

# ヒト胃癌の進展における自己分泌型運動因子受容体の発現と役割

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/2297/9191">http://hdl.handle.net/2297/9191</a>

## ヒト胃癌の進展における自己分泌型運動因子受容体の発現と役割

金沢大学医学部医学科外科学第二講座 (主任: 宮崎逸夫教授)

広野 靖 夫

細胞運動は癌の浸潤・転移に関わる主要因子の一つであるが、胃癌の進展と細胞運動との関係はこれまで明らかにされておらず、運動能を司ると考えられる遺伝子の発現も検討されていなかった。本研究では、ヒト胃癌における自己分泌型運動因子 (autocrine motility factor, AMF) 受容体の発現と浸潤、転移、予後との関係を調べるとともに、胃癌培養細胞を用いて受容体をコードする当該遺伝子の発現と機能を検討した。まず、原発性胃癌221例について免疫組織化学的に AMF 受容体の発現を検討したところ、125例 (56.6%) が発現陽性であった。AMF 受容体の発現と分化度、腫瘍径との間に相関は認められなかったが、肉眼型、壁深達度、血管侵襲、リンパ管侵襲といった浸潤関連因子との間に統計学的に有意な相関を示した。また、リンパ節転移、腹膜播種との間にも高い相関を認め、AMF 受容体は転移にも深く関わっていることが示唆された。さらに、臨床病理学的病期が進むにつれて発現陽性率は上昇し、発現陽性群は陰性群に比し有意に予後不良であった。次に、胃癌培養細胞株を用いて AMF 受容体遺伝子の発現と機能を解析した結果、ノーザンブロット分析により使用した8株すべてで AMF 受容体 mRNA が検出され、オルタナティブポリアデニル化によると推定される新しい AMF 受容体 mRNA 分子種の存在も見出された。AMF 受容体 mRNA の 5'領域に相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチドを化学合成し、TMK-1 細胞の培地中に投与すると、細胞増殖はほとんど影響を受けないものの、ケモインページョンアッセイで最大60%浸潤が抑制されることが見出された。したがって、本研究より、AMF 受容体遺伝子はヒト胃癌の進展に関わりうるということが明らかにされ、その発現は胃癌の浸潤、転移、予後に関わる重要な因子であると結論された。

**Key words** autocrine motility factor receptor, cell motility, invasion, metastasis, gastric cancer

癌の浸潤・転移の機構の解明は癌研究における重要命題である<sup>1)</sup>。近年の細胞接着、マトリックス分解、細胞運動に関する分子生物学的研究の目覚ましい進歩は癌細胞の浸潤や転移を明らかにするうえで新しい視点を与えた<sup>2)~5)</sup>。

細胞運動は増殖因子<sup>6)</sup>、細胞外マトリックス<sup>8)</sup>、スキャッター因子 (scatter factor)<sup>9)</sup> 等の種々の因子によって制御されていることが報告されているが、腫瘍細胞自体の自律的な制御系も発見され、自己分泌型運動因子 (autocrine motility factor, AMF) やオートタキシン (autotaxin) などがそれを担う因子として同定されてきた<sup>10)11)</sup>。AMF は Liotta らによってヒト黒色腫細胞の培養液中から産生細胞自身の走化性刺激活性として見出され<sup>10)</sup>、その後マウス黒色腫細胞、ヒト線維肉腫細胞からも分離された<sup>12)13)</sup>。一方、マウスに転移性腫瘍を形成することで知られている B16-F1 黒色腫細胞は扁平から球形状態に変化すると可逆的に肺転移能が高まることが明らかになり<sup>14)</sup>、球形細胞ではレクチンの一種であるピーナツ凝集素 (peanut agglutinin) によって認識される 78kDa の糖蛋白 (78kDa glycoprotein, gp78) の発現が増強していることが報告された<sup>15)</sup>。その後抗 gp78 モノクローナル抗体 (3F3A 抗体) を用いた実験から gp78 が AMF の受容体であることが判明し<sup>12)16)</sup>、ヒト AMF 受

容体 (human autocrine motility factor receptor, hAMFR) をコードする cDNA 配列も Watanabe らによって決定された<sup>6)</sup>。AMF および 3F3A 抗体刺激は AMF 受容体を介して細胞の運動能を高めることが線維肉腫細胞や黒色腫細胞で立証され、腫瘍の進展に AMF および AMF 受容体に関わっている可能性が示唆されるに至った<sup>6)12)16)~18)</sup>。

我が国で癌人口の上位を占める胃癌の進展については、従来細胞増殖あるいは種々の接着分子やマトリックス分解酵素の発現を中心に研究が進められてきているが<sup>19)20)</sup>、細胞運動に関する研究はほとんどなされていない。そこで本研究では、ヒト胃癌の進展と細胞運動性との関係を明らかにする目的で、原発性胃癌における AMF 受容体の発現と浸潤・転移を中心とした癌形質および予後との相関を検討するとともに、胃癌培養細胞を用いて AMF 受容体遺伝子の発現と機能を解析した。

### 材料および方法

#### 1. 対象症例

1985年~1991年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癌221例の10%ホルマリン固定切除標本を用いた。症例の内訳は男性139例、女性82例;管状腺癌71例、乳頭状腺癌

平成7年12月15日受付, 平成8年1月19日受理

Abbreviations: AMF, autocrine motility factor; bp, base pair; BSA, bovine serum albumin; DMEM, Dulbecco's modified Eagle medium; FBS, fetal bovine serum; gp78, 78kDa glycoprotein; hAMFR, human autocrine motility factor receptor; PBS, phosphate-buffered saline; MTT, methylthiazol tetrazolium bromide

17例, 低分化腺癌106例, 粘液癌12例, 印環細胞癌15例; Ia期およびIb期50例, II期49例, IIIa期およびIIIb期39例, IVa期およびIVb期83例であった. 各臨床病理学的因子の記載は胃癌取り扱い規約(改訂第12版)<sup>21)</sup>に従った.

II. 培養細胞株

ヒト胃癌由来培養細胞株 MKN1, MKN7, MKN28, MKN45, MKN74, KATOIII, NUGC3 (Japanese Cancer Research Resources Bank, JCRB より供与), TMK-1 (広島大学病理学, 田原栄一博士より供与) の8株を用いた. いずれの細胞株も RPMI 1640液(日本製薬, 東京)にペニシリン100U/ml, ストレプトマイシン 100 $\mu$ g/ml (GibcoBRL, Grand Island, USA) および10%非働化牛胎児血清 (fetal bovine serum, FBS) (Cell Culture Laboratories, Cleveland, USA) を加えた培地にて培養した. ヒト線維芽細胞株 MRC-5 (JCRB より供与) は15%FBS 加ダルベッコ改変イーグル培地 (Dulbecco's modified Eagle medium, DMEM) (日本製薬) にて維持した. HeLa 細胞 (金沢医科大学第二生化学, 吉竹佳乃博士より供与) は10%FBS 加 DMEM にて維持した. 培養はいずれも37 $^{\circ}$ C, 5%CO<sub>2</sub> 気相下で行った.

III. 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4 $\mu$ m 切片を作製し, 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%過酸化水素水加メタノールに20分間浸透し, リン酸緩衝生理食塩水 (pH7.4) (phosphate-buffered saline, 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正常ヤギ血清 (Dakopatts, Copenhagen, Denmark) に15分間反応させた後, 300倍希釈抗 gp78 モノクローナル抗体 (3F3A 抗体) (群馬大学整形外科, 渡辺秀臣博士より供与) と一晚4 $^{\circ}$ Cにて反応させた. PBS にて洗浄した後, ビオチン化抗ラット IgG 抗体 (Dakopatts) に室温で30分間反応させ, 次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 (Dakopatts) に15分間反応させ 0.04% 3, 3'-ジアミノベンチジン (Sigma, St. Louis, USA) 溶液で発色させた. 核染色は0.3%メチルグリーンにて行った. 陽性コントロールとして悪性黒色腫の10%ホルマリン固定パラフィン包埋標本を用いた. 陰性コントロールには1次抗体として正常ラット血清を用い, 陽性像が得られないことを確認した. 20%以上の癌細胞が染色されたものを陽性として判定した.

IV. 統計学的解析

臨床病理学的因子との相関は $\chi^2$ 検定にて判定した. 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.

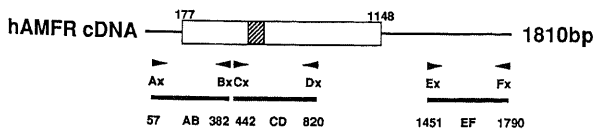


Fig.1. Primers and probes for detecting AMF receptor mRNAs. Box indicates open reading frame; hatched box, transmembrane domain; arrows, primers used for PCR; bars, probes for Northern blot hybridization. Numbers indicating the nucleotide positions are from ref. 5.

V. DNA の化学合成

1. プライマーおよびプローブ

全長1810塩基対 (base pair, bp) のヒト AMF 受容体 cDNA から, 5'非翻訳領域, コード域, 3'非翻訳領域に対応するプローブを作製した (図1). プローブを PCR 法で調製するためのプライマーとして以下のオリゴデオキシリボヌクレオチドを設計し, DNA 合成装置モデル 392 (Applied Biosystems, CA, USA) を使用して合成した後, OPC カラム (Applied Biosystems) を用いて精製した. 各プライマーの配列は Ax (5'-GTGTGCCACTGGACCTCAGT-3'), Bx (5'-CTAGGAGGTCTGCTGCTTCT-3'), Cx (5'-CTGTCCCAATTCTGCCCTCC-3'), Dx (5'-ACAGATGTTACCCCACGACG-3'), Ex (5'-TGAACCATGAAGTCATAGGT-3'), Fx (5'-CAAATAGCTATGCTCTCAGC-3') である. hAMFR cDNA (群馬大学整形外科, 渡辺秀臣博士より供与) を鋳型として PCR 法でプローブ DNA を増幅, 精製した.

2. アンチセンスおよびセンスオリゴヌクレオチド

AMF 受容体 mRNA の開始コドンを含む 5'領域に相補的な18塩基のフォスフォロチオエート型アンチセンスオリゴデオキシリボヌクレオチドおよび対照となるセンスオリゴデオキシリボヌクレオチドを DNA 合成装置モデル392を用いて合成し, AQUAPORE RP-300 カラム (Applied Biosystems) を用いた逆相分配高速液体クロマトグラフィーにて精製した. アンチセンスオリゴヌクレオチドの塩基配列は 5'-CGCTGTCTCTCATCAGCA-3', センス配列は5'-TGCTGATGAGAGACAGCG-3' である. フォスフォロチオエート型オリゴヌクレオチドは通常のフォスフェイト型に比し安定性が高く, 細胞への取り込み効率も良好であることが知られている<sup>22)</sup>.

VI. サザンブロットハイブリダイゼーション

高分子 DNA を Cooper ら<sup>23)</sup>の方法に従って抽出し, 10 $\mu$ g を制限酵素 EcoRI および Hind III にて切断して1%アガロースゲル電気泳動後, ナイロンメンブレンフィルター (Gene Screen Plus, Dupont, Boston, USA) へ転写した. メンブレンフィルター上の DNA 断片はマルチプライム標識キット (Amersham, Buckinghamshire, UK) と [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP (NEN Research Products, Wilmington, USA) を用いて標識した 1810bp の hAMFR cDNA をプローブとして10%硫酸デキストラン, 1% SDS, 1M NaCl, 50mM Tris (pH7.5), 100 $\mu$ g/ml 変性サケ精子 DNA (Sigma) 中で20時間, 65 $^{\circ}$ Cにてハイブリダイゼーションを

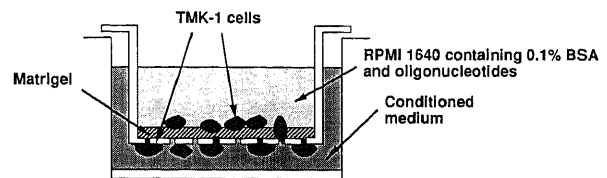


Fig.2. Schematic diagram illustrating chemoinvasion assay system. The porous (8  $\mu$ m) membrane of the upper chamber was coated with 10  $\mu$ g of matrigel. Suspension of TMK-1 cells in RPMI 1640 containing oligonucleotides and 0.1% BSA was added to the upper chamber. Conditioned medium prepared from MRC-5 cells culture, was used as a source of chemoattractants and placed in the lower chamber.

行った。フィルターを洗浄後、 $-80^{\circ}\text{C}$ でオートラジオグラフィを行った。

### III. ノーザンブロットハイブリダイゼーション

Poly (A)<sup>+</sup>RNA は QuickPrep mRNA Purification Kit (Pharmacia, Uppsala, Sweden) を用いて抽出した。また全 RNA は Chomczynski ら<sup>20)</sup>の方法にて抽出した。ポリ (A)<sup>+</sup>RNA 1 $\mu\text{g}$ あるいは全 RNA 20 $\mu\text{g}$ をホルムアミド、ホルムアルデヒドで変性後、2%ホルムアルデヒド加1.5%アガロースゲル上を電気泳動し、ナイロンメンブレンフィルター (Gene Screen Plus) に転写した。プローブはサザンブロットと同じ<sup>32</sup>P 標識 cDNA を使用し、ハイブリダイゼーション液 (50%ホルムアミド, 5 $\times$ Denhalt (0.1% ポリビニールピロリドン, 0.1%ウシアルブミン, 0.1%フィコール), 1M NaCl, 10%硫酸デキストラン, 1% SDS, 50mM Tris (pH7.5), 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 変性サケ精子 DNA) 中で20~24時間、 $42^{\circ}\text{C}$ にてインキュベートした。Watanabe ら<sup>5)</sup>と同一条件にてフィルターを洗浄後、 $-80^{\circ}\text{C}$ でオートラジオグラフィを行った。同じフィルターをデハイブリダイゼーションを行った後、 $\beta$ -アクチン cDNA と再びハイブリダイゼーションを行い、得られたシグナルを内部コントロールとした。

### VI. ウェスタンブロット

60~70%飽和状態の TMK-1 細胞に種々の濃度のフォスホロチオエート型アンチセンスオリゴヌクレオチドおよび対照のセンスオリゴヌクレオチドを投与し48時間培養した。PBS にて洗浄した後、0.25%トリプシンで分散し、遠心回収した沈渣を細胞溶解液 (10mM Tris-HCl (pH7.4), 0.1M NaCl, 1mM EDTA, 0.1%SDS, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ フェニルメチルスルホニルフルオリド (phenylmethylsulfonyl fluoride)) 中で超音波破碎にて溶解した。上清のみ採取し、Bradford 法<sup>25)</sup>で蛋白定量した。10 $\mu\text{g}$ を $\beta$ -メルカプトエタノール (和光純薬, 大阪) にて還元後、8% SDS-PAGE にて電気泳動し、ニトロセルロースメンブレン (Hybond ECL) (Amersham, Buckinghamshire, UK) にセミドライトランスファーした。ブロッキングは Lotan ら<sup>26)</sup>の方法に準じて行った。メンブレンを15%スキムミルク含 PBS にて一晩振とうした後、1000倍に希釈した抗 gp78 モノクローナル抗体 (3F3A 抗体) 含腹水上清と室温で1時間反応させた。0.1% Tween20 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) 加 PBS で洗浄した後、10000倍希釈したヒツジ由来西洋ワサビペルオキシダーゼ (horseradish peroxidase, HRP) 標識抗ラット抗体 (Amersham) で室温で1時間処理した。0.1% Tween20 加 PBS にて洗浄し ECL (Amersham) を用いて発光させ検出した。

### VII. 細胞増殖アッセイ

低分化胃癌由来培養細胞として TMK-1 細胞株, 高分化胃癌由来培養細胞として MKN28 細胞株を用いた。96穴マイクロプレートにウェル当たり2000個の細胞を播き24時間培養した後、培地をアンチセンスおよびセンスヌクレオチドを含む10%FBS 加 RPMI1640 培地に交換して一定時間培養した。細胞増殖は Alley ら<sup>27)</sup>の方法を改変したメチルチアゾールテトラゾリウムブロマイド (methylthiazol tetrazolium bromide, MTT) (Sigma) 法にて測定した。すなわち、培地を除き PBS で細胞洗った後、0.1M コハク酸ナトリウム (和光純薬) と 0.4%MTT を 1 : 1 に混合した溶液をウェル当たり 20 $\mu\text{l}$  を加えて3時間インキュベーションをし、生成されたホルマザンを

遠心回収した。150 $\mu\text{l}$  のジメチルスルホキシド (和光純薬) にて溶解した後、Model EAR 340 reader (SLT-Lab Instrument, Salzburg, Austria) を用いて 540nm で吸光定量した。

### VIII. 細胞浸潤アッセイ

VIの実験と同様に、TMK-1 細胞株および MKN28 細胞株を使用し、Albini ら<sup>28)</sup>の方法を改良して行った。すなわち、図2に示すように 8 $\mu\text{m}$  ポアサイズのインベージョンチャンバー

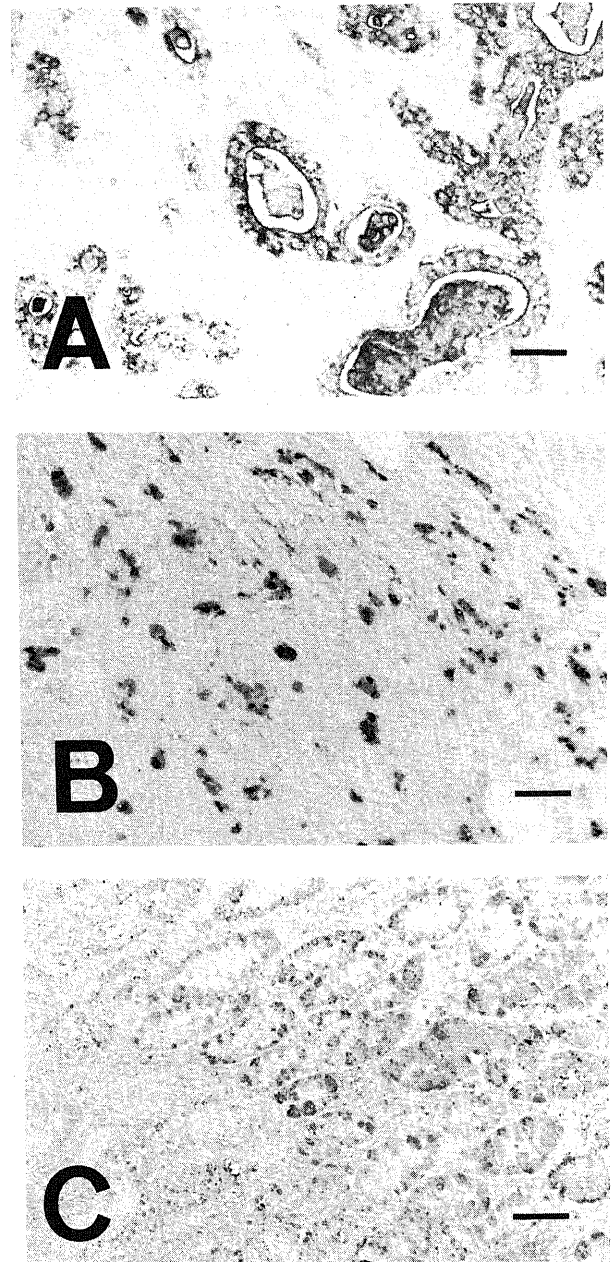


Fig. 3. Immunohistochemical staining with anti-gp 78 monoclonal antibody. (A) Well differentiated adenocarcinoma of the stomach. Immunoreacted materials are markedly on the plasma membrane and cytoplasmic of the tumor cells. (B) Poorly differentiated adenocarcinoma of the stomach. Only tumor cells are intensively stained for gp 78. (C) Epithelial cells in normal mucosa is showing weak immunoreactivity. Bars in (A) and (B), 50  $\mu\text{m}$ ; bar in (C), 100  $\mu\text{m}$ .

(Becton Dickinson Labware, Bedford, USA) の上面を 10 $\mu$ g のマトリゲル (Becton Dickinson) でコートして風乾し, 使用前に培養液にてゲルを膨潤させた. 0.1%牛血清アルブミン (bovine serum albumin, BSA) (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) を含む RPMI1640 培地にて細胞浮遊液を作製した後, 1 $\times$ 10<sup>5</sup>個をチャンバーに加えた. 同時に 0, 5, 10 $\mu$ M の各濃度になるようにアンチセンス, センソオリゴヌクレオチドを加えた. また AMF と同様の走化性誘導活性を持つ<sup>19,20</sup>抗 gp78 モノクローナル抗体 (3F3A 抗体) 含腹水を 25 $\mu$ l/ml の濃度で投与した. チャンバー下段には飽和状態のヒト線維芽細胞 MRC-5 に24時間接触させた 0.1%BSA 加 RPMI1640 培地をケモアトラクタント溶液として置いた. 37 $^{\circ}$ C, 5%CO<sub>2</sub>気相下で8時間培養した後, メタノールにて固定した. フィルター上面に残存した細胞をマトリゲルとともにふき取り, 下面に遊走した細胞を核染色した後, 1検体当たり最小20視野ずつ200倍にて鏡検し細胞数を計測した. 実験は各3回ずつ行った.

成 績

1. ヒト原発性胃癌における AMF 受容体の発現と臨床病理学的因子との関連

外科的に切除した原発性胃癌221検体中125検体 (56.6%) で AMF 受容体蛋白の発現が認められた. 癌細胞は細胞膜および

細胞質に抗 gp78 抗体と反応する免疫原物質を有し, 分化型では細胞質内に細かい顆粒状にはほぼ均一に染まり, 未分化型では比較的大きな顆粒が2~3個当該抗体で染色された (図 3A, B). 一方, 正常胃粘膜は増殖帯中心に陽性像を認めるものもあったが染色像は癌部に比して淡かった (図 3C). 腫瘍先進部は中央部に比して強く発現している像をしばしば認めた (図 4). 表 1 は臨床病理学的各因子と AMF 受容体 (gp78) 発現との関連をまとめたものである. 年齢, 性別には両群間で差がない. 分化度と gp78 発現の間には有意な相関は認めなかった. 浸潤関連形質との関連をみると, 肉眼型では限局型 (41.7%) に比して浸潤型 (68.0%) に有意に陽性例が多く ( $p=0.0002$ ), 深達度の上昇ともなって t1 で31.4%, t2 で54.1%, t3, 4 で69.3%と有意に陽性率は上昇した ( $p=0.0005$ ). 脈管侵襲ではリンパ管侵襲 ( $p=0.0020$ ) および血管侵襲 ( $p=0.0075$ ) 双方と高い相関を示した. 次に転移との関係をみると, 肝転移との間には gp78 陽性例に肝転移陽性例が多いものの, 有意な相関を認めなかった. リンパ節転移との間には高い相関を認めた

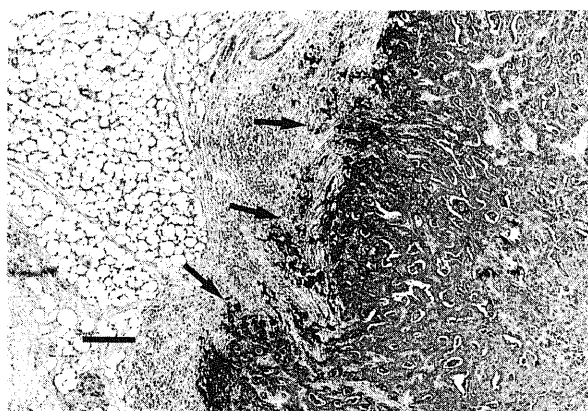


Fig. 4. Immunohistochemical staining with anti-gp 78 monoclonal antibody in the invasive front of the tumor. Tumor cells in the invasive front (arrows) are more strongly stained for gp 78 than those in tumor center (bar, 250  $\mu$ m).

Table 1. Correlation of gp78 expression and clinicopathological findings

Variables	Number of samples		P value*
	gp78-negative	gp78-positive	
Tumor size			
<6cm	49	54	0.2467
$\geq$ 6cm	47	71	
Histologic type			
Differentiated	43	45	0.2361
Undifferentiated	53	80	
Macroscopic type			
Localized	56	40	0.0002
Infiltrating	40	85	
Grade of tumor penetration			
t1 (m, sm)	24	11	0.0005
t2 (mp, ss)	45	53	
t3, 4 (se, si)	27	61	
Venous invasion			
Negative	59	53	0.0075
Positive	37	72	
Lymphatic invasion			
Negative	24	11	0.0020
Positive	72	114	
Lymph node metastasis			
Negative	36	24	0.0040
Positive	60	101	
Hepatic metastasis			
Negative	88	111	0.6320
Positive	8	14	
Peritoneal dissemination			
Negative	86	87	0.0007
Positive	10	38	
Histopathological stage			
I	32	18	0.0018
II	24	25	
III	14	25	
IV	26	57	

\*Chi-square test  
m, mucosa; sm, submucosa; mp, muscularis propria; ss, subserosa; se, serosa-exposed; si, serosa-infiltrating.

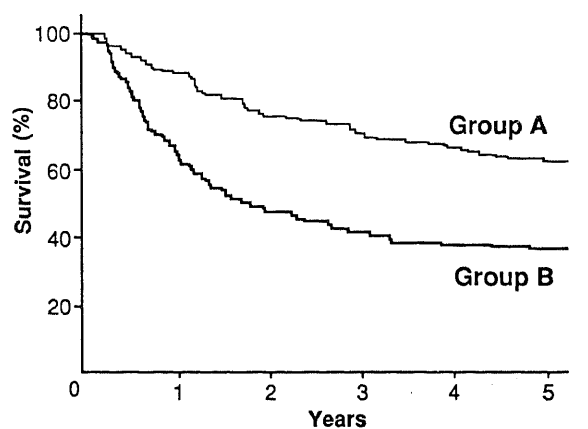


Fig. 5. Overall survivals of gp 78-positive and negative cases with primary gastric cancer. Group A, gp 78-negative patients (n=96); group B, gp 78-positive patients (n=125). \*,  $P<0.001$ .

( $p=0.0040$ ). また、腹膜播種陽性例では79.2%と極めて高い gp78 陽性率が得られ、統計学的にも高い相関を認めた ( $p=0.0007$ ). 臨床病理学的病期との関係では、陽性率は I a, I b 期で36.0%, II 期51.0%, III a, III b 期64.1%, IV a, IV b 期68.7%と病期の進行とともに上昇し、有意な相関を認めた. 予後との関係をみると、全症例を含めた検討では gp78 発現陰性例の5年生存率は63.8%であるのに対し、陽性例の5年生存率は37.5%と極めて不良であり、両群間に有意の差を認めた ( $p<0.001$ ) (図5). また、治癒切除後の再発が一番問題となる II 期, III a 期, III b 期の症例のみに限った検討でも gp78 発現陽性群と陰性群の間には5年生存率でそれぞれ59.3%, 75.3%と差があり、発現陽性群は有意に予後不良であった ( $p<0.05$ ) (図6).

II. 胃癌培養細胞株における AMF 受容体遺伝子の発現と機能

1. サザンブロット法による AMF 受容体遺伝子の解析  
胃癌培養細胞株8株からゲノム DNA を分離し、制限酵素

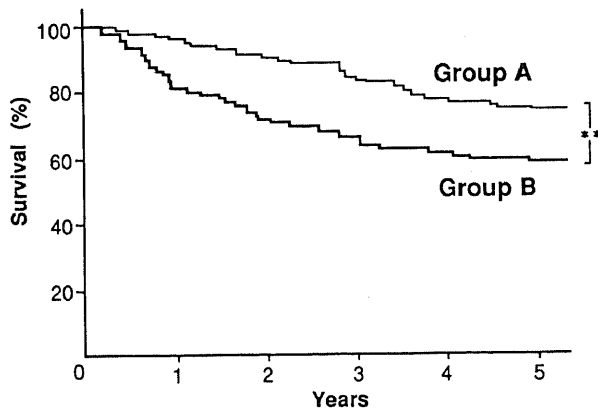


Fig. 6. Survival curves of 88 patients at stages II and III. They were subdivided with respect of the presence or absence of gp 78 expression in primary tumors. Group A, gp 78-negative patients (n=38); group B, gp 78-positive patients (n=50). \*\*,  $P<0.05$ .

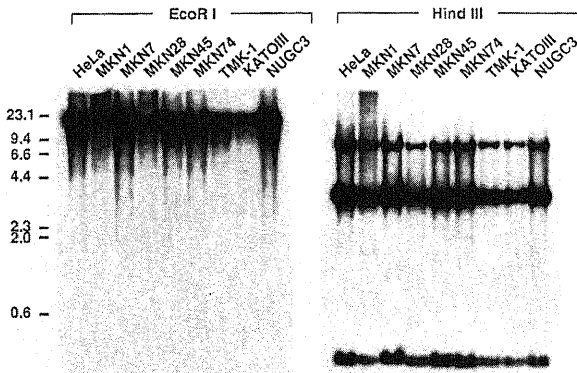


Fig. 7. Southern blot hybridization of DNAs from HeLa cells and from 8 gastric cancer cell lines. DNAs were digested with restriction endonucleases, *Eco* RI and *Hind* III, electrophoresed on 1% agarose gel, and transferred to nylon membrane. The membrane was hybridized with  $^{32}$ P-labeled hAMFR cDNA probe.

*Eco*RI, *Hind*III にて消化後、hAMFR cDNA プローブを用いてサザンブロットハイブリダイゼーションを行った. 対照として AMF 受容体遺伝子の発現が既に知られている HeLa 細胞を用いた. 図7に示すように、すべての胃癌細胞株 DNA 消化物において対応する HeLa 細胞 DNA 消化物と同じ位置にバンドが検出され、ほぼ同等のシグナル強度を示した. 欠失、再構成等は検出されなかった.

2. ノーザンブロット法による AMF 受容体 mRNA の検出  
同じ9種の細胞株から RNA を分離し、hAMFR cDNA をプローブとしたノーザンブロットハイブリダイゼーションを行った. 図8に示すように、どの胃癌細胞株でも対照の HeLa 細胞と同様、約 4.0kb の位置に主要バンドが認められた. また、弱くハイブリッドを形成する鎖長のより短い 3.5kb のバンドも各レーンで観察された. この 3.5kb の由来を調べるため、5'非翻訳領域、コード域、3'非翻訳領域に対応する cDNA 断片を PCR 法で調製し、各増幅 DNA 断片をプローブとしてノーザンブロット分析を行った. その結果、4.0kb ほどのプローブでも検出される一方、3.5kb バンドは 5'領域、コード域に対応するプローブで検出され、3'領域プローブでは検出されなかった

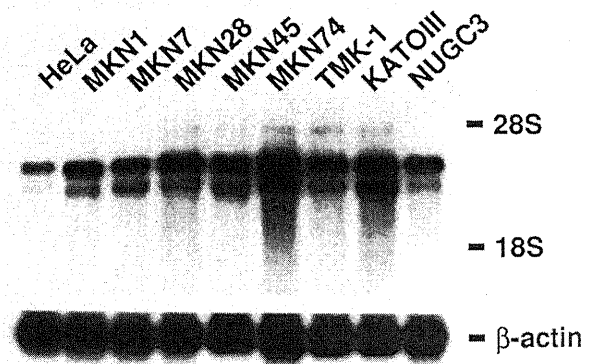


Fig. 8. Northern blot analysis of AMF receptor mRNA in gastric cancer cell lines. One  $\mu$ g each of poly (A)<sup>+</sup> RNA from HeLa cells and from 8 gastric cancer cell lines was probed with a  $^{32}$ P-labeled hAMFR cDNA. Clear hybridization bands are marked at 4.0 and 3.5 kilobase in all cell lines. The same membrane was hybridized with  $\beta$ -actin probe.



Fig. 9. Northern blot analyses using probes directed toward the 5- and 3-untranslated regions and the coding region of AMF receptor mRNA. One  $\mu$ g of poly (A)<sup>+</sup> RNA from MKN 74 and KATO III was hybridized with the cDNA fragments. AB and CD probes detected 4.0- and 3.5-kilobase transcripts, whereas probe EF hybridized with only 4.0 kilobase transcript.

(図9). なお、実際のヒト胃癌症例でも原発巣と周辺健常部から別々に RNA を抽出し、ノーザンブロット解析を行うと 4.0kb あるいは 3.5kb mRNA の発現が癌領域で強く認められ、正常組織では弱かった (図10).

3. AMF 受容体アンチセンスオリゴヌクレオチドの増殖への影響

AMF 受容体遺伝子の発現と胃癌細胞の増殖との関係を見るため、AMF 受容体 mRNA に相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチドを作製して、当該遺伝子を発現している TMK-1 株 (低分化型胃癌由来) と MKN28 株 (高分化型胃癌由来) の増殖に及ぼす影響を調べた。発現に対するオリゴヌクレオチドの作用は予めウエスタンブロット法で確認した (図11)。アンチセンスオリゴヌクレオチド投与細胞では AMF 受容体蛋白が実際減少しており、対照のセンスオリゴヌクレオチド投与細胞では受容体蛋白レベルに変化は認められなかった。図12は細胞増殖アッセイの結果を示す。TMK-1 細胞株、MKN28 細胞株のいずれにおいてもアンチセンスオリゴヌクレオチドによって増殖は

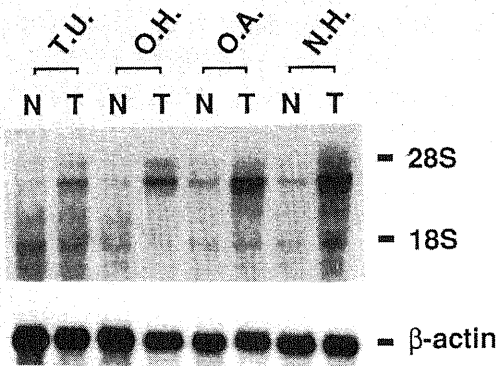


Fig. 10. Northern blot analysis of AMF receptor mRNA in primary gastric tumors. Twenty  $\mu\text{g}$  of total RNA from surgical specimens and their neighboring normal tissues of the same patients, was hybridized with  $^{32}\text{P}$ -labeled hAMFR cDNA probe. T. U., O. H., O. A. or N. H. stands for the initials of each patient's name. T, tumor tissue; N, normal tissue.

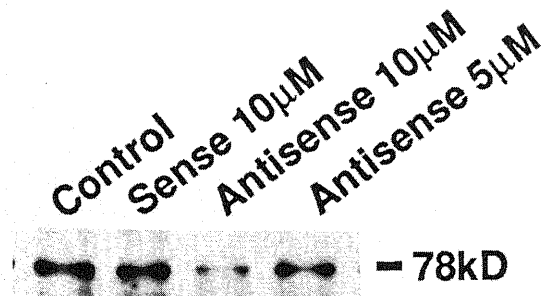


Fig. 11. Inhibition of the translation of AMF receptor mRNA by AMF receptor antisense oligonucleotides. After treatment with sense or antisense oligonucleotides for 2 days, proteins were extracted from TMK-1 cells, and subjected to Western blot analysis with anti-gp 78 monoclonal antibody.

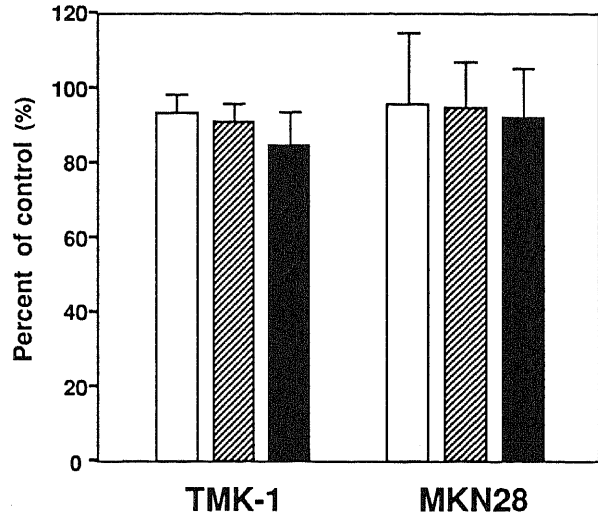


Fig. 12. Effect of antisense oligonucleotides on the proliferation of TMK-1 and MKN 28 cells. Cells ( $2 \times 10^5$  cells/well) were seeded into 96-well cluster dishes and treated with either antisense and sense oligonucleotides for 24 hr. Cell growth was assessed by the methylthiazol tetrazolium bromide (MTT) method. Values are expressed as  $\bar{x} \pm \text{SD}$  of 3 separate experiments, each of which was conducted in triplicate, and related to those of untreated control. White columns, 10  $\mu\text{M}$  sense oligonucleotide; hatched columns, 5  $\mu\text{M}$  antisense oligonucleotide; black columns, 10  $\mu\text{M}$  antisense oligonucleotide.

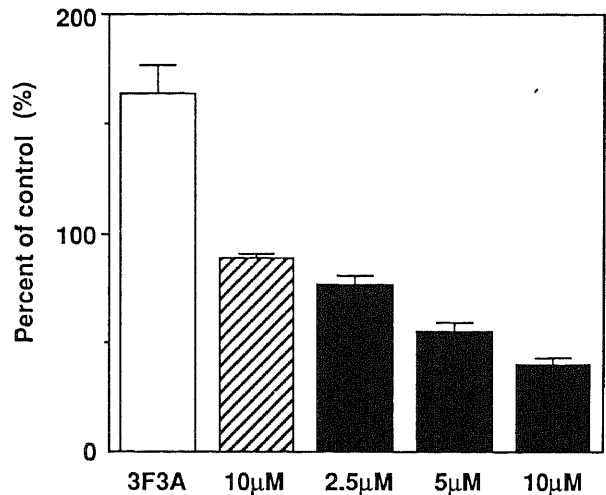


Fig. 13. Effect of antisense oligonucleotides on the invasion of TMK-1 cells. Cells ( $1 \times 10^5$  cells/chamber) were seeded into matrigel-coated invasion chamber. After incubation with 3F3A antibody or oligonucleotides for 8 hr, cells that had invaded underneath the membrane were counted. Data were conducted in triplicate, and from 3 separate experiments, each expressed as the mean percent value ( $\pm$  SEM) relative to untreated control. Values represent the average of performed in triplicate. White column, 3F3A antibody-treated; hatched column, sense oligonucleotide-treated; black columns, antisense oligonucleotide-treated.

抑制されなかった。センスオリゴヌクレオチドも変化を与えなかった。

#### 4. アンチセンスオリゴヌクレオチドによる浸潤抑制

次に、AMF 受容体アンチセンスオリゴヌクレオチドが胃癌細胞の浸潤を抑制しうるかどうかを同じ2種の細胞株を用いてケモインページョンアッセイ法にて調べた。まず TMK-1 細胞株の浸潤度は図13に示すように AMF と同等の走化性誘導活性を持つ 3F3A 抗体による刺激で約1.6倍に増加した。そこで次に、AMF 受容体に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドを投与すると浸潤は濃度依存的に抑制され、10  $\mu$ M で浸潤度は約60%抑制された。センスオリゴヌクレオチドでは抑制は認められなかった。一方、MKN28 細胞株はインページョンアッセイ系では浸潤を示さず、アンチセンスおよびセンスオリゴヌクレオチドの影響を受けなかった。

### 考 察

細胞運動は個体発生、創傷治癒、血管新生、組織再生、免疫防御など生体の様々な過程で大きな役割を果たしている。しかし通常は隣接する組織間で厳重に制御されていると考えられ、腫瘍の浸潤・転移は運動制御が乱れるか、あるいは自律的に行われる状態と考えられる<sup>11)17)18)</sup>。腫瘍の浸潤・転移にとって運動性は重要な因子の一つであり、高転移能株は低転移能株より運動能が高いことも報告されている<sup>30)</sup>。最近、腫瘍細胞が産生、分泌し、腫瘍細胞自身の運動を刺激する活性因子が複数発見され、自己分泌型の運動制御因子として自律的な細胞運動に関与する可能性が示唆されている<sup>10)11)31)</sup>。AMF はこれらの因子の一つで、ヒトおよびマウスの黒色腫細胞、ヒト線維肉腫細胞、ヒト膀胱癌細胞などから分離されているが、未だその一次構造は決定されていない<sup>13)16)32)</sup>。一方、AMF をリガンドとする受容体は、転移能の上昇した B16-F1 黒色腫で発現が増強することが知られていた糖蛋白 (gp78) と同一物質であることが判明し、gp78 に対するモノクローナル抗体 (3F3A 抗体) を用いて cDNA クローンも分離された<sup>5)12)15)~18)</sup>。この AMF 受容体の発現と腫瘍進展との関連は現在までに膀胱癌と大腸癌において免疫組織化学的に検討され<sup>33)34)</sup>、培養下での細胞運動に及ぼす AMF 受容体の効果が黒色腫細胞や線維肉腫細胞を用いて研究されてきているが、他の腫瘍細胞、特に消化器癌細胞での研究はほとんどなされていない<sup>13)17)18)26)35)~37)</sup>。本研究で著者は、胃癌の進展における AMF 受容体の役割に関して、1) ヒト胃癌検体における AMF 受容体発現と浸潤、転移、予後との相関、2) 胃癌培養細胞における AMF 受容体発現と浸潤能の関連の両面から検討した。

まず原発性胃癌検体の免疫組織化学染色による解析より、AMF 受容体蛋白の発現頻度が胃癌の進行度に応じて増大し、発現陽性率は肉眼型、壁深達度、脈管侵襲など浸潤と関連するすべての因子と高い相関を示すことが明らかにされた。膀胱癌では腫瘍病変が進行したもののほど gp78 の陽性率が上昇し、大腸癌においては深達度や脈管侵襲と相関していると報告されており、これらは本研究の結果とも一致する。また、胃癌ではリンパ節転移とも相関しており、大腸癌と極めて近い結果となった。膀胱癌、大腸癌いずれの場合にも分化度の低い方が gp78 の陽性率は有意に高いとされているが、胃癌においては同様の傾向はあるものの統計学的な差は認めなかった。本研究でさらに胃癌においては gp78 の発現が腹膜播種とも関連することが

はじめて明らかとなった。腹膜播種は胃癌の根治性を失わせる最大の要因であり、このメカニズムの解明に AMF 受容体の研究が役立つ可能性が考えられる。腹膜播種をしばしば認める卵巢癌など他の腫瘍の進展にも AMF 受容体が関係していることが予想され、興味を持たれるところである。更に AMF 受容体の発現は大腸癌だけでなく、胃癌でも予後と関係していることが本研究により明らかになった。これは術後特に再発の有無を経過観察していく必要のある<sup>38)39)</sup> IIa 期、IIIa 期、IIIb 期の症例に限った場合でも予後とよく相関するため、AMF 受容体は症例の予後を占うよい指標となろう。AMF 受容体蛋白の発現は免疫組織化学染色で簡便に調べられるため、術後補助療法の指標としても有用と考えられた。

本研究でまた、手術標本を免疫組織化学染色にて検討すると組織型により染色パターンすなわち gp78 の局在が異なることが見出された。すなわち、管腔形成を示す高分化型では AMF 受容体蛋白は細胞膜および細胞質に発現を認めるものの細かい顆粒状に分散して存在していた。ところが、スキルス胃癌のように腫瘍細胞が散在性に広がっている低分化型では、AMF 受容体蛋白は細胞内に凝集した数個の濃い顆粒として存在した。また、腫瘍先進部では発現強度が上昇していることが多かった。従来 AMF 受容体は細胞膜上で AMF と結合した後、内部移行することが報告されており、この際高転移能を有する細胞では核周囲から先進方向へ運ばれ、内部移行されなかったものは後端に偏在するというように、偏在傾向が強くなり、一方、低転移能株では偏在傾向が比較的弱いとされてきた<sup>18)37)</sup>。すなわち AMF 受容体が発現する細胞運動能を規定するには gp78 蛋白の発現レベルのみでなく局在化 (偏在) という要素が重要と考えられ、仮に発現レベルが同程度でも gp78 蛋白偏在の強弱により、生物学的性質の違いを生じているのではないかと推察された。また、Silletti らは細胞接触により gp78 蛋白の発現が低下することを報告したが<sup>29)</sup>、最近前立腺癌細胞の高転移能株や膀胱癌細胞ではこの制御が欠如していることを報告している<sup>36)40)</sup>。さらに、AMF 受容体の発現は E-cadherin の発現と逆相関しているとの観察もある<sup>34)</sup>。したがって、細胞接触の状態やある種の接着分子も浸潤能に影響を与えている可能性がある。AMF 受容体と接着分子、分化度の関係は癌の浸潤機構を解明する上で重要と考えられる。

本研究ではつぎに、ヒト胃癌由来培養細胞を用いて、AMF 受容体遺伝子の発現と機能の検定を行った。まず、サザンブロット分析で検索した胃癌細胞株 8 株すべてで当該遺伝子には大きな構造変化がないことが明らかにされた。つぎに、ノーザンブロット分析でいずれの胃癌細胞株も AMF 受容体 mRNA を発現していることが見出された。同様の方法でヒト胃癌組織と同一個体粘膜での AMF 受容体 mRNA を調べたところ、全例で癌組織における発現レベルが正常組織より高かった。以上の結果から胃癌における AMF 受容体遺伝子の発現の増大は遺伝子増幅よりはむしろ転写の活性化によるものと推定された。なお、ノーザンブロットで AMF 受容体 cDNA とハイブリッドを形成する約 3.5kb のバンドが検出された。これは 3'プロブでは検出されなかったことから、オルナティブなポリアデニル化の結果生じた新しい AMF 受容体 mRNA 分子種と考えられた。また、本研究では腫瘍のみでなく正常胃粘膜にも低レベルながら AMF 受容体が発現していることがはじめて確認された。胃粘膜の細胞動態に関しては従来主として細胞回転の観点



から研究が行われ<sup>(41)(42)</sup>, 粘膜構成細胞の移動を司るメカニズムについては明らかでなかった. 本研究で観察された正常胃粘膜における定常レベルの AMF 受容体 mRNA の発現は AMF リガンド-受容体系が胃粘膜の恒常性維持に関係している可能性を示唆している.

AMF 受容体の生物学的役割は従来受容体を刺激する方法で調べられてきたが<sup>(12)(10)(20)(37)</sup>, 本研究ではアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いて AMF 受容体遺伝子の発現を逆にブロックすることによりその機能を検定した. 多くの増殖因子が運動能に影響を及ぼすことが報告され細胞増殖と運動因子との関連が注目されており<sup>(6)(7)(8)</sup>, 加えて AMF が線維芽細胞の増殖を促進するという報告がなされている<sup>(29)</sup> ことから, まず胃癌培養細胞の増殖に及ぼす効果について検討を行ったが, 発現抑制による大きな変化は認められなかった. これは 3T3/A31 線維芽細胞でも AMF の増殖因子活性を発現する濃度は運動能を刺激する濃度の約10倍高い値を要することが報告されており<sup>(29)</sup>, AMF-AMF 受容体系は通常増殖には直接関与しないのではないかと推察される. また, 免疫組織化学染色による臨床症例での検討でも, 増殖と関係すると考えられる腫瘍径と受容体発現とは相関が認められなかった. 次に胃癌細胞の浸潤能に及ぼす効果につき検討したところ, アンチセンスオリゴヌクレオチドを用いて AMF 受容体の発現を抑制することで TMK-1 細胞の浸潤が抑制されることが見出された. これは, AMF 受容体が胃癌細胞の浸潤に機能的に関わっていることを示している. 本研究で開発したような AMF 受容体 mRNA に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドがヒト胃癌の進展阻止のための有効な治療手段となる可能性も考えられる.

## 結 論

細胞運動に関係する AMF 受容体の発現が胃癌の進展にどのような役割を果たしているのかにつき, 原発性胃癌切除標本と胃癌培養細胞株を用いて検討し, 以下の知見を得た.

1. 抗 gp78 モノクローナル抗体を用いた免疫組織化学染色の結果, AMF 受容体の発現は胃癌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.

2. すべての胃癌培養細胞株で AMF 受容体 mRNA が検出されオルタナティブポリアデニル化によると考えられる新しい AMF 受容体 mRNA 分子種も見出された. AMF 受容体 mRNA をコードする遺伝子には増幅や大きな構造変化は認められなかった. AMF 受容体 mRNA は正常粘膜にも低レベルで存在していた.

3. AMF 受容体 mRNA に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド投与により TMK-1 胃癌細胞株の浸潤が抑制された. 一方細胞増殖は大きな影響を受けなかった.

以上の結果から, AMF 受容体は胃癌の浸潤, 転移, 予後に関わる重要な因子であり, 当該遺伝子は胃癌の進展に機能的に関わりうると結論された.

## 謝 辞

稿を終えるに臨み, 御指導, 御校閲を賜りました恩師宮崎逸夫教授に深甚なる謝意を表します. また終始直接の御指導, 御助言を賜りました金沢大学医学部生化学第二講座の山本博教授ならびに外科学第二講座米村豊博士に心から感謝致します. さらに御支援と御協力を頂きました金

沢大学外科学第二講座ならびに生化学第二講座の皆様には感謝致します. 尚, 本論文の要旨の一部は第54回日本癌学会 (1995, 京都), 第46回日本消化器外科学会総会 (1995, 福井), 第5回アンチセンスシンポジウム (1995, 筑波) において発表した.

## 文 献

- 1) Fidler, I. J.: Critical factors in biology of human cancer metastasis: Twenty-eighth G. H. A. Clowes memorial award lecture. *Cancer Res.*, **50**, 6130-6138 (1990).
- 2) Sato, H., Takino, T., Okada, Y., Cao, J., Shinagawa, A., Yamamoto, E. & Seiki, M.: A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells. *Nature*, **370**, 61-65 (1994).
- 3) Foekens, J. A., Buessecker, F., Peters, H. A., Krainick, U., van Putten, W. L., Look, M. P., Klijn, J. G. & Kramer, M. D.: Plasminogen activator inhibitor-2: prognostic relevance in 1012 patients with primary breast cancer. *Cancer Res.*, **55**, 1423-1427 (1995).
- 4) Okada, A., Bellocq, J. P., Rouyer, N., Chenard, M. P., Rio, M. C., Chambon, P. & Basset, P.: Membrane-type matrix metalloproteinase (MT-MMP) gene is expressed in stromal cells of human colon, breast, and head and neck carcinomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 2730-2734 (1995).
- 5) Watanabe, H., Carmi, P., Hogan, V., Raz, T., Silletti, S., Nabi, I. R. & Raz, A.: Purification of human tumor cell autocrine motility factor and molecular cloning of its receptor. *J. Biol. Chem.*, **266**, 13442-13448 (1991).
- 6) Mooradian, D. L., McCarthy, J. B., Komanduri, K. V. & Furcht, L. T.: Effects of transforming growth factor- $\beta$ 1 on human pulmonary adenocarcinoma cell adhesion, motility, and invasion in vitro. *J. Natl. Cancer Inst.*, **84**, 523-527 (1992).
- 7) Stracke, M. L., Engel, J. D., Wilson, L. W., Rechler, M. M., Liotta, L. A. & Schiffmann, E.: The type I insulin-like growth factor receptor is a motility receptor in human melanoma cells. *J. Biol. Chem.*, **264**, 21544-21549 (1989).
- 8) Turley, E. A., Austin, L., Vandelight, K. & Clary, C.: Hyaluronan and a cell-associated hyaluronan binding protein regulate the locomotion of ras-transformed cells. *J. Cell. Biol.*, **112**, 1041-1047 (1991).
- 9) Weidner, K. M., Arakaki, N., Hartmann, G., Vandekerckhove, J., Weingart, T., Rieder, H., Fonatsch, C., Tsubouchi, H., Hishida, T., Daikuhara, Y. & Birchmeier, W.: Evidence for the identify of human scatter factor and human hepatocyte growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 7001-7005 (1991).
- 10) Liotta, L. A., Mandler, R., Murano, G., Katz, D. A., Gordon, R. K., Chiang, P. K. & Schiffmann, E.: Tumor cell autocrine motility factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 3302-3306 (1986).
- 11) Stracke, M. L., Krutzsch, H. C., Unsworth, E. J., Arestad, A., Cioce, V., Schiffmann, E. & Liotta, L. A.:

- Identification, purification, and partial sequence analysis of autotaxin, a novel motility-stimulating protein. *J. Biol. Chem.*, **267**, 2524-2529 (1992).
- 12) Silletti, S., Watanabe, H., Hogan, V., Nabi, I. R. & Raz, A.: Purification of B16-F1 melanoma autocrine motility factor and its receptor. *Cancer Res.*, **51**, 3507-3511 (1991).
- 13) Watanabe, H., Kanbe, K. & Chigira, M.: Differential purification of autocrine motility factor derived from a murine protein-free fibrosarcoma. *Clin. Exp. Metastasis*, **12**, 155-163 (1994).
- 14) Raz, A. & Benze'ev, A.: Modulation of the metastatic capacity in B16 melanoma by cell shape. *Science*, **221**, 1307-1310 (1983).
- 15) Nabi, I. R. & Raz, A.: Cell shape modulation alters glycosylation of a metastatic melanoma cell-surface antigen. *Int. J. Cancer*, **40**, 396-402 (1987).
- 16) Nabi, I. R., Watanabe, H. & Raz, A.: Identification of B16-F1 melanoma autocrine motility-like factor receptor. *Cancer Res.*, **50**, 409-414 (1990).
- 17) Nabi, I. R., Watanabe, H., Silletti, S. & Raz, A.: Tumor cell autocrine motility factor receptor. *In* I. D. Goldberg (ed.), *Cell Motility Factors*, 1st ed., p163-177, Birkhauser Verlag, Basel, 1991.
- 18) Nabi, I. R., Watanabe, H. & Raz, A.: Autocrine motility factor and its receptor: role in cell locomotion and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.*, **11**, 5-20 (1992).
- 19) 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).
- 20) 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 cancer. *Cancer*, **76**, 941-953 (1995).
- 21) 胃癌研究会: 胃癌取り扱い規約, 改訂12版, 1-89頁, 金原出版, 東京, 1993.
- 22) Scanlon, K. J., Ohta, Y., Ishida, H., Kijima, H., Ohkawa, T., Kaminski, A., Tsai, J., Horng, G. & Kashani-Sabet, M.: Oligonucleotide-mediated modulation of mammalian gene expression. *FASEB J.*, **9**, 1288-1296 (1995).
- 23) Cooper, G. M. & Temin, H. M.: Infectious Rous sarcoma virus and reticuloendotheliosis virus DNAs. *Virology*, **14**, 1132-1141 (1974).
- 24) Chomczynski, P. & Sacchi, N.: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, **162**, 156-159 (1987).
- 25) Bradford, M. M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254 (1976).
- 26) Lotan, R., Amos, B., Watanabe, H. & Raz, A.: Suppression of melanoma cell motility factor receptor expression by retinoic acid. *Cancer Res.*, **52**, 4878-4884 (1992).
- 27) Alley, M. C., Scudiero, D. A., Monks, A., Hursey, M. L., Czerwinski, M. J., Fine, D. L., Abbott, B. J., Mayp, J. G., Shoemaker, R. H. & Boyd, M., R.: Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res.*, **48**, 589-601 (1988).
- 28) Albini, A., Iwamoto, Y., Kleinman, H. K., Matrin, G., Aaronson, S. A., Kozlowski, J. M. & McEwan, R. N.: A rapid in vitro assay for quantitating the invasive potential of tumor cells. *Cancer Res.*, **47**, 3239-3245 (1987).
- 29) Silletti, M. & Raz, A.: Autocrine motility factor is a growth factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **194**, 446-457 (1993).
- 30) Volk, T., Geiger, B. & Raz, A.: Motility and adhesive properties of high-and low-metastatic murine neoplastic cell. *Cancer Res.*, **44**, 811-824 (1984).
- 31) Ishisaki, A., Oida, S., Momose, F., Amagasa, T., Rikimaru, K., Ichijo, H. & Sasaki, S.: Identification and characterization of autocrine-motility-factor-like activity in oral squamous-cell-carcinoma cells. *Int. J. Cancer*, **59**, 783-788 (1994).
- 32) Guirguis, R., Schiffmann, E., Liu, B., Birkbeck, D., Engel, J. & Liotta, L.: Detection of autocrine motility factor in urine as a marker of bladder cancer. *J. Natl. Cancer Inst.*, **80**, 1203-1211 (1988).
- 33) Nakamori, S., Watanabe, H., Kameyama, M., Imaoka, S., Furukawa, H., Ishikawa, O., Sasaki, Y., Kabuto, T. & Raz, A.: Expression of autocrine motility factor receptor in colorectal cancer as a predictor for disease recurrence. *Cancer*, **74**, 1855-1862 (1994).
- 34) Otto, T., Birchmeier, W., Schmidt, U., Hinke, A., Schipper, J., Rubben, H. & Raz, A.: Inverse relation of E-cadherin and autocrine motility factor receptor expression as a prognostic factor in patients with bladder carcinomas. *Cancer Res.*, **54**, 3120-3123 (1994).
- 35) Silletti, S., Timar, J., Honn, K. V. & Raz, A.: Autocrine motility factor induces differential 12-lipoxygenase expression and activity in high-and low-metastatic K1735 melanoma cell variants. *Cancer Res.*, **54**, 5752-5756 (1994).
- 36) Silletti, S., Yao, J., Sanford, J., Mohammed, A. N., Otto, T., Wolman, S. R. & Raz, A.: Autocrine motility factor receptor in human bladder carcinoma: Gene expression, loss of cell-contact regulation and chromosomal mapping. *Int. J. Oncology*, **3**, 801-807 (1993).
- 37) Watanabe, H., Nabi, I. R. & Raz, A.: The relationship between motility factor receptor internalization and the lung colonization capacity of murine melanoma cells. *Cancer Res.*, **51**, 2699-2705 (1991).
- 38) Yu, C. C., Levison, D. A., Dunn, J. A., Ward, L. C., Demonakou, M., Allum, W. H. & Hallisey, M. T.: Pathological prognostic factors in the second British Stomach Cancer Group trial of adjuvant therapy in resectable gastric cancer. *Br. J. Cancer*, **71**, 1106-1110 (1995).

- 39) Nakazato, H., Koike, A., Saji, S., Ogawa, N. & Sakamoto, J.: Efficacy of immunochemotherapy as adjuvant treatment after curative resection of gastric cancer. Study Group of Immunochemotherapy with PSK for Gastric Cancer. *Lancet*, **343**, 1122-1126 (1994).
- 40) Silletti, S., Yao, J. P., Pienta, K. J. & Raz, A.: Loss of cell-contact regulation and altered responses to autocrine motility factor correlate with increased malignancy

in prostate cancer cells. *Int. J. Cancer*, **63**, 100-105 (1995).

- 41) Hattori, T. & Fujita, S.: Tritiated thymidine autoradiographic study of cell migration and renewal in the pyloric mucosa of golden hamsters. *Cell Tissue Res.*, **175**, 49-57 (1976).

- 42) Hattori, T. & Fujita, S.: Tritiated thymidine autoradiographic study on cellular migration in the gastric grand of the golden hamster. *Cell Tissue Res.*, **172**, 171-184 (1976).

**The Role of Autocrine Motility Factor Receptor in the Progression of Human Gastric Cancer** Yasuo Hirono, Department of Surgery (II), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. *Juzen Med Soc.*, **105**, 144—153(1996)

**Key words** autocrine motility factor receptor, cell motility, invation, metastasis, gastric cancer

#### Abstract

Cell motility has been implicated in cancer invasion and metastasis. However, little attention has been paid to the relationship between cell locomotion and the progression of gastric cancer. In the present study, the expression and role of the autocrine motility factor receptor (AMF receptor, gp78) are investigated with surgically extirpated gastric carcinomas and with human gastric cancer cell lines in culture. First, a monoclonal antibody against AMF receptor (gp78) was used to screen primary gastric carcinoma specimens from two hundred and twenty one patients, and the incidence of AMF receptor expression was related to various clinicopathological criteria. One hundred and twenty five out of the 221 (56.6%) primary carcinomas were positively strained for gp78. Expression of gp78 was correlated with macroscopic type, lymphatic and venous invasions, and lymph node and peritoneal metastasis. The incidence of gp78 expression in the cancer specimens increased as the histopathological stage of the cancer and the grade of tumor penetration proceeded. gp78 expression in the primary gastric cancer was also correlated with prognosis; 5-year survival in positive cases was significantly poorer than that in negative cases ( $p < 0.001$ ). Second, Northern blot analysis of RNA from eight gastric cancer cell lines revealed that all the cell lines examined were expressing AMF receptor mRNA, and that there is in gastric cancer cells a previously unreported AMF receptor mRNA species which would seem to be generated through alternative polyadenylation. Southern blot analysis showed no amplification or gross structural dysorganizations of AMF receptor genes in those gastric cancer cell lines. Further, I examined the functional roles of AMF receptor gene in TMK-1 gastric cancer cell line, employing an antisense strategy. When antisense oligodeoxyribonucleotides complementary to AMF receptor mRNA were administered to the culture medium, the invasion of TMK-1 cells was markedly inhibited in a dose dependent manner; at 10  $\mu\text{M}$ , as high as 60% inhibition was achieved. The growth of TMK-1 cells was essentially unaffected by the antisense oligonucleotide. These results suggest that AMF receptor plays important roles in the invasion and metastasis of human gastric cancer and that AMF receptor may be a suitable target for gene therapy in human gastric cancer.