

病 態 生 化 学 部 門

教 授	済 木 育 夫	(医学博士)
助教授	中 島 松 一	(医学博士)
助 手	村 田 純	(理学博士)
技 官	林 和 子	

病態生化学部門は病態の生化学的研究を行うとともに、和漢薬を含む種々の薬物の病態に及ぼす効果を生化学的、免疫学的、あるいは遺伝学的に研究することを目的としている。和漢薬を中心に、構造の明かにされた成分あるいは化合物を用いて、種々の病態（癌、アレルギーなどの疾患）に有効な薬物の探索とその作用機序を分子レベルで解明する。また、「証」といわれる病態変化を遺伝子工学的、免疫学的手法等を駆使してその遺伝的背景を解析し、薬物の効果発現との関連性からその科学的基盤を解明する。

I. 癌および癌転移の抑止に関する基礎的研究

- 1) 癌および癌転移の抑制物質の探索（伝統薬物を中心に）
- 2) 癌の悪性化・進展モデルの確立とその分子機序の解析
- 3) 癌ワクチンを指向した免疫遺伝療法の開発と免疫力増強物質の検索
- 4) 同所移植性転移モデルにおける転移の臓器特異（選択）性とその機序の解析
- 5) 細胞接着の制御に基づく浸潤・転移の抑制
- 6) 基底膜分解酵素の転写・産生・分解レベルでの阻害物質の探索

II. 免疫抑制に関する基礎的研究

- 1) アレルギー性／炎症性疾患モデルの確立と有効物質（抑制／増強）の探索
- 2) マクロファージによる臓器移植片および癌細胞の排除機構に関する研究
- 3) 免疫応答調節機構解明と和漢薬への応用

III. 細胞の機能制御とシグナル伝達機構の解析

- 1) 自己分泌型運動因子の特性とそのレセプターの解析
- 2) 細胞運動と細胞内調節分子の関連性の解析
- 3) 神経ペプチドによる細胞浸潤の制御と細胞内機能分子の関与

◇ 原 著

- 1) Oku N., Tokudome Y., Koike C., Okada S., Nishikawa N., Mori H. and Saiki I. : Effective inhibition of metastasis by liposomal Arg-Gly-Asp analogs. *Drug Delivery System*, 12 (1) : 13-18, 1997 (in Japanese).

L-arginine-L-glycine-L-aspartic acid (RGD) sequence, originally found in fibronectin, one of

main component of extracellular matrices, is known as a ligand to some adhesion molecules.

Since the interaction of metastatic tumor cells with target endothelium and extracellular matrices under it, is important for establishment of blood-borne metastasis, analogs of the peptide have been developed for the suppression of tumor metastasis. In fact, some synthetic peptides having the RGD

sequence have been found to decrease metastatic colonization. To enhance the metastasis-suppressing efficacy of these analogs, we attempted to stabilize and to prolong the circulation time of these analogs by liposomalization.

Various structures of hydrophobized-RGD analogs (lipophilic antimetastatic peptides, LAPs) were synthesized, and incorporated into liposomes. Liposomes composed of distearoylphosphatidylcholine, cholesterol, dipalmitoylphosphatidylglycerol and LAPs were injected intravenously with B16BL6 murine melanoma cells into mice. Liposomal RGD ($0.6 \mu\text{mol}$ of the analog equivalent to ca. $200 \mu\text{g}$ RGD peptides) inhibited lung colonization up to 76%. This dose is an order of magnitude lower than that for comparable inhibition reported for free RGD. Multi-dose administration of LAP-liposomes ($0.15 \mu\text{mol}$ of the analog equivalent to ca. $50 \mu\text{g}$ RGD peptides) also inhibited the spontaneous lung metastasis of cells from a primary tumor site of B16BL6 cells subcutaneously implanted into the footpad of mice.

In conclusion, liposomal RGD may be useful for the suppression of tumor metastasis.

2) Ohnishi Y., Sakamoto T., Fujii H., Kimura F., Murata J., Tazawa K., Fujimaki M., Sato Y., Kondo M., Une Y., Uchino J. and Saiki I: Characterization of liver metastatic variant

of murine colon 26 carcinoma cells. *Tumor Biology*, 18 : 113-122, 1997.

Intraportal vein injection of highly metastatic L5 cells consistently resulted in liver metastases (increases in the number of tumor colonies in the liver), whereas inoculation of P cells rarely did (Fig. 1). L5 cells invaded the basement membrane Matrigel in greater numbers than did P cells, suggesting that metastatic potential of L5 cells is partly related to enhanced invasive properties. The enhanced adhesion of L5 cells to fibronectin-, laminin- and Matrigel-coated substrates, as well as their haptotactic migration to fibronectin, may be associated with the preferential expression of VLA-2 and VLA-4 integrins on the surface of these cells detected by flow cytometry. Gelatin zymography showed that the degradative activity of 72-kDa gelatinases was greater in L5 cells than P cells. These results indicate that the invasive ability of L5 cells may be also due to enhanced gelatinolytic activity as well as adhesiveness and motility. L5 cells grew *in vitro* more rapidly than P cells. Thus, an experimental model using highly metastatic colon 26 L5 cells would be useful for analyzing the molecular mechanism of liver metastasis and for evaluating the efficacy of treatment of occult micrometastasis which may have been already disseminated at the time of surgery.

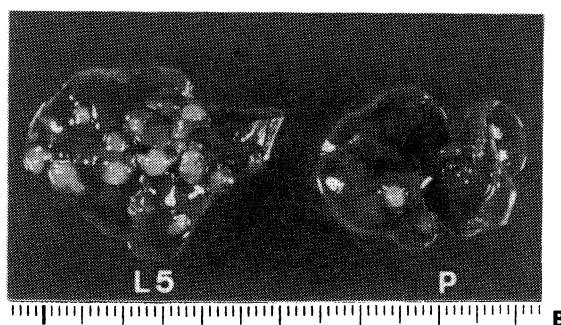
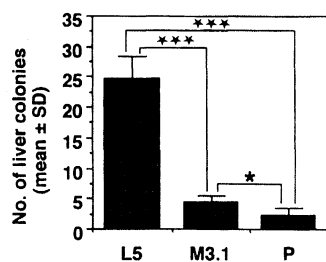


Fig. 1 Experimental liver metasyasis by L5, M3.1 and P carcinoma cells. Five BALB/c mice per group were inoculated with an intraportal vein injection of L5, M3.1 and P cells (1×10^4). Twenty days after tumor inoculation, the mice were killed and the number of liver colonies was manually counted (A).

* $p < 0.05$ compared with the group inoculated with P cells ; *** $p < 0.001$ compared with the group injected with M3.1 and P cells by Student's two-tailed t-test. Macroscopic observations of liver metastases by L5 and P cells 20 days after tumor inoculation (B).

- 3) Oku N., Koike C., Tokudome Y., Okada S., Nishikawa N., Tsukada H., Kiso M., Hasegawa A., Fujii H., Murata J. and Saiki I.: Application of liposomes for cancer metastasis. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 24: 215–223, 1997.

Metastasis is established by a complex cascade of activities, and adhesion of tumor cells to endothelia or to extracellular matrix is one of the critical steps in the metastatic cascade. Therefore, agents that suppress such interaction may serve as anti-metastatic drugs. We previously established a non-invasive method to determine metastatic tumor cell trafficking by use of positron emission tomography (PET). In this method, positron-labeled metastatic cells are injected into bloodstream to determine tumor cell biodistribution in real-time from immediately after injection in a living animal. Here, to elucidate the involvement of cellular surface adhesion molecules in metastatic process, we investigated the effect of liposomalized sialyl Lewis X (sLe^x) as well as L-arginine-L-glycine-L-aspartic acid (RGD)-related peptide on the trafficking of B16BL6 melanoma cells and on metastatic potential. The trafficking of B16BL6 cells after injection into the tail vein was highly affected by liposomal sLe^x, but only little by RGD-related peptide, suggesting that the adhesion of metastatic cells to the target is initially mediated via selectin, and integrin-mediated adhesion may occur the later stages.

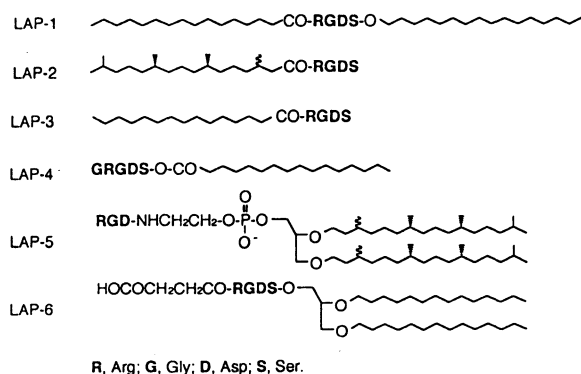


Fig. 2 Structure of hydrophobized RGD (from Ref. [10]).

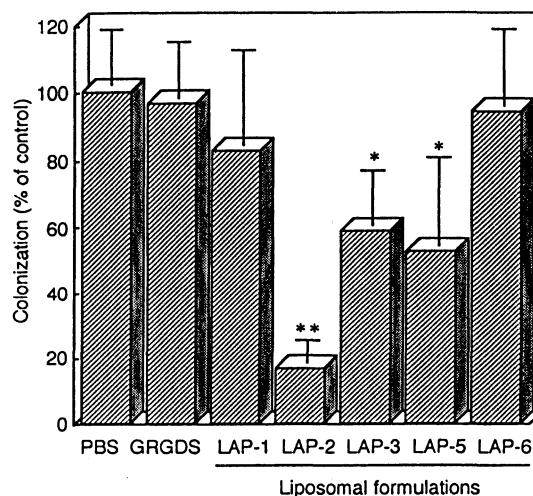


Fig. 3 Effect of liposomal RGD on experimental lung metastasis. Liposomal RGD (0.6 μ mol RGD derivative equivalent to ca. 200 μ g as RGD moiety/mouse) as well as free GRGDS were co-injected with B16BL6 cells (1×10^5 cells/mouse) into a tail vein of male mice ($n=5$). At day 14, the mice were sacrificed under anesthesia, and the metastatic colonies in lungs were examined. Colony numbers are expressed as percent of control and S.D., where the colony number of control was 94.8 ± 14.9 . * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. PBS control. (from Ref. [10]).

Furthermore, liposomal sLe^x suppressed experimental metastasis suggesting that adhesion via selectin is an important step for metastasis. Next, to enhance the metastasis-suppressing efficacy, liposomalization of RGD was attempted, since RGD-related peptides have been found to suppress metastasis. Various structures of RGD analogs grafted to hydrophobic groups were synthesized and then incorporated into liposomes (Fig. 2). Some liposomalized RGD markedly inhibited lung colonization at the concentration of an order of magnitude lower than that for comparable inhibition reported for free RGD (Fig. 3). The present study indicates that liposomal application is useful for both clarifying the mechanism of metastasis and the development of anti-metastatic pharmaceuticals.

- 4) Saito K., Oku T., Ata N., Miyashiro H., Hattori M. and Saiki I.: A modified and convenient method for assessing tumor cell invasion and migration and its application to

screening for inhibitors. *Biol. Pharm. Bull.*, 20 (4) : 345-348, 1997.

In order to screen potent inhibitors of tumor invasion and metastasis, we here devised a simple and reproducible *in vitro* assay for tumor invasion and migration. A conventional cell-counting assay using a Transwell chamber with a microporous membrane filter is troublesome and time-consuming, involving visually counting the cells under a microscope, and the invaded or migrated cells are sometimes distributed unevenly in predetermined fields on the lower surface of the filter. Therefore, it is difficult to evaluate the invasive and migratory abilities of tumor cells easily and quantitatively by the cell counting method. In the present study, crystal violet dye was used for staining the invaded cells and colorimetrically assessing the invasive ability per filter as an absorbance. In this crystal violet assay, tumor cell invasion into a reconstituted basement membrane Matrigel was proportional to both the cell number added into the chamber and the incubation period, and inversely proportional to the amount of Matrigel barrier on the upper surface

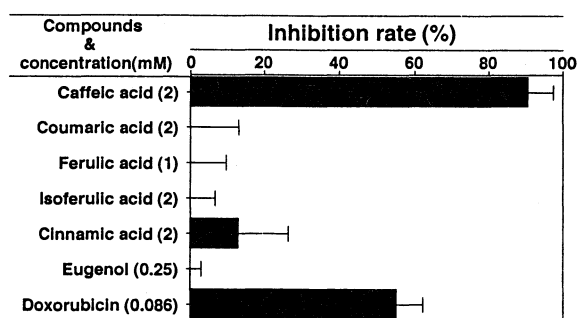


Fig. 4 Effect of Caffelic Acid and Its Related Compounds on the Invasion of HT-1080 Cells in the Crystal Violet Assay

The invasive activity of HT-1080 cells was assayed in Transwell chambers, as shown in Fig. 3. HT-1080 cells (2.5×10^4 cells/0.1 ml) were added into the upper compartment of the chamber and incubated with or without caffeic acid, its related compounds or DOX for 4 h at 37°C. The numbers of invaded cells were assessed by the crystal violet assay method, as shown in Fig. 1. The data were expressed as the mean \pm S.D. of triplicate cultures.

of filter. The results obtained by this dye-uptake method were highly consistent with those of a conventional cell-counting assay. Using this crystal violet assay, the anti-invasive effect of doxorubicin (DOX) was detected more easily and found to be highly proportional to that by the conventional cell-counting method. We therefore applied this convenient assay method to screen anti-invasive and anti-metastatic compounds. As a result, caffeic acid was found to be more active in the inhibition of both tumor cell invasion and migration without showing direct cytotoxicity *in vitro* than other related compounds (Fig. 4).

5) Ogasawara M., Murata J., Ayukawa K. and Saiki I: Differential effect of intestinal neuropeptides on invasion and migration of colon carcinoma cells in vitro. *Cancer Letters*, 119: 125-130, 1997.

We investigated the effect of neuropeptides, which are vasoactive intestinal polypeptide (VIP), substance P (SP), neuropeptide Y (NPY), neurokinin A (NKA), somatostatin (SOM), calcitonin gene-related peptide (CGRP), and leucine-enkephalin (L-ENK), on the invasion of murine Colon 26-L5 adenocarcinoma cells through a reconstituted basement membrane (Matrigel) using a Transwell cell culture chamber assay. VIP, SP, NPY, and L-ENK reduced invasive potential of tumor cells in a concentration-dependent manner, whereas SOM, CGRP, and NKA had no effect (Fig. 5). Especially, VIP showed the most effective in inhibiting tumor invasion, and achieved 50 % reduction at 10^{-6} M. A similar effect by VIP was also observed in cell migration to fibronectin. VIP had no effect on the growth of tumor cells at the concentrations ranging from 10^{-10} to 10^{-6} M. The suppressed ability of the tumor cell motility by VIP (10^{-6} M) was practically recovered by co-treatment with 2',5'-dideoxy-adenosine, an adenylate cyclase inhibitor. These results indicate that VIP, among the neuropeptides used, could inhibit Matrigel invasion of Colon 26-L5 carcinoma cells through partial suppression of their motility, and the reduction was associated with an intracellular cAMP-mediated pathway.

6) Oku T., Ata N., Yonezawa K., Tokai H., Fujii H., Shinagawa A., Iwata K. and Saiki I.:

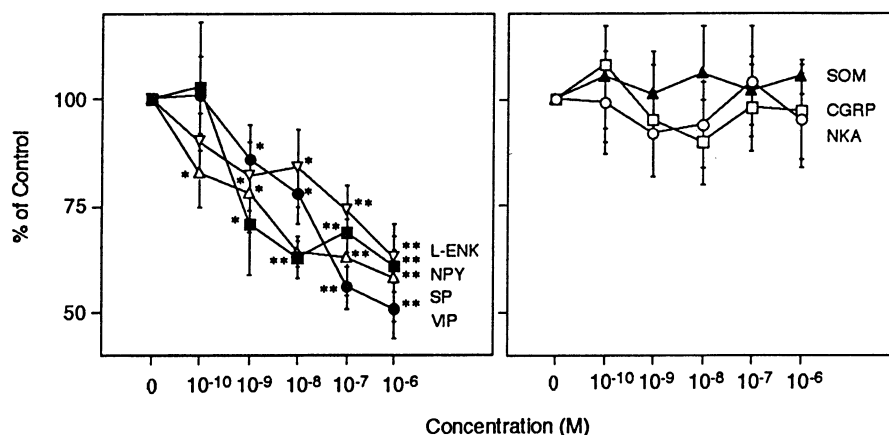


Fig. 5 Effect of neuropeptides on invasion of Matrigel by Colon 26-L5 cells. Colon 26-L5 cells (1×10^5) were pretreated with various concentrations of neuropeptides for 30 min on ice. The cells were seeded onto the filters precoated with $10 \mu\text{g}$ Matrigel on the upper surface and $1 \mu\text{g}$ fibronectin on the lower surface in the presence or absence of neuropeptides in the Transwell chambers. After a 6-h incubation, the cells invading to the lower surface were visually counted. Mean number of invaded cells 111 for control. ●, VIP; △, SP; ■, NPY; ▽, L-ENK; ▲, SOM; □, CGRP; ○, NKA. Experiments were repeated three times separately, and typical data are represented. Values are indicated as mean \pm S.D.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Antimetastatic and antitumor effect of a recombinant human tissue inhibitor of metallo-proteinases-2 in murine melanoma models.

Biol. Pharm. Bull., 20 (8) : 843-849, 1997.

Tumor metastasis into distinct organs and tissues, of which many patients with malignancies died, is regulated in multisteps. As one of the main causes of metastasis, the imbalance between the degradative activities of matrix metalloproteinases (MMPs) and their specific inhibitors in host, including tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs), is well documented. Using a murine metastasis model, in which highly metastatic B16-BL6 melanoma cells were i.v. inoculated into syngeneic C57BL/6 mice, administrations of recombinant human TIMP-2 (r-hTIMP-2) once a day on days -1 to 3 postimplantation significantly inhibited the formation of metastatic foci in lungs. The antimetastatic effect of r-hTIMP-2 was detected irrespective of administrating routes [i.v., i.p., s.c., and i.m. routes] and in a dose-dependent manner (Fig. 6). The i.m. injections of r-hTIMP-2 at 2-day intervals during the early phase after tumor inoculation are suggested to be sufficient for antimetas-

tasis. In another model using spontaneously metastasizing B16-BL6 cells, multiple injections of r-hTIMP-2 also resulted in the reduced number of pulmonary metastases. In addition to these antimetastatic effects, a slightly inhibitory effect on the tumor cell growth was observed *in vitro* and *in vivo*. In conclusion, the antimetastasis by r-hTIMP-2 may be due to the inhibition of the degradation of extracellular matrix by MMPs and to the suppression of the tumor cell growth.

7) Saiki I. : Review : Cell adhesion molecules and cancer metastasis. *Jpn. J. Pharmacol.*, 75 (3) : 215-242, 1997.

The adhesive interaction between tumor cells and host cells or the extracellular matrix (ECM) plays a crucial role in metastasis formation. Therefore, understanding the mechanism controlling metastasis may assist in the development of antimetastatic therapy. We have used synthetic or recombinant polypeptide analogues containing the Arg-Gly-Asp (RGD) sequence found in the functional domains of fibronectin, such as poly(RGD) or CH-271, to regulate the mechanisms involved in cell adhesion during the metastatic process. Poly (RGD)

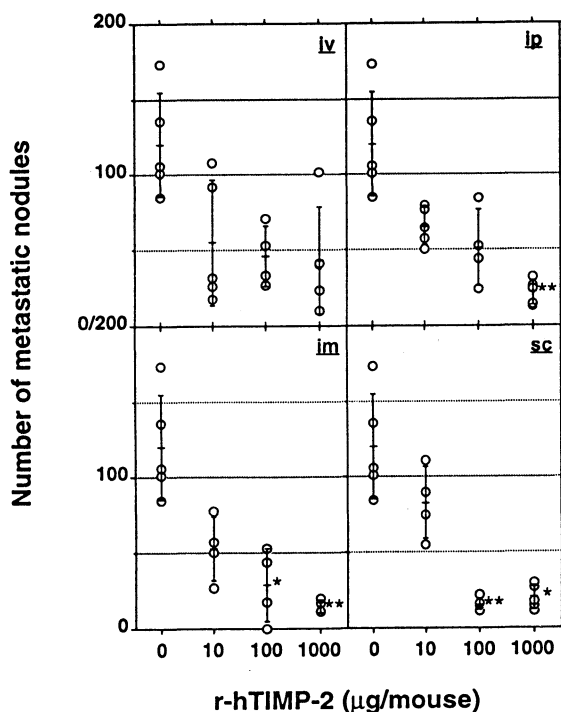


Fig. 6 Effect of r-hTIMP-2 on Lung Metastasis of i.v.-Inoculated B16-BL6 Cells

B16-BL6 cells (1×10^4 cells/0.1 ml) were implanted into a mouse tail vein and r-hTIMP-2 was given parenterally once a day on days -1 to 3 after tumor inoculation via an i.v.-route. The untreated mice served as the control. Mice were sacrificed and the number of metastatic nodules on the lung surface was counted on day 14 after the tumor inoculation. The symbols (\circ and $+$) represent the individual numbers of pulmonary metastases and the averages of the treatment groups with S.D. ($n=4-5$), respectively. All the data were statistically analyzed using Kruskal-Wallis/Dunn tests:

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ vs. the control group.

inhibited experimental lung and liver metastasis effectively when coinjected i.v. with various types of tumors. In a model of spontaneous lung metastasis using the B16-BL6 melanoma, repeated administration of this polypeptide before or after surgical excision of the primary tumor resulted in a significant inhibition of tumor metastasis without affecting the growth of the primary tumor, and substantially prolonged the survival time of mice. The mechanism responsible for the inhibition of tumor metastasis by the polypeptides is at least partly associated with the ability to interfere with cellular

functions such as adhesiveness, motility and invasiveness in the process of metastasis. Combined treatment of the CH-271 fusion polypeptide and anticancer drugs, *i.e.* anti-adhesion therapy combined with chemotherapy, caused a marked inhibition of lung and liver metastasis of tumors as compared with either treatment alone or with the control. In contrast, the promotion of tumor cell interaction with immune cells via cell adhesion molecules, which differs from the anti-adhesive mechanism, may lead to the induction of anti-tumor immune responses and, consequently, to the inhibition of tumor metastasis. The transfection of the gene of B7-1 adhesion molecule into tumor cells (B16-BL6 or K1735-M2 melanoma) resulted in the remarkable reduction of lung metastasis caused by the i.v. injection into mice. Immunization of B7-transfected tumor was effective as a tumor vaccine for preventing the metastasis of B7 negative original tumor cells. Thus, the regulation of the adhesive interaction with tumor cells may provide a new and promising approach for the control and prevention of cancer metastasis.

8) Wakabayashi C., Hasegawa H., Murata J. and Saiki I.: *In vivo* anti-metastatic action of ginseng protopanaxadiol saponins is based on their intestinal bacterial metabolites after oral administration. *Oncol. Res*, 9: 411-417, 1997.

The present study demonstrated *in vivo* and *in vitro* anti-metastatic activities of a major intestinal bacterial metabolite M1 formed from protopanaxadiol saponins of Ginseng (the root of *Panax ginseng* C. A. Meyer) in comparison with its whole standardized extract and ginsenosides Rb₁, Rb₂, and Rc (Fig. 7). Although Ginseng extract (1 mg/mouse) and ginsenosides (0.5 mg/mouse) significantly inhibited lung metastasis produced by i. v. injection of B16-BL6 melanoma cells in syngeneic mice (27-61 % of untreated control), they hardly inhibited the invasion and migration of B16-BL6 melanoma and HT1080 fibrosarcoma cells *in vitro*. However the intestinal bacterial metabolite M1 inhibited lung metastasis of melanoma cells and *in vitro* tumor cell invasion and migration at non-toxic or marginally toxic concentrations. Addition-

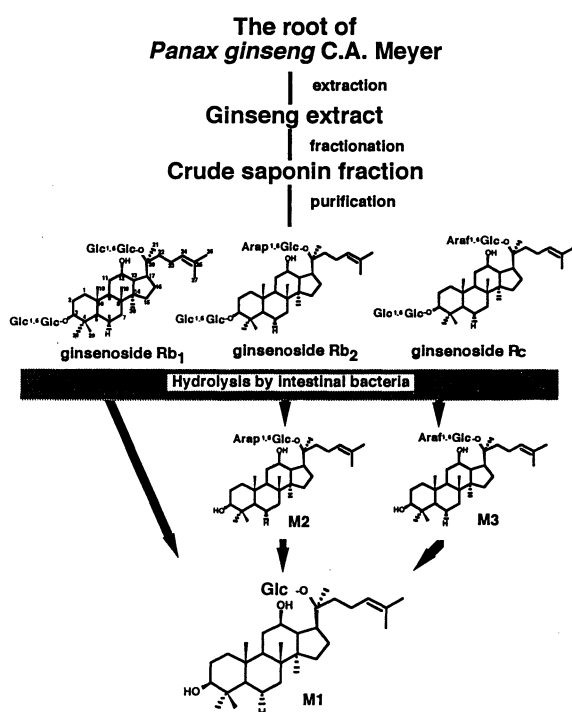


Fig. 7 Isolation and chemical structure of ginsenosides and their metabolite. Glc, β -D-glucopyranosyl; Arap, α -L-arabinopyranosyl; Araf, α -L-arabinofuranosyl.

ally, pharmacokinetic studies of ginsenoside Rb₁ and M1 after oral administration (2 mg/mouse) revealed that intact Rb₁ was not detectable in serum for 24 h by HPLC analysis, whereas the level of M1 in the serum reached maximum at 8 h ($8.5 \pm 0.4 \mu\text{g/ml}$) after Rb₁ administration and at 2 h ($10.3 \pm 1.0 \mu\text{g/ml}$) after M1 administration. These findings suggest that the *in vivo* anti-metastatic effect by oral administration of ginsenosides is mediated by their metabolic component M1.

◇ 学会報告等

- 1) 済木育夫：癌の悪性化進展と十全大補湯，平成8年度北陸地区漢方症例報告会，1997，3，23，富山。
- 2) 済木育夫：衛生化学部会シンポジウム「病態と酵素-プロテアーゼとインヒビター」癌の浸潤・転移における膜結合型アミノペプチダーゼ N (CD13) の役割，日本薬学会第117年会，1997，3，26-28，東京。

癌細胞が，組織構成成分（フィブロネクチン，ラミニン，コラーゲン，ヘパラン硫酸など）に接着した後，

種々の癌細胞由来のプロテオグリカン分解酵素あるいはタンパク分解酵素により破壊を受け，その結果癌細胞の移動・浸潤が起こる。また，細胞外マトリックスや基底膜と癌細胞との相互作用は癌細胞由来の分解酵素の産生や活性化の調節・制御に深く関係している。従って，種々の酵素の産生や活性を阻害あるいは制御することにより，癌細胞の浸潤・転移のカスケードのいくつかの段階に影響を与えることが可能であるかも知れない。

アミノペプチダーゼ (APase) の阻害剤であるベスタチン (BS) が，癌細胞由来の IV 型コラーゲナーゼ活性を阻害すること，その結果として，再構成基底膜（マトリジェル）への転移性癌細胞の浸潤を抑制することを明らかにした。さらに，アミノペプチダーゼの1つである膜結合型アミノペプチダーゼ N (APaseN/CD13) に着目し，抗 CD13 抗体 (WM15) を用いて癌細胞の浸潤・転移における APaseN/CD13 の役割について解析した。APaseN/CD13 を発現し APase 活性を示すヒト腎臓癌細胞株 SN12M を含む3種の転移性癌細胞のマトリジェルへの浸潤は，BS 及び抗 CD13 抗体によって濃度依存的に抑制された。一方，細胞外マトリックス成分への癌細胞の接着能や運動・移動能には BS 及び抗 CD13 抗体の影響は観察されなかった。抗 CD13 抗体は BS と同様に癌細胞の APase 活性及び IV 型コラーゲナーゼ活性を濃度に依存して阻害した。癌細胞がマトリジェル内へ浸潤する際に浸潤先端 (invasion edge, *invadopodia*) に APaseN/CD13 が局在していた。また，ヒト癌細胞に APaseN/CD13 遺伝子を導入し高発現させることにより，*in vitro* の基底膜浸潤および IV 型コラーゲンの分解活性が促進した。この遺伝子導入ヒト癌細胞をヌードマウスに移植することにより，対照の癌細胞に比較して有意に肺への転移が増強されることが明かとなった。

以上の結果から，APaseN/CD13 は癌細胞の浸潤時の微小環境下において，効率的に細胞外マトリックスの分解，IV 型コラーゲナーゼの活性化などに関与していることが考えられ，その重要性が示唆された。アミノペプチダーゼのインヒビターであるベスタチンはマウスの転移性癌細胞 (B16-BL6 メラノーマあるいは3LL 肺癌) の転移を抑制した成績から，酵素阻害に基づく浸潤抑制がその機序の一つであると考えられる。

- 3) 長尾則男，中山朋子，江藤哲也，羽田実代，三羽信比古，済木育夫，宮崎香，正札研一，伊東 忍，小方英二：アスコルビン酸の細胞機能 VII：癌浸潤・転移の抑制効果，日本薬学会第117年会，1997，3，26-28，東京。

- 4) 西川尚之, 駒澤宏幸, 小島政芳, 伊藤 勇, 東 市郎, 藤猪英樹, 済木育夫: RGD の部分レトロおよび部分レトロ逆転ペプチドの合成と生物活性, 日本化学会第72春季年会, 1997, 3, 27-30, 東京.
 - 5) 済木育夫: シンポジウム「がんの浸潤・転移研究手法に関する最近の進歩」癌の浸潤・転移研究への培養細胞を用いたアプローチ, 第6回がん転移研究会総会, 1997, 4, 3-4, 広島.
 - 6) 鮎川幸一, 村田 純, 済木育夫: マウスに移植された B16-BL6 メラノーマの原発巣及び肺転移における α -MSH の機能解析, 第6回がん転移研究会総会, 1997, 4, 3-4, 広島.
- 【目的】我々は, 昨年の本学会等で神経ペプチド α -MSH (α -Melanocyte Stimulating Hormone) が, メラノーマ細胞に対し, 基底膜浸潤, 特に運動性を著明に阻害することにより, 肺転移を抑制する可能性を報告した. 組織においてはすでに高転移性メラノーマ細胞の浸潤端に α -MSH の発現が明らかにされている. 今回, メラノーマ細胞の浸潤・転移における α -MSH の効果を, 特に原発腫瘍局所に着目して高転移性の B16-BL6 マウスメラノーマを用いて検討した.
- 【方法, 結果】 α -MSH は B16-BL6 細胞の自然肺転移を阻害し, 腫瘍移植後翌日から隔日に 50 pmol を合計 8 回投与した群で 70 % の抑制効果を示した. また, α -MSH の receptor antagonist H-D-W-R-W-D-F-K を上記と同様の方法で投与した結果, BL6 の自然肺転移を 3 倍に促進した. マウスから角化細胞を単離しその培養上清を用いて癌細胞の接触走化性 (haptotaxis) を検討した結果, BL6 細胞の fibronectin 基質への移動を 60 % 以上阻害した. α -MSH の receptor antagonist は, 今回実験に用いた何れの濃度においても, 癌細胞の増殖に影響を与えなかった.
- 【考察】担癌マウスでは, 生理的な α -MSH が高転移性の B16-BL6 細胞の自然肺転移及び基底膜浸潤を抑制し, 特に, 局所において α -MSH が正常細胞から自己防衛的にメラノーマ細胞に対し分泌されている可能性が示唆された.
- 7) 大西康晴, 藤猪英樹, 木村文成, 早川芳弘, 作川理恵子, 村田 純, 坂本 隆, 田沢賢次, 藤巻雅夫, 佐藤裕二, 近藤正男, 宇根良衛, 内野純一, 済木育夫: 十全大補湯の肝転移抑制効果, 第6回がん転移研究会総会, 1997, 4, 3-4, 広島.
 - 8) 藤猪英樹, 駒澤宏幸, 西川尚之, 織笠 敦, 伊藤勇, 東 市郎, 済木育夫: RGD 疑似ペプチドを用いた癌転移・浸潤の阻止効果, 第6回がん転移研究会総会, 1997, 4, 3-4, 広島.

細胞接着性 RGD ペプチドの血中でのプロテアーゼ耐性を獲得する目的で, アルギニンとグリシンの間のアミド結合を反転させた, すなわちアルギニン側鎖が天然型 RGD と同じ方向に出ているレトロ逆転型と, 側鎖が逆に出ているレトロ型疑似ペプチドを作成し, 癌転移, 浸潤におよぼす効果を検討した. その結果, レトロ逆転型, レトロ型のいずれの異性体も RGDS に比べて B16-BL6 メラノーマ細胞, Colon 26 M3.1 結腸癌の実験的肺転移を, L5178Y-ML25 の実験的肝転移を著明に抑制し, その効果は用量依存的であった. さらに, レトロ疑似ペプチドの頻回の静脈内投与は, 対照群に比べて B16-BL6 メラノーマ細胞の自然肺転移も有意に抑制した. また, レトロ疑似ペプチドは *in vitro* における基底膜再構成基質 (マトリジェル) への癌細胞の浸潤に対しても用量依存的な抑制効果を示し, さらに, レトロ疑似ペプチドはヒト血漿中のプロテアーゼに対する耐性を獲得し, RGDS ペプチドの 80 % が分解される6時間後においても, ほとんど分解されなかった.

以上の結果より, RGD ペプチドの Arg-Gly 結合を反転させることにより, 高いプロテアーゼ耐性を獲得すると共に, 種々の転移性癌細胞の転移, 浸潤を, より強く抑制することが明かとなった.

- 9) 松岡 翼, 鄭 容錫, 八代正和, 西村重彦, 井上透, 富士原知史, 澤田鉄二, 仲田文造, 前田 清, 済木育夫, 曾和融生: 胃癌腹膜播種性転移形成に対する各種接着ペプチドの予防効果, 第6回がん転移研究会総会, 1997, 4, 3-4, 広島.
- 10) 小笠原 勝, 村田 純, 済木育夫: マウス Colon26-L5 結腸癌細胞の肝転移に及ぼす神経ペプチド VIP の抑制効果とその作用機序の解析, 第6回がん転移研究会総会, 1997, 4, 3-4, 広島.

【目的】神経ペプチド VIP (Vasoactive Intestinal Polypeptide) は中枢および末梢神経より分泌され, 神経伝達物質としての役割を担っている. 生体内においては結腸にその存在が最も多く認められ, その生理活性としては, 血管拡張および腸管平滑筋の弛緩, 腸上皮細胞からの水分分泌の促進などが知られている. 最近, VIP がアンドロゲン依存性前立腺癌細胞の浸潤能を高めることが報告された. しかし, 結腸癌細胞の浸潤に対する VIP の影響は知られていない. そこで, 今回我々は, 結腸癌細胞 (Colon26-L5) の浸潤, 転移における VIP の効果を検討した.

【方法, 結果】 VIP は Colon26-L5 細胞の Matrigel (再構成基底膜) への浸潤を濃度依存的に阻害し, その抑制率は 10^{-6} M において約 50 % であった. この抑制

機序を検討した結果、VIP は L5 細胞の fibronectin 基質に対する接触移動 (haptotaxis) を浸潤における場合と同程度抑制した。同様の阻害効果は laminin 基質への移動においても認められた。一方、VIP は L5 細胞の Matrigel および fibronectin, laminin 基質への接着、さらに TypeIV Collagenase の産生およびその酵素活性には影響しなかった。また VIP は L5 細胞の増殖に対しても影響を与えなかった。VIP (500pmol) と L5 細胞を同時にマウス門脈内に投与した場合、実験的肝転移は有意に抑制された。同様の結果は実験的肺転移においても認められた。

【考察】VIP は Colon26-L5 細胞の基底膜浸潤、特に運動性を強く阻害することにより、転移を抑制する可能性が示唆された。

11) 済木育夫：特別講演：細胞接着の制御と癌転移の抑止，第10回富山癌治療懇話会，1997，5，23.

12) 大西康晴，藤猪英樹，木村文成，早川芳弘，作川理恵子，村田 純，坂本 隆，田沢賢次，藤巻雅夫，済木育夫：マウス結腸癌肝転移モデルにおける十全大補湯の転移抑制効果，第18回癌免疫外科研究会，1997，5，28-29，岐阜。

【目的】我々はこれまでに、マウス退縮型癌細胞の増殖型への変換を、漢方薬である十全大補湯の経口投与により抑制できることを報告してきた。今回、マウス Colon26 結腸癌高肝転移株 (L5) による転移モデルを用いて、十全大補湯の転移抑制効果を検討したので報告する。

【方法・結果】(1) BALB/c マウスを開腹し、L5 を門脈内注入することによる実験的肝転移モデルにおいて、十全大補湯 (4, 20, 40 mg/day) を腫瘍接種前の7日間経口投与した。また、control として腫瘍接種後1, 8日目に CDDP (80 μ g) を静脈内投与した。腫瘍移植後19日目に犠牲解剖した結果、十全大補湯投与群は用量依存的に肝転移結節数および肝重量の減少を示し、CDDP 投与群でみられた副作用 (体重減少) は認められなかった。(2) 十全大補湯 (40 mg/day) 経口投与群では、対照群に比較して有意に生存期間の延長が観察された。(3) 本モデルにおいて、腫瘍接種前日に抗 asialo GM1 抗体あるいは 2-chloroadenosine を静脈内投与した。その結果、NK 細胞を除去した群で、十全大補湯の腫瘍接種前投与により対照群に比較して有意な肝転移抑制が観察されたが、macrophage を除去した群では転移抑制効果は認められなかった。

【結語】十全大補湯の経口投与により、L5 の実験的肝転移が著明に抑制され、その効果は用量依存的であった。十全大補湯による転移抑制の機序として、macro-

phage が関係していることが示された。十全大補湯は原発巣の外科切除後の微小肝転移の予防に有用であると考えられる。

13) 大西康晴，藤猪英樹，村田 純，坂本 隆，田沢賢次，藤巻雅夫，済木育夫：シンポジウム 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」細胞接着阻害擬似ペプチドによる抗接着療法 of 癌転移におよぼす効果，第50回日本消化器外科学会，1997，7，17-18，横浜。

【目的】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等に見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 (抗接着療法)。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。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・結果】FC-336 を用いて、数種の転移性癌細胞による実験的転移について転移阻止効果を検討した。その結果、腫瘍移入時における FC-336 の静脈内同時投与は、RGDS に比べて B16-BL6 メラノーマ細胞および Colon26M3.1 結腸癌の実験的肺転移と L5178Y-ML25 リンパ種の実験的肝転移を著明に抑制し、その効果は用量依存的であった。消化器癌の血行性転移に比較的近いモデルとして樹立された Colon26 結腸癌高肝転移株 (L5) の門脈内接種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頻回の静脈内投与により、対照群に比べて著明な転移抑制と有意な生存期間の延長がみられた。*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、用量依存的な抑制効果を示したが、その抑制効果は RGDS と同程度であった。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 matrix metalloproteinases (MMP-2, -9) によるゼラチン基質の酵素的破壊を抑制した。

【考察】以上の結果より、従来の抗接着抑制作用に加え、癌細胞が産生する MMP によるゼラチン基質の酵素的破壊を抑制する作用を有する新規擬似ペプチド (FC-336) は、種々の転移性癌細胞の転移・浸潤をより強力に抑制することが明かとなった。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。

- 14) 李 貞範, 林 利光, 三川 潮, 林 京子, 三嶋 敬章, 村田 純, 済木育夫, 前田昌徹: 藍藻スピルリナ *spirulina platensis* 由来硫酸化多糖, カルシウムスピランの構造と癌転移抑制作用, 第11回天然薬物の開発と応用シンポジウム, 1997, 81-2, 東京.
- 15) 済木育夫: 特別講演 1 「十全大補湯による癌の悪性化進展および転移の抑制」, 第4回札幌臨床漢方研究会, 1997, 8, 8, 札幌.
- 16) 済木育夫, 阿多直美, 奥 亨, 服部征雄, 中島元夫: 癌細胞の基底膜浸潤における GG6-10 の効果とその作用機序の解析, 第2回病態と治療におけるプロテアーゼとインヒビター研究会, 1997, 8, 20-21, 名古屋.

癌細胞の基底膜への浸潤 (接着性, 運動能, 酵素による分解能など) を制御する物質を和漢薬・伝統薬物などの天然薬物を中心に探索し, その作用機序の解析を行なった。本研究では, 駆虫, 抗炎症作用を有すると報告のある“五倍子”の成分の一つである galloylg-lucose : GG6-10 が, 癌細胞の増殖能, 細胞外マトリックスへの接着能, 運動能に影響することなく, 強い浸潤抑制効果を示すことを明らかにした。ヒト癌細胞 HT1080 のマトリックス分解酵素 MMP-2, -9 の産生能および基質分解活性を gelatin zymography にて解析した結果, MMP 産生および分解能のいずれも濃度に依存して抑制することを見出した。さらに, MMP-9 のプロモーター領域に reporter gene として luciferase gene を結合した遺伝子を導入した癌細胞を用いて, MMP-9 の転写発現レベルに及ぼす効果を検討した結果, GG6-10 は TNF により誘導される luciferase 活性を顕著に抑制した。

- 17) 大越基弘, 中島元夫, 済木育夫: セリンプロテアーゼインヒビターによる悪性腫瘍細胞の浸潤・転移阻害実験, 第2回病態と治療におけるプロテアーゼとインヒビター研究会, 1997, 8, 20-21, 名古屋.
- 18) 済木育夫: 十全大補湯による癌の悪性化進展および転移抑制に関する基礎的検討, 生体防御と補剤～補剤治療の意義とその位置づけをめぐって～, 第13回臨床和漢薬研究会, 1997, 8, 29, 大阪.

我々は既に, マウス退縮型癌細胞の増殖型への悪性変換を, 十全大補湯 (株ツムラ, TJ-48) の経口投与により抑制できることを報告してきた (Jpn. J. Cancer

Res. 87, 1039-1044, 1996)。本研究ではマウス Colon 26 結腸癌高肝転移株 (Colon 26-L5) による転移モデルを用いて, 十全大補湯の転移抑制効果を検討したので報告する。BALB/c マウスを開腹し L5 を門脈内注入する実験的肝転移モデルにおいて, 十全大補湯を腫瘍接種前の7日間経口投与し, 腫瘍移植後19日目に犠死解剖した。十全大補湯投与群は用量依存的に肝転移結節数および肝重量の減少を示すとともに, 対照群に比較して有意な生存期間の延長が観察された。また, 腫瘍接種後1, 8日目に CDDP (80 μ g) を静脈内投与した群でみられた副作用 (体重減少, 薬物死) は十全大補湯投与群では認められなかった。さらに, 腫瘍接種前日に抗 asialo GM1 抗体あるいは 2-chloroadenosine を静脈内投与した結果, NK 細胞を除去した群で, 十全大補湯の腫瘍接種前投与により対照群に比較して有意な肝転移抑制が観察されたが, macrophage を除去した群では転移抑制効果は認められなかった。十全大補湯による癌転移の抑制の機序として, macrophage が関係していることが示された。

- 19) 渡辺知恵, 長谷耕二, 奥 亨, 永井博式, 門田重利, 難波恒雄, 済木育夫: シンポジウム「生薬利用の新展開」ススキ花穂による実験的アトピー性皮膚炎に及ぼす効果について, 第14回和漢医薬学会大会, 1997, 8, 30-31, 大阪.

【目的】ススキ花穂 (*Miscanthus sinensis* Andersson) は利尿, 解毒に使用され, IgE 抗体産生抑制の報告のある民間薬である。また同じイネ科 (Gramineae) の南蛮毛 (Corn silks) にはインターフェロン誘起能, IgE 抗体産生抑制が報告されている。そこで, 我々はススキ花穂のアトピー性皮膚炎に及ぼす影響を IgE 依存性二相性皮膚反応を用いて検討した。

【方法】抗アトピー性皮膚炎効果の指標として, マウスにおける IgE 依存性二相性皮膚反応モデルを用いた。すなわち BALB/c 系雌性マウスに抗 DNP モノクローナル IgE 抗体を静脈内投与して受動感作, あるいは DNP-OVA と Alum を腹腔内投与して能動感作した。受動感作 24 時間後または能動感作 2 週間後に 2,4-dinitrofluorobenzene (DNFB) をマウス両耳介の表裏に塗布して反応を惹起した。反応惹起前, 惹起後1および24時間目にダイヤルシックスネスゲージを用いて耳殻の厚みを測定し, その差を耳介浮腫量として算定した。ススキ花穂は乾燥後, 熱水抽出したものを水抽出物とし, その抽出残渣をメタノールで加熱還流して抽出したものをメタノール抽出物とした。また水抽出物を限外濾過により分画したものを透析画分 (MW < 50KDa, dialysate) と非透析画分 (MW > 50KDa, non-

dialysate) とした。さらに非透析画分をゲル濾過により精製し、溶出液中の糖質と蛋白質をそれぞれ Phenol/H₂SO₄ 法と Lowry 法により検出して糖質画分 (Fraction 1)、糖蛋白画分 (Fraction 2) を分別し減圧濃縮後、凍結乾燥したものを実験に用いた。

【結果・考察】感作マウスの耳殻に DNFB を塗布すると塗布 1 時間後と 24 時間後にピークを示す二相性の腫張が観察された。ススキ花穂の各画分はメタノール抽出物を除き受動感作マウスにおいて抗原塗布 2 時間前の腹腔内投与により塗布 1 時間後 (即時相: IPR) と 24 時間後 (遅発相: LPR) の両相を有意に抑制した。特に Fraction 2 においてその効果は最も強く、受動あるいは能動感作マウスにおいて抗原塗布 2 時間前の腹腔内または経口投与により濃度依存的に両相を有意に抑制した。さらに IPR の反応を確認した後 (すなわち抗原塗布 2 時間後) に 10 mg/kg の Fraction 2 を腹腔内投与しても、LPR を有意に抑制した。以上の結果から、Fraction 2 は炎症性細胞の遊走、浸潤あるいはメディエーター産生遊離、作用発現を抑制する可能性が示唆された。

20) 若林千里, 長谷川秀夫, 村田 純, 内山雅守, 済木育夫: 人参サポニンおよびその代謝物による癌の浸潤・転移におよぼす効果, 第14回和漢医薬学会大会, 1997, 8, 30-31, 大阪。

【目的】薬用人参 (*Panax ginseng* C. A. MEYER) は古来より多くの疾患に用いられてきた。その主要成分として ginseng saponin が挙げられてきたが、近年その成分が腸内において代謝修飾をうけるということがあきらかとなり、実際に血中にはサポニン成分ではなく、その代謝物が現れることが確認された。本研究では、サポニンが体内において薬理作用を発揮しているのか、それともその代謝産物であるのかを検討するために、*in vivo* における癌細胞の肺転移および *in vitro* における癌細胞の基底膜への浸潤および遊走に及ぼす効果を比較検討した。

【方法】抗転移効果の指標としてマウスにおける実験的肺転移モデルを用い、癌細胞を静脈内より移入した後、肺に転移した癌細胞のコロニー数を計測した。また、B16-BL6 マウスメラノーマ細胞および HT-1080 ヒト線維芽細胞腫を用いて、*in vitro* の癌細胞の浸潤およびフィブロネクチンへの遊走能に及ぼす効果を、フィルター下面に浸潤あるいは移動した癌細胞の数を計測することにより評価した。マウスに ginsenoside-Rb₁ および代謝物 M1 を経口投与後、経時的に血液を採取し、血中の Rb₁ および M1 の濃度を HPLC により計測した。

【結果・考察】人参エキス、サポニン、および代謝物はいずれも経口投与により肺転移を抑制した。また、サポニン Rb₁, Rb₂ および Rc は癌細胞の浸潤、遊走に影響を及ぼさなかったが、それらの代謝物 M1 は癌細胞の増殖を阻害しない濃度で浸潤抑制効果が認められた。また、Rb₁ および M1 投与後のマウス血中の Rb₁, M1 濃度を経時的に測定した結果、いずれの投与群も血中で Rb₁ は検出されなかったが、その代謝物である M1 が検出された。M1 の血中濃度は Rb₁ 投与群で 8 h, M1 投与群で 2 h 目にピークに達した。代謝物を直接投与することによりその血中濃度の急激な上昇が観察され Rb₁ 投与群の場合と明らかに異なったパターンを示した。以上の *in vivo* および *in vitro* の結果から、サポニンは経口投与により体内において Rb₁ から M1 に代謝されて効果発現を示すことが示唆された。

21) 大西康晴, 藤猪英樹, 斎藤健一, 山浦 剛, 早川芳弘, 作川理恵子, 村田 純, 坂本 隆, 田沢賢次, 藤巻雅夫, 済木育夫: 十全大補湯の経口投与によるマウス結腸癌肝転移抑制効果, 第14回和漢医薬学会大会, 1997, 8, 30-31, 大阪。

22) 早川芳弘, 藤猪英樹, 大西康晴, 作川理恵子, 長谷耕二, 門田重利, 難波恒雄, 済木育夫: マウス結腸癌実験的肝転移モデルにおける青箱子の転移抑制効果, 第14回和漢医薬学会大会, 1997, 8, 30-31, 大阪。

【目的】青箱子はヒユ科のノゲイトウ (*Celosia argentea* L.) の成熟種子を乾燥させたもので、強壯、消炎薬として眼疾、創傷等の治療に用いるとされている。既に我々は、青箱子が様々な肝障害モデルに対して肝保護効果を有することを報告してきた。今回、マウス colon26 結腸癌高肝転移株 (L5) による肝転移モデルを用いて、この青箱子抽出エキスの肝転移抑制効果とその作用機序について検討した。

【方法・結果】(1) 青箱子は乾燥後、熱水抽出したものの (Water extract) を限外濾過により、透析画分 (dialysate: MW < 100kDa) と非透析画分 (non-dialysate: MW > 100 kDa) に分画し、肝保護作用を示した非透析画分を青箱子抽出エキス (CAE) として用いた。(2) Balb/c マウスを開腹し、L5 を門脈内注入することによる実験的肝転移モデルにおいて、CAE を腫瘍接種前の 7 日間、腹腔内及び経口投与した。腫瘍移植後 18 日目に犠死解剖し、肝転移の指標として肝重量の増加を測定した。CAE 投与群は、対照群と比較して用量依存的に肝転移の抑制を示した。(3) CAE は L5 の *in vitro* における基底膜浸潤及び増殖に対して影響を及ぼさなかった。(4) CAE の mitogen 活性を BALB

splenocyte を用いて検討した結果、明らかな活性が認められたが、plastic dish を用いて adherent splenocyte を除去することにより、活性が消失した。

【結語】CAE の腹腔内及び経口投与により、L5 の実験的肝転移が著明に抑制され、その効果は用量依存的であった。CAE による転移抑制の機序としては、癌細胞の基底膜への浸潤の抑制ではなく、免疫系の関与が示唆された。特に、plastic dish に接着性の splenocyte、即ち Macrophage 系の免疫細胞に作用していると考えられた。更に詳細な作用機序について現在検討中である。

- 23) 済木育夫：特別講演：スピリリナの生理作用～腫瘍転移抑制効果，スピリリナ生理活性研究会，1997，9，95-6，バンコク。
- 24) 徐 強，蔣 潔雲，吳 斐華，藤猪英樹，済木育夫：遅延型免疫反応性肝障害の発症と中薬土茯苓の肝障害改善効果，第1回免疫薬理研究会，1997，9，19，岐阜。
- 25) 小嶋聡一，劉 建文，吉田龍太郎，済木育夫：朝鮮ニンジンサポニンによる線溶活性の亢進，第70回日本生化学会大会，1997，9，22-25，金沢。
- 26) 大西康晴，藤猪英樹，早川芳弘，村田 純，田沢賢次，藤巻雅夫，済木育夫：十全大補湯のマウス Colon 26 結腸癌肝転移抑制効果，第56回日本癌学会総会，1997，9，25-27，京都。
- 27) 小笠原 勝，村田 純，済木育夫：マウス Colon 26-L5 結腸癌細胞の肝転移に及ぼす神経ペプチド VIP の抑制効果とその作用機序の解析，第56回日本癌学会総会，1997，9，25-27，京都。
- 28) 藤猪英樹，村上正晃，大西康晴，東 市郎，上出利光，済木育夫：B7-1 (CD80) 遺伝子導入した癌細胞ワクチンと抗接着ペプチド (FC-336) の併用による癌転移抑制効果，第56回日本癌学会総会，1997，9，25-27，京都。

【目的】B7 接着分子を発現していない B16-BL6 メラノーマ細胞に B7 (CD80) 遺伝子を導入した細胞株 (B7⁺ BL6) を樹立し、不活化した B7⁺ BL6 細胞 (癌ワクチン) を用いて抗腫瘍免疫を誘導することにより、B7⁻ BL6 細胞による実験的および自然肺転移に対する抑制効果を示すことを明らかにした。今回、我々が従来より行っている細胞接着性 RGD 関連ペプチド (FC-336) を用いた抗接着療法と、癌ワクチンとの併用による転移抑制効果について検討した。【方法・結果】マウス右足蹠部に B7⁻ BL6 細胞を移植し、21 日目に原発巣を外科的に切除後、その翌日より癌ワクチン (B7⁺ BL6 細胞) をマウスの皮下に 7 日間隔で 2 回接

種した。その結果、癌ワクチン接種群では対照群に比べて顕著な転移抑制効果が見られた。また、同じモデルにおいて腫瘍移植後 FC-336 を尾静脈より頻回投与することによって肺の転移結節数の有意な減少がみられた。さらに、癌ワクチンと抗接着療法 (FC-336) を併用することにより、各々の単独処置群に比べて顕著な転移抑制の増強がみられた。【考察】以上の結果より、B7⁺ BL6 細胞を用いた癌ワクチン療法により転移の抑制が認められ、その効果は抗接着療法との併用でさらに増強されることを明らかにした。

- 29) 村田 純，鮎川幸一，済木育夫：マウス B16-BL6 メラノーマ細胞の自然肺転移モデルにおける α -MSH の機能解析，第56回日本癌学会総会，1997，9，25-27，京都。

【目的】我々は、昨年の本学会で神経ペプチド： α -MSH (α -Melanocyte Stimulating Hormone) が、マウス B16-BL6 メラノーマ細胞による基底膜浸潤及びその運動性を阻害し、マウスの実験的肺転移を抑制することを報告した。マウス皮下組織において BL6 細胞の浸潤領域に α -MSH の発現が認められているが、その生理的な意義は不明である。今回、マウスの自然肺転移モデルにて、BL6 細胞の原発巣での浸潤及びその肺転移における α -MSH の役割を検討した。

【方法、結果】マウスの自然肺転移実験において、BL6 細胞のマウス足蹠内への皮下移植後、翌日から隔日に α -MSH を計 8 回腫瘍内に投与した結果、PBS 投与群と比較して腫瘍移植後 2 週目及び 3 週目で腫瘍体積のわずかな減少が認められた。腫瘍移植後 2 週目の病理組織より、PBS 投与群では腫瘍の骨への浸潤が認められたのに対し、 α -MSH 投与群では腫瘍塊は結合組織及び筋層内に観察された。一方 α -MSH のレセプターアンタゴニスト (MRAT: H-dW-R-W-dF-K) 投与群では、腫瘍移植後 3 週目で腫瘍体積が有意に増加し、腫瘍の骨髄への浸潤像が観察された。原発巣切除後 2 週目の肺転移結節数を計測した結果、 α -MSH 投与群では著明な転移抑制効果が認められたが、MRAT 投与群では肺転移結節数が 2 倍以上増加した。

【考察】 α -MSH は、生体内において B16-BL6 細胞により形成された原発腫瘍の周辺組織への浸潤の遅延に寄与し、肺転移を阻止している可能性が示唆された。

- 30) Ohnishi Y., Fujii H., Sakamoto T., Fujimaki M. and Saiki I.: A new pseudo-peptide of Arg-Gly-Asp (RGD) with inhibitory properties of tumor metastasis and enzymatic degradation of extracellular matrix. 50th Annual Symposium on Fundamental Cancer Research

“Molecular Determinants of Cancer Metastasis”, 1997, 10, 28-31, Houston.

In order to augment the inhibitory effect on tumor invasion and metastasis, we here synthesized a new pseudo-peptides of RGD sequence (FC-336) and examined its inhibitory effects on tumor metastasis in vivo and on adhesion, migration and invasion in vitro. FC-336 significantly inhibited experimental lung metastasis produced by i.v. co-injection with B16-BL6 melanoma or colon 26 M3.1 cells in a dose-dependent manner. The intraportal injection of FC-336 with highly metastatic colon 26-L5 cells resulted in a marked reduction of tumor colonies in the liver and the liver weights to the normal level. However, the co-injection of tumor cells with a high dose of RGDS tetrapeptide led to a slight inhibition of liver metastasis. The multiple i.v. administration of FC-336 after the inoculation of tumor cells into the portal vein caused significant inhibition of liver metastasis. FC-336 significantly enhanced the survival rate of mice as compared to the untreated controls when injected intraportally with tumor cells or intravenously administered after the tumor inoculation. Furthermore, FC-336 effectively inhibited the invasion, migration and adhesion of tumor cells in vitro, but its inhibitory effects were not more than RGDS peptide. Zymography analysis revealed that FC-336 inhibited the degradation of gelatin substrate by matrix metalloproteinases (MMPs) produced by tumor cells, while RGDS peptide did not affect the enzymatic degradation. These findings indicate that the pseudo-peptides of RGD sequence, possessing inhibitory property of the degradation by MMPs differently from original RGD-containing peptides, may provide an advantage and useful basis for preventing tumor metastasis.

Key words ; Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS), pseudo-peptide, metastasis, invasion, matrix metalloproteinase (MMP)

- 31) 永川 修, 藤猪英樹, 小笠原 勝, 村田 純, 布施秀樹, 済木育夫: ヒト前立腺癌細胞株 PC-3 の浸潤能及び移動能に及ぼす各種神経ペプチドの影響, 第47回日本泌尿器学会中部総会, 1997, 11, 9-10, 岐阜.
- 32) Nishikawa N., Komazawa H., Oriksa A.,

Yamaguchi J., Kojima M., Ono M., Itoh I., Azuma I., Fujii H., Murata J. and Saiki I.: Synthesis and biological properties of partially modified retro and retro-inverso pseudo peptides of Arg-Gly-Asp (RGD). The Seventh International Kyoto Conference on New Aspects of Organic Chemistry IKCOC-7., 1997, 11, 10-14, Kyoto.

- 33) 済木育夫: 教育講演「十全大補湯による癌転移の抑制に関する基礎的検討」, 第7回外科漢方研究会, 1997, 11, 13, 大阪.
- 34) 作川理恵子, 村上孝司, 藤猪英樹, 大家信治, 佐野正樹, 山田雄次, 済木育夫: 大腸癌高転移株 Colon 26-L5 を用いた TAC-101 の肝転移抑制効果とその作用機序, 第8回日本レチノイド研究会, 1997, 11, 14-15, 静岡.

TAC-101 (Am555S) は RAR- α , β に親和性を有し, 各種ヒト癌の肝転移モデル系に対し優れた肝転移抑制効果を発揮する(第7回レチノイド研究会学術集会)。また, 転写因子 AP-1 に対する DNA 結合阻害作用を有している(第56回日本癌学会総会)。我々はマウス結腸癌 Colon 26 の高肝転移株である Colon 26-L5 を用い, TAC-101 の肝転移抑制効果とその作用機序について ATRA と比較検討した。

【方法】1) 肝転移抑制効果; Colon 26-L5 細胞を雌性 BALB/c マウスの門脈より移入し実験的肝転移モデルを作製し, TAC-101 および ATRA を投与したマウスの肝転移結節数を判定した。2) 細胞死の誘導; Colon 26-L5 細胞に TAC-101, ATRA を添加し, 細胞死誘導作用を検討した。3) Gelatin zymography; Colon 26-L5 細胞に対し in vitro で細胞障害を起こさない用量の TAC-101, ATRA を添加し, Phorbol ester 処理により誘導される MMP-9 活性の誘導阻害作用を測定し比較した。4) 浸潤阻害効果; 上層に Matrigel™, 下層に Fibronectin を塗布した hapto-invasion assay 系を作製し, Phorbol ester 処理により誘導される Colon 26-L5 細胞の浸潤に対する TAC-101, ATRA の阻害効果を検討した。

【結果】1) TAC-101 は Colon 26-L5 細胞の肝転移結節形成を著明に抑制した(抑制率 80% 以上)。2) TAC-101 の 24 時間処理では 10 μ M 以上の濃度で細胞死が誘導された。ATRA 処理では 24 時間後も細胞死の誘導は起こらなかった。3) TAC-101, ATRA は Phorbol ester により誘導される MMP-9 活性を抑制した。さらに, TAC-101 は MMP-2 の活性も抑制した。4) TAC-101 は Phorbol ester 誘導性の浸潤を阻

害したが ATRA は阻害しなかった。

【結論】TAC-101 は ATRA に比し優れた肝転移抑制効果を示した。その作用機序として、高濃度では細胞死の誘導、低濃度では AP-1 結合阻害による MMP-9 の産生阻害、さらに未知の制御機構による MMP-2 産生阻害に基づく浸潤阻害作用が関与するものと考えられた。

- 35) 村上孝司, 佐野正樹, 大家信治, 橋本章弘, 柴田治郎, 松浦知和, 蓮村 哲, 永森静志, 山田雄次, 済木育夫: TAC-101 のヒト肝細胞癌肝内増殖における阻害機序, 第 8 回日本レチノイド研究会, 1997, 11, 14-15, 静岡。

我々は第 7 回レチノイド研究会において TAC-101 (Am555S) がヒト消化器癌肝転移モデルに対して優れた抑制効果を発揮することを報告した。本研究において TAC-101 の作用機序について検討し、肝細胞癌に対する増殖抑制効果に加え、肝内転移抑制効果を示唆する結果が得られたので報告する。

【方法】1) 細胞死の誘導; ヒト肝細胞癌株 JHH-7 に対する TAC-101, ATRA の細胞死誘導活性を検討した。2) 浸潤阻害効果; 上層に Matrigel™, 下層に Fibronectin を塗布した hapto-invasion assay 系を作製し, HGF 処理により誘導される JHH-7 細胞の浸潤に対する TAC-101, ATRA の阻害効果を検討した。3) Western blot analysis: JHH-7 細胞の c-met 蛋白 (HGF receptor) 発現に対する TAC-101 および ATRA の影響を検討した。4) 肝細胞癌-病態モデルに対する延命効果; JHH-7 細胞を雄性 KSN ノードマウスに脾注し多結節型の実験的肝内転移モデルを作製し, TAC-101, ATRA と既存抗癌剤の延命効果を検討した。

【結果】1) TAC-101 は JHH-7 に対し ATRA より低濃度から細胞死を誘導した。2) HGF 添加により JHH-7 の細胞外基質への浸潤は促進されるが, TAC-101, ATRA はこれを阻害した。また, TAC-101 の浸潤阻害効果は ATRA よりも強かった。3) TAC-101 は細胞死を誘導しない濃度で JHH-7 の c-met 蛋白発現を低下させた。さらにこの効果は ATRA より低濃度から認められた。4) JHH-7 肝細胞癌-病態モデルに対し TAC-101 は T/C 値 170 % を超える生存期間延長効果を示した。この効果は ATRA や既存抗癌剤のそれを上回った。

【結論】肝細胞癌患者の予後は肝内転移を含む残肝再発により影響を受ける。TAC-101 は肝細胞癌に対する増殖抑制作用および c-met の発現抑制による浸潤阻害作用を示すことで肝細胞癌の肝内増殖を抑制する

可能性が示唆された。また、肝細胞癌-病態モデルに対し延命効果を示したことから、臨床肝細胞癌に対する効果が期待される。

- 36) Ohnishi Y., Fujii H., Sakamoto T., Fujimaki M. and Saiki I.: A new pseudo-peptide analogue of Arg-Gly-Asp (RGD) inhibits liver metastasis of colon 26-L5 carcinoma cells. 14th Asia Pacific Cancer Conference/4th Hong Kong International Cancer Congress, 1997, 11, 16-19, Hong Kong.
- 37) 渡辺知恵, 長谷耕二, 奥 亨, 永井博式, 門田重利, 難波恒雄, 済木育夫: IgE 依存性二相性皮膚反応に及ぼすススキ花穂抽出物の効果, 第18回日本炎症学会, 1997, 11, 20-21, 東京。
- 38) 大西康晴, 藤猪英樹, 坂本 隆, 田沢賢次, 済木育夫: 十全大補湯の肝転移抑制効果, 第51回日本消化器外科学会総会, 1998, 2, 19-20, 東京。

◇ 著 書

- 1) 済木育夫, 村田 純: 第 I 部: 転移臓器別モデル, A. 肺, 2. B16 メラノーマの肺転移, 「続=がん浸潤・転移研究マニュアル」, がん転移研究会 / 編, pp7-11, 金芳堂, 1997.

◇ 総説及びその他

- 1) 済木育夫: 特集「第 6 回日本臨床腫瘍研究会」, 新しい化学療法 標的分子阻害剤のスクリーニング法, 基底膜浸潤阻害物質, 癌と化学療法, 24 (2): 187-195, 1997.
- 2) 済木育夫: インタビュー/漢方を拓く, 十全大補湯が癌のプロGRESSIONを抑制, 漢方医学, 21 (1): 11-13, 1997.
- 3) 済木育夫: 第 9 回関越 UFT 研究会 特別講演 I 「細胞接着の制御と癌転移の抑制」, 接着相互作用の阻害と亢進, 第 9 回関越 UFT 研究会講演集, 41-50, 1997.
- 4) 済木育夫, 大西康晴: 漢方特集, 十全大補湯による癌の悪性化進展抑制, JAMA 日本語版, 18 巻 4 号: 48-49, 1997.
- 5) 大西康晴, 藤猪英樹, 猪部 学, 木村文成, 村田純, 村上正晃, 上出利光, 坂本 隆, 田沢賢次, 藤巻雅夫, 済木育夫: 特集「第 17 回癌免疫外科研究会」(速報) サイトカインと腫瘍免疫, B7-1 (CD80) 遺伝子を導入した癌細胞ワクチンによる転移抑制効果, Biotherapy, 11 (5): 621-622, 1997.
- 6) 済木育夫, 大西康晴: 癌と十全大補湯, 第 2 回天

然薬物研究方法論アカデミー白樺湖シンポジウム
記録集, Methods in Kampo Pharmacology, 2:
54-60, 1997

- 7) 済木育夫: “BACT 研究会のさらなる発展を期待して”, BACT ニュースレター, 1:1-2, 1997.
- 8) 済木育夫: 特集「第6回がん転移研究会シンポジウム記録集」シンポジウムII がん浸潤・転移研究手法に関する最近の進歩, 癌の転移・浸潤研究への培養細胞を用いたアプローチ, Biotherapy, 11 (9): 1016-1020, 1997.
- 9) 佐治重豊, 済木育夫, 相良祐輔, 中津川重一: 座談会/十全大補湯による癌の転移・再発の予防, 漢方医学, 21 (11): 2-11, 1997.
- 10) 済木育夫: 春季シンポジウム「癌転移研究の最近の進歩」, 癌細胞の接着阻止による転移治療, 第56回北海道癌談話会記録, ミノファーゲンレビュー, 42 (5): 35-36, 1997.
- 11) 永川 修, 布施秀樹, 済木育夫: 特集「器官培養とその応用」, 癌細胞浸潤能の in vitro 測定系, 組織培養工学, 23 (14): 12-16, 1997.

◇ その他の活動

- 1) 済木育夫: 第2回和漢薬研究所発表会, 発表, 1997, 5, 29-30, 富山.
- 2) 済木育夫: 富山医科薬科大学大学院生物薬学 I 講義「細胞生物学特論」, 1997, 6, 12, 19, 26, 富山.
- 3) 済木育夫: 三重大学生物資源学部 大学院集中講義「生物資源化学特論」, 1997, 6, 23-24, 三重.
- 4) 済木育夫: 富山医科薬科大学医学部 統合講義(5年生), 1997, 7, 2, 富山.
- 5) 済木育夫: 第2回和漢薬研究所夏期セミナー「和漢薬に触れる」, 講演: 癌と和漢薬, 1997, 7, 23-24, 富山.
- 6) ススキ花穂による実験的アトピー性皮膚炎に及ぼす効果, 第14回和漢医薬学会シンポジウム「生薬利用の新展開」の取材, 1997, 8, 25, 漢方医薬新聞.
- 7) 済木育夫: 富山医科薬科大学薬学部専門教育 講義「生理化学」, 1997, 9, 10-11, 富山.
- 8) 済木育夫: 岐阜大学農学部生物資源利用学科 集中講義「分子薬理学」, 1997, 9, 17-20, 岐阜.
- 9) ススキ花穂に強力なアトピー性皮膚炎抑制作用, 第14回和漢医薬学会シンポジウム「生薬利用の新展開」の取材, 1997, 10, 9, Medical Tribune.
- 10) 済木育夫: 第11回経営者・研究者交流会, 「ゲノム解析とDNA産業の展望」, パネルディスカッション・コーディネーター, 1997, 11, 26, 富山.
- 11) 済木育夫: 富山医科薬科大学薬学部専門教育 講義「和漢薬論」, 1997, 12, 1, 富山.