

15-13 がん生物像を規定するがん組織内微小環境に関する研究

主任研究者 慶應義塾大学医学部 岡田 保典

本年度の主な研究成果は以下の通りである。1) ヒト乳癌と肺癌でADAM28 の高発現と癌細胞増殖能との相関を示し、増殖に関わるメカニズムを検討した。2) シェディングされて切り残されたHB-EGFの細胞内ドメインは、細胞周期進行と連動してPLZFの核外移行を誘導することを明らかにした。3) c-Met/HGF リセプターシグナル変換にc-Metのjuxtamembrane領域のSer⁹⁶⁵のリン酸化が重要なことを示した。4) HGF 活性化因子の HGFAとその活性阻害因子HAI-1 に関して、ノックアウトマウスと悪性腫瘍細胞による解析でHGFAによるHGF活性化が癌細胞の浸潤性増殖に関わることを明らかにした。5) 癌組織間質に骨髄由来の線維芽細胞の出現を証明するとともに、線維芽細胞の動員に腫瘍細胞の性格と生着臓器の微小環境の重要性を示した。6) 食道表在癌の簇出像が転移の必要条件であることを示すとともに、ケモカインリセプターのCXCR4 の食道癌での役割を解析した。

分担研究者名	所属施設および職名
岡田 保典	慶應義塾大学医学部 教授
東山 繁樹	愛媛大学医学部 教授
松本 邦夫	大阪大学大学院医学研究科 助教授

片岡 寛章	宮崎大学医学部 教授
-------	------------

石井 源一郎	国立がんセンター研究所 室長
--------	----------------

藤盛 孝博	獨協医科大学 教授
-------	-----------

(班 友)	
鈴木 宏明	国立札幌病院 室長
草野 由理	国立名古屋病院 研究員

分担研究課題
ヒトがん組織における膜型 ADAM の発現
膜型増殖因子 HB-EGF の shedding と新規シグナリング
HGF をメディエーターとする癌-間質相互作用を介した
浸潤・転移とその阻止
細胞膜結合型インヒビターによる癌細胞周囲微小環境に
おける生理活性物質活性化調節
がん間質を形成する線維芽細胞の生物学的不均一性に
ついての研究
微小転移の生物学的・臨床的意義

肺癌および肺組織における CD44 の発現
腫瘍細胞のシンデカン-2は発現量依存的に腫瘍組織微小
環境を調整する

1. 研究目的

ヒトがん細胞がもつ増殖・浸潤・転移などの生物学的多様性は、がん組織内微小環境によって規定されていることから、がん組織内微小環境の理解なしにがん細胞の制御は不可能と考えられる。がん細胞は間質組織との密接な連携のもとにはじめて生存可能であり、がん組織間質細胞が産生した細胞外マトリックスや増殖因子はがん細胞の増殖・運動・浸潤のバリアーや血管新生などの作用を営んでおり、局所で働くプロテアーゼは細胞外マトリックスや増殖因子の代謝に関わっている。また、血管新生は組織酸素化や高栄養状態によりがん細胞の増殖・浸潤に必須である。近年、がん間質を標的とした薬剤（血管新生阻害剤、マトリックス分解酵素阻害剤など）に関する治験が国内外で行われてきたが、がん組織内微小環境の検索なく実施されており、実際その効果も芳しくないのが現状である。本研究班では、がん生物像を規定するがん細胞周囲微小環境に関して、①がん細胞周囲での増殖因子と受容体代謝における ADAM (a disintegrin and metalloproteinase) の作用機序、②血管新生因子HGF (hepatocyte growth factor)

の活性調節機構とその制御による浸潤・転移、③がん間質細胞の由来、④ヒトがん組織局所での遺伝子発現などについて解析し、がん組織微小環境モジュレーターの分子作用機構を基礎的に解析し、新規の間質標的治療法開発に役立てることを目的とする。

今年度遂行した主な研究課題は、以下の通りである。(1) ヒト癌組織で発現亢進するプロテアーゼ型 ADAM 分子の同定とその作用解析。(2) ADAM12 の作用でシェディングされた HB-EGF (heparin-binding epidermal growth factor) の細胞内ドメインの役割解析。(3) HGF レセプターである c-Met のシグナル変換機構。(4) HGF 活性化因子 HGF activator (HGFA) と HGFA inhibitor (HAI-1) の生体内での機能解析。(5) ヒト癌細胞株移植マウスモデルでの癌組織内線維芽細胞の由来検討。(6) 食道表在癌の簇出像の病理学的評価と臨床検体における CXCR4 蛋白発現解析。

2. 研究成果

本年度の研究成果として以下のことを明らかにした。

1). ヒト悪性腫瘍での膜型 ADAM の発現解析:

ヒト乳癌と肺癌組織において、メタロプロテアーゼ型 ADAM(ADAM8、9、10、12、15、17、20、21、28、30)の遺伝子発現を real-time PCR と RT-PCR で検討した結果、分泌型 ADAM28s と膜型 ADAM28m の発現は癌組織において非癌部よりも有意に高値を示した。ADAM28 特異的モノクローナル抗体を作製し免疫染色を行ったところ、ADAM28 は癌細胞に局在し、癌組織内においては ADAM28 は活性型酵素として存在することがイムノブロット法で示された。また、これらの癌組織では、ADAM28 の mRNA 発現レベルは MIB-1 染色による増殖能と正の相関を示し、肺癌ではリンパ節転移と相関した。一方、リコンビナント ADAM28 は IGFBP-3(insulin-like growth factor binding protein-3)を分解して IGF-I/IGFBP-3 複合体から IGF-I を遊離することを示すとともに、乳癌組織における ADAM28 の発現レベルは IGFBP-3 の分解と相関し、ADAM インヒビターや ADAM28 抗体での癌組織の処理により分解が抑制された。これらのデータは、ADAM28 が IGFBP-3 の分解を通してヒト癌細胞の増殖に関わることを示唆している。また、肺癌では ADAM28 は浸潤・転移にも関与する可能性があり、さらに検討を進めている。

2). HB-EGF カルボキシ末端ペプチド (HB-EGF-C) の機能解析:

Aphidicolin 処理により細胞を G1/S 境界で同調させ細胞周期を揃えた後、各細胞周期における細胞表面 HB-EGF 量を HB-EG 特異抗体を用いた FACS 解析により解析した。その結果、late G1 期で細胞表面 HB-EGF 量が最も低いこと、すなわち HB-EGF-C 産生量が高いという結果が得られた。以上のデータから、HB-EGF の shedding は細胞周期の G1-S 期への進行過程で最もよく誘導されると考えられた。さらに、初代培養細胞の表皮ケラチノサイトを用いて、内在性 HB-EGF-C ならびにその標的蛋白質である内在性転写リプレッサー PLZF の細胞内局在を各々の特異抗体で免疫染色し、Laser Scanning Cytometer (LSC)を用いて各細胞周期に分離した。その結果、early G1 期では HB-EGF-C は細胞膜に局在し、PLZF は核に局在した。一方、S、G2 期になると、各々の局在は大きく変化し、HB-EGF-C が核に移行し、PLZF は細胞質に移行していることが確認された。以上のことから、HB-EGF の shedding は細胞周期進行と連動しており、HB-EGF-C は細胞周期の late G1 から S 期にかけて PLZF の核外移行を誘導することが明らかとなった。

3). c-Met/HGF レセプターシグナル変換能に関する ON⇌OFF 制御機構の解析:

c-Met/HGF レセプターの細胞質領域内の juxtamembrane 領域 (jxt 領域) は 47 個のアミノ酸からなり高度に保存されている。Jxt 領域には PKC によってリン酸化される Ser⁹⁶⁵が存在し、そのリン酸化が

c-Met レセプターの活性化を負に調節する可能性が考えられた。そこで、Ser⁹⁶⁵のリン酸化と c-Met の活性化制御を、培養 A549 ヒト肺癌細胞を用いて解析した。Ser⁹⁶⁵は TPA 刺激によって強くリン酸化されたが、あらかじめ TPA 処理によって Ser⁹⁶⁵をリン酸化した細胞では HGF による c-Met のチロシンリン酸化は強く抑制され、Ser⁹⁶⁵のリン酸化は c-Met のシグナル伝達能を OFF に制御する機能をもつことが明らかとなった。また、Ser⁹⁶⁵のリン酸化に関与する細胞外刺激の検討から、H₂O₂による酸化ストレスによって Ser⁹⁶⁵がリン酸化されることを見いだした。この Ser⁹⁶⁵リン酸化は PKC の阻害剤によってブロックされることから、H₂O₂による Ser⁹⁶⁵のリン酸化は PKC (PKC /) を介することが明らかになった。一方、Ser⁹⁶⁵のリン酸化レベルはセリン/スレオニンフォスファターゼ阻害剤によって増大することから、セリン/スレオニンフォスファターゼが Ser⁹⁶⁵の脱リン酸化に関与することが示唆された。種々の検討により、Protein Phosphatase-2A (PP2A) が Ser⁹⁶⁵の脱リン酸化を担うセリン/スレオニンフォスファターゼであることを明らかにするとともに、H₂O₂刺激による Ser⁹⁶⁵のリン酸化を受けた細胞では HGF による c-Met チロシンリン酸化抑制と一致して HGF による増殖促進と細胞分散活性が強く抑制されることがわかった。これらのデータは c-Met レセプターの jxt 領域内 Ser⁹⁶⁵は PKC ならびに PP2A によってリン酸化/脱リン酸化制御を受け、Ser⁹⁶⁵のリン酸化は HGF による c-Met レセプターの活性化ならびに細胞応答を“OFF”にする制御機構であることを示している。最近、複数のヒトがんにおいて jxt 領域内の遺伝子変異が報告されており、c-Met シグナル変換能における抑制機能 (“OFF”機能)の喪失が発がん・がん悪性化に関与することが示唆された。

4). HGFA と HAI-1 の生体内における機能解析:

HGFA ノックアウトマウスを作製したところ、ノックアウトマウスは正常に生まれた。しかし、血清中の HGF 活性化能は失われており、血清中の HGF 活性化は HGFA に由来することが明らかとなった。実験的腸炎モデルを作製したところ、ノックアウトマウスでは傷害粘膜組織での HGF 活性化抑制とともに粘膜の再生 (特に再生初期における上皮細胞による再被覆) が遅延し、マウスの生存率が有意に低下し、強い組織傷害後においては血中 HGFA による HGF 活性化が重要であることが明らかとなった。悪性神経鞘腫細胞を用いた実験において、HGFA 発現が浸潤性増殖を亢進させることを明らかにし、HGF 活性化機構が癌細胞の浸潤性増殖に重要な役割を持つことを示した。HAI-1 ノックアウトマウスを作製したところ、胎盤における迷宮層形成障害により胎生約 10.5 日で致死となった。HGF およびその受容体 MET のノックアウトマウスも胎盤迷宮層の形成異常を示し致死となるが、致死期は E12.5 - E14.5 と明らかに HAI-1 ノックアウトマウスの方が早期に致死

となることや、HAI-1 の標的酵素とされている HGFA とマトリプテースのノックアウトマウスは胎盤に異常をきたさない事実から、HAI-1 には HGF 活性化調節以外の生体内機能を有することが明らかとなった。一方、膜型 HAI-1 の過剰発現は *in vivo* において悪性神経膠腫細胞の増殖を亢進させるのに対し、分泌型 HAI-1 ではむしろ抑制的な効果を示した。上記の実験結果は、HGF・MET シグナリングにおける HGF 活性化機構の重要性を示しており、HGF 活性化機構は癌細胞の浸潤性増殖抑制を念頭においた分子標的治療の候補となると考えられる。一方、HAI-1 には予想外の重要な生体内機能が存在すると思われ、今後さらなる基礎研究が必要である。

5). がん組織における線維芽細胞の動員機構およびその機能解析：

GFP トランスジェニックマウス骨髓細胞を免疫不全マウス(SCID)に骨髓移植後、10 種類のヒトがん細胞株をこれらマウス皮下に移植し、生着した腫瘍組織の大きさ、間質量、微小血管密度、骨髓由来線維芽細胞数、骨髓由来血管内皮細胞数を解析した。その結果、間質反応を伴うがん組織では、間質量と相関して、骨髓由来の線維芽細胞と血管内皮細胞が動員されることが明らかとなった。さらに、膀胱がん細胞株 Capan-1 を、皮下、腹膜、脾、肝、肺に移植した結果、腫瘍間質量は生着臓器により異なっていた(皮下、腹膜>>脾、肝、肺)。また、間質反応を伴うがん組織(皮下、腹膜)では骨髓由来の線維芽細胞が高頻度に動員されていたが、間質反応の乏しい組織(脾、肝、肺)ではほとんど動員はみられなかった。この事実は、がん間質形成における骨髓由来線維芽細胞の重要性を意味しているものと考えられる。さらに、骨髓からの線維芽細胞の動員機構には、腫瘍細胞の生物学的性格のみならず、腫瘍生着臓器の微小環境が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

6). 食道表在癌の簇出像の病理学的評価と臨床検体における CXCR4 蛋白発現解析：

食道表在癌の簇出像に関する臨床病理学的検討により、簇出と脈管侵襲が明白な転移の必要条件であることが確認された。しかし、これらは十分条件ではなく、転移の形成には簇出・脈管侵襲・微小転移後の異所環境での生き残りと適応が必要であると考えられた。そこで、癌細胞の異所環境への適応をサポートする因子として CXCR4 を標的とし、遺伝子工学的および病理組織学的に検討した。ヒト CXCR4 と蛍光蛋白質 GFP の融合蛋白質を発現させるベクターを構築し(pIRES2-EGFP-CXCR4)、本ベクターを導入したヒト培養癌細胞の GFP を蛍光顕微鏡で確認した。さらに CXCR4 が導入された細胞は SDF-1 シグナルにより活性化されることを浸潤アッセイにて確認した。また、内視鏡的・外科的に切除された食道扁平上皮癌を対象とし、抗 CXCR4 抗体(CXCR4 fusin; Clone 12G5, BD Biosciences)を用いた免疫染色

を行った結果、食道扁平上皮癌症例の腫瘍細胞や非癌部扁平上皮の傍基底層が CXCR4 陽性を示した。Clone 12G5 による染色では細胞質と核のいずれかあるいは両方に顆粒状の陽性所見を認めたが、CXCR4 の核内陽性像に関する意義は明らかではなく、さらに検討を進めている。

7). 班友の研究成果：

鈴木班友は、RT-PCR とシーケンス法で肺組織や気管支組織に多種類の CD44 スプライスバリエントを同定した。同定したバリエントのうち 2 種は新規のものであった。また、正常組織に比較して癌組織で発現低下していた転写産物は、variant exon v3, v4, v5, v6, v7 を有しており、この産物の機能解析を進めている。草野班友は、各シンデカンのタンパク質細胞外ドメイン組換えペプチドに対する抗体を作製し、本抗体がシンデカンに特異性の高い抗体であることを確認した。本抗体を基質に用い、シンデカンからの刺激により細胞内に誘導されるアクチン細胞骨格形成能を検討した結果、シンデカン分子間には機能特異性があること、シンデカン-2 はインテグリン $\alpha 5 \beta 1$ の結合情報のみならず、シンデカン-4 からのシグナル伝達の下流に位置して制御していることを示した。本研究結果は、シンデカン-2 とシンデカン-4 のシグナル伝達系では階層性があり、両分子間のクロストークを示唆するものであり、シンデカン-2 は発現量依存的に、フィブロネクチン受容体としてその細胞応答性を制御する可能性があると考えられた。

3. 倫理面への配慮

本研究では、ヒト悪性腫瘍組織の手術検体を用い、これら組織での mRNA と蛋白質レベルの発現解析を行うことから、解析に関して患者本人のインフォームドコンセントを得た上で関係者の人権保護に十分配慮した。組換え遺伝子の担癌マウスへの導入とノックアウトマウスの解析は組換え遺伝子実験に該当し、安全対策については十分な注意を払ってきた。また、以上の研究計画については、各研究施設の倫理委員会と組換え遺伝子実験安全委員会の承認を得て行っている。

研究成果の刊行発表

外国語論文

1. Mochizuki, S., Okada, Y., et al., ADAM28 is activated by MMP-7 (matrilysin-1) and cleaves insulin-like growth factor binding protein-3. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 315: 79-84, 2004.
2. Nakamura, H., Okada, Y., et al., Constitutive and induced CD44 shedding by ADAM-like proteases and MT1-MMP: Shedding site-specific promotion of tumor cell invasion. *Cancer Res.* 64: 876-882, 2004.
3. Uekita, T., Okada, Y., et al., Membrane-type 1 matrix metalloproteinase cytoplasmic tail-binding protein-1 is a new member of the cupin superfamily. A possible multifunctional protein acting as an invasion suppressor

- down-regulated in tumors. *J. Biol. Chem.* 279: 12734-12743, 2004.
4. Kayano, K., Okada, Y., et al., The activation of proMMP-2 mediated by MT1-MMP in human salivary gland carcinomas: Possible implication of TIMP-2 in the regulation of proMMP-2 activation. *J. Pathol.* 202: 476-485, 2004.
 5. Hashimoto, G., Okada, Y., et al., ADAMTS4 (aggrecanase-1) interaction with the C-terminal domain of fibronectin inhibits proteolysis of aggrecan. *J. Biol. Chem.* 279: 32483-32491, 2004.
 6. Yokoyama, T., Okada, Y., et al., TIMP-3 is a possible regulator of proMMP-2 (progelatinase A) activation mediated by MT1-MMP in human gastric carcinomas. *Clin. Exp. Metastasis* 21:223-233, 2004.
 7. Mizuno, R., Okada, Y., et al., Inhibition of MKP-1 expression potentiates JNK related apoptosis in renal cancer cells. *J. Urol.* 172:723-727, 2004.
 8. Mikami, S., Okada, Y., et al., Coexpression of heparanase, basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor in human esophageal carcinomas. *Pathol. Int.* 54:556-563, 2004.
 9. Akai, T., Okada, Y., et al., High mobility group I-C protein in astrocytoma and glioblastoma. *Pathol. Res. Pract.* 200:619-624, 2004.
 10. Kodama, T., Okada, Y., et al., ADAM12 is selectively overexpressed in human glioblastomas and is associated with glioblastoma cell proliferation and shedding of HB-EGF. *Am J. Pathol.* 165:1743-1753, 2004.
 11. Yamashita, S. and Okada, Y., Mechanisms of heat-induced antigen retrieval: Analyses in vitro employing SDS-PAGE and immunohistochemistry. *J. Histochem. Cytochem.* 53:13-21, 2005.
 12. Matsumura, S., Okada, Y., et al.: Targeted deletion or pharmacological inhibition of MMP-2 prevents cardiac rupture after myocardial infarction in mice. *J. Clin. Invest.* 115:599-609, 2005.
 13. Shintani, Y., Higashiyama, S., et al., Overexpression of ADAM9 in non-small cell lung cancer correlates with brain metastasis *Cancer Res.* 64, 4190-4196, 2004
 14. Murayama, Y., Higashiyama, S., et al., CD9-mediated activation of the p46 Shc isoform leads to apoptosis in cancer cells. *J. Cell. Sci.* 117, 3379-3388, 2004
 15. Tanida, S., Higashiyama, S. et al., The mechanism of cleavage of EGFR ligands induced by inflammatory cytokines in gastric epithelial cells; ADAM10 mediates IL-8-induced EGFR transactivation. *Gastroenterology.* 127, 559-569, 2004
 16. Nanba, D., Higashiyama, S., et al., Charged amino acid residues in the cytoplasmic domain of proHB-EGF regulate its distribution and interaction with PLZF. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 320, 376-382, 2004
 17. Kinugasa, Y., Higashiyama, S., et al., Neuroglycan C, a novel member of the neuregulin family. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 321, 1045-1049, 2004
 18. Ongusaha, P.P., Higashiyama, S., et al., HB-EGF Is a Potent Inducer of Tumor Growth and Angiogenesis. *Cancer Res.* 64, 5283-5290, 2004
 19. Tanaka, M., Higashiyama, S., et al., ADAM-binding protein Eve-1 is required for ectodomain shedding of EGF receptor ligands *J. Biol. Chem.* 279, 41950-41959, 2004
 20. Myungsok, O., Higashiyama, S., et al., Structure-based virtual screening and biological evaluation of potent and selective ADAM12 inhibitors *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14, 6071-6074, 2004
 21. Toki, F., Higashiyama, S., et al., Ectodomain shedding of membrane-anchored heparin-binding EGF like growth factor and subcellular localization of the C-terminal fragment in a cell cycle *J. Cell. Physiol.* 202, 839-848, 2005
 22. Itoh, Y., Higashiyama, S., et al., IL-8 promotes cell proliferation and migration through metalloproteinase-cleavage proHB-EGF in Human Colon Carcinoma Cells. *Cytokine* in press, 2005
 23. Shirakata, Y., Higashiyama, S., et al., Heparin-binding EGF-like growth factor is essential for keratinocyte migration in skin wound healing. *J. Cell Science* in press, 2005
 24. Hashigasako, A., Matsumoto, K., et al., Bi-directional regulation of Ser-985 phosphorylation of c-met via protein kinase C and protein phosphatase 2A involves c-Met activation and cellular responsiveness to hepatocyte growth factor. *J. Biol. Chem.*, 279: 26445-26452, 2004
 25. Wen, J., Matsumoto, K., et al., Hepatic gene expression of NK4, an HGF-antagonist/angiogenesis inhibitor, suppresses liver metastasis and invasive growth of colon cancer in mice. *Cancer Gene Therapy*, 11: 419-430, 2004.
 26. Ohuchida, K., Matsumoto, K., et al., Radiation to Stromal Fibroblasts Increases Invasiveness of Pancreatic Cancer Cells through Tumor-Stromal Interactions. *Cancer Res.*, 4: 3215-3222, 2004.
 27. Maemondo, M., Matsumoto, K., et al., Gene therapy with secretory leukoprotease inhibitor promoter-controlled replication-competent adenovirus for non-small cell lung cancer. *Cancer Res.*, 64: 4611-4620, 2004.
 28. Kubota, T., Matsumoto, K., et al., Reduced HGF expression in subcutaneous C T26 tumor genetically modified to secrete NK4 and its possible relation with antitumor effects. *Cancer Sci.*, 95: 321-327, 2004
 29. Kushibiki, T., Matsumoto, K., et al., Suppression of tumor metastasis by NK4 plasmid DNA released from cationized gelatin. *Gene Ther.*, 11: 1205-1214, 2004.
 30. Ueda, K., Matsumoto, K., et al., Adenoviral-mediated Gene transduction of the hepatocyte growth factor (HGF) antagonist, NK4, suppresses peritoneal metastases of gastric cancer in nude mice. *Eur. J. Cancer*, 40: 2135-2142, 2004.
 31. Kushibiki, T., Matsumoto, K., et al., Suppression of the progress of disseminated pancreatic cancer cells by NK4 plasmid DNA released from cationized gelatin microspheres. *Pharma. Res.*, 21: 1109-1118, 2004.
 32. Tanaka, T., Matsumoto, K., et al., Gallbladder cancer treatment using adenovirus expressing the HGF/NK4 gene in a peritoneal implantation model. *Cancer Gene Therapy*, 11: 431-440, 2004.
 33. Jiang, W.G., Matsumoto, K., et al., Hepatocyte growth

- factor, its receptor, and their potential value in cancer therapies. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 53: 35-69, 2005.
34. Kashiwakura, Y., Matsumoto, K., et al., Hepatocyte growth factor receptor is a coreceptor for adeno-associated virus type 2 infection. *J. Virol.*, 79: 609-614, 2005.
 35. Fujiwara H, Matsumoto K, et al., Suppression of peritoneal implantation of gastric cancer cells by adenovirus vector-mediated NK4 expression. *Cancer Gene Ther.*, 12: 206-216, 2005.
 36. Itoh, H., Kataoka, H., et al., Regeneration of injured intestinal mucosa is impaired in hepatocyte growth factor activator-deficient mice. *Gastroenterology*, 127:1423-1435, 2004
 37. Miyata, S., Kataoka, H., et al. Diverse roles of hepatocyte growth factor activator inhibitor type 1 (HAI-1) in the growth of glioblastoma cells in vivo. *Cancer Lett.*, in press, 2005
 38. Yamauchi, M., Kataoka, H., et al., Hepatocyte growth factor activator inhibitor type 1 (HAI-1) and type 2 (HAI-2) are expressed by tubular epithelium in kidney and downregulated in renal cell carcinoma. *J. Urol.*, 171:890-896, 2004
 39. Nagaike, K., Kataoka, H., et al., Paradoxically enhanced immunoreactivity of hepatocyte growth factor activator inhibitor type 1 (HAI-1) in cancer cells at the invasion front. *Cancer Sci.*, 95:728-735, 2004
 40. Inoue, T., Kataoka, H., et al., Activation of c-Met (hepatocyte growth factor receptor) in human gastric cancer tissue. *Cancer Sci.*, 95:803-808, 2004
 41. Tjin, E.P.M., Kataoka, H., et al., Multiple myeloma cells catalyze hepatocyte growth factor (HGF) activation by secreting the serine protease HGF-activator. *Blood*, 104:2172-2175, 2004
 42. Yoh, K., Ishii, G., et al., Breast Cancer Resistance Protein Impacts Clinical Outcome in Platinum-based Chemotherapy for Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin. Cancer Res.* 10:1691-1697, 2004.
 43. Miyamoto, S., Ishii, G., et al., Matrix Metalloproteinase-7 Facilitates Insulin-Like Growth Factor Bioavailability through Its Proteinase Activity on Insulin-Like Growth Factor Binding Protein 3. *Cancer Res.* 64: 665-671, 2004.
 44. Goya, M., Ishii, G., et al., Growth inhibition of human prostate cancer cells in human adult bone implanted into nonobese diabetic/severe combined immunodeficient mice by a ligand-specific antibody to human insulin-like growth factors. *Cancer Res.* 64:6252-6358, 2004.
 45. Nakamura, M., Ishii, G., et al., Low levels of insulin-like growth factor type 1 receptor expression at cancer cell membrane predict liver metastasis in Dukes' C human colorectal cancers. *Clin. Cancer Res.* 10:8434-8441, 2004.
 46. Sangai, T., Ishii, G., et al., Effect of differences in cancer cells and tumor growth sites on recruiting bone marrow-derived endothelial cells and myofibroblasts in cancer-induced stroma. *Int. J. Cancer*. 2005. (Articles online in advance of print
 47. Kodama, K., Ishii, G., et al., Laminin 5 expression protects against anoikis at aerogenous spread and lepidic growth of human lung adenocarcinoma. *Int. J. Cancer*. in press, 2005
 48. Ishii, G., et al., *In vivo* immunophenotype of bone-marrow-derived fibroblasts recruited into fibrotic lesions. *Stem cells*. in press, 2005
 49. Kusano, Y., et al., Cooperation of syndecan-2 and syndecan-4 among cell surface heparan sulfate proteoglycans in the actin cytoskeletal organization of Lewis lung carcinoma cells. *J. Biochem.* 135:129-137, 2004
 50. Yoshitomi, Y., Kusano Y., et al., inhibition of experimental lung metastases of Lewis lung carcinoma cells by chemically-modified heparin with reduced anti-coagulant activity. *Cancer Lett.* 207:165-174, 2004
 51. Yamashiro, K., Suzuki, H., et al., Telecytology in Hokkaido Island, Japan: results of primary telecytodiagnosis of routine cases. *Cytopathol.*, 15, 221-227, 2004.

書籍

1. Okada Y., Proteinases and matrix degradation. In Kelley's Textbook of Rheumatology. Ed. by Harris E. D., Jr., Budd R. C., Ruddy S., Genovese M.C., Firestein G. S. and Sargent J. S. 7th edition, Elsevier Saunders. Philadelphia, pp63-81, 2005.
2. Matsumoto, K. and Nakamura, T., Hepatocyte growth factor. In "Encyclopedia of Endocrinology and Endocrine Diseases" (editor-in-chief, L. Martini), Academic Press, San Diego, pp. 436-442, 2004