日消外会誌　33（4）：560～563，2000年

特集10

ハムスター膵癌におけるMMP阻害剤の発癌抑制効果

川崎医科大学消化器外科教室
伊木　勝道　　真嶋　敏光　　久保添忠彦
岩本　末治　　小沼　英史　　角田　　司

ヒト膵管癌の実験系であるハムスター膵発癌系において，その浸潤，進展にマトリックス分解酵素（matrix metalloproteinase，MMP）が重要な役割を果たしているとの我々の結果と今までの他の知見をもとに，MMP阻害剤を用いた膵発癌抑制効果を検討した．方法としてハムスター短期膵発癌モデルにおいて，膵管上皮の過形成が出現する時期より，新たに合成されたMMP阻害剤OPB-3206を混餌投与した．実験開始後96日目に屠殺し膵臓を摘出後，病理組織学的検索および，ゼラチンザイモグラフィーによるMMP抑制効果を検討した．コントロール群に比しOPB-3206投与群での膵癌の発生個数の有意な減少がみられた．またゼラチンザイモグラフィーでOPB投与群におけるMMP-2の活性化抑制作用が確認された．以上より，ハムスター膵癌においてOPB-3206は膵発癌を抑制する可能性が示唆された．

はじめに

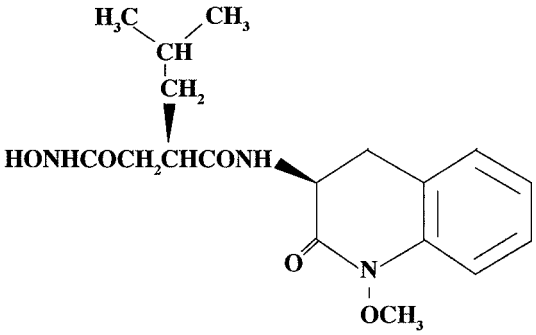
近年の診断，治療技術の向上にもかかわらず膵癌の早期発見は困難であり，その治療成績も他の癌と比較し，極めて予後不良である．我が国においても膵癌は増加しており，その診断，治療とともに膵癌の発生や癌進展の分子機構に関する研究が重要な課題となっている．また一方では，発癌の化学予防（chemoprevention）についても関心が高まっている．

癌が浸潤転移していく過程において，間質分解酵素であるmatrix metalloproteinase（MMP）が重要な働きをもつことが最近報告されているが[1]，我々の今までの実験結果においてもハムスター膵癌におけるMMP-2，9の発現が膵癌の発生に関して重要な役割を果たしていることを確認している[2]．今回我々は，これらの知見をもとに，新たに合成されたMMP阻害剤OPB-3206による膵発癌抑制効果を検討した（**Fig. 1**）．

材料と方法

短期膵発癌モデルに従い[3)4)]，MMP阻害剤，OPB-3206の経口投与を行った．6週齢雌性シリアンハムスターに体重あたり70mgのBOPを1回投与した後，コリン欠乏食，エチオニン，体重あたり20mgのBOP投与よりなる1連の操作（augmentation pressure）を2回行い，膵管の過形成病変の生じる46日目から96日目にかけて，OPB-3206を0%（group 1），0.1%（group 2），0.2%（group 3）の3群に分け，混餌投与した（**Fig. 2**）．96日目に屠殺後，膵臓をとりだし，ホルマリン固定後，病理組織学的に膵管病変の発生個数を比較検討した．さらに，剖検時に摘出された肉眼的に判別可能な膵癌組織を凍結保存し，MMPsの酵素活性を測定するために，ゼラチンザイモグラフィーを行った[5]．凍結標本をホモジナイズした後，蛋白を含む上清を1mg/mlのゼラチンを重合させた10%SDS-ポリアクリルアミドゲル上に電気泳動し，インキュベーションBuffer

Fig. 1　Chemical structure of OPB-3206（$C_{18}H_{25}N_3O_5$）.



＊第54回日消外会総会シンポ5・消化器癌転移能の分子生物学的側面（肝胆膵）

＜1999年12月22日受理＞別刷請求先：伊木　勝道
〒701-0192　倉敷市松島577　川崎医科大学消化器外科

Fig. 2 Experimental protocol of the rapid production model for pancreatic duct adenocarcinomas in hamsters. ⬇：70mg/kg BOP, s. c. ：⬇：20mg/kgBOP. s.c. ⇩：500 mg/kg DL-ethionine, i. P. ↓：800mg/kg L-methionine, i. p. ▼：sacrifice.

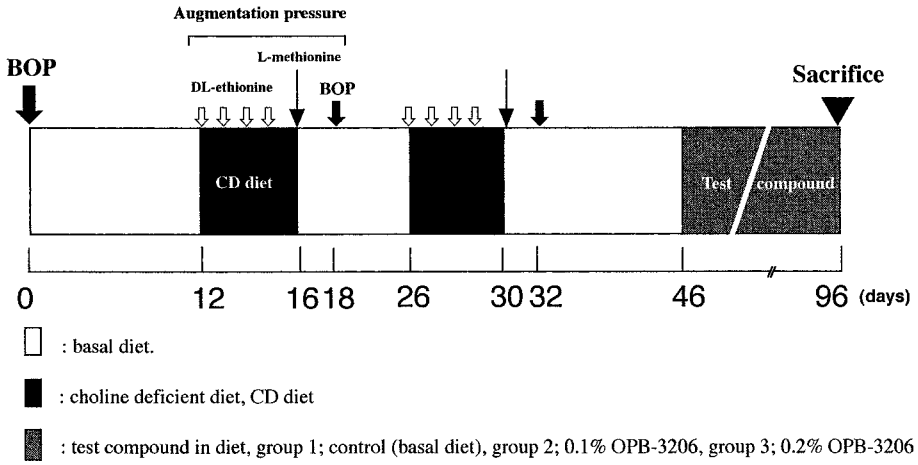
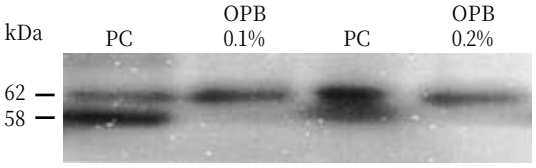


Table 1 Effects of OPB-3206 on the development of pancreatic ductal lesions in the rapid production model for pancreatic adenomarcinomas

Group	Dose of OPB (%)	Effective number of hamsters	Mean number of pancreatic ductal lesions (means±SD)			
			Hyperplasia	Atypical hyperplasia	Invasive carcinoma	Total
1	0	17	4.80±2.81	2.81±1.47	4.82±2.60	3.02±2.61
2	0.1	15	3.20±1.16	0.87±0.92*	1.87±1.19*	1.51±1.61*
3	0.2	14	4.43±3.27	1.73±1.44*	2.40±1.01*	2.25±2.46

CIS, carcinoma in situ.
*Significantly different from group 1, $p<0.05$

Fig. 3 Representative data for proMMP-2 activation in pancreatic cancers (PC) in hamsters with or without OPB-3206 treatments.



(50mM Tris-HCl，200mM NaCl，10mM $CaCl_2$) 内で16時間インキュベートした．その後，Coomassie blueにて染色，洗浄し，脱色部分のデンシトメトリーを測定し，酵素活性の指標とした．統計学的処理として，χ^2テストを行い，$p<0.05$を有意差有りとした．

結　果

OPB-3206を投与したgroup 2，3のハムスター群では非投与群（group 1）に比べ浸潤癌の発生個数，総膵管病変の個数で有意な減少がみられた(**Table 1**)．ザイモグラフィーによる酵素活性をみるとOPB-3206非投与群では，proMMP-2(62kDa)に対してactiveMMP-2(58kDa)のバンドが約3倍のインテンシティー強度で発現しているのに比べ，OPB投与群ではproMMP-2(62kDa)の発現が増加し，aciveMMP-2(58kDa)の発現減少がみられた（**Fig. 3，Table 2**）．

考　察

ゼラチナーゼ活性を持つマトリックス分解酵素であるMMP-2，MMP-9の発現が，腫瘍の進展，転移に重要な役割を果たす事が知られている．現在までのハムスター膵発癌モデルを用いた我々の実験結果では，遺伝子，蛋白レベルで，正常膵臓に比べ，膵癌組織にお

Table 2　Relation gelatinolytic activity of hamster pancreatic cancer[a)]

	PC (n=6)	0.1%OPB (n=6)	0.2%OPB (n=6)
proMMP-2	1.00	2.11±0.31	2.60±1.06
activeMMP-2	3.10±0.32	0.12±1.10	0.20±0.81

a) Gelatinolytic areas relative to that of proMMP-2 in extracts from PC. Values were obtained by densitometric scanning of zymograms. Data were values±SD. PC, primary pancreatic cancer.

ける MMP-2，-9の高発現が認められ，免疫染色では膵管の過形成（hyperplasia）から前癌病変である異型過形成（atypical hyperplasia）に至る段階で，MMP-2の染色強度が高まる事を確認している[2)]．本実験ではこれらの実験結果を踏まえ過形成病変が生じる時期から MMP 阻害剤による発癌予防効果を検討した．OPB-3206経口投与による発癌修飾作用をみると，可逆性病変である膵管の hyperplasia ではその発生個数に変化はみられず，非可逆性病変である atypical hyperplasia では，その発生個数の減少が認められ，結果として，膵管癌の総発生個数の有意な減少がみられているものと考えられた．この結果は，OPB-3206が発癌初期に MMP の酵素活性を抑制している事を意味し，逆に，MMP が膵癌の発生に何らかの重要な役割を果たしているとの我々の実験結果を支持するものである．加えて，ゼラチンザイモグラフィーの結果により，OPB-3206が proMMP から activeMMP への移行を阻害していることが裏づけられた．protype として分泌される MMP はシステイン残基で覆われた活性中心を有しており，他の MMP 群や血中のサイトカインによりシステイン残基の遊離が生じ，protype から active-type の酵素として働くことがわかっている．OPB-3206はこの MMP の活性中心に結合することで本酵素の働きを阻害していると考えられる[6)]．また，このような理由から OPB-3206は MMP-2のみならず，構造的な類似性をもつ MMP すべてに同様の機序で MMP の活性化阻害剤として作用すると考えられ，本実験における膵癌にとどまらず，他の悪性腫瘍に対してもその進展抑制効果が期待される．

文　献

1) Zena W：ECM and cell surface protyolysis：regulating cellular ecology. Cell **91**：439－442, 1997

2) 伊木勝道：膵癌進展過程における matrix metalloproteinases（MMPs）の役割と膵癌血清診断への応用に関する基礎的研究．川崎医会誌　**25**：1—10, 1999

3) Konishi Y, Tsutsumi M, Tsujiuchi T：Mechanistic analysis of pancreatic ductal carcinogenesis in hamsters. Pancreas **16**：300—306, 1998

4) 堤　雅弘，小西陽一：膵癌と癌遺伝子．消病セミナー　**63**：135—150, 1996

5) Nakajima IA, Sasaguri S, Nagase H et al：Coculture of human breast adenocarcinoma MCF-7 cells and human dermal fibroblasts enhance the production of matrix metalloproteinases 1, 2, and 3 in fibroblasts. Br J Cancer **71**：1039—1045, 1995

6) Kido A, Tsutsumi M, Iki K et al：Inhibition of spontaneous rat osteosarcoma lung metastasis by 3S-[4-(N-hydroxyamino)-2R-isobutylsuccinyl] amino-1-methoxy-3, 4-dihydrocarbostyril. a novel matrix metalloproteinase inhibitor. Jpn J Cancer Res **90**：333—341, 1999

Chemopreventive Effect of Hamster Pancreatic Cancer

Katsumichi Iki, Toshimitsu Majima, Tadahiko Kubozoe, Sueharu Iwamoto,
Eisi Onuma and Tsukasa Tsunoda
Department of Surgery, Division of Gastroenterology, Kawasaki Medical School

In the present experiment, the effects of OPB-3206, 3S-［4-(N-hydroxyamino)-2R-isobutylsuccinyl］amino-1-methoxy-3, 4-dihydrocarbostyril, a novel metalloproteinase inhibitor, were studied on the growth of hamster pancreatic ductal carcinomas induced by a rapid production model. OPB-3206 inhibited the activities of interstitial collagenase, gelatinase A and B, and stromelysis *in vitro*. When 0%, 0.1% and 0.2% OPB-3206 was orally administered in the diet for 7 weeks, the numbers of pancreatic nodules were significantly reduced in administered group from 46 days after BOP initiation onward. Zymographic analysis showed that the gelatinolytic activity of proMMP-2 and activeMMP-2 was detected in control group. On the 0.1 and 0.2% OPB-3206 diet proMMP-2 activity was increased, but that of activeMMP-2 became undetectable. The results thus suggest that OPB-3206 selectively inhibits carcinogenesis in hamster pancreas by inhibiting MMP-2 activation.

Key words：matrix metalloproteinase, chemoprevention, pancreatic cancer

〔Jpn J Gastroenterol Surg 33：560—563, 2000〕

Reprint requests：Katsumichi Iki　Department of Surgery, Division of Gastroenterology, Kawasaki Medical School
577 Matsushima, Kurashiki, 701-0192 JAPAN