とそれを用いた治療開発研究

分担研究者 久保田哲朗 慶應義塾大学医学部外科学教室助教授

研究要旨：MMP 阻害剤マリマスタットを用いて、その血管新生阻害が腹膜播種抑制に与える影響について検討した。5週齢の雄性 SCID マウスに、ヒト胃癌細胞株 TMK-1 1×10^6 を腹腔投与し腹膜播種モデルを作製した。腫瘍移植後 7 日目に皮下植え込み型ポンプを用いて治療群にはマリマスタット 27 mg/kg/day を、対照群には溶媒の DMSO を持続皮下投与した。21 日目に犠牲死させ、腹膜播種結節の検討を行った。血管新生の評価は、播種結節内の微小血管密度で行った。結節総重量 (g/body) は治療群 0.16 ± 0.08 、対照群 0.40 ± 0.18 と治療群において有意 ($P=0.026$) な腹膜播種抑制がみられた。結節数 (count/body) についてもそれぞれ 9.4 ± 3.8 vs. 18.2 ± 6.8 と治療群が有意 ($P=0.036$) に少数であった。MVD (count/mm²) は治療群で 61.2 ± 14.3 、対照群で 82.0 ± 8.8 と、治療群で有意 ($P=0.024$) に低値であった。

A. 研究目的

癌に対する手術や化学療法の標準的な治療法が存在している現況において、転移抑制剤単剤による臨床試験をおこなうことは倫理的に問題点が多い。とくに転移がいつ発生するかを臨床的に予測することは困難であり、転移抑制剤の臨床試験を組むとすれば、既存の標準的治療に転移抑制剤を on/off して薬剤の長期による生存期間の比較を行うことが現実的である。本年度はヒト胃癌株/SCID マウス腹膜播種モデルを用いて、matrix metalloproteinase (MMP) 阻害剤であるマリマスタット単剤の腹膜播種抑制効果を検討する。

B. 研究方法

ヒト胃癌細胞株 TMK-1 を広島大学より供与を受けた。5週齢の雄性 SCID マウス日本クレアより購入し、を当学実験動物センター内でアイソラックを specific pathogen-free 条件下で飼育した。基礎実験において TMK-1 細胞 1×10^6 の腹腔投与が移植 7 日目には径 2-3 mm の腹膜播種小結節を形成することを先に観察した。10匹のマウスに同量の細胞を腹腔内投与し、投与後 7 日目に対照群には 50% dimethylsulphoxide (DMSO) を治療群には合成 MMP 阻害剤 マリマスタット (TA-2516) を投与開始した。マリマスタットは 100% DMSO に溶解したのちに、蒸留水で 50% に希釈した溶液を用いた。ALZA 社のミニオスモティックポンプをマウスの背部皮下に挿入し、27 mg/kg/day の

マリマスタットを持続的に皮下に投与した。21日目にマウスを犠牲死させ腹膜に形成された癌結節を全て集めて計測した。微小血管密度 (Microvascular density; MVD) はランダムに 200 倍で 4 視野を観察し、Schor らの方法 (Histochem J. 1998; 30:849-56.) により血管密度を血管数/mm² として計測した。免疫組織学的検討では、組織を acetone-methylbenzoate-xylene (AMeX) 法により固定した。一次抗体は抗マウス CD31 (Parminggen, San Diego, CA) ラットモノクローナル抗体とし、ビオチン化二次抗体と反応後、ヘマトキシリンで染色後、標本を作製した。

(倫理面への配慮) すべての動物実験はヘルシンキ宣言および当学実験動物センター倫理規定に準拠して行われた。担当実験者は全員、実験動物センターの講習を受講した。すべての実験計画は実験動物センター倫理委員会へ提出され審議ののち、許可を受けて遂行された。

C. 研究結果

対照群と治療群のマウスのいずれにも実験期間中の死亡は認められず、体重減少も観察されなかった。また治療群のマウスにおいても、マリマスタットの特徴的な副作用である関節炎を示唆する歩行障害、関節の変形・腫脹等も認められなかった。対照群の腹膜播種腫瘍結節の総重量は 0.40 ± 0.18 g/body であったのに対してマリマスタット群の総腫瘍重量は 0.16 ± 0.08

g/body であり、治療群の腫瘍重量は推計学的に有意に減少していた ($P = 0.026$)。また腫瘍結節数についても、対照群 18.2 ± 6.8 個/マウスに比して治療群の腹膜播種個数 ($9.4 \pm 3.86.8$ 個/マウス)は推計学的に有意に少数であった ($P = 0.036$)。微小血管数は治療群 15.3 ± 8.8 vessels/mm² であり、対照群 (20.5 ± 14.3 vessels/mm²) に比して推計学的に有意な抑制が示された ($P = 0.024$)。また最大血管径の測定においても、治療群 15.3 micrometer は対照群 72.0 micrometer よりも推計学的に低値であった ($P=0.038$)。

D. 考察

MMP は生体内では tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)による制御を受けており、かつてはTIMP自体によるMMP阻害の可能性が検討された。しかしTIMPの分子量が大きく薬剤としては不向きであること、生体内にもともと存在する物質を投与してもMMP阻害効果が望みにくいことや正常細胞や腫瘍細胞に対して増殖促進活性が認められることなどから、TIMP自体の抗癌剤としての可能性は否定的となった。現在ではTIMP遺伝子を癌細胞に導入することによりMMP/浸潤・破壊の阻害することが検討されている。一方、欧米ではMMPによる転移機構に対抗する手段として、低分子のMMP阻害剤が開発されるようになってきた。BB-94(batimastat)については悪性腹水や癌性胸膜炎を対象とした臨床第I/II相試験が施行され、臨床上的有用性が確認されたが、本剤は水に難溶性のため臨床応用の道が限られており、内服投与の可能な次世代のマリマスタットによる臨床試験が進められてきている。今回検討したMMP阻害剤の血管新生阻害には血管基底膜分解阻害が大きく関与していると考えられる。マリマスタットは基底膜破壊に重要な役割を果たすMMP-2および9の強力な阻害剤として知られており、本実験における腹膜播種阻害が血管新生阻害を介して発現した可能性は高い。しかし一方、MMP阻害剤はVEGFを介してMT-MMP/MMPを抑制するとの報告もあり、今後は血管新生因子への影響を検討する必要がある。

E. 結論

マリマスタットは臨床では経口可能な薬剤

であり、癌を長期に dormant stage に置き、難治ではあるが非致死性の疾患とする可能性がある。

F. 健康危険情報

マリマスタットはすでに欧米において臨床第I/II相試験が終了し、第III相試験中であり、臨床的な安全性は確認されている。

G. 研究発表

1. Ishikawa, Y., Kubota, T., Otani, Y., Watanabe, M., Teramoto, T., Kumai, K., Takechi, T., Okabe, H., Fukushima, M. and Kitajima, M.: Dihydropyrimidine dehydrogenase and messenger RNA levels in gastric cancer: Possible predictor for sensitivity to 5-fluorouracil. Japanese Journal of Cancer Research, 91: 105-112, 2000.
2. Furukawa, T., Kubota, T., Tanino, H., Oura, S., Yuasa, S., Murate, H., Morita, K., Kozakai, K., Yano, T., and Hoffman, R.M.: Chemosensitivity of breast cancer lymph node metastasis compared to the primary tumor from individual patients tested in the histoculture drug response assay. Anticancer Research, 20: 3657-3658, 2000.
3. Inada, T., Ogata, Y., Kubota, T., Tomikawa, M., Yamamoto, S., Andoh, J., Ozawa, I., Hishinuma, S., Shimizu, H., and Kotake, K.: 5-Fluorouracil sensitivity and dihydropyrimidine dehydrogenase activity in advanced gastric cancer. Anticancer Research, 20: 2547-2462, 2000.
4. Abe, S., Kubota, T., Otani, Y., Furukawa, T., Watanabe, M., Kumai, K., and Kitajima, M.: UCN-01 (7-hydroxystaurosporine) enhances 5-fluorouracil cytotoxicity through down-regulation of thymidylate synthetase messenger RNA. Japanese Journal of Cancer Research, 91: 1192-1198, 2000.

H. 知的財産の出願・登録状況 (予定を含む)

なし