

200823022A

厚生労働科学研究費補助金

第3次対がん総合戦略事業

がん病理・病態学的特性の分子基盤の解析とそれに基づく診断・治療法の開発に関する研究

平成20年度 総括研究報告書

主任研究者 落合 淳志

平成21(2009)年4月

目 次

I	総括研究報告書	1
	がん病理・病態学的特性の分子基盤の解析とそれに基づく	
	診断・治療法の開発に関する研究	3
	落合 淳志	
II	分担研究報告書	9
1.	体内的における MMP/ADAM の作用機構および機能評価法の開発	11
	岡田 保典	
2.	病理材料・in vivo モデルを用いたがんの発育進展機構の解明	19
	坂元 亨宇	
3.	消化管腫瘍の病理組織像に対する Wnt シグナルと TGF- β シグナルの作用	27
	加藤 光保	
4.	がん組織の階層構造の解明と起源細胞の可視化	29
	平尾 敦	
5.	発現解析によるがん間質相互作用における重要分子の同定	31
	深澤 由里	
6.	グライコームの解析に基づくがんの診断法、治療応答性・転移再発予測法の開発	35
	神奈木 玲児	
III	研究成果の刊行に関する一覧表	41

I 総括研究報告書

がん病理・病態学的特性の分子基盤の解析とそれに基づく診断・治療法の開発に関する研究

落合 淳志

がん病理・病態学的特性の分子基盤の解析とそれに基づく診断・治療法の開発

総括研究者 落合淳志 国立がんセンター東病院臨床開発センター臨床腫瘍病理部・部長

研究要旨：本研究は、がん病理・病態学的特性を、がん細胞と間質細胞を含めたがん組織全体の分子機構として明らかにし、がん生物像に関わるがんと間質細胞の相互作用を総合的に検討し、新しい診断薬、治療標的を見出すことを目的とする。本年度は以下の研究成果を得た。1)前立腺がん骨転移、膵臓がん神経浸潤の病理病態学的特徴に対応する動物モデルを作製した。これらモデルを用いて、2)前立腺がん骨転移には骨由来IGF2が重要な役割を果たしていることを示した。3)膵臓がん神経浸潤にはラミニン5やIL6などが重要な役割を果たしていることを初めて示した。4)がん幹細胞/Tumor initiating cellの存在ニッチを明らかにするため分化型扁平上皮がんのがん幹細胞マーカー(ボドブランin)を同定し、がん幹細胞の性質を検討した。5)肺がん切除症例を用いて、がん間質細胞にもボドブランin陽性間質線維芽細胞が存在し、ボドブランin陽性線維芽細胞のがん細胞周囲への出現は、がん患者の予後と強い相関があることが示された。

A.研究目的

がん生物像は、がん細胞の遺伝子変化的積み重ねにのみ規定されるだけでなく、がん細胞と周囲微小環境芽重要な役割を果たしていると考えられる。特に、がんに特異的な病理・病態はがんの悪性度と強い相関を示し、これら病理・病態学的変化はがんの生物像を規定する分子基盤にかかわっていることが強く推察される。本研究班では、これらのがん生物像に関わる特徴的な病理・病態の分子基盤と、その分子機構が有する性粒学的意義を検討し、がん細胞とがん微小環境の相互作用として検討するものである。本年度は、1)前立腺がん骨転移、膵臓がん神経浸潤の病理病態学的特徴に対応する動物モデルを作製した。これらモデルを用いて、2)前立腺がん骨転移には骨由来のIGF2が前立腺がんの生着に重要な役割を果たしていることを示した。3)膵臓がん神経浸潤モデルを作製し、膵臓がんの高頻度の神経浸潤にはラミニン5やIL6が重要な役割を果たしていることを初めて示した。4)がん幹

細胞/Tumor initiating cellの存在ニッチを明らかにするため、形態学的に腫瘍周辺部にがん幹細胞が存在すると考えられる分化型扁平上皮がんのがん幹細胞マーカー(ボドブランin)を同定した。このマーカーにより、扁平上皮がんがん幹細胞を採取しその性質を確認した。扁平上皮がんのがん幹細胞はCD44やSHH(sonic hedge hog)の発現が高いことを明らかにした。また、抗がん剤投与によりがん細胞の障害は抑制され、動物移植により腫瘍形成能が極めて高いことが示された。5)肺がん切除症例を用いて、がん間質細胞にもボドブランin陽性間質線維芽細胞が存在し、ボドブランin陽性線維芽細胞のがん細胞周囲への出現は、がん患者の予後と強い相関があることが示された。

B.研究方法

1)ヒトがん組織特徴的病理・病態を示す動物モデルの作製
前立腺がんは90%を超える症例で骨に転

移を示す臨床病理学的特徴を示す。前立腺がんの骨転移の検討には動物骨ではなくヒト成人骨への転移を示すモデルを作製し、転移の分子基盤を明らかにする必要がある。ヒト成人骨を移植したNOD-SCIDマウスを用いてヒト前立腺がん培養細胞株の移植を行い、ヒト骨における微小環境を模倣するモデルを作製した。

2) 同モデルを用いて抗ヒトIGF2特異抗体による治療実験を行い、ヒト前立腺がんは骨内における生存および増殖には骨由来IGF2を利用していることを検討した。

3) ヒト膵がんの特徴的な浸潤様式である神経浸潤を模倣するモデルをマウス坐骨神経へのヒト膵がん細胞株移植を行い、形態学的にヒト膵がんの神経浸潤のモデルを作製した。

4) 扁平上皮のがん性幹細胞の新しいマーカーを検索した。またがん性幹細胞を選択しがん性幹細胞の生物学的意義を検討した。

5) ヒト肺がん切除材料を用いて、間質線維芽細胞に発現するボドブラニン分子に注目し、臨床病理学的検索を行った。

(倫理面への配慮)

ヒト試料を用いた検討では、いずれも国立がんセンター研究倫理審査を受けたのち研究を開始した。

C. 研究結果

1) 特徴的な病理・病態を示す動物モデルの作製

前立腺がんおよび膵がんの特徴的な病理・病態を示す動物モデルの作製を試み、ヒト前立腺がん細胞のヒト成人骨における増殖モデルを作製した。形態学的には、骨形成性の骨造成を示し、血中においてPSAの発現量により腫瘍の大きさが評価できた。また、ヒト膵がん細胞株によるマウス坐骨神経モデルを作製した。実際のヒト膵がんと同様な高分化腺がんを形成し、神経内を中枢方向に浸潤した。

2) ヒト成人骨におけるヒト前立腺がん増殖に関わる分子機構の解明

作製した前立腺がんヒト成人骨増殖モデルを用いて、前立腺がんの骨における増殖シグ

ナルを明らかにする目的で、骨内に最も蓄積するIGFに注目し、抗IGF2抗体を用いた治療実験を行った。ヒト骨内にはヒト由来IGF2が蓄積しており、抗ヒトIGF2抗体を用いることにより、前立腺がんの増殖に骨由来のIGF2がどのような働きをしているのか検討した。抗IGF2抗体処理によりヒト前立腺がんの骨における増殖は有意に抑制され、ヒト前立腺がんの骨における増殖はIGF2依存性であることを示した。

3) ヒト膵がんの特徴的な浸潤様式である神経浸潤を模倣するモデル

ヒト膵がん神経浸潤は病理形態学的にきわめて特徴的であり、実際のヒトがん組織を用いた検討ではほぼ100%の症例において確認される。マウス坐骨神経にヒト膵臓がん培養細胞を移植し、経時的に神経浸潤を確認し、マウスの状態を詳細に観察した。神経浸潤は移植部位から常に中枢側へ浸潤し、マウスは疼痛に対して過敏状態になるとともに、食事量の減少を伴わない体重減少をきたすようになった。これらのマウスの病態は、ヒト膵がん患者の病態ときわめてよく類似しており、本モデルは膵臓がんの病理・病態を模倣するモデルとして意義があると考えられた。膵臓がんの神経進展の分子機構を検討し、膵臓がん細胞からのラミニン5産生が神経進展距離と強い相関があることを初めて明らかにした。また、神経中枢側ではIL-6、LIFなどIL-6スーパーファミリー分子の発現が高率に認められた。また、これら分子はヒト膵臓がんの走化性に重要な役割を果たしていることを初めて明らかにした。

4) 分化型扁平上皮がんのがん性幹細胞の探索

がん幹細胞は不均等分裂し幹細胞自身と分化した細胞になる。一般に腫瘍形成にはがん幹細胞の存在が必要と考えられる。形態学的には扁平上皮がんは正常扁平上皮と同様に腫瘍辺縁部から中心部にかけて腫瘍細胞が角化分化する。これらの形態像はこれら扁平上皮がんではがん幹細胞が腫瘍辺縁部に存在していることを示している。これらががん幹細胞に発現する表面抗原を検索し、ボドブラニン陽性細胞にがん幹細胞を多く含んでいることを明らかにした。今年度は、この扁平上皮がん

幹細胞が腫瘍形成をすること、および抗がん剤に対して抵抗性であることなどを初めて明らかにした。また、がん幹細胞に発現する分子としてCD44ならびにSHHがボドプラニン陽性細胞には認められるが陰性細胞には発現しないことを明らかにした。

5) がん間質細胞におけるボドプラニン発現の臨床病理学的意義の検討

がん組織を構成する間質細胞の中で最も量的に多い細胞は線維芽細胞である。我々はこれまでにがん間質線維芽細胞はがん組織内に導入されることを初めて明らかにしてきた。その起源として骨髄由来線維芽細胞また血管周囲線維芽細胞が重要な役割を果たすと考えられた。今年度は、血管周囲線維芽細胞がボドプラニンを産生していることをヒト肺腺癌切除材料を用いて検索し、ボドプラニン発現線維芽細胞の存在量によりがん患者の予後が規定されていることを示した。これらの結果は、がん細胞の性質ががん細胞の遺伝子変化によるものでなく、誘導された間質線維芽細胞の機能により調節されている可能性が示された。

D. 考察

1) 特徴的な病理・病態を示す動物モデルの作製

ヒト前立腺がんヒト骨転移モデルおよびヒト膝がん神経浸潤モデルを作製し、これら特徴的な形態像を構成する分子機構の一端を解明した。ヒト組織では相関を確認できるものの、実際にこれらの分子機構であることを証明するためには、これら特徴的なモデルの作製が必要であり、また新しい治療法開発においても、これらヒトがんの病理・病態を模倣する動物モデルは極めて重要な意義を持っていると考えられた。

2) ヒト成人骨におけるヒト前立腺がん増殖に関わる分子機構の解明

IGF2はヒト骨においては最も蓄積されている増殖因子であり、ヒト前立腺がんは骨内のIGF2を利用して生存および増殖していると考えられる。一方、マウスでは骨内にはIGF1が蓄積していることより、マウス骨を用いた研究では

必ずしもヒト骨における状態を模倣できない。今回のモデルの作製とモデルを用いた治療実験により骨内IGF2が前立腺がん骨転移において重要な意義を有していることを初めて明らかにできた。

4) 分化型扁平上皮がんのがん性幹細胞の探索

がん幹細胞はこれまで既存のマーカーにより大まかに調べられていたが、形態学的に幹細胞が存在す部位に発現する分子の検討により初めてボドプラニンの意義を明らかにできた。現在、ボドプラニン分子の発現抑制による腫瘍形成や抗がん剤耐性機構を検討している。これら研究は、扁平上皮がんのみならず、正常扁平上皮の幹細胞の意義を明らかにするものであり、興味深いと考えられた。

5) がん間質細胞におけるボドプラニン発現の臨床病理学的意義の検討

がん間質線維芽細胞が産生する分子のみで患者予後が決められていることを初めて証明した。これらの結果は、間質細胞のもつ意義を明らかにすることが、がん生物像の検討のみならず、がん間質に関わる新しい治療法や治療剤の開発に極めて重要な意義を有していると考えられる。

E. 結論

今年度の成果により、新しいがん進展に関わる分子基盤の研究が進み、今後これらモデルを用いた研究の発展により、新しい治療薬の開発が可能になると考えられた。

F. 健康危険情報

現在のところ、特記すべきものはありません。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Hasebe T, Konishi M, Iwasaki M, Nakagohri T, Takahashi SI, Gotohda N, Kinoshita T, Ochiai A. Primary tumor/-vessel tumor/-nodal tumor classification of extrahepatic bile duct carcinoma. Hum Pathol. 39(1):37-48, 2008.

2. Fujii S, Ochiai A. Enhancer of zeste homologue 2 (EZH2) down-regulates E-cadherin by mediating histone H3 methylation in gastric cancer cell. *Cancer Science*, 99(4):738-46, 2008.
3. Sangai T, Ishii G, Ochiai A. Roles of osteoclasts and bone-derived IGFs in the survival and growth of human breast cancer cells in human adult bone implanted into nonobese diabetic/severe combined immunodeficient mice. *Clinical & Experimental Metastasis* ;25(4):401-10 2008.
4. Sugiyama K, Ishii G, Ochiai A, Esumi H. Improvement of the breaking strength of wound by combined treatment with recombinant human G-CSF, recombinant human M-CSF, and a TGF-beta1 receptor kinase inhibitor in rat skin. *Cancer Science* 99(5):1021-28. 2008.
5. Hoshino A, Chiba H, Nagai K, Ishii G, Ochiai A. Human vascular adventitial fibroblasts contain mesenchymal stem/progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 368(2):305-10, 2008
6. Mitsunaga S, Kinoshita T, Hasebe T, Nakagohri T, Konishi M, Takahashi S, Gotohda N, Ochiai A. Low serum level of cholinesterase at recurrence of pancreatic cancer is a poor prognostic factor and relates to systemic disorder and nerve plexus invasion. *Pancreas*. Apr;36(3):241-8, 2008.
7. Tsuchihara K, Ogura T, Fujioka R, Fujii S, Kuga W, Saito M, Ochiya T, Ochiai A, Esumi H. Susceptibility of Snark-deficient mice to azoxymethane-induced colorectal tumorigenesis and the formation of aberrant crypt foci. *Cancer Science*. ;99(4):677-82, 2008.
8. Kawase A, Ishii G, Nagai K, Ito T, Nagano T, Murata Y, Hishida T, Nishimura M, Yoshida J, Suzuki K, and Ochiai A. Podoplanin expression by cancer associated fibroblasts predicts poor prognosis of lung adenocarcinoma. *Int J Cancer*, 123(5):1053-9, 2008.
9. Kim H.K, Ishii G, Goto K, Ota S, Kubota K, Murata Y, Mishima M, Saijo N, Nishiwaki Y, and Ochiai A. Expression of Breast Cancer Resistance Protein is Associated with a Poor Clinical Outcome in Patients with Small-Cell Lung Cancer. *Lung Cancer* 2008 in press.
10. Mizuno T, Ishii G, Nagai K, Yoshida J, Nishimura M, Mochizuki T, Kawai O, Hasebe T, Ochiai A. Identification of a low risk subgroup of stage IB lung adenocarcinoma patients. *Lung cancer* 62(3):302-308, 2008.
11. Ito T, Ishii G, Nagai K, Nagano T, Kojima M, Murata Y, Atsumi N, Nishiwaki Y, Miyazaki E, Kumamoto T, Ochiai A. Low podoplanin expression of tumor cells predicts poor prognosis in pathological stage IB squamous cell carcinoma of the lung, tissue microarray analysis of 136 patients using 24 antibodies. *Lung Cancer*. 2009 Mar;63(3):418-24.
12. Fujii S, Ito K, Ito Y, Ochiai A. Enhancer of zeste homologue 2 (EZH2) down-regulates RUNX3 by increasing histone H3 methylation. *J Biol Chem*. 283(25):17324-32. 2008.
13. Kojima M, Ishii G, Atsumi N, Fujii S, Saito N, Ochiai A. Immunohistochemical detection of CD133 expression in colorectal cancer, a clinicopathological study. *Cancer Sci*. Aug;99(8):1578-83, 2008.
14. Chiba H, Ishii G, Ito TK, Aoyagi K, Sasaki H, Nagai K, Ochiai A. CD105 Positive Cells in Pulmonary Arterial Blood of Adult Human Lung Cancer Patients Include Mesenchymal Progenitors. *Stem Cells*. 26(10):2523-30, 2008.
15. Kawai O, Ishii G, Kubota K, Murata Y, Naito Y, Mizuno T, Aokage K, Saijo N, Nishiwaki Y, Gemma A, Kudoh S, Ochiai A. Predominant infiltration of macrophage and CD8+ T cell in cancer nests is significant predictor of survival in Stage IV non-small-cell lung cancer. *Cancer* 113(6):1387-95, 2008.
16. Mochizuki T, Ishii G, Nagai K, Yoshida J, Nishimura M, Mizuno T, Yokose T, Suzuki K, Ochiai A. Pleomorphic carcinoma of the lung. Clinicopathological characteristics of 70 cases. *Am J Surg Pathol*

- 32(11):1727-35, 2008.
17. Kosugi C, Saito N, Murakami K, Ochiai A, Koda K, Ono M, Sugito M, Ito M, Oda K, Seike K, Miyazaki M. Positron emission tomography for preoperative staging in patients with locally advanced or metastatic colorectal adenocarcinoma in lymph node metastasis. *Hepatogastroenterology*. 55(82-83):398-402, 2008
 18. Ota S, Ishii G, Goto K, Kubota K, Kim YH, Kojika M, Murata Y, Yamazaki M, Nishiwaki Y, Eguchi K, Ochiai A. Immunohistochemical expression of BCRP and ERCC1 in biopsy specimen predicts survival in advanced non-small-cell lung cancer treated with cisplatin-based chemotherapy. *Lung Cancer* 2009 Apr;64(1):98-104.
 19. Fujii S, Mitsunaga S, Yamazaki M, Hasebe T, Ishii G, Kojima M, Kinoshita T, Ueno T, Esumi H, Ochiai A. Autophagy is activated in pancreatic cancer cells and correlates with poor patient outcome. *Cancer Science*, 99(9):1813-9, 2008.
 20. Atsumi N, Ishii, G, Kojima, M, Sanada, M, Fujii, S. Ochiai A. Podoplanin, a novel marker of tumor-initiating cells in human squamous cell carcinoma A431. *Biochem Biophys. Res. Commun.* 15;373(1):36-41, 2008.
 21. Yanagihara K., Takigahira M, Tanaka H, Arao T, Aoyagi T, Oda T, Ochiai A, and Nishio K. Establishment and molecular profiling of a novel human pancreatic cancer panel for 5-FU. *Cancer Science* 99(9):1859-64, 2008.
 22. Yamada A, Sasaki H, Aoyagi K, Sano M, Fujii S, Daiko H, Nishimura M, Yoshida T, Chiba T, Ochiai A. Expression of cytokeratin 7 predicts survival in stage I/IIA/IIBSquamous cell carcinoma of the esophagus. *Oncology Rep.* 20(5):1021-7, 2008.
 23. Ito TK, Ishii G, Saito S, Yano K, Hoshino A, Suzuki T, Ochiai A. Degradation of soluble VEGF receptor-1 by MMP-7 allows VEGF access to endothelial cells. *Blood*. 2009 Mar 5;113(10):2363-9.
 24. Maeda H, Yonou H, Yano K, Ishii G, Saito S, Ochiai A. Prostate-specific antigen enhances bioavailability of insulin-like growth factor by degrading insulin-like growth factor binding protein 5. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009 Apr 10;381(3):311-6. Epub 2009 Jan 23.

H.知的財産権の出願・登録状況

1.特許取得

発明の名称:「抗PERP遺伝子組換え抗体
 出願番号:国際出願PCT/JP2008/61669
 出願人:国立がんセンター総長、
 協和醗酵工業株式会社
 発明者:落合 淳志(国立がんセンター)
 佐藤 崇(協和醗酵)
 木本 直哉(協和醗酵)
 古谷 安希子(協和醗酵)
 石田 洋幸(協和醗酵)

II 分担研究報告書

1. 体內的における MMP/ADAM の作用機構および機能評価法の開発
岡田 保典
2. 病理材料・in vivo モデルを用いたがんの発育進展機構の解明
坂元 亨宇
3. 消化管腫瘍の病理組織像に対する Wnt シグナルと TGF- β シグナルの作用
加藤 光保
4. がん組織の階層構造の解明と起源細胞の可視化
平尾 敦
5. 発現解析によるがん間質相互作用における重要分子の同定
中西 幸浩
6. グライコームの解析に基づくがんの診断法、治療応答性・転移再発予測法の開発
神奈木 玲児

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略事業）

分担 研究報告書

がん病理・病態学的特性の分子基盤の解析とそれに基づく診断・治療法の開発に関する研究

研究分担者 岡田 保典 慶應義塾大学医学部病理学教室 教授

研究要旨： MMP (matrix metalloproteinase) とADAM (a disintegrin and metalloproteinase) 分子はメタロプロテアーゼドメインを共有する近縁遺伝子ファミリーであり、組織内微小環境因子代謝を介して生体内で作用すると考えられている。本研究では、我々が開発したMMP-13 (コラゲナーゼ-3) ノックアウト (KO) マウスにおける皮膚創傷治癒過程を解析し、MMP-13が表皮細胞の移動による上皮化促進、増殖因子代謝による血管新生亢進、潜在型TGF- β の活性化による筋線維芽細胞の増殖・分化に関わることを明らかにした。また、マウス前立腺癌細胞の移植実験での検討で、MMP-13は癌細胞の生着・増殖に必須であることを示した。一方、ADAM28を測定できるアッセイ系を開発し、血清中でのADAM28蛋白濃度は健常者に比べて肺癌患者で有意に高値であり、病期の進行、リンパ節転移、腫瘍径に相関することを明らかにした。また、ADAM28免疫染色は肺腺癌の予後判定に利用できる可能性を示した。

A. 研究目的

MMP 遺伝子ファミリーは細胞外マトリックス分解に主役を演じることは周知の事実であるが、近年の研究ではこれらの酵素は非細胞外マトリックス成分の分解作用も有し、癌組織内微小環境因子代謝を通して癌細胞の増殖・運動や癌組織での免疫反応の制御にも関わると考えられている。本研究課題では、我々が独自に開発してきた MMP-13 KO マウスの皮膚創傷治癒過程における影響を解析するとともに、MMP-13 KO マウスの種々の臓器へ癌細胞を移植し、癌細胞の生着・増殖の解析により癌組織内微小環境因子代謝の重要性を解析した。一方、ADAM 遺伝子ファミリーに関しては、我々の研究

から ADAM28 が肺癌と乳癌で癌細胞特異的に高発現し、肺癌ではリンパ節転移と相関することを明らかにしていることから、本研究では肺癌患者血清中における ADAM28 濃度を定量できる ELISA 系を開発し、肺癌の診断、進展、再発などのモニターに利用できるかを検討した。

B. 研究方法

MMP-13 KO マウスでの皮膚創傷治癒解析： MMP-13 KO マウスと野生型マウス背部皮膚に径 8 mm の全層性皮膚欠損を作製し、創傷治癒過程を経時的に肉眼的および組織学的に観察し、表皮細胞の増殖能を PCNA 染色で検討した。マウス表皮細胞の運動能を I 型コラーゲンを

塗布したスライドガラス上での *in vitro* wound healing assay 法により解析した。また、創傷部肉芽組織における血管新生の程度と筋線維芽細胞の出現をそれぞれ CD31 と α -smooth muscle actin (α SMA) の免疫染色により解析するとともに、肉芽組織中の connective tissue growth factor (CTGF) をイムノブロット法で検討し、vascular endothelial growth factor (VEGF) の発現を RT-PCR とイムノブロット法で調べた。また、野生型と MMP-13 KO マウスの真皮より線維芽細胞を培養し、潜在型あるいは活性型 TGF- β の添加による増殖能と筋線維芽細胞への分化の程度を 5-bromo-2'-deoxy-uridine (BrdU) 標識および α SMA の免疫染色とイムノブロット法で検討した。

MMP-13 KO マウスを用いた前立腺癌細胞株移植実験: マウス前立腺癌細胞株 (TRAMP-C1 細胞株) を PBS で 1/2 希釈した Matrigel に 3×10^7 個/ml の濃度で浮遊させ、MMP-13 KO マウスと野生型マウスの脛骨髄内へ 10 μ l 移植し、骨髄内での生着・増殖能を経時的調べた。同様に、癌細胞株を皮下組織 (100 μ l)、筋肉内 (10 μ l)、脛骨骨膜周囲 (10 μ l) に移植し、これら癌細胞の生着率と増殖能を肉眼的および組織学的に解析した。

ADAM28 の ELISA 系の開発と肺癌患者の血液検体での定量: ADAM28 のメタロプロテアーゼドメインを認識する 2 種類の特異的モノクローナル抗体を作製し、一方をプレートに塗布し、他方をペリオキシダーゼ標識して、ADAM28 蛋白を測定できる ELISA 系

を開発した。本 ELISA 系の特異性検討のために、精製した ADAM8, 9, 10, 12, 17, ADAMTS1, 4, 5 や潜在型 MMP-1, 2, 3, 7, 9, 13 との交差反応を調べた。また、5 種類のヒト肺癌細胞株の培養液と細胞画分について、ADAM28 をイムノブロット法と ELISA 系で検出した。ヒト非小細胞肺癌患者 (n=102) および対照健常者 (n=20) より血液を採取し、血清中の ADAM28 と carcinoembryonic antigen (CEA) 蛋白を定量した。さらに、肺癌患者および健常者の早朝尿についても ADAM28 蛋白を ELISA 法とイムノブロット法で検討した。また、径 20 mm 以下の肺腺癌について、凍結組織ホモジネート中の ADAM28 濃度を測定し、その値とパラフィン切片における ADAM28 免疫染色による癌細胞陽性率を比較検討した。さらに、免疫染色性と 7 年間の予後との相関を Kaplan-Meier 法で解析した。

倫理面への配慮: ヒト肺癌患者および対照健常者の血液と尿を用いた ADAM28 の解析にあたっては、患者および健常者本人のインフォームドコンセントを得た上で測定した。また、組み換え DNA 分子の生細胞への導入、MMP-13 遺伝子欠損マウスと野生型マウスを用いた実験は、遺伝子組み換え・動物実験に該当することから、これらの実験に当たっては法令を遵守し、安全対策と動物への苦痛排除など十分な注意を払って行った。以上の実験は、慶應義塾大学倫理委員会と遺伝子組み換え実験安全委員会と動物実験委員会の承諾を得て行っている。

C. 研究結果

1. MMP-13 KOマウスでの皮膚創傷治癒過程での作用解析

肉眼的な創傷治癒と顕微鏡的な表皮細胞の上皮化は、野生型マウスに比較してMMP-13 KOマウスにおいては有意な遅延が認められた。好中球、マクロファージ、リンパ球の創傷部への浸潤には両群で差はみられなかった。MMP-13発現は、野生型マウス正常皮膚では陰性であるが、創傷作製後1日から14日まで検出され、28日では消失した。MMP-13は野生型マウス創傷部皮膚の先端部表皮細胞に発現を認めたが、表皮細胞増殖能は両群で差異を認めなかった。一方、*in vitro* wound healing assayでは、表皮細胞の運動にMMP-13活性が必要であることが証明された。MMP-13 KOマウスでは、肉芽組織形成期での血管新生は低下しており、創傷後1日、5日、10日の創傷部肉芽組織におけるCTGF分子の分解は、創傷後5日のサンプルにおいて明らかに低下していた。また、上皮化後の肉芽組織内での筋線維芽細胞の出現程度は、MMP-13 KOマウスでは野生型マウスに比べ有意に低下していた。野生型マウスとMMP-13 KOマウスから線維芽細胞を分離し活性型TGF- β で刺激すると、両群の線維芽細胞の増殖能は亢進したが、潜在型TGF- β 刺激では野生型マウス線維芽細胞のみで増殖が亢進した。MMP-13はTGF- β を潜在型から活性化型へ変換することが知られているが、実際これらのTGF- β による線維芽細胞増殖促進作用は、抗TGF- β 中和抗体や抗MMP-13中和抗体の投与で阻害され、活性型TGF- β の測定系でもMMP-13 KOマウス線維芽細胞にお

けるTGF- β の潜在型から活性化型への変換が抑制されていた。また、野生型マウス線維芽細胞でみられた潜在型TGF- β 添加による筋線維芽細胞分化誘導は、MMP-13 KOマウス線維芽細胞では有意に低下していた。

2. MMP-13 KOマウスへのマウス前立腺癌細胞株移植実験

MMP-13 KOと野生型マウスを用いて、マウス前立腺癌細胞株を脛骨骨髓内、皮下組織、筋肉内、脛骨骨膜周囲へ移植し、癌細胞の生着・増殖能を移植後12週まで検討した。その結果、脛骨骨髓内ではいずれのマウス群においても癌細胞は生着しなかった。一方、皮下組織、筋肉内、脛骨骨膜周囲での生着率は、MMP-13 KOマウスでは30%以下であるのに対し、野生型マウスでは80%以上に認められた。皮下組織移植モデルでは、両群とも移植後12時間後に腫瘍細胞塊周囲に好中球とマクロファージを主体とした炎症細胞浸潤が始まり、24時間から3日後までに腫瘍塊中心部の癌細胞の多くは細胞死に陥った。癌細胞死はMMP-13 KOマウスでは特に顕著であり、癌細胞は移植1-2週後にはほぼ完全に消失するのに対し、野生型マウスでは3-4週後から残存癌細胞が再増殖し、徐々に腫瘍塊の大きさが増大した。癌細胞死の原因、浸潤した炎症・免疫細胞の種類と程度、血管新生の程度、などに関して詳細な解析を現在行っている。

3. ADAM28 測定系の開発とヒト肺癌患者血清中での測定

本研究で開発したELISA系のADAM28

検出限界は1 ng/ml以下であり、ADAM8, 9, 10, 12, 17, ADAMTS1, 4, 5や潜在型MMP-1, 2, 3, 7, 9, 13とは交差反応しないことを確認した。検討した5種類のヒト肺癌細胞株全例において、膜型ADAM28 (55/57 kDa) と分泌型ADAM28 (42 kDa) のバンドがイムノプロット法により検出され、そのバンドの濃さと本アッセイ系で測定したADAM28濃度はよく相関した。対照健常者の血清中 (n=20) ではADAM28値は平均値で1.2 ng/mlであるのに対し、肺癌患者血清 (n=102) では5.4 ng/ml、肺癌再発例 (n=12) では9.9 ng/mlといずれも5.5倍ないし8.3倍有意に高値を示した。Stage Iの患者血清値は健常者のそれよりも2.1倍有意に高値であり、病期の進行とともにより高値を示した。また、リンパ節転移陽性群 (n=35) の血清ADAM28値は陰性群 (n=55) よりも3.8倍高値であった。さらに、ADAM28値は腫瘍径の増大とともに増加した。また、血清ADAM28値は、現在非小細胞性肺癌患者の診断で臨床的に使用されているCEAに比較し、感度と偽陰性率において有意に良好であり、両者を組み合わせることにより、感度、特異性、偽陽性率、偽陰性率の全てが改善された。肺癌患者尿のうち37% (34/91症例) で42 kDaのADAM28のバンドがイムノプロット法で検出され、肺癌患者 (n=26) および健常者 (n=10) の血清と尿中のADAM28濃度は正の相関を示した。また、径20 mm以下の肺腺癌 (n=37) での検討では、ADAM28は全例で腺癌細胞が免疫染色陽性であり、その染色性はこれらの組織ホモジネート中でのADAM28濃度と正の相関を示した。さらに、径20 mm以下

の肺腺癌 (n=102) を免疫組織染色性により高発現群、中発現群、低発現群の3群に分類すると、術後のdisease-free survivalは高発現群で有意に低かった。

D. 考察

MMP-13 (コラゲナーゼ3) は、MMP-1 (間質性コラゲナーゼ) とMMP-8 (好中球コラゲナーゼ) と並んで線維性コラーゲン分解活性を有することから MMP 遺伝子ファミリーの中ではコラゲナーゼ群に分類されており、MMP-1 遺伝子が欠損しているマウスでは主要なコラゲナーゼと考えられている。しかし、MMP-13 はプロテオグリカンやIV型コラーゲンに対しても強い分解活性を有するほか、非細胞外マトリックス成分の分解能を併せ持つ点で特異な MMP 分子である。我々は VEGF の血管新生活性は CTGF の共存下で VEGF/CTGF 複合体形成により不活化され、MMP-1, 3, 7, 13 などのうち特に MMP-13 が CTGF を選択的に分解し、VEGF 血管新生活性を賦活化することを報告してきた。本研究での皮膚創傷治癒実験では、MMP-13 KO マウスでは肉芽組織での血管新生が抑制されており、同部での CTGF 分解も抑制されていたことから、皮膚創傷治癒の組織内微小環境において MMP-13 が CTGF 分解を通して血管新生の制御に関わる可能性を示唆している。また、創傷治癒のリモデリング期において、MMP-13 は潜在型 TGF- β の活性化を通して筋線維芽細胞の増殖・分化にも関与することを示した。一方、マウス前立腺癌細胞株の MMP-13 KO マウスへの移植実験では、癌細胞株の生着率が野

生型マウスに比較して MMP-13 KO マウスでは極めて低率であることから、MMP-13 は組織内微小環境因子代謝を通して癌細胞株の生着や増殖に必須の役割を担うと考えられる。また、野生型マウスや MMP-13 KO マウスの区別なく骨髄内では全く生着できないことは、骨髄組織環境が皮下組織を始めとした他の組織環境と大きく異なることを示すとともに、骨髄細胞が本腫瘍細胞の生着阻止に働いている可能性を示唆しており、MMP-13 KO マウスの皮下組織などにおいても骨髄由来細胞の出現の有無と生着阻止機構について今後検討を進める。

ADAM28 はヒト肺癌と乳癌で高発現し、その発現レベルは癌細胞の増殖能やリンパ節転移の有無と相関すること示し、乳癌では癌細胞由来の ADAM28 が insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) を分解し、IGFBP-3 との複合体形成でブロックされていた IGF-I の増殖因子活性の賦活化を通して、癌細胞の増殖促進に関わることを報告してきた。ヒト肺癌や乳癌においては、ADAM28 は癌細胞特異的に発現することから、これら癌の診断や経過および治療効果判定をモニターするマーカーとして使える可能性が考えられる。今回本研究で開発した ADAM28 の ELISA 系は、多種類の ADAM、ADAMTS および MMP とは反応せず、イムノプロット法で検出された肺癌細胞株での ADAM28 蛋白レベルとも良好な相関を示すことから、ADAM28 に特異的なアッセイ系と考えられた。実際、本アッセイ系を用いて血清中の ADAM28 濃度を測定すると、肺癌患者血清では健常者血

清より有意に高値であり、再発症例では更に高値であった。重要なことは、血清 ADAM28 値が stage I の患者においても健常者より有意に高値であり、病期の進行や腫瘍径の増大とともに有意に増加を示した点である。このことは、早期肺癌の有効な診断マーカーが存在しない現状では、早期肺癌の非侵襲的なスクリーニングに本アッセイが有望であること示唆している。実際、これまで肺癌の血清診断に使用されている CEA と比較しても、ADAM28 のアッセイ系は感度と偽陰性率においてより優れており、CEA との併用でさらに感度、特異性、偽陽性率、偽陰性率が改善した。また、径 20 mm 以下の小肺腺癌において ADAM28 の癌細胞での免疫染色性は予後と相関することを示した。これらのことから、本研究は ADAM28 の血清値や免疫染色性がヒト非小細胞性肺癌の診断や予後因子となる可能性を示唆している。

E. 結論

MMP-13 KOマウスを用いた実験から、MMP-13は皮膚創傷治癒過程において、増殖因子代謝を通して血管新生や筋線維芽細胞への増殖・分化に関わり、移植癌細胞の生着・増殖に必須の役割を果す可能性が示された。また、血清中での ADAM28 濃度をモニターできる ELISA 系を開発し、それを用いたヒト非小細胞肺癌の血清診断や ADAM28 免疫染色による肺腺癌の予後判定に利用できる可能性を示した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Takaishi H., Kimura T., Dalal S., Okada Y. and D'Armiento J.: Joint diseases and matrix metalloproteinases: A role for MMP-13. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 9:47-54, 2008.
- Okada A., Mochizuki S., Yatabe T., Kimura T., Shiomi T., Fujita Y., Matsumoto H., Sehara-Fujisawa A., Iwamoto Y. and Okada Y.: ADAM12 (Meltrin α) is involved in chondrocyte proliferation via cleavage of insulin-like growth factor-binding protein-5 in osteoarthritic cartilage. *Arthritis Rheum.* 58:778-789, 2008.
- Imai, K. and Okada Y.: Purification of matrix metalloproteinases by column chromatography. *Nat Protoc.* 3: 1111-1124, 2008.
- Ikeda E., Kodama T. and Okada Y.: Brain-specific expression of vascular endothelial growth factor 146 correlates with the blood-brain barrier induction in quail embryos. *Dev. Neurosci.* 30:331-339, 2008.
- Mikami S., Oya M., Shimoda M., Mizuno R., Ishida M., Kosaka T., Mukai M., Nakajima M. and Okada Y.: Expression of heparanase in renal cell carcinomas: Implications for tumor invasion and progression. *Clin. Cancer Res.* 14:6055-6061, 2008.
- 佐々木 文、岡田保典：細胞—細胞外基質インターフェイスの病理生理学：組織内微小環境モジュレータ分子ADAMの機能と疾患への関与。生体の科学 59:129-133, 2008.
- Kimura N., Shukunami C., Hakuno D., Yoshikoka M., Miura S., Docheva D., Kimura T., Okada Y., Matsumura G., Shin'oka T., Yozu R., Kobayashi J., Ishibashi-Ueda H., Hiraki Y. and Fukuda K.: Local tenomodulin absence, angiogenesis, and matrix metalloproteinase activation are associated with the rupture of the chordae tendineae cordis. *Circulation* 118:1737-1747, 2008.
- Okada Y.: Proteinases and matrix degradation. In *Kelley's Textbook of Rheumatology*. Ed. by Firestein G. S., Budd R. C., Harris E. D., Jr., McInnes I. B., Ruddy S. and Sargent J. S. 8th edition, Elsevier Saunders. Philadelphia. pp115-134, 2009.
2. 学会発表
 第97回日本病理学会（2008年5月、金沢）
 岡田保典：MMP/ADAMによる組織内微小環境因子代謝。シンポジウム。日本病理学会誌 97:131, 2008.
- 第97回日本病理学会（2008年5月、金沢）
 下田将之、小宮浩一郎、藤田貴也、服部典子、岡田保典：ADAM28の血管内皮細胞による発現とその機能解析。日本病理学会誌 97:261, 2008.
- Masayuki Shimoda and Yasunori Okada :

Induction of ADAM28 in endothelial cells at inflammatory sites enhances leukocyte adhesion to endothelial cells. July 9 - 13, 2008. Workshop. The 21st FECTS Meeting. Marseille, France, Abstract p46, 2008.

Satsuki Mochizuki, Kenji Soejima, Masayuki Shimoda and Yasunori Okada: Analysis of ADAM28-interacting proteins that may be related to cancer cell invasion and metastasis: ADAM28 directly binds to and cleaves von Willebrand factor. July 9 - 13, 2008. Workshop. The 21st FECTS Meeting. Marseille, France, Abstract p161, 2008.

Yasunori Okada: Modulation of the tissue microenvironment in human cancers by cancer cell-derived metalloproteinases (MMPs and ADAMs): What and how can we target in cancers? Abcam Conferences: Cancer Degradome Symposium. October 8 -9, 2008. London. Abstract #1, 2008.

第38回日本創傷治癒学会(2008年12月、東京)

岡田保典:創傷治癒におけるMMP教育講演。抄録集 p34.

G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

厚生労働省科学研究費補助金
(第3次対がん総合戦略事業)
(分担)研究報告書

「がん病理・病態学的特性の分子基盤の解析とそれに基づく診断・治療法の開発に関する研究」班

分担研究者 坂元 亨宇 慶應義塾大学医学部病理学教室

研究要旨

卵巣がん・皮膚基底細胞がん・肺腺がん・肝細胞がん・膵管がん・大腸がんを主な対象として、特有な組織型・組織像、多段階発がん過程、特有の浸潤転移過程を規定する分子機構の解明をめざす。以上の病理病態を示す実際の病理組織材料を用いた遺伝子・蛋白の発現解析を行うと共に、それらの病理像を忠実に反映する免疫不全マウス移植モデルの作成と、同モデルを用いた *in vivo* での機能解析を行う。本年度は特に、マウス卵巣高転移モデルを樹立し、卵巣転移を認めた細胞株には E-cadherin の発現の消失が高率に見られ、E-cadherin の強制発現により卵巣への転移性のみが抑制されることを示した。臨床例の解析でも、特に遠隔由来の両側性の卵巣転移症例に E-cadherin の発現低下を認めることから、卵巣特異的転移に E-cadherin 発現の消失が関与している可能性が示唆された。肺腺がんの詳細な病理組織学的検討により、micropapillary pattern は、腫瘍細胞が pile-up し、足場非異存性増殖能を獲得したことを反映しており、臨床病理学的悪性度と相関することを示した。

A. 研究目的

ヒトのがん組織は、多段階発がん過程により、あるいはがん間質相互作用などの多様な細胞間相互作用により、多彩な発育進展様式を示す。そして、各臓器がんの病理学的特性は、臨床的特性と対応することが示されてきている。本研究では、病理組織ならびに *in vivo* モデルを用い相補的に解析を行うことで、多彩な病理像の背景の分子基盤を明らかにすることを目的とする。そして、同定された分子の悪性度診断、予後予測への有用性を検討すると共に、病態特異的治療標的分子としての可能性を検討する。以上の成果を

もとに、新規の個別化診断法・分子標的治療法の確立をめざす。

B. 研究方法

卵巣がん・皮膚基底細胞がん・肺腺がん・肝細胞がん・膵管がん・大腸がんを主な対象として、以下の3つのアプローチを統合的に行う。

- (1) 病理材料に発現する遺伝子・蛋白の網羅的解析。
- (2) 病理像を忠実に反映するヒトがんの増殖転移モデル開発と、それを用いた発現解析ならびに機能解析
- (3) 臨床材料・*in vivo* モデルでの診断・治療への有用性検証。

(1)の遺伝子・蛋白発現解析には、DNAマイクロアレイによるトランスクリプトーム解析・LC-MSによるプロテオーム解析を行うが、得られた遺伝子・分子群は、*in situ hybridization*、免疫組織化学による組織での発現の局在、病理像との対応を詳細に検討し病態との関連を絞り込む。

(2)では、免疫不全マウスを用いたがん細胞ないしがん組織の同所移植による増殖転移モデルにつき、既に樹立した系を含めて解析を行う。モデルの腫瘍組織を用いて(1)と同様に網羅的発現解析を行う。また(1)で同定された分子を導入あるいはknock-downし、*in vitro*と*in vivo*での機能解析を行うことで、分子の病態への直接的関与を明らかにする。このモデルを用いた転移の抑制などの治療実験は、前臨床試験として有用であるのみならず、分子の病態への関与をより明らかにすることが期待される。以上の解析で同定された分子群について病態の解明と診断・治療への応用の検討を行うために、(3)臨床材料・*in vivo*モデルにおける診断・治療への有用性の検証を行い、実際の臨床応用を目指す。治療への応用としては、遺伝子操作以外に、特異的阻害剤、抗体などの利用につき検討する。

(倫理面への配慮)

本研究計画では、がん組織で新たに生じた遺伝子の変化、発現の変化の解析ならびにがん組織の移植による機能解析を目的としており、三省合同指針

にあるヒトゲノム・遺伝子解析研究は含まれない。ヒト由来の組織を用いた研究に当たっては、三省合同による「遺伝子解析研究に付随する倫理問題等に対応するための指針」及び科学技術会議生命倫理委員会により制定された「ヒトゲノム研究に関する基本原則について」を遵守すると共に、当大学の倫理審査委員会の承認を得て実施する(承認番号 15-57-2, 15-59, 16-34, 16-90)。動物実験に関しては、米国実験動物資源協会の「実験動物の管理と使用に関する指針」ならびに「慶應義塾大学医学部動物実験ガイドライン」を遵守する。

C.研究結果

1) 卵巣転移機構の解析

8種類のヒトがん細胞株のNOD/SCIDマウスへの移植の結果、静脈注射による移植では、低分化肺がん細胞株RERF-LC-AIが高率に卵巣転移を来した。RERF-LC-AIの卵巣転移率は肺への転移率に次いで高率であり、両側性転移も1/3にみられることから、この細胞株のNOD/SCIDマウスへの静脈注射による移植の実験系は、*in vivo*卵巣転移モデルとして使用できると考えられた。なおRERF-LC-AIの卵巣転移腫瘍においては、卵巣線維芽細胞の間質反応が認められた。腹腔内投与による移植では、8種類のうちRERF-LC-AIを含む4種類が卵巣へ転移した。

卵巣転移能を持つ4種類の細胞株について E-cadherin の発現低下が文献的に報告されていることに着目し、8種類のがん細胞株について E-cadherin の発現を検討した。その結果、卵巣転移性を示した4種類及び Krukenberg 腫瘍の細胞株において E-cadherin の発現低下が認められた。その他の3種類の細胞株については、E-cadherin の発現低下は見られなかった。

E-cadherin 強制発現株の NOD/SCID マウスへの移植の結果、強制発現株においては卵巣への転移が完全に抑えられ、かつ卵巣以外の臓器への転移性は維持されることが示された。

30例の卵巣転移性腫瘍症例(手術及び剖検例)について病理組織学的な検討を行ったところ、卵巣転移性腫瘍症例の約半数において E-cadherin の発現低下が認められることが明らかになった。臨床病理学的因子との関連について解析を行ったところ、若年齢・胃がん原発・両側性の卵巣転移・低分化・卵巣転移性腫瘍における間質の増殖などが、E-cadherin 発現低下と有意な相関を示す因子であることが分かった。

2) 肺腺がんにおける micropapillary pattern の病理組織学的検討

Micropapillary pattern (MPP) の病理像は、一枚の切片上において、血管線維束を持たない腫瘍細胞からなる小集塊(以下 tuft) が肺腔内や結合組織内の内腔に存在する像であり、184

例(男性109人、女性75人)に認められ、focal、moderate、extensive 症例はそれぞれ 65(35%)、85(46%)、34(19%) 例であった。また後述する生存分析の結果により、none 症例を MPP 陰性群に、focal、moderate、extensive 症例を MPP 陽性群に分類した結果、MPP 陰性 / 陽性群はそれぞれ 199(52%) / 184(48%) 例となった。陽性群における dominant BAC、acinar、papillary、solid adenocarcinoma with mucin はそれぞれ 19(11%)、33(18%)、117(63%)、15(8%) 例であった。

連続切片による検討にて、tuft の多くは、他の tuft や主病巣との連続性を持つ事が示され、tuft は主病巣から腔内に伸張し、複雑な形態を呈していると考えられた。いっぽう、他の tuft との連続性が確認できない tuft も一部存在した。

免疫組織学的検討にて、tuft を構成する腫瘍細胞において、細胞間接着因子である E-cadherin や β catenin が細胞膜に陽性であり、同細胞-細胞間接着が保持されていると考えられた。いっぽう laminin は陰性であり、基底膜ならびに同細胞-基質間接着の欠失が示唆された。tuft 内に CD34 陽性細胞は認められず、血管構造の欠失が確認された。また同腫瘍細胞は Ki-67 陽性であり、増殖能の保持が示された。

電子顕微鏡による検討にて、tuft 内に基底膜や血管構造は認められなかった。いっぽう、tuft を構成する腫瘍細胞

胞-細胞間において接着構造が認められた。また tuft 内腫瘍細胞における微絨毛は疎であり、同細胞の apical / basal 側が明らかには指摘できず、細胞極性の欠失が示唆された。

各種臨床病理学的因子との相関分析では、MPP 陽性と、リンパ管侵襲 ($p < 0.001$)・静脈侵襲 ($p < 0.001$)・リンパ節転移 ($p < 0.001$)・胸膜侵襲 ($p = 0.006$)・dominant non-BAC subtype ($p < 0.001$)・dominant papillary subtype ($p < 0.001$)・喫煙 ($p = 0.044$) との間には有意な相関を認めた。リンパ節転移や胸膜侵襲を伴わない stage IA 群 ($N = 197$) においても、MPP 陽性と、リンパ管侵襲 ($p < 0.001$)・静脈侵襲 ($p < 0.001$)・dominant non-BAC subtype ($p < 0.001$)・dominant papillary subtype ($p < 0.001$)・喫煙 ($p = 0.031$) との間には有意な相関を認めた。

生存分析では、MPP 陽性群は陰性群と比較して、無再発生存期間 (disease free survival)・生存期間 (overall survival) 両者において有意に予後不良であった ($p < 0.001$ / $p = 0.027$)。MPP の割合が増加するに従って予後が悪化する傾向を認め、focal 群は none 群に比べて予後不良であった ($p = 0.027$ / $p = 0.068$)。すべての dominant histological subtype において、陽性群は陰性群に比較して予後不良の傾向を認めた。stage IA 群においても、陽性群は陰性群に比較して disease free survival / overall

survival 両者において有意に予後不良であり ($p = 0.001$ / $p = 0.001$)、陽性群の 5 / 10 年生存率は 77.6% / 67.6% であり、陰性群の同生存率 (98.1% / 98.1%) と比較して大きく不良であった。

D. 考察

1) 卵巣転移機構の解析

今回種々のヒトがん細胞株を経静脈的及び経腹的に NOD/SCID マウスへ移植し、卵巣への転移性について検討した。移植実験で卵巣転移性を示した 4 種類のヒトがん細胞株にはいずれも E-cadherin 発現低下がみられたことから、E-cadherin の発現の低下が卵巣特異的転移の機序に関与しているとの仮説を立てた。RERF-LC-AI に E-cadherin を強制発現させ、NOD/SCID マウスへ経静脈的に移植したところ、卵巣への転移性のみが特異的かつ完全に抑制されることが明らかとなった。E-cadherin は上皮性細胞において細胞間接着に寄与する接着分子である。一般に、E-cadherin の発現低下は癌細胞の遊走能・浸潤能を高め、転移を促進することが知られている。しかし、今回の実験結果は、E-cadherin の発現低下が特に卵巣転移を促進することを示唆している。E-cadherin のこのような役割は、既知の接着分子としての機能からは説明することが困難であることから、E-cadherin の関与する未知の調節機