

ヘパラーゼ：癌の浸潤・転移における役割

大阪医科大学泌尿器科学教室（主任：勝岡洋治教授）

郷司 和男, 勝岡 洋治

神戸大学医学部泌尿器科学教室（主任：守殿貞夫教授）

岡本 雅之, 守殿 貞夫

神戸大学医学部第二病理学教室（主任：前田 盛教授）

北 澤 莊 平

ノバルティスファーマ研究所

豊島美菜子, 董 堅, 中島 元夫

HUMAN HEPARANASE: ROLES IN INVASION
AND METASTASIS OF CANCER

Kazuo GOHJI and Yoji KATSUOKA

From the Department of Urology, Osaka Medical College

Masayuki OKAMOTO and Sadao KAMIDONO

From the Department of Urology, Kobe University School of Medicine

Sohei KITAZAWA

From the Department of 2nd Pathology, Kobe University School of Medicine

Minako TOYOSHIMA, Jian DONG and Motowo NAKAJIMA

From the Biology Research, Novartis Pharma Tsukuba Institute

Heparanase, which is an extracellular matrix degradative enzyme, degrades heparan sulfate and heparan sulfate proteoglycans, which are chief components of extracellular matrix and vascular basement membrane. The gene structure of this enzyme was recently determined. The biological functions of this enzyme in vivo were as follows: 1) this enzyme accelerates cancer cell invasion and metastasis though the degradation of vascular basement membrane and extracellular matrix by cancer cells; 2) this enzyme releases and activates heparin-binding growth factors such as bFGF and VEGF from heparan sulfate proteoglycans, and induces angiogenesis; 3) the degradative products of heparan sulfate proteoglycans by this enzyme suppress the biological function of activated T-lymphocytes. Therefore, heparanase is thought to be a favorable molecule for acceleration of cancer invasion and metastasis. The expression of heparanase is strongly correlated with the metastasis of melanoma and fibrosarcoma. Thus, heparanase may play important roles in invasion and metastasis of cancer. (Acta Urol. Jpn. 46: 757-762, 2000)

Key words: Heparanase, Invasion, Metastasis, Cancer

緒 言

尿路上皮癌は泌尿器科領域の悪性腫瘍のうち最も頻度の高いものとされる¹⁾ 近年, cis-platinum をふくむ多剤併用化学療法のレジメン開発, paxitase といった new drug の出現にしたいが進行性尿路上皮癌の予後改善が期待されている²⁾ しかし, 本症に最も有効とされ一般に広く行われている M-VAC 療法を受けた進行性尿路上皮癌患者の10年生存率はわずか7%と決して満足すべきものではない³⁾ そこでこれら進行性尿路上皮癌患者の予後改善のためには, 尿路上

皮癌が浸潤・転移をきたす分子機構をよく理解し, その機構を阻止することで浸潤・転移を抑制し, 患者の予後改善に結びつくと考えられる。

一方, 近年エンド-β-D-グルクロニダーゼの一種であるヘパラーゼは細胞外マトリックス分解酵素であり, 細胞が浸潤・転移をきたすのに重要な働きをする酵素であることが明らかにされつつある⁴⁻⁷⁾ 今回われわれはヘパラーゼについて概説すると共に尿路上皮癌の浸潤・転移におけるヘパラーゼの意義につき検討を加えた。

1. 癌の浸潤・転移の成立機序

癌の浸潤・転移機序は単一の分子により説明できるほど単純ではなく、いくつかの複雑なステップを経てはじめて成立するとされている⁸⁾ 癌の浸潤・転移の成立機序を Fig. 1 に示す すなわち、原発巣で増殖した癌細胞はマトリックスメタロプロテナーゼに代表される細胞外マトリックス分解酵素の作用により細胞外マトリックスを破壊し周囲へ浸潤、また auto-crine mortality factor などの作用をうけ遊走する。通常癌細胞はその病巣の大きさが直径 1~2 mm の範囲であれば自ら増殖に必要な栄養素を得ることができるが、それ以上の大きさになると間質あるいは癌細胞が分泌する各種血管新生因子の作用を受けた血管内皮細胞が遊走、浸潤、増殖および管腔を形成して血管新生が生じるとされる⁹⁾

2. ヘパラーゼとは

基底膜 (basement membrane) は、あらゆる組織において実質細胞と結合組織の間に存在する境界膜で癌細胞が浸潤・転移を形成するためには、この基底膜を通過することが必須である。基底膜はタイプ IV, V, VII などのコラーゲン、ラミニン、フィブロネクチン、ヒドロネクチンなどの糖蛋白とヘパラン硫酸プロテオグリカンおよびコンドロイチン硫酸プロテオグリカンよりなる強固なマトリックスである。ヘパラーゼは、1983年共同研究者の中島らによって発見されたメラノーマ細胞が産生しているヘパラン硫酸を特異的に分解するエンド β -D-グルクロニターゼである⁴⁾ このヘパラーゼはヘパラン硫酸と構造が類似するヘパリンを分解できないばかりか逆にヘパリンによってその活性が阻害される。1983年の発見以来、多くの研究者がその遺伝子構造を明らかにするために多大な労力を費やしてきた。1999年7月1日発行の Nature Medicine に異なった二つの研究所より、また同年9月1日発行の Journal of Biological chemis-

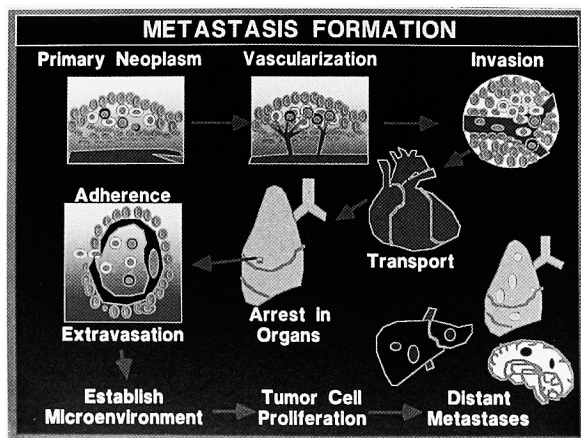


Fig. 1. Metastatic formation.

tory に共同研究者の中島らによってヒトヘパラーゼの精製と遺伝子のクローニングが報告された (投稿された月日は中島らの報告が他の二つの報告に比べて半年以上も早い)⁵⁻⁷⁾ ヘパラーゼ遺伝子のクローニングについての詳細はそれぞれの論文を参照していただきたいが、その概略を Fig. 2 に示す すなわち、ヒトヘパラーゼには分子量 50 KDa の活性型と 65 KDa の非活性型 (潜在型) が存在する。遺伝子は染色体上 4q21-22 に存在し、その mRNA は 5 Kbase で 1.8 Kbase の alternative splicing product が存在する。また、ヘパラーゼは生体内では pH 4.0~6.5 で活性を呈してその活性は pH 4.2 付近で最大となる。

3. 生体におけるヘパラーゼの役割

ヘパラーゼの基質であるヘパラン硫酸/ヘパラン硫酸プロテオグリカンは生体において、1) 細胞膜表面、2) 細胞外マトリックスおよび 3) 血管基底膜に存在している。これらは、1) 細胞接着に関与していること¹⁰⁾、2) 細胞外マトリックス、血管基底膜の骨格を形成していること¹⁰⁾および 3) bFGF, VEGF, TGF- β , IL-2 などの cytokine, growth factor を抱合しそれらの活性を抑制している¹⁰⁾、などの生理的役割を果たしている (Fig. 3)。ヘパラーゼはこれらの基質を分解し、1) 細胞の接着能を亢進させる¹¹⁾、2) 細胞の浸潤を促進する¹¹⁾、3) 抱合されていた bFGF, VEGF などのヘパリン結合性成長因子を遊離、活性化し、血管新生を惹起促進する¹²⁾、4) ヘパラーゼにより分解されたヘパラン硫酸の分解産物であるオリゴ糖は活性化 T 細胞の活性を抑制し、宿主の免疫能を低下させるなどの生理作用を有しており、癌細胞が転移・浸潤をきたすのに非常に都合の良い細胞外マトリックス分解酵素である。

4. 癌細胞とヘパラーゼ

前述したようにヘパラーゼは1983年に共同研究者の中島らによって命名された細胞外マトリックス分解

Human Heparanase

Protein

- Latent form: 65 kDa, 543 amino acids
- Active form: 50 kDa, 386 amino acids
- 6 potential N-glycosylation sites

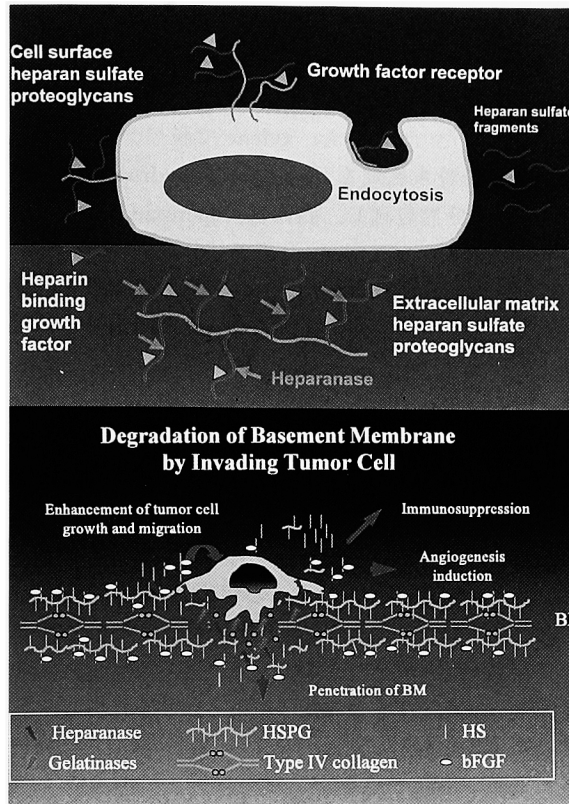
Gene

- 4q21-22
- 14 exons, 13 introns
- mRNA: 5 kb, 1.8 kb (alternative splicing products)

Enzyme activity

- endo- β -D-glucuronidase
- pH 4-6.5

Fig. 2. Characterization of human heparanase.

Fig. 3. Role of heparanase *in vivo*.

酵素でありこの酵素活性と B16 マウスメラノーマ細胞の肺転移能との間に正の相関関係があることが報告されている¹³⁾。その後ヒトメラノーマ細胞、およびマウス線維肉腫細胞でもヘパラーゼ活性とその転移能がよく相関していることが示された¹⁴⁾。さらに最近ヘパラーゼ遺伝子を導入させたヒト A375SM メラノーマ細胞では肺への転移能が著しく亢進していること、マウス T-lymphoma 細胞に同様にヘパラーゼ遺伝子を導入した細胞は肝への転移能の亢進がみられることが報告されている⁶⁾。またヒト乳癌細胞でのヘパラーゼ mRNA の発現が RT-PCR 法で検討され、non-metastatic MCF-7 乳癌細胞はヘパラーゼ mRNA の発現を認めなかったのに moderately-metastatic MDA231 細胞、および highly-metastatic MDA435 細胞ではヘパラーゼ mRNA の発現を認めている⁶⁾。また、癌の stage, grade との相関はまだ明らかにされていないがヒト肝癌、大腸癌、子宮頸癌では *in situ hybridization* 法によってそれぞれの正常組織では認められないヘパラーゼ mRNA の発現が認められている⁶⁾。一方、泌尿器科領域の悪性腫瘍のうちヒト前立腺癌細胞である PC3M 細胞はヘパラーゼの発現により血管基底膜の破壊が亢進していることが報告されている^{15, 16)}。

5. 尿路上皮癌におけるヘパラーゼの発現

尿路上皮癌におけるヘパラーゼの発現の有無と浸

潤・転移および血管新生との関係について検討した。対象は1996年1月より1998年12月までの間に外科的に切除した尿路上皮癌45例（膀胱癌：37例、腎盂尿管癌：8例）である。切除組織はホルマリン固定後、パラフィン包埋組織を作成した。腫瘍の組織型は全例移行上皮癌でその分化度は、WHO 分類の grade 1：10例、grade 2：17例、grade 3：18例であった。また深達度は TNM にしたがえば全例遠隔転移を有さず、PTa：4例、PT₁：11例、PT₂：10例、PT₃：11例、PT₄：9例、N(+)：12例であった (Fig. 4)。またヘパラーゼの発現を検討する方法として 1) *in situ hybridization* 法および 2) 免疫組織染色法を用いた。

1) *In situ hybridization* 法

われわれが既に報告した方法に準じて行った¹⁷⁾。すなわち、ヒトメラノーマ培養細胞より acid-guanidium-phenol-chloroform 法によって total RNA を抽出する。Sense (5'-AAGCACAGGACGTCGTGGACCT-3') および antisense (5'-GTGTTCTCGGAGTAGCAATTGCTCCTG-3') oligonucleotide primer を用いて RT-PCR 法によって 365 bp ヒトヘパラーゼ cDNA を増幅作成する。この RT-PCR 産物が目的とするヒトヘパラーゼの fragment であることを dideoxy termination 法と ABIPRISM-310 automated sequencer により確認後 digoxigenin (DIG) でラベルした一本鎖 DNA probe を作成した (Fig. 5)^{17, 18)}。パラフィン包埋ブロックより厚さ 4 μm の薄切標本を作成後 xylene で脱パラフィン化し、100, 95, 70% および 50% の ethanol に順次浸して脱水処理を施す。次に標本を 2 μg/ml proteinase K (Sigma, St. Louis, MO) で10分間処理、4% PFA で再固定、0.1 M triethanolamin (pH 8.0) で10分、0.25% 酢酸含有 0.1 M triethanolamin 溶液に15分間浸し、0.1 M PBS (pH 7.4) で軽くすすぐ。標本は moist chamber 内で 50°C で16時間 hybridization medium (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 600 mM NaCl, 0.25% sodium dodecyl sulfate, 1x Denhardt's medium, 50% (v/v) deionized formamide, 1 ng/ml DNA

Patients

January 1996 ~ December 1998
Transitional cell carcinoma : 45 patients
32 ~ 81 years (median : 66)

Sex	Grade
Male/Female : 37/8	1 : 10
PT	2 : 17
Ta : 4	3 : 18
T ₁ : 11	LN
T ₂ : 10	(-) : 33
T ₃ : 11	(+) : 12
T ₄ : 9	
Normal urothelium : 10	

Fig. 4. Patient characteristics.

Probe Labeling

Uni-directional PCR

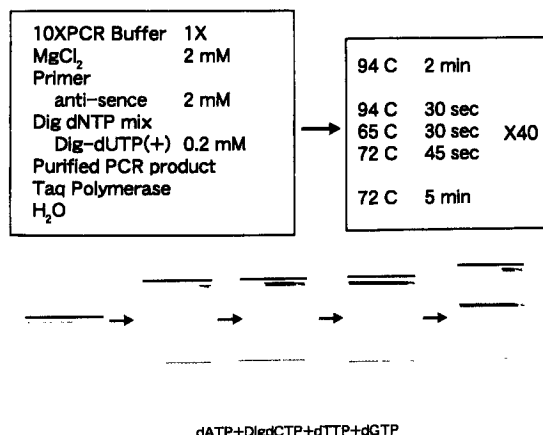


Fig. 5. Methods of probe labeling for *in situ* hybridization.

probe および 10% dextran sulfate) 中で incubate する。Hybridization 後、標本を 50% deionized formamide/2×SCC で軽くすすぎさらに 2×SCC, 0.2×SCC で洗浄する。標本を 1.5% non-fat milk 溶液で 30 分処理後 alkaline phosphatase (ALP)-anti-DIG 抗体 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim Germany) 中で 1 時間 incubate する。150 mM NaCl 含有 100 mM Tris-HCl (pH 7.5) で各々 20 分間 2 度洗浄し、100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂ 含有 100 mM Tris-HCl (pH 9.5) 中に標本を浸し nitro-blue tetrazolium salt および bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate 溶液 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim Germany) 中、遮光下に 5 時間呈色反応を行った後、1 mM EDTA 10 mM, Tris-HCl (pH 8.0) で反応を停止させる。スライドを CRYSTAL/MOUNT™ (Biomedica, Foster City, CA) でマウントして光学顕微鏡下に陽性細胞をカウントした (Fig. 6)。

2) 免疫組織染色

ホルマリン包埋ブロックより厚さ 4 μm の標本を作成し、通常の avidin/biotin peroxidase 法で免疫組織染色を行った。すなわち、xylene で脱パラフィン後、ethomol で脱水処理を行い、0.3% hydrogen peroxidase で 20 分間処理し、内因性の peroxidase 活性をブロックした。10% goat 血清で 40 分間処理後、rabbit anti-human heparanase polyclonal 抗体を 4°C, 14 時間作用させた。洗浄後、biotinylated anti-goat 2 次抗体および horseradish peroxidase-conjugated antibody (Vectastain ABC-peroxidase Kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA) で 30 分間処理した。その後室温で 3 分間 0.05% hydrogen peroxidase を含有する diaminobenzidine chromogen を作用させ hematoxylin で counter 染色を行った。

3) *In situ* hybridization および免疫組織染色の判定

In situ hybridization 法および免疫組織染色共、光学顕微鏡高倍率視野 (×400) 下に 1,000 個の細胞を数え、うち陽性を呈する細胞の占める割合を算出し以下の基準により判定した。

- ≤25% : 陰性 (—)
- 26~50% : 弱陽性 (±)
- 51~75% : 陽性 (+)
- ≥76% : 強陽性 (++)

4) 尿路上皮癌におけるヘパラーゼの発現

In situ hybridization と免疫組織染色を同時に施行した 19 例の結果を Table 1 に示す N(0) 症例では high-stage のもとでヘパラーゼ mRNA および蛋白の発現を low-stage のものに比べて高率に認めた。また、pT_{a+1} の表在癌でも mRNA の発現を 25% の例で認めたのに対して蛋白の発現は 1 例も認めなかった。N(+) の進行例では全例で mRNA および蛋白の発現を認め、このうち high-grade 例では low-grade の例に比べ共に高率に発現を認めた。またヘパラーゼ蛋白の発現を検討した 45 例での発現の程度は

In situ hybridization

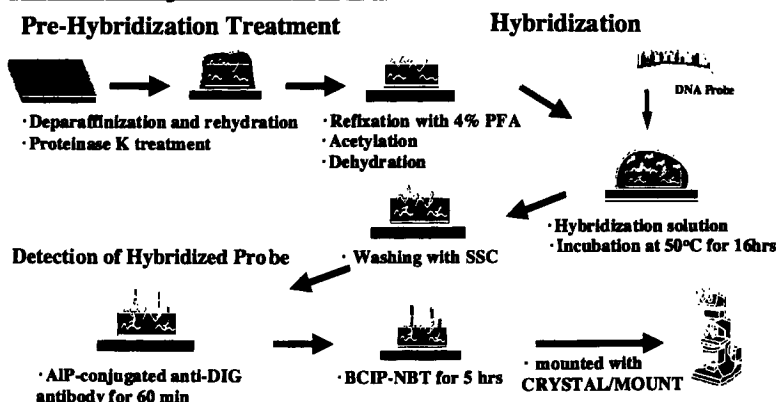


Fig. 6. Methods of *in situ* hybridization.

Table 1. Expression of heparanase protein and heparanase mRNA in multistage urothelial cancer

Subjects	N	IHS ¹⁾ (%)	ISH ²⁾ (%)
N(0)			
PT _{a+1}	4	0 (0)	1 (25)
PT ₂	4	0 (0)	3 (75)
PT ₃	1	1 (100)	0 (0)
PT ₄	4	3 (75)	3 (75)
N(1-2)			
PT ₃₋₄	6	6 (100)	6 (100)
Grade			
1+2	9	3 (33)	4 (44)
3	10	7 (70)	9 (90)
Total	19	10 (52)	13 (68)

¹⁾ IHS: Immunohistostaining, ²⁾ ISH: *In situ* Hybridization.

筋層浸潤を有するものは表在癌に比べて (73% vs. 13%, $p=0.0001$), リンパ節転移を有するものは有さないものに比べて (83% vs. 42%, $p=0.015$) 有意に発現率は高かった。さらに, 異型度の高いものは低いものに比べて, 有意にその発現は高かった (83% vs. 33%, $p=0.007$)。

6. 癌転移抑制への新しいターゲットとしてヘパラーゼ

ヘパラーゼが今後尿路上皮癌の浸潤・転移抑制のための新しいターゲット分子になりえるかを考察してみた。ヘパリンはヘパラーゼの強力な活性阻害物質であることは知られている¹⁸⁾。一方ではヘパリンは血小板凝集や血液凝固を阻害することで抗転移効果を示すと考えられる。しかし, 臨床の場合においてヘパリンはその抗凝固活性のためなかなか転移抑制剤として用いることは困難と思われる。そこで強いヘパラーゼ阻害活性を保持しつつ抗凝固活性を失った種々のヘパリン誘導体が調製され, これらのヘパリン誘導体はマウス B16 メラノーマ細胞の肺転移を抑制した¹⁹⁾。すなわち, これらヘパリン誘導体で処理したメラノーマ細胞をマウスの尾静脈に注射すると21日後に肺転移結節数は無治療群に比べ激減した¹⁹⁾。また, 既に前立腺癌をはじめとする悪性腫瘍や AIDS で臨床試験が行われているスラミンは, 増殖因子が細胞表面のレセプターに結合するのを阻害することでその効果を現すとされている。しかし, スラミンは, 増殖因子がレセプターに結合するのを阻害する濃度よりはるかに低い濃度で癌細胞のヘパラーゼ活性を抑制し, 浸潤・転移を抑制することが実験的に証明されている²⁰⁾。癌の浸潤・転移および血管新生に重要な役割を果たしているヘパラーゼの遺伝子構造が明らかにされた今日, 本酵素の産生・分泌あるいは生理的活性

を阻害することは癌転移を抑制する可能性を示唆している。それゆえヘパラーゼは癌転移抑制の新しいターゲット分子となり得ると思われる。

文 献

- 1) Silverberg E and Lubera JA: Cancer statistics—1989. *CA Cancer J Clin* **39**: 3-20, 1989
- 2) Moore MJ, Winkist EW, Murray N, et al.: Gemcitabine plus cisplatin, an active regimen in advanced urothelial cancer: a phase II trial of the National Cancer Institute of Canada clinical trials group. *J Clin Oncol* **17**: 2876-2881, 1999
- 3) Saxman SB, Propert KJ, Einhorn LH, et al.: Long-term follow-up of a phase III intergroup study of cisplatin alone or in combination with methotrexate, vinblastine, and doxorubicin in patients with metastatic urothelial cancer; a cooperative group study. *J Clin Oncol* **15**: 2564-2569, 1997
- 4) Nakajima M, Irimura T, Di Ferrante D, et al.: Heparan sulfate degradation: relation to tumor invasion and metastatic properties of mouse B16 melanoma sublines. *Science (Washington DC)* **220**: 611-613, 1983
- 5) Toyoshima M and Nakajima M: Human heparanase. purification, characterization, cloning, and expression. *J Biol Chem* **274**: 24153-24160, 1999
- 6) Vlodavsky I, Friedmann Y, Elkin M, et al.: Mammalian heparanase: gene cloning, expression and function in tumor progression and metastasis. *Nature Med* **5**: 793-802, 1999
- 7) Hulett MP, Freeman C, Hamdorf BJ, et al.: Cloning of mammalian heparanase, an important enzyme in tumor invasion and metastasis. *Nature Med* **5**: 803-809, 1999
- 8) Fidler IJ: Critical factors in the biology of human cancer metastasis: twenty-eight G.H.A. Clowes Memorial Award Lecture. *Cancer Res* **50**: 6130-6138, 1990
- 9) Folkman J: The role of angiogenesis in tumor growths. *Semin Cancer Biol* **3**: 65-71, 1992
- 10) Hileman RE, Fromm JR, Weiler JM, et al.: Glycosaminoglycan-protein interacts: definition of consensus sites in glycosaminoglycan binding proteins. *Bioessays* **20**: 156-167, 1998
- 11) Rapraeger AC: The coordinated regulation of heparan sulfate, syndecans and cell behavior. *Curr Opin Cell Biol* **5**: 844-853, 1993
- 12) Vlodavsky I, Korner G, Ishai-Michaeli R, et al.: Extracellular matrix-resident growth factors and enzymes: possible involvement in tumor metastasis and angiogenesis. *Cancer Metastasis Rev* **9**: 203-226, 1990
- 13) Nakajima M, Irimura T, Di Ferrante N, et al.: Metastatic melanoma cell heparanase: characterization of heparan sulfate degradation fragments

- produced by B16 melanoma endoglucuronidase. *J Biol Chem* **259**: 2283-2290, 1984
- 14) Ricoveri W and Cappelletti R: Heparan sulfate endoglycosidase and metastatic potential in murine fibrosarcoma and melanoma. *Cancer Res* **46**: 3855-3861, 1986
- 15) Kosir MA, Quinn CCV, Zukowski KL, et al.: Human prostate carcinoma cells produce extracellular heparanase. *J Surg Res* **67**: 98-105, 1997
- 16) Kosir MA, Wang W, Zukowski KL, et al.: Degradation of basement membrane by prostate tumor heparanase. *J Surg Res* **81**: 42-47, 1999
- 17) Kitazawa R, Kitazawa S, Kashimoto H, et al.: Expression of bone morphogenetic protein (BMPs) in fractured mouse bone tissue: in situ hybridization with polymerase chain reaction (PCR)-derived antisense DNA probe. *Acta Histochem Cytochem* **31**: 231-236, 1998
- 18) Nakajima M, Irimura T, Di Ferrante D, et al.: Metastatic melanoma cell heparanase: characterization of heparan sulfate degradation fragments produced by B16 melanoma endoglucuronidase. *J Biol Chem* **259**: 2283-2290, 1984
- 19) Irimura T, Nakajima M and Nicolson GL: Chemically modified heparins as inhibitors of heparan sulfate specific endo- β -glucuronidase (heparanase) of metastatic melanoma cells. *Biochemistry* **25**: 5322-5328, 1986
- 20) Nakajima M, DeChavigny A, Johnson CE, et al.: Suramin. a potent inhibitor of melanoma heparanase and invasion. *J Biol Chem* **266**: 9661-9666, 1991

(Received on September 11, 2000)
(Accepted on September 11, 2000)