

第2章 ヒト腫瘍における Aggrus の発現

2-1 目的

マウス Aggrus は、大腸癌細胞での発現が正常大腸組織よりも高いことが明らかにされたため、ヒトの癌における Aggrus の発現の変化を検討した (5)。マウスの系では、Aggrus の発現が高くなることにより、血小板凝集能が上がり、転移能も上がると考えられた。まず、様々な癌での Aggrus の発現を調べるため、Cancer Profiling Array による検討を行った。Aggrus の発現が高い癌があれば、腫瘍マーカーとしての臨床応用も可能である。さらに、分子標的療法のターゲットとしての利用が考えられる。

2-2 試薬および方法

2-2-1 細胞培養

ヒト肺癌細胞株 A549、NCI-H23、NCI-H226、NCI-H552 は、10%の非働化した Fetal Bovine Serum (Biocell)、 $2\mu\text{M}$ L-glutamine (Invitrogen)、 $100\mu\text{g/ml}$ kanamycin を添加した RPMI 培地中で、5% CO_2 incubator 内で 37°C で培養した (23-26)。

2-2-2 組織切片

大腸癌および正常大腸の組織切片は、MaxArray Tissue Microarray (Zymed)を用いた。14 症例の精巣腫瘍の組織は、山形大学病院において 1990 年から 2002 年まで手術により摘出されたものである。2 症例の正常精巣の組織は、山形大学病院において両側精巣摘除術を行われたものである。組織を研究目的に使うことに関しては、患者様からの informed consent を文書にて得た。一例の精巣腫瘍 (Lot:N29757) は Novagen から購入した。肺癌の組織切片は、Lung tissue array (Ambion)を用いた。

2-2-3 Cancer Profiling Array による解析

Cancer Profiling Array I, II (BD Biosciences)は、ヒトの様々な腫瘍の、腫瘍部分と正常部分から合成した cDNA がナイロンメンブレンに固定されている。 ^{32}P ラベルしたヒト Aggrus 遺伝子の全長を Cancer Profiling Array II にハイブリダイズさせ、BAS1000 Bio-Imaging Analyzer (Fuji Film)を用いて定量化した。それぞれの aggrus の発現量は ^{32}P ラベルした ubiquitin で normalize した。

2-2-4 Real-time PCR

ヒト Aggrus 遺伝子の定量用プライマーとして、5'- GGAAGGTGTCAGCTCTGCTC -3'、5'- CGCCTTCCAAACCTGTAGTC -3'を用いた。また、内部標準となる β -actin 遺伝子の定量用プライマーとしては、5'- ACTCTTCCAGCCTTCCTTCCTG -3'と 5'- ATCTCCTTCTGCATCCTGTCGG -3' を用いた。Real-time PCR 試薬は QuantiTect SYBR Green PCR (Qiagen)を、機種は LightCycler (Roche) を使用した。PCR の温度条件は以下の通りである。95°C for 15 min for 1 cycle, followed by 40 cycles of 94°C for 15 s, 55°C for 25 s; 72°C for 20 s。そして、融解曲線分析は0.2°C s⁻¹、40°C という条件で行った。Aggrus と β -actin の定量用の標準曲線は、それぞれ PCR 産物を希釈し、1 μ l あたり 1x 10⁹ コピー数から 1x 10³ コピー数まで使用した。

2-2-5 Western-blot 法

方法と試薬の調整は 2-2-5 に準じた。細胞を lysis buffer で可溶化し、タンパク定量の後、10 μ g を 10% constant gel に apply し、running buffer を用いて、20 mA で 2 時間電気泳動した。その後、PVDF 膜に転写し、blocking buffer で室温、1 時間 blocking した。その後、10 μ g/ml に blocking buffer で調整した各々の抗体 (8F11 抗体、TT679 抗体) を、室温で 1 時間反応させた。washing buffer (western-blot 用) で洗った後、blocking buffer で 1/1,000 に希釈した HRP-labeled anti-Rat IgG (DakoCytomation)、あるいは HRP-labeled anti-Rabbit IgG (DakoCytomation) を 1 時間反応させた。washing buffer (western-blot 用) で洗った後、ECL (Amersham Pharmacia Biotech) で発色させ、scientific imaging film に露光させた。

2-2-6 免疫組織染色

ホルマリン固定し、パラフィン包埋した大腸癌組織切片 (LandMark Tissue Microarrays, lot 022P15A; Ambion) を、脱パラフィン処理し、蒸留水に浸した。内因性のペルオキシダーゼを不活性化するために、3% H₂O₂ を 5 分反応させ、casein-containing blocking reagent (DakoCytomation) でブロッキングを 5 分行った。1%BSA/PBS で 0.01 μ g/ml の濃度に希釈した TT679 を 23°C で 18 時間反応させ、biotin-labeled anti-rabbit IgG、peroxidase-conjugated streptavidin (LSAB2 kit; DakoCytomation) を順に反応させた。最後に、DAB (3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride) tablet sets (DakoCytomation) で 10 分発色した。

CSA 法はの DAKO CSA System (DakoCytomation)、EnVision 法は DAKO EnVision System (DakoCytomation) を用い、方法は取り扱い説明書に準じた。一次抗体は、TT679

(1 μ g/ml)、抗 Prox-1 抗体 (ReliaTech; 10 μ g/ml)、抗 HCG 抗体 (DakoCytomation; 1 μ g/ml)、抗 AFP 抗体 (DakoCytomation; 1 μ g/ml)、抗 cytokeratin19 抗体(BA17, RDI; 1 μ g/ml)で、24°Cで4時間反応させた。

2-2-7 Flow cytometry

NCI-H226 細胞を 37°Cでトリプシン処理し、PBS で1回洗浄後、PBS に調整した 1 μ g/ml の抗 podoplanin (Aggrus) 抗体 (RDI)、normal rat IgG (DakoCytomation) を 100 μ l、1時間室温で反応させた。PBSで1回洗浄後、PBSで1/200に希釈したanti-mouse IgG-FITC (Cappel)を 50 μ l ずつ加え、室温で 30 分間、遮光して反応させた。PBS で1回洗浄後、FACSCalibur (Becton Dickinson)で測定した。

2-2-8 血小板凝集の測定

血小板凝集の測定は、2-2-7 に従って行った。

2-3 結果

2-3-1 Cancer Profiling Array

マウス Aggrus は大腸癌細胞での発現が正常大腸組織よりも高いことが分かっていたため、ヒトの癌でも Aggrus の発現の変化を、Cancer Profiling Array を用いて調べた (Fig. 11)。個人によってばらつきは見られるが、T/N 比の平均値をとると、結腸、直腸、小腸などの腸管系臓器と精巣において高い T/N 比が見られた。結腸 (n=10)、直腸 (n=7)、小腸 (n=10)、肺 (n=10)、乳腺 (n=10)、卵巣 (n=10)、精巣 (n=10)、前立腺 (n=4)、膀胱 (n=5)、腎 (n=10) の T/N 比の平均値はそれぞれ、2.8、3.2、3.9、1.6、0.94、1.1、4.3、1.2、1.3、0.8 であった。

2-3-2 大腸癌における Aggrus の発現

マウス Aggrus に対する 8F11 抗体は、ヒト Aggrus には交差反応性を示さなかったため、まずヒト Aggrus の 38-51 番目までのアミノペプチドに対するポリクローナル抗体 TT679 を作製した。Aggrus は Geleff らにより podoplanin と名付けられており、リンパ管のマーカーとして繁用されている。作製した抗 Aggrus 抗体 TT679 は、正常大腸のリンパ管を認識した (Fig. 12)。リンパ管のマーカーである Prox-1 に対する抗体でも、正常大腸のリンパ管に反応した。さらに、ヒト Aggrus に対する抗体 TT679 およびマウス Aggrus に対する抗体 8F11 抗体によって、western-blot 法を行ったところ、TT679 はヒト Aggrus に選択的に反応し、8F11 抗体はマウス Aggrus に選択的に反応した (Fig. 13A)。この TT679 抗体を用いて、大腸癌の組織切片に対する反応性を調べたところ、大腸癌にヒト Aggrus が高発現しているのが確認された (Fig. 13B, C)。TT679 抗体は正常大腸上皮には染色性を示さなかった (Fig. 13D, E)。

2-3-3 精巣腫瘍における Aggrus の発現

精巣胚細胞腫瘍は、セミノーマ、胎児性癌、卵黄嚢腫瘍、絨毛癌、奇形腫、多胎児癌の 6 基本型に分類されるが、本研究では山形大学病院において手術症例が多かったセミノーマ、胎児性癌におけるヒト Aggrus の発現を調べた。Table 1 に示す通り、合計 25 サンプルの精巣腫瘍について解析を行った。Table 1 の No.11 から No.25 の手術症例では、15 症例中 11 症例がセミノーマであり、4 症例が胎児性癌であった。この 15 症例について TT679 抗体による染色を行ったところ、セミノーマ 11 症例中 10 症例の 90.9%で陽性となったのに対し、胎児性癌 4 症例は全例陰性であった。未固定の手術標本を入手することのできたセミノーマ 2 例、胎児性癌 1 例、正常 2 例について、real-time PCR を行ったと

ころ、No.11 と No.12 のセミノーマの症例のみに Aggrus の発現が見られた (Fig. 14)。さらに、TT679 による western-blot 法を行ったところ、セミノーマの症例のみに約 38kDa のバンドが検出された (Fig. 15)。Fig 16 には、TT679 抗体による免疫染色の結果を示すが、セミノーマは TT679 抗体によって高い反応性を示すが、胎児性癌は全く染色されなかった。セミノーマの一例について、TT679 抗体と他の腫瘍マーカーである HCG, AFP に対する抗体を反応させたところ、TT679 抗体のみが反応した (Fig. 17)。

2-3-4 肺癌における Aggrus の発現

3-3-1 に示す通り、大腸、小腸と精巣以外の組織については、Cancer Profiling Array における T/N 比の平均値は低く、症例ごとにばらつきが見られた。そこで、各腫瘍を組織型別に分類し、T/N 比を比較した。Table 2 は Cancer Profiling Array の中で、肺癌の症例について、患者のプロフィールや肺癌の組織型、Aggrus の T/N 比を示した。肺癌においては、T/N 比の平均値は 1.6 (n=30) だが、肺癌を組織型別に分類して Aggrus の発現を比較したところ、扁平上皮癌では 2.2 (n=12) であるのに対し、腺癌では 0.9 (n=15) であり、扁平上皮癌では腺癌に比べ Aggrus の発現が有意に高いことがわかった ($p<0.01$, Fig. 18)。さらに、入手することのできた 3 症例の扁平上皮癌の cDNA を用いて、Aggrus の real-time PCR を行ったところ、3 症例中 2 症例の扁平上皮癌において、腫瘍部での発現が正常部での発現より高値を示した (Fig. 19)。

Table 3 では、肺癌の組織切片に対する TT679 抗体および扁平上皮癌のマーカーである cytokeratin19 に対する抗体の BA17 抗体の染色結果を示す。TT679 抗体による免疫染色では、扁平上皮癌 8 症例中 7 症例の 87.5% で陽性であり、腺癌では 13 症例中 2 例の 15.4% のみが陽性であった。これは、BA17 抗体による染色で扁平上皮癌の陽性率が 62.5% であるという結果を上回った。Fig. 20 に免疫染色の例を示すが、扁平上皮癌では Aggrus が陽性(A, B)だが、腺癌(C)では陰性であった。扁平上皮癌のマーカーである cytokeratin19 も同様に染色された (Fig. 20 D-E)。

次に、肺癌の細胞株における Aggrus の発現を調べた。Aggrus の発現を real-time PCR で調べたところ、扁平上皮癌細胞株の NCI-H226 細胞のみに Aggrus の発現が見られた (Fig. 21A)。さらに、flow cytometry にて NCI-H226 細胞における Aggrus の発現を調べたところ、明らかに発現が認められた (Fig. 21B)。また、NCI-H226 細胞をマウス血小板と反応させたところ、血小板凝集が引き起こされた (Fig. 21C)。

2-4 考察

Tsuruo らの研究により、マウス結腸癌細胞 NL-17 細胞においてマウス Aggrus (gp44) の発現が高いことが報告された (2)。さらに、Watanabe らにより、B16 メラノーマにおいてもマウス Aggrus の発現が高いことが示され、Aggrus の発現量が高いほど、高い血小板凝集活性や転移活性を示すことが報告された (22)。そこで本章では、ヒトの癌における Aggrus の発現の変化を検討した。様々な癌での Aggrus の発現を調べるため、Cancer Profiling Array による検討を行った。その結果、大腸、小腸、精巣において、高い T/N 比を示した (Fig. 11)。他の臓器の癌に関しても患者によってばらつきがあり、組織型による発現量の差の有無を検討した。その結果、肺癌においては、扁平上皮癌に高発現しており、腺癌では発現量が低いことがわかった (Fig. 18)。肺癌の中でも、扁平上皮癌と腺癌は分化癌であり、ともに気管支上皮細胞から分化すると考えられている(27)。それにも関わらず、なぜ Aggrus の発現が扁平上皮癌だけに見られるのかを解明することは今後の課題である。肺扁平上皮癌のマーカーとしては、SCC や CYFRA が臨床的に繁用されている(28, 29)。本研究において、Aggrus が肺癌のなかでも扁平上皮癌に特異的に発現していることから、肺扁平上皮癌の特異的マーカーとして期待される。さらに、症例は少ないが、甲状腺癌では髄様癌において Aggrus の発現が高いことがわかった。その他の臓器に関しても、免疫組織染色にて Aggrus が陽性の症例があり、今後、どのような症例で Aggrus が陽性になっているかをさらに詳しく検討する必要がある。

精巣胚細胞腫瘍は、セミノーマ、胎児性癌、卵黄囊腫瘍、絨毛癌、奇形腫、多胎児癌の 6 基本型に分類されるが、大きくセミノーマと非セミノーマに分類される(30, 31)。非セミノーマの腫瘍マーカーとして、HCG、AFP などが現在臨床的に良く使われている。セミノーマは放射線療法に反応性が良好であることから、セミノーマと非セミノーマを分類することは、治療や予後を考える上で重要である。しかしながら、セミノーマの特異的マーカーはこれまであまり報告されておらず、今回 Aggrus がセミノーマ特異的に発現していることから (Fig. 16)、Aggrus がセミノーマの腫瘍マーカーとして期待される(32)。

今回の研究に用いた肺癌の症例はすべて外科での切除標本であり、遠隔転移のある症例は含まれていなかった (Table 2, 3)。よって、Aggrus の発現と転移との相関関係を調べることはできなかった。血中での Aggrus を測定する系を確立し、遠隔転移をおこした非切除症例についても調べることにより、Aggrus の発現量と転移との相関関係を調べることは今後の課題である。

Table 1. Patient information of the samples used in this study.

Patient	Year	Race	Stage	type	T/N	TT679
1	unknown	Caucasian	T1N0M0	Seminoma	1.76	N/D
2	22	Asian	T2N0M0	Seminoma	5.19	N/D
3	45	Caucasian	T1N0M0	EC	1.53	N/D
4	69	Caucasian	T1N0M0	Seminoma	1.88	N/D
5	32	Caucasian	T1N0M0	Seminoma	3.07	N/D
6	54	Caucasian	T1N0M0	Seminoma	7.72	N/D
7	54	Caucasian	T1N0M0	Seminoma	1.20	N/D
8	42	Caucasian	unknown	Seminoma	5.56	N/D
9	38	Caucasian	unknown	Seminoma	11.20	N/D
10	28	Caucasian	T3N0M0	Seminoma	4.00	N/D
11	31	Asian	T2N2M0	Seminoma	N/D	positive
12	27	Asian	T1N1M1	Seminoma	N/D	positive
13	34	Asian	unknown	Seminoma	N/D	positive
14	34	Asian	T2N0M0	Seminoma	N/D	positive
15	28	Asian	T2N2M0	Seminoma	N/D	negative
16	35	Asian	T1N0M1	Seminoma	N/D	positive
17	18	Asian	T2N3M1	EC	N/D	negative
18	35	Asian	T1N0M0	EC	N/D	negative
19	33	Asian	T1N0M1	EC	N/D	negative
20	16	Asian	T2N3M0	EC	N/D	negative
21	31	Asian	T1N0M0	Seminoma	N/D	positive
22	61	Asian	T1N0M0	Seminoma	N/D	positive
23	34	Asian	T1N0M0	Seminoma	N/D	positive
24	34	Asian	T2N0M0	Seminoma	N/D	positive
25	47	unknown	T1N0M0	Seminoma	N/D	positive

EC: Embryonal carcinoma, N/D: Not determined.

Table 2. Personal and clinical patient information (Cancer profiling array)

Patient	Array	Age	Sex	Histology	TNM	T/N Ratio
1	I	66	M	SCC	N/A	3.60
2	I	69	F	AC	N/A	0.85
3	I	73	M	SCC	N/A	4.70
4	I	65	M	SCC	N/A	0.30
5	I	64	M	SCC	N/A	1.59
6	I	52	M	C	N/A	0.30
7	I	66	M	SCC	N/A	2.28
8	I	57	M	SCC	N/A	2.80
9	I	46	M	AC	N/A	1.04
10	I	65	M	AC	N/A	0.78
11	I	46	M	SCC	N/A	0.78
12	I	61	M	AC	N/A	0.76
13	I	65	F	SCC	N/A	0.57
14	I	62	M	AC	N/A	0.78
15	I	59	F	AC	N/A	0.75
16	I	44	F	AC	N/A	1.01
17	I	75	M	SCC	N/A	1.86
18	I	33	F	C	N/A	0.59
19	I	63	M	AC	N/A	0.77
20	I	60	M	SCC	N/A	5.06
21	I	58	M	SCC	N/A	0.60
22	II	72	M	AC	T3N2M0	1.00
23	II	N/A	N/A	AC	T3N1M0	1.14
24	II	51	M	AC	T3N0M0	1.19
25	II	63	M	SCC	T2N0M0	2.15
26	II	N/A	M	SCC	T1N0M0	1.94
27	II	N/A	M	SCC	T3N1M0	0.43
28	II	N/A	M	N/A	N/A	1.72
29	II	26	M	AC	N/A	1.09
30	II	44	F	SCC	T2N0M0	4.20

SCC:squamous cell carcinoma, AC:adenocarcinoma, C:carcinoid

Table 3. Personal and clinical patient information (Immunohistochemistry)

Patient	Age	Sex	Histology	TNM	TT679 Reactivity	BA17 Reactivity
31	70	M	SCC	T2N0M0	+	+
32	54	M	AC	T1N0M0	-	-
33	74	F	AC	T1N0M0	-	-
34	54	M	AC	T1N0M0	-	-
35	54	M	AC	T1N0M0	-	-
36	74	M	SCC	T2N0M0	-	-
37	62	M	AC	T2N0M0	-	-
38	67	F	AC	T1N0M0	-	-
39	58	M	AC	T2N2M0	-	-
40	50	M	SCC	T2N0M0	+	+
41	55	F	SCC	T2N0M0	+	-
42	76	F	SCC	T1N0M0	+	+
43	49	F	AC	T1N0M0	-	-
44	67	M	SCC	T2N1M0	+	+
45	43	M	AC	T1N0M0	-	-
46	55	M	AC	T2N0M0	-	-
47	68	F	AC	T2N0M0	-	-
48	57	M	AC	T1N0M0	+	+
49	75	M	SCC	T2N0M0	+	+
50	50	M	SCC	T2N1M0	+	-
51	65	F	AC	T1N0M0	+	+

SCC:squamous cell carcinoma, AC:adenocarcinoma

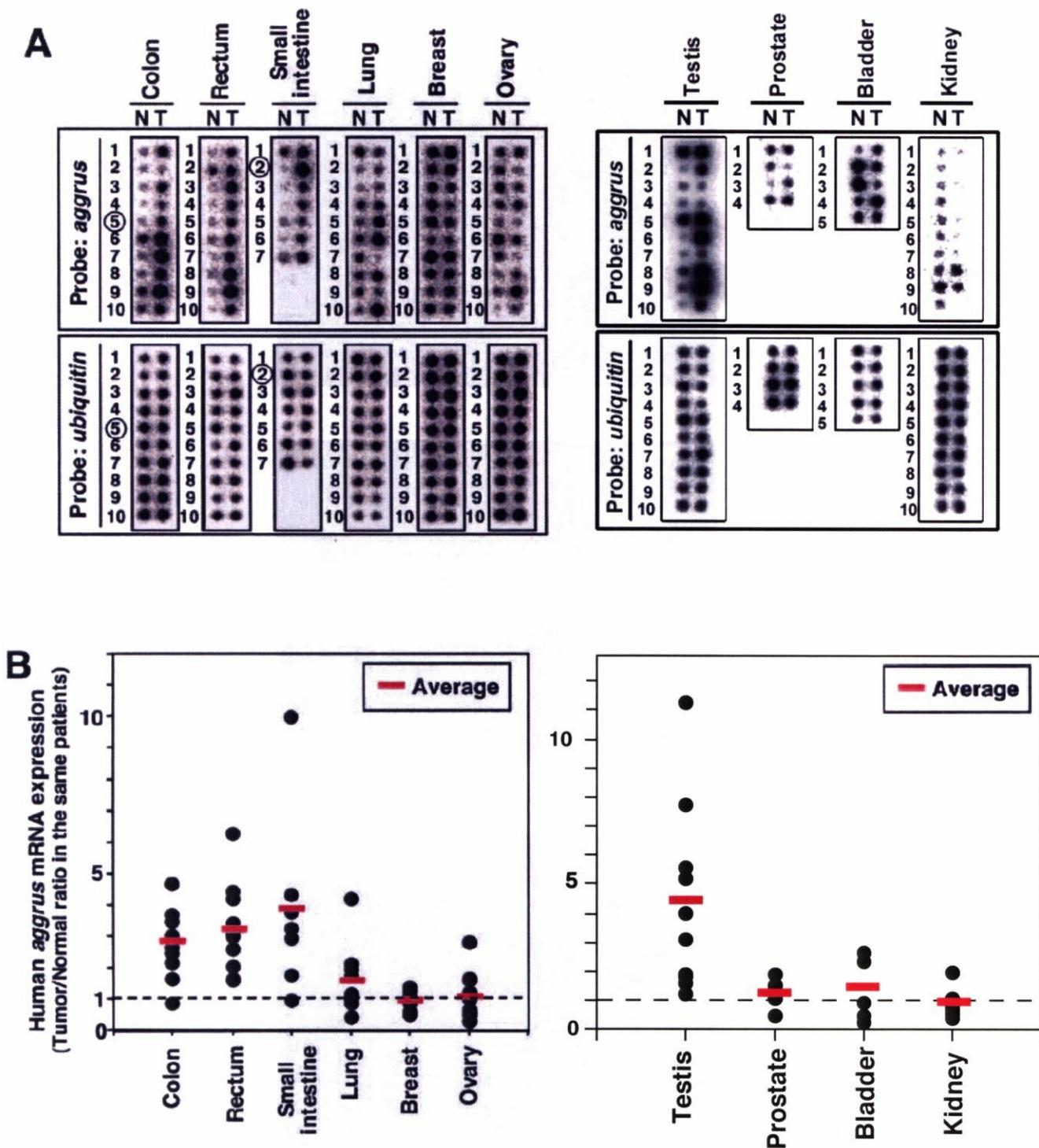


Fig. 11. Human *aggrus* expression in human tumors. Human *aggrus* expression in tumor (T) and normal (N) tissues in the same patient was assessed by hybridizing ^{32}P -labeled human *aggrus* cDNA to Cancer Profiling Array II. The expression level of human *aggrus* in the individual patients was normalized by measuring radioactivity of each dot after hybridization with ^{32}P -labeled *ubiquitin* cDNA. The radioactivity of each dot was visualized (A) and quantified (B). Red bar; average of the human Aggrus expression ratio in each tissue (B).

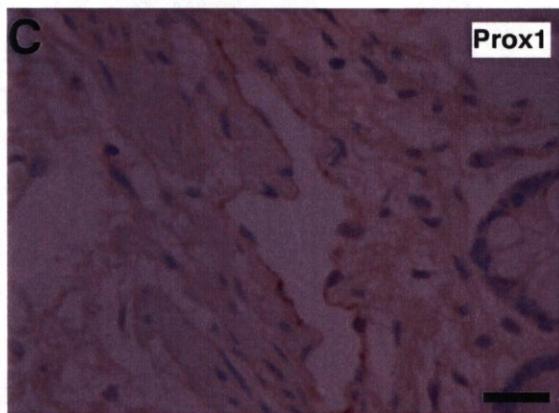
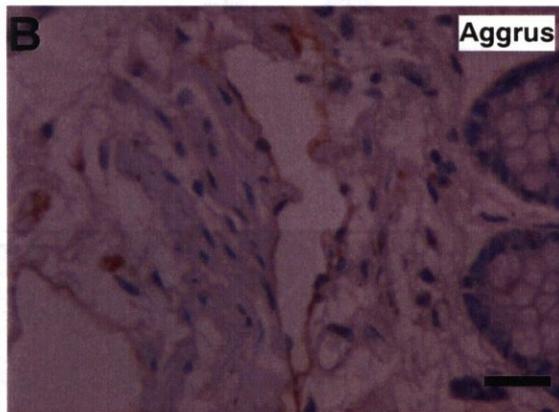
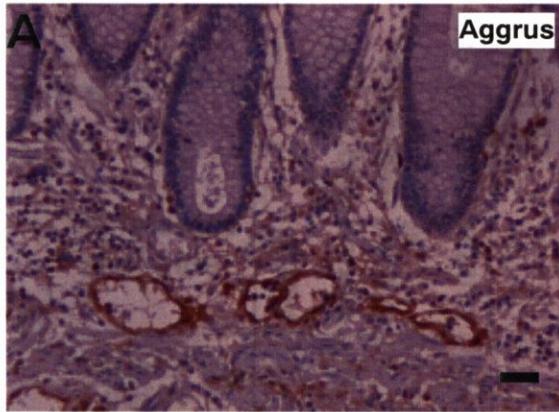


Fig. 12. Immunohistochemical staining of Aggrus and Prox1 in normal colorectal tissues. Normal colorectal tissue specimens were stained with an anti-human Aggrus antibody (TT679, **A**, **B**) and an anti-Prox1 antibody (**C**). Then the specimens were further developed using the DAKO EnVision System. Arrows indicate the lymphatic vessels. Bars, 10 μ m.

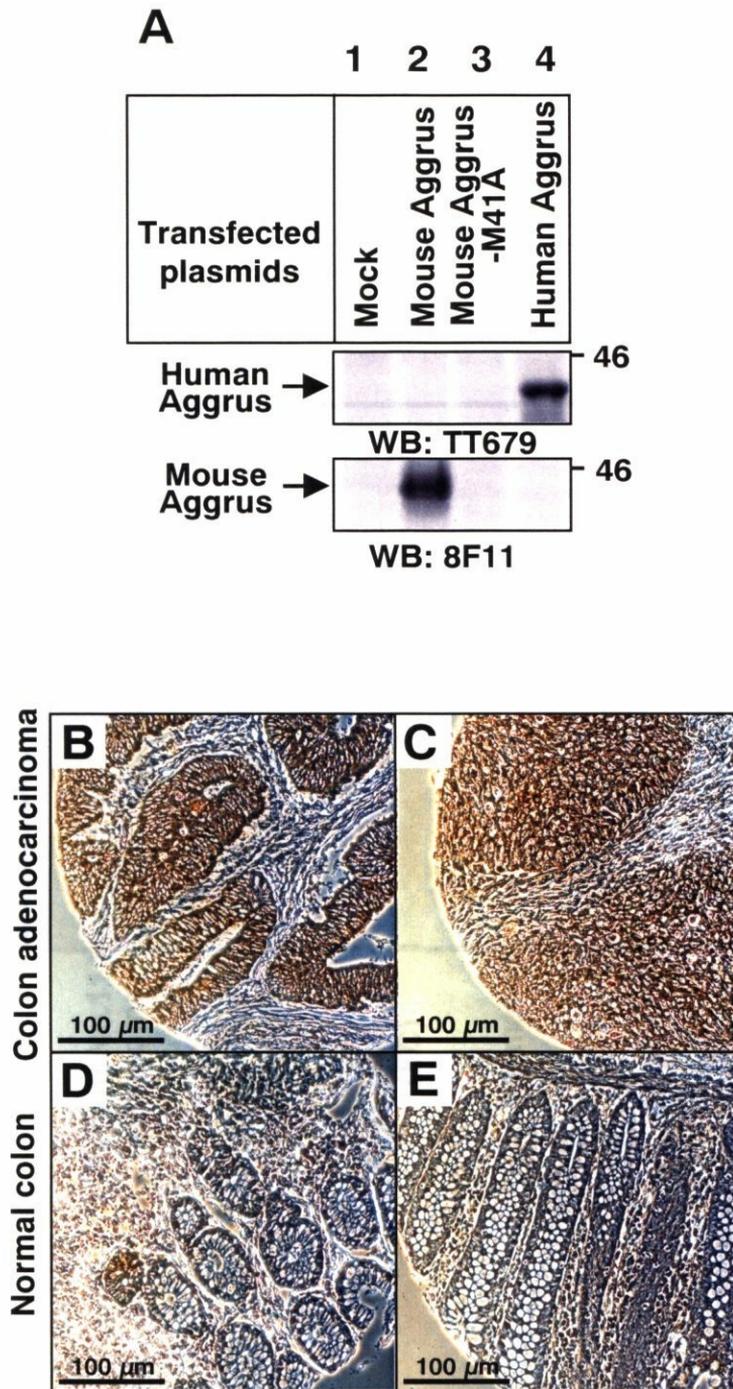


Fig. 13. Human Aggrus protein expression in colon adenocarcinoma. **A**, CHO cells were transiently transfected with a pcDNA3 vector containing the indicated mouse or human *aggrus* cDNAs. The cell lysates were immunoblotted with 8F11 antibody or anti-human Aggrus antibody (TT679). **B-E**, Immunohistochemical staining with anti-human Aggrus antibody (TT679) on human specimens derived from colon adenocarcinoma (**B** and **C**) compared with specimens derived from normal colon (**D** and **E**) tissues.

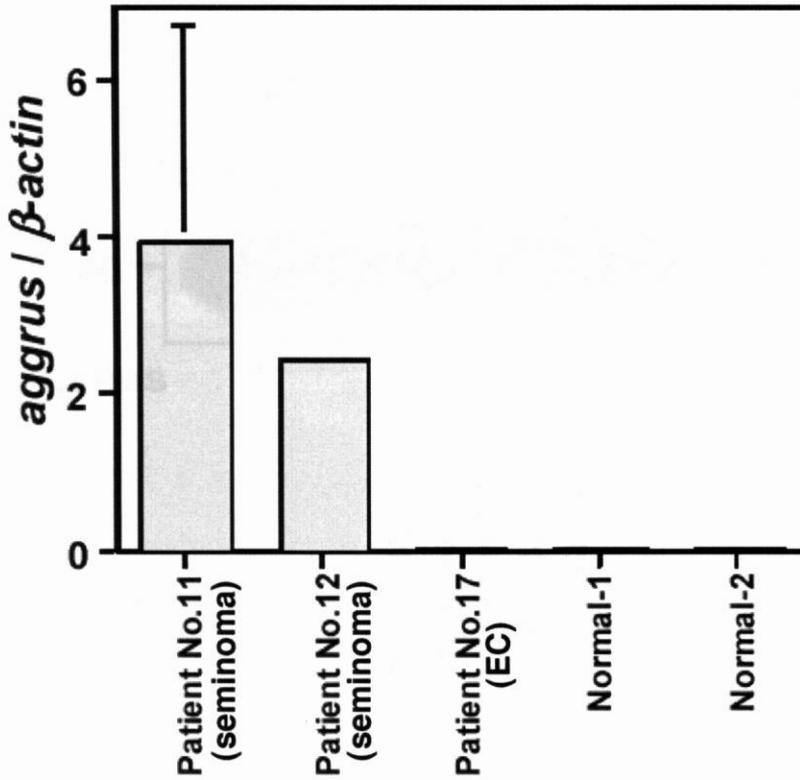


Fig. 14. Increased *aggrus* mRNA expression in testicular tumors. The *aggrus* transcripts in testicular tumor tissues (patients 11 and 12 ;seminoma, or patient 17; embryonal carcinoma; EC) and normal testicular tissues (Normal-1 and -2) were quantified by performing real-time PCR.

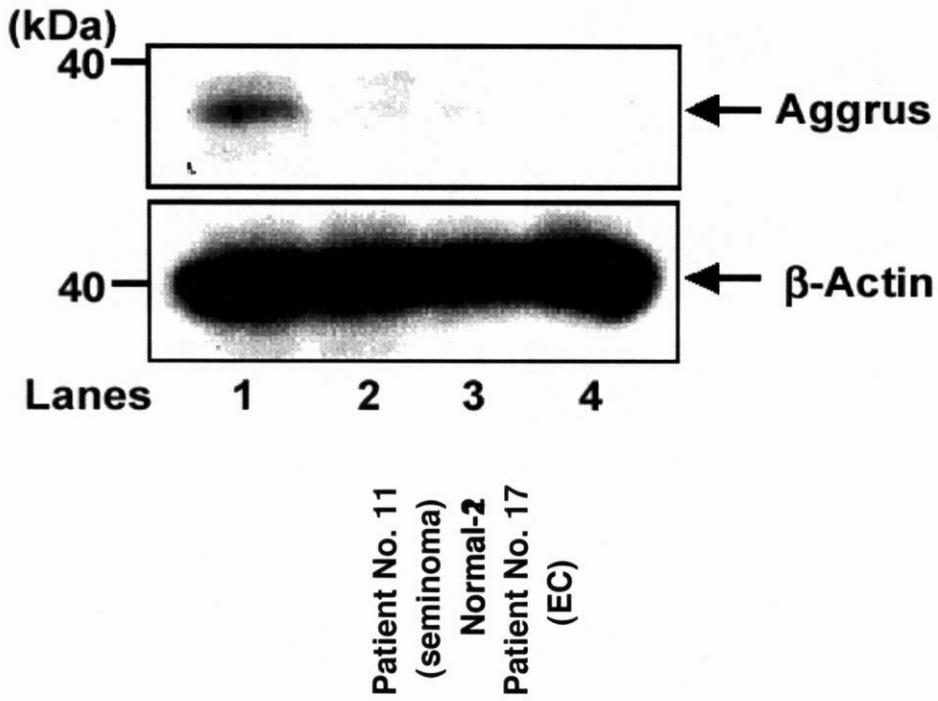


Fig. 15. Western-blot analysis of testicular tumors. lane 1; patient 11 (seminoma), lane 2; patient 17 (Embryonal carcinoma; EC), lane 3, 4; normal testicular tissues.

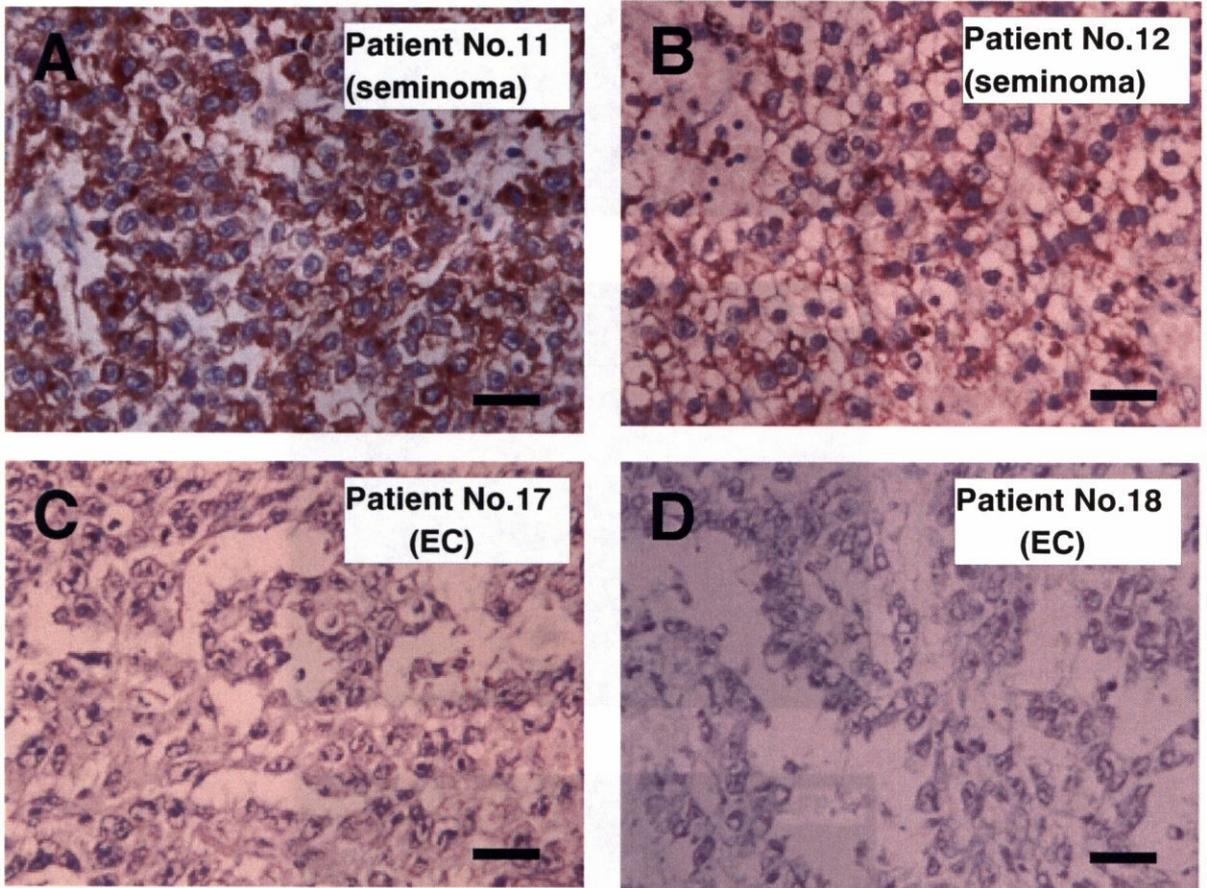


Fig. 16. Immunohistochemical staining of Aggrus protein in testicular tumors. Testicular tumor specimens were stained with an anti-human Aggrus polyclonal antibody (TT679). Then the specimens were further developed using the DAKO CSA System. Seminoma tissues from patients 11 (A) and 12 (B) and embryonal carcinoma tissues from patients 17 (C) and 18 (D). Bars, 10µm.

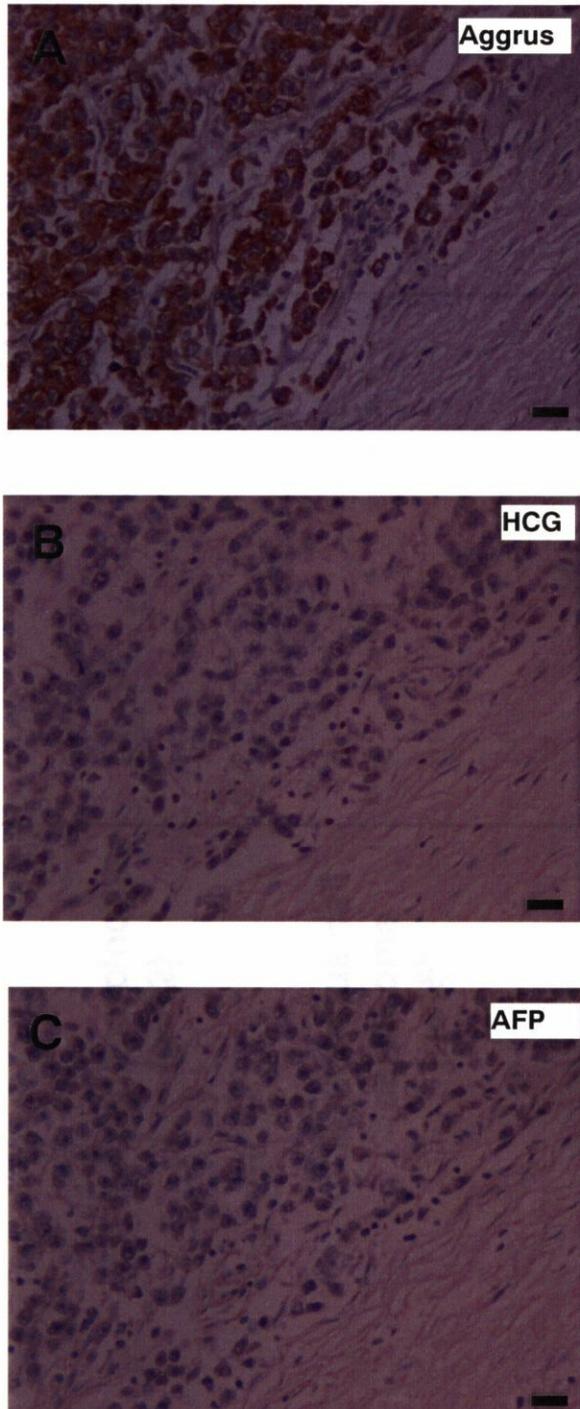


Fig. 17. Immunohistochemical staining of Aggrus, Prox1, AFP and HCG in seminomas. Seminoma specimens of patient 11 were stained with an anti-human Aggrus antibody (TT679, **A**), an anti-HCG antibody (**B**) and an anti-AFP antibody (**C**). Then the specimens were further developed using the DAKO EnVision System. Bars, 10 μ m.

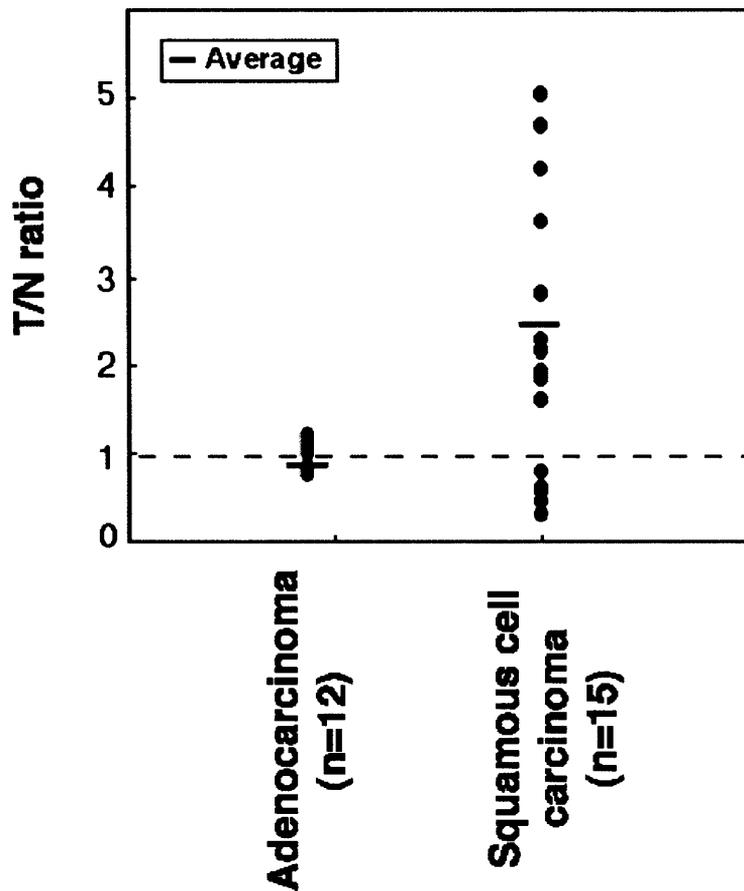


Fig. 18. Increased *aggrus* mRNA expression in squamous cell carcinoma of lung. The relative *aggrus* mRNA expression level in the each dot was normalized by measuring radioactivity of each dot after hybridization with ^{32}P -labeled *ubiquitin* cDNA in Cancer Profiling Array. The T/N ratio was calculated by dividing the normalized radioactivity of tumor samples with that of normal tissues in individual patients. Horizontal columns; average of T/N ratio in either AC or SCC.

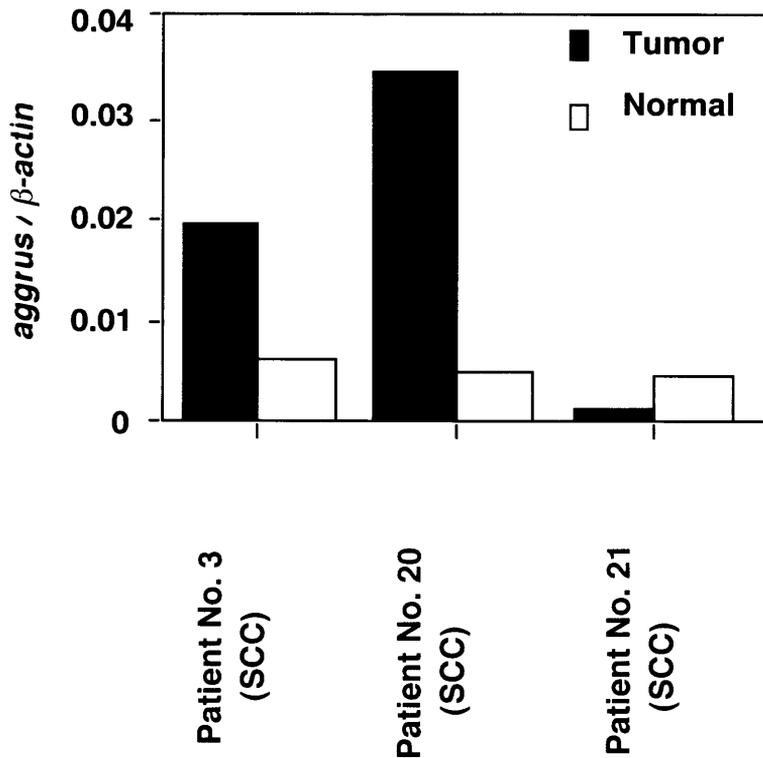


Fig. 19. Quantitative analysis of *aggrus* transcripts in lung squamous cell carcinoma and corresponding normal tissues by real-time PCR. The first-strand cDNA samples derived from tumorigenic and corresponding normal tissues of patients 3, 20 and 21 were used as templates for real-time PCR. The respective expression levels of *aggrus* were normalized to that of the β -actin transcript. *aggrus*/ β -actin; *aggrus* mRNA/ β -actin mRNA ratio.

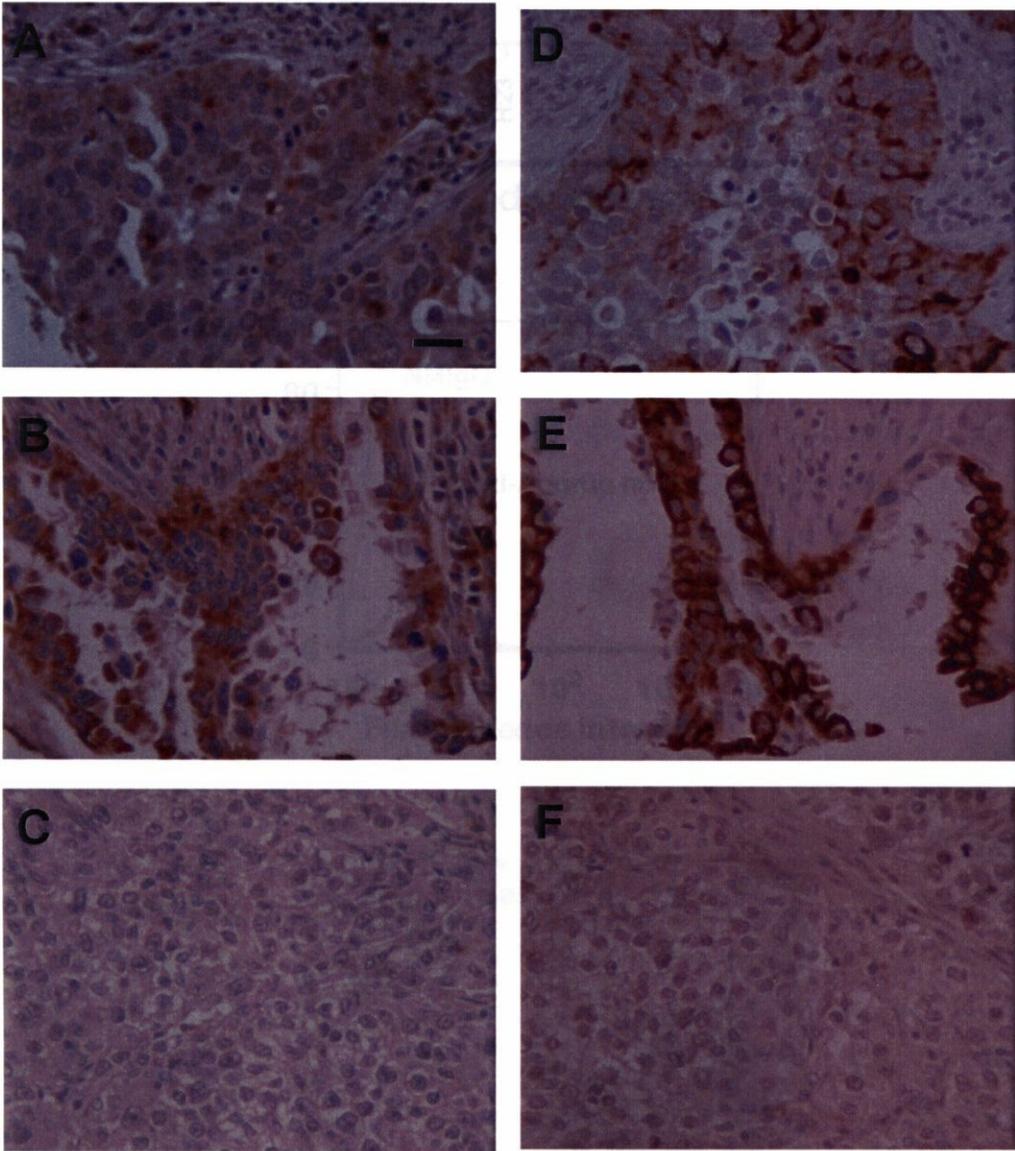


Fig. 20. Aggrus protein was expressed strongly in squamous cell carcinoma (SCC) of the lung. Immunostaining was done by TT679 (A, B, C) or BA17 (D, E, F) with a DAKO CSA System. Squamous cell carcinoma from patient 31 (A, D), squamous cell carcinoma from patient 42 (B, E) and adenocarcinoma from patient 35 (C, F). Bars, 10 μ m.

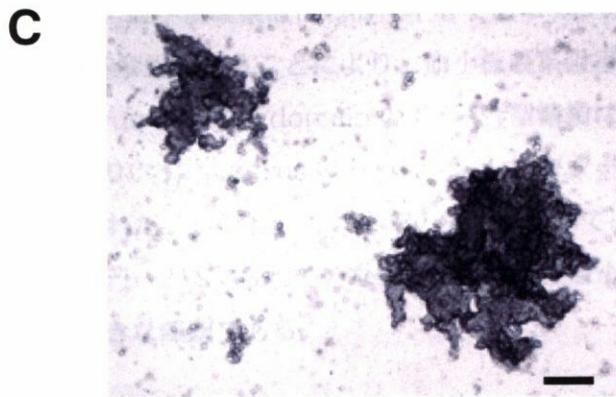
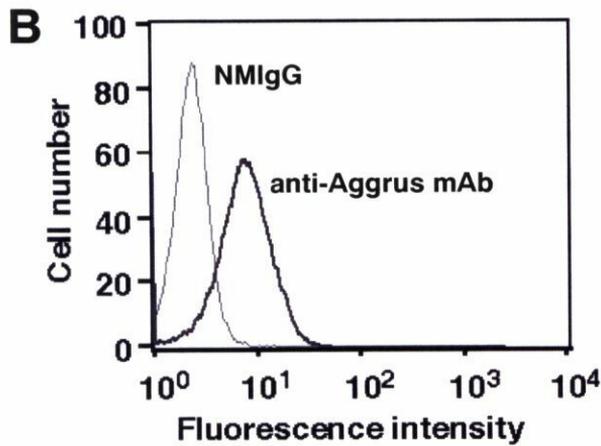
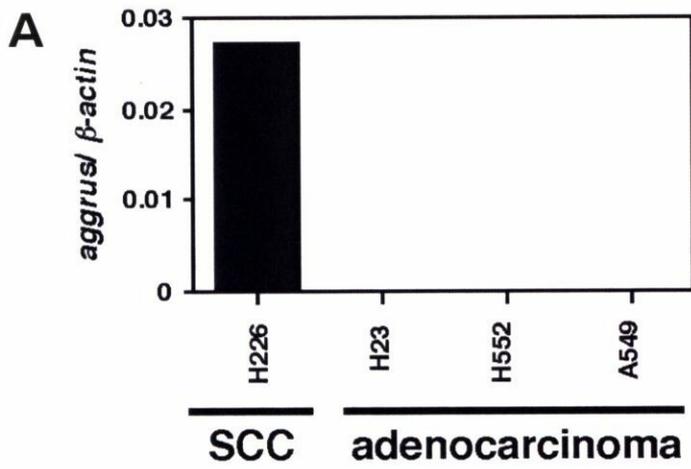


Fig. 21. Expression of *aggrus* in the SCC cell line. **A**, Quantitative analysis of *aggrus* transcripts in lung cancer cell lines by real-time PCR. *aggrus*/ β -actin; *aggrus* mRNA/ β -actin mRNA ratio. **B**, Detection of Aggrus protein in NCI-H226 cells by flow cytometry. Cells were treated with anti-Aggrus antibody or normal mouse IgG (NMIgG). **C**, Platelet-aggregating activity was estimated by incubating NCI-H226 cells with mouse PRP, and examined by light microscopy. Bars, 10 μ m.

総括

癌の血行性転移において、癌細胞と血小板の相互作用が重要な役割を果たしていることが知られているが、癌細胞上の血小板凝集因子は同定されていなかった。マウスの系では、Tsuruo らによって樹立された NL-17 細胞から Aggrus が発見され、その後多くの研究者によって、Aggrus がマウスの血小板凝集と転移に関わることが示されてきた。

本研究では、第 1 章にて、血小板凝集因子 Aggrus のクローニングに成功し、Aggrus が血漿成分非存在下で血小板凝集を引き起こすことを示した。さらに、Aggrus の血小板凝集活性の活性中心である PLAG domain を同定した。第 2 章では、様々なヒト腫瘍での Aggrus の発現を調べたところ、大腸癌、精巣腫瘍にて Aggrus が高発現していることがわかった。精巣腫瘍における Aggrus の発現を組織型別に調べたところ、セミノーマに特異的に発現しており、セミノーマのマーカーとしての可能性が示された。さらに、肺癌における Aggrus の発現を組織型別に調べたところ、扁平上皮癌に特異的に発現しており、扁平上皮癌細胞株に発現している Aggrus は血小板凝集活性を持つことを示した。これらの結果より、ヒト Aggrus もヒトの癌細胞による血小板凝集反応に、さらには癌の血行性転移に重要な役割を果たしていることが示唆された。

今後は、これらの腫瘍において、血清中から Aggrus を検出する系を確立し、腫瘍マーカーとして開発するとともに、癌の分子標的療法のターゲットとして、治療に役立てていきたいと考えている。さらに、血小板凝集活性の活性中心である PLAG domain に付加されている O-結合型糖鎖の構造解析を行うことにより、血小板凝集阻害剤の開発への糸口となるものと思われる。Aggrus の PLAG domain の O-結合型糖鎖にはシアル酸が付加していることが示唆されており(33)、Aggrus の血小板上のレセプターとして P-selectin や Siglec が候補として考えられた。しかし、これまでの実験において、これらの候補分子が Aggrus に結合するというデータは得られていない。Aggrus の血小板上のレセプターを探索することも、今後の大きな課題である。

参考文献

1. Honn, K. V., Tang, D. G., and Crissman, J. D. Platelets and cancer metastasis: a causal relationship?, *Cancer Metastasis Rev.* *11*: 325-351., 1992.
2. Tsuruo, T., Yamori, T., Naganuma, K., Tsukagoshi, S., and Sakurai, Y. Characterization of metastatic clones derived from a metastatic variant of mouse colon adenocarcinoma 26, *Cancer Res.* *43*: 5437-5442, 1983.
3. Watanabe, M., Okochi, E., Sugimoto, Y., and Tsuruo, T. Identification of a platelet-aggregating factor of murine colon adenocarcinoma 26: Mr 44,000 membrane protein as determined by monoclonal antibodies, *Cancer Res.* *48*: 6411-6416, 1988.
4. Sugimoto, Y., Watanabe, M., Oh-hara, T., Sato, S., Isoe, T., and Tsuruo, T. Suppression of experimental lung colonization of a metastatic variant of murine colon adenocarcinoma 26 by a monoclonal antibody 8F11 inhibiting tumor cell-induced platelet aggregation., *Cancer Res.* *51*: 921-925, 1991.
5. Toyoshima, M., Nakajima, M., Yamori, T., and Tsuruo, T. Purification and characterization of the platelet-aggregating sialoglycoprotein gp44 expressed by highly metastatic variant cells of mouse colon adenocarcinoma 26, *Cancer Res.* *55*: 767-773, 1995.
6. Nose, K., Saito, H., and Kuroki, T. Isolation of a gene sequence induced later by tumor-promoting 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in mouse osteoblastic cells (MC3T3-E1) and expressed constitutively in ras-transformed cells, *Cell Growth Differ.* *1*: 511-518, 1990.
7. Farr, A. G., Berry, M. L., Kim, A., Nelson, A. J., Welch, M. P., and Aruffo, A. Characterization and cloning of a novel glycoprotein expressed by stromal cells in T-dependent areas of peripheral lymphoid tissues, *J. Exp. Med.* *176*: 1477-1482, 1992.
8. Wetterwald, A., Hoffstetter, W., Cecchini, M. G., Lanske, B., Wagner, C., Fleisch, H., and Atkinson, M. Characterization and cloning of the E11 antigen, a marker expressed by rat osteoblasts and osteocytes, *Bone.* *18*: 125-132, 1996.
9. Williams, M. C., Cao, Y., Hinds, A., Rishi, A. K., and Wetterwald, A. T1 alpha protein is developmentally regulated and expressed by alveolar type I cells, choroid plexus, and ciliary epithelia of adult rats, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* *14*: 577-585, 1996.
10. Breiteneder-Geleff, S., Matsui, K., Soleiman, A., Meraner, P., Poczewski, H., Kalt, R., Schaffner, G., and Kerjaschki, D. Podoplanin, novel 43-kd membrane protein of glomerular epithelial cells, is down-regulated in puromycin nephrosis, *Am. J. Pathol.* *151*: 1141-1152, 1997.

11. Zimmer, G., Lottspeich, F., Maisner, A., Klenk, H. D., and Herrler, G. Molecular characterization of gp40, a mucin-type glycoprotein from the apical plasma membrane of Madin-Darby canine kidney cells (type I), *Biochem. J.* *326*: 99-108, 1997.
12. Zimmer, G., Oeffner, F., Von Messling, V., Tschernig, T., Groness, H. J., Klenk, H. D., and Herrler, G. Cloning and characterization of gp36, a human mucin-type glycoprotein preferentially expressed in vascular endothelium, *Biochem. J.* *341*: 277-284, 1999.
13. Boucherot, A., Schreiber, R., Pavenstadt, H., and Kunzelmann, K. Cloning and expression of the mouse glomerular podoplanin homologue gp38P, *Nephrol. Dial. Transplant.* *17*: 978-984, 2002.
14. Ramirez, M. I., Millien, G., Hinds, A., Cao, Y., Seldin, D. C., and Williams, M. C. T1alpha, a lung type I cell differentiation gene, is required for normal lung cell proliferation and alveolus formation at birth, *Dev. Biol.* *256*: 61-72, 2003.
15. Schacht, V., Ramirez, M. I., Hong, Y. K., Hirakawa, S., Feng, D., Harvey, N., Williams, M., Dvorak, A. M., Dvorak, H. F., Oliver, G., and Detmar, M. T1alpha/podoplanin deficiency disrupts normal lymphatic vasculature formation and causes lymphedema, *Embo J.* *22*: 3546-3556., 2003.
16. Chen, J., Chen, Z., Narasaraju, T., Jin, N., and Liu, L. Isolation of highly pure alveolar epithelial type I and type II cells from rat lungs, *Lab Invest.* *84*: 727-735., 2004.
17. Kerjaschki, D., Regele, H. M., Moosberger, I., Nagy-Bojarski, K., Watschinger, B., Soleiman, A., Birner, P., Krieger, S., Hovorka, A., Silberhumer, G., Laakkonen, P., Petrova, T., Langer, B., and Raab, I. Lymphatic neoangiogenesis in human kidney transplants is associated with immunologically active lymphocytic infiltrates, *J Am Soc Nephrol.* *15*: 603-612., 2004.
18. Schmid, H., Henger, A., Cohen, C. D., Frach, K., Grone, H. J., Schlondorff, D., and Kretzler, M. Gene expression profiles of podocyte-associated molecules as diagnostic markers in acquired proteinuric diseases, *J Am Soc Nephrol.* *14*: 2958-2966., 2003.
19. Valencak, J., Heere-Ress, E., Kopp, T., Schoppmann, S. F., Kittler, H., and Pehamberger, H. Selective immunohistochemical staining shows significant prognostic influence of lymphatic and blood vessels in patients with malignant melanoma, *Eur J Cancer.* *40*: 358-364., 2004.
20. Kato, Y., Fujita, N., Kunita, A., Sato, S., Kaneko, M., Osawa, M., and Tsuruo, T. Molecular identification of Aggrus/T1alpha as a platelet aggregation-inducing factor expressed in colorectal tumors, *J. Biol. Chem.* *278*: 51599-51605, 2003.

21. Ma, T., Yang, B., Matthay, M. A., and Verkman, A. S. Evidence against a role of mouse, rat, and two cloned human t1alpha isoforms as a water channel or a regulator of aquaporin-type water channels, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 19: 143-149, 1998.
22. Watanabe, M., Sugimoto, Y., and Tsuruo, T. Expression of a Mr 41,000 glycoprotein associated with thrombin-independent platelet aggregation in high metastatic variants of murine B16 melanoma, *Cancer Res.* 50: 6657-6662, 1990.
23. Kawai, K., Sasaki, T., Saijo-Kurita, K., Akaza, H., Koiso, K., and Ohno, T. Additive effects of antitumor drugs and lymphokine-activated killer cell cytotoxic activity in tumor cell killing determined by lactate-dehydrogenase-release assay, *Cancer Immunol. Immunother.* 35: 225-229, 1992.
24. Tsuruta, N., Yatsunami, J., Takayama, K., Nakanishi, Y., Ichinose, Y., and Hara, N. Granulocyte-macrophage-colony stimulating factor stimulates tumor invasiveness in squamous cell lung carcinoma, *Cancer.* 82: 2173-2183, 1998.
25. Yamori, T., Matsunaga, A., Sato, S., Yamazaki, K., Komi, A., Ishizu, K., Mita, I., Edatsugi, H., Matsuba, Y., Takezawa, K., Nakanishi, O., Kohno, H., Nakajima, Y., Komatsu, H., Andoh, T., and Tsuruo, T. Potent antitumor activity of MS-247, a novel DNA minor groove binder, evaluated by an in vitro and in vivo human cancer cell line panel, *Cancer Res.* 59: 4042-4049, 1999.
26. Nakashio, A., Fujita, N., Rokudai, S., Sato, S., and Tsuruo, T. Prevention of phosphatidylinositol 3'-kinase-Akt survival signaling pathway during topotecan-induced apoptosis, *Cancer Res.* 60: 5303-5309, 2000.
27. Travis, W. D., Travis, L. B., and Devesa, S. S. Lung cancer, *Cancer.* 75: 191-202, 1995.
28. Body, J. J., Sculier, J. P., Raymakers, N., Paesmans, M., Ravez, P., Libert, P., Richez, M., Dabouis, G., Lacroix, H., and Bureau, G. Evaluation of squamous cell carcinoma antigen as a new marker for lung cancer, *Cancer.* 65: 1552-1556, 1990.
29. Rastel, D., Ramaioli, A., Cornillie, F., and Thirion, B. CYFRA 21-1, a sensitive and specific new tumour marker for squamous cell lung cancer. Report of the first European multicentre evaluation. CYFRA 21-1 Multicentre Study Group, *Eur. J. Cancer.* 30A: 601-606, 1994.
30. Adami, H. O., Bergstrom, R., Mohner, M., Zatonski, W., Storm, H., Ekblom, A., Tretli, S., Teppo, L., Ziegler, H., Rahu, M., Gurevicius, R., and Stengrevics, A. Testicular cancer in nine northern European countries, *Int. J. Cancer.* 59: 33-38, 1994.
31. Moller, H. Clues to the aetiology of testicular germ cell tumours from descriptive epidemiology, *Eur. Urol.* 23: 8-13, 1993.

32. Kato, Y., Sasagawa, I., Kaneko, M., Osawa, M. , Fujita, N., and Tsuruo, T. Aggrus: A diagnostic marker that distinguishes seminoma from embryonal carcinoma in testicular germ cell tumors, *Oncogene*, in press, 2004.
33. Kaneko, M., Kato, Y., Kunita, A., Fujita, N., Tsuruo, T., and Osawa, M. Functional sialylated *O*-glycan to platelet aggregation on Aggrus (T1alpha/podoplanin) molecules expressed in CHO cells, *J. Biol. Chem.*, in press, 2004.

謝辞

本研究は、山形大学医学部法医学講座において、大澤資樹教授の御指導のもとで行わせて頂きました。大澤先生には、自由な研究の環境を与えて頂き、また、常にあたたかい御配慮をもって御支援頂きました。心より厚く御礼申し上げます。また、このような貴重な研究の機会を与えて下さいました、東京大学分子細胞生物学研究所の鶴尾隆教授には、研究に対する基本姿勢や研究方針などの研究全般について、御指示、御助言を頂き、深謝致します。

本研究を行うにあたり、修士課程の頃より直接御指導頂きました、東京大学分子細胞生物学研究所の藤田直也先生には、実験手技、論文作製など多岐にわたり、懇切丁寧に教えて頂き、心より感謝致します。同研究室の国田朱子さんには、共同研究者として大変お世話になり、深く感謝致します。

実験を進める上で多くの有益な御指導、御助言を頂きました山形大学医学部法医学講座の金子美華先生に深く感謝致します。同研究室の久合田伸子さんには、温かい多くの御助力を頂き心より感謝致します。

また、泌尿器科の笹川五十次先生、山形大学第一内科の佐田誠先生には、臨床研究に関する貴重な御助言を頂き、深く感謝致します。

最後に、多くの御支援を下さいましたすべての皆様と、医学部での生活を支えて下さいました両親に深く感謝申し上げます。