

悪性グリオーマ細胞におけるヘパリン結合性
epidermal growth factor (EGF) family タンパクの発現と機能解析

三 島 一 彦

悪性グリオーマ細胞におけるヘパリン結合性epidermal growth factor (EGF) family タンパクの発現と機能解析

三島一彦

(1) 研究の背景

悪性グリオーマは、血管に富み、急速でしかも浸潤性に発育する腫瘍で、脳実質内発生腫瘍の中でも非常に予後が不良なものである(Burger et al., 1985, Russell et al., 1989)。中枢神経系以外の腫瘍細胞と同様に、悪性グリオーマ細胞においても、腫瘍細胞は、増殖因子あるいは血管新生因子を産生している。それら因子は、腫瘍細胞や腫瘍内の血管内皮細胞に発現している対応するレセプターを介して、オートクラインあるいはパラクラインループを形成して、腫瘍細胞の増殖や、血管新生を伴う腫瘍増大、さらには腫瘍の悪性化に働いていると考えられている(Weiner 1995)。中でも、epidermal growth factor receptor (EGFR)の発現亢進、及び質的な変化がグリオーマ細胞の悪性化と密接に関係していることが知られている。すなわち、悪性度の高いグリオーマほどEGFR mRNAの過剰発現を示すものが多く、最も悪性であるグリオブラストーマでは、約40%にEGFR遺伝子の増幅を伴ったEGFR mRNAの過剰発現が認められている。また、EGFRタンパクに関しては、57-100%に高発現しているとの報告もあり、この高発現にはEGFR遺伝子の増幅を必ずしも伴わないとされている(Libermann et al., 1985, Wong et al., 1992, Jaros et al., 1992, Schlegel et al., 1994, Weiner et al., 1995)。このようなことから、悪性グリオーマ細胞ではEGF/EGFRシステムを介するシグナル伝達機構が、腫瘍細胞の増殖、悪性化に重要な役割を果たしていると考えられる。

一方、これまでにEGFRを活性化するリガンドに関しては、EGFファミリーに属するtransforming growth factor α (TGF α)がグリオーマ細胞で産生されており、増殖や悪性化に関与しているとの報告がなされてきた(Nister et al., 1989, Schlegel et al., 1990, Maxwell et al., 1991)。しかし近年、TGF α 以外にも、構造的にEGFファミリーに属し、EGFRを介してシグナルを伝達できる増殖因子として、amphiregulin (AR) (Plowman et al., 1990)、heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF) (Higashiyama et al., 1991)、betacellulin (Shing et al., 1993)、schwannoma-derived growth factor (SDGF) (Kimura et

al.,1990)等が存在することがわかってきた。

実際、TGF α を発現していないグリオーマ細胞株、悪性グリオーマ組織が存在することからも(Maxwell et al., 1991. Abe et al., 1993)、TGF α 以外にもEGFRのリガンドとして機能するEGFファミリーの増殖因子が悪性グリオーマ細胞で発現している可能性が十分に考えられる。

本研究に先立ち私は、EGFファミリーに属する増殖因子の中で、ヘパリンに結合性を有するSDGFが、EGFRと共にラットのグリア型腫瘍細胞で高発現していることを見いだした。さらにSDGFに対するアンチセンスRNAをラットグリオーマ細胞に発現させると、その増殖能、造腫瘍性が抑制されることから、SDGFがオートクライン増殖因子としてラットグリオーマ細胞の増殖に深く関与していることを報告した(Mishima et al., 1996)。ところが、構造的にSDGFのhuman counterpartと考えられている amphiregulin (AR) の発現をヒトグリオーマ細胞株7種で検討したところ、1種(SF763)を除き、AR mRNAを検出することができなかった。さらに、ヒト悪性グリオーマ組織11例においてもAR mRNAの発現を検出することができなかった。これらの結果から、ヒトではAR以外のヘパリン結合性EGFファミリータンパクが、グリオーマの増殖、造腫瘍性に関与していると考えられた。そこで本研究において、ヘパリン結合性EGFファミリーのもう一つの代表的な因子であるHB-EGFのヒト悪性グリオーマにおける発現を検索し、その機能についての解析を行った。

HB-EGFは、マクロファージ細胞であるU-937細胞の培養濾液から、血管平滑筋細胞に対する増殖活性を指標に液性因子として分離、精製された(Higashiyama et al., 1991)。HB-EGF cDNAがクローニングされ、その構造解析が行われた結果、HB-EGFはN末端側を細胞外に、C末端側を細胞内にもつ膜1回貫通型の膜結合タンパク(membrane anchored proHB-EGF)であることがわかった。さらに、この膜結合型 proHB-EGFは、細胞外部分がプロセッシングを受け、分泌型のタンパクとなることが判明した(Higashiyama et al., 1992) (Fig.1)。

HB-EGFの細胞外部分には、EGFモチーフが存在し、他のEGFファミリーに属する

増殖因子であるEGFやTGF α と同様に、EGFRと結合し、それを活性化して増殖刺激を伝える(Higashiyama et al., 1992. Thompson et al., 1994)。

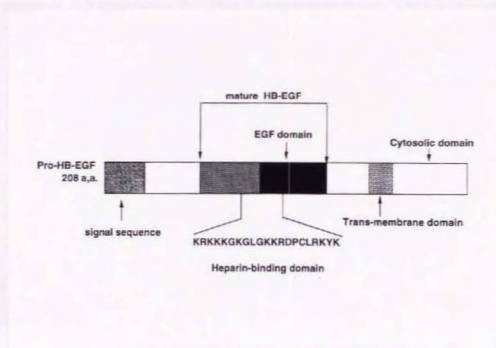


Fig.1 Structure of HB-EGF

分泌型のHB-EGFは、平滑筋細胞、ケラチノサイト、肝細胞に対して増殖活性を示すことが報告されている(Higashiyama et al., 1991. 1993. Hashimoto et al., 1994. Ito et al., 1994)。さらに、平滑筋細胞に対しては、遊走因子としても働くことが示され、この細胞に対するHB-EGFの増殖活性、遊走因子としての活性は、他のEGFファミリーに属すEGF、TGF α に比較して、数十倍強いことがわかっている(Higashiyama et al., 1993)。HB-EGFのこれらの生物活性は、他のEGFファミリータンパクではみられないことから、HB-EGFのもつ強い生物活性は、細胞表面に発現しているヘパラン硫酸プロテオグリカンへのHB-EGFの結合とEGFRへの結合によって形成されるヘテロリマー形成によるものと考えられている(Higashiyama et al., 1993)。

膜結合型細胞増殖因子による細胞間でのシグナル伝達様式は、分泌された液性の

増殖因子によるシグナル伝達様式であるバラクラインに対し、ジャクスタクラインと呼ばれている(Brachmann et al., 1989)。このジャクスタクラインによるシグナル伝達は同じ受容体をもった細胞の中から、隣接した標的細胞にのみシグナルを送りうるという利点をもっている。最近、膜結合型のproHB-EGFは、分泌型の前駆体として存在するだけでなく、それ自身が膜結合型増殖因子としてジャクスタクラインに働き、近接する細胞のEGFRを活性化し、増殖刺激を伝えることができるということが示された(Higashiyama et al., 1995)。さらに、膜結合型のproHB-EGFはジフテリア毒素の受容体としても機能していることが示され、多機能をもつユニークな分子であることがわかってきた(Iwamoto et al., 1994)。

本研究では、このように他のEGFファミリーに属するタンパクとは生物活性や機能が異なるHB-EGFについて、悪性ヒトグリオーマ細胞及び、悪性グリオーマ組織における発現を検討し、その機能解析を行った。

(2)材料、及び研究方法

細胞株及び脳腫瘍組織標本

悪性ヒトグリオーマ細胞株として樹立されている、U87MG, U251MG, U343MG, SF126, SF188, SF763, T98Gの7種を使用した。これらの細胞は、10% fetal bovine serum (FBS), glutamine 300 µg/ml, 0.14 % NaHCO₃, Penicillin G 100 units/ml, Streptomycine 60 µg/mlを加えたDulbecco's modified Eagle minimal essential medium (DMEM)にて37℃、95%空気、5%CO₂、湿度100%の条件下で培養を行った。脳腫瘍組織標本はglioblastoma 11例、大型深部腫瘍摘出に際し、腫瘍への到達のため手術中に切除された非腫瘍部脳 2例の計13例を使用した。これらの標本は手術で摘出後、直ちに液体窒素により凍結し、使用直前まで-70℃で保存した。

HB-EGF cDNAの合成

東山らの報告したHB-EGF cDNA配列 (Higashiyama et al., 1991)に従い、以下の primer setを用いて、reverse transcription (RT)-polymerase chain reaction (PCR)法にて594bpのHB-EGF cDNAを得た。

すなわち、primer は、sense primer: 5'-AGGCTCGGACCATGAAGC-3'(20-37)及び、antisense primer: 5'-TTCAAGTCATAACCTCTCT-3'(596-613)を使用し、codon 20から613までの領域を増幅した。精製されたPCR産物をphagemid vector pTZ19Rにsubcloningし、competent cell: JM109に感染させ、増幅し、DNAを抽出後、dideoxy法で塩基配列を決定して目的の産物であることを確認した。このように作成したHB-EGF cDNAは以下のNorthern hybridizationで使用した。また、amphiregulin cDNA probeは大阪大学生化学教室の東山繁樹先生より供与を受けた。

1. Northern blot によるHB-EGF mRNA発現の解析

各種培養細胞から約 1×10^7 個のsubconfluentな状態の細胞と、約1gの腫瘍組織標本からacid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform method (AGPC)法によりtotal RNAを調製した。20 μ g/laneのRNAを1% agarose-1.6M formaldehyde gelに電気泳動後、nylon membrane (Biodine B)上にtransferした。 32 P-dCTP存在下でrandom priming法で標識したHB-EGF cDNA probe、或いはamphiregulin cDNA probeを用いて、prehybridization buffer中で、4時間、42℃でprehybridization後、hybridization buffer中で、16時間、42℃でhybridizationを行った。washingは、2xSSC (1xSSC: 150mMNaCl, 15mM sodium acetate(pH7.0)), 0.1%SDSで65℃で30分、0.1xSSC, 0.1%SDSで65℃で30分洗い、高感度X線film及び増感紙を使用し、-70℃にてautoradiographyを施行した。同じmembraneをglyceraldehyde phosphate dehydrogenase (GAPDH)のprobeと同様の条件でhybridizationを行い、loadingしたRNA量の指標として、発現量をphosphoimagerで比較した。

2. Western blotによるHB-EGF タンパクの解析

細胞表面タンパクのビオチン化、免疫沈降はColeら(1987)の方法を用いた。U251MG, U343MG, T98Gグリオーマ細胞をそれぞれ 1×10^6 個ずつ100mm dishに撒き、10% FBS, DMEMで12時間培養した後、cold Hanks bufferで3回洗浄した後、0.1mg/mlのsulfo-NHS-biotin sulfosuccimidobiotin (Pierce Chemical Co., Rockford, IL)を50mM Hepes, pH7.5, 0.15M NaClに溶解し氷上で30分incubateし、10% FBS, DMEMで洗浄した。細胞をlysis buffer (1% Triton X-100, 3mM EDTA, 1mM p-amidino phenylmethylsulfonyl fluoride, 5 μ M 3,4-dichloroisocoumarin, 10 μ g/ml Aprotinin, 0.4M NaClを含む20mM Hepes, pH 7.2)で溶解後、17,000gで15分遠心し、上清を10 μ gの抗HB-EGF抗体 (rabbit anti HB-EGF antibody: H1) と2時間4℃でincubateし、10 μ lのprotein

A Trisacryl (50% suspension) (Pierce, Rochford, Co) と2時間4℃で免疫沈降後、sample buffer (62.5mM Tris-HCl (pH6.8), 2% SDS, 10% glycerol, 5% 2-mercaptoethanol) に溶解し、15% SDS-PAGEで180mAで3時間電気泳動し、ニトロセルロース膜にtransferした。membrane を5%スキムミルクでブロッキングし、avidin-conjugated horseradish peroxidase (HRP) (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA) と室温30分間incubateし、ECL kit (Amersham)を用いて、X-OMAT フィルム (Kodak) にexposeした。

尚、ここで用いた抗HB-EGF抗体は、大阪大学医学部 生化学教室の東山繁樹博士より供与を受けたものであり、すでにproHB-EGF細胞内ドメインに対する抗体で、膜結合型proHB-EGFと特異的に反応することが報告されている(Higashiyama et al., 1995, Nakagawa et al., 1996)。

3. 免疫組織染色によるHB-EGF、EGFRの発現

手術時に摘出した標本を10%ホルマリン液、或いは、メタノール液中で一晩固定後パラフィン包埋し、4 μ m薄切切片を作成した。切片を脱パラフィン後、ホルマリン固定標本に関しては、Nortonらの方法(1994)で、抗原の賦活化を行い、0.3% H₂O₂メタノール溶液中で30分、内因性ペルオキシダーゼを不活化し、10%正常馬血清、或いは10%正常ヤギ血清で30分ブロッキングの後、一次抗体としてHB-EGFには、抗HB-EGFウサギポリクロナル抗体(H1抗体)、EGFRに対しては、抗EGFRマウスモノクロナル抗体(Novocastera社)と4℃で16時間反応させた。続いて二次抗体としてビオチン標識ヤギ抗ウサギimmunoglobulin、或いはビオチン標識抗マウスimmunoglobulinを1:1000に希釈し1時間室温で反応させ、さらにavidin-biotin-peroxidase 複合液(ABC kit, Vector, USA)と30分室温で反応させた。diaminobenzidine (DAB) H₂O₂を加えた0.05M Tris-HCl緩衝液(pH7.6) 中にて発色後、ヘマトキシリンにて核染色を行った。陽性コントロールとしてはすでにHB-EGF発現が過剰発現していることが知られている肝癌を用た。コントロールとして正常マウスIgG、或いは正常ウサギ血清

(preimmune serum)を用い対照とした。

ここで用いた抗HB-EGF抗体(H1)は、膜結合型proHB-EGFと特異的に反応することがすでに示されている(Nakagawa et al., 1996)。

4. ジフテリア毒素感受性の解析

ジフテリア毒素感受性は毒素によるタンパク合成阻害能で検討した(Mitamura et al., 1995)。グリオーマ細胞を 4×10^4 個ずつ24-well plateに撒き12時間培養後、ジフテリア毒素を $0-1 \mu\text{g/ml}$ の濃度で添加し90分培養後、培養液をleucine-free DMEMに換え $100 \mu\text{Ci/ml}$ の $[^3\text{H}]$ ロイシンを $10 \mu\text{l}$ 加え、1時間培養した。培養液を捨てPBSで洗浄後、細胞を 1ml の 0.1N NaOHで溶解し、これに20%トリクロロ酢酸溶液(TCA)を 0.5ml 加え、生じた沈殿をWhatman GF/Cでトラップし、さらにフィルターを5%TCAで洗浄、100%エタノールで洗浄し風乾後、シンチレーションカウンターで測定した。ジフテリア毒素を加えなかった試料の値を100%として、毒素を加えたときのタンパク合成能を算出した。

5. 細胞増殖、DNA合成能の解析

a) 細胞増殖能

U251MG, U343MG, T98Gグリオーマ細胞をそれぞれ、6-well dishに 4×10^4 個ずつ撒き、10% FBS, DMEMで12時間培養した後、phosphate buffer saline (PBS)で洗浄し、mediumを血清を除去したDMEMに換え、recombinant HB-EGF (rHB-EGF) (Hashimoto et al., 1994)を各濃度で添加し、24時間ごとに培養液を新しいものに換え、72時間培養した後、生存細胞数をカウントした。結果は、rHB-EGF未処理にて増殖した細胞数に対する増加比で表示した。

b) 抗HB-EGF中和抗体の効果

上記と同様に培養した細胞に抗HB-EGF中和抗体 (goat anti HB-EGF polyclonal antibody:197)、あるいはコントロールとしてnormal goat IgGをそれぞれ45 μ g/mlずつ添加し、24時間ごとに培養液を新たなものに換え72時間培養した後、生存細胞数をカウントした。結果は、抗体未処理の細胞数を基準(100%)として算出した。ここで用いた中和抗体は、TGF α 、EGF、amphiregulin等の他のEGFファミリータンパクに対する中和活性がなく、HB-EGFに特異的であることがすでに報告されているものである (Hashimoto et al., 1994)。

c) DNA合成能

U251MG, U343MG, T98Gグリオーマ細胞をそれぞれ、24-well dishに 2×10^4 個ずつ撒き、10% FCS, DMEMで12時間培養した後、0.5%FBS, DMEMに培養液を換え、10 ng/mlになるようrHB-EGF、EGF、basic FGFあるいは5%になるようFCSをそれぞれ加え16時間培養したのち、 $[^3\text{H}]$ -thymidine 0.3 μ Ci/well 加えさらに2時間培養した。培養液を除き、0.5mlの5%TCAを加え、4 $^{\circ}$ Cで20分incubateし、TCAを除き、1M NaOHを加え37 $^{\circ}$ Cで20分、1M HClを250 μ l加えscintillation vialに移し、3 mlのAquasol 2を加え攪拌後、液体シンチレーションカウンターで測定した。なおバックグラウンドは0.5%FCSで培養した細胞で測定し、実測値より差し引いた。結果は、5%血清でそれぞれの細胞を刺激したときに得られたDNA合成能を100%として算出した。

6. 各種増殖因子がHB-EGF mRNA発現に与える影響

T98Gグリオーマ細胞をそれぞれ 5×10^6 ずつ100mm dishに培養し、12時間後に無血清DMEMに培地を変換し、24時間培養した後、rHB-EGF、EGF、TGF α 、bFGF、IGF-I、TGF β をそれぞれ10ng/mlで加え各時間培養後、total RNAを調製した。Northern blotは

前述と同様の方法で行った。プローブは、 ^{32}P -dCTP存在下にrandom priming法で標識したHB-EGF cDNAを用いた。EGF、TGF α 、bFGF、IGF-I、TGF β は、Upstate Biotechnology Incorporated より入手した。

7. rHB-EGFがVEGF mRNA 発現に与える影響

a) VEGF mRNAの経時的变化

U251MG, U343MG, T98Gグリオーマ細胞をそれぞれ 5×10^6 ずつ100mm dishに培養し、12時間後に無血清DMEMに培地を変換し、24時間培養した後rHB-EGFを10ng/mlで加え、各時間培養後にtotal RNAを調製した。

b) VEGF mRNA誘導におけるHB-EGFの濃度依存性

T98Gグリオーマ細胞を、 5×10^6 ずつ100mm dishに培養し、12時間後に無血清DMEMに培地を変換し、24時間培養した後rHB-EGFを各濃度で加え、3時間培養後にtotal RNAを調製した。

Northern blotは前述と同様の方法で行った。 ^{32}P -dCTP存在下でrandom priming法で標識したVEGF cDNA probeを用いてhybridizationを行った。ここで使用したVEGF cDNA probeは国立ガンセンター研究所 分子腫瘍部の高橋 敦先生より供与を受けた (Takahashi et al., 1994)。

c) HB-EGFがVEGF タンパク分泌に与える影響

U251 MG, U343MG, T98Gグリオーマ細胞をそれぞれ 5×10^6 ずつ100mm dishに培養し、12時間後、無血清DMEMに培地を変換し24時間培養した後、新しい無血清培地に換えると共に10ng/mlのrHB-EGFを加えたものと、無添加をそれぞれ24時間培養した。培養液を集め、phenylmethylsulfonyl (PMSF) 50mMを加えCentricon-10 microconcentrator

(Amicon, Bererly, MA)で60倍に濃縮した。サンプルは培養後の生細胞数でnormalizeし、15% SDS-PAGEで電気泳動後、Western blottingを行った。一時抗体としては抗VEGF抗体 (Oncogene Science, Inc.)を用いた。

(3)結果

1. 悪性グリオーマ細胞、組織におけるHB-EGF mRNAの発現

HB-EGF cDNAをプローブとしたNorthern blot解析の結果をFig.1に示す。7種類いずれの悪性ヒトグリオーマ細胞株においても、2.5kb, 1.5kb, 1kbのサイズのHB-EGF mRNAの発現が認められた(Fig. 2 (a))。このHB-EGF mRNAはこれまでにその発現が報告されているマクロファージと同様のサイズであった(Higashiyama et al., 1991)。特に、HB-EGF遺伝子の主転写産物である2.5kb mRNAは、U87MG, SF763, T98Gにおいて、U251MG, SF126, SF188におけるより高い発現を示した。一方、1.4 kbのAR mRNAの発現は、SF763細胞で認めるのみであった。

次に、ヒト悪性グリオーマ組織におけるHB-EGF mRNAの発現を検討した。悪性グリオーマ(glioblastoma)では正常脳に比較し、2倍から5倍のHB-EGF mRNAの発現を認めた(Fig. 2 (b))。一方、AR mRNAは正常脳、腫瘍組織のいずれにおいても検出できなかった。

2. 悪性グリオーマ細胞におけるHB-EGF タンパクの発現

グリオーマ細胞(U251MG, U343MG, T98G)の細胞膜をビオチン化し、抗HB-EGF抗体を用いて免疫沈降した後、HB-EGFタンパクの発現をWestern blot法を用いて解析したところ、約30kDaの膜結合型proHB-EGFに相当するバンドが認められた(Fig. 3)。このサイズは、これまで報告されている膜結合型proHB-EGFに相当した(Iwamoto et al., 1994)。また、このバンドは、これまでにHB-EGFの発現がないことが示されているマウスL細胞では認められなかった。以上の結果より、グリオーマ細胞では、細胞表面に膜結合型proHB-EGFを発現していることが明らかとなった。

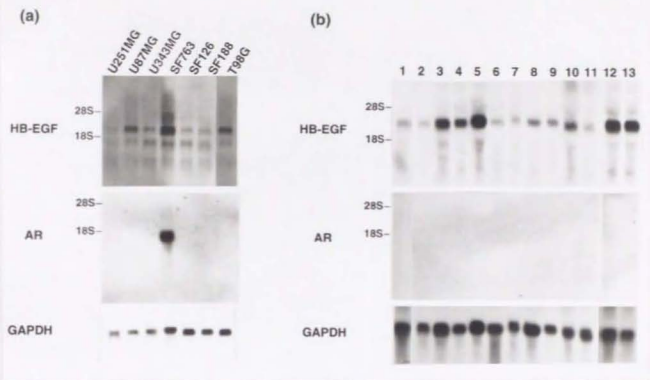


Fig.2 Northern blot analysis of human malignant gliomas.

(a) HB-EGF and amphiregulin (AR) mRNA expression in human malignant glioma cell lines. Total RNA was electrophoresed and transferred to nylon filters. The membranes were then hybridized with 32 P-labeled HB-EGF and AR cDNA probes. Filters were rehybridized with GAPDH cDNA probe to equivalent loading of samples. The positions of the 18S and 28S ribosomal RNA bands as size markers are shown.

(b) HB-EGF and AR mRNA expression in glioblastoma tissues. Lanes: 1, 2, control nonmalignant brain tissues; 3-13, glioblastomas.

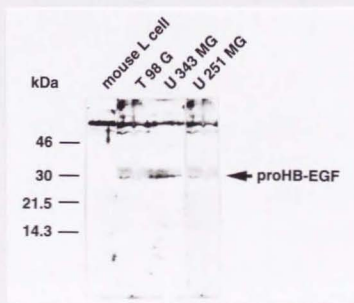
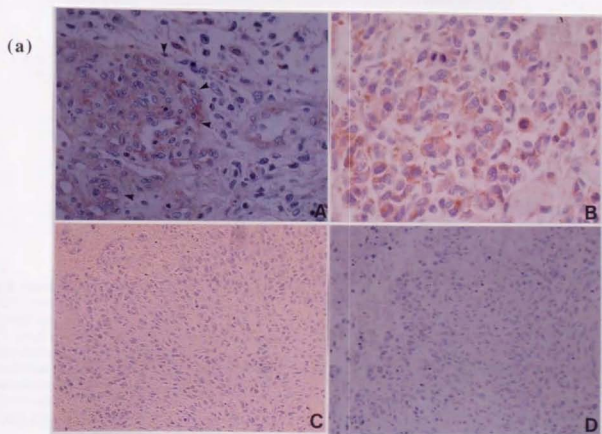


Fig. 3 Immunoprecipitation of HB-EGF.

Glioma cells were biotinylated, immunoprecipitated with anti-HB-EGF antibody H1, and after SDS-PAGE analyzed avidine-HRP.

3. グリオーマ組織におけるHB-EGFおよびEGFRの発現

悪性グリオーマ組織でのHB-EGFの発現を確認するために、HB-EGFのレセプターとして知られているEGFRの発現とを併せて、免疫組織化学染色法を用いて検討した。Fig.4にglioblastomaの代表染色例を示す。抗proHB-EGF抗体では腫瘍細胞の細胞質、及び一部の腫瘍細胞の細胞膜が染色された。また、血管増生の部位での血管内皮細胞及び、pericyteと思われる細胞が陽性像を示した(Fig.4 (a)A, (b)A 矢印)。抗EGFR抗体では、これまでの報告(Watanabe et al.,1996)と同様、腫瘍細胞の細胞膜と細胞質が染色され、血管内皮細胞は染色されなかった(Fig.4 (b)B 矢印)。Fig.4(a)は、EGFR陰性、proHB-EGF陽性を示した代表症例であり、Fig.4(b)はEGFR、proHB-EGF共に陽性であった代表症例である。検討し得た34例の悪性グリオーマ(anaplastic astrocytoma 9例、glioblastoma 25例)組織中、50%以上の腫瘍細胞が染色されたものを陽性としたとき、EGFRが陽性であったanaplastic astrocytoma 3例中の2例(66%)で、glioblastoma 13例では全例(100%)でproHB-EGFも陽性であった。また、EGFR陰性のanaplastic astrocytoma 2例、glioblastoma 4例においても、proHB-EGFは陽性であった。



(b)

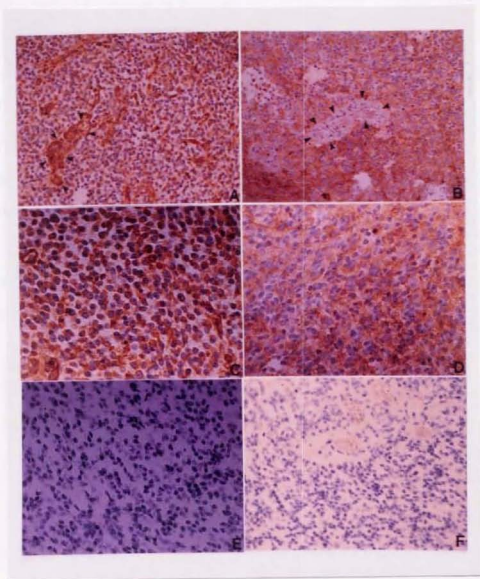


Fig.4 Immunohistochemical staining of proHB-EGF and EGFR in tissue sections from glioblastomas. (a) ProHB-EGF(A, B) was positive in neoplastic cells and vascular endothelial cells (arrowheads), but EGFR(C) immunoreactivity was absent. Negative control using preimmune sera in place of anti-proHB-EGF antibody (D). (A, B X400; C, D X200) (b) ProHB-EGF(A, C) immunoreactivity was evident in the cytoplasm of neoplastic cells and proliferating vascular endothelial cells (arrowheads). Strong staining of EGFR (B, D) in the cytoplasm and plasma membranes of neoplastic cells but no expression in the area of endothelial proliferation (arrowheads). Negative control using preimmune sera (E) or immunoglobulin isotype (F) in place of each primary antibody. (A, B X200; C-F X400)

4. ジフテリア毒素に対するグリオーマ細胞の感受性

これまでに膜結合型proHB-EGFは、ジフテリア毒素(DT)のreceptorとしても機能することが示されている(Iwamoto et al., 1994)。そこで、グリオーマ細胞で発現が確認された膜結合型proHB-EGFがDTのreceptorとしても機能し得るか、すなわちグリオーマ細胞がDTに対する感受性を示すかどうかを検討した。green monkeyの腎細胞であるVero細胞はDTに高感受性の細胞として知られている(Iwamoto et al. 1994)。この細胞に比較すればDT投与によるタンパク質合成阻害能は低いものの、グリオーマ細胞でも10ng/mlのDT投与によって、DT未投与のコントロール細胞でのタンパク質合成の約20%まで阻害されることがわかった(Fig. 5)。一方、proHB-EGFタンパクの発現を認めないマウスL細胞(Fig.3)では、DTによるタンパク質合成阻害は認められなかった。以上の結果は、proHB-EGFがDT receptorとしても機能するというこれまでの報告に矛盾しないものであった。

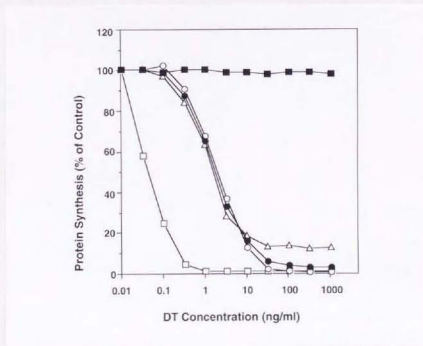


Fig. 5 DT sensitivity of human malignant glioma cells. The data are expressed as percent of protein synthesis compared with the control without toxin. The values represent the average of two independent experiments. The symbols used are Vero cells: □, T98G: ○, U343MG: △, U251MG: ●, mouse L cell: ■

5. HB-EGFのグリオーマ細胞に対する増殖活性の検討

HB-EGFは正常細胞では、bovine aortic smooth muscle cell、ヒトkeratinocyte、肝細胞、腫瘍細胞では肺癌、肝癌細胞でオートクライン増殖因子として機能していることが示されているが(Higashiyama et al., 1991, 1993, Hashimoto et al., 1994, Ito et al., 1994, Kobrin et al., 1994)、神経系腫瘍細胞でHB-EGFの増殖能を検討した報告はこれまでにない。上記の1-3の結果は、HB-EGFがオートクラインあるいはジャクスタクライン増殖因子として悪性グリオーマ細胞やその腫瘍組織において機能していることを示唆している。この点を確かめるために、血清除去下で培養した3種類のグリオーマ細胞に種々の濃度でrecombinant HB-EGF(rHB-EGF)を投与した。その結果、濃度依存的に細胞増殖増強効果が認められ、10ng/mlのrHB-EGF投与群では、未投与のコントロール群に比較し、細胞数が約2倍に増加することがわかった (Fig. 6 (a))。

次に、HB-EGFに対する中和抗体を加えると、コントロールのIgGを加えたものに比較し、30-40%の細胞増殖抑制が認められた (Fig. 6 (b))。

以上の結果より、HB-EGFはグリオーマ細胞に対して増殖活性を有し、オートクライン増殖因子として機能していることが明らかになった。

次に、これまでにグリオーマ細胞に対して増殖因子として働くことが示されているbFGF及びEGFの増殖活性をDNA合成能を指標にHB-EGFのそれと比較した。10ng/mlのrHB-EGFの投与はグリオーマ細胞に対し、5% FCS投与に比べると、約1.2-2.3倍程度のDNA合成能を促進することがわかった (Fig. 6 (c))。また、このDNA合成促進能は、10ng/mlのEGF、bFGFに比較すると、10-20%とわずかながら高い値であった。

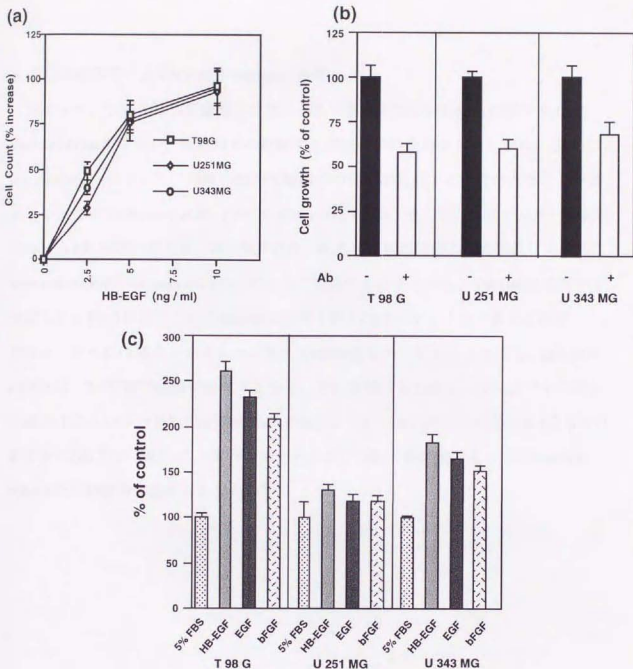


Fig.6 Effect of HB-EGF on the proliferation of human glioma cells.

(a) Effect of human rHB-EGF on glioma cell growth. The results are expressed as the percentage of cell number of HB-EGF treated culture compared to cell number of control culture without serum using the formula:

$$\frac{a-b}{b} \times 100$$

where a and b represent cell number in treated and control cells respectively. The cell number of control culture was 14.4×10^4 for T98G, 12.6×10^4 for U251MG and 10.4×10^4 for U343 MG respectively. Each value represent the mean \pm standard deviation of triplicate determinations.

(b) Growth inhibition of glioma cells by anti-HB-EGF-blocking antibody. The cell growth is expressed as a percentage of cell number of treated culture compared with control culture without serum (100%). The cell number of control culture was 14.0×10^4 for T98G, 13.3×10^4 for U251 MG and 11.2×10^4 for U343 MG respectively. Each value represent the mean \pm standard deviation of triplicate determinations.

(c) Effect of HB-EGF, EGF or bFGF on DNA synthesis of glioma cells. The rate of DNA synthesis of the cells cultured in the presence of 5% FBS was designated 100%. Each value represents the mean \pm standard deviation of triplicate samples.

These assays were repeated three times with similar results.

6. 各種増殖因子によるHB-EGF mRNAの誘導

TGF α や、TGF β 等の増殖因子では、それらを産生している細胞に投与すると、auto-inductionがかり、細胞内での対応する増殖因子の発現を亢進したり、さらにはcross-inductionによって、同族の他の増殖因子の発現を亢進する能力のあることが最近わかってきた(Barnard et al., 1994, Coffey et al., 1992)。そこで、悪性グリオーマ細胞におけるHB-EGFの発現が、HB-EGF自身、あるいは他の増殖因子の刺激により、auto-induction或いはcross-inductionによって亢進するかどうかを、T98G細胞を用いて検討した。Fig 7に示すごとくrHB-EGF投与や同じEGFファミリーに属するEGF、TGF α 、さらには他のファミリーに属するbFGF投与のいずれによっても、HB-EGF mRNAは、3-6時間で発現がピークとなり、それ以降はもとのレベルにまですみやかに減少するという一過性の発現が誘導されることがわかった。一方、IGF-I投与では、わずかにHB-EGF mRNAの上昇が認められたが、TGF β の添加によってはHB-EGF mRNAの発現誘導は認められなかった。

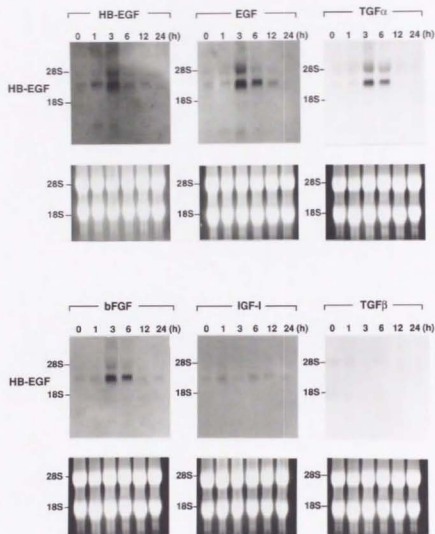


Fig.7 Effect of HB-EGF and various growth factors on HB-EGF mRNA expression in T98G glioma cells.

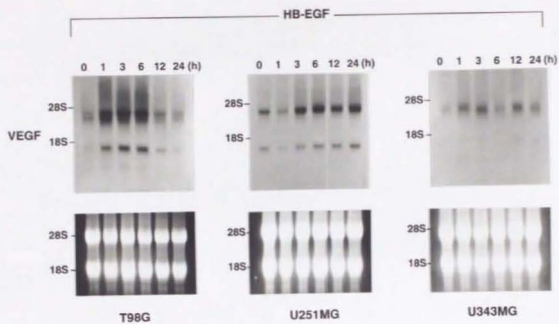
Cells were cultured for 48 h in serum-free medium, then with 10 ng/ml of rHB-EGF, EGF, $TGF\alpha$, bFGF, IGF-I, or $TGF\beta$ for the indicated periods. Total RNA (20 μ g) from human glioma cells incubated with a growth factor was fractionated by electrophoresis in a 1% agarose / formaldehyde gel, transferred to a nylon membrane, and probed with [32 P]-labeled HB-EGF cDNA. The quality and quantity of RNAs applied on a gel were confirmed by staining with ethidium bromide. The positions of the 18S and 28S ribosomal RNA bands as size markers are shown.

All experiments were repeated with a different set of RNAs from independent experiments.

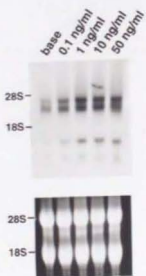
7. HB-EGFによるVEGF mRNA及びタンパクの誘導

血管内皮特異的な増殖因子であるvascular endothelial growth factor (VEGF)は、血管新生因子として、グリオーマの血管新生に重要な役割を果たしていることがこれまで報告されてきている(Samoto et al., 1995. Plate et al., 1992. Berkman et al., 1993)。HB-EGFと同じEGFファミリーに属するTGF α は、血管内皮細胞に対する増殖活性を有するが、HB-EGFは血管内皮細胞への直接の増殖活性作用はないといわれている(Higashiyama et al., 1991)。またInterleukin-1 β では、それ自体には血管内皮細胞増殖活性がないが、間接的に内皮細胞増殖因子を誘導することで血管新生に関わっているという報告がある(Li et al, 1995)。このようなことからHB-EGFには、直接内皮細胞増殖活性をもたなくとも、VEGFを誘導する能力があれば間接的に血管新生にも関与しようと考えた。そこで、rHB-EGFをグリオーマ細胞に投与し、VEGFが誘導されてくるかを検討した。Fig. 8 (a)に示すように、10ng/mlのrHB-EGFを投与することによって、今回検討した3つのグリオーマ細胞株のいずれにおいてもVEGF mRNAの発現が誘導されたが、個々の細胞株でのVEGF mRNA誘導に差が認められた。すなわち、T98GやU343MG細胞では、rHB-EGF投与1時間後より、またU251MG細胞ではrHB-EGF投与3時間後より、VEGF mRNAが誘導された。また、T98Gでは、rHB-EGF投与後6時間以降にVEGF mRNAの発現の減少がみられたが、U343MGやU251MGでは24時間後もVEGF mRNAは高レベルの発現が維持された(Fig. 8 (a))。またT98G細胞でのVEGF mRNAの発現誘導は、加えるrHB-EGF濃度に依存して増加することが示された(Fig. 8 (b))。さらにrHB-EGFによるVEGF mRNAの発現誘導が、VEGFタンパクの培養液中への分泌促進に結びつくことが、抗VEGF抗体を用いたWestern blot解析の結果から確認された(Fig. 8 (c))。

(a)



(b)



(c)

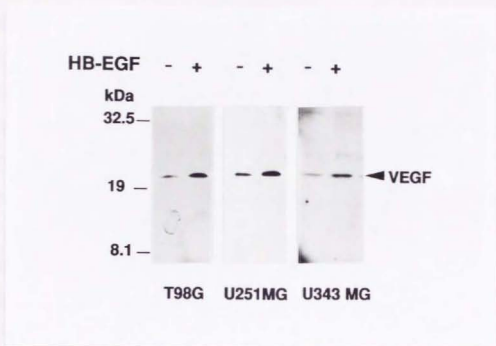


Fig. 8. Induction of VEGF mRNA and VEGF protein expression by HB-EGF in human glioma cells.

(a) Northern blot analysis demonstrating the induction of VEGF mRNA expression by HB-EGF. The quality and quantity of RNAs applied on a gel were confirmed by staining with ethidium bromide. The positions of the 18S and 28S ribosomal RNA bands as size markers are shown. Results are representative of two independent experiments.

(b) Dose-response of VEGF mRNA induction by HB-EGF in T98G glioma cells.

(c) Induction of VEGF protein in culture supernatants by HB-EGF. Medium was conditioned by T98G glioma cells in the presence or absence of HB-EGF, then concentrated by using a Centricon and analyzed by immunoblotting for the presence of VEGF protein. Bio-Rad low-range prestained markers were used as size-marker proteins.

(4)考察

今回の悪性グリオーマ細胞株を用いたin vitroの実験結果より、1) ヒト悪性グリオーマ細胞がHB-EGF mRNAを発現していること、2) グリオーマ細胞は膜結合型proHB-EGFタンパクを産生していること、3) グリオーマ細胞がDTに対して感受性を示したことは、proHB-EGFがDTのレセプターとしても機能するとのこれまでの報告に矛盾しないこと、4) recombinant HB-EGFの刺激に反応してグリオーマ細胞は増殖し、DNA合成をおこすこと、さらに5) HB-EGFに対する特異的な中和抗体でグリオーマ細胞の増殖が抑制されること、が明らかとなり、HB-EGFはオートクライン増殖因子としてグリオーマの増殖に関与していることが示された。このように、HB-EGFがグリオーマ細胞でオートクライン増殖因子として機能していることが示されたのはこれが初めてである。

膜結合型proHB-EGFは、その細胞外部分が、プロテアーゼによって切断され、分泌されると考えられている(Higashiyama et al., 1992) (Fig. 1)。近年、膜結合型proHB-EGFは、EGFRを発現するmouse myeloid 細胞 (EP170.7 cell) と、proHB-EGFを選択的に発現するように遺伝子導入によって作成されたmouse melanoma細胞 (LH cell) とのco-cultureの系を用いて、近接する細胞間でproHB-EGFがEGFRと結合し、EGFRを介して増殖シグナルを、結合した細胞に伝達しようということが示された(Higashiyama et al., 1995)。このことは、膜結合型proHB-EGFが単に分泌型HB-EGFの前駆体として存在するだけではなく、それ自身がジャクスタクラインと呼ばれる増殖刺激機構によって、増殖シグナルを他の細胞に伝える増殖因子としても機能しようことを示唆している。TGF α においても、膜結合型TGF α が同様の機構で増殖に関与することが報告されている(Brachmann et al., 1989)。今回の免疫組織化学染色の結果から、proHB-EGFタンパクが悪性グリオーマ細胞株だけでなく、悪性グリオーマ組織でも発現しており、かつそのレセプターであるEGFRと共発現している腫瘍が多く存在していることが明らかになった。このことは、proHB-EGFを発現した腫瘍細胞がin vivo

においてもジャクスタクライン機構を介して、EGFRを発現する近接腫瘍細胞に増殖シグナルを伝達していることを示唆している。さらに、ホルボールエステル刺激により、膜結合型proHB-EGF分子の切断が促進され、分泌型HB-EGFの産生が亢進される(Raab et al., 1994)といわれていることから、グリオーマ組織においても、腫瘍細胞で産生された膜結合型proHB-EGFが、PKCを活性化する何らかの刺激によって、オートクラインまたはパラクライン増殖因子としての分泌型HB-EGFに変換されていると考えられる。

グリオーマ細胞ではTGF α 以外にも、bFGF、PDGF、IGF-I等がオートクライン増殖因子として、その増殖に関与していることがこれまでに報告されている(Hermansson et al., 1988. Sandberg-Nordqvist et al., 1993. Redekop et al., 1995)。ただし、bFGFに関しては、分泌シグナルを持っていないため、細胞から分泌されたbFGFが、いわゆるexternal autocrine mechanismのもつて機能しうるか否かは議論されるところである(Kandel et al., 1991)。今回の実験結果が示すように、分泌型のHB-EGFが、グリオーマ細胞に対してmitogenとして、あるいはオートクライン増殖因子として働き、また、グリオーマ細胞で産生されていると考えられているbFGFやTGF α 等の増殖因子に応答してHB-EGF mRNAが誘導されることより、HB-EGFは、これら他の増殖因子とクロストークすることによって、複雑なシグナル伝達のネットワークを構築し、グリオーマ細胞の増殖促進や腫瘍の進展に重要な役割を果たしていると考えられる。

HB-EGFは平滑筋細胞に対しては、同じEGFファミリーに属するEGFやTGF α に比べて、細胞増殖や遊走因子としての活性がより強いことが示されている(Higashiyama et al., 1993)。今回の結果から、HB-EGFはグリオーマ細胞においても、同じファミリーに属するEGFやヘパリン結合性のあるbFGFに比べ、約10%-20%高いDNA合成促進能を発揮しうることがわかった。HB-EGFとEGFの間でみられる活性の差は、平滑筋細胞で考えられているように、グリオーマ細胞表面に発現しているヘパラン硫酸プロテオグリカンを介したHB-EGFとEGFRとのヘテロトリマー形成による結合力の強さの違いによる可能性がある。また、最近、EGFファミリータンパク(EGF, TGF α ,

HB-EGF, AR, BTC)のEGFRファミリータンパク(ErbB-1,-2,-3,-4)への結合性や、活性化能が詳細に検討された結果、乳癌細胞では、HB-EGFがEGFやTGF α とは異なり、EGFR(ErbB-1)だけではなく、ErbB-3とErbB-4レセプターを介するシグナル伝達機構にも関与していることが示された(Beerli and Hynes, 1996)。また、HB-EGFにはEGFR以外にも特異的な未知のreceptorが存在することも示唆されており(Cook et al., 1995)、グリオーマ細胞で見られたEGFファミリー間での活性の差異も、HB-EGFのEGFRとは異なったレセプターを介する効果として生じている可能性も考えられる。免疫組織化学染色の結果で、EGFRの発現はないが、proHB-EGFを発現している腫瘍が存在した理由も、今後、EGFR以外のレセプターが明らかにされたり、ErbB-3,-4の発現とHB-EGFの発現との相関性を検討すれば説明できるかもしれない。

一般に腫瘍の発生と成長には血管新生が不可欠である(Folkman and Shing, 1992)。グリオーマでは悪性になるほど血管が豊富となり、血管内皮細胞の増生像(endothelial proliferation)を認めることが、病理学的悪性度を決定する重要な指標の一つとなっている(Burger et al., 1985, 1991. Daumas-Duport et al., 1998. Germano et al., 1989. Kleihues et al., 1993)。いわゆる増殖因子の中には、血管内皮細胞に対する増殖や遊走能を促進するとともに、血管基底膜や細胞外マトリックスの消化に必要なプラスミノゲンアクチベーターの産生促進やコラゲナーゼ活性の促進をもたらし、血管新生を促す方向に作用するものが知られている。さらに、腫瘍細胞が産生する血管新生因子は、血管新生を共なった腫瘍の増大を引き起こす重要な因子と考えられている(Bussolino et al., 1996)。中でも、VEGFは血管内皮細胞特異的に働く強力な増殖因子であり(Dvorak et al., 1995. Thomas et al., 1996)、細胞外に効率よく分泌される。グリオーマの血管新生とVEGFとの関わりについてはこれまでもよく研究されており、その重要性が指摘されてきている(Zagzag et al., 1995)。すなわち、グリオーマが悪性になるに従ってグリオーマ細胞におけるVEGF産生が高くなること(Berkman et al., 1993. Samoto et al., 1995)、VEGFのレセプターであるFltはグリオブラストーマの新生血管部の血管内皮細胞で発現が高くなっていること(Plate et al., 1993)、腫瘍細胞のVEGFの

発現を中和抗体やantisense RNAで抑えると腫瘍形成が抑制されること(Kim et al., 1993, Saleh et al., 1996)、Fltの細胞内チロシンキナーゼ部を欠損させた dominant negativeのFltを発現させると、腫瘍形成が著明に抑制されること(Millauer et al., 1994)、グリオプラストーマ組織におけるVEGFが、腫瘍壊死の周囲のpseudopalisadingの部分、すなわち低酸素部において強く発現されていること(Plate et al., 1992)、in vitroの実験系ではあるが、低酸素負荷によりグリオーマ細胞からのVEGF産生が増強されること(Shweiki et al., 1992)、等の点がこれまでに明らかにされている。このように、グリオーマの増殖、進展のメカニズムを明らかにしていくためにも、VEGFの発現制御機構を明らかにすることは重要であると考えられる。

一方、低酸素によるVEGFの産生増加以外に、最近癌抑制遺伝子で、転写因子として機能するp53が変異型である細胞では、VEGFのmRNAも高いことがin vitroの系で示された(Kieser et al., 1994)。しかし、p53の変異はグリオーマのtumor progressionにおいて早期より起こっており(Louis et al., 1994)、一方、血管増生は比較的後期に生じることより、p53の変異のみでVEGFの発現が悪性グリオーマで上昇することは説明できない。また、グリオーマ組織を用いた免疫組織化学染色の検討でも、変異型p53タンパクを発現する細胞が、必ずしも多くのVEGFを産生しているとは限らないことから(Plate et al., 1994)、in vivoでp53を介するVEGFの発現制御機構が働いているかは今後の検討の余地がある。VEGFと異なり、HB-EGF自体には内皮細胞に対する増殖活性はないとされていた(Higashiyama et al., 1991)。しかし、最近ヒトのmicrovascular endothelial cellに対して、HB-EGFは管腔形成を誘導する機能があるとの報告がなされ(Ushiro et al., 1996)、血管形成にも何らかの役割を果たしていることが予想される。本研究の結果より、HB-EGFはVEGF mRNAの発現を誘導し、またVEGFタンパクの分泌を促進することが示された。従って、HB-EGFは悪性グリオーマの増殖のみならず、VEGFの発現を誘導することで、グリオーマ組織における血管新生にも関与し、その進展に重要な役割を演じている可能性があると考えられる。

今後は、in vitroで見られたVEGFの発現制御機構が、はたして実際のグリオーマ組

織においても成立するのか、また、グリオーマにおけるHB-EGFの発現機構はどのように制御されているのか、グリオーマ細胞のHB-EGFの発現をアンチセンスRNA等で抑制すると、造腫瘍性、血管新生能に変化が生じるか等について検討していく必要があると考えられる。

(5)まとめ

本研究より、HB-EGFはオートクライン増殖因子としてヒト悪性グリオーマ細胞の増殖に深く関与していることが明らかとなった。また、免疫組織化学染色の結果から、proHB-EGFタンパクは悪性グリオーマ組織でも発現しており、かつそのレセプターであるEGFRと共発現している腫瘍が多く存在していることから、*in vivo*においては、オートクライン機構のみではなく、ジャクスタクライン機構を介しても、EGFRを発現する近接細胞に増殖シグナルを伝達している可能性があると考えられた。

グリオーマ細胞での産生が報告されているTGF α 、bFGF等の他の増殖因子に応答して、HB-EGF mRNAが誘導されることより、HB-EGFは、他の複数の増殖因子との間で複雑なシグナル伝達のネットワークを構築し、グリオーマ細胞の増殖促進や、腫瘍の増大進展に重要な役割を果たしていると考えられた。

HB-EGFは、グリオーマ細胞でのVEGFの産生を増強することより、腫瘍の増殖のみならず、VEGFの発現誘導を介した血管新生を伴う腫瘍増大にも関与する可能性があると考えられた。

(6)文献

1. Abe, T., Okamura, K., Ono, M., Kohno, K., Mori, T., Hori, S., and Kuwano, M. Induction of vascular endothelial tubular morphogenesis by human glioma cells . A model system for tumor angiogenesis. *J. Clin. Invest.*, 92: 54-61, 1993.
2. Barnard, J.A., Graves-Deal, R., Pittelkow, M.R., DuBois, R., Cook, P., Ramsey, G.W., Bishop, P.R., Damstrup, L., and Coffey, R.J. Auto- and cross-induction within the mammalian epidermal growth factor-related peptide family. *J. Biol. Chem.*, 269 :22817-22822, 1994.
3. Beerli, R.R., and Hynes, N.E Epidermal growth factor-related peptide activate distinct substrate of ErbB receptors and differ in their biological activities. *J.Biol. Chem.*, 271:6071-6076, 1996
4. Berkman, R.A., Merrill, M.J., Reinhold, W.C., Monacci, W.T., Saxena, A., Clark, W.C., Robertson, J.T., Ali, I.U., and Oldfield, E.H. Expression of the vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor gene in central nervous system neoplasms. *J. Clin. Invest.*, 91: 153-159, 1993.
5. Brachmann, R., Lindquist, P.B., Nagashima, N., Kohr, W., Lipari, T., Napier, M., and Derynck, R. Transmembrane TGF- α precursors activate EGF/TGF- α receptors. *Cell*, 56: 691-700, 1989
6. Burger, P.C., Vogel, F.S., Green, S.B., and Strike, T.A. Glioblastoma multiforme and anaplastic astrocytoma. Pathologic criteria and prognostic implications. *Cancer*, 56: 1106-1111, 1985.
7. Burger, P.C., Scheithauer, B.W., and Vogel, F.S. *Surgical Pathology of the Nervous System and Its Coverings*. ed 3, Churchill Livingstone, New York, N.Y., 1991.

8. Bussolino F, Albini G, Camussi M, Viglietto PG, Ziche M, and Persico G. Role of soluble mediators in angiogenesis. *Eur. J. Cancer* 32: 2401-2412, 1996
9. Coffey, R.J., Graves-Deal, R., Dempsey, P.J., Whitehead, R.H., and Pittelkow, M.R. Differential regulation of transforming growth factor α autoinduction in a nontransformed and transformed epithelial cell. *Cell Growth and Differentiation*, 3: 347-354, 1992.
10. Cole, S.R., Ashman, L.K., and Ey, P.L. Biotinylation: an alternative to radioiodination for the identification of cell surface antigens in immunoprecipitates. *Mol. Immun.* 24: 699-705, 1987
11. Cook, P.W., Ashton, N.M., Karkaria, C.E., Siess, D.C. and Shipley G.D. Differential effects of a heparin agonist (hexadimethine) or Chlorate on amphiregulin, basic fibroblast growth factor, and heparin-binding EGF-like growth factor activity. *J. Cell. Physiol.* 163: 418-429, 1995
12. Dumas-Duport, C., Scheithauer, B.W., O'Fallon, J., and Kelly, P.J. Grading of astrocytomas; a simple and reproducible method. *Cancer*, 62: 2152-2165, 1988.
13. Dvorak, H.F., Brown, L.F., Detmar, M., and Dvorak, A.M. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Review. Am. J. Pathol.*, 146: 1029-1039, 1995.
14. Folkman J and Shing Y. Angiogenesis. *J. Biol. Chem.* 267: 10931-10934, 1992
15. Germano, I.M., Ito, M., Cho, K.G., Hoshino, T., Davis, R.L., and Wilson, C.B. Correlation of histopathological features and proliferative potential of gliomas. *J. Neurosurgery*, 70: 701-706, 1989.

16. Hashimoto, K., Higashiyama, S., Asada, H., Hashimura, E., Kobayashi, T., Sudo, K., Nakagawa, T., Damm, D., Yoshikawa, K., and Taniguchi, N. Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor is an autocrine growth factor for human keratinocytes. *J. Biol. Chem.*, 269: 20060-20066, 1994
17. Hermansson M, Nister M, Betsholz C, Heldin CH, Westermark B, and Funai K. Endothelial cell hyperplasia in human glioblastomas: Coexpression of mRNA for platelet derived growth factor (PDGF) B chain and PDGF receptor suggests autocrine growth stimulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 7748-7752, 1988
18. Higashiyama, S., Abraham, J.A., Miller, J., Fiddes, J.C., and Klagsbrun, M. A heparin-binding growth factor secreted by macrophage-like cells that is related to EGF. *Science* (Washington DC), 251: 936-939, 1991.
19. Higashiyama, S., Lau, K., Besner, G.E., Abraham, J.A., and Klagsbrun, M. Structure of heparin-binding EGF-like growth factor: multiple forms, primary structure, and glycosylation of the mature protein. *J. Biol. Chem.*, 267: 6205-6212, 1992.
20. Higashiyama, S., Abraham, J.A., and Klagsbrun, M. Heparin-binding EGF-like growth factor stimulation of smooth muscle cell migration dependence on interactions with cell surface heparan sulfate. *J. Cell Biol.*, 122: 933-940, 1993.
21. Higashiyama, S., Iwamoto, R., Goishi, K., Raab, G., Taniguchi, N., Klagsbrun, M., and Mekada, E. The membrane protein CD9/DRAP27 potentiates the juxtacrine growth factor activity of the membrane anchored heparin-binding EGF-like growth factor. *J. Cell Biol.*, 128: 929-938, 1995.

22. Inui Y, Higashiyama S, Kawata S, Tamura S, Miyagawa J, Taniguchi N, and Matsuzawa Y. Expression of heparin-binding epidermal growth factor in human hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 107:1799-1804, 1994
23. Ito, N., Kawata, S., Tamura, S., Kiso, S., Tsushima, H., Damm, D., Abraham, J.A., Higashiyama, S., Taniguchi, N., and Matsuzawa, Y. Heparin-binding EGF-like growth factor is a potent mitogen for rat hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 198: 25-31, 1994.
24. Iwamoto, R., Higashiyama, S., Mitamura, T., Taniguchi, N., Klagsbrun, M., and Mekada, E. Heparin-binding EGF-like growth factor, which acts as the diphtheria toxin receptor, forms a complex with membrane protein DRAP27/CD9, which up-regulates functional receptors and diphtheria toxin sensitivity. *EMBO (Eur. Mol. Biol. Organ.) J.*, 13: 2322-2330, 1994.
25. Jaros, E., Perry, R.H., Adam, L., Kelly, P.J., Crawford, P.J., Kalbag, R.M., Mendelow, A.D., Sengupta, R.P., and Pearson, A.D.J. Prognostic implications of p53 protein, epidermal growth factor receptor, and Ki-67 labelling in brain tumours. *Br. J. Cancer*, 66: 373-385, 1992.
26. Kandel J. Bossy-Wetzel E. Radvanyi F. Klagsbrun M. Folkman J. Hanahan D. Neovascularization is associated with a switch to the export of bFGF in the multistep development of fibrosarcoma. *Cell*, 66:1095-104, 1991
27. Kieser, A., Weich, H.A., Brandner, G., Marme, D., and Kolch, W. Mutant p53 potentiates protein kinase C induction of vascular endothelial growth factor expression. *Oncogene*, 9: 963-969, 1994.
28. Kimura H. Fischer WH, and Schubert, D Structure, expression and function of a schwannoma-derived growth factor. *Nature(Lond.)* 348: 257-260, 1990

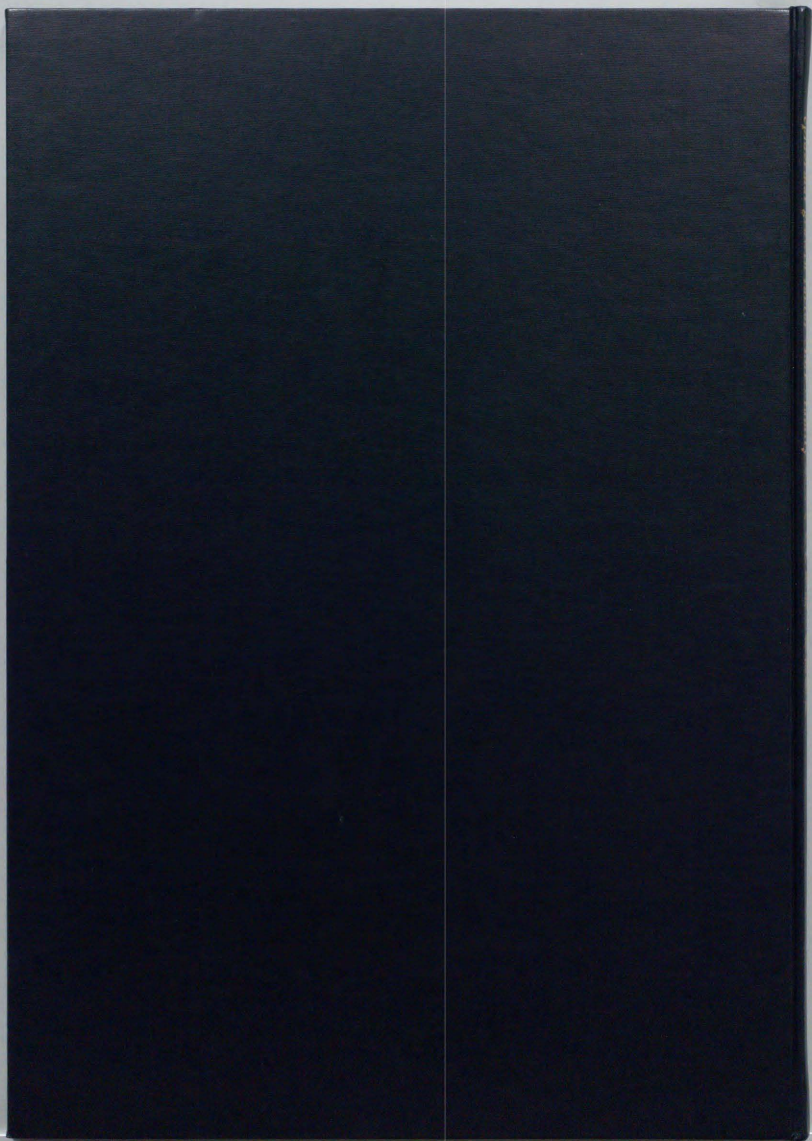
29. Kleihues, P., Burger, P.C., and Scheithauer, B.W. Histological Typing of Tumors of the Central Nervous System. World Health Organization International Histological Classification of Tumors. No 21, Springer-Verlag, Berlin, Germany, 1993.
30. Kobrin MS, Fubatomi H, Friess H, Buchler MW, Stathis P, and Kore M Induction and expression of heparin-binding EGF-like growth factor in human pancreatic cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 202: 1705-1709, 1994
31. Li J, Perrella MA, Tsai J-C, Yet S-F, Hsieh C-M, Yoshizumi M, Patterson C, Endege WO, Zhou, F, and Lee M-E. Induction of vascular endothelial growth factor gene expression by interleukin-1 β in rat aortic smooth muscle cells. *J Biol. Chem.* 270: 308-312, 1995
32. Libermann, T.A., Nusbaum, H.R., Razon, N., Kris, R., Lax, I., Soreq, H., Whittle, N., Waterfield, M.D., Ullrich, A., and Schlessinger, J. Amplification, enhanced expression and possible rearrangement of EGF receptor gene in primary human brain tumors of glial origin. *Nature (Lond.)*, 313: 144-147, 1985.
33. Louis DN. The p53 gene and protein in human brain tumors. *J Neuropath. Exp. Neurol.* 53: 11-21, 1994
34. Maxwell, M., Naber, S.P., Wolfe, H.J., Hedley-Whyte, T., Galanopoulos, T., Neville-Golden, J., and Antoniades, H.N. Expression of angiogenic growth factor genes in primary human astrocytomas may contribute to their growth and progression. *Cancer Res.*, 51: 1345-1351, 1991.
35. Millauer, B., Shawver, L.K., Plate, K.H., Risau, W., and Ullrich, A. Glioblastoma growth inhibited *in vivo* by a dominant-negative *Flk-1* mutant. *Nature (Lond.)*, 367: 576-579, 1994.

36. Mishima, K., Asai, A., Sugiyama, A., Miyagi, Y., Kitanaka, C., Kagaya, S., Kirino, T., and Kuchino, Y. Increased expression of schwannoma-derived growth factor (SDGF) mRNA in rat tumor cells: Involvement of SDGF in the growth promotion of rat gliomas. *Int. J. Cancer*, 66: 352-357, 1996.
37. Mitamura T, Higashiyama S, Taniguchi N, Klagsbrun M, and Mekada E. Diphtheria toxin binds to the epidermal growth factor (EGF)-like domain of human heparin-binding EGF-like growth factor/diphtheria toxin receptor and inhibits specifically its mitogenic activity. *J Biol Chem*. 270: 1015-1019, 1995
38. Nakagawa T, Higashiyama S, Mitamura T, Mekada E, and Taniguchi N. Amino-terminal processing of cell surface heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor up-regulates its juxtacrine but not its paracrine growth factor activity. *J Biol Chem*. 271: 30858-30863, 1996
39. Nister M, Libermann TA, Betsholtz C, Pettersson M, Claesson-Welsh L, Heldin C-H, Schlessinger J, and Westermark B. Expression of messenger RNAs for platelet-derived growth factor and transforming growth factor- α and their receptors in human malignant glioma cell lines. *Cancer Res*. 48: 3910-3918, 1989
40. Norton, A.J., Jordan S., and Yeomans P. Brief, high-temperature heat denaturation (pressure cooking): a simple and effective method of antigen retrieval for routinely processed tissues. *J. Pathol*. 173: 371-379, 1994
41. Plate, K.H., Breier, G., Weich, H.A., and Risau, W. Vascular endothelial growth factor is a potential tumor angiogenesis factor in human gliomas *in vivo*. *Nature (Lond.)*, 359: 845-848, 1992.

42. Plate KH, Breier G, Weich HA, Mennel HD, and Risau W. Vascular endothelial growth factor and glioma angiogenesis: Coordinate induction of VEGF receptors, distribution of VEGF protein and possible *in vivo* regulatory mechanisms. *Int J Cancer* 59: 520-529, 1994
43. Plowman, G.D., Green, J.M., McDonald, V.L., Neubauer, M.G., Distechi, C.M., Todaro, G.J., and Shoyab, M. The amphiregulin gene encodes a novel epidermal growth factor-related protein with tumor inhibitory activity. *Mol. Cell Biol.*, 10: 1969-1981, 1990.
44. Raab, G., Higashiyama, S., Hetelekidis, S., Abraham, J.A., Damm, D., Ono, M., and Klagsbrun, M. Biosynthesis and processing by phorbol ester of the cell surface-associated precursor form of heparin-binding EGF-like growth factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 204: 592-597, 1994
45. Redekop GJ, Naus CCG. Transfection with bFGF sense and antisense cDNA resulting in modification of malignant glioma growth. *J Neurosurg* 82: 83-90, 1995
46. Russell, D.C., Rubinstein, L.J. *Pathology of Tumors of the Nervous System.* ed 5, Edward Arnold, London, Great Britain, 1989.
47. Saleh M, Stacker SA, and Wilks AF. Inhibition of growth of C6 glioma cells *in vivo* by expression of antisense vascular endothelial growth factor sequence. *Cancer Res.* 56: 393-401, 1996
48. Samoto, K., Ikezaki, K., Ono, M., Shono, T., Kohno, K., Kuwano, M., and Fukui, M. Expression of vascular endothelial growth factor and its possible relation with neovascularization in human brain tumors. *Cancer Res.*, 55: 1189-1193, 1995.

49. Sandberg-Nordqvist A, Stahlbom P, Reinecke M, Collins VP, von Holst H, and Sara V. Characterization of insulin-like growth factor I in human primary brain tumors. *Cancer Res* 53: 2475-2478, 1993
50. Schlegel, J., Merdes, A., Stumm, G., Albert, F.K., Forsting, M., Hynes, N.E., and Kiessling, M. Amplification of the epidermal growth factor receptor gene correlates with different growth behaviour in human glioblastoma. *Int. J. Cancer*, 56: 72-77, 1994.
51. Schlegel U, Moots PL, Rosenblum MK, Thaler HT, and Furneaux. Expression of transforming growth factor alpha in human gliomas. *Oncogene* 5: 1839-1842, 1990
52. Shing Y, Cristofori G, Hanahan D, Ono Y, Sasada R, Igarashi K, and Folkman J. Betacellulin: A mitogen from pancreatic beta cell tumors. *Science*, 259: 1604-1607, 1993
53. Shweiki, D., Itin, A., Soffer, D., and Keshet, E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature (Lond.)*, 359: 843-845, 1992.
54. Takahashi, A., Sasaki, H., Kim, S.J., Tobisu, K., Kakizoe, T., Tsukamoto, T., Kumamoto, Y., Sugimura, T., and Terada, M. Markedly increased amounts of messenger RNAs for vascular endothelial growth factor and placenta growth factor in renal cell carcinoma associated with angiogenesis. *Cancer Res.*, 54: 4233-4237, 1994.
55. Thomas, K.A. Vascular endothelial growth factor, a potent and selective angiogenic agent. Minireview. *J. Biol. Chem.*, 271: 603-606, 1996.
56. Thompson, S.A., Higashiyama, S, Wood, K., Pollitt, N.S., Damm, D., McEnroe, G., Garrick, B., Ashton, N., Lau, K., Hancock, N., Klagsbrun, M., and Abraham, J.A. Characterization of sequences within heparin-binding EGF-like growth factor that mediate interaction with heparin. *J. Biol. Chem.*, 269: 2541-2549, 1994.

57. Ushiro, S., Ono, M., Izumi, H., Kohno, K., Taniguchi, N., Higashiyama, S., and Kuwano, M. Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor: p91 activation, induction of plasminogen activator/plasminogen activator inhibitor, and tubular morphogenesis in human microvascular endothelial cells. *Jpn. J. Cancer Res.*, 87: 68-77, 1996.
58. Watanabe K, Tachibana O, Sato K, Yonekawa, Kleihues P, and Ohgaki H. Overexpression of the EGF receptor and p53 mutations are mutually exclusive in the evolution of primary and secondary glioblastomas. *Brain Pathol.* 6: 217-224, 1996
59. Weindel, K., Moringlane, J.R., Marme, D., and Weich, H.A. Detection and quantification of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor in brain tumor tissue and cyst fluid: The key to angiogenesis? *Neurosurg.*, 35: 439-449, 1994.
60. Weiner, H.L. The role of growth factor receptors in central nervous system development and neoplasia. *Neurosurgery*, 37: 179-194, 1995.
61. Wong, A.J., Ruppert, J.M., Bigner, S.H., Grzeschik, C.H., Humphrey, P.A., Bigner, D.S., and Vogelstein, B. Structural alterations of the epidermal growth factor receptor gene in human gliomas. *Proc Natl.Acad. Sci. USA*, 89: 2965-2969, 1992.
62. Yoshizumi, M., Kourembanas, S., Temizer, D.H., Cambria, R.P., Quertermous, T., and Lee, Mu-En. Tumor necrosis factor increases transcription of the heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor gene in vascular endothelial cells. *J. Biol. Chem.*, 267: 9467-9469, 1992.
63. Zagzag, D. Angiogenic growth factors in neural embryogenesis and neoplasia. Review. *Am. J. Pathol.*, 146: 293-309, 1995.



cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM Kodak

Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black



Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM Kodak

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

