日消外会誌　29（4）：888～892，1996年

特集7

Protease inhibitor および proton pump inhibitor を用いた膵癌治療に対する新しい制癌治療戦略

金沢大学医学部第2外科
太田　哲生　　中川原寿俊　　荒川　　元
二上　文夫　　月岡　雄治　　北川　裕久
萱原　正都　　永川　宅和　　宮崎　逸夫

ヒト膵癌細胞3株（Capan-1，BxPC-3，MIAPaCa-2）における serine protease の発現からみた肝転移能ならびに protease inhibitor である FOY-305投与による肝転移抑制効果をヌードマウスを用いた脾内移植法による肝転移モデル実験で評価した．さらに，vacuolar type proton pump（V-type ATPase）発現の有無を検索し，その inhibitor である bafilomycin A_1 による浸潤抑制効果を matrigel invasion chamber を用いた chemoinvasion assay 法で評価した．その結果，膵癌の転移能は trypsinogen 1（cationic type）の発現とよく相関し，その転移発生率は FOY-305投与で有意に抑制された．さらに，膵癌の浸潤能は bafilomycin A_1 によって有意に抑制された．以上の成績より，ヒト膵癌の浸潤・転移に際し trypsinogen 1と V-type ATPase 発現が重要な役割を演じていること，さらに浸潤・転移の制御法として protease および proton pump の inhibitor を用いた治療法の有用性が示唆された．

Key words： pancreatic cancer，vacuolar-type H^+-ATPase，bafilomycin A_1

はじめに

最近，筆者らは膵癌細胞が浸潤・転移する際にはマトリックス分解酵素や第3の proton pump である vacuolar type H^+-ATPase（V-type ATPase）が重要な役割を演じている可能性のあることを報告した[1]．そこで，本研究ではマトリックス分解酵素の活性化を制御することによる転移制御法の1つとして，protease inhibitor（PI）および proton pump inhibitor（PPI）療法という新しい制癌治療法の可能性につき検討し，興味ある2，3の知見を得たので報告する．

対象ならびに方法

1．材料

3種類のヒト膵癌細胞株（Capan-1，BxPC-3，MIAPaCa-2）を ATCC より購入して使用した．In vivo の実験では，6週齢のヌードマウスを使用した．使用した薬剤は serine protease のインヒビターとして FOY-305（小野薬品工業より供与）を，また V-type ATPase の specific inhibitor として bafilomycin A_1（和光純薬工業，大阪）を使用した．なお，ヌードマウスを用いた実験では FOY-305は原末0.1％を含有する粉末飼料として経口投与させた．

2．方法

1）膵癌細胞における serine protease の発現からみた肝転移能ならびに FOY-305投与による肝転移抑制効果の評価方法

膵癌細胞株における trypsinogen と urokinase-type plasminogen activator（uPA）の発現の有無は reverse transcription-polymerase chain reaction（RT-PCR）法を用いて mRNA レベルで検索した．ヒト trypsinogen 1，2ならびに uPA の cDNA 塩基配列から，それぞれに特異的な合成 oligonucleotide primer（**Table 1**）を作製した．また，各種細胞株での肝転移能は，対数増殖期にある細胞株を 1×10^6個ずつヌードマウスの脾臓内に注入し（脾内移植法），6週後に犠牲死させて肉眼的ならびに組織学的レベルで転移の有無を評価した．さらに，FOY-305粉末飼料を移植2週間前より実験期間中ずっと経口摂取させた FOY-305投与群と FOY-305を投与しなかった非投与群の間で，肝転移発生率の差異についても検討した．

2）膵癌細胞における V-type ATPase 発現の有無と bafilomycin A_1 による浸潤抑制効果の評価方法

V-type ATPase は9種類の subunit で構成されて

＊第46回日消外会総会シンポ1・消化器癌転移の機序と対策

<1995年11月15日受理>別刷請求先：太田　哲生
〒920　金沢市宝町13－1　金沢大学医学部第2外科

Table 1 Oligonucleotide primers for RT-PCR

Genes	Primer sequences	
Trypsinogen 1		
sense	5'-CCCCCAATACGACAGGAA-3'	(18mer)
anti-sense	5'-TTCTGGGCACAGCCATCA-3'	(18mer)
Trypsinogen 2		
sense	5'-CCCCAAATACAACAGCCG-3'	(18mer)
anti-sense	5'-TTCTGGGCACAGCCATAG-3'	(18mer)
uPA		
sense	5'-ACCACCATCGAGAACCAGCC-3'	(20mer)
anti-sense	5'-AATCAGCTTCACAACAGTCA-3'	(20mer)
β-actin		
sense	5'-GAAAATCTGGCACCACACCTT-3'	(21mer)
anti-sense	5'-GTTGAAGGTAGTTTCGTGGAT-3'	(21mer)

いるが，なかでも16-kDa の subunit は proton の移動に中心的な役割を果たしていると考えられている[2)3)]．そこで，ヒト16-kDa subunit の cDNA 塩基配列より特異的 primer と probe を作製し，RT-PCR・Southern blotting 法を用いて mRNA レベルで検索した．また，bafilomycin A_1による浸潤抑制効果については BIOCOAT MATRIGEL invasion chamber (Becton Dickinson 社製) を用いた chemoinvasion assay[4)]を行って評価した．

成　績

1．膵癌細胞における serine protease の発現からみた肝転移能について

膵癌細胞株での serine protease の発現を mRNA レベルで見てみると，分化型である Capan-1と BxPC-3は trypsinogen 1と uPA の両者をともに発現していたが，未分化型である MIAPaCa-2は uPA だけを発現していた (**Fig. 1, Table 2**)．そこで，各種細胞株の

Fig. 1 Expression of serine proteases in human pancreatic cancer cell lines and normal pancreas.

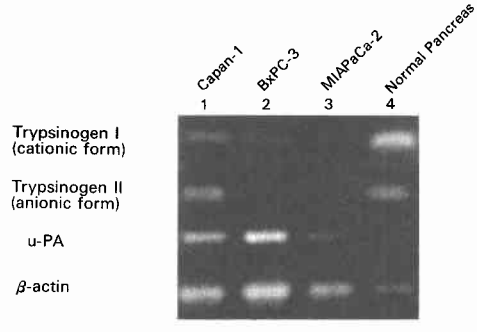
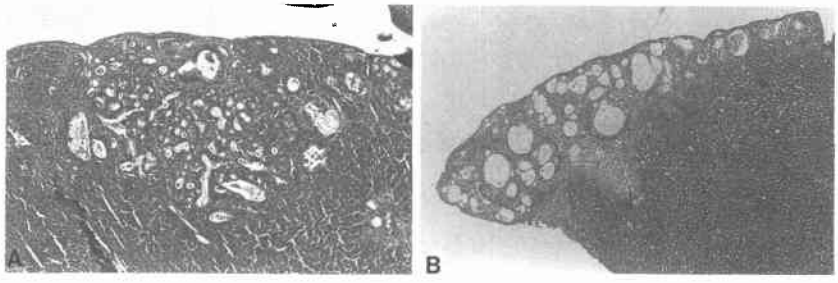


Table 2 Characteristics of Human Pancreatic Cancer Cell Lines Studied

	Human pancreatic cancer cell lines		
	Capan-1	BxPC-3	MIAPaCa-2
Histology			
Differentiation	Well differentiated adenocarcinoma	Moderately～Poorly differentiated adenocarcinoma	Undifferentiated carcinoma
Mucin production	+	+	−
Desmoplasia	+	−	−
Serine protease expression			
Trypsinogen-1 (cationic form)	+	+	−
Trypsinogen-2 (anionic form)	+	−	−
Urokinase-type plasminogen activater	+	+	+
Metastatic potential (Intrasplenic injection method)	Strong	Strong	None
Doubling time (in vitro)	76h	60h	40h

Fig. 2 Histologic appearance of hepatic metastasis in nude mice using intrasplenic implantation method. A, Capan-1 cell line (H & E, ×40) ; B, BxPC-3 cell line (H & E, ×40).



肝転移能を脾内移植法にて検討した．その結果，Capan-1では9匹中5匹(56%)，BxPC-3では10匹中5匹（50%）に肝転移巣の形成が認められた．これに対しMIAPaCa-2では10匹全例に転移巣は見られなかった．肝転移巣は肉眼的には肝表面に白色調の結節として認められ，組織学的には粘液の豊富な癌細胞が腺管構造を形成し，しかも間質結合織の増生も伴っており，ヒト膵癌組織像にきわめて近い形態をとっていた（**Fig. 2**）．

以上，膵癌細胞株においてtrypsinogen 1の発現と肝転移能はよく相関するという成績が得られた．そこで，次にCapan-1細胞を用いて，serine protease のinhibitor であるFOY-305による転移抑制効果について検討した．

2．FOY-305による肝転移抑制効果について

Capan-1細胞の脾内移植法による肝転移の発生率は，FOY-305非投与群（n=13）では62%であったのに対し，FOY-305投与群（n=14）では14%と有意（$p<0.05$）に抑制された．また，肝表面の転移結節数についてもFOY-305非投与群では10.3±11.2個（mean±SD）であったのに対し，FOY-305投与群では2.3±6.8個と有意（$p<0.05$）に減少していた．ただし，実験期間中両群における体重の推移には有意な差は認められなかった（**Table 3**）．

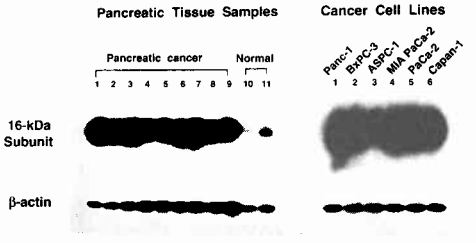
3．膵癌細胞におけるV-type ATPaseの発現について

ヒト膵癌組織でみられた[1]と同様，膵癌細胞株でも正常膵組織と比較して明らかに過剰のPCR産物が認められた（**Fig. 3**）．

4．Bafilomycin A_1による浸潤抑制効果について

V-type ATPaseが癌細胞の浸潤能に及ぼす影響をみる目的で，MATRIGEL invasion chamberを用いてV-type ATPaseのspecific inhibitorであるbafilomycin A_1の浸潤抑制効果の有無について検討した．種々の濃度でのbafilomycin A_1と癌細胞を血清不含培地で2時間preincubationし，その後上室には1×10^6個/mlに調整した細胞懸濁液を各200μlずつ，下室にはケモアトラクタント溶液として各種培養細胞株の培養上澄液を入れ，24時間後に浸潤した細胞数の判定を行った．判定は，フィルター下面に付着した癌細胞をメタノールで固定し，その後ヘマトキシリン・エオジン染色を行い，×200倍の倍率で光顕レベルでランダムに5視野を選び，1視野当たりの癌細胞数を算出して行った．その結果，Capan-1およびBxPC-3のいずれの細胞株もbafilomycin A_1によってその浸潤能が濃度依存性に，しかもすでに100nM濃度のレベルで有意に抑制された（**Fig. 4**）．

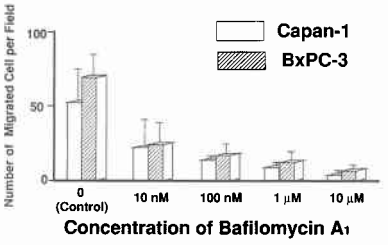
Fig. 3 Southern blot analysis of PCR amplified products of mRNA in human pancreatic ductal cancer and normal pancreatic tissues with probes for 16 kilodalton subunit of V-ATPase and β-actin.



考　察

最近，筆者らはserine proteaseの1つであり，通常膵の腺房細胞で合成・分泌されているtrypsinogenがヒト膵癌や他の消化器癌で高率に過剰発現していることを報告し，uPAと同様にtrypsinogenも活性体に変換されれば細胞外マトリックス分解酵素として癌の浸潤・転移に深く関与する可能性のあることを指摘してきた[5]．さらに今回の研究で，ヒト膵癌細胞株でのser-

Fig. 4 Effect of a V-ATPase inhibitor agent, bafilomycin A_1 on the cancer cell invasion in vitro by chemoinvasion assay using a MATRIGEL invasion chamber.



ine proteaseの発現RT-PCR法を用いてmRNAレベルで検索し，serine proteaseの発現からみた肝転移能について検討した．その結果，trypsinogen 1 (cationic type) の発現と肝転移能はよく相関するという成績が得られた．さらに，Capan-1細胞株での肝転移巣の発生率ならびに発生個数は，FOY-305の投与で有意に抑制されたことが注目される．以上の実験成績から，膵癌細胞株での肝転移巣形成には従来から指摘されているuPAに加えてcationic typeのtrypsinogen 1が重要な役割を演じている可能性が示唆された．したがって，マトリックス分解酵素の1つであるserine proteaseの活性化を抑制することによる肝転移制御法として，低分子合成serine protease inhibitorであるFOY-305を投与するprotease inhibitor (PI) 療法はきわめて有用な治療法と言える．

ところで，ヒト膵癌細胞はtrypsinogenを分泌するだけでなく，pancreatic secretory trypsin inhibitor (PSTI) も過剰に分泌していることが知られている[6]．しかし，通常PSTIはtrypsinと会合して複合体を形成し，いったんはtrypsin活性を阻害するが，時間の経過とともにtrypsin活性が復活 (PSTIの一時的阻害) することが知られており，Knitz型インヒビターである塩基性膵トリプシン・インヒビター (BPTI) がtrypsinと安定な複合体を形成して永久阻害するのとは対照的である[7]．また，一般に癌巣部の間質は酸性環境下にあるため，このような部位ではtrypsinとPSTIの複合体は解離しやすいことも知られている．したがって，ヒト膵癌組織中に過剰発現しているPSTIは必ずしも永続的に抗trypsin作用を発揮するとは限らないことからも，trypsin活性やplasmin活性などのserine protease活性を広範囲に永久阻害する目的で低分子合成serine protease inhibitorであるFOY-305を外因性に投与することの意義は十分にあると考えている．

V-type ATPaseはF-type ATPase (ミトコンドリアに存在し，ATP合成に関与)，P-type ATPase (主に胃の壁細胞の頂端膜に存在し，細胞外へのH^+排出に関与) に次ぐ第3のproton pumpとして近年見いだされたもので，真核細胞の液胞，lysosome, endosome, trans-Golgi network (TGN)，clathrin-coated vesicleなどの細胞内膜系に広く分布し，各オルガネラの微小環境を酸性に保つことにより独自の機能を発揮させていると考えられている[2)3)]．最近，筆者らはヒト膵癌組織内でV-type ATPaseが過剰発現しているのをRT-PCR法を用いてmRNAレベルで確認し，さらに16-kDa subunitに対する抗血清を用いてこのproton pumpが膵癌細胞の細胞質内に過剰発現しているのを免疫染色を行って蛋白レベルで確認した(投稿中)．このV-type ATPaseは癌細胞のみならず，破骨細胞，マクロファージ，活性化好中球の細胞膜にも発現し，なかでも破骨細胞においては骨吸収の場に面した原断質膜であるruffled borderに過剰のV-type ATPaseが存在し，多くのH^+を細胞外のresorption lacuneaに排出して骨吸収に必要な微小酸性環境を作り上げていることが知られている[8]．このlacuneaでの微小な酸性環境下で，骨吸収に係わるlysosomal enzymeやMMP-9が活性化され，骨の脱灰と有機基質の分解が起こって骨吸収が進んでいくと考えられている．

ところで，筆者らは膵癌細胞が高率にtrypsinogenやprocathepsin Bを発現していることを報告してきたが[1]，lysosomal enzymeであるprocathepsin Bは言うまでもなく，cationic typeのtrypsinogen 1はacidic pH (pH 4.5～5) で効率よくautoactivationされることが知られている[9]．したがって，破骨細胞における骨吸収の機序と同様，膵癌細胞においても細胞膜に存在するV-type ATPaseによって細胞外へ排出されたH^+により，微小な酸性環境が作られ，これによりtrypsinogen 1やprocathepsin Bが活性化されてtrypsinやcathepsin Bとなって自ら細胞外マトリックスを破壊すると同時に，MMPsなどのproenzymeの活性化にも関与している可能性が十分に考えられる．そこで，V-type ATPaseの過剰発現がみられ，しかもヌードマウスを用いた脾内移植法にて肝転移を認めた2種類の膵癌細胞株 (Capan-1とBxPC-3) を用いてV-type ATPaseの浸潤能に及ぼす影響をchemoinvasion assay法で評価した．その結果，Capan-1およびBxPC-3のいずれの細胞株もV-type ATPaseのspecific inhibitorであるbafilomycin A_1によってその浸潤能が濃度依存性に有意に抑制されるという成績が得られた．以上の成績は，膵癌細胞が浸

潤する際にV-type ATPaseがきわめて重要な役割を演じていることを示すものであり，その浸潤抑制の機序として，細胞外へのH^+排出抑制に伴うtrypsinogen 1やprocathepsin Bなどのマトリックス分解酵素の活性化抑制による浸潤能低下が推察される．現在，筆者らはV-type ATPaseのマトリックス分解酵素の活性化におよぼす影響をみるため，各種膵癌細胞の培養上澄中の酵素活性をザイモグラフィを用いて観察し，bafilomycin A_1投与による酵素活性の変化を検討中である．

以上，今回の実験でヒト膵癌細胞の浸潤・転移に際しtrypsinogenとV-type ATPaseの発現の重要性を指摘した．さらに，浸潤・転移の際に必要とされているマトリックス分解酵素の活性化を抑制することによる浸潤・転移の制御法としてprotease inhibitor療法の有用性をin vivoの実験で，またproton pump inhibitor（PPI）療法の有用性をin vitroの実験で示した．今後は，これらの研究成績をもとに，両治療法を併用する新しい制癌療法（PI・PPI併用療法）の有用性について，さらなる研究を行う予定である．

文　献

1) 太田哲生，沼田雅行，大熊勝治ほか：膵癌におけるマトリックス分解酵素の活性化機序とその阻害．胆と膵　16：407—412，1995
2) 森山芳則：動物細胞における液胞型H^+輸送性ATPase (V-ATPase)の発見とその機構と機能に関する研究．生化学　65：413—436，1993
3) Nelson N: Structure, molecular H^+-ATPase. J Bioenerg Biomembr 21：553—571，1989
4) Hasegawa Y, Takada M, Yamamoto M et al: The gradient of basic fibroblast growth factor concentration in human pancreatic cancer cell invasion. Biochem Biophys Res Comm 200：1435—1439，1994
5) Ohta T, Terada T, Nagakawa T et al: Expression of pancreatic trypsinogen in human extrapancreatic gastrointestinal carcinomas. Oncol Rep 1：759—764，1994
6) Ogawa M, Tomita N, Hori A et al: Pancreatic secretory trypsin inhibitor in cancers. Adv Exp Med Biol 240：547—553，1988
7) 寺岡　宏，吉田信男：ヒト膵分泌性トリプシンインヒビター(PSTI)のタンパク質工学．蛋・核・酵 35：2654—2664，1990
8) Vaananen HK, Karhukorpi EK, Sundquist K et al: Evidence for the presence of a proton pump of the vacuolar type H^+-ATPase in the rufled borders of osteoclasts. J Biol Chem 265：7645—7654，1990
9) Figarella C, Miszczuk-Jamska B, Barrett AJ: Possible lysosomal activation of pancreatic zymogens. Biol Chem Hoppe Seyler 369：293—298，1988

A New Strategy for the Therapy of Pancreatic Cancer Invasion and Metastasis by Protease Inhibitor and Protein Pump Inhibitor Agents

Tetsuo Ohta, Hisatoshi Nakagawara, Hajime Arakawa, Fumio Futagami, Yuji Tsukioka, Hirohisa Kitagawa, Masato Kayahara, Takukazu Nagakawa and Istuo Miyazaki
Department of Surgery (II), School of Medicine, Kanazawa University

The potential for hepatic metastasis in nude mice was studied by the intrasplenic implatation method with three human pancreatic cancer cell lines, Capan-1, BxPC-3, and MIAPaCa-2, especially in relation to serine protease expression. The inhibitory effect of a protease inhibitor agent, FOY-305, on hepatic metastasis was also assessed. In addition, we examined these cell lines, for expression of he vacuolar type proton pump (V-type ATPase), and determined the effect of its inhibitor agent, bafilomycin A1, on the cancer cell invasion in vitro by chemoinvasion assay using a MATRIGEL invasion chamber. The potential for hepatic matastasis was well correlated with expression of trypsinogen I (cationic isoform) in these cell lines, and the incidence of metastasis was significantly decreased by FOY-305. In addition, the potential for invasion in vitro in these cell lines was also significantly suppressed by bafilomycin A1. These findings suggest that pharmacologic inhibition of the activity of serine protease and V-type ATPase may be a new strategy for the therapy of pancreatic cancer invasion and metastasis.

Reprint requests: Tetsuo Ohta　Department of Surgery (II), School of Medicine, Kanazawa University 13-1 Takara-mach, Kanazawa, 920 JAPAN