

2. Takahashi K, Suzuki K and Tsukatani Y: Induction of tyrosine phosphorylation and association of β -catenin with EGF receptor upon tryptic digestion of quiescent cells at confluence. *Oncogene*, 15:71-78 (1997)

3. Suzuki K and Takahashi K: Reduced substratum adhesion and decreased expressions of β 1 and β 4 integrins in human breast cancer cells with a property of anchorage-independent growth. *Int J Oncol*, 14:897-904 (1999)

4. Takahashi K: Cadherin-mediated cell-cell adhesion and growth regulation. (Review) *Curr Top Biochem Res*, 1:249-253 (1999)

2. 学会発表

1. 高橋和秀、鈴木勝雄：EGF受容体によるベータ・カテニンのチロシンリン酸化と増殖時のチロシンリン酸化ベータ・カテニンの役割. 第56回日本癌学会総会(1997)

2. 高橋和秀、鈴木勝雄：上皮細胞・基質間接着におけるアクチンの役割. 第50回日本細胞生物学会大会(1997)

3. 鈴木勝雄、高橋和秀：ヒト乳癌細胞におけるシグナル伝達と抗細胞死シグナル伝達. 第57回日本癌学会総会(1998)

4. 高橋和秀、鈴木勝雄：浮遊細胞特異的なPI3Kを介したMAPキナーゼの活性化. 第58回日本癌学会総会(1999)

分野 2 転移・浸潤およびがん細胞の特性に関する研究

研究テーマ がんの浸潤・転移に関する病理学的及び分子生物学的研究

分担課題 がん細胞の分化／アポトーシス抵抗性とカスパーゼの発現異常

分担研究者 菊地慶司（神奈川県立がんセンター臨床研究所 主任研究員）

研究要旨 正常上皮細胞は、基底膜や細胞外マトリックスとの接触が絶たれた場合、最終分化或いは自殺的細胞死（アポトーシス、特にこの場合 anoikis と呼ばれる）を起こす。がん細胞ではこの最終分化・アポトーシスが異常になっており、がん細胞の浸潤・転移の背景のひとつになっているものと考えられる。本研究では、① がん細胞の最終分化に対する抵抗性（脱分化）と anoikis に対する抵抗性が連関しているかどうか、② がん細胞の anoikis に対する抵抗性にアポトーシスの調節系・実行系の蛋白群の発現異常が関与しているかどうかを中心に検討を行った。その結果、① がん細胞での分化異常と anoikis への耐性は独立しており、分化異常が anoikis への耐性に先行して出現すること、② がん細胞でアポトーシスの実行に関わる蛋白質分解酵素カスパーゼ群のうち、カスパーゼ1およびカスパーゼ4の発現の消失あるいは減弱が高率（25%）に認められること、しかしこれらはがん細胞のアポトーシス／anoikis 耐性に直接に関与するというより、宿主の免疫応答からの回避に関与しているらしいことを見出した。

A. 研究目的

正常な上皮組織の恒常性は、細胞の基底層での増殖と、その上層での細胞死（分化あるいはアポトーシス）の平衡によって維持されている。がん細胞は、細胞の増殖が過剰な状態であるとも、細胞死が起こらなくなった状態であるとも表現できる。本研究の目的は後者の見方、すなわち「死すべき時に死ななくなった細胞」としてがん細胞を理解することにある。正常上皮細胞は足場（培養器への接着）の喪失下で最終分化の形質を発現するとともに、アポトーシス（anoikis）を起こす。がん細胞の浸潤・転移の背景には、分化異常（脱分化）あるいは anoikis への抵抗性があると考えられる。がん細胞での

分化・anoikis の異常を検査するとともに、分化とアノイクスが相互に関連した事象なのか検討する。さらに、anoikis に対する抵抗性の背後に、がんのアポトーシスの実行に関わるアポトーシス調節・実行遺伝子の異常（特に後者に関わる蛋白質分解酵素カスパーゼ群の発現異常）があることを想定し、これを検証する。

B. 研究方法

1. ヒト子宮頸部由来の正常上皮細胞（NCE 細胞）は、重度の子宮筋腫のため摘出手術をされた子宮の頸部組織より調製した。子宮頸がん由来の細胞株として C33A, SiHa, Caski を用いた。浮遊培養は 0.5% アガロースをコートしたディ

ツッシュ上で実施した。所定の時間の浮遊培養後、一定数の細胞を通常のディッシュに播き、24 時間後に再接着した細胞数、並びに 10~14 日後に増殖してきた細胞の数を計数し、再接着能、増殖能を評価した。細胞 DNA のヌクレオソーム単位の断片化は、常法に従って DNA を抽出し DNA を 2 % のアガロースゲル中で電気泳動して検出した。細胞 DNA の 50kb 単位の断片化は常法に従って細胞をアガロースに封入、蛋白質を消化後、パルスフィールド電気泳動法によって検出した。TUNEL 法は BrdU 存在下で DNA 断端の標識反応を行い、それを FITC 標識抗 BrdU 抗体によりフローサイトメーター上で検出して行った。

2. Bcl ファミリー蛋白群およびカスパーゼ群の発現を以下のヒト細胞株で検討した。

ヒト子宮頸部由来の正常上皮細胞 (NCE 細胞)、NCE 細胞にヒトパピローマウイルス 16 型の DNA を導入して樹立した不死化細胞株 (NCE16 系列、4 株)、子宮頸がん由来: C33A, SiHa, Caski、胃がん由来: STKM1, STKM2, MKN28, MKN45、前立腺がん由来: LNCap, PC-3, DU-145, TSU-P1、乳がん由来: MCF-7。これらの細胞株より常法に従って蛋白質を抽出し、ウェスタンブロット法によって Bcl ファミリー蛋白群あるいはカスパーゼ群の検出を行った。

(倫理面への配慮)

ヒト子宮頸部由来の正常上皮細胞を調製するにあたって子宮筋腫の患者からの摘出検体を用いたが、その際、検体の提供者たる当該の患者に対し、担当医より摘出した組織検体を本研究の用途に限って利用に供する旨の説明を口頭で行い、提供者の同意を得ている。また、本研究においては、取得した細胞の挙動のみを解析し、提供者個人の背景に立ち入る解析は一切行っていない。その他に用いたがん由来の細胞株は、がん研究の資源として広範に使用されているも

のであって、倫理的な問題はないものと考えられる。

C & D. 結果と考察

1. 上皮細胞の最終分化とアポトーシス、およびがん化に際してのその異常

正常の上皮 (重層扁平上皮) 細胞は、基底膜と接着している基底細胞層を離脱すると、増殖を停止して繊維質の蛋白を合成するようになる。最終的には細胞構造が崩壊し、細胞内に蓄えられていた繊維質の蛋白 (fiber protein) が重合して、表皮組織の最表層を構成することになる。

この上皮組織の構築の過程、すなわち上皮細胞の最終分化は、いくつかの観察結果から、プログラム細胞死 (自殺的細胞死、アポトーシス) の一形態とみなすことができるのではないかと提唱されている。本研究では、この仮説が妥当であるか否か検討を加えるとともに、がん細胞で正常細胞でみられる最終分化・アポトーシスがどのように異常をきたしているのか、ヒト子宮頸部由来の正常細胞およびがん細胞を用いて検討した。

1) 正常上皮細胞を浮遊培養系に移した場合、それだけでは、ヌクレオソーム単位の DNA 断片化 (DNA ラダリング) を指標として、アポトーシス (anoikis) は認められない。ただし、カルシウムに反応して anoikis を起こすようになった。時間的にこれと並行して、細胞は培養器に再接着する能力を喪失するとともに、たとえ再接着しても増殖を再開する能力を失う (以降、「clonogenicity の喪失」という)。

2) 浮遊培養中の正常上皮細胞に、アポトーシスの実行にあたる蛋白質分解酵素カスパーゼの阻害剤 (Z-Asp-CH₂-DCB) を加えてアポトーシスを阻害しても、clonogenicity の喪失は阻止できなかった。また、アポトーシスを TUNEL 法によって定量的に検討したところ、48 時間の浮遊

培養によってほぼすべての細胞が *clonogenicity* を喪失するのに対し、アポトーシスを起こす細胞は高々20%であった。これらの結果は、*clonogenicity* の喪失はアポトーシスとは独立して進行する過程であることを示唆している。

3) 子宮頸がん由来の細胞株 C33A, SiHa, Caski の浮遊培養下での挙動を正常細胞と比較した。C33A はアポトーシスに対して完全な抵抗性を示すのに対して、SiHa は 50kb 単位のクロマチン DNA 断片化によって観察される弱い感受性を示し、Caski は顕著な DNA ラダリングにいたるアポトーシスを起こした。これに対し、浮遊培養下において、これらの細胞はすべて **clonogenicity* を維持していた。

* アポトーシス感受性の Caski 細胞については、細胞の形態を保持しているものについての観察

4) 並行して、分化マーカー（繊維質の蛋白インボルクリンおよびその重合に関わる酵素トランスグルタミナーゼ I）の発現を検討した。正常細胞では浮遊培養によってインボルクリンの発現が増強されるのに対し、がん細胞ではその発現をそもそも欠如しているか（C33A, SiHa）、あるいは発現の増強が認められない（Caski）。トランスグルタミナーゼ I についても、これらのがん細胞での発現は検出されなかった。

5) これらの結果は、① 浮遊培養下での上皮細胞の *clonogenicity* の喪失と *anoikis* とは、独立して進行する過程である ② 細胞のがん化にあつては、足場喪失下かでの *clonogenicity* の喪失が起こらなくなるとともに分化マーカーの発現異常（脱分化）がおり、その後 *anoikis* に対する耐性が出現してくる、ことを示唆している。

2. がん細胞株でのアポトーシス調節系・実行系分子の発現異常

Anoikis 耐性の背景には ① がん細胞では接

着シグナルが足場によらず恒常的に生成されている、あるいは ② アポトーシス機構そのものの異常、がありうる。本研究においては、がんの治療抵抗性も念頭において、②の可能性を検討した。アポトーシスの調節系として Bcl ファミリー蛋白群（Bcl-2：抗アポトーシス、Bak および Bax：アポトーシス促進）の発現を、またアポトーシスの実行系として蛋白質分解酵素カスパーゼ群の発現を検討した。

1) がん細胞での Bcl ファミリー蛋白群の発現：

がん化の手前にある不死化細胞株では、正常細胞に比べて Bcl-2 の発現が昂進している一方、Bak, Bax の発現が減少しているのが認められた。これに対して、子宮頸がん由来の細胞株ではむしろ正常細胞と大きな発現の差が認められなくなっていた。この理由として、がん細胞では、アポトーシスの調節系よりも下流の、実行系であるカスパーゼ群の発現に異常があるのではないかと考えた。

2) がん細胞株でのカスパーゼの発現異常とアポトーシス：

1) の結果を受けて子宮頸がん由来の細胞株 3 株でカスパーゼ群（カスパーゼ 1、2、3、4、6、7）の発現を検討した結果、カスパーゼ 1 および 4 の発現の消失を C33A 細胞で認めた。これが他臓器のがん由来の細胞株についても認められるかどうか、胃がん、乳がん、前立腺がん由来の細胞で検討を加えた。カスパーゼ 4 についてはそれぞれ 2/4 株、1/1 株、2/4 株で、カスパーゼ 1 についてはそれぞれ 2/4 株、1/1 株、4/4 株で、発現の消失或いは減弱を認めた。

カスパーゼ 4 の発現の消失が *anoikis* に関係しているかどうかを検討するために、カスパーゼ 4 の cDNA を正常細胞より RT-PCR 法でクローニングし、発現ベクターを作成、これを C33A 細胞に導入後（カスパーゼ 4 の発現を確認）、

細胞を浮遊培養に移し、アポトーシスが誘導されるかどうか検討した。また、抗がん剤によるアポトーシスについても検討を行った。カスパーゼ4（およびカスパーゼ1）の発現レベルと anoikis あるいは抗がん剤に対する感受性との間に有意な相関は認められなかった。すなわち、カスパーゼ4（およびカスパーゼ1）は細胞のアポトーシス実行に直接関わる因子ではないと考えられる。

3) アポトーシス実行の中核であるカスパーゼ3発現を欠失する乳がん細胞での「アポトーシス」の機序：

乳がん由来の細胞株 MCF-7 においては、カスパーゼ1、4に加えて、アポトーシス実行の中核となるカスパーゼ3の発現が消失していた。それにもかかわらず、MCF-7細胞をエトポシドなどの抗がん剤で処理すると、clonogenisityの喪失すなわち細胞死が誘導される。MCF-7細胞での細胞死の機序について、染色体DNAの分解にどのようなプロテアーゼ（カスパーゼ/非カスパーゼ）が関与しているかを明らかにすることを中心にして、検討を行った。

MCF-7細胞ではアポトーシス誘導剤（抗がん剤あるいは蛋白リン酸化酵素阻害剤スタウロスポリン）によってヌクレオソーム単位のDNA分解（DNAラダリング）は誘導されなかったが、50kb規模のDNA断片化は誘導された。このことは、50kb規模のDNA断片化がDNAラダリングよりも細胞死に直結していることを示している。50kb規模のDNA断片化は、MCF-7細胞においてはカスパーゼに対する阻害剤、セリンプロテアーゼに対する阻害剤いずれによっても阻害された。アポトーシス実行に関わるもう一つのカスパーゼである、カスパーゼ7の活性化は一過的にのみ認められたが、その時点でカスパーゼ7の基質である poly ADP ribose polymerase の分

解は認められず、細胞死を完結するには至らないものと考えられた。これまで、カスパーゼ3が機能しない場合は、カスパーゼ7が補完的に働くものと想定されてきたが、本研究の結果からは、抗がん剤などアポトーシス要因によって初動系のカスパーゼ（カスパーゼ8あるいは9）の活性化が起こるが、それはアポトーシスの実行分子としてカスパーゼ7ではなく、むしろセリンプロテアーゼ系を活性化することで細胞死（50kb規模のDNA断片化）に至る経路が存在するものと推測される。

E. 結論および今後の展望

がん細胞の浸潤・転移の背景には、細胞が基底膜との接触を断たれてなお生存/増殖しうることがある。その背後には、がん細胞の「脱分化」と「アポトーシス抵抗性」があるが、本研究では、それらが細胞がん化の過程で独立に進行し、「脱分化」が「アポトーシス抵抗性」に先行して出現することを示した（C-1）。これは、細胞が細胞死/アポトーシスについては冗長性のある機構を持っており、それ故に破綻をきたしにくいことに由来すると思われる（C-2）。従って、がんの成立要因としては「脱分化」に重点を置くことが必要になる。

がん細胞でのアポトーシス耐性の背景をカスパーゼの発現異常に指定してその発現を検討した結果（C-2）、がん細胞ではカスパーゼ4並びにカスパーゼ1の発現異常が高率に認められることがわかった。しかし、これらのカスパーゼはアポトーシスの実行に直接関わっていないようである。カスパーゼ4はカスパーゼ1の上流にあって炎症性サイトカイン（IL-1 β , IL-18）の分泌に関与しているのではないかと推測されている：すなわち、がん細胞でのカスパーゼ4/1の発現異常は、がん細胞が（「脱分化」によって成立した後）宿主のがん細胞に対する免疫応

答から逃れて浸潤・転移することに寄与する要因のひとつであり得るものと考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Kikuchi, K., Tsutsumi, K., Ohta, Y., and Yasumoto, S. : Time correlation of commitment to calcium-induced apoptosis and terminal differentiation in human ectocervical keratinocytes in suspension cultures. *Cell Growth & Differentiation* 8 : 571-579 (1997)
2. Ohta, Y., Tsutsumi, K., Kikuchi, K., and Yasumoto, S., Two distinct human uterine cervical epithelial cell lines established after transfection with human papillomavirus 16 DNA. *Jpn. J. Cancer Res.* 88 : 644-651 (1997)
3. Kunimura, C., Kikuchi, K., Ahmed, N., Shimizu, A. and Yasumoto, S. , Telomerase activity in a specific subset co-expressing integrin β 1/EGFR but not p75NGFR/ bcl2/ integrin β 4 in normal epithelial cells. *Oncogene* 17 : 187-197 (1998)
4. Kikuchi, K. and Yasumoto, S., Retention of cell adhesion and growth capability in human cervical cancer cells deprived of cell anchorage. *Jpn. J. Cancer Res.* 90 : 867-873 (1999)

2. 学会発表

1. 菊地慶司、安本茂：浮遊培養系でのヒト重層扁平上皮細胞の最終分化誘導とアポトーシス。日本組織培養学会第70回大会、1997年5月 横浜
 2. 菊地慶司、太田雄治郎、堤康一郎、国村忠司、安本茂：ヒト上皮不死化細胞株での神経成長因子受容体 (p75NGFR) の発現とその機能。第56回日本癌学会総会、1997年9月 京都
 3. 菊地慶司、太田雄治郎、堤康一郎、国村忠司、安本茂：ヒト上皮細胞での神経成長因子受容体 (p75NGFR) の発現とその機能。第20回日本分子生物学会年会、1997年12月 京都
 4. 菊地慶司、森村茂、安本茂：足場喪失にともなうアポトーシスに対する子宮頸癌細胞の耐性。第57回日本癌学会総会、1998年10月 横浜
 5. 菊地慶司、森村茂、安本茂：足場喪失にともなうアポトーシスに対する子宮頸癌細胞の耐性。第21回日本分子生物学会年会、1998年12月 横浜
 6. 菊地慶司、森村茂、安本茂：ヒトがん細胞株でのカスパーゼの発現異常とアポトーシス。第58回日本癌学会総会、1999年9月、広島
- ### 3. その他
- 安本茂、菊地慶司、國村忠司；ヒトパピローマウイルスと多段階発癌。 *実験医学*、(1997) 15 : 167-174 (総説)

厚生科学研究費補助金（がん克服新10か年戦略研究事業）

総合研究報告書

分野 2 転移・浸潤およびがん細胞の特性に関する研究

研究課題 がんの浸潤・転移に関する病理学的及び分子生物学的研究

主任研究者 原田昌興（神奈川県立がんセンター臨床研究所長）

研究要旨 前立腺癌、乳癌等ホルモン依存性癌を含む浸潤転移性ヒトがんの実態および悪性化進展に関わる要因・分子機構を病理学的並びに分子生物学的に解析し、個々症例における的確な診断・予後指標、難治性がんに対する新たな制御方策の開発に資する知見の集積を目指し研究を行った。前立腺癌個々例は生物学的性状の異なる多様な組織構成を示し、浸潤・転移性癌ではアンドロゲン非依存性、高増殖能ほか多くの悪性形質の蓄積した髓様・索状増殖要素の組織内構成率が高率との特徴を示し、髓様・索状組織要素は量的に劣勢な組織要素であっても個々例の予後因子として重要であることを見出した。前立腺癌では Bcl-2 発現、神経内分泌細胞出現は予後不良指標となり、PTHrP 発現は骨転移と関連することを見出した。高率なマイクロサテライト異常を示す胃癌では、しばしば TGF β RII, BAX, hMSH3 遺伝子などの複合フレームシフト変異を認めるが、その変異態様は同一症例の部位、組織型により相違することを見出した。子宮頸癌、前立腺癌、胃癌など多くのヒトがん細胞は非足場依存性増殖能を示し、しばしばカスパーゼ1及び4の発現減弱・消失を認め、乳癌 MCF-7 ではカスパーゼ3も消失、カスパーゼ失調とがん細胞のアポトーシス抵抗性との関連が示唆された。がん細胞では抗癌剤などによりアポトーシスとは異なる 50kb 単位の DNA 断片化による細胞死が誘発される可能性が示唆された。非基質依存性増殖能を示す MCF-7 では、インテグリン β 4 の総発現量及び β 1 の細胞表面発現が著明に低下していることを見出し、浮遊状態での IGF-1 刺激に応答した細胞増殖には、基質接着増殖時の主要 DNA 合成系 (PI3K-PKB/Akt) に加え Raf1-MEK-ERK 系活性化の関与が示唆された。

分担研究者

原田昌興 神奈川県立がんセンター臨床研究所
所長

高橋和秀 神奈川県立がんセンター臨床研究所
専門研究員

松隈章一 神奈川県立がんセンター臨床研究所
主任研究員

菊地慶司 神奈川県立がんセンター臨床研究所
主任研究員

A. 研究目的

ヒトがんにおける浸潤・転移性がんの動的病態を知るためには、実際の臨床例の解析は不可欠である。代表的なホルモン依存性がんである前立腺癌は欧米においては以前から主要がん死因の一つで、近年は本邦においても増加傾向が著しく、その克服が重要課題となっている。がんの悪性度診断は一般に組織学的異型度を基本

とし量的に優勢な異型度をもって代表され、多数集積症例による統計的予後解析では組織異型度の予後因子としての有意性が認められる。しかし、多くのヒトがんは多様な組織構成を示し、個々症例の治療反応性、予後予測は組織異型度のみでは困難なことが少なくない。実際、主として内分泌療法により治療される進行性前立腺がん個々症例の臨床経過は、同一分化度、同一病期症例でも一様ではなく、治療反応性、再燃予知に関わる的確な診断指標の確立が望まれている。また、前立腺癌克服のためには悪性化進展に伴うアンドロゲン依存性喪失機構、高率な骨転移発生に関わる要因の解明が最も重要な課題とされている。がんの浸潤・転移形質の獲得過程に伴う遺伝子変異の集積にはがん細胞の特性の一つであるゲノム不安定性が関与すると想定されている。近年、遺伝性非腺腫性大腸癌の原因遺伝子としてミスマッチ修復遺伝子が同定され、マイクロサテライト不安定性に由来するとミスマッチ修復遺伝子異常、がん関連遺伝子蛋白コード領域のフレームシフト型変異の発がん、悪性化進展過程との関連が注目されている。ヒトがんにおけるマイクロサテライト変異とがん関連遺伝子変異の関連を解析することは、がん細胞の遺伝子不安定性獲得の実態を知る上で重要であるのみでなく、悪性化進展あるいは化学療法後の再燃予知の指標、新たながん制御法の開発にも寄与するものと考えられる。がん細胞の浸潤・転移性獲得過程においては、細胞間ないし細胞基質間接着分子機構の異常が重要な要因であることは疑いなく、ヒトがんにおける細胞間接着分子カドヘリン・カテニン系と浸潤・転移性との関連についてはかなり研究が進展しているが、上皮細胞系のがん進展過程における細胞基質間接着分子の動態、特にその細胞増殖シグナル伝達との関連についての知見は未だ乏しい。がんの浸潤・転移に関わる分子機構

の解明は難治性がん制御法開発のために重要な課題となる。また、がん細胞増殖特性の一つとして接触阻止現象の喪失、非足場依存性増殖能の獲得が知られている。つまり、正常上皮系細胞は非足場依存性状態ではアポトーシスに陥るが、がん細胞は浮遊培養下で増殖能を有しアポトーシス抵抗性を示す。従って、がんの発育進展過程には無限増殖能の獲得とともに、正常上皮系組織の恒常性維持に与る細胞死、アポトーシス過程の失調も関与していると想定される。上皮細胞においてアポトーシス過程に関わる蛋白の発現動態について、悪性化進展との関連のもとに系統的に解析し、細胞間ないし細胞基質間接着性喪失とアポトーシス抵抗性獲得との関連についての分子機構を解明することは、この分子機構を応用した新たながん転移抑制法開発への展開が期待される。本研究は、主要なヒトがんである上皮性悪性腫瘍、特に近年本邦でも増加傾向の著しい前立腺癌、乳癌などのホルモン依存性癌を視点に据え、浸潤・転移性癌の実態、特性についての病理学的解析、悪性化進展過程に関連する遺伝子不安定性を指標とする細胞遺伝学的解析、浸潤・転移能獲得に関わる接着分子と細胞増殖シグナル伝達系およびアポトーシス抵抗性との相互関連についての細胞生物学的解析を行い、個々症例に対する的確な診断、予後指標の確立、治療抵抗性がん発生の機構、要因を明らかにしその制御方策の開発に資する知見の集積を目指す研究である。

B. 研究方法

(1) 前立腺癌の増殖浸潤・転移ならびに再燃の病理学的研究

前立腺癌個々症例の内分泌療法に対する反応性、的確な悪性度診断、予後指標の確立及び高率な骨転移に関わる要因の解明を目指して、浸潤・転移性前立腺癌の病理学的特性について生

検組織材料、前立腺摘出術材料、剖検組織などを用いて解析した。前立腺癌診断時の生検組織を用い、アンドロゲン受容体、増殖周期細胞核抗原 Ki-67、アポトーシス関連蛋白 Bcl-2、接着分子 E-カドヘリン、神経内分泌細胞の指標としてのクロモグラニン A、ニューロン特異エノラーゼ、副甲状腺ホルモン関連蛋白 PTHrP など種々形質の発現動態の免疫組織化学的に検索、7番、11番、17番および X、Y 染色体特異プローブを用いた *in situ hybridization* 法による染色体数的異常細胞の検索を行い、分化度、Gleason 分類、WHO 組織型構成率などとの対応のもとに分析検討した。一部症例については TRAP assay によるテロメラーゼ活性の測定を行い鏡面組織による組織学的所見との対応を検討した。併せて内分泌療法施行後の予後解析を行い、種々検索項目の予後指標としての意義を検討した。

(2) がんの進展過程における遺伝子不安定性に関する研究

がんの悪性化進展における遺伝子不安定性の関与について予備的検討を行うため、遺伝子変異の定量的試験系として開発されたトランスジェニックマウス Big blue を用い、発がん刺激の種類、暴露時期等による変異集積性の相違および誘発変異のスペクトラム解析を行った。ついで、ヒト胃がん臨床外科材料を用い、癌部と非癌部のそれぞれの組織から DNA を調整し、8 染色体の 13 遺伝子座のマーカーを用いてマイクロサテライト変異の有無を検索し、併せて遺伝子蛋白コード領域に単純塩基繰り返し配列を含むミスマッチ修復遺伝子 hMSH3、がん関連遺伝子 BAX、TGF β RII の変異を PCR 法により検出し、塩基配列決定により検出変異遺伝子の変異様式の解析を行った。また、一部症例については癌巢の異なる部位及び所属リンパ節組織から抽出した DNA を用いて同様に遺伝子変異の有無を組織像との対応のもとに検索した。

(3) がん細胞の接着喪失に伴うアポトーシス耐性の獲得

がんの進展過程におけるアポトーシス抵抗性の実態を解析するために、正常子宮頸部扁平上皮、HPV16 型 DNA 導入による不死化頸管上皮及び子宮頸癌細胞 3 株 (C33A, SiHa, Caski) を用い、アポトーシス関連蛋白 Bcl-2 ファミリーの発現動態、非足場依存性増殖モデル・浮遊培養系におけるアポトーシス誘導の有無についての検討を行った。また、これらの細胞系に発現するカスパーゼの 3'-RACE 法による同定、および発現カスパーゼの RT-PCR 法による mRNA レベルおよびウエスタン解析による蛋白レベルの発現についての解析を行った。さらに、ヒト前立腺癌細胞 4 株 (LNCaP, PC-3, DU-145, TSU-P1)、胃癌細胞 4 株 (STKM1, STKM2, MKN28, MKN45)、乳癌細胞 1 株 (MCF-7) についてのカスパーゼ蛋白発現、抗癌剤、アポトーシス誘導剤に対する反応性について検討した。

(4) 細胞基質間接着による増殖制御に関する研究

浸潤・転移に関わる分子機構、がん細胞の特性の一つである非足場依存性増殖における接着分子動態と増殖シグナル伝達経路の関連を解析するために、正常乳腺上皮及び乳癌細胞系 MCF-7 の培養細胞を用い、細胞基質間接着に関与する接着分子インテグリン-アクチン系の発現動態および IGF-1 刺激による DNA 合成系活性化・増殖シグナル伝達系について、各種酵素阻害剤、特異抗体を用いた免疫沈降法、ウエスタン分析、酵素基質のリン酸化活性の測定、フローサイトメトリー法等により解析した。

(倫理面への配慮)

臨床材料による検索は、神奈川県立がんセンター病院検査科に提出された病理組織材料を用いて行ったものであるが、検索に当たっては特

に患者個人を識別することなく結果の解析を行い、個人のプライバシーの侵害、差別化などに関わるものではないと考える。細胞系などによる検索は、市販されている系ないし供与者の了解のもとに使用したもので倫理面での問題はないと判断した。

C. 結果

(1) 前立腺癌の増殖浸潤・転移ならびに再燃の病理学的研究

前立腺癌全摘術施行例および剖検例の検討から、臨床的組織内限局性癌の半数は病理学的にはすでに被膜貫通性浸潤を、25%~27%に精嚢浸潤ないしリンパ節転移を認め、低分化・高異型度例ほど浸潤頻度は高率であった。WHO組織型に準拠した6組織型、単純腺管・微小腺管・篩状腺管・融合腺管・髓様増殖・索状増殖要素の構成率を分析した結果、前立腺癌は一般に多様な組織構成を示し、浸潤・転移癌では髓様・索状増殖要素の構成率が有意に高率との特徴を認めた。この髓様・索状要素の約50%はアンドロゲン受容体(AR)の発現が陰性化し、Ki-67標識率は有意に高く高増殖能を有することが示された。浸潤・転移陽性例では組織内限局癌に比してテロメラーゼ高活性例が多く、テロメラーゼ高活性群では髓様・索状要素の平均構成率が高率で、Ki-67標識率も有意に高値との特徴を示した。Bcl-2発現例でも同様に陰性例に比して髓様・索状要素の構成率が高く、Ki-67標識率高値、同一分化度症例群でも予後不良の傾向を認めた。さらに、LH-RH analog 投与効果不全例の投与後組織では、投与前には発現のないBcl-2発現がしばしば認められ、Ki-67標識率も上昇していた。初診断時骨転移陽性例ではE-カドヘリンの発現低下ないしは分布異常が70%の症例に認められ、E-カドヘリン発現異常と転移性との関連が窺われた。Bcl-2蛋白発現も転移陽性例で明らかに高

率であり、発現例の予後は陰性例に比して明らかに不良であった。E-カドヘリンの発現異常例、Bcl-2陽性例では分化不良の髓様・融合索状増殖要素の構成率が高率な傾向、Ki-67標識率も高い傾向を示した。転移陽性例の中でもBcl-2陽性、E-カドヘリン発現異常の複合例の予後はきわめて不良であることが示された。染色体数的異常細胞の検索でも、髓様・索状要素の部分では多倍体細胞出現率が有意に高率な傾向が認められた。神経内分泌細胞出現も、髓様・索状要素の構成率の高い、Ki-67標識率高値例に多く見られ、PTHrP発現は骨転移陽性例に高率に認められた。髓様・索状組織型の構成率のみで0%、1-20%、21%以上に群別した症例群の内分泌療法後の予後は有意に異なっていた。

(2) がんの進展過程における遺伝子不安定性に関する研究

トランスジェニックマウス(Big blue)における、発がん剤刺激による誘発変異発生率は曝露時期(胎齢)で異なり、胎齢12.5日までは増加し以後減少する、また誘発変異のスペクトラムも異種物質(ENU, MNU)では相違することが明らかにされた。胃癌症例40例を対象として、外科的切除組織材料の癌部および非癌部組織より抽出したDNAを検体として用い、8染色体の13遺伝子座のマーカーによりマイクロサテライト不安定性(MSI)について検索した結果、15例・38%に異常(8%~92%)が検出された。これら15例中10例(25%)は40%以下(9~40%)の座位でのみMSIを認めるにとどまったが、5例・13%では検索マーカーの50%以上(50%~92%)の座位に集積してMSIが認められた。これらの高率なMSIを示した症例において、遺伝子コード領域に単純塩基繰り返し配列を含むがん関連遺伝子Bax, TGFβRII およびミスマッチ修復遺伝子hMSH3遺伝子の異常を検索した結果、フレームシフト型変異がそれぞれ3例づつ見出

され、4例では2種の遺伝子に複合変異を認めた。40%以下の座位にしかMSIの認められなかった10例ではこれらの遺伝子変異は認められなかった。TGF β RIIおよびhMSH3遺伝子の複合変異の認められた症例において、癌組織における12箇所の異なる部位から抽出したDNAを用い、その変異態様を検索したところ、組織学的に大部分を占める中分化管状腺癌 tub2 の領域ではTGF β RIIのフレームシフト型変異が、劣勢な組織要素である低分化腺癌 por1 領域ではhMSH3遺伝子の変異のみが認められ、組織型部位により遺伝子変異態様の異なることが見出された。ちなみに、転移リンパ節からの検体ではTGF β RIIの異常が検出されたが、転移組織は原発巣同様 tub2 の組織型を示すものであった。

(3) がん細胞の接着喪失に伴うアポトーシス耐性の獲得

正常子宮頸管上皮 (NCE)、HPV16 遺伝子導入による不死化細胞 (NCE16) 及び子宮頸癌細胞の非足場依存性増殖モデル・浮遊培養系における増殖動態を検討した。浮遊培養 48 時間後、NCE ではカルシウム依存性のアポトーシスが誘導されたが、NCE16 及び子宮頸癌細胞 C33A、SiHa はアポトーシス抵抗性を示した。不死化 NCE16 細胞ではアポトーシス制御系遺伝子 Bcl-2 発現レベルの増大、Bak, Bax 発現の減弱が認められた。また、子宮頸癌細胞系ではアポトーシス実行に関連する遺伝子蛋白カスパーゼ 1 の発現も初代培養細胞に比して明らかに減弱ないし消失を認めた。さらに、上皮細胞系で発現するカスパーゼについて、カスパーゼ遺伝子群の酵素活性中心に保存されている共通塩基配列を PCR の 5'末端側プライマーとして用いて、3'-RACE (Rapid Amplification of cDNA End) 法によるクローニングを試みた結果、子宮頸管上皮にはカスパーゼ 3、4、5、7 の発現が同定された。頸癌細胞 C33A, SiHa 等と共に複数のヒトがん細胞系におけるカスパーゼ 1、4、3、7 の発現を検索した結果、子宮頸癌 C33A、前立腺癌 2/4、胃癌 2/4、乳癌 MCF-7 においてカスパーゼ 4 および 1 の発現減弱ないし消失を認め、前立腺癌細胞ではカスパーゼ 1 の消失は全細胞系で認められた。また、乳癌細胞 MCF-7 においてはカスパーゼ 3 も消失していた。このカスパーゼ 1、4、3 の消失した MCF-7 は抗癌剤ないしアポトーシス誘導剤スタウロスポリン処理によりヌクレオゾーム単位の DNA 断片化・アポトーシスは誘導されず、50kb 単位の DNA 断片化を示し、この DNA 断片化はカスパーゼ 3、7 の阻害剤ないしセリンプロテアーゼ阻害剤により抑制された。

胞系におけるカスパーゼ 1、4、3、7 の発現を検索した結果、子宮頸癌 C33A、前立腺癌 2/4、胃癌 2/4、乳癌 MCF-7 においてカスパーゼ 4 および 1 の発現減弱ないし消失を認め、前立腺癌細胞ではカスパーゼ 1 の消失は全細胞系で認められた。また、乳癌細胞 MCF-7 においてはカスパーゼ 3 も消失していた。このカスパーゼ 1、4、3 の消失した MCF-7 は抗癌剤ないしアポトーシス誘導剤スタウロスポリン処理によりヌクレオゾーム単位の DNA 断片化・アポトーシスは誘導されず、50kb 単位の DNA 断片化を示し、この DNA 断片化はカスパーゼ 3、7 の阻害剤ないしセリンプロテアーゼ阻害剤により抑制された。

(4) 細胞基質間接着による増殖制御に関する研究

正常乳腺上皮と乳癌細胞 MCF-7 の培養細胞系を用い、がん細胞の特性の一つとしての非足場依存性細胞増殖に関わる細胞基質間接着分子機構とそのシグナル伝達について解析した。MCF-7 は正常細胞に比して培養基質への接着時間は早い、接着力は正常細胞の方が強固であった。この基質への接着はインテグリン β 1、 β 4 に対する機能阻害抗体により阻害されるが、正常乳腺上皮ではより高い抗体濃度が必要とされた。正常乳腺上皮の基質接着はアクチンの重合阻害剤により阻害されないが、基質上伸展は強く阻害され、DNA 合成も著明に阻害された。基質接着細胞ではインテグリン β 1 と α アクチニン、アクチンとの共存が免疫沈降法および免疫染色により確認され、基質上での伸展過程ではアクチン線維がまず伸展先進部に伸長し、次いでインテグリン β 1 を足掛かりに α アクチニンが移動することが観察された。乳癌細胞 MCF-7 ではインテグリン β 4 の発現が正常細胞 60-70% に低下し、 β 1 の細胞表面での発現量も正常細胞の 10% に過ぎず、基質接着に依存せずに増殖刺激 IGF-1 に応答して増殖し得る。この MCF-7 における

IGF-1 の増殖シグナル伝達を解析した結果、IGF-1 で活性化される PI-3K の標的分子 PKB/Akt のリン酸化・活性化は基質接着時、poly-HEME により接着を阻害した浮遊状態ともに認められたが、浮遊状態では基質接着時の PI3K-PKB/Akt の系に加えて、Raf 1-MEK (MAPKK) - ERK (MAPK) の活性化が観察され、この IGF-1 依存性 ERK 活性化は PI-3K の特異的阻害剤および MEK の阻害剤両者によっては阻害された。

これらの研究結果から、ヒトがんの進展に関わる要因としてテロメラーゼ高活性化、増殖周期細胞率の増大等による細胞増殖活性の増大、E-カドヘリン発現異常、インテグリン発現低下などの細胞間及び細胞基質間接着分子の失調、および Bcl-2 発現の増大、Bax 発現低下、さらにカスパーゼ群の発現低下消失などによる細胞死抵抗性の獲得等の関与が示唆される。この細胞増殖活性の増大あるいはアポトーシス抵抗性獲得にはマイクロサテライト不安定性に関連した TGF β RII 遺伝子変異ないし Bax 遺伝子変異等も関与している可能性が示唆される。また、非足場依存性増殖能を獲得したがん細胞では正常ないし足場依存性増殖細胞とは異なる増殖刺激シグナル伝達系の活性化されている可能性も想定される。

D. 考察

がんは本来モノクローナルな増殖を示すとされているが、実際のヒトがんにおいてはしばしば多様な組織構成を示す。前立腺癌臨床例の病理学的解析により同一症例においてもアンドロゲン依存性、増殖能、アポトーシス関連遺伝子蛋白発現、テロメラーゼ活性等の生物学的性状の異なる組織要素の混在が認められた事実は、個々症例の動的病態の複雑性を示す重要な知見と考えられる。臨床的早期前立腺癌において、病理学的には既に隣接臓器浸潤あるいはリンパ

節転移を示していた多数の症例の認められたことは病期診断の難しさを物語るものである。早期浸潤・転移例では組織学的に低分化・高異型度の髄様・索状組織要素の優勢増殖が特徴的であり、これらの優勢増殖組織要素はアンドロゲン非依存性でアポトーシス抑制的形質 (Bcl-2) 発現、高増殖能、テロメラーゼ高活性、E-カドヘリンの細胞膜表面での発現低下ないし分布異常等の特性を示し、染色体数的異常細胞の出現率も高率で多くの悪性化形質が蓄積されている可能性が示唆される。同一分化度症例においても Bcl-2 発現例では予後不良との結果は Bcl-2 発現の予後因子としての重要性を示す結果であり、予後想定指標としての実際の臨床応用も可能と考えられる。また、神経内分泌性細胞は傍分泌的に増殖因子を分泌し、悪性化進展に関わる要因として注目されているが、本研究においても神経内分泌細胞陽性例では増殖周期細胞率が陰性例に比べ有意に高値を示し、予後不良であったことは今後より詳細な検討を要する課題と考えられる。一種の神経内分泌的蛋白 PTHrP の機能は完全には解明されていないが、骨転移陽性例では高率に発現の認められたことは PTHrP は前立腺癌の高率骨転移の要因としての関与を示唆する結果と考えられる。がんの悪性度診断は主として優勢な組織学的異型度を基本としてなされ、異なる異型度要素の混在例では通常優勢組織像により代表されるが、前立腺癌においては臨床的早期癌でも髄様・索状組織要素の構成率の高い症例は既に多くが進行癌であったこと、また、逆に浸潤・転移癌では髄様・索状要素の組織構成率が高率であり、髄様・索状要素の構成率のみにより群別した症例群の予後は有意に異なるとの事実は、個々例の治療反応性、予後はたとえ劣勢な組織要素であっても多くの悪性形質の蓄積した高異型度要素の混在により左右されている可能性を示唆する結果と考えられる。

近年、遺伝性非腺腫性大腸癌のみならず前立腺癌などにおいてもマイクロサテライト不安定性に関連して、アポトーシス促進的作用遺伝子 Bax、上皮細胞増殖抑制的蛋白 TGF β の受容体遺伝子にフレームシフト型変異が高率に認められ、ミスマッチ修復異常とがん悪性化進展との関係が注目されている。胃癌臨床例におけるマイクロサテライト不安定性と Bax、TGF β RII およびミスマッチ修復遺伝子 hMSH3 の変異についての検討で、高頻度のマイクロサテライト異常を示す胃癌では、これらの遺伝子のフレームシフト型変異が検出され、しかも複数の遺伝子変異を示した症例が高頻度であったことは注目すべき結果と考えられる。すなわち、実際にがんの進展過程に関与する遺伝子変異の集積にはマイクロサテライト不安定性の関与している可能性を強く示唆する結果と考えられる。さらに、同一症例においても部位、組織型により変異遺伝子、変異態様は異なっていたことは、前立腺癌の組織学的多様性と同様、ヒトがんにおける多段階進展機構の複雑性、既存の混在高悪性組織要素の選択的増殖と共に、生体微小環境要因の相違等による発現形質の転換の可能性を示唆する結果と考えられる。遺伝子変異の集積性、多様性は遺伝子変異修復系を含む生体の背景因子および環境因子の相違によりもたらされる可能性はトランスジェニックマウスを用いた実験的検討からも示唆される。従って、今後ヒトがんの分子生物学的解析にあたっては、詳細な組織分析などとの対応のもとに検討する必要がある。現時点では検索症例数が少なく、症例の背景因子も多岐に亘り、遺伝子異常の同定された症例の臨床病理的特性については明らかではないが、高率なマイクロサテライト異常を示す症例は複数の遺伝子変異が集積しやすく、短期間に悪性化進展する可能性も想定され、これらの症例の特性についての解析は今後の重要な課題となる

と思われる。

前立腺癌において Bcl-2 蛋白の発現は転移陽性例で明らかに高率で、内分泌療法後の再燃癌で陽性転化例の存在したことは、アポトーシス抵抗性と進行癌の関連を示唆する知見と考えられる。また、実験的にも子宮頸管上皮系においてその不死化、がん化過程に伴い細胞死抑制的に作用する Bcl-2 蛋白発現の亢進、アポトーシス促進作用を示す Bax、Bak 発現の減弱・消失が認められ、子宮頸癌細胞は非足場依存性増殖モデル浮遊培養系において正常頸管上皮にみられるアポトーシスを示さず、がん細胞のアポトーシス抵抗性獲得と悪性化進展との関連を示唆する重要知見と考えられる。このアノイキス抵抗性を示す子宮頸癌細胞株はじめ前立腺癌、胃癌細胞系の多くがアポトーシス実行系酵素蛋白カスパーゼ 1 あるいは 4 の発現減弱・消失を示し、乳癌細胞 MCF-7 ではカスパーゼ 3 の消失も認められ、これらの細胞系はいずれも転移巣より樹立された細胞系であることを考慮すると、転移性がん細胞における細胞死抵抗性獲得過程でのカスパーゼ失調の関与が示唆される。乳癌細胞 MCF-7 はアポトーシス誘導作用物質処理により 50kb 単位の DNA 断片化を示し、この断片化がセリンプロテアーゼ阻害剤により抑制されたことは、ある種のがん細胞ではセリンプロテアーゼ系活性化によるこの 50kb の DNA 断片化が細胞死に直結する系として存在する可能性を示唆するものと考えられる。

乳癌細胞 MCF-7 の非足場依存性増殖に関連して、細胞基質間接着分子動態の検討からインテグリン $\beta 4$ の総発現および $\beta 1$ の細胞表面での著明低下の認められたことは、浸潤能獲得過程における細胞間接着分子カドヘリン-カテニン系の失調の重要性と共に、細胞基質間接着性に関わる分子機構の重要性の一端を示すものと考えられる。インテグリンは接着分子としての機能

と共に、細胞外シグナル受容体、増殖シグナル伝達系としての重要性も示唆されている。MCF-7において、浮遊培養時には IGF-1 刺激により基質接着増殖時に活性化される PI3K-PKB/Akt系に加えてRaf-MEK-ERK系の活性化が認められたことは、アノキス抵抗性がん細胞では細胞基質接着分子の失調に伴い正常細胞とは異なるDNA合成系を活用している可能性を示すと共に、増殖カスケード相互のクロストークの存在を示唆する知見と考えられる。

E. 結論

ヒトがん個々症例はしばしば発現形質の異なる組織要素の混在からなり、浸潤・転移性がんはより多くの悪性形質の蓄積した組織要素の優勢増殖を特徴とするが、遺伝子変異の態様はしばしば同一症例内の部位、組織型により異なり、患者病態、予後予測には組織像に対応した遺伝子発現の詳細な分析の必要性が示唆される。がん細胞の浸潤、転移能獲得過程には、細胞外シグナル伝達系としての接着分子異常に伴う生理的状态とは異なる細胞増殖系の活性化及びアポトーシス関連分子の失調による細胞死抵抗性の関与が示唆される。これらの研究成果をもとに、今後さらに浸潤転移性ヒトがんの特性、clonal evolution に関与が想定される各要因相互の関連性を詳細な組織像の検索との対応のもとに詳細に分析し、的確な診断指標、がんの個性に対応した制御方策の構築が必要と考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Lin, Y., Uemura, H., Fujinami, K., Hosaka, M., Harada, M. and Kubota, Y.: Telomerase activity in primary prostate cancer. *J. Urol.*, (1997) 157 : 1161-1165

2. 近藤猪一郎、三浦 猛、藤波 潔、里見佳

昭、井田時雄、石塚栄一、上村博司、野口純男、窪田吉信、穂坂正彦、原田昌興：前立腺癌初診時生検組織と全摘標本組織およびリンパ節転移組織の比較。 *泌尿紀要*, (1997) 43:97-101

3. 吉田 明、大沢やすよ、麻賀太郎、河原 悟、中村圭靖、清水昭男、原田昌興：乳癌予後因子としての bcl-2 蛋白発現—p53 蛋白発現との比較—。 *日臨外医学会誌*, (1997) 58 : 507-512

4. Lin Y, Uemura H, Fujinami K, Hosaka M, Iwasaki Y, Harada M and Kubota Y : Detection of telomerase activity in prostate needle-biopsy samples. *Prostate*, (1998) 36: 121-128.

5. Nemoto R, Nakamura I, Uchida K and Harada M : Numeric chromosome aberration in prostate cancer detected by in situ hybridization. *Int J Clin Oncol*, (1998) 3 : 138-142.

6. Noguchi K, Harada M, Masuda M, Takeda M, Kinoshita Y, Fukushima S, Miyai K, Fukuoka H and Hosaka M : Clinical significance of interruption of therapy with allylestrenol in patients with benign prostatic hyperplasia. *Int J Urol*, (1998) 5: 466-470.

7. 原田昌興. 前立腺癌の組織学的分類— Gleason 分類の意義—. *病理と臨床* (1998) 16 : 1381-1386.

8. 原田昌興. 前立腺癌の予後規定因子—病理学的立場より—. *腎と透析* (1998) 44 : 749-753.

9. Masuda M, Iki M, Noguchi S, Mikata K, Kubota Y, Harada M, Hosaka M : The worst histologic elements predict prognosis in moderately-differentiated prostate cancer patients with androgen-withdrawal endocrine therapy. *Eur Urol*, (1999) 36: 197-202.

10. Yoshida A, Nakamura Y, Imada T, Asaga T, Shimizu A, Harada M : Apoptosis and proliferative activity in thyroid tumors. *Jpn J Surg*, (1999) 29: 204-208.

11. Ochi T, Nakajima F, Shimizu A, Harada M :

- Induction of multinucleated cells in V79 Chinese hamster cells exposed to dimethylarsinic acid, a methylated derivative of inorganic arsenics : Mechanism associated with the formation of aberrant mitotic spindles. *Toxicol in Vitro*, (1999) 13: 11-25.
12. 原田昌興 : 前立腺癌の組織異型度—Gleason 分類と本邦取扱い規約分化度分類の比較. *泌尿器外科*, (2000) 13: 135-138
13. 原田昌興 : 前立腺に発生する神経内分泌腫瘍. *病理と臨床*, (1999) 17: 1269-1273
14. 原田昌興, 根本良介 : Gleason 分類の本邦取扱い規約および WHO 組織分類との関連. *泌尿器外科*, (1999) 12: 1033-1036
15. Chen T, Yamamoto S, Kitano M, Murai T, Wanibuchi H, Matsukuma S, Nakatsuru Y, Ishikawa T and Fukushima S. Possible rare involvement of O6-methylguanine formation as a significant mutational factor in mouse urinary bladder carcinogenesis models. *Teratog Carcinog Mutag*, (1998) 18: 101-110 .
16. Matsukuma S, Kondo M, Yoshihara M, Matsuda M, Utakoji T and Sutou S. Mea2/Golga3 gene is disrupted in line of transgenic mice with a reciprocal translocation between chromosome 5 and 19 and is responsible for defective spermatogenesis in homozygotes. *Mammal Genom* (1999) 10 :1-5.
17. Tsukatani Y, Suzuki K and Takahashi K: Loss of density-dependent growth inhibition and dissociation of α -catenin from E-cadherin. *J Cell Physiol*, (1997) 173:54-63
18. Takahashi K, and Suzuki, K and Tukatani Y : Induction of tyrosine phosphorylation and association of β -catenin with EGF receptor upon tryptic digestion of quiescent cells at confluence. *Oncogene*, 15: 71-78 (1997).
19. Takahashi K : Cadherin-mediated cell-cell adhesion and growth regulation. *Curr Topics Biochem Res*, (1999) 1: 249-253
20. Suzuki K, Takahashi K : Reduced substratum adhesion and decreased expression of $\beta 1$ and $\beta 4$ integrins in human breast cancer cells with a property of anchorage-independent cell growth. *Int J Oncol*, (1999) 14 : 897-904
21. Kikuchi K, Ohta Y, Tsutsumi K and Yasumoto S. Time correlation of commitment to calcium induced-apoptosis and terminal differentiation in human ectocervical keratinocytes in suspension culture. *Cell Growth Differentiation*, 8 : 571-579 (1997).
22. Ohta Y, Tsutsumi K, Kikuchi K and Yasumoto S. Two distinct human uterine cervical epithelial cell lines established after transfection with human papillomavirus 16 DNA. *Jpn J Cancer Res*, 88: 644-651 (1997)
23. Kunimura C, Kikuchi K, Ahmed N, Shimizu A and Yasumoto S. Telomerase activity in a specific cell subset co-expressing integrin $\beta 1$ /EGFR but not p75NGFR/bcl-2/ integrin $\beta 4$ in normal epithelial cells. *Oncogene*, (1998) 17 : 187-199.
24. Kikuchi K, Yasumoto S : Retention of cell adhesion and growth capability in human cervical cancer cells deprived of cell anchorage. *Jpn J Cancer Res*, (1999) 90: 867-873.
2. 学会発表
1. 原田昌興、中村圭靖、清水昭男、亀田陽一、山口正直、飯田萬一 : 前立腺癌 WHO 分類組織型 の特性と予後. 第 86 回日本病理学会総会 (1997).
2. 清水昭男、中村圭靖、林幹也、亀田陽一、山口正直、飯田萬一、原田昌興、菊地慶司、安本 茂 : 食道早期癌における Bcl-2 蛋白ならびに nerve growth factor receptor (NGFR) の発現について. 第 86 回日本病理学会総会 (1997).

3. 林 毅、上村博司、藤浪潔、窪田吉信、穂坂正彦、原田昌興：ヒト前立腺癌におけるテロメラーゼ活性. 第 85 回日本泌尿器科学会総会 (1997).
4. 根本良介、中村勇夫、西嶋由貴子、内田克紀、原田昌興：骨転移マーカーとしての血清 Pyridinoline—実験モデルと臨床成績. 第 85 回日本泌尿器科学会総会 (1997).
5. 原田昌興、根本良介、中村勇夫、内田克紀：前立腺癌に対する LH-RH アナログ 単独投与の組織学的効果. 第 85 回日本泌尿器科学会総会 (1997).
6. 原田昌興、中村圭靖、清水昭男、亀田陽一、山口正直、飯田萬一：前立腺癌の進展・転移の実態に関する病理学的検討. 第 56 回日本癌学会総会 (1997).
7. 西嶋由貴子、内田克紀、赤座英之、根本良介、原田昌興：LNCaP を用いたマウス頭頂骨骨転移モデルの作成. 第 56 回日本癌学会総会 (1997).
8. 内田克紀、島居徹、赤座英之、友部光朗、服部一紀、根本良介、原田昌興：膀胱癌における予後因子としての組織異型度、浸潤度、各種染色体の数的異常、KI-67, AGNOR, Bcl-2 発現の比較. 第 56 回日本癌学会総会 (1997).
9. Harada M, Nakamura Y, Shimizu A, Lin, Y, Kubota Y, Hosaka M: Histochemical expression of Ki-67, Bcl-2, AR, and telomerase activity in prostatic adenocarcinoma. 22nd International Congress of the International Academy of Pathology (1998)
10. 原田昌興、亀田陽一、山口正直、清水昭男、中村圭靖、飯田萬一：前立腺癌全摘術症例の病理学的検討. 第 87 回日本病理学会総会 (1998)
11. 太田幸子、上田明子、越智崇文、原田昌興、山本興太郎：ヒト線維芽細胞における紫外線と過酸化水素による 8-ヒドロキシデオキシグアニン生成に対する L-ヒスチジンの増強作用. 第 57 回日本癌学会総会 (1998)
12. 西嶋由貴子、根本良介、中村勇夫、内田克紀、原田昌興：血中 hydroxypyridinoline の骨転移マーカーとしての有用性—前立腺癌臨床例での検討. 第 57 回日本癌学会総会 (1998)
13. 吉田 明、中村圭靖、清水昭男、原田昌興、平川昭平、麻賀太郎：乳癌組織における erbB2 蛋白発現と抗エストロゲン剤. 第 6 回日本乳癌学会総会 (1998)
14. 三浦 猛、原田昌興、甲斐祥生、小柴 健、神奈川県前立腺腫瘍研究会：80 歳以上高齢者前立腺癌患者に対する除根術あるいは酢酸クロルマジノン投与による治療効果. 第 36 回日本癌治療学会総会 (1998)
15. 原田昌興、中村圭靖、根本良介、窪田吉信、内田克紀、清水昭男：前立腺癌組織の多様性に関する組織化学的・分子生物学的解析. 第 58 回日本癌学会総会 (1999)
16. 三好康秀、上村博司、藤浪潔、池田直弥、三好代志子、北村均、原田昌興、窪田吉信、穂坂正彦：FISH法を用いた前立腺癌における c-myc, androgen receptor 遺伝子増幅及び 8 番、X 染色体数の異常の解析. 第 58 回日本癌学会総会 (1999)
17. 西嶋由貴子、内田克紀、赤座英之、根本良介、原田昌興：LNCaP による骨転移像—マウスの頭頂骨骨転移モデルによる検討. 第 58 回日本癌学会総会 (1999)
18. 原田昌興、中村圭靖、清水昭男、亀田陽一、山口正直：進行前立腺癌の病理学的特性に関する組織化学的検討. 第 88 回日本病理学会総会 (1999)
19. 高瀬和紀、上村博司、窪田吉信、穂坂正彦、原田昌興：前立腺癌組織における human TR3 orphan receptor の発現と Ki-67 標識率について. 第 87 回日本泌尿器科学会総会 (1999)
20. 増田光伸、野口純夫、窪田吉信、原田昌興、穂坂正彦：中分化前立腺癌における充実性 (髓

- 様) / 索状 (柱状) 組織構築成分の意義について. 第 87 回日本泌尿器科学会総会 (1999)
21. 原田昌興: 前立腺癌の悪性度分類—本邦規約分類と Gleason 分類の比較. 第 64 回日本泌尿器科学会東部総会 (1999)
22. 原田昌興: 前立腺癌 Gleason 分類の実際. 第 4 回日本外科病理学会学術総会 (1999)
23. 吉田明、中村圭靖、清水昭男、原田昌興、永野篤、麻賀太郎: 乳癌組織における parathyroid hormone-related protein (PTHrP) の発現と骨転移. 第 7 回日本乳癌学会総会 (1999)
24. 松隈章一、吉原光代: マイクロサテライト多型による C3H マウスの肝臓腫瘍発生の遺伝的特性の解析. 第 56 回日本癌学会総会 (1997).
25. 吉原光代、宇多小路正、長尾美奈子、松隈章一: Bigblue マウスにおける自然発生突然変異の DNA 修復遺伝子 *ada* トランスジーンによる差異. 第 56 回日本癌学会総会 (1996).
26. 松隈章一、吉原光代、吉川貴己、西連寺意典: 胃がんにおける DNA マイクロサテライト不安定性及び BAX, TGF β RII 遺伝子の frame shift 変異. 第 57 回日本癌学会総会 (1998)
27. 松隈章一、吉原光代、宇多小路正: マウス染色体における転座断端と転座に伴う微小欠失の radiation hybrid による mapping 解析. 第 58 回日本癌学会総会 (1999)
28. 高橋和秀、鈴木勝雄: EGF 受容体によるベータ・カテニンのチロシンリン酸化と増殖時のチロシンリン酸化ベータ・カテニンの役割. 第 56 回日本癌学会総会 (1997).
29. 高橋和秀、鈴木勝雄: 上皮細胞・基質間接着におけるアクチンの役割. 第 50 回日本細胞生物学会大会 (1997).
30. 鈴木勝雄、高橋和秀: ヒト乳癌細胞における増殖シグナル伝達と抗細胞死シグナル伝達. 第 57 回日本癌学会総会 (1998)
31. 高橋和秀、鈴木勝雄: 浮遊細胞特異的な PI3K を介した MAP キナーゼの活性化. 第 58 回日本癌学会総会 (1999)
32. 菊地慶司、安本茂: 浮遊培養系でのヒト重層扁平上皮細胞の最終分化誘導とアポトーシス. 第 70 回日本組織培養学会大会 (1997).
33. 菊地慶司、太田雄治郎、堤康一郎、国村忠司、安本茂: ヒト上皮不死化細胞株での神経成長因子受容体 (p75NGFR) の発現とその機能. 第 56 回日本癌学会総会 (1997).
34. 太田雄治郎、菊地慶司、堤康一郎、安本茂: 低親和性神経細胞成長因子レセプターを発現するヒト不死化細胞の特性. 第 56 回日本癌学会総会 (1997).
35. 高須賀晶子、菊地慶司、安本茂: HPV16 不死化ヒトケラチノサイトにおける接着による EGF レセプターと初期遺伝子 *egr-1* 発現の調節: 足場依存性増殖における役割. 第 56 回日本癌学会総会 (1997).
36. 菊地慶司、太田雄治郎、堤康一郎、国村忠司、安本茂: ヒト上皮細胞での神経成長因子受容体 (p75NGFR) の発現とその機能. 第 20 回日本分子生物学会年会 (1997).
37. 菊地慶司、森村 茂、安本 茂: 足場喪失にともなうアポトーシスに対する子宮頸癌細胞の耐性. 第 57 回日本癌学会総会、第 21 回日本分子生物学会年 (1998)
38. 菊地慶司、森村茂、安本茂: ヒトがん細胞株でのカスパーゼの発現異常とアポトーシス. 第 58 回日本癌学会総会 (1999)
39. 安本茂、木口一成、菊地慶司、国村忠司、森村茂: ヒト再生上皮幹細胞の分離培養と発癌実験系構築の試み. 第 58 回日本癌学会総会 (1999)