

膵癌に対する tumor dormancy therapy への模索 新しい血管新生阻害物質の単離・精製とその抗腫瘍作用

長崎大学医学部第2外科, ハーバード大学医学部小児病院外科*

鬼塚 伸也 Oliver Kisker* Steven Pirie-Shepherd*
Judah Folkman* 兼松 隆之

ヒト膵癌培養細胞から新しい血管新生阻害物質の単離を行い, 血管内皮細胞増殖抑制効果および腫瘍増殖抑制作用, さらに tumor dormancy therapy への応用の可能性について検討した。ヒト膵癌細胞株 BxPC-3の培養上清を用いヘパリンカラム, ゲル濾過カラム高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により最終蛋白精製産物を得た。SDS-PAGE, microsequence でアミノ酸配列を決定した。SCID マウス背部皮下に BxPC-3を移植し新規血管新生阻害物質を21日間投与し腫瘍増殖抑制効果を検討した。新しい血管新生阻害物質はおのおの58kDa, 53kDaの latent form, cleaved form の antithrombin III (aaAT-III)であった。aaAT-III 投与により, 膵癌の増殖は対照群に比べ90%抑制され, 投与開始時とほぼ同じ大きさに維持されていた。aaAT-III は dormancy を誘導し, 今後膵癌に対する tumor dormancy therapy への応用が期待できる。

はじめに

血管新生とは, 既存の血管から新しい血管網が形成される現象である。Folkman が, 腫瘍の増殖には血管新生が必須であるという概念を提唱して以来¹⁾, 多くの研究が行われてきており, 1990年代には内因性血管新生阻害物質である angiostatin²⁾, endostatin³⁾がそれぞれ単離・同定された。

近年, 腫瘍を dormancy(休眠状態)に誘導し長期間の延命をめざす tumor dormancy therapy が提唱されている⁴⁾。Folkman らは, マウス肺癌に angiostatin を投与すると tumor dormancy が得られることを示し, 血管新生阻害剤の有用性を報告した⁵⁾。

一方, 膵癌において bFGF⁶⁾や VEGF⁷⁾が発現しているとの報告があり, 血管新生との関連性が注目されている。予後不良で有効な治療法がない膵癌⁸⁾に対し, 血管新生阻害剤による tumor dormancy therapy は, その有効性が期待できると思われる。

そこで, 私どもは, ヒト膵癌細胞培養上清から新し

い血管新生阻害物質の単離, 精製を行い, その腫瘍増殖抑制効果について検討し, さらに tumor dormancy therapy への応用の可能性についても検討した。

実験材料と方法

1. 細胞培養

ヒト膵癌細胞株 BxPC-3 (American Type Culture Collection, MD, USA)を用いた。BxPC-3を10%牛胎児血清(FBS)(Gibco)および抗生物質(Penicillin G 100μg/ml, Streptomycin 100mg)を添加したRPMI 1640培地(Gibco)で37℃, 5%CO₂, 95% airの条件下で72時間培養した。その培養上清2Lを蛋白質精製に使用した。

2. 蛋白質精製

まず, ヘパリン セファロースカラム高速液体クロマトグラフィー(HPLC)(Pharmacia, Sweden)を用いNaCl勾配による蛋白分離を行った。次いで, ゲル濾過カラムHPLCを施行した。最終精製産物はSDS-PAGE電気泳動ゲルにblotし, microsequenceを行ってアミノ酸配列を決定した。

3. 血管内皮細胞増殖試験(BCE assay)

おのおのの蛋白質精製課程において得られた蛋白を含む分画を, ウシ微小血管内皮細胞(BCE cell)を用いた血管内皮細胞増殖試験(BCE assay)を行い, その血

* 第55回日消外会総会シンポ9・消化器癌における tumor dormancy therapy

<2000年12月19日受理> 別刷請求先: 鬼塚 伸也

〒852 8501 長崎市坂本1 7 1 長崎大学医学部第

2 外科

管内皮細胞増殖抑制効果を確認した。最終精製蛋白についても同様に行った。

4. ヒトリコンピナント蛋白の精製

ヒトアンチトロンピン III (AT-III) 5mg を RPMI 1640 500ml に加え、BxPC-3 とともに同条件下で培養した。この培養上清を前述と同様のカラムを用いた HPLC にてリコンピナント AT-III を精製した。

5. 腫瘍担癌マウスの作製及びリコンピナント蛋白の腫瘍増殖抑制効果

培養した BxPC-3 4×10^6 個を 8 週齢 SCID マウスの背部皮下に移植した。腫瘍が約 100mm^3 に達した時点で、リコンピナント AT-III 50mg/kg/day を 21 日間、腫瘍と離れた部位に皮下投与した。

結 果

ヘパリン セファロースカラム HPLC 後の 1.5M NaCl 分画は、BCE assay にて最も強い血管内皮細胞抑制を認めた。同分画を用いてゲル濾過カラム HPLC を行った結果、分画 13 に最も強力な血管内皮細胞増殖抑制を示す蛋白が分離された (Fig. 1)。同様に、ヘパリン セファロースカラム HPLC 後の 0.5M NaCl 分画からも血管内皮細胞増殖抑制を示す蛋白が分離された。

これらの蛋白を用いた SDS-PAGE 電気泳動および microsequence の結果、この新しい血管新生阻害物質はそれぞれ 58kDa のアンチトロンピン III (latent

form) 及び 53kDa のアンチトロンピン III (cleaved form) であった (Fig. 2)。

BCE assay では、通常のアンチトロンピン III (native form) は血管内皮細胞の増殖をほとんど抑制しなかった。これに対し、今回精製した latent および cleaved form のアンチトロンピン III は、いずれも用量依存性に血管内皮細胞の増殖を抑制した (Fig. 3)。

BxPC-3 皮下移植 SCID マウスモデルにおいて、生食を投与したコントロール群は経時的に腫瘍が増大した。これに対し、ヒトリコンピナントアンチトロンピン III すなわち cleaved アンチトロンピン III 投与群では腫瘍増殖が抑制され、投与前の大きさのまま維持されていた (Fig. 4)。

考 察

Folkman らは、臨床的に癌の原発巣を切除した後に転移巣が急速な増大する現象に着目し、原発巣から血管新生阻害物質が産生されていると推測した。この仮説に基づき、Lewis 肺癌モデルを確立し、その尿から新しい血管新生阻害物質である angiostatin を単離・精製した²⁾。この angiostatin は、血管新生を抑制することにより腫瘍増殖を抑制し、tumor dormancy を誘導できる。

近年、高橋らは、癌の tumor dormancy therapy を提唱しており、癌との共存による生存期間の延長を目指した新しい治療戦略として注目されている⁹⁾。血管新

Fig. 1 Elution profile of gel filtration chromatography and inhibition of bovine capillary endothelial cell proliferation.

The fraction 13 after gel filtration chromatography showed high peak of UV absorbance. It also showed highest inhibitory activity of the endothelial cells proliferation.

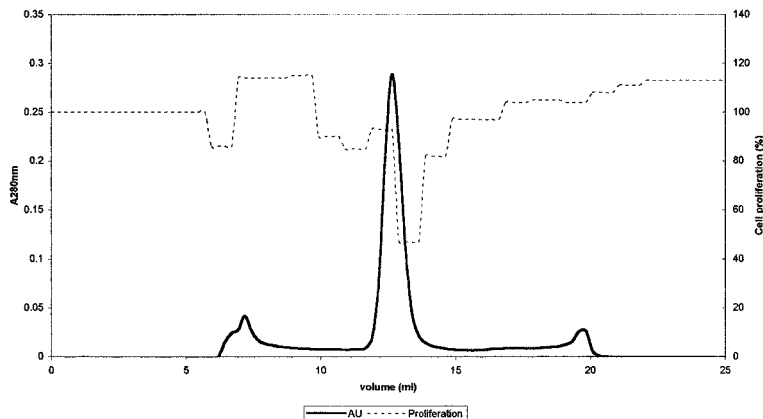


Fig . 2 SDS-PAGE analysis of purified antithrombin III. Purified proteins revealed 58 kDa and 53 kDa bands on the gel.



Fig . 3 Bovine capillary endothelial cells proliferation assay.

Both latent () and cleaved () forms of antithrombin III inhibited proliferation of the endothelial cells in a dose dependent manner, whereas no inhibitory effect on the endothelial cells in native antithrombin III ()

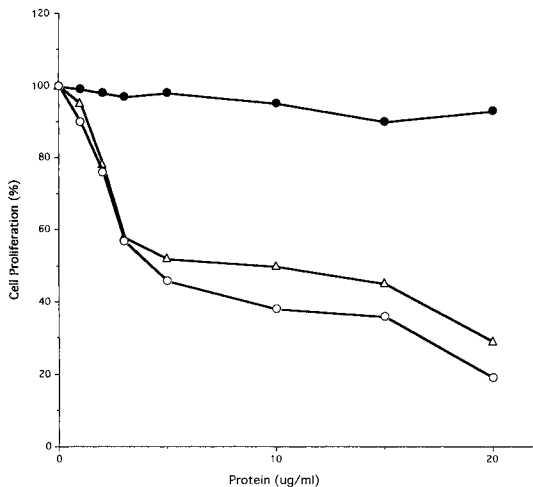
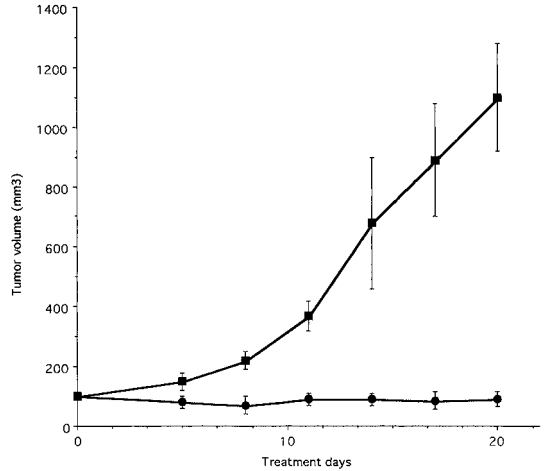


Fig . 4 Treatment of BxPC-3 tumor with recombinant human antithrombin III.

After tumors formed 100 mm³ in size, mice were treated with natural saline (as control) and recombinant human antithrombin III for 21 days. The tumor was developing time-dependently in control group (n=4) in contrast, recombinant human antithrombin III inhibited tumor growth(n=4) () The tumor was almost 100 mm³ in size, maintaining tumor dormancy during treated period.



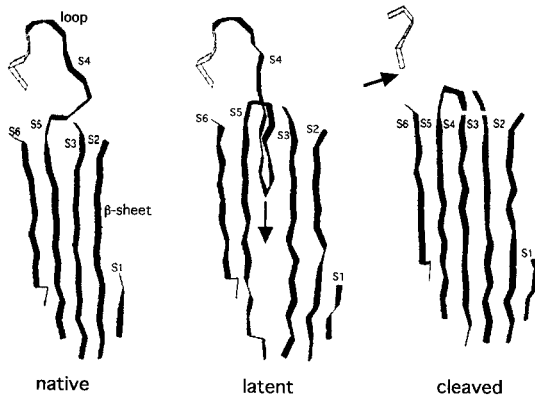
生阻害物質は腫瘍血管内皮細胞を標的とし、結果として腫瘍増殖を抑制することから、tumor dormancy therapy に適した薬剤と考えられる。

一方、膵癌は、最近の診断、手術手技の発達にもかかわらず、予後不良であり、有効な治療法は確立されていない⁸⁾。私どもは、膵癌においても、外科的に原発巣切除後に転移巣が急速に増大する経験をし、膵癌から何らかの血管新生阻害物質が産生されている可能性を考え、本実験を行った。

今回、精製できた新しい血管新生阻害物質はアンチトロンビン III (AT-III) であり、latent form および cleaved form の 2 種類であった。AT-III はセリンプロテアーゼインヒビターの種類であり、反応ループの構造変化により、latent form, cleaved form と呼ばれる 2 種類の variant が存在している^{10,11)} (Fig. 5)。反応ループが切断を受けることなく β-sheet のなかに入り込むものを latent form, 切断されて入るものを cleaved form と呼ぶ。latent form の分子量は native form と同じ 58kDa であるが、cleaved form は 53kDa とやや小さくなる。これらの latent および cleaved

Fig. 5 Conformation of the serpin, antithrombin III (modified from Carrell R : Nature 353 : 576-578, 1991)

Antithrombin III, a member of the serpin (serine protease inhibitors) family, has reactive loop that can bind target protease. Latent antithrombin III (58 kDa) shows the loop, which inserts into the β -sheet without cleavage. Cleavage of the loop () induces cleaved antithrombin III (53 kDa) in which the loop irreversibly inserts into the β -sheet.



AT-IIIを総称して抗血管新生性AT-III (antiangiogenic AT-III, aaAT-III)と名付けた。

AT-IIIは元来血液凝固系の主要な制御因子であり、血管新生抑制作用はない。ところが、AT-IIIの反応ループの構造変化により立体構造が変化すると、本来持っている抗凝固作用を失い、代わりに血管内皮細胞の増殖抑制という新たな機能をもつようになるのである。このことは、プラスミノゲンが切断されて angiostatin が生成される²⁾あるいは collagen XVIII から endostatin が生成される³⁾機序とよく類似している。すなわち、これらの内因性血管新生阻害物質の特徴は、元来生体内に存在している既知の蛋白から、腫瘍が産生する酵素などによって分解されて新たな蛋白が生成される点であるといえる。

aaAT-IIIは、O'Reillyがほぼ同時期に肺の小細胞癌株から単離、精製しており¹²⁾、私どもは他にも複数の悪性腫瘍の培養上清中にaaAT-IIIの存在を確認している。また、同じセリンプロテアーゼインヒビターの一つである maspin も強力な血管新生阻害物質であることが報告されている¹³⁾。従来より、癌の増殖、転移においては局所の血液凝固・線溶系が関与し、血小板凝集やフィブリン沈着が重要であるといわれている¹⁴⁾。

Plasminogen, thrombospondin, platelet factor 4などの血液凝固因子が血管新生に関与していることもすでに知られており¹⁵⁾、血液凝固・線溶系が腫瘍増殖や血管新生にとって重要な役割を果たしていることが示唆される。

Angiostatinはプラスミノゲンのc末端側 fragmentであるが²⁾、腫瘍から産生される elastase¹⁶⁾、MMP-9¹⁷⁾などの作用により生成される。同じ内因性血管新生阻害物質である aaAT-IIIの生成にも同様の機序が働いているであろうと考えた。そこで、ヒトAT-IIIを肝癌細胞とともに培養した結果、その培養上清中に分泌される未知の酵素によりヒトリコンビナント aaAT-IIIが産生された。生成に関与する酵素は同定を今後行う予定である。

リコンビナントAT-III投与により、マウス背部皮下の肝癌の増殖は抑制され、投与開始時と同程度の大きさのままに留まっていた。これは、リコンビナントAT-IIIにより tumor dormancy が誘導できたものと考えられた。実験的には tumor dormancy では相対的に apoptosis が増大しているとされる¹⁸⁾。本実験においても今後組織学的検討を重ねる必要があると思われる。

Tumor dormancyは、局所における血管新生因子と抑制因子のバランスにより制御されているとの報告がある¹⁹⁾。本実験では、肝癌において aaAT-IIIなどの血管新生抑制因子の増強により tumor dormancy を誘導できる可能性が示唆された。今後、aaAT-IIIは血管新生抑制を標的とした肝癌の tumor dormancy therapyへの応用が期待できるものと考えられ、更なる研究の発展が望まれる。

文 献

- 1) Folkman J : Tumor angiogenesis : therapeutic implications. N Engl J Med 285 : 1182-1186, 1971
- 2) O'Reilly M, Holmgren L, Shing Y et al : Angiostatin : A novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. Cell 79 : 315-328, 1994
- 3) O'Reilly M, Boehm T, Shing Y et al : Endostatin : An endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. Cell 88 : 277-285, 1997
- 4) 漆崎一朗 : Tumor dormancy therapy の考え方 . Biotherapy 12 : 923-932, 1998
- 5) O'Reilly M, Holmgren L, Chen C et al : Angiostatin induces and sustains dormancy of human primary tumors in mice. Nat Med 2 : 689-692, 1996
- 6) Ellis L, Takahashi Y, Fenoglio C et al : Vessel counts and vascular endothelial growth factor expression in pancreatic adenocarcinoma. Eur J

- Cancer 33 : 337 340, 1998
- 7) Yamanaka Y, Fries H, Buchler M et al : Overexpression of acidic and basic fibroblast growth factors in human pancreatic cancer correlates with advanced tumor stage. *Cancer Res* 53 : 5289 5296, 1993
- 8) 平岡武久 : 膵癌治療の現況 . 日消病会誌 97 : 153 160, 2000
- 9) 高橋 豊 : Tumor Dormancy Therapy 癌治療の新たな戦略 . 医学書院 , 東京 , 2000, p102 112
- 10) 城谷裕子 , 小出武比古 : アンチトロンビンのプロテアーゼ阻害機構とヘパリンの作用機構 立体構造で見る動的構造変化 . 日血栓止血会誌 10 : 93 99, 1999
- 11) Carrell R, Evans D, Stein P : Mobile reactive centre of serpins and the control of thrombosis. *Nature* 353 : 576 578, 1991
- 12) O'Reilly M, Pirie-Shepherd S, Lane W et al : Antiangiogenic activity of the cleaved conformation of the serpin antithrombin. *Science* 285 : 1926 1928, 1999
- 13) Zhang M, Volpert O, Shi Y et al : Maspin is an angiogenesis inhibitor. *Nat Med* 6 : 196 199, 2000
- 14) 金城 満 , 三村和郎 , 福本純雄ほか : 癌の転移と血液凝固 . 臨科学 22 : 597 605, 1986
- 15) Kerbel R : Tumor angiogenesis : past, present and the near future. *Carcinogenesis* 21 : 505 515, 2000
- 16) Gately S, Twardowski P, Stack M et al : Human prostate carcinoma cells express enzymatic activity that converts human plasminogen to the angiogenesis inhibitor, angiostatin. *Cancer Res* 56 : 4887 4891, 1996
- 17) Patterson B, Sang Q : Angiostatin-converting enzyme activities of human matrilysin(MMP-7) and gelatinase B/type IV collagenase(MMP-9) . *J Biol Chem* 272 : 28823 28826, 1997
- 18) Holmgren L, O'Reilly M, Folkman J : Dormancy of micrometastases : Balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nat Med* 1 : 149 153, 1995
- 19) Ramanujan S, Koenig G, Padera T et al : Local imbalance of proangiogenic and antiangiogenic factors : A potential mechanism of focal necrosis and dormancy in tumors. *Cancer Res* 60 : 1442 1448, 2000

Attempt to Tumor Dormancy Therapy for Pancreatic Cancer
Purification of the Novel Angiogenesis Inhibitor from
Pancreatic Carcinoma Cell Lines

Shinya Onizuka, Oliver Kisker*, Steven Pirie-Shepherd*,
Judah Folkman* and Takashi Kanematsu

Department of Surgery II, Nagasaki University School of Medicine

*Department of Surgery, Children's Hospital, Harvard Medical School

Tumor growth in cancers is angiogenesis-dependent. Angiogenesis inhibitors induce tumor dormancy by increasing apoptosis. Tumor dormancy therapy may be useful in pancreatic cancer because new therapeutic strategies are required in this malignant tumor, which has a dismal prognosis. We demonstrated that the human pancreatic carcinoma cell line, BxPC-3 generates an angiogenesis inhibitor, latent and cleaved forms of antithrombin III (antiangiogenic antithrombin III, aaAT-III) that regress tumor growth in severe combined immunodeficiency disease (SCID) mice. Conditioned BxPC-3 medium was applied to heparin-sepharose affinity and gel filtration high-pressure liquid chromatography (HPLC) Fractions eluted from this chromatography showed 58 kDa and 53 kDa bands on SDS-PAGE. Microsequencing identified latent and cleaved antithrombin III, both of which inhibited bovine capillary endothelial(BCE)cell proliferation ; native AT-III had no such effect. This demonstrates that conformational change in AT-III results in a new function as an angiogenesis inhibitor. Human recombinant aaAT-III was obtained in the same purification step using the conditioned BxPC-3 medium cultured with human AT-III. It inhibited tumor growth of BxPC-3, maintaining tumor dormancy during 21 days of treatment. Antiangiogenic therapy using aaAT-III may thus have clinical application as tumor dormancy therapy for pancreatic cancer in the near future.

Key words : pancreatic cancer, angiogenesis, tumor dormancy

[Jpn J Gastroenterol Surg 34 : 420 424, 2001]

Reprint requests : Shinya Onizuka Department of Surgery II, Nagasaki University School of Medicine
1 7 1 Sakamoto, Nagasaki, 852 8501 JAPAN