

厚生科学研究費補助金（がん克服戦略研究事業）
総合研究報告書

ヒトがんの浸潤・転移性増殖の基盤となる分子・細胞機構の総合的把握に関する研究
(H 10-がん-009)

主任研究者 広橋 説雄 (国立がんセンター研究所 所長)

研究要旨：がんにおけるカドヘリン細胞接着系の不活化の様々なメカニズムを明らかにし、それらが、がんの病態、浸潤・転移性とよく相関することを見出してきた。カドヘリン細胞接着系の構成成分である β カテニンは、細胞増殖の制御に関わるc-erbB-2およびEGF受容体と β カテニンの中央に存在する12番目のアルマジロ反復配列により結合し、増殖因子の刺激により同部位がリン酸化されることを示した。カドヘリン細胞接着系と同時にWntシグナル伝達系に関与する β カテニンの細胞内蓄積量が、培養細胞ではAPC腫瘍抑制遺伝子の変異位置と良く相関することを多数の大腸がん細胞株により明らかにした。また、子宮内膜がんの一部では β カテニンに遺伝子変化が認められると共にその発現量が増加し、Wntシグナル伝達系の発がんへの関与が示唆された。さらに β カテニンとTCF/LEFの転写複合体の新しい標的遺伝子の一つとして、プロモーターに複数のTCF4の応答部位がある遺伝子を同定した。N末を欠いた β カテニンに結合する分子として、膜突起部に局在する分子を新たに同定した。若年性胃がん9例のEカドヘリン遺伝子の変異を調べ、7例で体細胞性遺伝子変異を認めたが、家族性胃がんで報告された胚細胞性遺伝子変異は認められなかった。がんで発現が亢進し、カドヘリン機能を不活化することで転移を更新する新規分子Dysadherinを同定し、その機能解析を進め、アクチンと相互作用を示すこと、120kDaの細胞内結合タンパクが存在することを示した。細胞基質間接着分子であるインテグリン β 4の発現低下が胃がんの腹膜播種性転移ならびに膀胱がんの上皮内進展に関与していることを明らかにした。がんの運動性・浸潤性に関与する新規アクチン結合性タンパクであるアクチニン4を同定し、アクチニン4の発現様式が乳がん患者の予後と良く相関することを示した。扁平上皮がんにおいて、ラミニン5 γ 2鎖の発現の強い症例は予後不良であること、ラミニン5 γ 2鎖の発現とEGFRの発現、遺伝子増幅が良く相関することを示した。Bcl-2またはBcl-2結合蛋白BAG-1の過剰発現によりアポトーシスを阻害し或いは運動能を亢進することによって、がんの転移や浸潤が亢進することを明らかにした。ヒアルロン酸合成酵素1の遺伝子を単離し、同遺伝子を含むHAS遺伝子群のうち、HAS1の発現と大腸がんのリンパ節転移能との間に有意な相関性があることを明らかにした。ヒアルロン酸合成酵素HAS遺伝子発現とがん浸潤・転移性との密接な関連を、SrcまたはRasでトランスフォームしたラット3Y1細胞を用いた実験系でも確認した。子宮体がん細胞ではH1型糖鎖の発現の有無が浸潤・転移能と相関することが示唆された。細胞外基質分解酵素阻害剤による腹膜播種抑制効果を動物モデルを用いて検討し、新たな胃がん腹膜播種治療法の開発を試みた。大腸がんの肝転移に原発巣におけるCOX-2の発現が強く相関することを示した。

分担研究者

1. 広橋説雄 国立がんセンター研究所
所長
2. 今井浩三 札幌医科大学医学部
教授
3. 野澤志明 慶應義塾大学医学部
教授
4. 木全弘治 愛知医科大学分子医科学
研究所 教授
5. 北島政樹 慶應義塾大学医学部
教授

A. 研究目的

がんが発生局所にとどまる間に外科的治療が行えれば完全治癒となるが、いったん周辺そして遠隔臓器への浸潤・転移が起これば、治癒が極めて困難となる。従って、このがんの浸潤・転移の機構を分子・細胞レベルで明らかにすることは、がん研究の中でも最も重要な課題の1つである。本研究では、実際の臨床がんにおける浸潤・転移、そしてそれを良く模倣する *in vivo*, *in vitro* モデルを対象に最新の分子細胞生物学的手法を用いて解析し、転移・浸潤能の正確な診断を可能とし個々の症例に現時点における最適の治療法を選択可能とすると同時に、今後の新たな治療法開発のための治療標的を明らかにすることを目的とする。

これまでに、ヒトがんの臨床像をよく反映する *in vitro*, *in vivo* の浸潤・転移モデルを作製し、さらにがんの浸潤・転移過程にともなうがん細胞接着不全の機構をカドヘリン・カテニン細胞接着系構成員の分子異常・発現異常として明らかにしてきた。そこでこれまでの研究成果を発展させ、確立された浸潤・転移モデルを対象に、がん細胞間接着の不活化機構が細胞基質間接着、細胞運動、蛋白分解酵素の産生、腫瘍

血管・マトリックス誘導などを含むがん間質相互作用など、浸潤・転移性増殖に関わると予想される他の分子細胞機構といかに連携しているのか、シグナル伝達ならびに転写のレベルで解明すべく研究を進める。またすでにごがん細胞にはがん遺伝子やがん抑制遺伝子の変異に加えて細胞表面のレセプター、細胞接着分子ならびにごがん周囲間質の異常が見出されている。そこで、がん遺伝子・がん抑制遺伝子の変異がいかに悪性形質を直接担う機能分子の異常につながるか、あるいはシグナル伝達の異常をどう引き起こすのかを明らかにする必要がある。これらの基礎的研究に加え、実際の臨床がん手術材料を対象に遺伝子・分子・細胞レベルでの解析を行うことにより、分子・細胞レベルでの変化とがん浸潤・転移性増殖の臨床像との対応を直接明らかにするとともに、新しいがん治療の標的になると考えられるがん浸潤・転移に関わるがん細胞間接着分子と増殖因子受容体、細胞基質間接着分子、アポトーシス関連分子、がん間質誘導機構ならびにごがん細胞運動阻害剤などの検討を重点的に行う。

B. 研究方法

1. がん浸潤・転移に関わる細胞接着分子と増殖因子受容体

胃がんならびに大腸がん培養細胞株に c-erbB-2 がん遺伝子産物とカドヘリン細胞内結合分子である β カテニンの結合部位を含んだ cDNA を導入し、SCID マウスを用いた同所性移植を行ない、がんの浸潤・転移能の変化を検索した。また、c-erbB-2 や EGF 受容体など増殖因子受容体と β カテニンとの間の結合部位を明らかにする目的で β カテニンの多数の deletion mutants を作製し、c-erbB-2 ならびに EGF 受容体との結合部位を検索し

た。また、増殖因子受容体から β カテニンへのシグナル伝達機構として増殖因子受容体の活性化による β カテニンのリン酸化を GST-fusion β カテニンタンパクを用いて試験管内で検討した。

2. 大腸がんにおける Wnt シグナル伝達系の変化

ヒト大腸がん 96 症例の原発巣の AMeX 固定パラフィン包埋切片を抗 β カテニン抗体を用いて免疫染色を施行し、 β カテニンの組織内・細胞内局在について検討し、臨床病理学的因子との関連を検討した。また 31 種のヒト大腸がん培養株より DNA・RNA を抽出し、APC 腫瘍抑制遺伝子および β カテニン遺伝子の第 3 エクソンの塩基配列を決定した。これより APC 遺伝子産物内に残存している β カテニン結合部位の数を推定し、Western blotting 法による β カテニンの細胞内蓄積量との相関を調べた。さらにこれら大腸がん細胞株を SCID マウスの皮下に移植し、移植腫瘍における β カテニンの組織内分布を検討した。

3. 子宮内膜がんにおける β カテニン遺伝子変化

子宮内膜がん由来培養細胞株あるいは手術材料、ホルマリン固定後組織切片から DNA を抽出し β カテニン遺伝子の変異集積部である exon3 を PCR にて増幅、配列解析を行い遺伝子変異を検索した。同時に蛋白レベルの発現異常を免疫組織化学的に評価した。

4. β カテニン/TCF 4 転写複合体の標的遺伝子の検索

β カテニンと TCF4 の複合体形成により転写の活性化が起こる標的遺伝子群を

同定するために、テトラサイクリン調節性プロモータを用いた発現誘導システムを用い、TCF4 の転写活性が厳密に調節できる細胞株 2 種を樹立した。

1) β カテニンとの結合部位を欠き dominant-negative に TCF4 の転写活性を抑制する TCF4B Δ N30 を発現誘導できる大腸癌細胞 DLD-1 Tet-ON TCF4B Δ N30

2) N 末のリン酸化部位が欠損した安定化 β カテニン (β カテニン Δ N134) を発現誘導できる胎児腎上皮由来細胞 293 Tet-ON β カテニン Δ N134

この 2 株で誘導前後で発現の変化する遺伝子群を 2 色蛍光プローブによる cDNA microarray hybridization 法にてスクリーニングを行った。発現の変化が見られた遺伝子はさらに Northern blot 法、Western blot 法による発現変化の確認や Luciferase assay 法や gel shift assay 法による遺伝子の転写調節領域の TCF 4 / β カテニン転写複合体への応答性を検討した。また DLD-1 細胞の誘導前後での細胞生物学的特性の変化につき検討した。

5. N 末を欠いた β カテニンに結合する分子の単離

蛋白質相互作用を検知する Far-western 法を用いて、N 末を欠いた β カテニンに結合する分子の単離を試みた。N 末を欠いた human β カテニンを大腸菌内にて GST 融合蛋白質として作製精製し、*in vitro* において ^{32}P γ -ATP と bovine protein kinase A を用いて標識し、プローブとして用いた。 λ gt-11 を用いて作製した Human brain cDNA library を IPTG により誘導後ニトロセルロース膜に転写し、標識したプローブと反応させ、*in vitro* で結合するクローンをス

クリーニングした。4回スクリーニングをくり返すことで、再現性が見られるクローンを単離した。得られたクローンは、塩基配列を決定することでその分子を同定した。更にその分子に FLAG tag を付け培養細胞内に発現させ、tag に対する抗体を用いて免疫沈降を行い、 β カテニンの抗体を用いた Western blot により、細胞内での結合を確認した。

6. 若年性胃がんにおける Eカドヘリン遺伝子変異

国立がんセンター中央病院において 1992年から1997年までに外科的切除がなされた、35歳以下の進行胃がん9例を対象とした。何れも家族歴はみられず、病理組織学的に diffuse type であった。腫瘍部ならびに非腫瘍部の組織を各々一部分採取し、メタノール固定標本を作製した。これらを薄切し、レーザーマイクロダイセクション法にてがん細胞と非がん細胞とを別個に採取し DNA を抽出した。これらの DNA を鋳型とし Eカドヘリン遺伝子および β カテニン遺伝子の変異を PCR-SSCP 法ならびに direct sequence 法にて検討した。PCR-SSCP は、Eカドヘリン遺伝子に関しては第2エクソンから第16エクソンまでの15箇所を、 β カテニン遺伝子に関しては β カテニンの分解に参与する第3エクソンの1箇所のみについて行った。同一のメタノール固定標本を用いて、第9エクソン欠失 Eカドヘリンを認識する抗体、抗 β カテニン抗体ならびに抗 *H. pylori* (Hp) 抗体による免疫組織化学的染色も併せて行った。

7. 新規転移関連遺伝子 Dysadherin の同定と機能解析

肝細胞がん Li-7 細胞を免疫し、モノク

ローナル抗体 NCC-3G10 を作成した。 λ gt11 の免疫学的スクリーニング、リンパ球 cDNA ライブラリーとのクロスハイブリダイゼーションにより全長の cDNA (L3) を単離した。トランスフェクションは L3cDNA の C 末端に HSVTag を付け pCDNA3 に組み込んだものを Lipofectamine 法を用いた。Cy2-ラベル NCC-3G10 抗体とビオチン化 HECD-1、Rhodamin avidin の二重染色ないし単染色を行い共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。免疫組織化学においては、ヒト組織ホルマリンパラフィン切片を用いた。染色結果は対象標本の癌部 20%以上が陽性を示したものを強陽性、20%以下を陽性とし、全く染色されなかったものは陰性とした。電子顕微鏡並びに免疫電子顕微鏡的に超微形態を観察した。0.5% TritonX100 可溶分画、不溶分画での Eカドヘリンと Dysadherin の発現を Western blot にて解析した。Ca⁺⁺存在下で1分間80回転で30分間培養し凝集能を判定した。SCID マウスの脾臓にトランスフェクタント群と親株を $1 \times 10^6 / 50 \mu l$ 注入し、2週間後肝臓への転移の有無を調べた。結果は、マウス3匹の肝臓の最大断面における転移した数を平均値で示した。

Dysadherin ならびにアクチンの局在を、Dysadherin 遺伝子導入細胞、各種培養細胞株を用いて、蛍光抗体法にて検討した。抗 Dysadherin 抗体 NCC-3G10 を latex beads にコートし、Dysadherin 遺伝子導入細胞及び、臍帯内皮細胞へ添加し、37°C 30分間インキュベート後、蛍光抗体法でその局在を観察した。また、Dysadherin の細胞内領域に対する GST 融合タンパクを作成し membrane 上での overlay assay 及び細胞での overlay assay と蛍光抗体法

を組合わせた独自の方法を考案し検討を行った。

8. 細胞・基質接着分子インテグリン β 4とがん浸潤・転移機構

細胞基質間接着分子インテグリンの発現とヒト胃がん腹膜播種との関係を明らかにするため、ヒト分化胃がん細胞株4株と未分化胃がん細胞株6株を用い、各種インテグリンの発現と腹膜播種能の相関を検索した。がん細胞株の腹膜播種能は動物モデルにより、肉眼で確認しうる腹膜結節の数に基づいて評価した。インテグリン β 4のcDNA全長をインテグリン β 4を発現せず腹膜播種をするTMK-1細胞に導入し、また、インテグリン β 4の細胞内ドメインに対応するcDNAをインテグリン β 4を発現するMKN-28細胞に導入して、インテグリン β 4機能を阻害し、インテグリン β 4の腹膜播種に及ぼす影響を検討した。実際の胃がん組織におけるインテグリン β 4発現と腹膜播種との関係を調べるため、腹膜浸潤した胃がん120症例を用い、インテグリン β 4の発現と、腹膜播種、腹膜播種性再発までの期間ならびに予後と比較検討した。

膀胱がん認められる、上皮内がん (CIS: carcinoma in situ) は浸潤性結節状がん (nodular invasive carcinoma) の前駆病変と考えられている。がん細胞の上皮内進展が浸潤性結節状がん成立のための重要なステップであると考え、色々なインテグリンを発現しているヒト膀胱がん細胞6株をSCIDマウス腎盂、膀胱に移植し、がん細胞の上皮内進展 (IES: intraepithelial spreading) の有無を組織学的に検討するとともに、がん細胞の細胞外基質への接着性、運動性を併せて検索した。

9. がんの運動性・浸潤性と関与する新規アクチン結合性タンパク (アクチニン4) の同定

アクチン細胞骨格の調節は細胞の接着性や運動性に重要な役割を担い、がんの浸潤転移に直接関与すると予想される。がんの浸潤に関与する分子機構を明らかにすることを目的として、肺大細胞がん株をBalb/c mouseに免疫し、免疫組織化学的に浸潤性増殖を示すがんに対し特徴的に反応するモノクローナル抗体、NCC-Lu-632を作製した。その抗原分子のcDNAをhuman foreskin keratinocyteのlambda gt11 cDNA libraryから immunoscreening 法にて単離し、新しいアクチン結合分子の塩基配列を決定した。さらに confocal immunofluorescence microscopy にて培養細胞における抗原分子の細胞内局在を細胞の運動性と併せて検討した。また、実際のがんにおける本抗原の発現の状態を、乳がん83例で免疫組織染色を行い検索し、その発現状態と組織亜型や予後との関連を検討した。

10. 食道、頭頸部扁平上皮がんにおける laminin-5 γ 2 鎖及び Epidermal growth factor receptor (EGFR) の発現異常とその相互関係

当研究室で作製した laminin-5 γ 2 鎖に対するマウス単クローン抗体を用いて、1989年から1995年までに切除された舌扁平上皮がん67例における発現異常を免疫組織化学的に検討し、その臨床病理学的意義に関して検索した。口腔扁平上皮がん細胞株7株を用いて、Southern blotting 法により EGFR の遺伝子増幅を、また Western blotting 法により laminin-5 γ 2 鎖の発現を調べそれらの相関に関して検討した。また、上記の laminin-5 γ 2 鎖に

対するマウス単クローン抗体及び EGFR に対するマウス単クローン抗体(ZYMED 社製)を用いて、99例の進行食道がん切除材料におけるそれらの発現異常を免疫組織化学的に検討した。

11. 消化器がんの浸潤・転移に関わるアポトーシス関連分子の解析

Bcl-2 及び Bcl-2 結合蛋白 BAG-1 は、いずれもアポトーシスに対し抑制的に働くことが知られている。これらの遺伝子を過剰発現させることによってアポトーシスに対する感受性を低下させることにより、ヒト消化器がんの腹膜播種能にいかなる効果をもたらすかを検討した。ヒト分化型胃癌細胞株 MKN74 は、ヌードマウスにおいて腹膜播種することが知られている。この細胞は、Bcl-2 及び BAG-1 蛋白のいずれも低発現であることから、PcDNA3-bcl-2 もしくは PcDNA3-BAG-1 発現ベクターをリポフェクトアミンを用いてこの細胞に遺伝子導入した。ネオマイシンにより選択し Bcl-2 もしくは BAG-1 蛋白を過剰発現させた遺伝子導入株を作製した。これらの細胞株を用いて *in vitro* における細胞増殖能のみならずヌードマウス皮下における腫瘍形成能を検索した。さらに血清除去や足場喪失によるアポトーシスに対する抵抗性を検索した。腹膜播種能は、 10^6 個の細胞をヌードマウスの腹腔内に接種し、6週間後の腹腔内腫瘍の重量で比較検討した。細胞運動能の評価は、金コロイド及びトランスウェルアッセイを用いて行った。細胞内局在の解析は、FITC を用い confocal microscopy により行った。

12. がん浸潤・転移におけるヒアルロン酸の意義の解明

ヒアルロン酸合成酵素 HAS1 遺伝子のゲノム構造と転写調節領域の解析のため、マウス HAS1 cDNA をプローブとして、マウス ES 細胞由来ゲノムライブラリーをスクリーニングし、ゲノムクローンを得た。制限酵素マップを作製し、Sequencing と 5'-RACE により転写開始点と 5'上流領域の塩基配列を決定した。様々に悪性度の異なるがん組織より RNA サンプルを得て、3種類の HAS 遺伝子に特異的な Primer を用いて ABI PRISM 7700 Sequence Detector を用いたリアルタイム RT-PCR 法により、各 HAS 遺伝子の発現量(mRNA の絶対量)を定量した。また発現タンパク質を抗原として各 HAS に特異的な抗体を作製しているため、免疫組織化学による HAS タンパク質発現も検討した。さらにがん細胞の転移能などの形質と各 HAS 遺伝子の発現との関連を明らかにするため、正常細胞にがん遺伝子を導入してがん化させて、3種類の HAS 遺伝子発現とヒアルロン酸合成酵素活性の変化を解析した。

13. 子宮内膜がんにおける H1 型糖鎖の発現

ヒト子宮内膜がん由来培養株 SNG-II より MSN-1 抗体との反応性によって、MSN-1 認識抗原高発現亜株 (SNG-S) と低発現亜株 (SNG-W) を作成し、両亜株の糖鎖発現を免疫細胞化学的染色を用いて解析した。つぎに、*in vitro*での検討として、組織切片や血管内皮への接着能、マトリゲルを用いた *in vitro* invasion assay にて浸潤能をそれぞれ調べた。また、*in vivo*での検討としては、ヌードマウスに細胞を尾静注した際の肺転移の頻度を検討した。MSN-1 抗体はおもに Le^b型糖鎖を認識することが明らかになっているが、Le^b型糖鎖のどの部分を認識するかを検索した。

14. MMP 阻害剤による転移抑制

ヌードマウス可移植性ヒト胃癌株である3種の低分化腺がん培養株, TMK-1, MKN-45, HSC-43のそれぞれ 5×10^5 個, 10^6 個, 10^6 個/マウスを各群5匹の雄BALB/cヌードマウス5週齢に腹腔内播種した。腫瘍移植後1週間目と3週間目に、全身麻酔下に micro osmotic pump ALZET 2002® (ALZA 社製)2個あるいは3個を背側皮下に埋め込み, marimastat (18あるいは28 mg/kg/day) を計4週間持続的に皮下投与した。腫瘍移植から5週目にマウスを犠牲死させ、腹膜播種結節の重量および体重を測定した。

15. 大腸がんにおける COX-2 発現の意義

様々な肝転移能を有するヒト大腸がん細胞株8株 (HT29, SW1116, WiDr-M, WiDr-W, HCT-15, NCC-CO33, Colo201, Colo205) における COX-2 の発現を RT-PCR 法, Western blotting 法を用いて検討した。また, 232例の大腸がん切除標本における COX-2 の発現様式と個々の症例の背景因子との関連を免疫組織染色を用いて臨床病理学的に検討した。

(倫理面への配慮)

手術標本からの組織の採取にあたっては、患者の治療方針決定のための病理学的検索を切除後迅速かつ優先して行い、その残った組織を研究に用いることにより患者への不利益はないように行った。組織サンプルの由来する患者の臨床的情報のうち本研究に必要なものは、あらかじめカルテより調査しておき、研究の過程ではサンプルは無記名で番号でだけで扱い、患者の個人を特定していない。又、本研究の結果を組織を入手した患者の臨床に直接戻って解析することは行わないことにより、患

者のプライバシーは厳守されている。さらに手術にて摘出した標本を、診断のために検索した後に、残りの試料を医学の進歩を目的とした種々の研究に使わせていただくことに関しては、平成11年より、患者に説明の上、同意を得て実施している。動物実験に関しては、米国実験動物資源協会の「実験動物の管理と使用に関する指針」を遵守して行った。

C. 研究結果

1. がん浸潤・転移に関わる細胞接着分子と増殖因子受容体

c-erbB-2およびEGF増殖因子受容体チロシンキナーゼとカドヘリン細胞内結合分子である β カテニンの結合を遺伝子導入により阻害することにより、胃・大腸がん細胞培養細胞株の細胞接着が強固となり浸潤・転移能は抑制された。これらの分子の結合部位を明らかにする目的で、 β カテニンの多数の deletion mutants を作製し検索したところ、この増殖因子受容体には β カテニンのc-端側に存在する12番目のアルマジロ配列(42アミノ酸)を介して結合していることが明らかとなった。また、in vitro kinase assayにより、EGF、TGF α などの増殖因子の刺激で、結合部位である12番目のアルマジロ反復配列がリン酸化されることを示した。 β カテニンと増殖因子受容体との結合を阻害する目的で、12番目のアルマジロ配列のcDNAをヒト低分化胃癌培養細胞株TMK-1に遺伝子導入すると、細胞間の接着は強固になり、上皮様の形態を形成することが示され、同部位が増殖因子受容体との結合とそのシグナル伝達に重要な部位であることを示した。

2. 大腸がんにおける Wnt シグナル伝達系の変化

ヒト大腸がん原発巣においては細胞膜の β カテニン発現の減弱、細胞質および核の β カテニン蓄積をそれぞれ69.8%、67.7%、65.6%に認め、また β カテニンは腫瘍の辺縁部で細胞質・核に蓄積する傾向が認められた。細胞質の β カテニン蓄積は血行性転移 ($P=0.005$)、腫瘍の壁深達度 ($P=0.004$)、静脈浸潤 ($P=0.049$)、focal dedifferentiation ($P=0.0001$) と有意に相関した。多変量解析の結果、細胞質内の β カテニン蓄積 (hazard 比 = 8.94, $P=0.054$) とリンパ節転移 (hazard 比 = 4.97, $P=0.061$) が血行性転移に対する独立した予知因子であることが示された。ヒト大腸がん培養細胞では APC 遺伝子産物の長さ β カテニンの細胞内蓄積量との間に逆相関が認められた ($r=-0.582$, $P=0.0025$)。これらの細胞株を SCID マウスの皮下に移植した腫瘍で β カテニンの発現を調べた結果、7株においてヒト大腸がん組織と同様に β カテニンの組織内分布の部位差を認めた。

3. 子宮内膜がんにおける β カテニン遺伝子変化

培養細胞株及び臨床材料双方において β カテニン遺伝子変異が確認された。臨床材料76例に関して exon3 の遺伝子変異を解析した結果76例中10例に変異を認めた。また、抗 β カテニンモノクローナル抗体を用いた免疫染色を行った結果、76例中29例(38%)に β カテニンの蓄積に起因すると考えられる染色性の増強が認められ、特に高分化型においては40例中19例(47.5%)と高率に認められた。遺伝子変異が認められた症例では有意に β カテニン染色性の増強が認められたが、同時に遺

伝子変異を伴わずに染色性が増強している症例が20例(26%)認められた。

4. β カテニン/TCF 4 転写複合体の標的遺伝子の検索

β カテニンと TCF4 の複合体形成により転写の活性化が起こる標的遺伝子を同定した。この遺伝子転写調節領域には複数の TCF 4 / β カテニン転写複合体への応答部位を認めた。DLD-1 細胞は、dominant-negative TCF4 の誘導により、軟寒天中でのコロニーが小型化し、単層培養下での pile up が抑制されることを見出した。

5. N 末を欠いた β カテニンに結合する分子の単離

2×10^6 クローンをスクリーニングした結果、4つの陽性クローンを得た。そのうちわけは、がん抑制遺伝子産物 APC、新規 cadherin family 分子、細胞骨格関連分子、新規分子であった。そのうち細胞骨格関連分子について、更に検討を進めた。Tag を用いた免疫沈降と Western blot により、細胞内での β カテニンとの結合を確認した。

6. 若年性胃がんにおける Eカドヘリン遺伝子変異

PCR-SSCP 法により6/9例(67%)に Eカドヘリン遺伝子の体細胞性遺伝子変異を認めた。PCR-SSCP 法で Eカドヘリン遺伝子の体細胞性遺伝子変異が検出されなかった3例のうち1例は、第9エキソン欠失 Eカドヘリンを認識する抗体ががん細胞のみ陽性に反応し、非がん細胞は反応していなかった。このことから、この症例については Eカドヘリン遺伝子の体細胞性遺伝子変異があるものとして捉えた。し

たがって、若年発症の胃がんの 7/9 例 (78%) に E カドヘリン遺伝子の体細胞性遺伝子変異が確認された。 β カテニンの第 3 エキソンには何れの症例も遺伝子変異が認められなかった。 β カテニンの免疫組織化学的染色により、6/9 例ではがん細胞は細胞膜ならびに細胞質が染色された。これに対し、残りの 3 例のうち 1 例では、がん細胞の染色性が全く認められなかった。したがって、若年発症の胃がんの 7/9 例 (78%) は β カテニンが細胞内において異常な分布を示していた。これらをまとめると、若年発症の胃がん 9 例全例において E カドヘリン細胞接着系の破綻を確認した。また、若年発症の胃がんの 6/9 例 (67%) では、その背景粘膜に Hp の感染が検出された。

7. 新規転移関連遺伝子 Dysadherin の機能解析

Dysadherin cDNA は 872bp でアミノ酸は 178 個で膜貫通型の蛋白であることがわかった。また、細胞外領域はセリン、スレオニンの豊富な部位が存在することから、糖鎖修飾が推定された。実際、Western blot の結果では分子量 50 K d を示し、cDNA から推定された分子量とは違っていった。細胞内領域は 17 個のアミノ酸で構成され疎水性のアミノ酸を多く含んでいた。モノクローナル抗体 NCC-3G10 の反応性から、Dysadherin の発現は、正常組織ではリンパ球、扁平上皮の基底細胞、がん組織では大腸がん 76%、乳がん 60%、膀胱がん 100%、肺扁平上皮がん 56%、食道がん 82% で陽性ないし強陽性を示した。また、Stage II 乳がん症例において NCC-3G10 陽性群は陰性群に比して有意に予後が悪いことが示された。

この蛋白の機能解析のために L3cDNA を PLC/PRF/5 ヘトランスフェクション

し、安定して発現する細胞をクローニングした (AL3-1,6,7)。AL3-1,6,7 細胞はベクターのみトランスフェクションした細胞、親株と比較し、E カドヘリン蛋白の発現量及び機能が著しく低下していた。一方、mRNA レベルの減少は認められなかった。電子顕微鏡的観察では、AL3-1,6,7 細胞は細胞間及び細胞表面に不規則で無数の microvilli が豊富に認められ、細胞間接着装置の消失を認めた。Dysadherin 分子は細胞膜表面に局在してみられた。SCID マウスを用いた転移の実験では、AL3-1,6,7 は、SCID マウス肝臓への転移形成が何れもコントロールに比して数的に著増していた。

Dysadherin 遺伝子導入 NIH-3T3 細胞、各種培養細胞株において、細胞の小突起部分に一致して、Dysadherin とアクチンの共存を認めた。NCC-3G10 をコートした latex beads を用いた検討では、latex beads の付着部位に一致して Dysadherin と actin 線維の濃縮が 2 種の細胞で観察された。また、コントロールの牛アルブミンコート latex beads ではこれら蛋白の濃縮は起こらなかった。membrane 上の Dysadherin の細胞内領域に対する GST 融合タンパクの overlay assay では、主に 120 K D 付近に強いバンドとして認められたが、他にも幾つかのバンドが認められた。更に、細胞を用いた overlay assay では、細胞膜、細胞の小突起に一致して陽性像が認められ、コントロールの GST 蛋白では認められなかった。

8. 細胞・基質接着分子インテグリン β 4 とがん浸潤・転移機構

胃がん細胞株 10 株を対象に SCID マウスを用いて腹腔内注入によるがん細胞の腹膜播種性転移を評価し、インテグリンの

発現と腹膜播種能との関連について検討し、インテグリン $\beta 4$ の発現量と腹膜播種結節数が逆相関することを明らかにした。さらに、インテグリン $\beta 4$ の発現が極めて低い腹膜播種性の低分化胃がん細胞株にインテグリン $\beta 4$ 全長を導入し、導入株の腹膜播種能を評価したところ、 $\beta 4$ 高発現株で著明に抑制され、一部に形成された腹腔内結節にはインテグリン $\beta 4$ の発現の強い部分でアポトーシスが認められた。また、インテグリン $\beta 4$ 高発現株では腹膜の基底膜構成分子であるラミニンと腹水中に存在する増殖因子の刺激により増殖抑制およびアポトーシスが誘導されることを確認した。漿膜浸潤を伴う胃がん症例 120 例を用いた免疫組織化学的検討では、インテグリン $\beta 4$ 高発現群で腹膜播種再発までの期間は低発現群よりも長く、予後が良好であった。

膀胱がん細胞の上皮内進展機構を明らかにする目的で、ヒト膀胱がん細胞 6 株を SCID マウス腎盂、膀胱に移植しがん細胞の上皮内進展の動物モデルを作製した。腎盂、膀胱において上皮内進展を示した 3 株は、ラミニン上でコロニーをつくらず強く分散するだけでなく、ラミニンに対する高い接着能、遊走能、運動能を有しており、またインテグリン $\beta 4$ の発現が著明に低下していた。インテグリン $\beta 4$ を遺伝子導入すると、ラミニン上での接着能、遊走能は変わらないが運動能が低下し、マウス腎盂での上皮内進展が抑制された。実際のヒト膀胱がん手術材料の免疫組織化学的検討により、膀胱上皮内がんにおいてインテグリン $\beta 4$ の発現低下が確認され、 $\beta 4$ の発現低下とそれに基づくラミニン上での運動能の亢進が実際のヒト膀胱がんの上皮内進展にも関与していると考えられた。

9. がんの運動性・浸潤性に関与する新規アクチン結合性タンパク (アクチニン 4) の同定

遺伝子配列を明らかにしたところ抗原分子は既知の non-muscle alpha-アクチニン(アクチニン 1)と高い相同性を示す新規の分子であることが分かり、この分子をアクチニン 4 と名付けた。アクチニン 4 は細胞運動性の昂進した細胞の先進部や細胞が進展したところに濃縮し、既知のアクチニン 1 が focal adhesion plaque や adherence junction に局在するのに対し、その局在は明らかに異なっていた。また免疫細胞化学染色によるとアクチニン 4 は phosphatidylinositol 3 kinase の阻害剤であるワルトマニーやアクチン線維の重合を阻害するサイトカラシン D にて、その細胞内局在が細胞質から核に移行した。手術的に摘出した乳がん 83 症例の免疫染色ではアクチニン 4 の細胞内局在はその局在の部位より nuclear type、combined type、cytoplasmic type に分類でき、cytoplasmic type が nuclear type に比べて病理組織学的により浸潤性増殖を示す症例が多く、また、臨床病期 I、II 期の症例では、cytoplasmic type の方が、nuclear type や combined type に比べて統計学的に有意差をもって予後が悪かった。

10. 食道、頭頸部扁平上皮がんにおける laminin-5 $\gamma 2$ 鎖及び Epidermal growth factor receptor(EGFR)の発現異常とその相互関係

舌扁平上皮がんにおける laminin-5 $\gamma 2$ 鎖の発現は、腫瘍細胞の細胞質に明瞭に認められた。発現異常のパターンは特徴的で、type A (陽性細胞がほとんど見られない症例) 6 例 (9%)、type B (腫瘍胞巣の一部にのみ陽性所見が見られる症例) 31 例

(46%)、type C (腫瘍胞巣を縁取るように陽性所見が見られる症例) 19例 (28%)、type D (ほとんどの腫瘍細胞に陽性所見が見られる症例) 11例 (16%)に分類できた。陽性細胞の個数は、type A, B, C, Dの順に有意に増加した。その結果、laminin-5 γ 2鎖の発現の亢進している症例は、有意に分化度が低く、浸潤性増殖の強い腫瘍であることがわかった($p < 0.05$)。また、単変量及び多変量解析による検討で、laminin-5 γ 2鎖の発現の亢進している症例は、有意に予後不良であることがわかった($p = 0.0003$)。

扁平上皮がん細胞株を用いた検討では、EGFRの遺伝子増幅の程度とlaminin-5 γ 2鎖の発現には相関が認められた。また、99例の進行食道がん切除材料を用いた免疫組織化学的検討では、laminin-5 γ 2鎖の発現の亢進している症例は有意にEGFRの発現も亢進しており($p < 0.0005$)、小胞巣あるいは索状に配列する低分化な腫瘍に両分子の強い発現が見られた。

11. 消化器がんの浸潤・転移に関わるアポトーシス関連分子の解析

各トランスフェクタント間において、*in vitro*における細胞増殖に有意差を認めず、ヌードマウスにおける皮下腫瘍の増殖能においても有意差を認めなかった。しかし、Bcl-2及びBAG-1の過剰発現したトランスフェクタントは、血清除去によるアポトーシスに対して有意に抵抗性を示した。これらの細胞株を腹腔内接種し、その後の腫瘍形成能を検索するとBcl-2およびBAG-1を過剰発現させた細胞株の腹腔内播種は、Mockトランスフェクタントを接種したコントロール群に比し有意に増強されていることが判明した。腹腔内に形成された腫瘍を病理学的に検索すると、中な

いし高分化型胃がん細胞が充実性に浸潤していることが判明した。したがって、腫瘍の総重量によって、各群の腹膜播種能を比較できるものと判断した。Bcl-2及びBAG-1過剰発現株のヌードマウス接種群は、コントロール群に比し3-4倍も腫瘍の総重量が増大していることが判明した。MKN74は、浮遊培養では2日以内にほとんど死滅する細胞であるのに対し、Bcl-2及びBAG-1を過剰発現させた遺伝子導入株は、浮遊培養においても有意に生存していることを明らかにしたことから、腹膜播種亢進の機序としてアノイキス(足場の喪失によるアポトーシス)に対する抵抗性に関わるものと推測された。次に、BAG-1を過剰発現させた遺伝子導入細胞株MKN74の細胞運動能を検索した。BAG-1は、Bcl-2と結合するのみならずhsp/hsc 70蛋白と結合し、シャペロン機能を調節していることが判明している。このことは、BAG-1が、アポトーシス以外にも様々な機能を有していることを示唆している。BAG-1を過剰発現させたMKN74細胞は、他の遺伝子導入細胞株と比して明らかに運動能が亢進しており、さらにBAG-1がケラチンやアクチンなどの細胞骨格蛋白と共存していることを見出した。

12. がん浸潤・転移におけるヒアルロン酸の意義の解明

HAS1遺伝子のゲノム構造と転写調節領域を解析した結果、HAS1ゲノム遺伝子が全長約11 kbにわたって5個のエクソンによって構成されていることが明らかとなった。また転写開始点から1 kb上流までの領域に、様々な既知の転写調節モチーフの存在が明らかとなった。その中にがん抑制遺伝子として知られているIRF-1やIRF-2そしてp53のモチーフが含まれて

いることから、HAS1 遺伝子の発現と細胞のがん化・悪性化との関連が示唆された。近年、HAS1に加えてさらに2種の異なるヒアルロン酸合成酵素(HAS2、3)遺伝子が同定され、それらの発現に組織や発生段階的な特異性があることも分かった。大腸がん約30症例についてリアルタイム RT-PCR法を用いて、3種類のHAS遺伝子(HAS1, 2, 3)の発現(mRNA絶対量)を検討し、HAS1発現についてはリンパ節への転移性との間に有意な相関を認めしたが、HAS2とHAS3の発現は、がん組織で上昇を示したものの、浸潤性、転移性との有意な相関が見られなかった。さらに特異抗体染色によってもこの結果を確認した。SrcまたはRasでトランスフォームしたラット3Y1細胞は、前者では3種類のHASの、後者ではHAS2の特異な発現上昇が認められた。これらの細胞と、さらにアンチセンスHAS2遺伝子を導入した細胞について、ラットにおける腫瘍形成と浸潤性を検討した。アンチセンスHAS2遺伝子導入により、ヒアルロン酸合成の低下とともに腫瘍は明らかに散在性の性質を失い増殖は抑制され、HAS2によるヒアルロン酸合成の腫瘍増殖と細胞形態における役割が示唆された。

13. 子宮内膜がんにおけるH1型糖鎖の発現

SNG-SはLe^b型糖鎖を強く発現するのに対し、SNG-WはH1型糖鎖を強く発現することが判明した。in vitroの検討にて、SNG-W細胞はSNG-Sに比べ組織接着能、血管内皮細胞への接着が高く、またマトリゲルへの浸潤能も亢進していた。SNG-Wの血管内皮への接着は、抗H1型糖鎖抗体によって阻害されたが、他の血液型関連糖鎖に対する抗体処理では、接着阻害は見られなかった。in vivoの検討にて、SNG-WはSNG-Sに比べ尾静注した際の肺転移の頻度は高率であった。MSN-1抗体はLe^b

のほかにLe^y型糖鎖も認識することが判明した。このことから、MSN-1の抗原決定基はLe^bとLe^yに共通する部分で、糖鎖非還元末端の α 1,2結合したフコースを含む部分であることが明らかになった。

14. MMP阻害剤による転移抑制

TMK-1に対するMarimastat 28 mg/kg/day投与群において対象群の平均結節重量は 1.61 ± 0.35 gに対し治療群の平均結節重量は 0.17 ± 0.18 gであり、18 mg/kg/day投与群において対象群の平均結節重量は 2.18 ± 0.57 gに対し治療群の平均結節重量は 0.80 ± 0.68 gであった。MKN-45では対象群の平均結節重量は 1.26 ± 0.32 gであり、治療群の平均結節重量は 0.42 ± 0.14 gであった。HSC-43では対象群の平均結節重量は 5.68 ± 2.39 gであり、治療群の平均結節重量は 2.33 ± 1.70 gであった。TMK-1, MKN-45両者とも推計学的有意差($p < 0.01$)をもって腹膜播種抑制効果を示した。さらに、TMK-1では腹膜播種を投与量依存的に抑制した。またこの抑制効果はHSC-43に対しては軽度であった。実験中にマウスの死亡は観察されず、推計学的に有意なマウスの体重減少も認められなかった。

15. 大腸がんにおけるCOX-2発現の意義

肝転移能を有するヒト大腸がん細胞株6株(HT29, SW1116, WiDr-M, WiDr-W, HCT-15, NCC-CO33)ではCOX-2のmRNAおよび蛋白の発現が認められたが、非肝転移性株2株(Colo201, Colo205)では、COX-2の発現は認められなかった。大腸がん組織におけるCOX-2の発現は71.6%(166/232)に認められ、肝転移、腫瘍径、組織型、深達度および病期と有意に相関し、多変量解析の結果、原発巣におけ

る COX-2 の発現は独立した肝転移の危険因子であり、さらに予後にも有意な相関を示した。

D. 考察

1. がん浸潤・転移に関わる細胞接着分子と増殖因子受容体

カドヘリン細胞内結合分子である β カテニンは、c-erbB-2 および EGF 受容体と結合し、増殖因子の刺激により、細胞間接着の調節を果たしていることが示された。

2. 大腸がんにおける Wnt シグナル伝達系の変化

β カテニンの細胞内発現は APC 遺伝子もしくは β カテニン遺伝子の第 3 エクソン内の突然変異により調節されていると考えられており、多くのヒト大腸がんにはいずれかの突然変異があることが示されている。大腸がん細胞株でも APC 遺伝子の変異位置と β カテニンの細胞内発現量は良い相関を示し、これを裏付けている。しかしこれらの遺伝子変異は大腸がん発がんの比較的初期に関与するとされているにもかかわらず、ヒト大腸がん原発巣内における β カテニンの組織内分布は一定しておらず、また大腸がん細胞株を SCID マウス皮下に移植した腫瘍においても同様であった。以上より細胞内 β カテニンの発現量は原則的にこれら遺伝子変異の部位により規定されているものと考えられるが、さらにこれら遺伝子変異以外の機構、おそらく間質からの増殖因子刺激により β カテニン発現量が修飾されていると考えられた。その機序のいかんにかかわらず β カテニンの細胞内蓄積は腫瘍の浸潤転移に深く関与すると考えられ、 β カテニンの標的遺伝子の解明ががんの浸潤転移機構を解明する鍵となる可能性が示唆され

た。

3. 子宮内膜がんにおける β カテニン遺伝子変化

培養細胞株及び臨床材料双方において β カテニン遺伝子変異が確認された。いずれも β カテニン 蛋白分解に関与する GSK-3 β リン酸化標的部位の変異であり、この部位の変異によって β カテニンの分解が妨げられることが予想された。実際遺伝子変異が認められた症例では有意に β カテニン染色性の増強が認められたが、同時に遺伝子変異を伴わずに染色性が増強している症例が 20 例 (26%) 認められたことから、 β カテニン遺伝子変異に起因しない β カテニン signaling pathway の活性化も示唆され、さらに検索を要すると考えられた。何れにせよ子宮内膜がんの形成過程において β カテニン signaling pathway の活性化が重要な意味を持つことが示唆された。

4. β カテニン/TCF 4 転写複合体の標的遺伝子の検索

がん抑制遺伝子 APC の変異は大腸発がんのもっとも初期におこる遺伝子変化である。APC あるいは β カテニンの変異は散发性大腸がんおよび大腸腺腫のほとんどで見られ β カテニンと TCF4 の複合体形成による標的遺伝子群の転写の活性化が発がんに関わっているものと考えられている。DLD1 細胞で得られた知見も、このことを示すものと考えられる。本研究の成果は大腸発がん機構の解明に役立つのみならず、標的遺伝子の発現抑制あるいは機能抑制によって大腸腺腫形成を抑制し、特に外科的切除を行わなければ確実に発がんに至る家族性大腸腺腫症患者や大腸がんの高危険群での発症予防等への臨床応

用が期待できる。

5. N末を欠いた β カテニンに結合する分子の単離

β カテニンは大腸がん、子宮内膜がん、肝がんなど複数の腫瘍で遺伝子異常が報告されており、その機能の解明はがんの発生あるいは悪性化の機構の理解に重要と考えられる。既に、N末を欠いた β カテニンが胃がん並びに大腸がん細胞株の形態変化と腹膜播種の抑制を来すことを報告しており、その機構の解明の為に結合分子の単離を試みた。今回のスクリーニングでは既に β カテニンに結合することが知られている APC 並びに cadherin family も単離されたことから、新しく単離した分子群も β カテニンに結合している可能性が高いと推測された。実際そのうちの1つは、免疫沈降法により細胞内でも結合していることが確認された。この分子は、細胞骨格と膜分子を繋ぐ分子であり、膜突起部に局在していることが報告されている。 β カテニンも、細胞運動時あるいは接着初期には膜突起部に局在することが知られており、今回単離された分子を含めた複合体を形成している可能性が考えられた。また APC も膜突起部に局在し、細胞形態あるいは運動の調節に関与しているとの報告もあり、これらの複合体がどのようにがん細胞の浸潤転移の際に見られる細胞形態変化あるいは運動性亢進に関与しているかについて今後更に研究を進めていく予定である。

6. 若年性胃がんにおける Eカドヘリン遺伝子変異

Diffuse type が多い家族性胃がん患者のなかに、Eカドヘリン遺伝子の胚細胞性遺伝子変異があることが最近報告されて

きた。したがって diffuse type が多くみられる若年発症の胃がんでも同様な変化が見られるか明らかにする目的で検討を行った。結果的には若年発症の胃がんの78%にEカドヘリンの体細胞性遺伝子変異を確認した。また背景粘膜には高率に Hp 感染がみられた。これは同年代の control に比べ高いものであった。Eカドヘリンおよび β カテニン以外の遺伝子異常による遺伝的素因の関与を否定しきれないが、今回の検討より、若年発症の胃がんの発生には遺伝的素因よりもむしろ Hp 感染を含む環境要因の関与が強いものと考えられた。

7. 新規転移関連遺伝子 Dysadherin の同定と機能解析

NCC-3G10 抗体の認識する抗原をクローニングし、新規の 50Kd の蛋白であることが明らかになり、その分子の機能から Dysadherin と命名した。トランスフェクタントの解析から Dysadherin の導入により、Eカドヘリンが蛋白レベルで可溶分画、不溶分画ともに低下し、細胞接着能が低下する事が示された。一方、mRNA レベルには変化がなかったことから、post-translational な変化であることが推定された。Eカドヘリンの発現、機能低下ががん細胞の転移浸潤に関わっていることを報告してきたが、今回の SCID マウスの転移の実験での結果も Eカドヘリンの低下とよく相関していた。がん細胞における Eカドヘリン不活化の新たな機構として、Dysadherin の発現亢進の関与が示された。

蛍光抗体法にて Dysadherin とアクチンの共存を認め、また latex beads に抗体をコートした解析では、latex beads の付着部位に一致して Dysadherin とアクチン線維の濃縮が観察された。これらの所見は Dysadherin がアクチンと直接あるいは間

接的に相互作用していることが示唆される。さらに蛋白-蛋白相互作用の解析のために、Dysadherin の細胞内領域に対する GST 融合タンパクを作製し membrane 及び細胞上で Overlay assay を行い他の蛋白との結合の有無を調べた。細胞を用いた overlay assay では、NCC-3G10 染色に類似した結合が認められた。また、membrane 上でも 120kD 他複数のバンドが認められたことから Dysadherin 分子の細胞内領域と結合するタンパクの存在が強く示唆された。今後、これら結合タンパクを同定するために、two-hybrid 法なども併用して細胞接着系の不活化の機序を明らかにする。

8. 細胞・基質接着分子インテグリン β 4 とがん浸潤・転移機構

上皮細胞と基質間の接着分子であるインテグリン β 4 ががん細胞の腹膜播種に対し抑制的に働く因子であることが初めて示され、その機序はラミニンとの結合と増殖因子刺激のシグナル伝達によりアポトーシスを引き起こすことによると考えられた。これらの結果は、より上皮様がん包巣を形成する分化型胃がん腹膜播種の頻度が少ない臨床像とよく一致する。また、膀胱がんの上皮内進展機構がインテグリン β 4 の発現低下により制御されている可能性が強く示され、がん基質間接着分子が浸潤・転移の諸段階に重要な役割を果たしていることが示された。

9. がんの運動性・浸潤性と関与する新規アクチン結合性タンパク (アクチニン 4) の同定

細胞運動性に関与するアクチン細胞骨格と結合すること、および immunofluorescence microscopy でアク

チン線維と共通して存在すること、また細胞運動性の亢進した細胞に良く濃縮することより、アクチニン 4 はがん細胞の運動性に深く関わる分子であると考えられた。アクチニン 4 はがん細胞株、がん組織ともに核に局在するものがあり、条件によって核に移行する分子であることが示された。アクチニン 4 は細胞質ではアクチン細胞骨格と結合し、その機能を制御することが推察されたが、核での機能に関しては不明である。アクチニン 4 はがん細胞の細胞運動性とがんの浸潤性増殖に関与し、その細胞内局在は、乳がんを含む種々のがんの転移再発を予知する新たな腫瘍マーカーになる可能性が示唆された。

10. 食道、頭頸部扁平上皮がんにおける laminin-5 γ 2 鎖及び Epidermal growth factor receptor(EGFR)の発現異常とその相互関係

頭頸部、食道の扁平上皮がんにおいては、EGFR の遺伝子増幅あるいは発現亢進は予後不良因子として知られているが、その理由として EGFR の遺伝子増幅により EGFR からのシグナルが増加し、細胞の増殖能が上がるだけでなく、laminin-5 γ 2 鎖の発現が亢進することによってがん細胞の浸潤能が亢進することも予後不良の原因となっていると考えられた。

11. 消化器がんの浸潤・転移に関わるアポトーシス関連分子の解析

アポトーシスの抑制によってヒト胃がん細胞の腹膜播種能が亢進することが明らかとなった。既にアポトーシスを抑制することによりマウスメラノーマ高肺転移株 B16-BL6 の転移能が有意に亢進することを明らかにしてきており、これらの研究成果から、アポトーシスの抑制は、様々

ながん細胞においてがんの浸潤・転移などの進展様式に密接に関わることが明らかになった。足場喪失や増殖因子の欠乏、さらに細胞間相互作用の欠落などから誘導されるアポトーシスは、がんの進展プロセスにおける様々なステップで関与していることが推察される。したがって、本研究の成果から、転移を抑制する新しい治療法を開発するというアプローチの際に、アポトーシスに対する感受性を制御することは極めて重要な課題となるという新しい知見が得られたものと思われる。また、anti-apoptotic molecule の代表である BAG-1 を過剰発現させる研究から、BAG-1 の新しい機能、すなわち細胞運動能の亢進に寄与することを見出してきた。これらのことからがんの進展を考える際には、アポトーシスに対する抵抗性ととともに、BAG-1 による浸潤能の亢進も重要な要素であることを示し得た。

12. がん浸潤・転移におけるヒアルロン酸の意義の解明

本研究において HAS には異なる遺伝子由来する 3 種類が存在することを明らかにしてきたが、ヒト大腸がんについて、これら 3 種類の発現を real time RT-PCR 法と特異抗体で検討し、HAS のがん組織での発現とリンパ節転移群における HAS1 の有意な発現上昇を明らかにした。3 種類の HAS の一次構造と各活性との詳細な比較研究により、各々の異なる特性（酵素の安定性、比活性、HA 糖鎖長）を持ち、生化学的細胞生物学的性質の異なるヒアルロン酸マトリックス形成に関与することを示した。HAS1 発現は、おそらくリンパ節への転移性に有利なヒアルロン酸マトリックスの形成に関与するものと推定された。今後、遺伝子操作によるアミノ酸置

換により 3 種類の HAS 間の相違を規定している部位を特定し、HAS1 によるマトリックスが転移性に特異に関与する機構を明らかにして、広範な機能をもつヒアルロン酸の転移性に関連する性質の特異な抑制を目指したい。さらに、宿主側ヒアルロン酸合成の関与を、作製に成功した HAS 遺伝子ノックアウトマウスにおける実験転移がんのレスポンスの相違を解析して、患者自身のヒアルロン酸合成能の相違点に注目したモデル実験系としての利用を考えている。

13. 子宮内膜がんにおける H1 型糖鎖の発現

子宮内膜がん細胞では H1 型糖鎖の発現の多寡が組織接着能・転移能と関連を有し、H1 型糖鎖を高発現する細胞は、組織接着能や転移能が高い可能性が示唆された。

14. MMP 阻害剤による転移抑制

腹膜播種結節の形成には基底膜の分解や細胞外マトリックスの分解が必要であり、マトリックス分解酵素(MMP)が不可欠である。したがって Marimastat はがん細胞や周囲の細胞が産生する MMP を抑制することによって腹膜播種の形成を抑制したと考えられる。

15. 大腸癌における COX-2 発現の意義

大腸癌の原発巣における COX-2 の発現は肝転移さらには予後を予測するマーカーとして有用であることが示唆された。

E. 結論

本研究は、実際の臨床がんにおける浸潤・転移、そしてそれを良く模倣する *in vivo*、*in vitro* モデルを対象に最新の分子細胞生物学的手法を用いて解析し、転移・

浸潤能の正確な診断を可能とし個々の症例に現時点における最適の治療法を選択可能とすると同時に、今後の新たな治療法開発のための治療標的を明らかにしようとするものである。第二期では、がん細胞間接着分子と増殖因子受容体の相互作用の解析、大腸がんにおける Wnt シグナル伝達系の変化の解析、子宮内膜がんにおける β カテニン遺伝子変化の検索、 β カテニン/TCF 4 転写複合体の標的遺伝子の検索、N 末を欠いた β カテニンに結合する分子の単離、若年性胃がんにおける E カドヘリン遺伝子変異の検索、新規転移関連遺伝子 Dysadherin の同定と機能解析、インテグリンの発現と浸潤転移能の関連の解析、新規アクチン結合性タンパク (アクチニン 4) の同定、頭頸部扁平上皮がんにおける laminin-5 γ 2 鎖及び Epidermal growth factor receptor (EGFR) の発現異常とその相互関係の検討、胃がんにおけるアポトーシス関連分子の機能解析、ヒアルロン酸合成酵素遺伝子の単離と大腸がんにおける発現の解析、子宮内膜がんにおける H1 型糖鎖の発現の解析、大腸がんにおける COX-2 発現の解析などを行い、動物実験モデルや実際の臨床がんにおいて、これら分子の浸潤・転移への関与を明らかにした。今後、分子・細胞レベルでの変化とがん浸潤・転移性増殖の臨床像との対応を直接明らかにするとともに、新しいがん治療の標的になると考えられるがん浸潤・転移に関わるこれらの分子機構の研究を重点的に行う予定である。

F. 研究発表

論文発表

1) Sun, L., Hirohashi, S., et al., Increased DNA methyltransferase expression is associated with an early

stage of human hepatocarcinogenesis. *Jpn. J. Cancer Res.*, 88(12): 1165-1170, 1997.

2) Kanai, Y., Hirohashi, S., et al., The E-cadherin gene is silenced by CpG methylation in human hepatocellular carcinomas. *Int. J. Cancer*, 71: 355-359, 1997.

3) Hui, A-M, Hirohashi, S., et al., Reduced p21^{WAF1/CIP1} expression and p53 mutation in hepatocellular carcinomas. *Hepatology*, 5(3): 575-579, 1997.

4) Noguchi, M., Hirohashi, S., et al., Modified formalin and methanol fixation methods for molecular biological and morphological analyses. *Path. Int.*, 47(10): 685-691, 1997.

5) Tsuda, H., Hirohashi, S., et al., Detection of numerical and structural alterations and fusion of chromosomes 16 and 1 in low-grade papillary breast carcinoma by fluorescence *in situ* hybridization. *Am. J. Pathol.*, 151(4): 1027-1034, 1997.

6) Yamada, T., Hirohashi, S., et al., Identification of semaphorin E as a non-MDR drug-resistance gene of human cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94(26): 14713-14718, 1997.

7) Eguchi, K., Hirohashi, S., et al., DNA hypermethylation at the *D17S5* locus in non-small cell lung cancers: its association with smoking history. *Cancer Res.*, 57(21): 4913-4915, 1997.

8) Iwaya, K., Hirohashi, S., et al., Immunoreaction at 43 kDa with anti-ubiquitin antibody in breast neoplasms. *Jpn. J. Cancer Res.*, 88(3): 273-280, 1997.

9) Nakanishi, Y., Hirohashi, S., et al., Expression of E-cadherin, α -catenin, β -catenin and plakoglobin in

- esophageal carcinomas and its prognostic significance. *Oncology*, 54: 158-165, 1997.
- 10) Shibata, T., Hirohashi, S., et al., Identification of human cadherin-14, a novel neurally specific type II cadherin, by protein interaction cloning. *J. Biol. Chem.*, 272(8): 5236-5240, 1997.
- 11) Osada, T., Hirohashi, S., et al., Increased ubiquitin immunoreactivity in hepatocellular carcinomas and precancerous lesions of the liver. *Hepatology*, 26: 1266-1273, 1997.
- 12) Adachi, M., Imai, K., et al., Interleukin-2 induces tyrosine phosphorylation of SHP-2 through IL-2 receptor β chain. *Oncogene*, 14: 1629-1633, 1997.
- 13) Adachi, T., Imai, K., et al., Increased sensitivity of gastric cancer cells to natural killer and lymphokine-activated killer cells by antisense suppression of *N*-acetylgalactosaminyltransferase. *J. Immunol.*, 159: 2645-2651, 1997.
- 14) Yamamoto, H., Imai, K., et al., Relation of enhanced secretion of active matrix metalloproteinases with tumor spread in human hematocellular carcinoma. *Gastroenterology*, 112: 1290-1296, 1997.
- 15) Kobayashi, Y., Nozawa, S., et al., Flow cytometric analysis of cell surface antigen recognized by monoclonal antibody (MSN-1) in normal, hyperplasia, and carcinoma of endometrial cells: its diagnostic value for endometrial carcinoma. *Cytometry (Commun. Clin. Cyt.)*, 30: 23-27, 1997.
- 16) Ma, J., Nozawa, S., et al., Expression of human β 1,4-galactosyltransferase in gynecological cancer cell lines. *Int. J. Oncol.*, 11: 117-122, 1997.
- 17) Yoshiki, J., Nozawa, S., et al., High expression of uridine diphosphate-galactose: Lc3Cer β 1-3 Galactosyltransferase in human uterine endometrial cancer-derived cells as measured by enzymeliked immunosorbent assay and thin-layer chromatography-immunostaining. *Jpn. J. Cancer Res.*, 88: 669-677, 1997.
- 18) Lin, B., Nozawa, S., et al., Alteration of acidic lipids in human sera during the course of pregnancy: characteristic increase in the concentration of cholesterol sulfate. *J. Chromatography B*, 704: 99-104, 1997.
- 19) Spicer, A.P., Kimata, K., et al., Chromosomal localization of the human and mouse hyaluronan synthase genes. *Genomics*, 41: 493-497, 1997.
- 20) Karasawa, K., Kimata, K., et al., Inhibition of experimental metastasis and cell adhesion of murine melanoma cells by chondroitin sulfate-derivatized lipid, a neoproteoglycan with anti-cell adhesion activity. *Clin. Exp. Metastasis*, 15: 83-93, 1997.
- 21) 高木秀和, 木全弘治 II. 細胞外マトリックスとの接着 - 3 抗-細胞接着活性をもつ細胞外マトリックス. *細胞工学*, 16: 850-856, 1997.
- 22) 板野直樹, 木全弘治 4 転移における細胞外マトリックスの役割. *BIO Clinica*, 12: 601-606, 1997.
- 23) Inomata, M., Hirohashi, S., et al., Macroscopic features at the deepest site of tumor penetration predicting liver metastases of colorectal cancer. *Jpn. J. Clin. Oncol.*, 28(2): 123-128, 1998.
- 24) Honda, K., Hirohashi, S., et al., Actinin-4, a novel actin-bundling

protein associated with cell motility and cancer invasion. *J. Cell Biol.*, 140(6): 1383-1393, 1998.

25) Shimoyama, Y., Kitajima, M., Hirohashi, S., et al., Molecular cloning and characterization of a novel human classic cadherin homologous with mouse muscle cadherin. *J. Biol. Chem.*, 273(16): 10011-10018, 1998.

26) Kumamoto, K., Hirohashi, S., et al., Specific detection of sialyl Lewis X determinant carried on the mucin GlcNAc β 1 \rightarrow 6GalNAc α core structure as a tumor-associated antigen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 247(2): 514-517, 1998.

27) Hirohashi, S. Inactivation of the E-cadherin-mediated cell adhesion system in human cancers. *Am. J. Pathol.*, 153(2): 333-339, 1998.

28) Fukuchi, T., Nozawa, S., Hirohashi, S., et al., β -catenin mutation in carcinoma of the uterine endometrium. *Cancer Res.*, 58(16): 3526-3528, 1998.

29) Akimoto, S., Hirohashi, S., et al., Expression of cadherin-catenin cell adhesion molecules, phosphorylated tyrosine residues and growth factor receptor-tyrosine kinases in gastric cancers. *Jpn. J. Cancer Res.*, 89(8): 829-836, 1998.

30) Hui, A-M, Hirohashi, S., et al., Reduced p27^{Kip1} expression in hepatocellular carcinomas. *Cancer Lett.*, 132: 67-73, 1998.

31) Nakanishi, Y., Hirohashi, S., et al., The clinicopathologic significance of small areas unstained by Lugol's iodine in the mucosa surrounding resected esophageal carcinoma. *Cancer*, 82(8): 1454-1459, 1998.

32) Kanai, Y., Hirohashi, S., et al., DNA

hypermethylation at the D17S5 locus is associated with gastric carcinogenesis. *Cancer Lett.*, 122: 135-141, 1998.

33) Takaoka-Suzuki, A., Imai, K., Hirohashi, S., et al., Cloning and characterization of the human β 4-integrin gene promoter and enhancers. *J. Biol. Chem.*, 273(50): 33848-33855, 1998.

34) Sakamoto, M., Hirohashi, S., et al., Natural history and prognosis of adenomatous hyperplasia and early hepatocellular carcinoma: Multi-institutional analysis of 53 nodules followed up for more than 6 months and 141 patients with single early hepatocellular carcinoma treated by surgical resection or percutaneous ethanol injection. *Jpn. J. Clin. Oncol.*, 28(10): 604-608, 1998.

35) Sugitani, S., Hirohashi, S., et al., Hyperplastic foci reflect the risk of multicentric development of human hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol.*, 28: 1045-1053, 1998.

36) Suwa, T., Imai, K., et al., Increased invasiveness of *MUC1* cDNA-transfected human gastric cancer MKN74 cells. *Int. J. Cancer*, 76: 377-382, 1998.

37) Takaoka, A., Imai, K., et al., Reduced invasive and metastatic potentials of *KAI1*-transfected melanoma cells. *Jpn. J. Cancer Res.*, 89: 397-404, 1998.

38) Sasaki, S., Imai, K., et al., Human tumor growth suppression by apoptosis induced with anti-erbB-2 chimeric monoclonal antibody. *Jpn. J. Cancer Res.*, 89: 562-570, 1998.

39) Senota, A., Imai, K., et al., Relation of matrilysin messenger RNA expression with invasive activity in

- human gastric cancer. Clin. Exp. Metastasis, 16: 313-321, 1998.
- 40) Yoshida, Y., Imai, K., et al., Decreased DCC mRNA expression in human gastric cancer is clinicopathologically significant. Int. J. Cancer (Pred. Oncol.), 79: 634-639, 1998.
- 41) Shinoda, M., Imai, K., et al., Effective adaptive immunotherapy by T-LAK cells retargeted with bacterial superantigen-conjugated antibody to MUC1 in xenografted severe combined immunodeficient mice. Cancer Res., 58: 2838-2843, 1998.
- 42) Takaoka, A., Imai, K., et al., Suppression of invasive properties of colon cancer cells by a metastasis suppressor KAI1 gene. Oncogene, 16: 1443-1453, 1998.
- 43) Yawata, A., Imai, K., et al., Prolonged cell survival enhances peritoneal dissemination of gastric cancer cells. Oncogene, 16: 2681-2686, 1998.
- 44) Kaneta, Y., Nozawa, S., et al., Immunoconjugate with monoclonal antibody MSN-1 to endometrial adenocarcinoma on antigen-producing tumor cells *in vivo*. Jpn. J. Cancer Res., 89: 583-588, 1998.
- 45) Udagawa, Y., Nozawa, S., et al., Clinical characteristics of a newly developed ovarian tumour marker, galactosyltransferase associated with tumour (GAT). Eur. J. Cancer, 34(4): 489-495, 1998.
- 46) Itano, N., Kimata, K., et al., Hyaluronan synthase: New directions for hyaluronan research. Trends in Glycosci. Glycotechnol., 10 :23-38, 1998.
- 47) Mani, K., Kimata, K., et al., Heparan/chondroitin/dermatan sulfate primer 2-(6-hydroxynaphthyl)-O- β -D-xylopyranoside preferentially inhibits growth of transformed cells. Cancer Res., 58: 1099-1104, 1998.
- 48) Yamada, Y., Kimata, K., et al., The gene structure and promoter sequence of mouse hyaluronan synthase 1 (mHAS1). Biochem. J., 330: 1223-1227, 1998.
- 49) 板野直樹, 木全弘治 プロテオグリカン 2 癌転移におけるヒアルロン酸の役割. 週刊医学のあゆみ, 184: 251-253, 1998.
- 50) 米田雅彦, 木全弘治, 他 ヒアルロン酸リッチマトリックスの役割と形成機構. Connective Tissue, 30: 69-73, 1998.
- 51) 板野直樹, 木全弘治 ヒアルロン酸合成酵素: 細胞外マトリックス改変に向けてのシナリオ. 生化学, 70: 1171-1175, 1998.
- 52) 板野直樹, 木全弘治 ヒアルロン酸合成酵素 遺伝子改変によるヒアルロン酸機能解析. 蛋白質 核酸 酵素, 43: 2387-2393, 1998.
- 53) 板野直樹, 木全弘治 3. 細胞外マトリックスと分解 1)プロテオグリカン 1. プロテオグリカンの構造機能. 癌転移 転移の分子メカニズムと臨床展望. 医薬ジャーナル社, pp.102-112, 1998.
- 54) Yasui, N., Hirohashi, S., et al., Tumor growth and metastasis of human colorectal cancer cell lines in SCID mice resemble clinical metastatic behaviors. Invasion & Metastasis, 17(5): 259-269, 1999.
- 55) Osada, T., Hirohashi, S., et al., Acquisition of glutamine synthetase expression in human hepatocarcinogenesis: relation to disease recurrence and possible regulation by ubiquitin-dependent proteolysis. Cancer, 85(4): 819-831, 1999.