

キメラ毒素を用いた新しい癌化学療法

(07670553)

平成9年度科学研究費補助金（基礎研究C2）

研究成果報告書

平成10年4月



研究者 小野 稔

(旭川医科大学医学部講師)

研究組織

研究代表者：小野 稔（旭川医科大学医学部講師）

研究経費

平成7年度 900千円
平成8年度 1,000千円
平成9年度 500千円

研究発表

(1) 学会誌等

1. 小野 稔, 高後 裕, Michael Klagsbrun. HB-EGF-Chimeric toxin による肝癌の targeting therapy 日本癌治療学会雑誌1995 ; 30 : 1035
2. Minoru Ono, Michel Klagsbrun, Yutaka Kohgo
Cell killing effect of heparin-binding EGF-like growth factor-Pseudomonas exotoxin on human hepatoma cells. International Communicaton of hepatology 6: 79-84, 1996
3. Ohhira.Mo, Ono M, Oohira Ma, Matsumoto A, Ohta H and Namiki M.
Case report: splenic vein aneurysm-report of lesion that progressively expanded. Brit J Radiology 67: 656-658, 1994
4. Gallo RL, Ono M, Povsic T, Page C, Eriksn E, Klagsbrun M and Bernfield M.
Syndecan, cell surface heparan sulfate proteoglycans, are induced by a proline-rich antimicrobial peptide from wounds. Proc Natl Acad Sci USA 91: 11035-11039, 1994
5. Ono M, Raab G, Lau K, Abraham JA and Klagsbrun M.
Purification and characterization of transmembrane forms of heparin-binding EGF-like growth factor. H Biol Chem 269: 31315-31321, 1994
6. Mesri EA, Ono M, Kreitman RJ, Klagsbrun M and Pastan I.
The heparin-binding domain of heparin-binding EGF-like growth factor can target Pseudomonas exotoxin to kill cells exclusively through heparan sulfate proteoglycans. J Cell Sci 107, 2599-2608, 1994
7. Raab G, Higashiyama S, Hetelekidis S, Abraham JA, Damm D, Ono M and Klagsbrun M.
Biosynthesis and processing by phorbol ester of the cell surface-associated precursor from of heparin-binding EGF-like growth factor. Biochem Biophys Res Commun 204: 592-597, 1994
8. Mangrulkar RS, Ono M, Ishikawa M, Takashima S, Klagsbrun M and Nowak RA.
Isolation and characterzation of heparin-binding growth factors in human leiomyomas and normal myometrium. Biology of Reproduction 53: 636-646, 1995
9. Ohhira M, Ono M, Ohhira Ma, Sekiya C, Namiki M, Fijimoto Y, Nagao M and Mori M.
Changes in free radical-meyaboizing enzymes and lipid peroxides in the liver of Long-Evans with cinnamon-like coat color rats. J Gastroenterology 30: 619-623, 1995

(2) 口頭発表

1. 藤本圭範, 小野 稔, 高後 裕, ワークショップ分子生物と消化器癌－肝胆膵－
肝細胞癌の進展における syndecan-1 の発現低下と組織学的・臨床的悪性度との関連。
第37回日本消化器病学会大会 1995年11月5日 名古屋
2. 小野 稔, 高後 裕, Michael Klagsbrun, 学術シンポジウム 癌治療薬開発のための新戦略,
HB-EGF-chimeric toxin による肝癌の targeting therapy.
第33回日本癌治療学会総会 1995年9月22日 札幌
3. Matsumoto A, Ono M, Fujimoto Y, Gallo RL, Bernfield M, Kohgo Y.
Reduced expression of syndecan-1 in human hepatocellular carcinoma with high metastatic potential.
87th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, April 20-24, 1996.
Washington, DC.
4. Fujimoto Y, Ono M, Nouse K, Matsumoto A, Ohtake M, Kohgo Y.
Post-transcriptional suppression of nm-23-H1 expression in hepatocellular carcinoma and hepatoma
cell lines.
87th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, April 20-24, 1996.
Washington, DC.
5. 藤本圭範, 小野 稔, 松本昭範, 大竹孝明, 大平基之, 高後 裕,
複数の電気泳動法を用いて解明した肝癌細胞における転位抑制遺伝子 nm23-H1 の発現制御
機序について。
第46回日本電気泳動学会シンポジウム 1996年5月22日 札幌
6. 藤本圭範, 小野 稔, 松本昭範, 大竹孝明, 大平基之, 高後 裕
肝癌細胞の転移能獲得における転位抑制遺伝子産物 nm23-H1 の転写後制御による発現低下
について－転位能獲得阻止をめざして－
第5回日本癌病態研究会シンポジウム 1996年6月2日 浜松
7. Yutaka Kohgo, Minoru Ono.
A novel defense mechanism mediated by endogenous multifunctional peptide produced by gastric
mucosal cells.
The 6th Taisho International Symposium on Gastroenterology 1996, 4, 24, Shimoda.
8. 大平基之, 小野 稔,
原発性胆汁性肝硬変の重症度判定における腹腔鏡検査の意義。
第52回日本消化器内視鏡学会総会シンポジウム 1996年10月 横浜
9. 小野 稔, 胃粘膜防御に関与する新しい内因性抗菌ペプチド PR-39.
第6回大雪シンポジウム 1996年8月23日 札幌
10. 大竹孝明, 藤本圭範, 松本昭範, 齊藤浩之, 大平基之, 小野 稔, 高後 裕,
Syndecan の発現誘導因子である synducin 遺伝子の導入による肝癌細胞株の形態変化につい
て。
第55回日本癌学会総会ワークショップ 1996年10月10日 横浜
11. 松本昭範, 小野 稔, 藤本圭範, 大竹孝明, 齊藤浩之, 大平基之, 高後 裕,
原発性肝細胞癌における Syndecan-1 の発現低下－特に転移との関連について－
第55回日本癌学会総会ワークショップ 1996年10月12日 横浜

1. はじめに

癌の化学療法で重要なことは、いかに癌細胞を選択的に破壊できるかどうか、即ち癌細胞への targeting である。この targeting への新たなアプローチが“Targeted Toxin”である。これは、遺伝子工学的に細菌毒素とある種の増殖因子 (EGF, TGF など) からなるキメラ蛋白を作製し、ある種の受容体 (EGF 受容体など) を多量に発現している細胞を標的 (target) にし、細胞毒素によって破壊するものである。Heparin-binding EGF like growth factor (HB-EGF) は新たに発見された EGF family に属する増殖因子である。この因子の特徴は EGF 類似の構造を持つ EGF ドメインの N 端側にヘパリン結合ドメインをもち、EGF 受容体と結合すると同時に細胞膜上の heparan sulfate proteoglycan (HSPG) と強く結合することである。HB-EGF は線維芽細胞、血管平滑筋細胞の増殖を刺激し、動脈硬化の発症・進展要素として注目されている。(1-3)。さらに、HB-EGF は、ケラチノサイトおよび肝細胞など上皮系細胞の増殖をも刺激することが明らかになった(4)。筆者は、HB-EGF の前駆体の構造を決定すると同時に、膜結合蛋白である HB-EGF 前駆体も増殖因子としての活性があり、いわゆる juxtacrine growth factor として機能することをすでに明らかに(5)。さらに筆者は肝癌と HB-EGF との関係について調べた結果、正常肝細胞では HB-EGF の mRNA はほとんど発現していないが、肝癌細胞では mRNA および HB-EGF 蛋白が著しく発現しており、肝癌では HB-EGF の autocrine loop が存在することを示唆する成績をえた。最近ヒト胃癌および乳癌でも同様の成績が報告された。これらの成績より、われわれは次のような作業仮説をたてた。すなわち、“HB-EGF をベースにした targeted toxin は EGF 受容体および HSPG を発現している腫瘍細胞を選択的に破壊できるのではないか?”

緑膿菌毒素は、受容体を介して標的細胞内に取り込まれた後、細胞質の elongation factor-2 を ADP-リボシル化することにより細胞を死滅させる(6)。われわれは受容体との結合能を欠いた緑膿菌変異毒素と HB-EGF が結合したキメラ蛋白 (HB-EGF-toxin) を遺伝子工学的に作製した。

本研究の目的は、このキメラ毒素を新しい癌の化学療法剤として応用できるかどうか基礎的検討を行うことである。具体的には、肝癌をはじめとする腫瘍細胞の細胞株についてキメラ毒素にたいする感受性を *in vitro* で検討し細胞膜上の EGF 受容体・ヘパリン硫酸の発現との関連性を明らかにすることである。

2. 対象および実験方法

(1) 培養細胞は、American Type Culture Collection より入手した。

(2) HB-EGF-Pseudomonas exotoxin (HB-EGF-PE) の作製: HB-EGF-PE を遺伝子工学的に作製するため、成熟型 HB-EGF の full length をコードする DNA 断片を既に報告した方法で、PE^{4E}KDEL の N 末端に結合させた(7)。ここで用いた PE^{4E}KDEL は、緑膿菌毒素の full length form であるが、細胞結合ドメインが不活化されており、標的細胞との結合はできないように作製されていると同時に、C 末端に KDEL の変異を作製しており、毒素の活性が増加している。HB-EGF のヘパリン結合ドメインと Pseudomonas exotoxin のキメラ毒素 (HB-PE) のプラスミドは、HB-EGF の N 末端の45残基のアミノ酸の配列を PE^{4E}KDEL の N 末端に結合させて作製した。HB-EGF-PE は EGF 受容体と細胞表面上の heparan sulfate proteoglycan (HSPG) の両方と結合可能であるが、HB-PE は EGF 受容体との結合能は有していない。これらのキメラ毒素は、それぞれのプラスミドを組み込まれた大腸菌 (E. coli) から TSK-ヘパリンカラムで既に報告した方法で精製した(7)。HB-TGF_α-PE および TGF_α-PE

もすでに報告した方法 (7) で作製した。

(3) キメラ毒素の細胞障害性の測定

キメラ毒素を加える24時間前に、それぞれの細胞を 1×10^5 /mlの細胞密度になるように96穴のプレート上に培養した。キメラ毒素を細胞に加え37°Cで16~18時間培養し、さらに $1 \mu\text{Ci}$ の $[3\text{H}]$ -leucineを加えさらにインキュベートした後、細胞に取り込まれた $[3\text{H}]$ -leucineの放射活性を測定した。

(4) 細胞傷害性に対するヘパリンとEGFの影響

キメラ毒素による細胞傷害性に対する外因性のヘパリンの影響を調べるため、種々の濃度のヘパリン (Upjohn) をキメラ毒素とともに細胞に加え細胞傷害性を測定した。EGFの影響を調べるため、キメラ毒素を加える2時間前にEGF (GIBCO) を $4 \mu\text{g/ml}$ の濃度で加え4°Cで90分インキュベートした後、キメラ毒素を加え細胞傷害性を測定した。

(5) 肝組織におけるシンデカン-1の発現

ヒト肝組織中におけるシンデカン-1の発現を免疫組織化学的に検討した。57例の肝癌組織 (針生検23例, 外科手術17例, 剖検17例) を用いて、シンデカン-1のコア蛋白に対する特異抗体 HSE-1 (8) による免疫染色を常法に従って行った。

3. 結 果

(1) キメラ毒素の精製: TSKヘパリンカラムを用いてキメラ毒素の精製を行い同時に、それぞれのキメラ毒素のヘパリンに対する親和性を調べた。Fig. 1Aに示すようにHB-EGF-PEはTSKヘパリンカラムより、1.0 MのNaCl濃度で溶出された。HB-PEもほぼ同様の濃度で溶出された。しかし、ヘパリン結合ドメインを持たないPEは0.15 Mと非常に低い塩濃度で溶出された。この成績はHB-EGFのヘパリン結合ドメインを遺伝子工学的に導入することにより、緑膿菌毒素にヘパリンに対する親和性を付加できたことを示している。Fig. 1BにTSKヘパリンカラムによって、高度に精製されたキメラ毒素のSDS-PAGEを示す。

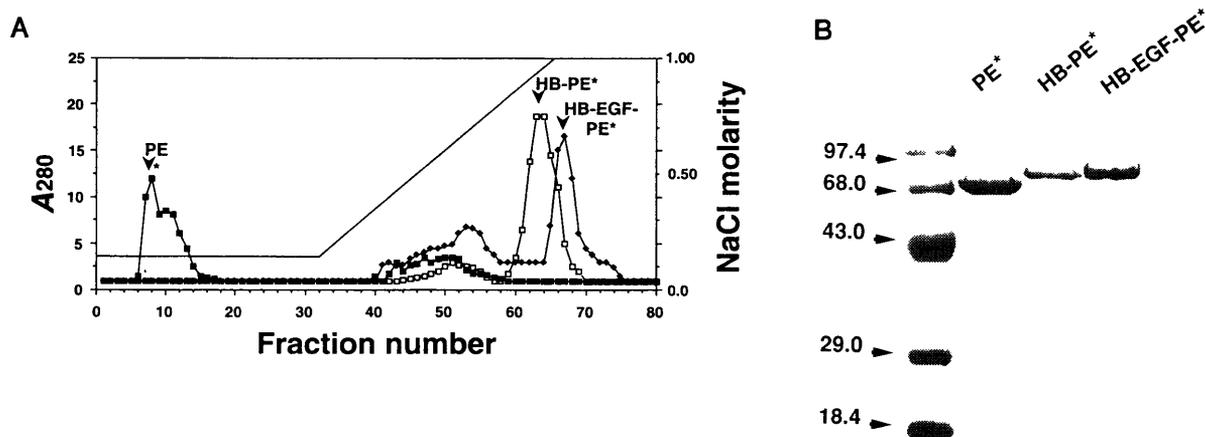


Figure 1A: Heparin affinity chromatography profiles on TSK-heparin columns of the recombinant toxins.

The arrow indicate the fraction of each protein with the highest cytotoxicity to A431 cells.

Figure 1B: SDS-PAGE of purified recombinant toxins.

(2) キメラ毒素の腫瘍細胞に対する細胞傷害性

Table 1 に HB-EGF-PE, HB-TGF α -PE および TGF α -PE の EGF 受容体の発現の異なる各種の細胞株に対する細胞障害活性を示す. HB-TGF α -PE は HB-EGF-PE に比べ EGF 受容体を高度に発現している A431 および KB 細胞に強い細胞障害活性を示した.

一方, HB-EGF-PE は HB-TGF α -PE に比べ EGF 受容体発現の少ない Hep-G2 細胞により強い細胞障害性を示した.

Table 1. Cytotoxicity of TGF α -PE, HB-TGF α -PE and HB-EGF-PE

Cell line (EGFR/cell)	ID50 (ng/ml)		
	TGF α -PE	HB-TGF α -PE	HB-EGF-PE
A431 (10 ⁶)	0.030	0.12	0.4
KB (10 ⁵)	0.35	0.7	2.5
Hep-G2 (10 ⁴)	0.5	0.1	0.05
MCF-7 (10 ³)	0.5	0.5	0.5

次に Table 2 に種々の腫瘍細胞に対する HB-EGF-PE, HB-PE および PE の細胞障害性を示す.

Table 2. Cytotoxicity of HB toxins to cancer cell lines

Cell line (cancer type)	ID50 (ng/ml)		
	HB-EGF-PE	HB-PE	PE
A431 (epidermoid)	0.2	8	300
KB (epidermoid)	2.5	300	>1,000
MCF-7 (breast)	0.6	30	100
CRL1739 (gastric)	0.15	10	300
SW-13 (adrenal)	2	50	1,000
HEP-G2 (hepatic)	0.3	10	50
HTB-2 (bladder)	0.3	200	1,000
J-82 (bladder)	30	700	>1,000
T-98 MG (glioma)	0.3	20	700
U-251 (glinoma)	0.03	5	250
NCID471 (lung)	0.6	32	1,000
HUT102 (ATL)	30	100	1,000

ID50: concentration of toxin necessary to acheve 50% inhibition of [3H] leu incorporation.

すべての細胞株において HB-PE は PE に比べ強力な細胞障害性を示した. HB-PE は EGF 受容体とは結合しないので, この細胞障害活性はすべて標的細胞上に存在する heparan sulfate proteoglycan (HSPG) を介するものと考えられた. また, 全ての細胞株において HB-EGF-PE は HB-PE よりも強い細胞障害活性を示したが, 特に A431, CRT1739, HEP-G2, T-98 MG, U-251 などが強い感受性を示した. 従って, HB-EGF-PE の細胞障害性は, おもに EGF 受容体を介するものと考えられる. しかしながら, HUT102 などのように EGF 受容体の発現が少ない細胞において, HB-EGF-PE は HB-PE よりもたかだか 3 倍程度

の細胞障害性を示したことは、HB-EGF-PE および HB-PE の細胞障害性におけるヘパリン結合ドメインの重要性を示している。

(3) キメラ毒素の細胞障害性におよぼす EGF の影響

HB-EGF-PE, HB-PE および PE の細胞障害活性に対する外因性の EGF の影響を検討した。

Fig. 2A に示すように、A431, CRT1739, HEP-G2, MCF-7 の細胞株において、外因性に加えた EGF は、HB-EGF-PE の細胞障害活性を阻害したが、HB-PE および PE の細胞障害性には影響を与えなかった。

(4) キメラ毒素の細胞障害性におよぼすヘパリンの影響

HB-EGF-PE, HB-PE および HB-TGF α -PE の細胞障害活性に対する外因性ヘパリンの影響を検討した。Fig. 2B に示すように、KB, HEP-G2, MCF-7 においてヘパリンは濃度依存性にこれらのキメラ毒素の細胞障害性を阻害したが、EGF 受容体を多量に発現している A431 細胞では、HB-EGF-PE と HB-TGF α -PE の細胞障害活性はヘパリンによって阻害されなかった。

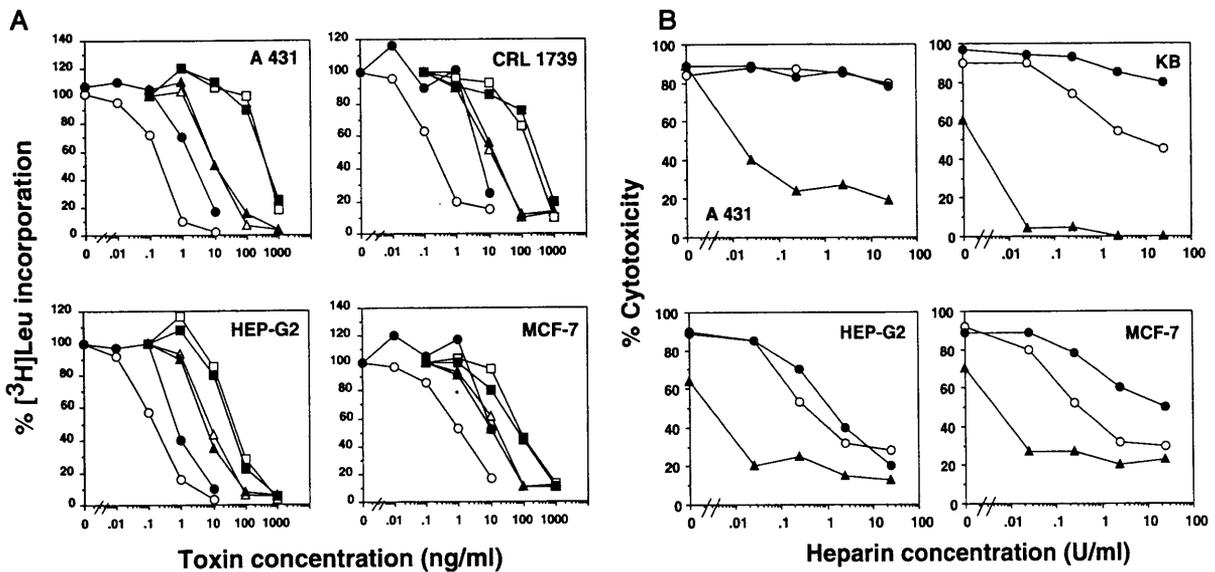


Figure 2: Cytotoxicity of HB-containing toxins. (A) Protein synthesis inhibition towards target cell lines (A431, CRT 1739, HEP-G2 and MCF-7) of (○) HB-EGF-PE, (●) HB-EGF-PE+EGF, (△) HB-PE, (▲) HB-PE+EGF, (□) PE, and (■) EGF. The final EGF concentration, when added, was $3\mu\text{g/ml}$. (B) Effect of heparin in the cytotoxicity of HB toxins. A fixed amount of toxin was incubated with the cells with the addition of increasing amounts of heparin (A431, 1 ng/ml; 10 ng/ml; HEP-G2, 10 ng/ml; MCF-7, 10 ng/ml). (○) HB-EGF-PE, (●) HB-TGF α -PE, (▲) HB-PE.

(5) キメラ毒素の血管平滑筋細胞に対する細胞障害性

HB-EGF はもともと平滑筋細胞に対する強力な増殖因子として報告されている (1-3)。

血管平滑筋細胞の増殖は、動脈硬化の進展と密接に関連しており、われわれが作製した HB-EGF-PE が血管平滑筋細胞の増殖を阻止しうるかどうかは、興味深い問題である。

Fig. 3A にキメラ毒素による牛大動脈より採取した血管平滑筋細胞に対する細胞障害性を示した。HB-EGF-PE は 0.4 ng/ml の ID50 を示し、血管平滑筋細胞に対して強力な細胞障害活性を示した。TGF α -PE も同様に強い障害性を示した。

興味深いことには、EGF 受容体との結合能を持たない HB-PE も ID50 は 100 ng/ml と HB-EGF-PE に比べ高いものの、血管平滑筋細胞に対して障害活性を示した。Fig. 3B にこれらのキメラ毒素の細胞障害性におよぼす EGF の影響、Fig. 3C にヘパリンの影響を示した。

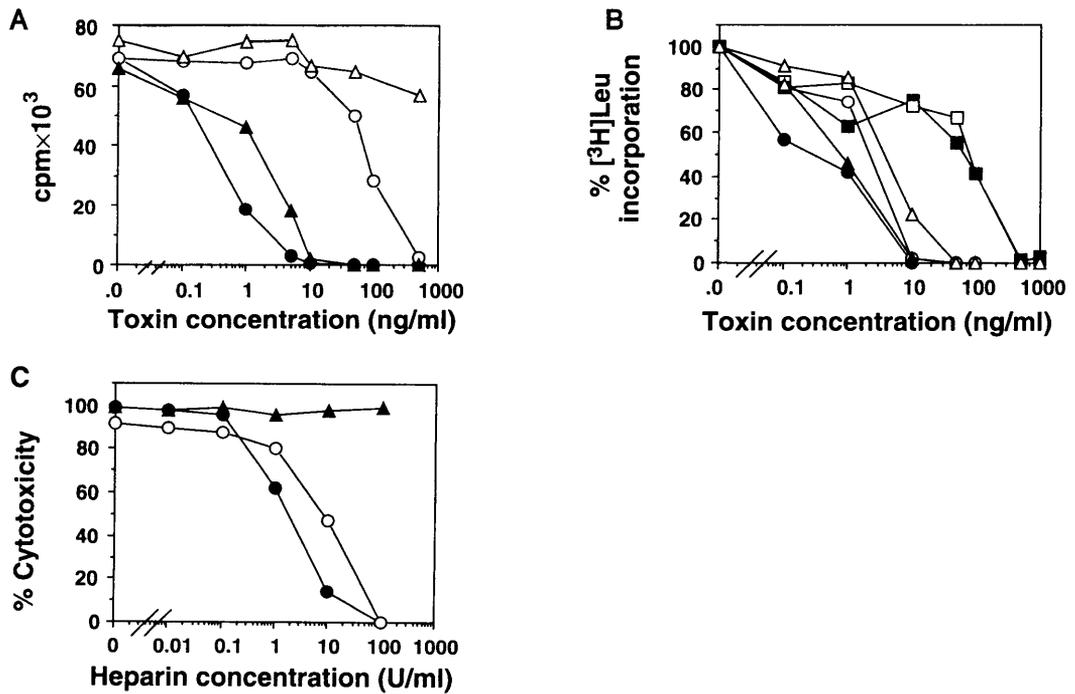


Figure 3. Cytotoxicity of chimeric toxins towards BASMCs. (A) Without competition. (●) HB-EGF-PE*, (○) HB-PE*, (▲) TGF $_{\alpha}$ -PE* (△) PE*, (B) Effect of EGF competition (4 $\mu\text{g/ml}$) on the cytotoxicity towards BASMC. (●) HB-EGF-PE*, (■) HB-PE* (▲) TGF $_{\alpha}$ -PE*, (○) HB-EGF-PE*+EGF, (□) HB-PE*+EGF, (△) TGF $_{\alpha}$ -PE+EGF. (C) Effect of heparin in the cytotoxicity of chimeric toxins to BASMC. A fixed amount of toxin was incubated with the cell with the addition of increasing amounts of heparin (●) HB-EGF-PE* 10 ng/ml (▲) TGF $_{\alpha}$ -PE* 10 ng/ml (○) HB-PE* 500 ng/ml.

EGF (4 $\mu\text{g/ml}$) は、HB-EGF-PE と TGF $_{\alpha}$ -PE の細胞障害性を阻害した。またヘパリンは濃度依存性に、HB-EGF-PE と HB-PE の細胞障害性を阻害した。これらの成績より、HB-EGF-PE は腫瘍細胞の場合と同様に血管平滑筋細胞の EGF 受容体を主なターゲットとしているが、同時にヘパリン結合ドメインも細胞障害性に重要な役割をはたしているものと考えられる。

(6) キメラ毒素の Chinese Hamstar ovary 細胞に対する細胞障害性

これまでの成績より、キメラ毒素のヘパリン結合ドメインが標的細胞上の HSPG に結合することによって、細胞障害活性を発揮することが考えられる。そこで、細胞上に様々な程度の HSPG を発現している Chinese Hamstar ovary 細胞 (CHO) を用いて、キメラ毒素のヘパリン結合ドメインと HSPG の意義を検討した。CHO-K1 は野生株であり EGF 受容体と HSPG を細胞表面上に発現しているが、変異株である CHO667 は HSPG を正常の 1~10%しか発現していない (9)。

Fig. 4A にこれらの細胞株に対する HB-EGF-PE, HB-PE, TGF $_{\alpha}$ -PE の細胞障害性を示した。CHO-K1 に対しては HB-EGF-PE が最も強い障害活性を示した。HB-EGF-PE の CHO667 に対する障害活性は非常に弱く、TGF $_{\alpha}$ -PE と同程度の障害活性を示した。非常に興味深いことに、HB-PE は野生株の CHO-K1 に対しては障害活性を有するが、HSPG をほとんど発現していない CHO667 に対しては障害活性を示さなかった。ヘパリンによる阻害効果を見ると Fig. 4B が示したように、ヘパリンは CHO-K1 に対する HB-EGF-PE および HB-PE の細胞障害活性を用量依存性に阻害したが、TGF $_{\alpha}$ -PE の活性に影響を及ぼさなかった。しかし、CHO667 に対する障害活性に有意な影響は見られなかった。これらの成績は、HB-EGF-PE の標的細胞への結合および internalization のプロセスの一部に HSPG とヘパリン結合ドメインとの結合が重要な役割を果たしていることを示している。

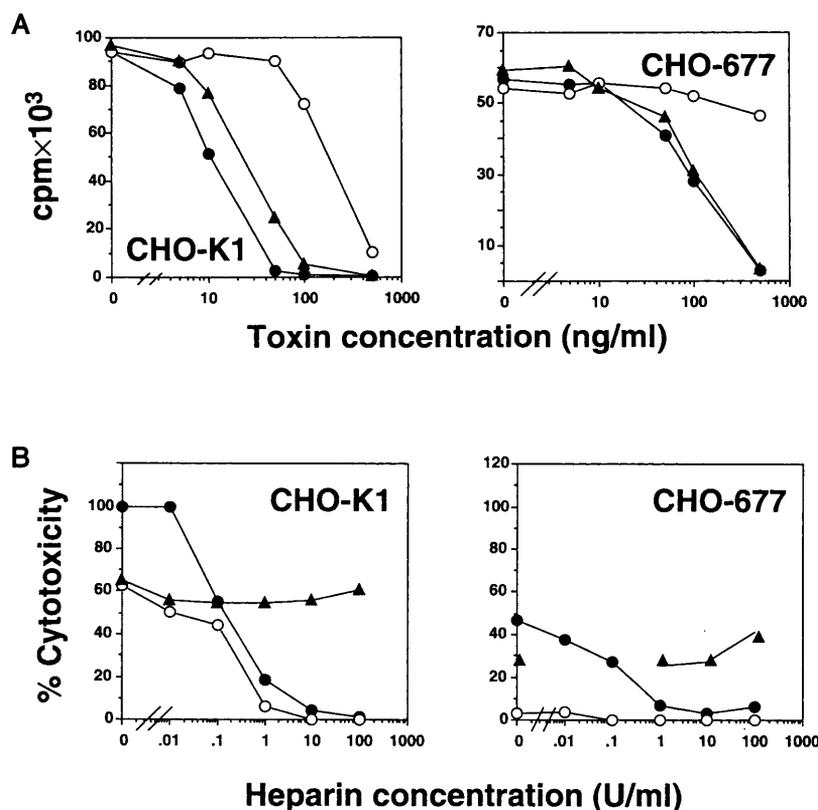


Figure 4. Cytotoxicity of chimeric toxins towards CHO cells. (A) Without competition. (●) HB-EGF-PE*, (○) HB-PE*, (▲) TGF α -PE*. (B) Effect of heparin on the cytotoxicity of chimeric toxins to CHO cells. A fixed amount of toxin was incubated with the cells with the addition of increasing amounts of heparin. (●) HB-EGF-PE*, 10 ng/ml; (○) HB-PE*, 500 ng/ml; (▲) TGF α -PE*, 10 ng/ml.

(7) ヒト肝組織におけるシンデカンの発現

シンデカン は、細胞表面上に存在する代表的な膜貫通型の HSPG であり、ラミニンやフィブロネクチンなどの細胞外基質に対する細胞の受容体として機能し、また bFGF に対する co-receptor としての機能などが知られている。これまでにシンデカン-1、-2、-3 および -4 の 4 種類のシンデカンの存在が知られている。(10) HB-EGF は先に述べたように EGF 受容体と結合するのみならず、細胞表面上の HSPG との結合がその生物学的活性に重要である。従って HB-EGF-PE を用いた癌の標的治療を考える際に、標的細胞上の HSPG の発現が重要な要素のひとつになる。この様な理由から、われわれはヒト肝組織におけるシンデカン-1 の発現を検討した。Fig. 5A に示すようにシンデカン-1 は正常肝細胞膜および細胞質に免疫染色で陽性所見を示した。一方、肝癌組織では、癌部において非癌部組織と同様の発現を示すものと (Fig. 5B)、癌部においてはほとんど蛋白の発現が見られないもの (Fig. 5C) が認められた。このシンデカン-1 の発現低下は、組織学的により未分化な肝癌や肝内転移・肝外転移を有する生物学的に悪性度の強い肝癌で著明であった。(Table 3, 4)

Table 3. Syndecan-1 protein expression and grade of tumor cell differentiation

Grade of differentiation		Staining intensity	
		Positive	negative
well	(n = 16)	8 (50.0%)	8 (50.0%)
moderately	(n = 24)	7 (29.2%)	17 (70.8%)
poorly	(n = 17)	3 (17.6%)	14 (82.4%)

Table 4. Relationship between syndecan-1 protein expression and tumor metastasis

variable	staining intensity	
	positive	negative
Intrahepatic metastasis		
with (n = 27)	4 (14.8%)	23 (85.2%)
without (n = 25)	13 (52.0%)	12 (48.0%)
Distant metastasis		
with (n = 12)	1 (8.3%)	11 (91.7%)
without (n = 45)	17 (37.8%)	28 (62.2%)

a, the prevalence of negative staining of syndecan-1 expression in the cases with intrahepatic metastasis is significantly higher ($p = 0.007$) than that of the cases without intrahepatic metastasis.

b, the prevalence of negative staining of syndecan-1 expression in the cases with distant metastasis is significantly higher ($p = 0.048$) than that of the cases without distant metastasis.

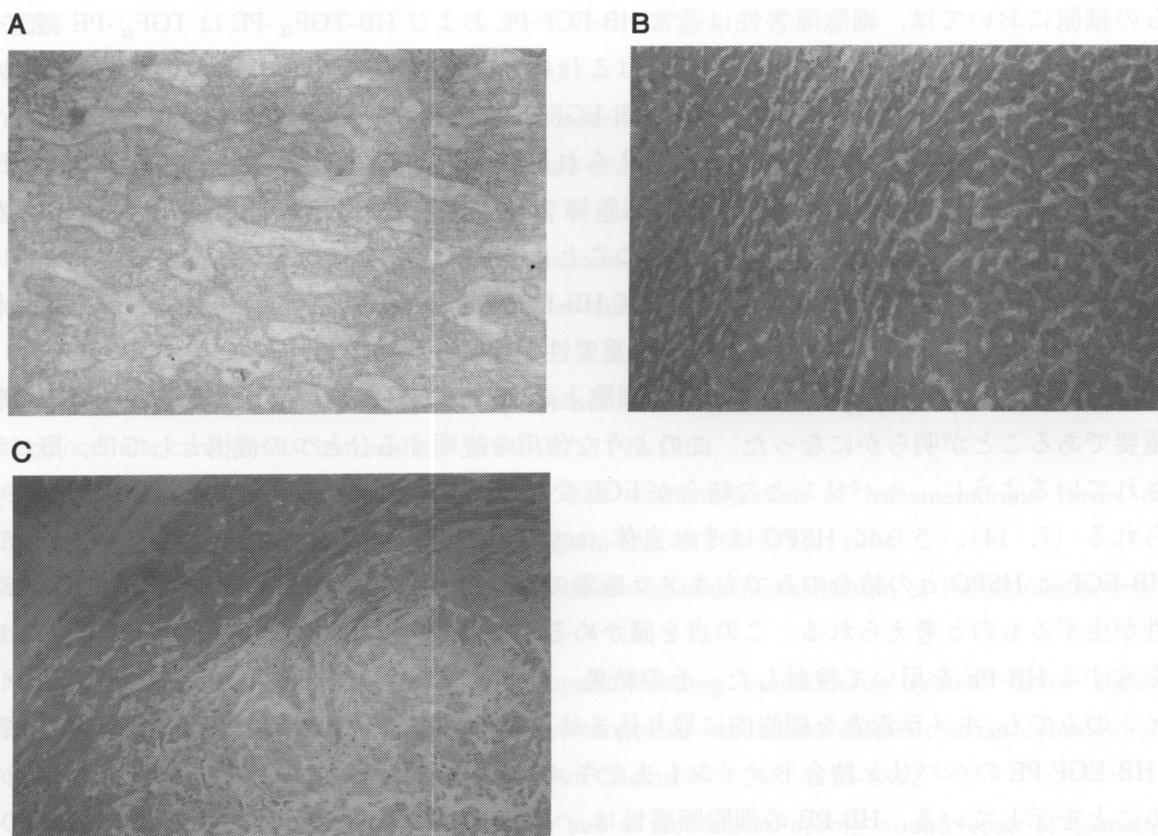


Figure 5A: Immunohistochemical findings of syndecan-1 in human liver tissues. Expression of human syndecan-1 was detected with Ab HSE-1, a polyclonal antibody raised against the human syndecan-1 core protein.

Figure 5B: Immunohistochemical findings of syndecan-1 in human hepatocellular carcinoma (HCC) tissues. The positive immunostaining of syndecan-1 protein in HCC. The section of the well differentiated HCC sample was stained with Ab HSE-1. Positive expression of syndecan-1 protein was found in the HCC portion with almost the same intensity of staining in the non-tumoral portion. (Original magnification X125)

Figure 5C: The negative immunostaining of syndecan-1 protein in HCC. The section of the poorly differentiated HCC sample was stained with Ab HSE-1. Positive expression of syndecan-1 protein was found in the non-tumoral hepatocytes, whereas no expression was observed in the HCC portion. (Original magnification X125)

4. 考 察

細胞を殺すためには、緑膿菌毒素が特異的な受容体を介して細胞内に取り込まれる事が必要である。このように、キメラ毒素を用いた細胞障害性の研究は、受容体とリガンドの相互作用を調べる上で有用な手段と成りうる (11-13)。本研究において、bifunctional ligand としては、EGF 受容体と HSPG の両方に結合できる HB-EGF を用いた。

本研究においてわれわれは、bifunctional ligand として HB-EGF-PE および HB-TGF α -PE を、monofunctional ligand として TGF α -PE と HB-PE を用いた。これらのキメラ毒素を用いて、種々の腫瘍細胞や血管平滑筋細胞などに対する細胞障害性を検討した結果、キメラ毒素が標的細胞に取り込まれるためには、2種類の経路が存在することが明らかになった。殆どの細胞は、HB-EGF が EGF 受容体と結合することによってキメラ毒素が細胞内に取り込まれ障害される。しかし同時に、HB-EGF のヘパリン結合ドメインが標的細胞上の HSPG と結合する事によって細胞障害性がより増強されると考えられる。このヘパリン結合ドメインが細胞障害性を増強する効果に関しては、MCF-7, Hep-G2, 平滑筋細胞および CHO 細胞などの、EGF 受容体の発現が低-中程度の細胞に対する HB-EGF-PE および HB-TGF α -PE の細胞障害性の成績が示している。これらの細胞においては、細胞障害性は通常 HB-EGF-PE および HB-TGF α -PE は TGF α -PE に比べるとその作用は強力であった。HB-EGF-PE はこれらの細胞に対して HB-TGF α -PE よりも強力な細胞障害性を示したが、これはおそらく、HB-EGF-PE は HB-TGF α -PE よりもヘパリンに対して強い親和性を有している事によるものと考えられる。このような細胞に対して TGF α -PE に比べ HB-EGF-PE および HB-TGF α -PE が強い細胞障害性を示したのには、これらのキメラ毒素が EGF 受容体に対しては同様の親和性を持つことより、ヘパリン結合ドメインが関与しているものとみられる。さらに、CHO 細胞に対して HB-EGF-PE は TGF α -PE に比べ強い細胞障害活性を示したことより、ヘパリン結合ドメインの重要性が確認された。

このように、ヘパリン結合ドメインと細胞上の HSPG との結合がキメラ毒素の細胞障害性に重要であることが明らかになった。このような作用を説明するひとつの機構としては、既に報告されているように、ヘパリンとの結合が EGF 受容体とリガンドとの結合を促進することが考えられる (7, 14)。さらに、HSPG はそれ自体、recycling の過程で細胞内に取り込まれる (15) ので、HB-EGF と HSPG との結合のみでもキメラ毒素の細胞内への取り組みおよびその後の細胞障害活性が生ずるものと考えられる。この点を確かめるために、われわれはヘパリン結合ドメインのみを有する HB-PE を用いて検討した。その結果、EGF 受容体を介することなくヘパリン結合ドメインのみでも、キメラ毒素を細胞内に取り込ませることが可能である事が判明した。この成績は、HB-EGF-PE のヘパリン結合ドメインもまたキメラ毒素を標的細胞に作用させることが可能であることを示している。HB-PE の細胞障害性は、ヘパリンによって完全に阻止されることより、この細胞障害活性はヘパリン結合ドメインと標的細胞上の HSPG との相互作用であることを示している。CHO 細胞に対する HB-PE の細胞障害性の成績もこれらのことを支持する結果であった。HSPG の internalization の速度は、半減期が3~8時間と EGF に比べ非常に遅いものであるが (15)、われわれの成績は、EGF 受容体の発現が中等度で HSPG の発現が高度な細胞に対しては大きな影響を及ぼすものであると考えられる。このような HSPG を介した internalization の結果は、すでに他のヘパリン結合性増殖因子である bFGF で報告されている成績と合致するものである (16~18)。

本研究において HB-EGF をベースにしたキメラ毒素は、細胞上の EGF 受容体のみならず HSPG をも分子標的とすることが明らかになった。種々の腫瘍細胞に対する細胞障害性の成績は、

HB-EGF-PE は低一中等度の EGF 受容体を発現している肝癌をはじめとする腫瘍細胞や血管平滑筋細胞に対して強い障害活性を有することを示しており、新しい癌化学療法としての臨床応用の可能性を強く示唆するものである。実際に、ヒト肝組織における代表的な HSPG のひとつであるシンデカン-1 の発現を調べた結果、悪性度の高い高転移能を有する肝癌ではシンデカン-1 の発現は低下していた。HB-EGF-PE を肝癌の治療に応用する際、分子標的となるのは肝癌細胞上に発現している EGF 受容体とシンデカン-1 である。ヒト肝癌細胞株である Hep-G2 におけるシンデカン-1 の発現をみると、中等度の発現がみられたが、HB-EGF-PE が Hep-G2 に対して高度の細胞障害活性を示したのは、EGF 受容体とシンデカン-1 を介したものであると考えられる。今後臨床応用に当たって、問題になるのはシンデカン-1 の発現が低下して腫瘍細胞にどう対処するかということである。われわれは、最近ブタの白血球からシンデカン-1 の誘導因子である PR-39 を分離精製した (19) が、この誘導因子をもちいて腫瘍細胞上のシンデカン-1 を誘導し、HB-EGF-PE の targeting の効率を促進する可能性について現在検討を進めている。

参考文献

1. Higashiyama S, Abraham J, Miller J et al. A heparin-binding growth factor secreted by macrophage-like cells that is related to EGF. *Science* 1991; 251: 936-938/.
2. Higashiyama S, Lau K, Besner GE et al. Structure of heparin-binding EGF like growth factor. *J Biol Chem* 1992; 267: 6205-6212.
3. Higashiyama S, Abraham J, Klagsbrum M. Heparin-binding growth factor stimulation of smooth muscle cell migration: Dependence on interaction with cell surface heparan sulfate. *J cell Biol* 1991; 122: 933-940.
4. Inui Y, Higashiyama S, Kawata S et al. Expression of heparin-binding growth factor in human hepatocellular carcinoma. *Gastroenterol* 1994; 107: 1799-1804.
5. Ono M, Raab G, Lau K et al. Purification and characterization of transmembrane forms of heparin-binding EGF-like growth factor. *J Biol Chem* 269: 31315-31321, 1994.
6. FitzGerald DJP, Morris RE, Saelinger CB. Receptor-mediated internalization of Pseudomonas toxin by mouse fibroblast. *Cell* 1980; 21: 867-873.
7. Mesri EA, Kreitman RJ, Fu YM et al. Heparin binding transforming growth factor alpha-Pseudomonas exotoxin A: A heparan sulfate proteoglycan modulated chimeric toxin cytotoxic to cancer and proliferating smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1993; 268: 4853-4862.
8. Gallo R, Kim C, Kokenyesi R et al. Syndecan-1 and -4 are induced during wound repair of neonatal but not fetal skin. *J Invest Dermatol*, in press.
9. Esko JD, Rostand KS, Weinke JL. Tumor formation dependent on proteoglycan biosynthesis. *Science* 1988; 241: 1092-1096.
10. Bernfield M, Kokenyesi R, Kato M et al. Biology of the syndecans: A family of transmembrane heparan sulfate proteoglycans. *Annu Rev Cell Biol* 1992; 8: 365-393.
11. Pastan I, Willingham MC, FitzGerald DJP. Immunotoxins. *Cell* 1986; 47: 641-648.
12. Pastan I, FitzGerald DJP. Pseudomonas exotoxin: chimeric toxins. *J Biol Chem* 1989; 264: 15157-15160.

13. Pestan I, Chaudhary VK, FitzGerald DJP. Recombinant toxins, novel therapeutic agents. *Annu Rev Biochem* 1992; 61: 331-354.
14. Ruoslahti E, Yamaguchi Y. Proteoglycans as modulators of growth factor activities. *Cell* 1991; 64: 867-869.
15. Yanagishita M, Hascall VC. Cell surface heparan sulfate proteoglycans. *J Biol Chem* 1992; 267: 9451-9454.
16. Gannoun-Zaki L, Pierri I, Badet J et al. Internalization of basic fibroblast growth factor by Chinese hamster lung fibroblast cell: involvement of several pathways. *Exp Cell Res* 1991; 197: 272-279.
17. Roghani M, Moscatelli D. Basic fibroblast growth factor is internalized through both receptor-mediated and heparan sulfate proteoglycan-mediated mechanisms. *J Biol Chem* 1992; 267: 22156-22162.
18. Rusnati M, Urbinati C, Presta M. Internalization of basic fibroblast growth factor (bFGF) in cultured endothelial cells: Role of the low affinity heparin-like bFGF receptors. *J Cell Physiol* 1993; 154: 154-162.
19. Gallo RL, Ono M, Povsic T et al. Syndecan, cell surface heparan sulfate proteoglycans, are induced by a proline-rich antimicrobial peptide from wounds. *Proc Natl Acad Sci, USA* 91: 11035-11039, 1994.