

2003 0/54

厚生労働科学研究費補助金  
がん克服戦略研究事業

ヒト浸潤・転移性がんの特性及び制御方策  
に関する研究

(分野 2 転移・浸潤およびがん細胞の特性に関する研究)

平成 15 年度 研究報告書

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)  
平成 16 年 4 月

## 目 次

1. ヒト浸潤・転移性がんの特性及び制御方策に関する研究  
平成 15 年度 総括研究報告書 ----- 原 田 昌 興 1
2. 浸潤・転移性前立腺癌の病理学的特性に関する研究  
平成 15 年度 分担研究報告書 ----- 原 田 昌 興 8
3. 癌転移に関与する腫瘍特異的血液凝固惹起物質の研究  
- 腫瘍組織特異的抗凝固療法による転移阻止に向けて -  
平成 15 年度 分担研究報告書 ----- 宮 城 洋 平 12
4.  $\text{Ca}^{2+}$ /カルモジュリンキナーゼ(CaMK) II とフォスファターゼ  
(PP)2A による細胞接着の制御機構  
平成 15 年度 分担研究報告書 ----- 高 橋 和 秀 15
5. ゲノム不安定性を示す胃がんの特性  
平成 15 年度 分担研究報告書 ----- 松 隈 章 一 17
5. 神経成長因子受容体 p75 の発現にともなう遺伝子発現の変動  
平成 15 年度 分担研究報告書 ----- 菊 地 慶 司 21

厚生労働科学研究費補助金（がん克服戦略研究事業）

総括研究報告書

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 ヒト浸潤・転移性がんの特性および制御方策に関する研究  
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ヒト上皮系悪性腫瘍を対象として、オーダーメイド医療の提供に必須である個々症例の的確な診断、予後指標の確立、治療抵抗性癌に対する新たな制御方策の開発を目指し、浸潤・転移性癌の実態と特性、悪性化進展に関与する分子機構について細胞生物学的、臨床病態的解析を行った。がん細胞の浸潤性獲得要因の一つと想定される基質接着性低下の要因について乳がん細胞系 MCF-7 を用いて解析し、接着性低下は $\beta 1$  インテグリン結合性フォスファターゼ PP2A-A の発現低下による $\beta 1$  の脱リン酸化阻害に加えて、PP2A-A のアクチン重合促進作用の阻害に起因している可能性を明らかにした。血液凝固関連蛋白第 VII 因子(VII)は肝細胞癌のみならず乳癌、卵巣癌細胞系等でも発現し、VII 強制発現卵巣癌細胞系は細胞膜表面に活性型 TF-VIIa 複合体を形成、*in vitro* での運動能、浸潤能の亢進を示すことを明らかにした。前立腺癌における組織化学的な組織因子(TF)の発現は浸潤先進部、高異型度、転移陽性例に高度で、VEGF 発現誘導、神経内分泌細胞の出現と関連し、予後不良指標である可能性を明らかにした。ヒト胃癌におけるマイクロサテライト不安定性 (MSI) に伴うミスマッチ修復遺伝子、がん関連遺伝子のフレームシフト型変異を検索し、複数の遺伝子変異を示す高 MSI 症例は腸型管状腺癌 (tub) で、進行に伴い複数の遺伝子変異例が増加、一度生じた変異は経時的に変遷し、MSIはヒトがん多様性要因に関与している可能性が示唆された。神経成長因子受容体 p75 により発現制御される遺伝子を検索し、ヒト不死化上皮細胞株に発現する p75 は、フィブロネクチンの発現を抑制する可能性を見出した。

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  
宮城洋平 神奈川県立がんセンター臨床研究所  
技幹  
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  
専門研究員  
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

今後のがん医療に求められているオーダーメイドの医療提供のためには、個々のがんの的確な個性診断と治療方針選択指標の確立が必須である。がんの確定診断は組織学的になされ、組織異型度は予後、再発、術後 QOL 等の規定要因として重要であるが、個々症例の経過、治療反応性等は組織異型度のみでは予測困難なことが少なくない。その一因は、個々の患者の遺伝的背景はもとより、生体微小環境要因は一様ではなく、本来単一クローン性に発生したヒト臨床がんの多くは、その進展過程において、ゲノム

不安定性要因と相まって、性状の異なるサブクローンの集合組織へと変転するためと思考される。したがって、個々の臨床がん症例の的確な診断指標、治療法選択指標を見出すためには、浸潤・転移性に関わる種々の分子機構の異常を詳細な組織構成分析との対応のもとに解析する必要がある。欧米において主要ながん死因の一つである前立腺癌、乳癌は、近年本邦においても増加傾向が著しく、内分泌療法抵抗性癌および高率な骨転移の制御が緊要な課題とされている。既存の治療法に抵抗性を示すがん、転移の新たな制御法開発のためには、がん細胞の浸潤・転移性獲得の分子機構に関与する遺伝子・蛋白に対する抑制因子、阻害剤などの応用が考えられる。がんの浸潤転移性獲得には細胞間ないし細胞基質間接着分子機構の失調が重要と想定されるが、ヒトがんにおける接着分子の動態、増殖因子シグナル伝達との関連は未だ十分に解明されていない。また近年、血液凝固関連蛋白分子が、がん細胞の浸潤転移過程に関与している可能性を示唆する報告があり、新たながん制御法開発の標的分子として注目されている。がんの悪性化進展過程にはマイクロサテライト不安定性に伴うがん関連遺伝子変異の関与も想定される。ヒトがんは各組織幹細胞に由来すると想定されるが、その実体は未だ不明である。本研究は、上皮性悪性腫瘍、特にホルモン依存性がんを対象に加え、浸潤、転移能に関わる血液凝固関連因子の機能、がん細胞の基質接着低下に関わる分子機構、実際の治療抵抗性癌、転移性癌の特性について、組織学的多様性との対応のもとに組織化学的あるいはゲノム不安定性指標等により分析し、日常的組織診断あるいは遺伝子診断を含め、個々臨床癌の的確な悪性度診断の指標、治療反応性、化学療法後の再発予知指標の構築、治療抵抗性がん・転移性がんに対する新たな制御方策の開発に寄与する成果の確保を目的とする。

## B. 研究方法

(1)  $\text{Ca}^{2+}$ /カルモジュリン (CaMK) II とフォスファターゼ (PP) 2A による細胞接着の制御機構  
がん細胞の特性の一つである基質接着 (足場) 非依存性増殖機構を解明する目的で、基質接着分子  $\beta 1$  インテグリンのリン酸化による機能調節と、その分子機構への関与の想定されるプロテインキナーゼ及びプロテインフォスファターゼ (PP) の検索を行った。具体的には乳がん細胞系 MCF-7 と正常乳腺上皮細胞系を用い、細胞周期に依存した接着性の調節における PP2A とカルモジュリンキナーゼ CAMKII の役割をそれぞれの阻害剤であるオカダ酸あるいは KN62 等を用いて明確にし、 $\beta 1$  インテグリンの脱リン酸化以外の機能について、特に GTPase 依存性あるいは非依存性のアクチン重合および  $\beta 1$  インテグリン-アクチン結合の調節における PP2A の関与の可能性について検討を加えた。

(2) 血液凝固反応と共役する情報伝達とがんの浸潤・転移及びその制御

種々のヒトがん細胞系における第 VII 因子 (VII) を中心とする血液凝固関連蛋白の発現について RT-PCR 法により検索した。また、卵巣癌細胞系に第 VII 因子を強制発現させた恒常的・高発現細胞は運動能の亢進を示すことから、この卵巣癌細胞の浸潤能、転移形成能、血管誘導能等の分子機構について、主としてマトリゲルを用いた *in vitro* trans-well assay 法により解析した。また、組織因子 (TF)、第 X 因子、トロンビン、PARs (protease activated receptors) 等の細胞運動能、浸潤能に対する影響についてそれぞれの蛋白抗体ないし阻害剤を用いて詳細に検討した。

(3) 浸潤・転移性前立腺癌の病理学的特性に関する組織化学的検索

浸潤・転移性前立腺癌の特性を知るために、血液凝固関連蛋白組織因子 (TF) の組織化学的発現を前立腺癌臨床材料を用いて検索した。また、

TFにより発現誘導の示唆されている血管内皮増殖因子 VEGF の組織化学的発現との関連について検索し、併せてホルモン非依存性増殖能獲得、浸潤転移性との関連が想定される神経内分泌細胞出現、増殖細胞指標 Ki-67 の標識率、EGFR の発現、アポトーシス関連蛋白 Bcl-2 発現等との関連について検討した。

#### (4) ゲノム不安定性を示す胃がんの特性

ヒト胃癌臨床例の内視鏡的粘膜切除術による早期癌及び進行癌外科切除材料を用い、パラフィン薄切標本より抽出した DNA を用いて、蛍光プライマーにより BAT26 を指標とするマイクロサテライト変異 (MSI) の有無、およびミスマッチ修復遺伝子 hMSH3、がん関連遺伝子 Bax、TGFβRII のフレームシフト変異について検索し、さらに複数の遺伝子に変異の認められた高 MSI 症例について、MSH-6, IGFIIR, BLM, RAD25 の変異及び変異様式について、組織型との関連のもとに解析を行った。一部の早期がん症例については、マイクロディセクション法を適用し、粘膜層と粘膜下層浸潤部における変異態様について比較検討を試みた。

#### (5) 神経成長因子受容体 p75 を介した転写調節と細胞悪性化

がんは幹細胞を発生起源とするとの仮説のもとに、上皮幹細胞の指標候補である神経成長因子受容体 p75 の発現の消長と発癌との関連についての検索を行った。ヒト子宮頸管部由来の扁平上皮細胞にヒトパピローマウイルス HPV16 の DNA を導入して樹立された不死化細胞株から、p75 陽性、陰性の細胞群を分離し、両細胞系における発現遺伝子のプロファイルを cDNA アレイを用い比較検討した。その結果 p75 陽性細胞で発現抑制の認められたフィブロネクチンの p75 による転写制御機構について解析を行った。

#### (倫理面への配慮)

ヒト試料を使用してのがん関連遺伝子解析等

に際しては国の定めた倫理指針に従い、倫理性を遵守して研究を行った。研究内容を診療情報に還元すると予測される場合は、担当医のインフォームドコンセントのもとに検体採取等を行った。培養細胞系を用いた実験的研究では倫理面での問題はなく、動物実験に当たっては当施設における動物実験要項に従い、実験動物の生命の尊厳を損なうことのないよう十分な配慮のもとに行った。

#### C. 研究結果

##### (1) Ca<sup>2+</sup>/カルモジュリン (CaMK) II とフォスファターゼ (PP) 2A による細胞接着の制御機構

昨年度までに、がん細胞における基質接着性低下の要因について正常乳腺上皮細胞と乳がん細胞 MCF-7 を用いて解析し、MCF-7 の基質接着性低下はβ1インテグリンの CaMKII を介するセリン・スレオニン残基のリン酸化によること、さらにこの恒常的リン酸化はプロテインフォスファターゼ 2A の制御サブユニット A の発現欠損による脱リン酸化過程の阻害によることを見いだした。本年度はこれに加えて PP2A のアクチン重合における役割を検討し、基質接着正常細胞ではβ1インテグリンはアクチン線維に結合しているが、遊離細胞ではアクチン結合の低下が見られ、乳がん細胞 MCF-7 ではアクチン結合が全く認められないことを明らかにした。その原因を解析した結果、正常細胞においては基質接着時にβ1インテグリンが IQGAP1 と結合した PP2A-AC および RAC と複合体を形成しているが、乳がん細胞 MCF-7 では接着時でもこの複合体形成が認められず、β1インテグリンとアクチンの重合に PP2A-A が重要な役割を演じている可能性が示唆された。

##### (2) 血液凝固反応と共役する情報伝達とがんの浸潤・転移及びその制御

これまで正常肝細胞、肝癌細胞のみに発現が認められていた血液凝固第 VII 因子は、種々の培養ヒト癌細胞において認められ、特に乳癌、卵巣癌

細胞では強発現を示すものがあることを確認した。この第 VII 因子の発現レベルの低い卵巣癌細胞系を用い、第 VII 因子発現ベクターの導入による、強制的な高発現卵巣癌細胞株を樹立、運動能、浸潤能を解析した結果、明らかに亢進が認められ、細胞表面上に活性化第 X 因子の認められたことから、TF-VII 複合体はがん細胞の浸潤性獲得に関与している可能性が示唆された。また、この浸潤能は PAR (protease activated receptors) 1 により抑制傾向が見られ、PARs とがん細胞の浸潤能との関連も示唆された。

#### (3) 浸潤・転移性前立腺癌の病理学的特性に関する組織化学的検索

TF の組織化学的発現は良性前立腺上皮ではほとんど認められず、腺癌組織では染色強度に差があるものの、ほぼすべての症例で陽性であった。明らかな陽性を呈する TF 高発現例は検索 63 例中 36 例 (57%) で、この TF 高発現群では転移陽性の進行癌の頻度が高く、浸潤先進部で強陽性を呈する傾向が認められ、索状増殖要素、Gleason grade 5 の混在と相関し、低発現例に比べ明らかに予後不良であった。TF 高発現群では、細胞増殖指標 Ki-67 標識率、EGFR 陽性率が高率な傾向を認めたが統計的有意差はなく、Bcl-2 発現との関連も見られなかった。なお、高発現群には神経内分泌細胞陽性例が存在し、さらに神経内分泌細胞に一致して VEGF の発現が認められる症例があった。

#### (4) ゲノム不安定性を示す胃がんの特性

内視鏡的胃粘膜切除術による早期胃がん 250 症例において、BAT26, TGFβRII, MSH3, BAX 遺伝子のマイクロサテライト変異の検索で複数の遺伝子に変異の認められた症例 (MSI-H 群) では、IGFIIR, BLM, RAD25, MSH-6 遺伝子についての MSI の追加検索により約 60%の症例に新たなフレームシフト遺伝子変異が認められた。その結果、MSI-H 群では検索 7 遺伝子の 14-80%に変異が認められ、フレームシフト変異の発生頻度は

MSH3:82%, TGFβRII:68%, BAX:41%, RAD50:36%, MSH6:27%, IGFIIR:25%, BLM:14%であった。BAT26 の変異のない症例でも複数遺伝子にフレームシフト変異の認められた症例が 1/7 (14%) 存在した。MSI-H 群症例で粘膜下層浸潤を示す 4 症例についてマイクロディセクション法により粘膜内と粘膜下層浸潤癌組織における変異遺伝子を検索した結果、3 例では両組織での遺伝子変異態様に不一致が認められた。また、高度進行低分化腺癌では MSI-H 例は僅か 1/112 (0.9%) であった。

#### (5) 神経成長因子受容体 p75 を介した転写調節と細胞悪性化

ヒト子宮頸管上皮の HPV16-DNA 導入による不死化細胞株 NCE16 から、p75 高発現亜株とほぼ陰性の亜株を分離し、その発現遺伝子プロファイルを比較検討した。その結果、両細胞系において発現レベルに差の認められるいくつかの遺伝子のうち、細胞の悪性化に関与の想定される遺伝子としてフィブロネクチン (FN) が注目された。FN は p75 陰性細胞では発現しているが、高発現細胞ではほとんど発現していないことが確認され、FN の発現は p75 により制御されている可能性が示唆された。この FN 発現の p75 による転写制御は転写因子 SP1 の活性制御による可能性が明らかとなった。

#### D. 考察

がん細胞の増殖特性である足場非依存性増殖機構を解析するため、正常乳腺上皮と乳癌細胞における主要な基質接着因子β1 インテグリンの分子動態についての解析を進めてきた。その結果、乳癌細胞の基質接着の喪失にはβ1 インテグリンのセリン・スレオニン残基のリン酸化によるアクチンとの結合阻害が関与していると想定された。今年度はβ1 インテグリンのアクチン結合の分子機構について解析し、正常乳腺上皮におけるβ1 インテグリンのスレオニン残基の脱リン酸化

に必須であるフォスファターゼ PP2A-AC の活性は、 $\beta 1$  インテグリンとアクチンとの安定な複合体形成にきわめて重要な働きをしている可能性が示唆された。つまり、PP2A の制御サブユニット A の欠損による $\beta 1$  インテグリンの脱リン酸化の調節失調とアクチン結合失調が乳癌細胞の足場非依存性増殖に関与している可能性が示唆される。

これまで肝細胞ないし肝細胞癌においてのみ発現すると報告されていた外因系血液凝固反応に関わる第 VII 因子は、脳腫瘍以外の種々のがん細胞系で発現が認められたことは興味深い。第 VII 因子の恒常的高発現卵巣癌細胞は、運動能、浸潤能の亢進を示し、この運動能、浸潤能の亢進は TF-VII 複合体形成により活性化される第 X 因子の作用による可能性が示唆され、詳細な機構は未だ不明であるが、その一部は活性化 X による PAR1 の活性化が関与していると考えられる。また、TF は培養細胞系のみでなく、前立腺癌臨床例においてもほぼ全例に発現を認め、特に浸潤先進部に高発現が認められ、高発現例は有意に予後不良との結果は、TF の浸潤性増殖、予後因子としての意義を示唆する結果と考えられる。TF は血管誘導、VEGF 活性化誘導作用のあることが知られている。TF 発現と内分泌療法不応性癌の特性である神経内分泌細胞出現との関連が認められたこと、さらに VEGF 発現が神経内分泌細胞に一致して認められたことは、癌細胞の自己分泌的ないし傍分泌的浸潤増殖能獲得要因として興味深い知見である。今後、癌細胞表面に於ける TF-VIIa 形成に端を発する分子機構の詳細な解析により、あらたな分子標的療法への展開も想定される。

胃癌の内視鏡的粘膜切除術症例においてマイクロサテライト不安定性 (MSI) に関連したがん関連遺伝子のフレームシフト変異は腺腫において既に認められ、BAT26, TGFBR2 等の 2 遺伝子以上に変異を認める MSI-H 例はほぼ全例が高分

化腸型管状腺癌で、多数の遺伝子変異例ほど組織学的多様性を示す傾向が見られたことから、MSI は腸型早期癌の進展には何等かの関与が示唆される。一方、印環細胞癌などの低分化症例、瀰漫性浸潤癌、特に高度進行癌症例では MSI-H 症例は殆ど認められず、印環細胞癌などの発癌、進行過程にはマイクロサテライト不安定性の関与は乏しいものと考えられる。また、同一症例でも粘膜層と粘膜下層浸潤部の癌組織でその変異態様が異なり、浸潤部では変異の消失している例も認められたことは、進展過程でクローナルセレクションが関与している可能性を示唆するものとも考えられる。ヒトがんの進展過程には、エピジェネティックな機構とともに、MSI 等に伴う遺伝子変異の結果、生物学的性状の異なる不均一な組織構成へと転換する可能性も考えられる。

上皮幹細胞の指標と想定される神経成長因子受容体 p75 は、実験的子宮頸癌の発生過程に伴い、あるいは多くの臨床がんでは消失している。がんの幹細胞起源説の視点から、このがん化に伴う p75 消失の積極的な意義を見出すために、子宮頸管上皮の不死化細胞系において、p75 の発現有無による発現遺伝子プロファイルの変動を解析した結果、フィブロネクチン遺伝子の発現が p75 により負に制御されている可能性が見出された。フィブロネクチンには上皮細胞の分化抑制作用が想定されている。また、p75 は Fas/TNF 受容体ファミリーに属し、神経系細胞や前立腺癌細胞のアポトーシス誘導作用があると報告されている。p75 の消失、その結果としてのフィブロネクチンの産生亢進、アポトーシス抵抗性獲得はがん化過程においては有利であると想定される。また、p75 によるフィブロネクチン遺伝子の発現抑制は基本転写因子の一つである SP1 の活性調節によるとの結果は、p75 は細胞がん化過程に抑制的に関与している可能性を示唆するものと考えられる。

## E. 結論

がん細胞の浸潤性獲得要因の一つと想定される基質接着性低下は、基質接着因子インテグリンβ1 結合性フォスファターゼ PP2A の制御サブユニット A の発現低下によるスレオニン残基の脱リン酸化阻害およびアクチン結合阻害による可能性を明らかにした。この結果は多機能酵素系としての PP2A に関する新たな知見である。がん細胞の浸潤・転移過程には、血液凝固反応関連蛋白 TF-VIIa 複合体形成、それに引き続く第 X 因子、PAR1 活性化が関与している可能性を明らかにした。また、TF 発現は浸潤・転移性前立腺癌の特性の一つであり、予後指標としての可能性を見出した。この結果から、抗凝固剤等を応用した新たながん制御法開発への展開も期待される。胃癌のうち分化型管状腺癌においてはマイクロサテライト不安定性(MSI)に伴うがん関連遺伝子のフレームシフト変異の進展過程への関与が想定されるが、低分化印環細胞癌では MSI の関与は乏しいものと推察された。この結果は、胃癌の個性診断指標の構築に寄与するものと期待される。神経成長因子受容体 p75 は、基本転写因子 SP-1 の活性制御によりフィブロネクチンの発現を抑制し、細胞がん化に抑制的に作用している可能性を見出した。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Suzuki, K. and Takahashi, K. (2003) Reduced cell adhesion during mitosis by threonine phosphorylation of β1 integrin. *J Cell. Physiol.* 197, 297-305.
2. Suzuki, K. and Takahashi, K. (2003) Reduced expression of the regulatory A subunit of serine/threonine protein phosphatase 2A in

human breast cancer MCF-7 cells. *Int. J. Oncol.* 23, 1263-1268.

3. Sugiyama A, Miyagi Y., Komiya Y, Kurabe N, Kitanaka C, Kato N, Nagashima Y, Kuchino Y, Tashiro F: Forced expression of antisense 14-3-3{beta} RNA suppresses tumor cell growth in vitro and in vivo. *Carcinogenesis.* 24(9): 1549-59, 2003.
4. Ruf W, Seftor E. A., Petrovan R. J., Weiss R. M., Gruman L. M., Margaryan N. V., Seftor R. E. B., Miyagi Y., Hendrix M. J. C: Differential Role of Tissue Factor Pathway Inhibitors 1 and 2 in Melanoma Vasculogenic Mimicry. *Cancer Res* 63: 5381-9, 2003.
5. Cho H, Kobayashi O, Tsuburaya A, Sugiyama Y, Sairenji M, Motohashi H, Yoshida T, Miyagi Y., Imada T. Metastatic Gastrointestinal Stromal Tumor with an Exon 11 c-Kit Mutation Responding to the Tyrosine Kinase Inhibitor Imatinib. *Dig Surg* 21(1):74-77. Epub 2004 Feb 12.
6. Oshita F, Sekiyama A, Suzuki R, Ikehara M, Yamada K, Saito H, Noda K, Miyagi Y.: Detection of occult tumor cells in peripheral blood from patients with small cell lung cancer by promoter methylation and silencing of the retinoic acid receptor-beta. *Oncol Rep.* 10(1):105-8, 2003.
7. Akakura K, Tsujii H, Morita S, Tsuji H, Yagishita T, Isaka S, Akaza H, Hata T, Fujime M, Harada M., Shimazaki J, and the Working Group for Genitourinary Tumors, National Institute of Radiological Science : Phase I/II clinical trials of carbon ion therapy for prostate cancer. *Prostate* 58: 252-258, 2004.
8. 原田昌興、宮城洋平、中村圭靖、江澤英史 : 放射線医学と病理学. 前立腺癌. 病理診断. *病理と臨床* 21: 1136-1141, 2003



9. Matsuda M, Kondo M, Kashiwabara S, Yoshihara M, Sutou S, Matsukuma S: Co-localization of Trax and Mea2 in Golgi complex of pachytene spermatocytes in the mouse. J. Histochem. Cytochem. 2004 (in press).
2. 学会発表
  1. 宮城洋平、中村圭靖、広瀬史和、金明寿、矢野間俊介、宮城悦子、平原史樹、安光英太郎、宮崎香、亀田陽一、長嶋洋治、原田昌興：胃癌では Kunitz type serine protease inhibitor PP5/TFPI2 の発現減弱／消失が悪性形質の獲得に関与している可能性がある。第 62 回日本癌学会総会、名古屋、2003.9
  2. 金明寿、宮城悦子、椎名香織、小川幸、五来逸雄、平原史樹、中村圭靖、矢野間俊介、広瀬史和、原田昌興、ルフ・ラルフラム、宮城洋平：血液凝固第 VII 因子の発現は卵巣癌細胞の運動能・浸潤能を高める。第 62 回日本癌学会総会、名古屋、2003.9.
  3. 高橋和秀、鈴木勝雄：細胞周期による基質接着の制御。第 56 回日本細胞生物学会大会、大津、2003.5.
  4. 高橋和秀、鈴木勝雄：インテグリンβ1 の磷酸化・脱磷酸化による基質接着の制御。第 62 回日本癌学会総会、名古屋、2003.9.
  5. 赤倉功一郎、辻井博彦、森田新六、辻比呂志、柳下次雄、井坂茂夫、伊藤晴夫、赤座英之、島亮、藤目真、原田昌興、島崎淳：シンポジウム・早期前立腺癌の治療；前立腺癌に対する重粒子線（炭素イオン線）治療。第 91 回日本泌尿器科学会総会、徳島、2003.4.
  6. 池田伊知郎、福岡洋、森山正敏、野口純男、里見佳昭、石塚栄一、岩崎皓、斉藤清、小川勝明、原田昌興：前立腺癌全摘術長期成績の検討。第 91 回日本泌尿器科学会総会、徳島、2003.4.
  7. 池田直弥、三浦猛、河上 哲、滝沢明利、小林一樹、宮城洋平、原田昌興：再燃前立腺癌に対する CDDP, Docetaxel を用いた化学療法の有効性の検討。第 91 回日本泌尿器科学会総会、徳島、2003.4.
  8. 吉原光代、西連寺意勲、小林理、亀田陽一、原田昌興、松隈章一：内視鏡粘膜切除早期胃癌症例のマイクロサテライト不安定性 MSI と形態学的特性。第 62 回日本癌学会総会、名古屋、2003.9.
  9. 松隈章一、松田美由紀、吉原光代：すい臓特異性発現を示す ER 蛋白遺伝子 GP25L の特性。第 62 回日本癌学会総会、名古屋、2003.9.
  10. 松隈章一：進化的に保存された ER 蛋白遺伝子 p24α1 のヒトでの変異。第 5 回日本進化学会、福岡、2003.10.
  11. 松田みゆき、近藤雅昭、柏原真一、吉原光代、須藤鎮世、松隈章一：パキテン期精母細胞内ゴルジ体における mTrax と Mea2/Δ Mea2 の相互作用。第 26 回日本分子生物学会年会、神戸、2003.12.
  12. 菊地慶司・安本茂：神経成長因子受容体 p75 の発現にともなう遺伝子発現の変動。第 62 回日本癌学会総会、名古屋、2003.9
  13. 菊地慶司・安本茂；神経成長因子受容体 p75 の発現にともなう遺伝子発現の変動。第 24 回日本分子生物学会年会、神戸、2003.12
  14. 政木隆博、安本茂、森村茂、菊地慶司、亀田陽一、宮川薫、玉井拙夫、杉政征夫、大川伸一、多羅尾和郎：膵管上皮不死化細胞株の樹立と膵発癌過程の研究。第 62 回日本癌学会総会、名古屋、2003.9
- H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）
  1. 特許取得：該当なし
  2. 実用新案登録：該当なし

厚生科学研究費補助金（がん克服戦略研究事業）

分担研究報告書

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 ヒト浸潤・転移性がんの特性およびその制御方策に関する研究  
分担課題 浸潤・転移性前立腺癌の病理学的特性に関する研究

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長

研究要旨 前立腺癌の個別化治療に向けて、前立腺癌個々症例の的確な診断、予後指標を見出し、アンドロゲン非依存性癌および骨転移性癌の制御方策の開発に資する知見の集積を図ることを目的として、浸潤・転移性前立腺癌の病理学的特性を組織化学的、分子病理学的手法を導入して臨床病態との関連について分析を進めてきた。前立腺癌 63 例の診断時生検組織および培養前立腺癌細胞系における外因系血液凝固反応の初動因子・組織因子 (TF) の発現について検索した結果、TF は良性前立腺上皮ではほとんど発現を認めず、培養前立腺癌細胞系にはすべて発現が見られ、腺癌生検組織ではほぼ全例に組織化学的発現が認められた。発現は、特に浸潤先進部、索状増殖要素ないし Gleason grade 5 の要素の存在例で強陽性で、高発現群 36 例 (57%) の 1/3 では同時に神経内分泌細胞の出現を認めた。この神経内分泌細胞にはしばしば VEGF の発現が認められ、高発現群は低発現群に比して明らかに転移陽性例が多く予後不良であった。この結果から、前立腺癌において TF は VEGF の誘導などを介して進展に関与している可能性が示唆された。

A. 研究目的

前立腺癌は欧米においては男性がん死因の第 1-3 位にあり、本邦でも近年増加傾向が著しい。前立腺癌は組織学的確認をもって確診とされ、通常の腺癌は組織異型度により分類されている。前立腺癌の組織異型度分類としては組織分化度による 3 段階分類、あるいは前立腺癌のみの特異な分類法である Gleason 分類が用いられ、いずれの分類法も多数例の解析では予後因子として有意であるが、個々症例の臨床経過、予後の予測は困難なことが少なくない。その一因は、ヒトがんは多元的要因により発生し、生体内環境は一様ではなく、進展過程で様々な二次的

修飾を受けるためと考えられる。実際に、代表的ホルモン依存性癌である前立腺臨床癌の多くは、極めて多様な組織構成を示し、組織型によりアンドロゲン依存性、増殖能などの生物学的性状も異なっている。この組織学的、生物学的多様性の要因は、前立腺癌には多中心発生日も少なくないことも一因と考えられるが、内分泌療法に伴う生体内ホルモン環境の人為的変動を含め、個々の症例における、がん細胞の増殖、進展に関与する生体内要因の相違により複雑に修飾された結果であることが示唆される。すなわち、多くの再燃癌の特性が、内分泌療法抵抗性組織要素の優勢増殖であることは、まさにが

んの悪性新生物としての性格を如実に示すものである。そして、前立腺癌制御の最大の課題はアンドロゲン非依存性癌および高率な骨転移の制御方策を見出すことで、そのためにはまず、非依存性癌及び転移性癌の特性、発生要因を解明し、新たな治療標的分子等を探索しなければならない。本研究はこの様な背景のもとに、前立腺癌個々症例の的確な診断、予後指標を見出すとともに、アンドロゲン非依存性癌および骨転移の制御方策開発に資する知見の集積を図ることを目的とする。

## B. 研究方法

近年、外因系血液凝固反応の初動因子である組織因子(Tissue factor, TF)、第VII因子、組織因子経路抑制蛋白 TFPIs 等の蛋白が、がん細胞の浸潤・転移性と関連していることを示唆する報告がある。前立腺癌培養細胞系、LNCaP, PC-3, DU-145, Tsu-P1 におけるその発現を検索した結果、すべての細胞系において TF の発現が認められた。そこで、未治療前立腺癌63例を対象として、診断時生検組織における、TF の組織化学的発現を、組織分化度、Gleason 分類、WHO-Mostofi 組織型構成(率)などとの対応のもとに検討した。また、同一症例を用いて血管内皮増殖因子 VEGF、アポトーシス関連蛋白 Bcl-2、増殖因子 EGF 受容体 EGFR、細胞増殖指標 Ki-67、神経内分泌細胞の出現等についての組織化学的発現についての検索を行った。

### (倫理面への配慮)

検索対象とした組織材料は病理診断のために採取、検査科に提出された検体であるが、データの解析は特定の個人を識別せずに行い、検索結果の公表によりプライバシーを侵害し、あるいは特定個人に不利益をもたらす可能性はないと判断される。

## C. 研究結果

(1) 前立腺癌における組織因子・TF の発現について

TF の発現は良性前立腺上皮においては、ほぼ全例陰性ないしごく微弱に陽性であったが、腺癌組織ではほとんど全例で陽性細胞が認められた。しかし、その染色強度には差があり、発現レベルにより陰性または弱陽性例は低発現群、陽性ないし強陽性例は高発現群とすると、63例中36例(57%)が高発現例であった。TF 高発現群は転移陽性の stage D 症例が多く、特に浸潤先進部で強陽性を呈する傾向が認められた。高発現群の組織学的特長は WHO-Mostofi 分類に準拠した6組織型の構成率で索状増殖要素の構成率が高く、Gleason grade 5 の要素の混在率の高い症例であった。

(2) TF 発現レベルと Ki-67, EGFR, Bcl-2, VEGF の組織化学的発現及び神経内分泌細胞の出現について

TF 高発現群と低発現群における細胞増殖指標 Ki-67 標識率、EGFR 陽性率を比較したところ、高発現群では標識率、陽性率とも統計的有意差はないが、高率な傾向が認められた。Bcl-2 発現との関連はなかった。検索63例中クロモグラニンAを指標とする神経内分泌細胞陽性例は12例で、いずれも TF 高発現群であり、TF 低発現群には神経内分泌細胞陽性例は1例もなかった。TF 発現細胞に一致してしばしば VEGF の組織化学的発現を認めた。さらに VEGF 発現は神経内分泌細胞にも認められる症例があった。

(3) TF 発現の予後因子としての意義

TF 高発現群と低発現群の内分泌療法後の予後について Kaplan-Meier ほうによる非癌死率を解析した結果、高発現群では有意に予後不良であった。

#### D. 考察

前立腺癌の組織学的異型度の分類法はこれまでに多数の報告があり、未だ国際的統一はなされていない。本邦では1985年「前立腺癌取扱い規約」において、WHOの分化度分類に準拠した3段階分類が規定された。しかし近年、米国を中心に Gleason 分類が推奨されていることから、2002年の規約改定に伴い、Gleason 分類が取り上げられた。Gleason 分類は、腺癌の量的に優勢な組織型に加えて副次的組織型を判定し、両者のスコアの和を最終的な異型度とする分類法で、前立腺癌の組織学的多様性を考慮した分類法として有用と思われた。しかし、5段階分類を採用していることもあり、観察者間での偏差、同一観察者における異時的再現性に問題がある。また、規約分化度分離も Gleason 分類でも核の異型度は勘案されていない。これからの医療の方向性であるオーダーメイド医療を可能とするためには、まず個々の症例の治療反応性をはじめ臨床経過、予後の予測に優れ、普遍化が容易な、再現性にも優れた異型度分類の構築が必要である。また、前立腺癌制御の最大の課題は内分泌療法抵抗性癌の特性ならびにその発生の機構、高率な骨転移、特に造骨性転移の機構解明ならびに制御方策の構築である。この様な視点から、ヒト前立腺癌、特に浸潤・転移性癌の特性ならびに悪性化進展の要因を病理学的に分析し、個々例の性状についての的確な診断、治療反応性の指標を明らかにするために研究を進めてきた。

TFは47-kdの細胞膜貫通性糖蛋白で、血液凝固第VII因子と複合体を形成し外因系血液凝固反応の初動因子として作動することが知られている。TFはこの機能とは別に、細胞増殖、血管新生、腫瘍細胞の浸潤能等に関与し、ある種のヒトがんにおいてその進行、転移に関与することが報告されている。腫瘍の進展に対する

TFの作用はVEGF等の血管新生促進因子の誘導によるものと想定されている。前立腺癌においてTFは、転移陽性のstage D症例に高発現を示す症例が多く、特に浸潤先進部の低分化索状増殖要素ないし Gleason grade 5の要素の混在例で高発現の認められたことは、他臓器のがんでの報告を支持する結果である。TFは第VII因子と複合体を形成し、第X因子の活性化などを経て浸潤、転移性に関与することが明らかにされつつある。したがって、前立腺癌におけるTFの高発現が、浸潤先進部あるいはstage D症例で有意に高率との結果は、この想定を支持するものと考えられる。TF発現とKi-67標識率、EGFR発現あるいはBcl-2発現との関連はなく、TF発現細胞に一致してVEGFの発現が認められたことは、TFは直接的に細胞増殖を促進あるいはアポトーシスの抑制に作用するものではなく、VEGF誘導などの血管新生促進等の間接的作用によりもたらされている可能性を示唆する。

前立腺癌では悪性化進展に伴って神経内分泌細胞が増加し、この神経内分泌細胞は傍分泌的に増殖因子などを産生していると想定されている。今回の検索で、TF高発現群では神経内分泌細胞陽性例が認められ、この神経内分泌細胞にVEGFの発現を認めたことは、前立腺癌細胞の産生したTFにより神経内分泌細胞にもVEGF誘導がもたらされた可能性が示唆される。すなわち、前立腺癌細胞において産生されたTFは自己分泌、傍分泌的にVEGFを誘導し、がんの進展に関与しているものと想定される。TFの高発現群の予後が不良であった要因は、高発現群には病期進行例、高異型度例が高率であったことが主要な要因であって、おそらく独立した予後因子としての意味合いは乏しいと想定され、今後多変量解析などによる検討を要する

## E. 結論

未治療前立腺癌における TF の組織化学的発現動態を検索した結果、ほぼ全例に陽性細胞を認め、転移陽性の病期進行例、浸潤先進部、低分化の索状増殖要素、 Gleason grade 5 の要素の存在例で発現強度が高まる傾向を認め、TF 高発現群は予後不良であった。TF 発現細胞および神経内分泌細胞に一致して VEGF 発現が認められ、TF は VEGF 誘導能を介して前立腺癌の悪性化進展に関与している可能性が示唆された。今後さらに、これまでに検索した種々のがん関連蛋白に加えて、血液凝固反応関連分子の消長と浸潤・転移性前立腺癌との関連を解析し、ホルモン療法抵抗性癌等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て研究を進める。

## F. 健康危険情報

特記すべきことはない。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Akakura K, Tsujii H, Morita S, Tsuji H, Yagishita T, Isaka S, Akaza H, Hata T, Fujime M, Harada M, Shimazaki J, and the Working Group for Genitourinary Tumors, National Institute of Radiological Science : Phase I/II clinical trials of carbon ion therapy for prostate cancer. Prostate 58: 252-258, 2004.
2. 原田昌興、宮城洋平、中村圭靖、江澤英史：放射線医学と病理学。前立腺癌。病理診断。病理と臨床 21: 1136-1141, 2003

### 2. 学会発表

1. 赤倉功一郎、辻井博彦、森田新六、辻比呂志、柳下次雄、井坂茂夫、伊藤晴夫、赤座

英之、島亮、藤目真、原田昌興、島崎淳：シンポジウム・早期前立腺癌の治療；前立腺癌に対する重粒子線（炭素イオン線）治療。第 91 回日本泌尿器科学会総会、2003.4、徳島

2. 池田伊知郎、福岡洋、森山正敏、野口純男、里見佳昭、石塚栄一、岩崎皓、齊藤清、小川勝明、原田昌興：前立腺癌全摘術長期成績の検討。第 91 回日本泌尿器科学会総会、2003.4、徳島
3. 池田直弥、三浦猛、河上 哲、滝沢明利、小林一樹、宮城洋平、原田昌興：再燃前立腺癌に対する CDDP, Docetaxel を用いた化学療法の有効性の検討。第 91 回日本泌尿器科学会総会、2003.4、徳島
4. 宮城洋平、中村圭靖、廣瀬史和、金明寿、矢野間俊介、宮城悦子、平原史樹、安光英太郎、宮崎香、亀田陽一、長嶋洋治、原田昌興：胃癌では Kunitz type serine protease inhibitor: PP5/TFPI2 の発現減弱・消失が悪性形質の獲得に関与している可能性がある。第 62 回日本癌学会総会、2003.9. 名古屋
5. 吉原光代、西連寺意勲、小林理、亀田陽一、原田昌興、松隈章一：内視鏡粘膜切除早期胃がん症例のマイクロサテライト不安定性 MSI と形態学的特性。第 62 回日本癌学会総会、2003.9. 名古屋
6. 金明寿、宮城悦子、椎名香織、小川幸、五来逸雄、平原史樹、中村圭靖、廣瀬史和、矢野間俊介、原田昌興、ラフ ウオルフラム、宮城洋平：血液凝固第 VII 因子の発現は卵巣癌細胞の運動能・浸潤能を高める。第 62 回日本癌学会総会、2003.9. 名古屋

## H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

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

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 ヒト浸潤・転移性がんの特性およびその制御方策に関する研究

分担課題 血液凝固反応と共役する情報伝達とがん転移、およびその制御  
—腫瘍組織特異的抗凝固療法による転移阻止にむけて—

分担研究者 宮城 洋平 神奈川県立がんセンター臨床研究所 技幹

研究要旨 癌の浸潤・転移の成立には様々な現象が複雑に関与している。血液凝固因子や凝固反応の結果生ずるフィブリンが、細胞接着、血管新生などを介して、浸潤・転移に深く関与していることが示唆されている。本研究により、これまで肝細胞、肝癌細胞、一部の単球系細胞のみにしか発現が報告されていない血液凝固第 VII 因子が、脳腫瘍を除く、様々な癌細胞で発現していること、低酸素状態で誘導されること、*in vitro trans-well assay* による癌細胞の移動・浸潤を促進することが明らかとなり、浸潤・転移における癌細胞膜表面上の TF-VIIa 複合体を起点とする細胞内への情報伝達や血液凝固反応を介した現象の重要性が示唆された。更に、TF-VIIa 複合体活性を阻害する抗 TF 抗体、TF-VIIa 複合体により活性化された第 Xa 因子の阻害剤 NAP5 により、亢進した移動・浸潤能が抑制されること、thrombin 阻害剤の hirudin にはその作用がないことが示された。更に、G タンパク質共役型受容体である PAR (protease activated receptor)1, PAR2 に対する抗体を用いた阻害実験で、浸潤能の亢進には、一部、PAR1 を介する情報伝達に関与する可能性が示唆された。血液中に普遍的に存在し、癌細胞に容易に供給されうる凝固関連因子は、今回、低酸素状態で癌細胞自らに発現誘導が起こることが示された第 VII 因子も含めて、浸潤・転移の制御を考える上で重要な標的分子であると考えられる。

A. 研究目的

癌の浸潤・転移の成立には様々な現象が複雑に関与している。近年、血液凝固因子や凝固反応の結果生ずるフィブリンが細胞接着、血管新生などを介して転移の成立に深く関与していることを示す報告が、我々を含めた複数の研究室からなされている。血液凝固関連因子は、血液から、容易かつ豊富に癌細胞に供給されることから、癌の浸潤転移に密接に関わると同時に、

これらを標的とした抗癌転移療法の開発が期待される。更に、近年、組織因子(TF)・血液凝固第 VII 因子の複合体は、外因系血液凝固反応の起点となるのみに留まらず、細胞膜に存在する G タンパク質共役型受容体 protease activated receptors (PARs)を活性化し、細胞内に情報伝達を行うことが明らかになりつつある。本研究では、癌細胞における組織因子(TF)・血液凝固第 VII 因子やその関連遺伝子の発現と、浸潤・転移の

関連を明らかにする。特に、本年度は、癌細胞が産生する血液凝固関連因子の中でも、第 VII 因子に注目し、癌細胞の浸潤能に与える影響と発現制御メカニズムについて検討を加える。

## B. 研究方法

これまでの研究で、第 VII 因子の発現と癌細胞の運動能、浸潤能の関係を明らかにするため、遺伝子導入により第 VII 因子を恒常的に発現し、細胞膜表面上に TF-VIIa 複合体活性を認める卵巣癌細胞を樹立している。

B-I. 卵巣癌細胞野生株 OVSAYO、ベクターのみの導入株 2 株、第 VII 因子発現ベクター導入株 2 株の計 5 株を用いて、*in vitro transwell assay* による細胞移動能、Matrigel に対する浸潤能の解析を行う。

B-II. 3種類のTFに対するマウスモノクローナル抗体TF9 6B4、TF9 9C3、TF8 5G9、あるいはTF9 6B4+TF9 9C3を添加し、移動能、Matrigel に対する浸潤能に与える影響をみる。また、第 Xa 因子の阻害剤 NAP5、thrombin 阻害剤の hirudin の投与による影響を解析する。

B-III. PAR1、PAR2 に対する抗体を用いた阻害実験で、これらの G タンパク質共役型受容体を介する情報伝達の関与を解析する。

## C. 研究結果

C-I. 第 VII 因子発現ベクター導入株 2 株では、卵巣癌細胞野生株 OVSAYO、ベクターのみの導入株 2 株と比べて、増殖速度に差は見られなかったが、細胞移動能、Matrigel に対する浸潤能が優位に上昇していた。

C-II. TF-VIIa 複合体の形成を阻害する、あるいは、複合体のプロテアーゼ活性を阻害することが知られる、抗TFマウスモノクローナル抗体TF9 6B4、TF9 9C3、TF8 5G9はいずれも単独で第VII因子発現ベクター導入株の移動能、浸潤能を抑制し、

TF9 6B4+TF9 9C3の両方を同時に添加すると、ほぼ野生株、ベクターのみの導入株と同レベルまで低下した。更に、第Xa因子の阻害剤NAP5は第VII因子発現ベクター導入株の移動能、浸潤能を対照群レベルまで抑制したものの、thrombin阻害剤のhirudinは効果を示さなかった。

C-III. PAR1 に対する 2 種類の抗体 ATAP2、WEDE15 のカクテルを用いた阻害実験では、浸潤能に対してのみ、軽度の抑制効果を示した。PAR2 に対する抗体 PAR2 の添加では、移動能、浸潤能のいずれに対しても抑制効果を示さなかった。ヌードマウス移植腫瘍の解析が現在進行中である。

## D. 考察

様々な癌細胞が、第 VII 因子を発現し、且つ、その活性化に不可欠とされるグルタミン酸残基の  $\alpha$ -カルボキシル化反応を触媒する酵素も同時に発現していること、凝固第 VII 因子が低酸素状態で誘導されることをこれまで明らかにしてきた。今回、第 VII 因子を高発現する卵巣癌細胞で、細胞の移動能、浸潤能が亢進していることを示した。また、この現象には、TF-VIIa 複合体を介する凝固第 X 因子の活性化が必要であるが、血液凝固連鎖反応の最終活性化物質である thrombin の生成は関係しないことが明らかとなった。活性化型第 X 因子、Xa が、どのようなメカニズムで働いているかは今後、更なる詳細な解析を必要とするが、PAR1 の活性化が一部関与していると考えられる。これまでの免疫染色で、癌細胞の浸潤先端部に TF、第 VII 因子が発現する（前々年度本研究）ことと考え合わせ、TF・VIIa を介するメカニズムが浸潤・転移に密接に関わること、腫瘍細胞における低酸素状態がこれらを誘導する可能性を強く示唆するものである。

## E. 結語

本研究で得られたヒト癌細胞株の解析結果から、TF・VIIa複合体を起点とする血液凝固関連の様々な現象が癌細胞の浸潤・転移に及ぼす影響を、更に分子レベルで詳細に解明することは、浸潤・転移の理解と、その制御のための分子標的を定める上でも重要であると考えられる。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Sugiyama A, Miyagi Y, Komiya Y, Kurabe N, Kitanaka C, Kato N, Nagashima Y, Kuchino Y, Tashiro F. Forced expression of antisense 14-3-3 $\beta$  RNA suppresses tumor cell growth in vitro and in vivo. *Carcinogenesis*. 24(9):1549-59, 2003.
2. Ruf W, Seftor E. A., Petrovan R. J., Weiss R. M., Gruman L. M., Margaryan N. V., Seftor R. E. B., Miyagi Y, Hendrix M. J. C. Differential Role of Tissue Factor Pathway Inhibitors 1 and 2 in Melanoma Vasculogenic Mimicry. *Cancer Res* 63: 5381-9, 2003.
3. Cho H, Kobayashi O, Tsuburaya A, Sugiyama Y, Sairenji M, Motohashi H, Yoshida T, Miyagi Y, Imada T. Metastatic Gastrointestinal Stromal Tumor with an Exon 11 c-Kit Mutation Responding to the Tyrosine Kinase Inhibitor Imatinib. *Dig Surg* 21(1):74-77. Epub 2004 Feb 12.

### 2. 学会発表

1. 金明寿、宮城悦子、椎名香織、小川幸、五来逸雄、平原史樹、中村圭靖、矢野間俊介、広瀬史和、原田昌興、ルフ・ヨルフラム、宮城

洋平：血液凝固第 VII 因子の発現は卵巣癌細胞の運動能・浸潤能を高める。第 62 回日本癌学会総会、名古屋、2003.9.

2. 宮城洋平、中村圭靖、広瀬史和、金明寿、矢野間俊介、宮城悦子、平原史樹、安光英太郎、宮崎香、亀田陽一、長嶋洋治、原田昌興：胃癌では Kunitz type serine protease inhibitor PP5/TFPI2 の発現減弱／消失が悪性形質の獲得に関与している可能性がある。第 62 回日本癌学会総会、名古屋、2003.9.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし



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 ヒト浸潤・転移性がんの特性およびその制御方策に関する研究

分担課題名  $Ca^{2+}$ /カルモジュリンキナーゼ(CaMK) II とフォスファターゼ(PP)2A  
による細胞接着の制御機構

分担研究者 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

研究要旨 乳癌細胞における基質接着性の顕著な減弱は CaMKII による $\beta 1$ -integrin の恒常的リン酸化と、これを脱リン酸化する PP2A の制御 subunit A の発現欠如に原因がある事が、それぞれの阻害剤と cell-free 系の利用によって明らかとなった。また PP2A は $\beta 1$ -integrin の脱リン酸化のみならず、actin ゲル化能を有す IQGAP1 を結合し、Rac GTPase を結合している $\beta 1$ -integrin へ recruit し、 $\beta 1$ -integrin が anchoring する actin assembly の重合を促進する新たな機能を有する事を発見した。

#### A. 研究目的

がん細胞の浸潤・転移能獲得に必須と考えられる integrin を介した基質接着機構の破綻メカニズムを、 $\beta 1$ -integrin の CaMKII によるリン酸化、また PP2A による脱リン酸化による $\beta 1$ -integrin の機能調節の点から解析した。

#### B. 研究方法

細胞の脱着、再接着に際しての $\beta 1$ -integrin のリン酸化、脱リン酸化は CaMKII および PP2A の特異的阻害剤 KN-62 あるいはオカダ酸(OA)の存在下でリン酸化部位特異的抗体を用いて検出した。Cell-free での $\beta 1$ -integrin のリン酸化および脱リン酸化は透過性にした細胞を CaMKII あるいは PP2A 酵素を用いて行った。またタンパク質の相互作用は特異的抗体による免疫沈澱およびウェスタン

分析によって行った。

#### C. 研究結果

正常乳腺細胞を trypsin で基質から脱着すると、 $\beta 1$ -integrin の Thr788-789 がリン酸化され、同時に結合していた PP2A が遊離した。このリン酸化は CaMKII 阻害剤 KN-62 により阻害された。遊離細胞の再接着過程で $\beta 1$ -integrin は脱リン酸化されたが、再接着および脱リン酸化とも PP2A の阻害剤 OA により阻害された。また基質に接着している正常細胞では $\beta 1$ -integrin は actin 繊維に結合しているのに対し、遊離細胞では結合 actin が顕著に減少し、また乳癌細胞では全く結合していなかった。その原因を解析した結果、基質接着している正常細胞では IQGAP1 を結合した PP2A-AC が Rac を結合した  $\beta 1$ -integrin と複合体

を形成していた。一方、PP2A-A の発現を欠く乳癌細胞では基質接着時でも PP2A-C-IQGAP1 およびβ1-integrin-Rac は存在するものの、両者の複合体形成が見られなかった。

#### D. 考察

細胞の脱着に伴うβ1-integrin の Thr788-789 の磷酸化は阻害剤の特異性から CaMKII による事が示唆された。cell-free 系におけるβ1-integrin の CaMKII による磷酸化と阻害剤による磷酸化阻害はこれを支持した。また再接着とβ1-integrin の脱磷酸化が OA により阻害される事、さらに cell-free 系でβ1-integrin が PP2A により脱磷酸化される事は、磷酸化β1-integrin の脱磷酸化は PP2A による事が示唆された。またβ1-integrin の actin 繊維への結合は、actin ゲル化能を有する IQGAP1 の Rac-β1-integrin への recruitment が必要であり、これを担う分子として PP2A が機能している可能性が強く示唆された。これらの結果は、β1-integrin が actin 繊維に結合して基質接着に必須な張力を得るにはβ1-integrin の脱磷酸化と actin 繊維への結合が必要であり、これら両方の機能を PP2A が果たしている事が示唆された。この仮説は癌抑制遺伝子産物 PP2A-A の発現を欠く乳癌細胞においては、β1-integrin が恒常的に磷酸化されて CaMKII を結合し、反対に actin 繊維と PP2A-A を介した IQGAP1 の結合を欠いている事をよく説明する。

#### E. 結論

癌細胞の特徴である顕著な基質接着性の低下を示す乳癌細胞では、主要な基質接着因子β1-integrin が細胞内で actin 繊維と結合していない。その原因は、癌抑制遺伝子産物 PP2A-A の

発現が乳癌細胞では欠如している事にあると考えられた。正常細胞における解析から、PP2A は actin 繊維との結合を阻害する磷酸化β1-integrin を脱磷酸化すると同時に、actin 重合活性を有する IQGAP1 を Rac GTPase と結合したβ1-integrin のもとに recruit する機能を合わせ持つ事が明らかとなった。

#### F. 健康危険情報

該当無し

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1 Suzuki, K. and Takahashi, K. (2003) Reduced cell adhesion during mitosis by threonine phosphorylation of β1 integrin. *J Cell. Physiol.* 197, 297-305, 2003
- 2 Suzuki, K. and Takahashi, K. (2003) Reduced expression of the regulatory A subunit of serine/threonine protein phosphatase 2A in human breast cancer MCF-7 cells. *Int. J. Oncol.* 23, 1263-1268, 2003

##### 2. 学会発表

1. 高橋和秀、鈴木勝雄：細胞周期による基質接着の制御。第 56 回日本細胞生物学会大会、2003 年 5 月
2. 高橋和秀、鈴木勝雄：インテグリン $\alpha$ 1 の磷酸化・脱磷酸化による基質接着の制御。第 62 回日本癌学会総会、2003 年 9 月

#### H. 知的所有権の取得状況

該当無し

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 ヒト浸潤・転移性がんの特性およびその制御方策に関する研究

分担課題 ゲノム不安定性を示す胃がんの特性

分担研究者 松隈 章一 神奈川県立がんセンター臨床研究所 専門研究員

研究要旨 胃がんの進行過程とゲノム不安定性のひとつの形態であるマイクロサテライト不安定性(MSI)について検討した。初期の臨床胃がんとして内視鏡粘膜切除(EMR)早期胃がん症例、進行胃がんへの移行過程として2 cm以下の高度分化型胃がん症例、さらに進行胃がんとして未分化型胃がん2 cmおよび10 cmの症例についてMSIによる遺伝子変異を検索し、MSI形質を示す胃がんの進展過程について検討した。MSIを示す胃がんはEMR早期胃がんの多数症例において認められ、MSIによる遺伝子フレームシフト変異は症例ごとにさまざまな頻度で発生していることが認められた。また、遺伝子のフレームシフト変異はランダムに起こるのではなく、変異を起こしやすい遺伝子の順列があることがわかった。TGF $\beta$  RII、MSH3、BAX遺伝子が特にフレームシフト変異を起こしやすいことが確認され、MSI-Hのスクリーニングとして、BAT26の変異のほかこれらの遺伝子変異を検索し50%以上の変異があるものをMSI-Hと判定することは適当であろうと考えた。早期EMR胃がん251症例中24例(9.5%)、2 cm高度分化型胃がん84症例中5例(5.9%)、未分化型進行胃がん112症例中1例(0.9%)と胃がんの進行過程でMSI-H形質を示す胃がんの頻度が減少することがわかった。

#### A. 研究目的

がんの発生を増加させる因子としてDNA損傷修復遺伝子の異常があることは多数例で立証されてきた。この中でも、ミスマッチ修復遺伝子の異常に起因すると考えられるマイクロサテライト不安定性(MSI)は、環境因子によらずDNA複製過程でのエラーを修復できないために生じる変異であり、遺伝子蛋白コード領域中の単純繰り返し配列にフレームシフト型突然変異を引き起こす。このようなDNA損傷の修復異常ががんの進展にどのように寄与しているかが論議されてきた。特に遺伝子群BAX、TGF

$\beta$  RII、MSH3において、ミスマッチ修復異常に由来すると思われるフレームシフト型変異が発生し、がん細胞に選択的に残ると考えられてきた。日本人に発生頻度の高い胃がんにおいてこれまでの解析で、高度MSI (MSI-H) では、BAX、TGF $\beta$  RII、MSH3遺伝子の単純配列を含む領域において遺伝子のフレームシフト型変異を起こしていた。これらのフレームシフト変異に加えて1アレル型マイクロサテライトBAT26を検索し、胃がん病理組織切片から抽出したDNAを解析することにより、胃がんの進行にMSIがどのような関与するかを見出すこと

を目的とした。MSI-H型胃がんの経過を内視鏡粘膜切除の早期胃がん症例、2 cm 高度分化型胃がん手術症例、および未分化型進行胃がん症例を検索し、胃がんの進展過程での MSI 遺伝子変異と組織異型度との関連を調べた。

## B. 研究方法

### [胃がん組織材料]

高度分化型胃がん (2 cm、84 例)、進行胃がん (2 cm、51 例 及び 10 cm、61 例) を過去 10 年の手術症例から選別し、病理組織パラフィン薄切標本の 2 mm 角微小片から DNA を抽出し解析に用いた。非がん部組織より抽出した DNA は対照として用いた。また、内視鏡胃粘膜切除 (EMR) による早期胃がんの組織標本 246 症例についても同様の検索を行った。

### [マイクロサテライト不安定性の検索]

マイクロサテライト検索用の PCR プライマーの片方を蛍光末端ラベルし、がん部および非がん部 DNA をテンプレートとして PCR 増幅後、6%PAGE 変性ゲル電気泳動により分離し、蛍光イメージアナライザー(Storm860)で検出した。

### [遺伝子変異の検索]

遺伝子変異が想定される部分を含む断片を蛍光末端ラベルしたプライマーにより PCR 増幅後、上記と同様、6%PAGE 後蛍光イメージアナライザーで検索した。1 塩基以上の差異が検出された胃がん DNA がフレームシフト変異によることは PCR 産物をプラスミドにクローン化し、さらに塩基配列を決定して確定した。MSI によるフレームシフト変異を受ける遺伝子として TGF  $\beta$  RII、MSH3、BAX のほか、IGFIIR、RAD50、MSH6、BLM についても検索を行った。

### (倫理面への配慮)

研究材料は手術後の摘出組織、及びその病理学的検索後の試料の一部で診療の範囲内で収集され、個人情報 は病院個人情報と同様に保護管

理されている。また、がん組織中での DNA 変異に限り解析し、個人のゲノム遺伝子情報は得られていない。

## C. 研究結果

### [EMR早期胃がんMSI-H症例でのフレームシフト変異遺伝子の検索]

EMR早期胃がん251症例中のBAT26、TGF  $\beta$  RII、MSH3、BAXの検査で2種以上の変異を有するMSI-H胃がん症例について、さらにRAD25、IGFIIR、BLM、MSH6遺伝子のフレームシフト変異を追加検索したところ、59% (13/22) の症例で新たな遺伝子のフレームシフト変異が見られた。この結果、MSI-Hと判定したEMR早期胃がん症例のフレームシフト変異遺伝子数は検索した全7遺伝子の14-80%にわたり、40-60% の遺伝子でフレームシフト変異のある症例は12/21 (57%)、40% 以上の遺伝子でフレームシフト変異のある症例は15/21 (71%) であった。BAT26の変異のあったEMR胃がん症例中でフレームシフト変異の起こった頻度を遺伝子ごとに集計してみると、MSH3 (82%)、TGF  $\beta$  RII (68%)、BAX (41%)、RAD50 (36%)、MSH6 (27%)、IGFIIR (25%)、BLM (14%)の順で減少が認められ、遺伝子によってフレームシフト変異の起こりやすさが異なっていることがわかった。MSI-H判定の基準遺伝子として用いたMSH3、TGF  $\beta$  RII、BAX遺伝子は上位3位を占めており、これらの3遺伝子によるMSI-Hの検索は妥当であったと考えられる。BAT26の変異がなく基準遺伝子中1遺伝子のみのフレームシフト変異が認められMSI-Lと判定した胃がん7症例でさらにRAD25、IGFIIR、BLM、MSH6遺伝子のフレームシフト変異を追加検索したところ、6症例ではフレームシフト変異遺伝子の追加は認められなかったが、1症例では2遺伝子で追加の変異が見つかったので、BAT26の変異がなくMSI-Lと判断し