

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

**特許第4997492号**  
**(P4997492)**

(45) 発行日 平成24年8月8日 (2012.8.8)

(24) 登録日 平成24年5月25日 (2012.5.25)

(51) Int. Cl.	F 1		
<b>A 6 1 K 31/37 (2006.01)</b>	A 6 1 K 31/37	Z N A	
<b>A 6 1 P 43/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 43/00	1 1 1	
<b>A 6 1 P 35/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 35/00		
<b>A 6 1 P 1/16 (2006.01)</b>	A 6 1 P 1/16		
<b>A 6 1 P 9/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 9/00		

請求項の数 2 (全 18 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2005-187157 (P2005-187157)	(73) 特許権者	504229284 国立大学法人弘前大学 青森県弘前市文京町1番地
(22) 出願日	平成17年6月27日 (2005.6.27)	(74) 代理人	100106611 弁理士 辻田 幸史
(65) 公開番号	特開2007-1955 (P2007-1955A)	(74) 代理人	100087745 弁理士 清水 善廣
(43) 公開日	平成19年1月11日 (2007.1.11)	(74) 代理人	100098545 弁理士 阿部 伸一
審査請求日	平成20年5月12日 (2008.5.12)	(72) 発明者	中村 敏也 青森県弘前市文京町1番地 国立大学法人 弘前大学医学部内
		審査官	清野 千秋

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 4-アルキルウンベリフェロンの新規医薬用途

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

4-アルキルウンベリフェロンまたはその薬学的に許容される塩を有効成分とすることを特徴とするヒアルロン酸分解酵素H Y A L 1 遺伝子発現抑制剤（但し、がんの予防・治療の用途と皮膚外用剤としての用途を除く）。

【請求項2】

4-アルキルウンベリフェロンまたはその薬学的に許容される塩を有効成分とすることを特徴とするマトリックスメタロプロテアーゼ9 (M M P - 9) 遺伝子発現抑制剤（但し、がんの予防・治療の用途と皮膚外用剤としての用途を除く）。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、4メチルウンベリフェロン（4 Methylumbelliferone: MU）に代表される4アルキルウンベリフェロンの新規医薬用途に関する。

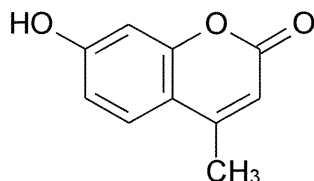
【背景技術】

【0002】

下記の化学構造式で表されるMUは、古くから利胆剤としての医薬用途が知られている他、最近では、ヒアルロン酸に対して合成阻害効果を有することが報告されている（非特許文献1）。

【0003】

## 【化1】



## 【0004】

ヒアルロン酸は、グルクロン酸とNアセチルグルコサミンの二糖単位の繰り返し構造からなる直鎖状の高分子多糖で、細胞外マトリックスの主要な構成成分の一つとして生体内に広く分布している。近年、このヒアルロン酸が、組織の構築材料としてばかりでなく、細胞の挙動に大きな影響を与えていることが知られてきた。その一例として挙げられるのが、がん細胞とヒアルロン酸との関係である。がん組織は、ヒアルロン酸リッチな環境を形成していることが知られており、がん細胞の増殖や浸潤とヒアルロン酸との間に関連性があることが示唆されている。事実、培養系においても、がん細胞と線維芽細胞を混合培養すると、線維芽細胞のヒアルロン酸合成が顕著に増加することが知られている。前述の通り、MUにはヒアルロン酸合成阻害効果があることが知られているが、MUのヒアルロン酸に対する作用は、未だ十分に解明されている訳ではない。従って、このような状況に鑑みれば、ヒアルロン酸に対する作用を含めたMUが持つ薬理作用を解明することで、その新規医薬用途を探索する意義は大きいと言える。

【非特許文献1】 Nakamura, T., Takagaki, K., Shibata, S., Tanaka, K., Higuchi, T., and Endo, M. (1995) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 208, 470-475

## 【発明の開示】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0005】

そこで本発明は、MUに代表される4アルキルウンベリフェロンの新規医薬用途を提供することを目的とする。

## 【課題を解決するための手段】

## 【0006】

本発明者は、MUの薬理作用を解明するため、ヒト線維芽細胞HDFとヒト大腸癌細胞WiDrをMUの存在下または非存在下において単独または混合して培養し、培地に分泌されたヒアルロン酸をセルロース・アセテート膜電気泳動およびHPLCにより調べた。また、それぞれの細胞から総RNAを抽出し、ヒアルロン酸合成酵素1 (HAS1)、同2 (HAS2)、同3 (HAS3)の遺伝子発現をRT-PCRにより調べた。その結果、HDFとWiDrを混合培養すると、培地中のヒアルロン酸が増加し、HAS2の遺伝子発現が顕著に亢進すること、このHAS2の遺伝子発現をMUが抑制することを見出した。

また、ヒアルロン酸合成能の高いリンフォーマ細胞であるOHK細胞をMUの存在下または非存在下において培養し、培養後の細胞から調製したホモジネートに対してヒアルロン酸を基質としたザイモグラフィーを行うことで、MUによるOHK細胞のヒアルロン酸分解酵素 (ヒアルロニダーゼ) 活性への影響を調べるとともに、この細胞から総RNAを抽出し、ヒアルロン酸分解酵素HYAL1の遺伝子発現をRT-PCRにより調べた。その結果、MUにはHYAL1の遺伝子発現抑制作用に基づくヒアルロン酸分解抑制活性があることを見出した。

また、OHK細胞をMUの存在下または非存在下において培養し、培地に分泌されたマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) について、ザイモグラフィーおよびウエスタンブロットを行った。その結果、OHK細胞の分泌する主なMMPIはMMP 9 (ゼラチナーゼB) であり、MUはこのMMP 9を濃度依存的に抑制することを見出した。また、この細胞から総RNAを抽出し、RT-PCRを行ったところ、MUにはMMP 9の遺伝子発現抑制作用があることを見出した。

## 【0007】

本発明は、MUがHAS2、HYAL1、MMP-9の遺伝子発現を抑制する多機能物

質であるという上記の知見に基づいてなされたものであり、本発明のHYAL1遺伝子発現抑制剤は、請求項1記載の通り、4-アルキルウンベリフェロンまたはその薬学的に許容される塩を有効成分とすることを特徴とする（但し、がんの予防・治療の用途と皮膚外用剤としての用途を除く）。

また、本発明のMMP-9遺伝子発現抑制剤は、請求項2記載の通り、4-アルキルウンベリフェロンまたはその薬学的に許容される塩を有効成分とすることを特徴とする（但し、がんの予防・治療の用途と皮膚外用剤としての用途を除く）。

#### 【発明の効果】

##### 【0008】

本発明によれば、MUに代表される4-アルキルウンベリフェロンの新規医薬用途としての、HAS2遺伝子発現抑制剤、HYAL1遺伝子発現抑制剤、MMP-9遺伝子発現抑制剤が提供される。

##### 【発明を実施するための最良の形態】

##### 【0009】

本発明において有効成分とする4-アルキルウンベリフェロンとしては、MUの他、4-エチルウンベリフェロン、4-プロピルウンベリフェロン、4-ブチルウンベリフェロンなどの、4位に炭素数1~4のアルキル基を有するウンベリフェロン（7-ヒドロキシクマリン）を例示することができる。その薬学的に許容される塩としては、ナトリウム塩やカリウム塩などのアルカリ金属塩などを例示することができる。

##### 【0010】

##### (1) 本発明のHAS2遺伝子発現抑制剤について

ヒアルロン酸合成酵素には、HAS1、HAS2、HAS3の3種類が存在し、HAS2は、非常に多量の高分子ヒアルロン酸（分子量100万以上）を産生することが知られている。がん組織にはヒアルロン酸が多く存在し、がん細胞は正常細胞と接触することで高分子ヒアルロン酸を産生させ、構造蛋白質を押し広げることで自身の増殖空間を確保するとともに、自身の細胞表面にあるヒアルロン酸結合蛋白質を介して正常組織に浸潤していく（必要であれば Knudson, W., Biswas, C., and Toole, B.P. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 6767-6771. または Knudson, W., Biswas, C., Li, X.Q., Nemecek, R.E., and Toole, B.P. (1989) The Biology of Hyaluronan, Wiley, Chichester (Chiba Found Symp 143) p 150-169を参照のこと）。本発明のHAS2遺伝子発現抑制剤は、HAS2の遺伝子発現抑制作用に基づいて、高分子ヒアルロン酸の産生を抑制することで、がん細胞の増殖・浸潤を阻害する効果を持つことから、がんの予防・治療に有用である。また、本発明のHAS2遺伝子発現抑制剤は、ヒアルロン酸の過剰産生に起因する各種の線維化疾患、例えば、慢性肝炎をはじめとする、肝、肺、腎などの各種臓器における慢性炎症性疾患に伴う線維化、胸膜中皮腫などの予防・治療にも有用である。

##### 【0011】

##### (2) 本発明のHYAL1遺伝子発現抑制剤について

ヒアルロン酸分解酵素（ヒアルロニダーゼ）は、組織における分子量100万以上の高分子ヒアルロン酸をオリゴ糖や低分子ヒアルロン酸に分解する酵素であり、1980年代、低分子ヒアルロン酸が血管新生を誘導する機能を有することが報告されて以来、これを支持する種々の研究成果が蓄積されている。血管新生は、がん組織においてはがん細胞に栄養を導く上において極めて重要であり、ヒアルロニダーゼ遺伝子を破壊したがん細胞と破壊していないがん細胞を動物に移植した場合、ヒアルロニダーゼ遺伝子を破壊したがん細胞は、ヒアルロニダーゼ遺伝子を破壊していないがん細胞と比較して、増殖の程度が極めて悪いという報告もある（必要であれば Simpson, M.A., Wilson, C.M., McCarthy, J.B. (2002) Am. J. Pathol., 161, 849-857.を参照のこと）。本発明のHYAL1遺伝子発現抑制剤は、HYAL1の遺伝子発現抑制作用に基づいて、低分子ヒアルロン酸による血管新生の誘導に基

10

20

30

40

50

づくがん細胞の増殖を阻害する効果を持つことから、がんの予防・治療に有用である。また、本発明のHYAL1遺伝子発現抑制剤は、ヒアルロン酸分解酵素に起因する各種の疾患、例えば、炎症やアレルギーの予防・治療の他、皮膚老化防止、慢性関節リウマチの予防・治療（高分子ヒアルロン酸との関節胞内混合投与による）などにも有用である。

#### 【0012】

(3) 本発明のMMP 9遺伝子発現抑制剤について

MMPは、コラーゲンやエラスチンやフィブロンectinやラミニンなどの繊維状蛋白質やプロテオグリカンなどの、細胞外マトリックスの構造蛋白質を分解する亜鉛含有酵素である。中でも、MMP 9は、基底膜成分であるタイプIVコラーゲンを分解する活性が非常に高く、この活性が高いがん細胞は、血管を破壊してその内部に侵入することで転移・浸潤を起しやすいとされている（必要であればOkada, Y., Gonoji, Y., Naka, K., Tomita, K., Nakanishi, I., Iwata, K., Yamashita, K., and Hayakawa, T. (1992) J. Biol. Chem., 267, 21712-21719.を参照のこと）。本発明のMMP 9遺伝子発現抑制剤は、MMP 9の遺伝子発現抑制作用に基づいて、このようなMMP 9によるがん細胞の転移・浸潤を阻害する効果を持つことから、がんの予防・治療に有用である。また、本発明のMMP 9遺伝子発現抑制剤は、MMP 9に起因する各種の疾患、例えば、創傷治癒の遅延の他、湿疹皮膚炎や紫外線皮膚炎や角化異常症といった皮膚の炎症性疾患、血管壁プラークの不安定化による急性心筋梗塞などの予防・治療にも有用である。

#### 【0013】

従来、遺伝子の発現を抑制するためには、当該遺伝子のアンチセンス鎖を標的細胞に取り込ませる方法によるものが主であったが、このような方法は、標的細胞に目的とするアンチセンス鎖を取り込ませることが必ずしも容易ではないといった問題や、同時に複数の遺伝子の発現を抑制することは困難であるといった問題があった。しかし、本発明において有効成分とする4アルキルウンベリフェロンは、細胞に取り込まれやすい性質を有するとともに、がん細胞の増殖や浸潤や転移などを助長する複数の酵素、即ち、HAS2、HYAL1、MMP 9の遺伝子発現を同時に抑制することができる性質を有する。従って、本発明によれば、例えば、がん細胞への核酸導入によるがんの予防・治療方法の有する上記のような欠点を解消することができる。

#### 【0014】

4アルキルウンベリフェロンまたはその薬学的に許容される塩は、経口投与または非経口投与（例えば、静脈注射、皮下投与、直腸投与など）することができる。投与に際してはそれぞれの投与方法に適した剤型に製剤化すればよい。製剤形態としては、例えば、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、細粒剤、丸剤、トローチ剤、舌下錠、坐剤、軟膏、注射剤、乳剤、懸濁剤、シロップなどが挙げられ、これら製剤の調製は、無毒性の賦形剤、結合剤、滑沢剤、崩壊剤、防腐剤、等張化剤、安定化剤、分散剤、酸化防止剤、着色剤、矯味剤、緩衝剤などの添加剤を使用して自公知の方法にて行うことができる。無毒性の添加剤としては、例えば、でんぷん、ゼラチン、ブドウ糖、乳糖、果糖、マルトース、炭酸マグネシウム、タルク、ステアリン酸マグネシウム、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、アラビアゴム、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール、ペトロラタム、グリセリン、エタノール、シロップ、塩化ナトリウム、亜硫酸ナトリウム、リン酸ナトリウム、クエン酸、ポリビニルピロリドン、水などが挙げられる。なお、製剤中には、本発明の有用性を補強したり増強したりするために、他の薬剤を含有させてもよい。

#### 【0015】

製剤中における有効成分の含有量は、その剤型に応じて異なるが、一般に0.1~100重量%の濃度であることが望ましい。製剤の投与量は、投与対象者の性別や年齢や体重の他、症状の軽重、医師の診断などにより広範に調整することができるが、一般に1日当たり0.01~300mg/Kgとすることができる。上記の投与量は、1日1回または数回に分けて投与すればよい。

#### 【実施例】

#### 【0016】

10

20

30

40

50

以下、本発明を実施例によって詳細に説明するが、本発明は、以下の記載に何ら限定して解釈されるものではない。

#### 【0017】

実施例1：MUのHAS2遺伝子発現抑制作用について

##### (実験方法)

#### 1. 細胞培養

ヒト線維芽細胞HDFとヒト大腸癌細胞WiDrを用いた。これらの細胞を、10%ウシ胎仔血清 (Biofluid, Australia)、1%ペニシリン ストレプトマイシン溶液 (100units/ml Penicillin G + 100 µg streptomycin sulfate, Gibco BRL)、1%ファンギゾン溶液 (Gibco BRL) を含むイーグルMEM培地 (IWAKI) にて5%CO<sub>2</sub> 95%air中、37 °Cで培養した。培養は、それぞれの細胞の50万個ずつを単独あるいは1:1で混合して100mmシャーレに播種して行った。24時間後に培地を除き、細胞層をダルベッコのCa<sup>2+</sup>およびMg<sup>2+</sup>不含リン酸緩衝液にて洗浄した後、1mMのMU (ナカライテスク) /ジメチルスルフォオキシドの存在下または非存在下で無血清イーグルMEM培地 (上記の培地から血清のみを除いたもの) に交換して培養を続けた。MUの非存在下における培養は、MU溶液の溶媒として用いたジメチルスルフォオキシドのみを最終濃度が0.1%になるように加えた培地を用いて行った。

#### 【0018】

#### 2. グリコサミノグリカン画分の分画とセルロース・アセテート膜電気泳動

それぞれの培養系で3日間培養した後の培地を回収し、以下のようにグリコサミノグリカン画分の分画を行った。培地を2000rpmで5分間遠心し、その上清7.5mlの3倍量 (22.5ml) のエタノール (食塩飽和) を加え、20 °Cで1時間放置した後、4 °C、10000rpmで20分間遠心した。得られた沈殿を200 µlの50mMトリス塩酸緩衝液 (pH8.0, 5mMのCaCl<sub>2</sub>を含む) に懸濁し、5%アクチナーゼ溶液10 µlを加え、45 °Cで1時間イキュベートした。インキュベート後の反応液を氷冷し、これに氷冷した50%トリクロール酢酸30 µlを加え、0 °Cで30分間放置した。4 °C、12000rpmで20分間遠心し、上清200 µlに4倍量 (800 µl) のエタノール (食塩飽和) を加え、20 °Cで1時間放置した後、4 °C、15000rpmで20分間遠心した。得られた沈殿を20 µlの蒸留水に溶解し、これをグリコサミノグリカン画分とした。このグリコサミノグリカン画分を0.1Mのギ酸ピリジン緩衝液 (pH3.0) 中、1mA/cmで30分間電気泳動を行った。泳動後の膜はアルシアンブルーで染色した。

#### 【0019】

#### 3. 高速液体クロマトグラフィー (HPLC)

グリコサミノグリカン画分を10000rpmで1分間遠心し、その上清の10 µlをShodex OHpak SB 805 HRカラム (Showa Denko, 8mm x 30cm) を用いたゲルろ過HPLC (HITACHI L 7100) にかけた。溶出液0.2MのNaCl、流速1ml/minで操作を行い、溶出プロファイルはHITACHI L 7400 UV Detectorにてモニターした。

#### 【0020】

#### 4. 総RNAの抽出およびRT PCR (Reverse transcription polymerase chain reaction)

培養後、それぞれの細胞層からAGPC (acid guanidinium phenol chloroform) 変法により総RNAを抽出した。このRNAからOligo(dT)15primerを用いた逆転写反応 (37 °C 60分、95 °C 5分) を行ってcDNAを得た。これをテンプレートとしてQiagen HotStarTaq DNA polymeraseを用いて、iCycler (BIO RAD)によりPCRを行った。PCRに用いたプライマーは、HAS1遺伝子検出用としてsense: 5' GTGAGTGGCTGTACAACGCG 3' (配列番号1) /antisense: 5' AGAGGGACGTAGTTAGCGGC 3' (配列番号2)、HAS2遺伝子検出用としてsense: 5' TGGCA TCACACCTCATCATC 3' (配列番号3) /antisense: 5' ACCAATTGCGTTACGTGTTG 3' (配列番号4)、HAS3遺伝子検出用としてsense: 5' TTGGCTGTGTGCAGTGTATTAGT 3' (配列番号5) /antisense: 5' GGTCTCTGTGAGGCACTTGG 3' (配列番号6) とした (Calabro, A., Oken, M.M., Hascall, V.C., and Masellis, A.M. (2002) Blood, 100, 2578-2585.に記載のもの)。また、コントロールとするGAPDH遺伝子検出用のプライマーとしてsense: 5' CCAC CCATGGCAAATTCATGGCA 3' (配列番号7) /antisense: 5' TCTAGACGGCAGGTCAGGTCCACC 3' (配列番号8) を用いた。なお、PCRの条件は熱変性 (denature) 94 °C 1分、アニーリン

グ (annealing) 61 1分、伸長反応 (extension) 72 1分を35サイクルとした。合成されたPCR産物5  $\mu$ l、ローディングバッファー1  $\mu$ lを混合したものを2%アガロースゲルにアプライし、Mupid (コスモ・バイオ) を用いて100Vで約30分間電気泳動を行った。泳動後のゲルをエチジウムブロマイドで室温、遮光下で30分間染色した。その後、蒸留水ですすいでから落射式蛍光読取装置Epi Light UV FA1100でバンドを検出し、IMAGE CONTROLLERMC 1100で泳動像をプリントした。

#### 【0021】

##### (実験結果)

#### 1. ヒアルロン酸合成における線維芽細胞とがん細胞との相互作用

HDFとWiDrをそれぞれ単独あるいは1:1で混合して3日間培養し、それぞれのコンディション培地からグリコサミノグリカン画分を分画し、そのセルロース・アセテート膜電気泳動およびHPLCを行った。セルロース・アセテート膜電気泳動の結果を図1に示す (Mu(+)) (なお図1における縦軸のChSはコンドロイチン硫酸を、DSはデルマトン硫酸を、HAはヒアルロン酸を表す)。図1から明らかなように、HDFとWiDrの単独培養 (HDFとWiDr) では、ヒアルロン酸を明確なバンドとして検出することができなかった。一方、これらの混合培養 (HDF+WiDr) では、ヒアルロン酸の明らかなバンドが検出された。また、HPLCの結果を図2 (A) に示す。図2 (A) から明らかなように、HDFとWiDrの単独培養では、ヒアルロン酸の溶出位置に検出されうる量のヒアルロン酸は認められなかった。しかし、これらの混合培養では、ヒアルロン酸の溶出位置にピークが検出された。以上の結果から、HDFとWiDrのそれぞれの単独培養におけるヒアルロン酸合成量よりも、これらの混合培養におけるヒアルロン酸合成量が顕著に亢進していることがわかった。

#### 【0022】

#### 2. ヒアルロン酸合成酵素遺伝子の発現

HDFとWiDrの混合培養においてヒアルロン酸合成の亢進が観察されたので、このヒアルロン酸合成がどのヒアルロン酸合成酵素によるものであるかを知るために、それぞれの培養系における細胞層から総RNAを調製し、3種のヒアルロン酸合成酵素についてRT PCRを行った。PCR産物をアガロースゲル電気泳動により調べた結果を図3に示す。図3から明らかなように、HAS1については、HDF、WiDrおよび混合培養 (HDF+WiDr) の3者の間には顕著な差はみられなかった。HAS3の混合培養 (HDF+WiDr) における発現量は、HDFとWiDrの単独培養の発現量のちょうど中間程度であった。しかし、HAS2については、混合培養 (HDF+WiDr) の発現量は、HDFとWiDrの単独培養の発現量に比べ顕著に多かった。以上の結果から、HDFとWiDrを混合培養することにより、WiDrがHDFに何らかのシグナルを送り、その結果、3種のヒアルロン酸合成酵素のうちHAS2の遺伝子発現量が亢進し、これによりヒアルロン酸合成が増加したことが推測された。

#### 【0023】

#### 3. MUによるヒアルロン酸合成への影響

セルロース・アセテート膜電気泳動の結果を図1に示す (Mu(+))。図1から明らかなように、MU非存在下でのHDFとWiDrの混合培養により検出されたヒアルロン酸のバンドは、MU存在下では著しく減弱した。また、HPLCの結果を図2 (B) に示す。図2 (B) から明らかなように、MU非存在下でのHDFとWiDrの混合培養により検出されたヒアルロン酸のピークは、MU存在下では著しく減弱した。以上の結果から、HDFとWiDrの混合培養により亢進されるヒアルロン酸合成をMUは顕著に抑制することがわかった。

#### 【0024】

#### 4. MUによるヒアルロン酸合成酵素遺伝子発現量への影響

HDFとWiDrの混合培養において、MUの存在により抑制されたヒアルロン酸合成が、どのヒアルロン酸合成酵素の抑制によるものであるかを知るために行った、1 mMのMUの存在下におけるmRNAの発現量をRT PCRにより分析した結果を図4 (A) ~ (C) に示す。図4から明らかなように、HDFとWiDrの単独培養においては、HDFでは、3種のヒアルロン酸合成酵素遺伝子のうちHAS1とHAS3の発現量にはMUの存在の有無による差異は見られなかったが、HAS2の発現量は、MUの存在により減少した (A)。また、WiDrでは、HAS1の発現量の増加

傾向がMUの存在により見られたものの、HAS3の発現量には変化がなかった。しかし、HAS2の発現量の減少は、HDFのそれよりも顕著であった(B)。一方、これらの混合培養では、MUの存在によりHAS1の発現量は増加し、HAS3の発現量は減少しているように見られたが、HDFとWiDrの単独培養と同様に、MUの存在によりHAS2の発現量の減少が中でも最も顕著に認められた(C)。以上の結果から、MUの非存在下におけるHDFとWiDrの混合培養において発現量が増加したHAS2は、MUの存在によりその発現量が顕著に減少し、それにより、ヒアルロン酸合成量が減少したと考えられた。

#### 【0025】

実施例2：MUのHYAL1遺伝子発現抑制作用について

#### (実験方法)

##### 1. 細胞培養

OHK細胞は大阪医科大学の桑原宏子博士から供与されたものを用いた。この細胞を10%ウシ胎仔血清(Biofluid, Australia)、1%ペニシリン ストレプトマイシン溶液(100units/ml Penicilin G + 100 µg streptomycin sulfate, Gibco BRL)を含むRPMI1640培地(GI BC0)中で5%CO<sub>2</sub>:95%air、37 °Cの条件で培養した。培養は、100mmシャーレに50万個の細胞を播種して行った。3日間培養した後、遠心(1200rpm, 4 °C, 5min)により細胞を回収し、これを無血清RPMI1640培地で洗浄した後、1mMのMU(ナカライテスク)/ジメチルスルフォオキシドを含む無血清RPMI1640培地に交換して3日間培養した。また、この時、溶媒に用いたジメチルスルフォオキシドの濃度は培地に対して0.1%になるので、コントロール細胞については、ジメチルスルフォオキシドのみをその濃度が0.1%となるように加えて3日間培養した。

#### 【0026】

##### 2. 試料の調製

OHK細胞を遠心(1200rpm, 4 °C, 5min)により回収し、これを無血清RPMI1640培地で洗浄した。得られた細胞にlysis buffer(20mMトリス塩酸緩衝液, pH7.5, 15mMのNaClおよび0.01%TritonX 100を含む)を2ml加えた後、ソニケーター(TOMY model UR 20P)で10秒×3回、計30秒間ソニケートし、得られたホモジネートを試料とした。

#### 【0027】

##### 3. ザイモグラフィ

試料を試料バッファー(0.27Mトリス塩酸緩衝液, pH6.8, 8.7%SDS, 30%グリセロールおよび適量のプロモフェノールを含む)と7:3に混合した(容量比)。これを0.13%~0.20%のヒアルロン酸を含むSDS ポリアクリルアミドゲル(10%アクリルアミド, 0.1cm×6.5cm×9.0cm)でゲル1枚あたり15mAの定電流で2時間泳動した。泳動後のゲルを2.5%Triton X 100中で、室温で1時間緩やかに振盪し、SDSにより変性した蛋白質の再生を行った。再生後のゲルを、50mMクエン酸緩衝液(pH4.0)に浸し、37 °Cで一晩インキュベートした。インキュベート後のゲルを0.2Mトリス塩酸緩衝液(pH8.0)中で、15分間緩やかに振盪した後、0.1mg/mlアクチナーゼを含む0.2Mトリス塩酸緩衝液(pH8.0)中で、緩やかに振盪しながら37 °Cで2時間インキュベートした。その後、ゲルを25%エタノール 10%酢酸中で室温、15分間振盪した後、0.5%アルシアンブルー/25%エタノール 10%酢酸により室温で1時間染色した。染色後のゲルは25%エタノール 10%酢酸で適度になるまで脱色した。酵素活性は青色背景に透明なバンドとして検出された。

#### 【0028】

##### 4. 高速液体クロマトグラフィ(HPLC)

試料100 µlを、0.2%ヒアルロン酸50 µlおよび、0.25Mクエン酸緩衝液(pH3.0~4.0)または0.25M酢酸緩衝液(pH4.0~6.5)100 µlと混合し、37 °Cで種々の時間インキュベートした。100 °Cで1分間処理することにより酵素反応を停止し、10000rpmで3分間遠心した。上清の10 µlをShodex OHpak SB 805 HRカラム(Showa Denko, 8mm×30cm)を用いたゲルろ過HPLC(HITACHI L 7100)にかけた。溶出液0.2MのNaCl、流速1ml/minで操作を行い、溶出プロフィールはHITACHI L 7400 UV Detectorにて波長210nmでモニターした。

#### 【0029】

10

20

30

40

50

## 5. 総RNAの抽出およびRT PCR ( Reverse transcription polymerase chain reaction )

総RNAの抽出はAGPC変法で行った。簡単に述べると、2メルカプトエタノールを含むグアニジンチオシアネートで細胞をホモジネートした。RNAはクロロホルムに抽出され、イソプロパノールで沈殿された。RNAは260nmに最大吸収をもち、抽出されたRNAの純度は260nm/280nmで評価した。総RNA1μgから、Omniscript RT kit ( Qiagen ) およびOligo(dT)15p rimerを用いた逆転写反応 ( 37 60分、95 5分 ) により1st strand cDNA合成を行った。ヒアルロン酸分解酵素に対応するcDNAをPCRによって増幅した。増幅は10×PCR buffer、5×Q solution、dNTP mixture、sense primerとantisense primer、およびHotStarTaq DN Aポリメラーゼ ( Qiagen ) を含む反応液中で行った。PCRに用いたプライマーは、HYAL1遺伝子検出用としてsense : 5' TCAGCCCCAAGGTTGTCCTCGACCA 3' ( 配列番号9 ) /antisense : 5' CTGCCAGCCAGGGTAGCATCGACAT 3' ( 配列番号10 ) とした ( Nicoll, S.B., Barak, O., Csoka, A.B., Bhatnagar, R.S., and Stern, R. (2002) Biochem. Biophys. Res. Commun., 292, 819-825.に記載のもの )。また、コントロールとするGAPDH遺伝子検出用のプライマーとしてsense : 5' CCACCCATGGCAAATTCATGGCA 3' ( 配列番号7 ) /antisense : 5' TCTAGACGGCAGGTCAGGTCCACC 3' ( 配列番号8 ) を用いた。PCRサイクルは、HYAL1については1サイクル ( 95 15分 )、35サイクル ( 94 1分、62 1分、72 1分 )、1サイクル ( 72 10分 ) とし、GAPDHについては1サイクル ( 95 15分 )、25サイクル ( 94 1分、62 1分、72 1分 )、1サイクル ( 72 10分 ) とした。

【 0 0 3 0 】

( 実験結果 )

### 1. OHK細胞のヒアルロン酸分解活性へのMUの影響

OHK細胞をMU非存在下 ( MU ) または1mMのMU存在下 ( MU+ ) に無血清RPMI1640培地中で3日間培養し、培養後の細胞を回収し、Triton X 100を含むTris buffer中でソニケートして調製したホモジネートを、pH4にてヒアルロン酸を基質としたザイモグラフィーにかけた結果を図5に示す。図5から明らかなように、MU非存在下で培養した細胞のホモジネートではヒアルロン酸分解活性を示すバンドが検出されたが、1mMのMU存在下で培養した細胞のホモジネートではこのようなバンドは認められず、ヒアルロン酸分解活性がMUにより抑制されたことわかった。

【 0 0 3 1 】

### 2. ヒアルロン酸分解酵素の同定

OHK細胞のホモジネートとヒアルロン酸をマイクロチューブ内でpH4にて経時的にインキュベートした後、ゲルろ過HPLCにかけた結果を図6に示す。図6から明らかなように、MU非存在下 ( MU ) で培養した細胞のホモジネートではヒアルロン酸のピークが反応時間とともに右側、即ち、低分子領域にシフトしており、ヒアルロン酸分解酵素による低分子化が進行していた。一方、1mMのMU存在下 ( MU+ ) で培養した細胞のホモジネートではこのようなピークの低分子領域へのシフトが顕著に抑制された。このMU非存在下 ( MU ) で培養した細胞における低分子化は、pH3.5~4.0で顕著であり、pH5.0以上ではほとんど認められないことから、この作用はヒアルロン酸分解酵素のうちHYAL1によるものである可能性が強く示唆された。

【 0 0 3 2 】

### 3. OHK細胞におけるHYAL1のmRNA発現へのMUの影響

OHK細胞をMU非存在下または1mMのMU存在下に無血清RPMI1640培地中で3日間培養し、培養後の細胞から総RNAを調製し、これを用いたRT PCRを行い、HYAL1遺伝子発現へのMUの影響を調べたPCR産物のアガロースゲル電気泳動の結果を図7に示す。図中、レーン1は分子量マーカー、レーン2はMU非存在下で培養した際のHYAL1の検出結果、レーン3は1mMのMU存在下で培養した際のHYAL1の検出結果、レーン4はMU非存在下で培養した際のGAPDHの検出結果、レーン5は1mMのMU存在下で培養した際のGAPDHの検出結果を表す。図7から明らかなように、レーン2で認められたHYAL1のバンドがレーン3では検出感度以下であったことから、MUがOHK細胞のHYAL1の遺伝子発現を抑制することにより、この細胞のヒアルロン酸分解活性を抑制していることがわかった。なお、データは示さないが、このMUによるHYAL1



の遺伝子発現抑制作用は、ヒト大腸癌細胞WiDrとヒト乳癌細胞CRL 1500でも確認することができた。

### 【 0 0 3 3 】

実施例3：MUのMMP 9遺伝子発現抑制作用について

(実験方法)

#### 1. 細胞培養

実施例2に記載の方法によってOHK細胞を3日間培養した後、遠心(1200rpm, 4 , 5min)により細胞を回収し、これを無血清RPMI1640培地で洗浄後、種々の濃度のMU(ナカライテスク)/ジメチルスルフォオキシドを含む無血清RPMI1640培地に交換し、3日間培養した。この時、全てのMU濃度においてジメチルスルフォオキシドの最終濃度が0.1%となるように調製した。また、MU含有培地とは別に、ストレプトミセス・ヒアルロニダーゼ(生化学工業, 5TRU/ml)を含む無血清RPMI1640培地でも、上記と同様に3日間培養した。

ヒト大腸がん細胞WiDrは、10%ウシ胎仔血清、1%ペニシリン ストレプトマイシン溶液、1%ファンギゾン溶液を含むイーグルMEM培地(IWAKI)にて100mmシャーレに培養した。24時間後に培地を除き、細胞層をダルベッコのCa<sup>2+</sup>およびMg<sup>2+</sup>不含リン酸緩衝液にて洗浄した後、1mMのMU/ジメチルスルフォオキシドを含む無血清イーグルMEM培地に交換して3日間培養した。

ヒト乳がん細胞(SK BR 3, MCF7, CRL1500およびHMC 1 8)は、10%ウシ胎仔血清、1%ペニシリン ストレプトマイシン溶液を含むRPMI1640培地にて35mmシャーレに培養した。24時間後に培地を除き、細胞層をダルベッコのCa<sup>2+</sup>およびMg<sup>2+</sup>不含リン酸緩衝液にて洗浄した後、1mMのMU/ジメチルスルフォオキシドを含む無血清RPMI1640培地に交換して3日間培養した。

### 【 0 0 3 4 】

#### 2. 試料の調製

OHK細胞の培地を回収し、1200rpm、4 、5分間遠心した。回収した上清にストレプトミセス・ヒアルロニダーゼ(1TRU/1ml)とphenylmethane sulfonylfluoride(PMSF, 0.1mM/ml)を加え、37 で2時間インキュベートした。その後、10000rpm、4 、20分間遠心し、得られた上清に硫酸飽和70%になるように硫酸を加えて4 に一晚静置した。これを、1200rpm、4 、20分間遠心し、培地に分泌された蛋白質を沈殿として回収した。得られた沈殿をlysis buffer(20mMトリス塩酸緩衝液, pH7.5, 15mMのNaClおよび0.01%TritonX 100を含む)200μlに溶解し、試料(約100倍濃縮)とした。

大腸がん細胞(WiDr)の培地を回収し、これにPMSF(0.1mM/ml)を加え、硫酸飽和70%になるように硫酸を添加して4 にて一晚静置した。これを、12000rpm、4 、20分間遠心し、培地に分泌された蛋白質を沈殿として回収した。得られた沈殿を上記lysis buffer 200μlに溶解し、試料(約50倍濃縮)とした。

乳がん細胞(SK BR 3, MCF7, CRL1500およびHMC 1 8)の培地1mlずつを、それぞれ倒立式遠心濾過チューブ(ADVANTEC ARTKISS 倒立式遠心濾過チューブシステム MWC010000)にとり、6000rpm、4 、90分間遠心した。得られた濃縮溶液(約100μl)を試料とした。

### 【 0 0 3 5 】

#### 3. ザイモグラフィー

試料を試料バッファー(0.27Mトリス塩酸緩衝液, pH6.8, 8.7%SDS, 30%グリセロールおよび適量のプロモフェノールを含む)に溶解した。これを0.147%のゼラチンを含むSDS ポリアクリルアミドゲル(10%アクリルアミド, 0.1cm×6.5cm×9.0cm)でゲル1枚あたり15mAの定電流で2時間泳動した。泳動後のゲルを50mMトリス塩酸緩衝液(pH7.5, 0.1MのNaClおよび2.5%Triton X 100を含む)中で、室温で1.5時間緩やかに振盪し、SDSにより変性した蛋白質の再生を行った。再生後のゲルを、50mMトリス塩酸緩衝液(pH7.5, 10mMのCaCl<sub>2</sub>を含む)に浸し、37 で一晚インキュベートした。その後、クマシーブリリアントブルーR 250で染色後、エタノール 酢酸 H<sub>2</sub>O(25:8:65)中で30分脱色、さらにエタノール 酢酸 H<sub>2</sub>O(10:15:175)中で適度になるまで脱色した。酵素活性は青色背景に透明なバンドとして検出された。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 3 6 】

## 4. ウェスタンブロット

試料を上記試料バッファー溶解した後、SDS ポリアクリルアミドゲル（10%アクリルアミド、0.1cm×6.5cm×9.0cm）でゲル1枚あたり15mAの定電流で2時間泳動した。ゲル中の蛋白質をニトロセルロース膜（BIO RAD, 8.5cm×9cm）にセミドライプロッター（AE 6677 S; ATTO, Tokyo, Japan）を用いて転写した。分子量マーカーストとしてFull Range Rainbow protein molecular markers（Amersham International）を用いた。転写されたニトロセルロース膜は、ブロッキング溶液（0.05%Tween20および3%スキムミルクを含むトリス塩酸緩衝液）中に4 時間で一晩静置した。その後、ブロッキング溶液で溶解した抗ヒトMMP 9マウスモノクローナル抗体（第一ファインケミカル）と室温で1時間反応させた。膜をTBST（0.05%Tween20を含むトリス塩酸緩衝液）で洗浄後、二次抗体（マウスIgGに対するヤギ抗体・アルカリホスファターゼ結合、ZYMED）と室温で一時間反応させた。膜をTBSTで洗浄後、さらにAPバッファーで洗浄した。APバッファーを除いた後、基質液（ニトロブルーテトラゾリウムおよび5 プロモ 4 クロロ インドールフォステート含有、Bio Rad）を加え、発色させた。

## 【 0 0 3 7 】

## 5. 総RNAの抽出およびRT PCR (Reverse transcription polymerase chain reaction)

総RNAの抽出はAGPC変法で行った。簡単に述べると、2メルカプトエタノールを含むグアニジンチオシアネートで細胞をホモジネートした。RNAはクロロホルムに抽出され、イソプロパノールで沈殿された。RNAは260nmに最大吸収をもち、抽出されたRNAの純度は260 nm/280nmで評価した。総RNA1 μgから、Omniscript RT kit (Qiagen) およびOligo(dT)15p rimerを用いた逆転写反応（37 60分、93 5分）により1st strand cDNA合成を行った。特異的MMPに対応するcDNAをPCRによって増幅した。増幅は10× PCR buffer、5× Q solution、dNTP mixture、sense primerとantisense primer、およびHotStarTaq DNAポリメラーゼ（Qiagen）を含む反応液中で行った。PCRに用いたプライマーは、MMP 9遺伝子検出用としてsense : 5' CACCTTCACTCGCGTGAC 3'（配列番号11）/antisense : 5' CATCTGCGTTTC CAAACCGAG 3'（配列番号12）とした（Tutton, M.G., George, M.L., Eccles, S.A., Burton, S., Swift, R.I., and Abulafi, A.M. (2003) Int. J. Cancer, 107, 541-550.に記載のもの）。また、コントロールとするGAPDH遺伝子検出用のプライマーとしてsense : 5' CCACCCATGGCAAATTCATGGCA 3'（配列番号7）/antisense : 5' TCTAGACGGCAGGTCAGGTC CACC 3'（配列番号8）を用いた。PCRサイクルは、MMP 9については1サイクル（95 15分）、35サイクル（94 1分、55 1分、72 1分）、1サイクル（72 10分）とし、GAPDHについては1サイクル（95 15分）、25サイクル（94 1分、62 1分、72 1分）、1サイクル（72 10分）とした。

## 【 0 0 3 8 】

## 6. 高速液体クロマトグラフィー (HPLC)

培地を分取し、10000rpmで1分間遠心し、その上清1mlを倒立式遠心濾過チューブ（MWCO 10000）にとり、6000rpm、4 分、20分間冷却遠心した。得られた濃縮溶液を試料（グリコサミノグリカン画分）とした。さらに、MU非存在下で培養した培地より得られた試料40 μlにストレプトミセス・ヒアルロニダーゼ10 μl（2TRU）を加え、37 度で一晩インキュベートした。100 度で3分間処理することにより酵素反応を停止し、これをヒアルロニダーゼ処理試料とした。試料10 μlをShodex OHpak SB 805 (Showa Denko, 8mm×30cm)を用いたゲルろ過HPLC（HITACHI L 7100）にかけた。溶出液0.2MのNaCl、流速1ml/minで操作を行い、溶出プロファイルはHITACHI L 3300 RI Monitorにて検出した。

## 【 0 0 3 9 】

## (実験結果)

## 1. MUによるOHK細胞のヒアルロン酸合成阻害

OHK細胞の培地に分泌されたグリコサミノグリカンについてのHPLCの結果を図8に示す。図中、符号1はMU非存在下での培養試料、符号2は1mMのMU存在下での培養試料、符号3はMU非存在下での培養試料にストレプトミセス・ヒアルロニダーゼを加えてインキュベートし

たヒアルロニダーゼ処理試料を表す。図8から明らかなように、MU非存在下での培養試料で観察されたピークは、MU存在下での培養試料では認められなかった。また、ヒアルロニダーゼ処理試料では、MU非存在下での培養試料で観察されたピークが消失した。以上の結果から、このピークはヒアルロン酸と同定され、MUはOHK細胞におけるヒアルロン酸の合成を阻害することがわかった。

【 0 0 4 0 】

## 2. OHK細胞の培地に分泌されたゼラチン分解活性へのMUの影響

OHK細胞を種々の濃度のMU存在下で3日間培養し、それぞれの培地を回収し、ゼラチン分解活性をザイモグラフィーで観察した結果を図9に示す。図中、レーン1はMU非存在下での培養試料、レーン2は0.1mMのMU存在下での培養試料、レーン3は0.2mMのMU存在下での培養試料、レーン4は0.5mMのMU存在下での培養試料、レーン5は1mMのMU存在下での培養試料を表す。図9から明らかなように、分子量77kDaの位置に見られるバンドの強度は、MUの濃度依存的に減弱した。

【 0 0 4 1 】

## 3. ゼラチン分解酵素の同定とその酵素量へのMUの影響

ゼラチンザイモグラフィーにより検出されたゼラチン分解酵素を同定するために、ウエスタンプロットを行った結果を図10に示す。図中、レーン1はMU非存在下での培養試料、レーン2は1mMのMU存在下での培養試料を表す。図10から明らかなように、ザイモグラフィーの活性バンドと対応する位置に抗MMP 9抗体と反応するバンドが見られた。以上の結果から、このMMPはMMP 9であることが同定され、このMMP 9の蛋白質としての産生量がMUの存在により減少することがわかった。なお、MMP 9の分子量は92kDaと報告されているので、77kDaの位置に見られるバンドはMMP 9とは異なるようにも思われるが、抗MMP 9抗体と反応することからMMP 9と同定することには問題はない。

【 0 0 4 2 】

## 4. MMP 9のmRNA発現へのMUの影響

RT PCRにより、OHK細胞におけるMMP 9のmRNA発現について調べたPCR産物のアガロースゲル電気泳動の結果を図11に示す。図中、(A)の符号1はMU非存在下での培養試料、符号2は1mMのMU存在下での培養試料、(B)の符号1はMU非存在下での培養試料、符号2はMU非存在下かつ5TRU/mlストレプトミセス・ヒアルロニダーゼ存在下での培養試料を表す。図11(A)から明らかなように、1mMのMU存在下での培養試料は、MU非存在下での培養試料に比べてMMP 9のmRNA発現量における顕著な減少が観察された。以上の結果から、MUを培地に加えて培養したOHK細胞ではmRNAレベルでのMMP 9遺伝子発現抑制が認められた。

【 0 0 4 3 】

## 5. ヒアルロニダーゼ処理したOHK細胞のMMP 9のmRNA発現

上記の実験からMUはOHK細胞においてもヒアルロン酸の合成を阻害することが示された。このことから、これまでのMUによるMMP 9の遺伝子発現抑制という結果は、MUのヒアルロン酸合成阻害の二次的影響とも考えられた。しかし、図11(B)から明らかなように、MU非存在下かつヒアルロニダーゼ存在下での培養試料においては、MU存在下での培養試料のようなMMP 9のmRNA発現の減少は見られなかった。よって、MUによるMMP 9の遺伝子発現抑制とヒアルロン酸合成阻害との関連性は極めて薄いことが推測された。

【 0 0 4 4 】

## 6. 他のがん細胞によるMMP 9産生へのMUの影響

OHK細胞で観察されたMUによるMMP 9の遺伝子発現抑制がOHK細胞に特異的な現象であるのかを知るために、他のいくつかのがん細胞におけるMMP 9の遺伝子発現へのMUの影響を調べた結果を図12と図13に示す。図12は大腸がん細胞WiDrにおけるMMP 9活性へのMUの影響を調べた結果であり、(A)はゼラチンザイモグラフィーの結果、(B)はウエスタンプロットの結果である。(A)(B)とも、符号1はMU非存在下での培養試料、符号2は1mMのMU存在下での培養試料を表す。図12の(A)(B)から明らかなように、1mMのMU存在下での培養試料においては、MMP 9の酵素活性および酵素量の顕著な減少がそれぞれ見られた。図13は4種類の乳がん細胞におけるMMP 9活性へのMUの影響を調べたゼラチンザイモグラフ

イーの結果であり、図中、レーン1はSK BR 3についてのMU非存在下での培養試料、レーン2は同1mMのMU存在下での培養試料を表す。レーン3はMCF7についてのMU非存在下での培養試料、レーン4は同1mMのMU存在下での培養試料を表す。レーン5はCRL1500についてのMU非存在下での培養試料、レーン6は同1mMのMU存在下での培養試料を表す。レーン7はHMC 18についてのMU非存在下での培養試料、レーン8は同1mMのMU存在下での培養試料を表す。図13から明らかのように、MUによるMMP 9の遺伝子発現抑制はOHK細胞に限った現象ではないことがわかった。

#### 【 0 0 4 5 】

##### 製剤例1：錠剤

1錠当たり5mgのMUを含む以下の成分組成からなる200mg錠剤を、各成分をよく混合してから打錠することで製造した。 10

MU	5mg
乳糖	137 "
でんぷん	45 "
カルボキシメチルセルロース	10 "
タルク	2 "
ステアリン酸マグネシウム	1 "
	合計200mg/錠

#### 【 0 0 4 6 】

##### 製剤例2：カプセル剤

1カプセル当たり20mgのMUを含む以下の成分組成からなる100mgカプセル剤を、各成分をよく混合してからカプセルに充填することで製造した。 20

MU	20mg
乳糖	53 "
でんぷん	25 "
ステアリン酸マグネシウム	2 "
	合計100mg/カプセル

#### 【 産業上の利用可能性 】

#### 【 0 0 4 7 】

本発明は、MUに代表される4 アルキルウンベリフェロンの新規医薬用途を提供することができる点において、産業上の利用可能性を有する。 30

#### 【 図面の簡単な説明 】

#### 【 0 0 4 8 】

【 図 1 】 実施例1における、ヒアルロン酸合成に対する線維芽細胞とがん細胞との相互作用とMUの存在の有無の影響を調べるためのセルロース・アセテート膜電気泳動の結果を示す図。

【 図 2 】 同、ヒアルロン酸合成に対する線維芽細胞とがん細胞との相互作用とMUの影響を調べるためのHPLCの結果を示す図。

【 図 3 】 同、ヒアルロン酸合成酵素遺伝子の発現を調べるためのPCR産物のアガロースゲル電気泳動の結果を示す図。 40

【 図 4 】 同、MUによるヒアルロン酸合成酵素遺伝子発現量への影響を調べるためのPCR産物のアガロースゲル電気泳動の結果を示す図。

【 図 5 】 実施例2における、OHK細胞のヒアルロン酸分解活性へのMUの影響を調べるためのヒアルロン酸ザイモグラフィの結果を示す図。

【 図 6 】 同、ヒアルロン酸分解酵素の同定のためのHPLCの結果を示す図。

【 図 7 】 同、HYAL1のmRNA発現へのMUの影響を調べるためのPCR産物のアガロースゲル電気泳動の結果を示す図。

【 図 8 】 実施例3における、OHK細胞のヒアルロン酸合成に対するMUの影響を調べるためのHPLCの結果を示す図。

【 図 9 】 同、OHK細胞の培地に分泌されたゼラチン分解活性へのMUの影響を調べるための 50

ゼラチンゼイモグラフィーの結果を示す図。

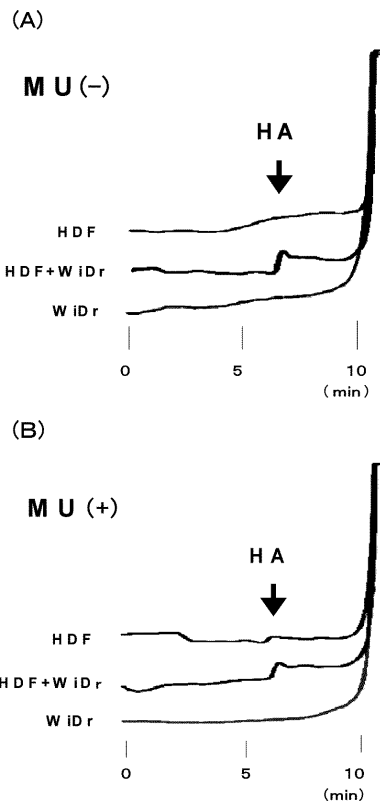
【図 1 0】同、ゼラチン分解酵素の同定のためのウエスタンブロットの結果を示す図。

【図 1 1】同、MMP 9のmRNA発現へのMUの影響を調べるためのPCR産物のアガロースゲル電気泳動の結果を示す図。

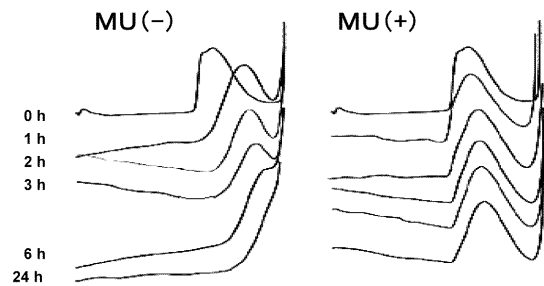
【図 1 2】同、大腸がん細胞におけるMMP 9活性とMUの影響を調べるためのゼラチンゼイモグラフィーとウエスタンブロットの結果を示す図。

【図 1 3】同、乳がん細胞におけるMMP 9活性とMUの影響を調べるためのゼラチンゼイモグラフィーの結果を示す図。

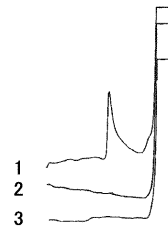
【図 2】



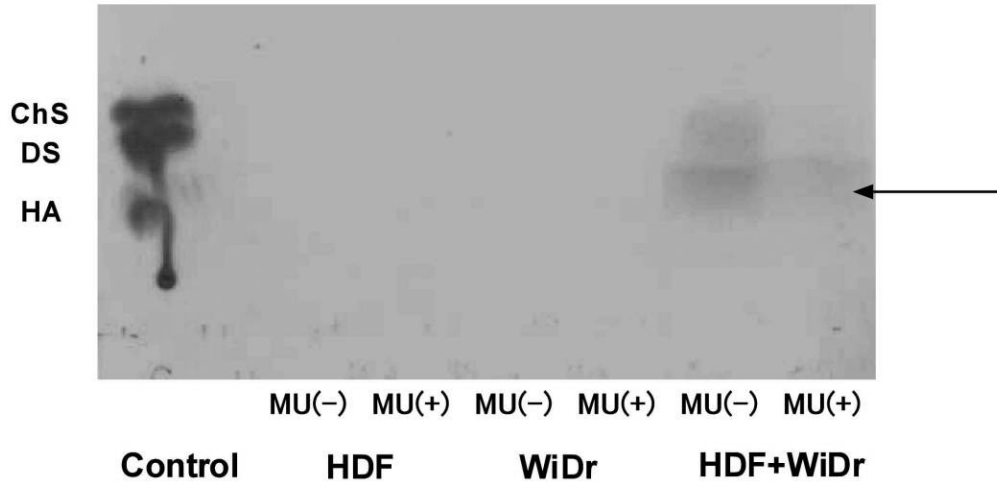
【図 6】



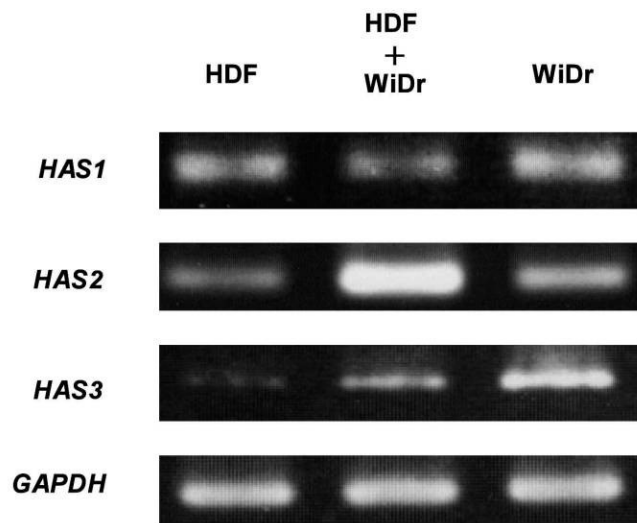
【図 8】



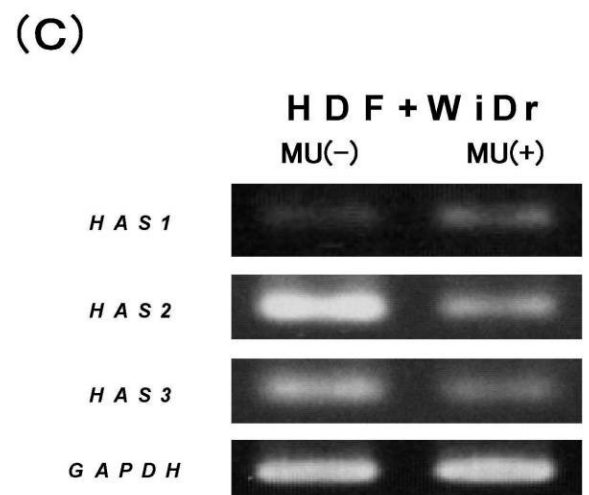
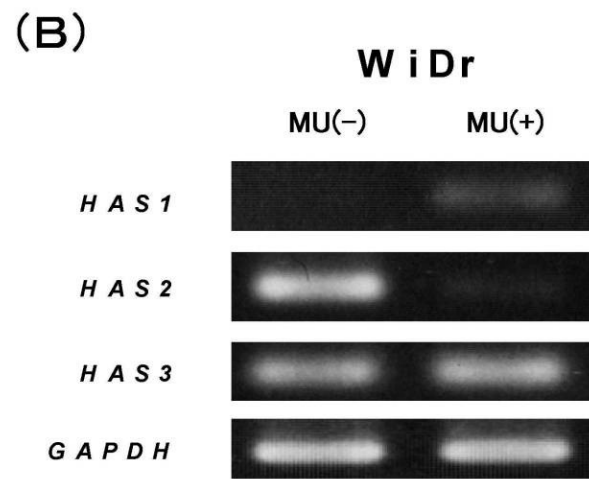
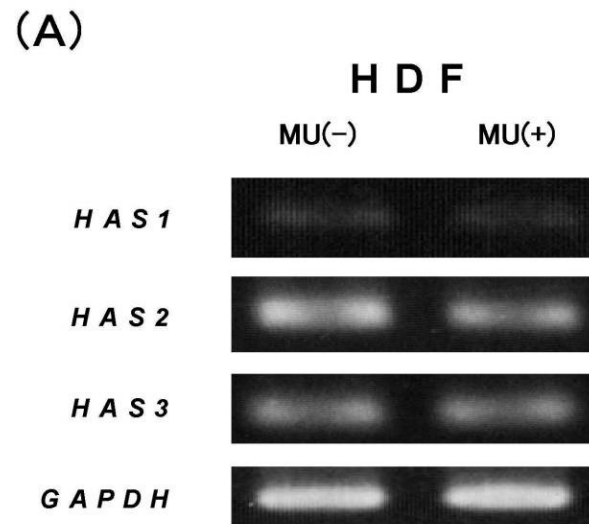
【 図 1 】



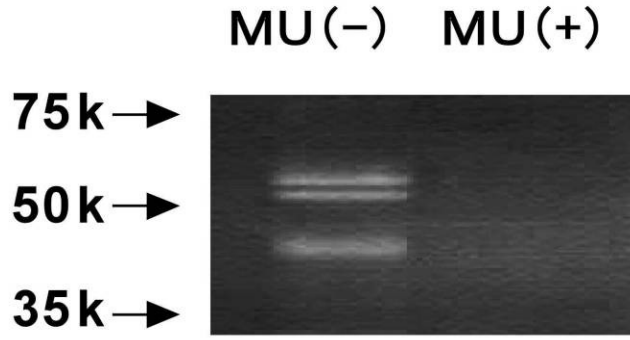
【 図 3 】



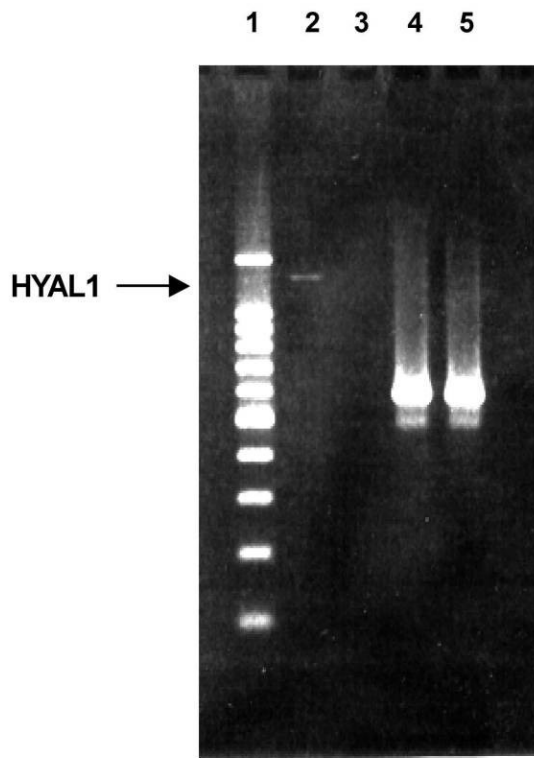
【 図 4 】



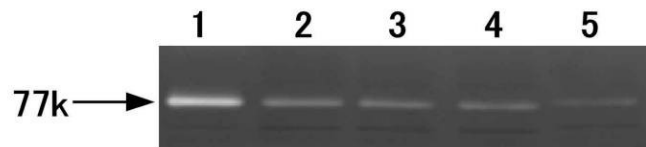
【 図 5 】



【 図 7 】



【 図 9 】

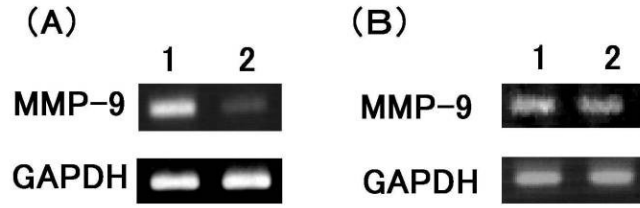


【 図 10 】

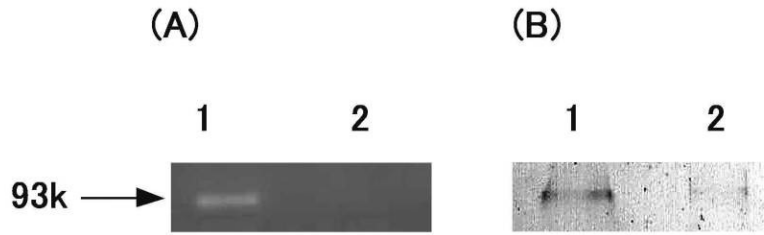




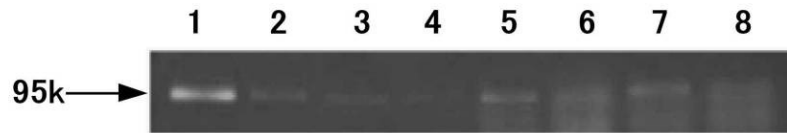
【図 1 1】



【図 1 2】



【図 1 3】



【配列表】

0004997492000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 P	29/00 (2006.01)	A 6 1 P	29/00
A 6 1 P	37/06 (2006.01)	A 6 1 P	37/06
A 6 1 P	17/16 (2006.01)	A 6 1 P	17/16
A 6 1 P	19/02 (2006.01)	A 6 1 P	29/00 1 0 1
A 6 1 P	17/02 (2006.01)	A 6 1 P	19/02
A 6 1 P	17/00 (2006.01)	A 6 1 P	17/02
A 6 1 P	9/10 (2006.01)	A 6 1 P	17/00
C 1 2 N	15/09 (2006.01)	A 6 1 P	9/10
C 0 7 D	311/16 (2006.01)	C 1 2 N	15/00 A
		C 0 7 D	311/16 1 0 1

- (56)参考文献 特開 2 0 0 5 - 3 0 6 8 1 6 ( J P , A )  
 特開 2 0 0 6 - 0 2 8 0 9 4 ( J P , A )  
 Hoult J R S et al , Agents Actions , 1 9 9 4 年 , Vol.42 , p.44 49  
 Nakamura T et al , Biochemical and Biophysical Research Communications , 2 0 0 2 年 , Vol .298 , p.646 650  
 Kawase M et al , Anticancer Research , 2 0 0 3 年 , Vol.23 , p.3243 3246  
 工藤大輔他 , マトリックス研究会大会 , 2 0 0 3 年 , 50th , p.30 31  
 Kakizaki I et al , The Journal of Biological Chemistry , 2 0 0 4 年 , Vol.279, No.32 , p.3 3281 33289  
 Kakizaki I , 生化学 , 2 0 0 4 年 8 月 , p.1007

## (58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

A 6 1 K 3 1 / 3 7  
 C 0 7 D 3 1 1 / 1 6  
 C 1 2 N 1 5 / 0 9  
 C A / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )  
 P u b M e d