

転移・浸潤に関わる接着因子の解析

分担研究者 神奈木 玲児 愛知県がんセンター・研究所分子病態学部・部長

研究要旨:接着分子セレクチンを介する細胞接着は癌の血行性転移において重要な役割を演じる。我々は近年遺伝子クローニングの進展したゴルジ装置の糖ヌクレオチド・トランスポーターmRNAの大腸癌における発現を検索し、UDP-ガラクトースのトランスポーターが癌細胞で有意に増大する事を見出した。このトランスポーター遺伝子を細胞に導入する事により、セレクチンのリガンドであるシアリルLe^xおよびシアリルLe^aの発現が著明に誘導された。また、右半大腸の癌組織において特異的に増加する6-硫酸基転移酵素アイソザイムを見出した。左半にくらべて右半大腸癌は従来から診断が困難で発見が遅れがちであり、本酵素およびその特異的産物を検出することにより、新しい診断法が樹立可能と考えられた。

A.研究目的

浸潤・転移における細胞接着分子の役割を、セレクチン並びにその特異的リガンド分子とに焦点をあて解析する。これらの解析により、浸潤・転移の早期検出と有効な防止法を可能とする。また、悪性細胞における細胞接着分子の異常発現を導く分子機構を解析する。本年度は特に、近年遺伝子クローニングの進展したゴルジ装置の糖ヌクレオチド・トランスポーターの、癌細胞の接着糖鎖発現における役割に焦点を当てて解析を進めた。

B.研究方法

悪性細胞における細胞接着糖鎖の異常発現を導く分子機構としては、これまで糖鎖を合成する糖転移酵素がよく調べられてきた。細胞の癌化にともなう糖転移酵素の異常は、歴史的には酵素活性の測定という方法で早期から検索が進められ、すでに多くの知見が集積している。我々をも含め、近年の糖転移酵素遺伝子の発現解析の結果も、旧来の酵素学的解析の結果を支持しほぼ追認するものであった。しかし、糖鎖の合成においては、基質である糖ヌクレオチドの供給がしばしば律速段階となっている。ゴルジ装置の糖ヌクレオチド・トランスポーターについては、その活性測定が難しく、また精製も困難であったため、これまでほとんど解析が進められてこなかった。近年これら糖ヌクレオチド・トランスポーター遺伝子のクローニングが進み、ようやくヒト癌における解析

が可能となった。そこで、ゴルジ装置の各種の糖ヌクレオチド・トランスポーター遺伝子およびそのest遺伝子9種について、大腸癌症例における癌組織および周囲非癌組織でのmRNAの発現を検索し比較検討した。ヒト癌で有意に変化したものについては、細胞への遺伝子導入によってその機能と生理的意義を解析した。

また、大腸組織にはN-アセチルガラクトサミンの6位が硫酸化された糖鎖や、ガラクトースの3位が硫酸化された糖鎖が多く発現していることを我々はこれまでに見出して報告している。これら硫酸化糖鎖の一部は、セレクチンのリガンドとしての生理機能を持っている。これらの糖鎖の発現には、大腸の右半と左半とで相違が見られる。これらを合成する6-硫酸基転移酵素や3'-硫酸基転移酵素のアイソザイムには我々がクローニングしたのものも含めて多数が知られている。従来から診断が困難である右半大腸癌のスクリーニングに役立つマーカーを目的として、大腸癌におけるこれらのmRNA発現を検索した。右半大腸癌で特異的に増加する硫酸基転移酵素アイソザイムについては、その酵素産物に特徴的なものがあることを期待して、純品基質を用いた基質特異性の検討を行った。

(倫理面への配慮)

研究に使用する臨床材料は、材料を得る各施設での倫理委員会を経たものを用いた。

C. 研究結果

大腸癌における各種の糖ヌクレオチド・トランスporter遺伝子の発現を解析した結果、UDP-ガラクトース・トランスporterのmRNAが、癌組織で非癌粘膜組織よりも有意に増加していることを見出した。このUDP-ガラクトース・トランスporter cDNAを大腸癌培養細胞株に遺伝子導入して糖鎖発現の変化を解析したところ、セレクチンのリガンドであるシアリルLe^a、シアリルLe^xの発現が誘導される事が判明した。さらにUDP-ガラクトース・トランスporter cDNAを導入した細胞では、血管内皮セレクチンへの細胞接着が有意に亢進することが判明した。また、大腸癌細胞を低酸素下で培養すると、UDP-ガラクトース・トランスporter mRNAの誘導が観察された。

大腸癌における硫酸基転移酵素のアイソザイムのmRNA発現解析からは、非癌組織に比して癌で有意に増大するもの2種と、癌で有意に減少するもの2種が見出された。癌で増加するものうちの一つ(HEC-GlcNAc6ST, 別名CHST3)は、統計的に有意に右半大腸に優位に発現していた。そこでこの酵素の反応特異性を解析したところ、この酵素には、硫酸基転移酵素の活性を測定する際に通常良く用いられる基質のほかに、ムチン型3型母核の糖鎖中のGlcNAcの6位に硫酸基を転移する能力を持っていた。この点が、他の硫酸基転移酵素には見られない大きな特色であることが判明した。このことから、この酵素が癌細胞に発現されると、他の酵素では合成できない独特の構造の硫酸化糖鎖が産生されると考えられた。これら硫酸基転移酵素の遺伝子を細胞に導入し、他の硫酸基酵素を導入した細胞とは反応しないが、本酵素を導入した細胞のみと反応する単クローン性抗硫酸化糖鎖抗体をスクリーニングした。その結果見出された抗体は、認識糖鎖の構造の詳細はまだ不明であるが、大腸右半に生じた大腸癌と高率に反応し、左半の大腸癌組織との反応頻度はやや低く、非癌大腸粘膜上皮細胞とはほとんど反応しなかった。

D. 考察

癌細胞に発現するシアリルLe^a、シアリルLe^x糖鎖は、血管内皮の接着分子セレクチンと結合することにより癌の血行性転移において重要な役割を演じる。癌ではシアリルLe^a、シアリルLe^xの発現が増大するが、従来の解析では、その増大をきたす機序が不明であった。今回我々の見出した癌におけるUDP-ガラクトース・トランスporter mRNAの増加は、癌でのシアリルLe^a、シアリルLe^xの発現増大を説明する有力な機序と考えられる。

右半大腸癌に優位に発現する6-硫酸化糖鎖については、今後、その構造を解明する必要がある。現在のところその構造は、N-アセチルグルコサミンの6位が硫酸化されていること以外にわかっていない。糖鎖中のN-アセチルグルコサミンの6位が硫酸化された構造は、ほ乳類や細菌由来の硫酸基分解酵素できわめて切断されにくいことがわかっている。HEC-GlcNAc6STの右半大腸癌での増加は著明であり、かなり多量の酵素反応産物があると思われる。大腸癌のスクリーニングでは現在抗ヘモグロビン抗体法による潜血検査が主流であるが、蛋白の変性のため、左半にくらべ右半大腸癌の検出率が悪いという欠点を持つ。この酵素産物の検出により、このような欠点を補完できる可能性があり今後検討する必要がある。

E. 結論

シアリルLe^a、シアリルLe^xなどのセレクチンの糖鎖リガンドは、既に広く腫瘍マーカー検査に応用されており、多数の患者がこの検査を受けている。しかし、これまでのところ、どうして癌でシアリルLe^a、シアリルLe^xが増加するのか、その機序が不明であった。今回の我々の検討は、癌細胞のゴルジ装置におけるUDP-ガラクトース・トランスporterの発現増大がその重要な機序であることを示した。

また、大腸癌における硫酸基転移酵素のアイソザイムのmRNA発現解析から、従来診断の困難であった、スクリーニング効率の良好でなかった右半大腸癌の検出につながる可能性の高い、右半大腸癌に選択的な遺伝子とその産物が見出された。

F.健康危険情報

現在のところ、特記すべきものはありません。

G.研究発表

1.論文発表

1. Kumamoto, K., Goto, Y., Sekikawa, K., Takenoshita, S., Ishida, N., Kawakita, M., and Kannagi, R. Increased expression of UDP-galactose transporter mRNA in human colon cancer tissues and its implication in synthesis of Thomsen-Friedenreich antigen and sialyl Lewis A/X determinants. *Cancer Res.*, **61**: 4620-4627, 2001.
2. El-Fasakhany, F.M., Uchimura, K., Kannagi, R., and Muramatsu, T. A novel human Gal-3-O-sulfotransferase: molecular cloning, characterization and its implications in biosynthesis of 3'-sulfo Lewis^x. *J. Biol. Chem.*, **276**: 26988-26994, 2001.
3. Ikeda, N., Eguchi, H., Nishihara, S., Narimatsu, H., Kannagi, R., Irimura, T., Ohta, M., Matsuda, H., Taniguchi, N., and Honke, K. A remodeling system of the 3'-sulfo Lewis a and 3'-sulfo Lewis x epitopes. *J. Biol. Chem.*, **276**: 38588-38594, 2001.
4. Kontani, K., Taguchi, O., Narita, T., Izawa, M., Hiraiwa, N., Zenita, K., Takeuchi, T., Murai, H., Miura, S., and Kannagi, R. Modulation of MUC1 mucin as an escape mechanism of breast cancer cells from autologous cytotoxic T-lymphocytes. *Br. J. Cancer*, **84**: 1258-1264, 2001.
5. Sekine, M., Taya, C., Kikkawa, Y., Yonekawa, H., Takenaka, M., Matsuoka, Y., Imai, E., Izawa, M., Kannagi, R., and Suzuki, A. Regulation of mouse kidney tubular epithelial cell-specific expression of core 2 GlcNAc transferase. *Eur. J. Biochem.*, **268**: 1129-1135, 2001.
6. Ito, K., Ye, C.L., Hibi, K., Mitsuoka, C., Kannagi, R., Hidemura, K., Ando, H., Kasai, Y., Akiyama, S., and Nakao, A. Paired tumor marker of soluble E-selectin and its ligand sialyl Lewis A in colorectal cancer. *J. Gastroenterol.*, **36**: 823-829, 2001.
7. Kannagi, R. Fucosyltransferases V and VI. In: N. Taniguchi, K. Honke and M. Fukuda (eds.), *Handbook of Glycosyltransferases and Their Related Genes*, pp. 232-245, Springer-Verlag, 2001.
8. Sawada, M., Moriya, S., Saito, S., Shineha, R., Satomi, S., Yamori, T., Tsuruo, T., Kannagi, R., and Miyagi, T. Reduced sialidase expression in highly metastatic variants of mouse colon adenocarcinoma 26 and retardation of their metastatic ability by sialidase overexpression. *Int. J. Cancer*, **97**: 180-185, 2002.
9. Koike, C., Luppi, P., Sharma, S.B., Kannagi, R., Nakashima, I., Starzl, T.E., and Trucco, M. Molecular basis of evolutionary loss of α 1,3-galactosyltransferase gene in higher primates. *J. Biol. Chem.*, **277**: 10114-10120, 2002.
10. Uchimura, K., El-Fasakhany, F.M., Hori, M., Hemmerich, S., Blink, S.E., Kansas, G.S., Kanamori, A., Kumamoto, K., Kannagi, R., and Muramatsu, T. Specificities of N-acetylglucosamine-6-O-sulfotransferases in relation to L-selectin ligand synthesis and tumor-associated enzyme expression. *J. Biol. Chem.*, **277**: 3979-3984, 2002.
11. Kannagi, R. Transcriptional regulation of expression of carbohydrate ligands for cell adhesion molecules in the selectin family. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **491**: 267-278, 2001.
12. Kannagi, R. Use of liposomes containing carbohydrates for production of monoclonal antibodies. *Method. Mol. Biol.*, **199**: in press, 2002.

2.学会発表

1. Kannagi, R. Regulation of T-lymphocyte traffic by carbohydrate ligands for selectin. (Invited Speaker). International Symposium on Protein Traffic, Glycosylation, and Human Health, Chaired by J. Roth, M. Aebi, N. Taniguchi, T. Kawasaki and J.C. Paulson, Interlaken, Switzerland, May 12-16, 2001.
2. 金森審子, 小島直也, 神奈木玲児. Shear

- flow下におけるセレクトインと新規硫酸化糖鎖リガンドを介した細胞接着. 第54回日本細胞生物学会大会ワークショップ20, 「マトリックス分子シグナルの多様性と細胞接着」(神奈木玲児、木全弘治 司会) 岐阜, 5月 29日-6月1日, 2001.
3. Kannagi R. Glycoconjugate ligands and regulation of selectin-mediated cell adhesion. (Plenary Lecture). XVIth International Symposium on Glycoconjugates (GLYCO XVI), (Chairman H. Vliegenthart), Plenary Lecture Chaired by M. Monsigny, The Hague, Netherlands, August 19 -24, 2001.
 4. 川喜田正夫, 石田信宏, 村岡正敏, 青木和久, 三木俊明, 瀬川宏知, 神奈木玲児, 隈元謙介. 糖ヌクレオチド輸送体と糖鎖合成. 第74回日本生化学会大会シンポジウム, 「予想を超える糖鎖の機能:糖鎖遺伝子からのメッセージ」(木全弘治、古川綱一 司会) 横浜, 10月25-28日, 2001.
 5. 神奈木玲児. 6-硫酸化ラクトサミン糖鎖の生体内分布と機能. 第74回日本生化学会大会シンポジウム, 「硫酸化糖鎖の識別と生理的意義」(山下克子、村松 喬 司会) 横浜, 10月25-28日, 2001.
 6. 隈元謙介、渡部暁也、福井布美代、齋藤理、石田信宏、川喜田正夫、竹之下誠一、神奈木玲児. Hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α)と大腸癌における糖鎖抗原の発現誘導. 第60回日本癌学会総会, 横浜, 9月26日-28日, 2001.
 7. 金森審子、小島直也、神奈木玲児. PSGL-1分子のN末近傍硫酸化チロシン残基がセレクトインによる細胞接着に及ぼす影響. 第60回日本癌学会総会, 横浜, 9月26日-28日, 2001.
 8. 平岩 望、神奈木玲児. セレクトイン・リガンド合成酵素Fuc-TVIIのHTLV-1 21-bp類似配列に結合する新規因子hF7CAF-1のクローニング及びTaxとの相互作用. 第60回日本癌学会総会, 横浜, 9月26日-28日, 2001.
 9. 丁 剛, 後藤嘉子, 福井布美代, 渡部暁也, 隈元謙介, 金森審子, 長谷川泰久, 河田 了, 島田剛敏, 中井 茂, 久 育男, 神奈木玲児. 癌細胞におけるホメオスタティック・ケモカインの発現と細胞接着. 第60回日本癌学会総会, 横浜, 9月26日-28日, 2001.
 10. 後藤嘉子, 金森審子, 光岡ちか子, 隈元謙介, 井澤峯子, 羽淵脩躬, 内村健治, 村松 喬, 神奈木玲児. 遺伝子導入によるL-セレクトインの硫酸化糖鎖リガンド結合特異性の研究. 第60回日本癌学会総会, 横浜, 9月26日-28日, 2001.
 11. 井澤峯子, 光岡ちか子, 後藤嘉子, 金森審子, 田口 修, 竹松 弘, 小堤保則, 川寄敏祐, 神奈木玲児. KOマウスを用いたリンパ節高血管内皮細静脈のL-セレクトインリガンドの検討. 第60回日本癌学会総会, 横浜, 9月26日-28日, 2001.
 12. 福井布美代, 井澤峯子, 齋藤 理, 渡部暁也, 隈元謙介, 石田廣次, 中村栄男, 神奈木玲児. 消化器癌の新生血管内皮細胞に選択的に発現する6,6'-ジスルホ糖鎖の検討. 第60回日本癌学会総会, 横浜, 9月26日-28日, 2001.
 13. 大森勝之, 福井布美代, 隈元謙介, 後藤嘉子, 金森審子, 神奈木玲児. 細胞接着分子セレクトインとの結合における糖鎖リガンドのムチン型糖鎖のコア2母核の意義. 第60回日本癌学会総会, 横浜, 9月26日-28日, 2001.
 14. Das K, Basu M, Henshaw J, Li S-C, Kannagi R, Basu S. GalNAcT-1 activity isolated from guinea pig bone marrow. XVIth International Symposium on Glycoconjugates (GLYCO XVI), (Chairman H. Vliegenthart), The Hague, Netherlands, August 19 -24, 2001.
 15. Tei K, Kumamoto K, Kannagi R, Kawata T, Nakai S, Hisa I. Expression of homeostatic chemokines in squamous cell carcinoma. The 2001 Annual Meeting & OTO EXPO of the American Academy of Otolaryngology - Head and Neck Surgery Foundation, Denver, Colorado, September 9-12, 2001.
- H.知的財産権の出願・登録状況
特にありません。

厚生省科学研究費補助金（がん克服戦略研究事業）
分担研究報告書

転移・浸潤に関わるプロテアーゼと細胞外マトリックス分子の解析

分担研究者 宮崎 香 横浜市立大学木原生物学研究所

要旨 がんの浸潤・転移機構を明らかにするために、がん細胞、マトリックスプロテアーゼ、および細胞外マトリックス分子の相互作用を調べた。その結果、ラミニン 5 (LN5) は腫瘍基底膜において腫瘍増殖を支えること、またその $\gamma 2$ 鎖がプロテアーゼによって切断されると細胞接着型から細胞運動促進型へと変換し、腫瘍細胞の浸潤を促進することが示唆された。さらに浸潤先進部位では $\gamma 2$ 鎖が単独で発現し、未知の機構でがんの浸潤を支えていると推測された。一方、がん細胞が発現するマトリライシンは自らの細胞膜に作用して転移を促進し、またがん細胞周囲の血管内皮細胞が発現するマトリライシンは内皮細胞の増殖と血管新生を誘導することによってがんの増殖と転移に寄与することが示唆された。

A. 研究目的

がん細胞は周囲の多様な細胞および物質と相互作用を行いながら増殖し、また浸潤・転移する。近年、細胞外マトリックス分解性プロテアーゼの重要性が広く認識されている。しかし、これらのプロテアーゼは障害物としての細胞外マトリックスを排除するだけでなく、より積極的に細胞機能を調節している可能性が考えられる。また、がん細胞と細胞外マトリックス分子の相互作用の実体は殆ど不明である。そこで本研究では、プロテアーゼの細胞膜や細胞外マトリックス成分への作用とその影響を調べた。

B. 研究方法

1) がん細胞の基底膜への浸潤はがん転移の重要な過程と考えられている。多くの上皮基底膜の主要成分であるラミニン 5 (LN5) は細胞の接着と運動を調節する機能をもつ。LN5 の 3 つのサブユニット ($\alpha 3$ 、 $\beta 3$ 、 $\gamma 2$) のうち、 $\gamma 2$ 鎖が MT1-MMP によって限定分解されると、LN5 の機能が変化することを最近報告した。また、がんの浸潤先進部位では $\gamma 2$ 鎖が単独で強発現することを見いだした。そこで、本研究ではヒト繊維肉腫細胞 HT1080 に LN5 を強制発現させることによって、 $\gamma 2$ 鎖が切断されない組み換え LN5 変異体をヒト胃がん細胞

MKN-28 を用いて作製することによって、さらに γ 2鎖を単独で強制発現させたヒト膀胱がん細胞 EJ-1 を作製することによって、LN5 およびその γ 2鎖のがんの悪性増殖における意義を調べた。

2) 最小のマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) であるマトリライシン (MMP-7) が大腸がんをはじめ、多くのがんの転移に関係すると考えられている。昨年度、活性型マトリライシンがヒト大腸がん細胞の膜表面に結合し、この細胞の凝集を促進することを明らかにした。本研究ではマトリライシンの転移促進機構を明らかにするために、マトリライシンによるヒト大腸がん細胞 (Colo202 および WiDr) を用いて、細胞凝集促進機構、およびそれと転移促進との関係について調べた。大腸菌で得られた組み換え型マトリライシンを使用し、転移能はヌードマウスの脾臓から肝臓への転移を測定して調べた。

C. 研究結果

1) がんの浸潤・転移におけるラミニン 5 (LN5) およびそのサブユニット γ 2鎖の役割を調べた。(a) 腫瘍増殖における LN5 の意義を明らかにするために、ヒト繊維肉腫細胞 HT1080 に LN5 を強制発現させた。この LN5 産生 HT1080 をヌードマウス皮下に注射すると、対照細胞に比べて著しく高い腫瘍形成が見られた。(b) ラミニン 5 (LN5) の γ 2鎖の限定分解による LN5 の生理活性の変化の機構を明らかにす

るために、切断部位に点突然変異を導入した非切断型組換え LN5 を作製した。精製した切断型および非切断型 LN5 の比較から、非切断型 LN5 では細胞接着活性が低下し、逆に細胞運動活性が亢進することが明らかになった。(c) がん浸潤先進部位での γ 2鎖の単独発現、および γ 2鎖の切断の意義を明らかにするために、 γ 2鎖の全長及び N 末端部分をヒト膀胱がん細胞に強制発現させ、ヌードマウスでの腫瘍形成能を調べた。その結果、 γ 2鎖強制細胞を腹腔に注射すると、対照細胞に比べて横隔膜への浸潤増殖が顕著であり、またこのようなマウスでは腹水の貯留も亢進することが明らかになった。2) マトリライシンの転移促進機構を調べた。(a) 活性型マトリライシンが細胞膜に結合すると、まずそのプロテアーゼ活性の発現により緩い細胞凝集が誘導され、ついでカドヘリンを介した強い細胞凝集へ移行することが分かった。この強い細胞凝集を起こした大腸がん細胞をヌードマウスの脾臓に注射すると高度に肝転移を起こしたが、緩い細胞凝集では未処理細胞と比べて顕著な差は見られなかった。(b) 精製マトリライシンが培養血管内皮細胞の DNA 合成および細胞増殖が亢進することが明らかになった。一方、マトリライシンをアガロースゲル内に封入してマウス皮下に注入するとその部位に血管新生が誘導された。同様な血管新生はマトリライシンを発現する WiDr 大腸がん細胞の注射によっても誘導され、それはマトリラ

イシンに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドの投与によって抑制された。

D. 考察

1) 本研究の結果から、がん細胞による LN5 の発現はその増殖を支え、一方、 $\gamma 2$ 鎖単量体の発現はがん細胞の浸潤的増殖を促進すると考えられる。また $\gamma 2$ 鎖が切断された LN5 は非切断型 LN5 に比べて細胞接着活性が低下し、細胞運動能が増加することが明らかになった。このことは基底膜へのがん細胞の浸潤に重要な意味をもつと考えられる。今後 $\gamma 2$ 鎖の機能をさらに明らかにすることは、がん浸潤のメカニズムを知る上で極めて重要と考えられる。

2) マトリライシン (MMP-7) は他の多くの MMP と異なり、がん細胞自身が産生し、間質細胞は産生しない。しかし、腫瘍近傍の血管内皮細胞はこれを過剰発現する。今回の研究から、マトリライシンががん細胞表面に結合して細胞凝集能を亢進し、その結果転移能を増大させること、また本酵素が血管内皮細胞の増殖を促進し、血管新生を誘導することが明らかになった。今後このメカニズムについても検討したい。これらの結果は、マトリライシンがオートクライン的に腫瘍細胞の転移を促進し、またパラクライン的に血管新生を促進することを強く示唆する。

E. 結論

ラミニン 5 (LN5) 強制発現細胞の高い造腫瘍能から、腫瘍基底膜

に存在する LN5 が腫瘍増殖を支えていることが考えられる。また正常上皮基底膜または腫瘍基底膜の LN5 の $\gamma 2$ 鎖がプロテアーゼによって切断されると、LN5 は細胞接着型から細胞運動促進型へと変換し、腫瘍細胞の浸潤に寄与すると考えられる。一方、浸潤先進部位では $\gamma 2$ 鎖が単独で発現し、未知の機構でがんの浸潤を支えていると推測される。

がん細胞が発現するマトリライシンは自らの細胞膜に作用して転移を促進する。一方、がん細胞周囲の血管内皮細胞が発現するマトリライシンは内皮細胞の増殖と血管新生を誘導することによってがんの増殖と転移に寄与することが示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Kagesato, Y., Mizushima, H., Koshikawa, N., Kitamura, H., Hayashi, H., Ogawa, N., Tsukuda, M. and Miyazaki, K. Sole expression of laminin $\gamma 2$ chain in invading tumor cells and its association with stromal fibrosis in lung adenocarcinomas. *Jpn. J. Cancer Res.*, 92: 184-192, 2001.

2) Adachi, Y., Itoh, F., Yamamoto, H., Arimura, Y., Kikkawa-Okabe, Y., Miyazaki, K., Carbone, D. P., and Imai, K.: Expression of angiomodulin (TAF/Mac 25) in invading tumor cells and blood vessels correlates with tumor progression and poor prognosis in human colorectal cancers. *Int.*

- Cancer Res., 95: 216-222, 2001.
- 3) Jin, M., Udagawa, K., Miyagi, E., Nakazawa, T., Hirahara, F., Yasumitsu, H., Miyazaki, K., Nagashima, Y., Aoki, I., Harada, M., and Miyagi, Y.: Expression of serine proteinase inhibitor PP5/TFPI-2/MSPI decreases invasive potential of human choriocarcinoma cells in vitro and in vivo. *Gynecol. Oncol.*, 83: 325-333, 2001.
- 4) Nishizuka, I., Ichikawa, Y., Ishikawa, T., Kamiyama, M., Hasegawa, S., Momiyama, N., Miyazaki, K., and Shimada, H.: Matrilysin stimulates DNA synthesis of cultured vascular endothelial cells and induces angiogenesis in vivo. *Cancer Lett.*, 173: 175-182, 2001.
- 5) Huo, H., Ichikawa, Y., Kamiyama, M., Ishikawa, T., Hamaguchi, Y., Hasegawa, S., Nagashima, Y., Miyazaki, K., and Shimada, H.: MMP-7 (matrilysin) accelerated growth of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). *Cancer Lett.*, 177: 95-100, 2002.
- 6) Dyce, O. H., Ziober, A. F., Weber, R. S., Miyazaki, K., Khariwala, S. S., Feldman, M., and Ziober, B. L.: Integrins in head and neck squamous cell carcinoma invasion. *Laryngoscope*, in press.
- 7) Tsuji, T., Kawada, Y., Kai-Murozono, M., Komatsu, S., Han, S. A., Takeuchi, K., Mizushima, H., Miyazaki, K., and Irimura, T.: Regulation of melanoma cell migration and invasion by laminin-5 and $\alpha 3\beta 1$ integrin(VLA-3). *Clin. Exp. Metastasis*, in press.
- 8) Mizushima, H., Hirosaki, T., Miyata, S., Takamura, H., Miyagi, Y., and Miyazaki, K.: Expression of laminin-5 enhances tumorigenicity of human fibrosarcoma cells in nude mice. *Jpn. J. Cancer Res.*, in press.
- 9) Lu, W., Miyazaki, K., Mizushima, H., and Nemoto, N.: Immunohistochemical distribution of laminin $\gamma 2$ chain and its developmental change in human embryonic and fetal tissues. in press.
- 10) Udagawa, K., Yasumitsu, H., Esaki, M., Sawada, H., Nagashima, Y., Aoki, I., Jin, M., Miyagi, E., Nakazawa, T., Hirahara, F., Miyazaki, K. and Miyagi, Y.: Subcellular localization of PP5/TFPI-2 in placenta: a possible role of PP5/TFPI-2 as an anticoagulant on the surface of syncytiotrophoblasts. *Placenta*, in press.
- 11) 宮崎香、森山佳谷乃：マトリックズの分解とがんの浸潤・転移。「バイオサイエンスの世紀。第8巻：多細胞体の構築と細胞接着システ

ム」(関口清俊、鈴木信太郎編)、共立出版、p. 174-186, 2001。

12) 宮崎香、森山佳谷乃：細胞外マトリックスタンパク質の作用、「基礎生化学実験法-第3巻タンパク質II」(日本生化学会編)、東京化学同人、p. 55-60, 2001。

13) 来生知、東昌市、宮崎香：腫瘍の増殖と転移におけるマトリックスメタロプロテアーゼの意義。血液・腫瘍科、42: 388-397, 2001。

14) 廣崎智巳、宮崎香：ヘパリン結合ドメイン。「生体の科学」医学書院、52: 470-472, 2001。

15) 坪田芳明、宮崎香：ラミニンGドメイン。「生体の科学」医学書院、52: 473-475 2001。

16) 苅谷慶喜、坪田芳明、宮崎香：細胞外マトリックス分子による細胞の接着と運動の制御-ラミニン5を例として。実験医学、20: 258-263, 2002。

2. 学会発表

1) 苅谷慶喜、坪田芳明、廣崎智巳、宮崎香：ラミニン5の細胞接着活性と細胞運動活性の発現におけるG3ドメインの役割。第54回日本細胞生物学会大会(岐阜)、2001年5月、講演要旨集、P3β-16。

2) 来生知、東昌市、山本和博、中谷雅年、越川直彦、宮崎香：癌細胞の転移能発現におけるマトリライシンの役割。第60回日本癌学会総会(横浜)、2001年9月、総会記事、458。

3) 坪田芳明、陰里ゆうみ、宮崎香：ラミニン-5を構成する γ 2鎖の癌

の増殖および浸潤への関与。第60回日本癌学会総会(横浜)、2001年9月、総会記事、467。

4) 足立靖、山本博幸、福島啓、吉田未央、垣内英樹、伊藤文生、宮崎香、今井浩三：大腸癌におけるAngiomodulin(TAF/mac25/IGFBP-7)の発現と血管新生、転移、予後。第60回日本癌学会総会(横浜)、2001年9月、総会記事、1538。

5) 廣瀬智巳、坪田芳明、苅谷慶喜、水島寛人、宮崎香：ラミニン-5とラミニン-6の活性発現における α 3鎖G4-5ドメインの構造。第74回日本生化学会大会(京都)、2001年10月、総会記事、S17-2. 1P-364。

6) 来生知、東昌市、宮崎香：マトリライシン(MMP-7)の癌転移への結合と癌転移におよぼす効果。第74回日本生化学会大会(京都)、2001年10月、総会記事、S72-5。

7) 小川崇、坪田芳明、宮崎香：ラミニン-5 γ 2鎖のプロテアーゼによるプロセシングの意義。第74回日本生化学会大会(横浜)、2001年10月、総会記事、1P-365。

8) 丸茂翠、宮崎咲江、和久井世紀、安光英太郎、廣崎智巳、東昌市、瀬原-藤沢淳子、宮崎香：ラット副腎髄質褐色細胞種由来PC12細胞の細胞死に及ぼすメルトリン γ (ADAM-9)の効果。第74回日本生化学会大会(京都)、2001年10月、総会記事、4P-237。

9) Yoshinobu kariya, Yoshiaki Tsubota, Tomomi Hirosaki and Kaoru Miyazaki : Differential regulation of cell adhesion and

migration by $\alpha 3$ -G3 domain of laminin 5. 10th International Symposium on Basement Membranes (Salzburg), September 2001, Abstracts 10.

10) Takashi Ogawa, Yoshiaki Tsubota and Kaoru Miyazaki : Changes in biological activity of laminin-5 by proteolytic processing of the $\gamma 2$ chain. 10th International Symposium on Basement Membranes (Salzburg), September 2001, Abstracts 16.

11) Shouich Higashi and Kaoru Miyazaki : A novel processing of β -amyloid precursor protein catalyzed by membrane type 1-matrixproteinase inhibitor activity. 2nd General Meeting of the International Proteolysis Society (Germany), October-November, 2001.

12) Yoshiaki Tsubota, Takashi Ogawa, Yoshinobu Kariya, and Kaoru Miyazaki : Functional modulation of laminin-5 by

proteolytic processing of its $\alpha 3$ and $\gamma 2$ chain. Keystone Symposia (Canada), February 2002, Extracellular Matrix Program 317.

13) 宮崎香：細胞の接着と移動を調節する細胞外マトリックス分子 - がんや血管病態への関与- 第6回 Vascular Medicine 学会特別講演 (東京)、2001年6月。

14) 宮崎香：がん細胞が分泌するタンパク質の機能解析。木原生物学研究所セミナー プロテオミクス最近の進歩 (横浜)、2001年8月。

15) 宮崎香：ラミニン 5 による細胞接着と細胞運動の調節。木原生物学研究所セミナー、2001年11月。

16) 宮崎香：がんの増殖・転移におけるマトリックスメタロプロテアーゼの役割。第69回 KIKUCHI バイオセミナー「三風会」(熊本)。2001年12月。

H. 知的財産権の出願・登録状態なし。

厚生省科学研究費補助金（厚生省がん克服戦略事業）
分担研究報告書

「分野2：がん細胞における悪性形質獲得の分子機構の把握およびその制御機構の解明」班
分担する研究項目：臨床像を反映した転移モデルの作製とそれを用いた治療開発研究

分担研究者 久保田哲朗 慶應義塾大学医学部外科学教室助教授

研究要旨：単純疱疹ウイルス（HSV）変異体 G207（G207）を用いてマウス大腸癌転移抑制効果の有効性を検討した。BALB/c マウスに同系マウス大腸癌株である CT26 株を対象として3種類の転移モデルを用いた。すなわち i) 脾臓内注入（脾注モデル, ii) 皮下移植／脾注モデル, iii) 同所移植モデルである。同所移植モデルでは、CT26 の腫瘍組織片を盲腸壁の上へ移植した。G207 は脾注モデルにおいては Day 7 に、皮下／脾注モデルでは移植後 Day 5 と 8 に、同所移植モデルにおいては Day 7 にいずれも腫瘍中に投与した。効果の判定は Day 21 または 28 に行った。G207 は全ての実験系において腫瘍の増殖を抑制したが、ヌードマウスにおいては G207 による腫瘍抑制効果は認められなかった。腫瘍特異的 CTL 反応は、同所移植モデル脾細胞において腫瘍細胞特異的 CTL が誘導された。これらの結果より、HSV 変異体 G207 が腫瘍特異性 T 細胞を介して、大腸癌肝臓転移を阻害する可能性が示唆された。

A. 研究目的

大腸癌の肝臓転移は約半数の症例で認められ、未治療の場合その予後は通常 5～10 ヶ月程度であり、たとえ外科的切除が行われても 5 年生存率は 20～40%に留まっている。変異型単純疱疹ウイルス（HSV）G207（G207）は、ICP6 遺伝子および ICP34.5 遺伝子を不活化し、lacZ 遺伝子を挿入することによって作製された。G207 は ribonucleotide reductase を欠損するため正常細胞においては複製せず、腫瘍細胞内においてのみ複製して腫瘍細胞破壊を引き起こすため、選択的な転移腫瘍の抑制が期待できる。BALB/c+/? マウスおよび BALB/c の背景を有するヌードマウスを対象として G207 の転移腫瘍に対する抗腫瘍性を検討した。

B. 研究方法

1) 脾注肝転移モデルの検討

BALB/c+/?マウスまたは BALB/c nu/nu マウスの脾に 5×10^5 の CT26 細胞を注入し、注入後 7 日目に脾に成立した腫瘍に対して G207(1×10^7 plaque-forming units; pfu)を投与した。CT26 投与後 21 日目に判定を行った。

2) 脾注肝転移および皮下移植モデル

BALB/c +/?マウスを用いて、CT26 の脾注肝転移および皮下腫瘍モデルを作製した。腫瘍移植後、5 および 8 日目に G207(1×10^7 pfu)を皮下腫瘍に投与し、脾は移植後 8 日

目に皮下腫瘍は移植後 14 日目に切除した。このモデルにおいては脾に G207 が投与されないため、肝転移に対するウイルスの直接細胞毒性は実験成績から除外された。

3) 同所移植モデル

臨床における大腸癌肝転移に近いモデルとして盲腸同所移植肝転移モデルを作製し、G207 による肝転移阻害効果を検討した。すなわち CT26 腫瘍組織を BALB/c +/? マウス盲腸壁上へ移植し、G207(1×10^7 pfu)を腫瘍移植後 7 日目に盲腸腫瘍に投与し肝転移阻害効果を検討した。本同所移植肝転移モデルにおける肝転移抑制効果が腫瘍特異的 CTL を介することを証明するために、G207 投与後 14 日目の脾細胞を対象として、 ^{51}Cr アッセイによる検討を行った。

（倫理面への配慮）すべての動物実験はヘルシンキ宣言および当学実験動物センター倫理規定に準拠して行われた。担当実験者は全員、実験動物センターの講習を受講した。すべての実験計画は実験動物センター倫理委員会へ提出され審議ののち、許可を受けて遂行された。

C. 研究結果

1) 脾注肝転移モデルの検討

BALB/c +/?マウスにおいては、対照群のマウス 8 匹すべてに CT26 の肝転移が認められたが、G207 治療群 8 匹中 5 匹には肝転移は認められず、このことは組織学的に

も確認された。また治療群の肝重量は対照群に比して推計学的に有意に低値であった。脾における腫瘍重量も治療群で低値であったが推計学的に有意な差には至らなかった ($P = 0.066$)。この脾注肝転移モデルをヌードマウスを宿主にして行ったが、この場合には肝転移の阻害効果は認められず、G207 の抗腫瘍発現に宿主免疫能が関与している可能性が示された。

2) 脾注肝転移および皮下移植モデル

皮下および脾注腫瘍移植後 28 日目に肝転移数の判定を行った。G207 治療群では 8 匹中 4 匹で腫瘍移植が完全に阻害され、移植成立したマウスにおいてもその転移数は推計学的に有意に減少していた。本実験系では G207 は脾を介して肝に到達しておらず、ウイルスによる肝転移に対する直接抗腫瘍性が除外された。

3) 同所移植モデル

全ての対照群のマウスでは CT26 移植後 21 日に多発肝転移を示した。一方 G207 治療群のマウス 8 匹のうち 5 匹では肝転移が完全に阻害され、このことは病理組織学的にも確認された。また盲腸壁に移植された腫瘍についても治療群の腫瘍重量は対照群に比して推計学的に有意に抑制された。本実験系を用いて G207 投与後 14 日目の脾細胞を effector とした ^{51}Cr リリースアッセイにおいて脾細胞は CT26 に対して抗腫瘍性を発現したが対照に用いた Meth A 細胞に対しては抗腫瘍性を示さず、G207 の腫瘍性が腫瘍細胞特異的であることが示された。

D. 考察

今回の成績では、replication-conditional HSV mutant G207 (G207) が 3 種類の肝転移モデルにおいて、腫瘍内注入により CTL を介して肝転移を抑制することが示された。G207 は ribonucleotide reductase を欠損しており、それ自体で replicate することはできず、細胞回転のさかんな glioma 細胞においてのみ複製し腫瘍細胞を破壊するが正常脳組織においては増殖しないことから、当初脳腫瘍に対する検討が進められた。その後、本ウイルスの選択的増殖/細胞破壊が頭頸部癌、前立腺癌、膀胱癌などにおいても発現することが報告されている。本報ではマウス大腸癌株 CT26 を対象として G207 の転移抑制効果を 3 種類の転移モデルを用いて検討した。まず脾

注肝転移モデルでは G207 を脾内に投与することにより肝転移は抑制され脾腫瘍自体も増殖が抑制された。また同じ実験系において宿主をヌードマウスにした場合には、この転移抑制効果は発現せず、本転移抑制効果が宿主免疫能を介することが示された。ついで本ウイルスの直接抗腫瘍効果を検討するために皮下移植/脾注肝転移モデルを作製し G207 を皮下腫瘍に注入し、直接肝に G207 が到達しない状態で実験を行ったところ、本実験系においても肝転移は推計学的に有意に抑制された。さらに臨床大腸癌肝転移に近似したモデルである盲腸同所移植肝転移モデルを作製して G207 の肝転移抑制効果を検討した。本実験系においても G207 は盲腸原発巣および肝転移巣の増殖を抑制した。また本実験系における脾細胞を用いた ^{51}Cr リリースアッセイにおいては脾細胞は CT26 に対してのみ細胞障害性を発現し、Meth A には抗腫瘍性を示さなかったことから、G207 の抗腫瘍性の一部が腫瘍特異性 T 細胞を介した免疫反応であることが示された。以上のことから、G207 は腫瘍細胞においてのみ複製し腫瘍細胞破壊を来すこと、宿主免疫能を介して遠隔腫瘍にも抗腫瘍性を示すことから大腸癌転移治療に有用な手段と考えられた。

E. 結論

変異型ヘルペスウイルス G207 は腫瘍細胞においてのみ replication 可能なウイルスであり、直接抗腫瘍効果のみならず宿主免疫系を介した非注入腫瘍に対しても抗腫瘍性を発現し、ヒト大腸癌肝転移に対する有力な手段と考えられた。

F. 健康危険情報

今回の成績はマウスに限った検討であり、人間に対する危険性は認められない。また実験期間中を通してマウスの毒性・死亡は認められなかった。

G. 研究発表

1. Kubota, T., Furukawa, T., Tanino, H., Suto, A., Otani, Y., Watanabe, M., Ikeda, T., and Kitajima, M.: Resistant mechanism of anthracyclines - Pirarubicin might breakthrough the p-glycoprotein-mediated drug-resistance of human breast cancer tissues. Breast

- Cancer, 8: 333-338, 2001.
2. Abe, S., Kubota, T., Otani, Y., Furukawa, T., Watanabe, M., Kumai, K., Akiyama, T., Akinaga, S. and Kitajima, M.: UCN-01 (7-Hydroxystaurosporine) inhibits in vivo growth of human cancer cells through selective perturbation of G1 phase checkpoint machinery. Japanese Journal of Cancer Research, 92: 537-545, 2001.
 3. Saikawa, Y., Kubota, T., Otani, Y., Kitajima, M., and Modlin, I.M.: Cyclin D1 antisense oligonucleotide inhibits cell growth stimulated by epidermal growth factor and induces apoptosis of gastric cancer cells. Japanese Journal of Cancer Research, 92: 1102-1109, 2001.
 4. Egawa, T., Kubota, T., Furukawa, T., Otani, Y., Watanabe, M., Furukawa, T., Kumai, K., and Kitajima, M.: Docetaxel enhances the cytotoxicity of tetrahydropyranladriamycin in a sequence-dependent manner. Anticancer Research, 21: 2597-2600, 2001.
 5. Komuro, Y., Udagawa, Y., Susumu, N., Aoki, D., Kubota, T., and Nozawa, S.: Paclitaxel and SN-38 overcome cisplatin resistance of ovarian cancer cell lines by down-regulating the influx and efflux system of cisplatin. Japanese Journal of Cancer research, 92: 1241-1250, 2001.
 6. Minagawa, A., Otani, Y., Kubota, T., Wada, N., Furukawa, T., Kumai, K., Kameyama, K., Okada, Y., Fujii, M., Yano, M., Sato, T., Ito, A., and Kitajima, M.: The citrus flavonoid, nobiletin, inhibits peritoneal dissemination of human gastric carcinoma in Scid mice. Jpn. J. Cancer Res., 92: 1322-1328, 2001.
 7. Yamauchi, T., Watanabe, M., Kubota, T., Hasegawa, H., Ishii, Y., Endo, T., Kabeshima, Y., Yorozuya, K., Yamamoto, K., Mukai, M., and Kitajima, M.: Cyclooxygenase-2 expression as a new marker of patients with colorectal cancer. Dis. Colon Rectum, 45: 98-103, 2002.
 8. Narai, S., Watanabe, M., Hasegawa, H., Nishibori, H., Endo, T., Kubota, T., and Kitajima, M.: Significance of transforming growth factor β 1 as a new tumor marker for colorectal cancer. Int. J. Cancer, 97: 508-511, 2002.
 9. Koh, J., Kubota, T., Migita, T., Abe, S., Hashimoto, M., Hosoda, Y., and Kitajima, M.: UCN-01 (7-hydroxystaurosporine) inhibits the growth of human cancer xenografts through disruption of signal transduction. Breast Cancer, 9 (1): 50-54, 2002.
- H. 知的財産の出願・登録状況（予定を含む）
なし