



Title	細胞接着分子の活性中心ペプチドおよびその Polyethylene glycol 修飾体のガン転移抑制に関する 研究
Author(s)	山本, 普
Citation	大阪大学, 1994, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/38765
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていない ため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利 用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文につい てをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏 名	山 本 晋
博士の専攻分野の名称	博 士 (薬 学)
学 位 記 番 号	第 1 1 3 3 6 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 6 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 薬学研究科応用薬学専攻
学 位 論 文 名	細胞接着分子の活性中心ペプチドおよびその Polyethylene glycol 修飾体のガン転移抑制に関する研究
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 眞弓 忠範 (副査) 教 授 馬場 明道 教 授 三浦 喜温 教 授 西原 力

論 文 内 容 の 要 旨

現在、わが国において死因の第一位を占める癌の治療を行うとき、最大の問題点は癌転移にある。事実、癌による死因の多くが、直接的または間接的に転移に関係している。そこで近年癌転移のプロセスをひとつひとつのステップに分け、分子レベルでそれらを解析する試みが盛んに行われている。特に癌細胞と細胞外マトリックスの接着は、転移巣形成において重要であり、癌転移抑制療法の大きなターゲットになる。

この細胞外マトリックスは、単なる細胞の足場ではなく、細胞の接着や移動さらには分化に大きく関与している。これらの細胞機能の発現は細胞表面に存在するレセプターを介して行われ、このレセプターの認識部位である細胞接着活性中心のアミノ酸配列が同定された。この細胞接着活性中心をペプチド合成により作製した細胞接着ペプチドは、接着分子と細胞との結合を競合的に阻害する。したがって細胞接着ペプチドは、細胞接着抑制というユニークな活性を持つ転移抑制剤となる可能性がある。そこで本論文では、癌転移に深く関与すると考えられる基底膜中の細胞外マトリックス、ラミニンおよびファイブロネクチンの細胞接着ペプチドおよびその誘導体を作製し、その癌転移抑制剤としての可能性を検討した。まず、ラミニンとファイブロネクチンの細胞接着ペプチドの転移抑制活性を B16 メラノーマ細胞の実験的肺転移により検討した。ラミニンの細胞接着ペプチド Cys-Asp-Pro-Gly-Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg (CDP GYIGSR), Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg (YIGSR) および Pro-Asp-Ser-Gly-Arg (PDSGR) とファイブロネクチンの Arg-Gly-Asp (RGD), Glu-Ile-Leu-Asp-Val (EILDV) および Arg-Glu-Asp-Val (REDV) はいずれも転移抑制作用を有しており、なかでも EILDV は最も強い転移抑制活性を示した。またペプチドの効果増強を目的に、YIGSR をモデルペプチドとして一部のアミノ酸の置換、二量体の作製および環状化を行ったところ、2 位の Ile を Cys で置換した YCGSR には YIGSR に匹敵する強い転移抑制活性が認められた。しかしその他のペプチドには、いずれも効果増強は認められなかった。

ところで、これらのペプチドは生体内では不安定であり、速やかに分解され排泄されると言われている。したがって細胞接着ペプチドを転移抑制剤として利用するためには何らかの方法でペプチドの安定性を改善し、効果の増強をはかる必要がある。一般、にペプチドを高分子タンパク質と結合させたり、ポリペプチド化すると生体内での安定性は改善されるが、この場合抗原性が問題となる。そこで生体内で安定で、毒性が極めて低く、かつ抗原性の低い水溶性高分子である polyethylene glycol (PEG) とペプチドのハイブリッド化を試みた。ラミニンとファイブロネクチンの各種細胞接着ペプチドについて PEG 修飾体を作製したところ、その効果はペプチドのモル換算で約 4 倍から 230

倍に増強された。修飾に用いる PEG の分子量を検討したところ、平均分子量6000の PEG は3000のものより強い増強作用が認められた。またペプチドの PEG 修飾法を検討したところ、C 端を amino-PEG で修飾する方法、N 端を carboxyl-PEG で修飾する方法とも有効であった。ところで、生体内における癌転移の複雑な過程と、癌細胞と細胞外マトリックスとの多様な作用を考えると、これらのペプチドの併用により、より高い転移抑制効果が期待できる。そこで各種の細胞接着ペプチド-PEG 誘導体を用いてその併用効果を検討したところ、YIGSR, EILDV, REDV の組み合わせが最も有効であった。

次に、PEG 化ペプチドの転移抑制効果をより臨床に即した自然肺転移法を用いて検討した。尾静脈内に投与したペプチドは原発巣の腫瘍増殖にはほとんど影響しなかったが、転移コロニー数は約45%から60%以上抑制し、細胞接着ペプチド-PEG 誘導体が非常に有効な癌転移抑制剤になる可能性が強く示された。実際の臨床の場での転移抑制剤の利用は、原発巣を外科手術により除去した後の侵襲による転移促進の予防にあると考えられるが、以上の結果から細胞接着ペプチド-PEG 誘導体は転移予防剤としても充分利用できると考えられる。

さらにこの PEG 化による効果増強のメカニズムを解明するため、YIGSR およびその PEG 化体を¹²⁵I でラベル化し、静脈内投与後の血中濃度推移、臓器分布をそれぞれ検討した。両者の血中放射活性の消失パターンは同様な二相性を示し、PEG 化による見かけの血中滞留性の延長は認められなかった。またこれらの体内分布を検討した結果、両者間に差はなく、癌転移臓器である肺への集積も観察されず、速やかに腎糸球体濾過をうけ尿中に排泄された。そこで尿中に排泄されたペプチドの分解性の検討を行ったところ、未修飾ペプチドの大半が分解物であったのに対し、PEG 化ペプチドはほとんど分解されていないことが判明した。従って体内で YIGSR は速やかに分解され、PEG 化体は非常に安定であると予想される。そこで In Vitro での血清中でのペプチドの安定性を確認した結果、未修飾ペプチドの大半が分解されたのに対し、PEG 化ペプチドはほとんど分解されなかった。すなわちペプチドを PEG でハイブリッド化することにより、生体内ペプチダーゼによる分解が阻害され、ペプチドの生物活性をも考慮した真の生体内半減期が延長されたことになる。

以上の知見から、細胞接着ペプチドを PEG 修飾することにより、癌転移抑制活性が顕著に増強されることを明らかにしただけでなく、その効果増強のメカニズムの一端を解明し、これが新規の癌転移抑制剤となる可能性を見いだした。

論文審査の結果の要旨

癌の転移は1) 癌細胞の基底膜破壊による原発巣からの遊離、2) 遊離した癌細胞の血管系への進入、3) 標的組織中の血管内皮細胞・基底膜への接着、4) 基底膜破壊による組織中への浸潤、5) 転移巣での癌細胞の増殖、といういくつかの過程を経て成立する。このように癌細胞は転移の過程で2度基底膜を浸潤することが必要で、基底膜を構成している細胞外マトリックスへの接着に始まる基底膜の破壊と浸潤は、癌転移のプロセスにおいて非常に重要である。

さて細胞外マトリックスには、ラミニンやファイブロネクチン等の成分が知られており、ファイブロネクチンの細胞接着ドメイン中に存在する RGD 配列、およびラミニン中の細胞接着活性部位 YIGSR が癌細胞の転移を抑制すると報告されている。しかしながら、生理活性ペプチドや蛋白質の多くは一般に各種分解酵素による分解を受けやすいため、体内滞留時間が短く十分な効果が得られていない。このような不安定性を克服する方法として、著者は polyethylene glycol (PEG) とペプチドとのハイブリッド化を試み、ラミニンおよびファイブロネクチンの種々活性中心ペプチドおよびその PEG 修飾体を合成し、癌転移抑制剤としての細胞接着ペプチドの可能性を検討した。

その結果、1) ラミニンおよびファイブロネクチン関連ペプチドを作製し、YIGSR, YCGSR, CDPGYIGSR, PDSSGR, RGD, EILDV, REDV に高い転移抑制活性を認めた。特に EILDV の効果が高かった。2) 細胞接着ペプチドの PEG 修飾により転移抑制効果は4~230 倍にも増強された。修飾に用いる PEG の分子量を検討したところ、平均分子量6000が最適であった。またペプチドの PEG 修飾法を検討したところ C 端を amino-PEG で修飾する方法、N 端を carboxyl-PEG で修飾する方法とも有効である事を認めた。3) 細胞接着ペプチド-PEG 修飾体は、実験的肺転移系のみならず自然転移系においても著明に肺転移を抑制した。4) PEG 修飾による細胞接着ペプチドの転移抑制効果増

強のメカニズムを検討したところ、生体内での安定性の改善がその主な要因であることが示唆された。

従来の癌転移抑制剤は、すべて癌細胞を直接障害することにより転移形成を抑制するものであり、細胞毒性による副作用は避けられなかった。しかし細胞接着ペプチド-PEG 誘導体は、癌細胞の細胞接着に着目し癌転移の抑制をねらったものであり、既製の制癌剤と比較して毒性はほとんど無視できる程度のものである。

従って細胞接着ペプチド-PEG 誘導体は新しい癌転移抑制剤として非常に期待できるものであり、博士（薬学）の学位を授与するにふさわしいものである。