

N-nitrosobis(2-oxopropyl)amine による ハムスター膵管癌発生に対する ウシおよびサメ軟骨水抽出物の影響

奈良県立医科大学附属がんセンター腫瘍病理学教室

村田 奈保

EFFECTS OF BOVINE AND SHARK CARTILAGE WATER EXTRACTS ON PANCREATIC DUCTAL CARCINOGENESIS IN HAMSTERS

NAO MURATA

Department of Oncological Pathology, Cancer Center, Nara Medical University

Received October 2, 2002

Abstract: Effects of shark cartilage water-extract (SCE) and bovine cartilage water-extract (BCE) on pancreatic duct carcinogenesis were investigated using a rapid production model for pancreatic duct carcinoma in hamsters, and the following results were obtained.

1. SCE inhibited activities of MMP-2 and MMP-9 but BCE did not *in vitro*.
2. BCE did not have beneficial effects on chemoprevention of pancreatic carcinomas.
3. No toxic signs, including growth retardation or loss of pancreatic and liver weights, were observed in hamsters treated with BOP followed by SCE.
4. The diet containing 0.4% SCE reduced significantly the numbers of adenocarcinomas and ductal lesions.
5. SCE did not affect the BrdU labeling indices of pancreatic ductal lesions.
6. SCE did not affect expression levels of proenzyme form of MMP-2 and MMP-9 and enzyme form of MMP-2 in adenocarcinomas.

These results indicate that SCE possesses inhibitory effects on development of pancreatic carcinomas and that SCE may be a candidate of chemopreventive agent for pancreatic carcinomas.

Key words: hamster, pancreas, shark cartilage, chemoprevention

緒 言

膵癌は、悪性腫瘍の中でも予後不良である難治性がんの代表的なものの1つである。近年の診断技術の進歩によっても、その早期発見は困難であり1999年の膵癌全国登録調査報告¹⁾において、切除例は39.4%にすぎないことが報告されている。また、拡大膵切除術、放射線およ

び化学療法を行う集学的治療法の開発により、予後の改善にある程度の成果が得られつつあるが、直径2 cm以下の小膵癌においても、5年生存率は32.2%にすぎない¹⁾。このように難治性である膵癌の制圧のためには、従来の治療法では限界が感じられることより、新たな治療戦略として癌の発生および進展を阻止あるいは遅延させる化学予防法の開発が、重要な研究課題の1つとして取り上

げられ、動物実験系を用いた化学予防法の基礎的研究の成果が望まれている。

膵癌は外分泌腺由来の悪性腫瘍と定義されているが、大別すると腺房細胞癌と膵管癌に分けられ、ヒト膵癌の大部分は膵管由来の膵管癌である。動物実験系では、腺房細胞由来の腫瘍についてはラットにazaserineや4-hydroxyaminoquinoline 1-oxideを投与する実験系があり^{2,3)}、膵管上皮由来の腫瘍については、ハムスターにN-nitrosobis(2-hydroxypropyl)amine (BHP)やその関連物質を投与する実験系がある⁴⁾。ハムスター膵癌実験系はヒト膵管癌に組織形態が類似しているのみならず、K-ras 遺伝子⁵⁾、p53 遺伝子⁶⁾などの遺伝子異常の点からもヒト膵管癌との類似性が高く、ヒト膵癌の良い実験系とされており⁷⁾、膵発癌を予防する化学物質の検索のためには、ハムスター実験系による検索が必要である。しかし、BHP関連ニトロソ化合物によるハムスター膵管癌実験系では、最も強力な膵発癌物質であるN-nitrosobis(2-oxopropyl)amine (BOP)を用いても膵癌の発生に長期間を要することより、膵発癌を予防する物質を効率よく検索するためには、短期間に膵癌を発生させる実験系の開発が望まれていた。Mizumotoらは、ラットの肝発癌系で示されていた化学物質によってinitiationを受けた細胞は化学物質に抵抗性を示し選択的に増殖へと導くことが可能であるとの仮説⁸⁾を膵発癌系に応用し10週間で約80%のハムスターに膵癌を発生させる実験系を開発した⁹⁾。この実験系において膵癌は、膵管上皮過形成、異型過形成、膵管内癌を経て浸潤癌へと段階的に進展すること、また、種々の遺伝子異常が段階的に蓄積して膵癌が発生および進展することが明らかにされた⁷⁾。種々の癌で、癌細胞の浸潤や転移に関与する重要な酵素とされているmatrix metalloproteinases (MMPs)のこの実験系における役割については、膵管癌の発生および膵癌細胞の浸潤増殖にMMP-2の発現および活性化が重要であることが明らかにされ、MMPs阻害剤の一つであるOPB-3206が膵癌化学予防の候補物質であることが示された¹⁰⁾。しかし、膵癌の発生および進展を阻止するために有効な用量を投与するとOPB-3206は動物体重の減少のような毒性作用を示し、膵癌患者への適用のためには、さらに毒性の少ないMMPs阻害物質の検索が必要とされていた。

サメ軟骨は、慢性関節リウマチや変形性関節症の民間薬として用いられていたが、Mosesらはサメ軟骨に血管新生抑制作用のあることをみだし、この血管新生抑制作用はMMPsの阻害による可能性を報告した¹¹⁻¹³⁾。一方、腫瘍の増殖や転移巣の形成には血管の新生が必須である

ことより、血管新生阻害剤の癌治療への応用が注目されており¹⁴⁾、また、MMPsは種々の癌の進展に関与していることより、MMPs阻害剤の抗腫瘍作用も注目されている¹⁵⁾。サメ軟骨については、血管新生抑制作用を持つ天然物質として、抗腫瘍効果が期待されており¹⁶⁾、サメ軟骨を癌患者に投与する臨床研究が計画されていた¹⁷⁾。しかし、サメ軟骨を十分量服用することは、腹部不快感などから困難であり、進行癌患者を対象としたMillerらの臨床研究では癌の進展を阻止する効果は無いと報告されている¹⁸⁾。また、サメ軟骨の抗腫瘍効果については、動物の発癌実験系を用いての基礎的研究は乏しいにもかかわらず、抗腫瘍薬として期待されているのが現状である¹⁹⁾。

本研究は、サメ軟骨の膵癌化学予防物質としての可能性を検索する目的で、サメ軟骨よりMMPs阻害作用のある画分を水にて抽出し、ハムスター短期膵癌発生実験系において膵癌の前癌病変が発生した時期よりサメ軟骨水抽出物(SCE)を投与し、前癌病変から膵癌の発生を指標としてSCEの膵癌化学予防作用について検索を行った。また、ウシ軟骨水抽出物(BCE)についても同様の実験を行い、サメ軟骨との比較を行った。

材料および方法

1. 化学物質

膵発癌物質として、BOPを用い、BOP、DL-ethionine、L-methionineはナカライテスク(京都)より購入した。サメ軟骨は、ヨシキリザメのひれの中骨を用いた。SCEは、この軟骨をハサミで細切後、ドライアイスとともにミキサーにかけて凍結粉碎を行い、この粉碎物に蒸留水を加えた後、布フィルターを用いて圧搾抽出し、エタノールを加え生じた沈殿物を凍結乾燥させ作製した。BCEは、ウシの椎間板軟骨を用い、SCEと同様の方法で作製した。

2. 動物および実験デザイン

動物は6週齢雌性シリアンゴールデンハムスター(日本エスエルシー、静岡)を用いた。動物はプラスチックケージに3から4匹ずつ収容し、温度24±1℃、湿度60±5%、照明時間12時間/日に制御した動物室で飼育した。飼料と飲水は自由摂取とし、基礎食としてCE-2(日本クレア、東京)を使用した。コリン欠乏食はDyets Inc. (Bethlehem, PA)より購入した。本研究において、同様の実験デザインよりなる実験1と実験2を行った。基本的な実験デザインをFig.1に示す。実験開始時に全動物に体重kgあたり50mgのBOPを皮下投与し、短期膵癌発生系⁹⁾に従い、コリン欠乏食投与、体重kgあたり500mgのエチオニン腹腔内投与、体重kgあたり800mg

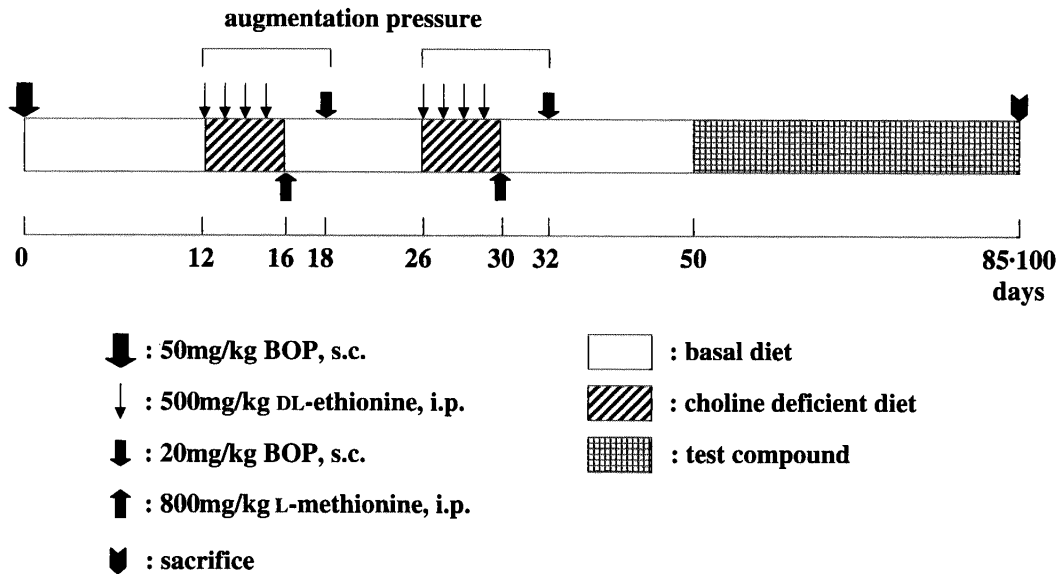


Fig. 1. Experimental protocol

のメチオニン腹腔内投与および体重 kg あたり 20 mg の BOP 皮下投与よりなる一連の操作(augmentation pressure)を2回行った。実験開始50日目に、動物を無作為に群分けし、被験物質をそれぞれの濃度で餌に混じり投与した。実験終了時に、動物はエーテル麻酔下に、腹部大動脈より脱血屠殺し、脾および肝臓を摘出した。実験1において、第1群は基礎食投与群12匹、第2群は0.2% SCE投与群12匹、第3群は0.4% SCE投与群12匹、第4群は0.4% BCE投与群13匹とし、被験物質は35日間投与し、実験開始85日目に生存していた全動物を屠殺剖検した。実験2において、第1群は基礎食投与群15匹、第2群は0.2% SCE投与群15匹、第3群は0.4% SCE投与群15匹とし、被験物質を50日間投与し、実験開始100日目に生存していた全動物を屠殺剖検した。なお、各群5匹ずつ、屠殺2時間前に bromodeoxyuridine (BrdU, 和光純薬, 京都)を体重 kg あたり 20 mg 腹腔内に投与した。また、肉眼的サイズの腫瘍がみられた場合には、腫瘍組織における MMPs の発現を検索するため、腫瘍の一部を切除し、液体窒素にて凍結した後、実験に使用する前まで、-80℃にて保存した。動物実験は奈良医大動物実験施設において、同施設の動物実験倫理規定を遵守して行った。

3. 病理学および免疫組織化学的検索

膵臓は重量を測定した後、ろ紙上に進展し、中性緩衝ホルマリンにて固定し、脾臓、胃臓、十二指腸臓に分けて標本を作製した。肝臓は重量測定後、肉眼的腫瘍の数を記録した後、腫瘍部分を中心に厚さ 5 mm に切り出し、

中性緩衝ホルマリンにて固定した。組織はパラフィン包埋した後、薄切標本を作製し、病理組織検索のため、ヘマトキシリン-エオジン (HE) 染色を、細胞増殖活性の検索のため、BrdU 染色をおこなった。BrdU 染色は、脱パラフィンした切片を 3% 過酸化水素含有メタノール液にて処理し、一次抗体として抗 BrdU マウスモノクローナル抗体 (DAKO JAPAN, 京都) を用い 4℃ で 16 時間反応させた後、LSAB2 kit (DAKO JAPAN, 京都) と 3'-3'-diaminobenzidine を用い可視化した。対比核染色はヘマトキシリンを用いた。BrdU 標識率の計測は、病変が 300 個以下の細胞で構成されている時は、全細胞を、それ以上の場合、任意の 2 から 3 部位を選択し、合計 600 から 1000 個の細胞を対象として行った。

4. SCE および BCE の MMPs 阻害作用と癌組織における MMPs 発現の検索

ウシ V 型コラーゲン 10 μ g を基質として含む溶液 (100 mM Tris-HCl, pH7.86, 20 mM CaCl₂) に 10 mU の MMP-9 と SCE あるいは BCE を加えて 37℃ で 12 時間反応させた後、ポリアクリルアミド電気泳動を行った。ウエスタンブロット法にて、タンパクを polyvinylidene difluoride membrane (アトー, 東京) に転写し、抗ウシ V 型コラーゲン抗体 (コスモバイオ, 東京) および POD immunostain kit (和光純薬, 京都) を用い染色を行い、MMP-9 により分解され低分子量となったウシ V 型コラーゲン量を Masterscan (CSPI, Billerica) にて測定し、MMP-9 の活性を計測した。MMP-9 のかわりに MMP-

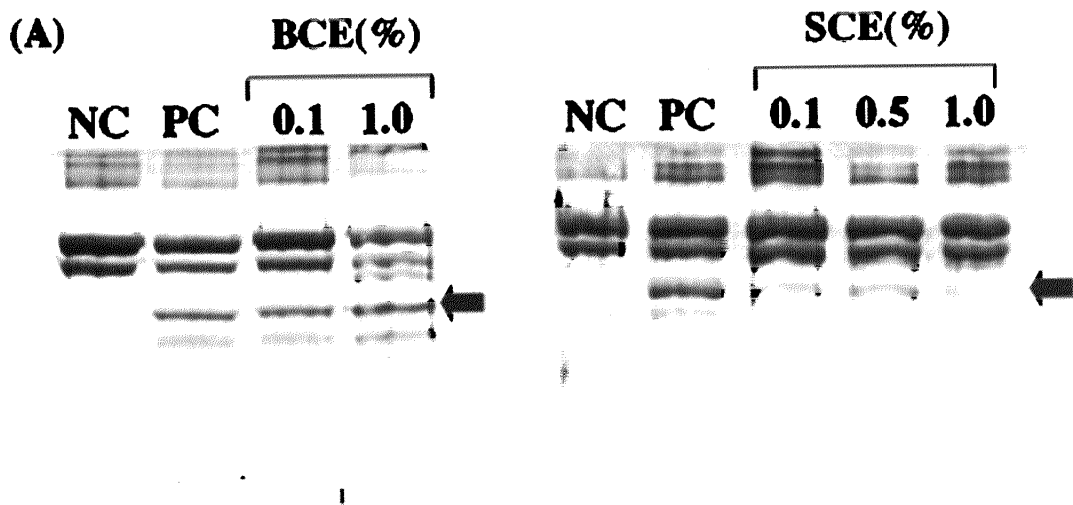


Fig. 2. Inhibitory effect of cartilage extract for MMPs activity. (A) Western blot for type V collagen, NC; collagen solution only, PC; collagen solution with MMP-9 and SCE (see Materials and Methods). Arrows indicate degraded collagen fragment.

2を用いて同様の検索を行い、SCEおよびBCEのMMP-2阻害作用を検索した。

凍結した腫瘍組織におけるMMP-2およびMMP-9の発現は、凍結組織に lysis buffer (1% TritonX-100, 50mM Tris-HCl pH7.6, 300mM NaCl)を加えてタンパクを抽出し、Gelatin Zymo Electrophoresis kit(ヤガイ, 東京)を用い、同キットのプロトコールに従いゼラチンザイモグラフィーにて行った。

5. 統計学的解析

Instat 2.03 (GraphPad Software Inc, San Diego)により、体重および臓器重量、病変の発生数、BrdU標識率はone-way ANOVAの後、DunnettのT-testにて行った。危険率5%未満を有意と判定した。

結 果

1. SCE および BCE の MMP-9 阻害活性

ウシV型コラーゲンを基質として、SCEおよびBCEのMMP-9阻害活性をwestern blot法を用いて検索した結果をFig.2Aに示す。レーンNCはMMP-9を加えずコラーゲン基質溶液のみの陰性対照を、レーンPCはコラーゲン基質溶液にMMP-9を加えインキュベーションした陽性対照を示す。矢印はMMP-9によって分解された低分子量のV型コラーゲンを示す。コラーゲン基質溶液にMMP-9とBCEを0.1および1.0%加えたものではコラーゲンの分解がみられるのに対し、SCEを0.1, 0.5および1.0%加えると用量依存性にコラーゲン分解産物の減少がみられた。同様の実験をMMP-2についても施

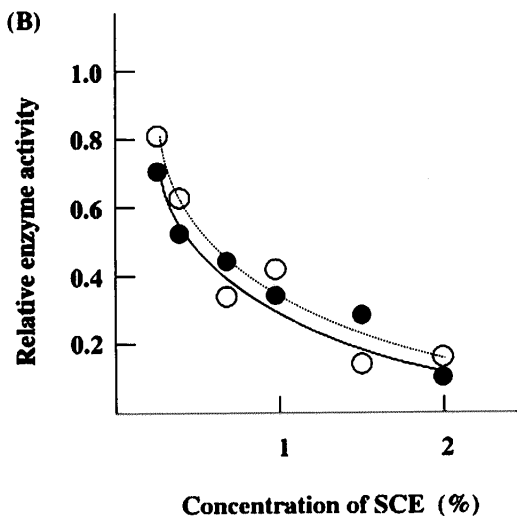


Fig. 2. Inhibitory effect of cartilage extract for MMPs activity. (B) Analysis of relative enzyme activity of MMP-2 and MMP-9. ○-○; effect of SCE to MMP-2 activity, ●-●; effect of SCE to MMP-9 activity.

行した結果、SCEはMMP-2によるコラーゲンの分解を用量依存性に抑制するが、BCEにはMMP-2に対する抑制作用はみられなかった。コラーゲン分解産物の量を densitometric analysis にて定量化し、SCEをそれぞれの濃度で加えたときのMMP-2およびMMP-9の相対的な酵素活性について検索した結果を、Fig. 2Bに示す。

MMP-2の活性は0.1%のSCEにより80%に、1% SCEでは41%、2% SCEでは18%に抑制された。MMP-9の活性は0.1% SCEにより72%、1% SCEにより38%、2% SCEにより12%に抑制された。

2. 実験1における結果

実験終了時における生存動物数、体重、脾及び肝臓重

量、1日あたりの平均摂餌量および軟骨抽出物の摂取量、体重60kgのヒトに換算した軟骨抽出物の摂取量をTable 1に示す。実験期間中の動物体重の推移はFig.3に示す。体重増加に各群間で差はみられず、最終体重、脾および肝の絶対重量および相対重量にも各群間で有意差はみられなかった。餌の摂取量についても各群間で有意差

Table 1. Body, organ weights, food consumption and chemical intake of hamsters given BOP followed by SCE or BCE (Experiment-1)

Group	Effective number of animals	Body weight (g)	Organ weight (g)★		Diet (g/day /hamster)	Shark or Bovine cartilage intake (mg/day /hamster)	Converted to 60kg body weight (g/day/60kgwt)
			Pancreas	liver			
1	9	163±8.1	1.0±0.2 (0.6±0.1)	10.9±4.4 (6.7±2.7)	9.7±0.5	0	0
2	7	158±12.2	1.1±0.1 (0.7±0.1)	11.4±4.5 (7.2±2.6)	9.2±0.9	18.4	8.5
3	12	161±10.9	1.2±0.3 (0.7±0.2)	11.8±3.8 (7.4±2.4)	10.6±1.4	42.2	19.5
4	6	156±12.1	1.0±0.3 (0.7±0.2)	11.8±3.4 (7.5±2.1)	8.4±1.9	33.6	15.5

★ : Mean±S.D.

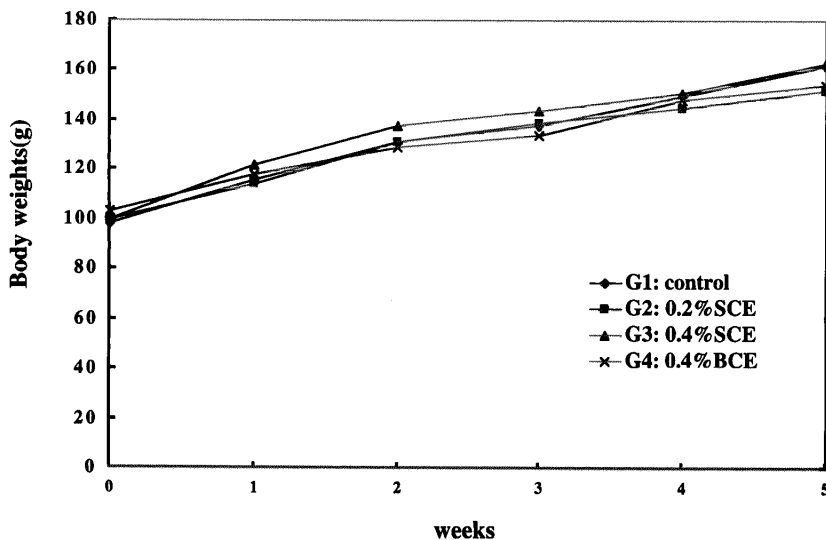


Fig. 3. Growth curves of body weight of hamsters given BOP followed by SCE or BCE (Experiment-1).

はみられなかった。動物の生存率をFig.4に示す。被験物質投与開始後、第1群で12匹中3匹、第2群で12匹中5匹、第4群で13匹中7匹が死亡した。第4群で動物が、他の群に比較して早期より死亡する傾向がみられた。第3群では、動物の死亡はみられなかった。死亡動物は共食いされるため、死亡原因の特定に限界があるが、死亡

前の動物は腹水貯留による腹部膨満がみられること、死亡直後に剖検し得た動物においては、肝内胆管癌の発生がみられたことより、肝内胆管癌の発生による肝不全が死亡の主原因と診断した。また、毛づやなどの動物の一般状態は、第3群では他の群の動物に比較して良好であった。実験終了時に生存していた動物に発生した膵管病

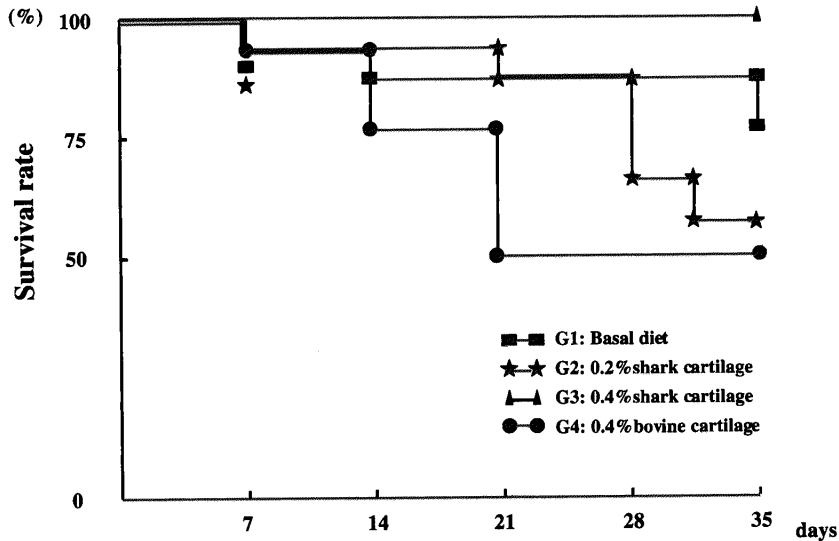


Fig. 4. Survival rate of hamsters given BOP followed by SCE or BCE (Experiment-1).

Table 2. Incidence and mean numbers of pancreatic and liver lesions and intrahepatic cholangiocellular carcinoma (ICC) of hamsters given BOP followed by SCE or BCE (Experiment-1)

Group	Number of effective animals	Number of pancreatic lesions [★]				Number of ICC
		Hyperplasia	Atypical hyperplasia	Carcinoma	Total	
1	9	3.2±1.1 (100)★★	1.8±1.1 (89)	1.4±1.2 (78)	6.4±1.9 (100)	4.7±7.5 (78)
2	7	5.3±1.4 (100)	3.6±2.5 (100)	1.7±1.1 (100)	10.6±3.6 ^b (100)	4.0±2.9 (83)
3	12	4.4±1.7 (100)	3.3±1.5 (100)	2.8±2.2 (83)	10.5±3.3 ^b (100)	3.3±3.2 (75)
4	6	5.3±2.0 ^b (100)	3.5±1.9 (100)	2.8±2.1 (83)	11.7±3.5 ^a (100)	9.8±12.6 (83)

★: Mean±S.D.

★★: Incidence is in parenthesis.

a: Significantly different from group1 (p<0.01)

b: Significantly different from group1 (p<0.05)

変および肝内胆管癌の発生頻度と動物 1 匹あたりの発生個数を Table 2 に示す。膵管癌を含む膵管病変の発生頻度には各群間で有意差はみられなかった。動物 1 匹あたりの膵管上皮過形成の発生個数は第 4 群で有意な増加がみられた。膵管癌の発生数は各群間で有意差はみられなかった。総膵管病変の発生数は、第 1 群に比較して、第 2, 3, 4 群において有意な増加がみられた。肝内胆管癌の発生頻度、動物 1 匹あたりの発生数には、各群間で有

意な差はみられなかった。

3. 実験 2 における結果

実験終了時における生存動物数、体重、膵及び肝臓重量、1日あたりの平均摂餌量および軟骨抽出物の摂取量、体重 60kg のヒトに換算した軟骨抽出物の摂取量を Table 3 に示す。実験期間中の動物体重の推移は Fig.5 に示す。体重増加に各群間に差はみられず、最終体重、膵および肝の絶対重量および相対重量にも各群間で有意差は

Table 3. Body, organ weights, food consumption and chemical intake of hamsters given BOP followed by SCE (Experiment-2)

Group	Dose of SCE (%)	Effective number of hamsters	Final body weight (g)	Organ weight (g)★		Average intake		
				(Relative ratio)		diet	SCE	
				Pancreas	Liver	(g/day /hamster)	(g/day /hamster)	(g/day /60kg w.t.)
1	0	15	182.4±14.4	1.38±0.23 (0.76±0.13)	7.91±2.06 (4.59±1.16)	10.3	0	0
2	0.2	15	178.3±19.9	1.40±0.43 (0.78±0.19)	8.99±2.05 (5.03±0.95)	10.1	0.02	8.1
3	0.4	14	175.9±24.3	1.20±0.14 (0.69±0.11)	9.59±2.92 (5.40±1.30)	9.8	0.04	15.7

★ : Mean±S.D.

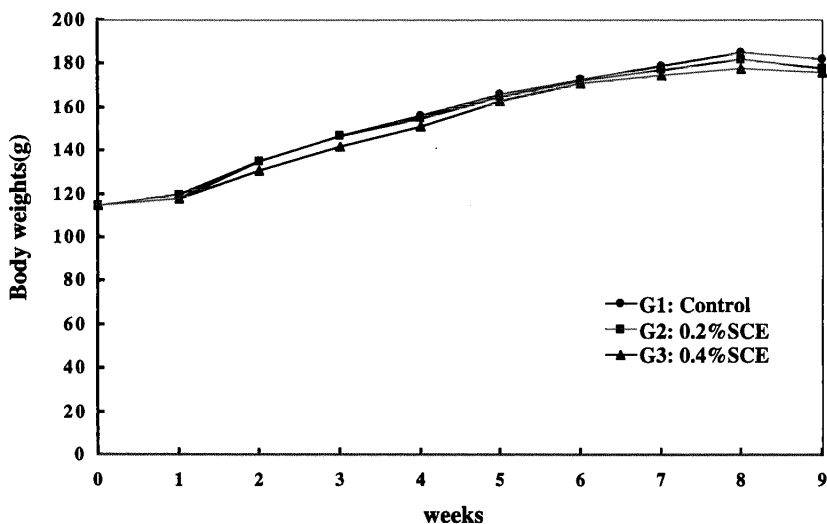


Fig. 5. Growth curves of body weight of hamsters given BOP followed by SCE (Experiment-2).

みられなかった。餌の摂取量についても各群間で有意差はみられなかった。餌の摂取量は実験1とほぼ同程度であり、SCEの摂取量は用量に応じて摂取されていた。体重60kgのヒトに換算したSCE摂取量は第2群で約8g、第3群で約16gであった。被験物質投与開始直後に、第

3群の動物が1匹死亡したことを除いて、実験2の期間中に動物の死亡はみられなかった。また、毛づやなどの動物の一般状態は、第3群では他の群の動物に比較して良好であった。実験終了時に生存していた動物に発生した膵管病変および肝内胆管癌の発生頻度と動物1匹あた

Table 4. Incidence and mean numbers of pancreatic and liver lesions and intrahepatic cholangiocellular carcinoma (ICC) of hamsters given BOP followed by SCE (Experiment-2)

Group	Dose of SCE (%)	Effective number of hamster	Pancreatic ductal lesions [★]				ICC
			Hyperplasia	Atypical hyperplasia	Carcinoma	Total	
1	0	15	3.9±2.2 (100) ^{★★★}	2.7±1.7 (100)	3.1±2.0 (87)	9.7±4.0 (100)	1.1±0.8 (73)
2	0.2	15	3.1±2.2 (100)	1.9±1.6 (100)	2.6±2.1 (93)	7.6±4.2 (100)	1.3±1.2 (67)
3	0.4	14	2.8±2.0 (100)	1.4±1.5 (100)	1.4±0.9 ^{★★} (86)	5.6±2.7 ^{★★} (100)	2.2±2.1 (86)

★ : Mean±S.D.

★★ : P< 0.05 compared with group1

★★★ : Incidence is in parenthesis.

Table 5. BrdU labeling indices in pancreatic ductal lesions of hamsters given BOP followed by SCE (Experiment-2)

Group	Dose of SCE (%)	Number of animals examined	BrdU labeling indices (%)		
			Pancreatic ductal lesions [★]		
			Hyperplasia	Atypical hyperplasia	Carcinoma
1	0	5	1.6±0.6	2.7±0.6	5.0±1.8
2	0.2	5	1.5±0.7	2.6±0.8	4.8±1.9
3	0.4	5	1.5±0.9	2.5±0.9	4.9±2.5

★ : Mean±S.D.

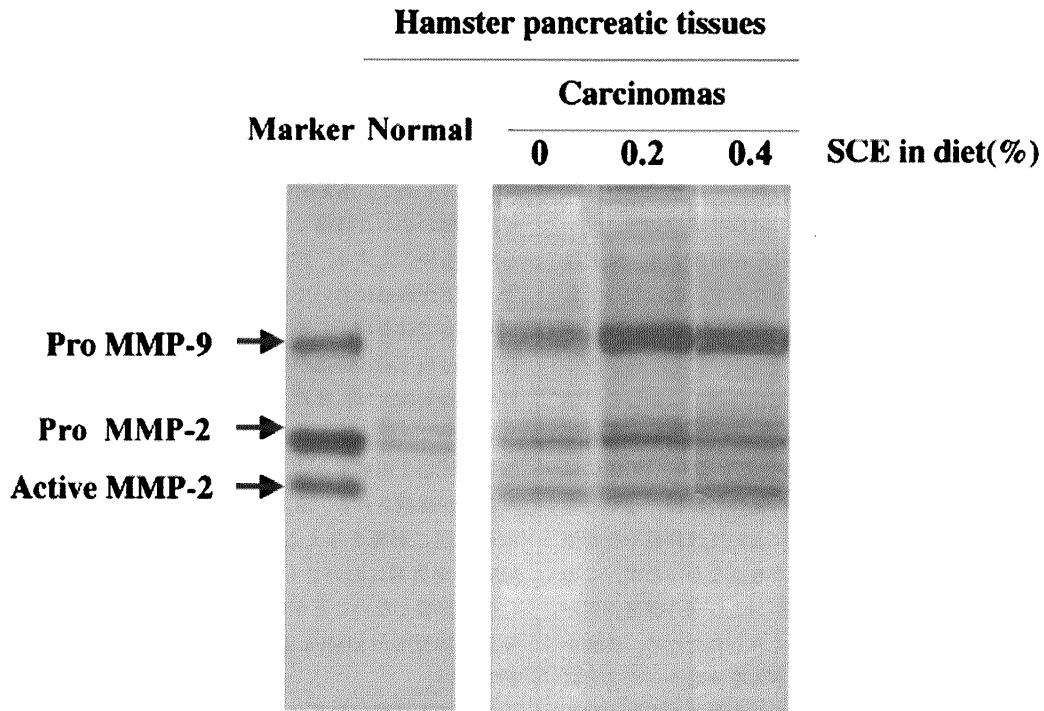


Fig. 6. Production of MMP-2 and MMP-9 in normal pancreas and carcinoma in hamsters treated with SCE.

りの発生個数を Table 4 に示す。膵管癌を含む膵管病変の発生頻度には各群間で有意差はみられなかった。動物 1 匹あたりの膵管上皮過形成および異型過形成の発生個数は第 2, 3 群で減少傾向がみられたが第 1 群に比較して有意な差はみられなかった。膵管癌の発生数は第 1 群で 3.1 ± 2.0 個, 第 2 群で 2.6 ± 2.1 個, 第 3 群で 1.4 ± 0.9 個と SCE の用量に相関して減少する傾向がみられ, 第 3 群では第 1 群に比較して有意に膵癌の発生が減少していた。総膵管病変の発生数においても, 第 1 群で 9.7 ± 4.0 個, 第 2 群で 7.6 ± 4.2 個, 第 3 群で 5.6 ± 2.7 個と SCE の用量に相関して減少する傾向がみられ, 第 3 群では第 1 群に比較して有意な発生個数の減少がみられた。肝内胆管癌の発生頻度, 動物 1 匹あたりの発生数には, 各群間で有意な差はみられなかった。膵管病変の BrdU 標識率を Table 5 に示す。膵管上皮過形成では 1.5 から 1.6, 異型過形成では 2.5 から 2.7, 膵管癌では 4.8 から 5.0 と病変の進展につれて標識率の増加がみとめられるが, それぞれの病変の標識率には各群間で有意差はみられなかった。ゼラチンザイモグラフィにて検索した膵組織および膵癌組織における MMP-2 および MMP-9 発現の代表的な結果を Fig. 6 に示す。正常膵組織においては, 不活性化型 MMP-2 の弱い発現がみられ, 膵癌組織において

は, 不活性化型の MMP-9 と MMP-2 および活性化型 MMP-2 の発現がみられた。0.2% および 0.4% の SCE を投与した動物に発生した膵癌における MMP-2 および MMP-9 の発現パターンは SCE を投与していない動物の膵癌組織における発現パターンと差異はみられず, SCE が MMP-2 の発現量や活性化に影響を与えることはなかった。

考 察

サメ軟骨の水抽出物には, MMP-2 および MMP-9 阻害作用があることが明らかにされた。一方, ウシ軟骨の水抽出物には MMP-2 および MMP-9 阻害作用はみられなかった。本研究で行った軟骨の水抽出操作で得られる分画の主成分はコンドロイチン硫酸を含有するプロテオグリカンと考えられる。コンドロイチン硫酸は, 動物の軟骨組織や体液などに存在する酸性ムコ多糖類の一種で, タンパク質と結合したプロテオグリカンや遊離の形で存在している。その化学構造は硫酸化した N-アセチルガラクトサミンとグルクロン酸からなる二糖類を基本単位とする多糖類で, 糖に結合する硫酸基の位置と数によりコンドロイチン硫酸 A から E, H, K 等に分けられている。ウシを始め哺乳類の軟骨にはコンドロイチン硫酸 A が主に含まれ, サメ軟骨にはコンドロイチン硫酸 C が特

に多く含まれている²⁰⁾。SCEとBCEのMMPsに対する作用の差異はコンドロイチン硫酸の型およびプロテオグリカンを構成するコアタンパクの差異によることが推察されるが、SCEに含まれるMMPs阻害作用を持つ物質の特定には、今後の詳細な分析が必要である。コンドロイチン硫酸は経口投与によっても高分子状態で吸収されることが報告されており、ヒトでは投与量の12%、ラットでは15%が吸収される²¹⁾。これらの結果より、SCEは*in vitro*でMMPsを阻害するのみならず、経口投与された生体においてもMMPsの阻害活性を保っている可能性が期待される。

本研究の実験1において、BCE投与群では動物の早期死亡がみられ、また、生存動物においても膵癌や胆管癌の発生数の減少がみられなかったことより、BCEにはBOPによる発癌に対し、有益な抑制作用は持たないと考えられる。一方、SCEは実験1においては膵癌や胆管癌の発生頻度、発生数の減少をもたらさなかったが、この実験においては、BOPの毒性作用および癌の誘発作用が強力に発現し、動物の死亡が多くみられたため、実験を被験物質投与後38日で打ち切らざるをえなかったことによりSCEの効果発現が十分にみられなかったことが推察される。しかし、実験1においても、0.4% SCE投与動物の死亡はみられず、動物の一般状態は比較的良好であり、血清タンパク分析を行った動物においては、基礎食投与群の動物に比較して、血中ハプトグロビン量が有意に高く、肝機能が良好に保たれていることが示され(未発表データ)、SCEは有益な生体作用を有することが推察された。実験2においてSCEは胆管癌の発生を抑制する作用は明らかではないものの、膵癌の発生を有意に抑制すること、および、今回の実験2でみられた膵発癌抑制効果は、合成MMPs阻害剤であるOPB-3206に匹敵する¹⁰⁾もので、SCEはOPB-3206より毒性が低いことから、膵癌の化学予防のための有力な候補物質となりうることを示された。胆管癌の発生については、SCEおよびOPB-3206ともに明らかな発癌抑制作用を示さないことから、癌の発生、進展に関与する分子機構が膵管癌とは異なる可能性があり、SCEの適応となりうる癌の検索も含め、今後の研究が必要である。

本実験で誘発された膵癌においても、MMP-2の発現と活性化がみられ、SCEはMMP-2の発現や活性化に影響を与えることはなかった。SCEが生体内においても、*in vitro*と同様に直接MMP-2活性を抑制するか、内因性のMMPs阻害物質であるtissue inhibitors of MMPs (TIMPs)などを介して抑制するかは、今後の検索が必要である。SCEの膵発癌抑制機構としては、MMPsの阻害

による癌細胞の浸潤の抑制や血管新生の阻害²²⁾が推察される。膵癌は、腫瘍血管の乏しい癌とみなされているが、膵癌の進展に対しても血管新生は重要とされ、ハムスター膵癌系においても血管新生に重要な増殖因子であるvascular endothelial growth factorの過剰発現がみだされている²³⁾。本実験において発生した膵癌は、間質増生が強い小さな腫瘍であり、血管数は肝臓などに比較して少ないことより、新生血管数を検索することは困難で、SCEが膵癌において血管新生を阻害するかについては明らかではない。しかし、本実験でみられた膵癌は直径3 mm以下の小膵癌がほとんどであることより、癌の増生に血管新生は、まだ、それほど重要な役割を果たしていないことが推察され、癌細胞の膵管基底膜や細胞外基質の破壊を阻害することで、浸潤癌の発生を抑制した可能性が推察される。SCEは、膵前癌病変および膵癌細胞の増殖に影響を与えることはなかったが、他の合成MMPs阻害剤においても、MMPs阻害剤が腫瘍の増殖に直接影響しないことが報告されており^{24,25)}、SCEの膵発癌抑制機構がMMPs阻害作用を介するものとして矛盾しない。

サメ軟骨は経口投与により、basic fibroblast growth factorによるウサギ角膜の血管新生を抑制する²⁶⁾など、いくつかの動物実験系において、経口投与での血管新生阻害作用が報告されている¹⁹⁾。一方、民間薬として利用されているサメ軟骨そのものにはカルシウムなど他の多くの成分が含まれており、十分量を服用することは患者あるいは被験者に多大な苦痛を強いるものである。実際、民間薬としての使用経験に基づきMillerらが進行癌患者を対象に行ったclinical trialでは1日の服用量として患者体重1 kgあたり1 gの大用量が投与されていた¹⁸⁾。このような事情からサメ軟骨に関する臨床研究では英文文献としてまとめられたものは乏しく、その効果については議論のあるところである¹⁹⁾。本研究で用いた抽出法は、毒性の強い薬物を一切使うことなく、MMPs阻害作用を有する画分を抽出していることから、ヒトへの適用にも危険性は少ないと考えられる。また、サメ軟骨と抽出物の重量比をとると、約10倍に有効成分が濃縮されていると考えられ、有効量を摂取するために患者に強いる苦痛をかなり軽減することが可能である。本実験で膵癌発生を抑制したSCE量は体重60 kgのヒトに換算すると1日約15.7 gとなり、Millerらのclinical trialで用いられた用量より少量であり、摂取可能な量である。MMPsは胎児の発育、器官形成、創傷治癒、血管新生やアポトーシスなどの多くの生体機能に関与する重要な酵素である²²⁾ことより、サメ軟骨のMMPs阻害画分を濃縮した

SCEでは予期せぬ毒性作用が発現する可能性もあり、臨床応用にあたっては、動物を用いた安全性の検証がなされなければならない。しかし、MMPsは関節炎、糸球体腎炎および肝や肺の線維症の発症、癌の進展など多くの疾患に関わることも知られており²²⁾、SCEは癌を含め多くの疾患に対する有用な機能性食品となりうることが期待される。また、膵癌に対しては、MMPs阻害剤のclinical trialが進められ、その効果が期待されている²³⁾ことから、SCEは膵癌化学予防の候補物質となりうるものであり、さらに、SCE中のMMPs阻害物質を特定することにより、新たなMMPs阻害剤が開発される可能性も期待される。

結 語

ハムスターにおける短期膵管癌発生系を用い、サメ軟骨水抽出物(SCE)およびウシ軟骨水抽出物(BCE)の膵管癌に対する影響について検索し、以下の結果を得た。

1. SCEはMMP-2およびMMP-9の活性を阻害したが、BCEには阻害作用はみられなかった。
2. 0.4% BCE含有食投与動物においては、肝内胆管癌の発生による動物の早期死亡がみられたが、0.4% SCE含有食投与動物では早期死亡はみられなかった。
3. SCEは、ハムスターの体重、膵臓および肝重量に変化を与えず、毒性所見はみられなかった。
4. 0.4% SCE含有食投与群において、動物1匹あたりの膵管癌および総膵管病変の発生数の有意な減少がみられた。
5. SCEは、膵管癌を含む膵管病変のBrdU標識率には影響を与えなかった。
6. 膵癌においては、MMP-9の発現、MMP-2の発現および活性化がみられたが、これらの発現および活性化にSCEは影響を与えなかった。

以上の結果より、SCEは毒性作用を示すことなく、膵管癌の発生を抑制する作用を有することが示された。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、終始御指導、御校閲を賜りました奈良県立医科大学附属がんセンター腫瘍病理学教室國安弘基教授ならびに堤 雅弘助教授に心から感謝を捧げますとともに、御校閲・御助言賜りました、本学口腔外科学教室桐田忠昭教授、本学第一外科学教室中島祥介教授、ならびに本学口腔外科学教室杉村正仁前教授に深謝申し上げます。また、本研究に直接御指導、御協力をいただいた京都府立大学人間環境学部佐藤健司助教授に深く感謝の意を表します。さらに、御協力を賜りました、

腫瘍病理学教室ならびに人間環境学部諸兄姉に感謝いたします。

文 献

- 1) 松野正紀: 膵癌全国登録調査報告書. 膵臓 **16** : 115-147
- 2) Longnecker, D.S. and Grawfold, B.G.: Hyperplastic nodules and adenomas of exocrine pancreas in azaserine treated rats. J. Natl. Cancer Inst. **53** (2): 573-577, 1974.
- 3) Konishi, Y., Denda, A., Inui, S., Takahashi, S. and Kondo, H. : Gann **67** : 919-920, 1976
- 4) Pour, P., Althoff, J., Kruger, F.W. and U. Mohr. : A potent pancreatic carcinogen in syrian hamsters. J. Natl. Cancer Inst. **58**(5): 1449-1453, 1977.
- 5) Tsutsumi, M., Kondo, S., Noguchi, O., Horiguchi, K., Kobayashi, E., Okita, S., Ohashi, K., Honoki, K., Tsujiuchi, T. and Konishi, Y. : K-ras gene mutation in early ductal lesions induced in a rapid production model for pancreatic carcinomas in syrian golden hamsters. Jpn. J. Cancer Res. **84** : 1101-1105, 1993.
- 6) Okita, S., Tsutsumi, M., Onji, M. and Konishi, Y. : p53 Mutation without allelic loss and absence of mdm-2 amplification in a transplantable hamster pancreatic ductal adenocarcinoma and derived cell lines but not primary ductal adenocarcinomas in hamsters. Mol. Carcinogenesis **13** : 266-271, 1995.
- 7) Konishi, Y., Tsutsumi, M., and Tsujiuchi, T. : Mechanistic analysis of pancreatic ductal carcinogenesis in hamsters. Pancreas **16** : 300-306, 1998.
- 8) Farber, E. : Cellular biochemistry of the stepwise development of cancer with chemicals: G. H. A. Clowes Memorial Lecture. Cancer Res. **44** : 5463-5474, 1984.
- 9) Mizumoto, K., Tsutsumi, M., Denda, A. and Konishi, Y. : Rapid production of pancreatic carcinoma by initiation with N-nitrosobis(2-oxopropyl)amine and repeated augmentation pressure in hamsters. J. Natl. Cancer Inst. **80** : 1564-1567, 1988.
- 10) Iki, K., Tsutsumi, M., Kido, A., Sakitani, H., Takahama, M., Yoshimoto, M., Motoyama, M.,

- Tatsumi, K., Tsumoda, T. and Konishi, Y. : Expression of matrix metalloproteinase 2 (MMP-2), membrane type 1 MMP and tissue inhibitor of metalloproteinase 2 and activation of proMMP-2 in pancreatic duct adenocarcinomas in hamsters treated with N-nitrosobis(2-oxopropyl)amine. *Carcinogenesis* **20** : 1323-1329, 1999.
- 11) **Moses, M.A., Sudhalter, J., and Langer, R.** : Identification of an inhibitor of neovascularization from cartilage. *Science* **248** : 1408-1410, 1990.
 - 12) **Moses, M.A. and Langer, R.A.** : A matrix metalloproteinase inhibitor as an inhibitor of neovascularization. *J. Cell Biochem.* **47** : 230-235, 1991.
 - 13) **Moses, M.A., Sudhalter, J., and Langer, R.** : Isolation and characterization of an inhibitor of neovascularization from scapular chondrocytes. *J. Cell Biol.* **119** : 475-482, 1992.
 - 14) **Folkman, J.** : Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat. Med.* **1** : 27-31, 1995.
 - 15) **Hidalgo, M. and Eckhardt, S.G.** : Development of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer therapy. *J. Natl. Cancer Inst.* **93** : 178-193, 2001.
 - 16) **Marwick, C.** : Natural compounds show antiangiogenic activity. *J. Natl. Cancer Inst.* **93** : 1685, 2001.
 - 17) **Ernst, E.** : Shark cartilage for cancer? *Lancet* **351**: 298, 1998.
 - 18) **Miller, D.R., Anderson, G.T., Stark, J.J., Granick, J.L. and Richardson, D.** : Phase I / II trial of the safety and efficacy of shark cartilage in the treatment of advanced cancer. *J. Clin. Oncol.* **16** : 3649-3655, 1998.
 - 19) **Gonzalez, R.P., Leyva, A., Moraes, M.O.** : Shark cartilage as source of antiangiogenic compounds: from basic to clinical research. *Biol. Pharm. Bull.* **24** : 1097-1101, 2001.
 - 20) **Sugahara, K. and Yamada, S.** : Structure and function of oversulfated chondroitin sulfate variants: unique sulfation patterns and neuroregulatory activities. *Trends in glycoscience and glycotechnology* **12** : 321-349, 2000.
 - 21) **Ronca, F., Palmieri, L., Panicucci, P. and Ronca, G.** : Anti-inflammatory activity of chondroitin sulfate. *Osteoarthritis Cartilage Suppl. A*: 14-21, 1998.
 - 22) **Nagase, H. and Woessener J.F.J.** : Matrix metalloproteinases. *J. Biol. Chem.* **274** : 21491-21494, 1999.
 - 23) **Egawa, S., Tsutsumi, M., Konishi, Y., Kobari, M., Matsuno, S., Nagasaki, K., Futami, H. and Yamaguchi, K.** : The role of angiogenesis in the tumor growth of Syrian hamster pancreatic cancer cell line HPD-NR. *Gastroenterology* **108** : 1526-1533, 1995.
 - 24) **Kido, A., Tsutsumi, M., Iki, K., Motoyama, M., Takahama, M., Tsujiuchi, T., Morishita, T., Tatsumi, K., Tamai, S. and Konishi, Y.** : Inhibition of spontaneous rat osteosarcoma lung metastasis by 3S-[4-(N-hydroxyamino)2R-isobutylsuccinyl]amino-1-methyl-3,4 dihydrocarboxystyryl, a novel matrix metalloproteinase inhibitor. *Jpn. J. Cancer Res.* **90** : 333-341, 1999.
 - 25) **Kimura, M., Otani, Y., Kubota, T., Igarashi, N., Yokoyama, T., Wada, N., Yoshimizu, N., Fujii, M., Kameyama, K., Okada, Y., Kumai, K. and Kitajima, M.** : Matrix metalloproteinase inhibitor, marimastat, decreases peritoneal spread of gastric carcinoma in nude mice. *Jpn. J. Cancer Res.* **93** : 834-841, 2002.
 - 26) **Gonzalez, R.P., Soares, F.S., Farias, R.F., Pessoa, C., Leyva, A., de Barros Viana G.S. and Moraes, M.O.** : Demonstration of inhibitory effect of oral shark cartilage on basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis in the rabbit cornea. *Biol. Pharm. Bull.* **24** : 151-154, 2001.
 - 27) **Bloomston, M., Zervos, E.E. and Rosemurgy, A.S.2nd** : Matrix metalloproteinase and their role in pancreatic cancer, a review of preclinical studies and clinical trials. *Ann. Surg. Oncol.* **19**(7): 668-674, 2002.