

D-41

EMMPRIN部分ペプチドによるEMMPRIN活性 (MMP産生、浸潤増強) の抑制

鮫島哲朗¹、鍋島一樹²、北條裕信³、中原義昭³、岡田保典⁴、脇坂信一郎¹、河野正² (1宮崎医大脳神経外科、2同病理、3東海大工学工業化学、4慶應医病理)

【目的】EMMPRIN(CD147/旧名TCSF)は免疫グロブリン(Ig)スーパーファミリーに属す膜蛋白で、通常癌細胞に発現し、間質細胞からのMMP-1, 2, 3, MT1-MMPの産生を刺激する。活性型分子量は40~58kDaで、N-glycosylation (N-gly)の存在が機能発現に重要と考えられている。我々は既にEMMPRINはヒトglioma組織で高発現し、その程度は組織学的悪性度と相関すること、*in vitro*ではglioma細胞は発現したEMMPRINを介して脳由来線維芽細胞からのMMP-2、MT1-MMPの産生を刺激することを報告した。今回、EMMPRIN活性部位を含む細胞外第1免疫グロブリンドメイン(EC1)由来のペプチドを用いて、EMMPRINによるMMP産生、腫瘍細胞浸潤増強作用に対する阻害効果と、EMMPRIN機能発現における糖鎖の重要性について検討した。

【方法】EC1由来の4本のペプチド(EMP#1-4)を用いて、glioma細胞株(EMMPRIN positive)と脳由来線維芽細胞(EMMPRIN negative)とのco-cultureにおけるMMP-2及びMT1-MMPの発現増強作用および両細胞存在下でのmatrigel浸潤増強作用に対する阻害効果を検討し、EC1+GlcNAc、EC1+(GlcNAc)₂を用いて線維芽細胞からのMMP産生刺激を検討した。

【結果と考察】作成したペプチドの中で、N-gly部位を含む20アミノ酸より成るEMP-2のみが、濃度依存性にEMMPRINによるMMP-2、MT1-MMPの産生増強活性を阻害し、線維芽細胞共存下でのglioma細胞の浸潤を30 µg/mlで63%、65 µg/mlで73%抑制した。EMP-2のN-gly部位を含む前半10アミノ酸では阻害活性は失われた。EC1には線維芽細胞からのMMP産生刺激は無いが、EC1+GlcNAcにて約5倍、EC1+(GlcNAc)₂にて約8.5倍のMMP-2産生増強効果を認めた。EMMPRIN活性発現における糖鎖の重要性とN-gly部位を含むペプチドによる制御の可能性が示唆された。

Inhibition of EMMPRIN-induced enhancement of MMP production and glioma cell invasion by EMMPRIN-derived peptides
Tetsuro Sameshima, Kazuki Nabeshima, Hironobu Hojo, Yoshiaki Nakahara, Yasunori Okada, Shinichiro Wakisaka, Masashi Koono.
Department of Neurosurgery and Pathology, Miyazaki Medical College; Department of Industrial Chemistry, Tokai University; Department of Pathology, Keio University School of Medicine

D-42

Marimastat による胃癌腹膜播種抑制と血管新生阻害

慶應義塾大学医学部 外科¹、同・病理²

和田則仁¹、大谷吉秀¹、亀山香織²、岡田保典²、久保田哲朗¹、皆川彰子¹、木全大¹、横山剛義¹、五十嵐直喜¹、桜井嘉彦¹、古川俊治¹、熊井浩一郎¹、北島政樹¹

【目的】私どもは matrix metalloproteinase (MMP) 阻害剤により胃癌腹膜播種が抑制されることを明らかにしてきた (Jpn J Cancer Res 90, 116, 1999; J Jpn Surg Soc 100, 363, 1999)。しかしながら、その機序については不明な点が多い。そこで、MMP 阻害剤、marimastat を用いて、その血管新生阻害作用に着目し腹膜播種抑制機序の解明を試みた。

【方法】5週齢の雄性 SCID マウスに、ヒト胃低分化型腺癌細胞株 TMK-1 1.0×10^6 を腹腔内投与し腹膜播種モデルを作製した。約 1~2mm 大の結節が形成される7日目に皮下植え込み型ポンプを用いて治療群 (n=5) には marimastat 27 mg/kg/day を、対照群 (n=5) には同量の溶媒 50% DMSO を持続皮下投与した。21日目に犠牲死させ、腹膜播種結節の検討を行った。血管新生の評価は、ラット抗マウス CD31 抗体による免疫染色法で播種結節内の微小血管を同定し、その密度 (MVD) をもって行った。なお、測定には両群とも約 5mm 大の播種結節を用いた。また *in vitro* の系として、TMK-1 と血管内皮細胞 HUVEC の共培養を行った。表記には mean ± SD、統計処理には Student's *t* test を用いた。

【結果】血清中の marimastat 濃度は $1.18 \pm 0.32 \mu\text{M}$ であった。結節総重量 (g/body) は治療群 0.16 ± 0.08 、対照群 0.40 ± 0.18 と治療群で有意 ($P=0.026$) な腹膜播種抑制がみられた。結節数 (count/body) についてもそれぞれ 9.4 ± 3.8 vs. 18.2 ± 6.8 と有意 ($P=0.036$) に少数であった。結節重量と結節中 marimastat 濃度に負の相関を認めた。MVD (count/mm²) は治療群で 61.2 ± 14.3 、対照群で 82.0 ± 8.8 と、治療群で有意 ($P=0.024$) に低値であった。Film *in situ* zymography では、治療群で gelatinase 活性の阻害が認められた。*In vitro* では、TMK-1 の VEGF 産生を ELISA により確認した。TMK-1 と HUVEC を共培養し培養上清を gelatin zymography で検討すると、marimastat 添加により proMMP-2 のバンドが増強し、MMP-2 が減弱した。

【考察】治療群において腹膜播種の抑制が認められ、微小血管密度の低下を伴っていたことから、marimastat の抗腫瘍効果には血管新生阻害が関与している可能性が示唆された。Marimastat は MT1-MMP の阻害活性も有することから、MMP-2 の活性化も抑え血管新生を阻害していると考えられた。

Inhibition of Angiogenesis in Peritoneal Dissemination Model of Human Gastric Cancer by Marimastat.

Norihito Wada¹, Yoshihide Otani¹, Kaori Kameyama², Yasunori Okada², Tetsuro Kubota¹, Akiko Minagawa¹, Masaru Kimata¹, Takeyoshi Igarashi¹, Naoki Igarashi¹, Yoshihiko Sakurai¹, Toshiharu Furukawa¹, Koichiro Kumai¹, Masaki Kitajima¹
Departments of Surgery¹ & Pathology², School of Medicine, Keio University, Tokyo 160-8582, Japan