硫酸化キチン誘導体による癌転移の抑止とその作用機序

済 木 育 夫

1. はじめに

キチンは菌界、植物界、動物界にわたって広く存在する構造多糖であり、*N*-アセチルグルコサミンを基本骨格とする巨大分子である。キチンおよびその化学修飾した種々の誘導体は成形加工の容易さ、リゾチームに代表される一連の糖加水分解酵素類による生体内分解性、蛋白質吸着性などの極めて多彩な性質と機能を有し、フィ

ルム、紙、繊維、濃縮担体などへの応用から医材料、医薬品に至るまでの開発・応用研究が盛んに行なわれている(図1)。

私共は北海道大学理学部の戸倉清一教授との共同研究でキチンの各種誘導体の生物活性について検討を行ない、免疫増強作用、抗腫瘍・抗転移効果、薬剤徐放担体としての有用性などを明らかにしてきた。本稿ではその一環としてキチンの硫酸化誘導体^{1,2)}を用いた癌転移の

図1 キチンおよびその誘導体の用途と応用

Inhibition of Tumor Metastasis by Sulfated Chitin Derivatives

筆者紹介 IKUO SAIKI

Institute of Immunological Science, Hokkaido University

北海道大学 免疫科学研究所 助教授、医学博士

筆者は細胞生物学、実験腫瘍学が専門で、「細胞接着の制御と癌転移の抑止に関する研究」で平成2年度、日本癌学会奨励賞を受賞された。

本稿では、硫酸化キチン誘導体の癌転移阻止能とその作用機序について解説していただいた。

表1のA B16-BL 6細胞の静脈内注射による実験的肺転移に及ぼすキチンヘパリノイドの効果

静脈内投与	投与量 (μ g / マウス)	肺転移結節数(14日目)		P*2
		平均値 $\pm$ SD (分布範囲)		
実験Ⅰ				
対照群 (PBS)	—	124 $\pm$ 34 (92 ~ 165)		
ヘパリン-Na	250	8 $\pm$ 4 (4 ~ 12)		<0.001
O-S-キチンⅡ (8.54) *1	250	52 $\pm$ 7 (47 ~ 65)		<0.005
O-S-キチンⅢ (10.22)	250	15 $\pm$ 7 (7 ~ 24)		<0.001
N-S-キトサン (11.89)	250	103 $\pm$ 9 (89 ~ 111)		
N-S-CM-キトサン (5.90)	250	134 $\pm$ 23 (96 ~ 156)		
実験Ⅱ				
対照群 (PBS)	—	62 $\pm$ 14 (47 ~ 78)		
O-S-CM-キチンⅠ (1.43)	250	58 $\pm$ 18 (40 ~ 90)		
O-S-CM-キチンⅡ (6.70)	250	30 $\pm$ 10 (20 ~ 42)		<0.005
O-S-CM-キチンⅢ (7.66)	250	8 $\pm$ 2 (4 ~ 12)		<0.001

(注) C57BL/6 マウス (5 匹/群) に, B16-BL 6 細胞 (5×10^4) とともにキチンヘパリノイドを静脈内に注射した。2週間後にマウスを殺し, 肺の転移結節数を測定した

* 1 スルホン化度 (%)

* 2 Student's two-tailed *t*-test で対照群と比較

表1のB B16-BL 6メラノーマ細胞の静脈内注射による実験的肺転移に及ぼすSCM-キチンIIIの効果

静脈内投与	投与量 (μg ／マウス)	肺転移結節数(14日目)	P*
		平均値±SD(分布範囲)	
対照群 (PBS)	—	109±16 (87～130)	
CM-キチン	250	100±12 (96～126)	
O-S-CM-キチンⅢ	500	35± 3 (29～ 42)	<0.001
	250	44± 7 (48～ 64)	<0.001
	100	77± 3 (74～ 81)	<0.005
	50	80± 6 (74～ 87)	<0.01
	10	95± 7 (86～101)	

(注) C57BL/6 マウス (5 匹/群) に, B16-BL 6 細胞 (5×10^4) とともにキチンヘパリノイドを静脈内に注射した。2週間後にマウスを殺し, 肺の転移結節数を測定した

* Student's two-tailed *t*-test で対照群と比較

図2 癌の転移形成過程と内皮細胞および基底膜マトリックスに対する浸潤過程

阻止とその機序の解析を中心に私どもの成績を記述する(3-6)。

2. 癌転移と細胞接着

癌の転移は癌細胞の原発巣からの離脱と周辺組織への浸潤から始まって遠隔部位(転移組織)での増殖による転移巣の形成に至るまでの複雑な反応カスケードから成り立っている(図2)。これら一連の過程で癌細胞は血管内皮細胞、免疫系細胞や血小板などの宿主細胞あるいは細胞外マトリックスや基底膜などの種々の生体成分と接着相互作用しており、癌細胞の転移形質の発現に重要な影響を及ぼしている。この転移過程にある癌細胞との接着相互作用を調節・制御することにより癌の転移を阻止しようとする新しい試みとして、細胞外マトリックス中の接着分子由来の接着性ペプチド(フィブロネクチン由来のRGDS, ラミニン由来のYIGSRなど)や糖鎖あるいは細胞接着レセプターに対する抗体が癌細胞の接着能、運動能を阻害するとともに転移・浸潤を抑制することが、私共を含めていくつかの研究グループにより報告されている⁷⁾。

フィブロネクチン, ラミニンおよびコラーゲンとは別にヘパラン硫酸やコンドロイチン硫酸などの硫酸化プロテオグリカンなども細胞外マトリックスや基底膜の重要な構成成分であり、癌の転移, 浸潤の発現に重要な役割を果たしている。転移性メラノーマはヘパラーゼを分泌しヘパラン硫酸を分解した後浸潤するが、ヘパリンはその酵素的分解を特異的に阻害することにより癌細胞の基底膜浸潤を抑制することが示された。ヘパリンはN-アセチルグルコサミンとウロン酸(グルクロン酸やイズロン酸)からなる構造上不均一な硫酸化多糖であり、その生物活性は極めて多様でアンチトロンビンⅢへの結合による抗血液凝固作用, 線維芽細胞増殖因子(FGF)との相互作用, 細胞外マトリックス中のⅣ型コラーゲン,

ラミニン, フィブロネクチンへの結合などが知られている⁸⁾。すでに、ヘパリンを含む硫酸化多糖およびその関連化合物を用いて癌転移を阻止しようとする研究も行われてきている。ヘパリンによる癌転移の抑制機序は、凝固系カスケードの活性化を伴う癌細胞誘導性の血小板凝集による腫瘍血栓の阻害によるが、ヘパリンの頻回投与に基づく副作用(出血のリスクなど)が癌転移治療上の重要な問題点ともなる。入村ら⁹⁾は抗凝血作用の少ないヘパリン誘導体がメラノーマ細胞のヘパラーゼ活性を阻害し、実験的肺転移の抑制に有効であることを示した。私どもはそれゆえヘパラン硫酸およびヘパリンの類似化合物としてキチンの硫酸化誘導体(ヘパリン様構造を示すことからキチンヘパリノイド誘導体とも呼ぶ)を作製し、転移性癌細胞を用いた転移阻止効果とその機序について以下の検討を行った³⁻⁶⁾。

3. 硫酸化キチン誘導体による癌転移抑制効果

マウス実験腫瘍系による肺転移実験モデルとしては、主として2つの方法が行われている。癌細胞をマウスの尾静脈より注射し、一定期間後の肺の転移結節数を計測する実験的(人工的)肺転移系と、癌細胞をマウスの足蹠に皮下移植し、原発巣が一定の大きさに達し既に転移が始まっている時期に外科的に切除し、さらに一定期間経過した後に肺の転移結節数を計測する自然肺転移系(治療実験モデル系)である。高転移性の癌細胞として、B16-BL6メラノーマおよびルイス肺癌(3LL)などを主として用いている。

用いた硫酸化キチン誘導体の化学構造および分析値(硫酸化度, カルボキシメチル化度)を図3に示した。これら硫酸化キチン誘導体のうちで、特に硫酸化度の最も高いO-S-CM-キチンⅢはヘパリンの有する血小板凝集阻害作用, 抗凝固作用が極めて弱く(ヘパリンの1/1,000-1/10,000以下), in vitro における癌細胞およ

標 品	S (%) *1	-SO ₃ ⁻ *2	-COO ⁻ *2	分子量 (×10 ⁴) *3
スルホン化キチン				
O-S-キチンⅡ	8.54	0.73	—	1.3
O-S-キチンⅢ	10.22	0.87	—	2.4
スルホン化CM-キチン				
O-S-CM-キチンⅠ	1.43	0.12	0.8	1.8
O-S-CM-キチンⅡ	6.70	0.57	0.4	1.0
O-S-CM-キチンⅢ	7.66	0.65	0.56	2.4
スルホン化脱アセチルキチン		NHAc *2		
N-S-キトサン	11.89	1.32 (0.30)	0.6	4.2
N-S-CM-キトサン	5.90	0.68 (0.30)	0.6	4.7
CM-キチン	0	0	0.8	6.3
(D-カルキニメチルキチン)				

[注] *1 スルホン化率(%)

*2 反応後の脱アセチルグルコサミン残基

*3 平均分子量(ヘパリンによる粘度方程式から換算)

図3 キチンおよびその誘導体の化学構造とその分析値

び他の正常細胞の生長に対する直接的な傷害作用もほとんど認められない。

種々の硫酸化キチン誘導体を B16-BL 6 細胞と共にマウスの尾静脈内に投与し、14日後に肺転移結節数を計測した(表1のA, B)。O-S-キチンおよびO-S-CM-キチンはヘパリンと同様に著明な肺転移の抑制効果を示し、その抑制は導入した硫酸化度に比例して強い効果を示した。

硫酸化度の高いO-S-CM-キチンⅢは用量(50-500 μg/マウス)に依存して強い転移抑制活性を示した。一方、高い硫酸化度にもかかわらず脱アセチル化したN-S-キトサンおよびN-S-CM-キトサン、さらに硫酸化されていないCM-キチンでは抑制効果が認められない。これらの結果は、グルコサミン残基中のC₆位の硫酸化およびC₂位のN-アセチル化が抗転移効果発現に重要な役割をしていることを示唆している。

次に、強い転移阻止活性を示したO-S-CM-キチンⅢを用いて、マウスの自然肺転移に及ぼす治療効果について検討した。(表2のA, B)。マウスの足蹠にB16-BL

図4 放射標識した癌細胞とキチンヘパリノイドを注射後の肺への癌細胞の捕捉の推移

B16-BL 6 細胞 (3×10^4) を PBS (○), 250 μg の O-S-CM-キチンⅢ (●), CM-キチン (▲) あ るいはヘパリン (△) とともにマウスの尾静脈内に注射した。

6細胞を移植後、21日目に原発巣を外科的に切除する前あるいは後にO-S-CM-キチンⅢを頻回全身投与した。O-S-CM-キチンⅢを外科的切除前に一日おきに計7回静脈内投与することにより、用量依存的に肺転移の抑制効果が認められた。外科的切除後にキチン誘導体を処置した場合も、O-S-CM-キチンの7回投与により硫酸化度に比例して転移抑制効果が観察され、O-S-CM-キチンⅢは著明な阻止効果を示した。O-S-CM-キチンⅡもヘパリンに比べて強い活性を示したが前述のごとくN-S-CM-キトサンおよびCM-キチンでは効果を示さなかった。また、O-S-CM-キチンⅢを腫瘍移植局所に投与し、21日目に原発巣を外科的に切除後さらに14日目に肺の転移結節数を調べた結果、O-S-CM-キチンⅢにより有意な転移阻止効果が認められたがCM-キチンでは全く効果を示さなかった。しかし、いずれの投与によっても、外科的切除時の原発腫瘍径(大きさ)には差異が認められなかった。これは癌細胞の増殖や生存率にO-S-CM-キチンⅢが全く影響しなかったin vitroの成績からも、転移抑制効果は癌細胞に対する直接的な傷害作用によるとは思われない。

4. O-S-CM-キチンⅢによる転移抑制機序の解析

O-S-CM-キチンⅢの転移抑制機構の解析結果を多少の無理があるかも知れないが、できる限り図2に示す転移形成過程に沿って紹介する。

脈管内へ侵入した癌細胞の標的臓器(肺)への着床過

表2のA B16-BL 6細胞の皮下移植による自然肺転移に及ぼすキチンヘパリノイドの治療効果

静脈内投与	投与日	投与量 (μg / マウス)	肺転移結節数 (35日目)	P*
			平均値 $\pm$ SD (分布範囲)	

実験Ⅰ				
対照群 (PBS)		—	62 $\pm$ 22 (35 ~ 84)	
O-S-CM-キチンⅢ	7, 9, 11, 13, 15, 17, 19	200	4 $\pm$ 3 (0 ~ 8)	<0.001
		100	11 $\pm$ 8 (4 ~ 22)	<0.005
		50	36 $\pm$ 26 (16 ~ 71)	
O-S-キチンⅡ		200	11 $\pm$ 8 (6 ~ 23)	<0.005
CM-キチン		200	41 $\pm$ 18 (25 ~ 72)	
ヘパリン-Na		200	19 $\pm$ 16 (8 ~ 43)	<0.01

実験Ⅱ				
対照群 (PBS)		—	43 $\pm$ 5 (38 ~ 49)	
O-S-CM-キチンⅢ	7, 9, 11, 13, 15, 17, 19	200	9 $\pm$ 8 (0 ~ 21)	<0.001
	7, 10, 13, 16, 19	200	48 $\pm$ 6 (41 ~ 54)	
	7, 11, 15, 19	200	48 $\pm$ 6 (41 ~ 54)	

(注) C57BL/6 マウス (5匹/群) に癌細胞を移植後、上記に示した時期にキチンヘパリノイドを静脈内に投与した。原発巣を移植後21日目に外科的に切除し、さらに2週間後にマウスを殺した

* Student's two-tailed *t*-test で対照群と比較

表2のB B16-BL 6細胞の皮下移植による自然肺転移に及ぼすキチンヘパリノイドの治療効果

静脈内投与	投与日	投与量 ($\mu\text{g}/\text{マウス}$)	肺転移結節数(35日目)	P*
			平均値 $\pm$ SD(分布範囲)	
対照群 (PBS)		—	52 $\pm$ 10 (39~65)	
O-S-CM-キチンⅠ		200	62 $\pm$ 18 (14~80)	
O-S-CM-キチンⅡ	22, 24, 26, 28, 30	200	14 $\pm$ 7 (7~24)	<0.001
O-S-CM-キチンⅢ	32, 34	200	9 $\pm$ 6 (1~17)	<0.001
O-S-キチンⅡ		200	14 $\pm$ 8 (7~26)	<0.001
CM-キチン		200	54 $\pm$ 22 (34~88)	
N-S-CM-キトサン		200	74 $\pm$ 7 (68~83)	
ヘパリン-Na		200	24 $\pm$ 7 (17~34)	<0.001

(注) C57BL/6 マウス (5匹/群) に癌細胞を移植後、上記に示した時期にキチンヘパリノイドを静脈内に投与した。原発巣を移植後21日目に外科的に切除し、さらに2週間後にマウスを殺した

* Student's two-tailed *t*-test で対照群と比較

図5 マトリジェル/フィブロネクチンあるいはマトリジェル/ラミニンをコートしたフィルターへの癌細胞浸潤に及ぼす硫酸化キチン誘導体の効果

B16-BL 6 細胞 (2×10^5) と 500 μ g のキチン誘導体をチャンバー上層に加え、8時間培養後にフィルター下面に浸潤した癌細胞数を計測する。

*: $P < 0.001$

程 (図2の②-④) に及ぼす O-S-CM-キチンⅢの効果解析するため、 ^{125} I-デオキシウリジンで標識した B16-BL 6 細胞を O-S-CM-キチンⅢあるいはヘパリンと共に静脈内投与後、各臓器への癌細胞の滞留・捕捉 (arrest) を放射活性を指標に計測した。その結果 (図4)、ヘパリンの投与により癌細胞の肺への捕捉は対照群 (標識癌細胞のみ) に比べてヘパリン投与後24時間までに著明に低下した。O-S-CM-キチンⅢの場合もヘパリンほどではないが、明らかな低下を示した。しかし、他の臓器 (肝・腎・脾・血液) 中での滞留には対照群との差異が認められなかった。一方、転移抑制効果を示さない CM-キチンは癌細胞の肺への捕捉・停滞に影響を示さなかった。これらの結果は癌細胞の脈管内侵入以降のいずれかの過程 (図2の②-④) に O-S-CM-キチンⅢが作用している可能性を示唆している。

多くの癌細胞は血小板の凝集を誘導し、その結果、微小管内で癌細胞の血管内皮細胞への着床をより安定化あるいは増強し、さらに、種々の免疫系細胞から癌細胞を防御することが知られている (図2の③)。ヘパリンは癌細胞誘導性の血小板凝集およびアンチトロンビンⅢ存在下の凝固活性を強く阻止したが (0.001 μ g/ml で 50% 阻害)、O-S-CM-キチンⅢは 0.00001-1000 μ g/ml の濃度範囲でヘパリンに比較してほとんど阻害効果を示さなかった。このことはヘパリンによる転移抑制は脈管内の癌細胞による血小板凝集およびそれに引き続いて起

こる凝固系カスケードの活性化に基づく腫瘍血栓形成を阻止していることによるものと考えられる。さらに、ヘパリンおよび O-S-CM-キチンⅢは癌細胞同士の凝集 (塞栓形成) に対しても影響は認められなかった。それゆえ、O-S-CM-キチンⅢの転移抑制はその他の機序に基づいていることが示唆される。

転移形成過程の各段階において癌細胞は種々の免疫系細胞により傷害を受ける可能性がある (特に図2の③)。免疫系細胞による生体防御機構に及ぼす O-S-CM-キチンⅢの効果を検討した結果、O-S-CM-キチンⅢの腹腔内投与によりマクロファージを活性化し殺腫瘍性を誘導することはできなかった。また、マウスをあらかじめカラゲナンあるいは抗アシアロ GM₁ 抗体で前処理し、それぞれマクロファージあるいは NK 細胞の機能を低下させた場合、B16-BL 6 細胞の静脈内投与による実験的肺転移は対照群に比べて増大が認められ、これらの細胞群が転移抑制に重要な働きをしていることが考えられた。しかし、この処置マウスに O-S-CM-キチンⅢを投与することにより増加した転移結節数が有意に抑制された。従って、転移抑制はマクロファージや NK 細胞の活性化を介した機序によるものではないことが考えられた。

癌細胞は脈管内を移動した後、毛細管の内皮細胞へ着床し基底膜への移動および浸潤を行なう (図2の④-⑤)。標的臓器への癌細胞の着床の初期段階は癌細胞と血管内皮細胞との接触により特徴づけられる (図2の

図6 B16-BL 6 メラノーマ細胞によるヘパラーゼおよびIV型コラーゲナーゼ活性に及ぼす硫酸化キチン誘導体の効果

④。O-S-CM-キチンⅢは肺の血管内皮細胞への癌細胞の接着に対して阻害効果を示さなかった。そこで癌細胞の内皮下基底膜マトリックスへの浸潤に及ぼすO-S-CM-キチンⅢの効果についてトランスウェルチャンバーを用いて検討を行なった(図5)。このチャンバーは、孔径8 µmのメンブランフィルターを境に上、下に区画されており、フィルターの下部表面を基質蛋白質(フィブロネクチン、ラミニン)でコートし、さらに上部表面を基底膜再構成基質(マトリジェル:IV型コラーゲン、ラミニン、エンタクチン、ヘパラン硫酸プロテオグリカンなどから構成)でコートした。チャンバー上層に癌細胞を加え8時間後にフィルター下部表面に浸潤してきた癌細胞数を計測した。その結果、マトリジェルへの浸潤はO-S-CM-キチンの添加によりその硫酸化度に依存して著明に阻害された。ヘパリンもO-S-CM-キチンⅢ程ではないが、抑制効果を示した。一方、抗転移効果の認められなかったCM-キチンおよびN-S-CM-キトサンでは浸潤阻害は認められない。以上の結果は、硫酸化キチン誘導体による転移抑制が明らかに基底膜の浸潤の抑制に部分的に起因していることを示唆している。

癌細胞の浸潤は細胞外マトリックスあるいは基底膜への接着、移動および癌細胞由来の酵素的分解(破壊)などを含む一連の過程から成立している(図2のA-E)。そこで基底膜浸潤過程の初期段階である内皮下基底膜マトリックスへの癌細胞の接着に及ぼすO-S-CM-キチンⅢの効果調べた。基底膜の主要成分であるラミニンへの癌細胞の接着はO-S-CM-キチンⅢおよびヘパリンの

存在下で有意に阻害された。キチン誘導体による癌細胞の接着阻害は明らかに浸潤抑制効果とよく相関した。さらに、癌細胞接着後の細胞の移動能に与えるO-S-CM-キチンⅢの影響を調べるため、浸潤実験と同様にトランスウェルチャンバーのフィルターの下部表面をラミニンあるいはフィブロネクチンでコートし、上層に癌細胞を加えて6時間後にフィルター下面に移動した細胞数を測定した(接触走化性:ハプトタキシス)。癌細胞の移動能はO-S-CM-キチンⅢおよびヘパリンの添加により用量かつ硫酸化度依存的に阻害された。この阻害効果はフィルター下面に固着化したラミニン分子へO-S-CM-キチンⅢおよびヘパリンが結合することにより、結果として癌細胞の移動を抑制(制御)していること、³H標識ヘパリンを用いた結合実験の成績からO-S-CM-キチンⅢおよびヘパリンのラミニン分子への結合は可逆的で、その結合部位としてラミニン分子内に存在するヘパリン結合ドメインである可能性も示された。

癌細胞は基底膜に接着しIV型コラーゲナーゼなどメタロプロテアーゼやヘパラーゼ(ヘパラン硫酸を特異的に分解)などの種々の基質分解酵素を産生し、これを分解・破壊して組織深部へと浸潤する(図2のD-E)。B16-BL 6細胞由来の部分精製したヘパラーゼによるヘパラン硫酸の分解活性はO-S-CM-キチンⅢおよびヘパリンの処理により用量依存的に抑制した(図6)。CM-キチンはヘパラーゼによる分解活性の抑制効果を示さなかった。一方、O-S-CM-キチンⅢは癌細胞による³H標識IV型コラーゲンの分解活性を強く阻害したが(約

80%阻害), ヘパリンは高用量を用いても比較的弱い効果しか示さなかった。すでにヘパリンがヘパラン硫酸を分解するヘパラーゼの特異的な阻害物質であることが知られているが, 上記の結果から O-S-CM-キチンⅢはヘパリンに匹敵する強い阻害活性を有すること, さらに, 基底膜に限局して存在し, 転移能と相関することが報告されている IV 型コラーゲンの分解を阻害することは興味深い。しかし, その阻害機序として O-S-CM-キチンⅢが酵素側あるいは基質側のどちらに作用しているか, などについては現在明らかではない。

癌細胞誘導性の血管新生は原発巣および転移巣の癌細胞

図7 癌細胞誘導性の血管新生機序

胞への酸素・栄養供給血管として働くのみならず, その形成された血管を通してさらなる転移の形成に導くことが考えられる。それゆえ新生血管の制御は血行性転移の抑止と密接に関係するものと思われる (図2の①および⑥)。そこで, すでに述べてきた抗転移・浸潤効果を有する O-S-CM-キチンⅢの癌細胞誘導性の血管新生に及ぼす効果についても検討した。キチン誘導体を癌細胞のマウス背部皮内への移植と同時にあるいは移植後1, 3, 7日目に腫瘍内に投与しさらに3日目に腫瘍塊に配向する新生血管数を測定した結果, O-S-CM-キチンⅢを腫瘍移植と同時にあるいは移植後初期すなわち1あるいは3日目に投与した場合に有意な新生血管数の減少を示した。しかし, 後期すなわち7日目の投与では対照群と差異は認められなかった。一方, CM-キチンおよびヘパリンはいずれの投与時期においても抑制効果を示さなかった。その際の腫瘍径には影響が認められなかった。

血管新生の過程は腫瘍塊より遊離した血管新生因子 (angiogenic factor) の刺激を受けて, 周辺組織の毛細血管より出芽した血管内皮細胞が基底膜を破壊・浸潤し, 腫瘍塊への移動と内皮細胞の増殖・分化による管腔形成などの段階により成立していると考えられる (図7)。

組 成	O-S-CM-キチンⅢ	ヘパリン
	N-acetylglucosamine	N-acetylglucosamine + Uronic acid
マウスにおける癌転移		
(実験的肺転移:	↓	↓
自然肺転移:	↓	↓
肺における癌細胞の捕捉:	↓	↓
癌細胞の基底膜浸潤:	↓	↓
癌細胞の移動能:	↓	↓
(接触走化性, ハプトタキシス)		
内皮細胞への接着能:	—	±
細胞外マトリックスへの接着能:	↓	↓
細胞外マトリックスの酵素的分解		
ヘパラーゼ:	↓	↓
IV型コラーゲナーゼ:	↓	—
腫瘍血管新生:	↓	—
血小板凝集/凝固:	±	↓
癌細胞の増殖:	—	—

↓: 抑制   ±: 部分的抑制   —: 効果なし

図8 O-S-CM-キチンⅢおよびヘパリンの生物活性の要約

内皮細胞の基底膜への浸潤は前述の癌細胞の浸潤と同様にトランスウェルチャンバーを用い、さらに下層には癌細胞由来の培養上清(血管新生因子を含むと考えられる)を添加して行なった。培養上清の添加により内皮細胞の浸潤能は未添加の場合に比べて増加したが、O-S-CM-キチンⅢをさらに下層に添加することによりこの増加した内皮細胞の浸潤は有意に抑制された。また、内皮細胞の周辺組織中の細胞外マトリックス(フィブロネクチン)への接触移動能はO-S-CM-キチンⅢを下層に添加することにより濃度依存的に抑制されたが、癌細胞由来の培養上清への化学走性(ケモタキシス)には影響が認められなかった。O-S-CM-キチンⅢは癌細胞の培養上清あるいは血管新生因子の一つとして知られているFGFの刺激下および非刺激下の内皮細胞の増殖にも影響しなかったことから、明らかに血管新生時における血管内皮細胞の腫瘍塊への接触走化性を阻止していることが示唆される(図7)。

以上の結果を図8に要約した。硫酸化キチン誘導体の中で、O-S-CM-キチンⅢは構造上ヘパリンと類似しているにもかかわらず、ヘパリンの生理活性である血小板凝集阻害、凝固系の阻害作用はほとんど認められない。マウスの実験的および自然肺転移モデルにおいて著明な転移抑制効果および腫瘍血管新生の阻害効果が得られた点から、その治療応用として極めて有望であると考えられる。その抑制機構は転移性癌細胞の宿主との相互作用を阻害すること、すなわち、接着性・移動性・浸潤能などの細胞機能を制御することにより転移抑制に導くものと考えられる。さらに癌細胞浸潤プロセスにおける周辺組織(細胞外マトリックス蛋白)の酵素的分解を阻害すること、特に、IV型コラゲナーゼ(メタロプロテアーゼ系)の阻害剤として作用しうるとは興味深い。癌転

移の形成過程は極めて複雑な反応カスケードから成り立っていることから、さらに、詳細な機序を究明することが必要と思われる。

5. おわりに

本稿で紹介した我々の研究は北海道大学理学部の戸倉清一教授、同大学免疫科学研究所の東市郎教授との共同によるものである。最後に本稿執筆の機会を与えて下さった北海道大学工学部の高井光男教授に深謝いたします。

参考文献

- 1) S. Nishimura, S. Tokura, *Int. J. Biol. Macromol.*, **9**, 225 (1987).
- 2) S. Nishimura, N. Nishi, S. Tokura, *Int. J. Biol. Macromol.*, **9**, 305 (1987).
- 3) J. Murata, I. Saiki, S. Nishimura, N. Nishi, S. Tokura, I. Azuma, *Jpn. J. Cancer Res.*, **80**, 866 (1989).
- 4) J. Murata, I. Saiki, K. Matsumoto, S. Tokura, I. Azuma, *Jpn. J. Cancer Res.*, **81**, 506 (1990).
- 5) I. Saiki, J. Murata, M. Nakajima, S. Tokura, I. Azuma, *Cancer Res.*, **50**, 3831 (1990).
- 6) J. Murata, I. Saiki, T. Makabe, Y. Tsuta, S. Tokura, I. Azuma, *Cancer Res.*, **51**, 22 (1991).
- 7) 済木育夫, 米田純也, *実験医学*, **10**(4), 66 (1992).
- 8) L. A. Liotta, C. V. Rao, S. H. Barsky, *Lab. Invest.*, **49**, 636 (1983).
- 9) I. Irimura, M. Nakajima, G. L. Nicolson, *Biochem.*, **25**, 5322 (1986).

(平成4年6月29日受理)

正会員・学生会員会費払込みのお願い

会費をお払込み願う時期になりました。お手数でも事務局から送付いたします振替用紙をご利用のうえお払込みくださいますようお願いいたします。(銀行振込みの場合には会員番号・氏名を必ずご連絡下さい。)

領収書の発行を省略させていただいております。郵便局でご送金の際発行される振込票を各自保管下さいますように。なお当学会の領収証が必要の方には、ご連絡いただければ従来通り発行致します。