OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	グアニジン誘導体による癌細胞の浸潤抑制
Author(s)	小川, 晴幾
Citation	大阪大学, 1998, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3144143
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

Kodak Color Control Patches
Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black
© Kodak, 2007 TM: Kodak
Kodak Gray Scale
A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19
© Kodak, 2007 TM: Kodak

大阪大学医学雑誌
第46巻第1号 平成6年1月

主論文

グアニジン誘導体による癌細胞の浸潤抑制

Inhibition of Tumor Cell Invasion by Guanidine Analogues

大阪大学医学部産婦人科教室
Dept. of Obsterics and Gynecology, Osaka Univ. Med. School

小 川 晴 幾
Haruki Ogawa

（平成5年11月16日受付）

大阪大学医学雑誌
第46巻第1号　平成6年1月

グアニジン誘導体による癌細胞の浸潤抑制

Inhibition of Tumor Cell Invasion by Guanidine Analogues

大阪大学医学部産婦人科教室
Dept. of Obsterics and Gynecology, Osaka Univ. Med. School

小　川　晴　幾
Haruki Ogawa

(平成5年11月16日受付)

The inhibitory effect of the guanidine analogues amiloride, guanethidine and triamterene on the invasive capacity of rat ascites hepatoma cells, AH130, was studied. The invasive capacity of AH130 was estimated in vitro by counting the number of penetrated single tumor cells and tumor cell colonies beneath a cultured mesothelial cell monolayer. (H. Akedo et al., Cancer Res., 46 : 2416-2422, 1986). These agents suppressed the invasive capacity of a highly invasive clone, MM1, in a dose-dependent manner. We previously reported that serum was required for the in vitro invasion by MM1 cells (Jpn. J. Cancer Res., 82 : 493-496, 1991). Serum addition to MM1 cell suspension caused an increase in intracellular pH (pHi) as well as transient elevation of intracellular free Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]$ i spike), whereas serum addition to a poorly invasive clone, W1 caused neither pHi change nor $[Ca^{2+}]$ i spike. The agents suppressed these ionic changes in MM1 cells in a dose-dependent manner. These results may indicate that serum, which induced the invasion, stimulated the intracellular signal transduction system related to Na^{+}-H^{+} exchange and $[Ca^{2+}]$ i spike, and that amiloride and its guanidine analogues inhibited the invasion through the suppression of this system.

Key Words : Ascites hepatoma, Amiloride, Triamterene, Guanethidine, Invasion, Intracellular signal transduction

緒　言

癌の進展に関わるのはただ単に細胞の増殖だけではなく，癌浸潤，癌転移は治療に対する1つの大きな障害となっている．したがって浸潤の予防と抑制は癌治療の新しい指針となってきている．浸潤の機序を解明し，その抑制剤を検索するため，我々はin vitroで浸潤能を測定できるモデルを開発した[1]．このモデルは癌細胞をラットの腹腔内に注入することによってできる浸潤性腫瘍の大きさとよく相関する．このモデルを使って我々は幾つかの浸潤促進物質[2-5]や浸潤抑制物質[6-8]を見い出してきたが，それらは癌の浸潤能が宿主によって影響されることを示唆していた[9]．このモデルでは中皮細胞や血管内皮細胞を単層培養し，その上に癌細胞を重層培養して浸潤能を測定するが，培養液には10%の胎仔血清が加えられている．しかし血清を除くと浸潤は認められない[10]．また血清を加えるとすぐに浸潤が開始される．血清は0.4%牛血清アルブミン，300 μg/ml トランスフェリン，5 μg/ml インシュリン，25ng/ml EGF (Epidermal growth factor)，100ng/ml IGF-I (Insulin-like growth factor)，4 μg/ml HGF (Hepatocyte growth factor)，20 μg/ml フィブロネクチン，あるいは8 μg/ml ヴィトロネクチンで代用できない[11]．血清より部分的に精製した分画を加えると浸潤誘発作用は認められるが

増殖促進作用は認めない．最近我々はオレオイルーリゾフォスファチジン酸やフォスフォリパーゼDの添加が血清の添加と同程度の浸潤誘発を起こすことを報告した[11]．リゾフォスファチジン酸による細胞刺激が浸潤を誘発する機構を解析する目的で，癌細胞を前もって，rho低分子量G蛋白を特異的にADPリボシル化して失活させるボツリヌス毒素C3で処理したところ，リゾフォスファチジン酸の作用が抑制された[11]ことからGTP結合タンパクを介する細胞内情報伝達が浸潤に関与していると考えられた．

血清に含まれているような多種の生物活性物質が細胞表面にある受容体に結合すると初期の変化として細胞のイオン輸送の変化が観察されることが報告されている[12]．この変化を抑制すると生物活性までも抑制される．例えばアミロライドは腫瘍の増殖を抑制することが報告されている[13]．種々のグアニジン誘導体はアミロライドと較べてナトリウムイオンの流入をより効果的に抑制することが報告されている．Kaczorowski，G．J．らによるとアミロライドのアシルグアニジン誘導体はその作用発現のためには陽イオン化されていなければならない[14]．本論文では浸潤における細胞内情報伝達を知り，新しい抗浸潤薬を探索するためにラット腹水肝癌(AH細胞)の細胞内pH(pHi)および細胞内カルシウムイオン($[Ca^{2+}]$ i)に対する血清の効果を調べた．また癌の浸潤に対するアミロライドとその構造類似体の効果を調べた．

対象および方法

1）試薬

アミロライド(3，5-diamino-6-chloro-N-(diaminomethylene)-pyrazinecarboxamide)，牛血清アルブミン，インスリン，N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonicacid (HEPES)はSigma社より購入した．1-2-(5'-carboxyoxazol-2'-yl)-6-aminobenzofuran-5-oxy)-2-(2'-amino-5'-methylphenoxy)-ethane-N，N，N'，N'-tetraacetic acid．K salt (fura-2)，fura-2-AM，2，7-Bis (carboxyethyl)-5，6-carboxy-fluorescein (BCECF)，BCECF-AMは和光化学工業より購入した．胎仔血清(FCS)はCell Culture Laboratoriesから購入した．グアネチヂン((2-hexahydro-1(2H)-azocinyl)-ethyl)-guanidine sulphate)およびトリアムテレン(2，4，7-triamino-6-phenylpteridine)は各々日本チバガイギィ社および住友製薬より供与された．

2）培養細胞

ラット腹水肝癌AH130(AH細胞)はEagle's minimum essential mediumに10% FCSを加えた培養液(modified MEM)にて培養した．低浸潤細胞株W1はAH細胞から限界希釈法により分離された．高浸潤細胞株MM1はAH細胞から軟寒天法にて分離された．

3）細胞内pHの測定

W1またはMM1 (3×10^7)を140mM NaCl，5mM KCl，1mM $MgCl_2$，10mM HEPES-Na，5mM glucose，1mM $CaCl_2$ (HEPES-glucose液，pH7.4)で洗浄し，10ml液に再浮遊させ，1 μMの BCECF-AMを加えて37℃で30分間反応させた．2度上記洗浄液で洗浄後同じ溶液に再浮遊させ，その0.2ml (3×10^6)を1.5ml HEPES-glucose液に加えた．pHiは細胞内に取り込ませたBCECFの蛍光強度で計測し，K^+/H^+イオノフォアであるニジェリシンを使って水素イオン平衡法で較正した．蛍光強度はAMINCO SPF-500(励起波長506nm，測定波長530nm)により測定した．

4）細胞内遊離カルシウムイオンの測定

W1またはMM1 ($3x10^7$)をHEPES-glucose液，pH7.4で洗浄し，10ml液に再浮遊させ，6 μMのfura-2-AMを加えて37℃で30分間反応させた．2度洗浄後同じ溶液に再浮遊させ，その0.2ml (3×10^6)を1.8ml HEPES-glucose液に加えた．$[Ca^{2+}]$ iは細胞内に取り込ませたfura-2の蛍光強度で計測し，イオノフォアであるイオノマイシンおよびEDTAを使って較正した．蛍光強度はAMINCO SPF-500(励起波長340nm，測定波長510nm)により測定した．

5）浸潤能の測定

浸潤能の測定は以前報告した方法によった[1]．すなわち，ラットの腸間膜より採取した中皮細胞を35mm培養皿に単層培養し(M細胞層)，その上にW1またはMM1細胞を$1x10^5$個蒔いて37℃で24時間培養した．M細胞層下に侵入した癌細胞とコロニー数を位相差顕微鏡を用いて数えて浸潤能とした．アミロライドとトリアムテレンは少量のDMSOに溶解し，培養液に加えた．浸潤能の抑制度はDMSOのみを培養液に加えた時の浸潤能に対する割合で示した．グアネチヂンは少量のPBSに溶解し，培養液に加えた．浸潤能の抑制度はPBSのみを培養液に加えた時の浸潤能に対する割合で示した．

結　果

癌の浸潤における細胞内情報伝達を調べるために，胎仔血清(FCS)を加える前後でMM1の細胞内pH (pHi)を測定した．HEPES-glucose液(pH7.4)に浮遊した高浸潤細胞株MM1と低浸潤細胞株W1のpHiはともに7.40であったが，FCS (HEPES-glucose液(pH7.4)に対して透析してある)をMM1に加える(終濃度10%)と，MM1のpHiは時間依存性に5分間で0.12上昇した(Figure 1)．しかし透析済みFCSのこのような効果はW1では小さくpHi上昇はMM1と較べて4分の1程度であった．このpHiの上昇に対するアミロライドの影響を調べるために，200 μMのアミロライドをFCSとともに加えた．Figure 1に示されたように，MM1のpHiの上昇は認められなかった．その上，FCS添加後7分でアミロライドを加えるとMM1のその後のpHiの上昇は完全に抑制された．

細胞内遊離カルシウムイオン($[Ca^{2+}]$ i)はpHiに反応して変化することが知られているため[15] FCSの添加によるMM1の$[Ca^{2+}]$ iの変化をfura-2をindicatorとして測定したが，変化の度合が小さいので，in vitro浸潤の誘発において FCSと同程度あるいはそれ以上の効果を持つリゾフォスファチジン酸(LPA)を添加し$[Ca^{2+}]$ iの変化を追跡した．Figure 2に示すようにLPA投与後48秒で鋭い上昇があり，その後ゆっくりとした下降が認められた($[Ca^{2+}]$ i spike)．この現象はW1では認められなかった．この$[Ca^{2+}]$i spikeに対するアミロライドの影響はこの薬剤の510nmでの自己蛍光のために測定できなかった．しかしアミロライドの構造類似体であり同様な薬理作用をもつグアネチヂンは自己蛍光を示さないので，グアネチヂンの効果を調べたところ濃度依存性にこの$[Ca^{2+}]$ i spikeを抑制することが明らかとなった(IC50=1mM) (Figure 2)．

次に浸潤に対するアミロライド，グアネチヂンその他のグアニジン誘導体の効果を検討した(Figure 3)．MM1のM細胞層への浸潤はアミロライドを培養液に加えることで濃度依存性に抑制され，200 μMのアミロライドで約80%の抑制が観察された．IC50は30 μMであった．我々の浸潤モデルは癌細胞とM細胞との重層培養であるためアミロライドの効果はM細胞に対するものである可能性がある．そこでMM1細胞あるいはM細胞をアミロライドで前処理して浸潤抑制効果を調べたが，全く抑制を認めなかった．このようにアミロライドの効果は可逆的で，その作用対象がいずれの細胞か明らかにはできなかった．アミロライドは幾つかの細胞株で増殖抑制作用をもつことが報告されているため[13]，MM1の増殖に与えるアミロライドの効果を調べた．100-200 μMのアミロライドは浸潤測定時間(20時間)内で増殖を抑制しなかった．しかしさらに72時間まで調べると100および200 μMのアミロライドは各々21%と59%の増殖抑制を示した．このことより浸潤における細胞内情報伝達経路は細胞増殖の経路と部分的に同一であることが推察された．アミロライドの構造類似体であるグアネチヂンとトリアムテレンも濃度依存性に浸潤を抑制した．グアネチヂンとトリアムテレンのIC50は各々200および40 μMであった．

考　察

我々は既にMM1がM細胞層に浸潤するためには培養液中に血清があることが不可欠であることを報告した[10]．

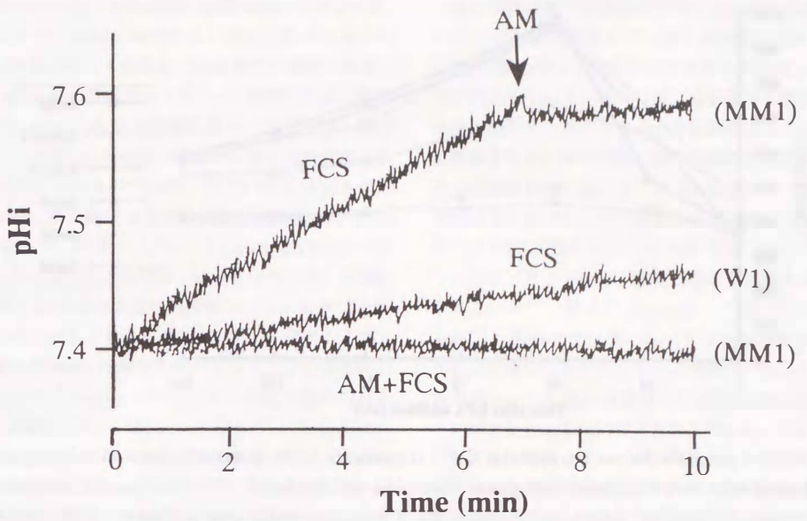

Figure 1. Effect of FCS and amiloride on cytoplasmic pH in AH cells. Routinely cultured W1 or MM1 cells were prepared and loaded with BCECF as described under "Materials and Methods". The loaded cell suspension (3×10^6 cells in 0.2ml HEPES-glucose buffer) was added into 1.5ml HEPES-glucose buffer and measured for its fluorescence intensity. The resting pHi of AH cells was estimated to be 7.40. When FCS was added into the resting state of MM1 cells, a highly invasive clone, suspended in HEPES-glucose buffer, pHi of MM1 cells increased in a time-dependent manner. However, pHi change by FCS of W1 cells, a poorly invasive clone, was much smaller. When 200 μM of amiloride was added together with FCS, no increase of pHi of MM1 cells was observed. When amiloride was added 7min. After the addition of FCS, the drug completely impaired the pHi increase of MM1 cells.

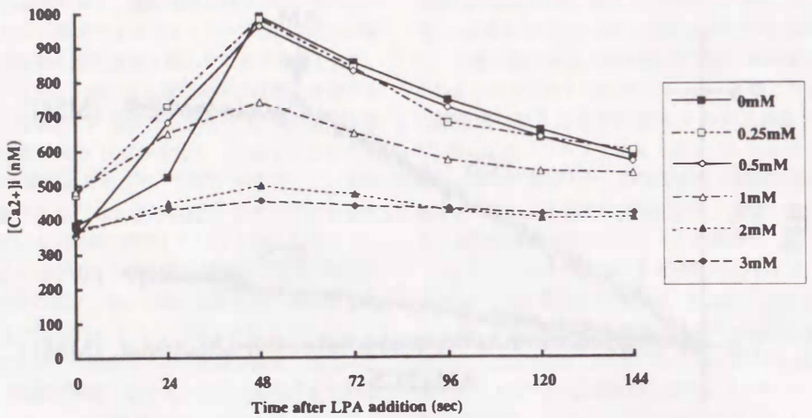

Figure 2. Effect of guanethidine on intracellular Ca^{2+} response to LPA. Routinely cultured MM1 cells were prepared and loaded with fura-2 as described under "Materials and Methods". The fluorescence intensity of 0.2ml of cell suspension (2×10^7/ml) added into 1.8ml of HEPES-glucose buffer was measured. LPA addition instantaneously resulted in a sharp increase of $[Ca^{2+}]$ i followed by its slower decrease ($[Ca^{2+}]$ i spike). Guanethidine suppressed the $[Ca^{2+}]$ i spike of MM1 cells in a dose-dependent manner. IC50 was estimated to be 1mM.

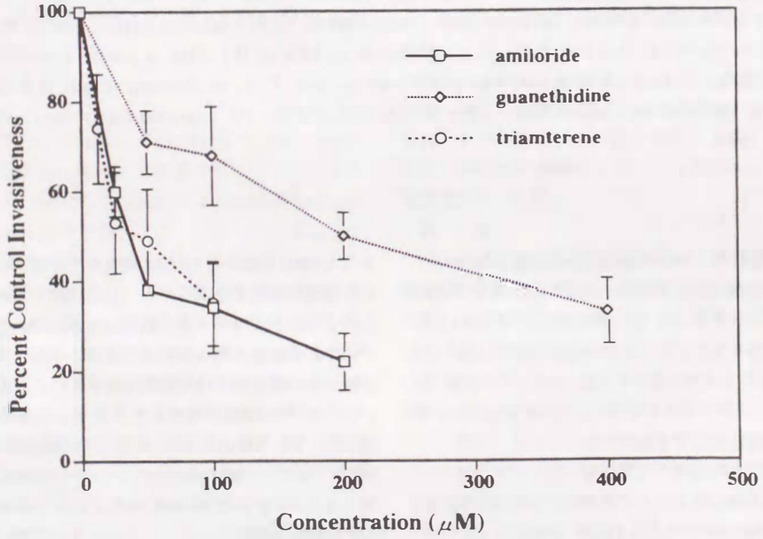

Figure 3. Effect of guanidine analogues on tumor invasiveness. Routinely cultured MM1 cells were prepared and in vitro invasive capacity of the cells was assayed as described under "Materials and Methods". Guanidine analogues added in the invasion assay medium inhibited the invasion of M cell layer by MM1 cells in a dose-dependent manner. Almost 80% inhibition was observed with 200 μM of amiloride. Half maximum inhibition was estimated to be at 30 μM. Almost 70% inhibition was observed with 400 μM of guanethidine. Half maximum inhibition was estimated to be at 200 μM. Almost 70% inhibition was observed with 100 μM of triamterene. Half maximum inhibition was estimated to be at 20 μM. Points, mean of triplicate experiments ; bars, SE.

FCS を培養液から除くと癌細胞の浸潤は認められないが，FCS を添加すると浸潤が開始する．FCS に見られるこのような浸潤誘発作用は人血清または血漿でも認められる．浸潤における血清の要求性は MM1－中皮細胞の系に特異的ではなく，MM1の血管内皮細胞層への浸潤やヒト肺小細胞癌のヒト胸膜中皮細胞層への浸潤に対しても認められる．浸潤に対する血清の作用機序についてはほとんど分かっていない．本実験では血清やこれに代わる LPA の添加により MM1の pHi 上昇と $[Ca^{2+}]$ i spike が誘起されることが明らかになった．現段階ではこれらのイオンの変化が M 細胞層への浸潤の過程に直接関わっているかは不明である．しかし pHi 上昇と $[Ca^{2+}]$ i spike を抑制するグアニジン誘導体が同時に浸潤を抑制すること及び浸潤抑制が pHi 上昇と $[Ca^{2+}]$ i spike の抑制と同じ濃度で認められることから，浸潤に伴って細胞内 pH や Ca^{2+} の変化が誘起されることが示唆される．低浸潤株である W1では血清刺激による pHi や $[Ca^{2+}]$ i spike がほとんど認められないという結果はこの推察を支持する．白血球遊走因子の１つである formylmethyonylleucylphenylalanine（fMet-Leu-Phe）はアミロライド感受性の Na^+-H^+ 逆輸送タンパクを介しての pHi 上昇を誘導する[16]が，我々の結果とよく合っている．またⅣ型コラーゲンによって A2058細胞が遊走刺激され，それに重要な役割を示している細胞カルシウムストアからのカルシウム放出をこのコラーゲンが誘導していることが報告されている[17]．

高浸潤株である MM1と低浸潤株である W1がほとんど同じ増殖曲線(倍加時間；18時間)を示すが血清によって誘起されるイオン変化は W1に較べて MM1ではるかに大きいことより，これらイオン変化が細胞増殖に対する初期応答である可能性は小さい．この推測は細胞増殖がイオン変化および浸潤を抑制する濃度ではアミロライドで抑制されなかったことによっても裏付けられる．Sparks らによってアミロライドが移植腫瘍の増殖を抑えることが報告されているが[13]，Szolgay-Daniel らは pHi の変化は細胞増殖に直接関わっていないことを報告している[18]．彼等は３種の腫瘍細胞株の増殖に対するアミロライドの効果を調べているが，２種の細胞株では増殖は抑制されたが，ほかの１種では抑制されなかった．この３種の細胞株のあいだでアミロライド存在下での pHi は同じであった．このことよりアミロライドの増殖抑制は pHi 制御と明らかな関連は認められない．アミロライドの浸潤抑制効果に対するもう１つの解釈は癌の浸潤や転移に関係していると考えられているウロキナーゼ型のプラスミノーゲン活性化因子をアミロライドが抑制するというものであろう[19]．しかし MM1による浸潤はアプロチニンのような serine protease inhibitor や trypsin inhibitor である phenylmethylsulphonyl fluoride[6]や tissue-specific metalloproteinase inhibitor などでは抑制されない．

最近細胞運動や癌細胞の浸潤を引き起こす情報伝達機構についての研究が進んでいる．癌細胞の運動を促進する AMF は細胞膜リン脂質のメチル化を誘発する[20]ことが明らかにされている．我々は既に細胞膜リン脂質のメチル化やある種のタンパクキナーゼを抑制することによって浸潤を抑制することから浸潤に関する細胞膜を介する信号伝達系の存在を報告している[8]．GTP 結合タンパクは細胞内情報伝達系における１つの重要な介在物質であるが，百日咳毒素は GTP 結合タンパクを ADP リボシル化することにより A2058ヒトメラノーマ細胞の遊走を抑制することが報告されている[21]．最近の Savarese．D．M．F．らの報告によると[17]，Ⅳ型コラーゲンによる A2058細胞の遊走刺激，それに重要な役割を示している細胞内カルシウムストアからのカルシウム放出の誘導は百日咳毒素感受性 GTP 結合タンパクを介してはいないとされている．かれらは幾つかの可能性を指摘しているが，細胞内カルシウムの上昇と百日咳毒素感受性 GTP 結合タンパクとの作用はⅣ型コラーゲン分子の異なったドメインを介するという可能性，あるいは細胞内カルシウムの上昇は遊走の誘導の初期応答であり百日咳毒素感受性 GTP 結合タンパクを介しての現象はもっと下流にある現象であるという可能性，あるいはⅣコラーゲンによる細胞内カルシウムの上昇が百日咳毒素感受性 GTP 結合タンパク(Gi，Go)を介する他の介在物質を誘導しそれによって細胞運動が引き起こされるという可能性などである．我々の系では百日咳毒素は MM1の浸潤には効果はなかったが，GTP 結合タンパク(Gs)を ADP リボシル化するコレラ毒素は著明な浸潤抑制効果を示した[11]．しかし百日咳毒素もコレラ毒素も MM1の $[Ca^{2+}]$ i spike を抑制しなかった．これらの結果は Savarese．D．M．F．らによって指摘されたのとまったく同じ可能性を示唆する．すなわち細胞内カルシウムの上昇とコレラ毒素感受性 GTP 結合タンパクとの作用は血清中の異なった物質あるいは同じ物質の異なったドメインを介するという可能性，あるいは細胞内カルシウムの上昇は遊走の誘導の初期応答でありコレラ毒素感受性 GTP 結合タンパクを介しての現象はもっと下流にある現象であるという可能性，あるいは血清による細胞内カルシウムの上昇が百日咳毒素感受性 GTP 結合タンパクを介する他の介在物質を誘導しそれによって細胞運動が引き起こされるという可能性などである．以上より，血清やⅣ型コラーゲンは GTP 結合タンパクを介しての信号を誘導し，それによる c-AMP レベルが浸潤や細胞運動を制御しているのかも知れない．百日咳毒素やコレラ毒素に対する感受性は細胞の種類によって異なるのであろう．ここで得られた結果は予備的なものであるが，浸潤における細胞内情報伝達において GTP 結合タンパクが関与していると思われる．アミロライドは最近幾つかのホルモンによって誘起される細胞内情報伝達において GTP 結合タンパクを修飾することが報告されている

Anand-Srivastava らは百日咳毒素感受性 GTP 結合タンパクを介するアデニレートシクラーゼの制御をアミロライドが修飾することを報告している[22].

腫瘍細胞の浸潤を抑制するアミロライドの作用は特異的ではなく，この構造類似物質であるグアネチヂンやトリアムテレンもまた浸潤を抑制する．我々は現在ラットをもちいた浸潤実験でのこれらの薬剤の効果を検討中である．これらの薬剤は現在利尿剤としてあるいは降圧剤として臨床で使用されており，薬効や副作用についてよく知られているため抗浸潤薬剤としての臨床応用が期待される．

文　献

1) Akedo H, Shinkai K, Mukai M, Mori Y, Tateishi R, Tanaka K, Yamamoto R. and Morishita T. Interaction of rat ascites hepatoma cells with cultured mesothelial cell layers : a model for tumor invasion. Cancer Res., 46 : 2416-2422, 1986.

2) Mukai M, Shinkai K, Tateishi R, Mori R. and Akedo. Macrophage potentiation of invasive capacity of rat ascites hepatoma cells. Cancer Res., 47 : 2167-2171, 1987.

3) Mukai M, Shinkai K, Komatsu K. and Akedo H. Potentiation of invasive capacity of rat ascites hepatoma cells by transforming growth factor-ア. Jpn. J. Cancer Res., 80 : 107-110, 1989.

4) Shinkai K, Mukai M. and Akedo H. Superoxide radical potentiates invasive capacity of rat ascites hepatoma cells in vitro. Cancer Lett., 32 : 7-13, 1986.

5) Imamura F, Horai T, Mukai M, Shinkai K. and Akedo H. Potentiation of invasive capacity of rat ascites hepatoma cells by adriamycin. Cancer Res., 50 : 2018-2021, 1990.

6) Shinkai K, Mukai M, Komatsu M. and Akedo H. Factor from rat liver with antiinvasive potential on rat ascites hepatoma cells. Cancer Res., 48 : 3760-3764, 1988.

7) Isoai A, Giga-Hama Y, Shinkai K, Mukai M, Akedo H. and Kumagai H. Purification and characterization of tumor invasion-inhibiting factors. Jpn. J. Cancer Res., 81 : 909-914, 1990.

8) Shinkai K, Mukai M, Horai T, Ohigashi H, Nishikawa S, Inoue H, Takeda Y, and Akedo H. Inhibition of in vitro tumor cell invasion by transmethylation inhibitors. Jpn. J. Cancer Res., 80 : 716-719, 1989.

9) Akedo H, Shinkai K, Mukai M. and Komatsu K. Potentiation and inhibition of tumor cell invasion by host cells and mediators. Invasion Metastasis, 9 : 134-148, 1989.

10) Imamura F, Horai T, Mukai M, Shinkai K, and Akedo H. Serum requirement for in vitro invasion by tumor cells. Jpn. J. Cancer Res., 82 : 493-496, 1991.

11) Imamura F, Horai T, Mukai M, Shinkai K, Sawada M, and Akedo H. Induction of in vitro tumor cell invasion of cellular monolayers by lysophosphatidic acid or phospholipase D. Biochem. Biophys. Res. Comm., in press.

12) Rollins B. J. and Stiles C. D. Serum-inducible genes. Adv. Cancer Res., 53 : 1-32, 1989.

13) Sparks R. L, Pool T. B, Smith N. K. R, and Cameron I. L. Effects of amiloride on tumor growth and intracellular element content of tumor cells in vivo. Cancer Res., 43 : 73-77, 1983.

14) Kaczorowski G. J, Barros F, Dethmers J. K, and Trumble M. J. Inhibition of Na^+/Ca^{2+} Exchange in pituitary plasma membrane vesicles by analogues of Amiloride. Biochemistry, 24 : 1394-1403, 1985.

15) Kiang J. G. Effect of intracellular pH on cytosolic free $[Ca^{2+}]$ in human epidermoid A-431 cells. Eur. J. Pharmacol., 207 : 287-296, 1991.

16) Grinstein S. and Furuya W. Amiloride-sensitive Na^+/H^+ exchange in human neutrophils : mechanism of activation by chemotactic factors. Biochem. Biophys. Res. Commun., 122 : 755-762, 1984.

17) Savarese, D. M. F, Russell J. T. Fatatis A, and Liotta L. A. Type Ⅳ collagen stimulates and increase in intracellular calcium. J. Biol. Chem., 267 : 21928-21935, 1992.

18) Szolgay-Daniel E, Carlsson J, Zierold K, Holtermann G, Dufau E, and Acker H. Effects of amiloride treatment on U-118 MG and U-251 MG human glioma and HT-29 human colon carcinoma cells. Cancer Res., 51 : 1039-1044, 1991.

19) Vassalli J. D, and Belin D. Amiloride selectively inhibits the urokinase-type plasminogen activator. FEBS lett, 214 : 187-191, 1987.

20) Liotta L. A, Mandler R, Murano G, Katz D. A, Godon R. K, Chiang P. K, and Schiffmann E. Tumor cell autocrine motility factor. Proc. Natl. acad. Sci. USA, 83 : 3302-3306, 1986.

21) Stracke M. L, Guirguis R, Liotta L. A, and Schiffmann E. Pertussis toxin inhibits stimulated motility independently of the adenylate cyclase pathway in human melanoma cells. Biochem. Biophys. Res. Comm., 146 : 339-345, 1987.

22) Anand-Srivastava M. B, Gutkowska J. and Cantin M. The presence of atrial-natriuretic-factor receptors of ANF-R2 subtype in rat platelets. Biochem. J., 278 : 211-217, 1991.

抄　録

我々はグアニジニウム基をもつアミロライド，グアネチヂン，トリアムテレンの3薬剤について，ラット腹水肝癌(AH 細胞)の浸潤抑制作用を調べた．浸潤能の測定はラットの初代培養中皮細胞層上に AH 細胞を重層培養し，AH 細胞が中皮細胞層下に侵入して形成されるコロニー数を測定する浸潤モデル系(H. Akedo et al., Cancer Res., 46 : 2416-2422, 1986)を使用した．これら3薬剤は濃度依存性に浸潤抑制効果を示した．我々は以前に，この系では血清無しでは浸潤は認められないことを報告した(Jpn. J. Cancer Res., 82 : 493-496, 1991)．血清を AH 細胞の高浸潤株 MM1に添加することにより，細胞内 pH (pHi)の上昇，遊離カルシウムイオンの一過性上昇($[Ca^{2+}]$ i spike)がみられるが，低浸潤株 W1ではこれらイオン変化はほとんど認められなかった．アミロライドは血清による MM1の pHi の上昇を濃度依存的に抑制した．また，グアネチヂンは$[Ca^{2+}]$ i spike を濃度依存的に抑制した．我々の系において血清は癌浸潤を誘導するが，この作用は Na^+-H^+交換やカルシウムイオン交換に関わる細胞内情報伝達を賦活することにより，また，グアニジニウム基をもつアミロライド，グアネチヂン，トリアムテレンの3薬剤はこの作用を抑えることにより，浸潤を抑制すると考えられた．