

原 著

## Ulinastatin の腫瘍における血管新生に対する抑制効果

獨協医科大学 外科学 (胸部)

吉井 直子

**要 旨** Serine protease inhibitor の1つである ulinastatin の腫瘍における血管新生および血行性転移に対する効果について検討した。方法・結果：1) 肺癌細胞 A549 又は EBC-1 を注入した chamber をマウス背部皮下に植え込んだ。Ulinastatin 投与群 (U 群) と非投与対照群 (C 群) に分けた。7 日後の A549 及び EBC-1 による皮下新生血管平均総長は、U 群は C 群に比し有意に減少した。2) EBC-1 をマウス背部皮下に移植し、PBS (P 群) 又は ulinastatin (U 群) を 7 日間連続投与した。15 日目の腫瘍の CD31 免疫染色で、腫瘍内血管数は、U 群は P 群に比し有意に減少した。TUNEL assay による腫瘍内アポトーシス細胞数は、U 群は P 群に比し有意に増加した。3) A549 をマウス尾静脈より注入し、注入日より PBS (P 群) または ulinastatin (U 群) を 14 日間連続投与した。29 日目の CEA 免疫染色による肺転移面積は、U 群は P 群に比し有意に減少した。結論：Ulinastatin は腫瘍血管新生を抑制し、腫瘍細胞死を誘導した。また、転移抑制効果も認められた。

**Key Words** : Ulinastatin, 血管新生阻害剤, 転移, 血管新生, アポトーシス

### 緒 言

血管新生とは、既存の血管より新たな血管が形成される現象であり、胎生期の器官形成、成人における黄体・胎盤形成、創傷治癒といった生理的にみられるものと、癌、網膜症、慢性関節リウマチといった病的に起こるものがある。これらの疾患は、近年、血管新生病ともいわれ、血管新生が病気の進行に大きな影響を及ぼしていることが報告されている<sup>1,2)</sup>。血管新生抑制因子である angiostatin<sup>3)</sup>、endostatin<sup>4)</sup> の発見以降、血管新生に関与する種々の分子をターゲットとした血管新生阻害剤の研究が進められており、serine protease inhibitor である gabexate mesilate (GM)<sup>5)</sup> や antithrombin III (AT III)<sup>6)</sup> についても血管新生を抑制する効果を持つことが報告されている。

Ulinastatin は、Urinary trypsin inhibitor (UTI) であり serine protease inhibitor の1つで、ヒト尿中より分離・精製された分子量約 67,000 の糖タンパクである。急性循環不全、急性肺炎を適応症とし、すでに臨床において広く使用されている薬剤である。Ulinastatin については、腫瘍細胞の浸潤抑制作用を有し転移を抑制するという報

告はされているが<sup>7,8)</sup>、血管新生抑制作用に関する報告は今までなされていない。我々はこの ulinastatin に血管新生抑制効果があるのではないかと考え、マウスを用いて腫瘍により誘導される血管新生に対する ulinastatin の影響を検討した。

### 材料と方法

#### 1. 動物、細胞および試薬

6 週齢メスの BALB/c マウスを実験 1 (マウス背部皮下法) に、4 週齢メスの SCID マウスを実験 2 (マウス皮下腫瘍モデルにおける腫瘍内血管新生) および実験 3 (マウスモデルにおける肺転移実験) に使用した。これらのマウスは、日本チャールス・リバー株式会社 (横浜) より購入した。本研究におけるすべての動物実験は、大阪大学動物実験指針に基づき、大阪大学にて行われた。ヒト肺腺癌細胞株である A549、ヒト肺扁平上皮癌細胞株である EBC-1 は、10% fetal bovine serum (FBS; 大日本製薬; 東京) と 50 units/ml penicillin, 50 µg/ml streptomycin (Life Technologies, Inc., Frederick, MD) を添加した DMEM (日本製薬; 東京) で培養した。Ulinastatin は、持田製薬より提供されたものを使用した。

#### 2. 実験 1 : マウス背部皮下法 (mouse dorsal air sac assay : DAS 法)

DAS 法は、Oikawa ら<sup>9)</sup> の方法に幾つかの改良を加え

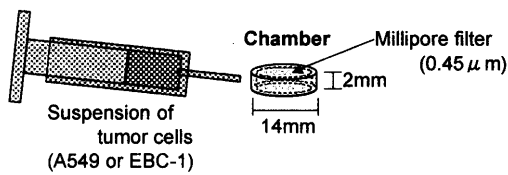
平成 16 年 11 月 15 日受付, 平成 16 年 12 月 20 日受理

別刷請求先: 吉井直子

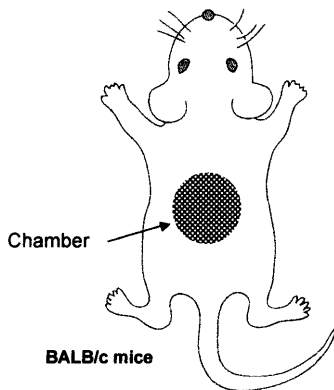
〒321-0293 栃木県下都賀郡壬生町北小林 880

獨協医科大学 外科学 (胸部)

### a. Preparation of the chamber



### b. Implantation of the chamber in dorsum of mouse



**Fig. 1** Mouse dorsal air sac assay ; a) Suspension of tumor cells was injected into a chamber, b) which was implanted in the dorsum of a mouse.

を行った。血清を加えないDMEM 200  $\mu$ lで希釈したA549 ( $1 \times 10^5$  cells), EBC-1 ( $5 \times 10^5$  cells)を、Millipore ringに2枚の0.45  $\mu$ m pore sizeのMillipore filterをMF cement (Millipore Co., Bedford, MA)で接着させて作成したMillipore chamberにそれぞれ注入した (Fig. 1 a)。Chamberからは癌細胞が通過することはなく、腫瘍細胞の分泌する因子のみが通過可能である。このchamberをネブタールにて麻酔したBALB/cマウスの背部皮下に植え込んだ (Fig. 1 b)。マウスは、chamber内にDMEMのみを注入した群 (コントロール群), A549を注入した群, EBC-1を注入した群の3群に分け、それらをさらにchamber植え込み日よりphosphate buffered saline (PBS) 200  $\mu$ lで希釈されたulinastatin 3000 Uを7日間連日皮下投与するulinastatin群 ( $n = 13$ )と非投与対照群 ( $n = 12$ )に分け、計6群とした。皮下へのchamber植え込み後7日目に、マウスをネブタールで安楽死させた後、chamber部分の皮膚を摘出し、実体顕微鏡にて皮下組織の観察、記録を行った。マウス皮下組織の画像はコンピューターに取り込み、皮下組織内に形成された新生血管の長さの総和をピクセル数で表し、ulinastatin投与群と非投与群で比較検討した。また、背部皮膚はIHC Zinc Fixative (Pharmingen, San Diego, CA)にて固定し、パラフィン包埋後、CD31による免疫組織染色を行った。

### 3. 実験2：マウス皮下腫瘍モデルにおける腫瘍内血管新生

EBC-1 ( $2 \times 10^6$  cells)を、血清を加えないDMEM 200  $\mu$ lで希釈し、ネブタールにて麻酔したSCIDマウスの背部皮下に移植した<sup>10)</sup>。移植後、週2回の体重測定及び腫瘍径の測定を行った。腫瘍体積 (V)は、腫瘍長径 (a)と短径 (b)より $V = ab^2/2$ の式を用いて算出した。移植8日目よりPBS群 ( $n = 6$ )としてPBS 200  $\mu$ lを、ulinastatin群 ( $n = 6$ )としてulinastatin 1000 U/200  $\mu$ l PBSをそれぞれ7日間連日皮下投与した。移植後15日目にネブタールによりマウスを安楽死させた後、皮下腫瘍を摘出した (Fig. 2)。腫瘍は、IHC Zinc Fixativeにて固定し、パラフィン包埋後、H & E染色、cytokeratin (AE1/AE3)とCD31による免疫組織染色およびTUNEL assayを行った。

腫瘍内血管新生の評価は、CD31により免疫染色された切片において各腫瘍につき6視野のCD31陽性血管数をカウントし、PBS群とulinastatin群で比較した。皮下腫瘍におけるアポトーシスの評価は、染色された切片より、各腫瘍につき8視野のTUNEL陽性細胞数をカウントし、PBS群とulinastatin群で比較した。

### 4. 実験3：マウスモデルにおける肺転移実験

A549 ( $1 \times 10^6$  cells)を血清を加えないDMEM 200  $\mu$ lにて希釈し、SCIDマウスの尾静脈より移植した<sup>11)</sup>。観察期間中は、週2回の体重測定を行った。腫瘍移植日 (1日目)より14日目までの14日間、PBS群 ( $n = 8$ )としてPBS 200  $\mu$ lを、ulinastatin群 ( $n = 9$ )としてulinastatin 2000 U/200  $\mu$ l PBSをそれぞれ連日皮下投与した。移植後29日目にネブタールによりマウスを安楽死させた後、肺を摘出した。摘出肺はIHC Zinc Fixativeにて固定し、パラフィン包埋後、H & E染色およびcarcinoembryonic antigen (CEA)による免疫染色を行った。CEAにより染色されたプレパラートの画像をコンピューターに取り込み、1切片の肺全体に対する転移面積のpercentageを測定した。

### 5. 免疫組織染色, TUNEL assay

IHC Zinc Fixativeにて固定されパラフィン包埋された検体より、3  $\mu$ m厚の薄切標本を作製し、H & E染色および免疫組織染色を行った。免疫組織染色は、50倍希釈のrat anti-mouse CD31 monoclonal antibody (Pharmingen, San Diego, CA), 100倍希釈のmouse anti-human cytokeratin (AE1/AE3: DakoCytomation, Inc., Carpinteria, CA)および200倍希釈のrabbit anti-human carcinoembryonic antigen (CEA: DAKO,

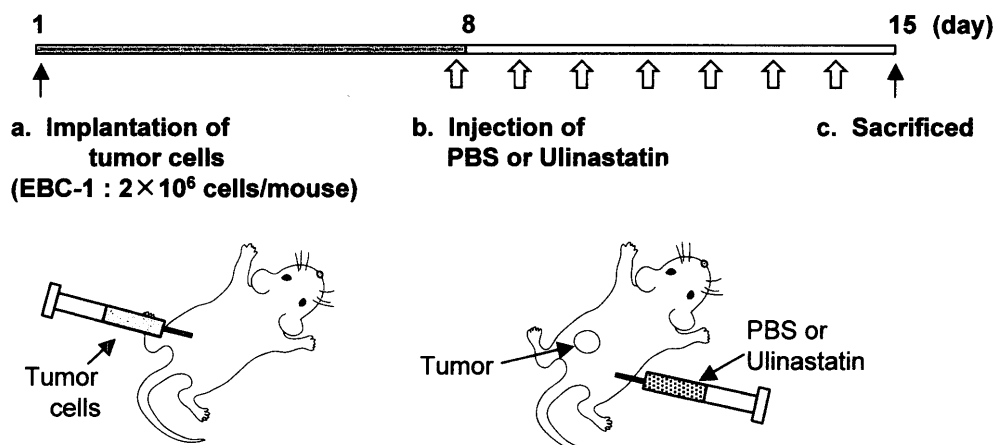


Fig. 2 Murine models of tumor angiogenesis ; a) EBC-1 tumor cells were implanted in the dorsum of a mouse. b) PBS or ulinastatin was injected subcutaneously from day 8 to day 14 after the tumor cell implantation. c) The mouse was sacrificed for examination on day 15.

Glostrup, Denmark) を用い, Avidin-Biotin Complex (ABC) 法 (Vecoer Laboratories, Inc., Burlingame, CA) により行った. AE1/AE3については, さらに, Mouse on Mouse Immunodetection kit (Vecoer Laboratories, Inc.) を用いてABC法による免疫組織染色を行った.

TUNEL assayは, DeadEnd™ Colorimetric TUNEL System (Promega, Madison, WI) を用いた<sup>13)</sup>. 薄切標本は, 脱パラ後4% paraformaldehydeで固定し, proteinase Kによる透過処理を行った. その後, DNAの切断箇所を terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) にてラベルし, streptavidin-HRPを結合させ, diaminobenzidine (DAB) により発色させた.

## 6. 統計解析

データは平均値 ± 標準偏差で求め, 群間比較は Student's unpaired t-testを用い危険率5%未満を有意差ありとした.

## 結 果

### 結果1: マウス背部皮下法

DAS法において腫瘍細胞を含まないDMEMのみを注入したchamberを埋め込んだ場合は, 血管新生はほとんど認められなかった (Fig. 3 a). ヒト肺癌細胞であるA549 (Fig. 3 b, 左), EBC-1 (Fig. 3 c, 左) は, チャンバー越しにマウス皮下に明らかに血管新生を引き起こした. しかし, ulinastatin 3000 U/mouseの1日1回, 7日間の皮下投与によりA549 (Fig. 3 b, 右), EBC-1 (Fig. 3 c, 右) による血管新生が抑制された. 画像解析による新生血管の平均総長の検討においても, A549の平均総長は, ulinastatin 非投与群 ( $1870 \pm 353$ ) に比べて uli-

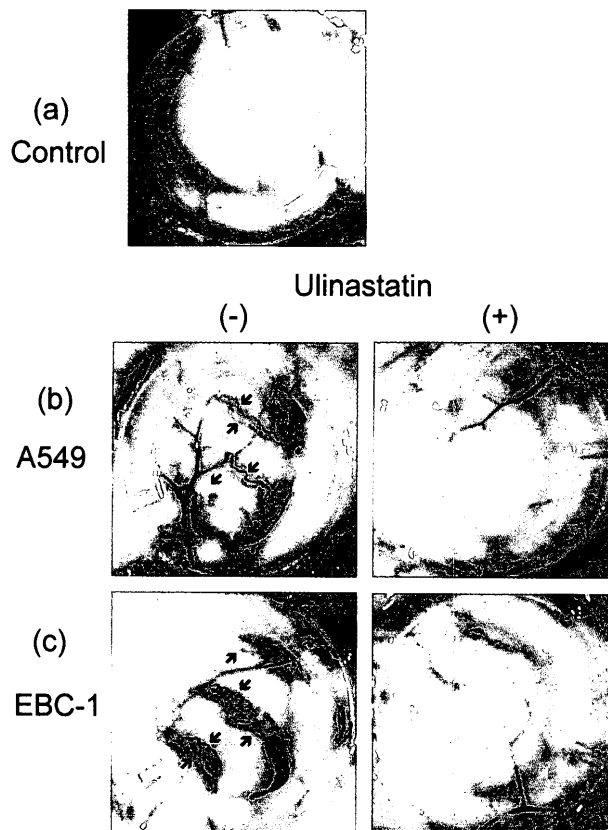
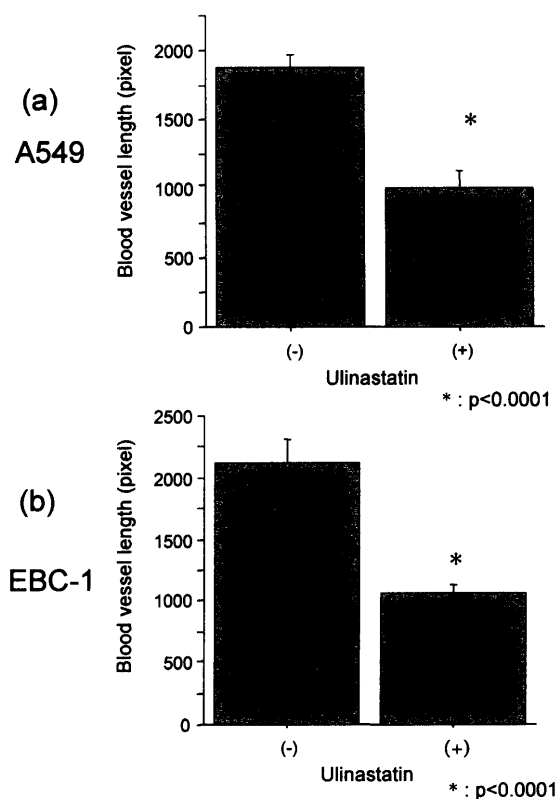
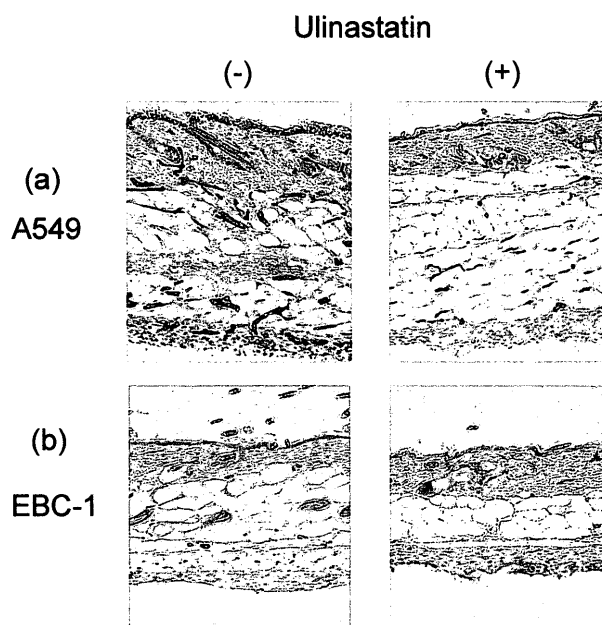


Fig. 3 Effect of ulinastatin on A549 or EBC-1-induced angiogenesis in the mouse dorsal air sac assay. ; a) Only DMEM was injected in a chamber, which did not induce new blood vessels. A549 (b) or EBC-1 (c) was injected in a chamber. Induced were new blood vessels with characteristic zigzagging lines, which were reduced with ulinastatin.



**Fig. 4** Blood vessel length in A549 or EBC-1-induced angiogenesis in the mouse dorsal air sac assay ; Blood vessel lengths induced by A549 (a) and EBC-1 (b) were both reduced significantly by the administration of ulinastatin.



**Fig. 5** Microphotographs of immunohistochemical staining of blood vessels with CD31 ; Blood vessels induced by A549 (a) and EBC-1 (b) were significantly reduced by the administration of ulinastatin.

**Table 1** Body weight and tumor volume of mice treated with PBS or ulinastatin.

Treatment	Number of mice	Body weight (g)	Tumor volume (mm <sup>3</sup> )
PBS	6	16.65 ± 1.23	2689 ± 1349
Ulinastatin	6	16.58 ± 1.78	2859 ± 2246

$p = 0.9445$        $p = 0.8772$

Values are shown as mean ± S.D.

There were no differences in body weight and tumor volume between PBS group and ulinastatin group.

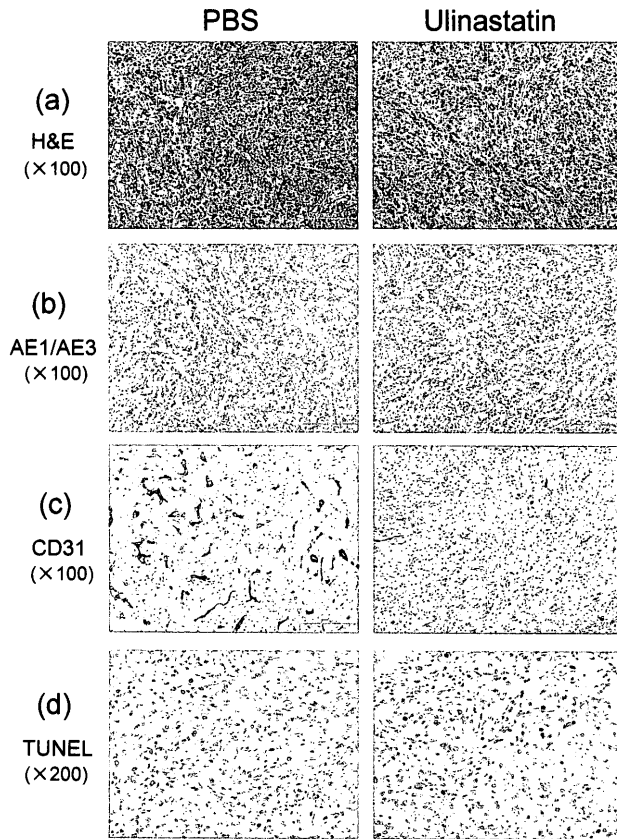
nastatin投与群 (993 ± 454) は有意に減少した (Fig. 4 a). 同様に, EBC-1においても平均総長は, ulinastatin非投与群 (2115 ± 658) に比べてulinastatin投与群 (1051 ± 300) は有意に減少した (Fig. 4 b).

血管内皮細胞に発現しているCD31による免疫組織化学染色においても, A549, EBC-1により増生する血管内皮細胞がulinastatinの投与により減少することが示された (Fig. 5).

## 結果2. マウス皮下モデルにおける腫瘍内血管新生

ヒト肺癌細胞であるEBC-1をマウス皮下に移植後14日目のマウス体重及び皮下腫瘍体積は, ulinastatin投与

の有無にかかわらず有意な変化は見られなかった (Table 1). 摘出した皮下腫瘍の組織学的所見は, HE染色, AE1/AE3による免疫組織化学染色では, グループ間で大きな変化は認められなかった (Fig. 6 a, b). CD31による免疫染色においては, PBS群では腫瘍内に多数の血管形成が見られるのに対し, ulinastatin群では明らかに減少していた (Fig. 6 c). CD31陽性となった腫瘍内血管のカウント数は, PBS群は107.6 ± 16.6, ulinastatin群は66.1 ± 21.2で, ulinastatin群の腫瘍内血管数はPBS群に比べて有意に減少していた (Fig. 7 a). また, TUNEL assayによる腫瘍内アポトーシスの検討では, PBS群に比べulinastatin群に, より多くアポトーシスが

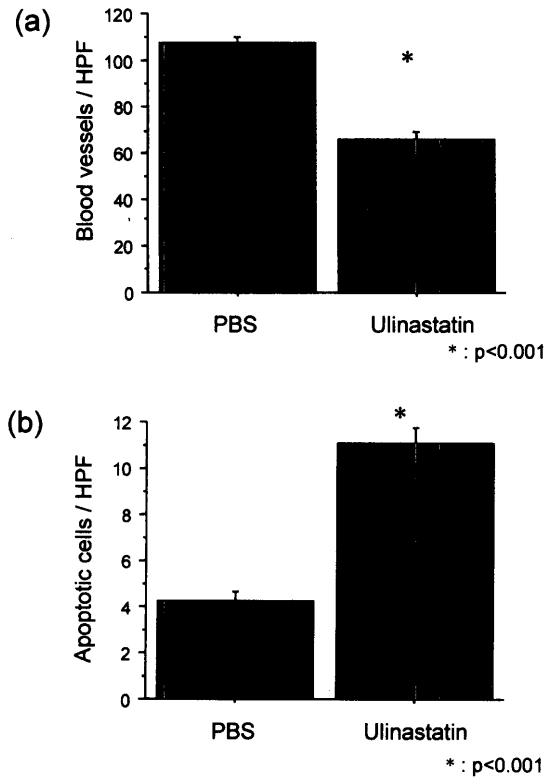


**Fig. 6** Microphotographs of H & E, AE1/AE3, CD31 and TUNEL assay staining of the tumor extirpated; There were no differences between PBS group and ulinastatin group in H & E (a) and AE1/AE3 (b) staining. Blood vessels induced by EBC-1 (c) were significantly reduced by the administration of ulinastatin. Number of tumor cells stained with TUNEL assay (d) significantly increased with the administration of ulinastatin.

誘導されていた (Fig. 6 d). アポトーシス陽性細胞数のカウントでは、Ulinastatin群 ( $11.10 \pm 4.19$ ) はPBS群 ( $4.25 \pm 3.17$ ) に比べて有意にアポトーシス陽性細胞が増加していた (Fig. 7 b).

### 結果3. 肺転移に対するUlinastatinの影響

ヒト肺癌細胞であるA549を尾静脈より移植後29日目のマウスの体重は、ulinastatin投与の有無による差は認められなかった (Table 2). 摘出した肺のHE染色およびCEAによる免疫染色では、PBS群に比べてulinastatin群において肺転移の減少が認められた (Fig. 8). CEA陽性部分のpercentageは、PBS群 ( $0.71 \pm 0.07$ ) に比べてulinastatin群 ( $0.49 \pm 0.06$ ) が有意に小さかった (Fig. 9).



**Fig. 7** Comparison of blood vessels and apoptotic tumor cells between PBS group and ulinastatin group; a) Number of blood vessels stained with CD31 in ulinastatin group was significantly smaller than that in PBS group. Number of apoptotic tumor cells stained with TUNEL assay in ulinastatin group was significantly larger than that in PBS group.

**Table 2** Body weight of mice in the lung metastasis model.

Treatment	Number of mice	Body weight (g)	
Control	8	$17.68 \pm 1.43$	p = 0.0716
Ulinastatin	9	$16.65 \pm 0.66$	

Values are shown as mean  $\pm$  S.D.

There were no differences in body weight between PBS group and ulinastatin group.

## 考 察

1970年代, Folkmanにより, 腫瘍は1~2 mmを越えて増殖するためには自己を栄養する新たな血管の形成を必要とし, 血管新生を阻害することで癌の進展が抑えられることが報告されて以降<sup>12)</sup>, 血管新生を抑制することは癌治療において重要な戦略の一つと考えられるようになった. 近年, 血管新生に関して分子レベルでのメカニズムの解析が進み, これら血管新生に関与する種々の分子をターゲットとした血管新生阻害剤の研究が勢力的

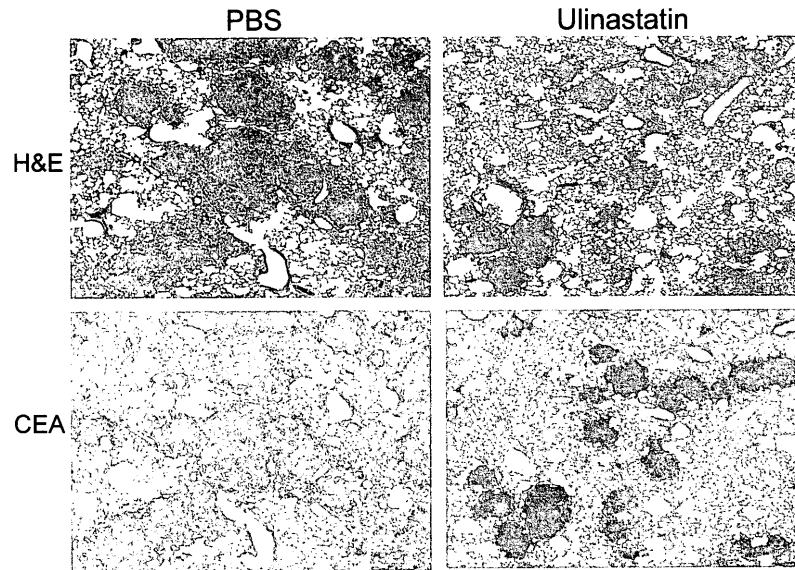


Fig. 8 Microphotographs of H & E (a) and CEA (b) immunohistochemical staining of the lung ; Areas of metastatic lesions were smaller in ulinastatin group.

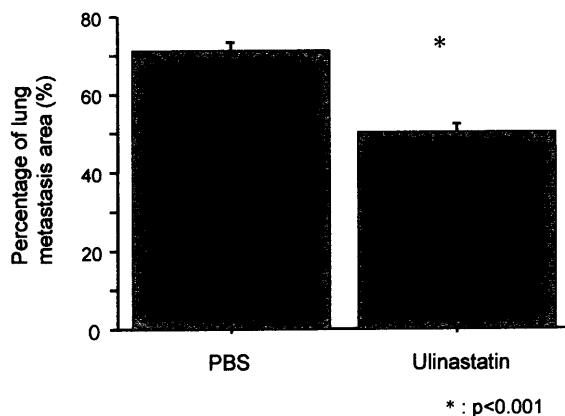


Fig. 9 Comparison of lung metastatic areas stained with CEA between PBS group and ulinastatin group : The percentage of metastatic area against whole lung area in the slide was significantly smaller in ulinastatin group than in PBS group.

に行われている<sup>13, 14</sup>。血管新生には増殖因子<sup>15</sup>、接着分子<sup>16</sup>など多くの分子の関与が考えられているが、その中でもプロテアーゼ<sup>17, 18</sup>は重要な役割を果たしていることが明らかにされてきた。その結果、プロテアーゼの阻害剤を用いて血管新生を抑制することにより癌の進展を制御する試みがなされてきた。Yoonらは、ヒト大腸癌細胞および血管内皮細胞を用いた検討により、serine protease inhibitorに属するgabexate mesilate (GM)がmatrix metalloproteinases (MMPs)やurokinase-type plasminogen activator (uPA)を抑制することで腫瘍細胞の浸潤や血管新生を抑制することを報告している<sup>5</sup>。

また、O'Reillyらは、同じくserine protease inhibitorに属するantithrombin III (AT III)が血管内皮細胞の増殖抑制や血管新生抑制すること、さらにマウス皮下腫瘍モデルにおいても抗腫瘍効果ならびに腫瘍内の血管新生抑制作用を持つことを明らかにし、その阻害因子がnative AT IIIから切断された開裂型 (cleaved) AT IIIが阻害因子の本体であることを報告している<sup>6</sup>。また、Larssonらにより潜在型 (latent) AT IIIも同様の効果を持つことが報告されている<sup>19</sup>。このようにserine protease inhibitor類の血管新生抑制作用が報告されているが、最も強い活性をもつserine protease inhibitorとして日常臨床で頻用されているulinastatinの血管新生抑制効果についての報告は見当たらない。そこで、本研究ではulinastatinの血管新生の抑制効果を明らかにするとともに、その血管新生抑制効果が腫瘍の増殖および転移に与える影響を検討した。

まず、ulinastatinに血管新生抑制効果があるかを確認するため、DAS法を用いて検討した。本法はin vivoにおける腫瘍血管新生を検討する標準的な方法であり、0.45  $\mu\text{m}$  pore sizeのmillipore filterで周囲組織と境されたchamber内に腫瘍細胞を注入し、腫瘍細胞が惹起する血管新生を評価する方法である。今回の検討でA549, EBC-1の2種類の肺癌細胞はいずれもchamber周囲の皮下組織に著明な血管新生を引き起こしたが、この血管新生はulinastatinにより明らかに抑制された。血管内皮細胞を用いたin vitroの検討でulinastatinは血管の形成をおさえる (data not shown) ことから、ulinastatinに血管新生の抑制作用があることが確認された。

次に、EBC-1を用いたマウスの皮下腫瘍モデルに対する ulinastatin の影響を検討した。その結果、ulinastatin の投与により腫瘍の増殖抑制は認められなかったが、腫瘍内血管数は明らかに減少していた。血管新生の阻害が見られたにもかかわらず、腫瘍の増殖が抑制されなかったことから、ある程度の大きさになった腫瘍に対して血管新生を阻害しても効果が期待できないと考えられた。腫瘍の増殖には多くの因子が関与しており、血管新生を抑制しても他の因子により補償される可能性が考えられる。また、このことから血管新生阻害剤は原発巣に対して用いるよりも例えば微小転移などといった微小な段階の腫瘍に使用した方が、より大きな効果が期待できることを示している。Zetterらは、腫瘍における血管新生の意義として癌細胞増殖を促すことに加えて、新生血管は既存の血管よりも透過性が高く奇弱な構造をしており、血行性転移を起こしやすいことを報告している<sup>20)</sup>。また、腫瘍内における微小血管密度 (microvessel density: MVD) は、腫瘍血管新生を見る指標の1つとして用いられるが、MVDは腫瘍の浸潤能や転移能と相関し、種々の癌で臨床的予後因子となることが指摘されている<sup>21)</sup>。したがって、ulinastatinによる腫瘍内血管新生の抑制は、腫瘍の原発巣そのものの制御よりも、転移抑制、さらには予後の改善に寄与する可能性が示唆された。

TUNEL assayによる腫瘍内アポトーシスの検討では、PBS群に比べて ulinastatin 群でより多くのアポトーシスが誘導されていた。データでは示されていないが、ulinastatin は *in vitro* の実験において EBC-1 の増殖に影響を与えなかったことから、ulinastatin 群でより多くのアポトーシスが見られたのは、ulinastatin 自体が直接にアポトーシスを誘導したのではなく、血管新生が抑制されることにより腫瘍細胞は虚血にさらされ、その結果としてもたらされたものと推察された。血流の保持は細胞の生存に必須であり、虚血によりアポトーシスが起こることが明らかにされており、脳虚血によるアポトーシスでは caspase ファミリー、bcl ファミリーなどが関与すると報告されている<sup>22)</sup>。また、虚血によって生じるオキシダントが、直接細胞に傷害を与えアポトーシスをもたらしたり<sup>23)</sup>、アポトーシスを誘導する TNF などのセカンドメッセンジャーとして作用すること<sup>24)</sup>なども報告されている。

転移抑制効果について、ヒト肺癌細胞 A549 をマウス尾静脈より注入する肺転移モデルを用いて検討したところ、ulinastatin の投与は A549 による肺転移を有意に抑制するという結果が得られた。このモデルは腫瘍細胞が血管内に侵入したあとの着床と着床後の増殖過程を解析

するものである。転移という現象において血管新生は重要な役割を果たす<sup>25)</sup>。原発巣を離れた癌細胞が着床後に増大するためには栄養供給源となる新生血管が必須であり、Xuらは血管新生抑制剤の検討で、転移巣の減少と転移巣における血管新生程度は相関しているという結果を報告している<sup>26)</sup>。本研究で ulinastatin が転移の抑制効果を示したという実験結果は、実験1および実験2から ulinastatin が転移巣においても血管新生を抑制したことを強く示唆している。Ulinastatin は serine protease inhibitor なので、腫瘍細胞から分泌されるプロテアーゼを抑制する可能性も考えられ、Kobayashiらは UTI が腫瘍細胞の浸潤に対して抑制的に作用すること<sup>7)</sup>、そしてその結果として転移が抑制されること<sup>8)</sup>を報告している。しかし、腫瘍から分泌されるプロテアーゼが最も重要な役割を果たすのは原発巣における基底膜あるいは間質への浸潤の時期であると想定され、転移巣における腫瘍細胞の着床、増大の時期での関与は相対的に小さく<sup>27)</sup>、血管新生の誘導を阻害した可能性はるかに高いと考えられた。

癌に対する外科手術あるいは放射線治療の進歩により、原発巣の制御は飛躍的に向上し、早期の段階の癌の治療成績は満足できるものになりつつある。しかし、進行癌においては十分な原発巣の制御が行われているにもかかわらず、満足すべき治療成績は得られておらず、再発する症例も少なくなく、ほとんどが血行性転移の形を取る。根治治療にもかかわらず血行性転移により再発するのは、原発巣に対する治療時に画像診断などで検出されない微小転移がすでに起こっている可能性を強く示唆している。原発巣の制御技術はほぼ完成されたものになっていると考えられ、癌の治療成績の向上のためには今後、血行性転移、特に微小転移をターゲットにする必要がある。その1つの手段として血管新生阻害は大きな期待が寄せられており、本研究の結果からも原発巣の抑制は見られなくても、転移巣は制御可能なことを示している。また、ヒト卵巣癌患者に UTI を用いた検討では、UTI 投与が有意に予後を延長させたことが報告されている<sup>28)</sup>。本研究で見られたように ulinastatin は副作用が見られず安全に使用することができ、効率よく血管新生を抑制することができるので、原発巣に対する根治的な治療の後に、このような薬剤を併用することで転移巣を抑制することにより良好な予後が期待される。

## 結 語

本研究において、ulinastatin は腫瘍周囲および腫瘍内血管新生の抑制に有効であることを初めて報告し、転移抑制にも効果があることが確認できた。Ulinastatin は、

既に臨床的に使用されている薬剤であり、従来の抗癌剤と比べ、重大な副作用を伴うことが少ない。このような点もふまえ、ulinastatinは、血管新生抑制作用を持った抗癌剤として今後が期待される薬剤であると考えられる。

謝 辞 稿を終えるにあたり、ご指導ならびに御高閲を賜りました獨協医科大学胸部外科学教室 三好新一郎教授に甚大なる謝意を表するとともに、本研究の場を提供していただき、直接御指導いただいた大阪大学大学院医学研究科保健学専攻分子病理学教室 松浦成昭教授に深謝いたします。

## 文 献

- 1) Aiello LP, Avery RL, Arrigg PG, et al : Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *N. Engl. J. Med.*, **331** : 1480-1487, 1994.
- 2) Paleolog EM and Miotla JM : Angiogenesis in arthritis : role in disease pathogenesis and as a potential therapeutic target. *Angiogenesis*, **2** : 295-307, 1998.
- 3) O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, et al : Angiostatin : a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell*, **72** : 315-328, 1994.
- 4) O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, et al : Endostatin : an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell*, **88** : 277-285, 1997.
- 5) Yoon WH, Jung YJ, Kim TD, et al : Gabexate mesilate inhibits colon cancer growth, invasion, and metastasis by reducing matrix metalloproteinases and angiogenesis. *Clin. Cancer Res.*, **10** : 4517-4526, 2004.
- 6) O'Reilly MS, Shepherd SP, Lane WS, et al : Antiangiogenic Activity of the Cleaved Conformation of the Serpin Antithrombin. *Science*, **285** : 1926-1928, 1999.
- 7) Kobayashi H, Shinohara H, Takeuchi K, et al : Inhibition of the Soluble and the Tumor Cell Receptor-bound Plasmin by Urinary Trypsin Inhibitor and Subsequent Effects on Tumor Cell Invasion and Metastasis. *Cancer Res.*, **54** : 844-849, 1994.
- 8) Kobayashi H, Shinohara H, Fujie M, et al : Inhibition of metastasis of Lewis lung carcinoma by urinary trypsin inhibitor in experimental and spontaneous metastasis models. *Int. J. Cancer*, **63** : 455-462, 1995.
- 9) Oikawa T, Sasaki M, Inose M, et al : Effect of cytogenin, a novel microbial product, on embryonic and tumor cell-induced angiogenic responses in vivo. *Anticancer Res.*, **17** : 1881-1886, 1997.
- 10) Zhou Z, Christofidou-Solomidou M, Garlanda C, et al : Antibody against murine PECAM-1 inhibits tumor angiogenesis in mice. *Angiogenesis*, **3** : 181-188, 1999.
- 11) Yano S, Nokihara H, Yamamoto A, et al : Multifunctional interleukin-1 $\beta$  promotes metastasis of human lung cancer cells in SCID mice via enhanced expression of adhesion-, invasion- and angiogenesis-related molecules. *Cancer Sci.*, **94** : 244-252, 2003.
- 12) Folkman J : Tumor angiogenesis : therapeutic implications. *N. Engl. J. Med.*, **285** : 1182-1186, 1971.
- 13) Gutheil JC, Campbell TN, Pierce PR, et al : Targeted Antiangiogenic Therapy for Cancer Using Vitaxin : A Humanized Monoclonal Antibody to the Integrin  $\alpha_v\beta_3$ . *Clin. Cancer Res.*, **6** : 3056-3061, 2000.
- 14) Hurwitz H : Integrating the Anti-VEGF- A Humanized Monoclonal Antibody Bevacizumab with Chemotherapy in Advanced Colorectal Cancer. *Clin. Colorectal Cancer*, **4** : 62-68, 2004.
- 15) Connolly DT, Heuvelman DM, Nelson R, et al : Tumor Vascular Permeability Factor Stimulates Endothelial Cell Growth and Angiogenesis. *J. Clin. Invest.*, **84** : 1470-1478, 1989.
- 16) Trikha M, Zhou Z, Timar J, et al : Multiple Roles for Platelet GP II b/III a and  $\alpha_v\beta_3$  Integrins in Tumor Growth, Angiogenesis, and Metastasis. *Cancer Res.*, **62** : 2824-2833, 2002.
- 17) Lakka SS, Gondi CS, Yanamandra N, et al : Inhibition of cathepsin B and MMP-9 gene expression in glioblastoma cell line via RNA interference reduces tumor cell invasion, tumor growth and angiogenesis. *Oncogene*, **23** : 4681-4689, 2004.
- 18) Mazar AP, Henkin J and Goldfarb RH : The urokinase plasminogen activator system in cancer : Implications for tumor angiogenesis and metastasis. *Angiogenesis*, **3** : 15-32, 1999.
- 19) Larsson H, Sjöblom T, Dixelius J, et al : Antiangiogenic Effects of Latent Antithrombin through Perturbed Cell-Matrix Interactions and Apoptosis of Endothelial Cells. *Cancer Res.*, **60** : 6723-6729, 2000.
- 20) Zetter BR : Angiogenesis and tumor metastasis. *Annu. Rev. Med.*, **49** : 407-424, 1998.
- 21) Yoshino S, Kato M and Okada K : Evaluation of the prognostic significance of microvessel count and tumor



- size in renal cell carcinoma. *Int. J. Urol.*, **5** : 119-123, 1998.
- 22) Pettmann B and Henderson CE : Neuronal cell death. *Neuron*, **20** : 633-647, 1998.
- 23) Gardner AM, Xu FH, Fady C, et al : Apoptotic vs. non-apoptotic cytotoxicity induced by hydrogen peroxide. *Free Radic. Biol. Med.*, **22** : 73-83, 1997
- 24) Albrecht H, Tschopp J and Jongeneel CV : Bcl-2 protects from oxidative damage and apoptotic cell death without interfering with activation of NF- $\kappa$ B by TNF. *FEBS Lett.*, **351** : 45-48, 1994.
- 25) Fidler IJ and Ellis LM : The implications of angiogenesis for the biology and therapy of cancer metastasis. *Cell*, **79** : 185-188, 1994.
- 26) Xu Y, Liu YJ and Yu Q : Angiopoietin-3 Inhibits Pulmonary Metastasis by Inhibiting Tumor Angiogenesis. *Cancer Res.*, **64** : 6119-6126, 2004.
- 27) Xuan JW, Tuck AB, Wilson SM, et al : MMP-2 expression is associated with, but not sufficient for, malignant conversion of murine LTA cells. *Anticancer Res.*, **18** : 743-749, 1998.
- 28) Kobayashi H, Suzuku M, Hirashima Y, et al : The Protease Inhibitor Bikunin, a Novel Anti-Metastatic Agent. *Biol. Chem.*, **384** : 749-754, 2003.

## Inhibitory Effects of Ulinastatin on Tumor Cell Induced Angiogenesis

Naoko Yoshii

*Department of Cardiothoracic Surgery, Dokkyo University school of Medicine, Tochigi, Japan*

We investigated effects of ulinastatin, one of serine protease inhibitors, on tumor cell induced angiogenesis and lung metastasis. Methods : 1) Lung cancer cell line, A549 or EBC -1, was injected into a chamber, which was implanted in the dorsum of mice. The mice were divided into 2 groups in each tumor cell line, based on 7-day administration of ulinastatin, with (U group) or without it (C group). The chamber with surrounding subcutaneous tissues was extirpated and newly induced blood vessels were observed with a microscope. The image was taken into a computer and the total length of blood vessels (TLBV) was measured. 2) EBC-1 was implanted in the dorsum of mice subcutaneously, in which PBS (P group) or ulinastatin (U group) was injected from day 8 to day 14. The grown tumors were extirpated on day 15 and the specimens were stained with CD31 or TUNEL assay. 3) A549 was injected into a tail vein of the mice, which were divided into 2

groups based on 14-day administration of PBS (P group) or ulinastatin (U group). On the day 29, the lung was extirpated and area of lung metastasis stained with CEA was measured. Results : 1) Each tumor cell line induced TLBV was significantly shorter in U group than C group. 2) Number of CD31 stained blood vessels in tumor was significantly smaller in U group than P group. Number of apoptotic tumor cells stained with TUNEL assay was significantly larger in U group than P group. 3) The area of lung metastasis was significantly smaller in U group than P group. Conclusion : Ulinastatin inhibited tumor cell induced angiogenesis. It is suggested that this inhibitory effect on angiogenesis led to tumor cell deaths and decrease in lung metastasis.

**Key Words** : Ulinastatin, Angiogenesis inhibitor, Metastasis, Angiogenesis, Apoptosis