九州大学学術情報リポジトリ
Kyushu University Institutional Repository

Roles for cathepsin E and RANKL-RANK signaling system in tumor growth and invasion

進, 正史
九州大学大学院歯学府口腔常態制御学講座口腔機能分子科学分野

https://doi.org/10.15017/14247

出版情報：九州大学, 2008, 博士（歯学）, 課程博士
バージョン：
権利関係：

癌の増殖・浸潤におけるカテプシン E および RANKL-RANK シグナル伝達系の役割

Roles for cathepsin E and RANKL-RANK signaling system in tumor growth and invasion

2009 年

進　正史

九州大学大学院歯学研究院　口腔常態制御学講座　口腔機能分子科学分野

（指導：山本　健二　教授）

本研究の一部は以下の学術誌に掲載されている。

Association of cathepsin E with tumor growth arrest through angiogenesis inhibition and enhanced immune responses

Masashi Shin, Tomoko Kadowaki, Jun-ichi Iwata, Tomoyo Kawakubo,
Noriko Yamaguchi, Ryosuke Takii, Takayuki Tsukuba and Kenji Yamamoto

Biol. Chem., Vol. 388, pp. 1173-1181, November 2007

目次

略語一覧・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・1

要旨・・3

第１章 カテプシン E による血管新生阻害と免疫亢進を介した腫瘍増殖抑制効果

１． 緒言・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・6

２． 実験材料および実験方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・9

３． 結果

３‐１ 癌細胞の増殖に及ぼすカテプシン E 遺伝子導入効果・・・・・・・・・15

３‐２ カテプシン E の血管新生機構への関与・・・・・・・・・・・・・・・・・19

３‐３ *in vitro* におけるカテプシン E と他のカテプシンによるコラーゲン

XVIII の NC1 ドメインから産生されるエンドスタチンの特定・・・・23

３‐４ HUVECs の管腔形成と破壊におけるカテプシン E の効果・・・・・・ 27

３‐５ ALVA101/CE 細胞と ALVA101/mock 細胞による腫瘍形成の形態観察・30

３‐６ ALVA101/CE 細胞と ALVA101/mock 細胞

に対するマクロファージの遊走能・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 34

４． 考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 36

第２章 口腔扁平上皮癌細胞の RANK の発現と顎骨浸潤における役割

１． 緒言・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・40

２． 実験材料および実験方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 43

３． 結果

３‐１ 口腔扁平上皮癌組織およびヒト口腔扁平上皮癌細胞株

における RANK 発現・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・47

３－２ RANKL 刺激によるヒトロ腔扁平上皮癌細胞 B88
細胞株の RANK 下流シグナル経路の活性化・・・・・・・・・・50
３－３ RANKL 刺激によるヒトロ腔扁平上皮癌細胞株
B88 細胞遊走能の亢進・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・54
３－４ OPG 投与によるヒトロ腔扁平上皮癌細胞株
B88 細胞の顎骨浸潤の抑制・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 56
４． 考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 61

総括・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 64

謝辞・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 66

引用文献・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 67

略語一覧

CBB：coomassie brilliant blue

DMEM：Dulbecco's modified Eagle's medium

DTT：dithiothreitol

ECL：enhanced chemiluminescence

EDTA：ethylenediaminetetraacetic acid

ELISA：enzyme-linked immunosorbent assay

EMSA：electrophoretic mobility shift assay

ERK：extracellular signal-regulated kinase 1 and 2

FBS：fetal bovine serum

HE：hematoxylin eosin

HRP：horseradish peroxidase

HUVECs：human umbilical vein endothelial cells

IL：interleukin

LAMP：lysosome-associated membrane protein

MCP-1：monocyte chemotactic protein-1

M-CSF：macrophage colony-stimulating factor

2-ME：2-mercaptoethanol

MIG：monokine induced by γ-interferon

MHC：major histocompatibility complex

MMP：matrix metalloproteinase

NC-1：noncollagenous fragment of collagen 18

NF-κB：nuclear factor κB

OPG：osteoprotegerin

PAGE：polyacrylamide gel electrophoresis

PBS：phosphate-buffered saline

PF-4：platelet factor-4

PMSF：phenyl-methyl-sulfonyl-fluoride

PVDF：polyvinylidene fluoride

RANK：receptor activator of the NF-κB

RANKL：receptor activator of the NF-κB ligand

SAM：significance analysis of microarray

SDS：sodium dodecylsulfate

SPF：specific pathogen-free

TAM：tumor-associated macrophage

TGC：thioglycollate

TIMP-1：tissue inhibitor of metalloproteinases-1

TNFα：tumor necrosis factor α

TRAIL：tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand

T-TBS：tween20-tris buffered saline

要旨

本研究は癌の増殖・浸潤機構におけるカテプシン E および RANKL-RANK シグナルの役割について追究したもので２つの章からなる。第１章では、アスパラギン酸プロテアーゼの一つであるカテプシン E の癌細胞における役割をヒト前立腺癌 ALVA101 細胞を用いて解析した。ヒトカテプシン E 遺伝子を ALVA101 細胞に導入した際の性状変化を調べた結果、*in vitro* での細胞系では、導入細胞と導入していない細胞の間に増殖能に差異が認められないものの、それらをヌードマウスの皮下に移植した *in vivo* の条件下では、カテプシン E 遺伝子を導入した癌細胞の方が有意に増殖が抑制された。抗体アレイ解析から、カテプシン E 遺伝子を導入した癌細胞から成る腫瘍は、mock 導入癌細胞から成る腫瘍に比べて、エンドスタチンを含む各種血管新生抑制分子が増加していることが示された。エンドスタチンはタイプ XVIII コラーゲンから産生される強力な内在性血管新生抑制因子で、カテプシン E はタイプ XVIII コラーゲンから特異的にエンドスタチンを産生することが *in vitro* 系で証明された。組織学的には、カテプシン E 遺伝子導入癌細胞から成る腫瘍は分葉状の形態を呈しており、その周囲には肥厚した皮膚および皮下組織と発達した線維性被膜が顕著であり、これらによって腫瘍の増大が抑制されている様子が伺えた。また、腫瘍周辺部にマクロファージの浸潤増加と活性化亢進が認められた。さらにカテプシン E 遺伝子導入癌細胞は、対照細胞に比べてマクロファージの遊走を強く誘導することがわかった。以上の結果から、癌細胞に発現させたカテプシン E は、血管新生抑制と宿主免疫応答増強によって腫瘍増殖を抑制することがわかった。

第２章では、口腔扁平上皮癌細胞の顎骨浸潤と RANKL-RANK シグナルシステムとの関連を検討した。口腔扁平上皮癌は舌や歯肉に好発するだけでなく、口腔底、口唇や口蓋にも発生し、進行すると顎骨へ浸潤することが多く、顎骨浸潤はその予後を規定する重要な因子となっている。口腔癌の顎骨浸潤の病理組織像を見ると、顎骨破壊部の最前線には多

数の破骨細胞が存在し、活発に骨を吸収している像が見えることから、癌細胞が破骨細胞の活性化を誘導することで顎骨を吸収し、さらに深部へと浸潤することが示唆される。そこで、破骨細胞形成因子である receptor activator of NF-κB ligand (RANKL)とその受容体 RANKからなるRANKL-RANKシステムと口腔扁平上皮癌による顎骨浸潤との関連を検討した。口腔扁平上皮癌患者の腫瘍組織は RANK を発現しており、さらにヒト口腔扁平上皮癌細胞株 BHY 細胞と B88 細胞は RANK を発現し、これらの細胞を RANKL で刺激すると RANK の下流シグナルである NF-κB や ERK の活性化が認められた。*in vitro* において RANKL が B88 細胞の遊走能を亢進し、この作用は RANKL と RANK の結合を妨げるデコイ受容体 osteoprotegerin (OPG)を添加することで抑制された。さらに、ヌードマウスの咬筋に B88 細胞を移植すると腫瘍の増大に伴って顎骨に腫瘍細胞が浸潤したが、OPG の局所投与により B88 細胞の顎骨浸潤が抑制された。これらの結果から、OPG の口腔扁平上皮癌顎骨浸潤の治療薬としての有用性が示唆された。

第１章　カテプシンＥによる血管新生阻害と免疫亢進を介した腫瘍増殖抑制効果

緒言

現行の抗癌剤の多くは、核酸や細胞内シグナル伝達分子をターゲットにして癌細胞の増殖を阻止する。そのため、癌細胞と正常細胞に対する影響に質的な差異を生じることが少なく、これが抗癌剤の副作用・毒性の最大の要因となっている。したがって、抗腫瘍効果の強いものほど副作用・毒性が強いため、癌の化学療法に際しては、それらの毒性を厳密に管理しながら使用される必要がある。癌細胞の増殖や転移は宿主防御機構との相互作用に大きく依存していることから、癌細胞が宿主免疫系と相互作用する微小環境は、副作用の少ない抗癌剤を開発する際の有用なターゲットとなり得る。腫瘍血管新生は、癌細胞が一定サイズ以上に増殖するためには必須の機構であり、抗腫瘍血管新生療法は腫瘍の進展を抑制するのに有効な手段であると考えられてきた。さらに、アンジオスタチンやエンドスタチンなどに代表される内在性血管新生阻害分子の発見は、これらの産生に関与するプロテアーゼが腫瘍血管新生阻害療法の有効な標的分子となる得ることを強く示唆している。一方、顆粒球、マクロファージ、NK 細胞、T および B リンパ球などといった免疫系細胞は、腫瘍部位における宿主免疫応答に重要な役割を果たしている。なかでも、マクロファージは貪食作用、抗原のプロセシング提示反応、tumor necrosis factor (TNF)α、interleukin (IL)-1、IL-6、IL-8 などの産生促進による非特異的宿主防御反応等を介して悪性腫瘍における宿主防衛反応に強く寄与している(van Ravenswaay, C.H.H. *et al.*, 1992, Naama, H.A. *et al.*, 2001, Varney, M.L. *et al.*, 2002) 。また、腫瘍部位に浸潤してきたマクロファージ (tumor-associated macrophage, TAM) は 、 tumor necrosis factor-related apoptosis -inducing ligand (TRAIL)の産生遊離を通じて腫瘍細胞特異的アポトーシスを誘導することが報告されている (Griffith, T.S. *et al.*, 1999, Herbeuval, J-P. *et al.*, 2003) 。このように、腫瘍微小環境における多様な宿主防御反応は、癌の増殖・進展の抑制機構に密接に関与しており、これらの賦活化を誘導する方法論の開発は新たな抗癌療法を開くものと期待されている。

リソソーム性カテプシン(B, L, D など)やマトリックスメタロプロテアーゼ(matrix metalloproteinase; MMP-1, MMP-9 など)の多くのタンパク分解酵素（プロテアーゼ）は、種々のタイプの癌の発症・進展や悪性度に密接に関連する、いわゆる悪玉因子であることが明らかにされている(Nomura, T. and Katunuma, N. 2005, Overall, C.M. and Kleifeld, O. 2006)。したがって、これらのプロテアーゼは悪性腫瘍を阻止するための有望な標的分子として、抗癌剤として利用するために様々なプロテアーゼ阻害剤が開発されている。しかし、プロテアーゼ阻害剤は、プロテアーゼ機能の多様性のために、当初期待されたような結果を得るには至っていない。一方、悪玉因子としてのプロテアーゼが多い中にあって、MMP-3, MMP-8, MMP-12 などのマトリックスプロテアーゼは、腫瘍血管新生の阻害や臓器特異的転移を仲介するサイトカインの分解を介して抗腫瘍作用を示すことが報告されている(Overall, C.M. and Kleifeld, O. 2006)。最近、筆者らの研究室では、エンドリソソーム性アスパラギン酸プロテアーゼであるカテプシン E が、癌細胞表面から TRAIL を特異的に切断遊離して癌細胞をアポトーシスに誘導することを見出した（Kawakubo, T. *et al.*, 2007)。カテプシン E はリンパ球や抗原提示細胞などの免疫系細胞に広く発現しているプロテアーゼであり、これらの細胞は活性化にともない活性型酵素としてカテプシン E を細胞外に多量に分泌することが知られている(Nakanishi, H. *et al.*, 1993, Sastradipura, D.F. *et al.*, 1992, Tominaga, K. *et al.*, 1998, Yanagawa, M. *et al.*, 2006, Bennett, K. *et al.*, 1992, Sealy, L. *et al.*, 1996)。カテプシン E は抗原提示細胞(マクロファージ、ミクログリア、樹状細胞)では、主にエンドソーム内に活性型成熟酵素として存在し(Sastradipura, D.F. *et al.*, 1998, Nishioku, T. *et al.*, 2002）、リンパ球（脾臓細胞、胸腺細胞）では、主に小胞体やゴルジ体に不活性前駆体として存在する（Sakai, H. *et al.*, 1989, Nishishita, K. *et al.*, 1996, Nishioku, T. *et al.*, 2002)。また、カテプシン E は major histocompatibility complex (MHC) クラスⅡを介した抗原提示機構において、外来性抗原のプロセシングに重要な役割を果たしていることが知られている(Bennett, K. *et al.*, 1992, Sealy, L. *et al.*, 1996, Chain, B.M.

et al., 2005)。筆者らの研究室のカテプシン E ノックアウトマウスを用いた個体ならびに細胞レベルでの解析からも、本酵素が宿主防御機構に強く寄与していることが明らかにされている(Tsukuba, T. *et al.*, 2003, 2006) 。さらに、カテプシン E ノックアウトマウス由来のマクロファージでは、主要なリソソーム性膜蛋白質の lysosome-associated membrane protein(LAMP-1、LAMP-2、LIMP-2)などが細胞内に蓄積してリソソーム性 pH が著明に上昇し、マクロファージの免疫反応に関係する様々な機能が障害されていることが明らかにされている（Yanagawa, M. *et al.*, 2007）。ヒト癌組織を用いた免疫病理学的解析では、カテプシン E は癌細胞周辺に集積した免疫系細胞に発現上昇していることも報告されている(Matsuo, K. *et al.*, 1996) 。しかし、カテプシン E の生体内における真の基質が未だ明らかにされていないことから、その生理的機能の詳細は依然として不明のままである。近年、膵臓、肺、膀胱等、種々の癌における網羅的遺伝子あるいは蛋白レベルの解析によって、本酵素の癌におけるバイオマーカーとしての有用性も示唆されている(Uno, K. *et al.*, 2000, Ullmann, R. *et al.*, 2004, Busquets, L. *et al.*, 2006, Blaveri, E. *et al.*, 2005, Wild, PJ. *et al.*, 2005) 。さらに、胃癌においては、カテプシン E が転移を抑制する重要な因子であることも示唆されている(Sakakura, C. *et al.*, 2005) 。これらの知見は、カテプシン E が癌の発症・進展を抑制する善玉因子として働いている可能性を強く示唆している。

第 1 章の研究は癌の増殖・浸潤機構におけるカテプシン E の役割を解明するために行われたもので、癌細胞におけるカテプシン E の発現の有無が移植したモデル動物における癌の増殖にどのような影響を与えるのか、また、その変化が腫瘍微小環境下における血管新生機構や免疫反応にどのように関連しているのか等を分子細胞生物学的に解析した。

実験材料および実験方法

（1）実験材料および試薬

Balb/cAJc1-nu ヌードマウスおよび C57BL/6N マウスは九動（佐賀）より購入した。ヒト前立腺癌細胞株 ALVA101 は Dr. J.Y. Bahk(Department of Urology, Medical College of Gyeogsang National University, Korea)より供与された。ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 HUVECs は TOYOBO(大阪)より、マウス悪性黒色腫細胞株 B16 は理研バイオソースセンター(茨城)より購入した。DMEM 培地は日水製薬株式会社(東京)より購入した。牛胎児血清(FBS)は Biomedicals, Inc. (Ca, USA)より購入し、非働化処理して使用した。10,000 U/ml ペニシリン-10,000 mg/ml ストレプトマイシン、2-メルカプトエタノール(2-ME)、カルシウム・マグネシウム不含 PBS、ならびに OPTI-MEM 培地は GIBCO(Gaithersburg, USA)より購入した。Cell Counting Kit-8 は同仁化学研究所(熊本)より購入した。抗ヒトエンドスタチン抗体は Cytimmune Sciences より購入した。ECL ウエスタンブロッティング検出試薬は Amersham Biosciences(NJ, USA)より購入した。カテプシン E(Yamamoto, K. *et al.*, 1978）、カテプシン B(Yamamoto, K. *et al.*, 1983）、カテプシン D (Yamamoto, K. *et al.*, 1985）、ならびにカテプシン L (Bando, Y. *et al.*, 1986)は先に報告した方法によって分離精製した。さらに蛍光基質 KYS-1 [MOCAc-Gly-Ser-Pro-Ala-Phe-Leu-Ala-Lys (DNP)-D-ARG-NH_2] (Yasuda, Y. *et al.*, 2005)は、ペプチド研究所(大阪)より購入した。

(2) 細胞培養

ヒト前立腺癌細胞 ALVA101 およびマウス悪性黒色腫細胞株 B16 は DMEM(10% FBS、100 U/ml ペニシリンおよび 100 μg/ml ストレプトマイシン含有)にて 5% CO_2、37℃の条件下で培養した。HUVECs は内皮細胞増殖培地(TOYOBO, 大阪)で培養した。

(3) カテプシン E 安定性発現株の作製

pAGS412(Azuma, T. *et al.*, 1989) を EcoRV と SmaI で制限酵素処理しヒトカテプシン E cDNA を得た。このヒトカテプシン E cDNA を含むフラグメントを pcDNA3.1(+)の EcoRV サイトに組み込んだ。100 mm ディッシュで 24 時間培養した ALVA101 細胞に TransFast™ トランスフェクション試薬(Promega, Madison, WI, USA) 45 μl を用いて 15 μg の hCE/pcDNA3.1(+)発現ベクターを導入した。ネガティブ・コントロールとして空ベクター pcDNA3.1(+)を ALVA101 細胞に導入した。遺伝子導入してから 48 時間後に培地を捨て、500 μg/ml G418 含有の新しい培地に交換した。2 日おきに培地交換を行い、2 週間後に G418 耐性の細胞を回収した。遺伝子組換え実験は九州大学遺伝子組換え実験指針に則り、機関承認を受けて行った。

(4) カテプシン E 酵素活性の測定

カテプシン E 酵素活性は安田らの方法に若干の改良をして測定した(Yasuda, Y. *et al.*, 2005) 。具体的には 10 μl 緩衝溶液(1 M 酢酸ナトリウム, pH 3.5)、10 μl KYS-1 蛍光基質(200 μM)と 80 μl のサンプル溶液を混和し、40℃で 10 分間反応させた。その後、0℃にて 2 ml の 5 %トリクロロ酢酸を加え反応を停止させた。蛍光強度の増加を励起波長 328 nm/蛍光波長 393 nm で蛍光光度計(F-3010; 日立, 東京)にて測定した。

(5) 細胞増殖率の測定

5×10^3 個の細胞を 96 ウェルプレートに播種し、100 μl 血清含有培地にて培養した。各々の時間ごとに 10 μl Cell Counting Kit-8 をウェルに加え、5% CO_2、37℃の条件下で 1 時間培養し、反応終了後、テトラゾリウム塩(WST-1; sodium 2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium) が細胞内脱水素酵素により還元され生成することで生じた水溶性ホルマザンを吸光プレートリーダーImmuno Mini

NJ-2300 (Nalge Nunc International、東京) (450 nm)にて測定した。

(6) ALVA101 細胞のヌードマウスへの移植

1×10^7 個の ALVA101/hCE 細胞と ALVA101/mock 細胞（それぞれ 0.1 ml PBS に懸濁）を 8 週齢の雄ヌードマウスの左側腹部皮下に移植した。腫瘍の大きさはノギスを用いて 2 日おきに測定した。具体的に、(腫瘍体積)＝(a×b^2)×0.52 [a: 腫瘍長径, b: 腫瘍短径]にて腫瘍体積を換算した。移植 4~9 週後に、腫瘍を摘出した。動物は SPF 条件下で飼育した。動物実験は、九州大学動物実験規則に則り九州大学総長の承認を得て行った。

(7) B16 細胞の C57BL/6N マウスへの移植

前項と同様にカテプシン E 遺伝子発現プラスミドを導入した細胞を作製し、1×10^7 個の B16/hCE 細胞と B16/mock 細胞（それぞれ 0.1 ml PBS）を 8 週齢の雄 C57BL/6N マウスの左側腹部皮下に移植した。腫瘍の大きさはノギスを用いて 2 日おきに測定した。具体的に、(腫瘍体積)＝(a×b^2) ×0.52 [a: 腫瘍長径, b: 腫瘍短径]にて腫瘍体積を換算した。

(8) 血管新生関連因子抗体アレイ

マウス血管新生関連因子抗体アレイは RayBiotech, Inc. (Norcross, GA, USA)より購入した。製品プロトコールに記載されている方法で行った。移植後 64 日目に摘出した腫瘍を、溶解緩衝溶液(PBS, 0.1% Triton X-100)にてホモジナイザーを用い破砕した。腫瘍抽出物を 27,000×g、30 分間遠心し、不溶性画分を除いた。既製のトレーに抗体を配列したメンブレンを置き、室温で 1 時間ブロッキングした。その後、500 μg タンパク質サンプルを室温で 2 時間反応させ洗浄した。ビオチン化抗体と 2 時間反応させ洗浄した。ペルオキシダーゼ(HRP)標識ストレプトアビジンを 2 時間反応させ洗浄した。LAS-1000 plus (フジフィルム, 東京)により撮影した。

(9) エンドスタチンの定量

エンドスタチン ELISA キットは Cytimmune Sciences (Rockville, MD, USA)より購入した。移植後 30 日目に摘出した腫瘍を溶解緩衝溶液(PBS, 0.1% Triton X-100)にてホモジナイザーを用い破砕した。腫瘍抽出物を 27,000×g、30 分間遠心し、不溶性画分を除いた。血清を移植後 30 日目のマウスの眼窩静脈叢から採取した。腫瘍抽出物中と血清中のエンドスタチンを定量した。

(10) カテプシン群による *in vitro* での NC1 の分解

組み換え NC1 (0.275 μg)をカテプシン E, D, B, L, H (1×10^{-12} mol)と pH 6.0、37℃で 13 時間反応させた。カテプシン B, L, H の反応液には 10 mM dithiothreitol (DTT)、1mM ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA)を加えた。SDS-PAGE は既報(Laemmli, U.K., 1970)に従って行なった。試料とする細胞はピペッティングならびにセルスクレーパー(NUNC 179693)にて回収し、遠心(4℃、5 分間、2000 回転)後、PBS で洗浄した。回収した細胞に、0.1% TritonX-100 ならびにプロテアーゼ阻害剤(10 μg/ml ロイペプチン、10 μg/ml ペプスタチン A、 10 μg/ml E-64、 10 μg/ml エラスタチノール、 10 μg/ml EDTA)含有 PBS を加えて溶解し、超音波破砕を行なった後、超遠心(4℃、105,000×g、30 分間)により不溶成分を取り除き、細胞抽出液とした。細胞抽出液に可溶化緩衝液[4% sodium dodecylsulfate (SDS)、 10% スクロース、 10 mM トリスアミノメタン(pH 8.0)、 1 mM EDTA]を入れ、還元条件化(2-ME 存在下)で 5 分間煮沸した後、SDS-PAGE を行なった。SDS-PAGE 後、ウエスタンブロッティングを行なった。ゲル上のタンパク質をニトロセルロース膜(Advantec MFS, CA, USA)に転写させ(Towbin, H. *et al.*, 1979) 、5%スキムミルクでブロッキングを行い、T-TBS [0.3% Tween20、20 mM トリスアミノメタン、 0.5 M 塩化ナトリウム (pH 7.5)] で洗浄後、抗エンドスタチン抗体を 4℃で一晩反応させた。その後、tween20-tris buffered saline (T-TBS)で十分に洗浄し、HRP 標識・２次抗体（抗ウサ

ギ抗体）を 4℃で一晩反応させ、T-TBS で十分洗浄した後、ECL 検出試薬で発色させ、LAS-1000 plus (Fujifilm)により撮影した。

(11) N 末端アミノ酸シークエンス

SDS-PAGE 後のゲル上のタンパク質を polyvinylidene fluoride(PVDF)膜に転写した。coomassie brilliant blue(CBB) R-250 染色し、カッターにて約 22 kDa のエンドスタチン様断片のバンドを切り出し、ペプチドシークエンサー(アプライド・バイオシステム 473A)にて N 末端アミノ酸配列を決定した。

(12) 管腔形成・破壊能の測定

96 ウェルプレートをマトリゲル(50 μl/well)(Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA)で 37℃、30 分間コートした後、HUVECs を播種した。管腔形成能の測定においては組み換え NC1 (0.275 μg)とカテプシン E, D, B, L, H (5×10^{-12} mol/well)を HUVECs と同時に添加し、18 時間細胞を培養した。管腔破壊能の測定では HUVECs を播種してから 7 時間後に NC1 とカテプシン群を添加し、さらに 13 時間細胞を培養した。生細胞をカルセイン AM(1 μM; Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, USA)で蛍光染色し、蛍光顕微鏡で撮影した。

(13) hematoxylin eosin(HE)染色・免疫染色

移植 29 日後の腫瘍を摘出し、10%ホルマリンで固定後、パラフィンに包埋した。切片を HE 染色した。さらに、F4/80、CD3 の免疫染色を行った(Sastradipura, D.F. *et al.*, 1998) 。組織切片の作製はバイオ病理研究所(大分)に委託した。

(14) 腹腔マクロファージの調製

腹腔マクロファージは、8～12 週齢 C57BL/6N マウスに 4.05% thioglycollate (TGC)を腹腔内投与(2 ml/マウス)し、投与 3.5 日後にカルシウム・マグネシウム不含 PBS で腹腔内を洗浄しながらマクロファージを採取した。採取後、100 mm ディッシュに播き、10% FBS、100 U/ml ペニシリンおよび 100 μg/ml ストレプトマイシン含有 RPMI1640 培地にて培養(37℃、5% CO_2)した。2 時間培養後、カルシウム・マグネシウム不含 PBS でよく洗浄し、付着して残った細胞をマクロファージとして使用した。なお、実験に使用した細胞については、TGC 誘導マクロファージのマーカーである MAC-2 の免疫染色を行い、95%以上の細胞が陽性であることを確認した。

(15) マクロファージ遊走能の測定

5×10^4 個の ALVA101/hCE と ALVA101/mock 細胞を細胞遊走チャンバー(Becton Dickinson)の下層に播種した。2×10^5 個の腹腔マクロファージをフィルター(8 μm ポアサイズ; Becton Dickinson)付きインサートに播種し、24 ウェルプレート上に置き、37℃、5% CO_2 で 2 時間培養した。フィルター上層の細胞を綿棒で擦り取り、下層の細胞をメタノールで固定後、ヘマトキシリン染色を行った。無作為に選んだ 5 視野(倍率×200)の細胞数の平均をフィルター下層に移動した細胞数とした。

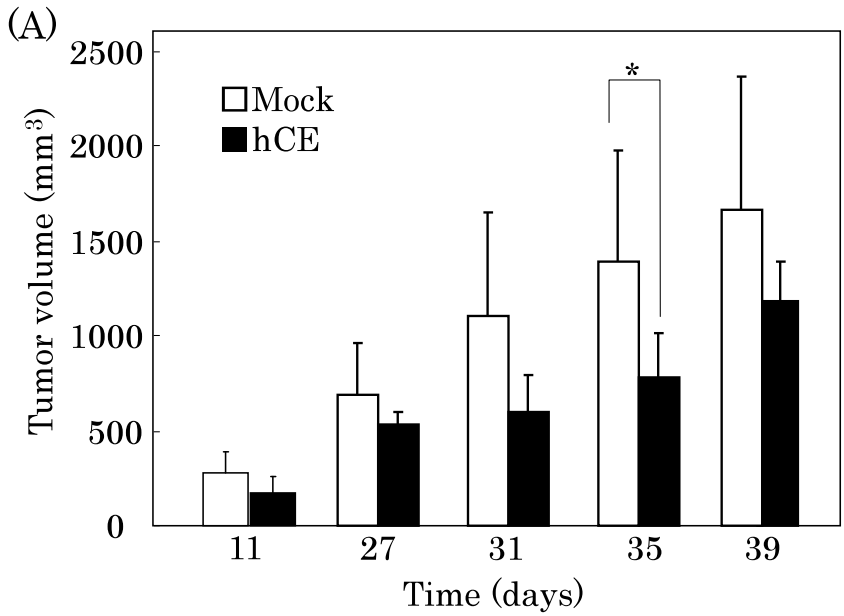
(16) 統計学的処理

データに示した値はすべて平均±標準誤差で表した。各群の有意差検定は Student's *t*-test を用いて行なった。すべての検定において、$p<0.05$ の値を以って有意であると判定した。

結果

１　癌細胞の増殖に及ぼすカテプシン E 遺伝子導入効果

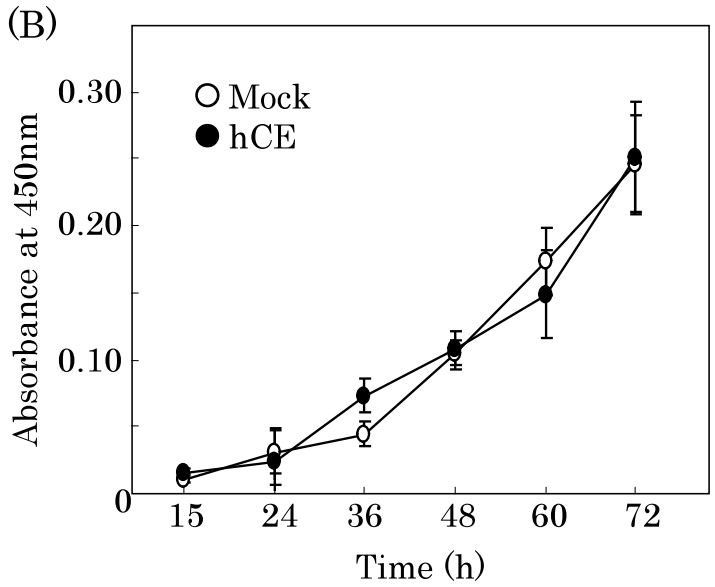
癌細胞に発現するカテプシン E の生理的意義を解明するために、ヒトカテプシン E 遺伝子を発現ベクターを用いてヒト前立腺癌細胞株 ALVA101 細胞に導入し、安定発現株 ALVA101/hCE を樹立した。ALVA101 細胞は多くのヒト前立腺癌細胞株の中でもカテプシン E の発現が非常に低い細胞株であることから、カテプシン E の発現が癌細胞における性状や機能にどのような影響を与えるのかを解析するには適している。樹立した安定発現株 ALVA101/hCE 中のカテプシン E 活性を特異的蛍光基質 KYS-1 [MOCAc-Gly-Ser-Pro-Ala-Phe-Leu-Ala-Lys(DNP)-D-ARG-NH_2]を用いて測定した結果、カテプシン E の活性は、対照とした ALVA101/mock 細胞と比較して、約 10 倍上昇していることがわかった。各々の導入細胞株をヌードマウスの皮下に移植すると、ALVA101/hCE 細胞による腫瘍の増殖は、腫瘍移植後 35 日後の時点で ALVA101/mock 細胞による腫瘍より有意に抑制された（図１A）。しかし、*in vivo* の結果に反し、*in vitro* の細胞増殖率はこれら導入細胞株間で有意な差異は認められなかった（図１B）。このことは、*in vivo* における癌細胞の増殖が腫瘍部位の微小環境に強く依存していることを示唆している。同様の結果は、マウス悪性黒色腫細胞株 B16 細胞にカテプシン E 遺伝子を導入して樹立した安定発現株 B16/hCE 細胞を同系の C57BL/6N マウスの皮下に移植し、癌の増殖を対照の B16/mock 細胞を移植した場合と比較した実験からも得られた。つまり、ALVA101 細胞の場合と同様に、B16/hCE 細胞による腫瘍の増殖が B16/mock 細胞による腫瘍よりも抑制された（図１C）。



（図1）カテプシンE発現の腫瘍増大に対する効果

(A) ヒト前立腺癌細胞ALVA101 細胞の*in vivo*における
腫瘍体積の経時的変化

1×10^7 個のカテプシンEを遺伝子導入したヒト前立腺癌細胞ALVA101/hCE と空ベクターを遺伝子導入したALVA101/mock をヌードマウスの側腹部皮下に移植し腫瘍体積を測定した。
具体的に、(腫瘍体積)＝$(a\times b^2)\times0.52$ [a: 腫瘍長径, b: 腫瘍短径] にて腫瘍体積を換算した。
統計は、6 頭のデータの平均±標準偏差で表記しており、mock に対する統計学的有意差を示す(*$p<0.05$)。
同じ実験を独立して4 回行った。

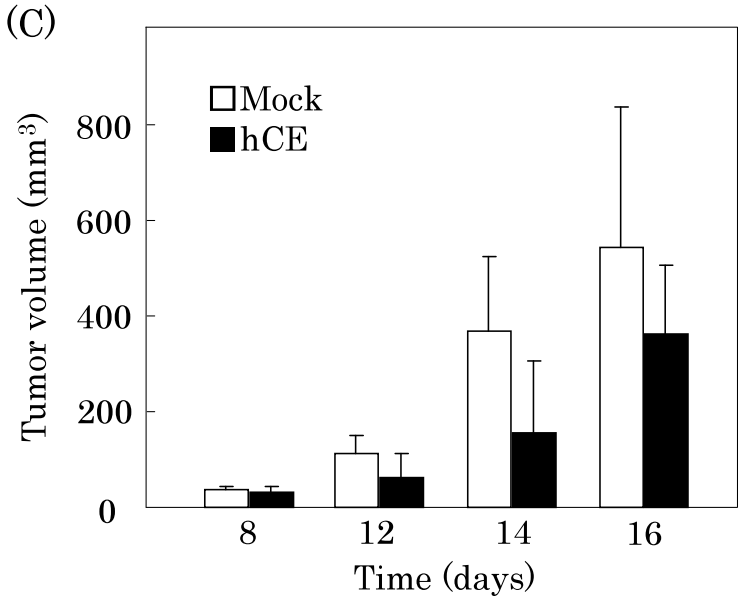


（図1）カテプシンE発現の腫瘍増大に対する効果

(B) *in vitro*における細胞増殖

カテプシンEを遺伝子導入したヒト前立腺癌細胞ALVA101/hCE と空ベクターを遺伝子導入したALVA101/mock の細胞増殖能をCell Counting Kit 8を用いて測定した。

統計は、3 ウェルの平均±標準偏差で表記する。同じ実験を独立して4 回行った。



（図1）カテプシンE発現の腫瘍増大に対する効果

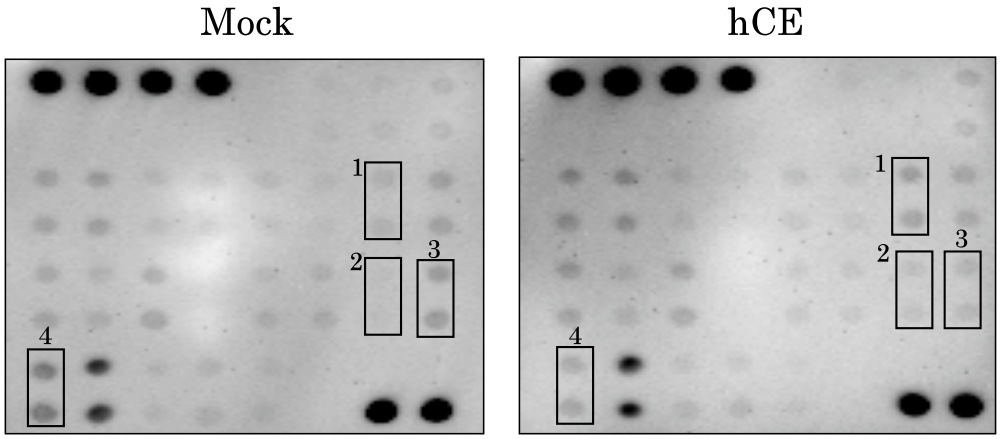
(C) マウス悪性黒色腫細胞B16の*in vivo*
における腫瘍体積の経時的変化

カテプシンEを遺伝子導入したマウス悪性黒色腫細胞B16/hCEと空ベクターを遺伝子導入したB16/mockをC57BL/6Nマウスの側腹部皮下に移植し腫瘍体積を比較した。具体的に、(腫瘍体積)＝$(a \times b^2) \times 0.52$ [a: 腫瘍長径, b: 腫瘍短径]にて腫瘍体積を換算した。
統計は、6 頭のデータの平均±標準偏差で表記している。
同じ実験を独立して4 回行った。

２　カテプシン E の血管新生機構への関与

最近、血管新生は固形癌の増殖や転移において必要かつ不可欠であることが報告されている(Folkman, 1989, Kim, K.J. *et al.*, 1993, Millauer, B. *et al.*, 1994) 。局所における血管新生は、その部位における血管新生促進因子と血管新生抑制因子のバランスによって制御されていることから、ALVA101/hCE 細胞によって形成されたヌードマウスの腫瘍増殖が ALVA101/mock 細胞による腫瘍増殖より抑制された理由の一つとして、前者では後者に比べて腫瘍部位における血管新生が阻害されている可能性が考えられた。そこで、血管新生関連分子抗体アレイを用いて、それぞれの腫瘍抽出物中の血管新生関連因子の発現レベルを解析した。ALVA101/hCE 細胞を移植したヌードマウスからの腫瘍抽出物は、ALVA101/mock 細胞の腫瘍と比べて、IL-12(p40/p70) および MIG(monokine induced by γ-interferon) の発現レベルが有意に上昇し、TIMP-1(tissue inhibitor of metalloproteinases)や PF(platelet factor)-4 の発現レベルが有意に減少していた（図２）。IL-12、MIG は抗腫瘍分子として腫瘍増殖を抑制し、一方、TIMP-1 は細胞の増殖因子として腫瘍増殖を促進することが示唆される。PF-4 は内皮細胞の増殖と血管新生を阻害すると言われているが、こうした知見と一見矛盾するような PF-4 発現量の低下は、この分子の多面的な性質や多様な生理機能によるかもしれない。これらの結果は、ALVA101/hCE 細胞を移植したマウスでは、ALVA101/mock 細胞を移植した動物に比べて、腫瘍血管新生が抑制される傾向にあることを示している。このことは、以下の実験結果からも検証された。すなわち、内在性血管新生阻害因子の中で最も強力な血管新生阻害因子であるエンドスタチンの発現の差異を ELISA kit を用いて測定した結果、ALVA101/hCE 細胞を移植したヌードマウス腫瘍抽出物のエンドスタチン量は、ALVA101/mock 細胞を移植した腫瘍と比較して明らかに高いことが示された（図３）。さらに興味あることに、血清中のエンドスタチン量も ALVA101/hCE 細胞を移植したマウスの方が ALVA101/mock 細胞を移植したマウスよりも有意に高か

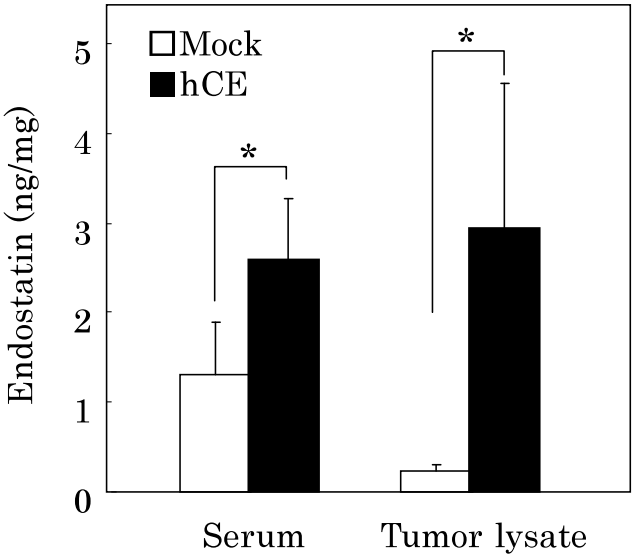
った。これらの結果から、カテプシン E を発現させた癌細胞は、対照細胞に比べて、移植した腫瘍部位において血管新生阻害因子をより多く産生し、腫瘍血管新生を抑制して腫瘍増殖を抑制していることが明らかとなった。



	A	B	C	D	E	F	G	H
1	POS				Blank	Eotaxin	Fas Ligand	bFGF
2	NEG							
3	G-CSF	GM-CSF	INF γ	IGF-Ⅱ	IL-1 α	IL-1 β	IL-12 p40/p70	IL-12 p70
4								
5	IL-13	IL-6	IL-9	Leptin	MCP1	M-CSF	MIG	PF-4
6								
7	TIMP-1	TIMP-2	TNF α	Thrombo-poietin	VEGF	Blank		
8							POS	

（図2）カテプシンE発現による血管新生関連因子の変動

カテプシンEを発現させたヒト前立腺癌細胞ALVA101/hCE と空ベクターを遺伝子導入したALVA101/mock の腫瘍抽出物中の血管新生関連分子の発現を抗体アレイを用いて比較した。ヌードマウスに移植後64 日後に摘出した腫瘍を溶解緩衝溶液(PBS, 0.1% Triton X -100)にてホモジナイザーを用い破砕した。腫瘍抽出物を27,000×g、30 分間遠心し、不溶性画分を除いた。 500 μgのタンパクを抗体を配列したメンブレン上で反応させた後、ビオチン化抗体と反応させ、さらにHRP標識ストレプトアビジンを反応させた。
ALVA101/hCE の腫瘍で発現が上昇した因子を ■ で、減少した因子を ■ で示す。



（図3）細胞移植後のマウスにおけるエンドスタチン発現量

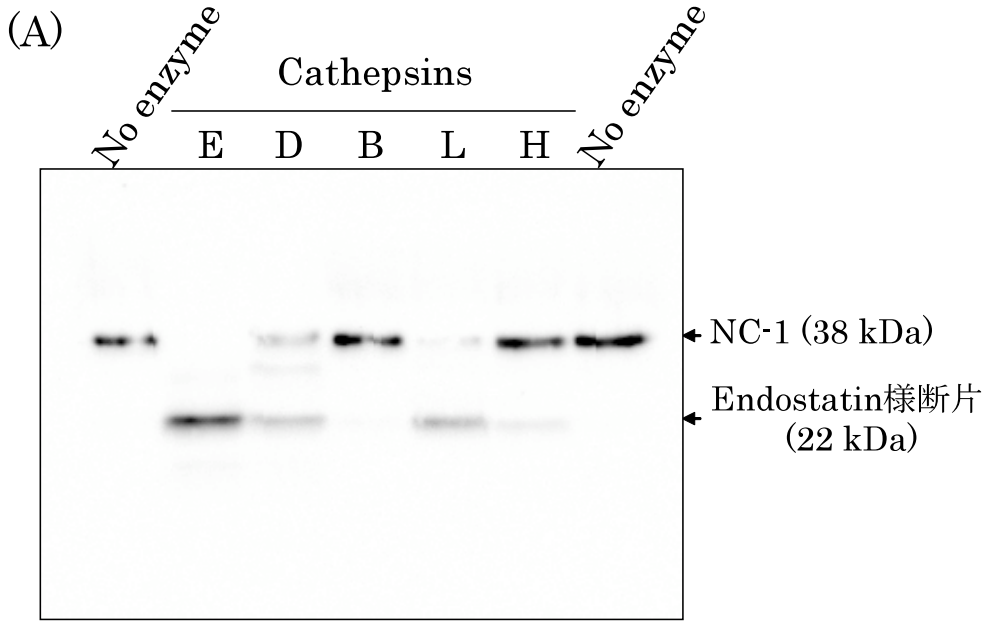
カテプシンEを発現させたヒト前立腺癌細胞ALVA101/hCE と空ベクターを遺伝子導入したALVA101/mock を移植したヌードマウスの血清中、腫瘍抽出物中のエンドスタチン量をELISAで定量した。

統計は、グループごとの4 匹のマウスの平均±標準偏差で表記しており、mockに対する統計学的有意差を示す(*p<0.05)。

３　*in vitro* におけるカテプシン E と他のカテプシンによるエンドスタチン産生能の検討

エンドスタチンはコラーゲンタイプ XVIII の C-末端非コラーゲン性（NC1）フラグメント部位がプロテアーゼ作用によって分解されて産生される分子量 22 kDa の強力な内在性の血管新生阻害分子で(Felbor, U. *et al.*, 2000, Ferreras, M. *et al.*, 2000)、血管内皮細胞の増殖と遊走を阻害する（O'Reilly, M.S. *et al.*, 1996, 1997, Yamaguchi, N. *et al.*, 1999)。しかし、エンドスタチンを *in vivo* で実際に産生する責任酵素については、マウスにおいてカテプシン L が同定されていることを除けば(Felbor U. et al., 2000)、ヒトなどの他の動物では明らかにされていない。そこで、リコンビナントヒト NC1 フラグメントを用いて種々の精製カテプシン類（E、D、B、L、H）を作用させ、エンドスタチン産生能を検討した。各精製酵素と NC1 をモル比 7.2:1 で混ぜ、pH 6.0 で 37 ℃、12 時間インキュベーションした後、SDS-PAGE と抗ヒトエンドスタチンポリクローナル抗体を用いた免疫ブロット法によってエンドスタチン産生能を解析した（図４A)。その結果、カテプシン E は最も効率よく、かつ安定的に 22-kDa のエンドスタチン様フラグメントを産生することがわかった。カテプシン D およびカテプシン L も NC1 からエンドスタチン様フラグメントを産生したが、それらはインキュベーション中に分解されて消失することがわかった。一方、カテプシン B およびカテプシン H には NC1 からエンドスタチン様フラグメントを産生する能力はほとんど検出されなかった。カテプシン E による 22-kDa のエンドスタチン様フラグメントの産生は濃度依存的、時間依存的に見られた（データは示していない)。カテプシン E により産生される 22 kDa フラグメントの N 末端アミノ酸配列をアミノ酸シーケンサーで解析すると、VHLRPAPT---であることから、ヒトコラーゲン XVIII の Val^{118} から開始するエンドスタチンの N 末端アミノ酸配列と一致していることがわかった (図４B)。同様に、カテプシン D も Val^{118} から開始するエンドスタチンを産生したが、本酵素はカテプシン E とは異なり、さら

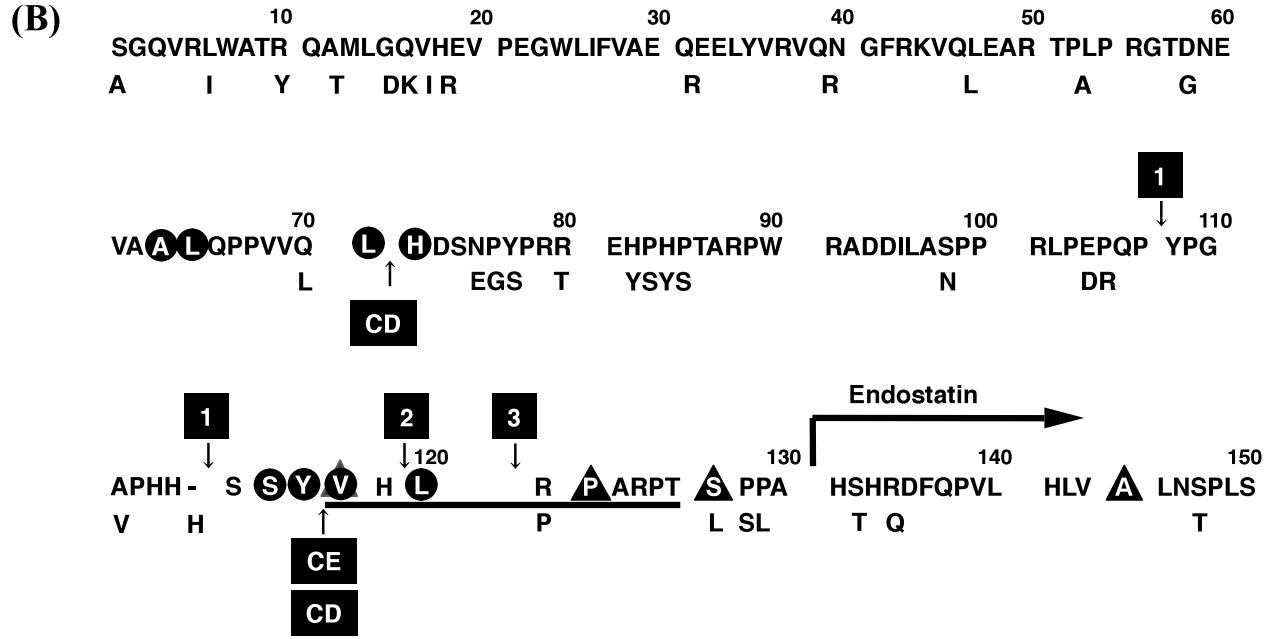
に N 末端上流の Leu[71] にも切断部位を持っていた。しかし、実際にヒトの組織・血漿に検出されるエンドスタチンの N 末端アミノ酸配列は、Val[118] から開始するもののみが検出されていることから(Standker, L. *et al.*, 1997, Sasaki, T. *et al.*, 1998)、ヒトにおけるコラーゲン XVIII からのエンドスタチンはカテプシン E によって産生されるるものと考えられる。加えて、カテプシン L によって産生されるマウスエンドスタチンの N 末端アミノ酸配列は His[131] から開始しており(Felbor, U. *et al.*, 2000)、ヒトにおけるエンドスタチンの N 末端アミノ酸配列とは明らかに異なっている。さらにカテプシン L、B、K は Leu[120] から開始する N 末端アミノ酸配列をもつエンドスタチン様フラグメントをも切り出すことが知られている(Ferreras, M. *et al.*, 2000) 。また、MMP-3, -9, -12, -13, -20 を含むマトリックスプロテアーゼは、*in vitro* において、ヒト NC1 から Tyr[108] と Ser[115] から開始する N 末端のエンドスタチン様フラグメントを切り出す(Standker, L. *et al.*, 1997) 。したがって、腫瘍微小環境と類似した弱酸性下で、カテプシン E が効率よくエンドスタチンを産生することは、本酵素が腫瘍部位でエンドスタチンを産生する責任酵素であることを強く示唆している。



（図4）各種プロテアーゼによるコラーゲンXVIII NC1ドメインの分解とエンドスタチンの産生

(A) *in vitro*における精製カテプシン群によるコラーゲンXVIII NC1ドメインの分解

精製NC-1 0.275 μgとカテプシンE, D, B, L,H(1 ×10^{-12} mol)をpH 6.0, 37 ℃の条件下で13 時間反応させた。各々のサンプルをSDS-PAGE にて電気泳動を行い、 抗エンドスタチン抗体を用いウエスタンブロッティングを行った。



(図4) 各種プロテアーゼによるコラーゲンXVIII NC1ドメインの分解とエンドスタチンの産生

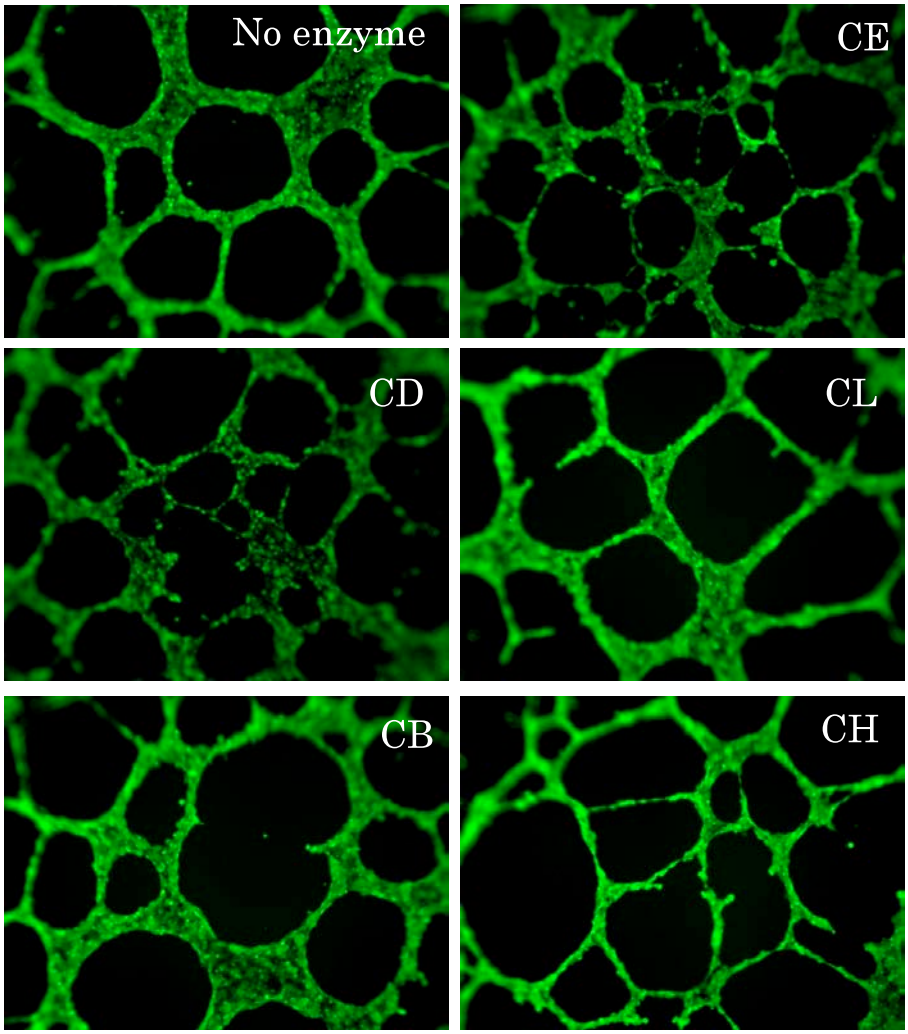
(B) コラーゲンXVIII NC1ドメインのアミノ酸シークエンスと各種プロテアーゼによる切断部位

上段に示すヒトコラーゲンXVIIIと下段に示すマウスコラーゲンXVIIIのアミノ酸シークエンスはOh et al. (1994a,b)による。下線でカテプシンEにより産生される22 kDaフラグメントのN末端アミノ酸配列を示す。ヒトおよびマウスの血清中に検出されるN末端のエンドスタチン様断片をそれぞれ●、▲で示す。黒ボックスの数字で示すMMP-9 (no. 1)、カテプシンL, B, K (no. 2)、膵臓エステラーゼ (no. 3)の切断部位は、Felbor et al. (2000)とFerreras et al. (2000)による 。太い矢印はマウスエンドスタチンのN末端を示す。

４　HUVECs の管腔形成と破壊におけるカテプシン E の効果

つぎに、カテプシン E によるエンドスタチンの産生能と管腔形成阻害能との関係を、human umbilical vein endothelial cells(HUVECs)を用いたマトリゲル管腔形成アッセイ系で検討した。マトリゲル管腔形成アッセイ系は細胞運動や分化を含めた血管新生能を反映していると考えられている(Grant, D.S. *et al.*, 1991) 。HUVECs をカテプシン E および他のカテプシン類の存在・非存在下で NC1 を添加しマトリゲル上において培養した結果、エンドスタチン産生能の結果と一致して、カテプシン E およびカテプシン D は効率よく管腔形成を阻害した（図５A)。一方、カテプシン L、カテプシン B、およびカテプシン H には、ほとんど管腔形成阻害能はなかった。また、エンドスタチンには管腔形成阻害能に加え、血管内皮細胞のアポトーシス誘導能があることから(O'Reilly, M.S. *et al.*, 1997, Dhanabal, M. *et al.*, 1999a,b)、カテプシン E および他のカテプシン類が、マトリゲル上に血管内皮細胞により形成された管腔を破壊する能力があるか否か、その程度はエンドスタチンの産生効率と相関があるかどうかを検討した。その結果、カテプシン E およびカテプシン D はマトリゲル上に形成される内皮細胞の管腔を効果的に破壊していることが示され、カテプシン L、カテプシン B、およびカテプシン H には、ほとんど管腔破壊能はないことが示された（図５B)。すなわち、これらのプロテアーゼによるエンドスタチン産生効率と管腔破壊能にも相関があることがわかった。

(A)

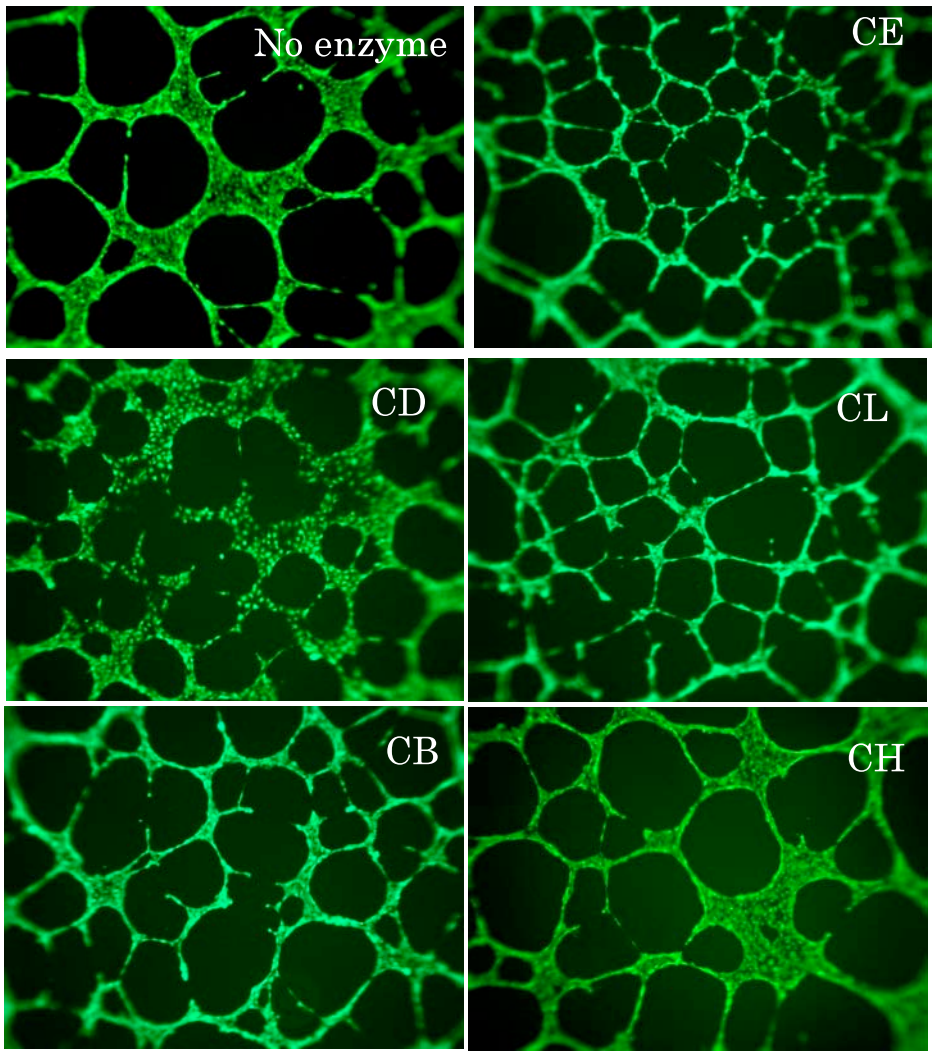


（図5）カテプシン群のHUVECs管腔形成・破壊への影響

(A) 1×10^{4} 個/wellのHUVECsをリコンビナントNC1 (0.275 μg)と各カテプシン(5×10^{-12} mol)添加し、96 ウェルプレートのマトリゲル上で18 時間培養した。その後生細胞を1 μMカルセインAMでラベルし、蛍光顕微鏡で観察した。

独立して行った3 回のデータの典型的な画像を示す。

(B)



（図5）カテプシン群のHUVECs管腔形成・破壊への影響

(B) 1×10^4 個/wellのHUVECsを96 ウェルプレートのマトリゲル上で7時間培養した。その後リコンビナントNC1 (0.55 μg)と各カテプシン(5×10^{-12} mol)を添加し、さらに13 時間培養した。(A)と同様の観察を行った。

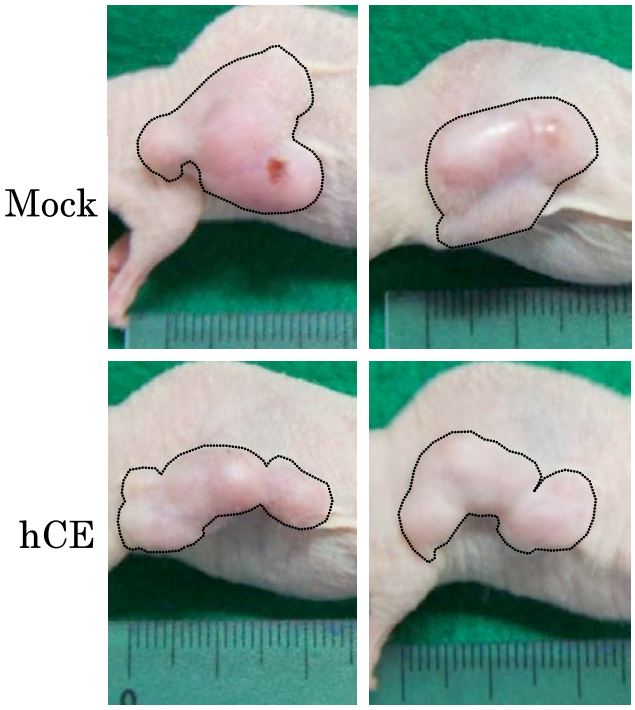
独立して行った3 回のデータの典型的な画像を示す。

５　ALVA101/hCE 細胞と ALVA101/mock 細胞によって形成された腫瘍の形態学的観察

つぎに、ALVA101/hCE 細胞と ALVA101/mock 細胞により形成された腫瘍の肉眼的形態学的観察を行った。移植 29 日後の ALVA101/hCE 細胞からなる腫瘍は、ALVA101/mock 細胞の形成した腫瘍と比較して、多形で不規則な辺縁を有し、より肥厚した皮膚によって被覆されていた（図６A)。組織化学的観察では、ALVA101/hCE 細胞からなる腫瘍は、よく発達した被膜様構造物に仕切られており、厚い層状皮膚組織に覆われていた（図 6B)。一方、ALVA101/mock 細胞からなる腫瘍は薄い被膜様構造によって囲われた大きな固形構造体を示した。顕微鏡下で観察すると、ALVA101/hCE 細胞からなる腫瘍は厚い層状に発達した表皮組織や間葉組織によって区切られていた（図 6C)。高倍率で観察すると、ALVA101/hCE 細胞からなる腫瘍と接している肥厚した皮下組織には、線維性被膜や脂肪組織、皮脂腺様構造に特徴づけられた発達したび漫性の過形成が観察された。このことは腫瘍細胞に発現したカテプシン E が周囲の正常細胞の増殖や分化に影響することを示唆している。

さらに免疫組織学観察では、ALVA101/hCE 細胞からなる腫瘍の内部は、ALVA101/mock 細胞からなる腫瘍と比べて、CD3 陽性 T リンパ球が減少するのに対し、腫瘍辺縁部では F4/80 陽性の腫瘍関連マクロファージ（TAM）の数と範囲は明らかに増えていた（図 6D)。

(A)

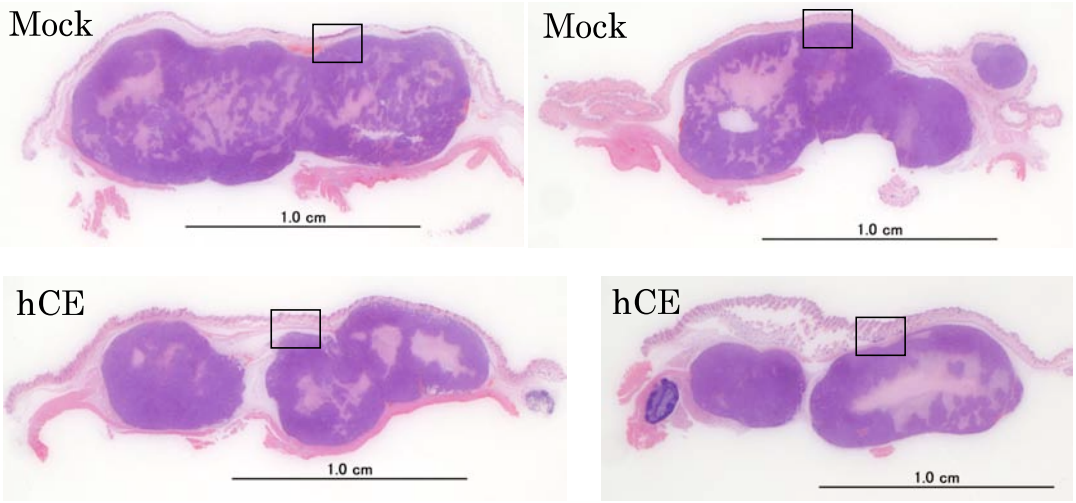


（図6） ALVA101/hCE とALVA101/moch を移植したヌードマウスの形態観察

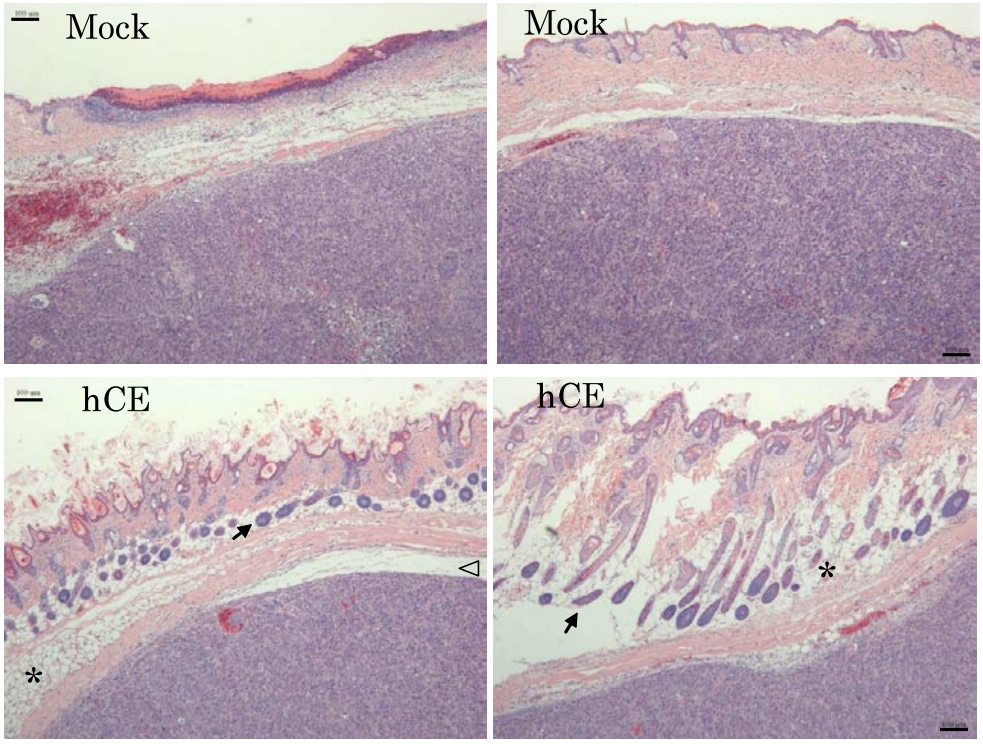
(A) ALVA101/hCE とALVA101/mock 担ったヌードマウスの移植後29 日後の腫瘍概観

各群6 頭のヌードマウスのうち典型的な2 匹の外観を示す。

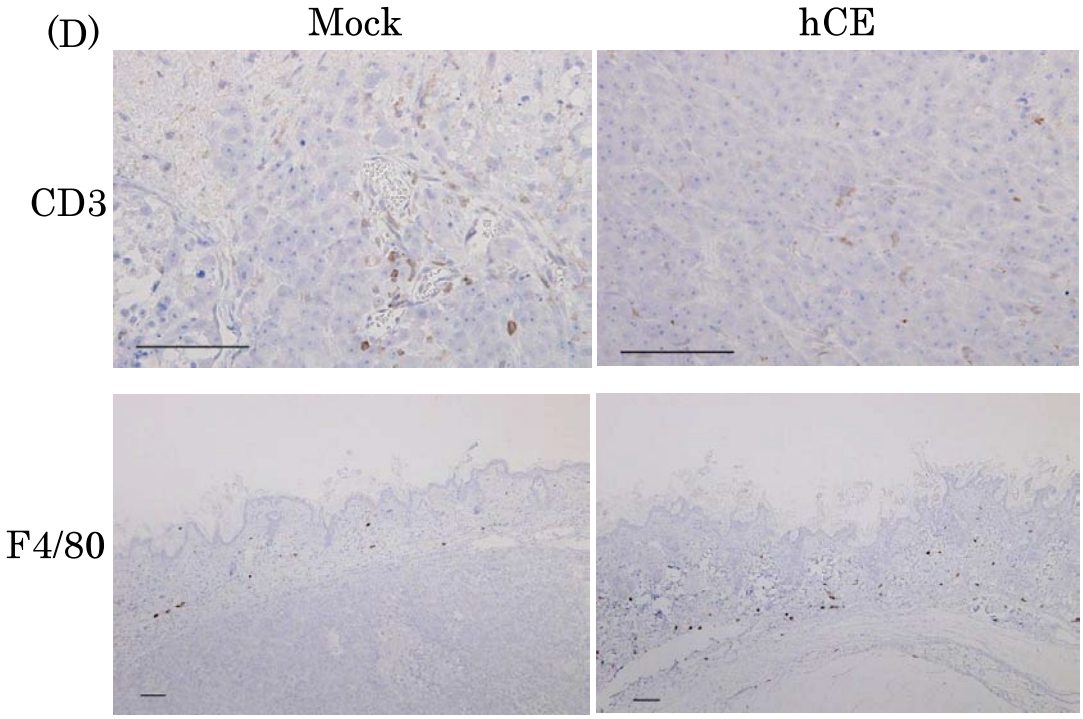
(B)



(C)



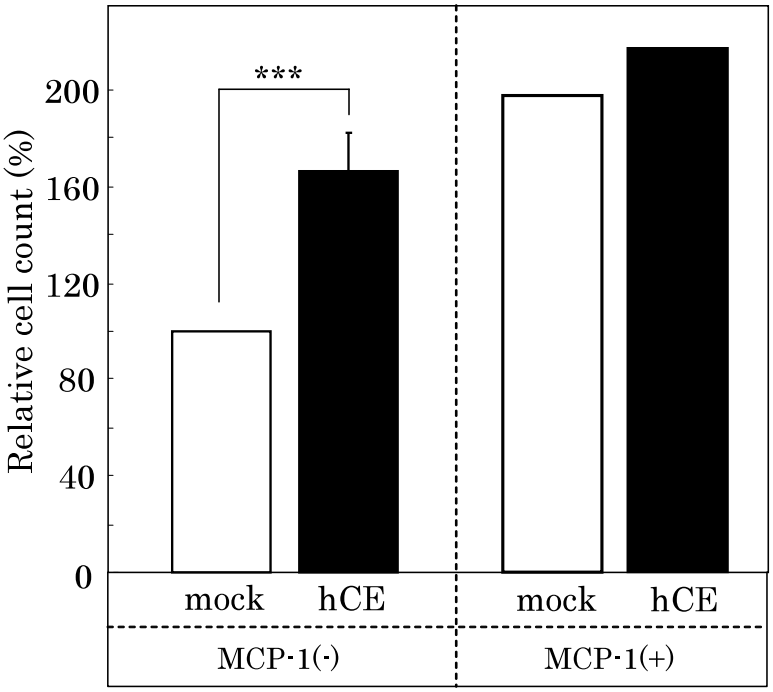
(B) 腫瘍移植後29 日後のHE染色サンプルの組織学所見を示す。
各群6 匹のヌードマウスのうち典型的な2 匹の外観を示す。
(C) (B)各腫瘍の周辺部(四角部分)の拡大図を示す。
＊：脂肪組織 ↗：皮脂腺様構造 ◁：線維性被膜



(D) ALVA101/hCE とALVA101/mock を腫瘍移植後29日後のヌードマウス腫瘍部を抗F4/80抗体と抗CD3抗体で免疫染色を行った。ビオチン２次抗体とストレプトアビジンHRP試薬で処理後、切片を3,3'-ジアミノベンジンで反応した。
各群6匹のヌードマウスのうち典型的な2匹の外観を示す。
スケールバー: 100 μm

６　ALVA101/CE 細胞と ALVA101/mock 細胞に対するマクロファージの遊走能

ボイデンチャンバーを使ってマクロファージの ALVA101/hCE 細胞と ALVA101/mock 細胞に対する走化性反応を monocyte chemotactic protein (MCP)-1 存在、非存在下で解析した。ALVA101/CE 細胞へのマクロファージの走化性は、MCP-1 非存在下で、ALVA101/mock 細胞と比較し 1.6 倍高かった（図７）。MCP-1 存在下においても、ALVA101/hCE 細胞へのマクロファージの走化性は、ALVA101/mock 細胞と比較して高かった。ALVA101/hCE 細胞によって形成される腫瘍抽出物中の MCP-1 の量は ALVA101/mock 細胞の腫瘍抽出物中量と変わらない(7.43±.2.99 pg/mg vs. 13.49±3.97 pg/mg)ことから、MCP-1 以外の因子がカテプシン E の発現によってマクロファージの走化性反応の増強に関与していることが示唆される。



(図7) ALVA101/hCE細胞とALVA101/mock細胞へのマクロファージの走化性反応

ALVA101/hCE細胞とALVA101/mock細胞を細胞遊走チャンバーの下層に播種し、マウス腹腔マクロファージを8 μmポアサイズのインサートに添加してカルチャーウェル上に置いた。MCP-1存在、非存在下で2時間37℃置いた後、メンブレンフィルターの上面を綿棒で拭き取り、固定しヘマトキシリン染色を行った。任意の5視野の細胞数を計測し平均した。
統計は、独立して行なった5回のデータの平均±標準偏差で表記しており、mockに対する統計学的有意差を示す(***p<0.001)。

考察

本研究において、癌細胞におけるカテプシン E の発現が血管新生阻害作用と免疫反応の促進を介して、*in vivo* における癌の増殖を抑制していることが示された。癌細胞のカテプシン E の発現が腫瘍制御にどう関係するのかを調べる目的で、癌細胞と相互作用する微小環境の血管新生系と免疫応答系について検討した。ALVA101 細胞は、ヒト前立腺癌細胞の骨転移部位から樹立された細胞株で(van Bokhoven, A. *et al.*, 2003）、カテプシン E の酵素活性が非常に低い。血管新生抗体アレイと ELISA による解析から、ALVA101/hCE 細胞によって形成された腫瘍は、ALVA101/mock 細胞によって形成された腫瘍と比較して、血管新生阻害因子である IL-12、MIG、エンドスタチンの発現が有意に増加し、TIMP のような細胞増殖因子の発現が減少していることが明らかにされた。リコンビナント NC1 を用いた *in vitro* の実験から、カテプシン E はコラーゲン XVIII の Tyr^{117}-Val^{118} に相当するペプチド結合を特異的に切断することによって 22 kDa のエンドスタチン断片を産生することがわかった。このエンドスタチン断片は、マウスのエンドスタチンよりも N 末端側に 13 残基分多いアミノ酸を有しており、ヒトの組織や血漿中に認められるエンドスタチンと一致していた。カテプシン E によるエンドスタチン産生能は他のカテプシンに比較して高く特異的である。また、ALVA101/hCE 細胞株の無血清培地のエンドスタチン産生効率は対照株と比較して多く、このことはカテプシン E 発現とエンドスタチン産生効率の間の直接的な関係を示唆している。さらに、カテプシン E によって産生されるエンドスタチンはマトリゲル上での血管内皮細胞の管腔形成抑制作用と管腔破壊作用の両方の作用を示した。カテプシン E によるエンドスタチン産生は pH6 付近の弱酸性で最も強かった。*in vivo* では腫瘍細胞は虚血、低酸素状態に曝されていること(Wike-Hooley, J. *et al.*, 1984, Tannock, L. and Rotin, D. 1989）、また、細胞膜上の ATP 合成を担うプロトン勾配が腫瘍の細胞外液に観察される（Gerweck, L.E. *et al.*, 1991）ことを考えると、腫瘍中心部は腫瘍表層や血管周辺部

分よりもより酸性に傾いていると思われる。したがって、腫瘍原発巣の弱酸性の微小環境は、カテプシン E がエンドスタチンを産生するのに適した条件を提供していると考えられる。

さらに本研究では、癌細胞のカテプシン E 発現が、非発現細胞に比べて、宿主免疫応答を高めることが明らかにされた。腫瘍部位に浸潤した（活性化）マクロファージの数は、ALVA101/mock 細胞を移植した腫瘍に比べて、ALVA101/hCE 細胞を移植した腫瘍において多く観察された。腫瘍浸潤性マクロファージ（TAM）は細胞間接触やサイトカインの産生を介して癌細胞を攻撃し、排除できること(Holen, I. *et al.*, 2002) から、TAM の増大は癌の増殖・転移を抑制すると考えられる。ALVA101/hCE 細胞からなる腫瘍では、活性化 TAM が著明に増加することから、癌細胞でのカテプシン E 発現が TAM の浸潤と活性化を促進し、結果として腫瘍増殖が抑えられたものと考えられる。このことと関連して、筆者らは、ALVA101/hCE 細胞が ALVA101/mock 細胞よりも強くマクロファージを遊走させることを示した。一方、最近、こうした腫瘍抑制作用とは別に、TAM には腫瘍促進効果があることが報告されている(Strand, S. *et al.*, 2004)。これは、TAM が癌細胞の遊走と浸潤の増大を誘導し、さらに細胞外基質の破壊と血管新生の亢進を誘導して、腫瘍増殖を引き起こすとするものである。こうした相反するように見える TAM の機能は、それらが置かれた環境（癌細胞の状態や性質、および病態）に応じて、多様なサイトカインや活性酸素種を産生した結果、それらのトータルとしての効果として生み出されたものと思われる。今回の結果は、カテプシン E を安定発現させた癌細胞が、TAM の腫瘍抑制効果に適した環境を与えたことを示唆している。これまでの報告では、癌細胞の産生するカテプシン B、L、D、MMP-1、9 などの多くのプロテアーゼが癌の増殖、進展を促進することが知られているが（Nomura, T. & Katsunuma, N. 2005, Overall, C.M. & Kleifeld, O. 2006)、逆に、癌の増殖・転移を阻害するプロテアーゼについてはほとんど知られていなかった。本研究は、癌細胞から

産生されたカテプシン E が抗癌作用を有するプロテアーゼであることをはじめて明らかにしたものとして注目される。

第２章　口腔扁平上皮癌細胞の RANK の発現と顎骨浸潤における役割

緒言

口腔領域の悪性腫瘍は、扁平上皮癌が最も多く、舌や歯肉に好発するだけでなく、口腔底、口唇や口蓋にも発生する(Jordan, R.C. *et al.*, 1997, Hicks, W.L. Jr. *et al.*, 1997）。口腔扁平上皮癌は進行すると顎骨に浸潤する可能性が高い。口腔扁平上皮癌の顎骨浸潤様式には大きく平滑型と虫喰い型の２通りがあり、Wong らの報告によると前者の３年生存率が 73%であるのに対して、後者では 30%と低いことが報告されている(Wong, R.J. *et al.*, 2000）。さらに臨床において、顎骨浸潤の治療は、放射線治療と化学療法の後に、手術により癌組織を切除する外科的療法が一般的で根治性が要求される。癌組織が残らない様に安全域を確保するために、顎骨浸潤が広範囲に及ぶ場合には外科的切除によって当然歯を失うケースも多く、切除後の発音障害、嚥下障害のほかに審美的にも不調和を生じることもあり、根治性と同時に患者の QOL を考慮した治療を行わなければならない。しかしながら、口腔扁平上皮癌の顎骨浸潤は X 線によってのみ診断されており、口腔扁平上皮癌による顎骨浸潤の細胞および分子レベルでの解明はほとんど行われていない。

以前より癌細胞自身産生するプロテアーゼなどによって直接顎骨を吸収するという考え方もあるが、実際に口腔癌の顎骨浸潤の病理組織像を見ると、顎骨破壊部の最前線には多数の破骨細胞が存在し、活発に骨を吸収している像が見える。すなわち癌細胞が破骨細胞を活発にすることで顎骨を吸収、さらに深部へと浸潤すると考えられることから、口腔癌による破骨細胞分化誘導および活性化機構を分子レベルで解明できれば、破骨細胞を標的とした薬剤を用いることで顎骨浸潤を抑制できると思われる。

破骨細胞はマクロファージ系の造血幹細胞から分化する多核細胞で骨を吸収するが、破骨細胞の分化には３つの分子が重要な役割を担っていることが明らかとなっている。まず、骨芽細胞が産生する破骨細胞形成因子である receptor activator of NF-κB ligand (RANKL)と破骨細胞前駆細胞の細胞膜上に発現する RANKL の受容体 RANK、

さらに、RANKL と RANK の結合を妨げるデコイ受容体 osteoprotegerin (OPG)である(Suda, T. *et al.*, 1999, Nakashima, T. *et al.*, 2003, Boyle, W.J. *et al.*, 2003) 。RANKL 欠損マウスまたは RANK 欠損マウスでは破骨細胞が存在しない大理石骨病を呈する一方で、OPG 欠損マウスでは破骨細胞数の増加により著しい骨量の低下が起こる(Bucay, N. *et al.*, 1998, Kong, Y.Y. *et al.*, 1999) ことからも、これらの分子が破骨細胞分化を調節していることが明らかとなっている。生理的状況下の骨組織では、骨芽細胞に OPG の発現が高く、RANKL はほとんど発現していないが、関節リウマチ、骨粗鬆症や歯周病などの過剰な骨吸収を伴う疾患では、interleukin(IL)-１や tumor necrosis factor (TNF)αなどの炎症性サイトカインが骨芽細胞に作用し、OPG の発現を抑制、または RANKL の発現を促進することで破骨細胞を誘導する(Suda, T. *et al.*, 1999)ことによる、RANKL と OPG の発現バランスの変化が、骨破壊への第一歩となる。

骨転移を引き起こす乳癌細胞や多発性骨髄腫も破骨細胞を誘導することで、骨破壊を引き起こすことが報告されているが、これらの細胞による破骨細胞誘導機構としては大きく２つの説が唱えられている。１つは癌細胞自身が RANKL を発現しており、この RANKL が破骨細胞前駆細胞に直接作用し、破骨細胞を誘導するというものであり、もう１つは癌細胞が骨芽細胞に働きかけ RANKL の発現を上昇させるか、もしくは OPG の発現を抑制することで破骨細胞を誘導するというものである。

これまで、この RANKL と OPG の発現バランスの変化に着目した口腔扁平上皮癌細胞による破骨細胞誘導メカニズムが検討されている。口腔扁平上皮癌細胞は骨芽細胞と接触し骨芽細胞の OPG の発現を抑制することで、破骨細胞を誘導することが報告された(Tada, T. *et al.*, 2005) 。また、口腔扁平上皮癌細胞は破骨細胞形成を促進するだけでなく、破骨細胞同士の多核化（融合)、延命効果および骨吸収の促進効果があることが示され、これらの効果は OPG を培養液中に添加することで抑制されることが報告された(Tada, T. *et al.*, 2008) 。以上の背景から、本研究では口腔扁平上皮癌細胞による

マウス顎骨浸潤モデルを作製し、OPG の効果を *in vivo* で検討した。

実験材料および実験方法

(1) 実験材料および試薬

ヒト RANKL はペプロテック(Rocky Hill, NJ)より購入した。ヒト OPG は第一三共株式会社(日本)より供与された。

(2) 細胞培養

ヌードマウスの咬筋に移植すると顎骨浸潤を起こすことが知られている BHY 細胞及び B88 細胞は武蔵野大学薬物療法学分野 岡本 正人先生より供与された。これらの細胞は、10% FBS、100 U/ml ペニシリンおよび 100 μg/ml ストレプトマイシンを含む DMEM 培地で 5% CO_2、37℃の条件下で培養した。

(3) 組織標本の作製

口腔扁平上皮癌患者から摘出した腫瘍および顎骨ブロックは福岡歯科大学病理学教室から得た。ブロックは 10% パラホルムアルデヒドで固定し、ギ酸で脱灰後、パラフィン包埋を行った。5 μm の厚さに薄切し、HE 染色と抗ヒト RANK モノクローナル抗体（R&D System, clone AF683）による免疫ペルオキシダーゼ法(Dako LSAB2 System; HRP;Dako, Carpinteria, CA)を用いた免疫染色を行った。簡略して述べると、内在性ペルオキシダーゼ活性を３% H_2O_2 に８分反応させ阻害し、スライドガラスを一次抗体と反応させ、さらにビオチン化抗マウス IgG とストレプトアビジン-HRP で 10 分反応させた。ペルオキシダーゼ反応は 3-3'-ジアミノベンジンで発現させ、ヘマトキシリンで対照染色を行った。すべての反応は室温で行った。

(4) RT-PCR

口腔扁平上皮癌細胞株 BHY 細胞および B88 細胞よりトライゾール(インビトロジェン, Carlsbad, CA)を用いて、全 RNA を採集した。2 μg に調整した全 RNA からスーパースクリプトⅡを用いて相補 DNA(cDNA)を調製した。cDNA の増幅は、Taq ポリメラーゼ(インビトロジェン)を用い、熱変性(95℃、40 秒間)、アニーリング(60℃、40 秒間)、伸長(72℃、1 分間)を 35 サイクルで行った。得られた PCR 産物を 1.5%アガロースゲルで電気泳動により分離し、エチジウムブロマイド染色後、UV 照射し、ポラロイドカメラで撮影した。本研究で用いたプライマーを以下に示す。

ヒト RANK 前 CATCCATGTACCAGTGAGAAG 後 CAAGGAAGGTACAGTTGGTC(増幅産物サイズ 441 bp) 、RANKL 前 TGGATCACAGCACATCAGAGCAG 後 ACTGGGGCTCAATCTATATCTCGAAC(増幅産物サイズ 558 bp)、OPG 前 GGGGACCACAATGAACAAGTTG 後 AGCTTGCACCACTCCAAATCC(増幅産物サイズ 409 bp)、GAPDH 前 TCAGACACCATGGGGAAGG 後 ACCACTGACACGTTGGCAGT(増幅産物サイズ 737 bp)。

(5) ウエスタンブロッティング

細胞を 6 ウェルプレートに播種し、RANKL(100 ng/ml)で刺激した後に、プロテアーゼ阻害剤を含む TNT バッファー(20 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 1% Triton X-100)を用いて可溶化した。BCA タンパク質測定キット(Pierce)でタンパク質濃度を測定後、各々のレーンに等量のタンパクを加え、SDS 電気泳動を行い、さらにタンク法によりタンパク質を PVDF メンブレン(ミリポア)に転写した。メンブレンへの非特異的結合を抑えるため 5 %スキムミルク含有 TBS-T バッファー(50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.1% Tween-20)でブロッキングを行った。抗リン酸化 IκBα抗体、抗リン酸化 ERK 抗体を 5 %BSA 含有 TBS-T バッファーで希釈し、抗 RANK 抗体、抗 p65 抗

体、抗 ERK 抗体、抗アクチン抗体を５％スキムミルク含有 TBS-T バッファーで希釈し、4℃で一晩反応させた。その後、TBS-T バッファーで洗浄後、HRP 標識２次抗体と反応させ、ECL(Amersham)により検出した。

(6) 核タンパクの調製

100 mm ディッシュに播種した B88 細胞をトリプシン・EDTA 処理し、プロテアーゼ阻害剤を含んだ NAR A バッファー[10 mM HEPES pH 7.9, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA]と１% NP-40 により細胞質画分を回収した。さらに、プロテアーゼ阻害剤を含んだ NAR C バッファー[20 mM HEPES pH 7.9, 0.4 M NaCl, 1 mM EDTA]により核画分を回収した。

(7) EMSA

放射線標識 DNA プローブとして用いた NF-κB、NF-Y 結合オリゴヌクレオチド配列はそれぞれ 5'-AGCTTGGGGACTTTCCGAG-3'と 5'-AGACCGTACGTGATTGGTTAAT-3'である。オリゴヌクレオチドは T4 ポリヌクレオチド・キナーゼにより[γ-^{32}P]ATP で標識し、エタノールで精製した(Guesdon, F. *et al.*, 1995) 。DNA 結合反応は室温で結合バッファー[10 mM Tris-HCl, pH 7.5; 1 mM EDTA; 4% グリセロール; 5 mM DTT; 100 μg/ml BSA]、3 μg poly(dI-dC)、1×10^5 cpm ^{32}P-標識プローブ、10 μg 核タンパクを含んだ 20 μl の総量で行った。15 分間反応後、サンプルを５%アクリルアミド/0.25×TBE ゲルにて電気泳動を行った。ゲルを乾燥し、IP プレート（フジフィルム，東京)もしくは X 線フィルムで一晩現像し、BAS2000 画像解析装置（フジフィルム)で解析した。

(8) 浸潤能の測定

フィブロネクチンコートしたメンブレン(ポアサイズ 8.0 μm)の改良ボイデンチャンバー法を用いた。200 μl の 1% FBS DMEM に懸濁した B88 細胞(3×10^5 個)を上層に、1 μg/ml の RANKL、OPG を添加した 700 μl の 1% FBS DMEM を下層に加えた。7 時間培養した後上面に残った細胞を拭い取り、下層に移動してきた細胞を 3.7% ホルマリンで固定後、メイヤー・ヘマトキシリンで染色した。結果はフィブロネクチンコートしたメンブレンを通過した細胞数を無作為に選択した 5 視野の平均で示した。

(9) B88 細胞の顎骨浸潤モデル

B88 細胞を 7 ~10 週齢の雄ヌードマウスの右側咬筋に移植した。B88 細胞移植 1 週間後から 2 日ごとに 5 μg/匹 OPG を腫瘍部に局所投与した。コントロールとして PBS を投与した。 B88 細胞移植後 21 日のマウスの体重及び腫瘍体積を測定した。具体的に、(腫瘍体積)＝$(a\times b^2)\times0.52$ [a: 腫瘍長径, b: 腫瘍短径]にて腫瘍体積を換算した。B88 細胞移植後 21 日及び 28 日の腫瘍周辺組織を摘出し、ホルマリン固定した。その後、EDTA により脱灰し、マウス頭部を上眼瞼外側で前頭断し薄切の基準面とした。脱水、パラフィン包埋、薄切をして HE 染色を行った。

結果

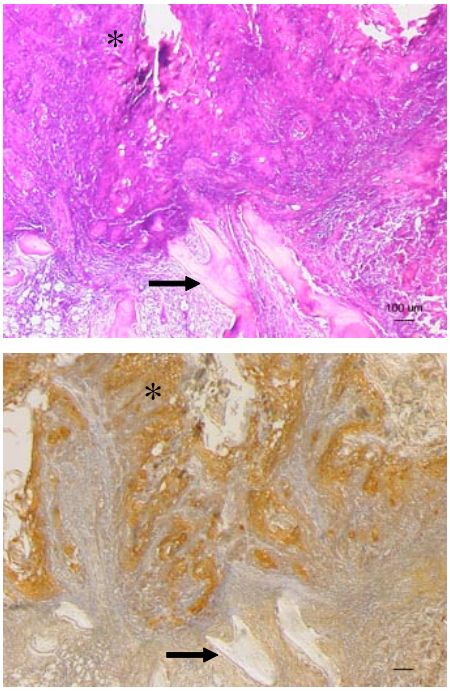
１　口腔扁平上皮癌組織およびヒト口腔扁平上皮癌細胞株における RANK 発現

まず、口腔扁平上皮癌患者より切除した癌および顎骨組織を用いて、抗 RANK 抗体による免疫染色を行い RANK の発現を検討した。その結果、口腔扁平上皮癌細胞は RANK を強く発現していた（図９A)。次に、ヌードマウスの咬筋部に移植すると顎骨浸潤を起こすことが知られているヒト口腔扁平上皮癌細胞株 BHY 細胞と B88 細胞を用いて RANK、RANKL および OPG mRNA の発現を RT-PCR 法により検討した。BHY 細胞および B88 細胞はともに RANK を発現しており、BHY 細胞は RANKL と OPG も発現していた（図９B)。さらに、BHY 細胞および B88 細胞における RANK のタンパク質レベルでの発現を抗 RANK 抗体を用いてウェスタンブロッティング法で検討したところ、BHY 細胞、B88 細胞はともに RANK を発現していた（図９C)。

(A)

H&E

αRANK

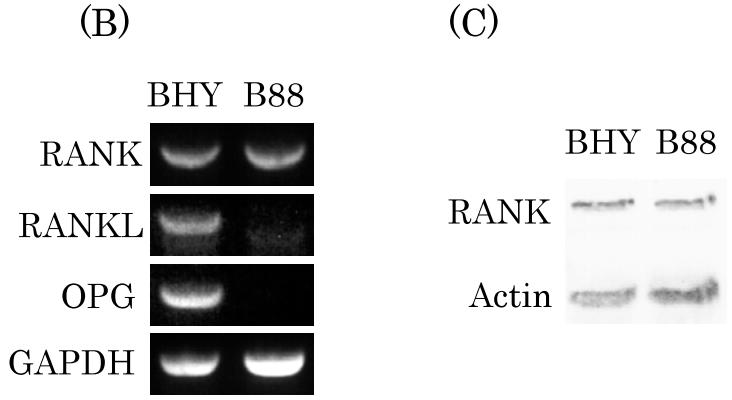


（図9） 口腔扁平上皮癌患者とヒト口腔扁平上皮癌細胞
におけるRANKの発現

(A) 口腔扁平上皮癌患者のRANKの発現

ヒト口腔扁平上皮癌患者の組織標本のHE染色及び抗RANK抗体を用いた免疫染色を行った。

スケールバー: 100 μm
→： 骨組織 ＊： 癌細胞



（図9） 口腔扁平上皮癌患者とヒト口腔扁平上皮癌細胞
におけるRANKの発現

(B) ヒト口腔扁平上皮癌細胞のRANKのmRNA発現

ヒト口腔扁平上皮癌細胞株BHY、B88細胞のRANK、RANKL、OPGおよびGAPDHの mRNA発現をRT-PCR法を用いて調べた。各細胞株から全RNAを抽出した後に、ランダム･プライマーにて逆転写反応を行った。相補DNAをそれぞれRANK、RANKL、OPG、GAPDH特異的プライマーによるPCR法を用いて検討した。

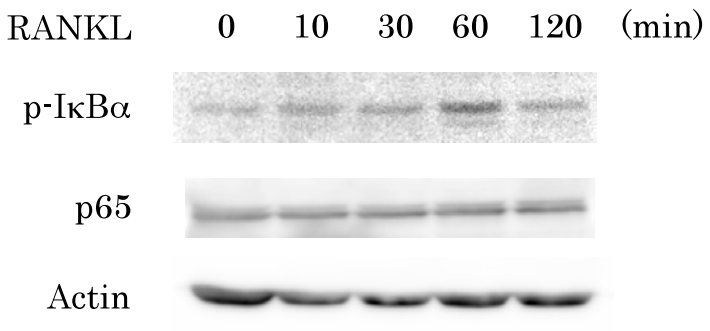
(C) ヒト口腔扁平上皮癌細胞のRANKタンパクの発現

ヒト口腔扁平上皮癌細胞株BHY、B88細胞のRANK発現をウエスタンブロッティングにて検討した。調製した細胞抽出物をSDS-PAGEした後に、PVDF膜に転写し、抗ヒトRANK抗体でブロットした。

２　RANKL 刺激によるヒトロ腔扁平上皮癌細胞 B88 細胞株の RANK 下流シグナルの活性化

RANKL は RANK に結合すると下流に存在する NF-κB や ERK シグナルを活性化する。NF-κB の代表的サブユニットの p65 は定常状態では IκBαと複合体を形成し、細胞質に留まっているが、細胞が外部から刺激を受けると IκB キナーゼが活性化され、IκBα がリン酸化される。さらに p65 と IκBαが解離すると p65 は核へ移行し、標的遺伝子のプロモーター領域に結合することで、標的遺伝子の転写を調節する。B88 細胞を 100 ng/ml RANKL で刺激すると、一過性に IκBαのリン酸化が亢進し、刺激後 60 分で最大となったが、p65 の発現量はほとんど変化しなかった（図 10A)。RANKL 刺激による NF-κB の DNA への結合能をゲルシフトアッセイによって検討したところ、その結合能が刺激後 5 分から亢進した(図 10B)。また、ERK のリン酸化も刺激後 10~60 分にわたり一過性に亢進した(図 10C)。以上の結果から，ヒトロ腔扁平上皮癌細胞が発現する RANK は機能的であり、RANK の下流の多様なシグナル伝達経路を活性化することがわかった。

(A)

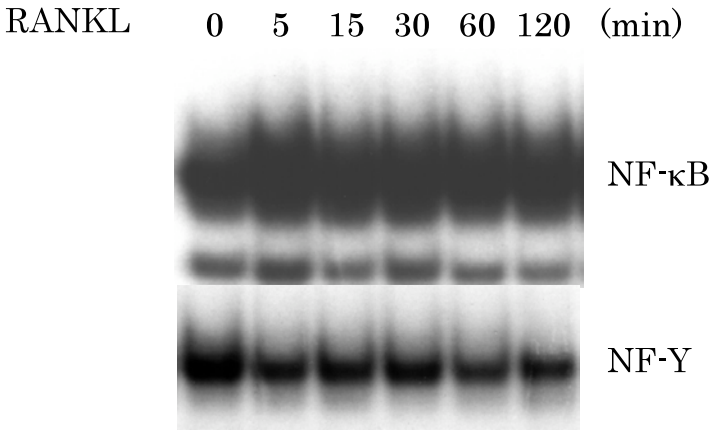


（図10）RANKLによるB88細胞におけるシグナル経路活性化の増強

(A) RANKL刺激によるB88細胞におけるNF-κBシグナルの活性化

ヒトロ腔扁平上皮癌細胞株B88細胞を100 ng/ml RANKLで経時的に刺激した。30 μgのたんぱく抽出物を10%SDS-PAGEで分離し、抗p-IκBα抗体、抗p65抗体でブロットした。アクチンをコントロールとした。
同じ実験を独立して3度行った。

(B)

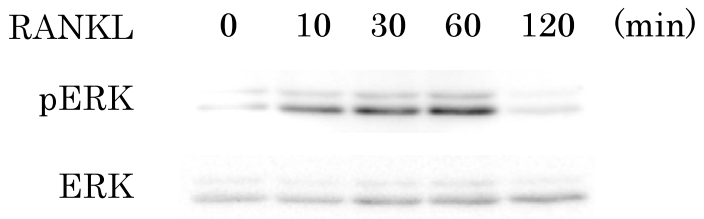


（図10）RANKLによるB88細胞におけるシグナル経路活性化の増強

(B) RANKL刺激によるNF-κBの転写結合部位への結合

ヒトロ腔扁平上皮癌細胞株B88細胞を100 ng/ml RANKLで経時的に刺激し、核画分を抽出した。[γ-^{32}P]ATP標識したNF-κB結合配列オリゴヌクレオチドと核タンパク質と反応させ、5%アクリルアミド/0.25×TBEゲルにて電気泳動を行った。NF-Yをコントロールとした。同じ実験を独立して3度行った。

(C)



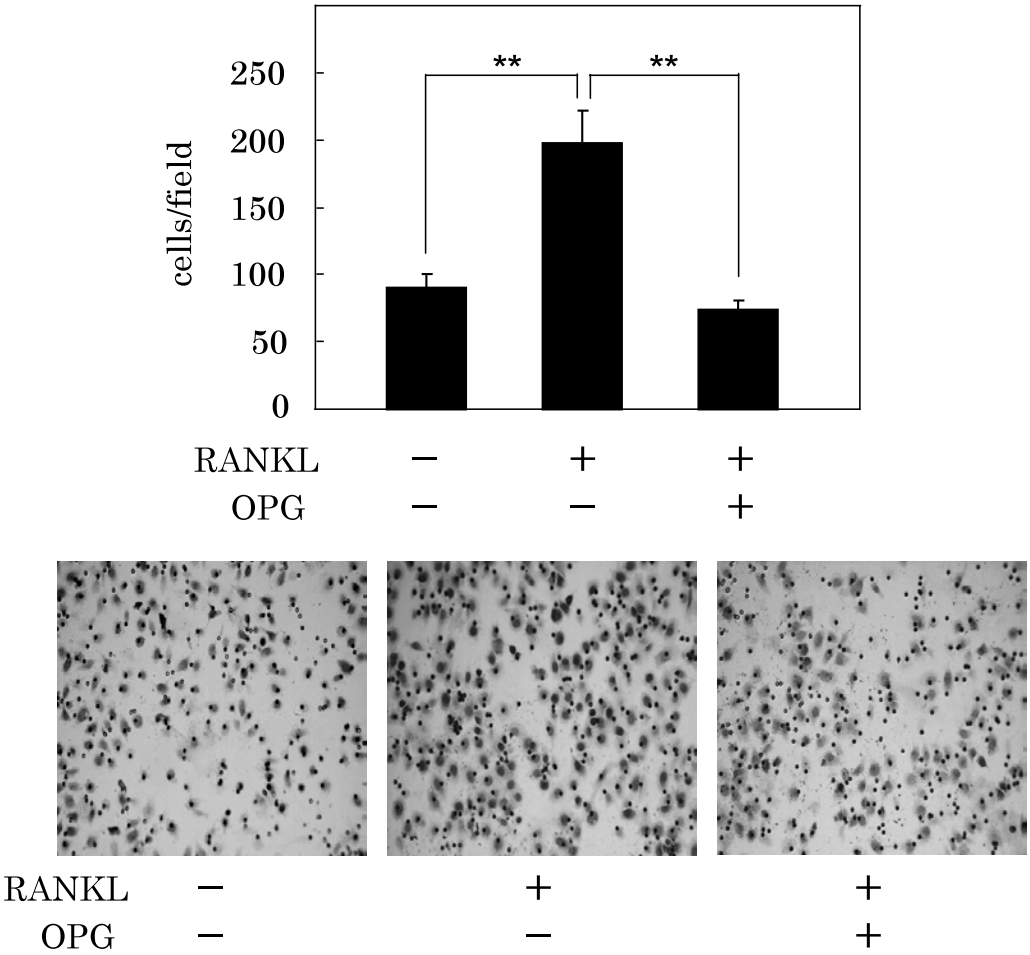
（図10）RANKLによるB88細胞におけるシグナル経路活性化の増強

(A) RANKL刺激によるB88細胞におけるERKシグナルの活性化

ヒトロ腔扁平上皮癌細胞株B88を100 ng/ml RANKLで経時的に刺激した。30 μgのたんぱく抽出物を10%SDS-PAGEで分離し、抗p-ERK抗体、抗ERK抗体でブロットした。
同じ実験を独立して3度行った。

３　RANKL 刺激によるヒトロ腔扁平上皮癌細胞株 B88 細胞遊走能の亢進

RANKL がヒトロ腔扁平上皮癌細胞の RANK 下流シグナルを活性化することから、癌細胞の何らかの機能を亢進する可能性を考えた。まず、B88 細胞を RANKL で刺激し、細胞増殖を検討したが、RANKL および OPG は B88 細胞の増殖に何ら影響をおよぼさなかった（データは示していない）。次に B88 細胞の *in vitro* での遊走能に及ぼす影響をボイデンチャンバーを用いて検討した。フィブロネクチンをコートしたボイデンチャンバーの上層に B88 細胞を播種し、下層に RANKL(100 ng/ml)を添加した。7 時間後にフィブロネクチンコートしたフィルターを通過して下層に移動した B88 細胞の数を計測したところ、RANKL により下層へ移動した B88 細胞数が増加した。しかし、下層に OPG を添加すると RANKL による細胞遊走促進作用は阻害された（図 11）。



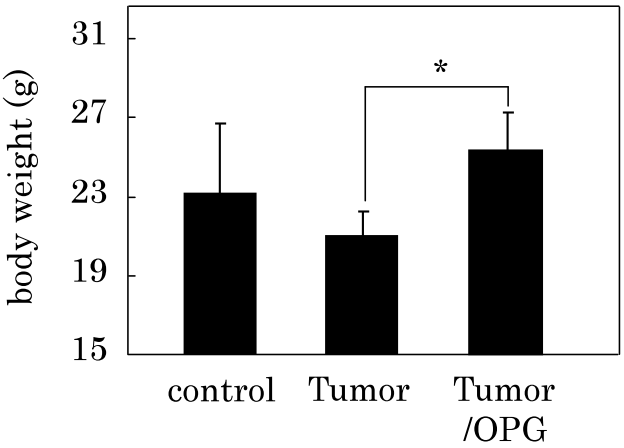
（図11）RANKLによるB88細胞遊走の促進

フィブロネクチンコートした8 μmポアサイズのメンブレンフィルターの上層にヒトロ腔扁平上皮癌細胞株B88細胞を播種し、下層に100 ng/ml RANKL、さらに下層にOPG存在、非存在下で7時間37℃置いた後、メンブレンフィルターの上面を綿棒で拭き取り、固定しヘマトキシリン染色を行った。任意の5 視野の細胞数を計測し平均した。
統計は、独立して行った3 回のデータの平均±標準偏差で表記しており、各々の統計学的有意差を示す(**p<0.01)。

４　OPG 投与によるヒトロ腔扁平上皮癌細胞株 B88 細胞の顎骨浸潤の抑制

ヒトロ腔扁平上皮癌細胞株 B88 細胞をヌードマウスの咬筋部に移植し、21 日後に体重を測定したところ、B88 細胞を移植したマウスは腫瘍を移植していないマウスと比較して体重が減少した。しかし、B88 細胞を移植しても OPG を投与した群では体重が減少しなかった（図 12A)。OPG を投与することで腫瘍の大きさが小さくなる傾向が認められたものの、有為差は認められなかった（図 12B)。

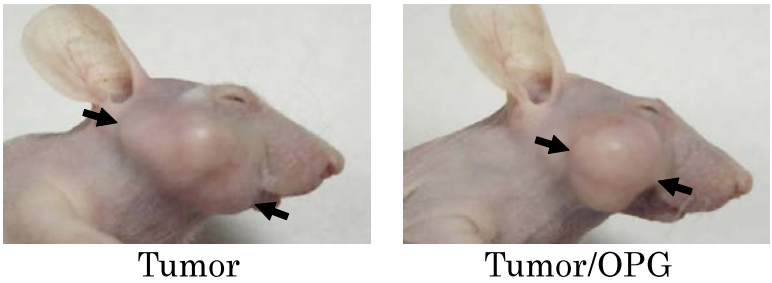
B88 細胞を移植したマウスでは移植していないマウスと比較して、下顎角部に反応性の骨形成と腫瘍が骨に浸潤した像が認められた（図 12C a,b,c)。骨吸収部位には多核の破骨細胞が認められた（図 12C d)。B88 細胞を移植したマウスに OPG を投与すると腫瘍は存在するものの、顎骨に浸潤した像は認められなかった（図 12C e)。OPG 投与により B88 細胞による顎骨浸潤が強力に抑制されるだけでなく（図 12C b,e)、OPG 投与群では、腫瘍と顎骨との距離が離れていた（図 12D)。また、OPG 投与群では宿主間葉系細胞が腫瘍を取り囲む像が観察され（図 12C f)、一部に腫瘍が壊死を起こしている像も認められた（図 12C g)。

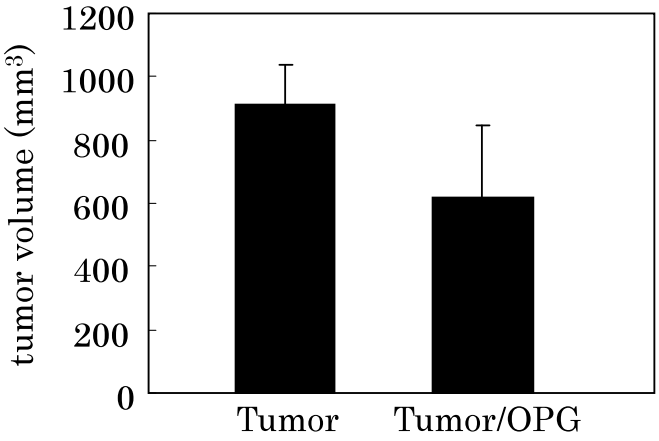


（図12） ヒトロ腔扁平上皮癌細胞株B88細胞のマウス移植モデルにおけるOPGの効果

（A） OPG投与によるB88細胞移植ヌードマウスの体重への影響

ヒトロ腔扁平上皮癌細胞株B88細胞をヌードマウスの咬筋部に移植し、5 μg/匹 OPGを2 日ごとに腫瘍部に局所投与した。コントロール群にはPBSを投与した。21 日後のマウスの体重を測定した。
各群3 匹の平均±標準偏差で表記しており、B88細胞移植マウスに対する統計学的有意差を示す(*p<0.05)。

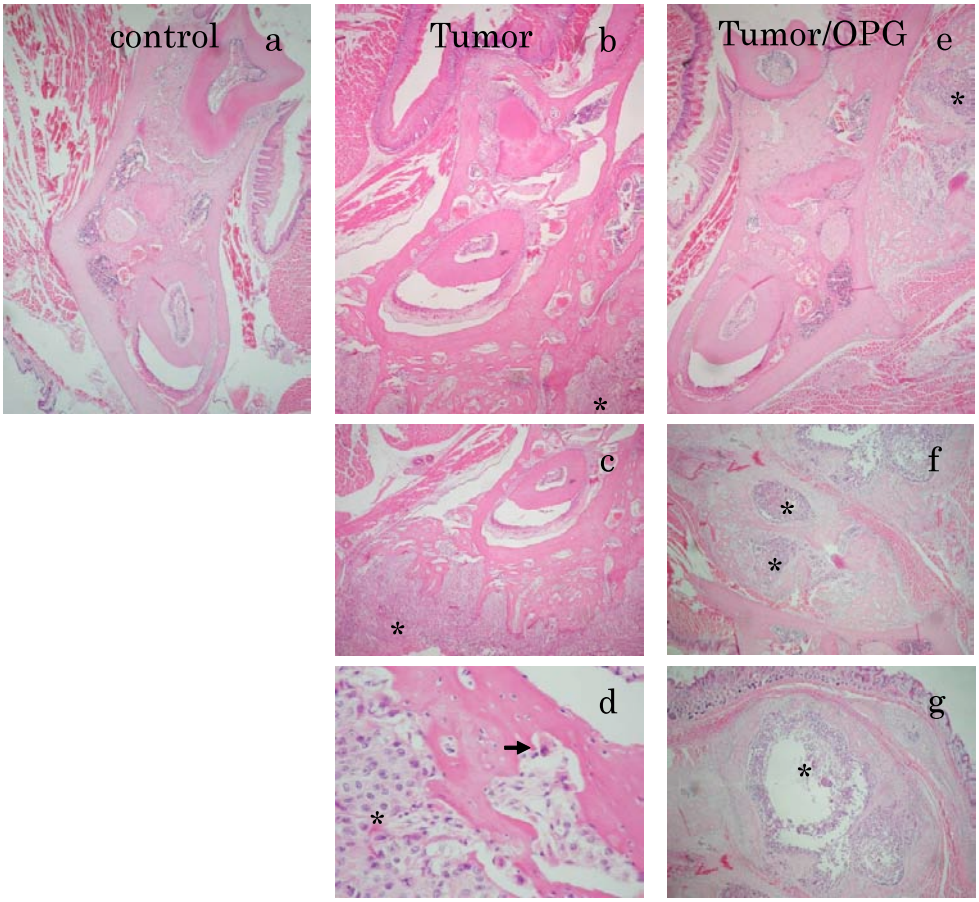




（図12） ヒトロ腔扁平上皮癌細胞株B88細胞のマウス移植モデルにおけるOPGの効果

(B) OPG投与によるB88腫瘍体積への影響

移植後21日の腫瘍体積を測定した。（腫瘍体積）＝（a×b^2）×0.52[a: 腫瘍長径、b: 腫瘍短径]にて腫瘍体積を求めた。
各群３匹の平均±標準偏差を表記する。



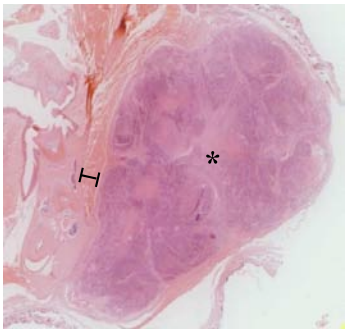
(図12) ヒトロ腔扁平上皮癌細胞株B88細胞のマウス移植モデルにおけるOPGの効果

(C) HE染色像における腫瘍周辺組織の詳細

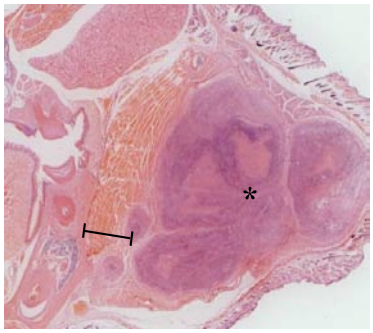
ヒトロ腔扁平上皮癌細胞株B88細胞を移植後28 日目の腫瘍周辺組織を摘出し、ホルマリン固定した。その後、EDTAにより脱灰し、HE染色を行った。

(a)健常側 (b-d) 腫瘍移植部 (e-g) OPG投与腫瘍移植部

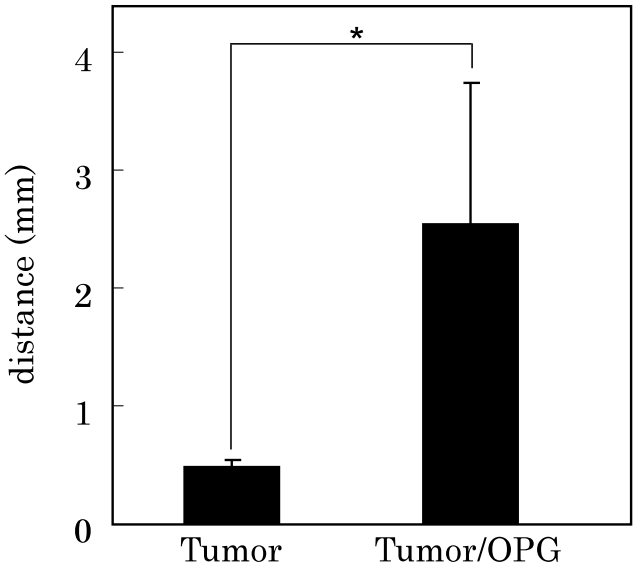
＊： 腫瘍部　　➔： 破骨細胞



Tumor



Tumor/OPG



(図12) ヒトロ腔扁平上皮癌細胞株B88細胞のマウス移植モデルにおけるOPGの効果

(D) OPGの腫瘍組織と下顎骨との位置への影響

腫瘍移植後21 日目の下顎骨外側と腫瘍組織の最短の距離を測定した。
各群3 匹の平均±標準偏差で表記しており、B88細胞移植マウスに対する統計学的有意差を示す(**p<0.05)。

＊ ： 腫瘍部

考察

骨は増殖因子に富む肥沃な環境であり、一般的に癌細胞が締着し、増殖するために都合の良い組織だと考えられている。骨を転移標的組織とする癌として、乳癌や多発性骨髄腫などが挙げられるが、乳癌では 65～75%、多発性骨髄腫では 95～100%の確率で骨に転移することが報告されている(Roodman, G.T. *et al.*, 2008) 。口腔癌の場合、頸部リンパ節転移の制御不能例や肺転移症例では比較的早期に患者が亡くなることが多いことや、また剖検で骨組織の解析がほとんど行われないために、骨転移の実態は不明な点が多い。口腔癌は癌細胞が直達性に顎骨に浸潤するのに対して、癌の骨転移では原発巣から骨に転移するまでに多くの転移ステップを経ていること、さらに特定の癌に骨転移が多発する点が大きく異なっている。口腔癌による顎骨浸潤の細胞および分子機構を解明する上で、単に癌細胞による骨転移のメカニズムと同じと考えるだけでは説明できない部分もあるが、RANKL-RANK システムが癌細胞の骨転移だけでなく、口腔癌の顎骨浸潤においても重要な役割を担っていることが示唆されている。これまで口腔扁平上皮癌細胞が直接破骨細胞を誘導するのではなく、宿主間質の OPG 発現を抑制することで破骨細胞形成を促進していること、また口腔扁平上皮癌が破骨細胞の多核化、延命効果や骨吸収能を促進する作用があることが報告されている(Tada, T. *et al.*, 2005, Tada, T. *et al.*, 2008) 。さらに重要なことは、口腔扁平上皮癌細胞のこれらの作用が、OPG を添加することでほぼ抑制されることから、OPG を投与することで口腔癌による顎骨浸潤を抑制できる可能性を考え、口腔癌による顎骨浸潤の動物モデルを作製し、OPG の効果を検討した。

近年、様々な癌細胞が RANK を発現していることが報告され、RANKL-RANK システムが単に破骨細胞形成に重要なだけでなく、癌細胞自身の機能を制御している可能性が示唆されている(Jones, D.H., *et al.*, 2006)。今回我々が検討した口腔扁平上皮癌患者の腫瘍組織は RANK を発現しており、さらにヒト口腔扁平上皮癌細胞株 BHY 細胞と B88

細胞は RANK を発現し、これらの細胞を RANKL で刺激すると RANK の下流シグナルである NF-κB や ERK の活性化が認められた。これらの結果は RANKL が口腔扁平上皮癌の何らかの機能を調節している可能性を示唆する。我々は RANKL が RANK を発現している口腔扁平上皮癌細胞の遊走能を亢進すること、さらにこの作用が OPG を添加することで抑制されることを示したが、これらの結果は他の RANK を発現している乳癌細胞や多発性骨髄腫でも同様の報告がされており(Jones, D.H., *et al.*, 2006)、RANKL の１つの作用として、癌細胞の遊走能を促進することが考えられる。

ヌードマウスの咬筋にヒト口腔扁平上皮癌細胞 B88 細胞を移植すると腫瘍の増大に伴って顎骨に腫瘍細胞が浸潤する。B88 細胞を移植した１週間後から OPG を２日ごとに局所投与することで、B88 細胞の顎骨浸潤が抑制された。OPG が顎骨浸潤を抑制する理由として以下の３つが考えられる。まず OPG が RANKL による癌細胞の遊走能の促進を抑制することであり、B88 細胞を移植したマウスでは腫瘍細胞が骨に接している組織像が見られるのに対して、OPG 投与群では腫瘍細胞が骨から離れた位置に存在していた。つまり OPG 投与は、癌細胞の遊走を阻害する可能性が考えられる。次に B88 細胞移植群では腫瘍に誘導されて破骨細胞が出現したが、OPG を投与群では破骨細胞はほとんど見られなかったことから、OPG が破骨細胞形成と骨吸収の活性化を抑制することで、癌細胞が浸潤するスペースを確保できないことが考えられる。もう１つは OPG が癌細胞の増殖や細胞死を引き起こすことである。B88 細胞移植群では対照群と比較して体重の減少が認められたが、OPG 投与群では対照群とほぼ同等の体重を示していた。しかし、OPG を投与することで腫瘍の大きさが小さくなる傾向が認められたものの、有為差は認められなかった。さらに組織切片上では、腫瘍が宿主の間質細胞に囲まれた像や、一部では腫瘍が壊死を起こしている像も認められたが、B88 細胞に RANKL、OPG または RANKL と OPG の両方を添加しても B88 細胞の増殖や細胞死は誘導されなかったことから(データは示さない)、OPG が癌細胞に直接作用するのでは

なく、宿主間質細胞に作用し癌細胞を取り囲むことで間接的に癌細胞の増殖を抑制し、細胞死を引き起こすことが示唆される。B88 細胞によるマウス顎骨浸潤は腫瘍反応性に新生する骨を破壊する点が、ヒトロ腔扁平上皮癌の顎骨浸潤様式とは異なっており、今後のさらなる顎骨浸潤の解析のためには、改良した新しい動物モデルの確立が必要であると考える。

OPG は癌の骨転移や骨粗鬆症の治療薬として治験が進んでおり、多発性骨髄腫や骨転移を伴う乳癌患者においても治療の第 1 相臨床試験がすでに開始されている(Body, J.J. *et al.*, 2003）。破骨細胞を標的とした骨吸収阻害剤としてビスフォスフォネートが用いられているが、近年ビスフォスフォネートを服用している患者に歯科治療を要因とした顎骨壊死が起こる可能性が高いことが報告され、深刻な問題となっている(Pogrel, M.A., 2004, Dannemann, C. *et al.,* 2007, Allen, M.R. *et al.,* 2008）。OPG を骨吸収阻害剤として応用するには、タンパク製剤である故の品質管理の困難さとコスト面が問題となってくるが、これまでの研究報告ではヒトへの一回投与による副作用は報告されていない(Bekker, P.J. *et al.*, 2001）。また、これまでの骨転移の治療薬として OPG を全身投与しているのに対して、口腔扁平上皮癌の顎骨浸潤の治療薬として用いる場合、局所投与を行うことが可能であることから、全身投与の場合と比較して副作用の可能性は低いと考えられる。さらに、宿主の細胞を介して癌細胞の増殖や細胞死を引き起こす可能性もあることから、副作用の少ない抗癌剤としての応用の可能性も期待できる。

結論として、RANKL は口腔扁平上皮癌が発現する RANK を介して癌細胞の遊走能を亢進することや、破骨細胞を誘導することで、癌細胞の顎骨への浸潤を促進することが考えられるが、OPG は RANKL-RANK システムを阻害することで口腔扁平上皮癌による顎骨浸潤を抑制する可能性が考えられる。以上の結果より、OPG の口腔扁平上皮癌顎骨浸潤の治療薬としての応用が期待される。

総括

第１章

１．カテプシン E を発現した安定性発現株 ALVA101/hCE はヌードマウスの皮下に移植すると、腫瘍の成長率は ALVA101/mock 細胞による腫瘍より有意に遅延した。*in vitro* の細胞増殖率は導入細胞株間で顕著な差は認められなかった。

２．ALVA101/hCE 細胞のヌードマウスからの腫瘍抽出物で ALVA101/mock 細胞の腫瘍と比較して IL-12 p40/p70 と MIG の発現レベルが顕著に上昇し、TIMP-1 と PF の発現レベルが減少していた。

３.血清中と腫瘍抽出物中のエンドスタチンの発現レベルは ALVA101/hCE 細胞を移植したヌードマウス腫瘍抽出物で ALVA101/mock 細胞の腫瘍と比較して高かった。

４．カテプシン E は *in vitro* において効率よく NC1 から 22-kDa のエンドスタチン様フラグメントを切り出した。カテプシン D、L も NC1 からエンドスタチン様フラグメントを切り出すが、その効率はカテプシン E よりも低かった。カテプシン B、H はエンドスタチン様フラグメントをほとんどもしくは全く産生しなかった。

５．カテプシン E、D は血管内皮細胞の管腔形成を阻害した。なお、カテプシン L、B、H はほとんど管腔形成を阻害しなかった。カテプシン E、D がカテプシン L、B、H と比較し効率よく血管内皮細胞の管腔を破壊した。

６．*in vitro* における ALVA101/hCE 細胞へのマクロファージの走化反応は、MCP-1 非存在下で ALVA101/mock 細胞と比較して増強された。MCP-1 存在下においても

ALVA101/CE 細胞へのマクロファージの走化反応が増強された。

第２章

１．口腔扁平上皮癌組織及び、ヒト口腔扁平上皮癌細胞株は RANK を発現していた。

２．RANKL 刺激により口腔扁平上皮癌細胞の NF-κB シグナルの活性化と ERK シグナルの活性化が亢進した。

３．RANKL 刺激により口腔扁平上皮癌細胞の細胞遊走能が亢進し、OPG によりその作用は阻害された。

４．口腔扁平上皮癌細胞株 B88 細胞をヌードマウスの咬筋部に移植すると、腫瘍を持たないマウスと比較して体重が減少するが、OPG を投与した群では体重が減少しなかった。

５． OPG の投与により口腔扁平上皮癌細胞株 B88 細胞による顎骨浸潤が強力に抑制された。

謝辞

本研究は、九州大学大学院歯学研究院・口腔常態制御学講座口腔機能分子科学分野 山本健二教授の御指導のもとに行われたものであり、先生の御懇篤な御指導と御助言に深く感謝致します。また、本研究を進めるにあたり終始御援助いただきました九州歯科大学生命科学講座分子情報生化学分野 自見英治郎教授、長崎大学大学院医歯薬総合研究科口腔病態薬理学分野 筑波隆幸教授、九州大学大学院歯学研究院・口腔常態制御学講座口腔機能分子科学分野 門脇知子助教、九州歯科大学生命科学講座分子情報生化学分野 福島秀文助教に深謝致します。本研究に対し多大なるご協力を賜りました第一薬科大学生理化学教室 岡本美子助教、Center for Craninofacial Molecular Biology, University of Southern California 岩田淳一博士、山口大学大学院医学系研究科医化学分野 瀧井良祐助教、九州大学大学院薬学研究院創薬科学部門プロテアーゼ疾患制御学分野 川久保友世特任助教に感謝致します。併せて本研究を行うにあたり、様々な御助言と御協力を戴きました九州大学大学院歯学研究院・口腔常態制御学講座口腔機能分子科学分野の諸先生ならびに九州歯科大学生命科学講座分子情報生化学分野の諸先生方には深く感謝致しますとともに厚く御礼申し上げます。また、本研究を行うにあたり、岩垂育英会の奨学援助を頂戴したことを感謝致します。最後に研究を陰ながら支えてくれた家族に感謝致します。

引用文献

1. Allen, M.R., Burr, D.B. (2008) Mandible matrix necrosis in beagle dogs after 3 years of daily oral bisphosphonate treatment. J. Oral Maxillofac. Surg. 66,987-994

2. Azuma, T., Pals, G., Mohandas, T.K., Couvreur, J.M., and Taggart, R.T. (1989). Human gastric cathepsin E. Predicted sequence, localization to chromosome 1, and sequence homology with other aspartic proteinases. J. Biol. Chem. 264, 16748-16753.

3. Bekker, P.J., Holloway ,D., Nakanishi, A., Arrighi, M., Leese, P.T., Dunstan, C.R. (2001). The effect of a single dose of osteoprotegerin in postmenopausal women. J. Bone Miner. Res. *16*,348-360.

4. Bennett, K, Levine T, Ellis JS, Peanasky, R.J., Samloff, I.M., Kay, J., and Chain, B.M. (1992). Antigen processing for presentation by class II major histocompatibility complex requires cleavage by cathepsin E. Eur. J. Immunol. *22,* 1519-24.

5. Body, J.J., Greipp, P., Coleman, R.E., Facon, T., Geurs, F., Fermand, J.P., Harousseau, J.L., Lipton, A., Mariette, X., Williams, C.D., Nakanishi, A., Holloway, D., Martin, S.W., Dunstan, C.R., Bekker, P.J. (2003). A phase I study of AMGN-0007, a recombinant osteoprotegerin construct, in patients with

multiple myeloma or breast carcinoma related bone metastases. Cancer *97*,887-892.

6. Boyle, W.J., Simonet, W.S., Lacey, D.L. (2003). Osteoclast differentiation and activation. Nature *423*,337-342.

7. Bucay, N., Sarosi, I., Dunstan, C.R., Morony, S., Tarpley, J., Capparelli, C., Scully, S., Tan, H.L., Xu, W., Lacey, D.L., Boyle, W.J., Simonet, W.S. (1998). osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. Genes Dev. *12*,1260-1268.

8. Chain, B.M., P. Free, P. Medd, C. Swetman, A.B. Tabor, and N. Terrazzini. (2005). The expression and function of cathepsin E in dendritic cells. J. Immunol. *174,* 1791-1800.

9. Dahnabal, M., Ramachandran, R., Volk, R., Stillman, I.E., Lombardo, M., Iruela-Arispe, M.L., Simons, M., and Sukhatme, V.P. (1999). Endostatin: yeast production, mutants, and antitumor effect in renal cell carcinoma. Cancer Res. *59,* 189-197.

10. Dannemann, C., Gratz, K.W., Riener, M.O., Zwahlen, R.A. (2007) Jaw osteonecrosis related to bisphosphonate therapy: a severe secondary disorder. Bone *40*,828-834

11. Dhanabal, M., Ramchandran, R., Waterman, M.J.F., Lu, H., Knebelmann, B., Segal, M., and Sukhatme, V.P. (1999). Endostatin induces endothelial cell apoptosis. J. Biol. Chem. *274,* 11721-11726.

12. Felbor, U., Dreier, L., Bryant, R.A.R., Ploegh, H.L., Olsen, B.R., and Mothes, W. (2000). Secreted cathepsin L generates endostatin from collagen XVIII. EMBO. J. *19,* 1187-1194.

13. Ferreras, M., Felbor, U., Lenhard, T., Olsen, B.R., and Delaisse, J. (2000). Generation and degradation of human endostatin proteins by various proteinases. FEBS Lett. *486,* 247-251.

14. Folkman, J. (1989). What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? J. Natl. Cancer Inst. *82,* 4-6.

15. Gerweck, L.E., Rhee, J.G., Koutcher, J.A., Song, C.W., and Urato, M. (1991). Reglation of pH in murine tumor and muscle. Radiat. Res. *126,* 206-209.

16. Grant, D.S., Lelkes, P.I., Fukuda, K., and Kleinman, H.K. (1991). Intracellular mechanisms involved in basement membrane induced blood vessel differentiation in vitro. In Vitro Cell. Dev. Biol. *27A,* 327-336.

17. Griffith, T.S., Wiley, S.R., Kubin, M.Z., Sedger, L.M., Maliszewski, C.R., and Fanger, N.A. (1999). Monocyte-mediated tumoricidal activity via the tumor

necrosis factor-related cytokine, TRAIL. J. Exp. Med. *189,* 1343–53.

18. Guesdon, F., Ikebe, T., Stylianou, E., Warwick-Davies, J., Haskill, S., Saklatvala, J. (1995). Interleukin 1-induced phosphorylation of MAD3, the major inhibitor of nuclear factor kappa B of HeLa cells. Interference in signalling by the proteinase inhibitors 3,4-dichloroisocoumarin and tosylphenylalanyl chloromethylketone. Biochem. J. *307* (Pt 1):287-295.

19. Herbeuval, J-P., Lambert, C., Sabido, O., Cottier, M., Fournel, P., Dy, M., and Genin, C. (2003). Macrophages from cancer patients: analysis of TRAIL, TRAIL receptors, and colon tumor cell apoptosis. J. Natl. Cancer Inst. *95,* 611-621.

20. Hicks, W.L. Jr., Loree, T.R., Garcia, R.I., Maamoun, S., Marshall, D., Orner, J.B., Bakamjian, V.Y., Shedd, D.P. (1997). Squamous cell carcinoma of the floor of mouth: a 20-year review. Head Neck *19*,400-405.

21. Holen, I., Croucher, P.I., Hamdy, F.C., and Eaton, C.L. (2002). Osteoprotegerin (OPG) is a survival factor for human prostate cancer cells. Cancer Res. *62,* 1619–1623.

22. Jones, D.H., Nakashima, T., Sanchez, O.H., Kozieradzki, I., Komarova, S.V., Sarosi, I., Morony, S., Rubin, E., Sarao, R., Hojilla, C.V., Komnenovic, V., Kong, Y.Y., Schreiber, M., Dixon, S.J., Sims, S.M., Khokha, R., Wada, T., Penninger, J.M. (2006). Regulation of cancer cell migration and bone metastasis by RANKL. Nature *440*,692-696.

23. Jordan, R.C., Daley, T. (1997). Oral squamous cell carcinoma: new insights. J. Can. Dent. Assoc. *63*,517-8, 521-5.

24. Kawakubo, T., Okamoto, K., Iwata, J., Shin, M., Okamoto, Y., Yasukochi, A., Nakayama, K.I., Kadowaki, T., Tsukuba, T., Yamamoto, K. (2007). Cathepsin E prevents tumor growth and metastasis by catalyzing the proteolytic release of soluble TRAIL from tumor cell surface. Cancer Res. *67*, 10869-10878

25. Kim, K.J., Li, B., Winer, J., Armanini, M., Gillett, N., Phillips, H.S., and Ferrara, M. (1993). Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumor growth in vivo. Nature *362,* 841-844.

26. Kong, Y.Y., Yoshida, H., Sarosi, I., Tan, H.L., Timms, E., Capparelli, C., Morony, S., Oliveira-dos-Santos, A.J., Van, G., Itie, A., Khoo, W., Wakeham, A., Dunstan, C.R., Lacey, D.L., Mak, T.W., Boyle, W.J., Penninger, J.M. (1999). OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. Nature *397*,315-323.

27. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature *227*, 680-685.

28. Millauer, B., Shawver, L.K., Plate, K.H., Risau, W., and Ullrich, A. (1994). Glioblastoma growth inhibited in vivo by a dominant-negative Flk-1 mutant. Nature *367,* 576-579.

29. Naama, H.A., Mack, V.E., Smyth, G.P., Stapleton, P.P., and Daly, J.M. (2001). Macrophage effector mechanisms in melanoma in an experimental study. Arch. Surg. *136,* 804-809.

30. Nakanishi, H., Tsukuba, T., Kondou, T., Tanaka, T., and Yamamoto, K. (1993). Transient forebrain ischemia induces increased expression and specific localization of cathepsins E and D in rat hippocampus and neostriatum. Exp. Neurol. *121,* 215-223.

31. Nakashima, T., Wada, T., Penninger, J.M. (2003). RANKL and RANK as novel therapeutic targets for arthritis. Curr. Opin. Rheumatol. *15,*280-287.

32. Nishioku, T., Hashimoto, K., Yamashita, K., Liou, S.Y., Kagamiishi, Y., Maegawa, H., Katsube, N. , Peters, C., von Figura, K., Saftig, P., Katsunuma, N., Yamamoto, K., and Nakanishi, H. (2002). Involvement of cathepsin E in exogenous antigen processing in primary cultured murine microglia. J. Biol. Chem. 277, 4816-4822.

33. Nishishita, K., Sakai, H., Sakai, E., Kato, Y., and Yamamoto, K. (1996). Age-related and dexamethasone-induced changes in cathepsins E and D in rat thymic and spleen cells. Arch. Biochem. Biophys. *333,* 349-358.

34. Nomura, T., and Katsunuma, N. (2005). Involvement of cathepsins in the invasion, metastasis and proliferation of cancer. J. Med. Invest. *52,* 1–9.

35. Oh, S.P., Warman, M.L., seldin, M.F., Cheng, S.D., Knoll, J.H.M., Timmons, S., and Olsen, B.R. (1994). Cloning of cDNA and genomic DNA encoding human type XVIII collagen and localization of the α1 (XVIII) collagen gene to mouse chromosome 10 and human chromosome 21. Genomics *19,* 494-499.

36. Oh, S.P., Yamagata, Y., Muragaki, Y., Timmons, S., Ooshima, A., and Olsen, B.R. (1991). Isolation and sequencing of cDNA for proteins with multiple domains of Gly-Xaa-Yaa repeats identify a distinct family of collagenous proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *91,* 4229-4233.

37. O'Reilly, M.S., Boehm, T., Shing, Y., Fukai, N., Vasios, G., Lane, W.S., Flynn, E., Birkhead, J.R., Olsen, B.R., and Folkman, J. (1997). Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. Cell, *88*, 277-285.

38. O'Reilly, M.S., Holmgren, L., Chen, C.C., and Folkman, J. (1996). Angiostatin induces and sustains dormancy of human primary tumors in mice. Nat. Med. *2,* 689-692.

39. Overall, C.M., and Kleifeld, O. (2006). Tumour microenvironment-opinion: validating matrix metalloproteinases as drug targets and anti-targets for cancer therapy. Nat. Rev. Cancer *6,* 227-239.

40. Pogrel, M.A. (2004). Bisphosphonates and bone necrosis. J. Oral Maxillofac. Surg. *62,*391-392.

41. Roodman, G.D., Dougall, W.C. (2008). RANK ligand as a therapeutic target for bone metastases and multiple myeloma. Cancer Treat. Rev. *34,*92-101.

42. Sakai, H., Saku, T., Kato, Y., and Yamamoto, K. (1989). Quantitation and immunohistochemical localization of cathepsin E and D in rat tissues and blood cells. Biochim. Biophys. Acta *991,* 367–375.

43. Sasaki, T., Fukai, K.M., Mann, K., Gohring, W., Olsen, B.R., and Timpl, R. (1998). Structure, function and tissue form of the C-terminal globular domain of collagen XVIII containing the angiogenesis inhibitor endostatin. EMBO J. *17,* 4249-4256.

44. Sastradipura, D. F., Nakanishi, H., Tsukuba, T., Nishishita, K., Sakai, H., Kato, Y., Gotow, T., Uchiyama, Y., and Yamamoto, K. (1998). Identification of cellular compartments involved in processing of cathepsin E in primary cultures of rat microglia. J. Neurochem. *70,* 2045–2056.

45. Sealy, L., Mota, F., Rayment, N., Tatnell, P., Kay, J., and Chain, B. (1996). Regulation of cathepsin E expression during human B cell differentiation in vitro. Eur. J. Immunol. *26,* 1838-1843.

46. Standker, L., Schrader, M., Kanse, S.M., Jurgens, M., Forssmann, W., and Preissner, K.T. (1997). Isolation and characterization of the circulating form of human endostatin. FEBS Lett. *420,* 129-133.

47. Strand, S., Vollmer, P., Abeelen, L., Gottfried, D., Alla, V., Heid, H., Kuball, J., Theobald, M., Galle, P.R., and Strand, D. (2004). Cleavage of CD95 by matrix metalloproteinase-7 induces apoptosis resistance in tumour cells. Oncogene, *23,* 3732–3736.

48. Suda, T., Takahashi, N., Udagawa, N., Jimi, E., Gillespie, M.T., Martin, T.J. (1999). Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. Endocr. Rev. *20,*345-357.

49. Tada, T., Jimi, E., Okamoto, M., Ozeki, S., Okabe, K. (2005). Oral squamous cell carcinoma cells induce osteoclast differentiation by suppression of osteoprotegerin expression in osteoblasts. Int. J. Cancer *116,*253-262.

50. Tada, T., Shin, M., Fukushima, H., Okabe, K., Ozeki, S., Okamoto, M., Jimi, E. (2008). Oral squamous cell carcinoma cells modulate osteoclast function by RANKL-dependent and -independent mechanisms. Cancer Lett. 2008 Oct 16.

51. Tannock, I., and Rotin, D. (1989). Acid pH in tumors and its potential for therapeutic exploitation. Cancer Res. *49,* 4373-4384.

52. Tominaga, K., Nakanishi, H., Yasuda, Y., and Yamamoto, K. (1998). Excitotoxin-induced neuronal death is associated with response of a unique intracellular aspartic proteinase, cathepsin E. J. Neurochem. 71, 2574-2584.

53. Towbin, H., Steahelin, T., and Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. *76*, 4350-4354.

54. Tsukuba, T., Okamoto, K.. Okamoto, Y., Yanagawa, M., Kohmura, K., Yasuda, Y., Uchi, H. Nakahara, T., Furue, M., Nakayama, K., Kadowaki, T., Yamamoto, K., and Nakayama, K.I. (2003). Association of cathepsin E deficiency with development of atopic dermatitis. J Biochem. *134,* 893-902.

55. Tsukuba, T., Yamamoto, S., Yanagawa, M., Okamoto, K., Okamoto, Y., Nakayama, K.I., Kadowaki, T., and Yamamoto, K. (2006). Cathepsin E-deficient mice show increased susceptibility to bacterial infection associated with the decreased expression of multiple cell surface Toll-like receptors. J. Biochem. *140,* 57-66.

56. van Bokhoven, A., Varella-Garcia, M., Korch, C., Johannes, W.U., Smith, E.E., Miller, H.L., Nordeen, S.K., Miller, G.J., and Lucia, M.S. (2003). Molecular characterization of human prostate carcinoma cell lines. Prostate *57,* 205-225.

57. van Ravenswaay, C.H.H., Kluin, P.M., and Fleuren, G.J. (1992). Tumor infiltrating cells in human cancer. On the possible role of CD16+ macrophages in antitumor cytotoxicity. Lab. Invest. *67,* 166-174.

58. Varney, M.L., Olsen, K.J., Mosley, R.L., Bucana, C.D., Talmadge, J.E., and Singh, R.K. (2002). Monocyte/macrophage recruitment, activation and differentiation modulate interleukin-8 production: a paracrine role of tumor-associated macrophages in tumor angiogenesis. In Vivo *16,* 471-477.

59. Wike-Hooley, J., Haveman, J., and Reinhold, H.S. (1984). The relevance of tumor pH in the treatment of malignant disease. Radiother. Oncol. *2,* 342-366.

60. Wong, R.J., Keel, S.B., Glynn, R.J., Varvares, M.A. (2000). Histological pattern of mandibular invasion by oral squamous cell carcinoma. Laryngoscope *110*,65-72.

61. Yamaguchi, N., Anand-Apte, B., Lee, M., Sasaki, T., Fukai, N., Shapiro, R., Que, I., Lowik, C., Timpl, R., and Olsen, B.R. (1999). Endostatin inhibits VEGF-induced endothelial cell migration and tumor growth independently of zinc binding. EMBO J. *18,* 4414-4423.

62. Yanagawa, M., Tsukuba, T., Okamoto, K., Takii, R., Terada, Y., Kadowaki, T., and Yamamoto, K. (2006). Up-regulation, enhanced maturation, and secretion of cathepsin E in mouse macrophages treated with interferon-γ or lipopolysaccharide. J. Oral. Biosci. *48*, 218-225.

63. Yanagawa, M., Tsukuba, T., Nishioku, T., Okamoto, Y., Okamoto, K., Takii, R., Terada, Y., Nakayama, K.I., Kadowaki, T., and Yamamoto, K. (2007). Cathepsin E deficiency induces a novel form of lysosomal storage disorder showing the accumulation of lysosomal sialoglycoproteins and the elevation of lysosomal pH in macrophages. J. Biol. Chem. *282,* 1851-1862.

64. Yasuda, Y., Kohmura, K., Kadowaki, T., Takayuki, T., and Yamamoto, K. (2005). A new selective substrate for cathepsin E based on the cleavage site sequence of α2-macroglobulin. Biol. Chem. *386,* 299-305.