

胃癌細胞株に対する tranilast の抗腫瘍効果とその機序

山村 真弘

Tranilast は抗アレルギー剤として使用されているが、いくつかの腫瘍細胞で増殖を抑制する効果が報告されている。この研究では胃癌細胞株に対する tranilast の抗腫瘍効果について検討した。5種類の胃癌細胞株に tranilast を72時間作用させ、腫瘍細胞の増殖抑制効果を Premix WST-1 cell proliferation assay を用いて評価した。用いたすべての胃癌細胞株において tranilast は濃度依存性に抗腫瘍効果を示し、 IC_{50} は80～240 μ M であった。次に、胃癌細胞株に抗癌剤 (CDDP, 5-FU, TXL) および tranilast との併用による増殖抑制効果の増強について検討し、抗癌剤単独投与と比較して抗癌剤と tranilast との併用では腫瘍増殖抑制の増強を認めた。Tranilast による胃癌細胞株の細胞周期に与える影響およびアポトーシスの誘導作用についてはFACS解析を用い、tranilast 単独投与により G_0 G_1 期細胞の増加を認め、TUNEL 法ではアポトーシス細胞が観察された。CDDP と tranilast の併用では、CDDP 単独投与と比較して sub G_1 期細胞の増加、アポトーシス細胞の増加がみられた。アポトーシス細胞の免疫染色では核の膨張、断片化が確認された。Western blot では、p 53, p 21 の発現増強がみられ、p 21 を介した G_1 停止による細胞増殖抑制が tranilast の主な作用と考えられた。Tranilast はヒト胃癌細胞株に対し単独でも抗腫瘍効果を認め、他の抗癌剤との併用による抗腫瘍効果の増強も認められ、tranilast は新たな抗腫瘍薬となることが示唆される。

(平成19年10月15日受理)

Antitumor Effect and It's Mechanism of Tranilast in Gastric Cancer Cell Lines

Masahiro YAMAMURA

An antitumor effect of tranilast was examined in five gastric cancer cell lines. Tranilast showed a dose-dependent antitumor effect in all of these gastric cancer cell lines with IC_{50} at 80–240 μ M. In combination with typical anticancer drugs, including cisplatin (CDDP), 5-fluorouracil, and paclitaxel, tranilast had a synergistic effect on the anti-proliferative activity of these anticancer drugs. From cell cycle analysis, a dose-dependent increase in G_0 - G_1 phase was noted with tranilast alone, and an increase in the sub G_1 phase which resulted in an increased proportion of apoptotic cells, was observed after tranilast and CDDP treatment as compared with CDDP alone. Immunohistochemical staining showed nuclear expansion and fragmentation with tranilast. Enhancement of p53 and p21 expression was detected six hours after the addition of tranilast with Western blot analysis. These results suggest that tranilast inhibits the proliferation of gastric cancer cells through G_1 arrest associated with the induction of p21 and p53, and that it has a synergistic

effect on the anti-proliferative activity of antitumor drugs. (Accepted on October 15, 2007) *Kawasaki Medical Journal* 34(1): 7-20, 2008

Key Words ① gastric cancer cell ② tranilast ③ antitumor effect
④ cell cycle ⑤ apoptosis

はじめに

胃癌に対する化学療法は、cisplatin (CDDP), 5-fluorouracil (5-FU) をはじめとして多くの薬剤が用いられている。しかし臨床では通常単剤では抗腫瘍効果は不十分で、多剤併用療法が一般的となっている。多剤併用療法では biochemical modulation の導入により、5-FU の modulator として methotrexate (MTX) や leucovorin (LV) を用いた MTX/5-FU 療法¹⁾ や LV/5-FU 療法²⁾ が行われ、CDDP の併用による CDDP/5-FU 療法も盛んに行われてきた。また近年胃癌に対し 1M tegafur-0.4M gimeracil-1M oteracilpotassium (TS-1) に CDDP を併用した TS-1/CDDP 療法³⁾ や TS-1 に paclitaxel (TXL), docetaxel などの taxane 系薬剤併用療法の奏効例の報告もされているが^{4), 5)}、標準的な化学療法として確立されたものはない。特に腹膜再発は治療抵抗性であり予後の改善も未だ十分ではない。そこで腹膜転移形成過程の解明とこれらの機序に基づいた分子標的薬の基礎研究が盛んに行われ、分子標的薬の臨床応用が期待されている⁶⁾。

Tranilast はナンテンの抽出成分より得られた抗アレルギー剤で、わが国で唯一のケロイド・肥厚性瘢痕治療薬である⁷⁾。その作用については多くの報告があり、肥満細胞、各種炎症細胞からのヒスタミン、ロイコトリエンなどのケミカルメディエーターの遊離抑制^{8)~10)} や サイトカイン (TGF- β) や 活性酸素の産生あるいは遊離抑制作用^{7), 11)} やケロイド・肥厚性瘢痕由来線維芽細胞のコラーゲン合成抑制作用¹²⁾ が知られている。一方で、肥満細胞腫¹³⁾、子宮

筋腫細胞¹⁴⁾、神経膠腫¹⁵⁾、マウス肺癌細胞¹⁶⁾、ハムスター膀胱癌細胞¹⁷⁾ で tranilast の抗腫瘍効果の報告があり、ヒト舌癌¹⁸⁾、ヒトスキルス胃癌¹⁹⁾ では線維芽細胞との混合培養において、線維芽細胞より産生される増殖因子を抑制することで、腫瘍細胞の間接的な抗腫瘍効果の報告がされている。今回、ヒト胃癌細胞株を用いて、tranilast の胃癌細胞に対する直接的な抗腫瘍効果の有無、抗癌剤併用時の抗腫瘍効果の増強の有無について検討した。

材料と方法

1. 胃癌細胞株

MKN1 (腺扁平上皮癌)、MKN28 (高分化腺癌)、MKN45 (低分化腺癌)、MKN74 (高分化腺癌)、TMK1 (低分化腺癌) を用いた (Table 1)。MKN1, MKN28, MKN45, MKN74 は免疫生物研究所 (群馬) より、TMK1 は広島大学大学院医歯薬学総合研究科、分子病理学研究室より分譲、継代培養したものを使用した²⁰⁾。継代培養に用いた培地は、RPMI-1640 (SIGMA 社) に 10% 牛胎児血清 (以下 FBS, MBL 社) およびカナマイシン (明治製菓) を添加して、5% CO₂, 37°C の条件下で培養した。

2. 薬剤

使用した薬剤は CDDP (cis-diamminedichloroplatinum, 日本化薬)、5-FU (協和発酵工業

Table 1. Human gastric cancer cell lines used in this study.

Cell line	p 53 type	Histopathologic type
MKN1	Mutant	Adenosquamous-cell carcinoma
MKN28	Mutant	Well differentiated adenocarcinoma
MKN45	Wild	Poorly differentiated adenocarcinoma
MKN74	Mutant	Well differentiated adenocarcinoma
TMK1	Mutant	Poorly differentiated adenocarcinoma

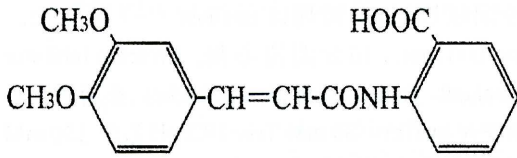


Fig. 1. Chemical structure of tranilast.

株式会社), TXL (プリストル・マイヤーズ株式会社) で, 市販されているものを使用した.

Tranilast [N-(3,4-dimethoxycinnamoyl) anthranilic acid] はキッセイ薬品工業株式会社より原末を供与され使用した. Tranilast の構造を Figure 1 に示す. 分子式は C₁₈H₁₇NO₅, 分子量は 327.33 である. Tranilast は 32.7 mg を 10 ml の 1% NaHCO₃ 溶液で 70°C に加熱溶解したものを原液 10 mM として使用した. これを 10% FBS 添加 RPMI-1640 培地で各濃度に調整し添加した. また, コントロールは tranilast を含まない 1% NaHCO₃ 溶液を同量添加した.

3. 胃癌細胞株に対する tranilast の IC₅₀ の測定

96 ウェルマイクロプレート (IWAKI) に MKN1 および MKN45 5 × 10³ cells/100 μl, MKN28 および MKN74 4 × 10³ cells/100 μl, TMK1 2 × 10³ cells/100 μl を分注し, 24 時間培養後, tranilast 10 mM 溶液を 10% FBS 添加 RPMI-1640 培地にて 0 ~ 1000 μM の濃度に調整し, 72 時間処理した. 濃度依存性の抗腫瘍効果の判定は Premix WST-1 cell proliferation assay system kit (Takara) を用い, マイクロプレートリーダーにて, 640 nm の対照波長で 450 nm 波長の吸光度を測定した. 3 回測定し, 薬剤処理時の OD₄₅₀/コントロールの OD₄₅₀ を増殖率とし, IC₅₀ を算出した.

4. 抗癌剤および tranilast 併用による抗腫瘍効果の増強の判定

96 ウェルマイクロプレート (IWAKI) に MKN45 は 5 × 10³ cells/100 μl 分注し, 24 時間培養した. コントロール群, tranilast 50 μM 群, tranilast 100 μM 群, CDDP 10 μM 群, CDDP 10

μM + tranilast 50 μM 群, CDDP 10 μM + tranilast 100 μM 群, 5-FU 50 μM 群, 5-FU 50 μM + tranilast 50 μM 群, 5-FU + 100 μM 群, TXL 3 μM 群, TXL 3 μM + tranilast 50 μM, TXL 3 μM + tranilast 100 μM 群をそれぞれ作成し, 培養細胞を 72 時間処理後, 抗癌剤単独投与群と抗癌剤および tranilast 併用群の細胞増殖抑制効果を上記と同様に測定した. 8 回測定し, 増殖率を抗癌剤単独処理群と抗癌剤および tranilast 併用群で比較した.

5. 胃癌細胞株に対する tranilast および抗癌剤の細胞周期に与える影響

6 ウェルマイクロプレート (IWAKI) に MKN45 5 × 10⁵ cells/2 ml を分注し, 24 時間培養した. コントロール群, tranilast 100 μM 群, tranilast 300 μM 群, CDDP 10 μM 群, CDDP 10 μM + tranilast 300 μM 群, 5-FU 50 μM 群, 5-FU 50 μM + tranilast 300 μM 群, TXL 5 μM 群, TXL 5 μM + tranilast 300 μM 群を作成し, MKN45 細胞を 48 時間処理した. 次いで培養細胞を 0.02% EDTA 添加 0.25% トリプシンで回収し, cycle TEST™ PLUS DNA Reagent kit (Becton Dickinson) を用い, buffer にて細胞を洗浄後 PI 染色し, FACS Calibar flow cytometer (Becton Dickinson) にてヒストグラムを作成した. データは 10⁴ 個の細胞を集積して解析し, 解析ソフトウェアは CELL Quest version 1.2.2 (Becton Dickinson) を使用した.

6. 胃癌細胞株に対する tranilast および抗癌剤のアポトーシスの誘導

6 ウェルマイクロプレートに MKN45 を 5 × 10⁵ cells/2 ml まき, 24 時間培養した. コントロール群, tranilast 100 μM 群, tranilast 300 μM 群, CDDP 10 μM 群, CDDP 10 μM + tranilast 300 μM 群, 5-FU 50 μM 群, 5-FU 50 μM + tranilast 300 μM 群, TXL 5 μM 群, TXL 5 μM + tranilast 300 μM 群を作成し, MKN45 細胞を 72 時間処理した. 上記と同様に細胞を回収し, In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein

(Roche)を用い、パラフォルムアルデヒドにて細胞固定し、浸透液(0.1%クエン酸ナトリウム中0.1% Triton X-100)で細胞の浸透化後、TUNEL反応液を加え、FACS Calibar flow cytometerにて解析した。

7. 蛍光抗体法によるM期標識およびアポトーシスの検出

4ウェルマイクロプレートにMKN45細胞 2×10^4 cells/500 μ lを分注し、24時間培養後、各濃度に調整したtranilastおよびCDDPで24時間処理した。分裂期細胞の標識はGotoら²¹⁾の方法に準じて、histone H3 (Ser28)-P抗体による免疫染色で行った。細胞を70% ethanol-formaldehyde-acetic acid (20:2:1, v/v)で固定後、PBSで洗浄し、TBS (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl)に1%ヤギ血清を加えたブロッキング液で処理した。TBSで1/500倍希釈した一次抗体(抗histone H3 (Ser28)-P, Sigma)と反応させた。TBSで洗浄後、同様に蛍光(FITC)標識した二次抗体と反応させ、洗浄した。その後DAPIで核を染色し、蛍光顕微鏡で検鏡した。M期細胞の比率の評価は、細胞密度の高い部位の計1000個の細胞数をカウントし比較した。

アポトーシス細胞の検出は、4ウェルマイクロプレートにMKN45細胞 2×10^4 cells/500 μ lを分注し、24時間培養後、各濃度に調整したtranilastおよびCDDPで48時間処理した。アポトーシス細胞の標識はIn Situ Cell Death Detection kit (TMR red 標識, Roche)を用いて行った。細胞固定後、PBSで洗浄し、0.1% Triton X-100を含む0.1%クエン酸ナトリウム液で細胞を浸透化した後、TUNEL反応液で処理した。核はDAPIで染色し蛍光顕微鏡で検鏡した。

8. ウェスタン・ブロット法

100 mm シャーレにTMK1 2×10^6 cells/10 mlを分注し、24時間培養した。その後tranilast 300 μ Mに調整した培地にて6, 12, 24時間処理後PBSで洗浄し、cell scraperにて掻き採り細胞

を回収した。0時間はtranilast (-)とした。10,000 rpm, 15分間遠心後、Protease Inhibitor Cocktail Tablet (Complete; Roche)を溶解したRIPA buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Nonidet P-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulfate: SDS) 200 μ lを加え、超音波細胞粉碎装置を用いて氷冷下で超音波処理を行った。 -20°C にて凍結融解し、Bradford法²²⁾でタンパク濃度を測定し、濃度を調整した。上記タンパク質試料にSample Buffer (NEB)を加え 90°C で2分間処理したのち、dithiothreitolを加えてSDSを含むポリアクリルアミドゲル(5~20%勾配ゲル)で電気泳動し、polyvinylidene-fluorideメンブレンへ電氣的に転写した。TBST (150 mM NaCl, 100mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.1% Tween 20)中に2.5%スキムミルク, 0.5% BSAを含むブロッキング溶液で処理した後、ブロッキング溶液で1,000倍希釈したanti-p 53抗体(DO-7: visionbiosystems), 100倍希釈したanti-p 21抗体(EA10: Calbiochem)で 4°C 一晚反応させた。ブロッキング溶液で3回洗浄した後、p 53, p 21ともにanti-mouse IgG抗体(GeneTex)をブロッキング溶液で20,000倍希釈した反応液中で1時間、室温で反応させた。その後TBSTで洗浄し、化学発光基質(ECL+; Amersham)を用いて検出した。

9. 統計学的処理

測定結果はmean \pm SDで示し、検定はStudent's t-testを用い、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

結 果

1. 胃癌細胞株におけるtranilastのIC₅₀の測定と抗腫瘍効果

各胃癌細胞株におけるtranilastの72時間処理のIC₅₀をTable 2に示した。5種類すべての胃癌細胞株においてtranilastは直接的な増殖抑制効果を示し、IC₅₀は80~240 μ Mであった。

Table 2. The IC₅₀ values of tranilast in gastric cancer cell lines.

Cell line	MKN1	MKN28	MKN45	MKN74	TMK1
IC ₅₀ (μ M)	100	90	80	110	240

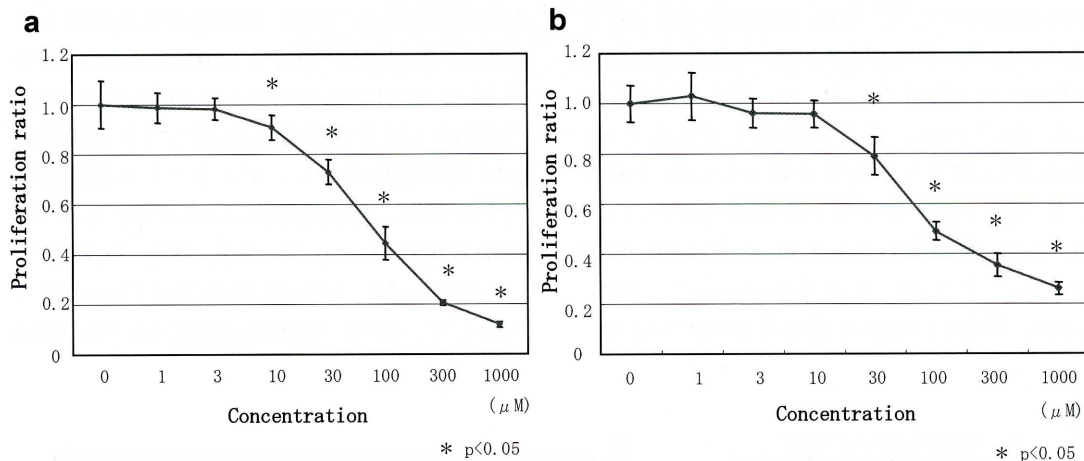


Fig. 2. Growth inhibition of MKN45 and MKN28 cells by tranilast in culture.

Data are presented as the mean (graph) with standard deviation (bar) of three independent experiments. The number of cells treated with tranilast compared to no treatment (control). Relative value is calculated using mean of control as 1.0. *, P<0.05.

(a) MKN45 (b) MKN28

Tranilast の感受性は、MKN45, MKN28, MKN1, MKN74, TMK1 の順に高く、MKN45では tranilast 10 μ M より腫瘍増殖抑制効果を認めた。感受性の高い MKN45, MKN28 を **Figure 2** に示した。ただし、IC₅₀ 値は1 ウェルあたりの細胞数によって変動が見られ、細胞数を1/2の数にすると、tranilast に対する感受性が高くなり IC₅₀ 値は低下した。

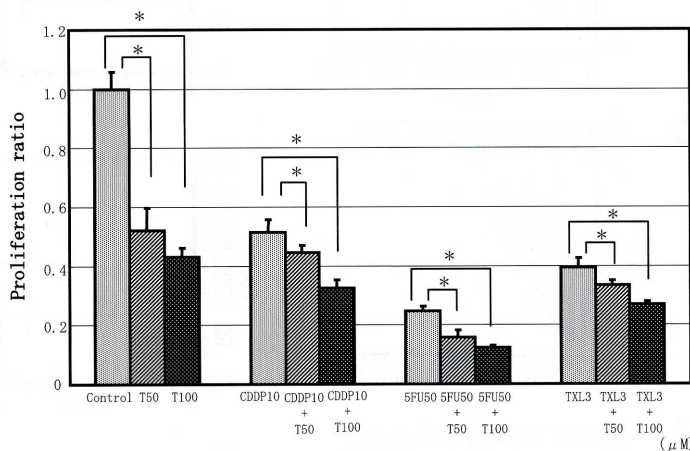


Fig. 3. Growth inhibitory effects of anticancer drug with or without tranilast in gastric cancer cell lines, MKN45.

Abbreviations : T50, tranilast 50 μ M ; T100, tranilast 100 μ M ; CDDP 10, cisplatin 10 μ M ; 5FU, 5FU 50 μ M ; TXL3, paclitaxel 3 μ M

2. 抗癌剤および tranilast 併用による抗腫瘍効果の増強の判定

MKN45 に CDDP, 5-FU, TXL の抗癌剤を作用させると腫瘍増殖抑制を認めたが、各々の抗癌剤に tranilast を併用すると、CDDP, 5-FU, TXL すべての抗癌剤で tranilast の濃度依存的に腫瘍増殖抑制効果の増強を認めた (p<0.05)

(Fig. 3).

3. 胃癌細胞株に対する tranilast および抗癌剤の細胞周期に与える影響

PI 染色した MKN45 細胞を FACS Calibar

flow cytometerにて解析すると、対照群では SubG₁ 期細胞が $3.8 \pm 0.7\%$ 、G₀G₁ 期細胞が $56.6 \pm 0.6\%$ 、S 期細胞が $21.5 \pm 0.01\%$ 、G₂M 期細胞が $10.4 \pm 0.2\%$ であった。tranilastにて48時間処理すると、G₀G₁ 期細胞が100 μ Mで $63.7 \pm 0.4\%$ 、300 μ Mで $64.6 \pm 0.5\%$ と対照群と比較して増加がみられ、G₁ 停止の様相を示した ($p < 0.05$)。また対照群と比較して tranilast 300 μ MでS 期細胞は $15.0 \pm 0.9\%$ と減少した ($p < 0.05$) が、SubG₁ 期細胞 $5.25 \pm 0.2\%$ 、G₂M 期細胞 $11.2 \pm 0.3\%$ とそれぞれ増加 ($p = 0.1$) したが、有意差はなかった (Fig. 4 a-c)。同様に MKN45 細胞を CDDP 10 μ M、

20 μ Mで48時間処理すると対照群と比較して、SubG₁ 期細胞が $28.8 \pm 1.0\%$ 、 $46.9 \pm 1.2\%$ と濃度依存性に増加 ($p < 0.05$) し、アポトーシスに相当する細胞の増加を認めた。G₀G₁ 期細胞、S 期細胞は減少、G₂M 期細胞の変化はみられなかった。CDDP 10 μ Mに tranilast 300 μ Mを併用した CDDP / tranilast 併用処理では、CDDP 10 μ M 単独処理と比較してS 期細胞、G₂M 期細胞は減少し、アポトーシス細胞に相当する SubG₁ 期細胞が $28.8 \pm 1.0\%$ から $44.0 \pm 0.2\%$ に増加 ($p < 0.05$) した (Fig. 5a, b)。

5-FU 50 μ M、100 μ M 処理では Control 群と比較して、SubG₁ 期細胞は $23.2 \pm 0.5\%$ 、 29.8

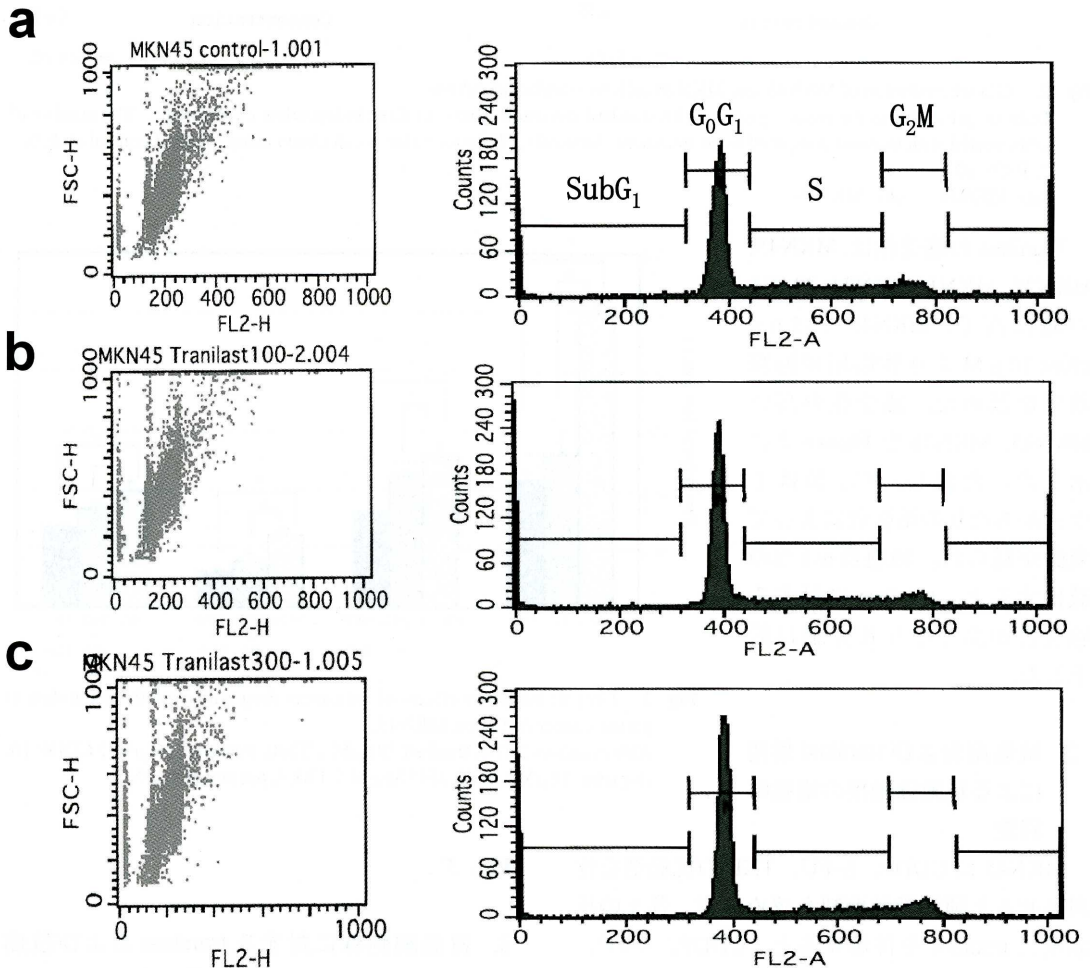


Fig. 4. Effect of tranilast on cell cycle in MKN45 cells determined with flow cytometric analysis.

(a) control, (b) Tranilast 100 μ M, (c) Tranilast 300 μ M.

± 0.7%と増加した ($p < 0.05$). 5-FU 50 μM に tranilast 300 μM を併用した5-FU / tranilast 併用処理では、5-FU 単独処理と比較して SubG₁ 期細胞が23.2 ± 0.5%から11.85 ± 0.2%に減少しアポトーシス細胞の増加はみられなかったが、G₀G₁ 期細胞が58.3 ± 0.6%から66.8 ± 0.3%と増加がみられ ($p < 0.05$) G₁ 停止の作用増強が考えられる (Fig. 5c, d).

TXL 5 μM , 10 μM 処理では Control 群と比較して、G₂M 期細胞が16.9 ± 0.5%, 22.6 ± 0.3%と増加した ($p < 0.05$). 一方、G₀G₁ 期細胞は35.1 ± 0.4%, 29.6 ± 0.6%と減少した ($p < 0.05$).

TXL 5 μM に tranilast 300 μM を併用した TXL / tranilast 併用処理では、TXL 単独処理と比較して G₀G₁ 期細胞が35.1 ± 0.4%から41.0 ± 1.4%に増加 ($p < 0.05$), G₂M 期細胞

が16.9 ± 0.5%から12.0 ± 0.1%と減少 ($p < 0.05$) した。SubG₁ 期細胞の増加はなかった (Fig. 5e, f).

5. 胃癌細胞株に対する tranilast および抗癌剤のアポトーシスの誘導

TUNEL 法にて処理した MKN45 細胞を FACS Calibar flow cytometer にて解析すると、対照群ではアポトーシス細胞は5.7 ± 1.6%に対して、tranilast 100 μM では21.2 ± 1.6% ($p < 0.05$), 300 μM では24.3 ± 0.5% ($p < 0.05$) に増加し、アポトーシスの誘導がみられた (Fig. 6a-c). 次に抗癌剤単独処理と抗癌剤 / tranilast 併用処理のアポトーシス細胞の比較では、CDDP 10 μM が53.0 ± 2.8%に対し CDDP 10 μM / tranilast 300 μM 併用処理では71.0 ± 1.4%と増加 ($p < 0.05$) がみられた (Fig. 7a, b).

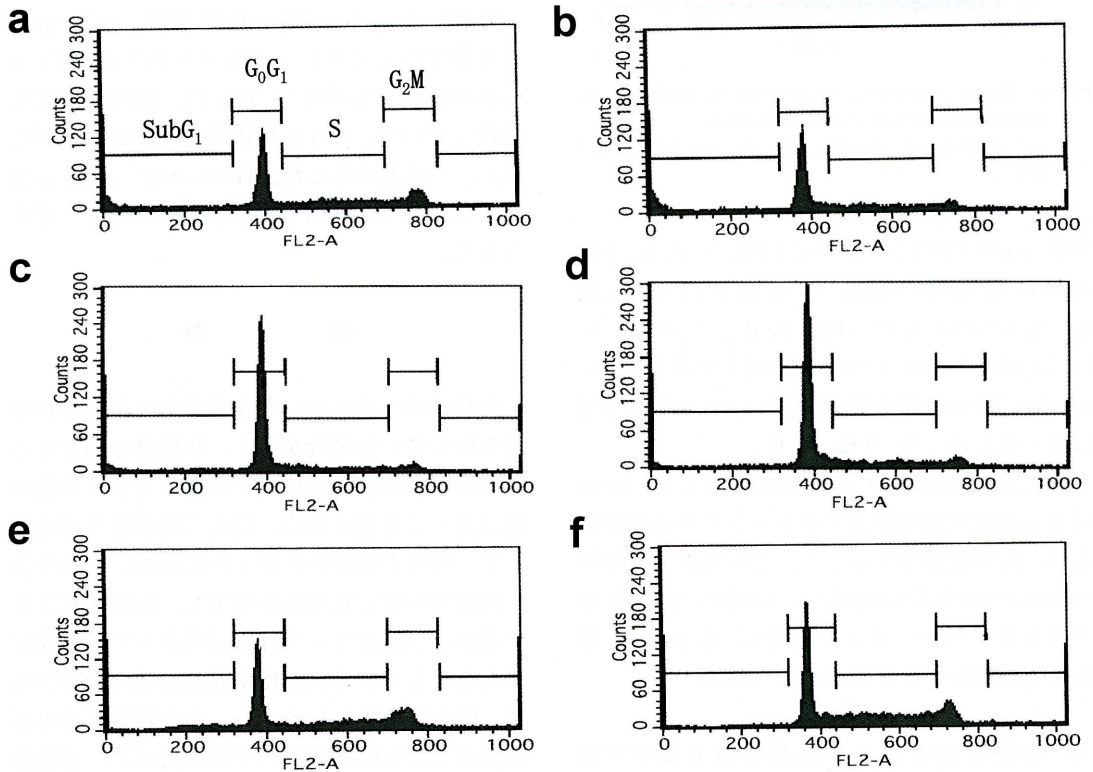


Fig. 5. Combined effects of tranilast and/or typical anticancer drugs on cell cycle in MKN45 cells determined with flow cytometric analysis.

- (a) CDDP 10 μM , (b) CDDP 10 μM + Tranilast 300 μM ,
- (c) 5-FU 50 μM , (d) 5-FU 50 μM + Tranilast 300 μM ,
- (e) TXL 5 μM , (f) TXL 5 μM + Tranilast 300 μM .

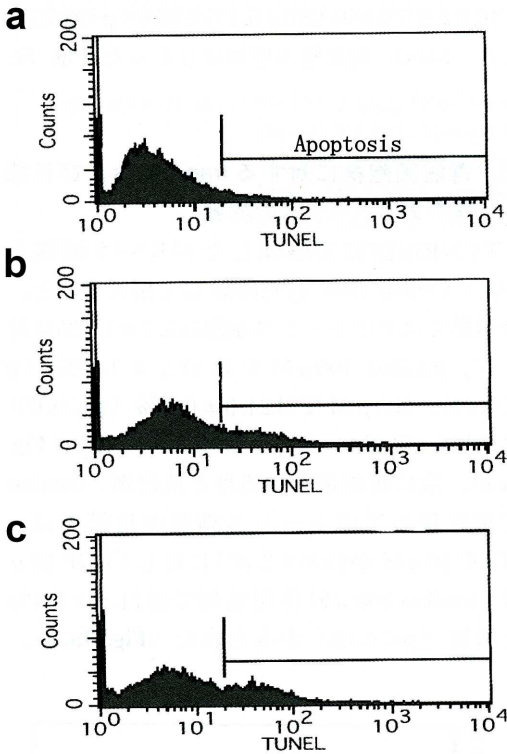


Fig. 6. Effect of tranilast on apoptosis in MKN45 cells determined with flow cytometric analysis.

(a) control, (b) Tranilast 100 μ M, (c) Tranilast 300 μ M.

TXL 5 μ M は $25.3 \pm 1.8\%$ に対し TXL 5 μ M / tranilast 300 μ M 併用処理では $36.9 \pm 1.8\%$ と増加 ($p < 0.05$) した (Fig. 7c, d). しかし, 5-FU 50 μ M では $45.1 \pm 1.5\%$ に対し 5-FU 50 μ M / tranilast 300 μ M 併用処理は $23.4 \pm 0.8\%$ で増加はみられなかった (Fig. 7e, f).

以上より tranilast は胃癌細胞株に対し G_1 arrest による細胞増殖抑制とアポトーシスの誘導がみられ, 抗腫瘍効果を示した. また抗癌剤と併用での抗腫瘍効果の増強は, CDDP, TXL 併用では主にアポトーシスの増強が, 5-FU では細胞増殖抑制が主な作用と考えられる.

6. 蛍光抗体法による M 期標識およびアポトーシスの検出

MKN45 細胞の蛍光抗体を用いた M 期細胞の標識では, DAPI 染色で核は青, histone H3

染色で M 期細胞の核は緑に染まる. 対照では M 期細胞が多数みられ, tranilast 300 μ M 処理では M 期細胞の変化はなく (Fig. 8a, b), CDDP 20 μ M 処理では M 期細胞の減少傾向がみられ, CDDP 20 μ M / tranilast 300 μ M 併用では M 期細胞はさらに減少した (Fig. 8c, d).

MKN45 細胞の TMR red を用いたアポトーシスの検出では, tranilast 500 μ M 処理するとアポトーシス細胞 (赤) と核の膨張, 断片化の形態変化が見られた (Fig. 9b) が, コントロール (Fig. 9a) と比較してアポトーシス細胞の増加は軽度だった. CDDP 20 μ M 処理では核の膨張, 断片化を伴うアポトーシス細胞の増加みられ, CDDP / tranilast 併用処理ではアポトーシス細胞がさらに増加した (Fig. 9c, d).

7. Tranilast による胃癌細胞の細胞周期調節因子に対する影響

TMK1 に tranilast 300 μ M 添加後, p 53, p 21 の発現をウェスタン・ブロット法で調べた. p 53 は 6 時間で 1.7 倍に上昇し 12, 24 時間後でも持続していた. p 21 は 6 時間後で 2 倍に上昇したが, 一過性であった. Tranilast は, p 53, p 21 発現による G_1 arrest が増殖抑制の機序と考えられる.

考 察

胃癌は同一癌の中でも組織学的に多種多様な像を呈している場合が多く, 組織型分類による癌の特徴, 転移進展様式を考慮する事は胃癌治療において重要である. 胃癌の組織発生母地として, 胃固有粘膜からは未分化型癌, 腸上皮化生粘膜からは分化型癌が発生し, 転移様式として未分化型癌はリンパ行性転移が主で, 腹膜転移もきたしやすく, 分化型癌は血行性転移が主で, 肝転移をきたしやすい. また胃癌術後の再発形式では腹膜播種が約半数を占め²³⁾, 胃癌患者の予後を左右する重要な因子である. われわれも胃癌術後腹膜再発に対し, 抗癌剤の腹腔内投与などを施行してきたが, 腹腔内薬剤濃度の

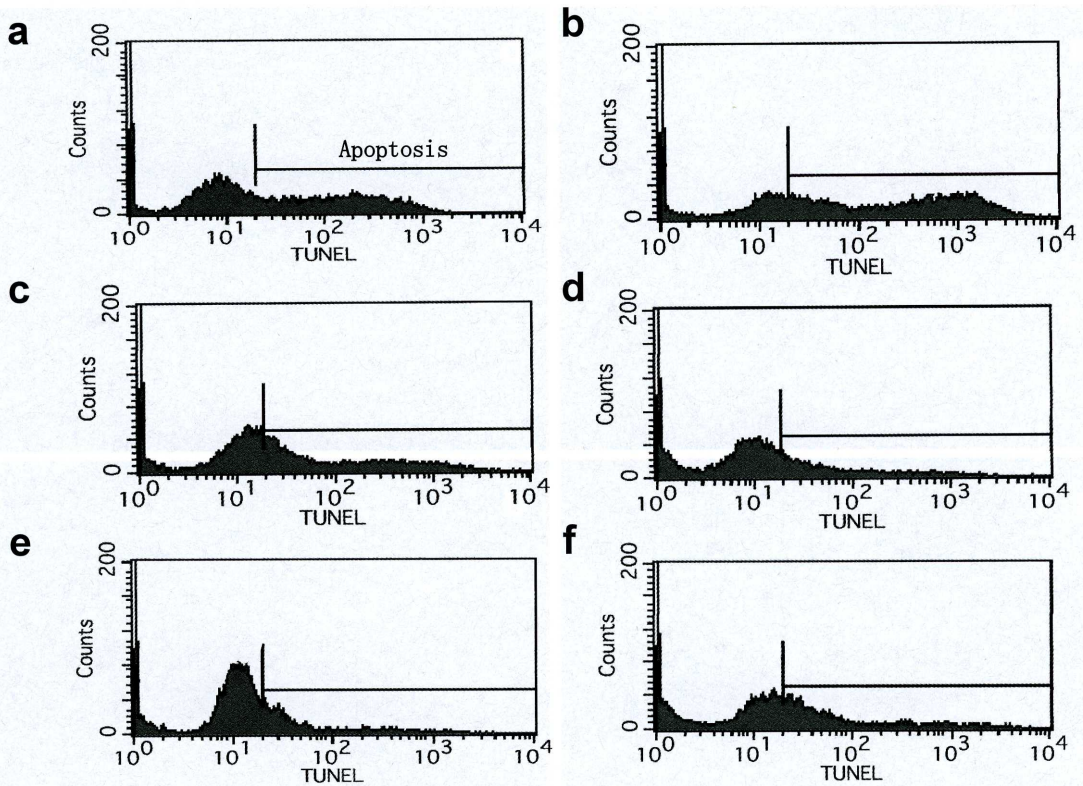


Fig. 7. Combined effects of tranilast and/or typical anticancer drugs on apoptosis in MKN45 cells determined with flow cytometric analysis.

(a) CDDP 10 μ M, (b) CDDP 10 μ M + Tranilast 300 μ M, (c) 5-FU 50 μ M, (d) 5-FU 50 μ M + Tranilast 300 μ M, (e) TXL 5 μ M, (f) TXL 5 μ M + Tranilast 300 μ M.

急速な低下，術後腹腔内癒着や化学性腹膜炎のため薬剤が十分に拡散しないことから十分な効果は得られていない。腹膜播腫の治療においては，癒着防止効果のある薬剤と分子量が大きく腹腔内に長時間停滞し血中移行が少ない抗癌剤の併用が有用と考えられる。

Tranilastには術後腹腔内癒着形成過程において重要な役割をする線維芽細胞の増殖を抑制したり，コラーゲン合成抑制効果¹¹⁾がある。ラット腹腔内癒着モデル²⁴⁾やウサギ腹壁子宮癒着モデル²⁵⁾において癒着軽減が報告されており，我々のマウス腹腔内癒着モデルにおいても癒着軽減効果を認めている（未発表）。

また tranilast は腫瘍細胞に対する直接的な抗腫瘍効果や，スキルス胃癌の増殖，浸潤に重要な役割をする線維芽細胞からの増殖因子を抑制

するなどの報告から，まず *in vitro* における胃癌細胞株に対する抗腫瘍効果について検討した。

胃癌のリンパ節転移から分離，樹立された MKN1 および MKN28，肝転移から分離，樹立された MKN45, MKN74 を含む 5 種類の胃癌細胞株を用いて tranilast の腫瘍増殖抑制効果を検討したところ，今回用いた腺扁平上皮癌，高分化腺癌，低分化腺癌のすべての細胞株で，腫瘍増殖抑制が見られた。5つの胃癌細胞株中，p53野生株である MKN45 が最も感受性が高かった。

次いで MKN45 細胞を用い，抗癌剤 (CDDP, 5-FU, TXL) を各濃度で処理すると腫瘍増殖抑制を認め，tranilast を併用すると濃度依存性に増殖抑制効果が増強した。Tranilast は単独

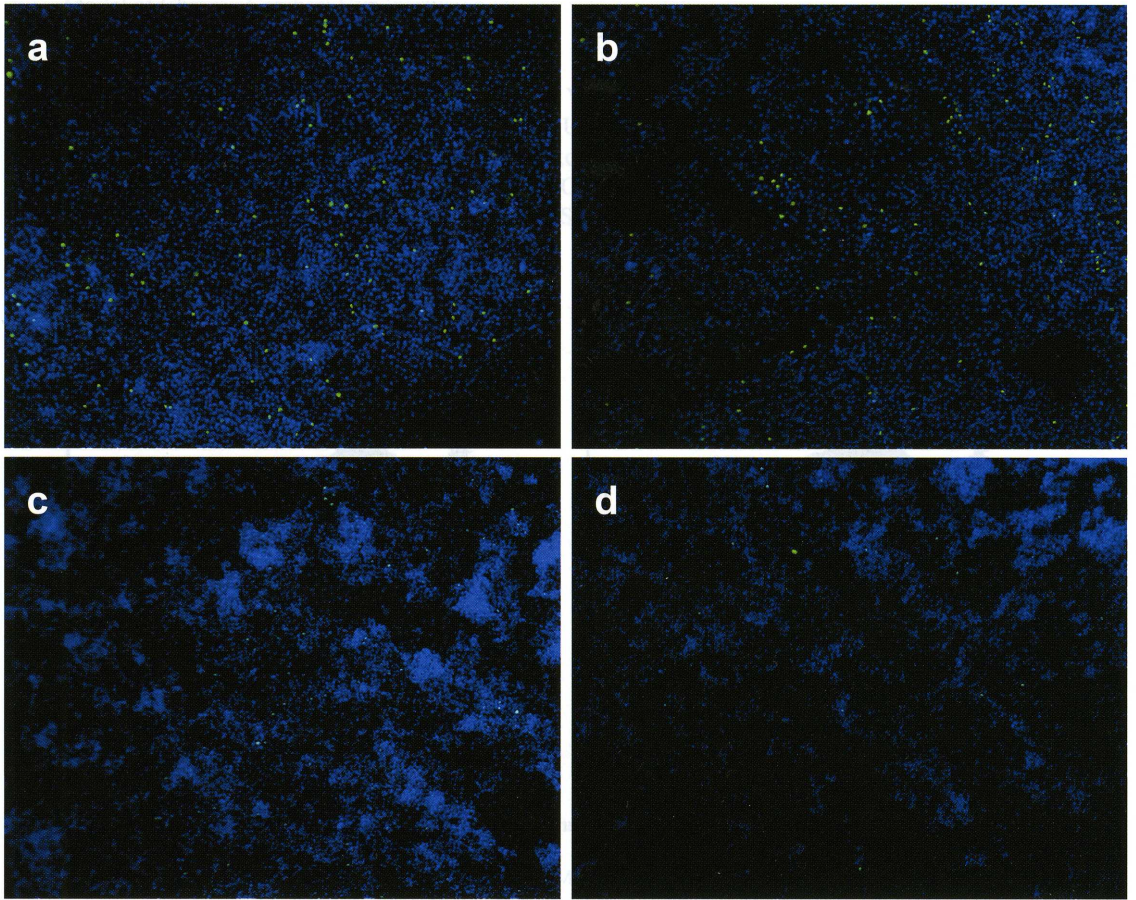


Fig. 8. Immunohistochemical detection of proliferating cells with M phase labeling for phospho-histone H3.

(a) Control (b) Tranilast 300 μM (c) CDDP 20 μM (d) CDDP 20 μM + Tranilast 300 μM

投与でも胃癌細胞に対し抗腫瘍効果を示し、抗癌剤との併用でさらに抗腫瘍効果の増強を認めた。

抗癌剤の作用機序として一般に腫瘍増殖抑制とアポトーシスの誘導がある。腫瘍細胞は一定の細胞周期特性 (cell kinetics) を持っている、細胞分裂を繰り返し増殖している。細胞周期からみると細胞集団は一様ではなく、固形癌塊の中心のように酸素や細胞生存に必要な物質の供給が十分になされない部分では細胞分裂は遅くなり、一部は分裂サイクルよりはずれて休眠期細胞 (dormant cells : G_0 期細胞) となっている。

このことは抗癌剤の基礎実験や臨床応用において重要で、治療効果に関連がある。今回の実験でも細胞が増殖し重なりあった状態では、抗

癌剤、tranilast の感受性は低下し、薬剤による胃癌細胞の形態変化も軽度であった。また抗癌剤は大きく cell cycle-dependent drug と cell cycle-independent drug に分けられる。細胞周期の特定の相に作用する薬剤は、一般的に細胞分裂が活発な腫瘍ほど有効性が高い。代謝拮抗剤やチューブリン蛋白阻害剤のような cell cycle-dependent drug は、DNA 合成期や細胞分裂期にある細胞に対しては効果があるが、non-cycling cells (G_0 期細胞) の分画が多く活発に分裂していない腫瘍に対しては有効性が低い。そのため臨床では、反復投与や持続投与が行われている。一方 DNA アルキル化剤やプラチナ化合物は細胞周期に関係なく腫瘍細胞に作用し、non-cycling cells にも殺細胞効果を発現する。

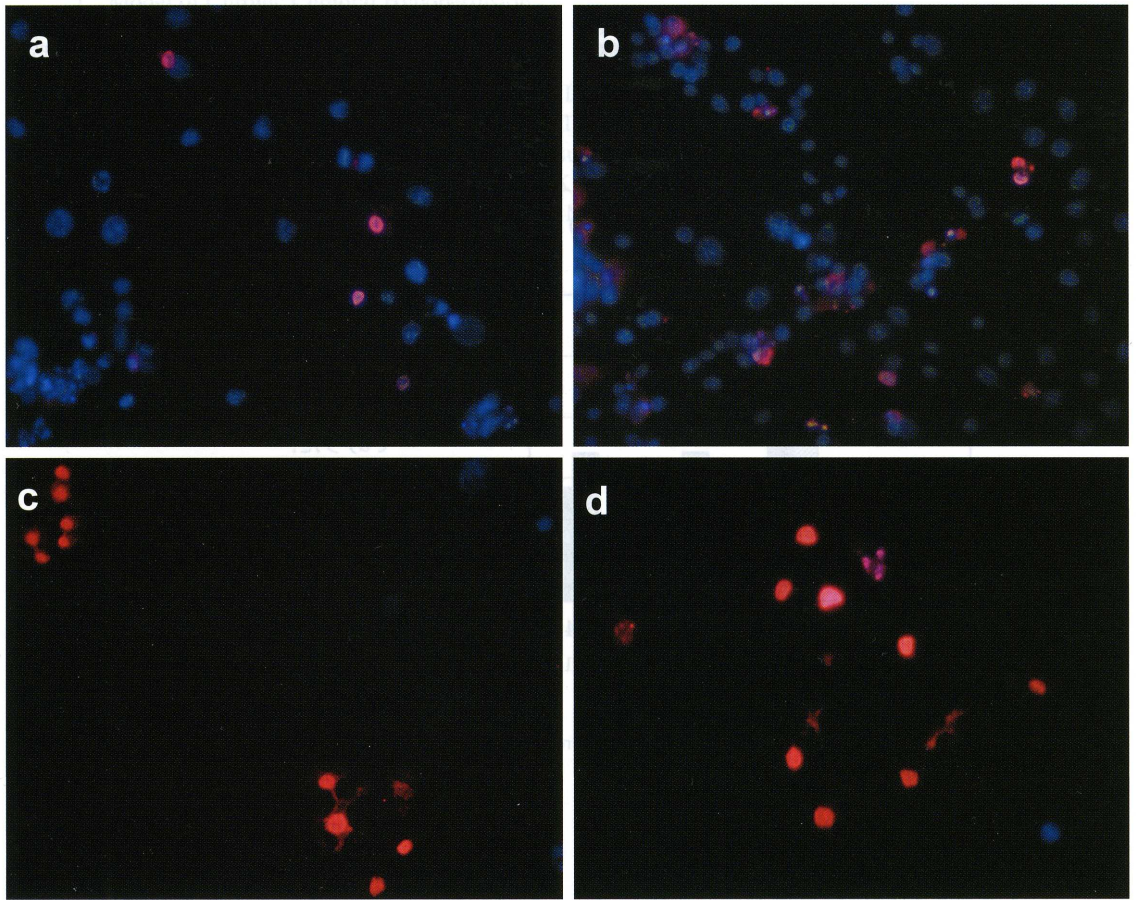


Fig. 9. Immunohistochemical detection of apoptotic cells with TUNEL method using TMR red.
 (a) Control (b) Tranilast 500 μ M (c) CDDP 20 μ M (d) CDDP 20 μ M + Tranilast 500 μ M

Tranilast が胃癌細胞の細胞周期に与える影響を FACS 解析したところ、MKN45 細胞において G_0G_1 期細胞の増加を認め、 G_1 停止による細胞増殖抑制が抗腫瘍効果の一つと考えられた。またアポトーシスの誘導では、TUNEL 法を用いた解析でアポトーシス細胞の増加も認めている。抗癌剤単独投与の作用として、CDDP は白金化合物で DNA 鎖上の二つのグアニン基に配位結合することにより DNA 合成を阻害し抗腫瘍効果を示す²⁶⁾。細胞周期に与える影響として CDDP の濃度上昇に従い G_0G_1 期細胞は減少するが、S 期や G_2M 期細胞は細胞の種類により異なると報告されている²⁷⁾。我々の結果でも G_0G_1 期細胞は濃度依存性の減少し、S 期、 G_2M 期細胞も減少した。Sub G_1 期細胞は

CDDP 単独投与と比較して tranilast 併用では増加がみられ、TUNEL での結果と一致してアポトーシス細胞が増加した。5-FU はフッ化ピリミジンで、その作用機序は RNA 機能障害、TS 阻害、FdUTP などの DNA への取り込み、および細胞膜障害がある²⁸⁾。細胞周期では低濃度では S 期の延長をきたし、高濃度では G_0G_1 期に細胞集積すると報告されている²⁹⁾。今回 5-FU 単独投与では、濃度依存性に S 期、 G_2M 期細胞は減少、Sub G_1 期細胞は増加した。この結果は今回 5-FU の作用時間が 48 時間だったことより、時間経過によりアポトーシスに相当する Sub G_1 期細胞の増加がみられたと考えられる。5-FU および tranilast 併用では G_0G_1 期細胞の増加はあるものの、TUNEL ではアポ

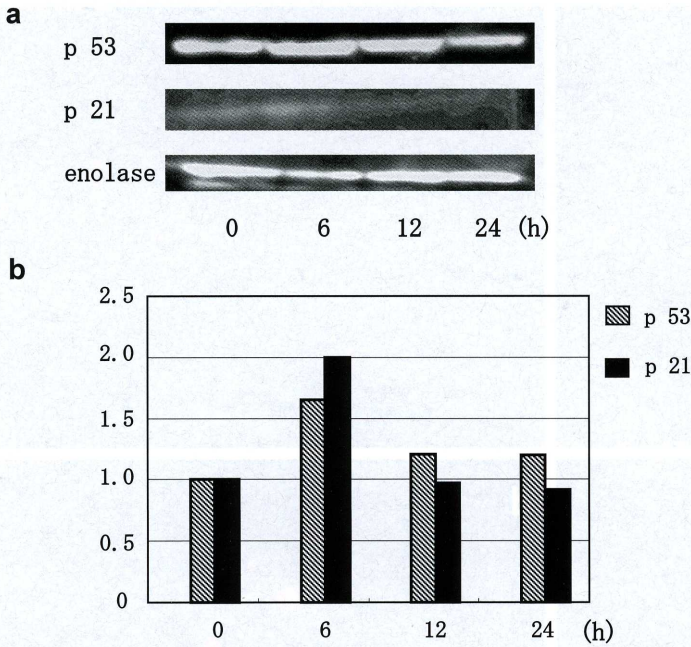


Fig. 10. Effect of tranilast on the expression of p 53, p 21 proteins using Western blotting.

(a) Time course study of the expression of p 53 and p 21

(b) The relative expressions of p 53 and p 21 proteins were estimated on a scanning densitometer.

トーション細胞の増加はみられず, tranilast の G_1 arrest による細胞増殖抑制効果が主に作用していた。

一方, TXL はチューブリン阻害剤で, 作用機序は微小管重合を促進, 安定化させ細胞分裂期において紡錘体の形成や機能に影響を及ぼし, 細胞周期を M 期で停止させ抗腫瘍効果を発揮する。胃癌細胞を TXL にて処理すると, G_2M 期細胞が増加し G_0G_1 期細胞が減少したが, tranilast を併用すると G_0G_1 期細胞が増加し, TXL の G_2M 期に対する作用よりも tranilast の G_0G_1 期への作用が増強されていた。また TUNEL では TXL 単独投与と比較して tranilast 併用ではアポトーシス細胞の増加を認めたが, これらの結果は薬剤濃度の変化や経時的な細胞周期の動態変化の解析等の問題があり, 今後の検討課題である。

胃癌細胞の tranilast 投与による M 期細胞に対する作用, およびアポトーシス細胞の形態変

化について免疫染色を行った。Tranilast 単独投与では M 期細胞に変化はなかったが, CDDP 投与では M 期細胞の減少がみられ, tranilast を併用すると M 期細胞はさらに減少し, FACS 解析による細胞動態変化と一致した。Tranilast のアポトーシス細胞の検出では, 核の膨張, 断片化は少数の細胞で見られるのみで, その形態変化は CDDP と比較して軽微であった。

ウェスタン・プロットによる p 53, p 21 の発現に対する効果では, tranilast による p 53, p 21 の発現増強がみられ, Shime ら¹⁴⁾ の報告と一致した。Tranilast は免疫染色, FACS 解析結果より M 期細胞の変化はなく, G_1 / S 期チェックポイントでの作用が考えられる。

この研究結果より, tranilast は胃癌細胞に対し抗腫瘍効果のある薬剤であることがあきらかになった。また臨床応用として分子量の大きな TXL と tranilast との繰り返し腹腔内投与を行うことで, 腹膜播種に対する治療効果が期待される。また, 細胞周期, アポトーシスのシグナル経路を含む抗腫瘍効果のメカニズムの解明することで, 新規抗腫瘍薬としての臨床応用に道が開ける。今後は tranilast の抗腫瘍効果のメカニズムに基づいてヒトを対象とした臨床試験を試み, 胃癌に対しての有用性を検討する必要があると考えられる。

結 論

Tranilast は臨床では, 抗アレルギー薬, ケロイド, 肥厚性瘢痕治療薬として用いられているが, 本研究で胃癌細胞株に対して直接的な抗腫瘍効果を示すことが明らかになった。Tranilast の抗腫瘍効果としては, アポトーシスの

誘導作用もみられるが、主な作用は G₁ arrest による細胞増殖抑制と考えられる。また CDDP, 5-FU, TXL との併用で抗腫瘍効果の増強が認められ、新たな抗腫瘍薬としての併用が示唆される。

謝 辞

本研究を行うにあたり御指導、御協力頂きました、川崎医科大学消化器外科平井敏弘教授、角田 司教授、川崎医科大学分子生物学濃野 勉教授および分子生物学教室、組織培養センターの皆様へ深謝いたします。

文 献

- 1) Tahara M, Ohtsu A, Boku N, Nagashima F, Muto M, Sano Y, Yoshida M, Mera K, Hironaka S, Tajiri H, Yoshida S : Sequential methotrexate and 5-fluorouracil therapy for gastric cancer patients with peritoneal dissemination : a retrospective study. *Gastric Cancer* 4 (4) : 212-218, 2001
- 2) 佐々木常雄, 太田和雄, 坂田 優, 松岡富男, 涌井 昭, 赤沢修吾, 小川一誠, 向山雄人, 吉野正暁, 坂井保信, 富永 健, 有吉 寛, 村上 稔, 星野 章, 小野芳孝, 阿部達生, 竹田彬一, 堀池重夫, 大谷 透 : 多施設共同研究による大量 Leucovorin, 5-FU 併用療法の進行胃癌および結腸・直腸癌に対する Phase II study. *癌と化療* 17 : 2361-2368, 1990
- 3) Koizumi W, Tanabe S, Saigenji K, Ohtsu A, Boku N, Nagashima F, Shirao K, Matsumura Y, Gotoh M : Phase I / II study of S-1 combined with cisplatin in patients with advanced gastric cancer. *Br J Cancer* 89 : 2207-2212, 2003
- 4) 曳野 肇, 山田貴子, 畑 俊行, 中村健一, 杉本真一, 金澤旭宣, 徳家敦夫, 尾崎信弘 : 胃癌癌性腹膜炎に対する Weekly Paclitaxel 投与方法の有用性. *癌と化療* 31 : 759-761, 2004
- 5) 吉田和弘, 峠 哲哉 : 高度進行胃癌における TS-1 および Docetaxel 治療の有用性. *癌と化療* 31 : 1982-1986, 2004
- 6) 八代正和, 平川弘聖 : 腹膜播種性転移の病態メカニズムと分子標的治療. *臨外* 61 : 733-740, 2006
- 7) Suzawa H, Kikuchi S, Arai N, Koda A : The mechanism involved in the inhibitory action of Tranilast on collagen biosynthesis of keloid fibroblasts. *Japan J Pharmacol* 60 (2) : 91-96, 1992
- 8) Ujiie A, Kojima M, Naito J, Nakazawa M : Effect of N-5' on histamine release from rat peritoneal exudata cells induced by calcium ionophore and ATP. *Japan J Pharmacol* 34 : 9-14, 1984
- 9) 須澤東夫, 菊池伸次, 市川 潔 : アレルギー疾患治療薬 Tranilast の Cytokine 産生・遊離に対する抑制作用. *応用薬理* 43 (5) : 409-414, 1992
- 10) 山村秀樹, 河野茂勝, 大幡勝也 : Tranilast のアナフィラキシー性 Chemical Mediator 遊離抑制作用. *アレルギー* 36 (10) : 937-942, 1987
- 11) 菊池伸次, 市川 潔, 須澤東夫, 浜野修一郎, 宮田廣志 : Tranilast および他の抗アレルギー薬のコラーゲン合成およびサイトカイン産生, 遊離に対する作用. *基礎と臨床* 26 (11) : 4377-4383, 1992
- 12) 市川 潔, 須澤東夫, 土屋興巨, 山田幸一郎, 菊池伸次, 荒井伸彦, 浜野秀一郎, 小松英忠, 宮田廣志, 杉本智透 : Tranilast, Triamcinolone および Heparin 類似物質の Keloid および肥厚性癬痕に対する作用比較. *応用薬理* 43 (5) : 401-407, 1992
- 13) Katoh N, Hirano S, Yasuno H : Solitary Mastocytoma treated with Tranilast. *Dermatol* 23 : 335-339, 1996
- 14) Shime H, Kariya M, Orii A, Momma C, Kanamori T, Fukuhara K, Kusakari T, Tsuruta Y, Takakura K, Nikaido T, Fujii S : Tranilast inhibits the proliferation of uterine leiomyoma cells in vitro through G1 arrest associated with the induction of p 21 and p 53. *J Clin Endocrinol Metab* 87 (12) : 5610-5617, 2002
- 15) Platten M, Wild-bode C, Wick W, Leitlein J, Dichgans J, Weller M : N-[3, 4-dimethoxycinnamoyl]- anthranilic acid (Tranilast) inhibits transforming growth factor- β release and reduces migration and invasiveness of human malignant glioma cells. *Int J Cancer* 93 : 53-61, 2001

- 16) Yasunami J, Aoki S, Fukuno Y, Kikuchi Y, Kawashima M, Hayashi S : Antiangiogenic and antitumor effects of tranilast on mouse lung carcinoma cells. *Int J Oncol* 17 : 1151 - 1156, 2000
- 17) Hiroi M, Onda M, Uchida E, Aimoto T : Antitumor effect of N-[3,4-dimethoxycinnamoyl]-anthranilic acid (Tranilast) on experimental pancreatic cancer. *J Nippon Med Sch* 69 : 224 - 234, 2002
- 18) Noguchi N, Kawashiri S, Tanaka A, Kato K, Nakaya H : Effect of fibroblast growth inhibitor on proliferation and metastasis of oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 39 : 240 - 247, 2003
- 19) Yashiro M, Murahashi K, Matsuoka T, Nakazawa K, Tanaka H, Osaka H, Koyama T, Ohira M, Hirakawa K, Chung YS : Tranilast (N-3,4-dimethoxycinnamoyl-anthranilic acid) : a novel inhibitor of invasion-stimulating interaction between gastric cancer cells and orthotopic fibroblasts. *Anticancer Res* 23 : 3899 - 3904, 2003
- 20) Ochiai A, Yasui W, Tahara E : Growth-promoting effect of gastrin on human gastric carcinoma cell line TMK-1. *Jpn J Cancer Res (Gann)* 76 : 1064 - 1071, 1985
- 21) Goto H, Tomono Y, Ajiro K, Kosako H, Fujita M, Sakurai M, Okawa K, Iwamatsu A, Okigaki T, Takahashi T, Inagaki M : Identification of a novel phosphorylation site on histone H3 coupled with mitotic chromosome condensation. *J Biol Chem* 274 : 25543 - 25549, 1999
- 22) Bradford MM : A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72 : 248 - 254, 1976
- 23) 山村義孝, 小寺泰弘, 紀藤 毅 : 胃癌の組織型と臨床的特徴 : 転移浸潤形式と予後. *癌の臨床*45 : 841 - 846, 1999
- 24) Adachi S, Maruyama T, Kondo T, Todoroki T, Fukao K : The prevention of postoperative intraperitoneal adhesions by tranilast : N-(3,4-dimethoxycinnamoyl) anthranilic acid. *Surg Today* 29 (1) : 51 - 54, 1999
- 25) Cooper K, Young J, Wadsworth S, Cui H, Dizerega GS, Rodgers KE : Reduction of post-surgical adhesion formation with tranilast. *J Surg Res* 141 (2) : 153 - 161, 2007
- 26) Rosenberg B, Van Camp L, Traskio J K, Mansour V H : Platinum compounds : a new class of potent antitumor agents. *Nature* 222 : 385 - 386, 1969
- 27) 井上勝一 : Flow cytometry による Platinum 化合物の細胞薬理学的検討. *Oncologia* 23 : 12 - 20, 1990
- 28) Duschinsky R, Plevin E, Heidelberger C : The synthesis of 5-fluoropyrimidines. *J Am Chem Soc* 79 : 45 - 59, 1957
- 29) 熊井恵美, 高橋幸明, 金井直樹, 海野徳二 : Flow cytometry を用いたヒト上顎癌培養細胞に対する抗癌剤作用効果の検討. *日耳鼻* 90 : 28 - 34, 1987