

厚生科学研究費補助金（がん克服戦略研究事業）
総括研究報告書

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
(H10-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。本年度は、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につき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。ヒトがん組織におけるWntシグナル系の発がん転移への関与を示してきたが、さらに β -catenin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。またN末を欠いた β -catenin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。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。BAG-1の細胞内局在の変化によってBAG-1の機能が異なり、このことが、がん細胞の運動能、治療後の再発などと関連していることを見出した。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。またヒト大腸がんについて、3種類のHASの発現をreal time RT-PCR法で検討し、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、免疫組織学的にも確認した。子宮体がん細胞ではH1型糖鎖の発現の有無が浸潤・転移能と関連を有する可能性が示唆された。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が示された。

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. 野澤志朗 | 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・転移が起こると、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一つである。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、さらにはがんの浸潤・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. 新規転移関連遺伝子Dysadherinの機能解析

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-mAb3G10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°C30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。

2. β -catenin/TCF4 転写複合体の標的遺伝子の検索

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

2) N末の磷酸化部位が欠損した安定化 β -catenin (β -catenin Δ N134)を発現誘導できる胎児腎上皮由来細胞293 Tet-ON β -catenin 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TCF4/ β -catenin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。

3. N末を欠いた β -catenin 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 -catenin に結合する分子の単離を試みた。N末を欠いたhuman β -catenin 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 -cateninの抗体を用いたWestern blotにより、細胞内での結合を確認した。

4. 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。

5. 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

BAG-1の生理的機能を明らかにするために、生体内のBAG-1発現を免疫染色によって解析した。胃がん患者の手術材料から正常部分の胃組織、さらにラットの各臓器の凍結切片を作製し、これらを用いて免疫染色を行った。さらに、細胞内局在の解析のため、共焦点顕微鏡や免疫電顕を行った。これらの結果から、ゴルジに多く存在していることが示唆されたことから、さらにBFA及びNocodazole処理した胃がん細胞株について共焦点顕微鏡も施行し、BAG-1の細胞内局在の変化を詳細に観察した。Subcellular fractionationのために、ラット胃粘膜を剥離、ミンチした後、cell lysateを作製し、

CsCl₂ や Zycodenz による linear 及び stepwise gradient を用いて細胞画分を得た。さらに、ウェスタンブロット法によってBAG-1の存在する画分を明らかにした。BAG-1-GST融合蛋白を作製して、これに結合する分子の同定をpull-down assayにより行った。胃がん細胞株のPost-nuclear fractionをBAG-1-GST beadsと混ぜて結合させた後、その蛋白をウェスタンブロットで検索した。また、特異性の検討のため細胞膜に多く存在するβ-cateninの結合の程度も比較した。ヒト下咽頭がんの生検もしくは手術材料を用いて、同様に免疫組織染色を施行し、BAG-1の発現パターンを調べた。

6. がん浸潤・転移におけるヒアルロン酸の意義の解明
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)を定量する。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する。さらには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する。

3種類のHASの一次構造の詳細な比較から、活性部位を予測し、この結果をもとにアミノ酸置換した酵素遺伝子を作成して発現させ酵素活性と性質の変化から酵素の活性部位を特定した。これらの情報をもとに変異遺伝子導入によるドミナントネガティブな効果、またアンチセンス遺伝子の導入などにより3種類のHASによるヒアルロン酸合成のそれぞれに特異的抑制方法、また普遍的な抑制方法を*in vitro*、*in vivo*において試み、がん転移の特異的な抑制方法への応用の可能性を調べる。この際、*in vivo*への応用を考慮してアデノウイルス感染による遺伝子導入方法も検討する。

7. 子宮内膜がんにおけるH1型糖鎖の発現

ヒト子宮体がん由来培養株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。つぎに、体がん組織21例を対象として

Le^b型糖鎖の細胞内での接着に必要なα1,2フコース転移酵素(Se酵素)とα1,4フコース転移酵素(Le酵素)の型を遺伝子レベルで解析した。Se酵素遺伝子およびLe酵素遺伝子では、ともにミスセンス変異を有するアリルが存在し、そのホモ接合体では酵素が不活化されている。そこで、患者白血球由来のDNAを鋳型としてSe遺伝子とLe遺伝子の翻訳領域をPCRにて増幅後、それぞれのPCR産物におけるAluIまたはPvuII siteの有無によって変異を有するアリルの検出を行い、体がん組織における糖鎖抗原の表現型と比較した。

8. 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. 新規転移関連遺伝子Dysadherinの機能解析

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-mAb 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120KD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。

2. β -catenin/TCF 4 転写複合体の標的遺伝子の検索
 β -catenin 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 -catenin 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。

3. N末を欠いた β -catenin 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 -catenin との結合を確認した。

4. 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

舌扁平上皮がんにおける laminin-5 γ 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。

5. 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

BAG-1 の生体内での発現は、ubiquitous ではあるが、

特に消化管上皮粘膜細胞に高いことが判明した。これらの細胞では、BAG-1 は、ゴルジ近傍に蓄積していることを、共焦点顕微鏡を用いた蛍光免疫染色後の観察、さらに免疫電顕を用いた BAG-1 シグナルの検出によって明らかにした。BAG-1 の一次構造から、BAG-1 自体にはゴルジ局在シグナルが存在しないことから、他の分子との会合により、ゴルジ野に蓄積していることが予測された。そこで、BFA や Nocodazole を用いて、BAG-1 のゴルジ局在の機序解析を行った結果、ARF 活性が必要であることが判明した。また、BAG-1 と b-COP との挙動の類似性、さらに Pull-down assay の結果から、BAG-1 は、COPI 小胞と結合し、両者が協調してゴルジに存在していることが示唆された。これらの結果から、BAG-1 は、消化管上皮細胞において、膜小胞輸送に貢献していることが示唆された。さらに下咽頭正常上皮及びがん組織における BAG-1 の発現を調べた。BAG-1 は、ほとんどの下咽頭がんにおいて高発現をしており、その発現は、核、細胞質及びその両者に認められることから、3 パターン存在することを見出した。さらに、核パターンを示す腫瘍は、細胞増殖能が高いこと、また、このような下咽頭がんの早期患者 (T1/T2) では、他の群に比較し優位に放射線治療後の再発率が高いことが判明した。したがって、BAG-1 が核パターン発現を示す症例では、放射線治療に抵抗性を示しやすいものと推測された。すなわち、BAG-1 発現のパターン認識により、放射線照射後の予後判定に有用であることが明らかになった。

6. がん浸潤・転移におけるヒアルロン酸の意義の解明
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。*Ras* でトランスフォームしたラット 3Y1 細胞のアンチセンス *HAS2* 遺伝子導入による腫瘍形成能の明らかな低下を観察し、さらに変異 *HAS1* 遺伝子の導入発現によるドミナントネガティブ効果を確認した。現在これらの成果をもとに、アデノウイルス感染によるこれらの遺伝子導入方法を試作中である。

7. 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。また、フコース転移酵素のミスセンス変異を有するアリアルホモ接合体は、Se遺伝子では3例に、Le遺伝子では4例に認められ、遺伝子レベルでSeまたはLe酵素が不活化されていた。これらの症例の体がん組織におけるLeb抗原の発現は、Se酵素が不活化されている場合であっても陽性なのに対し、Le酵素が不活化されている場合にはほとんど認められず、Le遺伝子の遺伝子型に一致していた。一方、MSN-1に対する反応は両者が不活化された場合でも陽性であった。

8. 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. 新規転移関連遺伝子Dysadherinの機能解析

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-mAb3G10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為に、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。

2. β -catenin/TCF4 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 -catenin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 -catenin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。

3. N末を欠いた β -cateninに結合する分子の単離

β -catenin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 -catenin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た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 -catenin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 -catenin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 -catenin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。

4. 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。

5. 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

がん細胞の転移をいかにして阻止するかが本研究の一貫した主たる目的であり、このために多角的に解析を進めてきた。上皮細胞において、アポトーシスを阻止させると転移能が亢進すること、また、上皮細胞が足場喪失時におこるアポトーシスであるアノキスをPKCaの活性化によって起こしやすくするという働きを持つことなどを見出してきた。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も、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。今年度の研究成果から、BAG-1の生理的機能がクローズアップされた。すなわち、上皮の分泌機能に寄与しているらしいということである。興味深いのは、過剰発現したがん細胞では、BAG-1がゴルジ以外の細胞内局在を示し、中間径フィラメント（アクチンやケラチン）に集まり、その結果、細胞運動能を高めるといふ本来の機能とは異なったmalfunctionを有することが推測された。すなわち、BAG-1の機能異常は、その過剰発現のみならず細胞内局在の変化によっても誘導され、がんの進展と深く関わっているものと思われた。

6. がん浸潤・転移におけるヒアルロン酸の意義の解明

これまでの研究でHASには異なる遺伝子に由来する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的な抑制を目指したい。さらに、ホスト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。

7. 子宮内膜がんにおけるH1型糖鎖の発現

子宮体がん細胞では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。また、MSN-1認識抗原の発現については、Se酵素だけでなくH酵素といった他の α 1,4フコース転移酵素が関与する可能性が示された。従って、子宮体がんの浸潤・転移には α 1,4フコース転移酵素の変化が関与している可能性が示唆された。

8. 大腸がんにおけるCOX-2発現の意義

大腸がんの原発巣における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。本年度は、新規転移関連遺伝子Dysadherinの機能解析、 β -catenin/TCF4転写複合体の標的遺伝子の検索、N末を欠いた β -cateninに結合する分子の単離、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、大腸がんにおけるヒアルロン酸合成酵素の発現の検討、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) Yasui,N., Kitajima,M., 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.

- 2) 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.
- 3) Harabayashi, T., Hirohashi, S., et al., Reduction of integrin β 4 and enhanced migration on laminin in association with intraepithelial spreading of urinary bladder carcinomas. *J. Urology*, 161(4): 1364-1371, 1999.
- 4) Ono, Y., Hirohashi, S., et al., Clinicopathological significance of laminin-5 γ 2 chain expression in squamous cell carcinoma of the tongue: immunohistochemical analysis of 67 lesions. *Cancer*, 85: 2315-2321, 1999.
- 5) Kondo, Y., Hirohashi, S., et al. Microsatellite instability associated with hepatocarcinogenesis. *J. Hepatology*, 31: 529-536, 1999.
- 6) Kondo, Y., Hirohashi, S., et al. β -catenin accumulation and mutation of exon 3 of the β -catenin gene in hepatocellular carcinoma. *Jpn. J. Cancer Res.*, 90(12): 1301-1309, 1999.
- 7) Tsuda, H., Hirohashi, S., et al., der(16)t(1;16)/der(1;16) in breast cancer detected by fluorescence in situ hybridization is an indicator of better patient prognosis. *Genes, Chromosomes & Cancer*, 24: 72-77, 1999.
- 8) Takeda, H., Hirohashi, S., et al., E-cadherin functions as a *cis*-dimer at the cell-cell adhesive interface *in vivo*. *Nature Structural Biology*, 6(4): 310-312, 1999.
- 9) Shimoyama, Y., Kitajima, M., Hirohashi, S., et al., Biochemical characterization and functional analysis of two type II classic cadherins, cadherin-6 and -14, and comparison with E-cadherin. *J. Biol. Chem.*, 274(17): 11987-11994, 1999.
- 10) Tsuda, H., Hirohashi, S., et al., Correlation of numerical and structural status of chromosome 16 with histological type and grade of non-invasive and invasive breast carcinomas. *Int. J. Cancer (Pred. Oncol.)*, 84: 381-387, 1999.
- 11) Saito, A., Hirohashi, S., et al., Disruption of E-cadherin-mediated cell adhesion systems in gastric cancers in young patients. *Jpn. J. Cancer Res.*, 90(9): 993-999, 1999.
- 12) Sato, H., Hirohashi, S., et al., Expression of E-cadherin in bone and soft tissue sarcomas: A possible role in epithelial differentiation. *Human Pathol.*,

30(11): 1344-1349, 1999.

- 13) Kanai, Y., Hirohashi, S., et al., Reduced mRNA expression of the DNA demethylase, MBD2, in human colorectal and stomach cancers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 264(3): 962-966, 1999.
- 14) Becker, K.F., Hirohashi, S., et al., Analysis of E-cadherin in diffuse-type gastric cancer using a mutation-specific monoclonal antibody. *Am. J. Pathol.*, 155(6): 1803-1809, 1999.
- 15) Genda, T., Hirohashi, S., et al., Cell motility mediated by Rho and Rho-associated protein kinase plays a critical role in intrahepatic metastasis of human hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 30: 1027-1036, 1999.
- 16) Ishii, Y., Hirohashi, S., et al., Integrin α 6 β 4 as a suppressor and a predictive marker for peritoneal dissemination in human gastric cancer. *Gastroenterology*, 118(3): 497-506, 2000.
- 17) Kanai, Y., Kitajima, M., Hirohashi, S., et al., Aberrant DNA methylation precedes loss of heterozygosity on chromosome 16 in chronic hepatitis and liver cirrhosis. *Cancer Lett.*, 148(1): 73-80. 2000.
- 18) Genda, T., Hirohashi, S., et al., Loss of cell-cell contact is induced by integrin-mediated cell-substratum adhesion in highly-motile and highly-metastatic hepatocellular carcinoma cells. *Lab. Invest.*, in press.
- 19) Oh-hora, M., Imai, K., et al., Direct suppression of TCR-mediated activation of extracellular signal-regulated kinase by leukocyte protein tyrosine phosphatase, a tyrosine-specific phosphatase. *J. Immunol.*, 163: 1282-1288, 1999.
- 20) Miyachi, M., Imai, K., et al., Butyrate augments interferon- α -induced S phase accumulation and persistent tyrosine phosphorylation of cdc2 in K562 cells. *Br. J. Cancer*, 79: 1018-1024, 1999.
- 21) Naishiro, Y., Imai, K., et al., BAG-1 accelerates cell motility of human gastric cancer cells. *Oncogene*, 18: 3244-3251, 1999.
- 22) Yoshida, Y., Imai, K., et al., Development of the arbitrarily primed-representational difference analysis method and chromosomal mapping of isolated high throughput rat genetic markers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96: 610-615, 1999.
- 23) Okuda, H., Imai, K., et al., Protein kinase C α promotes apoptotic cell death in gastric cancer cells depending upon loss of anchorage. *Oncogene*, 18: 5604-5609, 1999.

- 24) Kubushiro, K., Nozawa, S., et al., Change of β -1, 4-galactosyltransferase with the development of endometrial cancer. *Gynecol. Obstet. Invest.*, 48: 211-214, 1999.
- 25) Aoki, D., Nozawa, S., et al., Two soluble forms of β 1,4-galactosyltransferase released from an ovarian cancer cell line and from COS-1 cells transfected with its cDNA. *Acta Histochem. Cytochem.*, 32: 209-214, 1999.
- 26) Zhao, M., Kimata, K., et al., Immunohistochemical evaluation of the small and large proteoglycans in pleomorphic adenoma of salivary glands. *J. Oral Pathol. Med.*, 28: 37-42, 1999.
- 27) Itano, N., Kimata, K., et al., Relationship between hyaluronan production and metastatic potential of mouse mammary carcinoma cells. *Cancer Res.*, 59: 2499-2504, 1999.
- 28) Itano, N., Kimata, K., et al., Three isoforms of mammalian hyaluronan synthases have distinct enzymatic properties. *J. Biol. Chem.*, 274: 25085-25092, 1999.
- 29) Yamada, Y., Kimata, K., et al., Receptor for hyaluronan-mediated motility and CD44 expressions in colon cancer assessed by quantitative analysis using real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Jpn. J. Cancer Res.*, 90: 987-992, 1999.
- 30) Ichikawa, T., Kimata, K., et al., Increased synthesis of hyaluronate enhances motility of human melanoma cells. *J. Invest. Dermatol.*, 113: 935-939, 1999.
- 31) 板野直樹, 木全弘治, 他 癌転移研究の手法 癌転移と細胞外マトリックス. *癌と化学療法*, 26: 1663-1668, 1999.
- 32) Yoshida, M., Kimata, K., et al., *In vitro* synthesis of hyaluronan by a single protein derived from mouse HAS1 gene and characterization of amino acid residues essential for the activity. *J. Biol. Chem.*, 275: 497-506, 2000.

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

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

ヒトがんの浸潤・転移の病理と分子・細胞機構の解明

分担研究者 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。本年度は、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 につき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。ヒトがん組織における Wnt シグナル系の発がん転移への関与を示してきたが、さらに β -catenin 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。また N 末を欠いた β -catenin 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。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。

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・転移が起こると、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どうか連携しているのか、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か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、がん間質誘導機構ならびに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. 新規転移関連遺伝子 Dysadherin の機能解析

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-mAb3G10 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。

2. β -catenin/TCF 4 転写複合体の標的遺伝子の検索

β -catenin 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 -catenin 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 末の磷酸化部位が欠損した安定化 β -catenin (β -catenin Δ N134) を発現誘導できる胎児腎上皮由来細胞 293 Tet-ON β -catenin 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 -catenin 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。

3. N 末を欠いた β -catenin 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 -catenin に結合する分子の単離することを試みた。N 末を欠いた human β -catenin 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 g-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 -catenin の抗体を用いた Western blot により、細胞

内での結合を確認した。

4. 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。

(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. 新規転移関連遺伝子 Dysadherin の機能解析

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-mAb 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。

2. β -catenin/TCF 4 転写複合体の標的遺伝子の検索

β -catenin 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 -catenin 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。

3. N末を欠いた β -catenin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 -catenin との結合を確認した。

4. 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

舌扁平上皮がんにおける laminin-5 γ 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。

D. 考察

1. 新規転移関連遺伝子 Dysadherin の機能解析

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-mAb3G10 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為に、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。

2. β -catenin/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 -catenin の変異は散発性大腸がんおよび大腸腺腫のほとん

どで見られ、 β -catenin 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癌の高危険群での発症予防等への臨床応用が期待できる。

3. N 末を欠いた β -catenin に結合する分子の単離

β -catenin 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 -catenin 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た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 -catenin 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 -catenin 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 -catenin 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。

4. 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。

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。本年度は、新規転移関連遺伝子 Dysadherin の機能解析、 β -catenin/TCF 4 転写複合体の標的遺伝子の検索、N 末を欠いた β -catenin に結合する分子の単離、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の検討を行った。今後さらに、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) 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.
- 2) 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.
- 3) Harabayashi,T., Hirohashi,S., et al., Reduction of integrin β 4 and enhanced migration on laminin in association with intraepithelial spreading of urinary bladder carcinomas. *J. Urology*, 161(4): 1364-1371, 1999.
- 4) Ono,Y., Hirohashi,S., et al., Clinicopathological significance of laminin-5 γ 2 chain expression in squamous cell carcinoma of the tongue: immunohistochemical analysis of 67 lesions. *Cancer*, 85: 2315-2321, 1999.
- 5) Kondo,Y., Hirohashi,S., et al. Microsatellite instability associated with hepatocarcinogenesis. *J. Hepatology*, 31: 529-536, 1999.
- 6) Kondo,Y., Hirohashi,S., et al. β -catenin accumulation and mutation of exon 3 of the β -catenin gene in hepatocellular carcinoma. *Jpn. J. Cancer Res.*, 90(12): 1301-1309, 1999.
- 7) Tsuda,H., Hirohashi,S., et al., der(16)t(1;16)/der(1;16) in breast cancer detected by fluorescence in situ hybridization is an indicator of better patient prognosis. *Genes, Chromosomes & Cancer*, 24: 72-77, 1999.
- 8) Takeda,H., Hirohashi,S., et al., E-cadherin functions as a *cis*-dimer at the cell-cell adhesive interface *in vivo*. *Nature Structural Biology*, 6(4): 310-312, 1999.
- 9) Shimoyama,Y., Hirohashi,S., et al., Biochemical characterization and functional analysis of two type II classic cadherins, cadherin-6 and -14, and comparison with E-cadherin. *J. Biol. Chem.*, 274(17): 11987-11994, 1999.
- 10) Tsuda,H., Hirohashi,S., et al., Correlation of numerical and structural status of chromosome 16 with histological type and grade of non-invasive and invasive breast carcinomas. *Int. J. Cancer (Pred. Oncol.)*, 84: 381-387, 1999.
- 11) Saito,A., Hirohashi,S., et al., Disruption of E-cadherin-mediated cell adhesion systems in gastric cancers in young patients. *Jpn. J. Cancer Res.*, 90(9): 993-999, 1999.
- 12) Sato,H., Hirohashi,S., et al., Expression of E-cadherin in bone and soft tissue sarcomas: A possible role in epithelial differentiation. *Human Pathol.*, 30(11): 1344-1349, 1999.
- 13) Kanai,Y., Hirohashi,S., et al., Reduced mRNA expression of the DNA demethylase, MBD2, in human colorectal and stomach cancers.

Biochem. Biophys. Res. Commun.,
264(3): 962–966, 1999.

14) Becker, K.F., Hirohashi, S., et al.,
Analysis of E-cadherin in diffuse-type
gastric cancer using a mutation-
specific monoclonal antibody. *Am. J.*
Pathol., 155(6): 1803–1809, 1999.

15) Genda, T., Hirohashi, S., et al.,
Cell motility mediated by Rho and
Rho-associated protein kinase plays a
critical role in intrahepatic metastasis
of human hepatocellular carcinoma.
Hepatology, 30: 1027–1036, 1999.

16) Ishii, Y., Hirohashi, S., et al.,
Integrin $\alpha 6 \beta 4$ as a suppressor and a
predictive marker for peritoneal
dissemination in human gastric cancer.

Gastroenterology, 118(3): 497–506,
2000.

17) Kanai, Y., Hirohashi, S., et al.,
Aberrant DNA methylation precedes
loss of heterozygosity on chromosome
16 in chronic hepatitis and liver
cirrhosis. *Cancer Lett.*, 148(1): 73–80.
2000.

18) Genda, T., Hirohashi, S., et al.,
Loss of cell-cell contact is induced by
integrin-mediated cell-substratum
adhesion in highly-motile and highly-
metastatic hepatocellular carcinoma
cells. *Lab. Invest.*, in press.

消化器がんの浸潤・転移の臨床病態と分子・細胞機構の解明

(分担) 研究者 今井浩三 札幌医科大学医学部第一内科 教授

研究要旨

消化器がんの浸潤・転移の分子・細胞機能の解明を目的としてアポトーシス関連シャペロン調節分子 BAG-1 に着目し、その機能とがんの進展との関連性を検索した。その結果、BAG-1 の細胞内局在の変化によって BAG-1 の機能が異なり、このことが、癌細胞の運動能、治療後の再発などと関連していることを見出した。これらの研究成果から BAG-1 は、消化器がんの進展に関わる重要な分子に位置づけしうるものと考えられた。

A. 研究目的

消化器がんの浸潤・転移の分子・細胞機能の解明を目的として本研究では、アポトーシス関連シャペロン調節分子 BAG-1 に着目し、その細胞内局在と機能、さらに、がん進展との関連性を検索した。これまでに、アポトーシス抑制分子 Bcl-2 あるいは BAG-1 を過剰発現させることによって、胃癌の腹膜播種能が亢進することを明らかにしてきたが、特に BAG-1 は、細胞運動能を高めることにより Bcl-2 とは異なった機能によって浸潤能を高めるものと予想されたことから、本研究では、さらに BAG-1 の生理的及び病理的機能について詳細に検討した。

B. 研究方法

(1) BAG-1 の生理的機能を明らかにするために、生体内の BAG-1 発現を免疫染色によって解析した。ヒト BAG-1 に対するモノクローナル抗体は、共同研究者の高山晋一・JC Reed 博士より供与を受けた。胃癌患者の手術材料から正常部分の胃組織、さらにラットの各臓器の凍結切片を作製し、これらを用いて免疫染色を行った。さらに、細胞内局在の解析のため、共焦点顕微鏡や免疫電顕を行った。これらの結果から、ゴルジに多く存在していることが示唆されたことから、さらに BFA 及び Nocodazole 処理した胃癌細胞株について共焦点顕微鏡も施行し、BAG-1 の細胞内局在の変化を詳細に観察した。

(2) Subcellular fractionation のために、ラット胃粘膜を剥離し、ミンチした後、cell lysate を作製し、CsCl₂ や Zycodenz による linear 及び stepwise gradient を用いて細胞画分を得た。さらに、ウェスタンブロット法によって BAG-1 の存在する画分を明らかにした。

(3) BAG-1-GST 融合蛋白を作製して、これに結合する分子の同定を pull-down assay により行った。胃癌細胞株の Post-nuclear fraction を BAG-1-GST beads と混ぜて結合させた後、その蛋白をウェスタンブロットで検索した。コントロールとして、unfused GST と結合するフラクションを用いた。また、特異性の検討のため細胞

膜に多く存在する beta-catenin の結合の程度も比較した。

(4) ヒト下咽頭癌の生検もしくは手術材料を用いて、同様に免疫組織染色を施行し、BAG-1 の発現パターンを調べた。

(5) GFP-full-length-BAG-1 を含む様々な mutant BAG-1 発現ベクターを作製し、COS7 細胞にエフェクタンを用いて、遺伝子導入し、これらの BAG-1 変異型蛋白がどのような細胞内局在を示すかを明らかにした。

(6) In-situ hybridization によって、BAG-1 mRNA の組織レベルでの発現パターンを検索した。

(倫理面への配慮)

ヒトの材料を用いる際にはインフォームドコンセント(説明と理解)を得ている。また、ラット使用時に苦痛を与えない処置を施し、必要最小限の匹数しか使用していない。

C. 研究結果

1. BAG-1 は、消化管上皮粘膜で高い発現があり、COPI 小胞に結合し、ゴルジ近傍に蓄積している

BAG-1 の生体内での発現は、ubiquitous ではあるが、特に消化管上皮粘膜細胞に高いことが判明した。これらの細胞では、BAG-1 は、ゴルジ近傍に蓄積していることを、共焦点顕微鏡を用いた蛍光免疫染色後の観察、さらに免疫電顕を用いた BAG-1 シグナルの検出によって明らかにした。BAG-1 の一次構造から、BAG-1 自体にはゴルジ局在シグナルが存在しないことから、他の分子との会合により、ゴルジ野に蓄積していることが予測された。そこで、BFA や Nocodazole を用いて、BAG-1 のゴルジ局在の機序解析を行った結果、ARF 活性が必要であることが判明した。また、BAG-1 と β -COP との挙動の類似性、さらに Pull-down assay の結果から、BAG-1 は、COPI 小胞と結合し、両者が協調してゴルジに存在していることが示唆された。

これらの結果から、BAG-1は、消化管上皮細胞において、膜小胞輸送に貢献していることが示唆された。

2. BAG-1の固形癌における発現とその臨床的意義

BAG-1は癌の浸潤・転移に関わる重要な分子として位置づけることから、下咽頭正常上皮及び癌組織におけるBAG-1の発現を調べた。BAG-1は、ほとんどの下咽頭癌において高発現をしており、その発現は、核、細胞質及びその両者に認められることから、3パターン存在することを見出した。さらに、核パターンを示す腫瘍は、細胞増殖能が高いこと、また、このような下咽頭癌の早期患者(T1/T2)では、他の群に比較し優位に放射線治療後の再発率が高いことが判明した。したがって、BAG-1が核パターン発現を示す症例では、放射線治療に抵抗性を示しやすいものと推測された。すなわち、BAG-1発現のパターン認識により、放射線照射後の予後判定に有用であることが明らかになった。

3. BAG-1の細胞内局在を規定するBAG-1蛋白の構造

異なった細胞内局在を示すBAG-1発現を規定する分子機構を解析するために、様々なGFP-mutant BAG-1を作製し、COS7細胞内での局在を詳細に調べた。既に、BAG-1は、alternative translation initiationによって、三つの構造をもつ遺伝子産物ができることが知られている。本研究において検討した結果、全長p52 BAG-1Lは、ほとんど核内に存在すること、p50 BAG-1Mは、核とともに核周囲に存在し、この分子のc-末端の欠失型は、核周囲により多く蓄積することが明らかになった。p32 BAG-1は、その大部分は、ゴルジ近傍に存在していた。また、C-端のみでは、明らかな局在部位を認めないことが判明した。

D. 考察

がん細胞の転移をいかにして阻止するかが本研究の一貫した主たる目的であり、このために多角的に解析を進めてきた。上皮細胞において、アポトーシスを阻止させると転移能が亢進すること。また、上皮細胞が足場喪失時におこるアポトーシスであるアノイキスをPKC α の活性化によって起こしやすくするという働きを持つことなどを見出してきた。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。これらのことから癌の進展を考える際には、アポトーシスに対する配慮とともに、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。今年度の研究成果から、BAG-1の生理的機能がクローズアップされた。すなわち、上皮の分泌機能に寄与しているらしいということである。興味深いのは、過剰発現した癌細胞では、BAG-1がゴルジ以外の細胞内局在を示し、中間径フィラメント(アクチンやケラチン)に集まり、その結果、細胞運動能を高めるといった本来の機能とは異なったmalfunctionを有することが推測された。すなわち、BAG-1の機能異常は、その過剰発現のみならず細胞内

局在の変化によっても誘導され、癌の進展と深く関わっているものと思われた。

また、下咽頭癌のBAG-1発現パターンの解析から、BAG-1の新たな細胞内局在もクローズアップされた。すなわち、核に存在するBAG-1が存在すること、その様なBAG-1を発現している癌細胞は、細胞増殖能が高く、そうした腫瘍をもつ患者の予後は、BAG-1が細胞質内に発現している腫瘍を持つ患者に比較して悪いという結果が得られたのである。

異なった細胞内局在を示すBAG-1発現を規定する分子機構を解析した結果、N-端に核移行シグナルが存在しBAG-1Lは、ほとんど核に存在し、C-端は、ゴルジ局在を抑制する領域が存在していることが判明した。こうした研究成果から、BAG-1は、その細胞内局在の自在な変化とともに、様々な異なった機能を獲得し、癌の進展に深く関わっていることが判明した。このことは、BAG-1の機能制御を目指すことによって、癌の進展阻止を促す新しい遺伝子療法への発展のために極めて有益な情報を提供したものである。

E. 結論

BAG-1の生理的機能を示唆する結果を得た。このことは、BAG-1をターゲットとする遺伝子療法へ発展させてゆく際に有益な情報であると言える。すなわち、BAG-1のターゲット療法の際に、消化管及び膵臓などの分泌機能に対する影響を把握する必要があることが示された。

また、胃癌や下咽頭癌組織において、BAG-1の細胞内局在が変化しており、その結果、生理的機能とは異なった新たな機能を獲得し、癌の進展性に寄与していることが示された。多くの癌で、BAG-1は、過剰発現していることが既に明らかにされているが、過剰発現から生ずるアポトーシス抑制効果のみならず、そのことが細胞内局在を変え、がん細胞特性をも変えていることが示唆される。この点からもBAG-1は、極めて有望な転移・浸潤抑制を目指した遺伝子療法のターゲット分子と言えよう。

本研究で得た結果から、BAG-1の細胞内局在の解析は、癌進展や予後を判断するための有益な因子の一つであると思われることから、今後より広範な癌で大規模なスタディを行ってゆくことが望まれる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Okuda, H., Adachi, M., Miyazawa, M., Hinoda, Y. and Imai K. Protein kinase Ca promotes apoptotic cell death in gastric cancer cells depending upon loss of anchorage. *Oncogene*, (1999) 18: 5604-5609
2. Yoshida Y, Ushijima T, Imai K., Sugimura T and Nagao M. Development of the arbitrarily primed-representational difference analysis and its use for genetic markers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, in press (1999)
3. Naishiro, Y., Adachi, M., Okuda, H., Yawata, A., Mitaka, T., Takayama, S., Reed, J.C., Hinoda Y. and Imai K. BAG-1 accelerates cell motility of human gastric cancer cells. *Oncogene*, (1999) 18: 3244-3251
4. Miyachi, T., adachi, M., Hinoda Y. and Imai K. Butyrate augments interferon- α -induced S phase accumulation and persistent tyrosine phosphorylation of cdc2 in K562 cells. *Br. J. Cancer*, (1999) 79: 1018-1024
5. Oh-hora, M., Ogata, M., Mori, Y., Adachi, M., Imai K., Kosugi, A. and Hamaoka, T. Direct suppression of TCR-mediated activation of extracellular signal-regulated kinase by leukocyte protein tyrosine phosphatase, a tyrosine-specific phosphatase. *J. Immunol.*, (1999) 163: 1282-1288
6. Yawata, A., Adachi, A., Okuda, H., Naishiro, Y., Takamura, T., Hareyama, M., Takayama, S., Reed, J.C. and Imai K. Prolonged cell survival enhances peritoneal dissemination of gastric cancer cells. *Oncogene*, (1998) 16:2681-2686
7. Takaoka, A., Hinoda, Y., Sato, S., Adachi, Y., Itoh, F., Adachi M. and Imai K. Suppression of invasive properties of colon cancer cells by a metastasis suppressor KAI1 gene. *Oncogene*, (1998) 16:1443-1453
8. Shinoda M, Kudo T, Hinoda Y and Imai K. Effective adaptive immuno-therapy by T-LAK cells retargeted with bacterial superantigen-conjugated antibody to MUC1 in xenografted SCID mice. *Cancer Res.*, (1998) 58:2838-2843
9. Yoshida Y, Itoh F, Hinoda Y and Imai K. Decreased DCC mRNA expression in human gastric cancer is clinicopathologically significant. *Int. J. Cancer*, (1998) 79:634-639
10. Senota A, Itoh F, Hinoda Y and Imai K. Relation of matrilysin messenger RNA expression with invasive activity in human gastric cancer. *Clin. Exp. Metastasis*, (1998) 16: 313-321
11. Sasaki S, Tsujisaki M, Jinnohara T, Ishida T, Sekiya M, Adachi M, Takahashi T, Sato S, Hinoda Y and Imai K. Human tumor growth suppression by apoptosis induced with anti-erbB-2 chimeric monoclonal antibody. *Jpn. J. Cancer Res.*, (1998) 89: 562-570
12. Takaoka, A., Hinoda, Y., Sato, S., Itoh, F., Adachi, M., Hareyama, M. and Imai K. Reduced invasive and metastatic potentials of KAI1-transfected melanoma cells. *Jpn. J. Cancer Res.*, (1998) 89: 397-404
13. Suwa T, Hinoda Y, Makiguchi Y, Takahashi T, Itoh F, Adachi M, Hareyama M and Imai K. Increased invasiveness of MUC1 cDNA-transfected human gastric cancer MKN74 cells. *Int. J. Cancer*, (1998) 76: 377-382
14. Takaoka, A., Adachi, M., Okuda, H., Sato, S., Yawata, A., Hinoda, Y., Takayama, S., Reed, J.C. and Imai K. Anti-cell death activity promotes pulmonary metastasis of melanoma cells. *Oncogene*, (1997) 14:2971-2977
15. Yamamoto, H., Itoh, F., Adachi, Y., Sakamoto, H., Adachi, M., Hinoda, Y. and Imai K. Relation of enhanced secretion of active matrix metalloproteinases with tumor spread in human hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, (1997) 112:1290-1296
16. Adachi, T., Hinoda, Y., Nishimori, I., Adachi, M. and Imai K. Increased sensitivity of gastric cancer cells to natural killer and lymphokine-activated killer cells by antisense suppression of N-acetylgalactosaminyltransferase. *J. Immunol.*, (1997) 159:2645-2651
17. Adachi, M., Ishino, M., Torigoe, T., Minami, Y., Matozaki, T., Miyazaki, T., Taniguchi, T., Hinoda, Y. and Imai K. Interleukin-2 induces tyrosine phosphorylation of SHP-2 through IL-2 receptor β chain. *Oncogene*, (1997) 14:1629-1633

2. 学会発表

1. 安達 正晃, 高村 亮典, 和田 郁夫, 山内 英敬, 関谷 増夫, 今井 浩三: シャペロン調節分子 BAG-1 の細胞内局在 日本分子生物学会年会, 631, 1999
 2. 奥田 博介, 安達 正晃, 苗代 康可, 関谷 増夫, 日野田 裕治, 今井 浩三: PKCa の活性化は胃癌細胞株のアノイクスを亢進する 日本癌学会総会, 363, 1998
 3. 苗代 康可, 安達 正晃, 高村 亮典, 山内 英敬, 井戸川 雅史, 日野田 裕治, 三高 俊広, 今井 浩三: シャペロン調節分子 BAG-1 の細胞運動能への作用 日本分子生物学会年会, 522, 1998
 4. Okuda H, Adachi M, Sekiya M, Takamura T, Naishiro Y, Shonai T, Koyama Y, Hinoda Y and Imai K: Activation of protein kinase C alpha augments anoikis in gastric cancer cells. "Regulation of Machinery for Cancer Cell Growth, Immortality, Apoptosis and Invasion" The 18th International Symposium on Cancer by Sapporo Cancer Seminar Foundation. 61, 1998.
- G. 知的所有権の取得状況
特許取得及び実用新案登録などは、特に行っていない。

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 (平成11年度分)

研究テーマ 婦人科腫瘍の浸潤・転移の臨床病態と分子・細胞機構の解明
: 糖鎖抗原を中心とした解析

分担研究者 野澤志朗 慶應義塾大学医学部 教授

研究要旨

: 婦人科がんのなかで、近年増加傾向にある子宮体癌を対象として糖鎖抗原の発現と浸潤・転移の関連について検討した。研究分担者はすでに抗子宮体癌モノクローナル抗体MSN-1抗体を作成したが、本研究ではヒト子宮体癌由来株細胞よりMSN-1抗体の反応性によってMSN-1認識抗原高発現亜株と低発現亜株を作成し、両者の細胞特性を検討した。その結果、MSN-1認識抗原低発現亜株はH1型糖鎖を高発現しており、MSN-1認識抗原高発現亜株に比べ*in vitro*での組織接着能や浸潤能が亢進していた。また、*in vivo*については、ヌードマウスにおける肺転移の頻度がMSN-1認識抗原低発現亜株では、高発現亜株に比べ高率であった。以上より、子宮体癌細胞ではH1型糖鎖の発現の有無が浸潤・転移能と関連を有する可能性が示唆された。また、MSN-1認識抗原の発現には、 $\alpha 1, 2$ フコース転移酵素が関与することが明らかになった。

A. 研究目的

がん細胞の膜表面に存在する糖鎖は、血管内皮上のセレクトリン分子との結合を介して転移に関与することが明らかになっている。また、各種臓器のがんに発現される糖鎖と予後の関連があることが大腸癌などにおいて報告されている。一方、研究分担者はすでに抗子宮体癌モノクローナル抗体MSN-1を作成し、MSN-1はおもにLewisb (Leb) 型糖鎖を認識すること、MSN-1と反応する体癌患者の予後は、反応しない体癌に比べ予後が良好であることを見いだした。そこで、本年度は子宮体癌に発現される糖鎖とMSN-1認識抗原の多寡が、体癌細胞の特性に及ぼす影響を解析すると同時に、MSN-1認識抗原の発現機構についてフコース転移酵素の関与を検討した。

B. 研究方法

1. MSN-1認識抗原の高発現亜株と低発現亜株の作成と両亜株の細胞特性の検討

ヒト子宮体癌由来培養株SNG-IIよりMSN-1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。