◆トピックス◆

アンギオスタチン

浦 野 哲 盟*

Angiostatin

Tetsumei URANO*

Key words: angiostatin, plasminogen, angiogenesis, angiogenesis inhibitor, reductase

はじめに

アンギオスタチンは、担癌マウスの尿中から精製された、転移巣の増殖を抑える生理活性物質で、アミノ酸配列の分析からプラスミノゲン (plg) の分画であり、血管内皮細胞の増殖を特異的に阻害する生理的な血管新生阻害物質であることが示された。1994 年の論文発表¹⁾当初から、血中に高濃度で存在する plg の分解産物が著明な腫瘍増殖抑制作用を示すという事実は多くの注目を集めた。しかし特定の腫瘍を使用したデータしか示されなかったことや、腫瘍組織におけるアンギオスタチンの産生機構が明かでなかったため、その解析が待たれていた。

最近報告された産生機構に関する論文や、種々の異なる腫瘍を用いたデータをまじえ、紹介する。

転移巣の増殖抑制活性を有する尿中物質

アンギオスタチンの発見は、「癌の原発巣を切除すると転移巣が増殖する」という事実を背景として、「原発巣から、転移巣の増殖を抑制する物質が放出されている」という仮説に基づいて

いる。O'Reilly らは肺転移巣を有する Lewis Lung Carcinoma 移植マウスを用いて、原発巣を除去すると転移巣の増殖が観察されるが、原発巣を有するマウスの血清あるいは、濃縮透析尿を腹腔内に投与することによりこれが抑えられる事を示した¹⁾。この増殖抑制活性を有する分画を担癌マウスの尿より精製したところ、マウス plg の 98 番目の Val 以降の配列と 98% 以上の相同性を認める kringle 1-4 (K1-4) (M. W. 38kDa) であることが示され、アンギオスタチンと命名された。この生体内での生成過程は不明であったが、plg はエラスターゼにより、K1-3, K4 および K5-catalytic domain (mini-plg) あるいは K1-4 および mini-plg の各分画に限定分解されることから、エラスターゼ分解による K1-4 を用いてその抗腫瘍効果が検討された。

精製アンギオスタチンの血管新生抑制作用

精製アンギオスタチンは、原発巣の除去に伴う肺転移巣の数と、増殖に伴う肺重量の増加を抑制した (図 1)。また、basic FGF による角膜

* 浜松医科大学第二生理 [〒431-3192 静岡県浜松市半田町 3,600]

Dept. of Physiology, Hamamatsu University School of Medicine, [3,600 Handa-cho, Hamamatsu-shi, Shizuoka 431-3192, Japan.]

図1 原発巣除去後の転移巣増殖に対するアンギオスタチンの全身投与による抑制効果
 原発巣 (Lewis Lung Carcinoma) 除去 (Removed) の肺転移巣の増殖に対する影響を原発巣を残した場合 (Present) と比較して、肺表面転移巣の数 (A) と肺重量 (B) で検討した。更に原発巣除去群に、精製アンギオスタチンあるいは plg を投与 (初回投与 25 μ g, 引き続き 12.5 μ g/20 g mouse/day 13 日間腹腔内投与) し、その効果を検討した。(文献1より許可を得て転載: Copyright Cell Press)

の血管新生および血管内皮細胞 (bovine capillary endothelial cell: BCE) の増殖を抑制した。しかし、plg 分子ではこの抑制は認められなかった。BCE の増殖抑制に K1-4 のいずれの部位が関与するか検討され²⁾、K1-3, K1 にも同様の阻害活性が有り、K4 にはほとんど無いことが示されている。kringle 上のリジン結合部位 (LBS) は K1 と K4 にあることから、血管内皮細胞との結合には LBS は直接には関与していないらしい。興味深いことは、K2 あるいは K3 にも弱い活性があり両者の混合では相加効果が得られるのに、K2-3 では活性はきわめて弱く、K2 と K3 の間のジスルフィド結合が解離するほうが活性が高いことである。後に述べる free SH の関与の可能性を示し、興味深い。また別の報告で K5 にも同様の活性が示されている³⁾。

精製アンギオスタチンの抗腫瘍増殖作用

アンギオスタチンの抗腫瘍作用は上記の血管新生抑制作用によって説明されているが、*in vivo* の投与実験に於いて、異なる種類の移植腫瘍の増殖も抑えることが示された (図2)⁴⁾。エラ

スターゼ分解によって得られた精製ヒトアンギオスタチンの投与により、マウスに移植した、ヒト由来およびマウス由来の腫瘍の増殖を抑制し、これはアポトーシスが細胞増殖速度を上回った結果だとしている。この実験における投与アンギオスタチンの半減期は 4-6 時間とマウスの 72 時間¹⁾ より短い、このグループが最初から提唱している、「原発巣は細胞増殖因子と抑制因子 (アンギオスタチン) を放出するが、後者の半減期は長く、転移巣に有効に働く。」という仮説とは矛盾せず、移植原発巣の増殖も抑えたものと考えられる。

アンギオスタチンの生成機構

アンギオスタチンが腫瘍組織で産生されていることは当初から予想されていたが、腫瘍組織中の plg の mRNA は少なく¹⁾、アンギオスタチンが腫瘍組織で蛋白合成されている可能性は否定的であった。腫瘍細胞による産生は、前立腺癌の培養細胞に plg あるいは plasmin を添加する系で示され、これにはセリン酵素活性が必須である事が示された⁵⁾。一方、腫瘍中のマクロファージ (M Φ) で産生されたメタロエラスター

図2 ヒトおよびマウス腫瘍移植マウスに対する精製アンギオスタチンの効果

図中に示す、3種類づつのヒト由来腫瘍およびマウス由来腫瘍を 1×10^6 cells/mouse 皮下摂取し、精製アンギオスタチン投与 (50 mg/kg, 12時間毎皮下注) 後腫瘍容積 (width²×length×0.52) を経時的に測定した。また治療群とコントロールの腫瘍容積の比を T/C で表わした。(文献4より許可を得て転載: Copyright Nature Medicine)

ゼ (MME) により, plg からアンギオスタチンが産生されるという経路も報告された⁶⁾。これは $M\Phi$ が腫瘍に暴露されると, 腫瘍細胞由来の granyulocyte-macrophage colony stimulating factor の刺激により MME の産生が高まり, これが膵エラスターゼと同様に plg を限定分解するというものである。したがって MME の特異インヒビターや EDTA で抑制されるが, PMSF では抑制されないとしている。

セリン酵素の関与を提唱するグループは更に, 腫瘍細胞で産生される PA (主に uPA) により plg が plasmin に活性化されることが必須であることを変異 plg を用いて証明してい

る⁷⁾。また plasmin 生成後は, SH 供与体の存在下で自己触媒作用でアンギオスタチンに転換されるとしている (図3)。またほかのグループも, HT1080 の培養上清に plg あるいは plasmin を加えることによりアンギオスタチンの産生を確認しており, 後者には細胞から産生される小分子 (3kDa 未満, 恐らく還元グルタチオン) と分子量 3kDa 以上の熱により不活性化される分画 (plasmin reductase?) が必要である事を示した⁸⁾。また plg からの産生は PAI-1 によって抑制されるが plasmin からの産生は抑制されないこと, 更にアプロチニンも産生を抑えることから, PA および plasmin 活性の関与も示唆して

図 3 (a) SH 供与体存在下での plasmin からアンギオスタチンへの転換

plg を uPA sepharose 処理して得られた plasmin を SH 供与体 (N-Acetyl-L-Cysteine: NAC 100 μ M) と反応させるとアンギオスタチンに転換された。

(b) plasmin 産生とその触媒活性がアンギオスタチンの生成に必須である

血漿由来の plg (0.2 μ M) を NAC 存在下で uPA (0.2 nM) と反応させるとアンギオスタチンに転換された (lane 1)。遺伝子組み換え野生型 plg でも (lanes 2 & 3) 同様の結果が得られたが、PA により活性化されない変異型 plg (R 561 A) は転換されなかった (lanes 4 & 5)。更に触媒機能を発現しない変異型 plg (D 646 E) もアンギオスタチンに転換されなかった (lanes 6 & 7)。(文献 7 より許可を得て転載: Copyright National Academy of Sciences, U.S.A.)

いる。このように産生されたアンギオスタチンはエラストラーゼ分解によって得られたものとは異なり、ジスルフィド結合が解離して free の SH を有しており、血管内皮細胞 (human dermal microvascular endothelial cells) の増殖をより

強力に抑制する事を報告している⁸⁾。細胞外での蛋白の還元反応はきわめて珍しく、受容体との結合および血管内皮増殖抑制活性発現に重要な役割を担う可能性がある。更に、腫瘍細胞における uPA の産生量と共に、腫瘍細胞からの SH 供与体の分泌量がアンギオスタチンの産生量を制御している可能性もあり興味深い。

以上のような MME による産生、あるいは uPA と plasmin 活性を要する産生経路のいずれが関与するのか、あるいは両経路共に必要であるのか現時点では定かではない。いずれにしても両経路共腫瘍組織で特異的に働く可能性があり、興味深い。

おわりに

アンギオスタチンに関する最近の文献を紹介した。その産生機構に uPA が関与していることや、free SH を有している事など興味深く、特に後者は、精製アンギオスタチンの効果が、研究施設によって異なっていることの理由の一つであるかも知れない。今後、内皮細胞上のレセプターの同定、その作用機序の解明等、急速な進展が期待される。

文 献

- 1) O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, Chen C, Rosenthal RA, Moses M, Lane WS, Cao Y, Sage EH, Folkman J: Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell* **79**: 315-28, 1994.
- 2) Cao Y, Ji RW, Davidson D, Schaller J, Marti D, Sohndel S, McCance SG, O'Reilly MS, Llinas M, Folkman J.: Kringle domains of human angiostatin. Characterization of the anti-proliferative activity on endothelial cells. *J Biol Chem* **271**: 29461-29467, 1996.
- 3) Cao Y, Chen A, An Ssa, Ji RW, Davidson D, Llinas M.: Kringle 5 of plasminogen is a novel

- inhibitor of endothelial cell growth. *J Biol Chem* **272**: 22924-22928, 1997.
- 4) O'Reilly MS, Holmgren L, Chen C, Folkman J.: Angiostatin induces and sustains dormancy of human primary tumors in mice. *Nature Medicine* **2**: 689-692, 1996.
- 5) Gately S, Twardowski P, Stack MS, Patrick M, Boggio L, Cundiff DL, Schnaper HW, Madison L, Volpert O, Bouck N, Enghild J, Kwaan HC, Soff GA.: Human prostate carcinoma cells express enzymatic activity that converts human plasminogen to the angiogenesis inhibitor, angiostatin. *Cancer Res* **56**: 4887-4890, 1996.
- 6) Dong Z, Kumar R, Yang X, Fidler IJ: Macrophage-derived metalloelastase is responsible for the generation of angiostatin in Lewis lung carcinoma. *Cell* **88**: 801-810, 1997.
- 7) Gately S, Twardowski P, Stack MS, Cundiff DL, Grella D, Castellino FJ, Enghild J, Kwaan HC, Lee F, Kramer RA, Volpert O, Bouck N.: The mechanism of cancer-mediated conversion of plasminogen to the angiogenesis inhibitor angiostatin. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 10868-10872, 1997.
- 8) Stathakis P, Fitzgerald M, Matthias LJ, Chesterman CN, Hogg PJ: Generation of angiostatin by reduction and proteolysis of plasmin. Catalysis by a plasmin reductase secreted by cultured cells. *J Biol Chem* **272**: 20641-20645, 1997.
-