

## がん転移の分子機構の解明

## 《研究の概要》

がんの転移は原発巣で増殖したがん細胞が組織間隙へ分散・浸潤し、脈管系に侵入し、遠隔臓器に定着して増殖するというステップを経て成立する。したがってがん転移の全体像を明らかにするためには、それぞれのステップに関与する諸要因について明らかにしていく必要がある。本研究においてはがん細胞の分散、分散がん細胞の組織浸潤ならびに転移部位でのがん細胞の再増殖のステップに関与する分子について、特に遺伝子の転移性ががん細胞での発現異常並びにこれらの分子の転移性ががん細胞への作用機序などを中心に分子生物学的並びに細胞生物学的解析を行った。

がん細胞の分散については、強力な分散因子として知られている Scatter Factor (SF) について、がん細胞の組織浸潤については、組織破壊・浸潤の主役と考えられているマトリックスメタロプロテイナーゼ (MMP) について、また転移部位での再増殖については、増殖因子について解析を行い以下の知見を得た。(1) SF のレセプターをもつ細胞に SF の遺伝子を導入・発現させ自らが SF を産生するようになった細胞は、分散性が亢進し浸潤性、転移性に必要な形質を獲得していることが明らかになった。またがん細胞に対する SF による分散性亢進作用には、レセプター (c-Met) のチロシンキナーゼの活性化が必須であり、そのチロシンキナーゼの活性化には、主要自己チロシンリン酸化部位が重要であることが示された。さらに c-Met のチロシンキナーゼ活性を介して強くリン酸化される新規の蛋白質が同定された。(2) 転移性がん細胞における MMP の発現は、IV 型コラーゲン分解酵素である MMP-2 と MMP-9 の発現が転移能と良く相関することが示された。また MMP-9 遺伝子の発現は、少なくとも 3 つの独立した制御機構により調節を受け、その中心的なエレメントが AP-1 であることが明らかになった。また新たな MMP 遺伝子の検索を行った結果、がん細胞表層で細胞外マトリックス分解の引金となると考えられる新規の膜結合型 MMP を発見した。(3) 肺転移性結腸がん細胞の増殖は、IGF-1 と呼ばれる増殖因子により促進され、IGF-1 の作用には細胞内の 150kDa と 160kDa 蛋白質のチロシンリン酸化とホスファチジルイノシトール 3-キナーゼとの結合が重要であることが示唆された。また転移部位でのがん細胞の再増殖に関与しうる増殖因子として肺あるいは肝転移性がん細胞の増殖を促進する新規の因子が精製された。

以上のように、転移関連分子の発現異常およびそれらの転移性がん細胞への作用機序が明らかにされた。また新規の MMP、増殖因子および細胞内チロシンリン酸化蛋白質が見出された。次のステップとしてこれらの分子をターゲットとした転移抑止方法の検討が必要であるが、本研究ですでに MMP のインヒビターである TIMP-1 に転移抑止能があることが示された。また新規に見出された分子については、これらの発現異常あるいは活性の変化が、がん細胞の浸潤性、転移性に影響を与える可能性が高いので、種々の転移性がん細胞におけるこれらの分子の発現について解析することが今後の課題である。

## 研究者氏名及び所属機関

研究者氏名	所属機関及び地位	分担研究課題
喜多村直実	関西医科大学肝臓研究所教授	がん細胞の分散の機構
清木 元治	金沢大学がん研究所教授	がん細胞の組織浸潤の機構
矢守 隆夫	(財)癌研究会癌化学療法センター 主任研究員	がん細胞の転移先での再増殖の機構

## 研究報告

### I 研究目的

がんの転移は原発巣で増殖したがん細胞が組織間隙へ分散・浸潤し、脈管系に侵入し、遠隔臓器に定着して増殖するというステップを経て成立する。従ってがん転移の全体像を明らかにするためには、それぞれのステップに関与する諸要因について明らかにしていく必要がある。またこれらのステップには、転移性がん細胞側と宿主側の諸要因が複雑に相互作用している。本研究においてはがん細胞の分散、分散がん細胞の組織浸潤並びに転移部位でのがん細胞の再増殖のステップについて、それらに関与する諸要因の分子機構を明らかにすることを目的とする。がん細胞の分散に関しては、細胞分散因子とそのレセプター、組織浸潤に関しては、組織破壊を行うメタロプロテアーゼ酵素群とそのインヒビター、転移部位での再増殖に関しては、増殖因子とそのレセプターについて解析する。特にこれらの分子の遺伝子の転移性がん細胞での発現異常並びにこれらの分子の転移性がん細胞への作用機序などを中心に分子生物学的並びに細胞生物学的に解析し、がん転移形成におけるそれらの分子の役割を明らかにする。

近年の原発巣の固形がんの治療成績の飛躍的向上に比べて、転移が原因のがん患者の治療成績はほとんど進展がみられない。従ってがんの克服のためには、転移を抑止する方法の開発が必要である。細胞のがん化の機構の分子レベルでの解明はがん遺伝子およびがん抑制遺伝子を中心に非常に進んできている。これに比較して、がん転移の機構に関する分子レベルでの解明は遅れている。転移形成におけるステップについてそれらに関与する要因について分子機構が解明されれば、それらをターゲットとした転移の予測、抑止方法の開発に結び付けることが可能である。がんの転移を抑止できる方法の確立により、がんの治療成績がさらに向上することが期待される。

### II 研究計画及び材料と方法

#### 1 がん細胞の分散の機構

がん細胞が浸潤性や転移性を獲得するために細胞の分散性の亢進が必要であると考えられる。細胞の分散性に関与する分子としては、分散因子や細胞接着分子などが考えられるが、Scatter Factor (SF) は強力な細胞分散因子として知られ、がん細胞のコラーゲンゲル内への浸潤性を促進する作用があることからがん細胞の浸潤に関与することが示唆されている。なおSFは、肝細胞の増殖因子として単離されたHepatocyte Growth Factor (HGF) と同一の分子であることが明らかにされている。

SF は間質細胞より産生し上皮細胞に作用し細胞を分散する性質をもつ。SF のレセプターをもつがん細胞が自ら SF を産生するようになるいわゆるオートクリンループにより、自らが産生する SF によりがん細胞の分散性が亢進し、浸潤性を獲得するメカニズムが考えられる。そこで SF の遺伝子を導入・発現し、実際に細胞が自ら SF を産生するようになった場合の形質の変化について解析する。

SF のレセプターは c-met がん原遺伝子産物 (c-Met) であることが明らかにされている。c-Met はチロシンキナーゼ型レセプターである。そこで SF がどのようなメカニズムによりがん細胞の分散性を亢進するかを解明する一端として、c-Met の細胞内シグナル伝達における役割について c-Met のチロシンキナーゼ活性を中心に解析する。

種々のがん細胞において、c-Met の発現異常が見出されている。これらの発現異常の分子機構について調べる。また発現異常にともなうがん細胞の変化について SF の作用との関係において解析する。

## 2 がん細胞の組織浸潤の機構

がん細胞は常にその周辺を細胞外マトリックスに取り囲まれており、その分解と浸潤はがんの発生部位や種類によらず転移形成に重要なステップである。マトリックスメタロプロテイナーゼ (matrix metalloproteinase: MMP) と呼ばれる一群の酵素は未変性の細胞外マトリックス成分を基質として分解できることから、がん細胞による組織破壊・浸潤の主役と考えられている。

MMP には遺伝子クローニングにより 8 種類が知られている (本研究課題遂行中にさらに 1 種類と我々が同定した 1 種が加わった)。基底膜の浸潤との関連で注目されている IV 型コラーゲン分解活性を持つ MMP-2、MMP-3、MMP-9 とそのインヒビターである TIMP-1、TIMP-2 の遺伝子発現を様々なヒトがん細胞株を用いて調べる。また、これらの細胞の実験的な転移能を調べ MMP 発現異常のパターンとの関連を解析する。これらの細胞株のうち適切なものを選んで遺伝子導入実験を行うことにより、発現異常と転移能の間の因果関係を検証する。

がん細胞で発現異常が見られる MMP 及び TIMP 遺伝子についてその発現制御機構を解析し、がんでの発現異常の分子機構を解明する。このためにはそれら遺伝子上流領域の DNA ゲノムを単離し、遺伝子発現の制御エレメントを明らかにする。これらの制御エレメントの役割をがん遺伝子、がん抑制遺伝子、腫瘍局所炎症反応との関連で解析する。

現在知られている MMP が浸潤・転移に重要なすべてをカバーしているとは思えない。浸潤性がん細胞の表層にある MMP-2 活性化因子が MMP の一種である可能性が指摘されているし、MMP-11 遺伝子が悪性乳がん組織の differential hybridization によってクローニングされた例もある。様々なヒトがん組織で発現している MMP 関連遺伝子のライブラリーを PCR 法で作製し、その中から新規 MMP の候補を探し出す。

## 3 がん細胞の転移先での再増殖の機構

がん細胞の転移部位での再増殖には、個々の臓器の微小環境を構成するサイトカインや増殖因子が深く関わっていると考えられる。これらはまたがん細胞の臓器親和性を決定する要因とも考えられる。そこで、転移部位での再増殖に関与する増殖因子を明らか

にし、それらががん細胞への作用機作を解析する。

ここでは主に肺および肝への転移を研究対象とする。肺転移の研究材料としてマウス結腸がん colon26 細胞の肺転移系を用いる。また肝転移研究のため、結腸がん細胞の肝転移系の樹立および肝環境モデルとして肝実質細胞株の樹立を行う。これらを用い、がん細胞の転移部位での再増殖をコントロールする増殖因子あるいはサイトカインを明らかにする。またこれらの因子の転移細胞におけるシグナル伝達機構を解析する。以上の成果をふまえ、増殖因子あるいはそのレセプター等をターゲットとした転移抑止方法を検討する。

### III 研究成果

- ①SF に対して最も敏感な標的細胞である MDCK 細胞を用いて factor をオートクリン発現させ、細胞の分散性・運動性がどのように変化するかを調べた。ネオマイシン耐性遺伝子をもつベクターに SF の cDNA を SR $\alpha$  プロモーターにつないだものを挿入し、MDCK 細胞にトランスフェクションし、SF を産生している 6 個の細胞クローンを単離した。得られた 6 個のクローンについて細胞の形態をみると、6 個ともすべてが親株細胞とは全く異なり分散した状態で増殖した。得られた 6 クローンのうち 0.6ng/ml から 6.9ng/ml の SF を産生する 4 クローンを選び他の性質について解析を行った。まず運動性について Boyden chamber assay で調べると、すべてのクローンについて発現レベルに関わらず運動性が亢進していた。また軟寒天上での増殖、すなわち anchorage-independent な増殖は、発現レベルが高い場合に大きなコロニーの出現が見られた。この anchorage-independent な増殖は、細胞が transform した時の 1 つの特徴であるが、dish 上での増殖をみると、saturation density は、親株の細胞に比べて大きいということはなく、コンタクトインヒビションがかかっている。またよく発現しているクローンについてヌードマウスに植えたところがんは形成されなかった。したがって anchorage-independent な増殖の促進は、細胞が transform したためではなく、軟寒天上で細胞がよく分散するために起ったと考えられる。次にこれらの形質が SF が分泌することによって現れるのかどうかを抗体を用いて調べた。分散して増殖する細胞に抗 SF 抗体を存在させると、細胞が接着してくる。また軟寒天上での増殖も抗体存在下ではコロニーが小さくなる。したがって、細胞の分散性および軟寒天上での増殖は、factor が分泌して表面のレセプターに働いて作用すると考えられる。一方運動性の亢進については、抗体が存在する場合でもほとんど変化がみられなかった。したがって運動性の場合には、factor が細胞内で作用している可能性が考えられる。あるいは、このアッセイ系では抗体が十分に効かないという可能性も残されており、今後の検討が必要である。以上の結果をまとめると、パラクリン様式で factor に対する調節を受けていた上皮細胞が自ら factor を産生するようになりその性質が変化し、分散性および運動性が亢進し、その結果軟寒天上などでの anchorage-independent な増殖が促進するようになる。この細胞ががん細胞の場合は、浸潤性あるいは転移性亢進に必要な形質を獲得したことになる。

②c-Met は調べた限りのすべての上皮細胞で発現しており、内在性 c-Met を活性化することなく、強制発現させた c-Met の SF 刺激によるシグナル伝達能を調べることはで

きない。一方、c-Met を発現していない線維芽細胞はもともと分散した形態をしており、強制発現させた c-Met を介する細胞分散作用を観察するには適していない。そこで c-Met の細胞外領域を EGF レセプターのそれに置き換えたキメラレセプター (EMR) を SF の標的細胞に発現させ、EMR 発現細胞を EGF 刺激したときの細胞の応答を観察することにより、内在性 c-Met を活性化することなく強制発現させた c-Met の細胞内領域の機能を調べることが可能だと考えた。EGF レセプターと c-Met の cDNA を PCR 法により組換え EMRcDNA を構築した。構築した EMRcDNA を SRa プロモーターにつなぎネオマイシン耐性遺伝子をもつベクターに挿入した。得られた DNA を SF により分散性・運動性が強く亢進するが、EGF には応答しないマウス・メラノーマ由来細胞である B16-F1 細胞にトランスフェクションした。その結果 EGF レセプターと同程度の EGF 結合能をもった EMR 分子が細胞表面に発現した細胞株を得た。そして発現細胞を EGF で刺激することにより EMR のチロシンリン酸化が顕著に誘導された。さらに EGF 刺激した EMR 発現細胞は、分散した線維芽細胞様の形態をとり、運動性が亢進していた。以上の結果から、SF の細胞分散作用、運動性亢進作用のシグナルは c-Met の細胞内領域の活性化により伝達されることが証明され、さらに c-Met の細胞内領域のシグナル伝達能を検出する系が確立された。

次に *in vitro* mutagenesis により c-Met のチロシンキナーゼ領域内のチロシンキナーゼ活性に必須である ATP 結合部位および自己チロシンリン酸化部位に変異を導入したキメラレセプターcDNA を作成し、同様に B16-F1 細胞にトランスフェクションした。ATP 結合部位変異体 (K1108A) 発現細胞を EGF で刺激した時、チロシンリン酸化は全く起きなかった。また主要自己リン酸化部位変異体 (Y1233F) の EGF 刺激時のチロシンリン酸化も約 4% に低下していた。そして両変異体発現細胞において EGF 刺激による細胞分散・運動性亢進は観察されなかった。これら変異体のチロシンキナーゼ活性については、まず発現細胞を EGF で刺激した時に細胞内でチロシンリン酸化が誘導される蛋白質を解析した結果、親株である B16-F1 を SF で刺激したときに検出される分子量 115kDa の分子は、EMR キメラレセプター発現細胞では検出されたが、両変異体発現細胞では検出されなかった。次に免疫沈降した変異体の *in vitro* での自己リン酸化活性と外来性基質 (ミエリン塩基性蛋白) に対するキナーゼ活性を調べた結果、K1108A にはいずれの活性も検出されず、Y1233F でも自己リン酸化活性は EGF 非刺激時で約 16%、EGF 刺激時で約 12% に低下しており、ミエリン塩基性蛋白に対するキナーゼ活性は EGF 非刺激時で約 3%、EGF 刺激時で約 1% に低下していた。以上の結果から、c-Met のチロシンキナーゼの活性化が B16-F1 細胞の分散、運動性亢進作用のシグナル伝達に必須であり、そのチロシンキナーゼの活性化には主要自己リン酸化部位のチロシンリン酸化が重要な役割を果たしていることが示された。

SF で B16-F1 細胞を刺激した時に強くチロシンリン酸化される 115kDa の蛋白質 (p115) は、チロシンキナーゼ活性を失った c-Met を介してはチロシンリン酸化されないことから、SF による B16-F1 の分散性、運動性作用におけるシグナル伝達において重要な役割を果たすと考えられる。そこで p115 の構造解析を行った。SF で刺激した B16-F1 細胞より p115 蛋白質を精製し、その部分アミノ酸配列を利用して cDNA クローンを単離した。cDNA の構造解析の結果、p115 は分子内に Zn-finger ドメインを有する新規の蛋白質であることが明らかになった。Zn-finger ドメインは、DNA や蛋白質などの他の分子との

相互作用に必要なドメインと考えられている。したがって p115 は Zn-finger ドメインを介して、分子間相互作用に関わり、細胞内シグナル伝達における役割を果たしていると考えられる。

③c-Met は  $\alpha$  と  $\beta$  サブユニットからなるヘテロダイマーであり、一本鎖前駆体が切断されて生成する。ヒト大腸がん由来の LoVo 細胞では c-Met が切断されず、一本鎖型として存在することから c-Met の発現異常が認められる。この LoVo 細胞について解析した結果、LoVo 細胞では Furin と呼ばれるセリンプロテアーゼの遺伝子に突然変異が認められ正常型 Furin が生成しないことが明らかになった。また LoVo 細胞に Furin の cDNA をトランスフェクションして得た Furin 発現クローンでは c-Met の切断が起きていた。したがって一本鎖 c-Met は Furin によりヘテロダイマーに変換することが明らかになった。次に LoVo 細胞の Furin 発現、及び非発現クローンを用いて、SF 刺激による c-Met の自己チロシンリン酸化と細胞応答性について比較した。その結果、一本鎖 c-Met もヘテロダイマーと同様に SF 刺激により自己チロシンリン酸化を受け、また一本鎖、及びヘテロダイマー c-Met 発現クローンの細胞応答は SF 刺激により同程度であった。したがって c-Met の切断は SF のシグナル伝達上、必須ではないと考えられる。Furin は種々の分子の切断に関与すると考えられており、LoVo 細胞のがん細胞としての性質の変化は、c-Met 以外の分子の切断が行われてないためであると考えられる。

- 2 ①MMP/TIMP の発現を調べたがん細胞株 26 例について実験的転移能を鶏卵法によって調べたところ 5 例が胎児肝臓への転移巣を形成した。そのうち 3 例は間葉系で、2 例が上皮系細胞であった。MMP の発現で相関の高いものは IV 型コラーゲン分解酵素であった。MMP-2 が 4 例で、MMP-9 が間葉系の 3 例全ての細胞で発現していた。しかし、上皮系の 1 例 (T24) には何れの MMP 遺伝子の発現も見られなかった。T24 細胞が転移巣では MMP を発現している可能性について抗体を用いた免疫染色法で調べたところ MMP-2 と MMP-9 の発現を確認した。このことから、*in vivo* での環境も MMP 発現に重要であると考えられる。全体として MMP-2 および MMP-9 の発現が鶏卵法で転移能と良く相関することが示された。

実験的転移能の高い細胞の一つ (胃がん細胞株 KKLS) は MMP の特異的インヒビターである TIMP-1 の発現がほとんど見られなかった。そこで、この細胞を用いてがん細胞が発現する MMP 活性と転移能の間の因果関係を調べるために、TIMP 遺伝子をトランスフェクションして転移能に対する影響を調べた。転移能の評価は鶏卵法で行った。トランスフェクションした細胞では TIMP-1 の発現量に応じて転移能が抑制される結果を得た。このことから、鶏卵法における実験的肝転移形成には TIMP-1 で抑制される MMP の活性が必要であることが示された。この実験結果により、TIMP-1 の発現低下は転移能亢進の一因となり得ること、また、鶏卵法が MMP が関与する転移ステップを簡便に調べるときのアッセイ系として有用であることが示された。TIMP-1 による KKLS 細胞の転移抑制はヌードマウスの実験的転移でも再現された。

②がん細胞での MMP-9 発現異常がどのような機構によるものかを明らかにする目的で、MMP-9 遺伝子の発現制御領域を調べた。その結果、少なくとも 3 つの独立した制御機構によって調節を受けていることが明らかになった。第一は炎症性サイトカイン

(TNF-alpha、IL-1) による制御で、AP-1 と NF-kB あるいは Sp1 結合部位に同時にシグナルが入ることにより遺伝子発現が誘導される。腫瘍局所での炎症反応に伴う TNF-alpha や IL-1 がこの経路で MMP-9 の遺伝子を周辺の細胞で誘導していると考えられる。第二は v-src による発現誘導の経路である。この場合には NF-kB、Sp-1 部位は必要ないが AP-1 結合部位と GGGGTGGG 配列へのシグナルが共に必須であった。v-src による転写誘導には細胞の核に GGGGTGGG 配列結合因子が存在することが必要であった。大腸がんでは活性型の c-Src が高いレベルで発現していることが知られている。そこでの MMP-9 発現にはこの経路が関与している可能性がある。第三の経路は複数のがん遺伝子による制御である。活性型 H-Ras は単独では MMP-9 の発現誘導ができないが低レベルの AP-1 (c-Jun) が存在すると相乗的に発現が誘導される。この場合には AP-1 結合部位単独で十分で他のエレメントへの刺激を必要としない。がん細胞自身での発現機構にこの機構が関与している可能性がある。以上の結果はこれまでに報告されている MMP-1 や MMP-3 遺伝子の発現が共に AP-1 と Ets 結合配列の組み合わせで制御されているに対して、MMP-9 の発現制御が様々なシグナルに対応して多様に制御されていることを示している。その中心的なエレメントが AP-1 部位であり、アデノウイルスの E1A は MMP-9 の発現誘導を AP-1 部位を介してほぼ完全に抑制する。

③がん組織では様々なメタロプロテナーゼの発現が亢進しており、細胞外マトリックス分解と浸潤に関与している証拠が蓄積しつつある。これらの酵素ががん細胞の表面でどのように活性化され、浸潤の引金がかかるかが注目されている。特に 72-kDa type IV collagenase/gelatinase A は様々な腫瘍組織での広範な発現が報告されており、その活性型の検出は腫瘍に特異的である。その活性化因子は腫瘍細胞特異的に細胞膜表層に発現していると言われている。この仮定の活性化因子もメタロプロテナーゼの一種であると想像されており、世界のこの分野でのトップグループがその精製とクローニングを試みている、我々も新規 MMP 遺伝子を検索することにより、gelatinase A activator のクローニングを試みた。

がん組織および胎盤で発現している MMP 遺伝子を保存配列に対する PCRprimer(5種)を用いて増幅し、MMP 遺伝子の cDNA ライブラリーを構築した。各クローンの塩基配列を調べると 95%以上は既知の遺伝子であったが残りの部分の一つが新しい MMP 遺伝子の可能性を示した。これをプローブにして完全なコーディングフレームを持つ cDNA を胎盤のライブラリーから単離した。そのアミノ酸配列から、C 末端側に細胞膜貫通領域様構造を持つことが予想された。予想されるペプチドに対する抗体を調整することにより、63kDa の蛋白質が同定され、予想どおり細胞膜に結合してその表面に発現していることが免疫染色、細胞膜分離によって示された。そこで本酵素を膜結合型 MMP (membranetype matrix metalloproteinase: MT-MMP) と呼ぶことにした。トランスフェクションによって MT-MMP を発現させると pro-gelatinaseA の活性化が起こり、同時に in vitro では細胞の浸潤性が增强された。悪性度と gelatinaseA 活性化との相関が報告されている肺がんでもがん細胞自身に特異的な発現亢進があり、gelatinaseA の活性型の存在と確かに相関していた。このようにがん細胞表層で細胞外マトリックス分解の引金となると想像されていた gelatinaseA activator が MT-MMP として遺伝子クローニングによって明らかとなった。

3 ①肺転移性の高い colon26 細胞の増殖は、血中に高濃度存在することの知られる IGF-1 (Insulin-like Growth Factor 1) により促進された。この現象はヒト大腸がん細胞においても認められた。シグナル伝達を解析した結果、IGF-1 反応性がん細胞では、IGF-1 刺激により細胞内の 150kDa (pp150) および 160kDa 蛋白質 (pp160) が速やかにチロシンリン酸化されること、チロシンリン酸化されたこれらの蛋白質はホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ (P13K) に結合することが明らかとなった。さらに、pp150 はインスリン受容体基質 1 (IRS-1) と同一であることが明らかとなった。IGF-1 が、転移性の高いがん細胞の増殖を促進する例は、我々の系以外にもメラノーマ、骨肉腫細胞などで知られている。IGF-1 の血中濃度は増殖促進有効濃度をはるかに上回ることから見て、がん細胞によっては IGF-1 で転移を促進されるおそれは十分にあると思われる。IGF-1 反応性がん細胞では、IGF-1 シグナル伝達に 2 種の蛋白質 pp160 と IRS-1 がセカンドメッセンジャーとして機能する、すなわちチロシンリン酸化され P13K に結合することが判明した。これにより、おそらく P13K が活性化されると推察される。

②肺の組織抽出液には、肺転移性がん細胞の増殖促進活性 (Lung extract factors: LEF) のあることを見出した。そこでウシ肺より LEF の精製を試みた。その結果、LEF は複数の蛋白質より成っており、そのうち少なくとも一つは 27kDa の蛋白質であることが明らかとなった。

また肝実質細胞株を樹立し、この細胞株が、肝での増殖性の高いがん細胞の分裂を促進する因子を分泌することを見出した。精製の結果、この因子はヘパリンセファロース結合性を持つ 34kDa の糖蛋白質であることが判明した。

肺および肝の産生する増殖因子として、各々 27kDa の蛋白質および 34kDa の糖蛋白質が精製されてきたが、これらの蛋白質は、肺および肝で増殖能を持つがん細胞に対する増殖促進活性を指標に精製されたので肺転移または肝転移における転移後のがん細胞の再増殖に関係している可能性がある。臓器の産生する増殖因子でがん転移に関与するものの単離に成功した例はこれまでのところほとんど見られず、わずかに Nicolson ら (J. Cell Biochem., 43: 127-138, 1990) が肺から高転移性がん細胞の分裂を促進するトランスフェリン様の腫瘍増殖因子の単離を報告したに留まる。我々が、肺から精製した 27kDa 蛋白質はその分子量と抗原性から見てトランスフェリンとは明らかに異なるものである。一方、肝実質細胞株の分泌する 34kDa 糖蛋白質は分子量とヘパリンセファロース結合性から一見 PDGF の可能性があるが、34kDa 糖蛋白質のヘパリンセファロースへの結合力は PDGF に比べはるかに弱く、また抗 PDGF 抗体にまったく反応しないことから別の増殖因子と見て間違いない。

③結腸がん細胞の肝転移系 (HN7.23) を樹立した。肝転移性の上昇した細胞では、親株に比べゼラチナーゼ活性、モティリティおよび無血清培地中での増殖能上昇が見られた。HN7.23 細胞を BALB/C マウスに脾臓内移植後、肝転移阻害剤のモデル薬剤として抗がん剤を投与した結果、肝転移抑制効果が見られ、効果の大小は肝重量を測定することにより評価可能であった。従って、この肝転移系は、肝転移阻害剤の in vivo 評価系として有用と考えられる。

#### IV 考察

本研究では、がん細胞の転移形成に関連すると考えられるいくつかの分子について、それらの発現異常と浸潤性、転移性との関わりおよびがん細胞にどのように作用していくかなどを、培養がん細胞を用いた浸潤、増殖の解析あるいは実験的モデル転移系を用いた解析により行った。SF についてはオートクリン発現によるがん細胞の分散性、運動性獲得、あるいは SF のがん細胞に対する分散性、運動性亢進作用における c-Met レセプターのチロシンキナーゼ活性の役割などが明らかになった。また MMP については、いくつかのがん細胞において MMP-2 と MMP-9 の発現と転移性との相関が明確に示され、MMP-9 についてはその遺伝子の発現異常の詳細な機構が明らかにされた。さらに増殖因子については、IGF-1 の転移性がん細胞の増殖促進作用における細胞内チロシンリン酸化蛋白質が明らかにされた。以上の結果を踏まえてこれらの分子をターゲットとした転移抑止方法が検討される必要がある。本研究で MMP のインヒビターである TIMP-1 に転移抑止能があることが、鶏卵法を用いた実験的肝転移形成およびヌードマウスを用いた実験的転移において明らかにされた。今後ヒトがんの転移の抑止法に応用可能かどうかを検討していく必要がある。また最近、がん細胞に対して浸潤抑制能をもつペプチド分子が SF の浸潤性亢進作用に対して抑制的に働くという報告がなされた。この分子が本研究で明らかにされた SF のシグナル伝達経路のどこに作用するか解析が必要であり、さらに SF に対してより強力に抑制的に作用する分子の開発をしていく必要がある。

本研究において、がん細胞の浸潤性、転移性に関与すると考えられるいくつかの新しい分子が見出された。MMP の新しい分子として MT-MMP が単離された。MT-MMP はマトリックスメタロプロテイナーゼファミリーで膜貫通構造をもつ初めての酵素である。したがってこの発見はがん細胞の浸潤に関わる細胞表層での出来事を明らかにする時の手がかりという意味で様々な生物学分野にインパクトがあると考えられ、すでに世界中の多くの研究者との共同研究がスタートしている。また臓器由来増殖因子として 27kDa 蛋白質および 34kDa 糖蛋白質を単離精製した。これらの分子は、転移部位でのがん細胞の再増殖に関与しうる増殖因子の可能性もある。したがってこれらの分子の分子構造およびがん細胞への作用機序等の解明が急がれる。さらに SF でがん細胞を刺激した時に c-Met を介して強くチロシンリン酸化される分子量 115kDa の蛋白質が検出された。また肺転移性の高い colon26 細胞を IGF-1 で刺激すると、分子量 150kDa と 160kDa の蛋白質が強くチロシンリン酸化された。細胞内チロシンリン酸化蛋白質は、細胞の増殖、分化あるいはがん化の過程において、細胞内シグナル伝達分子として重要な役割を果たしている。転移関連分子の細胞内シグナル伝達においてもチロシンリン酸化蛋白質が重要な役割を果たしていると考えられる。これらの蛋白質の機能の解析が今後の重要な研究課題である。以上の新しく見出された分子の発現異常あるいは活性の変化が、がん細胞の浸潤性、転移性に影響を与える可能性は高い。したがって種々の転移性がん細胞におけるこれらの分子の発現について解析する必要がある。またこれらの分子は転移抑止のターゲットになることが期待される。特にチロシンリン酸化蛋白質をリン酸化するチロシンキナーゼについては、その活性を阻害する分子がすでに多く単離されている。これらの阻害分子について転移抑止能を解析する必要がある。

がん細胞はいろいろな組織に転移する。この組織特異性は、それぞれのがん細胞が異なる形質を獲得したことによると考えられる。したがって転移抑止剤の開発のためには、い

くつかの転移の実験モデルが必要である。本研究において鶏卵を用いた実験転移系が MMP が関与する転移ステップを簡便に調べるときのアッセイ系として有用であることが示された。哺乳動物を用いたモデル実験系としては、すでにマウスを用いた肺転移系が開発され、転移実験のモデルあるいは転移抑制剤の評価系としてよく使用されている。本研究ではこれらに加えて結腸がん細胞のマウスでの肝転移系を樹立した。またこの系を用いたモデル薬剤の投与により、転移抑制効果が認められ、肝転移抑制剤の *in vivo* での評価系として有用であることが明らかになった。今後この系を利用して肝転移抑制剤の開発が期待される。

## V 研究成果の発表

- 1 Y. Uehara and N. Kitamura: Expression of a human hepatocyte growth factor/scatter factor cDNA in MDCK epithelial cells influences cell morphology, motility and anchorage-independent growth. *J. Cell Biology.* 117, 889-894 1992
- 2 M. Komada, K. Miyazawa, T. Ishii and N. Kitamura: Characterization of hepatocyte-growth-factor receptors on Meth A cells. *Eur. J. Biochem.* 204, 857-864 1992
- 3 S. Shibamoto, M. Hayakawa, T. Hori, N. Oku, K. Miyazawa, N. Kitamura and F. Ito: Hepatocyte growth factor and transforming growth factor- $\beta$  stimulate both cell growth and migration of human gastric adenocarcinoma cells. *Cell Struct. Funct.* 17, 185-190 1992
- 4 D. Naka, T. Ishii, Y. Yoshiyama, K. Miyazawa, H. Hara, T. Hishida and N. Kitamura: Activation of hepatocyte growth factor by proteolytic conversion of a single-chain form to a heterodimer. *J. Biol. Chem.* 267, 20114-20119 1992
- 5 M. Okigaki, M. Komada, Y. Uehara, K. Miyazawa and N. Kitamura: Functional characterization of human hepatocyte growth factor mutants obtained by deletion of structural domains. *Biochemistry* 31, 9555-9561 1992
- 6 N. Kitamura, K. Miyazawa, Y. Uehara, M. Komada, A. Okajima, M. Okigaki and A. Kitamura: Gene expression and regulation of HGF-SF. *Hepatocyte Growth Factor-Scatter Factor (HGF-SF) and the C-Met Receptor.* (I. D. Goldberg and E. M. Rosen, eds.) 49-65 Birkhauser Verlag, Basel 1993
- 7 A. Okajima, K. Miyazawa and N. Kitamura: Characterization of the promoter region of the rat hepatocyte growth factor/scatter factor gene. *Eur. J. Biochem.* 213, 113-119 1993
- 8 K. Miyazawa, T. Shimomura, A. Kitamura, J. Kondo, Y. Morimoto and N. Kitamura: Molecular cloning and sequence analysis of the cDNA for a human serine protease responsible for activation of hepatocyte growth factor-Structural similarity of the protease precursor to blood coagulation factor XII. *J. Biol. Chem.* 268, 10024-10028 1993
- 9 M. Komada, K. Hatsuzawa, S. Shibamoto, F. Ito, K. Nakayama and N. Kitamura: Proteolytic processing of the hepatocyte growth factor/scatter factor receptor

- by furin. FEBS Lett. 328, 25-29 1993
- 10 M. Komada and N. Kitamura: The cell dissociation and motility triggered by scatter factor/hepatocyte growth factor are mediated through the cytoplasmic domain of the c-Met receptor. *Oncogene* 8, 2381-2390 1993
  - 11 T. Shimomura, J. Kondo, M. Ochiai, D. Naka, K. Miyazawa, Y. Morimoto and N. Kitamura: Activation of the zymogen of hepatocyte growth factor activator by thrombin. *J. Biol. Chem.* 268, 22927-22932 1993
  - 12 S. Takahashi, K. Kasai, K. Hatsuzawa, N. Kitamura, Y. Misumi, Y. Ikehara, K. Murakami and K. Nakayama: A mutation of furin causes the lack of the precursor-processing activity in a human colon carcinoma cell line LoVo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 195, 1019-1026 1993
  - 13 T. Hori, S. Shibamoto, M. Hayakawa, K. Takeuchi, N. Oku, K. Miyazawa, N. Kitamura, and F. Ito: Stimulation of prostaglandin production by hepatocyte growth factor in human gastric carcinoma cells. *FEBS Lett.* 334, 331-334 1993
  - 14 S. Shibamoto, M. Hayakawa, K. Takeuchi, T. Hori, N. Oku, K. Miyazawa, N. Kitamura, M. Takeichi, and F. Ito: Tyrosine phosphorylation of  $\beta$ -catenin and plakoglobin enhanced by hepatocyte growth factor and epidermal growth factor in human carcinoma cells. *Cell Adhesion Commun.* 1, 295-305 1994
  - 15 K. Miyazawa, T. Shimomura, D. Naka, and N. Kitamura: Proteolytic activation of hepatocyte growth factor in response to tissue injury. *J. Biol. Chem.* 269, 8966-8970 1994
  - 16 M. Komada, and N. Kitamura: Regulatory role of major tyrosine autophosphorylation site of kinase domain of c-Met receptor (scatter factor/hepatocyte growth factor receptor). *J. Biol. Chem.* 269, 16131-16136 1994
  - 17 Y. Uehara, O. Minowa, C. Mori, K. Shiota, J. Kuno, T. Noda, and N. Kitamura: Placental defect and embryonic lethality in mice lacking hepatocyte growth factor. submitted
  - 18 H. Sato, Y. Kida, M. Mai, Y. Endo, T. Sasaki, J. Tanaka, and M. Seiki: Expression of genes encoding type IV collagen-degrading metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases in various human tumor cells. *Oncogene* 7, 77-83 1992
  - 19 Y. Endo, M. Seiki, H. Uchida, M. Noguchi, Y. Kida, H. Sato, M. Mai, and T. Sasaki: Experimental metastasis of oncogene-transfected NIH3T3 cells in chick embryo. *Jpn. J. Cancer Res.* 83, 274-280 1992
  - 20 H. Sato, and M. Seiki: Regulatory mechanism of 92-kDa type IV collagenase gene expression which is associated with invasiveness of tumor cells. *Oncogene* 8, 395-405 1993
  - 21 Y. Tsuchiya, H. Sato, Y. Endo, Y. Okada, M. Mai, T. Sasaki, and M. Seiki: Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) is a negative regulator of the metastatic ability of a human gastric cancer cell line, KKLS, in the chick embryo.

- Cancer Res. 53, 1397-1402 1993
- 22 H. Sato, M. Kita, and M. Seiki: v-Src activates the transcription of 92-kDa type IV collagenase gene through the AP-1 site and the GT box homologous to retinoblastoma control elements (RCEs). J. Biol. Chem. 268, 23460-23468 1993
  - 23 Y. Tsuchiya, Y. Endo, H. Sato, Y. Okada, M. Mai, T. Sasaki, and M. Seiki: Expression of type IV collagenases in human tumor cell lines that can form liver colonies in chick embryo. Int. J. Cancer 56, 46-51 1994
  - 24 M. Uchijima, H. Sato, M. Fujii, and M. Seiki: Tax proteins of HTLV-1 and-2 induce expression of the gene encoding erythroid-potentiating activity (tissue inhibitor of metalloproteinases-1; TIMP-1). J. Biol. Chem. 269, 1496-14950 1994
  - 25 H. Sato, T. Takino, Y. Okada, J. Cao, A. Shinagawa, E. Yamamoto, and M. Seiki: A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumor cells. Nature 370, 61-65 1994
  - 26 T. Takino, H. Sato, E. Yamamoto, and M. Seiki: Cloning of a human gene potentially encoding a novel matrix metalloproteinase having a trans-membrane domain at the C-terminus. Gene in press.
  - 27 T. Abe, T. Mori, K. Kohno, M. Seiki, T. Hayakawa, HG. Welgus, S. Hori, and M. Kuwano: Expression of 72 kDa type IV collagenase and invasion activity of human glioma cells. Clin. Exp. Metastasis 12, 296-304 1994
  - 28 J. Cao, H. Sato, T. Takino, and M. Seiki: The hydrophobic amino acid stretch of membrane type-matrix metallo proteinase (MT-MMP) at the C-terminus is a transmembrane domain and essential for its progelatinase A activation function. J. Biol. Chem. submitted
  - 29 H. Sato, J. Cao, H. Yonezawa, T. Takino, and M. Seiki: Expression of MT-MMP induces a receptor function for activated gelatinase A. in preparation.
  - 30 E. Lengyel, J. Juarez, G. Clayman, M. Seiki, H. Sato, and D. Boyd: The expression of 92 kDa type IV collagenase (MMP) in a squamous cell carcinoma cell line is induced by fibroblasts. in preparation
  - 31 T. Yamori, Y. Iizuka, Y. Takayama, S. Nishiya, S. Iwashita, A. Yamazaki, T. Takatori, and T. Tsuruo: Insulin-like growth factor1 rapidly induces tyrosine phosphorylation of a Mr 150,000 and a Mr 160,000 protein in highly metastatic mouse colon carcinoma 26 NL-17 cells Cancer Res, 51, 5859-5865 1991
  - 32 M. Inaba, S. Sato, T. Yamori, T. Tashiro, Y. Ohnishi, K. Maruo, Y. Ueyama, and T. Tsuruo: Anticancer activities of orally administered menogaril against human stomach and breast cancers implanted in nude mice Anticancer Res. 12, 1953-1956 1992
  - 33 S. Kataoka, M. Naito, N. Fujita, H. Ishii, T. Yamori, M. Nakajima, T. Tsuruo: Control of apoptosis and growth of malignant T lymphoma cells by lymph node stromal cell Exp. Cell Res. 207, 271-276 1993
  - 34 A. Isoai, H. Goto-Tsukamoto, T. Yamori, T. Oh-hara, T. Tsuruo, S. Silletti, A.

- Raz, H, Watanabe, H. Akedo, and H. Kumagai: Inhibitory effects of tumor invasion-inhibiting factor 2 and its conjugate on disseminating tumor cells Cancer Res. 54, 1264-1270 1994
- 35 A. Furusaka, M. Nishiyama, K. Ohkawa, T. Yamori, T. Tsuruo, K. Yonezawa, M. Kasuga, S.-i. Hayashi, and T. Tanaka: Expression of insulin receptor substrate-1 in hepatocytes: an investigation using monoclonal antibodies Cancer Letters 84, 85-92 1994
- 36 T. Yamori, Y. Fukui, M. Nishiyama, and T. Tsuruo: Growth promoting effect of IGF-I on human cancer cell lines and its signal transduction Growth Regulation 4 (Suppl. 1) 119 (Abstract) 1994
- 37 T. Yamori, Y. Fukui, M. Nishiyama, A. Komi, Y. Nishizuru, S. Hattori, K. Shimada, and T. Tsuruo: The association of IGF-1-elicited phosphotyrosine proteins with phosphatidylinositol 3-kinase in a highly metastatic mouse colon carcinoma 26 NL-17 in preparation
- 38 K. Shimada, T. Yamori, H. Kanda, Y. Nishizuru, A. Komi, K. Yamazaki, K. Asanoma, and T. Tsuruo: Establishment of a hepatocyte cell line producing growth promoting factors for liver-colonizing tumor cells in preparation
- 39 喜多村直実 Scatter Factor と細胞の分散・運動 癌と化学療法 20 巻 410-416 頁 1993 年
- 40 佐藤博、清水元治 マトリックスメタロプロテイナーゼおよびインヒビターの発現調節と癌転移 実験医学 10 巻 263-270 頁 1992 年
- 41 清水元治、木田百合、佐藤博 マトリックスメタロプロテイナーゼと転移能、細胞工学 11 巻 29-39 頁 1992 年
- 42 清水元治、木田百合、内嶋雅人、佐藤博 癌悪性形質の制御因子 TIMPs、実験医学 10 巻 2301-2307 頁 1992 年
- 43 清水元治、メタロプロテイナーゼ発現制御とがん遺伝子、癌と化学療法 20 巻 387-392 1993 年
- 44 清水元治、癌転移—分子機構から臨床まで 実験医学 12 巻 12-17 頁 1994 年
- 45 清水元治、佐藤博、岡田保典、滝野隆久、山本悦秀、品川彰 癌組織における pro-gelatinase A の活性化因子の検索 オンコロジヤ 27 巻 397-400 頁 1994 年
- 46 矢守隆夫 癌転移阻害物質の検索 続医薬品の開発 (名取俊二、中西義信編) 7 巻 135-153 頁 1991 年
- 47 矢守隆夫、鶴尾隆 癌転移と増殖因子 蛋白質・核酸・酵素 36 巻 438-443 頁 1991 年
- 48 矢守隆夫 臓器選択的転移の分子レベルでの裏付け 細胞工学 11 巻 48-56 頁 1992 年
- 49 矢守隆夫 臓器特異的転移と増殖因子 メビオ 9 巻 37-44 頁 1992 年
- 50 矢守隆夫、島田耕次 転移に関する増殖因子 臨床科学 29 巻 1119-1124 頁 1993 年
- 51 矢守隆夫、鶴尾隆 高転移性細胞におけるインスリン様増殖因子 1 (IGF-1) のシグナ

- ル伝達 癌と化学療法 20 卷 393-398 頁 1993 年
- 52 鶴尾隆、矢守隆夫 転移に関与する癌細胞の血小板凝集因子と増殖因子 Oncologia  
26 卷 21-26 頁 1993 年
- 53 矢守隆夫 世界における転移モデル動物実験の統括 実験医学 12 卷 1060-1064 頁  
1994 年