

ヒト膵癌の浸潤・転移におけるセリンプロテアーゼの役割に関する実験的研究

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/9246

ヒト膵癌の浸潤・転移におけるセリンプロテアーゼの 役割に関する実験的研究

金沢大学医学部医学科外科学第二講座 (主任: 宮崎逸夫)

二 上 文 夫

癌の浸潤・転移における膵トリプシノーゲンおよびウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベーター (urokinase-type plasminogen activator, u-PA) に代表されるセリンプロテアーゼの役割に注目し、分化度の異なる5種類のヒト膵癌培養細胞を用いてセリンプロテアーゼの発現と浸潤・転移能ならびにセリンプロテアーゼインヒビターである FOY-305 の浸潤・転移能におよぼす影響について検討した。まず逆転写ポリメラーゼ連鎖反応を用いた mRNA レベルでの解析では、u-PA は分化度とは関係なく全種類に発現が認められたのに対し、膵トリプシノーゲンは分化型である Capan-1, BxPC-3, AsPC-1 の3種類にのみ発現がみられた。培養上清を用いた蛋白レベルでの検索の結果は mRNA レベルとよく一致していた。またヌードマウスの脾内移植法による肝転移発生率は、Capan-1 では56%, BxPC-3 では50%, AsPC-1 では89%と高率であったのに対し、分化度の低い Panc-1 と MIAPaCa-2 では転移が全くみられなかった。すなわち、膵癌細胞の肝転移発生率は分化度ならびに膵トリプシノーゲンの発現とよく相関した。次に FOY-305 の膵癌細胞の浸潤・転移におよぼす影響を検討したところ、マトリゲルを用いたインベージョンアッセイにおける Capan-1 細胞の浸潤細胞数は、FOY-305 処理により0.1 μ M濃度以上で濃度依存性に減少した。また Capan-1 細胞の脾内移植法による肝転移発生率は、FOY-305 非投与群の62%に対し投与群では14%と、FOY-305 投与により有意に低下した。以上の成績より、膵癌細胞の浸潤・転移においては u-PA のみならず、膵トリプシノーゲンが重要な役割を担っていること、またこれらセリンプロテアーゼの活性化を抑制することで癌の浸潤・転移を抑制できる可能性が示唆された。

Key words serine protease, pancreatic cancer, pancreatic trypsinogen, urokinase-type plasminogen activator, FOY-305

近年、癌細胞の浸潤・転移に対する種々の細胞外マトリックス分解酵素の関与が重要視されている¹⁾²⁾。その中でも、セリンプロテアーゼの1つであるプラスミンはマトリックスメタロプロテアーゼ (matrix metalloproteases, MMPs) など他の細胞外マトリックス分解酵素の前駆体を効率よく活性化することができるため、癌細胞が浸潤・転移する際の細胞外マトリックスや基底膜の分解に重要な役割を演じている可能性が示唆されている³⁾⁴⁾。また最近、Ohta ら⁵⁾⁶⁾はセリンプロテアーゼの1つである膵トリプシノーゲンが膵癌のみならず胃癌や他の消化器癌でも高率に発現していることを臨床材料を用いて報告し、消化器癌の浸潤・転移における膵トリプシノーゲンの重要性を指摘している。

そこで、本研究では膵トリプシノーゲンおよびウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベーター (urokinase-type plasminogen activator, u-PA) に代表されるセリンプロテアーゼに注目し、それらの発現からみたヒト膵癌細胞の浸潤・肝転移能、さらにはセリンプロテアーゼインヒビターである FOY-305 (Foipan®)⁷⁾を用いた膵癌細胞の浸潤・肝転移抑制効果について検討した。

材料および方法

I. ヒト膵癌培養細胞

分化度の異なるヒト膵癌細胞株を米国標準株機関 (American Type Culture Collection, ATCC) (Rockville, USA) より購入して使用した。使用した細胞株は、Capan-1 (高分化型腺癌)、BxPC-3 (中分化型腺癌)、AsPC-1 (中分化型腺癌)、Panc-1 (低分化型腺癌)、MIAPaCa-2 (未分化癌) の5種類である。細胞の培養には、10% 非働化牛胎児血清 (fetal calf serum, FCS) (GIBCO, Grand Island, USA) と 0.3mg/ml グルタミン (日水製薬, 東京) を含む RPMI-1640 培地 (日水製薬) を用い、5% CO₂ 濃度、37℃の条件下で培養した。

II. 実験動物

4週齢の雌ヌードマウス (BALB/c nu/nu) (日本クレア, 東京) を購入し、2週間の予備飼育の後、6週齢の時点で実験に供した。

III. 薬 剤

セリンプロテアーゼインヒビターとして FOY-305 (Camostat mesilate, 小野薬品工業, 大阪) を使用した。ヌードマウスを

平成8年9月30日受付, 平成8年11月11日受理

Abbreviations: BSA, bovine serum albumin; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; FCS, fetal calf serum; MMPs, matrix metalloproteases; PBS, phosphate-buffered saline; RIA, radioimmunoassay; RT, reverse transcription; u-PA, urokinase-type plasminogen activator

用いた実験では、Ohkoshi ら⁸⁾の方法に従って FOY-305 は本来 0.1% を含有する粉末飼料として経口投与させた。

Ⅳ. 逆転写-ポリメラーゼ連鎖反応 (revers transcription-PCR, RT-PCR) 法

1. 全 RNA 抽出

コンフルエント状態の各種腫瘍培養細胞を 0.02% EDTA 添加 0.25% トリプシン (GIBCO) にて剥離し、リン酸緩衝生理食塩液 (phosphate-buffered saline, PBS) (pH 7.2) にて 3 回洗浄後、Chomczynski ら⁹⁾の方法に従って全 RNA を抽出した。また胃癌手術時に合併切除した正常膵組織の一部を直ちに -80℃ に凍結保存して、ホットフェノールグアニジウムチオシアネート法¹⁰⁾にて全 RNA を抽出し、膵トリプシノーゲン発現の陽性コントロールとして使用した。

2. プライマー

ヒト膵トリプシノーゲン-1 (pancreatic trypsinogen-1,

cationic isoform)¹¹⁾, u-PA¹²⁾および β -アクチン (β -actin)¹³⁾の各 cDNA 塩基配列より以下のオリゴヌクレオチドプライマーを設計し、日本バイオサービス株式会社 (新座, 日本) より購入して使用した。なお、これらプライマーは GenBank データベースで他のものとホモロジーが全くないことを確認した。膵トリプシノーゲン-1: センスプライマー 5'-CCCCCAATACGACAGGAA-3' (cDNA 塩基番号 294-311), アンチセンスプライマー 5'-TTCTGGGCACAGCCATCA-3' (657-674), u-PA: センスプライマー 5'-ACCACCATCGAGAACCAGCC-3' (cDNA 塩基番号 2494-2513), アンチセンスプライマー 5'-AATCAGCTTCACAACAGTCA-3' (4174-4193), β -アクチン: センスプライマー 5'-GAAATCTGGCACCACACCTT-3' (cDNA 塩基番号 1299-1319), アンチセンスプライマー 5'-GTTGAAGGTAGTTTCGTGGAT-3' (2406-2426)

3. RT-PCR 法

1 μ g の全 RNA を 65℃, 15 分間変性後, 1 本鎖 cDNA 合成キット (CLONTECH Laboratories, Palo Alto, USA) を用いて, 逆転写反応にて cDNA を合成した¹⁴⁾。すなわち, 200 ユニットのモロネー白血病毒逆転写酵素と 0.5mM のデオキシリボヌクレオチド (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) 混合後, オリゴ dT プライマー, 1 単位 RNase 阻害因子, 50mM Tris-HCl (pH 8.3), 75mM KCl, 3mM MgCl₂ を 37℃, 90 分間反応させた。

次に, 各 mRNA に特異的なプライマーと Taq DNA ポリメラーゼ (宝酒造, 京都) を用いて DNA サーマルサイクラー (Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, USA) にて DNA を増幅した。なお, PCR 反応は, 熱変性を 94℃ で 30 秒間, アニーリングを 63℃ で 1 分間, DNA の伸長を 72℃ で 2 分間とし, これを 1 サイクルとして膵トリプシノーゲン-1, u-PA は 30 サイクル, β -アクチンは 18 サイクルで行った。得られた PCR 産物を 1.5% アガロースゲルにて定電圧 100V, 25 分間電気泳動した。泳動後,

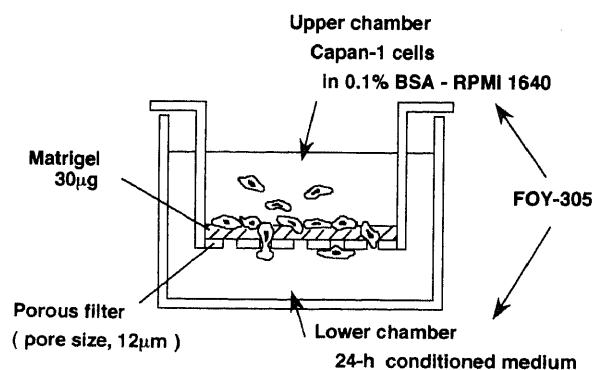


Fig. 1. Diagram of the Transwell chamber for *in vitro* invasion assay. Capan-1 cell suspension (1×10^5 /ml, 0.5 ml) and conditioned medium (1 ml) were added to the upper and lower chambers, respectively. Various concentrations of FOY-305 were added to both chambers.

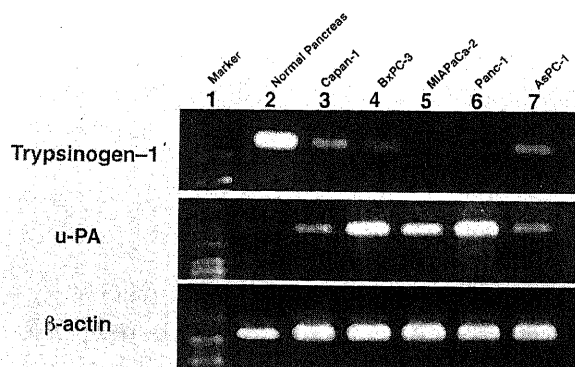


Fig. 2. Detection of RT-PCR amplified products of mRNA for pancreatic trypsinogen-1, u-PA and β -actin in human pancreatic cancer cells. Pancreatic trypsinogen-1 was expressed in lanes 2, 3, 4 and 7 and u-PA was done in lanes 3-7. Lane 1, size marker; lane 2, normal pancreas from surgical specimens; lane 3, Capan-1; lane 4, BxPC-3; lane 5, MIAPaCa-2; lane 6, Panc-1; lane 7, AsPC-1. Pancreatic trypsinogen-1, 381 base pair fragment; u-PA, 474 base pair fragment; β -actin, 592 base pair fragment.

Table 1. Concentrations of serine proteases in supernatant of culture medium of human pancreatic cancer cell lines

Cell line	Concentrations of serine proteases in supernatant ^{a)}	
	Trypsinogen (ng/ml)	u-PA (ng/ml)
Capan-1	224.0 $\pm$ 39.0	83.3 $\pm$ 11.5
BxPC-3	18.7 $\pm$ 1.2	56.7 $\pm$ 5.8
AsPC-1	178.3 $\pm$ 24.5	93.3 $\pm$ 20.8
Panc-1	0	146.7 $\pm$ 15.3
MIAPaCa-2	0	96.7 $\pm$ 11.5

^{a)} The results are expressed as $\bar{x} \pm$ SD of three experiments.

Table 2. Metastatic potential of human pancreatic cancer cells in nude mice using intrasplenic injection method

Cell line	No. of mice	No. (%) of liver metastasis-positive mice
Capan-1	9	5 (56)
BxPC-3	10	5 (50)
AsPC-1	9	8 (89)
Panc-1	10	0
MIAPaCa-2	10	0

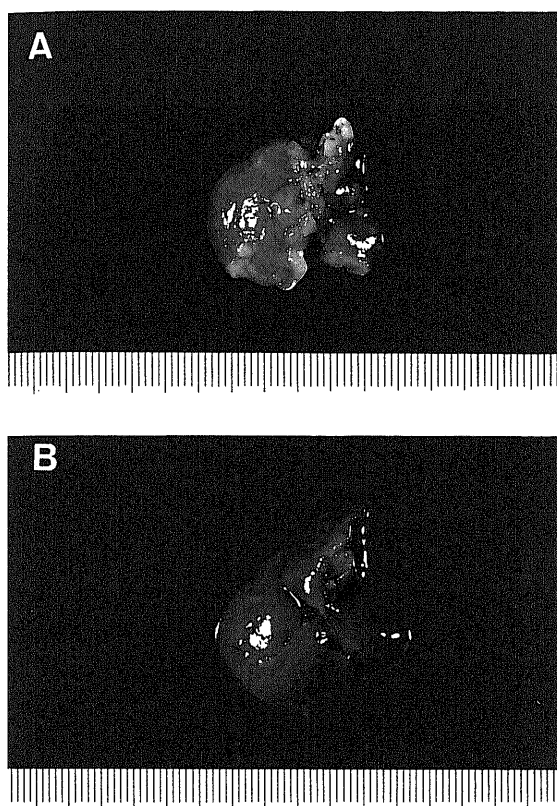


Fig. 3. Representative liver specimens from nude mice 6 weeks after intrasplenic injection of Capan-1 cells. (A) Multifocal metastases are visible as white nodules on the surface of liver. (B) No metastasis is seen.

エチジウムブロマイド染色を行い、UV トランスイルミネーター (フナコシ, 東京) にて観察した。

V. 膵癌細胞培養上清中のセリンプロテアーゼ濃度の測定

コンフルエント状態の各種膵癌細胞を PBS で 3 回洗浄後、無血清 RPMI-1640 培地で 5 % CO₂, 37℃ で培養し、24 時間後にその培養液を 1000rpm, 10 分間遠心し沈渣を除去した。このようにして得られた培養上清中の膵トリプシノーゲン濃度をラジオイムノアッセイ (radioimmunoassay, RIA) 二抗体法¹⁵⁾を用いて測定し、u-PA 濃度をエンザイムイムノアッセイ法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)¹⁶⁾を用いて測定した。

VI. ヌードマウス脾内移植法による肝転移モデル

対数増殖期にある各種膵癌培養細胞を 0.02 % EDTA 添加 0.25 % トリプシンにて剥離し遠心回収後、PBS にて 1×10^7 /ml の濃度に調整した。この際トリパンブルー色素排除試験にて生細胞率が 95 % 以上であることを確認した。6 週齢のヌードマウスに 2 Gy の全身照射を行った後、Morikawa ら¹⁷⁾の方法に準じ脾内移植を行った。すなわち、アバチンの腹腔内注入にて麻酔をかけ、左側腹より小切開にて開腹し脾臓を腹腔外に軽く露出させ、29G 注射針にて細胞懸濁液 0.1cc (細胞数 1×10^6 個) を脾臓内に注入後、腹壁、皮膚を吸収糸で縫合し閉腹した。なお脾摘は行わなかった。6 週後に犠牲死させ肝臓を摘出し、肉眼的ならびに組織学的に肝転移の有無を評価した。肉眼的に肝転移を有する場合は肝表面の結節数を数えた。組織学的検討は 10 % ホルマリン固定後、HE 染色にて行った。なお実験期間中定期的に (犠牲死時も含め) ヌードマウスの体重を測定した。

Ⅶ. インベージョンアッセイ (invasion assay)

膵癌細胞 Capan-1 を用い、Albini ら¹⁸⁾の方法を改良して行っ

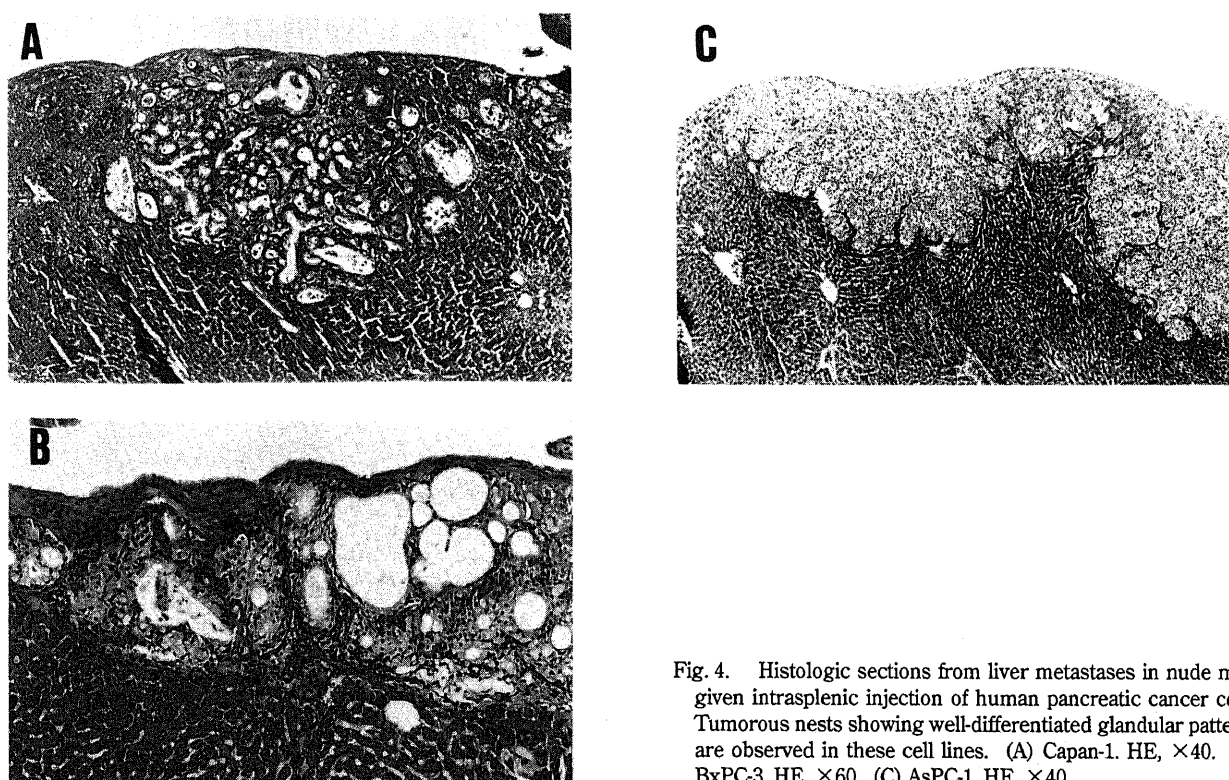


Fig. 4. Histologic sections from liver metastases in nude mice given intrasplenic injection of human pancreatic cancer cells. Tumorous nests showing well-differentiated glandular patterns are observed in these cell lines. (A) Capan-1. HE, $\times 40$. (B) BxPC-3. HE, $\times 60$. (C) AsPC-1. HE, $\times 40$.

た。すなわち図1のごとくフィルター径 12mm, ポアサイズ $12\mu\text{m}$ のトランスウェル・チャンバー (Transwell chamber) (Costar, Cambridge, USA) のフィルター上面にマトリゲル (Matrigel®) (Becton Dickinson Labware, Bedford, USA) $30\mu\text{g}$ をコーティングしたものを使用した。無血清 RPMI-1640 培地にてゲルを 1~2 時間膨潤した後, 0.1% 牛血清アルブミン (bovine serum albumin, BSA) (Sigma, St. Louis, USA) を含む RPMI-1640 培地で $1 \times 10^6/\text{ml}$ に調整した Capan-1 細胞懸濁液をチャンバー上室に $500\mu\text{l}$ 加えた。チャンバー下室には前述の要領で採取した培養上清 (24-h conditioned medium) をケモアトラクタント溶液として 1ml ずつ注入した。同時に FOY-305

を 0, 0.1, 1, 10, 100, $1000\mu\text{M}$ の各濃度に調整し, 薬剤が系全体にゆきわたるよう上・下室液およびゲル膨潤液に添加した。5% CO_2 , 37°C で 8 時間培養した後, メタノールで固定し, フィルター上面に残った細胞をマトリゲルとともに拭き取り HE 染色を行った。顕微レベルで $\times 400$ の倍率で観察し, フィルター下面に浸潤した細胞数をランダムに 5 視野ずつ数えた。これを各濃度につきトリPLICATEにて行いかつ 3 回施行した。

VII. Capan-1 腫瘍細胞の肝転移能におよぼす FOY-305 の影響

腫瘍細胞の生体における肝転移能に与えるセリンプロテアーゼインヒビターの影響を調べる目的で, ノドマウスを, FOY-305 飼料を 2 週間前より実験期間中 (移植後 6 週目まで) ずっと経口摂取させた FOY-305 投与群 (15 匹) と FOY-305 を投与しなかった非投与群 (15 匹) の 2 群に分け, Capan-1 細胞の脾内移植を行い, 6 週後に犠牲死させ肝転移発生率ならびに転移結節数の差異を検討した。

IX. 統計学的検定法

測定値はすべて平均 $\pm$ 標準偏差 ($\bar{x} \pm \text{SD}$) で示した。インバージョンアッセイの各群間の浸潤数, ノドマウスの肝転移結節数および体重の比較には Student の t 検定を用い, 肝転移率

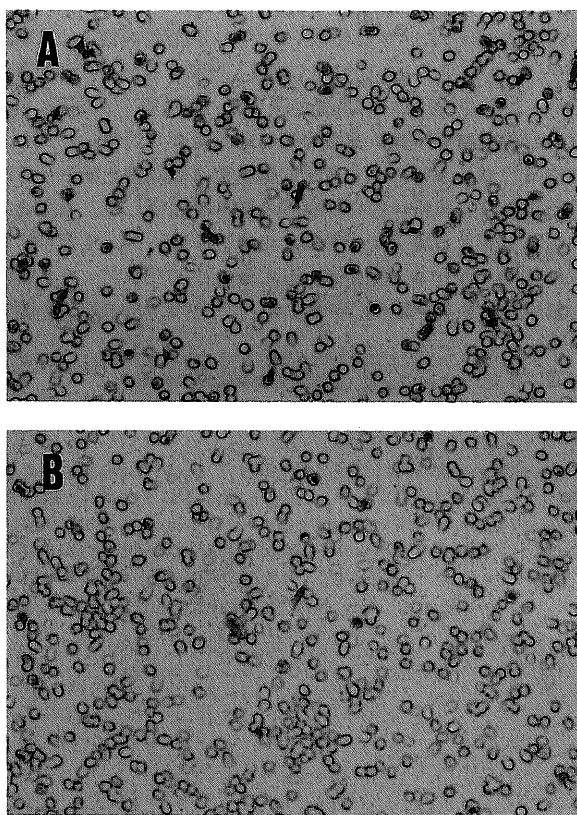


Fig. 5. *In vitro* invasion assay showing effect of FOY-305 on the invasion of Capan-1 cells. The migrated cells decreased by treatment of FOY-305. (A) Non-treated cells. (B) The cells treated with FOY-305 at a concentration of $1\mu\text{M}$. HE, $\times 400$.

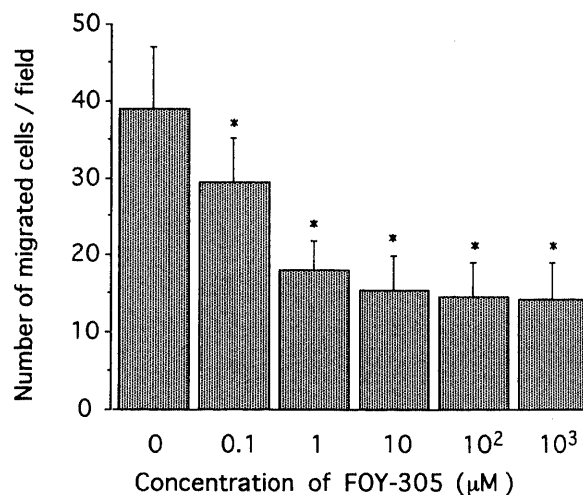


Fig. 6. Effect of FOY-305 on the invasion of Capan-1 cells. Capan-1 cells were cultured on Matrigel-coated filters in the presence of various concentrations of FOY-305. After 8 hr, the migrated cells on the lower surface of the filter were counted. Each value represents $\bar{x} \pm \text{SD}$ of triplicate in three independent experiments. * $p < 0.01$ compared with control (non-treatment) by Student's t test.

Table 3. Effect of FOY-305 on liver metastasis of human pancreatic cancer cell (Capan-1) in nude mice

Treatment	No. of mice	No. (%) of liver metastasis-positive mice	No. of metastatic nodules per mouse ($\bar{x} \pm \text{SD}$)	Body weight ($\bar{x} \pm \text{SD}$, g)
Control	13	8 (62)	10.3 ± 11.2	20.0 ± 1.6
FOY-305	14	2 (14)*	$2.3 \pm 6.8^*$	19.2 ± 2.4

* $P < 0.05$ vs Control.

の比較にはカイ 2 乗検定を用いた。いずれも危険率 5 % 未満をもって有意差ありと判定した。

成 績

I. 膵癌細胞におけるセリンプロテアーゼの mRNA レベルでの発現について

膵癌における膵トリプシノーゲン-1 の mRNA レベルでの発現の有無を、5 種類の膵癌培養細胞を用い RT-PCR 法にて検討した。なお陽性コントロールとしてヒト正常膵組織から抽出した全 mRNA を使用した。その結果、分化型である Capan-1, BxPC-3 および AsPC-1 の 3 種類において発現が認められ、特に Capan-1 と AsPC-1 では過剰に発現していた。これに対し、分化度の低い Panc-1 ならびに MIA PaCa-2 には発現がみられなかった。また同様に u-PA の mRNA レベルでの発現の有無をみたところ、5 種類すべてに発現が認められた (図 2)。

II. 膵癌細胞におけるセリンプロテアーゼの蛋白レベルでの発現について

各膵癌細胞培養上清中の膵トリプシノーゲン濃度を測定した結果、表 1 に示すように Capan-1, BxPC-3 および AsPC-1 の 3 種において発現が認められ、特に Capan-1 と AsPC-1 では高く、蛋白レベルでの発現は mRNA レベルでの発現によく相関していた。また上清中の u-PA 濃度を測定したところ 5 種類すべてに発現がみられ、こちらも mRNA の発現と一致していた。

III. 膵癌細胞の肝転移能について

ヌードマウス脾内移植法を用い、移植後 2 日以内に死亡した 2 匹を除く 48 匹を対象として、各種膵癌細胞の肝転移発生率を検討した。その結果、肝転移発生率は表 2 に示すように Capan-1 では 9 匹中 5 匹 (56%), BxPC-3 では 10 匹中 5 匹 (50%), AsPC-1 では 9 匹中 8 匹 (89%) に認められ、これら分化型の癌ではいずれも高率であった。これらの転移率には有意差を認めなかった。それに対し分化度の低い Panc-1 ならびに MIA PaCa-2 ではともに 10 匹全例で転移がみられなかった。すなわち、膵癌細胞の肝転移発生率は分化度ならびに膵トリプシノーゲンの発現とよく相関した。

肉眼的に肝転移巣は図 3 のように肝表面の白色調の結節として観察された。また肝転移部の組織像は、図 4 のように、Capan-1 ではよく発達した腺管構造とその中に粘液を有し、しかも間質結合組織の増生 (desmoplastic reaction) を伴っており、ヒト膵管癌の組織像に極めて近い形態をとっていた。BxPC-3 では腺管構造と粘液がみられるものの間質結合組織の増生は弱く、AsPC-1 では腺腔形成と間質結合組織をみるものの Capan-1 ほど強くなかった。

IV. Capan-1 膵癌細胞の浸潤能に及ぼす FOY-305 の抑制効果について

膵トリプシノーゲンを過剰発現し、しかも高肝転移能を有し、さらに組織像がヒト膵管癌に酷似する Capan-1 細胞を用いて、セリンプロテアーゼインヒビターの浸潤におよぼす影響をインベージョンアッセイで検討した。その結果、図 6 に示すように FOY-305 により 0.1~10 μ M 濃度の範囲で濃度依存性に浸潤細胞数が減少した。しかし、10~1000 μ M の範囲ではそれ以上の抑制効果は得られなかった。

V. Capan-1 膵癌細胞の肝転移能におよぼす FOY-305 の影響について

Capan-1 細胞の脾内移植後 2 日以内に死亡した 3 匹 (FOY-305

投与群の 1 匹と非投与群の 2 匹) を除く 27 匹を対象にして、6 週後に犠牲死させ肝転移の有無を調べた。その結果、肝転移発生は FOY-305 非投与群では 13 匹中 8 匹 (62%) と高率にみられたのに対し、投与群では 14 匹中わずか 2 匹 (14%) にのみ認められ、肝転移発生率は有意に減少した。また肝表面の転移結節数についても、非投与群が 10.3 ± 11.2 個 ($\bar{x} \pm SD$) であったのに対し、投与群では 2.3 ± 6.8 個と有意に少なかった。なお犠牲死時のマウス体重には両群で差を認めなかった (表 3)。

考 察

治癒切除が期待できる早期膵癌発見の必要性が叫ばれているにもかかわらず、膵癌手術例における早期膵癌の占める割合はきわめて低いのが実状である。膵癌はその解剖学的特性より症状の発現が遅いことや、有効なスクリーニング検査法がないことなどがその原因であることは言うまでもない。しかし、たとえ腫瘍径が 2cm 以下の小膵癌が発見されたとしても、組織学的にはすでに膵頭神経叢を含む膵後方組織へ高率に浸潤していたり、早晩肝転移の出現をみるなど進行癌の様相を呈する症例が多く、膵癌の生物学的悪性度の高さを伺い知ることができるといえる¹⁹⁾²⁰⁾。

ところで、これまでは癌が浸潤・転移する際には MMPs, u-PA, プラスミンなどの細胞外マトリックス分解酵素が重要な役割を演じ、u-PA→プラスミン→MMPs 活性化のカスケード反応に関心が寄せられていたが²¹⁾、膵トリプシンはあまり注目されなかった。最近になり、元来膵の腺房細胞で合成・分泌されている膵トリプシノーゲンが消化器癌や婦人科領域癌の癌細胞でも過剰発現していることが報告され^{5)6)22)・24)}、癌細胞の分泌する膵トリプシノーゲンの役割に関心が寄せられるようになった。活性化型の膵トリプシンは細胞外マトリックス分解酵素としては勿論のこと、消化器癌で過剰発現がみられる u-PA や MMPs など他の分解酵素の前駆体を直接効率よく活性化することが実験的に確認されており²²⁾、したがって、膵トリプシノーゲンは生体での癌組織内でも十分に細胞外マトリックス分解酵素としての役割を担っていることが推察される。そこで、本研究では、消化器癌の中でも特に生物学的悪性度が高いと言われているヒト膵癌の培養細胞株を用いて、癌の浸潤・転移の際に重要な役割を演じている細胞外マトリックス分解酵素の一つであるセリンプロテアーゼに注目し、膵癌細胞のセリンプロテアーゼ発現 (主に膵トリプシノーゲンの発現) と浸潤・転移能について検討した。

まず、分化度の違う 5 種類のヒト膵癌培養細胞株 (Capan-1, BxPC-3, AsPC-1, Panc-1, MIA PaCa-2) を用いて全 RNA を抽出し、RT-PCR 法にて膵トリプシノーゲンと u-PA の mRNA レベルでの発現を検討した。なお、膵トリプシノーゲンには現在まで少なくとも 3 つのアイソフォームが知られているが²³⁾²⁴⁾、胃癌で発現しているのは 1 本鎖あるいは 2 本鎖のカチオニック型 (cationic isoform) 膵トリプシノーゲン (pancreatic trypsinogen-1) であることがすでに Koshikawa ら²⁵⁾によって報告されている。そこで、本研究でもカチオニック型膵トリプシノーゲンの cDNA 塩基配列より特異的オリゴヌクレオチドプライマーを作製して検討した。その結果、u-PA は分化度とは無関係に全例発現が認められたのに対し、膵トリプシノーゲンは分化型である Capan-1, BxPC-3 および AsPC-1 にのみ発現がみられた。さらに、各膵癌細胞株の培養上清中の u-PA と膵トリ

プシノーゲンの蛋白レベルでの濃度を測定したが、それぞれ mRNA レベルでの発現とよく相関していた。すなわち、分化型の膵癌細胞は u-PA のみならず膵トリプシノーゲンを合成・分泌することが遺伝子レベルと蛋白レベルで確認できた。この成績は、Ohta ら⁹⁾の膵癌の臨床材料での検討と一致するものであった。

次に、各膵癌細胞株の肝転移能とセリンプロテアーゼの発現の関係を検索するため、6 週齢のヌードマウスを用いて脾内移植法での肝転移の有無を肉眼的ならびに組織学的に検討した。その結果、脾内移植 6 週後には Capan-1 では 9 匹中 5 匹 (56%)、BxPC-3 では 10 匹中 5 匹 (50%)、AsPC-1 では 9 匹中 8 匹 (89%) に肝転移巣の形成が認められたのに対し、Panc-1 および MIPaCa-2 ではともに 10 匹全例で転移巣は認められなかった。すなわち、膵トリプシノーゲンの発現が認められた分化型の膵癌はいずれも高率に肝転移が認められたのに対し、膵トリプシノーゲンの発現がない分化度の低い膵癌では肝転移は認められず、膵トリプシノーゲンの発現と肝転移能はよく相関するという成績であった。さらに、Capan-1 細胞の脾内移植法による肝転移の発生率ならびに発生個数は、強力な抗膵トリプシン作用を有する FOY-305 投与により有意 ($p < 0.05$) に減少し、さらにマトリゲルを用いたインベージョンアッセイでも Capan-1 細胞の浸潤細胞数は FOY-305 処理により有意に減少したことが注目される。以上の成績は、癌細胞が浸潤・転移する際には従来より関心が高かった u-PA のみならず、膵トリプシノーゲンが極めて重要な役割を担っている可能性を示すものであり、またこれらセリンプロテアーゼの活性を抑制することで癌の浸潤・転移を抑制できる可能性のあることを示すものでもある。

ところで、癌細胞から分泌される膵トリプシノーゲンは膵トリプシンの前駆体であり、どのような機序で癌細胞外での間質内で活性型の膵トリプシンに変換されるかが興味のもたれるところである。最近、教室の Ohta ら²⁰⁾は膵癌が第 3 のプロトンポンプである液胞型プロトンポンプ (vacuolar-type H⁺-ATPase) を過剰発現していることを報告しているが、このプロトンポンプを介して排出されるプロトンにより分化型膵癌の管腔内でつくられる微小環境内で膵トリプシノーゲンから活性型トリプシンにオートアクチベーション (autoactivation) されるという仮説をたて、膵トリプシノーゲン活性化の機序を解明しようとしている。なぜならば、膵トリプシノーゲンのいくつかのアイソフォームの中でも、今回 mRNA レベルでの発現が確認されたカチオン型膵トリプシノーゲンは acidic pH (pH 4.5-5.0) で効率よくオートアクチベーションされることが実験的に証明されているからである²⁰⁾。この他、膵癌組織中の癌細胞のみならず、癌巣周囲に遊走してくるマクロファージが産生するカテプシン B²¹⁾によっても活性化される可能性も考えられる。

以上、膵癌細胞におけるセリンプロテアーゼの発現と浸潤・転移能について言及した。今回の研究で、癌細胞が浸潤・転移する際には従来より関心が高かった u-PA のみならず、膵トリプシノーゲンが極めて重要な役割を担っていること、またこれらセリンプロテアーゼの活性化を抑制することで癌の浸潤・転移を抑制できる可能性が示された。したがって、抗トリプシン作用の強い FOY-305 を用いた抗酵素療法は周術期における転移予防策、とくに手術中のみみだし癌細胞の血行性転移対策としての臨床応用が可能であると思われる。

結 論

分化度の異なる 5 種類のヒト膵癌培養細胞を用いてセリンプロテアーゼの発現と浸潤・転移能ならびにセリンプロテアーゼインヒビターである FOY-305 の浸潤・転移能におよぼす影響について検討し、以下の結果を得た。

1. mRNA レベルおよび蛋白レベルにおいて、u-PA は分化度とは関係なく全種類に発現が認められたのに対し、膵トリプシノーゲンは分化型である Capan-1、BxPC-3 および AsPC-1 の 3 種類にのみ発現がみられた。

2. ヌードマウスの脾内移植法による肝転移発生率は Capan-1 では 56%、BxPC-3 では 50%、AsPC-1 では 89% と、分化型の癌で高率であったのに対し、Panc-1 ならびに MIPaCa-2 の分化度の低い癌では転移が全くみられなかった。すなわち、膵癌細胞の肝転移発生率は分化度ならびに膵トリプシノーゲンの発現とよく相関した。

3. インベージョンアッセイにおける Capan-1 細胞の浸潤細胞数は FOY-305 により $0.1 \mu\text{M}$ 以上で濃度依存性に減少した。

4. Capan-1 細胞の脾内移植法による肝転移発生率は、FOY-305 非投与群の 62% にに対し投与群では 14% と、FOY-305 投与により有意に低下した。

以上より、膵癌細胞の浸潤・転移においては u-PA のみならず、膵トリプシノーゲンが重要な役割を担っていること、またこれらセリンプロテアーゼの活性化を抑制することで癌の浸潤・転移を抑制できる可能性が示唆された。

謝 辞

稿を終えるに臨み、終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜りました金沢大学医学部外科学第二講座宮崎逸夫教授に深甚なる謝意を表します。本研究の遂行にあたり、直接御指導と御鞭撻を賜りました金沢大学医学部外科学第二講座太田哲生講師に深く感謝いたします。また御助言、御協力を戴きました金沢大学医学部保健学科永川宅和教授ならびに金沢大学医学部解剖学第一講座井関尚一教授、沼田雅行助手、薬学部放射薬品化学教室石垣靖人助手、および解剖学第一講座、外科学第二講座の諸兄に厚く御礼申し上げます。

尚、本研究の要旨は第 96 回日本外科学会総会 (1996, 千葉) において発表した。

文 献

- 1) 中島元夫. 転移に関与する細胞外マトリックス分解酵素. 実験医学 10: 249-255, 1992
- 2) 岡田保典. マトリックスメタロプロテイナーゼの活性調節. 実験医学 10: 256-262, 1992
- 3) Duffy MJ, Reilly D, Sullivan CO. Urokinase plasminogen activator, a new and independent prognostic marker in breast cancer. *Cancer Res* 50: 6827-6829, 1990
- 4) Kogha S. Localization of plasminogen activators in human colon cancers by immunoperoxidase staining. *Cancer Res* 45: 1787-1796, 1991
- 5) Ohta T, Terada T, Nagakawa T, Tajima H, Itoh H, Fonseca L, Miyazaki I. Pancreatic trypsinogen and cathepsin B in human pancreatic carcinomas and associated metastatic lesions. *Br J Cancer* 69: 152-156, 1994
- 6) Ohta T, Terada T, Nagakawa T, Kayahara M, Nishimura G, Tsukioka Y, Taniguchi K, Miyazaki I, Numata M, Yamamoto M, Iseki S, Kanno M. Expression of pancreatic trypsinogen in

- human extrapancreatic gastrointestinal carcinomas. *Oncol Rep* 1: 759-764, 1994
- 7) Fujii S, Hirato M. Synthetic protease inhibitors. *Taisha* 14: 33-44, 1977
- 8) Ohkoshi M, Fujii S. Effect of the synthetic protease inhibitor [N,N-dimethylcarbamoylmethyl 4-(4-guanidinobenzoyloxy)-phenylacetate] methanesulfate on carcinogenesis by 3-methylcholanthrene in mouse skin. *J Natl Cancer Inst* 71: 1053-1057, 1983
- 9) Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-159, 1987
- 10) Wang TY, Cox RA. Isolation of total nucleic acid. *In* SP Colowick & NO Kaplan (eds), *Method in Enzymology* Vol 12B, p115-129, Academic Press, New York, 1968
- 11) Emi M, Nakamura Y, Ogawa M, Yamamoto T, Nishide T, Mori T, Matsubara K. Cloning, characterization and nucleotide sequences of two cDNAs encoding human pancreatic trypsinogens. *Gene* 41: 305-310, 1986
- 12) Riccio A, Grimaldi G, Verde P, Sebastio G, Boast S, Blasi F. The human urokinase-plasminogen activator gene and its promoter. *Nucleic Acids Res* 13: 2759-2771, 1985
- 13) Sun-Yu NG, Gunning P, Eddy R, Ponte P, Leavitt J, Shows T, Kedes L. Evolution of the functional human β -actin gene and its multi-pseudogene family: conservation of noncoding regions and chromosomal dispersion of pseudogenes. *Mol Cell Biol* 5: 2720-2732, 1985
- 14) Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed, p7.30-7.79, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989
- 15) 早川哲夫, 近藤孝晴, 山崎嘉弘, 伊藤和人, 飯沼幸雄, 奥村信義, 榊原 哲, 成瀬 達, 戸田安士, 青木 勲. 膵疾患における血清トリプシンの診断的意義. *日消誌* 76: 1513-1521, 1979
- 16) Danø K, Andreasen PA, Grøndahl-Hansen J, Kristensen P, Nielsen LS, Skriver L. Plasminogen activators, tissue degradation, and cancer. *Adv Cancer Res* 44: 139-265, 1985
- 17) Morikawa K, Walker SM, Jessup JM, Fidler IJ. *In vivo* selection of highly metastatic cells from surgical specimens of different primary human colon carcinomas implanted into nude mice. *Cancer Res* 48: 1943-1948, 1988
- 18) Albini A, Iwamoto Y, Kleinman HK, Martin GR, Aaronson SA, Kozlowski JM, McEwan RN. A rapid *in vitro* assay for quantitating the invasive potential of tumor cells. *Cancer Res* 47: 3239-3245, 1987
- 19) 宮崎逸夫, 上野桂一, 永川宅和. 膵癌治療における日本の現状. *手術* 44: 1411-1417, 1990
- 20) 太田哲生, 永川宅和. 病理組織学的所見からみた小膵癌の診断における問題点について. *胆と膵* 9: 201-205, 1988
- 21) Mignatti P, Robbins E, Rifkin DB. Tumor invasion through the human amniotic membrane: requirement for a proteinase cascade. *Cell* 47: 487-498, 1986
- 22) Koivunen E, Huhtala ML, Stenman UH. Human ovarian tumor-associated trypsin. *J Biol Chem* 264: 14095-14099, 1989
- 23) Koshikawa N, Yasumitsu H, Umeda M, Miyazaki K. Multiple secretion of matrix serine proteinases by human gastric carcinoma cell lines. *Cancer Res* 52: 5046-5053, 1992
- 24) Hirahara F, Miyagi Y, Miyagi E, Yasumitsu H, Koshikawa N, Nagashima Y, Kitamura H, Minaguchi H, Umeda M, Miyazaki K. Trypsinogen expression in human ovarian carcinomas. *Int J Cancer* 63: 176-181, 1995
- 25) Guy O, Lombardo D, Bartelt DC, Amic J, Figarella C. Two human trypsinogens. Purification, molecular properties, and N-terminal sequences. *Biochemistry* 17: 1669-1675, 1978
- 26) Rinderknecht H, Renner IG, Abramson SB, Carmack C. Meso-trypsin: a new inhibitor-resistant protease from a zymogen in human pancreatic tissue and fluid. *Gastroenterology* 86: 681-692, 1984
- 27) Koshikawa N, Yasumitsu H, Nagashima Y, Umeda M, Miyazaki K. Identification of one- and two-chain forms of trypsinogen 1 produced by a human gastric adenocarcinoma cell line. *Biochem J* 303: 187-190, 1994
- 28) Ohta T, Numata M, Yagishita H, Futagami F, Tsukioka Y, Kitagawa H, Kayahara M, Nagakawa T, Miyazaki I, Yamamoto M, Iseki S, Ohkuma S. Expression of 16kDa proteolipid of vacuolar-type H⁺-ATPase in human pancreatic cancer. *Br J Cancer* 73: 1511-1517, 1996
- 29) Figarella C, Miszczuk-Jamska B, Barrett AJ. Possible lysosomal activation of pancreatic zymogens. *Biol Chem Hoppe-Seyler* 369: 293-298, 1988

The Role of Serine Proteases in the Invasion and Metastasis of Human Pancreatic Cancer Fumio Futagami, Department of Surgery (Ⅱ), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Jusen Med Soc., **105**, 717—724 (1996)

Key words serine protease, pancreatic cancer, pancreatic, trypsinogen, urokinase-type plasminogen activator, FOY-305

Abstract

This study was designed to examine the expression of serine proteases including pancreatic trypsinogen and urokinase-type plasminogen activator (u-PA) and the potential for invasion and metastasis in five human pancreatic cancer cell lines (Capan-1, BxPC-3, AsPC-1, Panc-1 and MIAPaCa-2). In addition, the inhibitory effect of a serine protease inhibitor agent, FOY-305, on the invasion and metastasis of human pancreatic cancer cells was examined. Firstly, reverse transcription-PCR analysis revealed that three of five cell lines (Capan-1, BxPC-3 and AsPC-1) expressed pancreatic trypsinogen-1 (cationic isoform) mRNA, while all five cell lines expressed u-PA mRNA. The expression level of pancreatic trypsinogen and u-PA proteins in supernatant of the culture medium corresponded well to that of pancreatic trypsinogen and u-PA mRNAs. Secondly, intrasplenic injection of cancer cells in nude mice resulted in frequent metastases to the liver in three cell lines (Capan-1, BxPC-3 and AsPC-1). However, no metastasis was found in Panc-1 or MIAPaCa-2 cell lines. These findings suggest that the potential for hepatic metastasis was well correlated with the differentiation and pancreatic trypsinogen expression in these cell lines. Furthermore, Matrigel® invasion assay displayed that the invasion of Capan-1 cells was inhibited by treatment of FOY-305 in a dose-dependent manner at concentrations greater than $0.1 \mu\text{M}$. The incidence of hepatic metastases after intrasplenic injection of Capan-1 cells significantly decreased after treatment of FOY-305 (14% in the treatment group compared with 62% in the non-treatment group). These findings suggest that not only u-PA but also pancreatic trypsinogen play a major role in the invasion and metastasis of pancreatic cancer, and that a serine protease inhibitor, FOY-305, inhibits cancer invasion and metastasis.