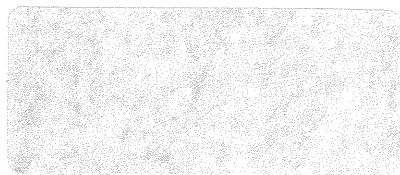


199800126A

浸潤、転移の分子機構に基づいた転移の予防
及び新しい治療法の開発

主任研究者
竜田正晴



浸潤、転移の分子機構に基づいた転移の予防及び新しい治療法の開発

主任研究者：竜田 正晴 大阪府立成人病センター研究所部長

研究主旨 1) ①浸潤を定量化しうる *in vivo* 浸潤モデルと②発癌から転移にいたる過程を研究しうる転移動物モデルを開発し、浸潤・転移の分子機構の解明と浸潤・転移抑制物質の検索を行った。

2) これまでに、リゾフォスファチジン酸 (LPA) が強力な浸潤誘発物質であること、及びその誘導体である cyclic LPA が c-AMP の上昇を介して浸潤を強く抑制することを示した。本年度はホスフォダイエステラーズⅢ阻害剤であるシロスタゾール（血小板凝集抑制剤として市販）が *in vitro* の浸潤を抑制することを明らかにした。

3) 浸潤・転移に低分子量 G 蛋白 Rho が深く関与しており、本年度は、その標的蛋白である Rho Kinase の特異的阻害剤が、がん細胞の腹膜への浸潤、播種を抑制することを示し、浸潤に Rho-Rho Kinase system が重要な役割をはたしていることを明らかにした。

4) 癌の手術に際し、姑息的手術操作のみに終わった場合、癌の進展や転移が著明になることに着目し、外科的操作による浸潤能への影響を検討した。腹腔内に留置したドレーン排液による浸潤能の増強を認めた。ドレーン排液中の浸潤促進活性は、熱耐性でトリプシンにより分解され、分子量 50~100Kd 程度の蛋白である可能性が示された。

5) 大豆に多く含まれる蛋白チロシンリン酸化酵素の特異的阻害剤であるゲニステインが浸潤、転移抑制作用を有することを明らかにした。

6) すでに存在する転移に対する治療法の開発を目指し、IL-18 ヒト乳癌細胞の骨転移に対する効果を検討した。IL-18 は破骨細胞の分化を抑制し、乳癌の骨転移を抑制した。

分担研究者

1. 竜田 正晴 大阪府立成人病センター研究所部長
2. 明渡 均 大阪府立成人病センター研究所所長
3. 向井 睦子 大阪府立成人病センター研究所
4. 高橋 克仁 大阪府立成人病センター研究所
5. 飯石 浩康 大阪府立成人病センター研究所
6. 伊藤 和幸 大阪府立成人病センター研究所

A. 研究目的

本研究班では①浸潤を定量化した *in vitro* 浸潤モデルと②ヒトにみられるような発癌から転移に至る過程を研究しうる転移動物モデルを開発した。浸潤モデルを用い、がん細胞の浸潤、転移の分子機構とシグナル伝達系の解明を行い、基礎研究により得られた成果に基づき、浸潤・転移抑制物質を検索し、さらに新たに開発した転移動物モデルを用い、その有効性を検証するという一貫した研究システムを構築した。この一貫した研究システムを用い、本年度は、さらに強力な浸潤・転移抑制作用を有する薬剤を検索し、その抑制機序を解明するとともに、転移

動物モデルを用い、その有効性と安全性を確認しヒトがん転移の予防、治療への道を拓きたい。

B. 研究方法

(1) 浸潤抑制物質の検索とその抑制機序の解明。

これまでに、リゾフォスファチジン酸 (LPA) が強力な浸潤誘発物質であること、及びその誘導体である cyclic LPA が cyclic AMP の上昇を介して浸潤を強く抑制することを示した。本年度は、癌細胞内の cyclic AMP 濃度を上昇させるホスフォダイエステラーズⅢ阻害剤であるシロスタゾールの浸潤抑制作用を検討した。浸潤の程度は、我々が既に開発した *in vivo* 浸潤モデル（単層培養浸潤モデル）を用い測定した。この培地に cyclic LPA やシロスタゾールなどの薬剤を添加し、MM1 細胞（ラット腹水肝癌細胞）の浸潤に及ぼす効果を検討した。

(2) 動物転移モデルを用いた転移抑制物質の検索。

Wistar 系雄性ラットに発癌剤 azoxymethane (7.4 mg/kg) を週 1 回、10 週間皮下注射するとともに、同時にオリーブ油に懸濁した消化管ホルモンである

ボンベシン 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を隔日に投与すると、実験開始 45 週目に腹膜播種性転移が高率に認められる。蛋白チロシンリン酸化酵素の特異的阻害剤であるゲニステイン 5 mg/kg または 10 mg/kg を実験開始 16 週目から実験終了まで皮下に隔日に投与する。すべてのラットを 45 週目に屠殺し、大腸・小腸腫瘍の有無、腹膜播種性転移の有無について、肉眼的および組織学的に検討した。

C. 研究成果

浸潤を定量化しうる *in vivo* 浸潤モデルと発癌から転移にいたる過程を研究しうる転移動物モデルを開発し、浸潤・転移の分子機構の解明と浸潤・転移抑制物質の検索を行い、以下の成果を得た。

(1) *in vitro* の浸潤モデルを用い、これまでにリゾフォスファチジン酸 (LPA) が強力な浸潤誘発物質であること、また LPA のアナログである cyclic LPA が細胞内の cyclic AMP の上昇を介して浸潤を強く抑制することを示した。本年度は細胞内 cyclic AMP を上昇させる作用を有するホスホダイエステラーズ III 阻害剤であるシロスタゾールの効果について検討した。シロスタゾールは *in vitro* 浸潤モデルでは、容量依存性に浸潤を強く抑制することが明らかにされた。その作用機序を検討すると、シロスタゾールは focal adhesion kinase 及び MAP kinase のリン酸化を抑制することが示された。

(2) これまでに浸潤・転移には低分子量蛋白 Rho が、深く関与していることを明らかにしてきたが、本年度は、その標的蛋白である Rho kinase とその特異的阻害剤 Y-27632 の効果について検討した。活性化 Rho kinase を発現させた細胞では、浸潤能は著しく亢進し、同時に myosin light chain kinase のリン酸化の亢進が認められた。Rho の特異的阻害剤 C3-toxin で処理すると、活性化 Rho kinase を発現させた細胞の浸潤能は明らかに抑制され、myosin light chain kinase のリン酸化も抑制されることが示された。位相差顕微鏡を用い観察すると、活性化 Rho kinase を発現させた細胞では、接着能の亢進が認められた。C3-toxin 処理により、細胞の接着能は失われ細胞が浮遊してき、癌細胞の浸潤には Rho kinase が深く関与していることが分かった。次に Rho kinase の特異的阻害剤である Y-27632 の効果について検討した。癌細胞に LPA を作用させると、浸潤能の亢進が認められるが、Y-27632 の添加に

より、容量依存性に浸潤が抑制される。また活性化 Rho および活性化 Rho kinase を発現させた細胞では、浸潤能の亢進が認められるが、Y-27632 はこれらの細胞の浸潤能を容量依存性に抑制することが示された。Y-27632 の浸潤抑制作用の機序を検討すると、Y-27632 は myosin light chain kinase のリン酸化を容量依存性に抑制し、その抑制作用は約 8 時間持続することが明らかにされた。次にラットを用いた *in vivo* の腹膜播種性転移形成に対する効果を検討した。活性化 Rho や活性化 Rho kinase を発現させた細胞を腹腔内へ注入すると、腹腔内に多数の腹膜播種による転移結節の形成が認められた。これに対し、浸透圧ポンプを腹腔内に植え込み Y-27632 を作用させると、腹腔内には転移結節の形成は殆ど認められなかった。

(3) 癌の手術に際し、姑息的手術操作のみに終わった場合、癌の進展が促進され、転移が著明になることに着目し、外科的操作による癌細胞の浸潤能への影響を検討した。消化器癌の術後腹腔内に留置されたドレーン排液を採取し、その効果を検討したところ、ドレーン排液中の浸潤活性は、健康者の血清に比し明らかに高値を示した。手術に際しては、HGF など各種の growth factor が産生され浸潤能の亢進が認められるが、これらの因子による浸潤能は、その特異的抗体により抑制されるが、ドレーン排液中の浸潤能は、これら増殖因子の抗体によっては抑制されなかった。その性状を検討すると、熱耐性で、トリプシンで分解され、分子量 50~100Kd 程度の蛋白と考えられた。

(4) 我々の考案した動物転移モデルでは、大腸癌の発生過程にボンベシンを投与すると、高率に腹膜播種性転移の形成が見られる。本年度はこのモデルを用い、蛋白チロシンリン酸化酵素の阻害剤であるゲニステインの効果について検討した。ゲニステインは、ボンベシンにより誘発される転移を明らかに抑制し、その作用機序として、アクチンの形成抑制とチロシンのリン酸化の抑制が関与していることが示された。

(5) すでに存在する転移巣に対する治療法の開発を目指し、interleukin (IL)-18 のヒト乳癌細胞の骨転移に対する効果を検討した。ヒト乳癌細胞をマウスの心房内に注入後 1 週目より、IL-18 を連続投与すると、癌細胞の増殖を抑制することなく、骨転移の頻度と個数が有意に減少することが示された。

D. 考察

(1) シロスタゾールについて

シロスタゾールは、ホスホダイエステラーゼⅢ阻害剤で、細胞内 cyclic AMP を上昇させることが知られているが、我々は乳癌細胞内の cyclic AMP の上昇が浸潤抑制することを既に報告しており、この点よりシロスタゾールに注目した。今回の検討よりシロスタゾールが in vitro 浸潤モデルで、浸潤を容量依存性に抑制することを示し、cyclic AMP の上昇が浸潤を抑制する一つのシグナルであることを改めて確認することができた。LPA のアナログである cyclic LPA が細胞内の cyclic AMP の上昇を介して強力に浸潤を抑制することを我々は既に報告しているが、この cyclic LPA は focal adhesion kinase の磷酸化を抑制するが、MAP kinase の磷酸化には何らの影響を与えないのに対し、シロスタゾールは focal adhesion kinase 及び MAP kinase の磷酸化をともに抑制することから、シロスタゾールは cyclic LPA に比べ、より上流のシグナル伝達系を抑制するものと考えられた。シロスタゾールは、血小板凝集抑制剤として既に市販されているため、今後はその臨床応用を旨とし検討を続けて行きたい。

(2) Y-27632 について

我々は低分子量 G 蛋白である Rho が浸潤、転移に深く関与していることを明らかにしたが、今回の検討では Rho の標的蛋白である Rho kinase が浸潤、転移に深く関わっていることを示し、浸潤に Rho-Rho kinase system が重要な役割を果たしていることを明らかにした。Rho-Rho kinase system を阻害することができれば浸潤を抑制しうることが想定される。Rho の特異的な阻害剤として C3-toxin が挙げられ、C3-toxin 処理により浸潤を抑制することが可能である。しかし臨床応用を考えた際には C3-toxin では臨床応用は不可能と言わざるを得ない。Y-27632 は Rho kinase の特異的な阻害剤で、Y-27632 が、癌細胞の腹膜への浸潤、播種を抑制することを示した。今後、臨床応用が期待される。

(3) ゲニステインについて

本年度は、動物転移モデルを用い、蛋白チロシン磷酸化酵素阻害剤であるゲニステインがボンベンシにより誘発される腹膜播種性転移を抑制することを示し、ゲニステインはアクチンの形成抑制とチロシンの磷酸化を抑制することを明らかにした。ゲニステインは大豆に多量に含まれる isoflavonone の一種

である。臨床応用を考慮するに際しては、ゲニステインは大豆に含まれる天然物質であることからその安全性には問題はなく、今後の研究の展開が期待できる。

(4) IL-18 について

転移巣の増殖は「異所性」である点に着目し、既に存在する転移に対する新しい治療法の開発が可能と考えられる。この観点に立って昨年度は骨粗鬆症治療剤が有効であることを既に報告した。本年度は IL-18 が、癌細胞の増殖を抑制することなく、骨転移を縮小させることを明らかにした。さらに IL-18 は破骨細胞の分化を抑制することにより転移巣を縮小させることが示され、今後さらに検討を進めて行きたい。

E. 結論

in vitro 及び in vivo の浸潤モデルを用い、浸潤・転移の分子機構を検討し、その成果に基づき新しい浸潤・転移抑制物質シロスタゾール、Y-27632、ゲニステイン、IL-18 などを見出し、これらの物質の臨床への応用の可能性を示した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Saeki Y., Seya T., Hazeki K., Ui M., Hazeki O., Akedo H., Involvement of phosphoinositide 3-kinase in regulation of adhesive activity of highly metastatic hepatoma cells. *J. Biochem.*, 124: 1020-1025(1998)
- 2) Sugihara A., Maeda O., Tsuji M., Tsujimura T., Nakata Y., Akedo H., Kotake T., Terada N., Expression of cytokines enhancing the osteoclast activity, and parathyroid hormone-related protein in prostatic cancers before and after endocrine therapy: An immunohistochemical study. *Oncol. Rep.*, 5: 1389-1394(1998)
- 3) Yamamura H., Yoshikawa H., Tatsuta M., Akedo H., Takahashi K., Expression of the smooth muscle calponin gene in human osteosarcoma and its possible association with prognosis. *Int. J. Cancer*, 79: 245-250(1998)

- 4) Tanigaki Y., Terada N., Kitamura H., Kitano E., Takemura K., Yamamoto T., Mori Y., Akedo H., Tanaka H., Cytotoxic activity of normal mouse tumor cells in vitro. *Oncol. Rep.*, 5: 693-698(1998)
- 5) Okamoto H., Nakamori S., Mukai M., Shinkai K., Ohigashi H., Ishikawa O., Furukawa H., Imaoka S., Matumoto Y., Monden M., Akedo H., Down-regulation of focal adhesion kinase, pp125FAK, in endothelial cell retraction during tumor cell invasion. *Clin. Exp. Metastasis*, 16: 243-252(1998)
- 6) Yoshioka K., Matsumura F., Akedo H., Itoh K., Small GTP-binding protein Rho stimulates the actomyosin system, leading to invasion of tumor cells. *J. Biol. Chem.*, 273:5146-5154(1998)
- 7) Nakae T., Horai T., Imamura F., Akedo H., Higashino K., Expression of cathepsin B in small cell lung carcinoma cells in relation to in vitro invasiveness. *Tumour Biol.*, 19:118-125(1998)
- 8) Sasaki A., Alcalde R.E., Nishiyama A., Lim D.D., Mese H., Akedo H., Matumura Y., Angiogenesis inhibitor TNP-470 inhibits human breast cancer osteolytic bone metastasis in nude mice through the reduction of bone resorption. *Cancer Res.*, 58: 462-467(1998)
- 9) Yamamoto T., Terada N., Seiyama A., Nishizawa Y., Akedo H., Kosaka H., Increase in experimental pulmonary metastasis in mice by L-arginine under inhibition of nitric oxide production by NG-nitro-L-arginine methyl ester. *Int. J. Cancer*, 75: 140-144(1998)
- 10) Mukai M., Imamura F., Ayaki M., Murakami-Murofushi K., Kobayashi S., Shinkai K., Yamamoto T., Nakamura H., Akedo H., Inhibition of tumor invasion and metastasis by a novel lysophosphatidic acid (cyclic LPA). *Int. J. Cancer*, (in press)
- 11) Imamura F., Mukai M., Ayaki M., Takemura K., Horai T., Shinkai K., Nakamura H., Akedo H., Involvement of small GTPase Rho and Rac in the invasion of rat ascites hepatoma cells. *Clin. Exp. Metastasis*, (in press)
- 12) Ueki N., Ohkawa T., Yamamura H., Takahashi K., Tsutsui T., Kawai Y., Yokoyama Y., Amuro Y., Hada T., Higashino K., Induction of calponin-h1 by transforming growth factor- β 1 in cultured human Ito cells. *LI90. Bioch. Biophys. Acta*, 1403: 28-36(1998)
- 13) Yamamura H., Ikeda W., Shibata N., Awata N., Takahashi K., Structure and expression of calponin in arterial smooth muscle cells. In *Ischemic Heart*, edited by Mochizuki S., Takeda N., Nagano M. Dhalla N.S., Kluwer Academic Publishers, pp87-95(1998)
- 14) Yoshikawa H., Taniguchi S., Yamamura H., Mori M., Sugimoto M., Miyado K., Nakamura K., Nakao K., Katsuki M., Shibata N., Takahashi K., Mice lacking smooth muscle calponin display increased bone formation that is associated with enhancement of bone morphogenetic protein responses. *Genes Cells*, 3: 685-695(1998)
- 15) Paker C.A., Takahashi K., Tang. J.X., Tao T., Morgan K., Cytoskeletal targeting of calponin in differentiated, contractile smooth muscle cells of the ferret. *J. Physiol.*, 508:187-198(1998)
- 16) Fujikawa H., Tani E., Yamaura I., Ozaki I., Miyaji K, Sato M., Takahashi K., Imajo-Ohmi S., Activation of protein kinases in canine basilar artery in vasospasm. *J. Cerebral Blood Flow Metab.*, (in press)
- 17) Sugimoto T., Mine H., Takahashi K., Nagai R., Komada Y., Sawada T., Smooth muscle cell components in human neuroblastoma cell lines. *Int. J. Cancer*, (in press)
- 18) Itoh K., Yoshioka K., Matsumura F., Akedo H., Small GTP-binding protein Rho stimulates actomyosin system, leading to transcellular migration of tumor cells. In *Cytoskeleton and G-proteins In the*

- regulation of cancer*, edited by N. Kuzumaki, pp129-131(1998)
- 19) Asai T., Ueda T., Itoh K., Yoshioka K., Aoki Y., Mori S., Yoshikawa H., Establishment and characterization of a murine osteosarcoma (LMB) with high metastatic potential to the lung, *Int. J. Cancer* 76: 418-422(1998)
 - 20) Iishi H., Tatsuta M., Baba M., Yano H., Iseki K., Uehara H., Nakaizumi A., Inhibition by galanin of experimental carcinogenesis induced by azaserine in rat pancreas. *Int. J. Cancer*, 75: 396-399(1998)
 - 1) Iishi H., Tatsuta M., Baba M., Sakai N., Yano H., Uehara H., Nakaizumi A., Iseki K., Promotion by the α -adrenoceptor agonist phenylephrine, but not by the β -adrenoceptor agonist isoproterenol, of gastric carcinogenesis induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in Wistar rats. *Cancer Lett.*, 122: 61-65(1998)
 - 22) Iishi H., Tatsuta M., Baba M., Yamamoto R., Uehara H., Nakaizumi A., Inhibition of experimental gastric carcinogenesis, induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in rats, by sodium nitroprusside, a nitric oxide generator. *Br. J. Cancer*, 34:554-557(1998)
 - 23) Tatsuta M., Iishi H., Baba M., Yano H., Sasaki N., Uehara H., Nakaizumi A., Chemoprevention by amiloride against experimental hepatocarcinogenesis induced by N-nitrosomorpholine in Sprague-Dawley rats. *Cancer Lett.*, 119: 109-113(1997)
 - 24) Tatsuta M., Iishi H., Baba M., Iseki K., Yano H., Uehara H., Yamamoto R., Nakaizumi A., Suppression by pravastatin, an inhibitor of p21^{ras} isoprenylation, of hepatocarcinogenesis induced by N-nitrosomorpholine in Sprague-Dawley rats. *Br. J. Cancer*, 77; 591-587(1998)

G. 知的所有権の取得状況
なし

分担研究報告書

がんの浸潤、転移に関与する因子に関する研究

分担研究者 明渡 均 成人病センター研究所

研究要旨

in vitro 浸潤系におけるMM1細胞の中皮細胞層下への浸潤に関与する接着系（インテグリン-フィブロネクチン）を明らかにした。浸潤誘導物質（LPA）はこの接着系の集積（接着斑形成）とアクチン系の活性化（既報）をもたらし、細胞の位置移動を誘発する。

A. 研究目的

これまで、癌細胞の浸潤誘導にかかわる分子機構を明らかにして来たが、それは癌細胞を浸潤誘導物質（LPA）で刺激することにより起こるシグナル系の解析であった。しかし細胞の位置移動には細胞の接着、脱着が必須であり、浸潤運動の発現には接着因子からのシグナルがLPAのシグナルとクロストークするものと思われる。そこで、この分子機構を明らかにし、抑制の戦略をたてるため、本年度は癌細胞のin vitro 浸潤モデルに於いて、関与する接着因子群を解析した。

B. 研究方法

- ・ラットの腸間膜より分離、培養した中皮細胞層の上にラット腹水肝癌細胞を重層培養する浸潤モデル実験法によって in vitro 浸潤能を測定する。
- ・スライドガラス上に金コロイドを作成し、その上で癌細胞の移動した面積を測定する。
- ・細胞をシャーレに接着させた後、固定、穴をあけビンキュリン抗体で免疫染色する。

C. 研究結果

- 1) 中皮細胞層下へのMM1細胞（ラット腹水肝癌細胞）の浸潤は抗フィブロネクチン抗体で80%抑制される。
- 2) MM1細胞は $\beta 1$ インテグリンが発現している。
- 3) 抗 $\beta 1$ 抗体は上記の浸潤を90%以上抑制する。
- 4) 中皮細胞層にはフィブロネクチンが存在する。
- 5) フィブロネクチンをコートしたシャーレにMM1細胞は接着伸展するが位置移動はしない。ここにLPAを添加すると胞体は紡錘形に変型し偽足と尾部を形成して活発に位置移動する。
- 6) 抗ビンキュリン抗体で接着斑の形成を見るとFN上では明瞭な接着斑は形成されずLPAを加えて始めて形成される。接着斑は尾部には常に偽足の先端には時々観察される。

D. 考察

中皮細胞層へのMM1細胞の浸潤には少なくとも $\beta 1$ インテグリン-FNの接着系が作動していることがわかった。MM1細胞が位置移動するためにはこ

の接着系に加えてLPAを添加することが必要である。LPAの添加はインテグリンの集積を介する接着斑の形成及びアクトミオシン系の活性化による駆動力の発生（既報）のための引き金になるものと考えられる。偽足に接着斑が時々見られるのは偽足の先端で接着、脱着がくり返されているからだと考えることができる。接着斑の形成はRhoにより制御されるNa-H交換系の活性化を介するインテグリンの集積によるものと思われる。このことはNa-H交換系の阻害剤であるアミロライドが浸潤を強く抑制する（既報）ことから裏づけられる。

E. 結論

in vitro 浸潤系におけるMM1細胞の中皮細胞層下への浸潤に関与する接着系（インテグリン-フィブロネクチン）を明らかにした。浸潤誘導物質（LPA）はこの接着系の集積（接着斑形成）とアクトミオシン系の活性化（既報）をもたらし、細胞の位置移動を誘発する。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Saeki Y., Seya T., Hazeki K., Ui M., Hazeki O., Akedo H., Involvement of phosphoinositide 3-kinase in regulation of adhesive activity of highly metastatic hepatoma cells. *J. Biochem.*; 124: 1020-1025 (1998)
2. Sugihara A., Maeda O., Tsuji M., Tsujimura T., Nakata Y., Akedo H., Kotake T., Terada N., Expression of cytokines enhancing the osteoclast activity, and parathyroid hormone-related protein in prostatic cancers before and after endocrine therapy: An immunohistochemical

study. *Oncol. Rep.*; 5: 1389-1394 (1998)

3. Yamamura H., Yoshikawa H., Tatsuta M., Akedo H., Takahashi K., Expression of the smooth muscle calponin gene in human osteosarcoma and its possible association with prognosis. *Int. J. Cancer*; 79: 245-250 (1998)
4. Tanigaki Y., Terada N., Kitamura H., Kitano E., Takemura K., Yamamoto T., Mori Y., Akedo H., Tanaka H., Cytotoxic activity of normal mouse serum on mouse tumor cells in vitro. *Oncol. Rep.*; 5: 693-698 (1998)
5. Okamoto H., Nakamori S., Mukai M., Shinkai K., Ohigashi H., Ishikawa O., Furukawa H., Imaoka S., Matsumoto Y., Monden M., Akedo H., Down-regulation of focal adhesion kinase, pp125FAK, in endothelial cell retraction during tumor cell invasion. *Clin. Exp. Metastasis*; 16: 243-252 (1998)
6. Yoshioka K., Mastumura F., Akedo H., Itoh K., Small GTP-binding protein Rho stimulates the actomyosin system, leading to invasion of tumor cells. *J. Biol. Chem.*; 273: 5146-5154 (1998)
7. Nakae T., Horai T., Imamura F., Akedo H., Higashino K., Expression of cathepsin B in small cell lung carcinoma cells in relation to in vitro invasiveness. *Tumour Biol.*; 19: 118-125 (1998)
8. Sasaki A., Alcalde RE., Nishiyama A., Lim DD., Mese H., Akedo H., Matsumura T., Angiogenesis inhibitor

TNP-470 Inhibits human breast cancer osteolytic bone metastasis in nude mice through the reduction of bone resorption. *Cancer Res.*; 58: 462-467 (1998)

9. Yamamoto T., Terada N., Seiyama A., Nishizawa Y., Akedo H., Kosaka H., Increase in experimental pulmonary metastasis in mice by L-arginine under inhibition of nitric oxide production by NG-nitro-L-arginine methyl ester. *Int. J. Cancer*; 75: 140-144 (1998)
10. Itoh K., Yoshioka K., Akedo H., Uehata M., Ishizaki T., Narumiya S., An essential part for Rho-associated kinase in the transcellular invasion of tumor cells. *Nature Medicine.*; 5: 221-225 (1999)
11. Mukai M., Imamura F., Ayaki M., Murakami-Murofushi K., Kobayashi S., Shinkai K., Yamamoto T., Nakamura H., Akedo H., Inhibition of tumor invasion and metastasis by a novel lysophosphatidic acid (cyclic LPA). *Int. J. Cancer*, (in press)
12. Imamura F., Mukai M., Ayaki M., Takemura K., Horai T., Shinkai K., Nakamura H., Akedo H., Involvement of small GTPase Rho and Rac in the invasion of rat ascites hepatoma cells. *Clin. Exp. Metastasis*, (in press)

2.学会発表

1. The 29th International Symposium of the Princess Takamatsu Cancer Research Fund

G. 知的所有権の取得状況

なし

分担研究報告書

浸潤、転移の危険因子とその抑制に関する研究

分担研究者 向井睦子 大阪府立成人病センター

研究要旨

1 cAMPを上昇させる薬剤（シロスタゾール）による癌細胞の浸潤の抑制

シロスタゾールはホスホダイエステラーゼⅢのインヒビターで血小板凝集抑制剤として既に使用されているが、in vitro の浸潤を濃度に依存して抑制することがわかった。

2. IL-18による乳癌細胞の骨転移の抑制

IL-18は乳癌細胞の増殖を抑制することなしに肺がん細胞の骨転移を抑制することを見い出した。

A. 研究目的

がんの浸潤、転移を抑制するため、我々の開発した浸潤モデルを用いて、この系で観察される浸潤に関与する因子、および阻害する薬剤をスクリーニングし、さらに動物実験でこれらの薬剤による転移の抑制を試みる。

B. 研究方法

- ・ラットの腸間膜より分離、培養した中皮細胞層の上にラット腹水肝癌細胞を重層培養する浸潤モデル実験法によって in vitro 浸潤能を測定する。
- ・マウスの左心室より癌細胞を注射し、骨への転移を macroscopic, microscopicに観察して評価する。

C. 研究成果

1. cAMPを上昇させる薬剤（シロスタゾール）による癌細胞の浸潤の抑制。

我々は、AH130腹水肝癌細胞と中皮細胞を用いたin vitro浸潤実験系で1-

オレオイルリイソホスファチジン酸 (LPA)が浸潤を誘発すること、および環状リイソホスファチジン酸(c-LPA)がその浸潤を強く抑制し、その抑制に cAMP の上昇が関与することを昨年度まで報告してきた。今年度は cAMP を上昇させる薬剤で既に臨床的に使用されている薬剤の中で浸潤が抑制されるものがあるかどうかを調べ、シロスタゾールが浸潤を濃度に依存して抑制することを見い出した。

2. IL-18による乳癌細胞の骨転移の抑制
骨は肝、肺に次いで転移の好発部位であり、その大部分は破骨性であり、骨転移は宿主の osteoclast の協力により成立すると考えられている。一方、IL-18 は osteoclast の分化を抑制することがわかっている。そこで、ヒト乳癌細胞 MDA-231 の破骨性骨転移に対する IL-18 の効果を検索した。

IL-18は乳癌細胞の増殖を抑制することなく骨転移を抑制することを見い出した。

D. 考察

- ・cAMPの濃度を上昇させる薬剤は、細胞運動を抑制することがわかり、臨床応用の可能性が示唆された。cAMPの浸潤抑制機序については、現在不明であるが、PKAの活性化を介するものと考えられる。低分子量G蛋白RHOの活性化にもとづくアクトミオシン系の活性化、接着斑の形成など、浸潤にかかわるシグナル系とPKAがどのようにクロストークしているかが今後の課題である。
- ・IL-18の骨転移抑制効果を乳癌細胞以外の骨転移系についても確認し、一般化をはかりたい。

E. 結論

- ・シロスタゾールはホスホダイエステラーズⅢのインヒビターで血小板凝集抑制剤として既に使用されているが、*in vitro*の浸潤を濃度に依存して抑制することがわかった。
- ・IL-18は乳癌細胞の増殖を抑制することなしに肺がん細胞の骨転移を抑制することを見い出した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- ・Okamoto H., Nakamori S., Mukai M., Shinkai K., Ohigashi H., Ishikawa O., Furukawa H., Imaoka S., Matumoto Y., Monden M., Akedo H., Down-regulation of focal adhesion kinase, pp125FAK, in endothelial cell retraction during tumor cell invasion. Clin. Exp. Metastasis; 16: 243-252 (1998)

- ・Mukai M., Imamura F., Ayaki M., Murakami-Murofushi K., Kobayashi S., Shinkai K., Yamamoto T., Nakamura H., Akedo H., Inhibition of tumor invasion and metastasis by a novel lysophosphatidic acid (cyclic LPA). Int. J. Cancer, (in press)
- ・Imamura F., Mukai M., Ayaki M., Takemura K., Horai T., Shinkai K., Nakamura H., Akedo H., Involvement of small GTPase Rho and Rac in the invasion of rat ascites hepatoma cells. Clin. Exp. Metastasis, (in press)

2. 学会発表

1. 第55回日本癌学会 平成10年

G. 知的所有権の取得状況
なし

厚生科学研究費補助金（浸潤、転移の分子機構に基づいた転移の
予防および新しい治療法の開発研究事業）

（総括、分担）研究報告書

癌の悪性化と転移を抑制する遺伝子群の解析

分担研究者 高橋 克仁 大阪府立成人病センター 研究所第5部 主任研究員

研究要旨

骨肉腫細胞におけるカルポニン(h1)遺伝子の発現低下は、肺転移や予後不良の指標となる。骨肉腫細胞における同遺伝子の発現抑制のメカニズムに、プロモーター領域のCpGメチレーションがあることをはじめて明らかにした。

A. B. 研究目的・方法

カルポニンは、平滑筋細胞から単離されたアクチン結合蛋白で5'プロモーター領域にメチル化CpG結合蛋白(MeCP2)の結合部位をもつ。我々は既に(1)カルポニン(h1)遺伝子が骨肉腫細胞に発現すること、(2)カルポニン(h1)遺伝子欠失マウスで骨芽細胞の増殖と骨形成の亢進が認められること、(3)同遺伝子の発現低下が骨肉腫症例の悪性度や予後不良の指標となることを明らかにした。今回、骨肉腫におけるカルポニン(h1)遺伝子の発現変化のメカニズムを明らかにする目的で、ヒト骨肉腫培養細胞株(HOS, MNNG-HOS, OST, SaOS)を用いて、HpaIIおよびSssIメチラーゼを使ったDNAメチレーションによるヒトカルポニン(h1)遺伝子プロモーター(-281~+137)の発現調節機構を検討した。

C. 研究結果

RT-PCR法では、カルポニン(h1)遺伝子のmRNA発現はHOSとSaOSで認められたが、OSTとMNNG-HOSでは検出できなかった。しかし、プロモーター活性は全ての骨肉腫細胞株で認められた。そこで、HOSとOSTを用いて、プロモーター領域に存在する3個のHpaII部位(-CCGG-)および15個のSssI部位(-CG-)をメチル化した後に転写活性を測定すると、HOSではメチル化(-)と有意差なく、OSTではHpaIIで76%、SssIで94%の抑制を示した。また、Sodium metabisulfiteを用いたカルポニン遺伝子プロモーターのCpGメチル化パターンの検討により、HOSに比してOSTとMNNG-HOSでCpGメチル化の亢進が認められた。DNAメチル化阻害剤である5-AzaCを作用させると、OSTでカルポニン遺伝子のmRNA発現が回復した。

D. F. 考察および結論

骨肉腫細胞において、カルポニン(h1)遺伝子の発現がプロモーター領域のCpGメチレーションによって抑制されることをはじめて明らかにした。癌細胞ではDNAメチレーションの活性が上昇していることが報告されており、腫瘍の転移や悪性化のメカニズムにメチル化によるカルポニン(h1)遺伝子の発現抑制が関与している可能性が示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表

- [1] Yamamura H., Yoshikawa H., Tatsuta M., Akedo H., Takahashi K. Expression of the smooth muscle calponin gene in human osteosarcoma and its possible association with prognosis. *International Journal of Cancer* (1998) 79: 245-250.
- [2] Ueki N., Ohkawa T., Yamamura H., Takahashi K., Tsutsui T., Kawai Y., Yokoyama Y., Amuro Y., Hada T., Higashino K. Induction of calponin-h1 by transforming growth factor- β 1 in cultured human Ito cells, LI90. *Biochimica Biophysica Acta* (1998) 1403: 28-36.
- [3] Yamamura H., Ikeda W., Shibata N., Awata N., Takahashi K. Structure and expression of calponin in arterial smooth muscle cells. In *Ischemic Heart*, edited by Mochizuki S., Takeda N., Nagano M. Dhalla N.S., Kluwer Academic Publishers (1998), pp87-95.
- [4] Yoshikawa H., Taniguchi S., Yamamura H., Mori M., Sugimoto M., Miyado K., Nakamura K., Nakao K., Katsuki M., Shibata N., Takahashi K. Mice lacking smooth muscle calponin display increased bone formation that is associated with enhancement of bone morphogenetic protein responses. *Genes to Cells* (1998) 3: 685-695
- [5] Fujikawa H., Tani E., Yamaura I., Ozaki I., Miyaji, K., Sato, M., Takahashi K., Imajo-Ohmi S. Activation of protein kinases in canine basilar artery in vasospasm. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* (1999), 19: 44-52
- [6] Parker C.A., Takahashi K., Tang J. X., Tao T., Morgan K. Ytoskeletal targeting of calponin in differentiated, contractile smooth muscle cells of the ferret. *Journal of Physiology (London)* (1998) 508: 187-198.
- [7] Kim B.K., Ozaki H., Hori M., Takahashi K., Karaki H. Increased contractility of rat uterine smooth muscle at the end of pregnancy. *Comp. Biochem. Physiol.* 121, 165-173, 1998

2. 学会発表

- [1] 佐々木洋、高橋克仁 他 肝細胞癌切除例における、腫瘍血管内アクチン結合蛋白"カルポニン"の発現と予後、第57回日本癌学会総会
- [2] 山村倫子、高橋克仁、竜田正晴 他 CpGメチレーションによるヒトカルポニン遺伝子プロモーターの転写抑制:骨肉腫培養細胞株を用いた検討 第57回日本癌学会総会
- [3] 新田隆、高橋克仁 他 ヒト非小細胞肺癌(NSCLC)培養細胞株におけるカルポニン遺伝子発現とp53遺伝子変異との関連、第57回日本癌学会総会
- [4] 谷口俊一郎、高橋克仁 他 カルポニンh1欠失マウスの転移アッセイ系としての可能性、第57回日本癌学会総会

分担研究者 飯石 浩康 大阪府立成人病センター研究所 2 部主幹

研究要旨：われわれは化学発癌剤による腸癌の発生過程に bombesin を併用することによって高率に腹膜播種性転移を起こす実験モデルを作成し、転移抑制物質の検索を進めている。われわれのグループを含めたこれまでの基礎的研究から、癌の浸潤過程において蛋白のチロシンリン酸化が重要な役割を果たしていることが明らかとなっている。今年度は蛋白のチロシンリン酸化を特異的に阻害する genistein の転移抑制作用について検討し、われわれの発癌・転移モデルにおいて genistein が bombesin の転移促進作用を抑制することを明らかにした。Genistein は大豆に含まれる isoflavonoid の一種で、欧米では床応用可能な癌の化学予防剤として有望視されており、将来は転移抑制剤としてもヒトへの使用が期待できる物質である。

A. 研究目的

われわれは化学発癌剤によるラット実験腸癌の発生過程に、消化管ホルモンの一つである bombesin (BBS) を投与することによって、化学発癌では稀な腹膜播種性転移が高率に発生することを初めて明らかにした、その後これを *in vivo* の転移モデルとして利用し、転移抑制物質の検索を進めてきた。これまでにポリアミン生合成の律速酵素であるオルニチン脱炭酸酵素の阻害剤 (1, 3-ジアミノプロパン)、グアニジン誘導体の利尿剤 (アミロライド、トリウムテレン)、紅参の抽出物 (ジンセノシド Rg3)、カルシウム拮抗剤 (ベラパミル) の転移抑制作用について報告した。

今回検討した genistein は大豆に含まれる isoflavonoid の一種で、各種臓器において発癌抑制作用を有することが報告されている。その作用機序の一つとして genistein の持つ蛋白のチロシンリン酸化に対する特異的阻害作用があげられている。一方、*in vitro* における浸潤モデルでの検討から、genistein が低分子量 G 蛋白 rho p21 を介した p125 focal adhesion kinase など癌浸潤に重要な蛋白のチロシンリン酸化を阻害し、癌細胞の浸潤を抑制することが明らかとなっている。そこで今年度は、genistein の転移抑制作用について、われわれが開発した転移モデルを用いて検討した。

B. 研究方法

Wistar 系雄ラット 120 匹を 6 群に分け、

すべてのラットに実験開始から発癌剤 (azo-xymethane 7.4 mg/kg) を週 1 回 10 週間皮下投与した。また、各群のラットには BBS (40 μ g/kg) は実験開始時から終了時 (45 週目) まで、genistein は 16 週目から 45 週目まで、いずれもオリーブ油に懸濁し以下のごとく週 3 回皮下投与した。45 週目にすべてのラットを屠殺し、腸腫瘍の有無、腹膜転移の有無などを肉眼的及び組織学的に調べた。

第 1 群 (対照群) : オリーブ油のみ

第 2 群 : BBS のみ

第 3 群 : BBS+genistein 5 mg/kg

第 4 群 : BBS+genistein 10 mg/kg

第 5 群 : genistein 5 mg/kg のみ

第 6 群 : genistein 10 mg/kg のみ

C. 研究結果

①第 1 群 (対照群) では 50% (10/20) のラットに腸腫瘍が発生した。これに対して第 2 群 (BBS 単独投与群) ではすべてのラット (20/20) に腸腫瘍を認めた。第 3 及び 4 群 (BBS と genistein 併用群) の腫瘍発生率はともに 90% (18/20) で、これら BBS 投与群では、genistein 併用の有無に関わらず、対照群に比べ腫瘍発生率が有意に高かった。一方、第 5 及び 6 群ではそれぞれ 45%、50% で対照群との差はなかった。

②第 1 群では腹膜播種性転移は認められなかった。第 2 群では担癌ラット 13 匹中 12 匹 (92%) に腹膜転移が認められ、第 1 群に比べ転移率が有意に高かった。これに対して BB

S に genistein を併用した第3及び4群における転移率はそれぞれ7% (1/14), 11% (2/17) で、いずれも第2群に比べ有意に低かった。

③腸癌を組織学的に検討した結果、6群間で癌の占拠部位、組織型、深達度、浸潤様式には有意な差を認めなかったが、第2群では第1群に比べ癌のリンパ管侵襲の頻度が有意に高かった。第2群に比べ第3及び4群ではリンパ管侵襲の頻度は有意に低かった。

D. 考察

BBS は培養前立腺癌細胞の浸潤を促進することが報告されている。また、ヒト癌においてもガストリン放出因子 (ほ乳類のBBS) に対する受容体が大腸癌組織に高率に存在し、しかも受容体陽性例ではリンパ管への癌細胞の侵襲率が高いことも報告されている。BBS が癌細胞の浸潤を促進するメカニズムとしては、癌細胞の浸潤に関与している p125 focal adhesion kinase や paxillin のチロシン磷酸化に対する BBS の刺激作用が深く関わっていると考えられている。

また、本班研究における共同研究から、低分子量G蛋白 rho p21 を介した p125 focal adhesion kinase や paxillin のチロシン磷酸化が癌細胞の浸潤過程において重要な役割を果たしており、浸潤を促進する lysophosphatidic acid の投与によってこれら蛋白のチロシン磷酸化が刺激されること、チロシン磷酸化を特異的に阻害する genistein が lysophosphatidic acid の浸潤促進作用を抑制することが明らかにされている。

以上の成績から、BBS は浸潤に関与する蛋白のチロシン磷酸化を介して癌細胞の浸潤・転移を促進し、一方 genistein はそれら蛋白のチロシン磷酸化を阻害することによって BBS の浸潤・転移促進作用を抑制していると考えられる。

E. 結論

(1)従来の移植癌を用いた転移モデルとは全く異なり、発癌から浸潤さらには転移へと多段階的に進展するヒト癌に類似した動物モデルを確立することができた。

(2)大豆に含まれる isoflavonoid の一種である genistein が BBS の発癌促進作用に影響を及ぼすことなく、BBS の持つ転移促進作用のみを抑制することが明らかとなった。

(3) genistein は臨床使用可能な癌化学予防物質として有力視されており、将来的には転

移抑制物質としても応用できる可能性がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

Iishi H., Tatsuta M., Baba M., Yano H., Iseki K., Uehara H., Nakaizumi A. Inhibition by galanin of experimental carcinogenesis induced by azaserine in rat pancreas. *Int. J. Cancer*, 75: 396-399 (1998)

Iishi H., Tatsuta M., Baba M., Sakai N., Yano H., Uehara H., Nakaizumi A., Iseki K. Promotion by the alpha-adrenoceptor agonist phenylephrine, but not by the beta-adrenoceptor agonist isoproterenol, of gastric carcinogenesis induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in Wistar rats. *Cancer Lett.*, 122: 61-65 (1998)

Iishi H., Tatsuta M., Baba M., Yamamoto R., Uehara H., Nakaizumi A. Inhibition of experimental gastric carcinogenesis, induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in rats, by sodium nitroprusside, a nitric oxide generator. *Br. J. Cancer*, 34: 554-557 (1998)

2. 学会発表

飯石浩康, 竜田正晴, 馬場 都, 明渡 均. ラット腸癌の腹膜播種性転移モデルを用いた Ca 拮抗剤ベラパミルの転移抑制作用の検討. 第57回日本癌学会総会. 1998年

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得: なし
2. 実用新案登録: なし
3. その他: なし

厚生科学研究費補助金（がん克服戦略研究事業）

分担研究報告書

浸潤、転移の分子機構に基づいた転移の予防並びに新しい治療法の開発班

研究課題

浸潤、転移に関与する細胞骨格蛋白質の制御

分担研究者 伊藤和幸 大阪府立成人病センター研究所主任研究員

研究要旨

腫瘍細胞の浸潤運動の制御には、低分子量 GTP 結合蛋白質 Rho 並びにその下流の Rho kinase-actomyosin 系が重要な役割を演じている。Rho kinase の特異的阻害剤の持続投与が、動物実験モデルでの肝臓がんの腹膜播種を効果的に抑制した事から、将来 Rho kinase を分子標的とした臨床治療の可能性がでてきた。一方臨床例では、Rho の mutation は見つかっておらず、その発現量が浸潤、転移と相関する事がいくつかのがん種で報告されている。我々が作成した wild type Rho を恒常的に過剰発現する肝臓がん細胞では、発現レベルに相関した actomyosin 系の活性化、*in vitro*, *in vivo* の浸潤能の亢進が認められた。その機序として、Rho の過剰発現により Rho 自身の細胞質から細胞膜への translocation の促進を認め、Rho 活性化機構の亢進が示唆された。

A. 研究目的

細胞運動の制御に関与する低分子量 GTP 結合蛋白質 Rho 並びにその下流の Rho kinase-actomyosin 系が、がん細胞の浸潤運動の制御に重要な役割を果たしている事を示すと共に、特異的阻害剤による浸潤、転移の抑制を試みる。

B. 研究方法

上記の目的の為、以下に示す3つの研究方法を用いた。

1. Rho、Rho-kinase の active form 並びに dominant negative form の cDNA を肝臓がん細胞

に導入、恒常的に発現させ、それらの細胞の性質を細胞生物学的、生化学的に *in vitro*, *in vivo* で詳しく検討した。

2. Rho kinase の特異的阻害剤として、吉富製薬研究所上畑らが開発した Y-27632 を用いて、浸潤運動やその signal transduction に及ぼす影響を調べ、*in vivo* での浸潤、播種抑制効果を検討した。

3. 臨床例では、Rho の mutation は見つかっておらず、その発現量が浸潤、転移と相関する事がいくつかのがん種で報告されている。今回 wild type Rho を恒常的に過剰発現する肝臓がん細胞を作成し、その *in vitro*, *in vivo* にお

ける機能を細胞生物学的、並びに生化学的に解析した。

C. 研究結果

我々は Rho kinase の特異的阻害剤 (Y-27632) が、Lysophosphatidic acid (LPA)→Rho を介する肝臓がん細胞の浸潤、活性化 Rho、活性化 Rho kinase 発現肝臓がん細胞の浸潤を *in vitro* で濃度依存性に抑制する事を見いだした。さらに Rho kinase の dominant negative mutant をがん細胞に導入すると、浸潤運動、myosin 軽鎖のリン酸化 (actomyosin 系活性化の指標) が共に抑制された。ところが、Rho kinase 阻害剤の生体内の半減期は短く、ラットの腹腔内 1 回投与後の半減期は約 2 時間である。そこで、効率的な薬剤送達(delivery)を行い、組織内の有効薬剤濃度を保つ為に高容量 (50mg/200 μ l/pump)の阻害剤を持続分泌型浸透圧ポンプ(Alzet model 2002) に注入しラット腹腔内に埋め込み、持続投与による浸潤の抑制を *in vivo* で検討した。2x10⁷ の肝臓がん細胞を 6 週令の Donryu ラット (体重 100g)の腹腔に移植すると同時に薬剤の入ったポンプ (2 個) を埋め込み、11 日目にラットを屠殺、腹水の出現とその量、腹腔内の腫瘍形成と播種を観察したが、すべて薬物ポンプ群がコントロールポンプ群(PBS を注入) に比して著明に抑制されていた。又この期間中全身及び局所の副作用は全く認められなかった。一方、腹水中、腫瘍内の阻害剤の濃度は、各々 21 μ M、48 μ M で *in vitro* で浸潤を抑制する濃度に匹敵し、薬物の投与が非常に効率良く行われた事を示していた。(論文 5)

又、wild type Rho を恒常的に過剰発現する肝臓がん細胞では、発現レベルに相関した actomyosin 系の活性化、*in vitro*, *in vivo* の浸潤能の亢進が認められた。その機序として、wild type Rho の過剰発現により、Rho の細胞質から細胞膜への translocation の促進を認め、Rho 活性化機構の亢進が示唆された。(論文 6)

D. 考察

本研究は、Rho 及び Rho kinase を始めとする下流の標的蛋白質を介するシグナル伝達と腫瘍細胞の浸潤運動、さらに Rho の発現量と Rho の活性化との関係を明らかにする点で独創的であり、その成果は腫瘍の浸潤転移機構の解明に寄与すると共に、阻害剤の臨床応用の可能性を開くものと考えられる。

E. 結論

Rho kinase の特異的阻害剤が、*in vitro*、*in vivo* において肝臓がん細胞の腹膜への浸潤、播種を有意に抑制した。浸潤運動に Rho-Rho kinase system が重要な役割をしている事、低分子量化学物質の抗転移薬としての臨床応用の可能性が示唆された。

F. 研究発表

論文発表

1. Yoshioka, K., Matsumura, F., Akedo, H. and Itoh, K.: Small GTP-binding Protein Rho Simulates the Actomyosin System, Leading to Invasion of Tumor Cells: **J. Biol. Chem.** 273: 5146-5154 (1998)
2. Itoh, K., Yoshioka, K., Matsumura, F. and

Akedo, H.: Small GTP-binding protein Rho stimulates actomyosin system leading to transcellular migration of tumor cells: **Cytoskeleton and G-proteins in the regulation of cancer** : 129-131 (1998)

3. Asai, T., Ueda, T., Itoh, K., Yoshioka, K., Aoki, Y., Mori S. and Yoshikawa H.: Establishment and characterization of a murine osteosarcoma (LM8) with high metastatic potential to the lung: **Int. J. Cancer** 76: 418-422 (1998)

4. Tanaka, K. and Itoh, K.: Reorganization of stress fiber like structures in spreading platelets during surface-activation: **J. Struc. Biol.** 124: 13-41 (1998)

5. Itoh, K., Yoshioka, K., Akedo, H., Uehata, M., Ishizaki, T. and Narumiya, S.: An essential part for Rho-associated kinase in the transcellular invasion of tumor cells: **Nature Medicine** 5: 221-225 (1999)

6. Yoshioka, K., Nakamori, S. and Itoh, K.: Overexpression of Small GTP-binding Protein Rho Promotes Invasion of Tumor Cells: **Cancer Research** 59: in press (1999)

7. 伊藤和幸、明渡均：癌の分子標的治療-抗転移、浸潤薬の分子標的：**Molecular Medicine** (中山書店) 35:1350-1356 (1998)

8. 伊藤和幸：がん細胞運動における低分子量GTP結合蛋白質 Rho の役割とその制御：がんの浸潤・転移—基礎研究の臨床応用はどこまで可能か—北島政樹編集 (医学書院) 279-285 (1998)

9. 伊藤和幸：癌転移の制御—癌転移学の治療への応用—3 運動：**Mebio**16: 2: 27-31 (1999)

学会発表

国際学会

1. 18 th. International symposium on Cancer. Itoh, K., Yoshioka, K., Ishizaki, T. and Narumiya, S.: Small GTP-binding protein Rho, Rho-associated kinase and actomyosin system in tumor cell invasion. (1998. 7. 7, Sapporo, Japan)

2. 1999 Keystone Symposia (C8: The functions of Small GTPases). Itoh, K., and Yoshioka, K: An Essential Role for Rho-associated Kinase in Transcellular Invasion of Tumor Cells. (1999.3.8, SantaFe, NM, USA)

3. NIH/NHLBI-LMC Seminar. Itoh, K.: The Rho-Rho kinase System as a Therapeutic Target. (1999.3.12, Bethesda, MD, USA)

国内シンポジウム

1. がん転移研究会第7会総会ワークショップ WS-1 伊藤和幸、岡部正美、がん転移研究会推進活動 “欧米における抗転移薬の開発状況とその評価法—前臨床における抗転移薬開発の現状 “ (1998.7.11, 札幌)

2. 日本癌学会第57回総会シンポジウム S05-6 伊藤和幸、向井睦子、明渡均 “がん細胞の運動性と浸潤の機構” (1998.9.30, 横浜)

3. 日本生化学会第71回大会シンポジウム 2M-S40-03 伊藤和幸、吉岡潔子、石崎敏理、成宮周 “Rho/Rho-kinase/actomyosin 系を介する腫瘍細胞浸潤運動の制御” (1998.10.15, 名古屋)

