

銅キレート剤トリエンチンの抗血管新生作用と 肝癌発育および肝発癌抑制効果の検討

奈良県立医科大学第3内科学教室

吉井純一

THE INHIBITORY EFFECT OF COPPER-CHELATOR, TRIENTINE, ON LIVER TUMOR GROWTH AND ON HEPATOCARCINOGENESIS BY ANGIOGENESIS SUPPRESSION

JUNICHI YOSHII

Third Department of Internal Medicine, Nara Medical University

Received August 13, 2004

Abstract : Angiogenesis is now recognized to play a pivotal role in tumor development, and even in the process of carcinogenesis. Trientine dihydrochloride (trientine) is used in clinical practice as a copper (Cu)-chelating agent. In this study, we elucidate that the effect of trientine on tumor development and carcinogenesis is due to the suppression of angiogenesis in the murine hepatocellular carcinoma cell (HCC) xenograft model and in the rat hepatocarcinogenesis model, respectively. Trientine suppressed the tumor development associated with suppression of intra-tumoral angiogenesis. Trientine treatment also resulted in a marked increase of apoptosis in the tumor, although tumor cell proliferation itself was not altered. In vitro studies also showed that trientine is not cytotoxic for the tumor cells, but it significantly suppressed the endothelial cell proliferation. In a diethylnitrosamine (DEN)-induced rat hepatocarcinogenesis model, trientine treatment significantly suppressed glutathione S-transferase placental form (GST-P)-positive preneoplastic lesions. Trientine also markedly suppressed neovascularization in the liver to a similar level as that of development of preneoplastic lesions. On the contrary, the intrahepatic cell proliferation was not altered with or without trientine treatment. These results suggested that Cu plays a pivotal role in HCC tumor development and carcinogenesis via angiogenesis suppression. Since trientine is already used in clinical practice without any serious side effects, it may be an effective new strategy for future HCC therapy.

Key words : copper, trientine, angiogenesis, hepatocellular carcinoma

緒 言

肝細胞癌(肝癌)の年間発生数は世界中で約500,000人と推定されており, 現在もその総発生数は増加し続けている^{1,2)}. 我が国においても毎年約27,000人が肝癌のために死亡しており, 男性の癌による死亡者数の第3位, 女

性の第4位を占めている³⁾. 肝切除手技の向上, エコー下局所療法などの局所療法や動注化学療法の進歩, さらに肝移植の導入など, 治療面での様々な工夫によりその生命予後は改善しつつあるものの, 多中心性発癌例や再発例が多く, これらのコントロールが困難であるという現実に対し, 新しい観点からの治療法の開発が望まれて

いる²⁾。

ところで、現在化学療法に用いられている抗癌剤は癌細胞のみならず正常細胞にも殺細胞作用を示し、骨髄抑制などの重篤な副作用を引き起こすため、長期間にわたる連続した使用には大きな制約がある。特に肝癌の場合、肝硬変を合併して肝予備能の低下を伴うことが多く、安全性の確立された長期投与可能な薬物の開発が強く望まれる。

近年、新しいコンセプトの癌治療法として抗血管新生療法が注目されている⁴⁻⁶⁾。血管新生阻害剤は従来の抗癌剤とは作用機序が異なり、癌細胞に対する「兵糧攻め」を基本コンセプトとしている。血管から酸素が拡散によって供給され得る距離はただか 200 から 250 μ m であり、これより離れた腫瘍細胞は新生血管の誘導がなければ壊死するとされる⁷⁾。即ち、腫瘍細胞の生存、増殖には血管新生が必須であり、血管新生がなければ腫瘍はわずか数 mm でも成長することができず、休眠状態(tumor dormancy)に陥ると考えられている。実験的にも、アンジオスタチンなどの内因性血管新生阻害因子を投与することにより、腫瘍が休眠状態に留まりそれ以上には成長しないことが報告されている⁴⁾。

一般に腫瘍の発育過程では新生血管の増加を伴うことが広く知られている。肝動脈からの栄養血管に富む hyper-vascular tumor であることが肝癌の生物学的特徴の1つにあげられており⁸⁾、代表的な治療法の1つである肝動脈塞栓術(TAE)もこの性質を利用したものである。また、TAEを繰り返す毎に新たな供血路が形成され、腫瘍が次々と新しい血管によって栄養されるようになる症例も少なからず経験する。ヒト肝癌組織標本の検討においても、癌部では非癌部に比べ様々な血管新生因子が高発現していることや腫瘍内で微小血管密度が増加していることが報告されており、血管新生が肝癌の病態形成に重要な役割を果たしていることが強く示唆されている⁹⁾。

従来の抗癌剤は遺伝的に極めて不安定な癌細胞を標的とするため、薬物耐性が生じ易く、数度の治療後に効果が著しく減弱することをしばしば経験する。これに対し、抗血管新生療法は遺伝的に安定な血管内皮細胞(EC)をターゲットとしているために、薬物耐性などは極めて生じにくいとされている¹⁰⁻¹¹⁾。さらに癌細胞は深部に存在するのに対して、内皮細胞は薬物が最初に到達する部分であり、有効投与量も少なく済み、抗癌剤の大量投与時に認められる副作用も極めて生じにくい¹⁰⁻¹¹⁾。さらに、動物実験において、通常の抗癌剤では数度の治療で耐性が生ずるのに対し、血管新生阻害薬では耐性は出現しな

いこと、さらに治療を重ねた後に、薬物投与を中止しても腫瘍発育が起こらないことが報告されている⁴⁾。このように、血管新生をターゲットとする癌治療はこれまでの既存の癌治療とは異なったコンセプトに基づく新しい治療法として世界中で精力的な研究が行われている^{7,10,12-13)}。現在、アメリカを中心に数十種類の血管新生阻害薬に対する臨床試験が行われているが、現時点で認可されているものはなく一般臨床医が使用できるまでにはしばらくの時間がかかるものと考えられる。

ところで銅は生体機能の維持に欠くことのできない微量元素であり、多くの生理学的あるいは病的な現象において重要な役割を果たすことが知られている¹⁴⁾。近年の研究より、血管新生においても必須の物質であることが示唆されている¹⁵⁻¹⁹⁾。銅はin vitroにおいてECの増殖刺激作用を有すると共に、vascular endothelial growth factor (VEGF)やbasic fibroblast growth factor (bFGF)などの種々の血管新生因子の活性化に必須の補因子であることが報告されている²⁰⁻²²⁾。また動物実験モデルにおいて、食餌中の銅を欠乏させることにより腫瘍の発育が抑制されることも認められている。さらに、様々な種類のヒト悪性腫瘍において、血清中あるいは腫瘍内の銅濃度の上昇が認められている。肝癌についても、癌部では非癌部に比し過剰な銅の蓄積が認められたとの報告がなされている²³⁻²⁶⁾。

ところで、肝癌は多くの場合肝硬変などの慢性肝疾患をその発生源としており、高危険度群が他の癌に比べて明らかであるためchemopreventionの必要性が大きいと考えられているが、現在臨床的に肝発癌抑制作用が認められているものはインターフェロンの長期投与などに限られている²⁷⁾。chemopreventive agentはその性格上、長期間の投与が必要であり安全性の確立された経口剤の開発が望まれている。さらに血管新生は癌の成長・発育に必須であるのみならず、より早期の発癌過程においても重要な役割を果たしていることが最近の研究より明らかにされつつある²⁸⁻³⁰⁾。従って抗血管新生薬は肝癌の発育のみならず肝発癌そのものを抑制し、有効なchemopreventive agentとなり得る可能性があると考えられる。

そこで本研究において著者は、血管新生阻害に基づく将来の肝癌治療の可能性を念頭に置き、臨床ですでに認可され広く使用されている銅キレート剤の実験的肝癌発育および肝発癌に及ぼす影響につき血管新生の関与を中心に検討した。

方 法

(A) マウス皮下肝癌モデル

(1) 動物, 薬剤, 細胞

5週齢雌BALB/cマウスを日本エスエルシー(浜松)から購入した。銅キレート剤としてペニシラミンとトリエンチンを用いた。ペニシラミンはSigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)より購入し、トリエンチンはツムラ(東京)より提供を受けた。マウス肝癌細胞として、同系マウスに移植可能なBNL, 1ME A. 7R. A HCC cells (BNL-HCC: 理研ジーンバンク, 東京)を今回の実験に使用した³¹⁾。またヒト臍帯血管内皮細胞(HUVEC)は大日本製薬(大阪)より入手した。

(2) 皮下肝癌モデルの作製

175cm²のフラスコにBNL-HCC細胞を撒き、10%FCS, 100 units/mlのペニシリンおよび100μg/mlのストレプトマイシンを含むDMEM培養液に、37℃, 5%CO₂の条件下で培養した。培養した細胞を1×10⁶ cells/mlの細胞濃度に調整したのち、100μlを同系のBALB/cマウスの背部皮下に接種してマウス皮下肝癌モデルを作製した。腫瘍は週に2回ノギスを用いて測定し、腫瘍容積を経時的に測定した。なお、腫瘍容積はCarlsson et al.³²⁾の方法にしたがい、次のように算定した。腫瘍容積(mm³) = 腫瘍長径(mm) × 腫瘍短径(mm)² ÷ 2。

(3) 銅キレート剤の抗腫瘍効果の検討

6週間にわたり食餌中の銅を欠乏させることにより充分な銅欠乏状態を達成できることが報告されているので³³⁾、半数のマウスには前処置として実験開始6週前から銅欠乏食を与え、銅欠乏食実験群とした。腫瘍接種後3日目に、マウスを無作為に各群8匹ずつに分け実験をおこなった。銅欠乏食投与群と通常の飼料を与えた群それぞれにおいて、ペニシラミンおよびトリエンチンを3,000 ppmの用量で飲料水に混じて投与し、腫瘍発育に及ぼす影響について検討した。またトリエンチンについては3,000 ppmに加えて1,500 ppm, 750 ppmの異なる用量の実験群を作製し、実際の臨床濃度に匹敵する低用量投与の影響を検討した。

(4) トリエンチンの血管新生に及ぼす影響の検討

トリエンチンの腫瘍内における血管新生抑制作用を検討するために、各群の皮下腫瘍より凍結切片を作成して新生血管のマーカーとして広く知られているplatelet/EC adhesion molecule (PECAM: CD31)の免疫染色をおこなった。免疫染色は、まず切片に1次抗体(Pharmingen, San Diego, CA; 1:100 dilution)を37℃で60分間反応させた後、2次抗体(anti-rat IgG)(Novocastra; Vector Laboratories, Burlingame, CA)を37℃で30分間反応させ、アビジン-ビオチン標識酵素複合体(ABC)を

加え37℃で30分間反応させた。さらに洗浄後、内因性ペルオキシダーゼ不活化をおこなうために、蒸留水2mlに30%H₂O₂ 1mlと70%メタノール7mlを加えた溶液を作成して標本に加え、10分間反応させた。その後ペルオキシダーゼ基質溶液(3,3'-Diaminobenzidine : DAB)を反応させることにより組織切片上の抗体の存在を検討した。最後に洗浄し、ヘマトキシリン-マイヤーにて対比染色をおこなった後、脱水処理をおこなった。さらに、微細新生血管の面積を半定量するために、画像解析システムを用いた。まず、200倍視野で代表像を5箇所選んでポジフィルムを用いて写真撮影し、イメージアナライザーを用いてデジタル化し、NIH image softwareを用いて新生血管の総面積を測定した。皮下腫瘍内のアポトーシスはTUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick labeling)にて、腫瘍細胞の増殖はPCNA (proliferative cell nuclear antigen)にて評価し、パラフィン包埋切片倍率400倍で任意の30視野における各々の陽性細胞数を数えた。

(5) トリエンチンの肝癌細胞および内皮細胞増殖に及ぼす効果

トリエンチンの肝癌細胞(BNL-HCC)およびECの増殖に対する抑制効果を検討するために、MTT (tetrazolium, 3-(4,5-diethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay法を用いて、in vitroにおける細胞増殖能を観察した。48穴培養皿に5×10³ cells BNL-HCCまたはECを撒き、トリエンチンを1.0μg/mlの濃度で添加し、10%FCS, 100units/mlのペニシリンおよび100μg/mlのストレプトマイシンを含むDMEM培養液を用い、37℃, 5%CO₂の条件下で24時間, 48時間, 72時間, 96時間培養した後にMTTを0.5 mg/mlの濃度で添加し、さらに2~3時間培養した後に培養液を取り除き、1mlのジメチルスルホキシドを加え浸透させた後に吸光度を測定した。吸光度はマイクロプレートリーダーを用いて540 nmフィルターで測定した。

(B) ラット化学肝発癌モデル

(1) 化学肝発癌モデルの作製

化学発癌モデルとしてSolt&Farberのラット肝発癌モデルを用いて検討した。6週齢雄Fisher 344ラット及びジエチルニトロサミン(DEN)を日本エスエルシー、半井化学(京都)からそれぞれ購入した。200 mg/kgのDENをラットに腹腔内投与し、3週後に部分肝切除を施行した。部分肝切除時から6週間トリエンチン750ppmを飲料水に混じて投与し、実験開始9週後に全てのラットを犠牲させた。陽性対照群として、実験的に肝発癌抑制作用を有することが知られている小柴胡湯(TJ-9)を1%の

濃度で粉餌に混じて投与した群を作製した³⁴⁾.

(2) トリエンチンの肝前癌病変に及ぼす影響

犠死させたラットから直ちに肝臓を摘出、厚さ 5 mm で切り出し氷冷したアセトンで固定してパラフィンで包埋した後に連続切片を作成、組織学的な検討を行った。前癌病変として Glutathione S-transferase placental form(GST-P) 陽性病変につき検討した。抗 GST-P 抗体は医学生物学研究所(名古屋)より購入し、先に述べたマウス肝癌モデルと同様の方法で免疫組織染色を行った。GST-P 陽性病変の数および面積は画像解析システムを用い血管新生解析と同様の方法にて半定量した。また肝発癌過程におけるトリエンチンの細胞増殖に及ぼす影響を検討するために、本モデルにおいても先に述べた方法と同様に PCNA 陽性細胞数を測定した。

(3) トリエンチンの肝内銅濃度、血液生化学検査に及ぼす影響

摘出した肝臓のうち、組織学的検討に用いた残りの部分は液体窒素で凍結した後に粉碎し、-80℃で保存した。肝内銅濃度は、coupled plasma emission spectroscopy (Plasma Spec, Leeman Laboratories Inc., Lowell, MA) を用いた原子吸光法を用いて測定した³⁵⁾。また、ラットを犠死させる際に腹部大動脈から採血して得た血清を用いて ALT (GPT) などの血液生化学検査を行った。

(4) トリエンチンの肝発癌過程における血管新生に及ぼす影響

す影響

肝発癌過程における血管新生に及ぼすトリエンチンの投与の影響について CD31 遺伝子特異的プライマーを用いた real-time PCR 法にて検討を行った。各群 5 匹の全肝より mRNA を抽出した後に ABI Prism 7,700 Sequence Detection System (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を用い、GAPDH を内因性コントロールとして定量した³⁶⁾。なお genomic DNA の混入による影響を避けるため抽出した RNA は DNAase 処理を行い、PCR にて生成曲線が得られないことを確認した。

(C) 統計学的処理

統計学的有意差を Tukey の多変量検定を用いて解析し、p<0.05 を有意差ありとした。

結 果

(A) マウス皮下肝癌モデル

(1) 腫瘍発育に対する銅キレート剤の効果

マウス皮下肝癌腫瘍接種後 3 日目よりペニシラミンおよびトリエンチンを 3,000 ppm の用量で飲料水に混じて投与し、腫瘍発育に及ぼす影響について検討した。Fig. 1A および Fig. 1B に示すように、ペニシラミンとトリエンチンは両者共に対照群に比し有意に腫瘍発育を抑制した。ペニシラミンとトリエンチンの効果を比較すると、トリエンチンは銅欠乏食投与の有無に関わらず、ほぼ完

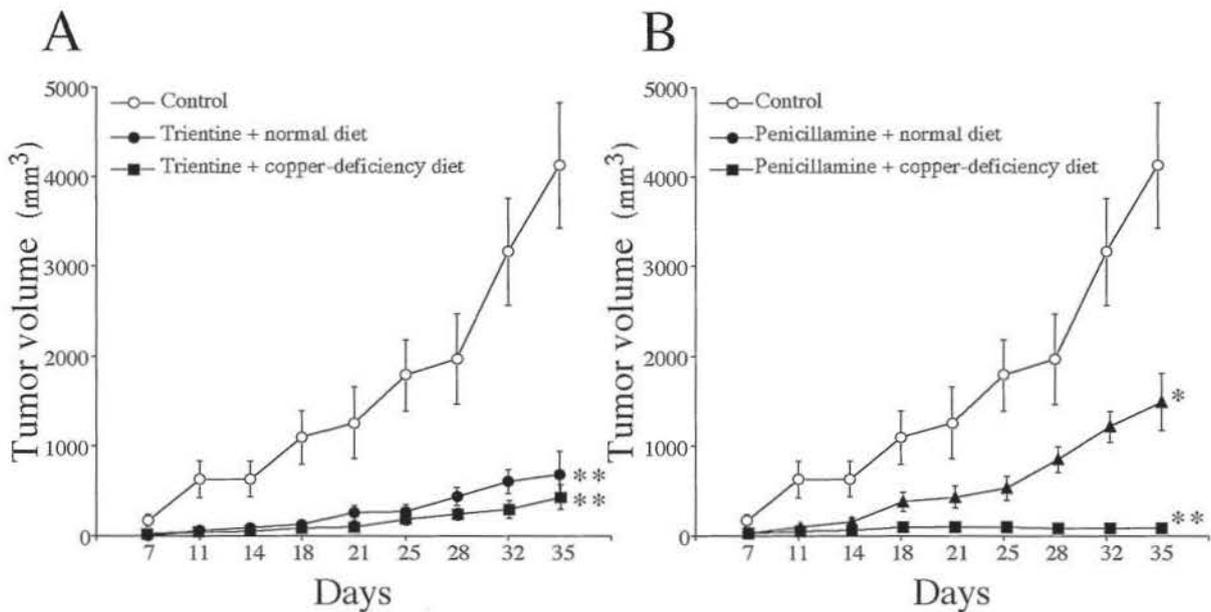


Fig. 1. The effect of Copper(Cu)-chelators; penicillamine and trientine on BNL-HCC tumor development. Penicillamine and trientine were administered at a dose of 3,000 ppm in the drinking water at three days after tumor implantation with or without Cu-deficient diet. The tumor volume was determined by calipers at the indicated time points. Each point represents the mean ± SD(n=8). * p<0.05, ** p<0.01 compared with the control group.

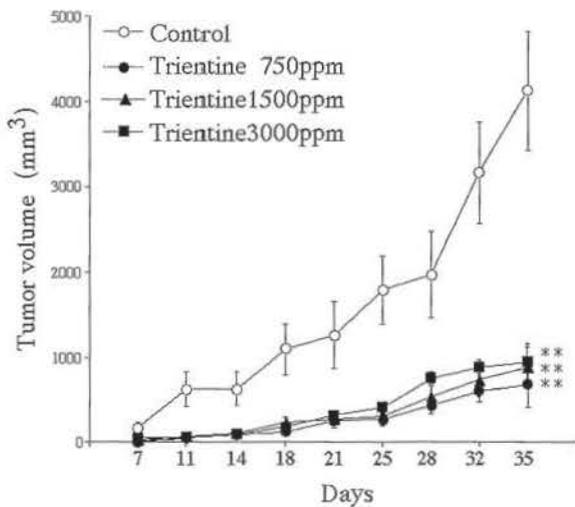


Fig. 2. The dose-ranging study of trientine on tumor development. Trientine was administered at dose of 3,000, 1,500, and 750 ppm in the drinking water at three days after tumor implantation. The tumor volume was determined by calipers at the indicated time points. Each point represents the mean \pm SD (n=8). * $p < 0.01$ compared with the control group.

全に腫瘍の発育を抑制したのに対して (Fig. 1A), ペニシラミンは銅欠乏食とともに投与することにより, 初めてトリエンチン単独投与と同等の強さで腫瘍発育を抑制した (Fig. 1B). 従って以下の実験についてはトリエンチンを中心に検討を行った.

次にトリエンチンが低用量においても腫瘍抑制効果を有するかどうかを検討するために同様のマウスに 3,000, 1,500, 750ppm の用量で投与して観察した. その結果, 750ppm の低用量でも 3,000ppm 投与群とほぼ同様に強い腫瘍抑制効果を示した (Fig. 2). なお全てのトリエンチン投与群において対照群に比し体重減少などの副作用は認められなかった.

(2) トリエンチンの腫瘍内血管新生に及ぼす影響

トリエンチンの腫瘍発育抑制効果が腫瘍血管新生の抑制を伴うか否かにつき腫瘍内の CD31 免疫組織染色を加えて検討した. その結果, CD31 陽性新生血管の発現は, 対照群 (Fig. 3A) に比しトリエンチン投与群 (Fig. 3B) で著明に抑制されていた. さらに NIH image を用いて CD31 陽性新生血管を半定量したところ, トリエンチン投与群の腫瘍内血管新生は, 対照群に比し, 1/4 以下に抑制されていた (Fig. 4A).

次にトリエンチンの抗腫瘍効果のメカニズムを検討するために, 腫瘍内の細胞増殖, アポトーシスについて

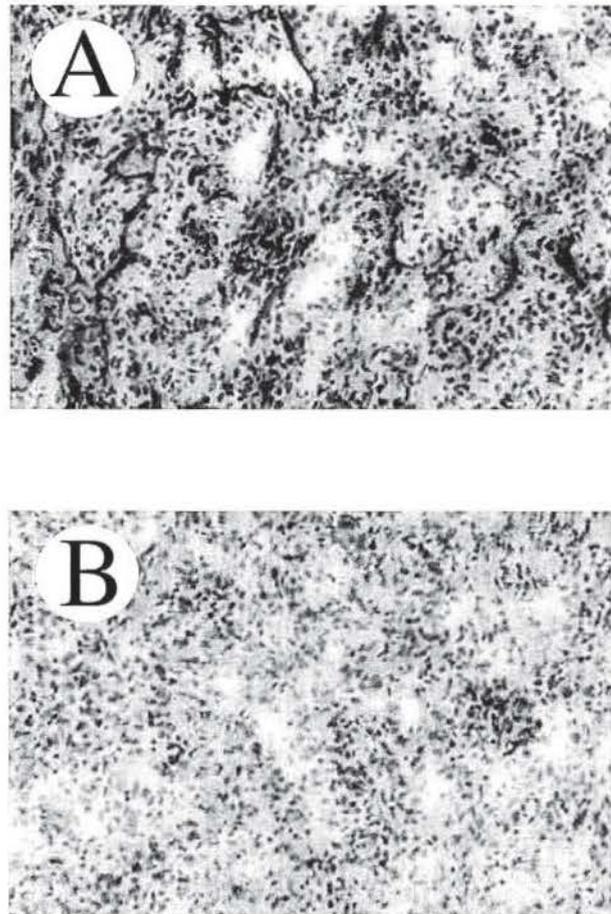


Fig. 3. Effect of trientine on the platelet/EC adhesion molecule (PECAM/CD31) expression in BNL-HCC tumors. Untreated BNL-HCC tumors (A) and tumors from animals receiving 750 ppm trientine (B) are shown. Tumor vascularization visualized by immunostaining of CD31 vascular endothelial adhesion protein. CD31-positive vessels significantly decreased by trientine (original magnification, $\times 200$).

PCNA, TUNEL 免疫染色を用いて検討したところ, PCNA 陽性細胞数はトリエンチン投与群と対照群との間に差異を認めなかったが, TUNEL 陽性細胞数は, トリエンチン投与群で有意に増加していた (Fig. 4B, 4C).

(3) トリエンチンの HCC および EC 増殖に対する影響

トリエンチンの腫瘍抑制効果が腫瘍細胞や EC に対する細胞毒性によるものか否かを検討するために, BNL-HCC および EC の増殖に及ぼすトリエンチンの添加の影響を経時的に検討した. その結果, in vivo での成績に一致してトリエンチンは BNL-HCC の in vitro での増殖には何ら影響を与えず, トリエンチンの抗腫瘍作用

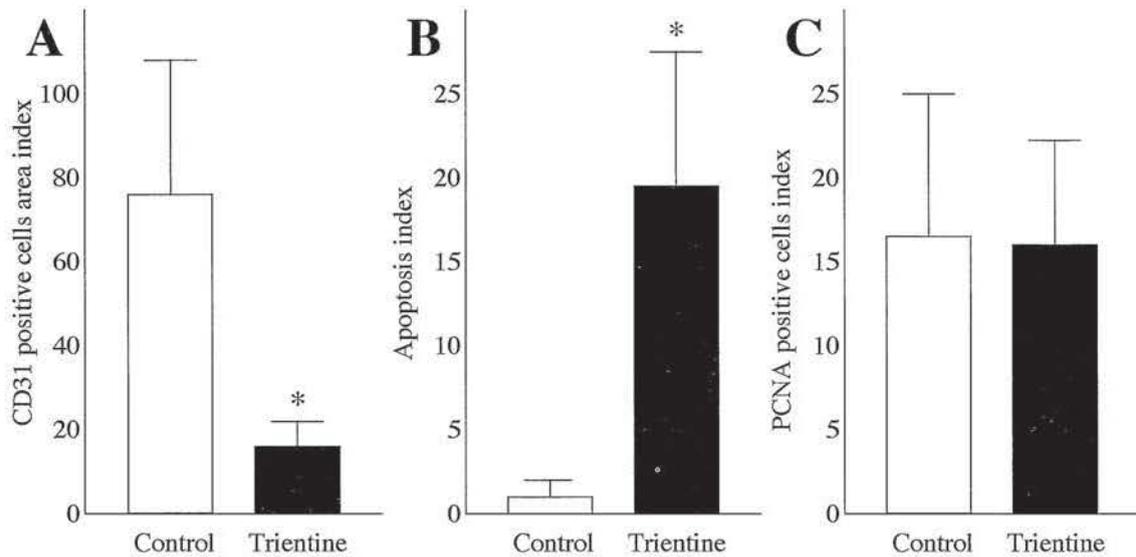


Fig. 4. Effect of trientine on CD31-positive cell area index(A), apoptosis index (B) and PCNA-positive cells index(C) in animals with BNL-HCC tumors, respectively. For each of the tumors. * $p < 0.01$ compared with the control group.

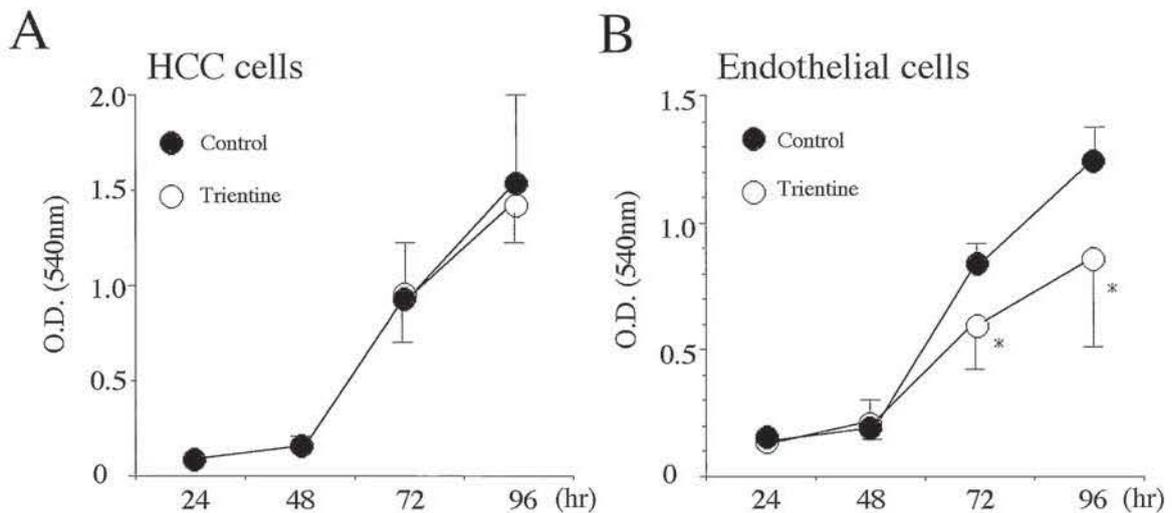


Fig. 5. Effect of trientine on the in vitro proliferation of HCC tumor cells(A) and endothelial cells (B). Cell proliferation was measured by MTT assay at 24, 48, 72 and 96hr. Trientine was added to the medium at $1.0 \mu\text{g/ml}$. Each point represents the mean \pm SD ($n=6$). * $p < 0.01$ compared with the control group.

が腫瘍細胞に対する直接的毒性によるものではないことが示唆された (Fig. 5A). 一方, トリエンチンはBNL-HCCの増殖には全く影響を与えない濃度においてECの増殖を有意に抑制していた (Fig. 5B). これらの結果は, トリエンチンの抗血管新生作用は主にECの増殖を抑制することによるものであることを示唆している.

(B) ラット化学肝発癌モデル

(1) 肝前癌病変発生に対するトリエンチンの効果

すべてのラットが実験終了時まで生存し, すべての実験群間でラットの体重に差異は認められなかった. Fig. 6にGST-P陽性前癌病変の典型的な免疫染色像を示した. トリエンチン投与群ではコントロール群に比べてGST-P陽性前癌病変数の有意の減少, 病変サイズの有意の縮小を認めた. 3,000ppm, 750ppmの異なるトリエ

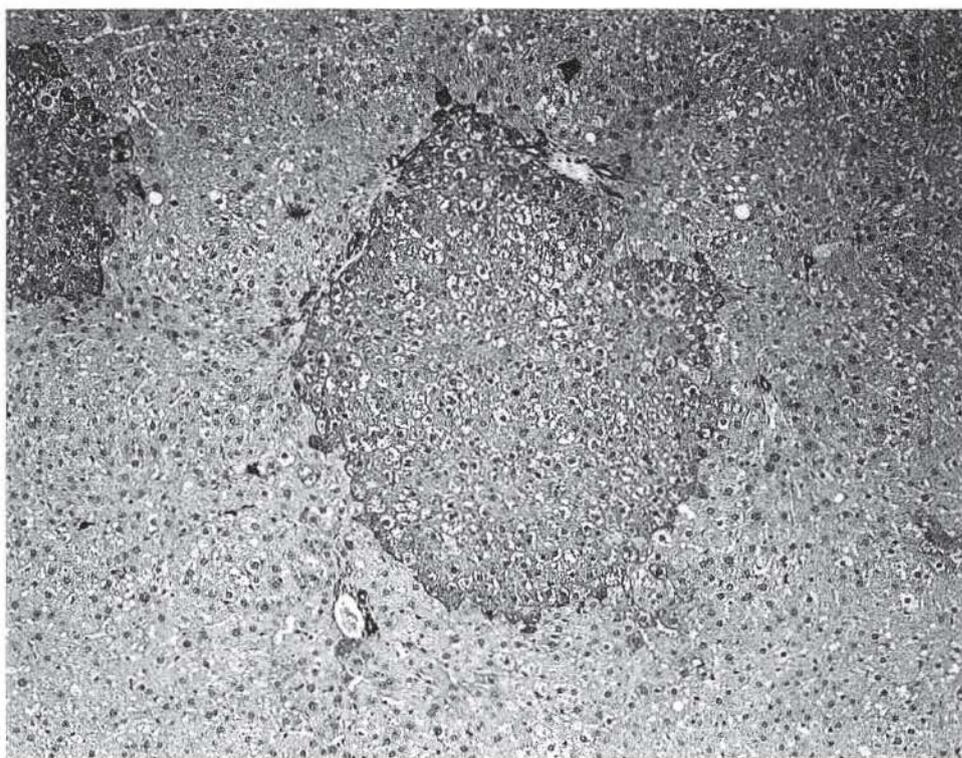


Fig. 6. Representative photomicrographs of a GST-P-positive preneoplastic lesion in the liver. No histological changes indicating liver injury or liver fibrosis were observed except for the development of GST-P-positive preneoplastic lesions. Magnification $\times 100$.

Table 1. Effect of trientine on the development of GST-P-positive lesions and Cu content in the liver

	GST-P positive lesions		Cu(μ g/ liver weight)
	No. (/cm ²)	Size (mm ² /10 ²)	
DEN	31.36 \pm 4.16	5.53 \pm 0.53	86 \pm 6.8
DEN + Tri (750)	22.40 \pm 3.20*	2.93 \pm 0.80**	42 \pm 4.8**
DEN + Tri (3000)	21.12 \pm 3.84*	2.67 \pm 0.47**	39 \pm 5.1**
DEN + TJ-9	15.36 \pm 4.80**	2.87 \pm 1.00**	82 \pm 6.6
PBS	N.D.	N.D.	85 \pm 6.9

* : p<0.05 vs. DEN treatment group. ** : p<0.01 vs. DEN treatment group.

Table 1. Effect of trientine on CD31 mRNA and PCNA-positive cells in the DEN-treated liver

	CD31 mRNA expression (/ GAPDH)	PCNA positive cells (%)
DEN	2.52 ± 0.42	4.41 ± 1.24
DEN + Tri (750)	1.58 ± 0.26 **	4.35 ± 1.18
DEN + Tri (3000)	1.55 ± 0.23 **	4.47 ± 1.18

** : p<0.01 vs. DEN treatment group.

ンチンの用量間で抑制効果に差は認められなかった。陽性対照群として設定したTJ-9についてもこれまでの報告と同様に有意な抑制効果を認めた (Table 1)。肝内銅濃度はトリエンチン投与群で対照群に比し有意に減少していた。なお、GST-P 陽性病変数の抑制の程度と肝内の銅濃度はほぼ平行して推移していた。

(2) 肝発癌過程における血管新生と細胞増殖に対するトリエンチンの効果

トリエンチンの GST-P 陽性前癌病変抑制効果と血管新生阻害作用の関連について、肝内 CD31 mRNA 発現を検討した。Table 2 に示すように、トリエンチン投与群では対照群に比し CD31 mRNA 発現は著明に抑制されていた。上述した肝内銅濃度と同様にトリエンチンによる CD31 発現抑制は GST-P 陽性前癌病変抑制とほぼ平行して推移していた。一方、PCNA 陽性細胞の発現は、トリエンチン投与によって影響を受けなかった (Table 2)。これらの結果より、トリエンチンは変異肝細胞の増殖を抑制するのではなく、肝内の銅濃度低下に基づく血管新生阻害が前癌病変発生の抑制に重要な役割を果たしているものと示唆された。

考 察

血管新生が腫瘍発育において重要な役割を担っていることは周知の事実であり^{12-13, 37-39)}、実験動物では腫瘍血管の抑制から腫瘍発育の阻止につながる事が報告されている¹⁰⁻¹¹⁾。抗血管新生治療薬は従来の化学療法薬のような副作用が少なく、薬物耐性を生じにくいという特徴を持つとされており、抗血管新生組み換え蛋白、モノクロー

ナル抗体を含む多種類の薬物の開発が世界中で精力的に行われている。これらのうちの一部は、現在特定の施設で臨床治験が行われており、その有効性がいくつかの種類で確認されつつある。しかし、これら抗血管新生薬は作用機序の特性上、長期間の投与が必要であるため、ヒト毒性判定には通常の薬物よりも時間がかかる。さらに、抗血管新生薬は腫瘍を休眠状態に保つといういわゆる cytostatic な薬物であり、これまでの抗癌剤のような cytotoxic な薬物の効果判定基準をそのままでは用いにくく、現時点では統一された基準がないのが現状である。これらの理由から現在広く臨床応用されている抗血管新生薬はなく、また一般臨床医が使用できる薬物が登場するまでにはしばらく時間がかかるものと予想される。その一方で、すでに臨床で使用されている薬物の中で抗血管新生作用を有するものを探索する研究も行われており、抗潰瘍薬のイルソグラジンや高脂血症剤のプラバスタチンが血管新生阻害作用を持ち、実験的腫瘍発育を抑制するという報告などがなされている⁴⁰⁻⁴¹⁾。しかしこれら薬物の投与量はヒトに換算した場合、実際の臨床用量よりもはるかに多いものであり、そのまま安全に投与できるかどうかについては不明である。

近年の研究により、生体に必須の微量元素である銅の血管新生促進作用が注目されてきている¹⁵⁻¹⁹⁾。一方で、慢性関節リウマチやウィルソン病に対する治療薬として銅キレート剤が用いられている。ペニシラミンはその代表的薬物であるが、本剤投与時には骨髄抑制や自己免疫疾患のような重篤な副作用がしばしば認められ、不耐性の患者も多いとされている。トリエンチンはペニシラミ

ンに比べて、これらの重篤な副作用が非常に低頻度であり⁴²⁾、ペニシラミン不耐性患者にしばしば用いられる銅キレート剤である。さらに最近、アメリカにおいて銅キレート剤の1つである tetrathiomolybdate (TM) の phase 1 臨床試験が行われ、TM 投与により転移性腫瘍患者6人中5人で重篤な副作用なしに病勢の安定を得たことが報告されている⁴³⁾。さらに述べた動物実験の結果と併せて、銅キレート剤の抗血管新生作用に基づく抗癌治療の可能性を示唆するものであり、アメリカではさらに大規模な TM の臨床試験が現在進行中である。しかし、TM は日本では認可されていないため、本研究では日本で使用可能なペニシラミン、トリエンチンの両銅キレート剤を用いて実験を行った。その結果、トリエンチンはペニシラミンに比べて有意に強い肝癌発育抑制作用を示した。さらに、トリエンチンを投与した実験動物において、対照群に比し、体重減少やトランスアミナーゼの有意な変化といったいかなる毒性も認められなかった。現段階ではこれら2薬物で抗腫瘍効果に差異が生じた理由は明らかではない。2薬物ともに銅のみをキレートし、亜鉛や鉄のような他の遷移金属のキレート作用はなく³⁹⁾、直接両者を比較した報告は見られないものの、両者の銅キレート力には差がないものと思われる。ところで、腫瘍の発育進展に酸化ストレスの関与が従来から報告されている⁴⁴⁾。SH基を有するペニシラミンは抗酸化作用を持つと考えられるため酸化ストレスを8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) 酸化性DNA傷害を指標として両薬物投与群間で比較したが、有意な差は認められなかった。両者の銅のキレート機序は若干異なっており、ペニシラミンは蛋白に結合した銅をキレートし、トリエンチンは遊離銅をキレートするとされている⁴⁵⁾。この結合方式の差異が抗腫瘍効果に関係しているか否かを含めメカニズムに関する詳細な検討は今後の課題である。

なお、銅キレート剤による抗血管新生効果において、内皮細胞特異的な機序が存在するの否かは今後の検討課題である。ただ、Fig. 5に示したように、トリエンチンは肝癌細胞の増殖に影響を及ぼさない低濃度で内皮細胞の増殖を抑制しているため、トリエンチンがまず内皮細胞に働くことによりそれに栄養される肝癌の発育が抑制されると考えられる。

血管新生はこれまでに考えられていたような腫瘍の発育、進展のみならず発癌過程そのものにも重要な役割を果たしていることが明らかにされつつある²⁸⁻³⁰⁾。わずかな数の細胞の変異からなるごく早期の発癌過程においても血管構築の変化はすでに生じており、血管新生がこれに続き、発癌が進行していくことが近年報告された⁴⁶⁾。

実験的にも脾癌、皮膚癌、リンパ腫などの発癌過程において担癌臓器における血管新生が増強することが示されている⁴⁷⁻⁴⁸⁾。ヒトでも慢性肝炎の段階からすでに肝内で血管新生が亢進していることや、慢性肝炎から肝硬変へと病期が進展するにつれて障害肝の血管密度が増加することが報告されている⁴⁹⁻⁵⁰⁾。今回、著者は前癌病変の発生に伴って肝内の血管新生が亢進すること、トリエンチンが肝内血管新生を阻害するとともに前癌病変の発生を著明に抑制することを見いだした。トリエンチンが肝における前癌病変の発生を抑制したのか、あるいは前癌病変の成長を抑制したのかについてはさらなる検討を要するが、今回 DEN による initiation 後の promotion の段階からトリエンチンを投与したこと、前癌病変抑制効果に関して数の抑制よりも面積の抑制がより強かったことを考えあわせると、トリエンチンは血管新生を阻害して前癌病変がある大きさ以上になることを主に抑制している可能性が大きいと考えられた。

本実験で用いた 750 ppm というトリエンチン濃度は、1日あたり 97.5 mg/kg の投与量に相当する。臨床におけるトリエンチンの1日投与量は 1,500-2,500 mg であり、今回の実験で用いたトリエンチンの濃度は単純換算でも臨床使用量と同じオーダーであり、臨床用量にきわめて近いものと考えられる。今回 750ppm の投与にてトリエンチンが非常に強い血管新生抑制作用を示し肝癌発育および前癌病変発生を阻害したことより、将来の肝癌治療へのトリエンチンの応用も可能であると考えられた。

結 語

マウス肝癌発育およびラット前癌病変発生に対する銅キレート剤の効果を検討し、以下の結果を得た。

1. マウス皮下肝癌発育に対し、ペニシラミン、トリエンチンの銅キレート剤は有意な腫瘍発育の抑制効果を示した。さらにトリエンチンはペニシラミンに比べてより強い抗腫瘍効果を示し、その作用は 750ppm という低用量においても認められた。
2. トリエンチンは *in vivo*, *in vitro* において著明な血管新生抑制作用を示した。この作用は主として EC の増殖抑制によるものと考えられた。
3. トリエンチンは *in vivo*, *in vitro* において肝癌細胞の細胞増殖には影響を与えなかった。一方、腫瘍内のアポトーシス陽性細胞は著明に増加していた。
4. トリエンチンはラット肝発癌モデルにおける前癌病変の発生を 750ppm の低用量で著明に阻害した。この

前癌病変の抑制の程度は肝内の血管新生阻害とほぼ平行していた。一方、トリエンチンの肝における細胞増殖促進作用は認められなかった。

以上よりトリエンチンの肝癌発育および肝前癌病変発生抑制作用は主として血管新生阻害によることが示唆された。これらの抑制効果が臨床用量に近い投与量で得られたことより、トリエンチン投与が将来の肝癌治療と発癌予防に効果的な戦略の1つとなり得ることが示唆された。

(本論文の要旨の一部は、第35回日本肝臓学会総会、第58回日本癌学会総会、第12回日本がん転移学会学術集会において発表した。)

稿を終えるに臨み、終始御懇篤なる御指導、御校閲を賜りました福井 博教授に深甚の謝意を捧げます。さらに、本研究の遂行にあたり常に御指導、御助力をいただきました吉治仁志博士に感謝いたします。また、終始、御協力いただきました第3内科学教室の諸兄に感謝の意を表します。

文 献

- 1) Montalto, G., Cervello, M., Giannitrapani, L., Dantona, F., Terranova, A. and Castagnetta, L. A. : Epidemiology, risk factors, and natural history of hepatocellular carcinoma. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **963**: 13-20, 2002.
- 2) Okuda, K., Musha, H., Nakajima, Y., Kubo, Y., Shimokawa, Y., Nagasaki, Y., Sawa, Y., Jinnouchi, S., Kaneko, T., Obata, H., Hisamitsu, T., Motoike, Y., Okazaki, N., Kojiro, M., Sakamoto, K. and Nakashima, T. : Clinicopathologic features of encapsulated hepatocellular carcinoma: a study of 26 cases. *Cancer* **40** : 1240-5, 1997.
- 3) Hatori, N. : Epidemiology of liver cancer in Japan. *J. Clin. Exp. Med.* **171**: 1097-1104, 1994.
- 4) Boehm, T., Folkman, J., Browder, T. and O'Reilly, M. S.: Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance. *Nature* **390** : 404-7, 1997.
- 5) Drixler, T.A., Rinkes, I.H., Ritchie, E.D., van Vroonhoven, T.J., Gebbink, M.F. and Voest, E.E. : Continuous administration of angiostatin inhibits accelerated growth of colorectal liver metastases after partial hepatectomy. *Cancer Res.* **15** : 1761-5, 2000.
- 6) Eisen, T.G. : Thalidomide in solid tumors: the London experience. *Oncology(Huntingt)* **14** : 17-20, 2000.
- 7) Folkman, J. : Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat. Med.* **1** : 27-31, 1995.
- 8) Mise, M., Aii, S., Higashitaji, H., Furutani, M., Niwano, M., Harada, T., Ishigami, S., Toda, Y., Nakayama, H., Fukumoto, M., Fujita, J. and Imamura, M. : Clinical significance of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor gene expression in liver tumor. *Hepatology* **23** : 455-64, 1996.
- 9) Miura, H., Miyazaki, T., Kuroda, M., Oka, T., Machinami, R., Kodama, T., Shibuya, M., Makuuchi, M., Yazaki, Y. and Ohnishi, J. : Increased expression of vascular endothelial growth factor in human hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol.* **27** : 854-61, 1997.
- 10) Ferrara, N. and Alitalo, K.: Clinical applications of angiogenic growth factors and their inhibitors. *Nat. Med.* **5** : 1359-64, 1999.
- 11) Lau, K. and Bicknell, R.: Antiangiogenic gene therapy. *Gene Ther.* **6** : 1793-5, 1999.
- 12) Fidler, I.J. and Ellis, L.M.: The implications of angiogenesis for the biology and therapy of cancer metastasis. *Cell* **79** : 185-8, 1994.
- 13) Ferrara, N. and Davis_Smyth, T.: The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr. Rev.* **18** : 4-25, 1997.
- 14) Committee on Medical and Biologic Effects of Environmental Pollutants. Copper. Washington: National Academy of Sciences, 1977.
- 15) Brem, S., Tsanaclis, A.M. and Zagzag, D. : Anti-copper treatment inhibits pseudopodial protrusion and the invasive spread of 9L gliosarcoma cells in the rat brain. *Neurosurgery* **26** : 391-6, 1990.
- 16) Hu, G.F.: Copper stimulates proliferation of human endothelial cells under culture. *J. Cell Biochem.* **69** : 326-35, 1998.
- 17) Parke, A., Bhattacharjee, P., Palmer, R.M. and

- Lazarus, N.R. : Characterization and quantification of copper sulfate-induced vascularization of the rabbit cornea. *Am. J. Pathol.* **130** : 173-8, 1988.
- 18) Raju, K.S., Alessandri, G., Ziche, M. and Gullino, P.M.: Ceruloplasmin, copper ions, and angiogenesis. *J. Natl. Cancer Inst.* **69** : 1183-8, 1982.
- 19) Ziche, M., Jones, J. and Gullino, P. M.: Role of prostaglandin E1 and copper in angiogenesis. *J. Natl. Cancer Inst.* **69** : 475-82, 1982.
- 20) Engleka, K.A. and Maciag, T. : Inactivation of human fibroblast growth factor (FGF-1) activity by interaction with copper ions involves FGF-1 dimer formation induced by copper-catalyzed oxidation. *J. Biol. Chem.* **267**: 11307-15, 1992.
- 21) Shing, Y. : Heparin-copper bioaffinity chromatography of fibroblast growth factors. *J. Biol. Chem.* **263** : 9059-62, 1988.
- 22) Watanabe, T., Seno, M., Sasada, R. and Igarashi, K. : Molecular characterization of recombinant human acidic fibroblast growth factor produced in *E. coli*: comparative studies with human basic fibroblast growth factor. *Mol. Endocrinol.* **4** : 869-79 1990.
- 23) Yoshida, D., Ikeda, Y. and Nakazawa, S. : Quantitative analysis of copper, zinc and copper/zinc ratio in selected human brain tumors. *J. Neurooncol.* **16** : 109-15, 1993.
- 24) Yoshida, D., Ikeda, Y. and Nakazawa, S. : Suppression of 9L gliosarcoma growth by copper depletion with copper-deficient diet and D-penicillamine. *J. Neurooncol.* **17** : 91-7, 1993.
- 25) Honda, H., Onitsuka, H., Kanazawa, Y., Matsumata, T., Hayashi, T., Kaneko, K., Fukuya, T., Tateshi, Y., Adachi, E. and Masuda, K. : MR imaging of hepatocellular carcinoma. Correlation of metal content and signal intensity. *Acta Radiol.* **36** : 163-7, 1995.
- 26) Kitagawa, K., Matsui, O., Kadoya, M., Takashima, T., Kawamori, Y., Yamahana, T., Kidani, H., Hirano, M., Masuda, S. and Nakanuma, Y. : Hepatocellular carcinomas with excessive copper accumulation: CT and MR findings. *Radiology* **180** : 623-8, 1991.
- 27) Okita, K., Sakaida, I. and Hino, K. : Current strategies for chemoprevention of hepatocellular carcinoma. *Oncology* **62** (Suppl 1): 24-8, 2002.
- 28) Bergers, G., Javaherian, K., Lo, K. M., Folkman, J. and Hanahan, D. : Effects of angiogenesis inhibitors on multistage carcinogenesis in mice. *Science* **284** : 808-12, 1999.
- 29) Brandvold, K. A., Neiman, P. and Ruddell, A.: Angiogenesis is an early event in the generation of myc-induced lymphomas. *Oncogene* **19** : 2780-5, 2000.
- 30) Bolontrade, M. F., Stern, M. C., Binder, R. L., Zenklusen, J. C., Gimenez-Conti, I. B. and Conti, C. J.: Angiogenesis is an early event in the development of chemically induced skin tumors. *Carcinogenesis* **19**: 2107-13, 1998.
- 31) Patek, P.Q., Collins, J.L. and Cohn, M. : Transformed cell lines susceptible or resistant to in vivo surveillance against tumorigenesis. *Nature* **276**: 510-1, 1978.
- 32) Carlsson, G., Gullberg, B. and Hafstrom, L. : Estimation of liver tumor volume using different formulas - An experimental study in rats. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **105** : 20-23, 1983.
- 33) Brem, S.S., Zagzag, D., Tsanaclis, A.M., Gately, S., Elkouby, M.P. and Brien, S. E.: Inhibition of angiogenesis and tumor growth in the brain. Suppression of endothelial cell turnover by penicillamine and the depletion of copper, an angiogenic cofactor. *Am. J. Pathol.* **137** : 1121-42, 1990.
- 34) Sakaida, I., Matsumura, Y., Akiyama, S., Hayashi, K., Ishige, A. and Okita, K. : Herbal medicine Sho-saiko-to (TJ-9) prevents liver fibrosis and enzyme-altered lesions in rat liver cirrhosis induced by a choline-deficient L-amino acid-defined diet. *J. Hepatology* **28** : 298-306, 1998.
- 35) Sone, K., Maeda, M., Wakabayashi, K., Takeichi, N., Mori, M., Sugimura, T. and Nagao, M. : Inhibition of hereditary hepatitis and liver tumor development in Long-Evans cinnamon rats by the copper-chelating agent trientine dihydrochloride. *Hepatology* **23** : 764-70, 1996.
- 36) Yoshiji, H., Kuriyama, S., Yoshii, J., Ikenaka, Y., Noguchi, R., Hicklin, D.J., Huber, J.,

- Nakatani, T., Tsujinoue, H., Yanase, K., Imazu, H. and Fukui, H. : Synergistic effect of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor in murine hepatocellular carcinoma. *Hepatology* **35** : 834-42, 2002.
- 37) Carmeliet, P. and Jain, R.K.: Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* **407** : 249-57, 2000.
- 38) Carmeliet, P. : Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat. Med.* **6** : 389-95, 2000.
- 39) Harris, S. R. and Thorgeirsson, U.P. : Tumor angiogenesis. *In Vivo* **12** : 563-70, 1998.
- 40) Ono, M., Kawahara, N., Goto, D., Wakabayashi, Y., Ushiro, S., Yoshida, S., Izumi, H., Kuwano, M. and Sato, Y. : Inhibition of tumor growth and neovascularization by an anti-gastric ulcer agent, irsogladine. *Cancer Res.* **56** : 1512-6, 1996.
- 41) Williams, J. K., Sukhova, G. K., Herrington, D. M. and Libby, P. : Pravastatin has cholesterol-lowering independent effects on the artery wall of atherosclerotic monkeys. *J. Am. Coll. Cardiol.* **31** : 684-91, 1998.
- 42) Walshe, J. M. : Treatment of Wilson's disease with trientine (triethylene tetramine) dihydrochloride. *Lancet* **1**: 643-7, 1982.
- 43) Brewer, G. J., Dick, R. D., Grover, D. K., LeClaire, V., Tseng, M., Wicha, M., Pienta, K., Redman, B. G., Jahan, T., Sondak, V. K., Strawderman, M., LeCarpentier, G. and Merajver, S. D. : Treatment of metastatic cancer with tetrathiomolybdate, an anticopper, antiangiogenic agent: Phase I study. *Clin. Cancer Res.* **6** : 1-10, 2000.
- 44) Toyokuni, S. and Sagripanti, J. L. : Increased 8-hydroxydeoxyguanosine in kidney and liver of rats continuously exposed to copper. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **126** : 91-7, 1994.
- 45) Sakai, K., Murata, N., Chiba, K. and Yamane, Y. : Effect of copper administration on the incorporation of [3H]-thymidine into the liver DNA of rats stimulated by dimethylnitrosamine and diethylnitrosamine. *Carcinogenesis* **2** : 1261-6, 1981.
- 46) Frachon, S., Gouysse, G. Dumortier, J., Couvelard, A., Nejari, M., Mion, F., Berger, F., Paliard, P., Boillot, O. and Scoazec, J. Y. : Endothelial cell marker expression in dysplastic lesions of the liver: an immunohistochemical study. *J.Hepatol.* **34** : 850-7, 2001.
- 47) Folkman, J., Watson, K., Ingber, D. and Hanahan, D. : Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia. *Nature* **339** : 58-61, 1989.
- 48) Larcher, F., Franco, M., Bolontrade, M., Rodriguez_Puebla, M., Casanova, L., Navarro, M., Yancopoulos, G., Jorcano, J. L. and Conti, C. J.: Modulation of the angiogenesis response through Ha-ras control, placenta growth factor, and angiopoietin expression in mouse skin carcinogenesis. *Mol. Carcinog.* **37** : 83-90, 2003.
- 49) Mazzanti, R., Messerini, L., Monsacchi, L., Buzzelli, G., Zignego, A.L., Foschi, M., Monti, M., Laffi, G., Morbidelli, L., Fantappie, O., Bartoloni Saint Omer, F. and Ziche, M. : Chronic viral hepatitis induced by hepatitis C but not hepatitis B virus infection correlates with increased liver angiogenesis. *Hepatology* **25** : 229-34, 1997.
- 50) Park, Y.N., Kim, Y.B., Yang, K.M. and Park, C. : Increased expression of vascular endothelial growth factor and angiogenesis in the early stage of multistep hepatocarcinogenesis. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **124** : 1061-5, 2000.