

癌浸潤転移・腫瘍血管新生抑制能をもつクリングル融合蛋白質による 制癌技術の確立

A New Anti-Tumor Strategy Using Kringle-Fusion Protein, Capable of Inhibiting Invasion, Metastasis, and Angiogenesis

松本邦夫

Kunio Matsumoto

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助教授
Associate Professor, Division of Biochemistry, Biomedical Research Center,
Osaka University Graduate School of Medicine

Hepatocyte growth factor (HGF) is involved in malignant behavior of cancers as a mediator in tumor-stromal interaction, through enhancing tumor invasion and metastasis. To establish a new therapeutic strategy to inhibit tumor invasion and metastasis, we prepared an antagonistic molecule for HGF. The antagonist, NK4, is an internal fragment of HGF that encompassing the N-terminal hairpin and subsequent four kringle domains. Notably, we found that is an angiogenesis inhibitor, as well as HGF-antagonist. When the anti-tumor activity of NK4 was examined in murine metastatic lung carcinoma, administration of NK4 suppressed tumor angiogenesis and the growth of primary tumors subcutaneously implanted in mice, and decreased the number of metastatic nodules in the lung. Moreover, NK4 had therapeutic effect on the most malignant tumor, pancreatic cancer, in mice. NK4 inhibited, tumor angiogenesis, peritoneal dissemination, accumulation of ascites, 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.

1. 研究目的

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-インデューサーを分泌する一方、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(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なった(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阻害作用をもつことを見出した。本研究はクリングルドメインを有する分子 NK4 を用いて、癌悪性化阻止に根ざす新しい制癌技術を確立する目的で行われた。

2. 研究経過ならびに研究成果

2.1 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 69kD の α 鎖と 34kD 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に続き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(図1A)7)。クリングルドメインは当初、血液凝固・線溶に関与するセリンプロテアーゼに見いだされたものであり、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(図1C)。一方、HGF のシグナルを伝えるレセプターは c-Met レセプターチロシンキナーゼであるが、HGF 分子内で c-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。

さて、NK4 は当初 HGF 分子をエラストラ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(図1A)。したがって NK4 は c-Met / HGF レセプターへの結合に関与する領域(NK1, NK2)を含み、HGF の約 1/10 の親和性で c-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作用する(図1B)。では c-Met / HGF レセプターへの結合ドメインからなる NK1 や NK2 も HGF アンタゴニストとして機能するのだろうか? 実は

そうではない。NK1 ならびに NK2 はともに c-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 末端へアピンとともに 4 個のクリングルをもつことが HGF アンタゴニスト活性をもつ上で重要である。

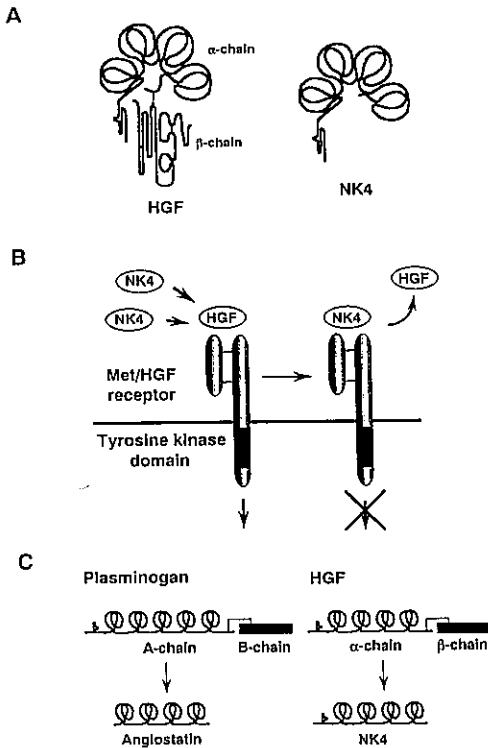


図 1 (A) HGF と NK4 の構造。(B) HGF アンタゴニストとしての NK4。NK4 は Met / HGF レセプターに結合するもののレセプターを活性化せず、HGF によるレセプターの活性化を競合的に阻害する。(C) プラスミノゲンと HGF ならびにアンジオスタチンと NK4 の構造的類似性。

2.2 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いえる。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出した。図 2 に血管内皮細胞の増殖ならびに DNA 合成に対する NK4 の作用を示す。HGF は bFGF や 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 (図 2 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、他の血管内皮細胞や非血管内皮細胞の増殖に対する 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が、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。

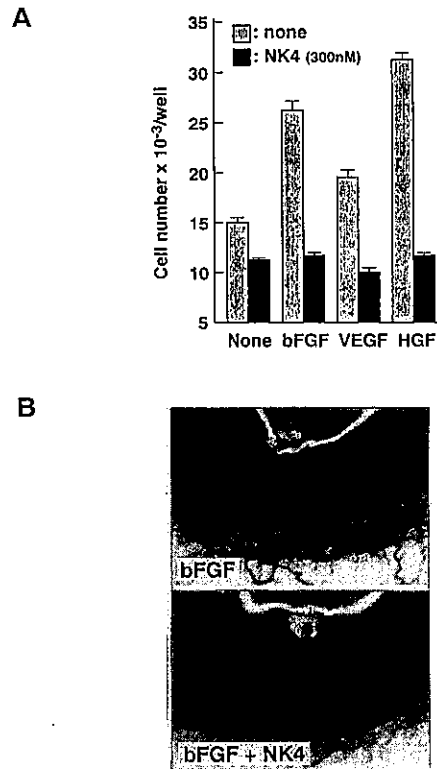


図 2 (A) NK4 による血管内皮細胞の増殖阻害。NK4 (300nM) は bFGF、VEGF、HGF などの血管新生因子によって促進されるヒト微小血管内皮細胞の増殖を阻害する。(B) ウサギ角膜系での NK4 の血管新生阻害。NK4 は bFGF によって誘導される *in vivo* での血管新生を強く抑制する。

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。図 2 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、NK 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。また、*in vivo* における NK4 の血管新生阻害作用はニワトリ漿羊膜 (CAM) アッセイにおいても認められている。では、NK4 はどのようなメカニズムで血管新生阻害作用を発揮するのであろうか？ 図3に私達が想定している NK4 による血管新生阻害作用のモデルを示す。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、このレセプター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及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 (14)。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 (図 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。ただし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。

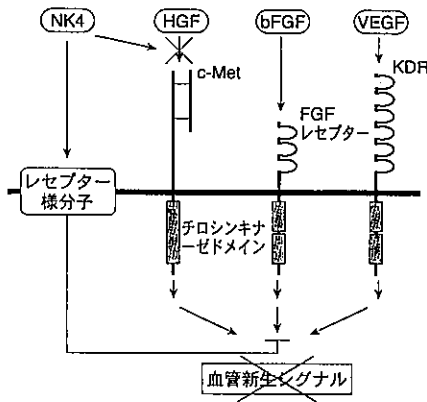


図3 予想されるNK4による血管新生阻害機構。

2.3 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 (15)。

冒頭で述べたように、HGFは宿主間質由来の因子として様々な癌の浸潤を促進する。図4に各種癌

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 (15)。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。

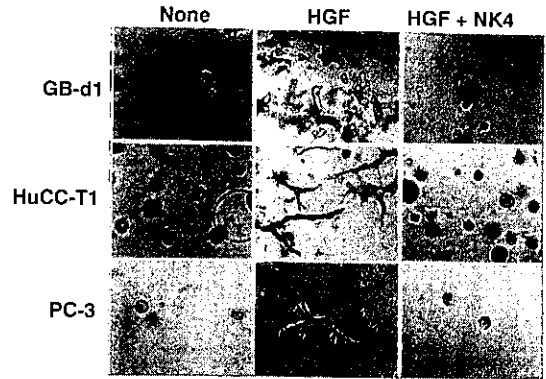


図4 NK4による癌細胞の浸潤阻害。HGF (110pM)はGB-d1 (ヒト胆のう癌)、HuCC-T1 (ヒト胆管癌)、PC-3 (ヒト肺癌)細胞のコラーゲンゲル内浸潤を促すが、NK4 (110nM)はHGFによって引き起こされる癌細胞の浸潤をほぼ完全にブロックする。

では、NK4は*in vivo*においても癌の浸潤や腫瘍血管新生をブロックするか？ヌードマウスに癌を移植し、NK4の効果調べた。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 (図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。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、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 (図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 (15) や乳癌でも同様に認められた他、NK4 は膵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。

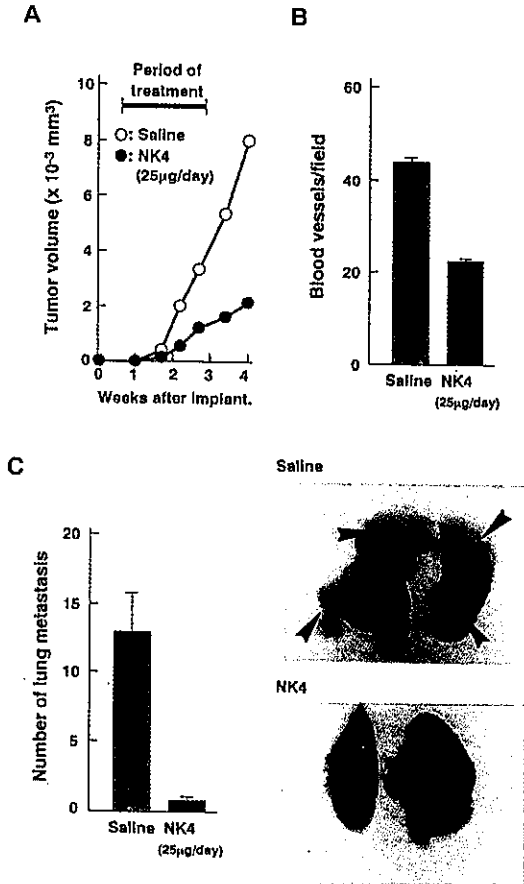


図5 Lewis 肺癌に対する NK4 の制癌作用の。Lewis 肺癌をマウス背部皮下に移植後、5 日目から NK4 を浸透圧ポンプを使って 2 週間投与した (A)。NK4 は腫瘍血管新生を阻害し (B)、その結果癌の成長を抑制するとともに (A)、肺への遠隔転移を強く阻害した (C)。

3. 今後の課題と発展

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。腫瘍血管新生阻害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・転移阻害ならびに腫瘍血管新生阻害という同一分子で 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。

参考文献

- 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* 87, 702-710 (1996)
- 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* 80, 1708-1717 (1999)
- 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* 81, 194-202 (1999)
- 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* 57, 3305-3313 (1997)
- 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* 420, 1-6 (1997)
- 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* 273, 22913-22920 (1998)
- Nakamura T, Nawa K, & Ichihara A. Partial purification and characterization of hepatocyte growth factor from serum of hepatectomized rats. *Biochem Biophys Res Commun* 122, 1450-1459 (1984)
- Nakamura T, Nishizawa T, Hagiya M, et al. Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor. *Nature* 342, 440-443 (1989)
- 中村敏一、荻原俊男監修 HGF の分子医学 (メディカルレビュー社、東京、1998 年)
- Matsumoto K, & Nakamura T. Hepatocyte growth factor as a tissue organizer for organogenesis and regeneration. *Biochem Biophys Res Commun* 239, 639-644 (1997)
- Hartmann G, Naldini L, Weidner KM, et al. 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* 89, 11574-11578 (1992)
- 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* 11, 2503-2510 (1992)
- Schwall RH, Chang LY, Godowski PJ, et al. Heparin induces dimerization and confers proliferative activity onto the hepatocyte growth factor antagonists NK1 and NK2. *J Cell Biol* 133, 709-18 (1996)
- O'Reilly M, Holmgren L, Shing Y, et al. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell* 79, 315-328 (1994)
- 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* 17, 3045-3054 (1998)