

63 ヒト卵巣癌におけるトリプシノーゲン遺伝子の発現および蛋白の局在に関する研究

横浜市立大学、同第2病理*、同木原生物化学研究所細胞生物学部門**、神奈川県がんセンター***
宮城悦子、平原史樹、仲沢経夫、長嶋洋治*、宇田川香織、小野瀬亮***、五来逸雄、水口弘司、宮崎香**

[目的]癌の浸潤、転移の過程で細胞外マトリックスを分解するプロテアーゼが重要な役割を果たしていると考えられている。われわれは、卵巣粘液性腺癌由来培養細胞株(MCAS)が、従来報告されている種々のマトリックスプロテアーゼに加え、消化酵素であるトリプシノーゲンを分泌していることを見出した。今回、卵巣癌の進展におけるトリプシンの関与を明らかにするために、細胞株と臨床検体を用いてトリプシノーゲン遺伝子発現および蛋白の局在を検討した。[方法]卵巣癌由来培養細胞株よりtotal RNAを抽出し、Northern blot法およびRT-PCRにより増幅した産物のSouthern blot法によりトリプシノーゲン遺伝子発現を検討した。手術時に採取した臨床検体における遺伝子発現をNorthern blot法により確認した。トリプシノーゲン蛋白の局在は、抗ヒトトリプシン/トリプシノーゲンモノクローナル抗体を用いて、卵巣癌組織の免疫染色法により検討した。[成績]培養細胞株5株のNorthern blot法による分析では、MCAS細胞のみで遺伝子発現を認めたが、RT-PCR-Southern blot法ではすべての細胞株で遺伝子発現がみられた。一方、臨床検体のNorthern blot法では、10例中8例に遺伝子発現が認められ、特に進行癌組織で強い発現がみられた。また、免疫染色法ではトリプシノーゲン/トリプシン蛋白は卵巣癌組織の癌細胞に局在していた。[結論]トリプシノーゲン遺伝子は、細胞株に於ても発現が認められるが、癌組織自体でより強く発現しており、強い蛋白分解活性を有するトリプシンが、in vivo における卵巣癌の浸潤、転移に関与していることが示唆された。

64 新規転移抑制剤 urinary trypsin inhibitor (UTI) の化学修飾による転移抑制活性増強の試み

浜松医大
山下美和、小林 浩、稲垣 誠、茂庭将彦、平嶋泰之、篠原弘光、小林隆夫、寺尾俊彦

[目的]我々は羊水およびヒト尿から精製された urinary trypsin inhibitor (UTI) に癌細胞の浸潤、転移抑制作用のあることを証明し、その活性基はUTI分子のCOOH末端のHI-8に存在することも確認した。そこでHI-8を効率よく癌細胞に結合させ、浸潤、転移抑制作用を増強させるための工夫を行い、人体投与可能な薬剤の開発を行った。[方法](1)UTIはヒト尿より精製し、HI-8はtrypsinによる限定分解により精製した。(2)癌細胞膜に存在するurokinase receptorに特異的に結合させる目的で、urokinaseを限定分解し、receptorの結合部位であるamino terminal fragment(ATF)を精製し、これとHI-8を共有結合させたhybrid protein(ATF-HI-8)を作成した。(3)癌細胞のin vitro invasion assayはMatrigelを用いたBoyden chamberにより行った。(4)in vivo metastasis assayはnude miceに癌細胞を皮下移植した系と、尾静脈から静注した系を用いた。(5)癌細胞膜のurokinase receptorの数および親和性とATF-HI-8の効果について検討した。[結果]ATFとHI-8を結合させるために架橋剤(SPDP)を用いて合成したが、その収率は約20%であった。ATF-HI-8はHI-8単独に比べて10から250倍以上の低濃度で癌細胞の浸潤を抑制した。この作用は癌細胞膜のurokinase receptorの数と関連した。ATF-HI-8はreceptorに結合した後、internalizeしないため約5時間以上も癌細胞膜上に存在した。nude miceによるin vivo metastasis assayの結果も少量のhybrid proteinで転移が抑制された。[結論]ATF-HI-8のhybrid proteinを使用することによりin vitroおよびin vivoで転移抑制に成功した。