

# The role of transcription factor c-ets-1 in the progression of human gastric cancer

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/9368">http://hdl.handle.net/2297/9368</a>

## 胃がんの進展における転写因子 *c-ets-1* の発現と役割

金沢大学医学部医学科外科学第二講座 (主任: 三輪晃一教授)

藤 田 秀 人

転写因子 ETS-1 蛋白は増殖因子やサイトカインなどの細胞外刺激に対して起こる細胞内シグナル伝達系の最終エフェクター分子の一つである。ETS-1 蛋白は、リンパ球細胞の増殖、分化および発生に関与する因子の遺伝子発現調節を担うと共に、形態形成や組織再構築に伴う血管新生に重要な細胞外マトリックス分解酵素および細胞接着因子の発現にも深く関わっている。特に、ETS-1 により発現調節を受けるこれらの血管新生関連遺伝子は腫瘍血管の新生のみならず、がん細胞の浸潤と転移においても重要な機能を果たすことが既に明らかにされているが、がん細胞内における ETS-1 蛋白の機能や転移形質との関連性に関しては明らかではない。本研究では、胃がんの悪性形質発現の細胞内活性化因子として ETS-1 蛋白および *c-ets-1* 遺伝子に着目し、ヒト胃がん培養細胞株および胃がん組織における *c-ets-1* の発現と転移関連因子の遺伝子発現を解析し、それらの相互関連性および浸潤、転移との相関について検討した。ヒト胃がん培養細胞6株における遺伝子発現を逆転写-PCR法により解析した結果、5株において、*c-ets-1*、ウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベーター (urokinase-type plasminogen activator, u-PA)、マトリックスメタロプロテアーゼ (matrix metalloproteinase, MMP)-1、MMP 阻害因子-1、インテグリン- $\alpha 2$ 、インテグリン- $\alpha 3$ 、インテグリン- $\beta 4$  および *c-met* 遺伝子の協調的発現を認めた。また、*c-ets-1* mRNA に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド処理により、胃がん細胞株 NUGC-3 の u-PA と MMP-1 の発現および、インテグリン- $\alpha 2$  蛋白の発現の低下が認められ、ETS-1 蛋白がこれらの遺伝子発現を正に制御していることが示された。原発性胃がん103例における抗 ETS-1 抗体を用いた免疫組織化学染色では、73例 (71%) で ETS-1 蛋白の発現が、がん細胞の核内と細胞質に認められた。ETS-1 蛋白の発現は分化型の胃がんによく、壁深達度、肝転移との間に統計学的に有意な相関を認め、発現群は非発現群より有意に予後不良であった。また、ETS-1 蛋白発現と u-PA および MMP-1 蛋白発現との間に正の相関を認めた。以上の結果から、ETS-1 蛋白の発現は胃がんの悪性形質発現における細胞外マトリックス分解酵素および細胞接着因子の協調的な転写活性化に関与していることが明らかにされた。

**Key words** gastric cancer, *c-ets-1*, extracellular matrix degradation enzymes, antisense oligonucleotide, metastasis

*c-ets-1* 遺伝子は、鳥類の白血病ウイルスである E26 から単離された *v-ets* のホモログとして同定されたがん原性遺伝子である<sup>1)</sup>。*c-ets-1* の遺伝子産物である ETS-1 蛋白はヘリックス・ターン・ヘリックス構造を有し、C 末端側の 85 個のアミノ酸からなる DNA 結合ドメインによって標的遺伝子の転写調節領域に存在する *ets* 結合配列 (GGAA/T) に結合することにより、その転写を調節する。*c-ets-1* の DNA 結合ドメインと相同性の高い構造を有する遺伝子産物が次々と同定され、*ets* 群遺伝子ファミリーを形成しているが、*c-ets-1* はそれらのプロタイプである<sup>2)</sup>。

がん細胞の組織浸潤性と遠隔臓器への転移性の発現においては、ウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベーター (urokinase-type plasminogen activator, u-PA) やマトリックスメタロプロテアーゼ (matrix metalloproteinase, MMP) などの基底膜や間質の細胞外マトリックス成分 (extracellular matrix, ECM) の分解酵素や、基底膜細胞間あるいは細胞-ECM 間の相互作用に関わる細胞接着因子などのいわゆる癌転移関連因子

は、最も重要な形質となる<sup>3)</sup>。最近、これらの因子の発現には、*ets* ファミリーを介した転写調節系が存在していることが示唆されている。胃がんについても、転移関連遺伝子と臨床病理学的悪性度との関連性が示されてきた<sup>4-6)</sup>。しかし、個々の転移関連因子についての解析は進んでいるが、それらの相互関係やその制御機構についての研究報告は少ない。

本研究では胃がん細胞における、転写因子 *c-ets-1* を中心とした転移関連遺伝子発現の制御系について検討を行い、さらに臨床での胃がんの浸潤、転移における ETS-1 蛋白の発現意義を明らかにすることを目的とした。

### 材料および方法

#### I. 材 料

##### 1. 培養細胞株

本研究に用いたヒト細胞株は、ヒト胃がん由来細胞株として MKN-45, NUGC-3, KATO-III (ヒューマンサイエンス研究資源

平成9年11月27日受付, 平成9年12月26日受理

Abbreviations: DTT, dithiothreitol; ECM, extracellular matrix; FBS, fetal bovine serum; HGF, hepatocyte growth factor; MMP, matrix metalloproteinase; MT-MMP, membrane type-MMP; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide; PAI, plasminogen activator inhibitor; PBS, phosphate-buffered saline; RT-PCR,

バンクより供与), KKLS, NKPS (以上2株は金沢大学がん研究所外科より供与), TMK-1 (広島大学病理学教室より供与)の6種と, 不活化した胎児線維芽細胞であるKMST-6 (金沢大学がん研究所ウイルス部より供与)の計7種類である。組織培養液としては10%非働化ウシ胎児血清 (fetal bovine serum, FBS) (Gibco, Grand Island, USA) と50 $\mu$ g/mlカナマイシン (和光, 大阪) を含むRPMI-1640培地 (日水製薬, 東京) を用いた。各細胞は組織培養液中において, 5% CO<sub>2</sub>存在下, 37℃で培養した。

## 2. 対象症例

1985年より1993年の間に金沢大学第二外科にて外科的に切除された原発性胃がん103例の10%ホルマリン固定切除標本を用いた。症例の内訳は, 管状腺がん35例, 乳頭状腺がん7例, 低分化腺がん53例, 粘液がん4例, 印環細胞がん4例であり, 病期別には, Ia期およびIb期17例, II期30例, IIIa期およびIIIb期28例, IVa期およびIVb期28例であった。各臨床病理学的因子の記載は胃がん取り扱い規約 (改訂12版)<sup>9)</sup>に従った。

## II. 逆転写-PCR法 (reverse transcription-PCR, RT-PCR)

### を用いた mRNA 発現の解析

#### 1. がん細胞株からの RNA 抽出

細胞 (10<sup>7</sup>個) に1mlのアイソジェン (ニッポンジーン, 東京) を加え懸濁させた。室温にて5分間放置し, 0.2mlのクロロホルムを加え, 振盪後室温にて2~3分間放置した。続いて4℃において12,000rpm, 10分間遠心した。上層を新しいチューブに移し, 0.5mlのイソプロパノールを加えて混合し, 室温で5分間放置した後, 4℃において12,000rpm, 10分間遠心した。1mlの75%エタノールを加え洗浄し, 風乾した後滅菌蒸留水を加え溶解させた。260nmにおける吸光度を測定し, 1ODを40 $\mu$ g/mlとしてRNA濃度を算出した。RNA試料は滅菌蒸留水を用いて400 $\mu$ g/mlに調製し, 引き続きRT反応およびPCR (RT-PCR) 法を行った。

#### 2. RT-PCRプライマーおよびプローブ用オリゴヌクレオチドの作成

表1に, RT-PCRに用いた28種の遺伝子に対する特異的なプライマーおよびプローブを示す。対象とした遺伝子は以下のとおりである; ヒト *c-ets-1*, *u-PA* とその関連遺伝子として, プラスミノゲンアクチベーター阻害因子 (plasminogen activator inhibitor, PAI)-1, PAI-2, *u-PA* 受容体 (*u-PA* receptor, *u-PAR*), MMPとその関連遺伝子として, MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-9, 膜貫通型 (membrane type) 1-MMP, MT2-MMP, MT3-MMP, MMP阻害因子 (tissue inhibitors of metalloproteinase, TIMP)-1, TIMP-2, インテグリン遺伝子としては $\alpha$ および $\beta$ サブユニットの各々に対して, インテグリン- $\alpha$ 2, - $\alpha$ 3, - $\alpha$ 4, - $\alpha$ 5, - $\alpha$ 6, - $\alpha$ v, - $\beta$ 1, - $\beta$ 3, - $\beta$ 4, - $\beta$ 5, がん原性遺伝子として, *c-met*, *c-erbB-2*, 内部標準として $\beta$ -アクチンをRT-PCRの対象とした (表1)。プローブの<sup>32</sup>P標識は, プローブ13pmolに対し [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP 50 $\mu$ Ci (Amersham, Buckinghamshire, England), ポリヌクレオチドキナーゼ緩衝液 [50mM Tris-HCl (pH7.6), 10mM MgCl<sub>2</sub>, 5mM ジチオトレイトール (dithiothreitol, DTT), 10mM スペルミジン, 0.1mM EDTA (pH8.0)], 10単位T4キナーゼ (宝酒造, 京都) および滅

Table 1. Oligonucleotide primers and probes for the RT-PCR analysis

Target gene	Primer and probe <sup>a)</sup>	Expected size of PCR product (bp)
<i>c-ets-1</i>	5'-GATAGCAAAGTAGTCTTCTGC-3' 5'-TCAAGTTAATGGAGTCAACCCA-3' 5'-AAGAGCTCCTCCCTCAAGTATGA-3'	259
<i>u-PA</i>	5'-AGAATTCACCACCATCGAGA-3' 5'-ATCAGCTTCACAACAGTCAAT-3' 5'-AGGCAGATGGTCTGTATAGT-3'	474
<i>u-PAR</i>	5'-TTACTCGAATGCATTTCTC-3' 5'-TTGCACAGCCTCTTACCATA-3' 5'-TCATCAGACATGAGCTGTGA-3'	455
PAI-1	5'-ATGGGATTCAGATTGATGA-3' 5'-TCAGTATAGTTGAACCTGTG-3' 5'-AGAGAGCCAGATTCATCAAT-3'	452
PAI-2	5'-TAAGCTGTTGGTGAGAAGT-3' 5'-TACATCATCTGTACAGGTGT-3' 5'-TAGACTTCTAGAAATGTGCA-3'	327
<i>c-met</i>	5'-AACTCTAGATGCTCAGACTTT-3' 5'-AACGACTTCTTCAACAAGAT-3' 5'-ACAAAGCAAGCCAGATTCGCGCA-3'	330
<i>c-erbB-2</i>	5'-GATGTAATTTGATGGTGAACCT-3' 5'-ATCTGGCTGGTTCACATATT-3' 5'-ACCCAGCCCTCTACAGGGTACAGTGAAG-3'	183
$\beta$ -actin	5'-GAAAACTGGCACCACACCTT-3' 5'-TTGAAGGTAGTTCTGGGAT-3' 5'-ACTGACTACCTCATGAAGAT-3'	592
MMP-1	5'-AAAGTGACTGGAAACCAGAT-3' 5'-ATATCAGTGAATGGGAGAGTCT-3' 5'-AGCAGACATCATGATATCTTTGTC-3'	476
MMP-2	5'-TTCTTCAAGGACCGGTTCTT-3' 5'-AGTCGGATTTGATGCTTCCAA-3' 5'-TTGATGCGGTATACGAGGCCCA-3'	511
MMP-3	5'-CCACCTTACATACAGGATTGT-3' 5'-TATATCATCTTGAGACAGCCG-3' 5'-TGATGAAGGAGAGGCTGATA-3'	433
MMP-7	5'-ATGTTAACTCCCGCTCATTA-3' 5'-CAGCATACAGGAAGTTAATCC-3' 5'-TGCCAGATGTTGCCAGAACT-3'	418
MMP-9	5'-TGGCAGAAATAGGCTTTCTCT-3' 5'-GGAAACAGCTGATTTGTTCA-3' 5'-TTCAAGGATGGGAAAGTACTGGCGAT-3'	442
TIMP-1	5'-TGCACCTGTGTCACCCACCCAGACAG-3' 5'-GGCTATCTGGGACCCGAGGACTGTCGAG-3' 5'-TTCACCAAGACCTACACTGTTGGCT-3'	552
TIMP-2	5'-CCGACGCTGCAGCTGCTCCCGGTGCACCCG-3' 5'-GGAAAGCTTTATGGGTCCTCGATGTCGAG-3' 5'-ATGGCAACCCATCAAGAGGATCCA-3'	601
MT1-MMP	5'-GCTTGAAGTAAACAGGCAAA-3' 5'-AAATTCCTCGTTCACATCCA-3' 5'-CTACATCCGTGAGGGCCATGAGA-3'	591
MT2-MMP	5'-TCGACGAAGAGACCAAGGAGT-3' 5'-CTTGAAGTTGTCAACGCTCT-3' 5'-GGAAAGTGAACAACCCAT-3'	578
MT3-MMP	5'-ATGTGCTACAGTCTGGGAACT-3' 5'-TATCCACATCACTTTGCCA-3' 5'-GTGGACAGAAACAAATTGAC-3'	461
Integrin- $\alpha$ 2	5'-TGACATCAGTTGTAATGTCAG-3' 5'-TGGTCTCATCAATCTCATCT-3' 5'-ACTTTCGATCATCAACGTTCCAG-3'	485
Integrin- $\alpha$ 3	5'-AGTGTACATCTATCACAGTA-3' 5'-ATCTGCAAGTTGCTCTACA-3' 5'-GATGTGGATGAGAACTTCTA-3'	687
Integrin- $\alpha$ 4	5'-AACTTCTGACGTGATTACAGGA-3' 5'-GTAGTTGACATGTAGAGTCTG-3' 5'-AAACTTTGCAAGGTTTGTGCC-3'	422
Integrin- $\alpha$ 5	5'-GCGCTCAGTGTACAGCTG-3' 5'-CAGCAGTCACTCAGCCCG-3' 5'-CGAGTACCTGATCAACTGGTTCA-3'	564
Integrin- $\alpha$ 6	5'-GAGGAATATTCAAAACCTGAAC-3' 5'-AACACTGTCACTACCTAGA-3' 5'-ACTGCTGCTGCCGAAATATCAG-3'	397
Integrin- $\alpha$ v	5'-GGAACATGCTTTCTTCAAGATGG-3' 5'-AAGGAGCTATGGCACTGCAAAAC-3' 5'-CATCTCCATTAATGTCAAGTGGCA-3'	664
Integrin- $\beta$ 1	5'-AGTGAAGGTTATTTCTTCACT-3' 5'-ACTTCCGATCTGTACACTTA-3' 5'-AGTAAGCATCCATGT-3'	515
Integrin- $\beta$ 3	5'-CGGCCAGATGATTCGAAGAA-3' 5'-TCAGTTAGCGTACGACGTTT-3' 5'-GGTCTTATATCATAGCAGG-3'	317
Integrin- $\beta$ 4	5'-GGACACCATCTGGGAGATCAACTA-3' 5'-ACAGTACTTCCAGCATAGCAGAG-3' 5'-CTCAAGGTCAAGATGTTGGACCA-3'	378
Integrin- $\beta$ 5	5'-GGATCAGCCTGAGGATCTTAATCTC-3' 5'-TAACCTGCATGGCACTTGCATTC-3' 5'-GGCCCATAGATCTTGCCAAACT-3'	479

<sup>a)</sup>The 1st oligonucleotide is a sense primer, the 2nd is an antisense primer, and the last is the probe for Southern blotting hybridization.

reverse transcription-PCR; TIMP, tissue inhibitors of metalloproteinase; *u-PA*, urokinase-type plasminogen activator; *u-PAR*, *u-PA* receptor

菌蒸留水を加え全量20 $\mu$ lとし、37 $^{\circ}$ Cにおいて45分間反応させた後ハイブリダイゼーションに用いた。

### 3. RT-PCR反応およびサザンブロットハイブリダイゼーション

RNA 4 $\mu$ gに対してオリゴ (dT) プライマー (Perkin Elmer Cetus, Norwalk, CA) 50 $\mu$ molを加え、68 $^{\circ}$ Cにおいて15分間、アニーリングを行い、水中において急冷した。RT反応緩衝液 [50mM Tris-HCl (pH8.3), 40mM KCl, 8mM MgCl<sub>2</sub>], 5mMDTT, 0.5mMデオキシリボヌクレオチド混合液 (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 20単位RNase阻害因子 (Promega Biotec, Madison, USA), および4単位逆転写酵素 (Life Sciences, St. Petersburg, USA) を加え、全量20 $\mu$ lとした。40 $^{\circ}$ Cにおいて90分間の逆転写反応を行い、cDNAを合成した。引き続き95 $^{\circ}$ Cにおいて5分間加熱し、逆転写酵素を失活させた。冷却後、調製したcDNA 1 $\mu$ lに対してPCR反応緩衝液 [50mM Tris-HCl (pH8.3), 40mM KCl, 8mM MgCl<sub>2</sub>], 0.5mMデオキシリボヌクレオチド混合液, 2.5単位Taq DNAポリメラーゼ (宝酒造) および各々50 $\mu$ molのプライマーを加え、滅菌蒸留水により全量100 $\mu$ lに調整した。PCR反応にはDNAサーマルサイクラー (Perkin-Elmer) を使用した。熱変性を94 $^{\circ}$ C, 1分間30秒, アニーリングを48 $^{\circ}$ C, 2分間, DNAの伸長を72 $^{\circ}$ C, 2分間とし、これを1サイクルとして、3サイクル施行した後、熱変性を94 $^{\circ}$ C, 40秒, アニーリングを48 $^{\circ}$ C, 1分間30秒, DNAの伸長を72 $^{\circ}$ C, 1分間20秒でさらに25サイクル行った。得られたPCR産物を、定電圧100Vにおいて2%アガロースゲルで電気泳動後、ナイロンメンブレンフィルター (Hybond-N+, Amersham) に転写した。ナイロンメンブレンフィルターに10分間紫外線を照射して、DNAをフィルターに固定した。フィルターはハイブリダイゼーション緩衝液 [6 $\times$ SSC, デンハルト液 (0.1%ポリビニルピロリドン, 0.1%ウシ血清アルブミン, 0.1%フィコール400), 10%硫酸デキストラン, 0.1% SDS, および0.1mg/mlサケ精子DNA] 中、42 $^{\circ}$ Cの恒温水槽において3時間のプレハイブリダイゼーションを行った。その後、0.05% (V/V) <sup>32</sup>P標識プローブを加え、42 $^{\circ}$ Cにおいて16時間のハイブリダイゼーションを行なった。フィルターは2 $\times$ SSCおよび0.1% SDSを含む溶液中で45 $^{\circ}$ C, 15分の洗浄を2回行ない、引き続き0.1 $\times$ SSCおよび0.1% SDSを含む溶液中で45 $^{\circ}$ C, 1時間の洗浄を行った。洗浄後、X線フィルム (Kodak, New York, USA) を用いて室温下12~18時間のオートラジオグラフィで解析を行った。さらにPCR産物量の測定はバイオイメージアナライザー (富士フィルム, 東京) を用いて、相補結合したプローブDNAの放射活性を計測して行った。

### III. アンチセンスおよびコントロールオリゴヌクレオチドの合成

*c-ets-1* mRNAの第一エクソンの開始コドンを含む17塩基に相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチド (5'-TCGACGGCCGCTTCAT-3') を設計した。また、コントロールオリゴヌクレオチドとしては、センスオリゴヌクレオチド (5'-ATGAAGCGCGCCGTCGA-3') と、アンチセンスオリゴヌクレオチドの塩基配列内で下線部の4塩基が異なるミスマッチオリゴヌクレオチド (5'-TGGACCGCGCCATCTT-3') を設計した。これらのオリゴヌクレオチドはリン酸ジエステル結合内の酸素原子を硫黄原子に置換したホスホロチオエート型オリゴヌクレオチドとして合成された (東亜合成, 東京)。

### IV. アンチセンスオリゴヌクレオチドによる細胞処理

種々の濃度のホスホロチオエート型オリゴヌクレオチドと10 $\mu$ g/mlのリポフェクチン (Gibco) 存在化に無血清RPMI培地中で、NUGC-3細胞を4時間培養した後、培地を吸引した。無血清RPMI培地で洗浄する事によりリポフェクチンを除去し、10% FBS含有RPMI培地にてさらに48時間培養を続けた。

### V. ウェスタンブロット

培養細胞をリン酸緩衝生理食塩水 (phosphate-buffered saline, PBS) (pH 7.4) にて洗浄した後、細胞溶解液 [50mM Tris-HCl (pH7.4), 0.15M塩化ナトリウム, 0.1% SDS, 0.1%デオキシコール酸ナトリウム, 5mM EDTA, 1%ノニデットP-40, 1%トリトンX-100, 2 $\mu$ g/mlアプロチニン, 1mMフッ化フェニルメチルスルホニル, 2 $\mu$ g/mlロイペプチン, 1mMオルソバナジン酸ナトリウム] にて溶解し、10,000rpm, 10分間遠心により不溶物を除去した。遠心により得られた上清を採取し、プロテインアッセイキット (Bio-Rad laboratories, Richmond, USA) を用いて蛋白定量した。得られた蛋白5 $\mu$ gを試料溶解液 [50mM Tris-HCl (pH6.5), 10%グリセロール, 2% SDS, 0.03%プロモフェノールブルー] に溶解し、40mM DTT添加後、94 $^{\circ}$ C3分間の熱変性を加え、10% SDS-PAGEを行った。なお、インテグリン- $\beta$ 1, MMP-1の検出には、DTTを添加せずに熱変性を行った。検出泳動後のゲルを、PVDF膜 (日本ミリポア・リミテッド, 東京) に転写し、1%脱脂粉乳を溶解した

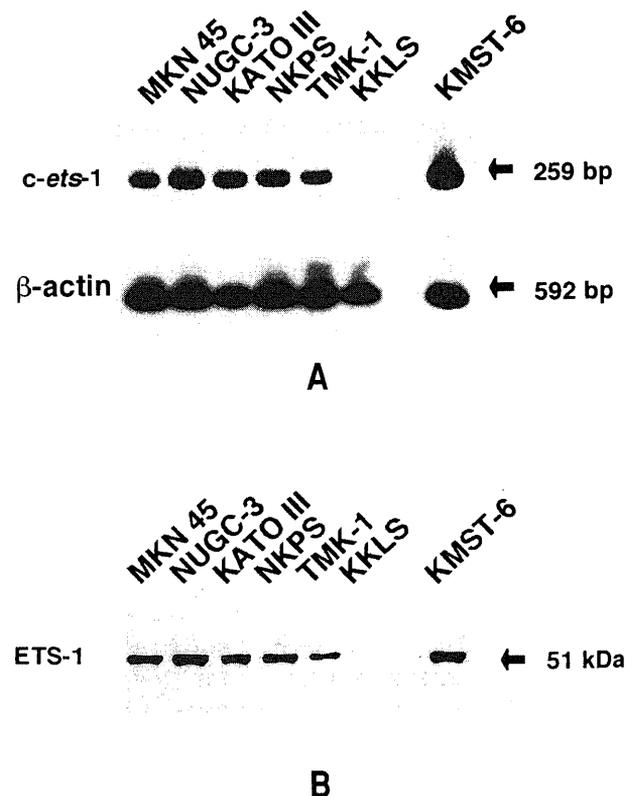


Fig. 1. Expressions of *c-ets-1* gene and ETS-1 protein in gastric cancer cell lines. (A) Detection of *c-ets-1* gene by the RT-PCR southern blotting. The expected sizes (bp) of the RT-PCR products are indicated at the right with arrows. (B) Detection of ETS-1 protein by western blotting. The size (kDa) of the ETS-1 protein is indicated at the right with arrow.

0.5% ツイーン 20 添加トリス緩衝液 (Tris-buffered saline, TBS) [20mM Tris-HCl (pH7.6), 137mM NaCl] に転写膜を 4℃, 一晚浸漬して非特異反応を阻止した後, 1μg/ml に希釈した一次抗体と室温で 2 時間反応させた. 使用した抗体は, 抗 ETS-1 モノクローナル抗体 (Clone 47, Transduction Laboratory, Lexington, USA), 抗 MMP-1 モノクローナル抗体 (Clone 41-

1E5, 富士薬品, 富山), 抗インテグリン-α2 ポリクローナル抗体 (AB1936, Chemicon, Temecula, USA), 抗インテグリン-β1 モノクローナル抗体 (Clone B-D15, 岩城硝子, 東京) および内部標準として用いた抗β-アクチンモノクローナル抗体 (Clone AC-15, Sigma, St.Louis, USA) である. 0.1% 脱脂粉乳を溶解した 0.5% ツイーン 20 添加 TBS にて洗浄後, 0.1μg/ml に調整したアルカリホスファターゼ標識抗マウス IgG (AP192A, Chemicon) あるいは抗ウサギ IgG (AP182A, Chemicon) を室温で 45 分間反応させた. 再度洗浄後, アルカリホスファターゼ基質 (BCIP/NBT Plus, Moss Inc, Pasadena, USA) を用いて反応, 発色させた.

VI. ELISA

前述の条件で培養後, 培養液を吸引し, 細胞を PBS で 2 回洗浄後, 無血清 RPMI-1640 培地で 24 時間培養し, その培養液を 3,000rpm, 10 分間遠心し沈渣を除去した. 得られた培養上清中の u-PA 蛋白抗原量を u-PA ELISA キット (TintElize uPA, Biopool AB, Umea, Sweden) を用いて測定した. 実験は各群について 3 回ずつ施行した.

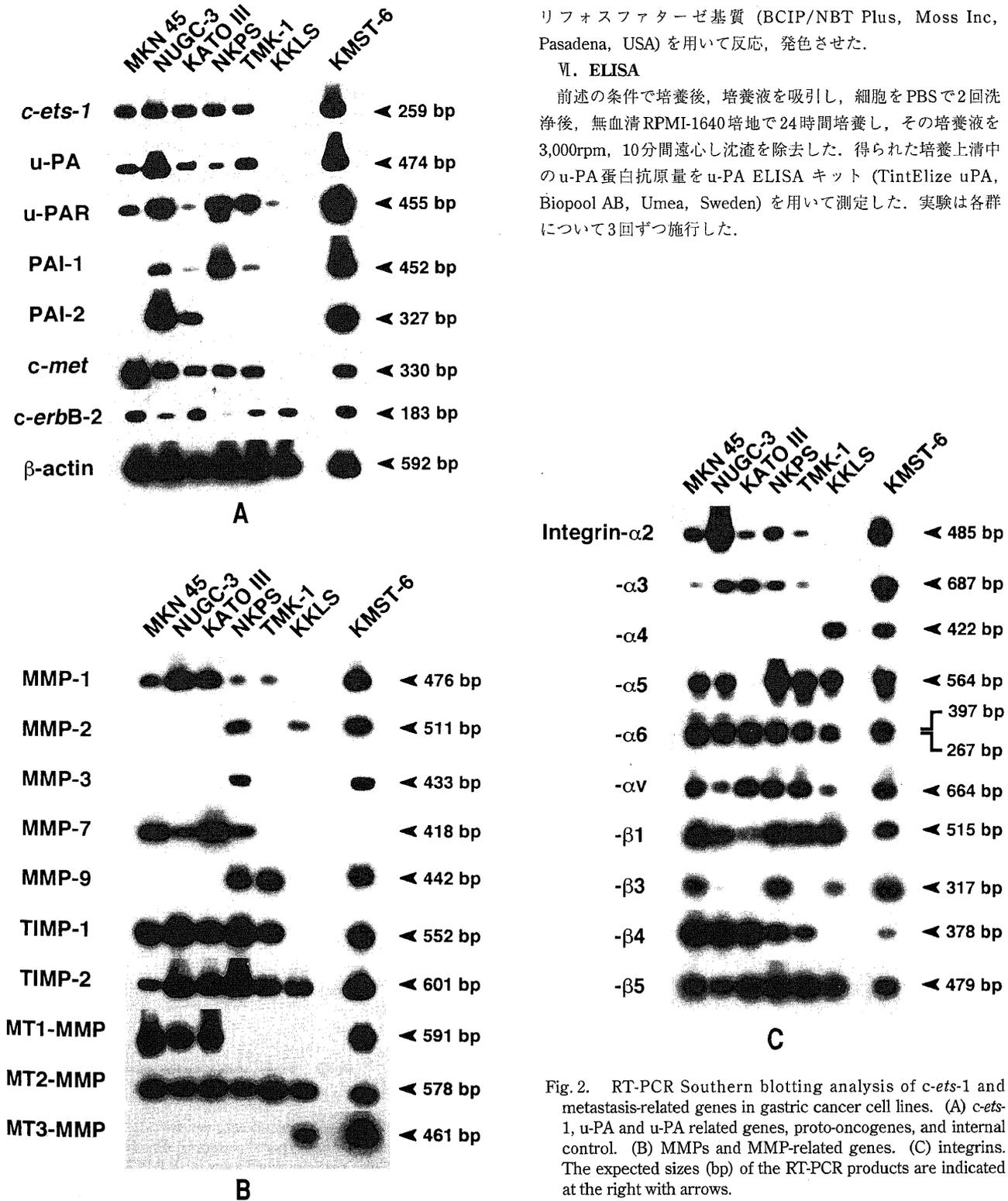


Fig. 2. RT-PCR Southern blotting analysis of *c-ets-1* and metastasis-related genes in gastric cancer cell lines. (A) *c-ets-1*, u-PA and u-PA related genes, proto-oncogenes, and internal control. (B) MMPs and MMP-related genes. (C) integrins. The expected sizes (bp) of the RT-PCR products are indicated at the right with arrows.

### Ⅶ. 細胞増殖試験

ジメチルチアゾールジフェニルテトラゾリウムブロマイド (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, MTT) 試験を行った。すなわち、96穴プラスチックプレート (Nunc, Roskilde, Denmark) において、細胞を培養後、各ウェルに、最終濃度0.2mg/mlに調整したMTT試薬 (Sigma) を加え、37℃に3時間静置した。細胞との反応により生じた色素産物をジメチルスルホキシドで可溶化し、波長540nmの吸光度をイムノリーダーで測定して細胞数の指標とした。実験は各群について3回ずつ施行した。

### Ⅷ. 免疫組織化学染色

パラフィン包埋10%ホルマリン固定標本より4μmの切片を作成し、脱パラフィン後内因性ペルオキシダーゼを不活化するため0.3%過酸化水素水添加メタノールに30分間浸漬し、PBSで洗浄した。次に、非特異的抗原抗体反応を防止するために10%正常ヤギ血清 (Dakopatts, Copenhagen, Denmark) に20分間反応させた後、1μg/mlに希釈した一次抗体と一晩4℃にて反応させた。使用した抗体は、抗ETS-1ポリクローナル抗体

(C-20, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA), 抗u-PAモノクローナル抗体 (#3689, American diagnostica inc, Greenwich, USA), 抗MMP-1モノクローナル抗体 (富士薬品) である。PBSにて洗浄した後、ビオチン化抗マウスIgG抗体 (Dakopatts) に室温で2時間反応させ、ついでストレプトアビジン・ビオチン・ペルオキシダーゼ複合体に30分反応させた。0.04%ジアミノベンチジン (Sigma) 溶液で発色させ、0.3%メチルグリーンで核染色を行った。陽性コントロールとして、正常副腎の10%ホルマリン固定標本を使用した。陰性コントロールには一次抗体として非免疫正常マウス血清を用いて、陽性像が得られないことを確認した。がん細胞数の10%以上が染色されたものを陽性として判定した。

### Ⅸ. 統計学的解析

測定値は全て $\bar{x} \pm SD$ で示した。臨床病理学的因子との相関は $\chi^2$ 検定で判定した。生存曲線はKaplan-Meier法を用いて作成し、2群間の有意差は一般化Wilcoxon検定を用いて判定した。多変量解析にはCoxの比例ハザードモデルを用いた。ELISAの測定結果にはMann-Whitney検定を用いた。いずれも危険率

Table 2. RT-PCR analysis of *c-ets-1* and metastasis-related genes in gastric cancer cell lines

Gene	Expression of gene in cell lines					
	MKN-45	NUGC-3	KATO-III	NKPS	TMK-1	KKLS
<i>c-ets-1</i>	+	+	+	+	+	-
u-PA	+	+	+	+	+	-
u-PAR	+	+	+	+	+	+
PAI-1	-	+	+	+	+	-
PAI-2	-	+	+	-	-	-
<i>c-met</i>	+	+	+	+	+	-
<i>c-erbB-2</i>	+	+	+	+	+	+
MMP-1	+	+	+	+	+	-
MMP-2	-	-	-	+	-	+
MMP-3	-	-	-	+	-	-
MMP-7	+	+	+	+	-	-
MMP-9	-	-	-	+	+	-
TIMP-1	+	+	+	+	+	-
TIMP-2	+	+	+	+	+	+
MT1-MMP	+	+	+	-	-	-
MT2-MMP	+	+	+	+	+	+
MT3-MMP	-	-	-	-	-	+
Integrin- $\alpha$ 2	+	+	+	+	+	-
Integrin- $\alpha$ 3	+	+	+	+	+	-
Integrin- $\alpha$ 4	-	-	-	-	-	+
Integrin- $\alpha$ 5	+	+	-	+	+	+
Integrin- $\alpha$ 6	+	+	+	+	+	+
Integrin- $\alpha$ V	+	+	+	+	+	+
Integrin- $\beta$ 1	+	+	+	+	+	+
Integrin- $\beta$ 3	+	+	-	+	-	+
Integrin- $\beta$ 4	+	+	+	+	+	-
Integrin- $\beta$ 5	+	+	+	+	+	+

Expressions of *c-ets-1* gene and metastasis-related genes in gastric cancer cell lines were examined using the RT-PCR following Southern blot analysis. The expression patterns were classified into two groups. +, positive; -, negative.

5%未満をもって有意差ありと判定した。

成 績

I. RT-PCR法によるヒト胃がん培養細胞における *c-ets-1* mRNA発現と転移関連遺伝子の発現の解析

胃がん細胞株6株における *c-ets-1* と転移関連因子の遺伝子発現を RT-PCR法およびウェスタンブロット法により解析した(図1, 図2)。また各がん細胞の遺伝子発現の解析結果をまとめ、表2に示した。*c-ets-1* の mRNA および ETS-1 蛋白の発現は6種の胃がん細胞株のうち KKLS を除いた5株の細胞株で認められた。この5株においては、同時に u-PA, MMP-1, TIMP-1, インテグリン- $\alpha$  2, - $\alpha$  3, - $\beta$  4 および *c-met* mRNA の協調的発現を認め、KKLS ではいずれの mRNA 発現も認められなかった。また、PAI-1, PAI-2, MMP-3, MMP-7, MMP-9 および MT1-MMP mRNA は、*c-ets-1* mRNA の発現が陽性であった細胞株においてのみ認められた。u-PAR, TIMP-2, MT2-MMP, インテグリン- $\alpha$  6, - $\alpha$  v, - $\beta$  1, および  $\beta$  5 mRNA は全ての細胞株に発現が認められ、インテグリン- $\alpha$  6 においては 267 塩基対のインテグリン- $\alpha$  6 バリエーション<sup>10)</sup> の発現が全株に認められた。MT3-MMP および インテグリン- $\alpha$  4 mRNA は、*c-ets-1* の発現を認めなかった KKLS のみに発現が認められた。また、MMP-2, インテグリン- $\alpha$  5 および  $\beta$  3 の mRNA 発現については、*c-ets-1* mRNA 発現との直接の関連性が認められなかった。

II. *c-ets-1* アンチセンスオリゴヌクレオチドによる細胞外マトリックス分解酵素および接着因子の発現抑制

*c-ets-1*, u-PA, MMP-1 および インテグリン- $\alpha$  2 を発現している NUGC-3 細胞を用いて、*c-ets-1* mRNA に特異的なアンチセンスオリゴヌクレオチド処理が転移関連遺伝子発現に及ぼす影響

について検討した。NUGC-3 の ETS-1 蛋白の発現量をウェスタンブロット法により解析した結果、アンチセンスオリゴヌクレオチド処理により、濃度依存性にごん細胞中の ETS-1 蛋白の発現が抑制されることが確認された(図3)。同時に、がん細胞中のインテグリン- $\alpha$  2 と MMP-1 蛋白の発現低下が認められた。一方、コントロールオリゴヌクレオチド処理ではこのような変化は認められなかった。また、アンチセンスオリゴヌクレオチドはインテグリン- $\beta$  1 蛋白および内部コントロールとして用いた  $\beta$ -アクトン蛋白には影響を与えなかった(図3)。ついで、培養上清中に放出された u-PA 蛋白の ELISA による測定では、u-PA 蛋白抗原量はアンチセンスオリゴヌクレオチドの投与により、濃度依存性に抑制され、500nM で 43% 抑制された。また、コントロールオリゴヌクレオチドでは変化は認められなかった(図4)。MTT 試験による細胞増殖の検討ではアンチセンスオリゴヌクレオチド、コントロールオリゴヌクレオチド投与のい

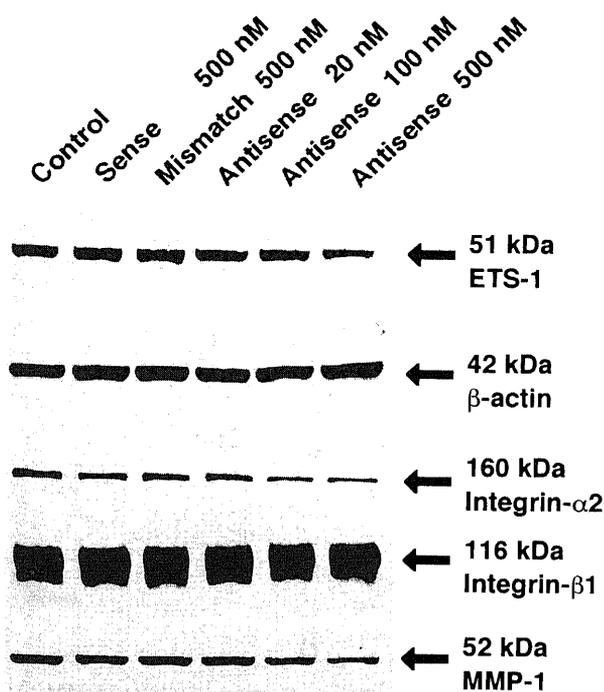


Fig. 3. Effects of antisense oligonucleotides targeted for *c-ets-1* gene on MMP-1 and integrin- $\alpha$  2 expressions. Black column, culture without oligomers; white columns, with antisense oligomers; hatched columns, control oligomers.

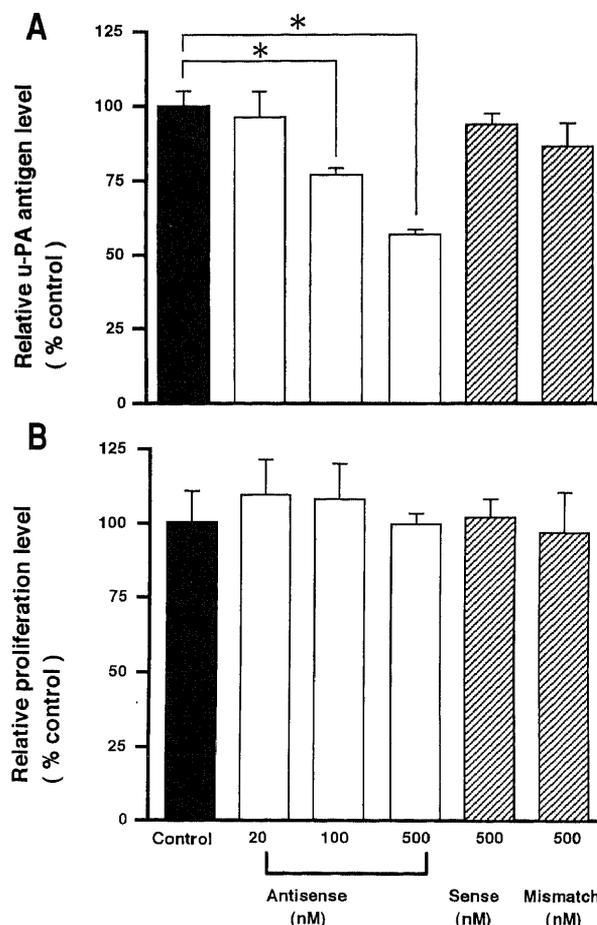
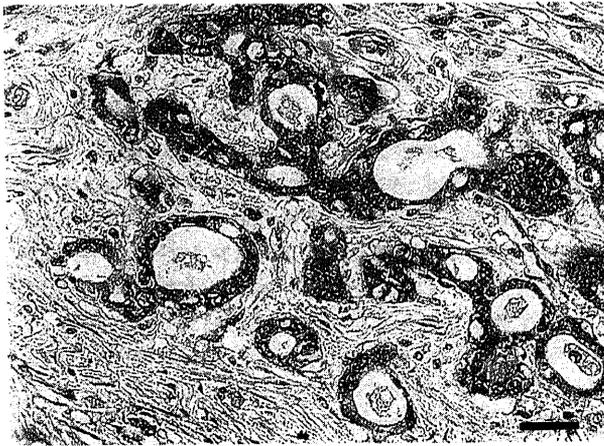
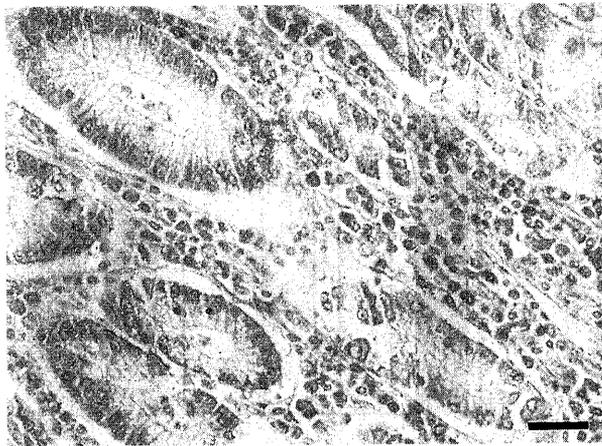


Fig. 4. Effects of antisense oligonucleotides on the production of u-PA and the proliferation in NUGC-3 cells. (A) The relative u-PA antigen levels were calculated by the ratio of amount of u-PA antigen in antisense-treated cells to that in non-treated cells and are expressed as  $\bar{x} \pm SD$  of triplicate cultures. (B) MTT assay was performed at the same condition as above. The relative proliferation levels were calculated by the ratio of amount of proliferation in antisense-treated cells to that in non-treated cells and are expressed as  $\bar{x} \pm SD$  of triplicate cultures. Black column, culture without oligomers; white columns, with antisense oligomers; hatched columns, control oligomers. \*  $p < 0.05$ .



A



B

Fig. 5. Immunohistochemical staining with anti-ETS-1 polyclonal antibody. (A) Well differentiated adenocarcinoma of the stomach. (B) Epithelial cells in normal mucosa. Bars in (A) and (B), 50  $\mu$ m.

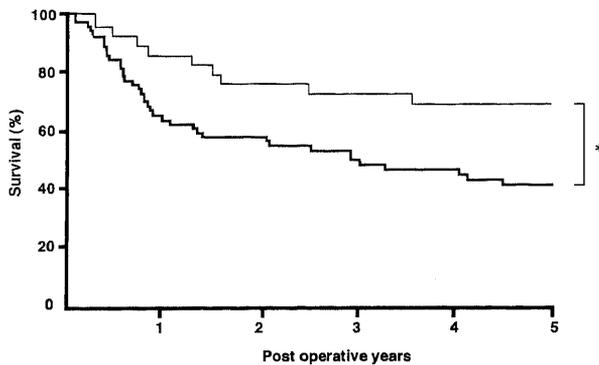


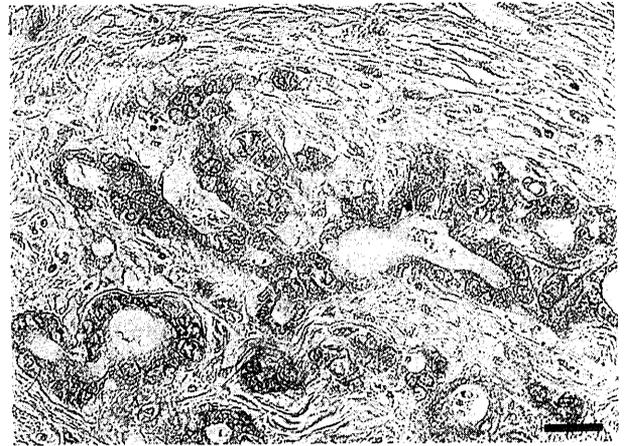
Fig. 6. Overall survival rates of patients with primary gastric cancers, according to ETS-1 protein expression of tumor. —, ETS-1 negative patients (n=30); - - -, ETS-1 positive patients (n=73). \* P<0.01.

れにおいても細胞増殖に変化は認められなかった(図4).

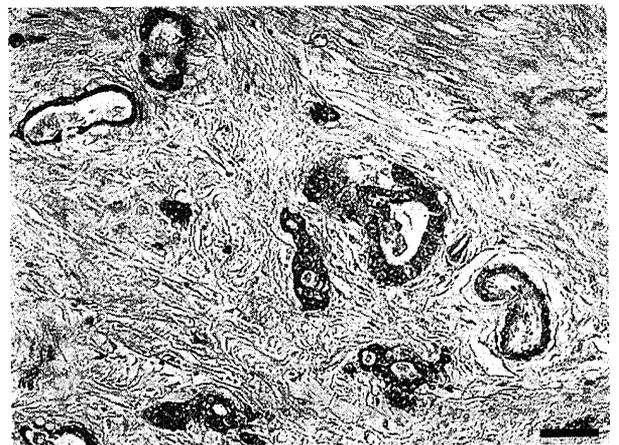
### Ⅲ. 原発性胃がんにおける ETS-1 蛋白の発現の検討

#### 1. 臨床病理学因子との相関

外科的に切除された原発性胃がん103症例中、73症例(71%)でETS-1蛋白の発現が認められた。がん細胞は、細胞質と核内に抗ETS-1抗体と反応する免疫原物質を有していた(図5A)。一方、正常胃粘膜は増殖帯を中心に陽性像を認めるものもあったが、染色像はがん部に比して淡かった(図5B)。表3に臨床病理学的因子とETS-1発現との相関を示した。分化度では、高分化腺がん(83%)が、低分化腺がん(62%)に比して有意に陽性例が多かった。浸潤関連形質では、深達度が固有筋層におよぶ進行胃がんにおいて陽性率が74%と早期胃がんに比して有意に高値を示したが、脈管侵襲や肉眼型とは相関が認められなかつ



A



B

Fig. 7. Immunohistochemical staining of u-PA and MMP-1. The examination was performed by using the same specimens as presented in Fig. 1. (A) Immunostaining with anti-u-PA monoclonal antibody. (B) Immunostaining with anti-MMP-1 monoclonal antibody. Bars in (A) and (B), 50  $\mu$ m.

た。次に転移との関連をみると、肝転移例では全症例において ETS-1 の発現が陽性であり、統計学的にも有意差が認められた。しかし、リンパ節転移、腹膜播種とは相関が認められなかった。予後との関連を検討したところ、ETS-1 陽性例の 5 年生存率は 68% と、陰性例の 40% に対して不良であり、両群間に有意差が認められた (図 6)。更に、ETS-1 の予後に対する重みを、背景因子の影響を除いて検討するために Cox の比例ハザードモデ

ルを用いて検討したところ、ETS-1 蛋白陽性率は、分化度、深達度、リンパ節転移にもまして、最も予後に対して重みのある因子であることが明らかとなった (表 4)。

## 2. u-PA および MMP-1 発現との相関

がん組織中における、u-PA 蛋白および MMP-1 蛋白の発現と ETS-1 蛋白の発現との相関性を検討した。u-PA, MMP-1 蛋白はいずれもがん細胞の細胞質に発現を認め、103 症例中、u-PA 陽

Table 3. Correlation between ETS-1 protein expression and clinicopathological findings

Variable	No. of cases	No. of cases		p-value by chi-square test
		ETS-1 expression <sup>a)</sup>		
		Negative	Positive	
<b>Histological differentiation</b>				
Differentiated	42	7	35	0.0367
Undifferentiated	61	23	38	
<b>Macroscopic type</b>				
Localized	48	15	33	0.8213
Infiltrating	55	15	40	
<b>Depth of tumor invasion</b>				
Early	8	5	3	0.0445
Advanced	95	25	70	
<b>Hepatic metastasis</b>				
Negative	93	30	63	0.0324
Positive	10	0	10	
<b>Peritoneal dissemination</b>				
Negative	88	27	61	0.5443
Positive	15	3	12	
<b>Lymph node metastasis</b>				
Negative	20	4	16	0.4161
Positive	83	26	57	
<b>Lymphatic invasion</b>				
Negative	7	4	3	0.1895
Positive	96	26	70	
<b>Venous invasion</b>				
Negative	55	20	35	0.1302
Positive	48	10	38	

<sup>a)</sup> Expression of *ets-1* protein was scored as positive ( $\geq 10\%$  of tumor cells were positive) or negative ( $< 10\%$  of tumor cells were positive).

Table 4. Results of multivariable analysis by Cox's proportional hazard model

Variable	Multivariable analysis	
	F-value	P-value
Histological differentiation (differentiated/undifferentiated)	0.6389	0.4241
Depth of invasion (early/advanced)	1.2118	0.2710
Lymph node metastasis (negative/positive)	3.6866	0.0449
<i>ets-1</i> status (negative/positive)	7.9352	0.0048

Table 5. Concordance of ETS-1 expression with u-PA and MMP-1 expression

Variable	No. of cases	No. of cases		p-value by chi-square test
		ETS-1 expression <sup>a)</sup>		
		Negative	Positive	
u-PA expression <sup>a)</sup>				
Negative	38	19	19	0.0008
Positive	65	11	54	
MMP-1 expression <sup>a)</sup>				
Negative	26	13	13	0.0139
Positive	77	17	60	

<sup>a)</sup> Expression of each protein was scored as positive ( $\geq 10\%$  of tumor cells were positive) or negative ( $< 10\%$  of tumor cells were positive).

性症例, MMP-1 陽性症例数はそれぞれ, 65 例 (63%), 77 例 (75%) であった (図7, 表5). ETS-1 発現症例と u-PA 発現症例との間には有意な相関関係が認められ, ETS-1 発現症例 73 例中の 54 例 (74%) に u-PA が発現していた. また, MMP-1 との相関でも, 有意な相関関係が認められ, ETS-1 発現症例 73 例中の 60 例 (81%) に MMP-1 が発現していた.

#### 考 察

がん細胞の浸潤と転移において ECM の酵素的破壊は不可欠のステップである. 生体内には分子構造, 基質特異性や活性化機構などの生化学的特性の異なる多様な ECM 分解酵素が増殖因子やサイトカインなどの外的刺激に依存的あるいは恒常的に発現されている. 特に, がん細胞の浸潤性と転移能を反映する最も重要な ECM 分解酵素として u-PA と MMP が知られている<sup>19)20)</sup>. 血清中に存在するプラスミノゲンを活性化型プラスミンに変換する酵素である u-PA は多様ながん細胞により分泌され, 浸潤性増殖における組織破壊と密接な関連があることが指摘されてきた. u-PA により活性化されたプラスミンは様々な ECM を基質とするほか, プラスミノゲン, u-PA, MMP などの潜在型酵素を活性化することからも細胞外マトリックス分解酵素の活性化カスケードの鍵となる酵素として注目されている<sup>19)20)</sup>. また, MMP についてもその生化学的機能解析の研究に加えて, 遺伝子クローニングが進み, 現在では今回検討したものも含めて 15 種の MMP 遺伝子が単離されている<sup>19)</sup>. 一方, がん細胞の ECM との接着, 細胞間接着や遊走に重要な因子である接着因子インテグリンは多くのがんで悪性形質との関連性が示唆されてきた<sup>18)21)</sup>.

近年, 細胞内シグナル伝達系や様々な遺伝子のプロモーター構造の解析が進み, がん細胞の浸潤に関与する因子群が遺伝子の発現調節レベルで密接かつ多段階的に相互連関する可能性が考えられるようになった. 転移関連遺伝子のなかで, シス領域に *ets* 結合モチーフが存在し, *ets* ファミリーによって遺伝子の発現が調節されることが報告されているものには, u-PA<sup>22)</sup>, MMP-1<sup>23)</sup>, MMP-3<sup>24)</sup>, MMP-7<sup>25)</sup>, TIMP-1<sup>26)</sup>, インテグリン- $\alpha$  4<sup>27)</sup>, *c-met*<sup>28)</sup> および *c-erbB-2* 遺伝子<sup>29)</sup> がある. すなわち, *ets* ファミリーが, これら転移関連遺伝子の制御因子としてがんの浸潤と転移に携わっている可能性が考えられる. しかし, がん細胞における *ets* ファミリーの機能的解析に関する報告は極めて少ない. そこで, 本研究では胃がんの悪性形質の発現における *c-ets-1* の

役割を明らかにすることを目的に, *c-ets-1* の発現と転移関連因子の発現を解析し, それらの相互関連性および浸潤, 転移との相関について検討を行った.

RT-PCR 法により遺伝子発現を解析した結果, 胃がん細胞株では 6 株中 5 株に *c-ets-1*, u-PA, MMP-1, TIMP-1, インテグリン- $\alpha$  2, - $\alpha$  3, - $\beta$  4 および *c-met* 遺伝子の協調的発現が認められ, これらの遺伝子が *c-ets-1* を中心とした制御を受けていることが示唆された. 一方, PAI-1, PAI-2, MMP-7, MMP-9 および MT1-MMP 遺伝子は, *c-ets-1* 遺伝子の発現が陽性であった細胞株においてのみ認められた. 従って, ETS-1 蛋白がこれらの遺伝子発現にも関与している可能性が考えられる. しかし, これらの遺伝子発現に ETS-1 が関与することを実験的に証明した報告はなく, その関連性についてはさらに詳細な検討が必要である. なお, 胃がん組織より抽出した mRNA について, 同様に遺伝子発現様式を解析したところ, ほぼ同様の協調的発現を確認している (結果未表示). 次に, 胃がん培養細胞 NUGC-3 に *c-ets-1* mRNA に相補的な配列を持つアンチセンスオリゴヌクレオチドによる処理を行った結果, ETS-1 蛋白の低下にもなって, MMP-1 と u-PA に加えて, インテグリン- $\alpha$  2 の発現の低下が認められた. このことから, NUGC-3 においては ETS-1 蛋白によって転移関連遺伝子のうち u-PA, MMP-1 およびインテグリン- $\alpha$  2 が正の制御を受けていることが明らかとなった. がんにおけるインテグリンの発現と転移能については, 一般的にはがんの悪性度の亢進に伴って, インテグリン- $\alpha$  2 $\beta$  1, - $\alpha$  3 $\beta$  1, - $\alpha$  4 $\beta$  1, - $\alpha$  6 $\beta$  1, あるいは - $\alpha$  6 $\beta$  4 などは発現が増加し, 一方, インテグリン- $\alpha$  5 $\beta$  1 はむしろ減少するという報告が多い. 過剰発現ががん転移を助長するという報告として, インテグリン- $\alpha$  2 $\beta$  1 を発現していない横紋筋肉腫細胞に  $\alpha$  2 の cDNA を遺伝子導入すると, もとの細胞に比して腫瘍形成や増殖速度には差はないが, 肺, 骨, 副腎, リンパ節への転移性が著明に亢進したというものがある<sup>21)</sup>. 胃がんにおいては腹膜播種モデルにおいて胃がん細胞のインテグリン- $\alpha$  2, - $\alpha$  3 の発現増強に伴って, 播種能が上昇するという報告があり<sup>30)</sup>, 胃がんおよび大腸がん組織においても, 肝転移巣でインテグリン- $\alpha$  3 $\beta$  1 が高発現することが示されている<sup>31)</sup>. さらに, マウス Lewis 肺がん細胞ではインテグリン- $\alpha$  6 $\beta$  4 の発現の高い株ほど高転移性を示すことが報告されている<sup>18)19)</sup>. 一方, 形質転換したハムスターの卵巣細胞にインテグリン- $\alpha$  5 $\beta$  1 を過剰発現させると, その細胞の移動能および腫瘍形成能が低下するという報告もある<sup>20)</sup>.

しかし、インテグリン- $\alpha 5\beta 1$ に関しては、原発腫瘍巣や転移巣で発現が亢進していたという報告<sup>32)</sup>もあることから、転移におけるインテグリン- $\alpha 5\beta 1$ の役割については未だ明らかではない。

原発性胃がん103症例について免疫組織化学染色法によりETS-1蛋白の発現を解析した結果、胃がんの進行度に応じて発現率は増加し、さらに発現陽性率は壁深度、肝転移などの悪性形質に関連する因子と高い相関を示すことが明らかとなった。さらにETS-1蛋白の発現が予後と相関することが示された。胃がんにおけるETS-1蛋白発現に関する知見として、進行がんほどETS-1蛋白発現率が高いことが報告されており<sup>33)</sup>、今回の研究結果と一致する。ETS-1蛋白発現の意義のひとつとして転移関連遺伝子産物の発現誘導が浸潤、転移につながったと考えられた。その確認のため、u-PAとMMP-1蛋白の発現も同時に検討したところ、ETS-1蛋白の発現とu-PAあるいはMMP-1蛋白の発現は強い相関性を示すことが明らかとなった。

一方、胃がんの進展に最も強く関与しているチロシンキナーゼ型増殖因子受容体のひとつに、肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor, HGF) の受容体である*c-met*遺伝子と*c-erbB-2*遺伝子がある。これらの遺伝子の発現も、がん細胞において*ets*ファミリーにより正の制御を受けていることが報告されている<sup>28)29)</sup>。本研究でも、*c-ets-1*の発現している細胞株は同時に*c-met*遺伝子を発現していた。細胞の種類によって異なるが、*c-ets-1*の発現を上昇させる増殖因子としては、HGFに加えて、腫瘍壊死因子- $\alpha$ 、血管内皮細胞増殖因子、塩基性線維芽細胞増殖因子、上皮増殖因子、インターロイキン-1などが知られている<sup>34)35)</sup>。このような増殖因子によるu-PAの遺伝子発現には*ets*ファミリーが関与しており、*ras*を介した新規マイトジェン活性化プロテインキナーゼによるETSのリン酸化が起こることが報告されている<sup>36)</sup>。また、液性因子による*ets*の発現誘導以外にもECMとそのリガンドであるインテグリン受容体を介したシグナル伝達系に依存した発現誘導が起こることも示唆されている。すなわち、タイプIコラーゲンとインテグリン- $\alpha 2\beta 1$ との結合はMMP-1の発現誘導を惹起し<sup>37)38)</sup>、ファイブロネクチンはインテグリン- $\alpha 5\beta 1$ に結合してMMP-1やMMP-3を誘導するが、これらの誘導には*ets*ファミリーが関与している<sup>39)40)</sup>。このように、がん細胞における*ets*ファミリーの発現制御機構についてはこれら増殖因子の発現とともに、がん遺伝子の活性化や接着因子などの関与、ETS蛋白リン酸化の機序も含め今後総合的に解析する必要があると考えられる。

近年、がん転移と血管新生の関連性が注目報告されているが、がんやカポジ肉腫組織中の間質線維芽細胞や血管内皮細胞で*c-ets-1*の発現が亢進していることから、間質細胞でのMMP-1やMMP-3の発現が*c-ets-1*により誘導されることが示唆された<sup>34)41)42)</sup>。最近、血管内皮細胞において、血管増殖因子により誘導された*c-ets-1*が内皮細胞のMMP-1やu-PAの産生を促進することが明らかとなった<sup>35)</sup>。これと同時に、細胞遊走や管腔形成も誘導されるが、今回の研究で示されたように、血管内皮においても胃がん細胞と同様の制御機構の存在推測され、血管新生においてもインテグリン- $\alpha 2$ が介在する可能性が考えられる。つまり、*c-ets-1*はがん細胞のみならず周囲の血管内皮細胞や線維芽細胞におけるECM分解酵素や接着因子の発現調節にも深く関わり、それらの機能を調整することにより、がん転移や血管新生に促進的に作用していることが示唆される。がん

の進展の抑制法あるいは治療法を論理的に新規開発するためにも、*c-ets-1*遺伝子およびETS-1蛋白はがん原発巣および周囲の間質細胞も含めた共通の標的遺伝子として有用であると考えられる。

## 結 論

がん転移形質の発現における重要なエフェクター因子として転写因子*c-ets-1*に着目し、ヒト胃がん培養細胞株および胃がん組織における*c-ets-1*遺伝子ならびにETS-1蛋白と転移関連因子の相互関連性について検討し、以下の結果を得た。

1. ヒト胃がん培養細胞株における*c-ets-1*および転移関連遺伝子発現をRT-PCR法により解析した結果、*c-ets-1* mRNAとu-PA, MMP-1, TIMP-1, インテグリン- $\alpha 2$ , - $\alpha 3$ , - $\beta 4$ および*c-met* mRNAの協調的発現が認められた。

2. *c-ets-1* mRNAに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドの処理により、胃がん細胞株NUGC-3においてu-PA, MMP-1, インテグリン- $\alpha 2$ 蛋白の発現低下が認められ、ETS-1蛋白がこれら転移関連遺伝子の発現を正に制御していることが明らかとなった。

3. 抗ETS-1抗体を用いた免疫組織化学染色の結果、ETS-1蛋白の発現は胃がんの浸潤や転移と関係する病理学的因子と高く相関し、発現群は非発現群より有意に予後不良であった。

以上の結果から、*c-ets-1*は胃がんの浸潤、転移、予後に関わる因子であり、胃がんの進展に機能的に関与していることが示された。

## 謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導、御校閲を賜りました恩師三輪見一教授に深甚なる謝意を表します。また、終始直接の御指導を戴きました金沢大学がん研究所化学療法部佐々木琢磨教授、遠藤良夫助手ならびに同外科学第二講座米村豊講師に心より感謝致します。さらに本研究遂行に際し、御支援とご協力を頂きました金沢大学外科学第二講座ならびに同がん研究所化学療法部の皆様に厚く御礼申し上げます。本論文の要旨の一部は第56回日本癌学会総会 (1997, 京都)、第96回日本外科学会総会 (1997, 京都) において発表された。

## 文 献

- 1) Nunn MF, Seeburg PH, Moscovici C, Duesberg PH. Tripartite structure of the avian erythroblastosis virus E26 transforming gene. *Nature* 306: 391-395, 1983
- 2) Leprince D, Gégonne A, Coll J, de Taisne C, Schneeberger A, Lagrou C, Stehelin D. A putative second cell-derived oncogene of the avian leukaemia retrovirus E26. *Nature* 306: 395-397, 1983
- 3) Wasyluk B, Hahn SL, Giovane A. The Ets family of transcription factors. *Eur J Biochem* 211: 7-18, 1993
- 4) Azvavorian S, Murphy AN, Stetler-Stevenson WG, Liotta LA. Molecular aspect of tumor cell invasion and metastasis. *Cancer* 71: 1368-1383, 1993
- 5) Duffy MJ. The role of proteolytic enzymes in cancer invasion and metastasis. *Clin Exp Metastasis* 10: 145-155, 1992
- 6) Ito H, Yonemura Y, Fujita H, Tsuchihara K, Kawamura T, Nojima N, Fujimura T, Nose H, Endo Y, Sasaki T. Prognostic relevance of urokinase-type plasminogen activator (uPA) and plasminogen activator inhibitors PAI-1 and PAI-2 in gastric

- cancer. *Virchows Arch* 427: 487-496, 1996
- 7) Yonemura Y, Nojima N, Kaji M, Fujimura T, Itoh H, Ninomiya I, Miyazaki I, Endo Y, Sasaki T. E-cadherin and urokinase-type plasminogen activator tissue status in gastric carcinoma. *Cancer* 76: 941-953, 1995
  - 8) Nomura H, Sato H, Seiki M, Mai M, Okada Y. Expression of membrane-type matrix metalloproteinase in human gastric carcinomas. *Cancer Res* 55: 3263-3266, 1995
  - 9) 胃癌研究会編. 胃癌取扱い規約, 改訂12版, 1-89頁, 金原出版株式会社, 東京, 1993
  - 10) Tennenbaum T, Belanger AJ, Glick AB, Tamura R, Quaranta V, Yuspa SH. A splice variant of alpha 6 integrin is associated with malignant conversion in mouse skin tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 7041-7045, 1995
  - 11) Stetler Stevenson WG. Type IV collagenases in tumor invasion and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 9: 289-303, 1990
  - 12) Liotta LA, Stetler Stevenson WG. Metalloproteinases and cancer invasion. *Semin Cancer Biol* 1: 99-106, 1990
  - 13) Danø K, Andreason PA, Grøndahl-Hansen J, Kristensen P, Nielsen LS, Skriver L. Plasminogen activators, tissue degradation, and cancer. *Adv Cancer Res* 44: 139-266, 1985
  - 14) Pöllänen J, Stephenes RW, Vaheri A. Directed plasminogen activation at the surface of normal and malignant cells. *Adv Cancer Res* 57: 273-328, 1991
  - 15) Testa JE, Quigley JP. The role of urokinase-type plasminogen activator in aggressive tumor cell behavior. *Cancer Metastasis Rev* 9: 353-367, 1990
  - 16) Duffy MJ, Reilly D, O' Sullivan C, O' Higgins N, Fennelly JJ, Anderson P. Urokinase-plasminogen activator, a new and independent prognostic marker in breast cancer. *Cancer Res* 50: 6827-6829, 1990
  - 17) Cossins J, Dudgeon T, Catlin G, Gearing A, Clements J. Identification of MMP-18, a putative novel human matrix metalloproteinase. *Biochem Biophys Res Commun* 228: 494-498, 1996
  - 18) Kennel SJ, Foote LJ, Falcioni R, Sonnenberg A, Stringer CD, Crouse C, Hemler ME. Analysis of the tumor-associated antigen TSP-180. Identity with alpha 6-beta 4 in the integrin superfamily. *J Biol Chem* 264: 15515-15521, 1989
  - 19) Sacchi A, Falcioni R, Piaggio G, Gianfelice M, Perrotti N, Kennel S. Ligand-induced Phosphorylation of a Murine Tumor Surface Protein (TSP-180) Associated With Metastatic Phenotype. *Cancer Res* 49: 2615-2620, 1989
  - 20) Schreiner C, Fisher M, Hussein S, Juliano RL. Increased tumorigenicity of fibronectin receptor deficient Chinese hamster ovary cell variants. *Cancer Res* 51: 1738-1740, 1991
  - 21) Chan BM, Matsuura N, Takada Y, Zetter BR, Hemler ME. In vitro and in vivo consequences of VLA-2 expression on rhabdomyosarcoma cells. *Science* 251: 1600-1602, 1991
  - 22) Nerlov C, Rorth P, Blasi F, Johnsen M. Essential AP-1 and PEA3 binding elements in the human urokinase enhancer display cell type-specific activity. *Oncogene* 6: 1583-1592, 1991
  - 23) Gutman A, Wasylyk B. The collagenase gene promoter contains a TPA and oncogene-responsive unit encompassing the PEA3 and AP-1 binding sites. *EMBO J* 9: 2241-2246, 1990
  - 24) Wasylyk C, Wasylyk B. Oncogenic conversion alters the transcriptional properties of ets. *Cell Growth Differ* 3: 617-625, 1992
  - 25) Gaire M, Magbanua Z, McDonnell S, McNeil L, Lovett DH, Matrisian LM. Structure and expression of the human gene for the matrix metalloproteinase matrilysin. *J Biol Chem* 269: 2032-2040, 1994
  - 26) Edwards DR, Rocheleau H, Sharma RR, Wills AJ, Cowie A, Hassell JA, Heath JK. Involvement of AP1 and PEA3 binding sites in the regulation of murine tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) transcription. *Biochim Biophys Acta* 1171: 41-55, 1992
  - 27) Rosen GD, Barks JL, Iademarco MF, Fisher RJ, Dean DC. An intricate arrangement of binding sites for the Ets family of transcription factors regulates activity of the alpha 4 integrin gene promoter. *J Biol Chem* 269: 15652-15660, 1994
  - 28) Gambarotta G, Boccaccio C, Giordano S, Ando M, Stella MC, Comoglio PM. *Ets* up-regulates *MET* transcription. *Oncogene* 13: 1911-1917, 1996
  - 29) Scott GK, Daniel JC, Xiong X, Maki RA, Kabat D, Benz CC. Binding of an ETS-related protein within the DNase I hypersensitive site of the HER2/neu promoter in human breast cancer cells. *J Biol Chem* 269: 19848-19858, 1994
  - 30) Yonemura Y, Endo Y, Yamaguchi T, Nojima N, Kawamura T, Fujimura T, Obata T, Kim BS, Miyazaki I, Sasaki T. Roles of VLA-2 and VLA-3 on the formation of peritoneal dissemination in gastric cancer. *Int J Oncol* 8: 925-931, 1996
  - 31) 高村博之, 遠藤良夫, 二宮 致, 米村 豊, 佐々木琢磨. ヒト胃癌, 大腸癌の原発巣, 転移巣におけるインテグリンの発現. *日本臨床* 53: 1678-1682, 1995
  - 32) Saito T, Kimura M, Kawasaki T, Sato S, Tomita Y. Correlation between integrin alpha 5 expression and the malignant phenotype of transitional cell carcinoma. *Br J Cancer* 73: 327-331, 1996
  - 33) Nakayama T, Ito M, Ohtsuru A, Naito S, Nakashima M, Fagin JA, Yamashita S, Sekine I. Expression of the Ets-1 proto-oncogene in human gastric carcinoma: correlation with tumor invasion. *Am J Pathol* 149: 1931-1939, 1996
  - 34) Wernert N, Gilles F, Fafeur V, Bouali F, Raes MB, Pyke C, Dupressoir T, Seitz G, Vandenbunder B, Stehelin D. Stromal expression of c-Ets1 transcription factor correlates with tumor invasion. *Cancer Res* 54: 5683-5688, 1994
  - 35) Iwasaka C, Tanaka K, Abe M, Sato Y. Ets-1 regulates angiogenesis by inducing the expression of urokinase-type plasminogen activator and matrix metalloproteinase-1 and the migration of vascular endothelial cells. *J Cell Physiol* 169: 522-531, 1996
  - 36) Yang BS, Hauser CA, Henkel G, Colman MS, Van Beveren C, Stacey KJ, Hume DA, Maki RA, Ostrowski MC. Ras-mediated phosphorylation of a conserved threonine residue enhances the transactivation activities of c-Ets1 and c-Ets2. *Mol Cell Biol* 16: 538-547, 1996
  - 37) Riikonen T, Westermarck J, Koivisto L, Broberg A, Kahari

VM, Heino J. Integrin alpha 2 beta 1 is a positive regulator of collagenase (MMP-1) and collagen alpha 1 (I) gene expression. *J Biol Chem* 270: 13548-13552, 1995

38) Langholz O, Rockel D, Mauch C, Kozłowska E, Bank I, Krieg T, Eckes B. Collagen and collagenase gene expression in three-dimensional collagen lattices are differentially regulated by alpha 1 beta 1 and alpha 2 beta 1 integrins. *J Cell Biol* 131: 1903-1915, 1995

39) Huhtala P, Humphries MJ, McCarthy JB, Tremble PM, Werb Z, Damsky CH. Cooperative signaling by alpha 5 beta 1 and alpha 4 beta 1 integrins regulates metalloproteinase gene expression in fibroblasts adhering to fibronectin. *J Cell Biol* 129: 867-879, 1995

40) Tremble P, Damsky CH, Werb Z. Components of the nuclear signaling cascade that regulate collagenase gene expression in response to integrin-derived signals. *J Cell Biol* 129: 1707-1720, 1995

41) Wernert N, Raes MB, Lassalle P, Dehouck MP, Gosselin B, Vandembunder B, Stehelin D. *c-ets1* proto-oncogene is a transcription factor expressed in endothelial cells during tumor vascularization and other forms of angiogenesis in humans. *Am J Pathol* 140: 119-127, 1992

42) Bolon I, Gouyer V, Devouassoux M, Vandembunder B, Wernert N, Moro D, Brambilla C, Brambilla E. Expression of *c-ets-1*, collagenase 1, and urokinase-type plasminogen activator genes in lung carcinomas. *Am J Pathol* 147: 1298-1310, 1995

**The role of transcription factor *c-ets-1* in the progression of human gastric cancer** Hideto Fujita, Department of Surgery (II), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920 — *J. Juzen Med Soc.*, **106**, 654 — 665 (1997)

**Key words** gastric cancer, *c-ets-1*, extracellular matrix degradation enzymes, antisense oligonucleotide, metastasis

#### Abstract

Transcription factor ETS-1 protein is one of the end effector molecules of the intracellular signal transduction pathway activated by extracellular stimulation such as growth factor or cytokine. It also regulates gene expression of factors related to proliferation, differentiation, and maturation of the lymphocyte cell. Moreover, it has been demonstrated that matrix degradation enzymes and adhesion molecules regulated by the ETS-1 play an important role in cancer invasion and metastasis. However, what is still not clear is the function of ETS-1 protein in its relevance to cancer progression and malignant phenotypes. Thus, this study focused on ETS-1 protein and *c-ets-1* gene as an activator of malignant behavior for gastric cancer. In 5 out of 6 gastric cancer cell lines, expression of *c-ets-1* mRNA was detected by reverse transcription-PCR analysis. These five cell lines with *c-ets-1* positive expression were all positive for the mRNA expression of u-PA (urokinase-type plasminogen activator), MMP-1 (matrix metalloproteinase-1), TIMP-1 (tissue inhibitors of metalloproteinase-1), integrin- $\alpha$  2, - $\alpha$  3, - $\beta$  4 subunits, and *c-met* proto-oncogene, whereas one cell line with *c-ets-1* negative expression was all negative for these genes. Treatment of NUGC-3 cells with *c-ets-1* antisense oligonucleotides inhibited the expression of ETS-1, MMP-1, and integrin- $\alpha$  2 in a dose-dependent manner and reduced the production of u-PA from NUGC-3 cells. These results suggested that ETS-1 protein up-regulates the expression of MMP-1, u-PA and integrin- $\alpha$  2. Seventy three out of 103 (71%) samples of primary gastric cancer tissues were positively stained for ETS-1 protein by immunohistochemical staining. Expression of ETS-1 protein was correlated with histological differentiation, depth of invasion, or hepatic metastasis of gastric cancer, and was confirmed to be an independent prognostic factor in gastric cancer by Cox multivariate analysis. Furthermore, ETS-1 expression was correlated with the expression of u-PA and MMP-1 in gastric cancer tissues. These results indicate that ETS-1 expression can contribute to promoting malignant behavior in gastric cancer by regulating various proteinases and adhesion molecules.