

活性型ランソプラゾール(AG-2000)の腹膜播種予防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: 田島, 秀浩 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/9302

活性型ランソプラゾール (AG-2000) の 腹膜播種予防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: 三輪晃一教授)

田 島 秀 浩

癌の転移で重要な役割を担うインテグリンは α 鎖と β 鎖が非共有結合で会合して立体構造をとるヘテロダイマーで、 β 鎖の細胞外ドメインにはシステイン残基に富む4か所の繰り返し配列部が存在する。この残基のスルフヒドリル (sulfhydryl, SH) 基を標的に、特異的に結合するSH試薬を反応させインテグリンの三次元構造を崩して、癌細胞の細胞外マトリックスへの接着阻害を実験的に試みた。用いた癌細胞株は、癌性腹水由来で高率に腹膜播種を形成し、しかもインテグリンの発現が確認された足場依存性のAsPC-1ヒト膵管癌細胞株である。SH試薬は、細胞表面のSH基と特異的に不可逆的に結合する活性型ランソプラゾール (AG-2000) を使用した。生体外アドヒージョンアッセイ法によるAG-2000含有培地 (0, 1, 10, 100, 500, 1000 μ M) 処理後のAsPC-1細胞の細胞外マトリックスに対する接着を、インテグリンの代表的リガンドであるラミニン、フィブロネクチンおよびIV型コラーゲンで検索したところ、AG-2000の培養濃度に依存して抑制された ($p < 0.01$)。次に、これらの細胞外マトリックス構成蛋白に接着した細胞にAG-2000をアドヒージョンアッセイと同濃度で1時間接触させたところいずれの濃度でも48時間までは細胞の形態学的変化は見られなかったが、500 μ M以上の濃度では72時間以降ではアポトーシスを示す遊離細胞が多く観察された。さらに、生体内では、AsPC-1細胞を 1×10^6 個腹腔内注射した対照のヌードマウス ($n = 10$) は高度の腹膜播種病変を認め、8週以内に全例癌死したのに対し、AG-2000で1時間前処理した癌細胞を注射したマウス ($n = 10$) では、途中死亡した1例を含め8週屠殺時に播種病変を認めたのは3例 (30%) で、播種病変数も有意に少なかった ($p < 0.01$)。以上の成績より、AG-2000は、AsPC-1細胞の細胞外マトリックスへの接着を強く阻害し、消化器癌の腹膜播種予防薬として臨床応用できる可能性が示唆された。

Key words activated lansoprazole, integrins, SH groups, adhesion, peritoneal dissemination

消化器癌が他臓器へ血行性に転移したり、腹膜に着床して播種性病変を形成する際にインテグリンが重要な役割を果たすことが知られている¹⁾。このインテグリンは α 、 β 鎖が非共有結合で会合するヘテロダイマーで、特に β 鎖の細胞外ドメインにはシステイン残基に富む4ヶ所の繰り返し配列 (システインリッチリピート, cystein-rich repeats) が存在し、システイン残基の数は約60に及ぶ。この繰り返し配列部位はインテグリンファミリーのすべての β 鎖に共通して含まれており、 β 鎖の三次元構造を保つとともにその機能と密接な関係にあると考えられている^{2)~8)}。このシステインにはスルフヒドリル (sulfhydryl, SH) 基が一つずつ含まれているため、癌細胞にSH基と特異的に結合するSH試薬を反応させると、この化合物がインテグリン β 鎖のSH基と結合し、その結果 β 鎖の三次元構造が崩れて、癌細胞の細胞外マトリックスへの接着能が低下する可能性が推察される。

そこで本研究では細胞外マトリックスへの接着能が強い足場依存性のヒト消化器癌由来の細胞株を用い、癌細胞膜に発現するインテグリン β 鎖のシステインリッチリピートを標的としてSH試薬を反応させることにより、癌細胞の細胞外マトリックスへの接着阻害効果を実験的に検索した。

材料および方法

I. 細胞株

癌性腹水由来で、腹腔内投与にて高度の腹膜播種を形成し、しかもインテグリンの発現が確認されているAsPC-1ヒト中分化型膵管癌細胞株^{9)~11)}を米国標準株機関 (American Type Culture Collection) (Rockville, USA) から購入して使用した。細胞は15%非働化牛胎児血清 (fetal bovine serum) (Cell Culture Laboratories, Cleaveland, USA) と0.3mg/mlグルタミン (日本製薬, 東京) を含むRPMI-1640培地 (日本製薬) を用い、5% CO₂濃度、37℃の条件下で維持した。

II. 実験動物

5週齢のヌードマウス BALB/c nu/nu (日本クレア, 東京) を購入し、1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

今回の研究では、SH試薬として活性型ランソプラゾール AG-2000 (武田薬品工業, 大阪) を使用した。本薬剤は抗消化性潰瘍薬であるランソプラゾール AG-1749 (武田薬品工業) の活性体であり、溶液中ではAG-2000分子は陽性に荷電した状態で存在するために細胞膜は通過できず、細胞膜表面のSH基のみ

平成10年3月4日受付, 平成10年3月24日受理

Abbreviations : SH group, sulfhydryl group; NEM, N-ethylmaleimide; PBS, phosphate buffer saline

と結合する性質があり、通常細胞内に取り込まれて細胞毒として作用する他のSH試薬とは明らかに異なる特性がある(図1)。実験に際して、AG-2000はメチルセルロースを含有する溶液に溶解して使用した。ただし、SH基への結合を確認する実験では、AG-2000の分子が不安定でアイソトープ標識できないため、AG-2000の前駆体であるAG-1749を¹⁴Cで標識し、使用時にpH 4.8の溶液で30分間活性化し、AG-2000として使用した^{12)~15)}。

Ⅳ. フローサイトメトリーによるAsPC-1細胞表面のインテグリンβ₁およびβ₄抗原の解析

インテグリンの代表的リガンドであり、細胞外マトリックスの主要構成成分であるラミニン、フィブロネクチンおよびⅣ型コラーゲンへの接着に必要とされる主たるβサブユニットはβ₁およびβ₄であると報告されている¹⁶⁾。そこでまず、AsPC-1細胞におけるβ₁およびβ₄サブユニットの蛋白レベルでの発現についてフローサイトメトリーを用いて検討した。すなわち、コンフレント状態のAsPC-1細胞を0.02% EDTA添加0.25%ト

リプシン(Gibco, Grand Island, USA)にて剥離し遠心回収後、0.1Mリン酸緩衝生理食塩水(phosphate buffered saline, PBS, pH7.4)で2回洗浄し、抗ヒトインテグリンβ₁およびβ₄抗体(Chemicon, Temecula, USA)を一次抗体に、フルオレゼン・イソチオシアン酸(fluorescein isothiocyanate)標識ヤギ抗マウスIgM抗体(Dako, Humburg, Germany)を二次抗体に用いて染色し、フローサイトメーターCytoron Absolute (Ortho Diagnostic System, 東京)にて抗原の発現を解析した¹⁷⁾¹⁸⁾。

Ⅴ. ランソプラゾールのSH基への結合

活性化したランソプラゾールがAsPC-1細胞表面のSH基と選択的に結合していることを確認するために、アイソトープ標識した活性型ランソプラゾールとAsPC-1細胞との結合能をSH試薬であるN-エチルマレイミド(N-ethylmaleimide, NEM)(和光, 大阪)を前投与し、SH基に対する結合を競合阻害させた場合と比較した¹³⁾。まずはじめに、エタノールにて200μCi/mlに希釈した¹⁴C標識AG-1749 50μlにpH無調整RPMI 1640培地(pH 4.0)を60μl加えてpH 4.8とし、室温で30分間反応させて活性化し、¹⁴C標識活性型ランソプラゾール溶液を作成した。次に、この溶液90μlを15×10⁶cells/mlに調整したAsPC-1細胞浮遊液1.8mlに加えて15, 30, 60, 90, 120, 180分後に50μlずつ反応液を抽出し、PBSで1回洗浄した後、液体シンチレーターAquasol-2(Packard, Meriden, USA)を加え液体シンチレーションカウンターLSC-5100(アロカ, 東京)にて放射活性を算出し、総投与量に対する結合率を計算した¹³⁾¹⁴⁾。NEM投与群はAsPC-1細胞浮遊液0.5mlに10mg/mlのNEM水溶液250μlを加えて攪拌した後に¹⁴C標識活性型ランソプラゾール溶液を25μl加えて経時的に反応液を抽出し、同様にして結合率を算出した。なお、測定値は3つの検体の平均および標準偏差をとった。

Ⅵ. アドヒージョンアッセイ(adhesion assays)

コンフレント状態のAsPC-1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、0.5%メチルセルロース含

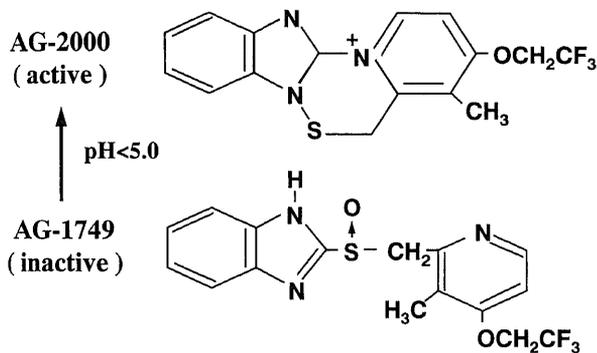


Fig. 1. Chemical structure of activated lansoprazole, AG-2000, and inactivated form, AG-1749. The latter is transformed into its active form, the former under acidic condition.

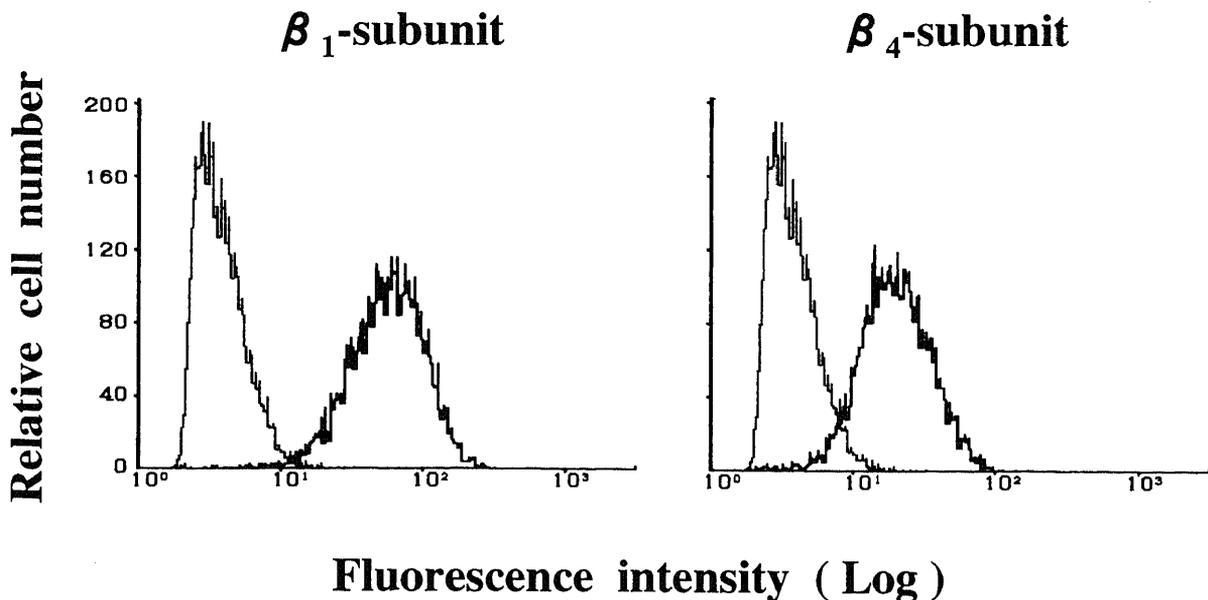


Fig. 2. Flowcytometric analysis of surface integrin β₁ and β₄ subunit expression on AsPC-1 cells. The cells were treated with anti-integrin β₁ and β₄ subunit MAb and stained further with FITC-conjugated goat anti-mouse IgM antibody. The fluorescence intensity was analyzed by a flowcytometer.

有RPMI-1640無血清培地に懸濁後、AG-2000を最終濃度が0, 1, 10, 100, 500, 1000 μ Mとなるように溶解し、37 $^{\circ}$ Cで1時間反応させた。細胞を再び遠心回収した後、通常の培地に再懸濁してラミニン、フィブロネクチンおよびIV型コラーゲンで被覆された6ウェル平底マイクロプレート Biocoat Variety Pack II (Becton Dickinson Labware, Bedford, USA) に1ウェルあたり 1×10^6 個ずつになるように分注し、5% CO₂濃度、37 $^{\circ}$ Cの条件下で12時間培養した後、接着した細胞を中性ホルマリン液にて30分間固定、0.1%クリスタルバイオレット(和光)水溶液にて1分間染色し、細胞密度計 Monocellater (オリンパス光学、東京)を用いてAG-2000濃度が0のウェルをコントロール(100%)として細胞密度を測定した¹⁹⁾²⁰⁾。なお、測定値は3回の実験の平均および標準偏差をとった。

Ⅶ. 接着したAsPC-1細胞に及ぼす活性型ランソプラゾールの影響

1. AsPC-1細胞に対するAG-2000の投与

まずAsPC-1細胞をアドヒージョンアッセイと同様ラミニン、フィブロネクチンおよびIV型コラーゲンをコートした6ウェル平底マイクロプレートに1ウェルあたり 1×10^6 個ずつ分注して5% CO₂濃度、37 $^{\circ}$ Cの条件下で12時間培養してプレートに接着させた。次に、PBSで1回洗浄し、0.5%メチルセルロースを含有するRPMI-1640無血清培地にAG-2000を0, 2, 10, 100, 500, 1000 μ Mとなるように溶解した反応液を2mlずつ加えて5% CO₂、37 $^{\circ}$ Cで1時間培養した後、反応液を除去して通常の培養条件に戻した。

2. 細胞接着率の解析

上記反応後0, 24, 48, 72, 96, 120時間後に細胞をアドヒージョンアッセイと同様に中性ホルマリン液にて固定、0.1%クリスタルバイオレット水溶液にて染色し、細胞密度計にてAG-2000濃度が0のウェルをコントロールとして細胞密度を測定した。なお、測定値は3回の実験の平均および標準偏差をとった。

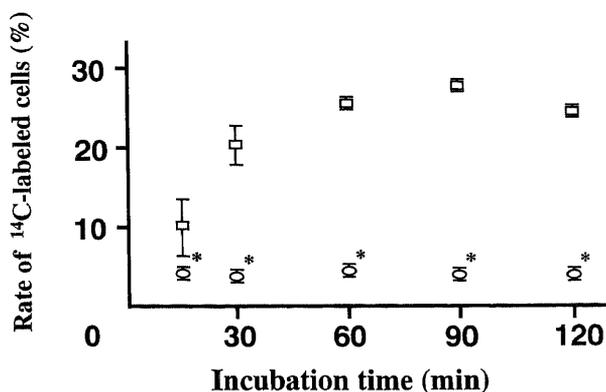


Fig. 3. Time course of binding of ¹⁴C-labeled activated lansoprazole to AsPC-1 cells and effect of NEM on competitive inhibition for specific binding with SH groups of the cell surface. The cells were incubated in medium containing ¹⁴C-labeled activated lansoprazole in the presence (○) or absence (□) of NEM for 15, 30, 60, 90 and 120 minutes, respectively. The $\bar{X} \pm$ SD of the value in three independent experiments are shown. * $p < 0.01$ compared with controls (NEM absent).

3. 細胞形態の観察

AG-2000処理後の細胞の形態は、光学顕微鏡および電子顕微鏡を用いて培地中に遊離した細胞とシャーレに接着した細胞とを別々に観察した。光学顕微鏡は培地中に浮遊したAsPC-1細胞およびシャーレから0.02% EDTA添加0.25%トリプシンを用いて剥離したAsPC-1細胞をそれぞれ細胞遠心沈殿装置 Cytospin 2 (Shandon Southern Products Ltd., Cheshire, England) を用いて、5分間、600回転でスライドガラス上に塗抹した後、エタノール固定、ヘマトキシリン・エオジン染色を行って、細胞の形態を観察した²¹⁾。

電子顕微鏡像は同様にして遊離した細胞をそれぞれ4%パラホルムアルデヒド・2%グルタルアルデヒド/カコジル緩衝液(pH 7.4)にて前固定し、1%オスミウム酸/カコジル緩衝液(pH 7.4)にて後固定を行った後、ゼラチンカプセルに包埋して切片を作成し、酢酸ウラニル、鉛により電子染色を施し、透過型電子顕微鏡 H-700 (日立、東京)にて観察した。

Ⅷ. AG 2000 による AsPC-1 細胞の腹膜播種形成への効果

AG-2000による生体内でのAsPC-1細胞に対する接着阻害効果を検討する目的で、AsPC-1細胞をAG-2000を用いて処理した後にヌードマウスに腹腔内投与し、腹膜播種形成の有無とその程度をAG-2000処理を行わずに細胞を投与したコントロール群と比較した。すなわち、対数増殖期にあるAsPC-1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、アドヒージョンアッセイと同じ方法で1000 μ MのAG-2000で1時間処理した。処理後の細胞を再度遠心回収し、PBSで懸濁して 1×10^6 個/mlの濃度に調整した。なお、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。この細胞懸濁液を6週齢のヌードマウスに29G注射針を用いて1ml(細胞数 1×10^6 個)ずつ腹腔内注入し、8週後に犠牲死させて肉眼的並びに組織学的に腹膜播種の有無を評価した²²⁾。コントロール群はAG-2000濃度が0であること以外はすべて同様の処理を行い、ヌードマウスに腹腔内投与した。腹膜播種の程度は肉眼的に結節が5個以内の場合を+, 6から10個までを++, 11個以上の場合++とした。なお、マウスが観察期間内に死亡した場合は、死亡後直ちに開腹して評価を行った。

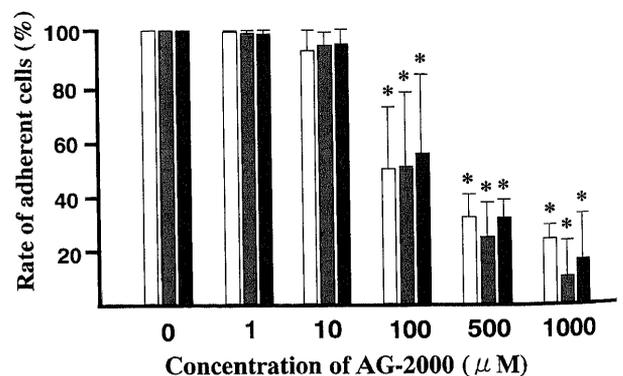


Fig. 4. Effect of AG-2000 on the adhesion of AsPC-1 cells. The cells were plated on microtiter wells coated with laminin (□), fibrinectin (▨), or collagen IV (■) after AG-2000 treatment. Results are expressed as percentages of total cells. The $\bar{X} \pm$ SD of the values in three independent experiments are shown. * $p < 0.01$ compared with controls.

Ⅷ. 統計学的検定法

測定値はすべて平均±標準偏差 ($\bar{X} \pm SD$) で示した。2群間比較はまずF検定による等分散の検定を行い、分散が等しい場合はStudentのt検定を用い、等しくない場合はWelchのt検定を行った。3群間比較はまずKruskal-Wallis検定を行った後に

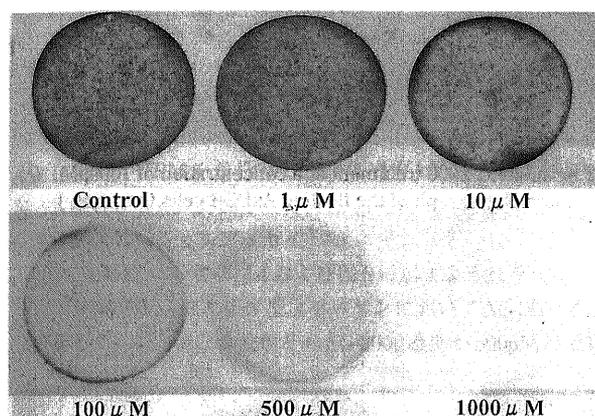


Fig. 5. Dose-dependent effect of AG-2000 on adhesion of AsPC-1 cells to laminin.

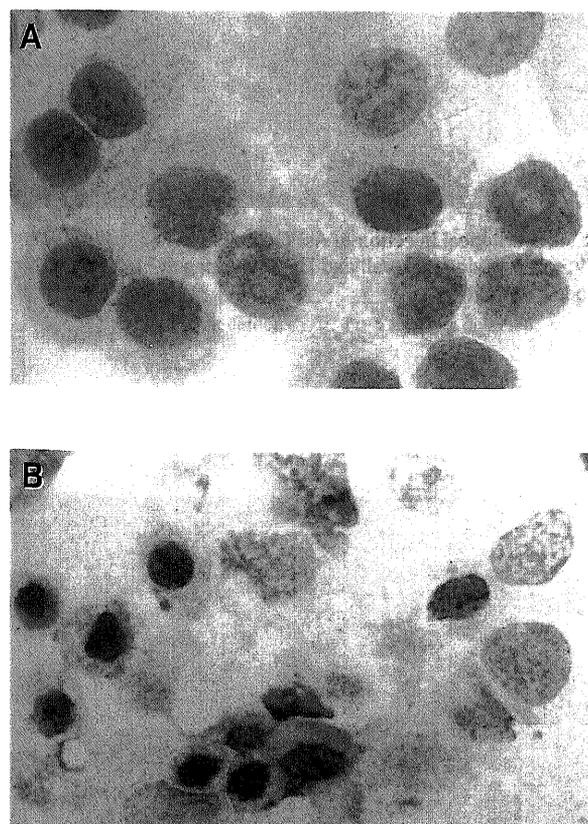


Fig. 7. Morphological features of the adherent and floating AsPC-1 cells 72 hr after AG-2000 treatment. (A) A light microphotograph of adherent AsPC-1 cells (HE, ×400). (B) A light microphotograph of floating AsPC-1 cells (HE, ×400).

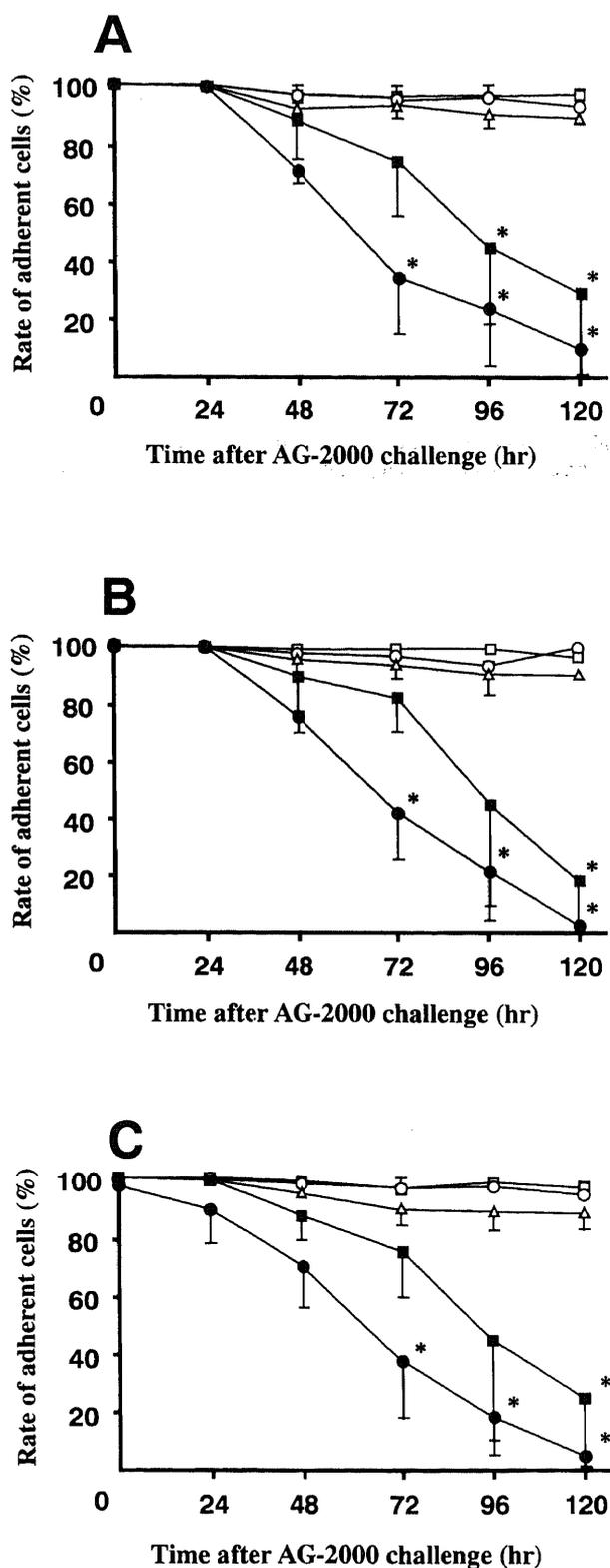


Fig. 6. Effect of AG-2000 on adherent AsPC-1 cells. AsPC-1 cells were plated on microtiter wells coated with laminin (A), fibronectin (B), or collagen IV (C). And the adherent cells were treated for 60 minutes with AG-2000 at a concentration of 0, 1 (\square), 10 (\circ), 100 (\triangle), 500 (\blacksquare) and 1000 (\bullet) μ M, respectively. The rate of adherent cells was then estimated 0, 24, 48, 72, 96 and 120 hours, respectively after AG-2000 treatment. The $\bar{X} \pm SD$ of the values in three independent experiments are shown. * $p < 0.01$ compared with the controls.

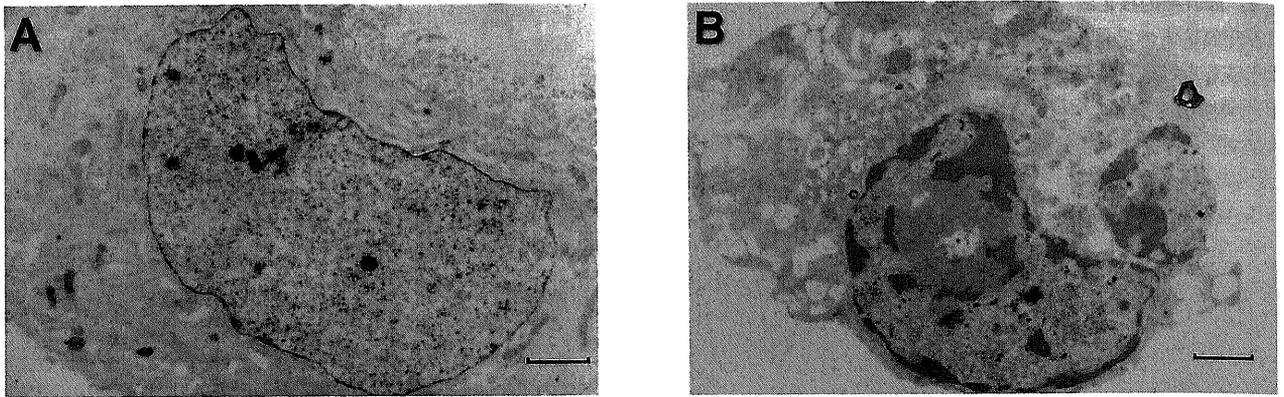


Fig. 8. Morphological features of the adherent and floating AsPC-1 cells 72 hr after AG-2000 treatment at a concentration of 1000 μ M. (A) An electron microphotograph of the adherent AsPC-1 cells. (B) An electron microphotograph of the floating AsPC-1 cells (bar, 1 μ m).

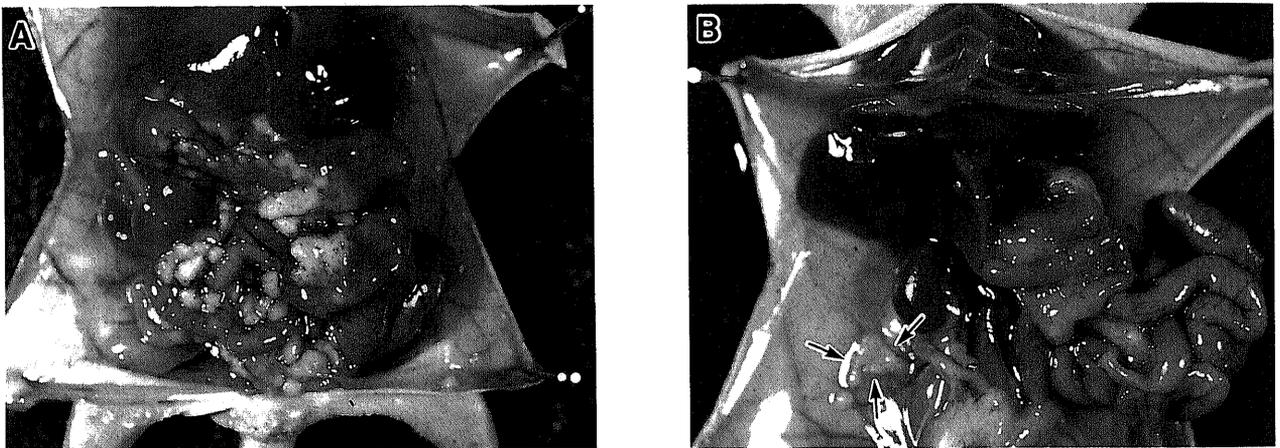


Fig. 9. Macroscopic findings of peritoneal dissemination in nude mice after intraperitoneal injection of AsPC-1 cells. In non-treated group (A) many cancer nodules are observed in omentum, mesentery, subphrenic space, abdominal wall and Douglas's pouch. In a mouse for AG-2000 treated group (B) a few peritoneal nodules were observed in the abdomen (arrows).

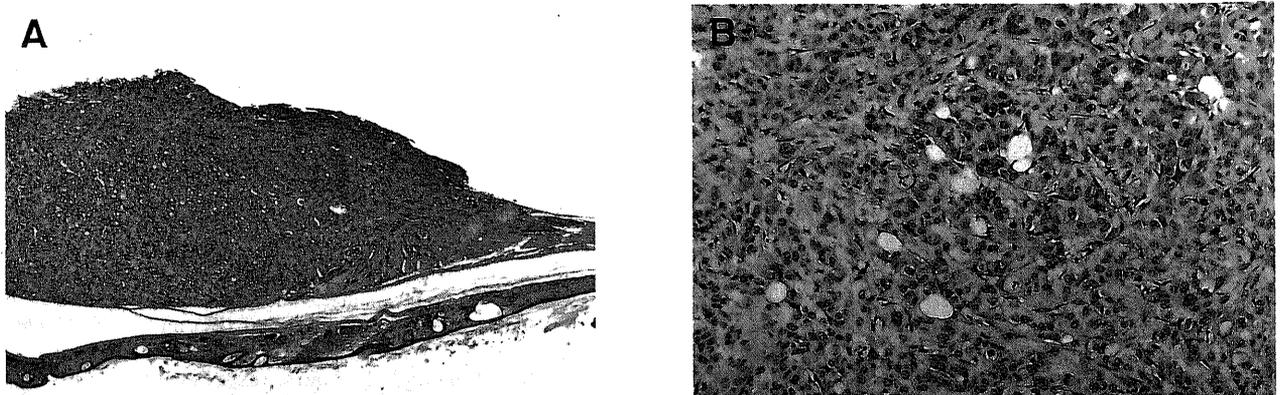


Fig.10. Histological findings of peritoneal dissemination in nude mice after intraperitoneal injection of AsPC-1 cells. Moderately differentiated adenocarcinoma is noted. (A) HE, \times 40. (B) HE, \times 400.

Scheffe's F検定を行った。いずれも危険率1%未満の場合 ($p < 0.01$) を統計学的に有意差ありと判定した。

成 績

I. AsPC-1 細胞におけるインテグリンβサブユニットの発現

フローサイトメトリーを用いた解析ではAsPC-1細胞の表面にインテグリンβ₁およびβ₄サブユニットの蛋白レベルでの発現が確認された(図2)。

II. 活性型ランソプラゾールとSH基との結合能

活性化した¹⁴C標識ランソプラゾールとAsPC-1細胞との結合率は反応開始後60分までは漸増し、以後プラトーとなった。これに対し、NEMを前投与した群は測定したすべての時間において結合が有意に抑制されていた ($p < 0.01$) (図3)。

III. アドヒージョンアッセイ

AsPC-1細胞の接着は図4および図5に示すようにラミニン、フィブロネクチンおよびIV型コラーゲンにおいてAG-2000濃度に依存して抑制され、3種類ともAG-2000濃度が500μM以上に

て有意に接着細胞数の減少を認めた ($p < 0.01$)。とくに、1000μMの処理により、AsPC-1細胞のラミニンに対する接着が25.0 ± 5.6%，フィブロネクチンに対する接着が11.5 ± 4.8%，IV型コラーゲンに対する接着が17.0 ± 8.3%まで抑制された。

IV. 接着したAsPC-1細胞に及ぼす活性型ランソプラゾールの影響

1. 細胞接着率

ラミニン、フィブロネクチンおよびIV型コラーゲンを被覆したプレートに接着しているAsPC-1細胞に対して、AG-2000を60分間反応させ、通常の培地に戻して細胞接着率を検討した。その結果、反応直後には各濃度間に接着細胞数の差はないが、500μMで処理した群は72時間後から接着細胞数が減り始め、96時間以降ではすべての基質において有意な減少がみられた。さらに、1000μMで処理した群では48時間後より接着細胞数が減少し始め、72時間後より有意な減少となった(図6)。

2. 細胞形態の観察

各群ともAG-2000処理後48時間までは培地中に浮遊した細胞

Table 1. The incidence of peritoneal dissemination after intraperitoneal injection of AsPC-1 cells.

No.	The numbers of detectable nodules in					days after injection
	abdominal wall	diaphragm	Douglas's pouch	mesenterium	omentum	
1	+	+	+	+	+	30
2	+	+	+	+	+	44
3	+	+	+	+	+	44
4	+	+	+	+	+	44
5	+	+	+	+	+	44
6	+	+	++	++	+	37
7	+	-	+	+	+	37
8	+	++	-	++	+	49
9	+	+	+	+	+	49
10	+	-	+	+	+	49

-, not detected; +, 1~5 nodules detected; ++, 6~10 nodules detected; ++, more than 11 nodules detected

Table 2. The incidence of peritoneal dissemination after intraperitoneal injection of AG-2000 treated AsPC-1 cells.

No.	The numbers of detectable nodules in					days after injection
	abdominal wall	diaphragm	Douglas's pouch	mesenterium	omentum	
1	-	-	-	-	-	56
2	-	-	-	-	-	56
3	-	-	-	-	-	56
4	-	-	-	-	-	56
5	-	-	-	-	-	56
6	-	-	-	-	-	56
7	-	-	-	-	-	56
8	+	-	-	-	-	56
9	+	+	-	+	+	56
10	+	+	+	+	+	31

-, not detected; +, 1~5 nodules detected; ++, 6~10 nodules detected

数も少なく、また浮遊した細胞とシャーレに接着した細胞に形態学的変化はみられなかった。しかし、72時間を経過すると500 μ M以上の濃度でAG-2000と接触したウェルでは培地中に浮遊する細胞が多くみられるようになった。接着した細胞には形態学的変化がみられなかったが、培地中に浮遊した細胞の中には光学顕微鏡レベルで核が濃縮した小さな細胞がみられ、電子顕微鏡レベルでそれらの細胞はクロマチンが核膜に沿って濃縮し細胞表面の微絨毛も消失しており、典型的なアポトーシスの所見を呈していた(図7, 8)。特にAG-2000濃度1000 μ Mで処理したウェルでは、72時間以後浮遊細胞の約半数にアポトーシスが観察された。

V. AsPC-1細胞の腹膜播種形成能におよぼすAG 2000の影響

ヌードマウス腹膜播種モデルにおいて、コントロール群には腹壁、横隔膜下、腸間膜、大網およびダグラス窩に肉眼的に多数の腹膜播種が認められ、組織学的にも中分化型腺癌が認められた(図9-A, 10, 表1)。このため、コントロール群のマウスは全例50日以内に死亡した。これに対して、AG-2000にて前処理したAsPC-1細胞を腹腔内投与した群では腹膜播種の認められたのはわずか3例で、1例を31日で失ったが観察期間内に死亡したのはこの1例のみで、有意に腹膜播種巣の数が少なかった(図9-B, 表2)。

考 察

腹膜播種の形成は消化器癌の治療を困難にする重要な要因の一つであり、今日の集学的治療をもってしても腹膜播種症例の予後はきわめて不良である²³⁾²⁴⁾。腹膜播種形成の最初の過程は、腹腔内遊離癌細胞が腹膜表面の露出した中皮下基底膜に接着することに始まると考えられており²⁵⁾、胃癌手術症例における臨床検討においても腹腔内遊離癌細胞と腹膜播種形成との相関が指摘されている²⁶⁾。そして、この癌細胞の基底膜への接着にはインテグリンの関与が不可欠であるといわれている^{26)~30)}。

本研究では、活性型ランソプラゾールAG-2000がSH基と選択的に結合する性質を有していること、インテグリンファミリーの β サブユニットすべてに共通してSH基を含む多数のシステイン残基の繰り返し配列部が存在することに着目し、インテグリン β 鎖のSH基を標的としたAG-2000によるインテグリンの三次元構造の崩れに伴う接着阻害効果について検討した。なお、AG-2000がSH基と選択的に結合することは胃の壁細胞において確認されているが¹⁴⁾、本実験にて用いたAsPC-1細胞においてもSH試薬であるNEMを用いた競合阻害試験にてSH基に選択的に結合していることが確認された。

生体外におけるAG-2000のAsPC-1細胞に対する接着阻害効果を検討するために、AsPC-1細胞をAG-2000で1時間前処理してアドヒージョンアッセイを行った。その結果、インテグリンの代表的リガンドであるラミニン、フィブロネクチンおよびIV型コラーゲンに対するAsPC-1細胞の接着はAG-2000濃度依存性に抑制された。さらに、既にこれらのリガンドに接着したAsPC-1細胞にAG-2000を1時間作用させたところ、AG-2000との接触後48時間までは細胞に形態学的変化はみられなかったが、500 μ M以上の濃度では作用後72時間から有意に細胞が遊離し始め、120時間後にはほぼ完全に細胞が遊離した。これらの所見から、AG-2000はインテグリンの機能を抑制することによりAsPC-1細胞の接着を阻害した可能性が示唆された。ただ

し、今回の研究ではインテグリンの β サブユニットとAG-2000との結合を直接証明したわけではなく、また、AG-2000は決して特異的にインテグリンと結合する薬剤ではない。実際、癌細胞の表面にはインテグリン以外にも細胞増殖因子受容体等にインテグリンほど多くはないが、システインリッチドメインの存在が知られている^{31)~33)}。しかし、インテグリン β サブユニットにきわめて多数のSH基が集簇して存在すること、AG-2000がSH基と特異的に結合すること、インテグリンのリガンドであるラミニン、フィブロネクチンおよびIV型コラーゲンに対するAsPC-1細胞の結合がAG-2000によって有意に抑制されたこと、AG-2000と接触後48時間までAsPC-1細胞には接着阻害以外に明らかな影響が認められなかったことより、インテグリンの機能がAG-2000によって阻害されたことは明らかで、他のSH基にAG-2000が結合したことによる影響は少ないものと思われた。また、さらに興味深いことは、AG-2000と接触し、培養液中に遊離した細胞の中に72時間以後アポトーシスの形態を呈した細胞がみられたことである。一般に、足場依存性の接着細胞はインテグリンを介する接着によって外界からのシグナル伝達が行われ、細胞外マトリックスへの接着が阻害され遊離した状態になると速やかにアポトーシスに陥るといわれている³⁴⁾。500 μ M以上の濃度でAG-2000と接触したAsPC-1細胞は72時間後から有意な細胞の遊離と、浮遊した細胞の中のみアポトーシスが観察されはじめ、接着細胞には変化がみられなかった。このことより、AsPC-1細胞はAG-2000処理による接着阻害とその後のシグナル伝達阻害により、アポトーシスに陥った可能性が示唆された。

今回の研究で、AG-2000のAsPC-1細胞に対する毒性の検討は、形態学的変化の観察とトリパンブルーによる色素排除試験によって行ったが、AG-2000作用後48時間まで細胞に形態学的変化はみられず、トリパンブルーによる色素排除試験においてもAG-2000処理した細胞と無処置の細胞とに生細胞率の差はみられなかった。すなわち、今回の実験で観察されたAG-2000によるAsPC-1細胞の接着阻害効果は、アポトーシスに先行して観察されており、決してアポトーシスの結果生じた現象ではないと考えられた。

ところで、今回使用したAG-2000は水に溶け難く、メチルアルコールやジメチルスルホキシド(dimethyl sulfoxide)には溶解する化合物である。これらの有機溶媒は細胞毒性が強いため、今回の研究ではAG-2000を培地に溶解する際にはメチルセルロースを使用した。メチルセルロースは細胞に対する影響はほとんどないが、溶媒として用いた場合、培養液中に多量の繊維成分が混入することになるため、メチルチアゾールテトラゾリウムブロマイド(methylthiazol tetrazolium bromide)法³⁵⁾やフローサイトメトリーなどの光学系を用いた検索法では正確に細胞毒性を検討することができなかった。このため、細胞毒性の検討は上述の如く形態学的変化の観察とトリパンブルーによる色素排除試験で行った。

ヌードマウスを用いた生体内の実験においてもAG-2000によってAsPC-1細胞を前処理した群では3例に腹膜播種の形成を認められたものの、観察期間内に癌死したのはわずか1例のみで、コントロール群が全例に高度の腹膜播種形成を認めて癌死したことに比して、有意に腹膜播種形成が少なかった。以上の所見より、AG-2000は生体内においてもAsPC-1細胞の接着を阻害することが示唆された。今回の生体内の実験ではAG-2000を確実

に癌細胞と接触させるために、AG-2000の前処理により検討を行ったが、今後はAG-2000の癌細胞腹腔内注射時や腹膜播種成立後の投与による効果も詳細に検索し、より臨床に近いモデルでの検討が必要であると思われた。

最後にこれらの実験成績を踏まえ、AG-2000の臨床応用の可能性について付言する。近年、インテグリンを介した細胞接着に着目し、抗インテグリン抗体やその他の薬剤を用いた様々な細胞接着阻害の試みがなされているが^{37)~45)}、臨床応用には至っていないのが現状である。AG-2000は溶液中では分子が陽性に荷電しており細胞膜を通過できないため¹³⁾、すでに腹膜播種を形成し、腹膜中皮下に浸潤・増殖した癌細胞に作用させることは理論的には不可能である。しかし、AG-2000はインテグリンファミリーのすべてのβ鎖に共通して多量に含まれるSH基を標的とした全く新しい接着阻害剤であり、また、1時間という短時間の接触においてその効果が認められ、腹腔内に遊離している癌細胞および着床直後で腹膜表面に存在する癌細胞に効果的に作用し、腹膜播種の形成を予防する可能性が示唆される。また、AG-2000の分解産物に関しては、抗潰瘍薬であるAG-1749の開発段階の研究で重篤な副作用がないことが既に確認されている³⁶⁾。本薬剤の臨床応用の可能性としては、漿膜浸潤を認める消化器悪性腫瘍に対する腹膜播種形成の予防や、術中操作に伴う医原性腹膜播種の予防などに適応があると考えられる。

結 語

活性型ランソプラゾール (AG-2000) を用いて癌細胞の接着阻害効果について検索し、以下の知見を得た。

1. AG-2000はAsPC-1細胞表面のSH基と特異的に結合することが確認された。
 2. アドヒージョンアッセイにおいてインテグリンの代表的リガンドであるラミニン、フィブロネクチンおよびIV型コラーゲンに対するAsPC-1細胞の接着はAG-2000濃度依存性に抑制された。
 3. 接着したAsPC-1細胞にAG-2000を1時間接触させたところ接触後48時間までは細胞に形態学的変化はみられなかったが、500μM以上の濃度で接触後72時間から有意に接着細胞数が減少し、培養液中に浮遊した細胞の中にアポトーシスの形態を呈するものが認められた。
 4. ノードマウス腹腔内投与による腹膜播種形成モデルにおいて、AsPC-1細胞をAG-2000で前処理した群では未処理のコントロール群に比して有意に腹膜播種形成が少なかった。
- 以上より、AG-2000は癌細胞の細胞外マトリックスへの接着を阻害することで、腹膜播種の形成を予防する可能性のあることが示唆された。

謝 辞

稿を終えるに望み、終始御懇篤なる御指導と後校閲を賜りました恩師三輪晃一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薬学部分子細胞薬学講座大熊勝治教授、金沢大学医学部解剖学第一講座山本美由紀助手、金沢大学医学部附属病院核医学診療科横山邦彦講師、金沢大学医学部附属病院小児科太田和秀講師、金沢大学医学部保健学科谷内江昭宏教授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39回日本消化器病学会大会 (1997, 福岡) において発表した。

文 献

- 1) Kiyasu Y, Kaneshima S, Koga S. Morphogenesis of peritoneal metastasis in human gastric cancer. *Cancer Res* 41: 1236-1239, 1981
- 2) Hogervorst F, Kuikman I, von dem Borne AEGR, Sonnenberg A. Cloning and sequence analysis of beta-4 cDNA: An integrin subunit that contains a unique 118kd cytoplasmic domain. *EMBO J* 9: 757-770, 1990
- 3) Yee G, Hynes RO. A novel, tissue-specific integrin subunit, βv, expressed in the midgut of *Drosophila melanogaster*. *Development* 118: 845-858, 1993
- 4) Beer J, Collier BD. Evidence that platelet glycoprotein IIIa has a large disulfide-bonded loop that is susceptible to proteolytic cleavage. *J Biol Chem* 264: 17564-17573, 1989
- 5) Calvete JJ, Henschen A, Gonzalez-Rodriguez J. Assignment of disulphide bonds in human platelet GP IIIa: A disulphide pattern for the β- subunits of the integrin family. *Biochem J* 274: 63-71, 1991
- 6) Parise LV, Phillips DR. Platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex incorporated into phospholipid vesicles. *J Biol Chem* 260: 1750-1756, 1985
- 7) Carrell NA, Fitzgerald LA, Steiner B, et al: Structure of human platelet membrane glycoproteins IIb and IIIa as determined by electron microscopy. *J Biol Chem* 260: 1743-1749, 1985
- 8) Nermut MV, Green NM, Eason P, Yamada SS and Yamada KM: Electron microscopy and structural model of human fibronectin receptor. *EMBO J* 7: 4093, 1988
- 9) Aoki K, Yoshida T, Sugimura T, Terada M. Liposome-mediated *in vivo* gene transfer of antisense *K-ras* construct inhibits pancreatic tumor dissemination in the murine peritoneal cavity. *Cancer Res* 55: 3810-3816, 1995
- 10) Christine L, Herbert Z K. Diversity of adhesion to basement membrane components of human pancreatic adenocarcinomas. *Cancer Res* 45: 5246-5251, 1985
- 11) Peter AH, Phillip C, Nicholas RL, Michael AH. Characterization of integrin chains in normal and neoplastic human pancreas. *J Pathol* 165: 33-41, 1991
- 12) Nagaya H, satoh H, Kubo K, Maki Y. Possible mechanism for the inhibition of gastric (H⁺ + K⁺)-adenosine triphosphate by the proton pump inhibitor AG-1749. *J Pharmacol Exp Ther* 248: 799-805, 1989
- 13) Nagaya H, satoh H, Kubo K, Maki Y. Possible mechanism for the inhibition of acid formation by the proton pump inhibitor Ag-1749 in isolated parietal cells. *J Pharmacol Exp Ther* 252(3): 1289-1295, 1990
- 14) 三輪 清, 三谷政義, 塚本剛司, 吉田清志, 小林卓郎, 木村智憲, 下村初志, 棚山薫晴. 新規プロトンポンプ阻害剤AG-1749のラット, マウス, イスにおける生体内動態. 薬理と治療 18: 3413-3435, 1990
- 15) Catherine C, McGowan, Timothy L, Cover, Martin JB. The proton pump inhibitor omeprazole inhibits acid survival of *Helicobacter pylori* by a urease-independent mechanism.

Gastroenterology 107: 738-743, 1994

- 16) Timple R, Brown JC. The laminins. *Matrix Biol* 14: 275-281, 1994
- 17) Miyazaki T, Uehara T, Nibu R, Tsuji T, Yachie A, Yonehara S, Taniguchi N. Differential expression of apoptosis-related Fas antigen on lymphocyte subpopulations in human peripheral blood. *J Immunol* 149: 3753-3758, 1992
- 18) Stallmach A, Rosewicz S, Kaiser A, Mattes H, Schuppan D, Riecken EO. Laminin binding in membranes of a rat pancreatic acinar cell line are targets for glucocorticoids. *Gastroenterology* 102: 237-247, 1992
- 19) 米村 豊, 腹膜播種 (米村 豊 編), 第1版, 65-70頁, へるす出版, 東京, 1996
- 20) Stefan R, Keno W, Bernd VL, Harald M, Astrid K, Ernst OR. Retinoids inhibit adhesion to laminin in human pancreatic carcinoma cells via $\alpha_6\beta_1$ -integrin receptor. *Gastroenterology* 112: 532-542, 1997
- 21) Iwaki K, Miyazaki T, Takizawa T, Konno A, Ohta K, Yachie A, Seki H, Taniguchi N. Differential expression of bcl-2 and susceptibility to anti-Fas-mediated cell death in peripheral blood lymphocytes, monocytes and neutrophils. *Blood* 84: 1201-1208, 1994
- 22) 野島直巳. 胃癌腹膜播種形成過程の解明. 十全医会誌 6: 834-844, 1996
- 23) Yonemura Y, Sawa T, Kinoshita K, Matsuki N, Fushida S, Tanaka S, Ohyama S, Takashima T, Kimura H, Kamata T, Fujimura T, Sugiyama K, Shima K, Miyazaki I. Neoadjuvant chemotherapy for high-grade advanced gastric cancer. *World J Surg* 17: 256-262, 1993
- 24) Yonemura Y, Fujimura T, Fushida S, Takegawa S, Kamata T, Katayama K, Kosaka T, Yamaguchi A, Miwa K, Miyazaki I. Hyperthermochemotherapy combined with cytoreductive surgery for the treatment of gastric cancer with peritoneal dissemination. *World J Surg* 15: 530-536, 1991
- 25) Kiyasu Y, Kaneshima S, Koga S. Morphogenesis of peritoneal metastasis in human gastric cancer. *Cancer Res* 41: 1236-1239, 1981
- 26) 三輪晃一, 山岸 満, 北村秀夫, 萩野 茂, 松木伸夫, 山口明夫, 浅野 健, 野口昌邦, 高島茂樹, 竹下八洲男, 宮崎逸夫, 谷本一夫, 松原藤継. 胃癌手術における腹腔内遊離癌細胞の意義. *J Jap Soc Cancer Ther* 15: 1131-1136, 1980
- 27) Weitzman JB, Pasqualin R, Takada Y, Hemler ME. The function and distinctive regulation of the integrin VLA-3 in cell adhesion, spreading, and hemotypic cell aggregation. *J Biol Chem* 268: 8651-8657, 1993
- 28) Dedhar S. Integrins and tumor invasion. *Bioessays* 12: 583-590, 1990
- 29) Terpe HJ, Tajrobehkar K, Gunthert U, Altmannberger M. Expression of cell adhesion molecules alpha-2, alpha-5 and alpha-6, E-cadherin, N-CAM and CD-44 in renal cell carcinomas. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 422: 219-224, 1993
- 30) Elices MJ, Urry LA, Hemler ME. Receptor functions for the integrin VLA-3: fibronectin, collagen and laminin binding are differentially influenced by ARG-GLY-ASP peptide and by divalent cations. *J Cell Biol* 112: 169-181, 1991
- 31) Lax I, Bellot F, Howk R, Ullrich A, Givol D, Schlessinger J. Functional analysis of the ligand binding site of EGF-receptor utilizing chimeric chicken/human receptor molecules. *EMBO J* 8: 421-427, 1989
- 32) Ullrich A, Schlessinger J. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 61: 203-212, 1990
- 33) Lin Y H, Wang X F, Eaton EG, Weinberg R A, Lodish H F. Expression cloning of the TGF- β type II receptor, a functional transmembrane serine/threonine kinase. *Cell* 68: 775-785, 1992
- 34) Zhang Z, Vuori K, Reed JC, Ruoslahti E. The $\alpha_5\beta_1$ integrin supports survival of cells on fibronectin and up-regulates Bcl-2 expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 6161-6165, 1995
- 35) Alley MC, Scudiero DA, Monks A, Hursey ML, Czerwinski MJ, Fine DL, Abbott BJ, Mayp JG, Shoemaker RH, Boyd MR. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res* 48: 589-601, 1988
- 36) 神子田武, 青森利雄, 佐藤秀哉. Lansoprazole (AG-1749) のマウスおよびラットのいける急性毒性試験. 薬理と治療 18 (Suppl. 10), 2657-2661, 1990
- 37) Mormoto C, Letvin NL, Boyd AW, Hagan M, Brown HM, Kornacki MM, Schlossmann SF. The isolation and characterization of the human helper inducer T cell subset. *J Immunol* 134: 3762-3769, 1985
- 38) Sonnenberg A, Modderman PW, Hogervorst E. Laminin receptor on platelets is the integrin VLA-6. *Nature* 336: 487-489, 1988
- 39) Gehlsen KR, Argraves WS, Pierschbacher MD, Ruoslahti E. Inhibition of *in vitro* tumor cell invasion by Arg-Gly-Asp-containing synthetic peptides. *J Cell Biol* 106: 925-930, 1988
- 40) Yamada K, Kennedy DW, Yamada SS, Gralnick H, Chen W, Akiyama SK. Monoclonal antibody and synthetic peptide inhibitors of human tumor cell migration. *Cancer Res* 50: 4485-4496, 1990
- 41) Skubitz APN, McCarthy JB, Zhao Q, Yi X, Furcht LT. Definition of sequence, RYVFLRP, within laminin peptide F-9 that mediates metastatic fibrosarcoma cell adhesion and spreading. *Cancer Res* 50: 7612-7622, 1990
- 42) Gehlsen KR, Sriamarao P, Furcht LT, Skubitz APN. A synthetic peptide derived from the carboxy terminus of the laminin A chain represents a binding site for the $\alpha_3\beta_1$ integrin. *J Cell Biol* 117: 449-459, 1992
- 43) 平澤路生, 四十坊典晴, 犬塚 学, 阿部庄作. 肺癌におけるインテグリンの発現と細胞外基質および血管内皮細胞への接着能. *日本臨床* 53: 1660-1665, 1995
- 44) Bazzoni G, Shih DT, Buck CA, Hemler ME. Monoclonal antibody 9EG7 defines a novel β_1 integrin epitope induced by soluble ligand and manganese, but inhibited by calcium. *J Biol Chem* 270: 25570-25577, 1995
- 45) Aznavoorian S, Stracke ML, Parsons J, McClanahan J, Liotta LA. Integrin $\alpha_v\beta_3$ mediates chemotactic and haptotactic motility in human melanoma cells through different signaling pathways. *J Biol Chem* 271: 3247-3254, 1996

Inhibitory Effect of AG-2000, Activated Lansoprazole on Peritoneal Seeding of AsPC-1 carcinoma Hidehiro Tajima, Department of Surgery (II), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 — J. Juzen Med Soc., 107, 144 — 153 (1998)

Key words activated lansoprazole, integrins, SH groups, adhesion, peritoneal dissemination

Abstract

Integrins are heterodimers consisting of α - and β - subunits which play an important role in tumor metastasis. Extracellular domains of the β -subunit contain four-fold cysteine-rich repeats containing up to 60 cysteine residues and integrins folded into a homologous tertiary structure. This precise structure is essential for integrin function. Activated lansoprazole (AG-2000) exhibits the appropriate chemical characteristics to react on the SH groups which constitute cysteine on the cell surface without being incorporated into the intracellular space. AG-2000 is therefore a candidate for causing deteriorated integrin function. This study was designed to examine whether AG-2000 inhibits the adhesion of anchorage-dependent AsPC-1 carcinoma cells to the extracellular matrix. <Experiment 1> The carcinoma cells were incubated for 60 minutes in RPMI-1640 media containing AG-2000 at concentrations of 0, 1, 10, 100, 500 and 1000 μ M, respectively. Then the cells were tested on laminin, fibronectin and collagen-IV. The ratio of cells adhering to each type of extracellular matrix 12 hours later was found to decrease in parallel to the increasing concentration of AG-2000 ($p < 0.01$). <Experiment 2> Carcinoma cells adherent to laminin, fibronectin and collagen IV were reacted for 60 minutes with AG 2000 at concentrations of 0, 1, 10, 100, 500 and 1000 μ M, respectively. No morphological changes were detected in the cells 0, 24 and 48 hours later. The numbers of adherent cells in the samples treated with AG-2000 at concentrations of 500 and 1000 μ M, were found to be remarkably reduced 72, 96 and 120 hours later ($p < 0.01$). Follow-up microscopy and electron-microscopy of cells floating in the supernatant showed apoptosis. <Experiment 3> 1×10^6 carcinoma cells were injected into the peritoneal cavities of nude mice. Every nude mouse in the control group ($n = 10$) died within 8 weeks with multiple peritoneal implantation (100% incidence). By contrast, in the 10 mice injected with AG-2000 treated carcinoma cells, only one died prematurely, and autopsy at the end of the 8 weeks span of the experiment found only 3 cases of peritoneal implantation, the premature mortality inclusive (30%=reduced incidence) ($p < 0.01$). Conclusively AG-2000 inhibited the carcinoma cells from adhering to extracellular matrix components both *in vitro* and *in vivo*. These observations suggest that intraperitoneal administration of AG-2000 may prevent peritoneal seeding in patients with gastrointestinal carcinomas.