

Title	新規ビンカアルカロイドconophyllineの子宮体癌細胞に対する抗腫瘍効果に関する検討
Sub Title	
Author	入江, 琢也(Irie, Takuya) 野澤, 志朗
Publisher	慶應医学会
Publication year	2005
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.82, No.4 (2005. 12) ,p.T313- T324
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	学位論文
Genre	Journal Article
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20051201-0313

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

学位論文

新規ビンカアルカロイド conophylline の
子宮体癌細胞に対する抗腫瘍効果に関する検討

慶應義塾大学医学部産婦人科学教室

(指導: 野澤志朗教授)

いり え たく や
入 江 琢 也

(平成 16 年 2 月 17 日受付)

Key Words : Conophylline, uterine endometrial cancer, Boyden chamber, *in vitro* experiment, invasion

わが国において、子宮体癌は欧米諸国に比べ罹患率が低率であるとされていたが、女性の平均寿命の上昇に伴う好発年齢層の増加や生活習慣の変化などにより、その罹患率は上昇傾向にある。子宮体癌の治療では手術療法が第一選択とされているが、術後の残存腫瘍や再発・転移に対する有効性の高い治療法はいまだ確立されていない。近年、さらに殺細胞効果の高い抗癌剤の開発が望まれているが、これらは一般に臓器選択性を欠くためその細胞毒性は少なくない。一方、欧米を中心として臨床開発が進められている血管新生阻害剤¹⁾、シグナル伝達阻害剤²⁾などは、癌細胞の増殖・分化・転移を制御する分子を標的として開発されていることから、殺細胞性の抗癌剤と比べ毒性は少ないことが予想され、癌の新たな治療法として期待されている。

1993 年、Umezawa はキョウチクトウ科植物である *Ervatamia microphylla* の葉のクロロホルム抽出物から K-ras-transformed normal rat kidney (K-ras-transformed NRK) 細胞³⁾の形態正常化を誘導する物質としてアルカロイドに属する一つの物質を単離した⁴⁾が、これは T. S. Kam らが 1992 年に報告した天然有機化合物 conophylline (コノフィリン) と同一物質であることが後に判明している⁵⁾。キョウチクトウ科植物からは今までに治療薬となる多くの生理活性物質が発見されており、その代表的なものにニチニチソウ (*Vinca rosea*) から発見された同じビンカアルカロイドである

vinblastine や vincristine がある。これらはチューブリンに結合して微小管形成を阻害 (G2/M 期阻害) することによりその抗腫瘍作用を発現することが知られている^{6), 7)}。しかし、conophylline は微小管の形成を阻害せず、normal rat kidney (NRK) 細胞⁸⁾を用いた実験では cycline D1 の発現を抑えることで G1 期 arrest を起こすことが判明していることから (投稿準備中)、conophylline は既存のビンカアルカロイドとは全く異なった作用を有することが予想されている。その後、*in vitro* の実験において Amino らにより、conophylline が K-ras-normal rat kidney (K-ras-NRK) 細胞⁹⁾の細胞増殖を抑制しない濃度でマトリゲルへの浸潤を抑制することが明らかにされた¹⁰⁾。このことから、conophylline は癌細胞の増殖抑制を標的とした従来の殺細胞性抗癌剤とは作用機序が異なり、宿主に対し細胞毒性のより少ない抗腫瘍剤としての可能性が示唆された。

癌細胞が原発病巣から離脱し、浸潤・転移を成立させるためにはいくつかの過程を経なければならない¹¹⁾。血管内皮細胞における基底膜と癌細胞との相互作用に着目した Liotta の three step theory¹²⁾によると、原発病巣から離脱した癌細胞はつぎの 3 つのステップを踏んで新たに転移巣を形成するとされている。すなわち、最初に癌細胞は血管内皮細胞下に存在する基底膜へ接着し、次に、基底膜に接着した癌細胞は MMP (matrix metalloproteinase) によって基底膜を分解、破壊す

本論文は、Irie T, Kubushiro K, Suzuki K, Tsukazaki K, Umezawa K, Nozawa S: Inhibition of Attachment and Chemotactic Invasion of Uterine Endometrial Cancer Cells by a New Vinca Alkaloid, Conophylline. *Anticancer Res* 19: 3061-3066, 1999 の一部を含む。

る^{13), 14)}。最後に癌細胞が基底膜を足場として血管内に移動するというステップである。以上のように、癌転移成立のプロセスは複雑で、そのすべてを突破するために癌細胞はさまざまなステップを乗り越えることが必要となる。それゆえ、そのうちどれか一つのステップを阻止することができれば、癌細胞の浸潤・転移の抑制につながる可能性がある。

そこで本研究では、conophylline の子宮体癌に対する浸潤・転移抑制効果を評価するため、子宮体癌由来培養細胞株 SNG-II¹⁵⁾ の細胞増殖に与える conophylline の影響を MTT assay により評価した後、ボイデンチャンパーによる *in vitro* invasion assay を施行した。その結果、conophylline は SNG-II 細胞の増殖を抑制しない濃度においてマトリゲルへの浸潤を抑制する結果を得た。Conophylline がこのマトリゲル浸潤のいずれのステップに影響を与えているかを解析することを目的とし、細胞接着能や接着分子に対する影響、細胞運動に対する影響をそれぞれ conophylline 添加群と conophylline 非添加群(コントロール群)とに分けて比較検討した。さらに、*in vivo* において、conophylline の子宮体癌由来培養細胞株 HOOUA¹⁶⁾ に対する抗腫瘍効果についても検討し、conophylline が新たな抗転移薬、あるいは抗腫瘍剤になり得るか否かについて考察した。

材料と方法

1. 培養細胞株と細胞培養

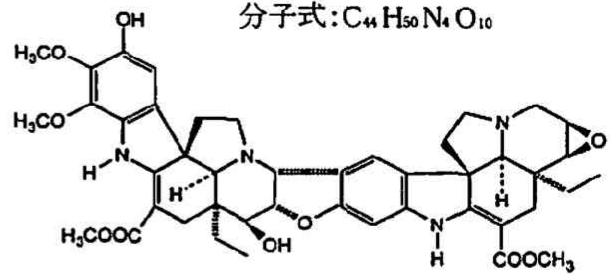
SNG-II 細胞¹⁵⁾ (高分化型子宮体癌由来培養株: 慶應大学医学部産婦人科学教室), HOOUA 細胞¹⁶⁾ (低分化型子宮体癌由来培養株: 石渡産婦人科, 石渡勇先生より供与) は, DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium: 日水製薬) に 10% ウシ胎児血清とカナマイシン (明治製菓株式会社) 100 µg/ml を加えたものを培地として 37°C, 5% CO₂ の条件下で培養した。

2. Conophylline

Conophylline (慶應大学理工学部梅澤教授より供与) は無色の物質で、分子量は FAB-MS (fast atom bombardment mass spectra) より 794 と決定され、分子式は HRFAB-MS (high-resolution fast atom bombardment mass spectra) および元素分析により C₄₄H₅₀N₄O₁₀ と確認されている (第 1 図)。Conophylline は、ベンゼンに溶解し冷凍または凍結乾燥した真空状態では安定である。そこで conophylline をベンゼン中に 1 mg/ml となるように溶解させ、-20°C で保存しておき、使用

分子量: 794

分子式: C₄₄H₅₀N₄O₁₀



第 1 図 Conophylline の化学構造。

する場合は直前にベンゼンを完全に揮発させてメタノールで希釈した。細胞懸濁液に添加する際には懸濁液中の conophylline の最終濃度が体積比 1% となるように調整して添加した。コントロール群には conophylline の溶媒であるメタノールのみを、細胞懸濁液中の最終濃度が、同じく体積比 1% となるように添加した。

3. MTT Assay

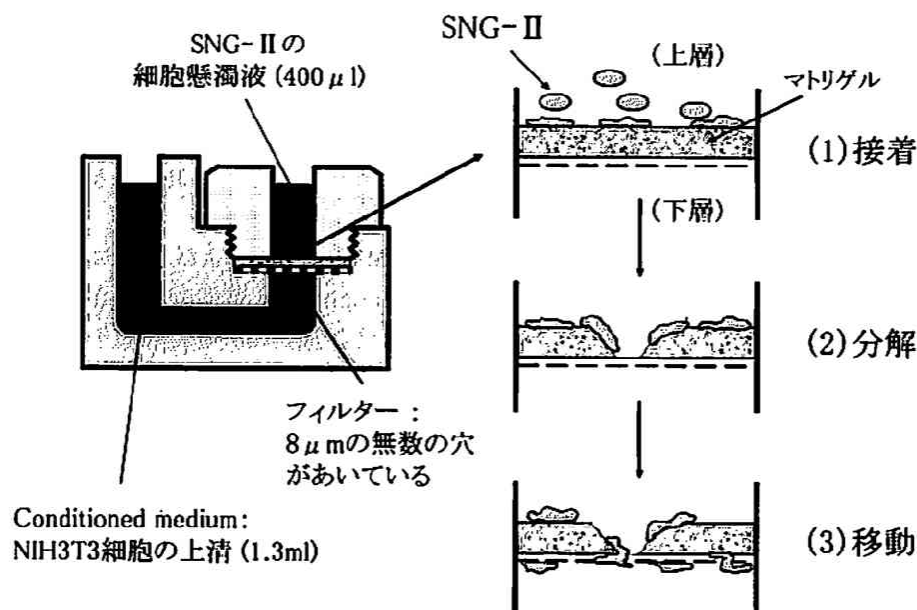
0.56 × 10⁵ 個/ml に調整した SNG-II 細胞の細胞懸濁液を 96 well (Falcon Lab ware) に 1 well につき 5000 (個) (90 µl) ずつまいた。24 時間培養後に conophylline を各濃度 (0.03, 0.1, 0.3, 10 µg/ml) 添加し、さらに培養時間を 24 時間群と 48 時間群とに分けて培養した。それぞれ培養終了後に dye solution を添加し、4 時間培養した。さらに、solubilization/stop solution を添加して 1 時間培養した後、これにより染色された細胞を分光光度計 590 nm の吸光度にて測定した。

4. トリパンプルー細胞外排出試験

2.0 × 10⁵ 個/ml に調整した SNG-II 細胞の細胞懸濁液を 24 時間培養した後、conophylline を各濃度 (0.03, 0.1, 0.3 µg/ml) 添加した。コントロール群にはメタノールのみを添加した。さらに 48 時間培養後、新しい培地を加え、トリパンプルー液 (GibcoBRL Trypan Blue Stain 0.4%) を加えて細胞を染色した。血球計算盤にて全細胞数とトリパンプルー液で染色されない生細胞数をそれぞれカウントし、以下の計算式にて各濃度における細胞の生存率 (%) を求めた。

$$\text{生存率 (\%)} = (\text{生細胞数}) / (\text{全細胞数}) \times 100$$

5. ボイデンチャンパーによる *in vitro* invasion assay 二層式ケモタキシスチャンパー (ボイデンチャンパー:



第2図 ボイデンチャンバーを用いた *in vitro* invasion assay. ボイデンチャンバーの本体はポリカーボネイトフィルターによって、上下二層に仕切られている。癌細胞はポリカーボネイトフィルターにコートされたマトリゲルを分解し、フィルター下に存在する走化性因子 (conditioned medium: chemoattractant) に応答して 8 μm の無数の小孔を通過し、フィルター下面に移動し付着する。図はポリカーボネイトフィルターにコートされたマトリゲルを浸潤している SNG-II 細胞の概念図である。

永大産業株式会社) を用いた (第2図)。

直径 8 μm の無数の穴があいた直径 13 mm のポリカーボネイトフィルター (以下フィルター: Costar) 上にマトリゲル (Becton Dickinson Lab ware) を 10 μg コートし、乾燥させた。2.0 × 10⁵ 個/ml に調整した SNG-II 細胞を 24 時間培養した後、conophylline を各濃度 (0.03, 0.1, 0.3 μg/ml) 添加した。コントロール群にはメタノールのみを添加した。これらをさらに 48 時間培養後、PBS で洗浄し新しい培地を加え、5.0 × 10⁵ 個/ml に希釈し、実験用細胞懸濁液とした。

マトリゲルをコートし、乾燥させた先のフィルターをチャンバーにセットした。その後、チャンバーの下層に conditioned medium を 1.3 ml 入れ、上層には conophylline を各濃度 (0.03, 0.1, 0.3 μg/ml) 添加した細胞懸濁液を 400 μl 入れた。これを 24 時間培養した後、フィルター下面に浸潤した細胞を固定・染色し、200 倍の顕微鏡視野でフィルターごとに 10 視野ずつ数えることにより浸潤細胞数を計測した。

6. 細胞接着能と接着分子に与える影響

1) 細胞接着能に与える影響: 2.0 × 10⁵ 個/ml に調整し

た SNG-II 細胞を 24 時間培養した後、conophylline を各濃度 (0.03, 0.1, 0.3 μg/ml) 添加した。コントロール群にはメタノールのみを添加した。さらに 48 時間培養し、マトリゲル、IV 型コラーゲン、ラミニンを固相化した well dish (Becton Dickinson: Biocoat Cell ware) に 1.0 × 10⁵ 個/ml に調整した SNG-II 細胞を 1 ml ずつまき、30 分間培養した。その後 3 分間シェーカーにて振とうすることにより非接着細胞を除去し、残った細胞を接着細胞とした。Well に接着した細胞はグルタルアルデヒドで室温に 15 分間固定し、0.05% のクリスタルバイオレットを加え、室温に 15 分間置くことで染色した。染色された接着細胞の色素を 0.05 M NaH₂PO₄/EtOH (50%) で抽出し、色素を吸光度計 540 nm の吸光度にて測定した。

2) 接着分子に与える影響: 2.0 × 10⁵ 個/ml に調整した SNG-II 細胞を 24 時間培養した後、conophylline 濃度 0.3 μg/ml を添加した。コントロール群にはメタノールのみを添加した。これらをさらに 48 時間培養した後培地を除去し、遠心チューブに回収した。1000 rpm 5 分間遠心分離し、PBS で洗浄後細胞数を 5.0 × 10⁵ 個/ml

に調節した。これに、FITC 標識抗 integrin $\beta 1$ 抗体 (住友電工, Yokohama, Japan), 抗 CD44 抗体 (IMMUNOTECH, Marseille, France) を $10 \mu\text{g/ml}$ 添加し, 氷上で 30 分間反応させた。その後 1000 rpm 5 分間遠心分離し, PBS で 3 回洗浄後, PBS $300 \mu\text{l}$ で再懸濁させ, フローサイトメトリー (EPICS Profile II, Coulter, Hialeah, USA) にて測定した。測定結果は縦軸を細胞数, 横軸を FITC 蛍光強度とするヒストグラムに表示し, conophylline 添加群とコントロール群との蛍光強度の分布の差異を検討した。

7. 細胞運動に与える影響

2.0×10^5 個/ml に調整した SNG-II 細胞を 24 時間培養した後, conophylline を各濃度 (0.03 , 0.1 , $0.3 \mu\text{g/ml}$) 添加した。コントロール群にはメタノールのみを添加した。さらに 48 時間培養し, ほぼ confluent となった時点で, マイクロピペット用のチップの先端で well の中央部に一直線に線を引いた後 24 時間培養した。細胞の移動距離は 400 倍顕微鏡下 10×10 方眼のマス目を用い, 傷つけ直後のマス目の数から 24 時間後のマス目の数を引くことにより細胞の移動距離として算出した。

8. 細胞形態変化

1.0×10^5 個/ml に調整した SNG-II 細胞を 24 時間培養した後, conophylline を各濃度 (0.03 , 0.1 , $0.3 \mu\text{g/ml}$) 添加した。コントロール群にはメタノールのみを添加し, さらに 48 時間培養した時点で顕微鏡 200 倍の視野で観察した。

9. *In vivo* における conophylline の抗腫瘍効果

ヌードマウスは 5 週齢の雌 BALB/cA Jcl-nu を日本クレア (東京) から購入した。実験は当大学の実験動物センターで滅菌飼料, 滅菌水を与え可能な限り無菌状態で飼育した。ヌードマウスに 1.0×10^7 個/ml に調整した HOOUA 細胞を背側左皮下に移植した。HOOUA 細胞は SNG-II 細胞と比べ, *in vivo* での皮下移植に対して生着率と細胞増殖率が高く, conophylline 投与による抗腫瘍効果を検討する実験により適切であると考え用いた。推定腫瘍重量は Geran らの方法¹⁷⁾により, 推定腫瘍重量 (mg) = $1/2 \times (\text{長径 mm}) \times (\text{短径 mm})^2$ として算出した。推定腫瘍重量が $300 \sim 400 \text{ mg}$ となったところで (皮下移植後 10 日目), 一群のマウスを 4 匹とし, 隔日に conophylline を 0.01 mg/mouse 腹腔内注射した。*In vivo* では Umezawa らの方法¹⁸⁾により

conophylline をオリーブオイルで希釈し, コントロール群にはオリーブオイルのみを $100 \mu\text{l}$ 腹腔内注射した。腹腔内注射を 10 回行ったところで (皮下移植後 28 日目) 投与を終了した。

結 果

1. MTT Assay およびトリパンプル細胞外排出試験

Conophylline 濃度 $0.03 \sim 0.3 \mu\text{g/ml}$ 添加群では, 24 時間培養後, 48 時間培養後のいずれにおいても conophylline 非添加群と比べ, SNG-II 細胞に対する細胞増殖にはほとんど影響を及ぼさなかった。しかし, conophylline 添加後 24 時間培養では $3.0 \mu\text{g/ml}$ までの濃度まではほとんど細胞増殖に影響を認めなかったのに対し, $10 \mu\text{g/ml}$ 添加では急激に細胞増殖の低下を認めた。同じく, conophylline 添加後 48 時間培養では $0.3 \mu\text{g/ml}$ まではほとんど細胞増殖に影響を認めなかったが $1.0 \mu\text{g/ml}$ 以上の濃度では徐々に細胞増殖の低下を認めた。48 時間培養の 50% 抑制濃度 (IC_{50}) は $6.5 \mu\text{g/ml}$ であった (第 3 図)。

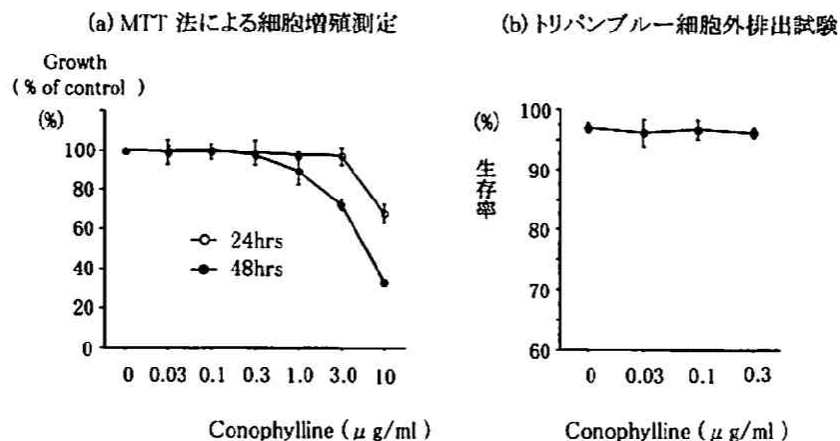
トリパンプル細胞外排出試験においては, 48 時間培養したコントロール群の生存率は 96.9% であった。Conophylline 濃度 $0.03 \mu\text{g/ml}$, $0.1 \mu\text{g/ml}$, $0.3 \mu\text{g/ml}$ 添加群の生存率もそれぞれ 96.1%, 96.6%, 96.2% であり (第 3 図), コントロール群と比較し, 生存率にほとんど差を認めなかった。

2. ボイデンチャンバーを用いた *in vitro* invasion assay

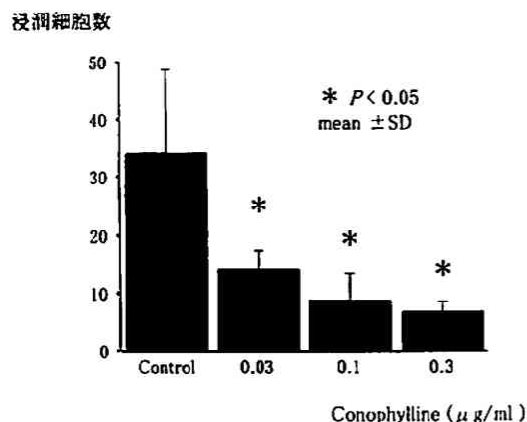
SNG-II 細胞を conophylline 添加後 48 時間培養し, ボイデンチャンバーでさらに 24 時間培養後, フィルター上にコートしたマトリゲルへの浸潤細胞数を 200 倍の顕微鏡視野でそれぞれ 10 カ所数えることにより計測した。SNG-II 細胞のマトリゲルへの浸潤細胞数はコントロール群では平均 34.5 であるのに対し, conophylline 濃度 $0.03 \mu\text{g/ml}$, $0.1 \mu\text{g/ml}$, $0.3 \mu\text{g/ml}$ ではそれぞれ平均, 14.2, 8.92, 6.69 となり, コントロール群と比べるとそれぞれ 41.2%, 25.2%, 19.4% と濃度依存的に減少した (第 4 図)。

3. 細胞接着能と細胞表面に発現する接着分子の発現に対する影響

細胞接着への影響を検討した結果, 固相化したマトリゲルへの接着率はコントロール群と比べ, conophylline 添加群 $0.03 \mu\text{g/ml}$, $0.1 \mu\text{g/ml}$, $0.3 \mu\text{g/ml}$



第3図 MTT assay およびトリパンプルー細胞外排出試験。(a) SNG-II 細胞を 24 時間培養後、conophylline を各濃度添加した。添加後さらに 24 時間、48 時間培養し、それぞれ培養終了後に Dye Solution を添加し、4 時間培養後 Solubilization/Stop Solution を添加して 1 時間培養した。これにより染色された細胞を分光光度計 590 nm の吸光度にて測定した。縦軸にはコントロール群を 100% としたときの、conophylline 各濃度における細胞数をパーセントで示した。(b) SNG-II 細胞の細胞懸濁液を 24 時間培養後、conophylline を各濃度添加した。さらに 48 時間培養後、トリパンプルー液を加えた。血球計算盤にて全細胞数、生細胞数をそれぞれカウントし、生存率 (%) = (生細胞数) / (全細胞数) × 100 にて各濃度における細胞の生存率 (%) を求めた。(Irie T et al : Anticancer Res 19 : 3061-3066, 1999 の Fig. 2 より許可を得て転載)



第4図 *In vitro* invasion assay における浸潤細胞数。SNG-II 細胞の細胞懸濁液を 24 時間培養した後、conophylline を各濃度 (0.03, 0.1, 0.3 μg/ml) 添加した。さらに 48 時間培養したものをサンプル用細胞懸濁液とした。

マトリゲルをコートしたフィルターをチャンバーにセットし、conditioned medium を下層に入れ、上層にサンプル用細胞懸濁液を入れた。これを 24 時間培養後、フィルター下面に浸潤した細胞を 200 倍の顕微鏡視野で各濃度のフィルターごとに 10 カ所ずつ数えることにより、浸潤細胞数を計測した。(Irie T et al : Anticancer Res 19 : 3061-3066, 1999 の Fig. 5 より許可を得て転載)

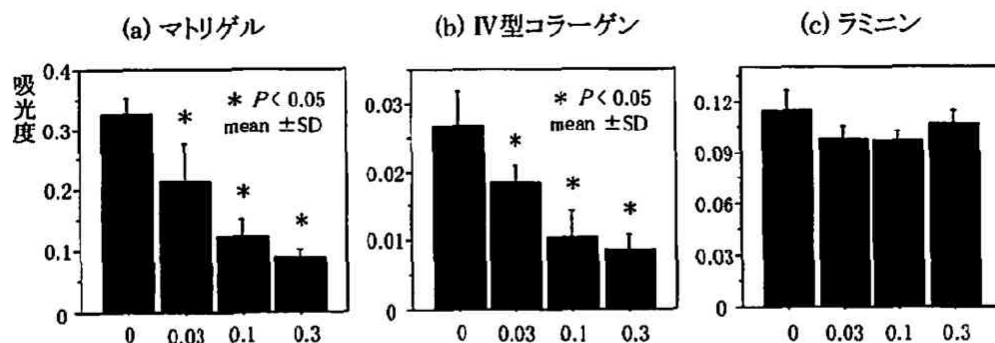
ではそれぞれ 65.6%, 37.6%, 26.9% と濃度依存的に減少した。

IV 型コラーゲンへの接着率においても、コントロール群と比べ、conophylline 添加群 0.03 μg/ml, 0.1 μg/ml, 0.3 μg/ml ではそれぞれ 68.5%, 46.1%, 32.5% と濃度依存的に減少した。しかし、ラミニンへの接着率はコントロール群と比べ、conophylline 添加群 0.03 μg/ml, 0.1 μg/ml, 0.3 μg/ml ではそれぞれ 86.4%, 84.5%, 95.5% と有意な差を認めなかった (第5図)。

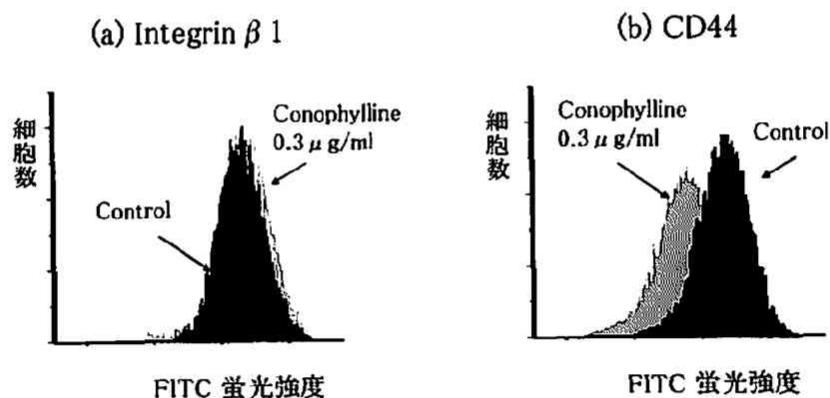
フローサイトメトリーによる接着分子の発現に対する影響を検討した結果、integrin β1 の蛍光強度は conophylline 添加 (灰色) のヒストグラムとコントロール (黒) とで蛍光強度の分布に変化は認められなかった。しかし、CD44 においては conophylline 添加 (灰色) のヒストグラムは、コントロール (黒) のヒストグラムと比べ蛍光強度の peak channel が左方へシフトし、その蛍光強度は減弱しているのが認められた (第6図)。

4. 細胞運動に対する影響

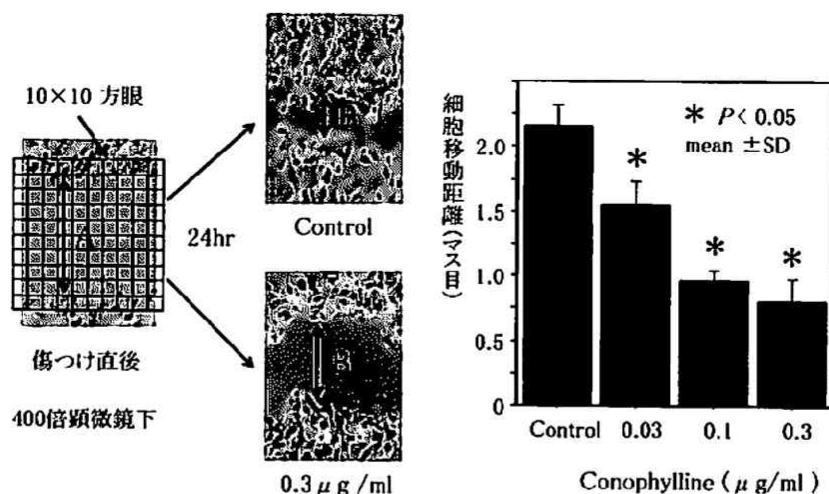
細胞の移動距離を 400 倍顕微鏡下 10×10 方眼のマスを数えることにより計測した結果、細胞の移動距離



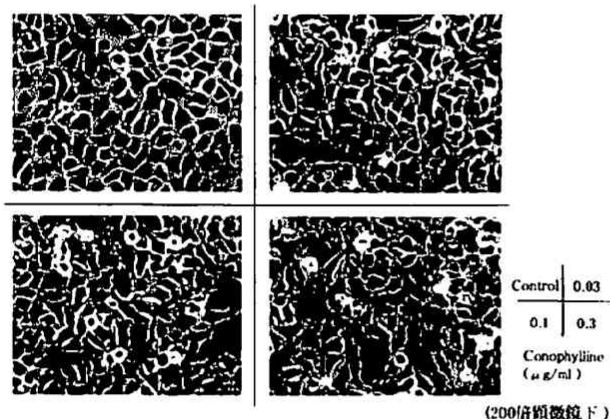
第5図 Conophyllineによる細胞接着への影響。SNG-II細胞を24時間培養した後、conophyllineを各濃度(0.03, 0.1, 0.3 μg/ml)添加し、conophylline非添加群にはメタノールのみを添加した。これらをさらに48時間培養した後、マトリゲル、IV型コラーゲン、ラミニンを固相化した24well dish (Becton Dickinson; Biocoat Cell ware)に 1.0×10^5 cells/mlに調整したSNG-II細胞を1 mlずつまき、さらに30分間培養した。これらを3分間シェーカーにて振とうすることにより非接着細胞を除去し、残った細胞を接着細胞とした。Wellに接着した細胞を固定、染色し、染色された接着細胞の色素を吸光度計で波長540 nmにて測定した。(Irie T et al: Anticancer Res 19: 3061-3066, 1999のFig. 4の一部より許可を得て転載)



第6図 細胞接着分子に与える影響。SNG-II細胞の細胞懸濁液を24時間培養した後conophylline濃度0.3 μg/mlを添加した。さらに48時間培養した後培地を除去し、遠心分離し、PBSで洗浄後細胞数を100 μl (5×10^5 cells)を分注し、FITC標識抗integrin β1抗体、抗CD44抗体をそれぞれ添加した。その後遠心分離し、PBSで洗浄後再びPBS 300 μlで懸濁させ、フローサイトメトリーにてこれらのFITC蛍光強度を計測した。黒色がコントロール、灰色がconophylline添加である。(Irie T et al: Anticancer Res 19: 3061-3066, 1999のFig. 7の一部より許可を得て転載)



第7図 細胞運動に与える影響。SNG-II細胞の細胞懸濁液を24時間培養した後、conophyllineを各濃度(0.03, 0.1, 0.3 µg/ml)添加した。さらに48時間培養した後、マイクロビペット用のチップの先端でwellの中央部に一直線に線を引いた後24時間培養した。400倍顕微鏡下10×10方眼で、傷つけ直後と24時間後の細胞間のマス目の差を細胞が移動した距離として計測した。A: 傷つけ直後のマス目の数, B: 24時間後のマス目の数。移動距離=A-B (Irie T et al: Anticancer Res 19: 3061-3066, 1999のFig. 6より許可を得て転載)



第8図 Conophylline添加によるSNG-II細胞の細胞形態変化。SNG-II細胞の細胞懸濁液を24時間培養した後、conophyllineを各濃度(0.03, 0.1, 0.3 µg/ml)添加した。さらに48時間培養した時点で顕微鏡200倍の視野で観察を行った。(Irie T et al: Anticancer Res 19: 3061-3066, 1999のFig. 3より許可を得て転載)

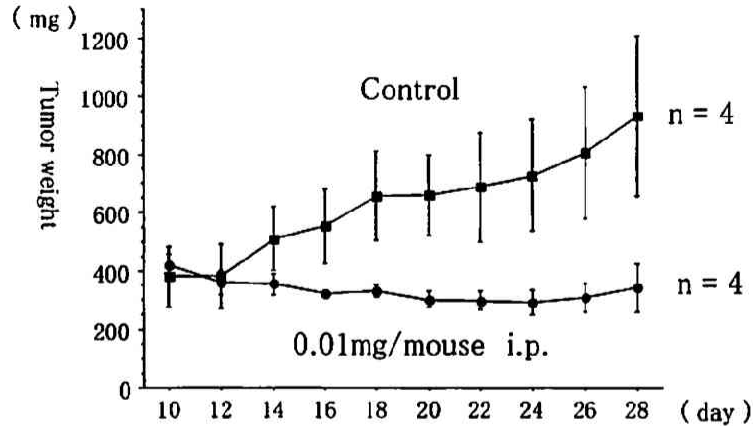
は、コントロール群ではマス目の平均が2.20であるのに対し、conophylline濃度0.03 µg/ml, 0.1 µg/ml, 0.3 µg/ml添加群ではそれぞれ1.52, 0.96, 0.78となりコントロール群と比べるとそれぞれ69.0%, 45.6%, 35.4%と濃度依存的にその移動距離は減少した(第7図)。

5. 細胞の形態変化に与える影響

Conophylline濃度0.03~0.3 µg/ml添加後48時間培養においてSNG-II細胞は濃度依存的に細胞相互の結合が徐々に粗となり、糸状仮足様の細胞突起が現れるのが観察された(第8図)。この変化はconophyllineを添加している間持続したが、conophyllineを除去することにより可逆性を示した。

6. In vivoにおけるconophyllineの抗腫瘍効果

Conophylline投与終了時(皮下移植後28日目)、HOOUA細胞を皮下移植したヌードマウスのいずれにおいても腫瘍死あるいは衰弱死は見られなかった。Conophylline投与群ではHOOUA細胞の腫瘍重量が 300 ± 20 mgであるのに対し、非投与群では 910 ± 180 mgとなり、conophylline投与により腫瘍重量が約67%抑制された(第9図)。腫瘍重量計測後屠殺したマウ



第9図 *in vivo*における conophylline の抗腫瘍効果. ノードマウスに 1×10^5 cell/ml に調整した HOOUA 細胞を背側左皮下に移植した. 推定腫瘍重量が, 300~400 mg となったところで(皮下移植後 10 日目)一群のマウスを 4 匹とし, 隔日に conophylline を 0.01 mg (100 μ l)/mouse 腹腔内注射し, control 群 (100 μ l のオリーブオイルを腹腔内注射)と腫瘍重量を比較した. 縦軸は腫瘍重量を, 横軸は皮下移植してからの日数を示す.

スには conophylline 投与群, コントロール群共に腹腔内に明らかな転移巣は認められなかった.

考 察

子宮体癌の予後因子として癌細胞の筋層への浸潤の深さ, リンパ節転移の有無, 組織分化度などがあげられる¹⁹⁾. Mariani らは, 筋層浸潤の深さが筋層の 50% 以上のものは血行性転移の独立した危険因子であると報告し²⁰⁾, さらに, これを当てはめると, 子宮全摘術と標準的追加治療を施行した 915 人の子宮体癌患者のうち 24% に術後に血行性転移を生じる可能性があり, そのうちの 28% に肺や肝臓などに血行性転移を生じたと報告している²¹⁾. また, この割合はリンパ行性転移や腹腔内転移より多かったとしている. よって, 子宮体癌に対し, 血行性を含め転移を抑制する薬剤は有用な治療薬になると考えられる.

癌細胞の浸潤・転移において, 基底膜は主要な役割を演じており, 主として IV 型コラーゲン, ラミニン, ファイブロンネクチン, プロテオグリカンなどの細胞外マトリックス成分により構成されている. 基底膜そのものを分離することは技術的にも量的にも困難であるが, マウス EHS (Engelbreth-Holm-Swarm) 腫瘍が基底膜と類似したマトリックス成分を産生していることが明らかとなり²²⁾, マトリゲルとして市販されるようになった. この

マトリゲルを一定サイズのポアを有するフィルター上にコートし, ボイデンチャンバーに装着したアッセイ系は *in vivo* における転移能と良く相関することから, 以降, 基底膜浸潤に関わる癌細胞の浸潤・転移を抑制する物質の検討などに有用性の高い方法^{23), 24)}として広く用いられるようになった. 本研究において, ボイデンチャンバーによる *in vitro* invasion assay を施行した結果, conophylline は SNG-II 細胞の増殖を抑制しない濃度においてマトリゲルへの浸潤細胞数を抑制した. この結果を解析する上で, 接着分子や細胞接着能に対する影響, 細胞運動に対する影響に着目し, 接着分子については integrin $\beta 1$ と CD44 を, 接着能についてはマトリゲル, IV 型コラーゲン, ラミニンについて検討した.

Integrin は α , β の組み合わせより 20 種類以上の integrin が存在するが²⁵⁾, そのうち $\beta 1$ は他の β サブユニットと比べ主なりガンドがコラーゲン, ラミニン, ファイブロンネクチンなどの細胞外マトリックス成分であることから本研究に用いた. 子宮体癌と integrin との関連については, α サブユニットと $\beta 1$ の組み合わせで, これらのモノクローナル抗体を用い, *in vitro* invasion assay でのマトリゲル浸潤抑制効果が得られた報告²⁶⁾や, 免疫組織染色を用いて筋層浸潤やリンパ節転移した子宮体癌の integrin の発現を検討した報告がある²⁷⁾.

CD44 はヒアルロン酸を始め, ファイブロンネクチン, IV 型コラーゲン, ラミニンなどの細胞外マトリックス

をリガンドとする膜貫通型タンパク質で、生体内に広く分布している^{28), 29)}。CD44の遺伝子は20個のexonから構成され、うち細胞外領域の10個のvariant exon (v1~v10)のalternative splicingによって多数の変異体CD44 variant (CD44v)が存在する³⁰⁾。CD44が癌の転移に関与する接着分子であることが報告されたのは1991年にGunthertら³¹⁾によって発表されたラット肺癌由来細胞株を用いた研究がその背景にある。以来、CD44と癌の浸潤・転移との関連性を論じた報告が数多く発表されており、子宮体癌との関連についての報告も多い^{16), 32-34)}。本研究では最も生体内に広範囲に発現し²⁹⁾、なおかつ子宮体癌との関与も報告されている標準型CD44 (CD44s)を用いておこなった^{32), 33)}。

固相化したマトリゲル、IV型コラーゲン、ラミニンに対する細胞接着実験においてマトリゲル、IV型コラーゲンでは共に接着細胞数は濃度依存的に減少したが、ラミニンの接着細胞数には変化が認められなかった。また、フローサイトメトリーを用いた実験の結果、conophylline添加によりコントロールと比べ、integrin $\beta 1$ ではその蛍光強度にほとんど変化を認めなかったが、CD44では蛍光強度の減弱を認めた。すなわち、conophylline添加によりSNG-II細胞の細胞表面に発現しているintegrin $\beta 1$ の発現は変化せず、CD44の発現は低下したと考えられた。マトリゲル、IV型コラーゲン、ラミニンはいずれもintegrin $\beta 1$ のリガンドであると共にCD44のリガンドでもある。よって、この結果に対する考察として、integrin $\beta 1$ とCD44のいずれが主にこれらリガンドとの接着に影響を与えていたかが一つの重要な因子と考えられ、ラミニンとの接着に対してはintegrin $\beta 1$ の方が結合特異性や親和性が高いため、接着細胞数に変化を認めず、マトリゲル、IV型コラーゲンの接着に対してはCD44の方が結合特異性や親和性が高いため、接着細胞数が減少したと推測された。Integrin $\beta 1$ とラミニンとの結合特異性を検討した報告はある^{35), 36)}が、integrin $\beta 1$ とCD44に対し、リガンドへの結合特異性を直接比較検討した報告は認められない。よって、integrin $\beta 1$ 、CD44に対するモノクローナル抗体を用いた接着阻止実験などにより、マトリゲル、IV型コラーゲン、ラミニンに対する接着細胞数がconophyllineの添加によりどのような影響を受けるかなど、今後の検討が必要と思われる。

癌転移の成立過程、とりわけ癌細胞が基底膜や周囲の正常組織などへ浸潤していく際には癌細胞の運動性は必要不可欠な細胞生物学的性状である。細胞運動は細胞形態の動的変化を伴い、細胞が前進するためには、細胞先

進部の細胞外マトリックスへの接着と細胞後端部の解離が必要である。すなわち、癌細胞の運動性を制御している重要な部分は癌細胞側の接着分子とそのリガンドであるといえる。本研究において、Wound assayを用いたconophyllineによる細胞の固有運動に対する影響を検討した結果、conophyllineを添加した群はコントロール群と比べ、濃度依存的に移動距離が減少した。ここで用いたconophylline濃度はSNG-II細胞の細胞増殖や生存率に影響を与えない濃度であることから、計測された細胞の移動距離は細胞増殖の影響によるものではなく、それぞれの濃度における運動能を表していると考えられた。先に検討したconophylline添加によるSNG-II細胞のリガンドへの接着能の低下が、細胞の移動距離の減少に関与していると推測された。また、conophylline添加による細胞形態に対する影響では、濃度依存的にSNG-II細胞相互の結合が徐々に粗となり、糸状仮足様の細胞突起が現れるのが観察された。これらの変化は細胞が運動（移動）するために必要な形態変化を反映していると推測され、conophyllineが細胞接着斑、アクチン線維束を中心とするストレスファイバーの形成に影響を与えている可能性が考えられた。

*In vivo*での実験を行うに際して、低分化型子宮体癌由来培養株HOOA細胞はSNG-II細胞と比べ、ヌードマウスでの皮下移植において生着率と細胞増殖率が高いため、conophylline投与による抗腫瘍効果を検討する実験に用いた。しかし、HOOA細胞は*in vitro*の実験では取り扱いが難しく、データの変動が大きい。ため、*in vitro*ではSNG-II細胞を、*in vivo*ではHOOA細胞を用いて実験を行った。また、conophyllineのHOOA細胞に対する細胞増殖に与える影響や細胞毒性について未知であったため、Umezawaらが*in vivo*で用いたconophylline濃度を参考とし、0.01 mg (100 μ l)/mouseで隔日に腹腔内投与とした¹⁰⁾。Conophylline投与終了時（皮下移植後28日目）、皮下移植したHOOA細胞の腫瘍重量はconophylline投与により約67%抑制され、*in vivo*においてはconophyllineの抗腫瘍効果が認められた。投与実験終了後屠殺したマウスでは、conophylline投与群コントロール群共に腹腔内に明らかな転移巣は認められず、このため、抗転移薬としての効果を評価することはできなかったが、conophylline投与群のいずれのマウスにおいても投与終了時まで生存しており、宿主に対する細胞毒性は少ないことが推測された。

以上、*in vitro*において、細胞接着能と細胞運動（移動）能に着目し検討した結果、conophyllineが細胞増

殖を抑制しない濃度において *in vitro* invasion assay でのマトリゲルへの浸潤細胞数を減少させた機序には、接着や細胞運動を制御する分子に影響を与えている可能性が示唆された。すなわち、conophylline 添加により、細胞が浸潤・転移するための最初のステップである基質への接着が抑制されてその足場を失い、細胞運動（移動）ができなかったことが原因であると考えられた。また、*in vivo* における実験では、皮下移植腫瘍の細胞増殖を抑制する結果を得た。

以上のことから、conophylline は子宮体癌細胞の接着分子や細胞運動を制御する分子を標的とした新たな抗転移薬、あるいは殺細胞性の少ない抗腫瘍剤としての可能性が考えられた。今後 conophylline の分子標的のさらなる解明により、臨床応用の可能性が示唆された。

現在のところ、conophylline はヒト T 細胞白血病細胞を用いた実験により、tumor necrosis factor- α (TNF- α) レセプターを down regulation させることで、リガンドに誘導される nuclear factor-kappaB (NF- κ B) の活性を抑制する³⁷⁾ことが判明している。また、ラット胎児膵臓培養細胞やラット膵臓腺房腫瘍細胞を用いた実験にて、conophylline 投与により neurogenin3 の誘導活性が見いだされ³⁸⁾、膵幹細胞から β 細胞への分化誘導作用が認められた³⁹⁾と報告されている。NF- κ B はアポトーシスにも関与している転写因子であり⁴⁰⁾、また、neurogenin3 は膵幹細胞から β 細胞への分化に関与する転写因子である。種々の表現型を変化させることから conophylline の標的分子は一般的に転写制御因子に関わっていることが推測されている。

総 括

新規ピンカアルカロイド conophylline は、キョウチクトウ科植物である *Ervatamia microphylla* の葉の抽出物から精製された。本研究ではヒト子宮体癌由来培養細胞株 SNG-II 細胞に対する *in vitro* における浸潤能抑制効果と、HOOUA 細胞に対する *in vivo* における抗腫瘍作用について検討し、conophylline が新たな抗転移薬、あるいは抗腫瘍剤になり得るかどうかについて検討した。

Conophylline は子宮体癌細胞において、細胞増殖を抑制しない濃度でマトリゲルへの浸潤細胞数を減少させた。この機序を解析する目的で、細胞が浸潤・転移するために必要なステップである細胞接着能と細胞運動能に着目した実験を行い、以下の結果を得た。

Conophylline は (1) 固相化したマトリゲルや IV 型コラーゲンへの接着数を減少させた。(2) wound

assay にて細胞運動能を抑制した。(3) フローサイトメトリーを用いた実験において CD44 の発現を減弱させた。さらに、*in vivo* における実験では、子宮体癌細胞を皮下移植したヌードマウスのいずれにおいても投与終了時まで衰弱死を認めず、コントロール群と比べ約 67% 腫瘍重量を抑制した。

Conophylline がマトリゲルへの浸潤細胞数を減少させた機序には、接着や細胞運動を制御する分子に影響を与えている可能性が考えられた。すなわち、conophylline 投与により、細胞が浸潤・転移するための最初のステップである基質への接着が抑制されてその足場を失い、細胞運動（移動）ができなかったことが原因と考えられた。さらに、*in vivo* における実験では、コントロール群と比べ腫瘍重量を抑制したことから、conophylline が抗腫瘍効果を有することが認められた。また、conophylline 投与により、いずれのマウスにおいても衰弱死を認めなかったことから、宿主に対する細胞毒性は少ないことが予想された。以上のことから、conophylline は新たな抗転移薬、あるいは殺細胞性の少ない抗腫瘍剤としての可能性を有していると考えられた。今後 conophylline の分子標的のさらなる解明により、臨床応用の可能性が示唆された。

本稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました慶應義塾大学医学部産婦人科教室野澤志朗教授に深甚なる謝意を表します。また、本研究に有益な御指導、御校閲を賜りました慶應義塾大学理工学部応用化学科生物化学教室梅澤一夫教授に深謝いたします。さらに、久布白兼行講師に深く感謝いたします。また、実験を様々な面から援助して下さいました産婦人科学教室塚崎克己助教授、鈴木完哉氏、婦人科病理研究室諸兄に感謝をいたします。

本研究の一部は、第 57 回日本癌学会総会、第 51 回日本産科婦人科学会総会、第 38 回日本癌治療学会総会、第 7 回がん転移研究会総会、第 6 回 International Gynecologic Cancer Society において報告した。

また、本研究の一部は平成 9 年度文部省科学研究費補助金奨励研究 (A) 課題番号 9771299 によった。

文 献

- 1) Kerbel R, Folkman J: Clinical translation of angiogenesis inhibitors. *Nat Rev Cancer* 2: 727-739, 2002
- 2) Lee AV, Schiff R, Cui X, Sachdev D, Yee D, Gilmore AP, Streuli CH, Oesterreich S, Hadsell DL: New mechanisms of signal transduction inhibitor action:

- receptor tyrosine kinase down-regulation and blockade of signal transactivation. Clin Cancer Res 9 : 516S-523S, 2003
- 3) Preiss J, Loomis CR, Bishop WR, Stein R, Nidel JE, Bell RM : Quantitative measurement of sn-1, 2-diacylglycerols present in platelets, hepatocytes, and ras- and sis-transformed normal rat kidney cells. J Biol Chem 5 : 8597-8600, 1986
- 4) Umezawa K, Ohse T, Yamamoto T, Koyano T, Takahashi Y : Isolation of a new vinca alkaloid from the leaves of *Ervatamia microphylla* as an inhibitor of ras functions. Anticancer Res 14 : 2413-2418, 1994
- 5) Kam TS, Loh KY, and Wei C : Conophylline and conophyllidine : new dimeric alkaloids from *Tabernaemontana divaricata*. J Nat Prod 56 : 1865-1871, 1993
- 6) Wilson L, Creswell KM, Chin D : The mechanism of action of vinblastine. Binding of [acetyl-3H] vinblastine to embryonic chick brain tubulin and tubulin from sea urchin sperm tail outer doublet microtubules. Biochemistry 30 : 5586-5592, 1975
- 7) Owellen RJ, Hartke CA, Dickerson RM, Hains FO : Inhibition of tubulin-microtubule polymerization by drugs of the Vinca alkaloid class. Cancer Res 36 : 1499-1502, 1976
- 8) Bradshaw GL, Dubes GR : Supplementary factors required for serum-free culture of rat kidney cells of line NRK-49F. In Vitro 19 : 735-742, 1983
- 9) De Vouge MW, Mukherjee BB : Transformation of normal rat kidney cells by v-K-ras enhances expression of transin 2 and an S-100-related calcium-binding protein. Oncogene 7 : 109-119, 1992
- 10) Amino N, Ohse T, Koyano T and Umezawa K : Inhibition of cellular chemotactic invasion by a vinca alkaloid, conophylline. Anticancer Res 16 : 55-60, 1996
- 11) Poste G, Fidler IJ : The pathogenesis of cancer metastasis. Nature 283 : 139-146, 1980
- 12) Liotta LA, Rao N and Wewer UM : Biochemical interactions of tumor cells with the basement membrane. Ann Rev Biochem 55 : 1037-1057, 1986
- 13) Stetler-Stevenson WG, Aznavoorian S, Liotta LA : Tumor cell interactions with the extra cellular matrix during invasion and metastasis. Annu Rev Cell Biol 9 : 541-573, 1993
- 14) Liotta LA, Steeg PS and Stetler-Stevenson WG : Cancer metastasis and angiogenesis. An imbalance of positive and negative regulation. Cell 64 : 121-125, 1991
- 15) Nozawa S, Sakayori M, Ohta K, Iizuka R, Mochizuki H, Soma M, Fujimoto J, Hata J, Iwamori M and Nagai Y : A monoclonal antibody (MSN-1) against a newly established uterine endometrial cancer cell line (SNG-II) and its application to immunohistochemistry and flow cytometry. Am J Obstet Gynecol 161 : 1079-1086, 1989
- 16) Fujita N, Yaegashi N, Ide Y, Sato S, Nakamura M, Ishiwata I, Yajima A : Expression of CD44 in normal human versus tumor endometrial tissues : possible implication of reduced expression of CD44 in lymphovascular space involvement of cancer cells. Cancer Res 54 : 3922-3928, 1994
- 17) Geran RI, Greenberg NH, MacDonald MM : Protocols for screening chemical agents and natural products against animal tumors and other biological systems (third edition). Cancer Chemotherapy Rep 3 : 51-52, 1972
- 18) Umezawa K, Taniguchi T, Toi M, Ohse T, Tsutsumi N, Yamamoto T, Koyano T, Ishizuka M : Growth inhibition of K-ras-expressing tumors by a new vinca alkaloid, conophylline, in nude mice. Drugs Exp Clin Res 22 : 35-40, 1996
- 19) Kadar N, Malfetano JH, Homesley HD : Determinants of survival of surgically staged patients with endometrial carcinoma histologically confined to the uterus : implications for therapy. Obstet Gynecol 80 : 655-659, 1992
- 20) Mariani A, Webb MJ, Keeney GL, Calori G, Podratz KC : Hematogenous dissemination in corpus cancer. Gynecol Oncol 80 : 233-238, 2001
- 21) Mariani A, Dowdy SC, Keeney GL, Long HJ, Lesnick TG, Podratz KC : High-risk endometrial cancer subgroups : candidates for target-based adjuvant therapy. Gynecol Oncol 95 : 120-126, 2004
- 22) Orkin RW, Gehron P, Mcgoodwin EB, Martin GR, Valentine T, Swarm R : A murine tumor producing a matrix of basement membrane. J Exp Med 145 : 204-220, 1977
- 23) Albini A, Iwamoto Y, Kleinman HK, Martin GR, Aaronson SA, Kozlowski JM and McEwan RM : A rapid *in vitro* assay for quantitating the invasive potential of tumor cells. Cancer Res 47 : 3239-3245, 1987
- 24) Repesh LA : A new *in vitro* assay for quantitating tumor cell invasion. Invasion Metastasis 9 : 192-208, 1989
- 25) Hynes RO : Integrins : a family of cell surface receptors. Cell 48 : 549-554, 1987
- 26) Prifti S, Zourab Y, Koumouridis A, Bohlmann M, Strowitzki T, Rabe T : Role of integrins in invasion of endometrial cancer cell lines. Gynecol Oncol 84 : 12-20, 2002
- 27) Lessey BA, Albelda S, Buck CA, Castelbaum AJ, Yeh I, Kohler M, Berchuck A : Distribution of integrin cell adhesion molecules in endometrial cancer. Am J Pathol 146 : 717-726, 1995
- 28) Jalkanen S, Jalkanen M : Lymphocyte CD44 binds the COOH-terminal heparin-binding domain of fibronectin. J Cell Biol 116 : 817-825, 1992
- 29) Mackay CR, Terpe HJ, Stauder R, Marston WL, Stark H, Gunthert U : Expression and modulation of CD44 variant isoforms in humans. J Cell Biol 124 : 71-82,

1994

- 30) Screaton GR, Bell MV, Jackson DG, Cornelis FB, Gerth U, Bell JI : Genomic structure of DNA encoding the lymphocyte homing receptor CD44 reveals at least 12 alternatively spliced exons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89 : 12160-12164, 1992
- 31) Gunthert U, Hofmann M, Rudy W, Reber S, Zoller M, Haussmann I, Matzku S, Wenzel A, Ponta H : A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells. *Cell* 65 : 13-24, 1991
- 32) Hoshimoto K, Yamauchi N, Takazawa Y, Onda T, Taketani Y, Fukayama M : CD44 variant 6 in endometrioid carcinoma of the uterus : its expression in the adenocarcinoma component is an independent prognostic marker. *Pathol Res Pract* 199 : 71-77, 2003
- 33) Tokumo K, Kodama J, Seki N, Miyagi Y, Yoshinouchi M, Kudo T : CD44 exon v6 is not implicated in the progression and metastasis of endometrial cancer. *Cancer Lett* 125 : 221-225, 1998
- 34) Tempfer C, Haeusler G, Kaider A, Hefler L, Hanzal E, Reinthaller A, Breitenecker G, Kainz CH : The prognostic value of CD44 isoform expression in endometrial cancer. *Br J Cancer* 77 : 1137-1139, 1998
- 35) Hall DE, Reichardt LF, Crowley E, Holley B, Moezzi H, Sonnenberg A, Damsky CH : The alpha 1/beta 1 and alpha 6/beta 1 integrin heterodimers mediate cell attachment to distinct sites on laminin. *J Cell Biol* 110 : 2175-2184, 1990
- 36) Kikkawa Y, Sanzen N, Fujiwara H, Sonnenberg A, Sekiguchi K : Integrin binding specificity of laminin-10/11 : laminin-10/11 are recognized by alpha 3 beta 1, alpha 6 beta 1 and alpha 6 beta 4 integrins. *J Cell Sci* 113 : 869-876, 2000
- 37) Gohda J, Inoue J, Umezawa K : Down-regulation of TNF-alpha receptors by conophylline in human T-cell leukemia cells. *Int J Oncol* 23 : 1373-1379, 2003
- 38) Umezawa K, Hiroki A, Kawakami M, Naka H, Takei I, Ogata T, Kojima I, Koyano T, Kowithayakorn T, Pang HS, Kam TS : Induction of insulin production in rat pancreatic acinar carcinoma cells by conophylline. *Biomed Pharmacother* 57 : 341-350, 2003
- 39) Ogata T, Li L, Yamada S, Yamamoto Y, Tanaka Y, Takei I, Umezawa K, Kojima I : Promotion of beta-cell differentiation by conophylline in fetal and neonatal rat pancreas. *Diabetes* 53 : 2596-2602, 2004
- 40) Deng Y, Ren X, Yang L, Lin Y, Wu X : A JNK-dependent pathway is required for TNFalpha-induced apoptosis. *Cell* 11 : 561-570, 2003