

アデノウイルスベクターを用いたcsk遺伝子導入
による大腸癌細胞の肺転移抑制

中川 匠

①

アデノウィルスベクターを用いた csk 遺伝子導入
による大腸癌細胞の肺転移抑制

指導教官 中村 耕三 教授

東京大学大学院医学系研究科
外科学専攻
平成8年4月入学

中川 匠

目次

1	研究の背景と意義	4
2	材料と方法	7
2-1	動物と細胞	7
2-2	抗体と試薬類	7
2-3	アデノウイルスベクター	7
2-4	アデノウイルスの細胞への感染	8
2-5	X-gal染色	8
2-6	細胞増殖アッセイ	8
2-7	ウェスタンブロット法	9
2-8	<i>in vitro</i> 免疫沈降・c-Srcキナーゼアッセイ	9
2-9	実験的肺転移アッセイ	10
2-10	マイクロボア・ケモタキシスアッセイ	10
2-11	ケモインページョンアッセイ	11
2-12	ゼラチンザイモグラムによるゼラチナーゼの検出	11
2-13	皮下移植による <i>in vivo</i> における浸潤能の評価	12
3	結果	13
3-1	アデノウイルスベクターのNL-17細胞に対する感染効率	13
3-2	Cskの過剰発現のNL-17細胞の増殖に対する影響	13
3-3	Cskの過剰発現によるNL-17細胞のSrcキナーゼ活性の抑制	14
3-4	Cskの過剰発現によるNL-17細胞の肺転移の抑制	14
3-5	Cskの過剰発現によるNL-17細胞の <i>in vitro</i> 浸潤能の低下	15

3-6	Cskの過剰発現によるNL-17細胞からの活性型MMP-2産生の低下	16
3-7	Cskの過剰発現によるNL-17細胞のin vivo浸潤能の低下	16
4	考察	18
5	図	22
	Figure 1	23
	Figure 2	24
	Figure 3	25
	Figure 4	26
	Figure 5	27
	Figure 6	28
	Figure 7	29
	Figure 8	30
	総括	31
	謝辞	32
	参考文献	33

1. 研究の背景と意義

癌は1981年以来国民の死亡率の第一位であり、1998の年度厚生省発表の統計によれば死亡した人のうち約4人に1人が癌で死亡している。癌の早期発見、治療法の進歩とともに原発巣に限局している癌の治療率は高まってきたが、転移とくに遠隔転移をおこした症例に対しての治療率はきわめて低いと言わざるを得ない。今後癌の治療率の向上にあたって、癌の転移の制御がきわめて重要であることは明白な事実である。転移を成立させる生体反応の過程には多様性があると考えられるが、マクロ的に見れば転移の成立過程をいくつかの共通のステップに大別する事が可能である。一般に癌細胞の転移成立には、原発巣から離脱しさらに浸潤してゆくステップ、原発巣から遊離した癌細胞が血管やリンパ管といった脈管系に進入してゆくステップ、さらに遠隔臓器で毛細血管に捕捉された癌細胞が血管内皮基底膜を浸潤する脈管から浸出するステップ、そして転移先臓器でアポトーシスを回避して増殖を開始する転移臓器において生着し増殖するステップが必要であると考えられている。このように転移の成立には様々な複雑なステップが関与していると考えられ、その機構の全容の解明その制御法の開発には様々な角度からのアプローチが必要であると考えられる。

これまでの研究から、ラウス肉腫より同定されたがん遺伝子v-srcをはじめとする多くのがん遺伝子産物が、チロシン残基を特異的にリン酸化するチロシンキナーゼ活性をもつことが明らかとなり、チロシン残基のリン酸化は細胞のがん化と直結した反応として注目された(1)。c-srcはがん遺伝子v-srcの正常細胞中に存在するcounterpartとして同定されたがん原遺伝子(proto-oncogene)であり、v-src同様にチロシンキナーゼ活性をもち細胞の増殖、分化、免疫応答など多様な生命現象に深く関与していることが明らかになりつつある(2)。このc-srcは大腸癌、乳癌をはじめとした様々な癌細胞においてその発現が上昇しているこ

とが報告されてきた(3-5)。特に大腸癌ではその発現上昇が詳細に検討されており、手術材料を用いた病理組織学的検討においてc-Srcの発現とがんの進行度とのあいだで強い相関が観察されている(6, 7)。これらの臨床材料を用いた観察と一致して、最近高転移性大腸癌細胞株では低転移性大腸癌細胞株に比べ、c-Srcの活性が上昇していることが報告された(8)。これらの事実からc-Srcの活性の制御は、大腸癌細胞の転移を抑制する1つの有力なターゲットであると考えられる。

c-Srcは細胞膜の内側に局在するチロシンキナーゼファミリーの一つであり、細胞におけるシグナルの伝達に関与している(2)。Srcファミリーチロシンキナーゼの活性はそのSH-2領域とC末に存在する527番目のリン酸化したチロシン残基との分子内結合により規定されている。すなわち、527番目のチロシン残基がリン酸化しているときは、SH-2領域とリン酸化チロシン残基とのあいだで分子内結合しそのキナーゼ活性は抑制されている。一方、527番目のチロシン残基が脱リン酸化しているときは、この分子内結合はおこらずそのキナーゼ活性は活性化している(9)。受容体刺激を介する活性化機構などについては詳細に知られていないが、Csk (C-terminal Src kinase) はSrcファミリーチロシンキナーゼの活性を抑制するチロシンキナーゼとして同定された(10)。CskはSrcファミリーのC末に存在するチロシン残基をリン酸化することにより、そのチロシンキナーゼをネガティブに制御する。csk遺伝子をターゲッティングしたマウスembryoでは、Srcファミリーキナーゼの活性が常に上昇している(11, 12)。他方、いくつかの細胞株においてCskを過剰発現させると、Srcファミリーキナーゼを介した細胞のシグナル伝達の抑制が誘導される(13-15)。これらの事実から、SrcファミリーキナーゼとCskのバランスによりSrcファミリーキナーゼの活性が制御されていると推察される。

以上の背景、すなわちヒト高転移性大腸癌細胞においてc-Srcの活性が上昇していること、またCskはc-Srcの活性を押さえることが出来る有力な分子であることから、Cskが大腸癌細胞の転移抑制に応用できるのではないかと考え本研究を開始した。NL-17細胞はマウス結腸癌細胞 colon adenocarcinoma 26より、Fidlerの方法に従い東京大学分子細胞生物学

研究所の鶴尾教授らにより樹立された高転移性癌細胞株である(16)。NL-17細胞をBALB/cマウスの尾静脈に静注すると2～3週後、肺に多数の転移性結節を形成する。本研究ではこのマウス結腸癌高転移株NL-17細胞に、アデノウイルスベクターを用いてCskを過剰発現させることにより、ヒト大腸癌においてその活性が上昇しているとされるc-Srcの活性が制御できるかどうか、またcsk遺伝子導入によりマウスにおけるNL-17細胞の実験的肺転移形成を抑制することが出来るかどうかを検討した。

2. 材料と方法

2-1. 動物と細胞

BALB/cマウス(8~12週齢:雌)はオリエンタル酵母株式会社より購入した。マウス結腸癌高転移株NL-17細胞は東京大学分子細胞学研究所の鶴尾教授らにより、Fidlerの方法に従い colon adenocarcinoma 26より樹立された(16)。NL-17細胞はRPMI-1640培地(水製薬)に非働化済みウシ胎児血清10% v/vを加え、37℃、CO₂インキュベーター(二酸化炭素濃度5%)にて培養した。

2-2. 抗体と試薬類

以下のタンパク質に対する抗体は、それぞれ右に記した会社から購入した。

Csk (clone52) : Transduction Laboratories社

v-Src (clone Mab327) : Oncogene Research Products社

horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse IgG : Zymed Laboratories社

その他一般的な試薬は、特に断り書きのない限り、和光純薬またはナカライテスク社の特級品を用いた。

2-3. アデノウイルスベクター

ラットcsk遺伝子が組み込まれたアデノウイルスベクター(AxCATcsk)は東京大学整形外科田中栄博士より供与を受けた(17)。コントロールのmockウイルス(Ax1w1)と β

-galactosidase遺伝子の組み込まれたウイルス(AxCATLacZ)は東京大学医科学研究所の齊藤泉教授より供与された。

2-4. アデノウイルスの細胞への感染

アデノウイルスのNL-17細胞への感染は以前の報告(17)にしたがい、以下のプロトコールで行った。60mmのディッシュに 5×10^6 個のNL-17細胞をまいたのち一晚培養し、mediumを吸引しPBSで一回ウオッシュし、アデノウイルスの含まれた少量のmediumを添加し1時間培養した。その後、最初に添加したmediumの10倍量のmediumを添加し、さらに48時間培養し実験に用いた。

2-5. X-gal 染色

β -gal活性の検出は5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactosidase (X-gal)を基質として行った。培養している細胞を3.7%ホルムアルデヒド入りPBSを用いて室温で10分間固定した後、PBSで2回リンスした。 β -gal活性は細胞を染色液(5 mM $K_4Fe(CN)_6$, 5 mM $K_3Fe(CN)_6$, 2 mM $MgCl_2$, 2 mM X-gal)中に3時間浸し、倒立顕微鏡(ニコン)で観察した。

2-6. 細胞増殖アッセイ

ウイルスを感染させ(300MOI)24時間培養した細胞を回収し、12ウェルの培養ディッシュに 2×10^4 cells/wellの細胞密度でまいた後培養し、24,48,72,96時間後に0.05% trypsin, 0.02% EDTAで浮遊させ、ヘモサイトメーターを用いて細胞数をカウントした(n=4)。

2-7. ウェスタンブロット法

細胞を回収し、1× SDS sample buffer (10% v/v グリセリン、5% v/v 2-ME、2% w/v SDS、62.5 mM Tris-HCl[pH6.8]、1 mM PMSF)にサスペンドし、100℃、5分間処理した。このサンプルをSDS-PAGEで展開し、ニトロセルロース膜(PROTRAN、Schneider & Shuell社)に電気的に転写した。転写した膜を抗Csk抗体(clone52)、抗v-Src抗体(Mab327)で処理した後、2次抗体として抗マウスIG-HRPで反応させ、ECL(Enhanced Chemiluminescence Detection) System(Amersham)を用いて標準的なプロトコールに従って検出した。

2-8. *in vitro*免疫沈降・Srcキナーゼアッセイ

細胞を回収し、200 μ lのTNE buffer (10 mM Tris-HCl[pH7.8]、150 mM NaCl、1% ノニデット P-40、1 mM EDTA、1 mM sodium orthovanadate、1 mM DTT、1 mM PMSF、10 μ g/ml aprotinin)で可溶化した。このcell lysatesを遠心して上清のタンパク量をBIO-RADプロテインアッセイキットを用いて定量し、サンプル間のタンパク量を合わせた。200 μ gの上清に抗v-src抗体(Mab327) 1 μ gを加え、4℃で1時間インキュベートした。プロテインG-セファロースビーズ4B(Zymed)を加えてさらに1時間回転攪拌し、ビーズを遠心分離した。このビーズをKinase buffer (40 mM HEPES-NaOH[pH7.4]、10 mM MgCl₂、2.5 μ g of rabbit muscle enolase(Sigma))でサスペンドした後、10 μ Ci [γ -³²P]-ATP(NEN)を添加して30℃水浴で10分間反応させた。SDS sample buffer (10% v/vグリセリン、5% v/v 2-mercaptoethanol、2% w/v ドデシル硫酸ナトリウム[SDS]、62.5 mM Tris-HCl[pH6.8])を加えてボイルし、SDS-PAGEで展開した。このゲルをオートラジオグラフィーで検出した。なお、バンドの

濃さは、バイオイメージングアナライザー-BAS-2000(富士写真フィルム)を用いて検出した。

2-9. 実験的肺転移アッセイ

アデノウイルスAx-CATcsk及びAx1w1を前述のごとく感染させたNL-17細胞を48時間培養後、0.05% trypsin, 0.02% EDTAで浮遊させ、PBSで洗浄後、さらにHBSS(Gibco)に浮遊させた。水中に10分間静置した後、 1.25×10^5 cells/mlに調製した。細胞の生存率は95%以上であった。この細胞浮遊液 0.2ml (2.5×10^4 cell)をBALB/c mouseに尾静脈から静注した。細胞静注後21日目に、マウスを剖検し肺の転移結節数および肺の重量を測定した(18, 19)。尚、マウスの屠殺は東大分子細胞生物学研究所の動物取り扱い規約に従い、エーテル麻酔法により行った。

2-10. マイクロポア・ケモタキ시스アッセイ

アデノウイルスAxCATcsk及びAx1w1を前述のごとく感染させたNL-17細胞を48時間培養後、0.05% trypsin, 0.02% EDTAで培養皿より浮遊させ、PBSで洗浄した後5分間遠心した。上清を捨て0.1%BSAを含んだRPMI無血清培地でsuspendした(細胞密度 2×10^5 cells/ml)。8 μ mのporeの開いたトランスウェルチャンバー(Costar)をセットし、トランスウェルに開いている窓から600 μ lのフィブロネクチン(KOKEN)の溶液(20 μ g/ml)を下室に入れ走化性因子とした。フィルターの下に気泡が出来ていないことを確認し、上室(トランスウェル側)に100 μ lの細胞浮遊液を入れた。インキュベーター内で12時間静置し、トランスウェルのメンブレンを固定液中(5%グルタルアルデヒド溶液、PBSで希釈)で30分間室温で静置し固定した。その後、染色液(Coomassie Brilliant溶液、PBSで希釈)を用いて

室温で30分間静置し染色した。綿棒でフィルターの上面の細胞を拭い取り、倒立顕微鏡でフィルターの下面に移動した細胞を観察した。細胞核のついた細胞のみ計数し、視野あたりの細胞数をもってケモタキシスの程度を評価した(20)。

2-11. ケモインベーションアッセイ

ケモインベーションアッセイは8 μ mのporeを有するフィルターにあらかじめ31 μ g/フィルターのマトリゲル(人工的に再構成した基底膜)がコートされている、バイオコート・マトリゲル・インベーションチャンバー(日本ベクトン・ディッキンソン社)を用いた。基本的な実験の流れはケモタキシスアッセイと同様に行った。アデノウイルス感染させたNL-17細胞を回収し、0.1%BSAを含んだRPMI無血清培地に細胞数 2×10^5 cells/mlとなるように懸濁した。マトリゲルコートしたチャンバー内に200 μ lの血清不含培地を加え、ゲルを膨潤させた後、培地を除き細胞懸濁液200 μ lをマトリゲルの上に加えた。ケモアトラクタントとして600 μ lのフィブロネクチンの溶液(20 μ g/ml)を用いた。24時間培養後、固定・染色し、綿棒でフィルターの上面の細胞を拭い取り、フィルターの下面に移動した細胞を観察した。視野あたりの細胞数をもってケモインベーションの程度を評価した(21)。

2-12. ゼラチンザイモグラムによるゼラチナーゼの検出

アデノウイルス感染後24時間血清入り培地でNL-17細胞を培養し、培地を0.1%BSAを含んだRPMI無血清培地に交換しさらに48時間培養した。培地を回収し、ゼラチンザイモ電気泳動キット(ヤガイ社)を用いて、キットのプロトコールに従いゼラチンザイモグラムアッセイを行った。

2-13. 皮下移植による *in vivo* における浸潤能の評価

アデノウイルス感染させたNL-17細胞を回収し、PBSで細胞数 5×10^6 cells/mlとなるように懸濁した。この細胞懸濁液 0.2ml (1×10^6 cells)をBALB/c mouseの背中に皮下注した。約21日後マウスの背中の皮下に形成した腫瘍を、マウスをエーテル麻酔下に屠殺後、周囲の正常組織とともに一塊として摘出し、ホルマリン固定後ヘマトキシリン・エオジン染色を行い病理組織的観察をした。

3. 結果

3-1. アデノウイルスベクターのNL-17細胞に対する感染効率

アデノウイルスがNL-17細胞に感染するかどうか確認するため、*lac Z gene*が組み込まれたアデノウイルスベクター(AxCASLacZ)を、感染させるウイルスの量(MOIs; multiplicity of infections)変えて感染させた。感染後48時間培養し、ガラクトシダーゼ活性をX-galを基質として検出した。Figure 1aに見られるように、染色後1時間以内に多くのNL-17細胞の細胞質が青く染色され、強いガラクトシダーゼ活性が観察された。またガラクトシダーゼ活性を示す細胞は、感染させるウイルスの量(MOI)濃度依存的に増加した(Figure 1b)。MOI300にて、95%以上のNL-17細胞がガラクトシダーゼ活性が観察された。またMOI300で感染させたとき、培養しているNL-17細胞に感染させていない細胞と比べて形態学的変化は観察されず、この濃度におけるアデノウイルスのNL-17細胞に対する細胞毒性は無視できるものと考えられた。以上の実験結果から、アデノウイルスベクターがマウス大腸癌高転移クローンNL-17細胞に効率よく感染することが確認された。

3-2. Cskの過剰発現のNL-17細胞の増殖に対する影響

Cskを過剰発現させることによりNL-17細胞の増殖に変化が生じるかどうか検討するため、NL-17細胞にmockウイルス(Ax1w1)、Cskウイルス(Ax1CATcsk)をそれぞれ感染させ、24時間インキュベートした。細胞を回収したのち、12ウェルのプレートに細胞密度 2×10^4 cells/wellでまいた後培養し、24,48,72,96時間後に細胞数をカウントし評価した。Figure 2に見られるように、mockウイルス、Cskウイルスを300MOIで感染させたNL-17細胞との間に

増殖の差は観察されなかった。

3-3. Cskの過剰発現によるNL-17細胞のSrcキナーゼ活性の抑制

Cskを過剰発現させることによりNL-17細胞のSrcのチロシンキナーゼ活性が抑制されるかどうか検討するため、NL-17細胞にmockウイルス(Ax1w1)、Cskウイルス(Ax1CATsk)、LacZウイルス(AxCASLacZ)をそれぞれ感染させ、48時間インキュベートした。細胞を回収しウェスタンブロッティング法によりCskとSrcの発現量を観察した。mockウイルス、LacZウイルスを感染させたNL-17細胞では、Cskの発現量は比較的少なかったが、Cskウイルスを感染させたNL-17細胞においては、ウイルス濃度依存的にCskの発現量が上昇しているのが観察された(Figure 3a)。一方、Srcの発現量はそれぞれのウイルスを感染させた細胞間で変化はなかった。以上の結果から、cskウイルスにより十分量のCskのタンパク質の発現上昇が得られることが確認された。次にこのCskのタンパク質の発現上昇により、NL-17細胞のSrcのチロシンキナーゼ活性が抑制されるかどうかを検討するため、エノラーゼを基質として *in vitro* キナーゼアッセイを行った。それぞれのウイルスを感染させた細胞を回収した後、細胞を可溶化しSrcを特異的に認識する抗体で免疫沈降させて、免沈産物のチロシンキナーゼ活性を *in vitro* キナーゼアッセイにて測定した。Figure 3bに示すようにcskウイルスを感染させた細胞で、チロシンキナーゼ活性の低下が観察された。これらの結果を総合すると、cskウイルスを用いてNL-17細胞にCskのタンパク質を過剰発現させることにより、Srcにチロシンキナーゼ活性が抑制されることが確認された。

3-4. Cskの過剰発現によるNL-17細胞の肺転移の抑制

Cskのタンパク質を過剰発現させることによる、NL-17細胞の実験的転移に与える影響に関して検討した。8-12週齢のBALB/c mouseに、cskウイルスを感染させて48時間培養し

たNL-17細胞を 2.5×10^6 個ずつ尾静注内に投与した。controlとしてmockウイルスを同様に感染させたNL-17細胞を尾静注内に投与した。21日後、肺を調べてみたところ、controlの肺には多数の白いNL-17細胞の結節が観察されたが(Figure 4)、CskをoverexpressさせたNL-17細胞を投与したマウスの肺ではその結節数が著明に減少していた(Figure 4)。本実験は同じ条件で3シリーズ行い、すべての実験において同様の結果が得られ、Cskを過剰発現によりNL-17細胞の転移が抑制されることが確認された。さらに、それぞれの肺の結節数及び肺の重量を測定した。今回の実験ではcsk群、control群それぞれ6匹ずつ用いた。control群は、肺の結節数の平均が①119.7 \pm 20.7個②82.6 \pm 15.6個③112.3 \pm 16.6個であるのに対し、csk群では①28.3 \pm 15.8個②19.3 \pm 7.5個③29.7 \pm 8.6個とそれぞれ有意に減少していた ($p < 0.01$; Figure 5)。さらに、肺重量を比較してみると、control群は平均が①433 \pm 68mg②346 \pm 55mg③524 \pm 65mgであるのに対し、csk群では①271 \pm 55mg②221 \pm 37mg③285 \pm 34mgと結節の数が少ない分だけ肺重量もそれぞれ有意に減少していた ($p < 0.01$; Figure 5)。これらの動物実験の結果より、in vitroにおけるcskウイルス感染によりNL-17細胞の肺転移が有意に抑制されることが確認された。

3-5. Cskの過剰発現によるNL-17細胞のin vitro浸潤能の低下

Cskの過剰発現によるNL-17細胞の転移能の低下をさらに解析するために、ケモタキシス用のチャンパーを用いて、cskウイルスを感染させた細胞とmockウイルスを感染させた細胞との間でその運動性を比較した。それぞれのウイルスを感染させ48時間培養した細胞を回収し、トランスウェルの上室に細胞を加え、走化性因子として下室にいたフィブロネクチン溶液に対する運動性を12時間培養後比較した。Figure 6aに示すように、Cskを過剰発現させた細胞とcontrolの細胞との間でケモタキシスの有意な差は観察されなかった。この実験結果からin vivoにおける転移能の差はフィブロネクチンに対する癌細胞の運動能の差で説明できないと考えられた。

がん遺伝子v-srcによるトランスフォームによって、細胞のマトリックス・メタロプロテアーゼ(MMP)の産生が誘導され、細胞は転移能を獲得するという報告がある(22)。そこで、Cskの過剰発現によりNL-17細胞の浸潤能に変化が見られるかどうか、*in vitro*で再構成された基底膜であるマトリゲルに対するケモインページョンを比較した。Figure 6b cに見られるように、controlのmockウイルスを感染させたNL-17細胞に比べて、cskウイルスを感染させた細胞ではマトリゲルをコートした膜を浸潤、通過した細胞数は減少していた。この結果から、Cskの過剰発現によるNL-17細胞の浸潤能の低下が、*in vivo*における転移能の差の一因になっている可能性が示唆された。

3-6. Cskの過剰発現によるNL-17細胞からの活性型MMP-2産生の低下

マトリゲルによるケモインページョンアッセイにより、CskのoverexpressionによりNL-17細胞の浸潤能が低下することが明らかになった。そこでウイルスを感染させたNL-17細胞の培養上清中のMMPの変化をゼラチンザイモグラムにより検出した。controlのmockウイルスを感染させたNL-17細胞に比べ、Cskウイルスを感染させた細胞では培養上清中のProMMP-2 (progelatinase A) には変化が観察されなかったが、活性型MMP-2 (gelatinase A) の低下が確認された(Figure 7)。以上の実験結果からCskの過剰発現によりSrcの活性が低下し、type IVコラーゲンなどの細胞外基質の分解に重要な役割を果たすMMP-2の活性化が阻害されたと考えられた。

3-7. Cskの過剰発現によるNL-17細胞の*in vivo*浸潤能の低下

cskウイルスとmockウイルスを感染させて48時間培養したNL-17細胞懸濁液 0.2ml (1X10⁶ cells)をBALB/c mouseの背中に皮下注射し、*in vivo*における浸潤能を比較検討した。cskウイルスとmockウイルスを感染させた細胞ともに、皮下注射3週間後に直径約3cmの腫瘍を形

成した。肉眼的には腫瘤の大きさに違いは見られなかった。腫瘍部ならびにその周囲の組織を展開してみると、control群では背部の筋肉をこえて後腹膜、腎臓まで浸潤していたが、csk群では筋肉まで浸潤しているにとどまった。ホルマリン固定後ヘマトキシリン・エオジン染色を行い病理組織的検討をしたところ、control群ではFigure 8に見られるように、筋膜を破壊して筋層に浸潤しているのに対し、csk群では同じ部位においてがん細胞が筋膜を越えずに広がっているのが観察された。この結果、Csk過剰発現によりin vivoにおいても浸潤能が低下していることが明らかとなった。

4. 考察

癌の治療成績を支配する重要な因子のひとつは転移といわれている。したがって、転移を制御することができれば治療成績が格段に向上することが期待できる。癌の転移のプロセスは、原発部位からの癌細胞の遊離、脈管・リンパ管を介しての移動、標的臓器への接着・浸潤、さらに増殖が関与する複雑な現象である。現在までにヒトの大腸癌の臨床サンプルを用いた数多くの仕事の蓄積から、大腸癌において細胞膜の内側に存在するチロシンキナーゼであるc-Srcの活性が上昇していることが明らかとなった(3-5)。さらに、c-Srcの活性と大腸癌の浸襲性との強い相関も指摘されてきた(6, 7)。転移との関連では、大腸癌高転移性クローンでは低転移性クローンに比べ著明にc-Srcの活性が上昇していることが最近報告された(8)。またヒト大腸癌細胞株において血管新生において重要な役割を担い、その浸襲性と相関するとされるVEGF(vascular endothelial growth factor)の発現をSrcの活性は制御しているという報告もなされている(23)。しかしながら、c-Srcの活性上昇と転移能獲得との相関を直接説明する分子レベルでのメカニズムは十分に解明されておらず、また大腸癌の転移を克服するためにc-Srcの活性制御を標的とした治療法の可能性を検討した研究は十分なされたとは言い難い。本研究では、c-Srcの活性制御を標的としたがん転移治療法の可能性を検討するために、マウスcolon adenocarcinoma 26より樹立された高転移クローンNL-17細胞による実験的転移の系を用いた。このNL-17細胞はBALB/c mouseの尾静脈にi.v.すると約3週間後肺に転移性結節を多数形成する。この今回用いたマウスの実験的肺転移系は、動物実験において転移を評価するのに一般的に用いられている実験系であり、本研究においてオリジナルなものではない。しかしながら、再現性よく安定して転移巣を形成する点、またマウスのがん細胞を用いておりヌードマウスを用いなくてもよいという長所がある。このNL-17細胞における肺転移形成には、これまでの研究からNL-17細胞の血小板凝集能が関与していること(18, 19)、また肺に多く存在する増殖因子であるIGF-Iに対す

る高い反応性が重要な因子であることが明らかとなっている(24, 25)。NL-17細胞に関しては、その遺伝子にミューテーションがあるかどうかは報告されていないが、他の多くの報告されている大腸癌の細胞株と同様にSrcの活性が上昇していた。

c-Srcの活性はそのC末の527番目のチロシン残基のリン酸化により制御されており、CskはそのC末のチロシン残基をリン酸化することによりc-Srcの活性をnegativeにregulateしている(10)。まずNL-17細胞においてCskによってc-Srcの活性をnegativeにregulate出来るかどうか検討するために、アデノウイルスベクターをもちいてCskを過剰発現させた。

Figure 1bに示すように、lac Z遺伝子の組み込まれたアデノウイルスはMOI 300で95%以上のNL-17細胞に感染した。MOI 300において感染後、細胞に明らかな形態学的変化が観察されず、また細胞の増殖にも影響がなく、アデノウイルスそのものによる細胞毒性は無視できる程度であると考えられた。cskウイルスを感染させたNL-17細胞では、濃度依存的にCskの発現増加が確認され、Cskの発現増加にともないSrcの活性が抑制された。この結果はcskウイルスを感染させることにより、NL-17細胞のSrcの活性が抑制できることを示している。Srcファミリーキナーゼが細胞周期、細胞増殖に関与しているという報告がなされているが(2, 26, 27)、MOI 300においてcskウイルスとmockウイルスを感染させたNL-17細胞では、細胞増殖の差は観察されなかった(Figure 2)。このことから、NL-17細胞の増殖にはSrcの活性以外の他の増殖因子を介するメカニズムが主に関与していると予想される。この結果は大腸癌ではc-Src以外の他の遺伝子も活性化しているという報告とも一致する(28-30)。このin vitroにおける細胞増殖のデータから、cskウイルス感染による細胞増殖変化がin vivoにおける転移能の大きな差に関与している可能性は低いと考えられた。

Srcファミリーのタンパク質は、細胞の接着の過程で、細胞の接着斑に局在して機能していることが知られている(31)。src-/-線維芽細胞ではフィブロネクチンでコートしたディッシュに、野生型の線維芽細胞に比べて、接着して広がるのにより時間がかかると報告されている(32)。そこでcskウイルスとmockウイルスを感染させたNL-17細胞との間で、細胞の接着して広がる効率を比較した。mockウイルスを感染させたNL-17細胞に比べ、Cskを過

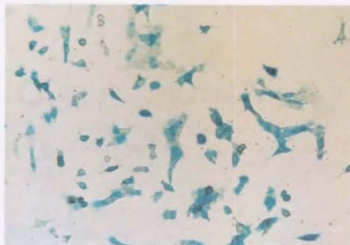
剝発現した細胞では、フィブロネクチンでコートしたディッシュに遅い速度で接着して広がる現象が観察された。この2つのウイルスを感染させた細胞間での接着の差は、細胞をディッシュに加えて2時間で顕著であったが、24時間後では差がなかった。この結果から、Cskの過剰発現ががん細胞の運動性に影響をおよぼしているのではないかと考え、トランスウェル・チャンバーを用いてフィブロネクチンに対するケモタキシスの差を比較した。しかしながら予想に反して、2つのウイルスを感染させた細胞間でフィブロネクチンに対する走化性の違いは観察されなかった(figure 4a)。そこで、*in vitro*において再構成した基底膜であるマトリゲルを浸潤する能力、すなわちケモインベーションの違いを検討した。cskウイルスを感染させたNL-17細胞では、mockウイルスを感染させたNL-17細胞に比べ、マトリゲルをコートした膜を通過した細胞は著明に少なかった。マトリゲルに対する浸潤能と細胞が産生するMMPの活性は強く相関していることが知られており(22)、Cskの過剰発現がMMPの活性をdown-regulateしていると考えられた。ゼラチンゼイモグラム法により、培養上清中に産生されるMMPを定量的に検討したところ、cskウイルスを感染させたNL-17細胞では活性型MMP-2 (gelatinase A)の減少が観察された。一方、活性型MMP-2 (Pro-gelatinase A)の前駆体であるProMMP-2の産生量には変化がなかった。さらにBALB/cマウスの背中下の皮下にウイルスを感染させたNL-17細胞を移植して、*in vivo*における浸潤能の差を観察した。controlの細胞に比べてcskウイルスを感染させたNL-17細胞では、その皮下結節の大きさには差は見られなかったが、浸潤能が低下しておりケモインベーションアッセイとゼラチンモグラム法の結果と一致した(Figure 7)。cskウイルスを感染させたNL-17細胞において活性型MMP-2の産生が減少し、さらにマウスの皮下注後の浸潤能が低下するという実験結果から、cskウイルスによる遺伝子導入はSrcキナーゼ活性が亢進している高浸潤性結腸がんの転移抑制ばかりでなく、がん原発巣に対してもその浸潤を抑制することにより応用できる可能性があると考えられる。がん細胞におけるMMP-2の活性には、がん細胞の表面に発現しているMT1-MMPなどの膜型マトリックス・メタロプロテアーゼが関与しているとされる(33-39)。またv-srcによりtransformした腎上皮細胞MDCKで

は、MT1-MMPの発現が誘導されるという報告もされている(40)。これらの報告と本研究における結果を総合して考えてみると、Cskの過剰発現によりSrcの活性を抑制することにより、NL-17細胞のMT1-MMPなどのMMP-2を活性化する機構が阻害され、細胞の浸潤能が低下し、in vivoにおける実験的転移が抑制されたという可能性が強く示唆される。csk遺伝子導入によるNL-17細胞の実験的転移結節数の減少に寄与する要因として、本研究において明らかになった浸潤能の低下以外にも、血管新生やレシビエントの免疫機能への関与などの可能性もあり、今後これらの要因についての検討が必要であると考えられる。またEGFRやIGF-IRなどの増殖因子レセプターがSrcキナーゼの機能を調節して、細胞のトランスフォーメーションに関与しているという報告(29, 30, 41, 42)や、SrcキナーゼとCskがIGF-IRの機能を調節しているという報告(43)がなされているが、Srcキナーゼの活性に伴ってその下流で変化する分子に関しては、まだその詳細が判明しておらず、今後の研究の展開により新たな転移抑制につながるメカニズムが解明される可能性があると思われる。



5. 図

a



b

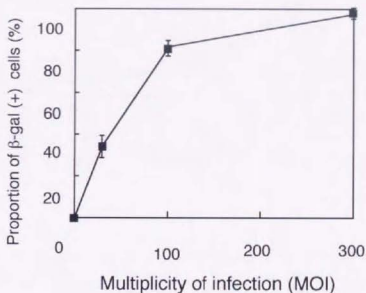


Figure 1 Efficient adenovirus-mediated gene transfer into highly metastatic variant clone of mouse colon adenocarcinoma 26, NL-17. *a*, To determine the efficiency of infection with the recombinant adenovirus, NL-17 cells were infected with the recombinant adenovirus carrying the lacZ gene. 2 days after the infection, the cells were fixed with formaldehyde with X-gal-staining solution. *b*, Dose dependent effect of the recombinant adenovirus on the proportion of NL-17 cells positive for β -gal expression. More than 95% of NL-17 were positive for β -gal activity at a MOI of 300.

Figure 1

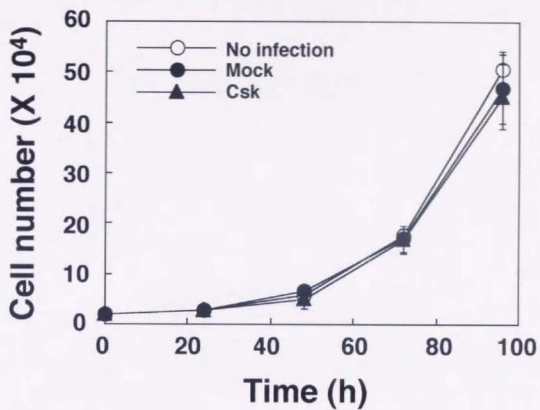


Figure 2 The growth of csk virus-infected NL-17 cells, mock virus-infected NL-17 cells and non-infected NL-17 cells. Cells (2X10⁴ cells/well) were plated and cultured for 24, 48, 72, 96h. Cell number was counted after trypsinization on a hemocytometer (n=4).

Figure 2

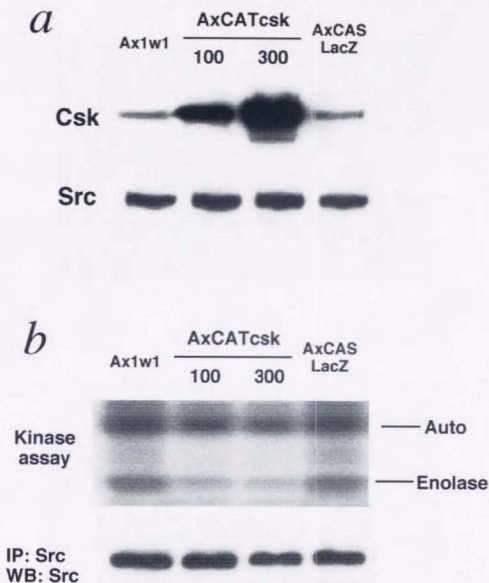


Figure 3 Dose dependent effect of Csk overexpression on specific activity of Src. *a*, NL-17 cells were infected with either the mock virus (Ax1w1), csk virus (AxCATcsk), or the lac Z virus (AxCASLacZ) at a MOI of 300. In the case of Csk, the MOI was varied as indicated. After 2 days of the infection, expression of Csk and Src were detected by Western blotting. *b*, To estimate the kinase activity of Src, the immunoprecipitate with anti-Src antibody was incubated with enolase and $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$. The radioactives incorporated into Src, and enolase was visualized by autoradiography. The amount of c-Src protein immunoprecipitated was detected by Western blotting with anti-Src antibody.

Figure 3



Ax1w1

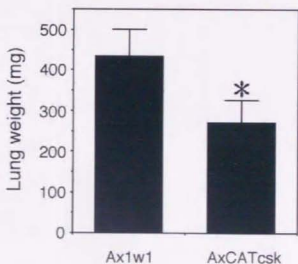
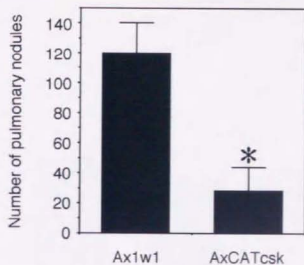


AxCATcsk

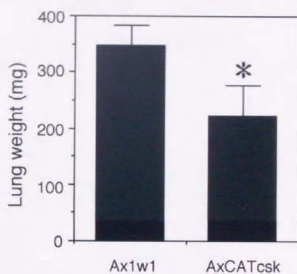
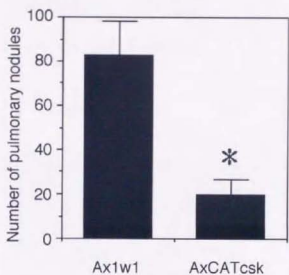
Figure 4 Suppression of pulmonary metastasis of Csk-expressing NL-17 cells in vivo. The pictures of lungs from BALB/c mice bearing esk virus (AxCATcsk:MOI 300) or mock virus (Ax1w1:MOI 300)-infected NL-17 cells 21 days after i.v. tumor (2.5×10^4 cells) inoculation.

Figure 4

NO 1



NO 2



NO 3

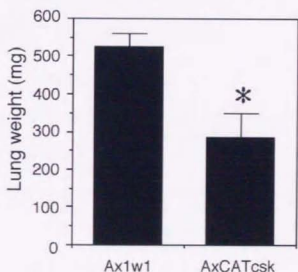
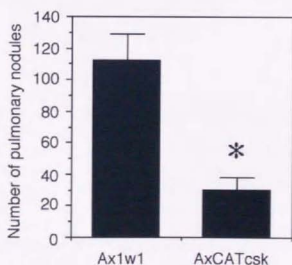


Figure 5 Nodules on the surface of lungs were counted, and lungs weights were weighed. The data represent the mean with S.D.; n=6; *, p<0.01 The graphs show data from three independently performed experiments.

Figure 5

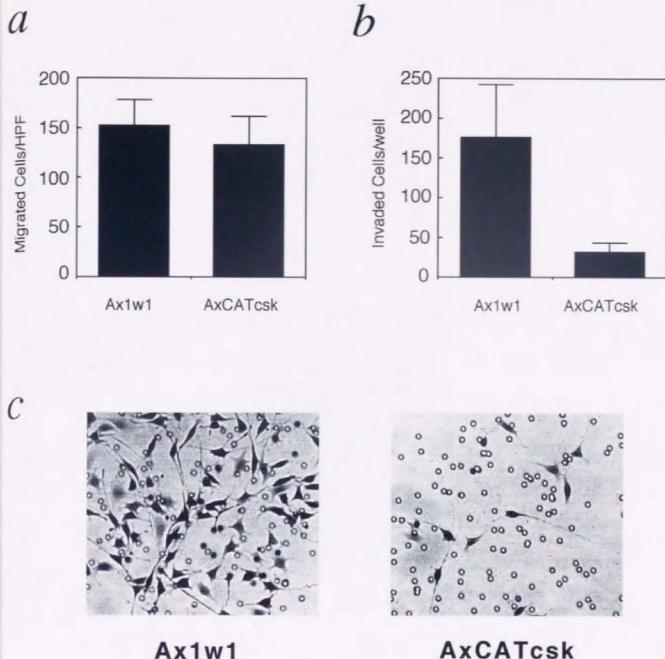


Figure 6 Csk overexpressed cells display no deficient migration, but show reduced *in vitro* invasiveness in Matrigel. **a**, To measure cell motility, Csk overexpressed cells were added to the upper chamber, incubated for 12 hours and allowed to migrate through the membrane into the lower chamber. Migrated cells on the lower side of the membrane were enumerated. The data represent the mean with S.D. of three wells from three independent experiments. **b**, Results of the Matrigel invasion assay. Csk-expressing cells were seeded onto matrigel-coated membrane. After 24 hours incubation, cells invaded the lower surface of the matrigel filter were enumerated. The experiments were carried out three times. The data represent the mean with S.D. in triplicate. **c**, Cells migrating onto lower surface of Matrigel membrane were fixed and stained.

Figure 6

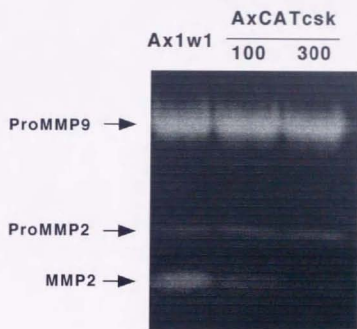
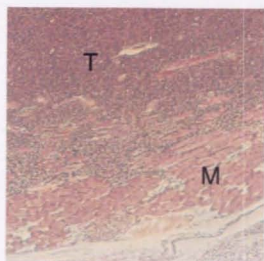


Figure 7 Inhibition of MMP-2 (Gelatinase A) activities in Csk overexpressed cells. MMP (Gelatinase) activity in serum-free conditioned media of csk virus (AxCATcsk;MOI 100-300)- or mock virus (Ax1w1;MOI 300)-infected NL-17 cells were determined by zymographic analysis. These data are representative of three experiments.

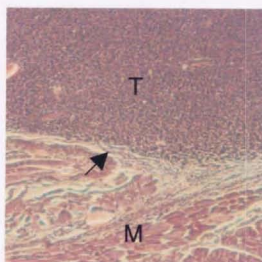
Figure 7

a



Ax1w1

b



AxCATcsk

Figure 8 Effect of Csk overexpression on histopathology of subcutaneously planted NL-17 cells. Hematoxylin and eosin staining of sections of paraffin-embedded tissue specimens 21 days after subcutaneously inoculation of (a) mock virus (Ax1w1)-infected NL-17 cells and (b) csk virus (AxCATcsk)-infected NL-17 cells (1X10⁶ cells/mouse). tumors (T) ; paravertebral muscle (M) ; fascia (arrows)

Figure 8

総括

本研究において、マウス結腸癌高転移クローンであるNL-17細胞に、アデノウィルスベクターを用いてcsk (C-terminal Src kinase) 遺伝子を導入することにより、Srcのキナーゼ活性を抑制できること、このCskを過剰発現させたNL-17細胞をBALB/c mouseに尾静注して、実験的肺転移に対する効果を検討したところ、コントロールに比べて肺転移が著明に減少することを見いだした。さらにこの実験的肺転移の抑制のメカニズムとして、csk遺伝子を導入によりマトリゲルに浸潤する能力が低下していること、また活性型MMP-2の産生が抑制されることが明らかとなった。実際に遺伝子治療への応用を考えた場合、大量のアデノウィルス直接人体に投与した場合、アデノウィルス由来の遺伝子が少量発現するため細胞性免疫反応を引き起こすこと、またがん細胞以外の正常細胞にも感染してしまうといった特異性などの問題点が現在のところ存在する。しかしながら、アデノウィルスには生体内で固形がんをはじめとした、多くの種類の細胞に感染することができ、目的の遺伝子を効率よく導入できるという長所がある(44, 45)。また、CEAなどの悪性腫瘍に特異的に発現しているタンパク質に反応するプロモーターを組み込まれたアデノウィルスベクターを用いた、癌特異的遺伝子治療の開発が進んでいる(46, 47)。したがって、将来様々なアプローチからの研究が展開し、これらの問題点が解決されたならば、アデノウィルスベクターを用いたcsk遺伝子の導入は大腸癌の転移の阻止に有望な一つの手段であると考えられる。さらに本研究の結果から考えると、特異性が高く毒性の低いSrc阻害剤、MMP阻害剤も大腸癌の転移の阻止に有望であり、これらの新しい薬剤の開発が待たれるところである。

謝辞

本研究は東京大学分子細胞生物学研究所・分子活性において行わせていただきました。このようなすばらしい機会を与えていただき、また終始御理解、御鞭撻を賜りました東京大学整形外科学教室・中村耕三教授ならびに黒川高秀名誉教授に深甚なる謝意を表します。

本研究を行うにあたり、直接に御指導、御助言を賜りました、東京大学分子細胞生物学研究所・所長 鶴尾隆教授に厚く御礼申し上げます。

実験を進める上でいろいろな有益なアドバイスを下さった、同研究分野の鈴木裕之君に感謝いたします。

多くの御指導、ご協力をいただきました、同研究分野の藤田直也助手に感謝いたします。

有益な討論をして下さり、さらにアデノウィルスベクターを供与していただいた東京大学整形外科学教室・田中栄先生、高柳広先生ならびに宮崎剛先生に御礼申し上げます。

参考文献

1. Hamaguchi, M., Wang, X. D., Machida, K., and Itoh, Y. [Cell transformation by Src kinase: role of cell adhesion system as a signal transducer], *Tanpakushitsu Kakusan Koso*. 42: 1687-93, 1997.
2. Brown, M. T. and Cooper, J. A. Regulation, substrates and functions of src, *Biochim Biophys Acta*. 1287: 121-49, 1996.
3. Cartwright, C. A., Kamps, M. P., Meisler, A. I., Pipas, J. M., and Eckhart, W. pp60c-src activation in human colon carcinoma, *J Clin Invest*. 83: 2025-33, 1989.
4. Cartwright, C. A., Meisler, A. I., and Eckhart, W. Activation of the pp60c-src protein kinase is an early event in colonic carcinogenesis, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 87: 558-62, 1990.
5. Garcia, R., Parikh, N. U., Saya, H., and Gallick, G. E. Effect of herbimycin A on growth and pp60c-src activity in human colon tumor cell lines, *Oncogene*. 6: 1983-9, 1991.
6. Talamonti, M. S., Roh, M. S., Curley, S. A., and Gallick, G. E. Increase in activity and level of pp60c-src in progressive stages of human colorectal cancer, *J Clin Invest*. 91: 53-60, 1993.
7. Termuhlen, P. M., Curley, S. A., Talamonti, M. S., Saboorian, M. H., and Gallick, G. E. Site-specific differences in pp60c-src activity in human

colorectal metastases, *J Surg Res.* 54: 293-8, 1993.

8. Mao, W., Irby, R., Coppola, D., Fu, L., Wloch, M., Turner, J., Yu, H., Garcia, R., Jove, R., and Yeatman, T. J. Activation of c-Src by receptor tyrosine kinases in human colon cancer cells with high metastatic potential, *Oncogene.* 15: 3083-90, 1997.

9. Cooper, J. A. and Howell, B. The when and how of Src regulation, *Cell.* 73: 1051-4, 1993.

10. Okada, M., Nada, S., Yamanashi, Y., Yamamoto, T., and Nakagawa, H. CSK: a protein-tyrosine kinase involved in regulation of src family kinases, *J Biol Chem.* 266: 24249-52, 1991.

11. Nada, S., Yagi, T., Takeda, H., Tokunaga, T., Nakagawa, H., Ikawa, Y., Okada, M., and Aizawa, S. Constitutive activation of Src family kinases in mouse embryos that lack Csk, *Cell.* 73: 1125-35, 1993.

12. Imamoto, A. and Soriano, P. Disruption of the csk gene, encoding a negative regulator of Src family tyrosine kinases, leads to neural tube defects and embryonic lethality in mice, *Cell.* 73: 1117-24, 1993.

13. Sabe, H., Knudsen, B., Okada, M., Nada, S., Nakagawa, H., and Hanafusa, H. Molecular cloning and expression of chicken C-terminal Src kinase: lack of stable association with c-Src protein, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89: 2190-4, 1992.

14. Chow, L. M., Fournel, M., Davidson, D., and Veillette, A. Negative regulation of T-cell receptor signalling by tyrosine protein kinase p50csk, *Nature*. 365: 156-60, 1993.
15. Takayama, Y., Tanaka, S., Nagai, K., and Okada, M. Adenovirus-mediated overexpression of C-terminal Src kinase (Csk) in type I astrocytes interferes with cell spreading and attachment to fibronectin. Correlation with tyrosine phosphorylations of paxillin and FAK, *J Biol Chem*. 274: 2291-7, 1999.
16. 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: 5437-42, 1983.
17. Tanaka, S., Takahashi, T., Takayanagi, H., Miyazaki, T., Oda, H., Nakamura, K., Hirai, H., and Kurokawa, T. Modulation of osteoclast function by adenovirus vector-induced epidermal growth factor receptor, *J Bone Miner Res*. 13: 1714-20, 1998.
18. 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: 921-5, 1991.
19. Kato, Y., Fujita, N., Yano, H., and Tsuruo, T. Suppression of experimental lung colonization of mouse colon adenocarcinoma 26 in vivo by an

anti-idiotypic monoclonal antibody recognizing a platelet surface molecule, *Cancer Res.* 57: 3040-5, 1997.

20. Yu, D. H., Qu, C. K., Henegariu, O., Lu, X., and Feng, G. S. Protein-tyrosine phosphatase Shp-2 regulates cell spreading, migration, and focal adhesion, *J Biol Chem.* 273: 21125-31, 1998.

21. Albini, A., Iwamoto, Y., Kleinman, H. K., Martin, G. R., Aaronson, S. A., Kozlowski, J. M., and McEwan, R. N. A rapid in vitro assay for quantitating the invasive potential of tumor cells, *Cancer Res.* 47: 3239-45, 1987.

22. Hamaguchi, M., Yamagata, S., Thant, A. A., Xiao, H., Iwata, H., Mazaki, T., and Hanafusa, H. Augmentation of metalloproteinase (gelatinase) activity secreted from Rous sarcoma virus-infected cells correlates with transforming activity of src, *Oncogene.* 10: 1037-43, 1995.

23. Ellis, L. M., Staley, C. A., Liu, W., Fleming, R. Y., Parikh, N. U., Bucana, C. D., and Gallick, G. E. Down-regulation of vascular endothelial growth factor in a human colon carcinoma cell line transfected with an antisense expression vector specific for c-src, *J Biol Chem.* 273: 1052-7, 1998.

24. Koenuma, M., Yamori, T., and Tsuruo, T. Insulin and insulin-like growth factor 1 stimulate proliferation of metastatic variants of colon carcinoma 26, *Jpn J Cancer Res.* 80: 51-8, 1989.

25. Yamori, T., Iizuka, Y., Takayama, Y., Nishiya, S., Iwashita, S.,

Yamazaki, A., Takatori, T., and Tsuruo, T. Insulin-like growth factor I 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: 5859-65, 1991.

26. Parsons, J. T. and Parsons, S. J. Src family protein tyrosine kinases: cooperating with growth factor and adhesion signaling pathways, *Curr Opin Cell Biol.* 9: 187-92, 1997.

27. Thomas, S. M. and Brugge, J. S. Cellular functions regulated by Src family kinases, *Annu Rev Cell Dev Biol.* 13: 513-609, 1997.

28. Luttrell, D. K., Lee, A., Lansing, T. J., Crosby, R. M., Jung, K. D., Willard, D., Luther, M., Rodriguez, M., Berman, J., and Gilmer, T. M. Involvement of pp60c-src with two major signaling pathways in human breast cancer, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91: 83-7, 1994.

29. Maa, M. C., Leu, T. H., McCarley, D. J., Schatzman, R. C., and Parsons, S. J. Potentiation of epidermal growth factor receptor-mediated oncogenesis by c-Src: implications for the etiology of multiple human cancers, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92: 6981-5, 1995.

30. Muthuswamy, S. K. and Muller, W. J. Direct and specific interaction of c-Src with Neu is involved in signaling by the epidermal growth factor receptor, *Oncogene.* 11: 271-9, 1995.

31. Liebl, E. C. and Martin, G. S. Intracellular targeting of pp60src expression: localization of v-src to adhesion plaques is sufficient to transform chicken embryo fibroblasts, *Oncogene*. 7: 2417-28, 1992.
32. Kaplan, K. B., Swedlow, J. R., Morgan, D. O., and Varmus, H. E. c-Src enhances the spreading of src-/- fibroblasts on fibronectin by a kinase-independent mechanism, *Genes Dev*. 9: 1505-17, 1995.
33. Nakamura, H., Ueno, H., Yamashita, K., Shimada, T., Yamamoto, E., Noguchi, M., Fujimoto, N., Sato, H., Seiki, M., and Okada, Y. Enhanced production and activation of progelatinase A mediated by membrane-type 1 matrix metalloproteinase in human papillary thyroid carcinomas, *Cancer Res*. 59: 467-73, 1999.
34. Kleiner, D. E. and Stetler-Stevenson, W. G. Matrix metalloproteinases and metastasis, *Cancer Chemother Pharmacol*. 43: S42-51, 1999.
35. Nomura, H., Sato, H., Seiki, M., Mai, M., and Okada, Y. Expression of membrane-type matrix metalloproteinase in human gastric carcinomas, *Cancer Res*. 55: 3263-6, 1995.
36. Ueno, H., Nakamura, H., Inoue, M., Imai, K., Noguchi, M., Sato, H., Seiki, M., and Okada, Y. Expression and tissue localization of membrane-types 1, 2, and 3 matrix metalloproteinases in human invasive breast carcinomas, *Cancer Res*. 57: 2055-60, 1997.

37. Pulyaeva, H., Bueno, J., Polette, M., Birembaut, P., Sato, H., Seiki, M., and Thompson, E. W. MT1-MMP correlates with MMP-2 activation potential seen after epithelial to mesenchymal transition in human breast carcinoma cells [published erratum appears in *Clin Exp Metastasis* 1997 May;15(3):338], *Clin Exp Metastasis*. 15: 111-20, 1997.

38. Sato, H., Takino, T., Okada, Y., Cao, J., Shinagawa, A., Yamamoto, E., and Seiki, M. A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells [see comments], *Nature*. 370: 61-5, 1994.

39. Ohuchi, E., Imai, K., Fujii, Y., Sato, H., Seiki, M., and Okada, Y. Membrane type 1 matrix metalloproteinase digests interstitial collagens and other extracellular matrix macromolecules, *J Biol Chem*. 272: 2446-51, 1997.

40. Kadono, Y., Okada, Y., Namiki, M., Seiki, M., and Sato, H. Transformation of epithelial Madin-Darby canine kidney cells with p60(v- src) induces expression of membrane-type 1 matrix metalloproteinase and invasiveness, *Cancer Res*. 58: 2240-4, 1998.

41. Wilde, A., Beattie, E. C., Lem, L., Riethof, D. A., Liu, S. H., Mobley, W. C., Soriano, P., and Brodsky, F. M. EGF receptor signaling stimulates SRC kinase phosphorylation of clathrin, influencing clathrin redistribution and EGF uptake, *Cell*. 96: 677-87, 1999.

42. Valentini, B., Morrione, A., Taylor, S. J., and Baserga, R. Insulin-like

growth factor I receptor signaling in transformation by src oncogenes, *Mol Cell Biol.* 17: 3744-54, 1997.

43. Arbet-Engels, C., Tartare-Deckert, S., and Eckhart, W. C-terminal Src kinase associates with ligand-stimulated insulin-like growth factor-I receptor, *J Biol Chem.* 274: 5422-8, 1999.

44. Liu, T. J., Zhang, W. W., Taylor, D. L., Roth, J. A., Goepfert, H., and Clayman, G. L. Growth suppression of human head and neck cancer cells by the introduction of a wild-type p53 gene via a recombinant adenovirus, *Cancer Res.* 54: 3662-7, 1994.

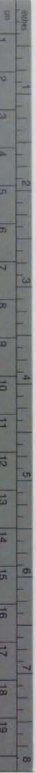
45. Chen, S. H., Shine, H. D., Goodman, J. C., Grossman, R. G., and Woo, S. L. Gene therapy for brain tumors: regression of experimental gliomas by adenovirus-mediated gene transfer in vivo, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91: 3054-7, 1994.

46. Kaneko, S., Hallenbeck, P., Kotani, T., Nakabayashi, H., McGarrity, G., Tamaoki, T., Anderson, W. F., and Chiang, Y. L. Adenovirus-mediated gene therapy of hepatocellular carcinoma using cancer-specific gene expression, *Cancer Res.* 55: 5283-7, 1995.

47. Tanaka, T., Kanai, F., Okabe, S., Yoshida, Y., Wakimoto, H., Hamada, H., Shiratori, Y., Lan, K., Ishitobi, M., and Omata, M. Adenovirus-mediated prodrug gene therapy for carcinoembryonic antigen-producing human gastric

carcinoma cells in vitro, *Cancer Res.* 56: 1341-5, 1996.





Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM Kodak

Blue	Cyan	Green	Yellow	Red	Magenta	White	3/Color	Black
[Patch 1]	[Patch 2]	[Patch 3]	[Patch 4]	[Patch 5]	[Patch 6]	[Patch 7]	[Patch 8]	[Patch 9]

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

