

細胞接着阻害擬似ペプチドによる抗接着療法の 癌転移におよぼす効果

富山医科薬科大学医学部第2外科¹⁾, 同 臨床看護学²⁾
同 和漢薬研究所病態生化学部門³⁾

大西 康晴¹⁾³⁾ 藤猪 英樹³⁾ 村田 純³⁾ 坂本 隆¹⁾
田沢 賢次²⁾ 藤巻 雅夫¹⁾ 塚田 一博¹⁾ 済木 育夫³⁾

癌転移阻止効果の増強を目的に、アルギニン-グリシン-アスパラギン酸 (RGD) ペプチドが擬似ペプチド化された配列を2つ有する新規擬似ペプチド (FC-336) を作成し、癌転移・浸潤に及ぼす効果を検討した。FC-336投与はアルギニン-グリシン-アスパラギン酸-セリン (RGDS) に比べて B16-BL6 黒色腫の実験的肺転移を用量依存的に抑制した。Colon 26結腸癌高転移株 (L5) による実験的肝転移モデルにおいても、FC-336の門脈内同時投与あるいは腫瘍移植後の5回の静脈内投与により、著明な転移抑制と有意な生存期間の延長がみられた。FC-336は *in vitro* における癌細胞の基底膜浸潤・接着・移動に対して RGDS に比べて強くはないが、濃度依存的な抑制効果を示した。ゼラチンザイモグラムにおいて、FC-336は MMP-2, -9によるゼラチン基質の分解を抑制した。従来の抗接着作用に加え、MMPによる酵素的破壊を抑制する作用を有する新規擬似ペプチドは、癌転移・浸潤をより強力に抑制することが明かとなった。

Key words: pseudo-peptide, metastasis, matrix metalloproteinase (MMP)

はじめに

今日の外科的治療の進歩にもかかわらず、依然として術後の遠隔臓器への転移・再発がみられることも少なくなく、その機序の解明と制御は重要な課題のひとつである。以前より、我々は癌転移形成過程における癌細胞と細胞外マトリックス分子との接着相互作用に着目し、その構成成分であるフィブロネクチン分子などにみられる細胞接着コア配列 (RGD) の合成誘導体を用いて、これらの相互作用を制御することにより癌転移を阻止することを試みてきた^{1)~3)}。最近、血中でのプロテアーゼ耐性を獲得するために、RGDペプチドの Arg-Gly 間のアミド結合を反転させて作成したレトロ型擬似ペプチドが、癌細胞の転移・浸潤を強く抑制することを明かにした⁴⁾。今回、さらなる癌転移阻止効果の増強を目的に、RGDペプチドが擬似ペプチド化され

た配列を2つ有する新規擬似ペプチド (FC-336) を作成し癌転移・浸潤に及ぼす効果を検討した。

方法

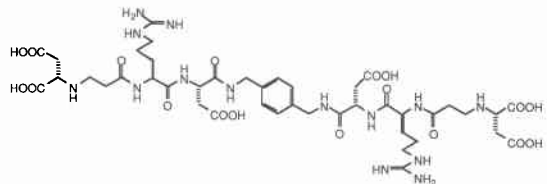
(1) FC-336の合成

本研究で用いた新規擬似ペプチド FC-336の合成は、富士写真フィルム (株) 足柄研究所との共同研究で行われた。Fig. 1 に FC-336の化学構造を示した。

(2) 転移性癌細胞を用いた実験的転移実験

C57BL/6マウスに同系の肺に高転移性のメラノーマ細胞株 B16-BL6⁵⁾ (5×10^4 個) あるいは BALB/c マウスに同系の肺に高転移性の結腸癌細胞株 colon 26-M3.1⁶⁾ (4×10^4 個) を、FC-336または RGDS ととも

Fig. 1 Structure of FC-336



* 第50回日消外会総会シンポ2・癌細胞と間質との相互関係からみた転移、浸潤の諸問題
<1997年12月3日受理>別刷請求先: 済木 育夫
〒930-0152 富山市杉谷2630 富山医科薬科大学和漢薬研究所病態生化学部門

に、それぞれ C57BL/6あるいは BALB/c に尾静脈より移植した。移植後14日目に肺転移結節数を計測した。また、肝に高転移性の結腸癌細胞株 colon 26-L5⁷⁾ (2×10^4 個) を、麻酔下にて開腹させた BALB/c マウスの門脈より移植した。FC-336または RGDS は、腫瘍細胞とともに門脈内に同時投与あるいは移植後1~5日目に静脈内投与した。移植後19日目に肝を摘出し、肝転移結節数および肝重量を計測した。

(3) 癌細胞による基底膜への浸潤実験 (invasion)

癌細胞の基底膜への浸潤は、Albini らの方法に従い、孔径8 μ mのメンブレンフィルターにより上下2層に区画されたトランスウエルチャンバーを用いて測定した⁸⁾。フィルターの上部表面を5 μ gのマトリジェル(基底膜再構成基質)で、下部表面を5 μ gのフィブロネクチンでおのおのコートした。0.1%BSA-MEMに浮遊した癌細胞をチャンバー上層に加え、FC-336またはRGDSの共存下で、37°C、5%インキュベーター内で一定時間培養した。培養終了後、フィルター下面に浸潤、移行した癌細胞数を光学顕微鏡($\times 400$)で計測し、5視野の平均細胞数にて浸潤の指標とした。

(4) 細胞移動実験 (cell migration)⁸⁾

癌細胞の細胞外マトリックス上の移動実験は、細胞の接触走化性 (haptotaxis) を利用した McCarthy らの方法に従い、トランスウエルチャンバーを用いて行った。フィルターは下部表面を5 μ gのフィブロネクチンでコートし、以後の操作は浸潤実験と同様に行った。

(5) 細胞接着実験 (cell adhesion)⁹⁾

フィブロネクチン、ラミニンあるいはマトリジェルをコートした96well microtiter plate に、癌細胞浮遊液を FC-336あるいは RGDS の共存下に加え、37°Cで30分間培養後、基質に接着した細胞を0.5%Crystal violet で30分間処理して固定、染色した。蒸留水で洗浄後、30%酢酸水溶液100 μ l にて染色細胞を溶解し、ELISA プレートリーダーにて吸光度を測定した。

(6) Zymography

10%FBS 含有 Dulbecco's modified MEM : Ham F-12 = 1 : 1 混合液中で高浸潤性のヒト線維肉腫細胞株 HT-1080細胞を細胞培養フラスコで subconfluent になるまで培養した。その後、無血清培地に置き換えさらに24時間培養し、培養上清を回収し、-20°Cで保存した。培養上清は検体用緩衝液[62.5mM Tris-HCl, pH 6.8/10%glycerol/0.00125%bromophenol blue/2% sodium dodesyl sulfate (SDS)] を 2 : 1 の割合で混

合し、37°C水浴中で30分間処理した。分子量マーカーは検体用緩衝液で2mg/ml に希釈し、沸騰水浴中で5分間加熱処理した。0.1%ゼラチンと0.1%SDS を含む7.5%アクリルアミド分離ゲルに3.3%アクリルアミド濃縮ゲルを重曹した電気泳動ゲルを作成し、これらの検体を冷室にて泳動した。泳動終了後、ゲルを洗浄用緩衝液で30分間2回、室温で振盪しながら SDS を洗浄、除去した。酵素反応用緩衝液に置換し、r-hTIMP-2を加えた酵素反応用緩衝液にゲルを浸して密封し水浴中にて37°C、18時間インキュベートした。クマシブルー染色液で染色し、脱色後、乾燥した。本ザイモグラムでは、MMPs によるゼラチン分解により、泳動バンドが染色されずに白く抜けてみえる。さらに、分子量マーカーからどの種の MMPs によるゼラチン分解かを判別できる。ゼラチン分解能はマスタースキャンゲル分析装置により定量した。

(7) 有意差検定

処置群と未処置群との統計的有意差は、Student's two-tailed t-test あるいは Mann Whitney's U-test により検討した。

結 果

(1) FC-336による癌転移抑制効果

FC-336を投与した群は B16-BL6細胞の肺転移を対照群に比較して用量依存的に抑制した (Table 1)。本実験において、肺転移を抑制した FC-336と同量の RGDS を投与した群では、高用量にもかかわらず有意な肺転移抑制効果は認められなかった。colon 26-L5結

Table 1 Effect of FC-336 on experimental lung metastasis produced by i.v. injection of B16-BL6 melanoma cells

Administered i.v. with	μ g/mouse	No. of lung metastasis on day 14
		Mean \pm SD (Range)
Untreated (PBS)		183 \pm 9 (174-193)
RGDS	2,000	180 \pm 7 (172-189)
FC-336	500	167 \pm 13 (152-180)
	1,000	57 \pm 24 (35-82)***
	2,000	11 \pm 5 (6-15)***
	5,000	0 (0)***

Five C57BL/6 mice per group were inoculated i.v. with B16-BL6 (4×10^4) with or without the compounds. Mice were killed 2 weeks after tumor inoculation and tumor colonies in the lungs were manually counted. ***; $p < 0.001$ as compared with untreated control by Student's two-tailed t-test.

腸癌による肝転移実験において、FC-336の門脈内同時投与あるいは腫瘍移植後の5回の静脈内投与により、対照群に比べて有明な転移抑制効果と有意な生存期間の延長がみられた (Fig. 2, 3, Table 2).

(2) 癌細胞の基底膜浸潤・接着・移動に及ぼすFC-336の効果

FC-336による癌転移抑制機序を解明するため、*in vitro* における癌細胞の基底膜浸潤・接着・移動に及ぼすFC-336の影響について検討した結果、いずれも用量依存的な抑制効果を示したが、その抑制効果はRGDS程強くはなかった (Fig. 4, 5).

(3) MMPのゼラチン分解能に及ぼすFC-336の効果

FC-336は癌細胞が産生するmatrix metallo-

Fig. 2 Effect of FC-336 pseudo-peptide on experimental liver metastasis produced by an intraportal injection of colon 26-L5 carcinoma cells. Five BALB/c mice per group were injected i.p.v. with colon 26-L5 cells (10^4) with or without FC-336 or RGDS at the indicated doses. Nineteen days after tumor inoculation the mice were sacrificed and tumor colonies in the liver (A) and liver weights (B) were measured. *; $p < 0.05$, **; $p < 0.01$, ***; $p < 0.001$ as compared with untreated control by Student's two-tailed t-test.

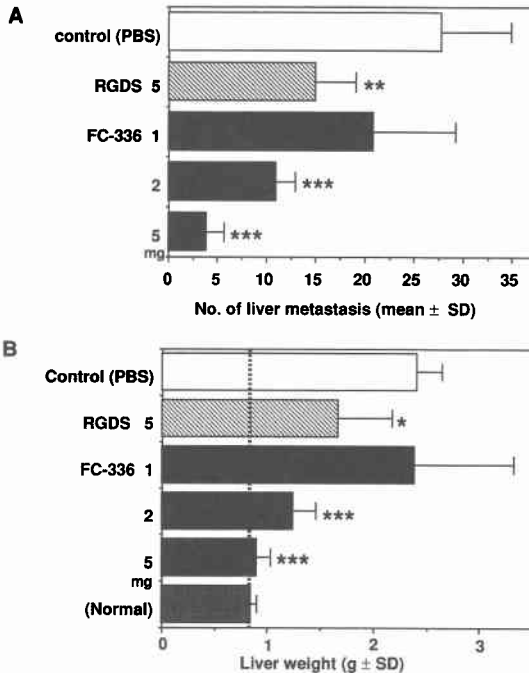
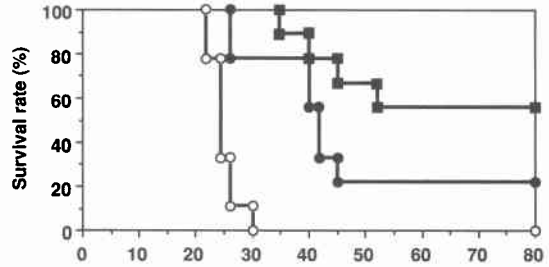


Fig. 3 Effect of FC-336 on the survival of mice inoculated with colon 26-L5 carcinoma cells. Ten BALB/c mice per group were inoculated i.p.v. with tumor cells (2×10^4) with (■) or without (○) 5mg FC-336, or administered i.v. with 1mg FC-336 on day 0, 1, 2, 3, and 4 after i.p.v. inoculation of the tumor cells (●). Animal survival was monitored as a function of time. $p < 0.01$; five consecutive administrations vs. control, $p < 0.001$; i.p.v. co-injection vs. control by the Mann-Whitney U-test.



proteinases (MMP-2, -9) によるゼラチン基質の酵素的分解を抑制したが、RGDSでは高濃度にもかかわらず抑制効果が認められなかった (Fig. 6).

考察

癌の血行性転移過程において、癌細胞は多くの接着相互作用を繰り返して転移の各段階をクリアし遠隔組織へと到達し、その組織特有の微小環境に影響され、適応した細胞のみが増殖し転移巣を形成する。詳細については十分に明かにされていないが、この一連の転移カスケードの少なくとも1つを阻害することにより、理論的には癌転移・浸潤を抑制あるいは阻止することが可能であろうと考えられる¹⁰⁾。近年、癌細胞間あるいは癌細胞-細胞外マトリックス間の相互作用に関わる細胞接着分子あるいはレセプターが明かにされるに伴って、それらのリガンドやその活性部位を用いることで、癌の転移・浸潤の抑制に応用することが可能となってきた(抗接着療法)。我々はすでに抗接着療法のひとつとして、細胞外マトリックス構成成分であるフィブロネクチン分子由来の細胞接着コア配列(RGD)の合成誘導体を用いて、癌転移を阻止することを試みてきた。従来より、RGDペプチドのArg-Gly間のアミド結合が血中内でプロテアーゼにより比較的容易に切断されやすいことが指摘されてきた。最近、血中でのプロテアーゼ耐性を獲得するために、RGDペプチドのArg-Gly間のアミド結合を反転させて作成したレトロ型擬似ペプチドが、癌細胞の転移・浸潤を強

Table 2 Effect of multiple i.v. and i.p.v. administration of FC-336 on experimental liver metastasis by intraportal injection of colon 26-L5 carcinoma cells

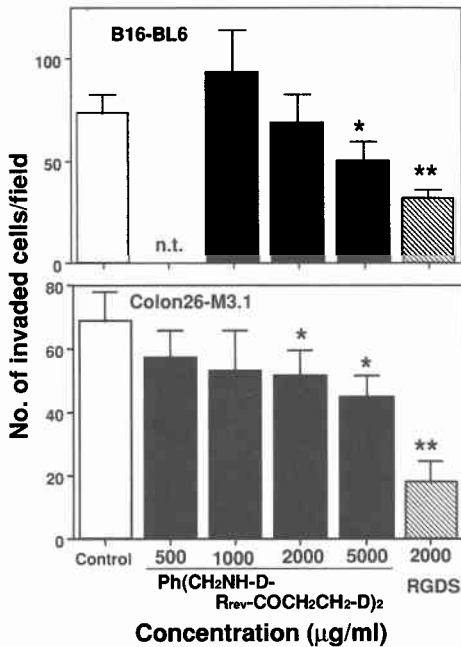
	Administered	Timing on day	Dose (mg×times)	No. of liver colonies
				Mean±SD(Range)
Control (PBS)				11±3(6-14)
RBDS	i.v.	O ^a ,1,2,3,4	1×5	8±5(3-15)
FC-36			1×5	5±1(4-7)*
RGDS	i.p.v.	O ^b	5	11±5(4-16)
FC-336			5	2±1(0-4)**

* ; p<0.01, ** ; p<0.001 as compared with control by Student's two-tailed t-test.

^aOn day 0 means 6h after tumor cell i.p.v. inoculation.

^bOn day 0 means co-injection with tumor cell i.p.v. inoculation.

Fig. 4 Effect of FC-336 on the invasion of B16-BL6 melanoma and Colon 26-M3.1 carcinoma cells into Matrigel/fibronectin-coated filters. Filters in Transwell cell culture chamber were precoated with 5μg fibronectin on their lower surfaces and with Matrigel (5μg) on their upper surface. Tumor cells (2×10⁴/well) in 0.1% BSA-medium were mixed with the indicated concentrations of FC-336 and then added into the upper compartment of the Transwell cell culture chambers. After 4h incubation, the invaded cells on the lower surfaces were visually counted. * ; p<0.01, ** ; p<0.001 as compared with control (PBS) by Student's two-tailed t-test.



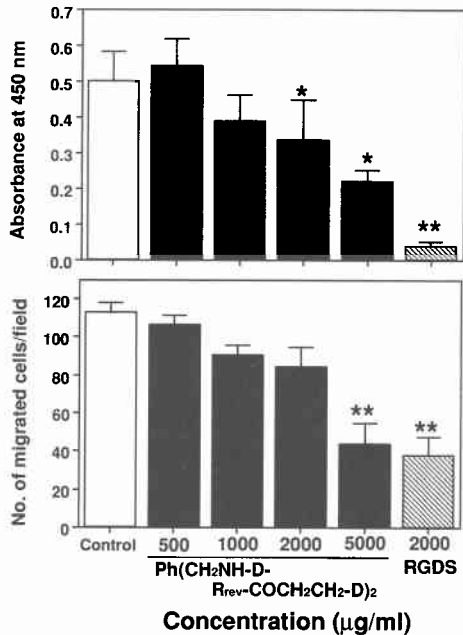
く抑制することを明らかにした⁴⁾。今回、RGD ペプチドが擬似ペプチド化された配列を2つ有する新規擬似ペプチド (FC-336) を作製し癌転移・浸潤に及ぼす効果を検討した結果、FC-336の投与により転移性癌細胞の実験的転移がRGDSに比べて著明に抑制されることが明らかとなった。

また、癌細胞の細胞外マトリックスや基底膜への浸潤は、転移形成の複雑な過程において極めて重要な段階であり、細胞外マトリックス構成成分との接着、癌細胞由来の酵素による基底膜の分解・破壊および細胞外マトリックス上の移動という3ステップからなる¹⁾。癌細胞の基底膜浸潤・接着・移動に及ぼすFC-336の影響について *in vitro* で検討した結果、いずれも用量依存的な抑制効果を示したが、その抑制効果はRGDS程強くなかった。ゼラチンザイモグラムを用いた検討では、FC-336は癌細胞が産生するMMP-2,-9によるゼラチン基質の酵素的分解を抑制したが、RGDでは抑制効果は認められなかった。この結果は、FC-336による *in vivo* での転移抑制効果とよく相関している。また、FC-336がMMPによるゼラチン基質の酵素的分解を抑制する理由のひとつとして、FC-336の化学構造からMMPのキレート作用が考えられるが、詳細な機序についてはさらに研究が必要であると思われる。

以上のことから、RGDペプチドが擬似ペプチド化された配列を2つ有する新規擬似ペプチドFC-336は、従来の抗接着作用に加え、癌細胞が産生するMMPによるゼラチン基質の酵素的分解を阻害する作用より癌細胞の浸潤を抑制し、結果として転移をより強く阻止すると考えられた。消化器癌術後の転移を制御するうえで、原発巣の外科切除、化学療法、放射線療法などに

Fig. 5 Effect of FC-336 on the adhesion and migration of B16-BL6 melanoma cells into Matrigel/fibronectin-coated filters.

Upper panel : Tumor cells (4×10^4) were added to wells which had been precoated with $50 \mu\text{l}$ of 3 mg/ml fibronectin in PBS. After 30-min incubation, non adherent cells were washed away and adherent cells were stained in 0.5% crystal violet containing 20% methanol for 30min. After washing, the stained cells were lysed by 30% acetic acid and the absorbance was measured at 590nm. Lower panel : Filters were precoated with $5 \mu\text{g}$ of fibronectin on their lower surfaces. B16-BL6 melanoma cells (2×10^4 /well) in 0.1% BSA medium were mixed with the indicated concentrations of peptides and then added into the upper compartment of the Transwell cell culture chambers. After 4-h incubation, the migrated cells on the lower surfaces were visually counted. * ; $p < 0.01$, ** ; $p < 0.001$, compared with control by Student's two-tailed t-test.



加え、細胞接着分子の制御に基づく新しい癌治療の臨床応用が期待される。

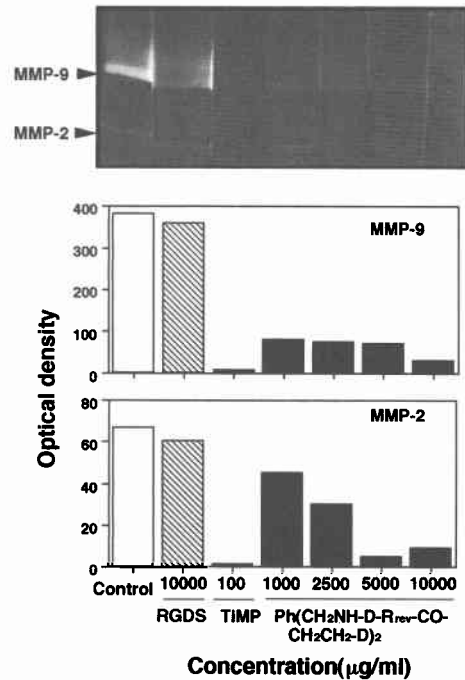
本研究の一部は富士写真フィルム小島政芳博士、西川尚之博士らとの共同研究である。

文 献

1) Saiki I, Iida J, Ogawa R et al: Inhibition of the metastasis of murine malignant melanoma

Fig. 6 Direct effect of FC-336 on the gelatinolytic activity of MMPs.

Subconfluent monolayers of HT-1080 cells were cultured for 24h in serum-free D-MEM/F-12. The conditioned media were subjected to electrophoresis in a gelatin embedded SDS-polyacrylamide gel. After electrophoresis, tripes of the gel were incubated with an incubation buffer alone (*lane 1*) ; RGDS (*lane 2*) ; TIMP-2 (*lane 3*) ; FC-336 (*lane 4-7*). After an 18-h incubation, the gel stripes were stained with Coomassie brilliant blue, the location of gelatinolytic enzymes were detected as clear bands (upper panel) and the gelatinolytic activity was quantified by Master Scan Gel Analysis System (Middle and lower panel).



by synthetic polymeric peptides containing core sequence of cell adhesive molecules. Cancer Res 49 : 3815-3822, 1989

2) Saiki I, Murata J, Iida J et al: Anti-metastatic effects of synthetic polypeptides containing repeated structures of the cell-adhesive Arg-Gly-Asp(RGD) and Tyr-Ile-Gly-Arg(YIGSR) sequences. Br J Cancer 60 : 722-728, 1989
 3) Fujii H, Komazawa H, Mori H et al: Antimetastatic activities of synthetic RGDS and RLDS peptide analogues and their inhibi-

- tory mechanisms. *Biol Pharm Bull* **18** : 1681–1688, 1995
- 4) Fujii H, Nishikawa N, Komazawa H et al: Inhibition of tumor invasion and metastasis by peptic mimetics of Arg-Gly-Asp(RGD) derived from the cell recognition site of fibronectin. *Oncol Res* **8** : 333–342, 1997
 - 5) Hart IR: The selection and characterization of an invasive variant of the B16 melanoma. *Am J Pathol* **97** : 587–592, 1979
 - 6) Yoo YC, Saiki I, Sato K et al: MDP-Lys(L18), a lipophilic derivate of muralyl dipeptide, inhibits the metastasis of haematogenous and non-haematogenous tumours in mice. *Vaccine* **12** : 175–180, 1994
 - 7) Ohnishi Y, Sakamoto T, Fujii H et al: Characterization of a liver metastatic variant of murine colon 26 carcinoma cells. *Tumour Biol* **18** : 113–122, 1997
 - 8) Saiki I, Murata J, Nakajima M et al: Inhibition of sulfated chitin derivatives of invasion through extracellular matrix and enzymatic degradation by metastatic melanoma cells. *Cancer Res* **50** : 3631–3637, 1990
 - 9) Komazawa H, Saiki I, Aoki M et al: Synthetic Arg-Gly-Asp-Ser analogues of the cell recognition site of fibronectin that retain antimetastatic and anti-cell adhesive properties. *Biol Pharm Bull* **16** : 997–1003, 1993
 - 10) 済木育夫, 大西康晴: 細胞接着分子と血行性転移—とくに細胞接着の制御による癌転移の抑制—. *消外* **18** : 1941–1952, 1995
 - 11) Liotta LA: Tumor invasion and metastasis—Role of the extracellular matrix: Rhoads memorial award lecture. *Cancer Res* **46** : 1–7, 1986

Effect of Anti-adhesion Therapy by a New Pseudo-peptide of Arg-Gly-Asp (RGD) on Tumor Metastasis

Yasuharu Ohnishi¹⁾³⁾, Hideki Fujii³⁾, Jun Murata³⁾, Takashi Sakamoto¹⁾,
Kenji Tazawa²⁾, Masao Fujimaki¹⁾ and Ikuo Saiki³⁾

Second Department of Surgery¹⁾, Department of Clinical Nursing²⁾, Faculty of
Medicine, Department of Pathogenic Biochemistry³⁾, Research Institute for Wakan-yaku,
Toyama Medical and Pharmaceutical University

In order to augment the inhibitory effect on tumor invasion and metastasis, we synthesized a new pseudo-peptide of RGD sequence (FC-336) and examined its inhibitory effect on tumor metastasis *in vivo* and on the adhesion, migration and invasion of tumor cells *in vitro*. FC-336 significantly inhibited experimental lung metastasis produced by i.v. co-injection with B16-BL6 melanoma in a dose-dependent manner. The intraportal injection of FC-336 with colon 26-L5 cells, a highly liver-metastatic cell line of colon 26 carcinoma, resulted in marked suppression of metastatic colonies in the liver and reduction of the liver weight, whereas the co-injection of tumor cells with a high dose of RGDS led to slight inhibition of liver metastasis. Multiple i.v. injections of FC-336 after tumor inoculation or the co-injection of FC-336 with tumor cells caused significant inhibition of experimental liver metastasis. FC-336 significantly increased the survival rate for mice compared to untreated controls when co-injected intraportally with tumor cells or intravenously administered after tumor inoculation. Furthermore, FC-336 inhibited the invasion, migration and adhesion of tumor cells *in vitro*, but it was not more inhibitory than RGDS peptide. Zymographic analysis revealed that FC-336 inhibited the degradation of a gelatin substrate by matrix metalloproteinases (MMPs) produced by tumor cells, while RGDS peptide did not affect the enzymatic degradation. These results indicate that the pseudo-peptides of RGD sequence, possessing the inhibitory property of degradation by MMPs differently from the original RGD-containing peptides, may provide an advantageous and useful basis for preventing tumor metastasis.

Reprint requests: Ikuo Saiki Department of Pathogenic Biochemistry, Research Institute for Wakan-Yaku, Toyama Medical and Pharmaceutical University 2630 Sugitani, Toyama, 930-0152 JAPAN