

り Ras 依存的細胞死のシグナル伝達に関わっているかを調べた。

C. 研究結果

RhoA については恒常活性型 RhoA の発現により Ras 依存的細胞死誘導が強力に抑制されることが判明した。また恒常活性型 RhoA 変異体のみならず野生型 RhoA の発現も弱いながら Ras による細胞死を抑制する傾向が認められた。Cdc42 については、恒常活性型 Cdc42 を発現させると単独ではごく軽度の細胞死が誘導されるのみであったが、活性型 Cdc42 とともに単独ではほとんど細胞死を誘導しない低いレベルで Ras を発現させると顕著な細胞死が誘導された。また、このような Cdc42 活性化による Ras 依存的細胞死の促進現象が Rac に依存するものか否かを明らかにするため、Ras と Cdc42 により協調的に誘導される細胞死に対する優性抑制 Rac 変異体の発現の効果を調べたところ、効率よく細胞死が抑制されることが判明した。2) 活性型 Tiam1 を神経芽腫細胞内で発現させたところ、Ras を発現させた場合と同様に不規則な大きさへの断片化を伴う細胞死が誘導された。また、活性型 Tiam1 による細胞死誘導はカスパーゼ阻害剤による影響を受けなかった。次いで野生型 Tiam1 を外来性に発現させて細胞内 Tiam1 レベルを上昇させてもそのみでは細胞死は誘導されなかったが、ここに単独ではほとんど細胞死を誘導しない低いレベルで Ras を同時に発現させると顕著な細胞死誘導が認められた。さらに内因性の Tiam1 の Ras 依存的細胞死における役割を明らかにするために Tiam1 の優性抑制変異体を用いて検討を行った。まず Tiam1 の優性抑制変異体として N 末端断片 (a. a. 393-854) を用いて Ras と同時に神経芽腫細胞内に発現させると Ras による細胞死誘導が効率よく抑制された。この Tiam1 の N 末端断片には Ras と直接結合する領域が存在するため、その領域が Ras に対して dominant-negative に機能している可能性が考えられた。そこでさらに優性抑制変異体のコンストラクト (a. a. 393-760, a. a. 760-854) を作製し検討を行なったところ、a. a. 393-760 断片が抑制効果を示したのに対して、Ras による Tiam1 の直接活性化を抑制することが知られている a. a. 760-854 断片には抑制効果が見られなかった。

D. 考察

恒常活性型 RhoA および弱いながら野生型 RhoA も Ras 依存的細胞死を抑制したことから、RhoA の活性化は Ras による細胞死誘導に対して抑制的に機能していると考えられた。

また恒常活性型 Cdc42 の発現が単独では細胞死をほとんど誘導せず Ras による細胞死誘導に対して促進作用を示した点は Rac と同様であった。しかしながら Cdc42 の優性抑制変異体が Ras 依存的細胞死を抑制しないのに対して Rac の優性抑制変異体が Cdc42 による Ras 依存的細胞死の促進を抑制したことから、Cdc42 は Rac と同等の働きをしているのではなく、おそらく Rac の上流で Rac 依存的に機能しているものと考えられた。Tiam1 については活性型が単独で細胞死を誘導し、野生型発現が Ras による細胞死誘導を促進し、かつ優性抑制変異体が Ras 依存的細胞死を抑制したことから、Tiam1 は Ras 依存的細胞死のシグナル伝達に関わっていると考えられた。さらに種々の優性抑制変異体を用いた詳細な解析から Ras から Tiam1 活性化に至るシグナルが Ras との直接会合によるものではなく、おそらく PI3 キナーゼを介した間接的なものであると考えられた。

E. 結論

昨年度の検討結果より Rho ファミリーメンバーである Rac が Ras 依存的細胞死の制御に関与していることがすでに明らかになっており、一方本年度の結果として他の Rho ファミリーメンバーである RhoA ならびに Cdc42 も Ras 依存的細胞死の制御に関わっていることがわかった。Rho ファミリー・ネットワークはこれまで主に細胞骨格の制御における働きが知られていたが、今回はじめてこのようなネットワークが non-apoptotic なプログラム細胞死の制御にも関与していることが明らかになり、Rho ファミリーの新たな生物学的機能が見出されたことになる。また Tiam1 が Ras との直接結合を介さないかたちで Ras 依存的細胞死に関与していることが示され、Ras→PI3 キナーゼ→Tiam1→Rac のように細胞死シグナルが流れている可能性が示唆されるようになった。

F. 健康危険情報 特になし

G. 研究発表

1. Otsuki Y, Tanaka M, Kamo T, Kitanaka C, Kuchino Y, Sugimura H. Guanine nucleotide exchange factor, Tiam1, directly binds to c-Myc and interferes with c-Myc-mediated apoptosis in Rat-1 fibroblasts. *J Biol Chem.* 2003;278:5132-40.
2. Sugiyama A, Miyagi Y, Komiya Y, Kurabe N,

Kitanaka C, Kato N, Nagashima Y, Kuchino Y, Tashiro F. Forced expression of antisense 14-3-3beta RNA suppresses tumor cell growth in vitro and in vivo. *Carcinogenesis*. 2003;24:1549-59.

3. Sunayama J, Ando Y, Itoh N, Tomiyama A, Sakurada K, Sugiyama A, Kang D, Tashiro F, Gotoh Y, Kuchino Y, Kitanaka C. Physical and functional interaction between BH3-only protein Hrk and mitochondrial pore-forming protein p32. *Cell Death Differ*. 2004, in press.

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: 癌の血行性転移において癌細胞が血管内皮に接着する際にセレクトインファミリーの接着分子が重要な役割を演じる。細胞の癌化に伴い、セレクトインファミリーの接着分子の特異的なリガンドであるシアリルルイスx糖鎖やシアリルルイスa糖鎖の発現が亢進する。しかし、癌細胞ではどのような機構でシアリルルイスx糖鎖やシアリルルイスa糖鎖の発現が亢進するのかは不明であった。シアリルルイスxについて我々は、この糖鎖がさらに硫酸基で修飾を受けた複雑な糖鎖が正常上皮細胞に存在し、癌細胞ではその合成不全によってシアリルルイスx糖鎖の発現が誘導されることを明らかにした。癌化にともない硫酸基修飾が低下する背景には、硫酸基修飾に関与する遺伝子のヒストン脱アセチル化による発現低下があると考えられた。また一部の特定の硫酸化糖鎖には癌で増加するものも認められ、新規腫瘍マーカーの候補であると考えられた。

A. 研究目的

がん細胞の浸潤・転移においては、細胞接着分子が重要な役割を演じる。本研究では特にがん細胞と血管内皮細胞との接着を誘導するセレクトイン系の細胞接着分子とその糖鎖リガンドに焦点を合わせて解析し、その生理的意義と機能を明らかにする。セレクトインの糖鎖リガンドには、CA19-9(シアリルルイスa系糖鎖)やSLX・NCC-ST-439(シアリルルイスx系糖鎖)などすでにがんの臨床診断において腫瘍マーカーとして用いられている糖鎖が含まれており、この物質の生理的意義と機能の解明は、がんの診療上も大きな意義をもつと考えられる。細胞の癌化に伴い、シアリルルイスx系糖鎖やシアリルルイスa系糖鎖の発現が亢進する。しかし、癌細胞ではどのような機構でシアリルルイスx糖鎖やシアリルルイスa糖鎖の発現が亢進するのかは不明であった。今年度はとくに、癌細胞でシアリルルイスx糖鎖の発現亢進をもたらす機構とその分子生物学的背景について探索した。

B. 研究方法

我々はこれまで、セレクトインとその特異的な糖鎖リガンドを介した細胞接着が、癌の血行性転移において重要な役割を演じていることを明ら

かにしてきた。今回、従来から知られているセレクトインの糖鎖リガンドであるシアリルルイスx糖鎖が、さらに硫酸基で修飾された一連の糖鎖の発現を、我々が作成した特異的な単クローン抗体による免疫組織学的方法を用いて解析した。また、これらの糖鎖の硫酸基修飾に関わる酵素やトランスポーターの遺伝子発現を、大腸癌患者手術標本から癌組織および周辺の非癌上皮細胞を採取して、定量的リアルタイムPCR法によって検討し、癌症例のステージや発生部位などについて変動の有意差を統計的に解析した。癌で特異的に増減した硫酸基修飾関連遺伝子については、ヒト培養癌細胞株における遺伝子発現も調査した。また、ヒト培養癌細胞株については、ヒストン脱アセチル化の阻害剤であるトリコスタチンAやDNAのメチル化阻害剤である5-aza-cytidineを用いてその遺伝子発現が変動するかどうか、また産物である硫酸化糖鎖の発現が変化するかどうかをRT-PCR法およびフローサイトメトリー法にて調査解析した。とくに癌で発現が増加する硫酸基転移酵素遺伝子については基質特異性を解析し、他の硫酸基転移酵素遺伝子によっては産生されない特異的な糖鎖構造を調べ、またそのような硫酸化糖鎖を特異的に検出する単クローン抗体を探索した。

(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

1) 大腸がんにおけるシアリルルイスX糖鎖の発現亢進のメカニズム

シアリルルイスX糖鎖は各種の癌で発現が増大しており、血管内皮細胞のE-セレクトインと結合して血行性転移を媒介する。これまで癌におけるシアリルルイスX糖鎖の発現亢進のメカニズムは不明であった。我々は正常大腸の上皮細胞に、シアリルルイスX糖鎖にさらに硫酸基が結合した、シアリル6-スルホルイスXが有意に発現されている事を見いだした。癌細胞でシアリルルイスX糖鎖の発現が増加するのは、癌化に伴って硫酸化が低下するためと考えられる。大腸の主要な硫酸基転移酵素である1-GlcNAc6STのmRNAは、非癌上皮細胞に比べて大腸癌細胞では有意に発現が低下していた。癌の進行の比較的初期(Dukes AおよびB)ですでに有意の低下が見られた。培養大腸癌細胞をトリコスタチンA処理すると1-GlcNAc6STのmRNAの誘導が見られ、癌における硫酸基転移酵素のmRNA発現低下の背景にはヒストンの脱アセチル化があると考えられた。

2) 大腸がんで増加する新規硫酸化糖鎖を用いた診断の試み

上記の大腸がんの硫酸化糖鎖を研究する過程で、むしろ癌で増加すると思われる特殊な硫酸化糖鎖を見いだした。これは、癌で発現が増加するマイナーな硫酸基転移酵素、HEC-GlcNAc6STの産物であると考えられた。この硫酸化糖鎖は非癌上皮細胞にはほぼまったく検出されず、大腸がんの約32% (31例中10例)に検出され、とくに右半大腸がんで頻度が高かった(60%, 10例中6例)。また、腺腫性ポリープでも陽性となった。糞便を用いたスクリーニング診断への応用を考えて糞便のPBS抽出物中のこの硫酸化糖鎖を測定したところ、大腸がんおよび大腸ポリープの患者検体で陽性者が見ら

れた。

D. 考察

1) 大腸がんにおけるシアリルルイスX糖鎖の発現亢進のメカニズム

これまで癌におけるシアリルルイスX糖鎖の発現亢進のメカニズムとしては、合成酵素の発現亢進があるのではないかとの仮説にたった研究がさかんに進められてきたものの、シアリルルイスX糖鎖の発現亢進を十分に説明できる結果は得られていなかった。今回の検討結果は、正常上皮細胞にはシアリルルイスX糖鎖の合成に必要な酵素はすでに全て備わっており、ただ正常細胞においては合成系路がさらに複雑な糖鎖の合成にまで進行するが、癌ではそれがブロックされていることを示している。これまでの合成酵素の発現亢進を考える仮説からは、転移治療法として合成酵素の阻害剤などが検討されはじめているが、そのようなアプローチは再考を要する。

2) 大腸がんで増加する新規硫酸化糖鎖を用いた診断の試み

従来の大腸がんスクリーニングである便潜血反応は、右半より左半の大腸がんの検出に優れているので、右半大腸がんによく出現するこの硫酸化糖鎖は、糞便中の酵素によってあまり分解さず排出されると考えられ、便潜血反応を良く補完するスクリーニング法に発展する可能性がある。

E. 結論

癌細胞ではシアリルルイスX糖鎖の発現の亢進は、正常細胞で行われていた複雑な糖鎖の合成が、癌化に伴って障害され、合成不全の結果として引き起こされていることを強く示唆する結果が得られた。この合成不全の背景には硫酸基修飾に関与する遺伝子のヒストン脱アセチル化による発現低下があると考えられた。癌細胞におけるヒストン脱アセチル化をもたらす機構について今後の研究が必要であると考えられた。また一部の特定の硫酸化糖鎖には癌で増加するものも認められ、新規腫瘍マーカーの候補であると考えられた。

F.健康危険情報

現在のところ、特記すべきものではありません。

G.研究発表

1.論文発表

1. Hiraiwa, N., Yabuta, T., Yoritomi, K., Hiraiwa, M., Tanaka, Y., Suzuki, T., Yoshida, M., and Kannagi, R. Transactivation of the fucosyltransferase VII gene by human T-cell leukemia virus type I tax through a variant cAMP-responsive element. *Blood*, 101: 3615-3621, 2003.
2. Tsuchida, A., Okajima, T., Furukawa, Ke., Ando, T., Ishida, H., Yoshida, A., Nakamura, Y., Kannagi, R., Kiso, M., and Furukawa, K. Synthesis of disialyl Lewis a structure in colon cancer cell lines by a sialyltransferase ST6GalNAc VI responsible for the synthesis of α -series gangliosides. *J. Biol. Chem.*, 278: 22787-22794, 2003.
3. Yamaguchi, M., Ishida, H., Kanamori, A., Kannagi, R., and Kiso, M. Studies on the endogenous L-selectin ligands: systematic and highly efficient total synthetic routes to lactamized-sialyl 6-O-sulfo Lewis X and other novel gangliosides containing lactamized neuraminic acid. *Carbohydr. Res.*, 338: 2793-2812, 2003.
4. Hamada, T., Hirota, H., Yokoyama, S., Yamaguchi, M., Ohtsu, Y., Ishida, H., Kiso, M., Kanamori, A., and Kannagi, R. NMR structure elucidation of cyclic sialyl 6-sulfo Lewis x, a biologically dormant form of L-selectin ligand. *Tetrahedron Lett.*, 44: 1167-1170, 2003.
5. Kannagi, R. Carbohydrate blood group antigens and tumor antigens. In: S.Y.C. Wong and G. Arsequell (eds.), *Immunobiology of Carbohydrates*, pp. 1-33, New York: Kluwer Academic / Plenum Publishers, 2003.
6. Kannagi, R. Carbohydrate-based treatment of cancer metastasis. In: C.H. Wong (ed.), *Carbohydrate-based Drug Discovery*, pp. 803-829, Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., 2003.
7. Kannagi, R. Carbohydrate recognition systems in cell-cell interactions and signaling. In: Y. Baba (ed.), *Biomolecular Chemistry, A Bridge for the Future*, pp. 88-91, Tokyo: Maruzen Co., Ltd., 2003.
8. Itano, N., Sawai, T., Atsumi, F., Miyaishi, O., Taniguchi, S., Kannagi, R., Hamaguchi, M., and Kimata, K. Selective expression and functional characteristics of three mammalian hyaluronan synthases in oncogenic malignant transformation. *J. Biol. Chem.*, in press, 2004.
9. Murata, K., Miyoshi, E., Ihara, S., Kameyama, M., Ishikawa, O., Doki, Y., Fukuoka, H., Tarui, T., Takada, Y., Kannagi, R., Taniguchi, N., and Imaoka, S. Attachment of colon cancer cells onto vascular endothelial cells is enhanced by *N*-acetylglucosaminyltransferase V (GnT-V). *Oncology*, in press, 2004.
10. Kannagi, R. Molecular mechanism for cancer-associated induction of sialyl Lewis X and sialyl Lewis A expression - the Warburg effect revisited. *Glycoconjugate J.*, in press, 2004.
11. Kannagi, R., Izawa, M., Koike, T., Miyazaki, K., and Kimura, N. Carbohydrate-mediated cell adhesion in cancer metastasis and angiogenesis. *Cancer Sci.*, in press, 2004.
12. Kannagi, R., Goto, Y. and Fukui, F. In search of the carbohydrate structures on CD44 critical for hyaluronic acid binding - roles of sialylation and sulfation. *Trends Glycosci. Glycotechnol.*, in press, 2004.

2.学会発表

1. 神奈木玲児: 糖鎖を介した細胞接着と癌の浸潤・転移. 第62回日本癌学会総会シンポジウム, 「糖鎖による細胞間相互作用とがん」(入村達郎, 神奈木玲児 座長) 名古屋, 9月25-27日, 2003..

2. 神奈木玲児: セレクチンを介した細胞接着の糖鎖による制御. 第3回日本蛋白質科学会年会ワークショップ「次世代ポストゲノム研究—糖鎖、脂質による蛋白機能調節—」(西村紳一郎、井ノ口仁一 司会) 札幌, 6月23-25日, 2003.
 3. 神奈木玲児: 癌転移と接着分子. 第58回日本大腸肛門病学会総会, 教育講演II, (吉雄敏文 座長) 名古屋, 11月7-8日, 2003.
 4. Kannagi R: Carbohydrate recognition systems in cell-cell interactions and signaling. First International Symposium on Biomolecular Chemistry, Chaired by Y. Baba, Awaji, Hyogo, Japan, December 2-5, 2003.
 5. 宮崎敬子、大森勝之、井澤峯子、後藤嘉子、藪田智範、隈元謙介、古川鋼一、山地俊之、橋本康弘、鈴木明身、神奈木玲児: 腫瘍マーカーCA19-9 (シアリルルイス_a)の癌における発現増加の背景とその生理的意義. 第23回日本分子腫瘍マーカー研究会, 名古屋, 9月24日, 2003.
 6. 後藤嘉子、渡部暁也、小池哲史、丁 剛、井澤峯子、宮崎敬子、神奈木玲児: 大腸粘膜におけるリンパ球動態調節における硫酸化シアリルルイス_xの機能. 第23回日本分子腫瘍マーカー研究会, 名古屋, 9月24日, 2003.
 7. 渡部暁也、後藤嘉子、小池哲史、宮崎敬子、藪田智範、金森審子、井澤峯子、竹之下誠一、神奈木玲児: 大腸癌細胞のリンパ球への細胞接着とホメオスタティック・ケモカインの特異的変化. 第62回日本癌学会総会, 名古屋, 9月25日-27日, 2003.
 8. 宮崎敬子、大森勝之、井澤峯子、後藤嘉子、藪田智範、隈元謙介、古川鋼一、山地俊之、橋本康弘、鈴木明身、神奈木玲児: 糖鎖不全現象による大腸癌シアリルルイス_a糖鎖の発現誘導と癌進展における機能的意義. 第62回日本癌学会総会, 名古屋, 9月25日-27日, 2003.
 9. 木村尚子、大森勝之、宮崎敬子、井澤峯子、殷 軍、北島 健、森山昭彦、神奈木玲児: リンパ球およびリンパ性白血病細胞におけるセレクチンリガンドのシアル酸サイクリック化反応. 第62回日本癌学会総会, 名古屋, 9月25日-27日, 2003.
 10. 小池哲史、渡部暁也、後藤嘉子、藪田智範、隈元謙介、竹之下誠一、平岩望、宮崎敬子、井澤峯子、神奈木玲児: セレクチンの糖鎖リガンドを合成するフコース転移酵素VIIの大腸癌における増加とその機序. 第62回日本癌学会総会, 名古屋, 9月25日-27日, 2003.
 11. 井澤峯子、宮崎敬子、木村尚子、大森勝之、石田廣次、中村栄男、山地俊之、橋本康弘、鈴木明身、神奈木玲児: 2,3/2,6ジシアロ糖鎖と特異的に結合するシアル酸結合タンパク質Siglec-7陽性リンパ球の大腸癌組織内分布. 第62回日本癌学会総会, 名古屋, 9月25日-27日, 2003.
 12. 井澤峯子、内村健治, Fathy El-Fasakhany, 門松健治, 村松 喬, 田口 修, 神奈木玲児: 硫酸基転移酵素遺伝子KOマウスを用いたリンパ節高血管内皮細静脈のL-セレクチンリガンドの解析. 第33回日本免疫学会総会, 福岡, 12月 8日-10日, 2003.
 13. Kannagi R, Koike T, Kimura N, Miyazaki K, Izawa M, Yabuta T, Kumamoto K, Takenoshita S, Chen J, Kobayashi M, Hosokawa M, Taniguchi A, Kojima T, Yamamoto H, Takematsu H, Kozutsumi Y, Ishida N, Kawakita M: Hypoxia transcriptionally induces adhesion of cancer cells to endothelial cells. The 6th Joint Conference of the American Association for Research and the Japanese Cancer Association "Advances in Cancer Research" (Chaired by Hong WK and Tsuruo T), Hilton Waikoloa Village, Waikoloa, Hawaii, January 25-29, 2004.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
特にありません。

厚生労働科学研究費補助金（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・所長

要旨 2種の基底膜分子のプロテアーゼによる限定分解と、その生理的意義を調べた。1) 腫瘍血管基底膜に蓄積する IGF 結合蛋白質様分子である angiomodulin (AGM) が膜結合型セリンプロテアーゼにより限定分解されること、これに伴い AGM のシンデカン1に対する結合性が増大し、IGF/insulin 依存性の細胞増殖活性が消失することなどが判明した。一方、大腸がん細胞での AGM の発現は腫瘍増殖を低下させることが判明した。2) 上皮基底膜の主要成分であるラミニン5 (LN5) の $\alpha 3$ 鎖 G ドメインの切断によって LN5 が低活性型から高活性型に変換されることが明らかになった。また今回初めて、新規 LN5 アイソフォームである LN5B を単離し、本分子が高い細胞接着活性、細胞運動活性、細胞増殖活性を示すことを明らかにした。

A. 研究目的

細胞外プロテアーゼは、単に細胞外マトリックス (ECM) を破壊するだけでなく、細胞表層や細胞外の多様な蛋白質の機能を修飾することによってがん細胞の浸潤能や転移能を亢進させることが明らかになりつつある。これまで、トリプシン、マトリライシン (MMP-7)、MT1-MMP などの細胞表層タンパク質への作用を明らかにしてきた。本年度は、細胞の接着、運動、増殖などを調節する2種の ECM 分子 (angiomodulin とラミニン5) に注目して研究を行った。

B. 研究方法

1) Angiomodulin (AGM)/IGF-BP-rP1 は膀胱がん細胞が分泌する細胞接着性の糖蛋白質として私たちによって見いだされ、その後浸潤先進部のがんで高発現すること、腫瘍血管基底膜に高度に蓄積することなどが明らかになった。また、AGM は IGF 結合蛋白質様構造をもち、IGFBP-rP1 と呼ばれている。そのため、IGFs や insulin に弱い結合性を有し、IGF/insulin 依存性の細胞増殖促進活性を示す。本研究では、多くのヒトがん細胞株による AGM の分泌とプロテアーゼによる分解を

分析するとともに、精製 AGM を用いて生理活性の検定と受容体の同定を行った。また、腫瘍増殖に及ぼす AGM の作用を明らかにするために、大腸がん細胞に AGM を強制発現させた。

2) 上皮基底膜の主要成分であるラミニン5 (LN5) は3つのサブユニット ($\alpha 3A/\beta 3/\gamma 2$) からなる約 500kDa の糖蛋白質で、細胞の接着と運動を強く促進する。また、LN5 の発現は *in vivo* での腫瘍増殖を促進する。これまで、LN5 の $\alpha 3$ 鎖 C 末端の G ドメイン (G1-G5) と $\gamma 2$ 鎖 N 末端領域が BMP-1 様プロテアーゼによって限定分解されること、後者の分解では LN5 の細胞運動活性が促進されることを報告した。今回、 $\alpha 3$ 鎖 G ドメインの G3-G4 間の切断部位に変異を導入した cDNA を作製し、これを $\beta 3$ 鎖と $\gamma 2$ 鎖に対する cDNA とともにヒト腎細胞 HEK293 に導入し、非切断型の LN5 を発現させた。非切断型 LN5 を調製し、プロテアーゼによるプロセシングの効果を調べた。一方、LN5 には通常の $\alpha 3A$ 鎖に比べて約 2 倍のサイズの $\alpha 3B$ 鎖をもつアイソフォームであるラミニン5 (LN5B: $\alpha 3B/\beta 3/\gamma 2$) が存在する事が示唆されているが、LN5B の生理活性や機能に関しては全く知られていない。そこで本研究では、 $\alpha 3B$ 鎖の cDNA 全長をクローニングし、組換え型ヒト LN5B の大量発現系を確立した。

C. 研究結果

1) 多数のヒトがん細胞株による angiomodulin (AGM) の分泌を分析した結果、約 40% の細胞株で分泌が確認された。胃がん細胞や卵巣がん細胞では 33kDa の AGM 分子が一箇所切断されて 25kDa と 8kDa の二本鎖型となった AGM が高い割合で検出された。さらに、この AGM の切断は細胞膜に結合したセリンプロテアーゼによって起こることが確認された。切断型および非切断型 AGM を単離し、生理活性を比較した結果、プロテアーゼによる切断に伴い細胞接着活性が増加するが、IGF/insulin 結合活性ならびに IGF/insulin 依存性の細胞増殖活性が消失することが分かった。また、AGM の細胞表面受容体として、ヘパラン硫酸プロテオグリカンの一種であるシンデカン1が同定された。一方、腫瘍増殖における AGM の作用を明らかにするため、大腸がん細胞株 DLD-1 に AGM を強制発現させたところヌードマウス腹腔および皮下での腫瘍増殖が著明に抑制されることが明らかになった。

2) ラミニン5 (LN5) の $\alpha 3$ 鎖 G ドメインの G3-G4 間の切断部位に変異を導入することによって、G ドメインが切断されない LN5 を調製した。その生理活性を、通常切断型 LN5 と比較した結果、非切断型は切断型に比べて細胞接着活性と細胞運動活性が共に低いこと、すなわち G4-G5 の切断によって LN5 が低活性型から高活性型に変換することが明らかになった。また、非切断型は切断型に比べて効率的にマト

リックスに沈着することが判明した。一方、 $\alpha 3B$ 鎖の cDNA 全長 (10 kbp) をクローニングし、HEK293 細胞を用いて組換え型ヒトラミン 5A (LN5B) を初めて調製した。LN5B は LN5 よりもさらに高い細胞接着活性と細胞運動活性を示し、また様々な正常上皮細胞の増殖を促進することが判明した。さらに、 $\alpha 3B$ 鎖の N 末端部位がプロテアーゼによる切断を受け、145 kDa の切断型 $\alpha 3B$ をもつ LN5B と 190 kDa の $\alpha 3B$ 鎖 N 末端断片が産生されること、またこの 190 kDa 切断断片もインテグリン $\alpha 3\beta 1$ を介して細胞の接着、運動、増殖を促進できることが明らかになった。

D. 考察

1) これまでの予想と異なり、AGM が腫瘍増殖を抑制することが明確になった。また、AGM がプロテアーゼにより限定分解されるとシンデカン 1 に対する結合性が増大し、一方で細胞増殖活性が消失することが判明した。AGM は IGF や insulin を細胞周囲に集積することによって増殖を促進すると考えられる。恐らくプロテアーゼによる AGM の機能変換が腫瘍増殖抑制作用に関係すると予測される。AGM はがん治療の標的分子として有望であり、今後 AGM の腫瘍増殖抑制機構を明確にしたい。

2) LN5 の $\alpha 3$ 鎖 G ドメインのプロセッシングによって LN5 が低活性型から高活性型に変換されることが明らかになった。LN5 の $\gamma 2$ 鎖 N

末端領域のプロセッシングが周囲の因子によって調節されているのに対して、 $\alpha 3$ 鎖のプロセッシングは恒常的に起こる。恐らく後者は正常組織の基底膜における LN5 の本質的な機能調節に関係すると考えられる。一方、今回 LN5B の生物学的性質を初めて明らかにした。LN5B は多数の既知 ECM 分子の中で、最も効率よく細胞を接着させ、運動を促進し、また細胞増殖を促進する。今後、がんとの関係に注目し、生体内での挙動を検討したい。

E. 結論

2 種の基底膜分子のプロテアーゼによる限定分解と、その生理的意義、およびがん細胞の浸潤・転移への関与について研究を行い、以下の結果を得た。1) 腫瘍血管基底膜に蓄積する IGF 結合蛋白質様分子である angiomodulin (AGM) が膜結合型セリンプロテアーゼにより限定分解されること、これに伴い AGM のシンデカン 1 に対する結合性が増大し、IGF/insulin 依存性の細胞増殖活性が消失することなどが判明した。一方、大腸がん細胞での AGM の発現は腫瘍増殖を抑制することが判明した。2) 上皮基底膜の主要成分であるラミン 5 (LN5) は細胞の接着と運動を効率的に促進する。LN5 の $\alpha 3$ 鎖 G ドメインの切断によって LN5 が低活性型から高活性型に変換されることが明らかになった。また今回初めて $\alpha 3B$ 鎖をもつラミン 5B (LN5B) を単離した。LN5B は既知の ECM 分子の中で、最も効

率よく細胞を接着させ、運動を促進した。また、他の ECM 分子と異なり、LN5B が細胞の増殖を促進する、増殖因子としての作用をもつことも明らかになった。

以上のように、AGM と LN5 の生理活性はプロテアーゼによるプロセッシングによって大きく変換する。このようなプロテアーゼによる機能調節ががんの増殖、浸潤、転移にも関与すると考えられる。

F. 健康危険情報

培養ヒトがん細胞以外にはヒト材料を使用していない。動物実験は研究所動物実験規定に基づき行なった。

G. 研究発表

1. Kariya, Y., Tsubota, Y., Hirotsuki, T., Mizushima, H., Puzon-McLaughlin, W., Takada, Y., and Miyazaki, K.: Differential regulation of cellular adhesion and migration by laminin-5 variants with structural changes in the G3 domain of $\alpha 3$ chain. **J. Cell. Biochem.**, 88, 506-520, 2003.
2. Higashi, S. and Miyazaki, K.: Identification of a region of β -amyloid precursor protein essential for its gelatinase A-inhibitory activity. **J. Biol. Chem.**, 278 : 14020-14028, 2003.
3. Higashi, S. and Miyazaki, K.: Novel processing of β -amyloid precursor protein catalyzed by membrane type 1 matrix metalloproteinase releases a fragment lacking the inhibitor domain against gelatinase A. **Biochemistry**, 42 : 6514-6526, 2003.
4. Kioi, S., Yamamoto, K., Higashi, S., Koshikawa, N., Fujita, K., and

Miyazaki, K.: Matrilysin (MMP-7) induces homotypic adhesion of human colon cancer cells and enhances their metastatic potential in nude mouse model. **Oncogene**, 22: 8662-8670, 2003.

5. Ahmed, S., Yamamoto, K., Sato, Y., Ogawa, T., Herrmann, A., Higashi, S., and Miyazaki, K.: Proteolytic processing of IGFBP-related protein-1 (TAF/angio-modulin/mac25) modulates its biological activity. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 310: 612-618, 2003.

6. Kariya, Y., Yasuda, C., Nakashima, Y., Ishida, K., Tsubota, Y., and Miyazaki, K.: Characterization of laminin-5B ($\alpha 3\beta 3\gamma 2$) and N-terminal proteolytic fragment of $\alpha 3$ B chain: Promotion of cellular adhesion, migration and proliferation. **J. Biol. Chem.**, in press.

7. Koshikawa, N., Schenk, S., Moeckel, G., Sharabi, A., Miyazaki, K., Gardner, H., Zent, R., and Quaranta, V.: Proteolytic processing of laminin-5 by MT1-MMP in tissues and its effects on epithelial morphology. **FASEB J.**, in press.

8. Kariya, Y. and Miyazaki, K.: The basement membrane protein laminin-5 acts as a soluble cell motility factor. **Exp. Cell Res.**, in press.

9. Ogawa, T., Tsubota, Y., Maeda, M., Kariya, Y., and Miyazaki, K.: Regulation of Biological Activity of Laminin-5 by Proteolytic Processing of $\gamma 2$ Chain., **J. Cell. Biochem.**, in press.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許申請

- 1) 「ラミニン5B」(特願 2003-159006)、発明者(宮崎香、荻谷慶

喜)、出願人 (よこはまティーエ
ルオー株式会社)。

厚生労働科学研究費補助金(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:Tyrosine kinase receptor(TKR)阻害剤である SU6668 を用いて、本剤が血管新生阻害剤としてヒト胃・大腸癌の転移・播種を阻害することを実験的に検討した。SU6668 は vascular endothelial growth factor (VEGF), basic fibroblast-derived growth factor, platelet-derived epidermal growth factor などの receptor に対して ATP と競合的阻害を行い、それ以降のシグナル伝達を阻害することにより血管新生を阻害する低分子化合物である。水溶性が高く経口投与が可能であることから、長期にわたる転移・播種阻害に有用な薬剤と考えられている。MTT アッセイでは SU6668 は 3 種類の胃癌細胞株に対して軽度の細胞障害性を示したが、HUVEC は SU6668 に対して感受性が高く 2 倍以上の感受性を示した。BrdU アッセイでは、VEGF は HUVEC の DNA 合成を促進したが、胃癌株の増殖は促進されなかった。ヌードマウスに腹膜播種された TMK-1 の播種結節数、播種湿重量はいずれも SU6668 により推計学的に有意に阻害された($P < 0.05$)。大腸癌肝転移阻害実験では HT-29 および WAV-1 の肝転移重量を推計学的に有意に抑制された($P = 0.03$, $P = 0.001$)。DAS 法では3株共に SU6668 で腫瘍血管新生阻害が認められ大腸癌肝転移モデルにおける転移阻害が血管新生阻害を介していることが示唆された。腹膜播種モデル、肝転移モデル、DAS 法の実験期間中に本剤によるマウスの毒性死や体重減少は認められなかった。以上 SU6668 は血管新生阻害を介してヒト胃癌の腹膜播種、ヒト大腸癌の肝転移を阻害することが示され臨床応用に有用な薬剤と考えられた。

A. 研究目的

SU6668 は VEGF, b-FGF, PD-EGF などの tyrosine kinase receptor の細胞内ドメインに ATP と競合的に結合し、以降の signal 伝達を阻害し血管新生を抑制する化合物である。現在米国で Phase II study が進行中であり、経口投与可能な低分子化合物で長期投与が可能なることから転移再発予防薬剤として有用である。ヒト胃・大腸癌転移モデルを用いて SU6668 の転移抑制効果を検討した。

B. 研究方法

(1)SU6668 の直接細胞障害性をヒト胃癌細胞株 (TMK-1, MKN-45, MKN-74) および HUVEC を対象として MTT アッセイと bromodeoxyuridine (BrdU)取り込み阻害試験によって行い、VEGF が抗腫瘍効果に与える影響を検討した。

(2)TMK-1 細胞をヌードマウスの腹腔内に播種して腹膜播種モデルを作製し、播種翌日から SU6668 (200 mg/kg)を 2 週間に渡って一日二回経口投与した。腫瘍播種結節数と重量により SU6668 の播種阻害効果を評価した。

(3)肝転移阻害実験:Day 0 に 10^5 個の

HT-29,WAV-1 腫瘍細胞 suspension $50 \mu\text{l}$ を脾臓の被膜下に投与し、SCID マウスを対照群と治療群に群わけし Day 1 より治療を開始した。SU6668 は1日 200 mg/kg を分2で強制経口投与し、Day 29 にマウスを sacrifice して肝転移を肝臓重量により評価した。

(4)DAS 法:Dorsal air sac 法では HT-29, WIdr-meta, WAV-1 を BALB/cA 雄性マウス (7-8 週齢)各群 4~5 匹の背部皮下に、 2×10^7 個の細胞を含む PBS cell suspension (0.2 ml) を注入し、chamber (内径 10 mm, 厚さ 2 mm) を移植して 6 日間連日経口投与 (治療群には SU006668 200 mg/kg/day, 対照群には vehicle を分2で強制投与) を行った。Day 6 にエーテル麻酔下にマウス背部皮膚を chamber ごと剥皮し、実体顕微鏡にて chamber の接触していた範囲における 3 mm 以上の蛇行血管数を計数した。スコア (angiogenesis index) は、蛇行血管数に応じて 0~5 までの 6 段階で評価し、蛇行血管数が 5 本以上のものはすべてスコア 5 とした。

(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。担当実験者は実験動物センターの講習を受けた。すべての実験計画は慶應義塾大学医学部実験動物センター倫理委員会へ提出され審議ののち本学の実験動物倫理規定に従っていることが確認され、許可を受けて遂行された。

すべての実験は当学実験動物センター倫理委員会の許可のもとに行い、実験者は当該センターの研修が義務付けられた。

C. 研究結果

(1) MTT アッセイでは SU6668 は 3 種類の胃癌細胞株に対して軽度の細胞障害性を示し、50%抑制濃度(IC50)は 22.6 $\mu\text{g/ml}$ (TMK-1), 31.8 $\mu\text{g/ml}$ (MKN-45), and 26.7 $\mu\text{g/ml}$ (MKN74)であった。一方、HUVEC は SU6668 に対して感受性が高く、IC50 は 8.9 $\mu\text{g/ml}$ と 2 倍以上の感受性を示した。BrdU アッセイでは、VEGF は HUVEC の DNA 合成を促進したが、胃癌株の増殖は促進されなかった。SU6668 は VEGF によって誘導された HUVEC の DNA 合成を阻害したが、胃癌細胞に対する影響は VEGF の存在に関係せず一定であった。

(2) 胃癌腹膜播種阻害実験:ヌードマウスに腹膜播種された TMK-1 の播種結節数、播種湿重量はいずれも SU6668 により推計学的に有意に阻害された($P < 0.05$)。(3) 大腸癌肝転移阻害実験:HT-29 における対象群の肝重量は $1.238 \pm 0.05 \text{ mg}$ 、治療群の重量は $1.096 \pm 0.03 \text{ mg}$ で、SU6668 の強制経口投与は HT-29 の肝転移重量を推計学的に有意に抑制した($P = 0.03$)。一方、WAV-1 における肝重量は対象群 $1.36 \pm 0.05 \text{ mg}$ 、SU6668 群 $1.13 \pm 0.02 \text{ mg}$ であり両者の間には推計学的に有意($P = 0.001$)な差が認められ、2 種類の大腸癌肝転移モデルにおいて SU6668 はヒト大腸癌の肝転移を推計学的に有意に抑制した。

(4) DAS 法では 3 株共に SU6668 で腫瘍血管新生阻害が認められ、その危険率は HT-29, $P = 0.03$; WiDr, $P = 0.003$; WAV-1, $P = 0.0007$ であった。大腸癌肝転移モデルにおける転移阻害が血管新生阻害を介していることが示唆された。

腹膜播種モデル、肝転移モデル、DAS 法の実験期間中に本剤によるマウスの毒性死や体重減少は認められなかった。

D. 考察

近年、グリベック、ハーセプチン、イレッサ、リ

ツキサンなどの分子標的薬剤が臨床に広く応用されるようになってきた。血管上皮も分子標的の一つとして着目され種々の薬剤が開発されるようになってきた。血管新生は生理的条件下では月経や創傷治癒にしか発現せず、腫瘍増殖における腫瘍血管新生阻害は局所増殖制御や転移の抑制に重要な役割をしめる。実際 2003 年の ASCO ではキメラ型抗 VEGF モノクローナル抗体である Avastin が大腸癌化学療法に有意の上乗せ効果を示すことが報告され大きな反響を呼んだ。腫瘍は遺伝子多型を背景とし容易に耐性を獲得するが、血管内皮細胞自身は腫瘍細胞ではなく耐性獲得も起こしにくく、抗癌治療の標的として適切であることから、多くの血管新生阻害剤の臨床応用が検討されてきている。Tyrosine kinase receptor (TKR) inhibitor である SU6668 は TKR のうち VEGF, b-FGF, PD-EGF などのレセプターを阻害して、それ以降の signal 伝達を阻止して血管新生を抑制する。

今後、本剤を臨床試験に応用するには種々の検討が必要である。本剤の作用機序からは新たな血管新生阻害を介した腫瘍の増殖停止を期待できるものの従来の細胞障害薬剤のような腫瘍縮小効果を単独で期待することはできない。従って単独薬剤の効果は stable disease, time to progression などにより評価し、腫瘍縮小効果については既存の抗癌剤との併用上乗せ効果を検討する必要がある。いずれにせよこれら抗腫瘍剤の final endpoint は生存期間の延長であり、選択的血管新生阻害剤 SU6668 は副作用が軽微で経口投与による抗腫瘍・抗転移作用を発現することから、今後臨床応用に有用と考えられる。

E. 結論

SU6668 は VEGF によって促進される HUVEC の増殖を抑制し、血管新生に対する選択的な抑制を示した。DAS 法によって本剤の血管新生阻害効果が確認された。SU6668 は単独で胃癌腹膜播種モデル、大腸癌肝転移モデルにおいて播種・転移の形成を阻害した。本剤は転移阻害薬剤として有用と考えられた。

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・死亡は認められず、本剤が臨床応用に当たって著しい副作用を惹起することは考えにくい。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kubota, T., Egawa, T., Otani, Y., Furukawa, T., Saikawa, Y., Yoshida, M., Watanabe, M. and Kitajima, M.: Cancer chemotherapy chemosensitivity testing is useful in evaluating the appropriate adjuvant cancer chemotherapy for stages III/IV gastric cancers without peritoneal dissemination. *Anticancer Research*, 23: 583-588, 2003.
2. Kubota, T.: Is gastric cancer decreasing? *Japan Medical Association Journal*, 46 (6): 246-250, 2003.
3. Kubota, T.: 5-Fluorouracil and dihydropyrimidine dehydrogenase. *International Journal of Clinical Oncology*, 8: 127-131, 2003.
4. Chemosensitivity Testing in Oncology, Reinhold, U., and Tilgen, W., eds., pp. 231-241, Kubota, T., Otani, Y., Furukawa, T., Hasegawa, T., Watanabe, M., and Kitajima, M.: Chemosensitivity testing – Present and future in Japan. 2003, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
5. Saikawa, Y., Akasaka, Y., Kanai, T., Otani, Y., Kumai, K., Kubota, T. and Kitajima, M.: Preoperative combination chemotherapy with S-1 and low dose cisplatin against highly advanced gastric carcinoma. *Oncology Report*, 10: 381-386, 2003.
6. Egawa, T., Kubota, T., Suto, A., Otani, Y., Furukawa, T., Saikawa, Y., Watanabe, M., Kumai, K. and Kitajima, M.: Antitumor activity of doxorubicin in combination with docetaxel against human breast cancer xenografts. *In Vivo*, 17: 23-28, 2003.
7. Yamauchi, T., Watanabe, M., Hasegawa, H., Nishibori, H., Ishii, Y., Tatematsu, H., Yamamoto, K., Kubota, T. and Kitajima, M.: The potential for a selective cyclooxygenase-2 inhibitor in the prevention on liver metastasis in human colorectal cancer. *Anticancer Research*, 23: 245-250, 2003.
8. Saikawa, Y., Kubota, T., Otani, Y., Kitajima, M. and Modlin, I.M.: Alteration of DNA methylation status induced by epidermal growth factor in gastric cancer cell line, MKN-74. *Anticancer Research*, 23: 143-148, 2003.
9. Suganuma, K., Kubota, T., Saikawa, Y., Abe, S, Otani, Y., Furukawa, T., Kumai, K., Hasegawa, H., Watanabe, M., Kitajima, M., Nakayama, H. and Okabe, H.: Possible chemoresistance-related genes for gastric cancer detected by cDNA microarray. *Cancer Science*, 94(4): 355-359, 2003.
10. Sugiura, T., Saikawa, Y., Kubota, T., Suganuma, K., Otani, Y., Watanabe, M., Kumai, K. and Kitajima, M.: Combination chemotherapy with JTE-522, a novel selective cyclooxygenase-2 inhibitor, and cisplatin against gastric cancer cell lines in vitro and in vivo. *In Vivo*, 17: 229-234, 2003.
11. Yoshinare, K., Kubota, T., Watanabe, M., Wada, N., Nishibori, H., Hasegawa, H., Kitajima, M., Takechi, T. and Fukushima, M.: Gene expression in colorectal cancer and in vitro chemosensitivity to 5-fluorouracil: A study of 88 surgical specimens. *Cancer Science*, 94 (7): 633-638, 2003.
12. Koh, J., Kubota, T., Koyama, T., Migita, T., Hashimoto, M., Hosoda, Y. And Kitajima, M.: Combined antitumor activity of 7-hydroxystaurosporine (UCN-01) and tamoxifen against human breast carcinoma in vitro and in vivo. *Breast Cancer*, 10 (3): 260-267, 2003.
13. Maeda, S., Saikawa, Y., Kubota, T., Aoki, M., Otani, Y., Furukawa, T., Watanabe, M., Kumai, K. and Kitajima, M.: No cross-resistance of taxotere and taxol to conventional chemotherapeutic agents against gastric cancers as detected by MTT assay. *Anticancer Research*, 23: 3147-3150, 2003.
14. Yoshimizu, N., Saikawa, Y., Kubota, T., Akiba, Y., Yoshida, M., Otani, Y., Kumai, K., Hibi, T. and Kitajima, M.: Complete response of a highly advanced gastric carcinoma to preoperative chemoradiotherapy with S-1 and low-dose cisplatin. *Gastric Cancer*, 6: 185-190, 2003.
15. Wada, N., Otani, Y., Kubota, T., Kimata, M., Minagawa, A., Yoshimizu, N., Kameyama, K., Saikawa, Y., Yoshida, M., Furukawa, T., Fujii, M., Kumai, K., Okada, Y. and Kitajima, M.: Reduced angiogenesis in peritoneal dissemination of gastric cancer through gelatinase inhibition. *Clinical & Experimental Metastasis*, 20: 431-435, 2003.
16. Isshiki, S., Kudo, T., Nishihara, S., Ikehara, Y., Togayashi, A., Furuya, A., Shitara, K., Kubota, T., Watanabe, M., Kitajima, M. and Narimatsu, H.: Lewis type 1 antigen synthase (β sGal-T5) is transcriptionally regulated by homeoproteins. *Journal of Biological Chemistry*, 278 (38): 36611-36620, 2003.

17. Suganuma, K., Otani, Y., Saikawa, Y., Yoshida, M., Kubota, T., Kumai, K., Kameyama, K., Mukai, M. and Kitajima, M.: Gastric carcinoid tumors with aggressive lymphovascular invasion and lymph node metastasis. *Gastric Cancer*, 6: 255-261, 2003.
 18. Takahashi, T., Saikawa, Y., Kubota, T., Akiba, Y., Shigematsu, N., Yoshida, M., Otani, Y., Kumai, K., Hibi, T. and Kitajima, M.: Histological complete response in a case of advanced gastric cancer treated by chemotherapy with S-1 plus low-dose cisplatin and radiation. *Jpn. J. Clin. Oncol.*, 33 (11): 584-588, 2003.
2. 学会発表
1. Yorozyua, K., Kubota, T., Watanabe, M., Hasegawa, H., Ozawa, S. and Kitajima, M.: TSU-68 (SU-6668) inhibits local tumor growth and liver metastasis of human colon cancer xenografts through anti-angiogenesis. 94th Annual Meeting of American Association of Cancer Research (Toronto) 2003. 4. (The meeting was canceled because of SARS, but the proceeding was published.)
 2. Tokuyama, J., Saikawa, Y., Kubota, T., Kurihara, N., Furukawa, T., Otani, Y., Kumai, K. and Kitajima, M.: Tyrosine kinase inhibitor, SU6668 inhibits formation of gastric cancer dissemination in the peritoneum via suppression of tumor angiogenesis. 94th Annual Meeting of American Association of Cancer Research (Toronto) 2003. 4. (The meeting was canceled because of SARS, but the proceeding was published.)
 3. Yoshimizu, N., Otani, Y., Saikawa, Y., Aoki, M., Toriumi, F., Maeda, S., Hashiguchi, N., Suganuma, K., Yoshida, M., Furukawa, T., Kubota, T., Kumai, K. and Kitajima, M.: Anti-tumor effects of *citrus flavonoid* (nobiletin) on gastric cancer. 94th Annual Meeting of American Association of Cancer Research (Toronto) 2003. 4. (The meeting was canceled because of SARS, but the proceeding was published.)
 4. Okabayashi, K., Watanabe, M., Fujita, T., Okada, T., Hasegawa, H., Nishibori, H., Ozawa, S., Ryu, J., Kitagawa, Y., Kubota, T., Kitajima, M. and Kawakami, Y.: Identification of BORIS by SEREX as a tumor antigen recognized by serum IgG antibody of cancer patients. 94th Annual Meeting of American Association of Cancer Research (Toronto) 2003. 4. (The meeting was canceled because of SARS, but the proceeding was published.)
 5. Ochiai, H., Watanabe, M., Hasegawa, H., Nishibori, H., Aoki, S., Yoshinare, k., Nitori, N., Ryu, J., Yabe, N., Okabayashi, K., Takano, S., Kubota, T., Kitajima, M., Kawakami, Y. and Toda, M.: Analyze of a novel tumor antigen for colon cancer. 94th Annual Meeting of American Association of Cancer Research (Toronto) 2003. 4. (The meeting was canceled because of SARS, but the proceeding was published.)
 6. Yoshinare, K., Kubota, T., Watanabe, M., Hasegawa, H., Nishibori, H., Saikawa, Y. and Kitajima, M.: The sensitivity of colon cancer specimens to 5-fluorouracil. 94th Annual Meeting of American Association of Cancer Research (Toronto) 2003. 4. (The meeting was canceled because of SARS, but the proceeding was published.)
 7. Furukawa, T., Kubota, T., Saikawa, Y., Otani, Y., Watanabe, M. and Kitajima, M.: Different drug resistant mechanism of human four bladder cancer cell lines to anthracyclines. 94th Annual Meeting of American Association of Cancer Research (Toronto) 2003. 4. (The meeting was canceled because of SARS, but the proceeding was published.)
 8. Suganuma, K., Kubota, T., Saikawa, Y., Aoki, M., Toriumi, F., Yoshimizu, N., Hashiguchi, N., Maeda, S., Nishibori, H., Furukawa, T., Hasegawa, H., Otani, Y., Watanabe, M., Kumai, K. and Kitajima, M.: Reversal of the chemoresistance, using the results of the comparison from microarray and chemo-sensitivity test. 94th Annual Meeting of American Association of Cancer Research (Toronto) 2003. 4. (The meeting was canceled because of SARS, but the proceeding was published.)
 9. Aoki, M., Kumai, K., Fukuda, K., Saikawa, Y., Kubota, T., Kawamura, M., Horinouchi, H., Kobayashi, K., Kitajima, M. and Hosokawa, S.: A morphological change and growth regulation of cancer cell lines by a human monoclonal antibody derived from tumor infiltrating B lymphocyte (TIB) in lung cancer. 94th Annual Meeting of American Association of Cancer Research (Toronto) 2003. 4. (The meeting was canceled because of SARS, but the proceeding was published.)
 10. Saikawa, Y., Kubota, T., Hosokawa, Y.,

- Yoshida, M., Furukawa, T., Otani, Y., Kumai, K. and Kitajima, M.: Development of a novel chemosensitivity test using molecular markers of DNA damage inducible genes for prediction of chemotherapy effect. 94th Annual Meeting of American Association of Cancer Research (Toronto) 2003. 4. (The meeting was canceled because of SARS, but the proceeding was published.)
11. Maeda, S., Saikawa, Y., Kubota, T., Sukanuma, K., Hashiguchi, N., Sugiura, T., Furukawa, T., Otani, Y., Watanabe, M., Yoshida, M., Kumai, K., Kubota, T. and Kitajima, M.: Usefulness of cancer chemotherapy with docetaxel (Doce) against advanced gastric carcinoma. 94th Annual Meeting of American Association of Cancer Research (Toronto) 2003. 4. (The meeting was canceled because of SARS, but the proceeding was published.)
 12. Kitagawa, Y., Kubota, T., Kumai, K., Otani, Y., Furukawa, T., Saikawa, Y., Yoshida, M., Matsuda, J., Shimizu, Y., Oyama, T., Fujii, H., Mukai, M., Kubo, A. and Kitajima, M.: Clinical significance of radio-guided sentinel node navigation for gastric cancer. 5th International Gastric Cancer Congress (Rome) 2003. 5.
 13. Akatsu T., Yoshida, M., Kumai, K., Kubota, T., Shimazu, M., Ueda, M., Otani, Y., Wakabayashi, G., Aiura, K., Tanabe, M., Saikawa, Y., Kawachi, S. and Kitajima, M.: Results of watchful waiting for cholelithiasis after gastrectomy. 5th International Gastric Cancer Congress (Rome) 2003. 5.
 14. Otani, Y., Furukawa, T., Saikawa, Y., Yoshida, M., Kubota, T., Kumai, K., Sugino, Y., Mukai, M. and Kitajima, M.: Gastric stromal tumors – Indication and procedure of laparoscopic surgery. 5th International Gastric Cancer Congress (Rome) 2003. 5.
 15. Hosokawa, Y., Yoshida, M., Kumai, K., Kubota, T., Otani, Y., Kitagawa, Y., Furukawa, T., Saikawa, Y. and Kitajima, M.: Clinicopathological analysis of proximal early gastrectomy. 5th International Gastric Cancer Congress (Rome) 2003. 5.
 16. Takahashi, T., Yoshida, M., Otani, Y., Kubota, T., Saikawa, Y., Ishikawa, H., Kumai, K. and Kitajima, M.: Cause of the gastroesophageal reflux after distal gastrectomy analysis using Endoscopy and computed tomography. 5th International Gastric Cancer Congress (Rome) 2003. 5.
 17. Yoshida, M., Kumai, K., Kubota, T., Otani, Y., Saikawa, Y., Ishikawa, H., Takahashi, T., Tsuyuki, A., Kikuchi, K., Tanabe, M., Fujishiro, Y. and Kitajima, M.: Reflux esophagitis after distal gastrectomy – Analyzed by questionnaire, pH monitoring and Endoscopy. 5th International Gastric Cancer Congress (Rome) 2003. 5.
 18. Kumai, K., Imaeda, H., Aiura, K., Ogawa, H., Yoshida, M., Saikawa, Y., Otani, Y., Kubota, T. and Kitajima, M.: Endoscopic mucosal resection for early gastric cancer as a curative and minimally invasive treatment. 5th International Gastric Cancer Congress (Rome) 2003. 5.
 19. Kubota, T., Sukanuma, K., Otani, Y., Furukawa, T., Kumai, K. and Kitajima, M.: Chemosensitivity resistance – related genes of gastric cancer detected by cDNA microarray. 5th International Gastric Cancer Congress (Rome) 2003. 5.
 20. Kubota, T., Chin, K., Hosoya, Y., Mochiki, E., Imazu, H., Tsujitani, S., Tokunaga, A., Machara, Y., Nakajima, T. and Exploratory Chemotherapy Trial Group for Gastric Cancer in Japan: Multi-centric Phase II study of neo-adjuvant cancer chemotherapy with continuous infusion of 5-fluorouracil and cisplatin on advanced gastric cancer – with reference to the predictive value of dihydropyrimidine dehydrogenase mRNA. 39th Annual Meeting of American Society of Clinical Oncology (Chicago) 2003. 5-6.
 21. Akiba, Y., Takaishi, H., Saikawa, Y., Kubota, T., Fujii, M., Kitajima, M., Hibi, T., Ishii, H.: High histological response and low toxicity of preoperative chemotherapy with S-1 plus low dose CDDP against stage IV gastric cancer. 39th Annual Meeting of American Society of Clinical Oncology (Chicago) 2003. 5-6.
- H. 知的財産の出願・登録状況 (予定を含む)
なし