

2. 単一糖鎖付着ビーズを用いた検討

子宮体癌細胞に発現された糖鎖が血管内皮と直接反応しているか否かを明らかにするため、単一糖鎖を付着させたビーズと血管内皮の反応性をフローサイトメトリーにより解析した。

3. MSN-1認識抗原の発現機構に関する解析

MSN-1抗体はおもにLeb型糖鎖を認識することが明らかになっているが、Leb型糖鎖のどの部分を認識するかを検索した。つぎに、体癌組織21例を対象としてLeb型糖鎖の細胞内での接着に必要な $\alpha 1, 2$ フコース転移酵素 (*Se*酵素) と $\alpha 1, 4$ 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アルが存在し、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アルの検出を行い、体癌組織における糖鎖抗原の表現型と比較した。

C. 研究結果

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

SNG-SはLeb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。

2. 単一糖鎖付着ビーズを用いた検討

H1型糖鎖、Leb型糖鎖などの血液型関連糖鎖をそれぞれ単一糖鎖の状態が付着させたビーズのなかで、H1型糖鎖付着ビーズは血管内皮と反応したのに対し、Lea型およびLeb型糖鎖の付着ビーズは血管内皮との反応性は見られなかった。

3. MSN-1認識抗原の発現機構

MSN-1抗体はLebのほかにLey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LebとLeyに共通する部分で、糖鎖非還元末端の $\alpha 1, 2$ 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のホモ接合体は、*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。これらの症例の体癌組織における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。

D. 考察

本研究では子宮体癌に発現される糖鎖の

生物機能を検討するため、研究分担者がすでに作製した抗子宮体癌モノクローナル抗体MSN-1を用いて、子宮体癌由来株よりMSN-1認識抗原高発現亜株と低発現亜株を分別・作製し、両亜株の細胞特性を比較解析した。MSN-1認識抗原低発現亜株はH1型糖鎖を高発現し、一方MSN-1認識抗原高発現亜株はH1型糖鎖の発現は弱いことが判明した。そして、MSN-1認識抗原低発現亜株は高発現亜株に比べ*in vitro*にて組織接着能や血管内皮への接着能および浸潤能が高く、また*in vivo*での実験的転移能が高いことが示された。さらに、単一糖鎖を付着させたビーズと血管内皮との反応性は、H1型糖鎖の場合にのみ見られたことから、H1型糖鎖は血管内皮との接着に直接関与していることが示唆された。また、MSN-1の認識は部位が非還元末端のFuc α 1, 2-であることを考慮すると、その発現には、 α 1, 4フコース転移酵素 (Le酵素) は関与しないものの、末端のFuc α 1, 2-の付加にはSe酵素だけではなく他の α 1, 2フコース転移酵素も関与することが示唆された。

E. 結論

子宮体癌細胞では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、子宮体癌の浸潤・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。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1 Kobayashi, Y., Tsukazaki, K., Ohta, K., Mikami, M., Kubushiro, K., and Nozawa, S.: 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 (Communications in Clinical Cytometry)*. 30:23-27, 1997
- 2 Ma, J., Kubushiro, K., Tashima, Y., Tsukazaki, K., Udagawa, Y., Nozawa, S. and Fukuda, M-N.: Expression of human β 1, 4-galactosyltransferase in gynecological cancer cell lines. *International Journal of Oncology*, 11:117-122, 1997
- 3 Yoshiki, J., Kubushiro, K., Tsukazaki, K., Udagawa, Y., Nozawa, S. and Iwamori M.: High expression of uridine diphosphate-galactose: Lc₃Cer β 1-3 Galactosyltransferase in human uterine endometrial cancer-derived cells as measured by enzymelike immunosorbent assay and thin-layer chromatography-immunostaining. *Jpn. J. Cancer Res.*, 88:669-677, 1997
- 4 Kaneta, Y., Tsukazaki, K., Kubushiro, K., Aoki, R., Sakayori, M., Ueda, M. and Nozawa, S.: Effects of gelonin immunoconjugate of monoclonal antibody MSN-1 to endometrial adenocarcinoma on antigen-producing

- tumor cells *in vitro*.
Oncology Reports, 4:331-336, 1997
- 5 Lin, B., Kubushiro, K., Akibo, Y., Cui, Y., Tsukazaki, K., Nozawa, S. and Iwamori, M.: 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
- 6 Kaneta, Y., Tsukazaki, K., Kubushiro, K., Aoki, R., Sakayori, M., Ueda, M., Nozawa, S.: Effect of Gelonin Immunoconjugate with Monoclonal Antibody MSN-1 to Endometrial Adnocarcinoma on Antigen-producing Tumor Cells *in vivo*. Jpn. J. Res., 89:583-588, 1998
- 7 Udagawa, Y., Aoki, D., Ito, K., Uejima, T., Uemura, M. and Nozawa, S.: Clinical characteristics of a newly developed ovarian tumour marker, galactosyltransferase associated with tumour (GAT). European J. Cancer, 34(4):489-495, 1998
- 8 Fukuchi, T., Sakamoto, M., Tuda, H., Maruyama, K., Nozawa, S., Hirohashi, S.: β -Catenin Mutation in Carcinoma of the Uterine Endometrium¹. Cancer Res., 58:3526-3528, 1998
- 9 Kubushiro, K., Ma, J., Fukuchi, T., Banno, K., Muramatsu, Y., Tsukazaki, K., Nozawa, S.: Change of β -1, 4-Galactosyltransferase with the Development of Endometrial Cancer. Gynecol Obstet Invest., 48:211-214, 1999
- 10 Aoki, D., Saito, E., Matsumoto, Y., Tominaga, E., Hirasawa, A., Susumu, N., Udagawa, Y., Nozawa, S.: Two soluble forms of β 1,4-galactosyltransferase released from ovarian cancer cells from COS-1 cells transfected with its cDNA. Acta Histochemica Cytochemica, 32(3):209-214, 1999
2. 学会発表
- 1 久布白兼行, 塚崎克己, 馬 軍, 三上幹男, 中川博之, 野澤志朗: β 1-4ガラクトース転移酵素の高発現細胞を用いた子宮体癌細胞の特性の解析. 第6回がん転移研究会, 広島, 1999.4
- 2 久布白兼行, 塚崎克己, 三上幹男, 吉村泰典, 野澤志朗: 子宮体癌における新たな接着分子としてのガラクトース転移酵素の検討-遺伝子導入による細胞特性の変化を中心に-. 第49回日本産科婦人科学会, 東京, 1997.4
- 3 青木大輔, 斉藤英子, 小室優貴, 二河田雅信, 小宮山慎一, 宇田川康博, 吉村泰典, 野澤志朗: 子宮体内膜の癌化に伴い高率に発現するフコシル化糖鎖の発現機構-フコース転移酵素の関与について-. 第49回日本産科婦人科学会, 東京, 1997.4

- 4 吉岐潤子, 久布白兼行, 塚崎克己, 入江琢也, 山下 博, 吉村泰典, 野澤志朗: 婦人科癌における糖鎖発現異常を規定する糖転移酵素に関する検討—癌の質的診断を志向した測定系の開発—
第49回日本産科婦人科学会, 東京, 1997.4
- 5 Kubushiro, K., Tsukazaki, K., Ma, J., Mikami, M., and Nozawa, S. :
Suppression of adhesion between laminin and endometrial adenocarcinoma cells by β 1-4 galactosyltransferase gene introduction.
88th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, San Diego, 1997.4
- 6 斉藤英子, 青木大輔, 植嶋孝夫, 大家真治, 長島義男, 小宮山真一, 宇田川康博, 野澤志朗: 卵巣癌由来の癌関連ガラクトース転移酵素(GAT)と正常型 β 1,4-ガラクトース転移酵素との関連性.
第38回日本臨床細胞学会総会, 高松, 1997.5
- 7 久布白兼行, 馬 軍, 吉田祐子, 山下博, 塚崎克己, 野澤志朗: 糖転移酵素の遺伝子導入による子宮体癌細胞の細胞外基質に対する接着・浸潤の亢進.
第26回日本婦人科病理・コルポスコピー学会, 東京, 1997.7
- 8 斉藤英子, 青木大輔, 植嶋孝夫, 進伸幸, 宇田川康博, 野澤志朗: 血清中に存在する2種の β 1,4-ガラクトース転移酵素の動向.
第17回腫瘍マーカー研究会, 京都, 1997.9
- 9 久布白兼行, 馬 軍, 吉田祐子, 岩田聡子, 塚崎克己, 野澤志朗, 岩森正男: ヒト子宮体癌細胞SNG-Mにおける β 1,4-ガラクトース転移酵素高発現による接着性の変化
第17回腫瘍マーカー研究会, 京都, 1997.9
- 10 北村潤子, 久布白兼行白, 中川博之, 山下 博, 塚崎克己, 野澤志朗, 岩森正男: 子宮体癌における β 1-3, β 1-4ガラクトース転移酵素の発現—組織型との関連を含めて—.
第56回日本癌学会総会, 京都, 1997.9
- 11 久布白兼行, 馬 軍, 入江琢也, 塚崎克己, 野澤志朗: β 1-4ガラクトース遺伝子導入による子宮体癌細胞の接着能、浸潤能の亢進.
第56回日本癌学会総会, 京都, 1997.9
- 12 斉藤英子, 青木大輔, 植嶋孝夫, 進伸幸, 富永英一郎, 小宮山真一, 宇田川康博, 野澤志朗: 血清中における卵巣癌由来の2種の β 1,4-ガラクトース転移酵素の変化.
第56回日本癌学会総会, 京都, 1997.9
- 13 青木大輔, 斉藤英子, 進伸幸, 富永英一郎, 小宮山真一, 宇田川康博, 野澤志朗: 卵巣癌腫瘍マーカーとしての β 1,4-ガラクトース転移酵素.
第38回日本組織細胞化学会, 1997.10
- 14 久布白兼行, 塚崎克己, 野澤志朗: 子宮体癌における糖鎖発現と予後—糖鎖遺伝子導入による細胞特性の解析を中心に—.
第35回日本癌治療学会総会, 京都, 1997.10

- 15 Kubushiri, K., Ma, J., Tsukazaki, K., Yoshida, Y., Nozawa, S.: Expression of glycoconjugates in endometrial cancer and its association with cell function. Sixth Biennial Meeting of the International Gynecologic Cancer Society, 福岡, 1997.10
- 16 Yoshiki, J., Kubushiro, K., Yoshida, Y., Ma, J., Tsukazaki, K., Nozawa, S.: Development of galactosyltransferase assay system in gynecological cancer: the evaluation of biological properties. Sixth Biennial Meeting of the International Gynecologic Cancer Society, 福岡, 1997.10
- 17 Saitoh, E., Aopki, D., Uejima, T., Susumu, N., Komiyama, S., Tominaga, E., Udagawa, Y., Nozawa, S.: Serum levels of β 1,4-galactosyltransferases released from human ovarian cancer cells transplanted into nude mice. Sixth Biennial Meeting of the International Gynecologic Cancer Society, 福岡, 1997.10
- 18 Yamashita, H., Kubushiro, K., Tsukazaki, K., Mikami, M., Nozawa, S.: Involvement of membrane-bound cholesterol sulfate in differentiation of endometrial cancer. Sixth Biennial Meeting of the International Gynecologic Cancer Society, 福岡, 1997.10
- 19 入江琢也, 久布白兼行, 馬 軍, 吉田 祐子, 中川博之, 山下 博, 塚崎克己, 野澤志朗: 新たに精製されたピンカルカロイド, コノフィリンの子宮体癌細胞の浸潤能に与える影響. 第36回日本臨床細胞学会秋期大会, 横浜, 1997.11
- 20 Tsukazaki, K., Kubushiro, K., Ma, J., Nozawa, S.: Glycoconjugates in Endometrial Cancer. XIIIth International Congress of Cytology, 東京, 1998.5
- 21 富永英一郎, 青木大輔, 松本有美, 長島義男, 進 伸幸, 宇田川康博, 野澤志朗: 子宮体癌で高率に発現するフコシル化糖鎖の発現機構 - α 1,2-フコース転移酵素 (Se酵素, H酵素) の関与について. 第39回日本臨床細胞学会総会, 札幌, 1998.6
- 22 久布白兼行, 馬 軍, 竹原京子, 山下博, 塚崎克己, 岩森正男, 野澤志朗: 新規アルカロイド Conophylline による子宮体癌細胞の浸潤能抑制効果. 第7回がん転移研究会総会, 札幌, 1998.7
- 23 久布白兼行, 馬 軍, 竹原京子, 山下博, 塚崎克己, 岩森正男, 野澤志朗: β 1,4ガラクトース転移酵素の遺伝子導入に伴う細胞増殖、接着、浸潤能の変化. 第7回がん転移研究会総会, 札幌, 1998.7
- 24 久布白兼行, 塚崎克己, 野澤志朗: 子宮体癌の浸潤・転移と糖転移酵素. 第27回日本婦人科病理・コルポスコピ

- 一学会, 大阪, 1998.7
- 25 Aoki, D., Saitoh, E., Matsumoto, Y., Susumu, N., Udagawa, Y., Nozawa, S. : A mechanism of the elevation of GAT level in the sera of patients with ovarian cancer. Fifth Joint Meeting The Japan Society of Histochemistry and Cytochemistry and The Histonecmlcal Society, San Diego, 1998.7
- 26 Saitoh, E., Aoki, D., Susumu, N., Matsumoto, Y., Tominaga, E., Nozawa, S. : Galactosyltransferase associated with tumor (GAT) in the sera of pregnant women. Fifth Joint Meeting The Japan Society of Histochemistry and Cytochemistry and The Histonecmlcal Society, San Diego, 1998.7
- 27 Matsumoto, Y., Aoki, D., Tominaga, E., Komiyama, S., Susumu, N., Udagawa, Y., and Nozawa, S. : MSN-1-reactive antigen and the expression of α -1, 2 fucosyltransferases in uterine endometrial adenocarcinoma. Fifth Joint Meeting The Japan Society of Histochemistry and Cytochemistry and The Histonecmlcal Society, San Diego, 1998.7
- 28 斎藤英子, 青木大輔, 進 伸幸, 松本有美, 宇田川康博, 野澤志朗 : COS-1を用いた癌関連ガラクトース転移酵素(GAT)上昇機構の検討. 第30回日本臨床電子顕微鏡学会, 東京, 1998.9
- 29 富永英一郎, 青木大輔, 進 伸幸, 宇田川康博, 野澤志朗 : 子宮体癌で増量するフコシル化糖鎖の発現機構. 第30回日本臨床電子顕微鏡学会, 東京, 1998.9
- 30 竹原京子, 久布白兼行, 斎藤深雪, 塚崎克己, 太田博明, 野澤志朗 : ガラクトース転移酵素の遺伝子導入細胞を用いた癌細胞の特性に関する検討. 第30回日本臨床電子顕微鏡学会, 東京, 1998.9
- 31 久布白兼行, 馬 軍, 入江琢也, 宇田川康博, 塚崎克己, 岩森正男, 野澤志朗 : β 1, 4 ガラクトース転移酵素の発現と婦人科癌細胞の特性. 第18回腫瘍マーカー研究会, 東京, 1998.9
- 32 斎藤英子, 青木大輔, 松本有美, 富永英一郎, 進 伸幸, 鈴木貴士, 宇田川康博, 野澤志朗 : 卵巣癌担癌状況における癌関連ガラクトース転移酵素GATの血中上昇機構についての検討. 第18回腫瘍マーカー研究会, 東京, 1998.9
- 33 斎藤英子, 青木大輔, 松本有美, 富永英一郎, 進 伸幸, 宇田川康博, 野澤志朗 : 卵巣癌細胞に由来する癌関連ガラクトース転移酵素(GAT)の産生機構の検討. 第37回日本臨床細胞学会秋期大会, 仙台, 1998.11
- 34 福地 剛, 久布白兼行, 岩田 卓, 三上幹男, 塚崎克己, 野澤志朗 : 子宮体癌における β -cateninの遺伝子の変異 第3回日本産婦人科腫瘍マーカー・遺伝

子診断学会学術集会，佐賀，1999.2

- 35 久布白兼行，岩田 卓，山下 博，竹原京子，塚崎克己，吉村泰典，野澤志朗：ガラクトース転移酵素のアンチセンス導入による子宮体癌細胞の増殖・浸潤の抑制。
第51回日本産科婦人科学会学術講演会，東京，1999.4
- 36 冨永英一郎，青木大輔，平沢 章，瀬藤江里，進 伸幸，宇田川康博，吉村泰典，野澤志朗：子宮体癌に特異的に出現する糖鎖の発現機構におけるフコース転移酵素の関与について。
第51回日本産科婦人科学会学術講演会，東京，1999.4
- 37 福地 剛，久布白兼行，山下 博，岩田 卓，塚崎克己，野澤志朗：子宮体癌培養細胞株を用いた β -cateninシグナル機構の検討。
第28回日本婦人科腫瘍学会学術集会，宇都宮，1999.7
- 38 久布白兼行，馬 軍，塚崎克己，野澤志朗：子宮体癌における糖鎖発現とその生物機能。
日本組織細胞化学会第40回記念総会・学術集会，京都，1999.12

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

がんの浸潤・転移における細胞外マトリックスの意義の解明

分担研究者 木全 弘治 愛知医科大学・分子医科学研究所

研究要旨

ヒアルロン酸合成酵素 HAS 遺伝子発現と癌浸潤・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。形質転換した 3Y1 細胞では、*Src* では 3 種類の *HAS* の、*Ras* では *HAS2* の特異な発現上昇が認められた。*Ras* 形質転換細胞と、さらにこれにアンチセンス *HAS* 遺伝子を導入した細胞によるラット腹腔での腫瘍形成と浸潤性を検討したところ、形質転換細胞は腹水中、及び腹腔内各種臓器に散在性の癌を形成したが、アンチセンス導入形質転換細胞では腫瘍形成の抑制、また散在性の喪失が観察された。また、変異 *HAS1* 遺伝子の導入発現により *Src* 形質転換細胞の 3 種類の *HAS* 活性発現に対するドミナントネガティブ効果を観察したので、今後 *Src* 形質転換細胞の腫瘍形成能や浸潤性の抑制効果を期待できた。ヒト大腸癌について、3 種類の *HAS* の発現を real time RT-PCR 法で検討し、*HAS* の癌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、さらに特異抗体染色によってもこの結果を確認した。これらの成果をもとに、*HAS* 発現の抑制、特に転移性に関連する *HAS1* 発現の特異な抑制方法の開発を試み、癌の浸潤・転移の特異な抑制方法の開発を急いでいる。この際、今後の遺伝子治療への応用を考慮し、アデノウイルス感染による *HAS* 発現制御の為の遺伝子導入方法を採用した。

A. 研究目的

ヒアルロン酸(HA)-リッチマトリックスの癌細胞の浸潤・転移における役割をその形成の主役であるヒアルロン酸の代謝に注目した。その生合成に関与する酵素を遺伝子レベルで明らかにし、遺伝子から得られる酵素タンパク質の構造や性質などの情報をもとに、抗体や酵素活性を制御する方法を開発して、癌の診断や標的治療方法の開発の可能性を探る。ヒアルロン酸合成酵素の遺伝子として現在までに 3 種類、*HAS1*、2、3 を同定し、それらの発現は組織や発生

段階的で異なること、さらに特に *HAS1* は胎児期の組織に高い発現を示すことを明らかにした。

今年度は、1) 昨年度に続き、3 種類のヒアルロン酸合成酵素(HAS)遺伝子の発現とヒト癌細胞の転移能(浸潤と増殖)との関連を種々のヒト癌腫瘍について解析し、検討する。癌転移能の予知マーカーとしての応用の可能性を検討する。2) ヒアルロン酸合成酵素遺伝子を高度に発現した癌細胞、逆にその発現を抑制した癌細胞について実験癌転移系で転移性を解析し、上記で示唆された関係

を確認するとともに、ヒアルロン酸合成の特異的な活性制御による転移抑制を目指す標的治療方法の開発を行う。3) ホスト側ヒアルロン酸合成の癌細胞の浸潤・転移性における関与を解析するため、遺伝子ノックアウトなどにより HAS 遺伝子変異マウスを作製し、この動物における癌転移能の変化を検討する。

B. 研究方法

臨床研究機関の協力下に、様々な悪性度の異なる癌組織より RNA サンプルを得て、3種類の HAS 遺伝子に特異的な Primer と Tagman のプローブを用意して 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。さらに癌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、正常細胞に癌遺伝子を導入して癌化させて、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。

癌細胞の HAS 遺伝子の発現制御による浸潤・転移性の変化を以下のように解析する。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、癌転移性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を考えている。

(倫理面への配慮)

現在のところ、ヒトサンプルについては共同研究として外部機関から供給されている。また、細胞培養系や実験動物を使用したモデル癌転移系を用いての研究であり、問題はないと思う。

C. 研究結果

前年度に外部機関との共同研究によりヒト大腸癌約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、癌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いとの興味ある結果を得た。他のヒト癌についてもこの結果を検討し、転移性と *HAS1* 発現との関係における普遍性を検討を目指した。しかし、転移性を同時に解析されたヒト癌組織の RNA サンプルを得ることは極めて困難であり、現在、共同研究下に口腔上皮癌、子宮癌についてサンプルを収集中で結果は次年度に得られる。

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* の特異的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形成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。前年度に得られたマウス乳癌細胞の化学変異剤による HAS1 遺伝子変異による転移性の低下とその後の正常 HAS1 遺伝子導入による転移性の復活を観察した成果とともに、癌細胞の悪性形質発現におけるヒアルロン酸合成の亢進の関与を証明できた。

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。特に転移性に関連する HAS1 発現を特異に抑制する方法としてアンチセンス HAS 遺伝子導入法を採用し、癌治療における課題である癌細胞の浸潤・転移性の特異な抑制方法の開発の可能性を検討している。

HAS1 遺伝子のノックアウトマウスの作製に成功した。幼児期に成長の遅れなどを観察しているがマウス自体の生存には大きな変化はない。現在、影響の個体差をなくするためコンジェニック系を確立中である。でき次第に移植癌細胞の浸潤・転移における影響を見る実験を計画してい

る。

D. 考察

昨年度の研究で 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、ヒト大腸癌について、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 の癌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、ホスト側ヒアルロン酸合成の関与を、今回作製に成功した HAS 遺伝子ノックアウトマウスにおける実験転移癌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。

E. 結論

癌細胞の浸潤・転移に有利な周辺環境としてヒアルロン酸-リッチマトリックスに注目して、その役割を形成の主役であるヒアルロン酸の合成

酵素を遺伝子レベルで明らかにした。これらの遺伝子から得られるタンパク質の構造や性質などの情報も解析して、酵素の発現、また酵素活性を制御する方法を開発して、癌の標的治療方法や診断への応用を可能とした。

F. 研究発表

1. 論文発表

・ M. Zhao, T. Tanaka, I. Ogawa, T. Tada, K. Kimata, H. Nikai.

Immunohistochemical evaluation of the small and large proteoglycans in pleomorphic adenoma of salivary glands. *J Oral Pathol Med* 1999;28:37-42.

・ N. Itano, T. Sawai, O. Miyaishi, K. Kimata. Relationship between hyaluronan production and metastatic potential of mouse mammary carcinoma cells. *Cancer Res* 1999;59:2499-2504.

・ N. Itano, T. Sawai, M. Yoshida, P. Lenas, Y. Yamada, M. Imagawa, T. Shinomura, M. Hamaguchi, Y. Yoshida, Y. Ohnuki, S. Miyauchi, A. P. Spicer, J. A. McDonald, K. Kimata. Three isoforms of mammalian hyaluronan synthases have distinct enzymatic properties. *J Biol Chem* 1999;274:25085-25092.

・ Y. Yamada, N. Itano, H. Narimatsu, T. Kudo, S. Hirohashi, A. Ochiai, A. Niimi, M. Ueda, K. Kimata. 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* 1999;90:987-992.

・ T. Ichikawa, N. Itano, T. Sawai, K. Kimata, Y. Koganehira, T. Saida, S.

Taniguchi. Increased synthesis of hyaluronate enhances motility of human melanoma cells. *J Invest Dermatol* 1999;113:935-9.

・ M. Yoshida, N. Itano, Y. Yamada, K. Kimata. *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* 2000;275:497-506.

・ 板野直樹, 山田陽一, 吉田衛, 木全弘治. 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* 1999;26:1663-1668.

2. 学会発表

・ 木全弘治, 板野直樹, 吉田衛, 山田陽一, 成松久, 広橋説雄, 落合淳志, 浜口道成. 転移におけるヒアルロン酸の関与. 第25回日本医学会総会. 東京, 1999.4.4.

・ 木全弘治. ヒアルロン酸(HA)と癌細胞のマトリックス形成. 第63回日本生化学会中部支部例会. 三重, 1999.5.14.

・ 板野直樹, 澤井崇博, 山田陽一, 吉田衛, 木全弘治, 千賀威, 浜口道成. 癌遺伝子によるヒアルロン酸合成酵素遺伝子の発現誘導. 第8回がん転移研究会総会. 東京, 1999.5.24.

・ 吉田衛, 板野直樹, 藤井克之, 木全弘治. ヒアルロン酸合成機構の解明. 第46回マトリックス研究会大会. 愛知, 1999.6.9.

・ 山田陽一, 板野直樹, 雑喉正泰, 畠賢一郎, 鷺見幸男, 水野裕和, 上田実, 木全弘治. 口腔粘膜細胞、口腔粘膜線維芽細胞と皮膚線維芽細胞における3種のヒアルロン酸合成酵素の発現 ; IL-1 β とEGFによる発現調節のReal Time RT-PCRによる評価. 第31回日本

結合組織学会学術大会. 名古屋,
1999.6.11.

・板野直樹, 澤井崇博, 山田陽一, 吉田衛, 木全弘治, 千賀威, 浜口道成. 癌遺伝子によるヒアルロン酸合成酵素遺伝子の発現増強. 第31回日本結合組織学会学術大会. 名古屋, 1999.6.11.

・ M. Zhao, M. Yoneda, L. S. Zhou, H. Watanabe, Y. Yamada, L. Huang, S. Nagasawa, H. Nishimura, T. Shinomura, N. Itano, Z. Isogai, K. Kimata. Roles of aggrecan and related proteoglycans in hyaluronan-rich matrix formation. *New Frontiers in Medical Sciences : Redefining Hyaluronan*. Padua, Italy, 1999.6.17.

・ M. Yoneda, M. Zhao, L. Zhou, H. Watanabe, Y. Yamada, L. Huang, H. Nishimura, S. Nagasawa, K. Kimata. Binding of inter-alpha-trypsin inhibitor (ITI) to aggrecan and PG-M/versican. *XVth International Symposium on Glycoconjugates*. 東京, 1999.8.25-27.

・ N. Itano, T. Sawai, M. Yoshida, P. Lenas, Y. Yamada, M. Imagawa, T. Shinomura, M. Hamaguchi, Y. Yoshida, Y. Ohnuki, S. Miyauchi, A. Spicer, J. McDonald, K. Kimata. Three isoforms of mammalian hyaluronan synthases have distinct enzymatic properties. *International Conference on Molecular Interactions of Proteoglycans*. 神奈川, 1999.8.27.

・山田陽一, 板野直樹, 成松久, 工藤崇, 広橋説雄, 落合淳志, 上田実, 木全弘治. 大腸癌におけるヒアルロン酸合成酵素遺伝子(HAS)の発現: 定量的 Real Time RT-PCRによる評価. 第58回日本癌学会. 広島, 1999.9.29.

・篠原淳, 板野直樹, 渥美ふき子, A. P.

Spicer, J. A. McDonald, 風岡宜暁, 山田史郎, 木全弘治. ヒアルロン酸合成酵素遺伝子(HAS1)ノックアウトマウスの下顎骨骨密度の検討. 第44回日本口腔外科学会総会. 東京, 1999.10.7.

・木全弘治. ヒアルロン酸とは? その特性、合成機構、機能について. *ECME研究会*. 名古屋, 1999.11.5.

・ Y. Yamada, N. Itano, M. Zako, K. Hata, M. Ueda, K. Kimata. Differential expressions of three different hyaluronan synthases in oral mucosal epithelium cells and fibroblasts, and dermal fibroblasts upregulations by IL-1b and EGF assessed by quantitative analysis using real time RT-PCR. 第4回アジア・太平洋結合組織学会. ニューゼーランド, 1999.11.18.

・吉田衛, 板野直樹, 木全弘治, 藤井克之. ヒアルロン酸合成制御法の開発 - HA合成酵素の酵素反応速度定数の解析 -. 第13回日本軟骨代謝学会. 横浜, 2000.3.3.

厚生省科学研究費補助金（がん克服戦略事業）
分担研究報告書

- I: ヌードマウスヒト胃癌腹膜播種モデルでのマトリックス分解酵素阻害剤(Marimastat: TA-2516)の転移抑制効果に関する研究
- II: 大腸がんの肝転移におけるシクロオキシゲナーゼ 2 (COX-2) 発現の意義

分担研究者 北島政樹 慶應義塾大学病院長

研究要旨：

I: 癌細胞の浸潤には MMP による細胞外マトリックスの分解が不可欠であるが、今回我々は、ヌードマウスヒト胃癌腹膜播種モデルを用いてマトリックス分解酵素阻害剤(Marimastat: TA-2516)の転移抑制効果を検討した。TA-2516 は単独投与にてヌードマウスにおけるヒト胃癌細胞の腹膜播種結節の形成を抑制し、MMC との併用投与にて相乗効果を認めた。

II: 近年、シクロオキシゲナーゼ 2 (以下、COX-2) が癌細胞における増殖や転移機構への関与が考えられているが、未だあきらかな作用機序は解明されていない。今回、大腸癌における COX-2 発現の意義について検討した結果、大腸癌の肝転移に原発巣における COX-2 の発現が密接に関わってくることを示された。

A. 研究目的

I: ヌードマウスヒト胃癌腹膜播種モデルを用いてマトリックス分解酵素阻害剤(Marimastat: TA-2516)の転移抑制効果を検討する。

II: 様々な肝転移能を有するヒト大腸癌細胞株および、大腸癌切除標本における COX-2 の発現様式を検討し、大腸癌における COX-2 発現の意義について検討する。

個を BALB/c nu/nu 5 週齢雄に腹腔内播種し、1 週目から osmotic pump ALZET 2002 にて Marimastat を 4 週間持続皮下投与する。5 週目にマウスを犠牲死させ、播種結節の総重量を測定した。また同様な方法で MMC との併用投与についても検討した。

II: 様々な肝転移能を有するヒト大腸癌細胞株 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。

B. 研究方法

I: ヒト胃癌株(TMK-1) 5×10^5

また、232例の大腸癌切除標本における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。

C. 研究結果

I: Marimastat 9 mg/kg/day 投与群において治療群と対象群の結節重量は 3.39 ± 1.12 g と 5.61 ± 2.23 g, 18 mg/kg/day では 0.80 ± 0.68 g と 2.18 ± 0.57 g, 27 mg/kg/day では 0.17 ± 0.17 g と 1.67 ± 0.35 g, 36 mg/kg/day では 0.16 ± 0.05 g と 1.16 ± 0.12 g であり, 治療群と対象群の比 (T/C) は 0.604, 0.367, 0.102, 0.138 であった。いずれも推計学的有意差 ($p < 0.05$) をもって腹膜播種の抑制効果を認めた。また Marimastat (18mg/kg/day の2週間持続投与) と MMC (2mg/kg の一回腹腔内投与) との併用投与の実験では結節重量が Control 9.37 ± 0.92 g, Marimastat 単独投与が 3.43 ± 1.23 g (T/C 0.367), MMC 単独投与が 0.68 ± 0.42 g (T/C 0.073), 両者の併用投与が 0.12 ± 0.16 g (T/C 0.013) であり両者の T/C を掛けたものより併用投与の方が小さい ($0.367 \times 0.073 > 0.013$) ことより相乗効果を認めたと考えられる。

II: 肝転移能を有するヒト大腸癌細胞株 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。大腸癌組織における 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

I: 癌細胞の浸潤には MMP による細胞外マトリックスの分解が不可欠である。

II: 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の可能性が考えられた。

E. 結論

I: Marimastat (TA-2516) は単独投与にてヌードマウスにおけるヒト胃癌細胞の腹膜播種結節の形成を抑制し, MMC との併用投与にて相乗効果を認めた。

II: 大腸癌の肝転移機構における COX-2 の関与が考えられた。

F. 研究発表

I: 論文発表

日本外科学会誌: Nippon Geka Gakkai Zasshi
1999 May;100(5):363

学会発表

がん転移研究会
(1999.5.18 東京)
癌学会(1999 広島)

制癌剤適応研究会
(2000.3.10 仙台)

II: 学会発表

第 54 回 日本消化器外
科学会総会

第 37 回 日本癌治療学
会総会

第 54 回 日本大腸肛門
病学会総会

第 33 回 制癌剤適応研
究会

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
K0