

大豆たん白質から抽出した大豆トリプシンインヒビターおよびその改変体によるがん転移制御：  
大豆由来クニッツ型トリプシンインヒビターのウロキナーゼ発現抑制による卵巣がん細胞の浸潤抑制作用の検討

\*小林 浩・鈴木美香

浜松医科大学産婦人科

**A Soybean Kunitz Trypsin Inhibitor Suppresses Ovarian Cancer Cell Invasion by Blocking Urokinase Upregulation**

Hiroshi KOBAYASHI and Mika SUZUKI

Department of Obstetrics and Gynecology,  
Hamamatsu University School of Medicine, Shizuoka 431-3192

ABSTRACT

We have previously reported in a series of papers that a Kunitz-type protease inhibitor, bikunin, suppresses upregulation of urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its specific receptor (uPAR) expression, phosphorylation of ERK1/2 and cancer cell invasion *in vitro* and the peritoneal disseminated metastasis *in vivo*. In the present study, we investigated the effects of soy bean trypsin inhibitor (SBTI) on the net enzymatic activity of secreted extracellular uPA, the signal transduction involved in the expression of uPA and the invasion in HRA human ovarian cancer cells. SBTI contains a Kunitz trypsin inhibitor (KTI) and a Bowman-Birk inhibitor (BBI). Here, we show 1) that KTI and BBI were purified separately from soybeans, 2) that neither KTI nor BBI effectively inhibits enzymatic activity of uPA, 3) that uPA upregulation observed in HRA cells was inhibited by preincubation of the cells with KTI with an  $IC_{50}$  of  $\sim 2 \mu M$ , whereas BBI failed to repress uPA upregulation, as measured by enzyme-linked immunosorbent assay, 4) that the cell invasiveness was inhibited by treatment of the cells with KTI with an  $IC_{50}$  of  $\sim 3 \mu M$ , whereas BBI failed to suppress cell invasion, as measured by an *in vitro* invasion assay, 5) KTI suppresses HRA cell invasion by blocking uPA up-regulation which may be mediated by a binding proteins other than a bikunin-binding protein and/or its receptor, and 6) that the transforming growth factor-beta 1 (TGF- $\beta$ 1)-mediated activation of ERK1/2 was significantly reduced by preincubation of the cells with KTI. In conclusion, KTI, but not BBI, could inhibit cell invasiveness at least through suppression of uPA signaling cascade, although the mechanisms of KTI may be different from those of

\*〒431-3192 浜松市半田山1-20-1

Key words : bikunin, urokinase, cancer metastasis, ovarian cancer, soybean protein

我々は長年にわたるがん転移抑制研究から、がん細胞が周囲の健常組織を破壊し浸潤する過程が非常に重要な作用を持つことを解明してきた。がん細胞は間質組織に接着し、ウロキナーゼで酵素学的に組織を破壊し、移動していく。これが転移である。したがって、がん細胞が接着するときはウロキナーゼ産生が抑制され、次に組織を破壊するときのみウロキナーゼ産生が亢進するという非常に巧妙な演技を演じる<sup>1)</sup>。

我々は、生理的がん転移抑制物質を探索しているときにヒト羊水由来のクニッツ型トリプシンインヒビターにその作用を見出した<sup>2-4)</sup>。現在この物質はビクニン (Bikunin) を命名され研究されている<sup>2-4)</sup>。ビクニンは各種がん細胞においてウロキナーゼ<sup>2,3)</sup>あるいはその受容体<sup>4)</sup>をmRNAレベルで産生抑制し、結果としてこれらのたん白質の産生も抑制することを確認した。主にMAP kinaseであるMEK, ERKなどのリン酸化が抑制されることも判明し、クニッツ型トリプシンインヒビターは単なるたん白質分解酵素阻害剤ではないことを見出した。もちろんたん白質分解酵素阻害剤としての例えばプラスミン活性抑制作用を認めるため、これによりがん転移が抑制されるという機序も考えられる。しかしむしろ、ビクニンはMAP kinaseの活性化を抑制し、ウロキナーゼあるいはその受容体をmRNAレベルで産生抑制し、がん転移を阻止していると考えられるほうが妥当であるということも多くのがん細胞株で確認してある。最近の臨床データでは進行卵巣がん患者においてビクニン使用群に有意に良好な5年生存率を認めた<sup>5)</sup>。

ところで、プロテアーゼインヒビターは植物にも多く含有されていることが知られている<sup>6)</sup>。大豆などのプロテアーゼインヒビターは昆虫による攻撃を阻止することにも一役かっているようである。乳製品をはじめ、豆腐などの大豆食品は健康食品として市場に出回っている。

大豆由来トリプシンインヒビターにはクニッツ型 (Kunitz Trypsin Inhibitor; KTI) とボーマンバーク型 (Bowman-Birk Inhibitor; BBI) の2種類存在していることが知られている。例えば、BBIには化学発がん物質や放射線による発がんを中和する作用が指摘されている<sup>7-12)</sup>。しかし、大豆KTIの作用に対しては未知の部分が多いとされている。

我々はヒト羊水由来ビクニンをがん転移抑制剤とし

て特許取得しているが材料確保の困難さ、あるいはリコンビナント作成のコスト高により安定供給に問題がある。しかし、もし大豆トリプシンインヒビターにがん転移抑制活性が確認できれば、非常に安価に大量生産でき、場合によっては内服することも可能となり、患者のQOL向上に大きく貢献できることになる。そこで今回はまず、大豆由来トリプシンインヒビターにがん浸潤抑制作用があるかどうかを検討した。

## 材料と方法

### がん細胞株

使用したがん細胞株はヒト卵巣がん細胞HRAであり、RPMI 1640に10% FBSを添加して培養した<sup>3,13)</sup>。

### 材料

KTIとBBIは過去に報告された方法で精製された<sup>14)</sup>。ウロキナーゼELISA、各種酵素、合成基質、酵素インヒビターはAmerican Diagnostica社より購入した。抗ERK1/2抗体、抗リン酸化ERK1/2抗体はZymed社より購入、JNKとp38抗体はSanta Cruz社より、TGF- $\beta$ はGenzyme社より、PD98059はNew England BioLabs社より、MatrigelはCollaborative Research社から、PP2とgenisteinはSigma社よりそれぞれ購入した。

### 培養上清採取

細胞は35 mmあるいは100 mm dishで培養した。添加した薬剤は、TGF- $\beta$ 1, KTI, BBI単独、あるいは両者同時投与を行い、細胞および培養上清を別々に採取した。

### 培養細胞膜上のウロキナーゼ活性測定

96穴プレートにがん細胞が集積するまで培養し、洗浄後にウロキナーゼの合成基質 (SpectrozymenUK) を添加しELISAリーダを用い405 nmで吸光度を測定した。

### ノーザンブロット

ウロキナーゼcDNAおよび $\beta$ アクトチンプローブを用いてデンシトメータで定量した。

### 細胞増殖

細胞増殖はMTTアッセイで測定した。

### ウロキナーゼ産生におけるインヒビターの作用

使用したインヒビターは以下のとおり。MEK inhibitorとしてPD98059を、tyrosine kinase inhibitorとしてgenisteinを、Src inhibitorとしてPP2を使用した。

## ウエスタンブロット

ERK1/2のリン酸化をWestern blotにより評価した。

## がん浸潤評価

がん浸潤アッセイはマトリゲルを敷いたinvasion chamber 法で評価した<sup>15,16)</sup>。

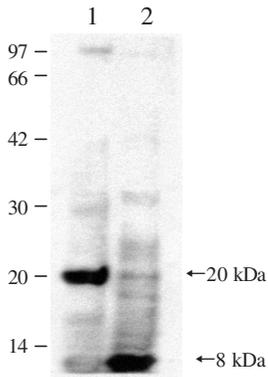


Fig. 1. KTI and BBI purified from soybeans: Western blot analysis. SBTI contains KTI and BBI. An aliquot (10  $\mu$ g/lane) was subjected to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis under non-reducing conditions. Lane 1, KTI (20 kDa); lane 2, BBI (8 kDa).

## 結果

無刺激あるいはTGF- $\beta$ 1刺激によるHRA卵巣がん細胞からのウロキナーゼ産生はKTI特異的に抑制された。実験に使用したKTIとBBIは既報にしたがって精製し、Fig. 1に示すように、KTIの分子量は20 kDa、BBIの分子量は8 kDaであった。

Fig. 2Aに示したように、がん細胞の培養液にKTIとBBIをそれぞれ添加し培養液中に産生されるウロキナーゼの濃度をELISAにより測定した。その結果、KTIにのみ濃度依存性にウロキナーゼ産生が抑制された。その50%抑制濃度は約2  $\mu$ Mであった。なお、トリパンブルー法で検討したが、実験に使用した範囲ではKTIもBBIも共にHRA細胞障害性は認めなかった。つまり、KTIはHRA細胞のviabilityを低下させた結果、ウロキナーゼ産生を抑制したのではない。

次に、TGF- $\beta$ 1によるウロキナーゼ産生亢進作用をKTIが抑制できるかどうか検討した (Fig. 2B)。その結果、これも、TGF- $\beta$ 1によるウロキナーゼ産生亢進をKTI濃度依存性に抑制することを確認した。しかし、同様にBBIにはその作用がみられなかった。

HRAがん細胞の細胞膜上にはウロキナーゼ活性が確認できた。これはがん細胞の膜に存在するウロキナーゼリセプタに結合したウロキナーゼは酵素学的に活性であることを意味している。amilorideやウロキナーゼ中和抗体を添加すると細胞膜結合性ウロキナーゼ活

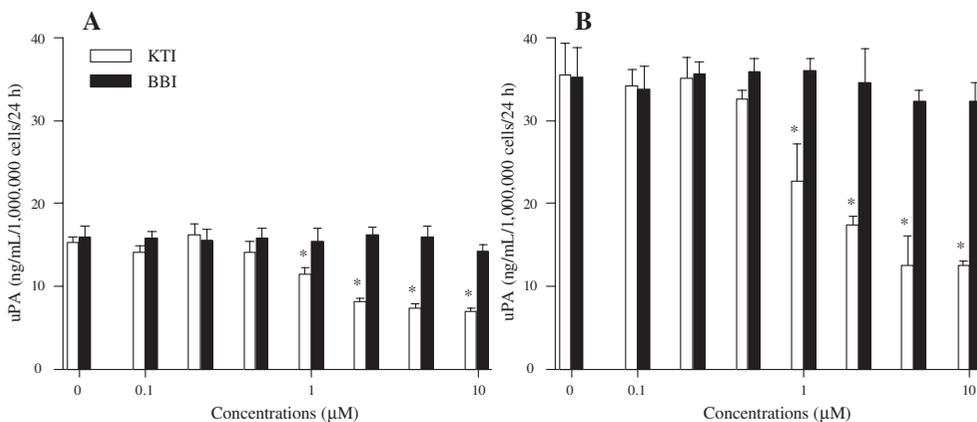


Fig. 2. Effects of KTI and BBI on uPA secretion. HRA cells were seeded in 35-mm dishes and then treated with the indicated concentrations of KTI (white column) or BBI (black column) in the absence (A) or presence (B) of 10 ng/mL TGF- $\beta$ 1 for 24 h. The uPA contents of cell-conditioned medium were measured by ELISA. Results represent mean values  $\pm$  SD of three experiments and triplicate determination. \* $P$ <0.05 compared with the control.

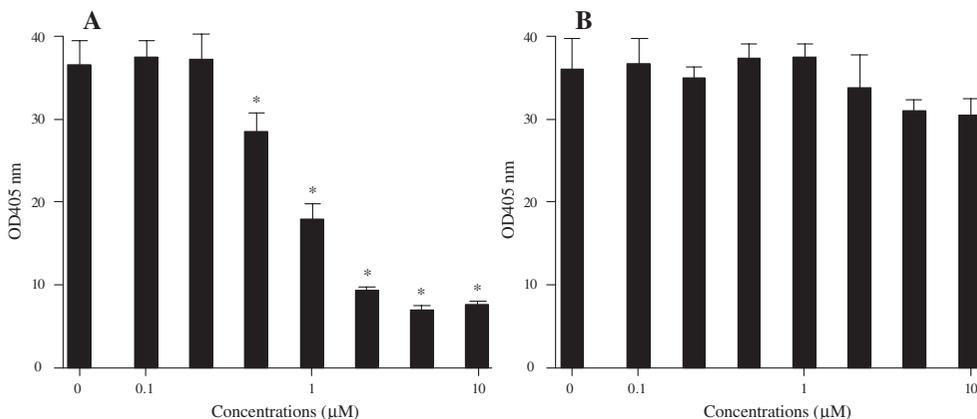


Fig. 3. Effects of KTI and BBI on cell-associated uPA activity. The monolayer of HRA cells seeded in 96-well plate was pretreated with KTI (0-10  $\mu$ M, A) or BBI (0-10  $\mu$ M, B) in the presence of 10 ng/mL TGF- $\beta$ 1 for 12 h. The monolayers were washed twice with PBS and analyzed by colorimetric assay in the presence of the Spectrozyme UK. Results represent mean values  $\pm$  SD of three experiments and triplicate determination. \* $P$ <0.05 compared with the control.

性が抑制され、細胞膜上に存在するのはウロキナーゼであることを確認した。Fig. 3に示すように、がん細胞にKTIを添加するとウロキナーゼ産生は抑制されるため、ウロキナーゼリセプタに結合したウロキナーゼそのものが減少した。その結果がん細胞膜上のウロキナーゼ活性も抑制された。同様にがん細胞をTGF- $\beta$ 1で刺激した場合も同様な結果を認めた。

#### KTIはウロキナーゼmRNA産生を抑制した

KTIががん細胞のウロキナーゼ活性を抑制してウロキナーゼ活性を抑制しているのではないことを確認した。そのために、HRAを無刺激およびTGF- $\beta$ 1刺激し、各種濃度のKTIとBBIを添加したときのウロキナーゼmRNAをNorthern blotにより測定した (Fig. 4)。その結果、3  $\mu$ MのKTIによりウロキナーゼmRNAは抑制された。この濃度はウロキナーゼたん白質を抑制した2  $\mu$ Mと類似した濃度であった。

Fig. 5に示すようにKTI以外にも各種inhibitorsによるウロキナーゼたん白質の産生抑制を確認した。

#### TGF- $\beta$ 1刺激によるERK1/2リン酸化のKTIによる抑制

TGF- $\beta$ 1刺激によりERK1/2のリン酸化がおこること、すなわち、MAP kinaseの活性化がおこることはWestern blotにより確認した (Fig. 6)。同時にKTIを添加するとこのリン酸化が消失した。その結果MAP kinaseの活性化が起こればウロキナーゼmRNAが上昇しないため、ウロキナーゼの産生が起これないことが推定された。

#### KTIは特異的にがん細胞浸潤を抑制する

がん細胞の浸潤能をポイデンチャンパー法で評価し

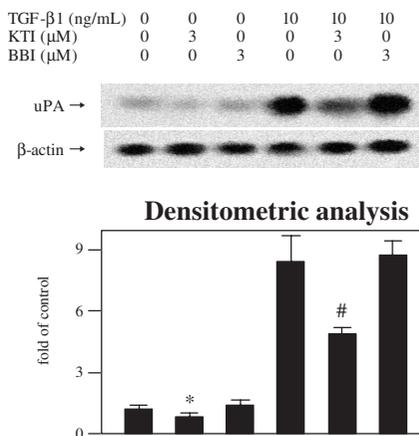


Fig. 4. KTI, but not BBI, specifically inhibits expression of uPA mRNA. *Upper panel*,  $10^6$  HRA cells were plated in 100-mm dishes and cultured for 48 h, then washed three times with phosphate-buffered saline. Confluent monolayers of HRA cells were incubated for 6 h with the indicated concentrations of KTI or BBI. Total RNAs were extracted and hybridized with uPA and  $\beta$ -actin cDNA. Each filter was loaded with 20  $\mu$ g of total RNAs. Filters were exposed for 24 h. *Lower panel*, data from three experiments were scanned and analyzed for quantification with the Macintosh software. Band intensities for uPA were normalized to  $\beta$ -actin and presented as the mean  $\pm$  SD Results are from at least three separate experiments. \* $P$ <0.05 vs control (lane 1); #,  $P$ <0.05 vs lane 4.

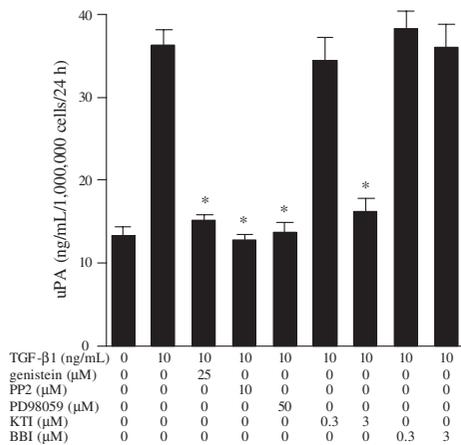


Fig. 5. Effects of protein tyrosine kinase inhibitor, MAP kinase inhibitor, and SBTI (KTI and BBI) on the secretion of uPA. HRA cells were seeded in 35-mm dishes and then treated with the indicated concentrations of drugs in serum-free medium for 24 h. The uPA contents of cell-conditioned medium were measured by ELISA. Results are the mean  $\pm$  SD of three different determinations. \* $P$ <0.05 vs lane 2.

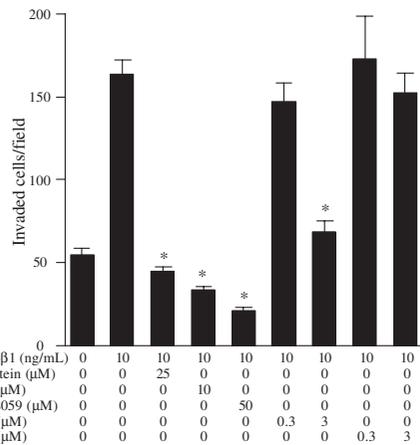


Fig. 7. Effects of pharmacological inhibitors and SBTI (KTI and BBI) on cell invasion. A cell suspension, 200  $\mu$ L (500,000 cells/mL) in RPMI 1640 containing 1% fetal bovine serum, was placed on the Matrigel-coated surface of the upper chamber. The indicated concentrations of genistein, PP2, PD98059, KTI or BBI in the presence of 10 ng/mL TGF- $\beta$ 1 were added to the upper compartment. After a 36-h incubation, cells that invaded through the Matrigel-coated membrane were stained and counted under the microscope. All experiments were performed three times, and typical data are shown. Results are the mean  $\pm$  SD of three different determinations. \* $P$ <0.05 vs lane 2.

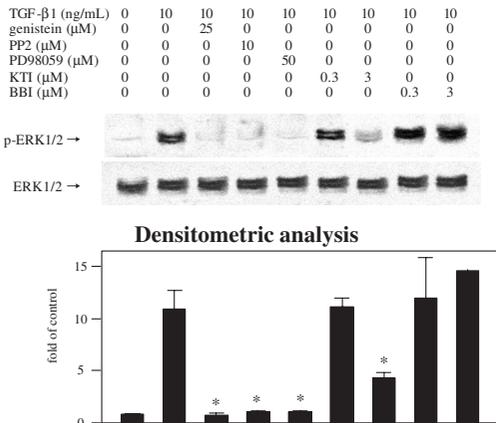


Fig. 6. Effects of SBTI (KTI and BBI) on the TGF- $\beta$ 1-stimulated activation of the ERK1/2 phosphorylation. Upper panel, HRA cells were exposed to 10 ng/mL TGF- $\beta$ 1 in the absence or presence of KTI or BBI for 15 min. Total and phosphorylated ERK1/2 were measured by Western blotting. Lower panel, data from three experiments were scanned and analyzed for quantification with the Macintosh software. Band intensities for phospho-Akt were normalized to total Akt and presented as the mean  $\pm$  SD. Results are from at least two separate experiments with similar results. \* $P$ <0.05 vs lane 2.

た (Fig. 7). KTI, genistein, PP2, PD98059は濃度依存性に関浸潤を抑制したが、BBIにはその活性はなかった。KTIのIC<sub>50</sub>は3  $\mu$ Mとウロキナーゼ産生抑制濃度と一致した。

## 考 察

我が国では、1981年以降、がんが死因の1位を占め続けており、全死因の1/4はがんによるものである。がんが死亡原因の第1位を占めている現在、がん撲滅が人類にとっての最大の課題となっている。現在、がん全体の治癒率は50%であり、固形腫瘍では進行がんの治癒率は現在でも10%しかない。がん患者が死亡するのはがんが実質臓器に転移するからであり、有効ながん転移抑制剤が開発されればがん患者、特に進行がん患者の予後は飛躍的に向上する。一方でがん転移を抑制するには長期間薬の摂取を継続することが必要であるため、全く毒性を有さず、安価に提供できることが理想である。

我々は先の研究によりヒト羊水中からがん転移を特異的に抑制する生理的物質ピクニンを発見し、ピクニンを用いた動物実験により副作用なく良好な生存率を得たことを報告した。しかしピクニンをがん患者に長期間投与するためには大量のヒト羊水を集め、これからピクニンを精製しなければならないため、非常に高価となり実用的ではない。そのため現在はヒト尿由来のピクニンを使用している。尿由来ピクニンでもウロキナーゼおよびその受容体の産生抑制<sup>17)</sup>は確認してある。また、リコンビナントたん白質を作成した場合でもがん患者の経済的負担は大きい。

がん細胞が転移するのはウロキナーゼに限定したものではない。マトリックスメタロプロテイナーゼなども重要な働きをしていることは数々の論文に報告されている。これらウロキナーゼとマトリックスメタロプロテイナーゼにはクロストークも認められている<sup>18~20)</sup>。

ところで、大豆の中にはトリプシンインヒビターが含まれており、特に分離大豆たん白質を製造する際に副生される大豆ホエー中に比較的豊富に含まれる。そして大豆ホエーの画分には抗皮膚がん効果を有することやKTIには制がん作用増強効果を有することや、マトリックスメタロプロテイナーゼ活性を抑制することなどが報告されている<sup>21~23)</sup>。

我々は、ヒト羊水・尿ピクニンの分子構造を検索したところ、大豆KTIと高い相同性を有することを確認した。そこでKTIの投与によるがん転移抑制効果を調べたところ、強力ながん転移抑制活性を見出すに到った。KTIは大豆から分離大豆たん白質などを調製する際に大量に排出される大豆ホエー中に多く含まれており、大豆ホエーは安価に入手できるため、これを原料として大量に抽出・精製すれば臨床応用が可能である

と思われる。我々の研究が発展すれば、大豆クニッツ型トリプシンインヒビターを有効成分とするがん転移抑制剤、および大豆クニッツ型トリプシンインヒビターを有効成分とするがん転移抑制食品が開発される可能性が示唆される。したがって、比較的早期がんであっても転移する可能性を否定できない症例や、すでに転移巣が形成されたがん患者であってもそれ以上のがん転移を抑制するためにはKTIは有用であり、薬剤や機能性食品として長期の投与が可能であると思われる。

具体的には日本のがんによる死亡数が男性17万人、女性11万人とすると最低でも約30万人ががん転移抑制剤の使用対象患者になると予想される。がんと共存を図るためには長期間使用し続ける必要がある。しかし、がん転移抑制剤の本来の使用方法は比較的早期がんを対象とし、がん転移を根本的に制御しようとする場合に再発の危険のある数年間、転移抑制剤を内服することが理想であると思われる。これらを総合すると50万人以上の患者が本薬剤や食品の使用対象者となるものと考えられる。

大学、研究機関のみならず製薬企業にもがん転移制御に関する研究の需要が拡大している。さらに、バイオインフォマティクス市場は、医学分野、食品業界や環境関連業界にも広がっており、バイオインフォマティクス企業の中には、環境分野の事業を行ったり、食品業界や環境関連業界への展開を視野に入れている企業も存在する。バイオインフォマティクス市場は、今後ますます拡大していくと考えられる。このような背景のもと、本薬剤の臨床応用により製薬業界の改革が起こることが予想され、さらには健康用途の食品業界の発展にまで期待できるであろう。

## 要 約

大豆由来トリプシンインヒビターにはクニッツ型 (Kunitz Trypsin Inhibitor; KTI) とボーマンバーク型 (Bowman-Birk Inhibitor; BBI) の2種類存在していることが知られている。大豆よりKTIとBBIを分離精製した。使用した培養細胞はヒト卵巣がん細胞HRAであり、この細胞株はヌードマウスに腹腔内移植するとがん性腹膜炎モデルを作成することができる悪性度の高いがん細胞である。KTIとBBIは名前のおりトリプシンを効率よく抑制するが、両者ともウロキナーゼ活性には強い抑制効果を有していない。しかし、KTIはがん細胞からのウロキナーゼ産生そのものを抑制する作用を有していた。その $IC_{50}$ は約 $2\mu M$ であった。一方、今回実験に使用した濃度の範囲ではBBIにはウロキナーゼ産生抑制作用は認められなかった。そこで、HRA細胞の浸潤、移動をKTI、BBIが阻止できるかどうか検討した。我々は過去の実験からHRAはウロキナーゼ依存性ながん細胞の浸潤・転移がおこることを確認してある。予想通り、KTIは $IC_{50}$ が $3\mu M$ でがん浸潤を抑制した。一方、BBIにはがん浸潤抑制作用は認めなかった。HRAからのウロキナーゼ産生はTGF- $\beta$ 依存性である。TGF- $\beta$ 1によりERK1/2がリン酸化され、MAP kinaseの活性化を介してウロキナーゼ産生がおこる

ことが知られている。そこで、TGF- $\beta$ 1投与と同時にKTIあるいはBBIを添加しておき、MAP kinaseの活性化を測定するとKTIによりERK1/2のリン酸化が阻止された。したがって、この実験から、大豆由来トリプシンインヒビターのなかのKTIがERK1/2のリン酸化を抑制し、MAP kinaseを介するウロキナーゼ産生を抑制し、結果としてがん細胞の浸潤が抑制されることが判明した。したがって、大豆由来のKTIを大量にかつ安価に精製することにより、がん転移抑制活性を有する薬剤あるいは食品を開発することができるものと思われる。今回、このデータを特許申請した。

## 文 献

- 1) Reuning U, Magdolen V, Wilhelm O, Fischer K, Lutz V, Graeff H and Schmitt M (1998): Multifunctional potential of the plasminogen activation system in tumor invasion and metastasis (review). *Int J Oncol*, **13**, 893-906.
- 2) Kobayashi H, Shinohara H, Gotoh J, Fujie M, Fujishiro S and Terao T (1995): Anti-metastatic therapy by urinary trypsin inhibitor in combination with an anti-cancer agent. *Br J Cancer*, **72**, 1131-1137.
- 3) Kobayashi H, Suzuki M, Tanaka Y, Hirashima Y and Terao T (2001): Suppression of urokinase expression and invasiveness by urinary trypsin inhibitor is mediated through inhibition of protein kinase C- and MEK/ERK/c-Jun-dependent signaling pathways. *J Biol Chem*, **276**, 2015-2022.
- 4) Kobayashi H, Suzuki M, Kanayama N, Nishida T, Takigawa M and Terao T (2002): Suppression of urokinase receptor expression by bikunin is associated with inhibition of upstream targets of extracellular signal-regulated kinase-dependent cascade. *Eur J Biochem*, **269**, 3945-3957.
- 5) Kobayashi H, Suzuki M, Hirashima Y and Terao T (2003): The protease inhibitor bikunin, a novel anti-metastatic agent. *Biol Chem*, **384**, 749-754.
- 6) Brandon DL, Bates AH and Friedman M (1991): ELISA analysis of soybean trypsin inhibitors in processed foods. *Adv Exp Med Biol*, **289**, 321-337.
- 7) Kennedy AR (1993) Troll W, Kennedy AR eds. Protease Inhibitors as Cancer Chemopreventive Agents, 65-91, Plenum Publishing Corp. New York.
- 8) Kennedy AR (1993) Troll W, Kennedy AR eds. Protease Inhibitors as Cancer Chemopreventive Agents, : 9-64, Plenum Publishing Corp. New York.
- 9) Kennedy AR (1998): Chemopreventive agents: protease inhibitors. *Pharmacol Ther*, **78**, 167-209.
- 10) Kobayashi H, Ohi H and Terao T (1991): Prevention by urinastatin of cis-diamminedichloroplatinum-induced nephrotoxicity in rabbits: comparison of urinary enzyme excretions and morphological alterations by electron microscopy. *Asia Oceania J Obstet Gynaecol*, **17**, 277-288.
- 11) Birk Y (1996): Protein proteinase inhibitors in legume seeds—overview. *Arch Latinoam Nutr*, **44**, 26S-30S.
- 12) Liener IE (1995): Possible adverse effects of soybean anticarcinogens. *J Nutr*, **125**, 744S-750S.
- 13) Kobayashi H, Suzuki M, Tanaka Y, Kanayama N and Terao T (2003): A Kunitz-type protease inhibitor, bikunin, inhibits ovarian cancer cell invasion by blocking the calcium-dependent transforming growth factor-beta 1 signaling cascade. *J Biol Chem*, **278**, 7790-7799.
- 14) Pusztai A, Watt WB and Stewart JC (1991): A comprehensive scheme for the isolation of trypsin inhibitors and the agglutinin from soybean seeds. *J Agric Food Chem*, **39**, 862-866.
- 15) Morrissey D, O'Connell J, Lynch D, O'Sullivan GC, Shanahan F and Collins JK (1999): Invasion by esophageal cancer cells: functional contribution of the urokinase plasminogen activation system, and inhibition by antisense oligonucleotides to urokinase or urokinase receptor. *Clin Exp Metastasis*, **17**, 77-85.
- 16) Hirashima Y, Kobayashi H, Suzuki M, Tanaka Y, Kanayama N and Terao T (2003): Transforming growth factor-beta1 produced by ovarian cancer cell line HRA stimulates attachment and invasion through an up-regulation of plasminogen activator inhibitor type-1 in human peritoneal mesothelial cells. *J Biol Chem*, **278**, 26793-26802.

- 17) Albini A, Iwamoto Y, Kleinman HK, Martin GR, Aaronson SA, Kozlowski JM and McEwan RN (1987): A rapid *in vitro* assay for quantitating the invasive potential of tumor cells. *Cancer Res*, **47**, 3239-3245.
- 18) Shetty S and Idell S (1999): Posttranscriptional regulation of urokinase receptor gene expression in human lung carcinoma and mesothelioma cells *in vitro*. *Mol Cell Biochem*, **199**, 189-200.
- 19) Bell SM, Connolly DC, Maihle NJ and Degen JL (1993): Differential modulation of plasminogen activator gene expression by oncogene-encoded protein tyrosine kinases. *Mol Cell Biol*, **13**, 5888-5897.
- 20) Bell SM, Brackenbury RW, Leslie ND and Degen JL (1990): Plasminogen activator gene expression is induced by the src oncogene product and tumor promoters. *J Biol Chem*, **265**, 1333-1338.
- 21) Suzuki M, Kobayashi H, Tanaka Y, Hirashima Y and Terao T (2001): Structure and function analysis of urinary trypsin inhibitor (UTI): identification of binding domains and signaling property of UTI by analysis of truncated proteins. *Biochim Biophys Acta*, **1547**, 26-36.
- 22) von Hofe E, Newberne PM and Kennedy AR (1991): Inhibition of N-nitrosomethylbenzylamine-induced esophageal neoplasms by the Bowman-Birk protease inhibitor. *Carcinogenesis*, **12**, 2147-2150.
- 23) Lewin MR, Chowcat NL, Jayaraj AP and Boulos PB (1986): Collagenase inhibition in colonic mucosa by proteinase inhibitors. *Br J Exp Pathol*, **67**, 523-526.