[シンポジウム：癌治療をめざした研究最前線]

浸潤・転移ならびに血管新生阻害作用を有する HGF の 分子内断片 NK4 による癌悪性化阻止

松本 邦夫・中村 敏一

SUMMARY

Hepatocyte growth factor (HGF) exhibits mitogenic, motogenic, morphogenic, and anti-apoptotic activities, through Met/HGF receptor. In a variety of tumor tissues, HGF is involved in malignant behavior of cancers as a mediator in tumor-stromal interaction, enhancing tumor invasion and metastasis. To establish a new strategy to inhibit tumor invasion and metastasis, we prepared an antagonistic molecule for HGF. The antagonist, NK4, is an internal fragment of HGF that encompasses the N-terminal hairpin and four kringle domains. Notably, NK4 inhibits tumor angiogenesis, growth and metastasis, as an angiogenesis inhibitor, as well as HGF-antagonist. *In vitro*, NK4 specifically inhibited tumor invasion induced by HGF. In contrast, NK4 inhibited growth and migration of microvascular endothelial cells induced by basic fibroblast growth factor (bFGF), vascular endothelial cell growth factor (VEGF), and HGF. NK4 inhibited bFGF-induced angiogenesis in rabbit cornea. We concluded that NK4 is bifunctional: it is HGF-antagonist and angiogenesis inhibitor. When the anti-tumor activity of NK4 was examined in murine metastatic tumors, Lewis lung carcinoma, administration of NK4 suppressed the growth of primary tumors subcutaneously implanted in mice, and decreased the number of metastatic nodules in the lung. NK4 suppressed neovascularization of tumor cells. Likewise, NK4 inhibited invasion, tumor angiogenesis, peritoneal dissemination, and liver metastasis of pancreatic cancer. The bifunctional properties of NK4 to act as an angiogenesis inhibitor and as a HGF antagonist raises possibility that NK4 may prove a therapeutic for cancer patients.

Key words: HGF, HGF-antagonist, metastasis, NK4, tumor angiogenesis.

序 論

癌細胞の浸潤・転移能といった悪性形質は癌細胞とそれを取り囲む宿主間質細胞との相互作用、癌-間質相互作用により賦与されることが古くから知られていた。私達は癌-間質相互作用を HGF (hepatocyte growth factor) を中心に解析した結果、多くの癌細胞が宿主間質細胞(線維芽細胞)に対して HGF の産生を高める HGF-誘導因子を

分泌する一方、間質に由来する HGF は癌細胞の浸潤能を著しく促進する宿主因子であることを見出した (Fig. 1)¹⁻⁴⁾。これに基づき HGF の作用をブロックすることが新しい制癌法につながるものと考え、HGF アンタゴニストの調製を行った^{5,6)}。得られた HGF アンタゴニスト (NK4) は4個のクリングルドメインを有する HGF の分子内断片である。その後、予期せずこの分子内断片 NK4 が HGF アンタゴニスト活性とは独立に、強力な血管新生

Suppression of tumor malignancy by NK4, a four-kringle fragment of HGF, that inhibits invasion-metastasis and angiogenesis.

Kunio Matsumoto, Toshikazu Nakamura; 大阪大学大学院医学系研究科バイオメディカル教育研究センター腫瘍医学部門腫瘍生化学研究部

Correspondence address: Toshikazu Nakamura, Division of Biochemistry, Department of Oncology, Biomedical Research Center, Osaka University Graduate School of Medicine, 1-7, Yamadaoka, Suita, 565-0871, Japan.

略号一覧: bFGF, basic fibroblast growth factor; HGF, hepatocyte growth factor; VEGF, vascular endothelial cell growth factor.

第 50 回日本電気泳動学会総会・シンポジウム

Fig. 1. Mutual interaction between tumor cells and stromal fibroblasts, as mediated by the HGF-HGF-inducer loop.

阻害作用をもつことを見出した。浸潤・転移阻止ならびに腫瘍血管新生阻止といった癌の悪性化を阻止することは癌治療の飛躍的な向上につながるものと予想され、NK4が新しい制癌剤となることが期待される。

NK4の構造

私達は HGF を肝細胞に対する増殖因子として発見・単離・クローニングした⁷⁻¹⁰⁾。HGF は 69 kD の α 鎖と 34 kD の β 鎖からなるヘテロダイマーで、 α 鎖は N 末端からヘアピンドメインとクリングルドメインと呼ばれる特徴的構造を 4 個有している (Fig. 2 A)⁸⁾。クリングルドメインは当初、血液凝固・線溶に与するセリンプロテアーゼに見出されたものであり、HGF は 5 個のクリングルドメインをもつプラスミノゲンと一次構造において 38% の相同性を有している (Fig. 2 C)。一方、HGF のシグナルを伝えるレセプターは Met レセプターチロシンキナーゼであるが、HGF 分子内で Met/HGF レセプターへの特異的結合を担っている領域は N 末端ヘアピンと、それに続く 1 個もしくは 2 個のクリングルドメインをもつ領域 (それぞれ NK1 ならびに NK2) である。

NK4 は当初 HGF 分子をエラスターゼで消化した断片から精製され、その構造解析から、NK4 は HGF の α 鎖全域から C 末端の 16 アミノ酸を欠いたもので、N 末端ヘアピンと 4 個のクリングルドメインを有することが明らかにされた (Fig. 2 A)。したがって NK4 は Met/HGF レセプターへの結合に与する領域 (NK1, NK2) を含み、HGF の約 1/10 の親和性で Met/HGF レセプターに結合するものの、それ自身レセプターのチロシンリン酸化を引き起こすことなく、HGF の競合的アンタゴニストとして

Fig. 2. (A) Schematic structures of HGF and NK4. (B) Schematic presentation of NK4 as HGF-antagonist. NK4 competitively binds to Met/HGF receptor, whereas it does not activate the receptor, thereby inhibits activation of Met by HGF. (C) Structural similarity between angiotensin and NK4.

作用する (Fig. 2 B)。一方、Met/HGF レセプターへの結合ドメインからなる NK1 や NK2 はともに Met/HGF レセプターに結合するとともに、細胞増殖・遊走促進活性を有するアゴニストとして作用する¹¹⁻¹³⁾。すなわち、N 末端ヘアピンとともに 4 個のクリングルドメインをもつことが HGF アンタゴニスト活性をもつ上で重要である。

NK4 による浸潤阻害

Fig. 3 A に HuCC-T1 ヒト胆管癌細胞の Met/HGF レセプターのリン酸化に対する NK4 の阻害作用を示す。癌細胞の培養系に HGF (110 pM) を添加すると Met/HGF レセプターのチロシンリン酸化が認められるが、NK4 は濃度依存的にチロシンリン酸化を阻害し、1000 倍の濃度で Met/HGF レセプターのチロシンリン酸化をほぼ完全にブロックした¹⁴⁾。しかしながら NK4 を単独で添加しても Met/HGF レセプターのチロシンリン酸化は認められ

Fig. 3. Competitive inhibition of HGF-induced Met receptor tyrosine phosphorylation by NK4 (A) and inhibition of HGF-induced tumor invasion in collagen gel matrix by NK4 (B).

NK4 competitively inhibited tyrosine phosphorylation of Met receptor in (A). HGF (110 pM) induced *in vitro* invasion of carcinoma cells, whereas NK4 (110 nM) inhibited HGF-induced tumor invasion in (B). GB-d1, human gallbladder carcinoma; HuCC-T1, human cholangiocellular carcinoma; PC-3, human lung adenocarcinoma; ME-180, human cervical epidermoid carcinoma.

ない。すなわち NK4 は HGF によって活性化される Met/HGF レセプターのチロシンリン酸化を競合的に阻害する。一方、各種癌細胞をコラーゲンゲル内で培養した際の HGF による浸潤ならびに NK4 による浸潤阻害を示す¹⁴⁾。HGF 存在下において癌細胞はコラーゲンゲルを分解しながら活発にゲル内に浸潤するが、NK4 は HGF による癌浸潤をほぼ完全に阻害する (Fig. 3 B)。

NK4 の血管新生阻害作用

NK4 が調製されたことにより、癌の浸潤・転移阻止を目的として HGF アンタゴニストを調製するという当初の

目的は達成された。ところが、血管内皮細胞に対する NK4 の作用を調べた結果、驚いたことに NK4 は HGF アンタゴニスト活性とは別に血管新生阻害作用を有することを見い出した。Fig. 4 A に血管内皮細胞の増殖に対する NK4 の作用を示す。HGF は basic fibroblast growth factor (bFGF) や vascular endothelial cell growth factor (VEGF) などと同様に強力な血管新生促進活性をもち、ヒト微小血管内皮細胞の増殖を促進する一方、NK4 は HGF の増殖促進活性を阻害する。NK4 は HGF のアンタゴニストであり、この結果は予想されたものである。ところが、bFGF や VEGF も血管内皮細胞の増殖を促すけれ

A

B

Fig. 4. Inhibitory effect of NK4 on vascular endothelial cell proliferation (A) and bFGF-induced angiogenesis in rabbit cornea (B).

NK4 (300 nM) almost completely inhibited proliferation of human microvascular endothelial cells in the presence of 3 ng/ml bFGF, 3 ng/ml VEGF, and 10 ng/ml HGF in (A). In rabbit cornea, bFGF induced neovascularization, but NK4 strongly inhibited bFGF-induced angiogenesis.

ども、NK4はbFGFやVEGFの増殖促進活性をも同様にほぼ完全に阻害する (Fig. 4 A)。さらに血管新生誘導には内皮細胞の増殖とともに遊走を促進することが必須であるが、NK4は増殖に対する作用と同様にHGFのみならずbFGFやVEGFによって促進される血管内皮細胞の遊走をもほぼ完全に阻害する。これらの結果は、NK4がHGFアンタゴニスト活性とは独立に血管新生阻害作用をもつことを強く示唆していた。そこで、他の血管内皮細胞ならびに非血管内皮細胞に対するNK4の作用を調べた結果、NK4はbFGFやVEGFによって促進される各種血管内皮細胞の増殖を阻害したのに対して、bFGFによって促進される非血管内皮細胞の増殖には無効であった。したがって、NK4は血管内皮細胞に対して特異的に増殖・遊走阻害活性を有している。ただし、NK4はHGFに対するアンタゴニスト活性をもっており、血管内皮細胞、非血管内皮細胞を問わず、HGFによって引き起こされる増殖や遊走をブロックする。

上記の結果に基づき、次にNK4が*in vivo*において血管新生阻止能を有するかを検討した。Fig. 4 Bにウサギ角膜アッセイの結果を示す。bFGFを含むペレットを角膜下に移植すると、bFGFに向かって活発な血管新生が誘導される。これに対して、bFGFとともにNK4を染み込ませておくと、NK4はbFGFによって引き起こされる*in vivo*での血管新生を強く阻害する。一方、NK4による血管新生阻害作用の分子機構は不明であるが、おそらく、血管内皮細胞にはc-Met/HGFレセプターとは異なる何らかのNK4に対するレセプター様分子が存在し、このレセプタ

様分子からのシグナルが血管新生につながる情報伝達系をブロックしているものと予想される。

ところでJ. Folkmanらは、1994年に担癌マウスの血液および尿中から血管新生阻害作用をもつ因子を分離し、アンジオスタチンと名付けた¹⁵⁾。アンジオスタチンはプラスミノゲンの分子内断片であり、NK4と同様4個のクリングルドメインをもつ (Fig. 1 C)。したがってNK4とアンジオスタチンの血管新生阻害活性にはクリングルドメインを介した共通のメカニズムが関与する可能性もあるけれども、私達の検討では内皮細胞に対する阻害作用に両者で違いがあることから、NK4はアンジオスタチンと異なるメカニズムで血管新生阻害作用を発揮するのではないかと予想している。

NK4による癌治療

NK4による血管新生阻害作用の詳細なメカニズムの解明が残されているものの、血管新生阻害作用に加え、癌の浸潤を強力に阻害するNK4の2面的活性はNK4が他に類のない新しい制癌剤となることを示唆していた。私達はいくつかの癌細胞を用いてNK4の制癌効果を調べたところ、NK4は腫瘍血管新生を阻害し、癌の成長を抑制するとともに癌の浸潤・転移をも阻害することを見出した¹⁴⁾。

Lewis 肺癌をヌードマウス背部皮下に移植し、移植後5日目から浸透圧ポンプを用いて移植癌近傍にNK4を持続的に投与した (Fig. 5 A)。その結果、NK4を投与したマウスでは癌の成長がコントロールの約30%に抑制された。

Fig. 5. Inhibition of tumor angiogenesis, growth and lung metastasis of Lewis lung carcinoma by NK4.

(A) Suppression of tumor growth by NK4. (B) Inhibition of tumor angiogenesis by NK4. (C) Inhibition of lung metastasis of the tumor by NK4. Murine Lewis lung carcinoma cells were subcutaneously implanted into nude mice and NK4 was administered into mice, using osmotic mini-pump from the 5th day for 2 weeks after the implantation.

そこで、NK4が癌細胞の増殖を阻害することによって癌の成長を抑制しているのか、あるいは癌細胞のアポトーシスを促進することによって癌の成長を抑制しているのかをそれぞれPCNA染色ならびにTUNEL染色によって調べた。その結果、NK4を投与した癌組織では癌細胞のアポトーシスが増加していた。NK4は直接癌細胞のアポトーシスを促進しないことから、NK4によるアポトーシスの増加はNK4により腫瘍血管新生が阻害された結果であると考えられた。実際に癌組織内の血管を解析した結果、NK4を投与したマウス癌組織では血管の数が減少しており (Fig. 5 B)、しかも血管の多くは血管径の小さい微小な血管であった。したがって、NK4はその血管新生阻害活性によって腫瘍血管新生を阻害し、癌細胞のアポトーシス増加、ひいては癌の成長抑制を示したと考えられる。さらに、生理食塩水を投与したコントロールのマウスでは、移植後28日目において多数の肺転移が認められたが、NK4は肺への遠隔転移を強力に抑制した (Fig. 5 C)。このようなNK4による強力な転移阻害は、NK4の2面的活性、すなわち浸潤阻止ならびに腫瘍血管新生阻害によってもたらされたものと思われる。また、NK4による浸潤阻害ならびに腫瘍血管新生阻害はヌードマウスに移植した胆のう癌¹⁴⁾や乳癌でも同様に認められたほか、NK4は脾臓癌の同所移植モデルにおいて、腹膜への播種性転移ならびに腹水の貯留を強く抑制した。

考 察

癌細胞を直接殺すという発想に基づく制癌戦略にはもはや限界があることが広く認識されている。これに対して、

いくつかの血管新生阻害剤が新しい制癌剤として期待され、現在すでに臨床治験の段階にある。腫瘍血管新生阻止を目的とした制癌剤がどのような癌に対してどのような制癌効果を示すか、その詳細は不明であるが、今後、腫瘍血管新生阻害剤が制癌剤として広く使用される日が来るものと予想される。一方、NK4は浸潤・転移阻止ならびに腫瘍血管新生阻止という同一分子で2役を演ずる。従来の制癌戦略とは全く異なり、いわば癌の悪性化阻止を標的とする新しい制癌剤となる可能性が高い。しかも癌-間質相互作用を介した癌の浸潤・転移阻止能はNK4が腫瘍血管新生阻害のみを標的とした制癌剤をも凌駕する可能性を示唆している。NK4がどのように血管新生を阻害するかという疑問が残されているものの、多くの癌は今なお、死の恐怖から解放されることのない病であり、一刻も早くNK4が癌治療の現場に登場できるよう準備を進めている。

文 献

- 1) Matsumoto K, Date K, Shimura H, Nakamura T. Acquisition of invasive phenotype in gallbladder cancer cells via mutual interaction of stromal fibroblasts and cancer cells as mediated by hepatocyte growth factor. *Jpn J Cancer Res* 1996; 87: 702-10.
- 2) Hasina R, Matsumoto K, Matsumoto-Taniura N, Kato I, Sakuda M, Nakamura T. Autocrine and paracrine motility factors and their involvement in invasiveness in a human oral carcinoma cell line. *Br J Cancer* 1999; 80: 1708-17.
- 3) Matsumoto-Taniura N, Matsumoto K, Nakamura T. Prostaglandin production in mouse mammary tumour cells confers invasive growth potential by

- inducing hepatocyte growth factor in stromal fibroblasts. *Br J Cancer* 1999; 81: 194-202.
- 4) Nakamura T, Matsumoto K, Kiritoshi A, Tano Y, Nakamura T. Induction of hepatocyte growth factor in fibroblasts by tumor-derived factors affects invasive growth of tumor cells: In vitro analysis of tumor-stromal interactions. *Cancer Res* 1997; 57: 3305-13.
 - 5) Date K, Matsumoto K, Shimura H, Tanaka M, Nakamura T. HGF/NK4 is a specific antagonist for pleiotropic actions of hepatocyte growth factor. *FEBS Lett* 1997; 420: 1-6.
 - 6) Matsumoto K, Kataoka H, Date K, Nakamura T. Cooperative interaction between α - and β -chains of hepatocyte growth factor on c-Met receptor confers ligand-induced receptor tyrosine phosphorylation and multiple biological responses. *J Biol Chem* 1998; 273: 22913-20.
 - 7) Nakamura T, Nawa K, Ichihara A. Partial purification and characterization of hepatocyte growth factor from serum of hepatectomized rats. *Biochem Biophys Res Commun* 1984; 122: 1450-9.
 - 8) Nakamura T, Nishizawa T, Hagiya M, Seki T, Shimonishi M, Sugimura A, Tashiro K, Shimizu S. Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor. *Nature* 1989; 342: 440-3.
 - 9) Matsumoto K, Nakamura T. Emerging multipotent aspects of hepatocyte growth factor. *J Biochem* 1996; 119: 591-600.
 - 10) Matsumoto K, Nakamura T. Hepatocyte growth factor as a tissue organizer for organogenesis and regeneration. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 239: 639-44.
 - 11) Hartmann G, Naldini L, Weidner KM, Sachs M, Vigna E, Comoglio PM, Birchmeier W. A functional domain in the heavy chain of scatter factor/hepatocyte growth factor binds the c-Met receptor and induces cell dissociation but not mitogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 11574-8.
 - 12) Lokker NA, Mark MR, Luis EA, Bennett GLK, Robbins KA, Baker JB, Godowski PJ. Structure-function analysis of hepatocyte growth factor: Identification of variants that lack mitogenic activity yet retain high affinity receptor binding. *EMBO J* 1992; 11: 2503-10.
 - 13) Schwall RH, Chang LY, Godowski PJ, Kahn DW, Hillan KJ, Bauser KD, Zioncheck TF. Heparin induces dimerization and confers proliferative activity onto the hepatocyte growth factor antagonists NK1 and NK2. *J Cell Biol* 1996; 133: 709-18.
 - 14) Date K, Matsumoto K, Kuba K, Shimura H, Tanaka M, Nakamura T. Inhibition of tumour growth and invasion by a four-kringle antagonist (HGF/NK4) for hepatocyte growth factor. *Oncogene* 1998; 17: 3045-54.
 - 15) O'Reilly M, 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* 1994; 79: 315-28.