

# Urinary trypsin inhibitor (UTI) による癌の浸潤・転移抑制機序

メタデータ	言語: jpn 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-28 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 篠原, 弘光 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10271/1565">http://hdl.handle.net/10271/1565</a>

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博論第 288号	学位授与年月日	平成10年11月20日
氏名	篠原弘光		
論文題目	Urinary trypsin inhibitor(UTI)による癌の浸潤・転移抑制機序		

博士(医学) 篠原弘光

## 論文題目

Urinary trypsin inhibitor (UTI) による癌の浸潤・転移抑制機序

## 論文内容の要旨

〔はじめに〕

局所で増殖していた癌細胞が転移するためには、細胞の遊離・血管内への侵入・転移先の血管内皮細胞への接着・血管外への侵出・転移先での接着と増殖という多段階のステップを踏まなければならない。ここで、血管内への侵入と血管外への侵出には癌細胞が産生するプロテアーゼによる基底膜及び細胞外マトリックスの破壊が必要である。我々は、これまでに、このプロテアーゼの活性化は、細胞膜表面のウロキナーゼやプラスミンの活性化によるものであることを確認し、これをプロテアーゼ阻害物質が阻止しうるか否かについて検討してきた。本研究では多価酵素阻害物質である urinary trypsin inhibitor (UTI) に着目し、癌細胞の浸潤・転移抑制作用を *in vitro* および *in vivo* の実験において検討した。さらに、UTI 分子内のアミノ酸配列を合成したペプチドを用い転移抑制作用を有する部位についても検討した。

〔材料ならびに方法〕

癌細胞株として、ヒト卵巣癌 (HOC-1) およびマウスリス肺癌細胞 (3LL) を用いた。これらの細胞は、抗ヒトウロキナーゼ抗体、抗ヒトプラスミン抗体をそれぞれ  $1 \mu\text{g/ml}$  の濃度で添加、洗浄後ビオチン標識二次抗体 ( $1.5 \mu\text{g/ml}$ ) 添加、アビジンペルオキシダーゼにより発色させ EIA 測定器 (450nm) にて測定し、癌細胞表面のウロキナーゼおよびプラスミンの存在および活性を確認した。以下の実験に用いた UTI は、持田製薬から提供されたもの ( $2330\text{U/mg}$ ) を用い、ペプチドは UTI のアミノ酸配列をもとにコンピューター解析 (Bio System 社, amino acid analyzer・amino acid synthesizer) により親水性の部位を決定し合成した (ペプチド 1, 2, 3)。これら UTI とペプチドは、プラスミンまたはヒト顆粒球エラスターゼとインキュベーション ( $23^\circ\text{C}$ , 5 分) の後、合成基質として S-2251 または S-2484 を添加のうえ EIA 測定器 (405nm) にて測定し、UTI はプラスミンとヒト顆粒球エラスターゼ双方の活性を抑制、ペプチド 2 は顆粒球エラスターゼを抑制、ペプチド 3 はプラスミンを抑制することを確認した。しかし、各ペプチドは UTI に比して約  $1/100$  の力価しか有しなかった。ペプチド 1 にはいずれの酵素抑制作用も認められなかった。

*in vitro* の invasion assay (浸潤実験) として、Boyden chamber (Coster 社製) に合成基質を敷き、上の chamber に上記癌細胞を  $2 \times 10^5$  cells/ $100 \mu\text{l}$  加えインキュベーションし、浸潤細胞を染色後 200 倍の視野で 3 ケ所計測した。この上の chamber に UTI ( $0.05, 0.5, 5 \mu\text{M}/100 \mu\text{l}$ ) または上記ペプチド ( $2, 20, 200 \mu\text{M}/100 \mu\text{l}$ ) を加え、無処置のものと比較し、浸潤の抑制をみた。

*in vivo* における UTI の 3LL 細胞に対する作用をみるため、マウス腹部皮下に 3LL 細胞 ( $1 \times 10^6$  cells) を移植。反対側皮下に UTI を  $500$  または  $5000 \mu\text{g}/\text{日}$  を移植直後より連日 7 日間投与のうえ、移植後 28 日目に屠殺し腫瘍体積および肺転移巣数を上記 2 群と無処置群間で比較した。

次に、転移に際して血管内への侵入と血管外への侵出を必要とする、癌細胞のマウス皮下移植による転移実験を行った。マウス腹部皮下に 3LL 細胞を  $1 \times 10^6$  cells 移植し 28 日後に肺転移巣数を計測。UTI およびペプチドを移植直後から 7 日間連続および 14 日間連続、移植後 7 日後から 7 日間連続および 14 日

間連続皮下注する4群について肺転移巣数を比較した。

さらに、転移に際して血管内への侵入過程が省略される癌細胞の静注による転移実験を行った。マウス尾静脈から3LL細胞 ( $2 \times 10^5$  cells/100  $\mu$ l) を静注。21日後に肺転移コロニー数を計測した。UTIおよびペプチドの投与スケジュールは、移植直後から7日間連続および14日間連続、移植後7日後から7日間連続皮下注し、これら3群について肺転移巣数を比較した。

#### 〔結果〕

in vitro においては、UTI とプラスミン活性を抑制するペプチド3のみが濃度依存性に細胞の浸潤を抑制した。すなわち、UTI 分子内のプラスミン活性抑制部位が癌細胞の合成基質への浸潤を抑制することが確認された。

C57BL/6マウスを用いた in vivo における実験では、UTI を投与しても移植巣の増殖には影響を与えなかったが、肺転移に関しては濃度依存性に抑制され、UTI が抗腫瘍作用によらない転移抑制作用を有することがわかった。また、転移の成立のためには血管内への侵入と血管外への侵出が必須である皮下移植モデルにおいては、in vitro の場合と同様 UTI とプラスミン活性を抑制するペプチド3のみが肺転移を抑制した。しかし、転移のために血管外への侵出のみでよい静注モデルにおいて、癌細胞がいったん血管内に入ってしまうといずれのペプチドにおいても転移の抑制がみられなかったが、UTI においては癌細胞接種直後より投与することにより有意に転移が抑制された。

#### 〔考察〕

in vitro の実験では、癌の浸潤を抑制するには UTI のプラスミン活性抑制部位が重要であることが確認できた。in vivo 実験でも UTI により癌の転移が抑制されており、癌細胞を皮下移植した場合においては、プラスミン活性を抑制するペプチドでも転移抑制が確認できた。しかし、血管内への侵入過程をバイパスされる尾静脈静注モデルにおいては、UTI により転移が抑制されるにも関わらずペプチドは無効であった。これらのことより癌細胞の血管内への侵入には腫瘍細胞膜結合プラスミン活性が重要でありプラスミン活性を抑制することにより癌の転移は抑制されるが、いったん癌細胞が血管内に入ってしまった後はプラスミン活性の抑制のみでは血管外への侵出は抑制されないと考えられる。また UTI による転移の抑制は腫瘍細胞膜結合プラスミン抑制作用による血管内への侵入の抑制だけでなくプロテアーゼ阻害以外の作用も関与している可能性がある。

#### 〔結論〕

今後 UTI の転移抑制を期待するための至適投与量および投与形態についても検討し臨床応用を考えるとともに、プロテアーゼ阻害物質としての機序以外の UTI の転移抑制の機構を明らかにすることが癌の浸潤・転移の機構の解明に有用であると考えられる。

### 論文審査の結果の要旨

癌細胞の増殖それ自体が生命を脅かすこともさることながら、その細胞が転移して種々の臓器で増殖し、その臓器の機能を損ねることが癌の治療、予後のもっとも大きな問題である。

腫瘍細胞が転移するためには細胞の遊離、血管内への侵入、転移臓器の血管への接着、血管外への侵出という経過をたどる。血管内への侵入と、血管外への侵出には癌細胞が産生するプロテアーゼによる

基底膜と細胞外マトリックスの破壊が必要である。

申請者はプロテアーゼ阻害剤である urinary trypsin inhibitor (UTI) を用いて癌細胞の浸潤・転移を抑制出来ないかと考え本研究を企画した。

癌細胞株としてヒト卵巣癌 (HOC-1) およびマウスルイス肺癌細胞 (3LL) を用いた。まず invasion assay では Boyden chamber をもちいて、Matrigel を敷き、上の chamber に癌細胞を入れ、下の chamber への浸潤細胞の数を計測した。その結果、上の chamber に UTI またはその分画であるペプチド 1、2、3 を加えた場合には無処置の場合に比べ浸潤が抑制された。in vivo の作用をみるためにマウスの腹部皮下に 3LL 細胞を移植し、反対側の皮下に UTI を投与、移植後 28 日目に屠殺し、腫瘍体積および肺転移巣数を調べ、無処置のものと比較した。

次にマウスの皮下への腫瘍の移植、血管内への腫瘍注入で、UTI やペプチドが転移の侵入過程か、侵出過程のどちらかに有効であるかを検討した。その結果 UTI とペプチド 3 は転移に抑制効果があること、さらにプラスミンの阻害効果を示すペプチド 3 のみに血管内への侵入の抑制が見られることから、UTI は抗プラスミン作用のドメインで効果を発揮することが示された。

以上から癌細胞の血管内への侵入には腫瘍細胞膜結合のプラスミン活性が必要であり、プラスミン活性を抑制することで癌の転移は抑制されるが、癌細胞が血管内に侵入した後ではプラスミン活性の抑制のみでは癌細胞の血管外への侵出は抑制されないと考えられた。

この発表に際して申請者に次のような質問が出された。

- 1) 腫瘍細胞にはプラスミンの受容体はあるのか
- 2) Matrigel は何で出来ているのか
- 3) type IV のコラーゲンはプラスミンでは分解されないが、コラゲナーゼはどこで産生されるのか
- 4) 転移巣の microscopic な数は結果に影響しないのか
- 5) 7 日目の切除の際に UTI を投与すると何故転移は少なくなるのか
- 6) この腫瘍の転移はすべて血行性か
- 7) ターゲティング療法は可能でないか
- 8) UTI などの大量投与で凝固線溶系に影響はないのか
- 9) UTI などは腫瘍に選択的に集まらないのか

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士 (医学) の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 教授 高田 明 和  
副査 教授 梶 村 春 彦 副査 教授 中 村 達