



ポリアミンの体内動態を検索するための方法論
の開発と固形癌への応用

(13672261)

平成13年度～平成16年度科学研究費補助金（基盤研究(C)(2)）

研究成果報告書

平成17年4月

研究代表者 鮫島啓二郎

(城西大学薬学部教授)

ポリアミンの体内動態を検索するための方法論
の開発と固形癌への応用

(13672261)

平成 13 年度～平成 16 年度科学研究費補助金 (基盤研究(C)(2))

研究成果報告書

平成 17 年 4 月

研究代表者 鮫島啓二郎

(城西大学薬学部教授)

は し が き

本研究の最終目標は、ポリアミンを調節して癌の治療に役立たせるための方策を見出すことにある。これまで行われてきた多くの研究では、ポリアミンの枯渇による癌細胞死を目指して種々の化合物が開発され、培養細胞レベルでは目覚ましい成果をあげてきた。しかし、担癌動物或いは癌患者にそれを適用すると、毒性の問題やポリアミンの取り込みの問題などのために、まだ目的達成の目途は立っていない。本研究では癌細胞の死滅を目指すのではなく、避けられないポリアミンの取り込みを前提として、癌細胞の増殖速度の低下或いは増殖停止を目指している。そのために、自然界で一般的に観察されるように、細胞増殖時に増えるスペルミジン(spd)量を減らし、細胞増殖時に減るスペルミン(spm)量を増やすことが一つの方策として考えられた。この spd, spm レベルの変化の方向性は、培養細胞でスペルミジン合成酵素(spd-syn)を阻害したときに観察される方向性と同じであり、in vivo で spd-syn を阻害した時の細胞増殖に及ぼす影響は興味ある問題であった。しかし、in vivo 研究を推進するためには、多数の生体試料中ポリアミンを正確・迅速に測定する必要があり、また、有用な spd-syn 阻害剤を開発する必要があった。これらの基本的な問題を解決するために、測定法としては HPLC のように分離に時間がかかる方法ではなく、当研究室で開発したイオンスプレーイオン化マスマススペクトロメトリー(IS-MS)によるポリアミン分析法を拡張、改良した後、それを利用することとし、阻害剤の開発では、ラット spd-syn の三次元構造の解明が役立つと考えられたので、それを並行して行った。これらの問題を解決した後、ラットに阻害剤を経口投与することにより人為的に spm : spd 比を高めたラットの調整が可能になったことがわかり、そのようなラットでは増殖が抑制されることを示した。本研究内容を次の5項目に分けて報告する。

- 1 ^{15}N -標識ポリアミンを用いるトレーサー実験法
 - (1) 開発
 - (2) ポリアミンの吸収・分布・代謝・排泄 (ADME)研究への応用
- 2 IS-MS によるジアセチルスペルミンとポリアミンの同時分析法
- 3 哺乳動物 spd-syn の三次元構造と阻害剤の開発
- 4 阻害剤の選択と spd-syn 阻害モデルラットの調整
- 5 モデルラットにおける肝再生の抑制

研究組織

研究代表者： 鮫島 啓二郎 (城西大学 薬学部 教授)
研究分担者： 新津 勝 (城西大学 薬学部 助教授)
研究分担者： 合田 ひとみ (城西大学 薬学部 助手)
(研究協力者： 古海 直美、天野 大介、許 泳吉、原 健、竹田 昇、
小林 正樹、渡邊 寿子、和田 牧子、細田 晴美、白幡 晶)

交付決定額 (配分額) (金額単位：千円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 13 年度	1, 1 0 0	0	1, 1 0 0
平成 14 年度	8 0 0	0	8 0 0
平成 15 年度	8 0 0	0	8 0 0
平成 16 年度	8 0 0	0	8 0 0
総 計	3, 5 0 0	0	3, 5 0 0

研究発表

(1) 学会誌

Y. J. Xu, T. Hara, K. Samejima, H. Sasaki, M. Kobayashi, A. Takahashi, and M. Niitsu: Simultaneous Determination of Endogenous and Orally Administered ^{15}N -Labeled Polyamines in Rat Organs, *Anal. Biochem.* 301 (2), 255-260 (2002).

M. Kobayashi, K. Samejima, K. Hiramatsu, and M. Kawakita: Mass Spectrometric Separation and Determination of N^1 , N^{12} -Diacetylspermine in Cancer Patients, *Biol. Pharm. Bull.* 25 (3), 372-374 (2002).

M. Kobayashi, Y. J. Xu, K. Samejima, H. Goda, M. Niitsu, M. Takahashi, and Y. Hashimoto: Fate of Orally Administered ^{15}N -Labeled Polyamines in Rats Bearing Solid Tumors, *Biol. Pharm. Bull.* 26 (3) 285-288 (2003).

H. Dejima, M. Kobayashi, H. Takasaki, N. Takeda, A. Shirahata, and K. Samejima: Synthetic Decarboxylated S-Adenosyl-L-methionine as a Substrate for Aminopropyl Transferases, *Biol. Pharm. Bull.* 26 (7) 1005-1008 (2003).

H. Goda, T. Watanabe, N. Takeda, M. Kobayashi, M. Wada, H. Hosoda, A. Shirahata, and K. Samejima: Mammalian Spermidine Synthase—Identification of Cysteine Residues and Investigation of the Putrescine Binding Site —, *Biol. Pharm. Bull.* 27 (9), 1327-1332 (2004).

M. Kobayashi, T. Watanabe, Y. J. Xu, M. Tatemori, H. Goda, M. Niitsu, A. Shirahata, and K. Samejima: Control of Spermidine and Spermine Levels in Rat Tissues by *trans*-4-Methylcyclohexylamine, a Spermidine-Synthase Inhibitor, *Biol. Pharm. Bull.* 28 (4), 569-573 (2005).

(2) 口頭発表

許 泳吉、原 健、佐々木ひとみ、新津 勝、鮫島啓二郎：動物組織中の非標識および¹⁵N-標識ポリアミンの同時分別定量、日本ポリアミン研究会 第16回（滋賀）2001年1月。

竹田 昇、佐々木ひとみ、鮫島啓二郎、和田牧子、白幡 晶、長野晃三：スペルミジン合成酵素の三次元構造研究、日本薬学会 第121回（札幌）2001年3月。

小林正樹、許 泳吉、佐々木ひとみ、新津 勝、鮫島啓二郎：IS-MSによるポリアミン及びアセチルポリアミンの同時定量法、日本薬学会 第121回（札幌）2001年3月。

許 泳吉、原 健、佐々木ひとみ、新津 勝、鮫島啓二郎：経口投与¹⁵N-標識ポリアミンのラット組織内取り込み量の測定、日本薬学会 第121回（札幌）2001年3月。

小林正樹、許 泳吉、原 健、佐々木ひとみ、新津 勝、鮫島啓二郎、平松恭子、川喜多正夫：IS-MSによるポリアミン分析法の拡張と応用、バイオメディカル分析科学シンポジウム 第14回（松島）2001年7月。

小林正樹、鮫島啓二郎、平松恭子、川喜田正夫：IS-MSによるN¹,N¹²-ジアセチルスペルミンの定量、日本ポリアミン研究会 第17回（東京）2002年1月。

小林正樹、佐々木ひとみ、鮫島啓二郎、新津 勝、高橋正一、橋本嘉幸：経口投与 ^{15}N -ポリアミンの ADME 研究、日本ポリアミン研究会 第 17 回（東京）2002 年 1 月。

小林正樹、佐々木ひとみ、鮫島啓二郎、新津 勝、高橋正一、橋本嘉幸：担癌ラットにおける ^{15}N -標識ポリアミンの ADME 実験系の作成、日本薬学会 第 122 回（千葉）2002 年 3 月。

佐々木ひとみ、竹田 昇、鮫島啓二郎、和田牧子、白幡 晶、長野晃三：ラットスペルミジン合成酵素の三次元構造に関する考察、日本薬学会 第 122 回（千葉）2002 年 3 月。

小林正樹、合田ひとみ、鮫島啓二郎、新津 勝、高橋正一、橋本嘉幸：担癌ラットにおける経口投与 ^{15}N -標識ポリアミンの分析、バイオメディカル分析科学シンポジウム 第 15 回（金沢）2002 年 8 月。

小林正樹、合田ひとみ、鮫島啓二郎、新津 勝、高橋正一、橋本嘉幸：経口投与 ^{15}N -標識ポリアミンのラット組織中異常検出、日本薬学会 関東支部大会 第 46 回（東京）2002 年 10 月。

渡邊寿子、合田ひとみ、鮫島啓二郎、和田牧子、白幡 晶、長野晃三：哺乳動物スペルミジン合成酵素の三次元構造と選択的阻害剤のデザイン、日本ポリアミン研究会 第 18 回（東京）2003 年 2 月。

小林正樹、渡邊寿子、鮫島啓二郎、合田ひとみ、新津 勝：安定同位体標識脱炭酸化 S-アデノシルメチオニンの合成と応用、日本薬学会 第 123 回（長崎）2003 年 3 月。

渡邊寿子、合田ひとみ、鮫島啓二郎、和田牧子、白幡 晶、長野晃三：プトレシン結合部位を目指したスペルミジン合成酵素阻害剤のデザインと合成、日本薬学会 第 123 回（長崎）2003 年 3 月。

渡邊寿子、合田ひとみ、和田牧子、白幡 晶、鮫島啓二郎：哺乳動物スペルミジン合成酵素—システイン残基の同定と阻害化合物—、日本ポリアミン研究会 第 19 回（札幌）2004 年 2 月。

小林正樹、渡邊寿子、合田ひとみ、新津 勝、鮫島啓二郎：スペルミジン合成酵素阻害剤の連続投与によるラット組織中ポリアミンの調節、日本ポリアミン研究会 第19回 (札幌) 2004年2月。

小林正樹、渡邊寿子、合田ひとみ、新津 勝、鮫島啓二郎：スペルミジン合成酵素阻害剤のラットへの連続投与—体重、組織中ポリアミン濃度、及びポリアミン取り込みへの影響—、バイオメディカル分析科学シンポジウム 第17回 (西宮) 2004年6月。

M. Kobayashi, T. Watanabe, M. Tatemori, H. Goda, M. Niitsu, and K. Samejima: Control of spermidine and spermine levels in rat tissues by *trans*-4-methylcyclohexylamine, 2004 INTERNATIONAL CONFERENCE ON POLYAMINES Functions and Clinical Application (Chiba) Dec. 2004.

[研究成果]

1 ^{15}N -標識ポリアミンを用いるトレーサー実験法

(1) 開発

既に当研究室で開発した IS-MS によるポリアミン定量法は、 ^{15}N -標識ポリアミンを内標準物質として天然の ^{14}N -ポリアミンを定量する方法である[1]。この方法の原理によれば、 ^{15}N -標識ポリアミンより質量の大きいポリアミンがあれば、それを内標準物質にして、天然及び ^{15}N -標識ポリアミンを同時に測定することができ、 ^{15}N -標識ポリアミンをトレーサー化合物として利用できることになる。さらに質量の大きいポリアミンがあれば、複数のトレーサー化合物を同時に測定することも可能であろう。この安定同位体を用いる方法は、通常トレーサーとして用いられている放射性同位体を用いる方法と比べて、いろいろな点で優れている。すなわち、MS を利用するので、感度的には放射能測定と比べて遜色なく、定量と同時に同定が行える、また、通常の実験施設で行え、動物実験のみならず必要に応じて人を対象にしてトレーサー実験ができるなどである。

本研究では、 ^{15}N -標識ポリアミンより質量の大きいポリアミンとして、プトレシン(put)の 1, 4-位の N を ^{15}N 、C を ^{13}C に変え ^{15}N -put より質量数 2 高められた $^{13}\text{C},^{15}\text{N}$ -put を基本骨格として、 $^{13}\text{C},^{15}\text{N}$ -spd、 $^{13}\text{C},^{15}\text{N}$ -spm を内標準物質として合成した[2]。これらを用いて天然の ^{14}N -ポリアミン及び ^{15}N -標識ポリアミンが定量できるかどうかを確かめた。種々の濃度の put、spd、spm、 ^{15}N -put、 ^{15}N -spd、 ^{15}N -spm、に一定量の $^{13}\text{C},^{15}\text{N}$ -put、 $^{13}\text{C},^{15}\text{N}$ -spd、 $^{13}\text{C},^{15}\text{N}$ -spm を加えた試料溶液を作り、無水酪酸で HFB 化した後 IS-MS で分析した。得られたマススペクトルの一例を Fig. 1 に示す。 $^{13}\text{C},^{15}\text{N}$ -put、 $^{13}\text{C},^{15}\text{N}$ -spd、 $^{13}\text{C},^{15}\text{N}$ -spm に対するそれぞれ put、spd、spm、 ^{15}N -put、 ^{15}N -spd、 ^{15}N -spm のイオン強度比をとり定量性を調べたところいずれも十分満足できる直線性を示した。また、方法の信頼性を検討するために、ラット肝の過塩素酸除タンパク質上清一定量に ^{15}N -spd、 ^{15}N -spm をいろいろな濃度で添加し、CM-cellulose 処理、HFB 化後 IS-MS で分析し、真度及び精度を調べた。結果を Table 1 にまとめて示す。これらの結果から本法が十分信頼できる方法であることがわかった。

[1] N. Furuumi, D. Amano, Y. J. Xu, K. Samejima, M. Niitsu, and A. Shirahata, *Anal. Biochem.* 265, 253-259 (1998).

[2] T. Hara, Y. J. Xu, H. Sasaki, M. Niitsu, and K. Samejima, *J. Labelled Cpd. Radiopharm.* 43, 1005-1011 (2000).

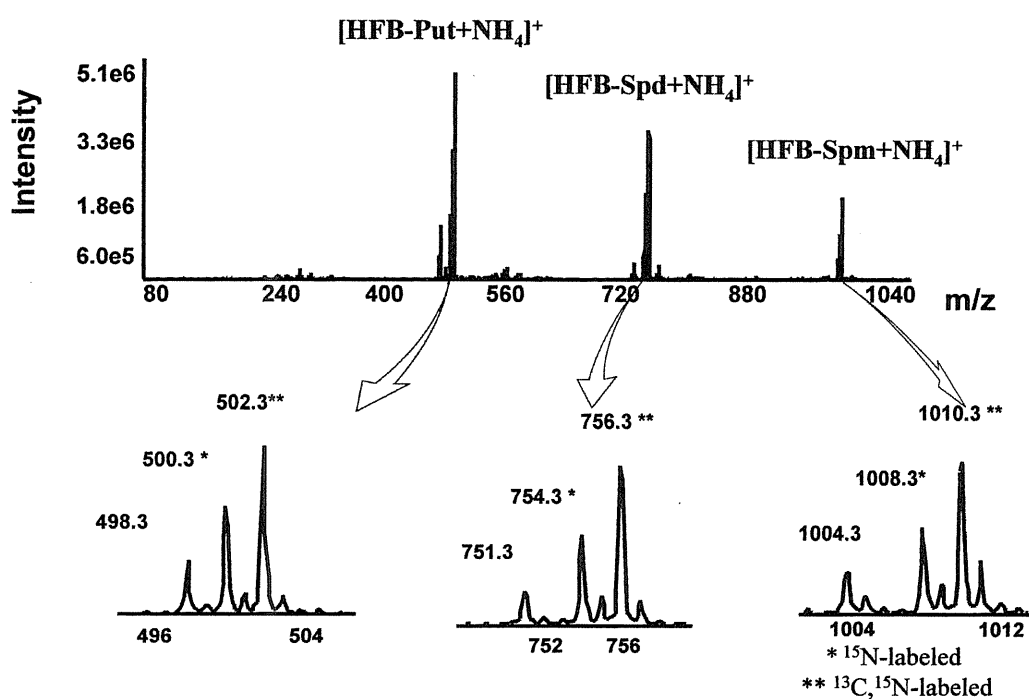


Fig. 1 Simultaneous mass analyses of endogenous put,spd,spm and ¹⁵N-labeled put,spd,spm

Table 1 Reliability of the method examined by standard addition of ¹⁵N-Spermidine and ¹⁵N-Spermine to aliquots of PCA-deproteinized Supernatant of rat liver^a

	¹⁵ N-Spermidine added (nmol)					CV(%)
	2.04	4.16	6.12	8.16	10.2	
¹⁵ N-Spermidine	0.09±0.01 ^b	0.17±0.01	0.27±0.01	0.33±0.02	0.40±0.02	5.2
Spermidine	0.44±0.02 ^b	0.44±0.02	0.43±0.03	0.42±0.03	0.42±0.03	6.6
Content of spermidine, 699.7nmol/g of liver ^d						
	¹⁵ N-Spermine added (nmol)					CV(%)
	2.02	4.04	6.06	8.08	10.1	
¹⁵ N-Spermine	0.10±0.01 ^c	0.17±0.01	0.25±0.01	0.35±0.02	0.41±0.03	7.0
Spermine	0.43±0.03 ^c	0.40±0.03	0.41±0.02	0.42±0.02	0.43±0.03	6.1
Content of spermine, 644.8nmol/g of liver ^d						

^a Liver(290mg) was homogenized successively with 1ml of 0.1M HCl and 1ml of 0.5M PCA, the mixture was then centrifuged, and the resulting supernatant was used. To an aliquot (100 μ l) of the supernatant were added different amounts of ¹⁵N-sprmidine(e.g. 2.04nmol) and ¹⁵N-spermine(e.g. 2.02nmol), and constant amounts of ¹³C, ¹⁵N-spermidine(23.7nmol) and ¹³C, ¹⁵N-spermine(22.3nmol) as internal standards.

^b The values are ion intensity ratios of ¹⁵N-spermidine or endogenous spermidine to ¹³C, ¹⁵N-spermidine, expressed as mean ± S.D. (n=9, 3 samples, 3 determinations/sample)

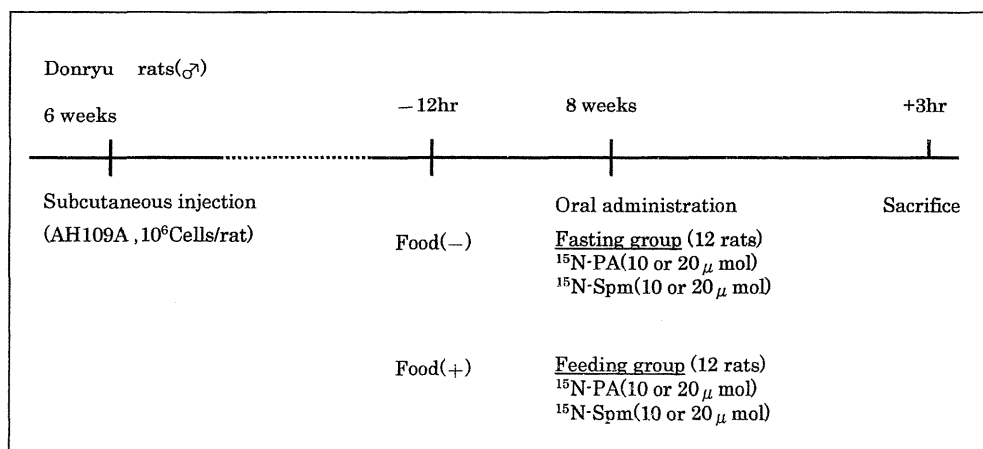
^c The same as described in b, except that spermine was measured.

^d Calculated based on the results obtained with endogenous spermidine or spermine.

(2) ポリアミンの吸収・分布・代謝・排泄 (ADME) への応用

^{15}N -標識ポリアミンをラットに経口投与して取り込み実験を行うに際して、食餌も含めた腸管内ポリアミンが担癌ラットの癌の生育を促進すると考えられていることから、癌への取り込みも同時に調べることにした。担癌ラットとしては、再現性が期待でき、また、 ^{15}N -ポリアミンの取り込みや内在性ポリアミンを正常組織と比較できる固形癌が好ましい、などを条件として、ドンリュウラットの腹水肝癌細胞を同ラットの皮下に移植して固形癌を作成する方法を採用することにした。腹水肝癌細胞としては、東北大学加齢研究所医用細胞資源センターから供与された、AH130 (TKG0530)、AH7974 (TKG0540)、AH109A (TKG0529)の三種について検討を行った。これらはいずれも 4-dimethylaminoazobenzene による肝癌由来細胞であり、正常肝とポリアミン含量の違いを比較できると考えた。種々検討の結果、AH109A の約 10^6 cells を 6 週齢のドンリュウラット (♂) の背部皮下に移植して、2 週間飼育したものを固形癌担癌ラットとして本実験に用いることとした。

^{15}N -標識ポリアミンの経口投与実験条件は次のように設定した。食餌中に含まれるポリアミンおよび腸内細菌由来あるいは消化液由来などのポリアミンによる ^{15}N -標識ポリアミンの希釈の影響を考慮し、投与量を $10\ \mu\text{mol}$ または $20\ \mu\text{mol}$ 匹の 2 系列で行うこととし、さらに投与前 12 時間絶食した群 (Fasting group) と食餌を与え続けた群 (Feeding group) とに分けた。また、肝への ^{15}N -spm と ^{15}N -spd の取り込みに際して両者が競合するという SD ラットの結果を再検討するために、 ^{15}N -put、 ^{15}N -spd、 ^{15}N -spm の 3 者同時投与 (^{15}N -PA) と ^{15}N -spm の単独投与の 2 系列で行うことにした。組織試料の採取は取り込み量が最大になる投与後 3 時間に決めた。測定対象組織は、小腸、肝臓、腎臓、癌とした。実験のスケジュールは下に示すとおりで、 ^{15}N -PA 投与 (4 群) 及び ^{15}N -spm 投与 (4 群) は各群 3 匹ずつで行った。



Fasting group と Feeding group について、それぞれ対応する 10 或は 20 μmol 投与のときの ^{15}N -標識ポリアミンの測定値を比べてみると、いくつかの例外を除けば、Feeding group の方が明らかに高く、投与量の 10 或は 20 μmol が 1 日のポリアミン摂取量のおよそ 50~150 倍であることを考えれば、食餌による希釈効果は無視できると思われた。さらに、腸内細菌や消化液由来のポリアミンによる希釈効果についても、10 μmol と 20 μmol 投与の値をそれぞれ対応するものと比べてみて投与量に比例する傾向が見られることから、少なくとも 10 μmol 以上の ^{15}N -ポリアミン一回経口投与実験においては、消化管内の内在性ポリアミンによる影響は余り考えなくてもよいことがわかった。 ^{15}N -PA 投与群の各臓器における ^{15}N -put、 ^{15}N -spd、 ^{15}N -spm の取り込み量の大小関係は、Fasting group でも Feeding group でも同様な傾向を示した。すなわち、小腸では三者共にほぼ同じで、肝では ^{15}N -spd $>$ ^{15}N -spm \gg ^{15}N -put の順で、腎では ^{15}N -spm $>$ ^{15}N -spd \gg ^{15}N -put の順であった。癌では他の組織と比べて ^{15}N -put が多く、 ^{15}N -spd は少なく、 ^{15}N -spm はさらに少なかった。

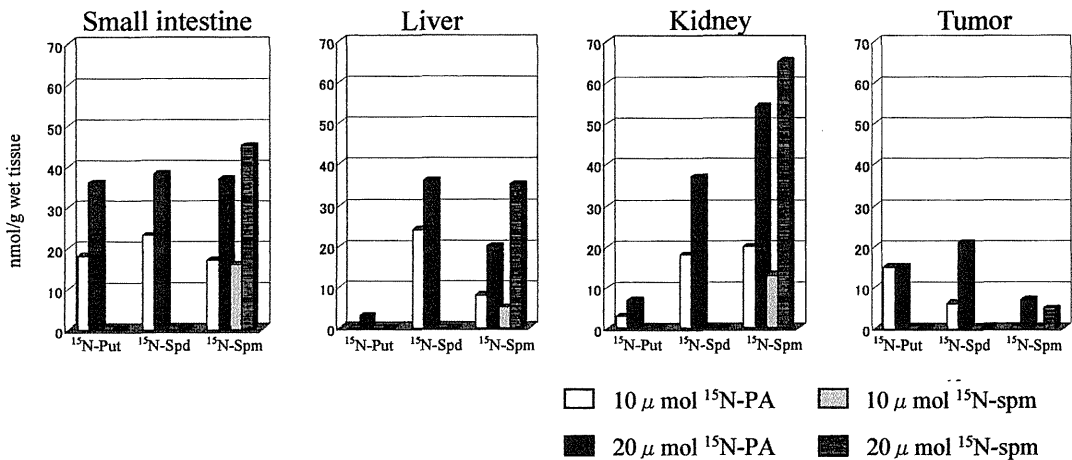


Fig. 2 ^{15}N -Polyamines in tissues of Feeding Rats

Fig. 2 は Feeding group についての ^{15}N -ポリアミンの測定値をヒストグラムにしたものである。小腸においては 10 或は 20 μmol 投与で、測定値に明らかな濃度依存性が認められ、 ^{15}N -put、 ^{15}N -spd、 ^{15}N -spm の値は各投与量で類似していた。このことは、小腸からのポリアミンの吸収が受動拡散機構によるとする説を支持している。肝臓では ^{15}N -PA において、 ^{15}N -spd の値が ^{15}N -spm の値よりも明らかに高く、また ^{15}N -spm 20 μmol の単独投与での ^{15}N -spm の値と ^{15}N -PA 20 μmol 投与での ^{15}N -spd の値がほぼ同じであった。これは、spd と spm の取り込み系が同一であり、spd の方が spm より取り込まれやすいことを物語っている。腎臓では、肝臓とは逆に、 ^{15}N -PA 投与で ^{15}N -spm が ^{15}N -spd を上回っていた。これは肝臓だけではなく多くの他の組織でも同様な競合が起こり、取り込まれにくかった ^{15}N -spm が排泄のため腎臓に集まり、高値を示したと考えられる。癌組織でも

^{15}N -PA 投与で、 ^{15}N -spd が ^{15}N -spm より高かったが、肝臓と比べてそれらの値は低かった。概観して、 ^{15}N -put の腸管からの吸収量と組織への取り込み量の収支が合わないのが特に目立った。これは、生体内のアミン酸化酵素により ^{15}N -put が分解された可能性が考えられる。

以上、本研究で得られた結果をまとめると、(1)腸管からの put、spd、spm の吸収はほとんど同じで濃度依存性があり、受動拡散機構による説を支持していること、(2)肝臓など腫瘍組織も含めて spdの方が spm より取り込まれやすいこと、(3)腸管から吸収された過量のポリアミンは速やかに腎臓に集まり排泄に向かうこと、(4)経口投与された put は spd や spm とは違う挙動を示し、アミン酸化酵素による活発な代謝を受けるらしいこと、などである。

2 IS-MS によるジアセチルスペルミンとポリアミンの同時分析法

近年になって、ジアセチルスペルミン ($\text{Ac}_2\text{-spm}$) が癌患者尿中で増えることが報告され、患者の予後を予測する指標として利用されている *carcinoembryonic antigen* より優れているという報告もあり注目されている。本研究では、 $\text{Ac}_2\text{-spm}$ を IS-MS によるポリアミン定量法に組み込むことを目的の一つとして行なった。

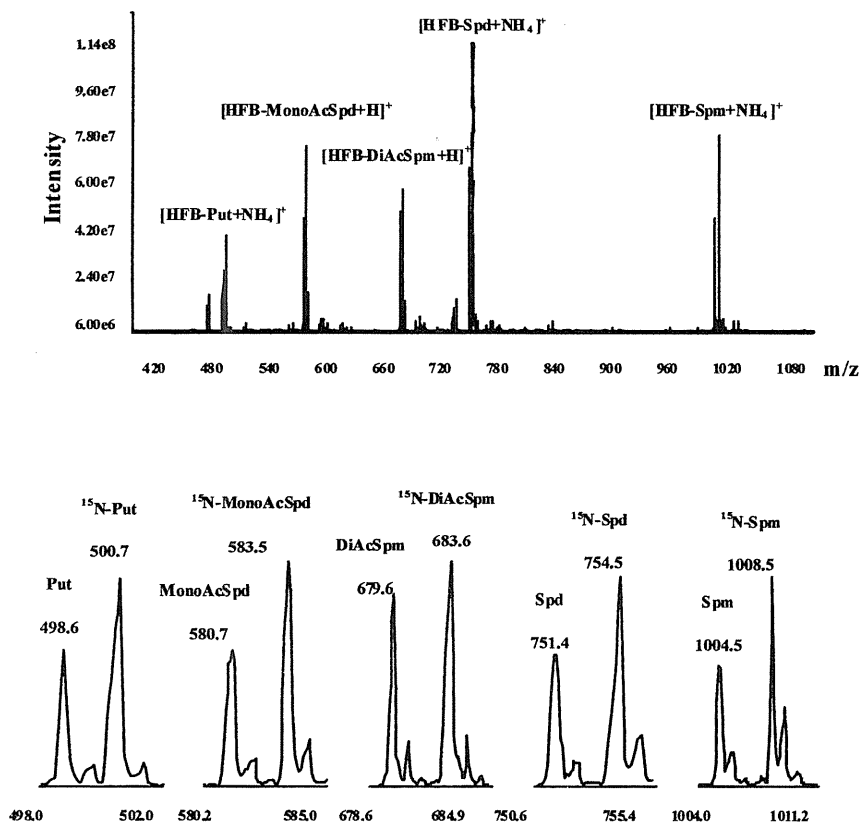


Fig. 3 Mass spectrum of a mixture of five polyamines and their ^{15}N -substituents

まず、従来の前処理及び IS-MS による測定の方法が適用できるかどうかを調べた結果、特に障害になるような問題はなかった。すなわち、CM-cellulose の前処理で Ac₂-spm (および Ac-spd) は put、spd、spm と同じポリアミン分画に溶出されるので、同時分析が可能でありまた、HFB 化の条件で脱アセチル化されないことが標品の Ac-spd、Ac-spm、Ac₂-spm を用いて確かめられた。それらの HFB-誘導体のマススペクトルをとると、主イオンピークはアンモニウムイオンを結合したのではなく、プロトンを結合したイオンであることがわかった。これらの知見を基にして、内標準物質に用いる ¹⁵N-標識アセチルポリアミンを合成し、設定した IS-MS 条件で非標識体と共に分析して得られたマススペクトルの一例を Fig. 3 に示す。HFB-put、HFB-spd、HFB-spm では、既報のとおり H⁺ 結合イオンピークと NH₄⁺ 結合イオンピークの両者が検出され、HN₄⁺ 結合イオンピークが主イオンピークであるのに対し、HFB-Ac₂-spm (及び HFB-Ac-spd) では、同様に H⁺ 結合イオンピークと NH₄⁺ 結合イオンピークが検出されたが、H⁺ 結合イオンピークの方が主イオンピークであり、前者の場合とは際立った対照を示していた。

標品の HFB-Ac₂-spm 及び HFB-¹⁵N-Ac₂-spm の拡大したマススペクトルを Fig. 4 に示す。ここで m/z 679.3 と 696.3 は Ac₂-spm 由来のピークで 683.3 と 700.3 は ¹⁵N-Ac₂-spm 由来のピークである。このスペクトルに基づき m/z 683.3 のイオン強度に対する m/z 679.3 のイオン強度比を用いて Ac₂-spm を定量することにした。一定量の ¹⁵N-Ac₂-spm に対し標品の Ac₂-spm 量をかえて得られた検量線は良好な直線性を示した。

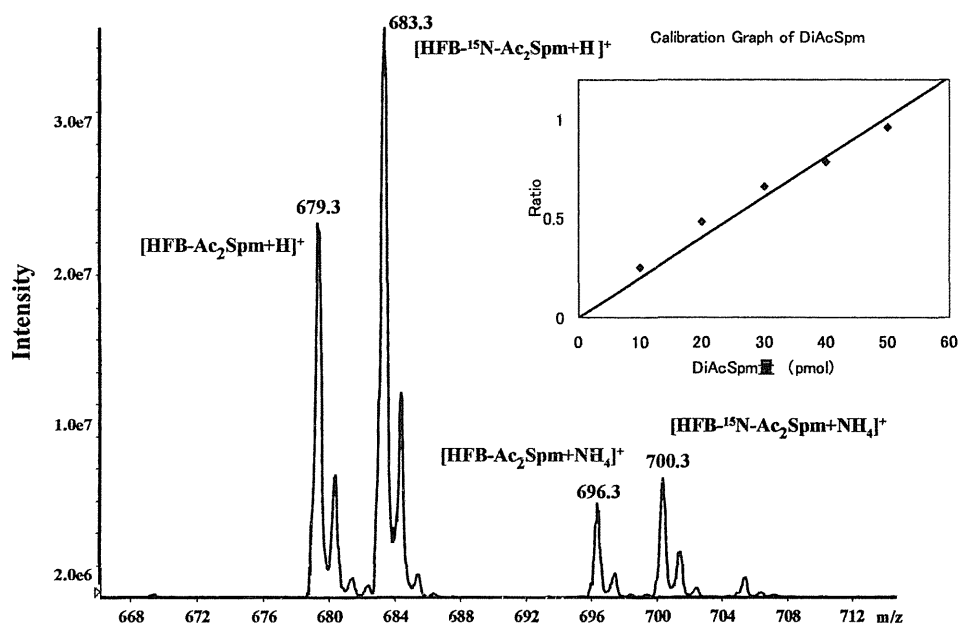


Fig. 4 Mass spectrum of Ac₂-spm

次に実際の癌患者尿を用いてこの方法の信頼性を検討した。癌患者尿に内標の $^{15}\text{N-Ac}_2\text{-spm}$ を加え、 $\text{Ac}_2\text{-spm}$ の量をかえて添加回収実験を行った。試料の前処理は常法にしたがい、測定した結果を Table 2 と Fig. 5 に示す。

Table 2 Reliability of the method examined by addition of various amounts of $\text{Ac}_2\text{-spm}$ to urine of a cancer patient ^{a)}

	$\text{Ac}_2\text{Spm added(nmol)}$				
	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3
Ratio ^{b)}	$0.37 \pm 0.02^c)$	0.42 ± 0.02	0.49 ± 0.03	0.56 ± 0.03	0.61 ± 0.04
cv (%)	5.4	4.8	6.1	5.4	6.6

^{a)} To 0.1ml of urine were added various amounts of Ac_2Spm and 0.6 nmol of $^{15}\text{N-Ac}_2\text{Spm}$ as internal standard.

^{b)} $\text{Ac}_2\text{Spm}/^{15}\text{N-Ac}_2\text{Spm}$

^{c)} Mean \pm S.D. (n = 9 : 3 samples , 3 determinations / sample)

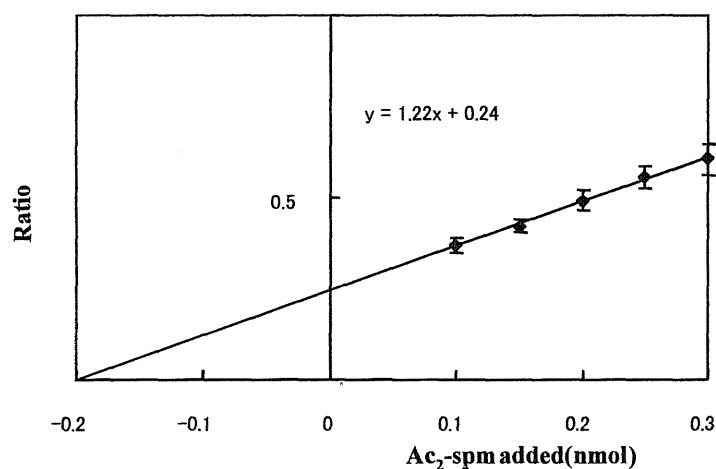


Fig. 5 Linearity of standard addition graph

この結果から本法が真度及び精度共に満足できるばかりでなく、 m/z 値から $\text{Ac}_2\text{-spm}$ の同定も同時に行っており、信頼性の高い方法であることが証明された。なお、グラフから読み取れるようにこの癌患者尿中には約 0.2 nmol の $\text{Ac}_2\text{-spm}$ が含まれており、この値は ELISA 法の測定値とほぼ一致した。

すでに癌患者尿中の $\text{Ac}_2\text{-spm}$ は ELISA や HPLC で定量され、癌の診断・予後を占うマーカーとして研究が進んでいる。ここでは開発した方法の有用性を調べる目的で、都臨床研で ELISA により測定された同一癌患者尿を本法で測定し両者を比較した。17 名の患者について ELISA 法と本法で測定した結果の相関を見たグラフを Fig. 6 に示す。グラフから相関係数は 0.94 となりいずれも信頼できる方法であることが証明された。同定しながら定量できる本法は、同定は出来ないが日常測定が可能な ELISA 法の有用性を確かめることができた。

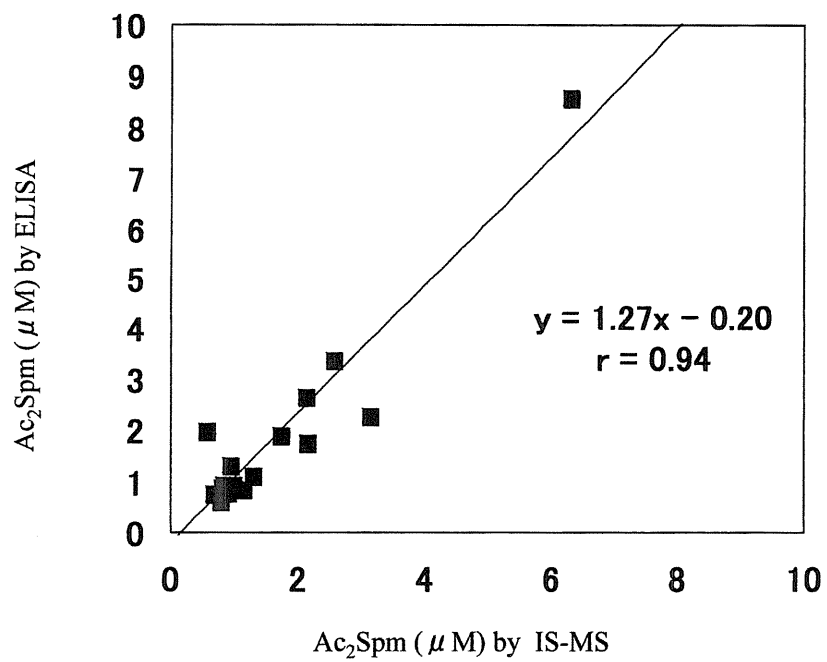


Fig. 6 Correlation Graph of Ac₂-spm Concentrations in the Urine of 17 Cancer Patients Measured by ELISA and IS-MS

3 哺乳動物 spd-syn の三次元構造と阻害剤の開発

(1) 三次元構造

当研究室では MALDI TOF-MS を活用して、ラット spd-syn の一次構造を決め、それがヒト、マウス酵素と 96 %以上の相同性があることから、哺乳動物間では極めて類似していることを報告した[3]。引き続き、X線回折で立体構造が報告されている *Thermotoga maritima* の spd-syn を参考にしながら、ラット spd-syn の立体構造を検討することにした。両酵素のアミノ酸配列で目立った違いは、含まれるシステイン残基の数が *T. maritima* では3個に対してラットでは10個という点にある。したがって、ホモロジーモデリングにより立体構造を考察する際に、ラット酵素のシステイン残基が SH か SS かを決めることが重要と考えられた。タンパク質中システイン残基を同定する方法はいろいろ報告されているが、還元剤非存在下では変性剤によりほぐれにくい本酵素の性質のため、通常の方法では明確な結果が得られなかった。種々検討した結果、C25 は SS として存在しており、他の6残基は SH として存在していることが証明されたが、残りの3残基については結論が出なかった。そこでホモロジーモデリングを導入して検討した結果、いずれも SH に帰属するのが妥当であるという結論になった。したがって、C25 の相手になるシステイン残基が同一プロトマー中には存在しないことになり、それを説明する必要が生じた。*T. maritima* を含めて細菌由来の spd-syn は2量体または4量体で、ラット酵素の N 末端から37個のアミノ酸を含むペプチドに相当する部分が、 β -hairpin 構造で絡み合いプロトマー同士を結合していることが X線回折により知られている。C25 がこのペプチド部分に位置していることを考えると、二つのプロトマーの C25 同士でジスルフィド結合を形成している可能性が強く示唆された。最近、*T. thermophilus* の4量体から成るアミノプロピルトランスフェラーゼのプロトマー同士の結合に、ジスルフィド結合の関与が X線回折により明らかにされた。この結果は哺乳動物 spd-syn の2量体形成に C25 同士のジスルフィド結合が関与していることを強く支持した。

ホモロジーモデリングによる活性部位構造は *T. maritima* とラットではほとんど同じで、進化の過程で維持されてきたことを物語っている。特に、put 結合部位に gatekeeping loop と名付けられた部分があり、これは put が結合するとそれを覆うような役割をしていると考えられ、ダイナミックな酵素反応の複雑さを思わせ、活性部位構造から阻害剤をデザインする難しさを認識させた。

[3] M. Wada, D. Amano, H. Hosoda, A. Shirahata, K. Samejima, and A. E. Pegg, *Biol. Pharm. Bull.* **22**, 889-895 (1999).

(2) 阻害剤

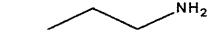

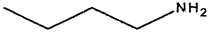
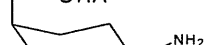
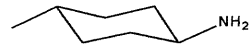
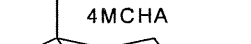
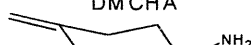
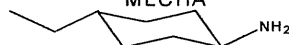
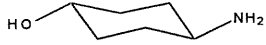

Spd-syn を選択的に阻害するために、活性部位を標的にしていくつかの競合阻害剤がデザイン・合成されてきた。Put 結合部位と脱炭酸化 S-アデノシルメチオニン(dcAdoMet)結合部位に亙り結合する S-adenosyl-1,8-diamino-3-thiooctane (AdoDATO)は、アミノプロピル基転移反応の遷移状態を考慮して合成された最も強い阻害剤として知られている。また、dcAdoMet 結合部位は spm-syn にもあり、それを標的とする阻害剤では spd-syn への選択性が期待できないため、put 結合部位を標的として、われわれは *trans*-4-methylcyclohexylamine(4MCHA)や *n*-butylamine (BA)などの比較的強い阻害剤を開発してきた。AdoDATO に比べて、4MCHA や BA の阻害性は弱いですが、細胞増殖時に dcAdoMet が増大すると、競合により AdoDATO の阻害性は弱められるのに対し、4MCHA や BA は影響を受けないことが実験的に証明されている。さらに AdoDATO はその合成や細胞内取り込みなどに制約があり、実用面から見て put 結合部位を標的とする阻害剤が有用と考えられる。そこで、本研究では環状の 4MCHA と直鎖状の BA をタイプの違う二つのモデル化合物として、各々について新たに化合物をデザイン・合成し、精製した spd-syn に対する阻害性を比較検討した。

4MCHA アナログ これまでの各種化合物による阻害実験および spd-syn の三次元構造モデルなどから、put 結合部位のアミノプロピル基転移反応が行われる空間は疎水的で比較的広いと考えられたので、4MCHA の 4 位にメチル基を導入した 4,4-dimethylcyclohexylamine(DMCHA)を合成した。これは *cis*, *trans* の区別もなく疎水空間への親和性も高まるのではないかと考えた。つぎに、4MCHA のメチル基の代わりにメチレン基を導入した 4-methylenecyclohexylamine(MLCHA)を合成した。これも *cis*, *trans* の区別はないが、二重結合による六員環の自由度の制約がどのような影響を与えるかに興味があった。また、4MCHA のメチル基をエチル基に変えた *trans*-4-ethylcyclohexylamine(4ECHA)は、4MCHA と同様に *cis*, *trans* 混合物の塩酸塩を再結晶を繰り返して精製した。なお、4MCHA のメチル基をフッ素に変えた化合物は不安定で合成できなかった。

BA アナログ 不飽和結合を含む鎖状アミンを調製した。鎖中の二重結合の導入は *cis*, *trans* 幾何異性体の問題が生じるため、鎖の末端に二重結合を導入し鎖長の違う 4-amino-1-butene(ABE), 5-amino-1-pentene(APE), 6-amino-1-hexene(AHE) の 3 種を合成した。また、鎖の末端に三重結合を導入したのものとして 5-amino-1-pentyne(APYN), 6-amino-1-hexyne(AHYN)を合成した。

各種化合物の精製 spd-syn に対する阻害性(IC₅₀)をまとめて Table 3 に示す。この結果から、4MCHA アナログの中ではそれに勝るものはなかったが、BA アナログの中では APE が最も強い阻害性を示し、その IC₅₀ は 4MCHA と同じ値を示した。

Table 3 IC₅₀ values of compounds tested

n-BA analogs	IC ₅₀ (μM)	4MCHA analogs	IC ₅₀ (μM)
	35		17
	3.8		430
<i>n</i> -BA	13.5		
ABE	3.6		1.7
<i>n</i> -PA	1.7		>1000
APE	20		60
APYN	>1000		135
2APYN	105		85
<i>n</i> -HA	22		400
AHE	40		
AHYN			

4 阻害剤の選択と spd-syn 阻害モデルラットの調整

上記阻害剤開発研究により、*in vitro* で同等の強い阻害効果を示した 4MCHA と APE をラットに経口投与し、その効果を比較検討した。6 週齢のドンリュウラット(♂)5 匹を一群として、コントロール群、APE 100 μ mol 毎日 1 回投与群、及び 4MCHA 100 μ mol 毎日 1 回投与群について、7 日後の肝臓及び腎臓中の put, spd, spm を測定した。結果を Table 4 にまとめて示す。APE 投与群の両組織中ポリアミン含量はコントロール群と有意な差はなく、APE は *in vivo* では効果を示さないことが明らかになった。これは恐らくアミン酸化酵素により速やかに代謝されたためと考えられる。一方、4MCHA 投与群では spd の顕著な減少と spm の増大が認められ、4MCHA が、*in vivo* で効果を示すことが明らかになった。この結果に基づき以後の研究には 4MCHA を用いることとした。

Table 4 Effects of orally administered APE and 4MCHA once daily for 1 week on polyamine contents in rat liver and kidney

	Liver		Kidney	
	spd	spm	spd	spm
control	904 \pm 52	682 \pm 125	559 \pm 48	682 \pm 184
APE (100 μ mol/day)	967 \pm 99	793 \pm 82	542 \pm 34	702 \pm 47
4MCHA(100 μ mol/day)	542 \pm 141	1002 \pm 158	357 \pm 75	714 \pm 123

Values in the Table show nmol/g wet tissue, mean \pm S.D. of 5 rats. Significance between 4MCHA-treated and control rats (* : $P < 0.05$)

われわれはすでに、HTC 細胞の懸濁培養の系で 4MCHA の効果を調べ、250 μ M 4MCHA 存在下では spd レベルはコントロールの 2% にまで減り、spm レベルは余り変わらず、put レベルは顕著に増え、それらの合計は余り変わらず、生育速度にも影響が見られないことを報告し、その結果から HTC 細胞の生育には spd がなくても put と spm があればよいのではないかと推察した。また、4MCHA 濃度を 1.25 mM に上げると、spd レベルはコントロールの 1% にまで減り、spm レベルも 25% に減り、put は 250 μ M 処理のレベルを保ち、それらの合計は減少し、生育速度も顕著に減少し、その減少は spd を添加しても回復せず、4MCHA を培地から取り除くと回復することを報告した。これらの結果から、4MCHA の濃度を高めることによる生育速度の減少は、spd-syn の阻害によるポリアミン濃度の変動が一部関与するにしても、生育に必須な部分に 4MCHA が作用するためではないかと推定した。このような *in vitro* の実験に加えて、飲料水に 4MCHA を溶

かしてラットに自由に飲ませ続ける in vivo 実験も行った。ラット組織中 spd レベルの減少、spm レベルの増大は明らかに 0.02%含飲料水で生育したラットより 0.1%含飲料水のラットの方が大きく、後者のラットで見られた体重増加の目立った減少は、ラットが 4MCHA を忌避し水を飲む量が 70%も減少したためと考えた。しかし、この体重減少が 4MCHA の作用により生じたことは、濃度を高めたときに見られた HTC 細胞の生育速度の減少と考え合わせても、十分に考えられることであり、4MCHA の in vivo 効果については定量的な実験により確認する必要があった。

投与量の影響 ドンリュウラット (♂, 6 週齢) 5 匹を一群として、はじめの平均体重が近似するように四群に分け、各群に生理食塩液 1 mL に溶かした濃度の違う 4MCHA (0, 30, 50, 100 μmol) を毎日 1 回経口投与して、1 週間に亘り各群の体重の増加の様子を調べた。Table 5 に示すように、体重の増加率は 4MCHA の投与量が増すにつれて明らかに減少することがわかった。50 μmol 及び 100 μmol 投与群において、投与 2 日目の一時的な体重増加の停止または減少の理由は不明である。なお、100 μmol 投与群については、他の群と比べて行動の活発さに差が認められたために、1 週間後に血液学的検査 (15 項目) 及び血液化学的検査 (16 項目) を行った結果、コントロールに比べて特に有意な差は認められず、4MCHA の毒性を窺わせるデータは得られなかった。

Table 5 Body-weight gains of rats administered different doses of 4MCHA once daily for 1 week

Administered(μmol) 4MCHA	day				
	1	2	4	6	8
0	211 \pm 21	218 \pm 21	239 \pm 20	259 \pm 23	279 \pm 24
30	210 \pm 11	219 \pm 10	235 \pm 11	252 \pm 13	264 \pm 12
50	207 \pm 21	208 \pm 23	227 \pm 27	242 \pm 30	255 \pm 30
100	209 \pm 16	202 \pm 17	211 \pm 27	222 \pm 33	229 \pm 32*

Values in the table show body weight (g), mean \pm S.D. of 5 rats. Significance between 4MCHA-treated and control rats (*: $P < 0.05$)

組織中ポリアミン濃度への影響 四群のラットについて、7 日目の 4MCHA 投与 24 時間後に肝臓、腎臓、小腸、脾臓を採取し、各組織中の put, spd, spm 濃度を測定した。Fig. 7 からわかるように、各組織によりポリアミン濃度は異なるが、4MCHA の投与量が増すにつれて spd レベルの減少及び spm レベルの緩やかな増大傾向は共通に認められた。Put は肝臓、腎臓では低レベルを維持していたが、

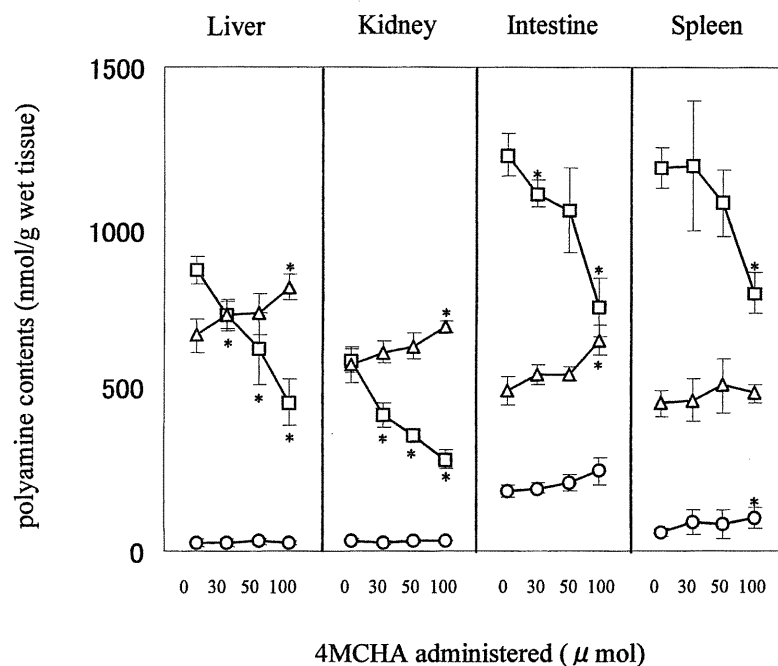


Fig. 7 Changes in polyamine levels in rat tissues administered different doses of 4MCHA once daily for 1 week. Put, —○—; spd, —□—; spm, —△—. Significance between 4MCHA-treated and control (0 μ mol) rats (* : $P < 0.01$)

代謝回転が活発で、オルニチン脱炭酸化酵素(ODC)誘導のために put レベルが比較的高い小腸、脾臓では上昇傾向を示した。これは 4MCHA により put から spd への合成が抑制されたために、put が余剰になった結果と考えられ、全組織を通じて 4MCHA による ODC の目立った誘導はなかったと考えてよい。Put, spd, spm 濃度の総和についてみると、4MCHA の投与量が増すにつれて、腎臓はほぼ同じ値を保ち培養細胞で見られる結果と矛盾しなかったが、肝臓、小腸、脾臓では明らかに減少傾向が見られた。これは spd レベルの顕著な減少に対してそれに見合う spm レベルの増大がなかったためである。その説明の一つとして、spd-syn の阻害により S-アデノシルメチオニン脱炭酸化酵素(AdoMetDC)が誘導され dcAdoMet が存在するにもかかわらず、spm 合成に利用される spd、すなわち新たに合成された遊離型の spd、が不足したことが考えられる。これを確かめるにはわれわれが考案した遊離ポリアミンの測定法[4]が役立つであろう。

なお、肝臓について、ポリアミン測定用の試料溶液を用いて、4MCHA をダンシル誘導体にしてその濃度を蛍光 HPLC により測定したが、検出限界 3 nmol/g 湿重量で、100 μ mol 投与群でも 4MCHA は検出されなかった。このことは 4MCHA が投与 24 時間後にはほとんど消失していることを示しており、もし 4MCHA に

[4]Y. J. Xu, N. Furuumi, K. Samejima, M. Niitsu, and A. Shirahata, *Biol. Pharm. Bull.* 23 (9), 1021-1026 (2000).

spd-syn 阻害以外の別の作用があればその効果は軽減されているかもしれない。しかし、4MCHA の未知の作用については代謝産物も含めて考慮しなければならず、今後の課題である。

長期連続投与 1 週間の 4MCHA 連続投与により引き起こされた組織中ポリアミン濃度の変動が、さらに長期間投与し続けた場合どうなるか、その間に正常レベルに戻されるような適応が見られるかどうか、を調べるために連続投与の期間を 4 週間に延長してその推移を検討した。4MCHA の投与量は、投与ラットがコントロールラットとくらべて、食餌摂取量などで見かけ上違いがないことを条件に、30 μmol と 50 $\mu\text{mol}/\text{day}$ を選んだ。長期投与の場合、ラットの成長に応じて投与量を増やさなければならず、各週毎のラットの平均体重を基準にして投与計画を次のように決めた。

30 μmol 投与シリーズ：I 週 30 μmol 、II 週 38 μmol 、III 週 45 μmol 、IV 週 53 μmol

50 μmol 投与シリーズ：I 週 50 μmol 、II 週 63 μmol 、III 週 75 μmol 、IV 週 88 μmol

実験は前節までに記したと同様に、ドンリュウラット（♂、6 週齢）5 匹を一群として、コントロール四群、30 μmol 投与シリーズ四群、50 μmol 投与シリーズ四群に対して、設定 4MCHA 量を含む生理食塩液 1 mL を毎日 1 回経口投与し、体重を測定した。各週毎にコントロールを含む 3 シリーズから各一群ずつを取り肝臓、腎臓、小腸、脾臓を採取し、各組織中の put, spd, spm 濃度を測定した。体重増加の減少は 50 μmol 投与シリーズで明らかに認められ 30 μmol 投与シリーズではわずかだった（IV 週目の平均体重：コントロール 390 g、30 μmol 投与シリーズ 380 g、50 μmol 投与シリーズ 340 g）。また、30 μmol 投与シリーズにおける put, spd, spm 濃度の変化はコントロールのそれらと比べて差が余りなかったので、ここではコントロールと 50 μmol 投与シリーズの結果を示す(Fig. 8)。ポリアミン濃度の変化は I 週目で観察された傾向が IV 週目まで持続され、正常な成長に伴う変化がそれに加わったもので、その間にポリアミンレベルをコントロールのレベルに戻すような変化は認められなかった。各組織で spm 濃度には大きな差はなく、成長の間も各組織でほぼ一定の値を維持していたのに対して、spd 濃度は各組織で大きな差があり、小腸を除けば成長に応じて減少する傾向が見られ、特に脾臓でその減少は目立った。したがって、spm/spd 値は小腸を除けば成長に伴い大きくなる傾向があり、4MCHA 投与群はコントロール群の上昇傾向と平行して高い値を保ち続けた。以上の結果から、4MCHA を連続経口投与されても見かけ上障害が認められずに、人為的に spm/spd 値が高められたラットを調整できることがわかった。

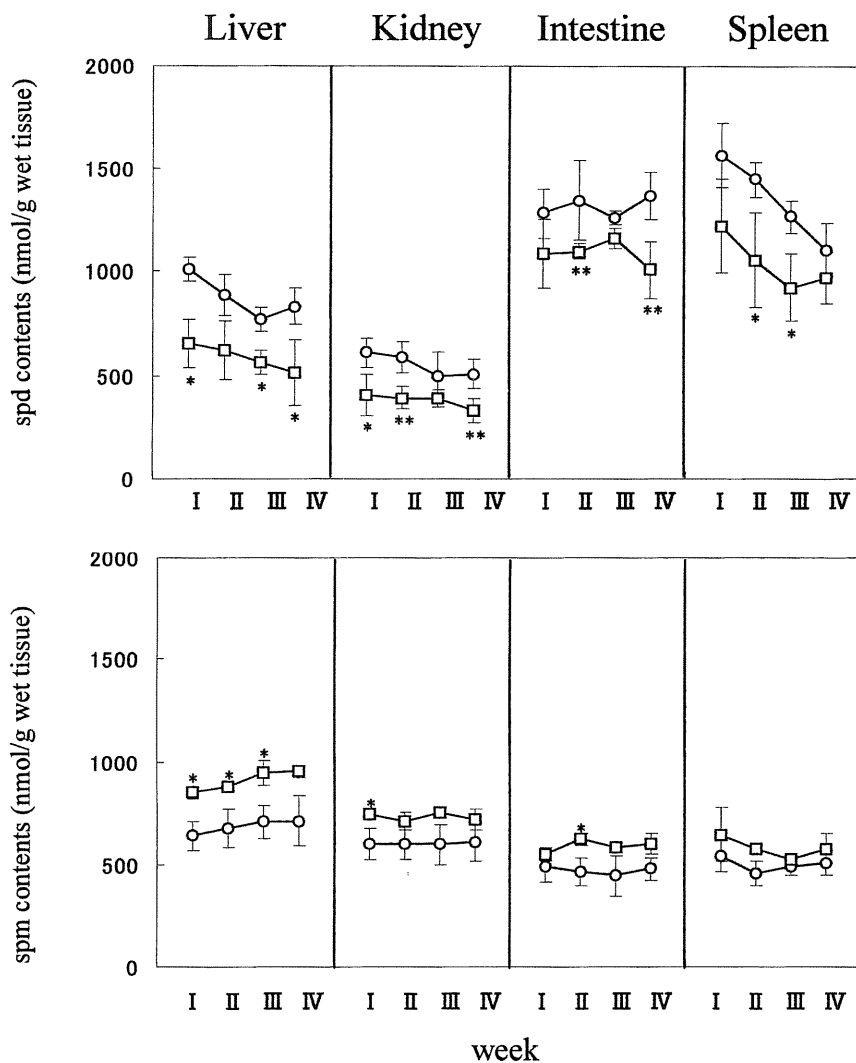


Fig. 8 Changes in spd and spm levels in rat tissues administered 4MCHA once daily for 4 week. Controls, —○—; 50 μ mol series of 4MCHA, —□—. Significance between 4MCHA-treated and controls (** : $p < 0.001$, * : $p < 0.01$)

ポリアミンとの同時投与 経口投与ポリアミンが腸管から吸収されて各臓器に分布することは良く知られている。4MCHAにより spd 濃度を減らしておき、同時に経口投与により spd を供給した場合、体重の増加率や組織内ポリアミン濃度にどのような影響が見られるかを検討した。4MCHA の投与量としては、100 μ mol を採用した。これは、取り込まれる spd が比較的少量でも検出し易くなるのではないかと考えて選んだ。同時投与 spd 量は、すでに ^{15}N -spd の取り込み実験から組織内取り込み量が明瞭に判別できる量として、20, 50, 100 μ mol が適当と考え選んだ。また、spm 20 μ mol の同時投与群についても検討した。

実験は前節と同様に、ドンリュウラット (♂、6 週齢) 5 匹を一群として、はじめの平均体重が近似するように六群に分け、一群はコントロールとして他の五群に生理食塩液 1 mL に溶かした 4MCHA 100 μ mol + (0; spd 20, 50, 100 μ mol; spm 20 μ mol) を毎日 1 回経口投与して、投与開始から 8 日目に肝臓、腎臓、小腸、脾臓を採取し、各組織中の put, spd, spm 濃度を測定した (Table 6)。コントロールにくらべて、spd の顕著な減少と spm の増大は 4MCHA を投与されたラットの全てで共通に見られ、spd 同時投与によりその減少分の spd を補うには時間がかかるように見えた。しかし、各臓器で見られるように、同時投与 spd の増量に伴い組織内 spd 濃度は徐々に高まる傾向を示した。特に、小腸や腎臓では取り込みは目立った。組織内 spm 濃度に及ぼす同時投与 spd の効果を見てみると、4MCHA 単独投与の場合にくらべて spm 濃度は明らかに低められており、その度合は同時投与 spd 量には依存していなかった。これは投与 spd が組織内 spm 合成を抑制したためで、その理由としては、4MCHA により誘導される AdoMetDC

Table 6 Effects of spd and spm administered simultaneously with 4MCHA once daily for 1 week on polyamine contents in rat tissues

Administered (μ mol)			Liver			Kidney		
4MCHA	spd	spm	spd	spm	spm/spd	spd	spm	spm/spd
-	-	-	1295 \pm 114	599 \pm 35	0.46	660 \pm 42	552 \pm 40	0.84
100	-	-	455 \pm 52 **	974 \pm 62 **	2.14	317 \pm 30 **	756 \pm 18 **	2.38
100	20	-	588 \pm 88 **	745 \pm 49 **	1.27	418 \pm 34 **	582 \pm 18	1.39
100	50	-	711 \pm 47 **	720 \pm 61 **	1.01	497 \pm 38 **	567 \pm 73	1.14
100	100	-	832 \pm 149 **	769 \pm 123	0.92	592 \pm 99	567 \pm 53	0.96
100	-	20	495 \pm 28 **	1063 \pm 28 **	2.15	311 \pm 31 **	780 \pm 39 **	2.51

Administered (μ mol)			Intestine			Spleen		
4MCHA	spd	spm	spd	spm	spm/spd	spd	spm	spm/spd
-	-	-	1251 \pm 86	411 \pm 33	0.33	1632 \pm 250	508 \pm 40	0.31
100	-	-	765 \pm 105 **	686 \pm 70 **	0.90	816 \pm 139 **	725 \pm 61 **	0.89
100	20	-	965 \pm 60 **	497 \pm 32 *	0.50	1147 \pm 77 *	604 \pm 41 *	0.53
100	50	-	1247 \pm 52	516 \pm 48 *	0.41	1375 \pm 171 **	601 \pm 87	0.44
100	100	-	1088 \pm 197	459 \pm 36	0.42	1381 \pm 300	569 \pm 97	0.41
100	-	20	874 \pm 129 **	713 \pm 63 **	0.82	962 \pm 235 *	695 \pm 93 *	0.72

Spd and spm contents in tissues show nmol/g wet tissue, mean \pm S.D. of 5 rats.
Significance between 4MCHA-treated and controls (** : $P < 0.001$, * : $P < 0.01$)

が投与 spd により抑制され dcAdoMet が不足したことが考えられる。培養細胞で spd を培地に加えると ODC, AdoMetDC の誘導が直ちに抑制されることは良く知られており、この結果は in vivo でもそのような誘導抑制がおこることを示した例と考えられる。Spm 同時投与で得られた結果は 4MCHA 単独投与で得られた結果とあまり変わらず、spd 同時投与の場合とは明瞭な違いがあった。

以上のことから、4MCHA と spd の同時投与は spd の取り込みと spm 合成の抑制により、4MCHA により引き起こされる異常なポリアミンレベルを正常レベルに戻す効果があるように思われた。しかし、体重増加の度合いについては、予期に反して、spd 同時投与群の方が 4MCHA 単独及び spm 同時投与群より低められる傾向（特に 2 日目）が認められた。その理由としては、ODC が誘導されないまま spd-syn が 4MCHA により阻害され、本来誘導されるべき AdoMetDC が投与 spd により抑制された結果、ポリアミンの恒常性に何らかの影響が生じたのではないかと思われる。

5 モデルラットにおける肝再生の抑制

動物個体を対象として、いろいろな生理的条件下で組織ごとに或いは細胞ごとに、その時の細胞機能に適応するように、ポリアミンレベルが調節されていることは確かである。したがって、人為的にポリアミンレベルを変えることは細胞機能に影響を及ぼす可能性がある。4MCHA をラットに経口投与して組織中の spm/spd 値を正常ラットより高値に維持できることがわかった。Spm/spd 値が高まる方向性は細胞増殖が停止していくときに一般的に観察されることから、4MCHA 投与モデルラットの細胞増殖系にどのような影響が見られるかを調べるために、増殖系として再生肝を選び検討した。

再生肝重量とポリアミン ドンリュウラット(♂、6 週齢)5 匹を 1 群として、コントロール四群及び 4MCHA 投与四群に分けた。投与群には 4MCHA 50 μ mol を毎日 1 回経口投与した。1 週間後に、コントロール群も含めた全ラットに 67% の部分肝切除を施した。投与群は術後も投与を継続した。術後 1, 2, 5, 10 日目に、コントロール及び 4MCHA 投与の両群から 1 群ずつをそれぞれとり、再生肝を摘出した。投与群とコントロール群は部分肝切除時に体重に差があったため、

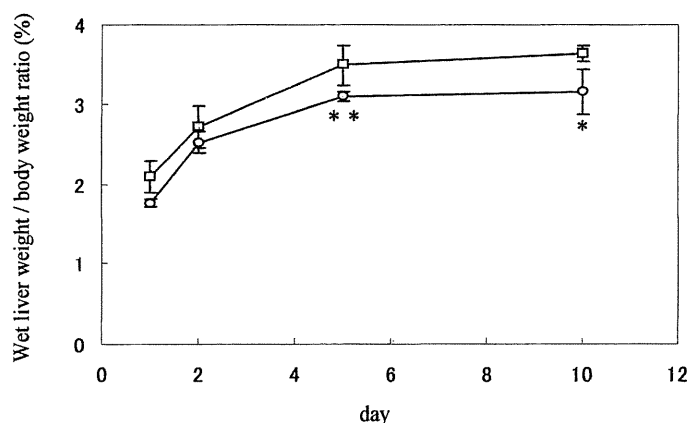


Fig. 9 Change of ratios of remnant liver wet weight to body weight.
Control, —□—; 4MCHA, —○— Significance between 4MCHA-treated and control rats (**: $p < 0.01$, *: $p < 0.05$)

再生肝増殖の程度をみる一指標として、体重に対する再生肝湿重量の百分率をとり、その推移を調べた。Fig. 9 に示すように、その指標はコントロール群に比べて 4MCHA 投与群で低く、術後 5、10 日目では有意な差を示した。これは、4MCHA 投与群では、肝の再生が本来あるべき大きさに到達せずに終了したことを意味している。

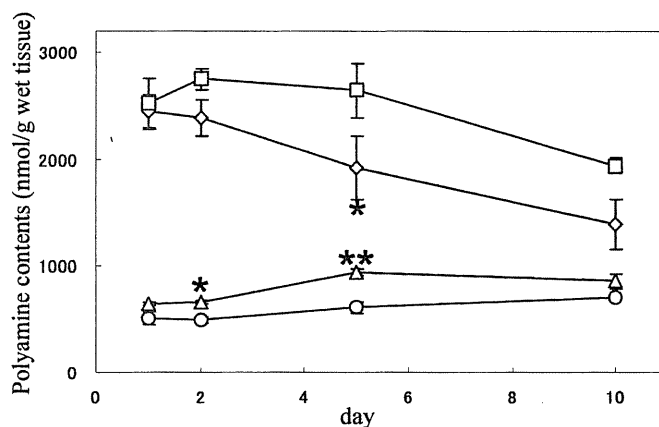


Fig. 10 Change in polyamine levels.

Control (spd—□—, spm—○—); 4MCHA (spd—◇—, spm—△—)

Significance between 4MCHA treated and control rats. (**: $p < 0.001$, *: $p < 0.01$)

再生肝中のポリアミンレベルの変動を Fig. 10 にまとめて示す。肝再生初期 (24h) に、ODC が誘導され、put レベルの上昇、spd レベルの顕著な上昇、spm レベルの下降が観察されることは良く知られている。術後 1 日目に見られた spd レベルの急激な上昇には、コントロール群と 4MCHA 投与群との間で差は認められず、術前までの 4MCHA 投与の影響は認められなかった。しかし、両群の spd レベルの変動は 2 日目以後に明らかに違いを示した。すなわち、コントロール群ではさらに上昇が続き 5 日目まで高レベルを保っていたが、投与群では 2 日目で下降に転じ、5 日目ではコントロール群のおよそ 70% にまで減少した。一方、spm レベルの変動は緩やかで、4MCHA 投与群の方がコントロール群より高値を保ちながら、術後 2 日目までは低いレベルを保った後、徐々に上昇し 10 日目では、ほぼ術前のレベルに戻った。なお、投与群の 5 日目の spm レベルが高めな感じを与えるが、spd レベルの低めな感じと相俟って、AdoMetDC 誘導のかかわりを暗示させる。なお、put レベルは両群間に差はなく、術後 1 日目が最も高く、以後減少し続けた。これは肝再生時に見られる ODC の一過性の誘導によるものであり、4MCHA はそれに影響を及ぼさないことを示している。

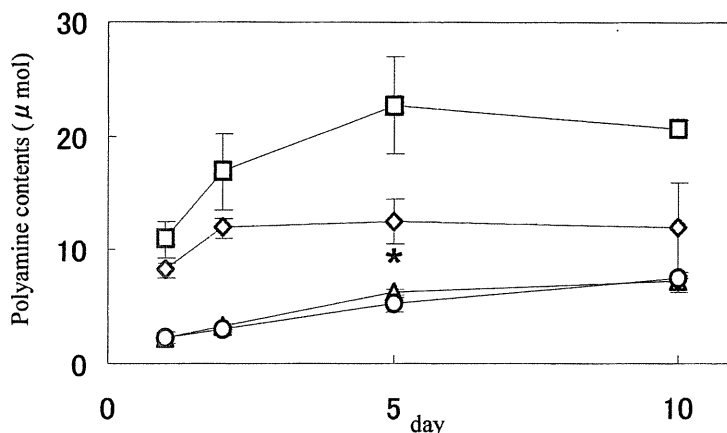


Fig.11 Change in total spd and total spm during liver regeneration.
Control (spd —□—, spm —○—); 4MCHA (spd —◇—, spm —△—).
Significance between 4MCHA treated and control rats. (* : p<0.01)

Fig. 11 は、spd 及び spm 合成の様子を見るために、全 spd 量あるいは全 spm 量(濃度×肝重量)を肝再生の過程でプロットしたものである。全 spd 量について、コントロール群と投与群の間で極めて顕著な違いが認められた。すなわち、コントロール群では5日目が最大値で10日目もほぼ同値を保っていたのに対し、投与群では2日目にほぼ最大値(コントロール群の最大値の約55%)に到達し、以後10日目までその値を保っていた。コントロール群の5日目の最大値が実際には3日目には到達していた可能性は高いが、このような事実は、肝再生の初期に、増殖が終わるまでに必要な大部分の spd が合成されてしまっていることを示していた。全 spm 量については両群に差は認められず、肝再生の間中増え続けた。

肝再生において、ODC とポリアミン(主に put と spd)が増大することはよく知られた事実であるが、ポリアミンが増殖に重要な役割を演じているかどうかについては、未だ結論が得られていない。α-Difluoromethylornithine を用いて得られた結果は、ODC の増大が増殖に重要であったという結果と ODC の抑制が増殖に影響を与えなかったという結果に分かれている。近年 spd, spm-N¹-acetyltransferase トランスジェニックラットを用いた肝再生研究において、spd and/or spm 特に spd が肝再生には重要であることが報告された。本研究で得られた結果もまた spd の重要性を示唆している。

免疫組織化学的検討 ラットの部分肝切除後、肝再生のマーカーとして proliferating cell nuclear antigen (PCNA) が有用であることは既に証明されている。術後 2,5,10 日目の再生肝について PCNA 染色を行い、全肝細胞数に対する PCNA 陽性細胞数の百分率を計算した。2日目についてみると、コントロール群は55.3%、4MCHA 投与群は28.8%となり、投与群の増殖細胞割合が明らかに低かった。この傾向は5日目でも見られたが、肝再生がほぼ終了した10日目では、両群ともに PCNA 陽性細胞はほとんど見られなかった。そのほか、鏡検的

には、両群ともに異常は認められず、4 MCHA の細胞形態に及ぼす影響は無かった。

なお 4MCHA の細胞増殖に及ぼす効果を調べるために、再生肝実験とは別に、小腸上皮細胞及び表皮細胞についてコントロールと比較した。この実験では、5-bromo-2-deoxyuridine(BrdU)の取り込みを、免疫組織化学的手法で調べた結果、4MCHA 投与群で増殖細胞割合が低いことが認められた。

以上、4MCHA による増殖抑制効果が明らかになった。得られた結果は spd-syn の *in vivo* 阻害による spm/spd 値の高まりと増殖抑制が関連することを支持している。その関連性をさらに明らかにすべく現在検討中である。

ま と め

本科学研究費補助金の交付期間中に行われた研究は、*in vitro* で spd-syn を阻害した時の spd の減少及び spm の増加が自然界で細胞増殖が停止していくときに見られる方向性に類似していることから、*in vivo* で spd-syn を阻害した時の細胞増殖に及ぼす影響を調べるために行ったものである。まず、IS-MS によるポリアミン分析法をポリアミントレーサー実験法や Ac₂-spm 定量法に応用・拡張していく過程で、数多くの生体試料を対象として、含まれるポリアミンを微量で正確・迅速に測定できる方法に改良された。阻害剤の開発では、spd-syn の put 結合部位を標的として BA 及び 4MCHA アナログを各種デザイン・合成し、IC₅₀ 値を比較検討する一方、哺乳動物 spd-syn の三次元構造をほぼ明らかにした。その結果、活性部位構造に基づく阻害剤のデザインは難しいことがわかり、IC₅₀ 値の最も低い APE と 4MCHA を *in vivo* 実験用の候補とした。ラットへの経口投与実験で APE は効果を示さず 4MCHA が効果を示したので、4MCHA を用いることとした。ラットに 4MCHA を毎日 1 回一週間経口投与したところ、投与量依存的に、体重増加の度合いは低められ、各組織中 spd の顕著な減少と spm の緩やかな増大が見られた。一ヶ月の連続投与でも基本的には同じで、spm/spd 比が高められたモデルラットを調整することができた。モデルラットに spd を同時投与すると spd の取り込みの様子や spm 合成の抑制などが観察され、ポリアミンの生理的意味を調べるために有用であることがわかった。つぎに、再生肝を用いてモデルラットとコントロールラットで肝再生の過程を比較したところ、モデルラットでは肝再生が抑制されており、それが spd レベルと関連することを示した。PCNA の測定結果からも 4MCHA による増殖の抑制は証明された。

以上の結果は、これまで関心が薄かった spd-syn の阻害が細胞増殖の抑制に関わることを初めて示唆したものである。本研究課題の固形癌への応用は行わなかったが、癌治療における spd-syn 阻害の意味として考えられることは、増殖速度の遅延や種々の化学療法剤との併用において、用量減による毒性軽減などが期待できるかもしれない。

ABSTRACTS OF RESEARCH PROJECT, GRANT-IN-AID FOR SCIENTIFIC RESEARCH (C)

1. RESERCH INSTITUTION NUMBER: 32403
2. RESEARCH INSTITUTION: Josai University
3. CATEGORY: Grant-in-Aid for Scientific Research (C)
4. TERM OF PROJECT (2001 ~ 2004)
5. PROJECT NUMBER: 13672261
6. TITLE OF PROJECT: Development of methodology to study in vivo changes in polyamines levels and its application
7. HEAD INVESTIGATOR: 00072413 Keijiro, Samejima Faculty of Pharmaceutical Sciences
Josai University, Professor
8. INVESTIGATORS: (1) 00077946 Masaru, Niitsu Faculty of Pharmaceutical Sciences
Josai University, Assistant Professor
(2) 30170690 Hitomi, Goda Faculty of Pharmaceutical Sciences
Josai University, Research Associate

9. SUMMARY OF RESEARCH RESULTS

The purpose of this study was to examine the influence of in vivo inhibition of spermidine synthase (spd-syn) on the growth of rat tissues. This was because in vitro inhibition of spd-syn causes a similar change in spermidine (spd) and spermine (spm) levels to that observed whenever cell growth is arrested. First, the method of polyamine determination by ionspray ionization mass spectrometry was semi-automated to treat many samples, by developing the polyamine tracer method using ^{15}N -labeled polyamines and the method for determining $\text{N}^1, \text{N}^{12}$ -diacetylspermine in the urine of cancer patients. Second, analogs of *n*-butylamine and *trans*-4-methylcyclohexylamine (4MCHA), which are potent competitive inhibitors at the putrescine binding site of spd-syn, were prepared and their inhibitory activities tested. This revealed that 5-amino-1-pentene (APE) and 4MCHA had the lowest IC_{50} value. In parallel with this research, the structure of the putrescine binding site was investigated. A possible three-dimensional structure of mammalian spd-syn, constructed with homology modeling and identification of the cysteine residues, showed the difficulty of designing an inhibitor from the active site structure. Third, APE and 4MCHA were administered orally to rats (once daily for 1 week), and 4MCHA alone showed a decrease in spd combined with a moderate increase in spm in rat tissues. The changes in spd and spm levels were dose-dependent, and the body-weight gain of the rats tended to decrease with increasing doses of 4MCHA. The altered polyamine levels were maintained during the extended 1-month period, with growth-dependent alteration. The results show it is possible to produce experimental rats with a higher spm:spd ratio than control rats to investigate the physiological significance of spd downregulation and spm upregulation in vivo. As an application, liver regeneration was compared between the model rats and control rats. The results showed that the inhibition of spd-syn repressed proliferation of the regenerating liver. Studies are now in progress.

10. KEY WORDS

- | | | |
|--------------------|---|---------------|
| (1) polyamine | (2) spermidine synthase | (3) inhibitor |
| (4) IS-MS | (5) regenerating liver | (6) PCNA |
| (7) stable isotope | (8) <i>trans</i> -4-methylcyclohexylamine | |

(CONTINUE TO NEXT PAGE)

11. REFERENCES

- | AUTHORS, TITLE OF ARTICLE | JOURNAL, VOLUME-NUMBER, PAGES
CONCERNED, YEAR |
|---|--|
| Y. J. Xu, T. Hara, K. Samejima, H. Sasaki, M. Kobayashi,
A. Takahashi, M. Niitsu:
Simultaneous Determination of Endogenous and Orally
Administered ^{15}N -labeled polyamines in rat organs. | <i>Anal. Biochem.</i> 301 (2), 255-260, 2002 |
| M. Kobayashi, K. Samejima, K. Hiramatsu, M. Kawakita:
Mass Spectrometric Separation and Determination of N^1 ,
N^{12} -Diacetylspermine in Cancer Patients. | <i>Biol. Pharm. Bull.</i> 25 (3), 372-374, 2002 |
| M. Kobayashi, Y. J. Xu, K. Samejima, H. Goda, M. Niitsu,
M. Takahashi, Y. Hashimoto:
Fate of Orally Administered ^{15}N -Labeled Polyamines in
Rats Bearing Solid Tumors. | <i>Biol. Pharm. Bull.</i> 26 (3), 285-288, 2003 |
| H. Dejima, M. Kobayashi, H. Takasaki, N. Takeda,
A. Shirahata, K. Samejima:
Synthetic Decarboxylated S-Adenosyl-L-methionine as a
Substrate for Aminopropyl Transferases. | <i>Biol. Pharm. Bull.</i> 26 (7), 1005-1008, 2003 |
| H. Goda, T. Watanabe, N. Takeda, K. Kobayashi, M. Wada,
H. Hosoda, A. Shirahata, K. Samejima:
Mammalian Spermidine Synthase—Identification of
Cysteine Residues and Investigation of the Putrescine
Binding Site— | <i>Biol. Pharm. Bull.</i> 27 (9), 1327-1332, 2004 |
| M. Kobayashi, T. Watanabe, Y. J. Xu, M. Tatemori,
H. Goda, M. Niitsu, A. Shirahata, K. Samejima:
Control of Spermidine and Spermine Levels in Rat
Tissues by <i>trans</i> -4-Methylcyclohexylamine, a Spermidine-
Synthase Inhibitor. | <i>Biol. Pharm. Bull.</i> 28 (4), 569-573, 2005 |

REFERENCES

- [1] N. Furuumi, D. Amano, Y. J. Xu, K. Samejima, M. Niitsu, and A. Shirahata, *Anal. Biochem.* **265**, 253-259 (1998).
- [2] T. Hara, Y. J. Xu, H. Sasaki, M. Niitsu, and K. Samejima, *J. Labelled Cpd. Radiopharm.* **43**, 1005-1011 (2000).
- [3] M. Wada, D. Amano, H. Hosoda, A. Shirahata, K. Samejima, and A. E. Pegg, *Biol. Pharm. Bull.* **22**, 889-895 (1999).
- [4] Y. J. Xu, N. Furuumi, K. Samejima, M. Niitsu, and A. Shirahata, *Biol. Pharm. Bull.* **23** (9), 1021-1026 (2000).

