癌の転移モデル

特集 癌の転移制圧のための DDS

高 倉 喜 信*

Tumor metastasis models

Tumor metastasis involves multiple processes such as angiogenesis, invasion, cell adhesion, extravasation, cell growth etc. In order to develop the drug delivery systems aiming at overcoming tumor metastasis, it is necessary to evaluate the delivery systems employing appropriate experimental models which can mimic tumor metastasis in the body. The models are classified into two categories, i. e., *in vitro* and *in vivo* models in which, in general, cell culture systems and experimental animals are used, respectively. *In vitro* models are useful for the analysis of individual metastasis process at cellular level. On the other hand, overall metastasis can be assessed in *in vivo* models at whole body level. In this review, both *in vitro* and *in vivo* experimental metastasis models are reviewed. Finally, some approaches for preventing tumor metastasis using these experimental models are also discussed.

Yoshinobu Takakura*

key words : metastasis, experimental model, drug delivery system, targeting

「転移を制するものは癌を制す」とも言われるように、転移性悪性腫瘍の克服は難しく、癌治療における最大かつ最後の問題と考えられている。薬物体内動態の時間的、空間的制御を目的とする DDS はこうした癌の転移を制圧するための有用な方法論となる可能性をもつと考えられる。

癌の転移は図 1 に示すように多段階からなる複雑なプロセスが進行することによって成立する¹⁾。したがって、癌転移制圧のための DDS 的方策を構築するには、実験的に転移現象を再現した転移モデルの確立が不可欠であり、これまでさまざまな系が作製されてきた。これらは、培養細胞などを用いて転移の各プロセスを個別に細胞レベルで評価することを目的としたモデルとマウスの系を中心とした実験動物を用いた転移モデルの二つに大別される。ここでは、これらの転移実験モデルの概略を述べるとともに、これらモデルを用いて転移克服の試みを評価した事例を紹介する。なお、癌転移メカニズムや治療法に関する最近の進歩^{2~4)}や実際の転移モデルを用いた実験方法⁵⁾については成書を参照されたい。

細胞レベルでの転移モデル

図 1 に示した多段階プロセスのうちの一つに焦点を当て、癌細胞の転移を培養細胞などを用いて細胞レベルで検討する種々のモデルが開発されている。

1. 細胞接着の評価モデル

細胞の接着性は転移におけるもっとも重要な因子の一つである。癌細胞は原発巣から標的組織で転移巣を形成するまでさまざまな細胞、生体成分との接着と脱着を繰り返しながら生体内を移動する。

(1) 癌細胞間接着

転移の最初のステップである原発巣から癌細胞が遊離する際には癌細胞間の接着分子が大きな役割を果たしていることが明らかになっており、もっとも重要な分子の一つとしてカドヘリンがあげられる⁶⁾。カドヘリンは、多数の分子種が同定されており大きなファミリーを形成していることが知られている。この分子群のもっとも特徴的な性質はカルシウム依存性の強固な接着で、カルシウム存在下ではトリプシン処理しても細胞間接着が起こる。これを利用してカドヘリンの活性を測定することができ

* Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University
京都大学大学院薬学研究科

図 1 転移のプロセス

臨床的に問題となる転移層が形成されるためには、癌細胞はこれら一連のプロセスを経ることが必要である。すなわち、① 原発巣における悪性腫瘍の発生、② 血管新生(neovascularization)、③ リンパ系や血管系への浸潤(invasion)、④ 細胞凝集および血栓形成(embolism)と遠隔臓器の毛細血管床による捕捉、⑤ 血管内皮細胞への接着(adherence)、⑥ 血管外漏出(extravasation)、⑦ 微小環境への適応とそこでの腫瘍増殖など多段階のプロセスを経て転移(metastasis)は成立する(文献1より引用)。

る⁷⁾。

(2) 細胞外マトリクスへの接着

転移プロセスにおいてつぎに必要な細胞接着としては、癌細胞が浸潤を開始する際に起こす基底膜などの細胞外マトリクスへの接着があげられる。細胞外マトリクスの主要構成成分としては、コラーゲン、ラミニン、フィブロネクチン、プロテオグリカンなどがあげられ、癌細胞に発現しているインテグリンとよばれるレセプターを介して接着が起こる。この細胞接着は単に物理的に両者を接触させるだけではなく、細胞増殖や分化などさまざまな細胞機能の調節を引き起こすことが知られている⁸⁾。これらの物質をあらかじめコートした培養プレートを用いて、癌細胞の接着の程度や細胞増殖など接着に伴う生物反応が評価できる⁹⁾。

(3) 血管内皮細胞への接着

血行性転移が成立するためのもっとも重要なプロセスの一つは血流中を移動してきた癌細胞が血管内

皮細胞に接着するステップである。古くから癌細胞の血管内皮細胞への接着性と転移能との間には相関があることが知られている¹⁰⁾。代表的な機構としては、癌細胞上に存在するシアリル Lewis X とよばれる糖鎖リガンドと血管内皮細胞上の E-セ렉チンとの結合により媒介される接着があげられる¹¹⁾。あらかじめ血管内皮細胞(たとえばヒト臍帯静脈血管内皮細胞)などを培養しておき、のちにアイソトープや蛍光物質で標識した癌細胞を添加し、接着した癌細胞の割合を測定することにより定量的評価が可能である¹²⁾。

(4) 血小板への接着

古くから特定の癌細胞が血小板凝集能を有し、転移形成過程とりわけ標的臓器への着床において重要な役割を果たすことが知られている¹³⁾。この場合にも、癌細胞と血小板の浮遊液を調製し、両者を混合することにより接着を評価する。

図 2 ケモインベーション法の操作概要(文献5より引用)

2. 血管新生の評価モデル

腫瘍の血管新生は、腫瘍が大きくなるための栄養・酸素の運搬や癌細胞の浸潤・転移などと密接に関連することが知られ、近年その分子メカニズムの解明が進められている。その進展に伴い、癌治療の新たな分子標的として注目されている³⁾。血管新生の現象は、癌細胞に由来する何らかの誘導因子が宿主の血管に直接あるいは間接的に作用することが引き金となり、その結果血管内皮細胞が遊走、増殖、管腔形成といった素反応を連続して起こすことにより成立するカスケード反応であると理解されている。

(1) 角膜法およびCAM(chick embryo chorioallantoic membrane)法

角膜法は、ウサギの角膜を利用する *in vivo* 評価法である。麻酔下、角膜に癌細胞の培養上清や血管新生に影響を及ぼす可能性のある薬物を入れたディスク(メチルセルロース、エチレン/酢酸ビニル共重合体などで)と癌細胞を同時に移植し、誘導されてくる新生血管の有無と程度を評価する¹⁴⁾。CAM 法は、同様の血管新生の評価を鶏受精卵を用いて行う実験方法である¹⁵⁾。

(2) 背部皮下法

これも *in vivo* 評価法であり、マウスやラットの背部皮下に小さなチャンバーを移植して行う方法で

ある¹⁶⁾。チャンバーは半透膜のフィルターで覆われており、内部に癌細胞を注入した後、皮下に埋め込む。チャンバーのうえの皮膚を剝離し、チャンバー内に誘導されてくる新生血管の分布の様子を観察するが、画像解析による定量的な評価も可能である。

(3) 管腔形成

培養した血管内皮細胞を用いる *in vitro* での血管新生の評価モデルで、増殖した血管内皮細胞がチューブ状の構造をとる現象を指標にしたものである。血管内皮細胞と癌細胞を co-culture する系で癌細胞由来の管腔形成を促進する因子などを検討したり、培養液中に管腔形成に影響を及ぼす薬物などを添加した系での評価が行われる¹⁷⁾。

3. 浸潤能の評価モデル

血管新生とともに、現在転移のプロセスのなかで治療の標的としてもっとも注目されているのが癌細胞の浸潤過程である。特にこの過程に重要な役割を果たしていることが明らかとされている matrix metalloproteinase(MMP)に関する研究の進展や MMP 阻害剤の開発研究において、癌細胞の浸潤能を評価する実験モデルは必要不可欠の系となっている。

(1) ケモインベーション法

癌細胞の浸潤能を評価系としてもっとも汎用され

図3 メラノーマ細胞と血管内皮細胞を用いた重層培養法

まず、マトリゲルをコートしたカバーガラス上で血管内皮細胞を播種し、3時間後に $\text{TNF-}\alpha$ で刺激を与える。メラノーマ細胞を添加し、適当な時間経過後細胞を観察する。メラノーマ細胞が内皮細胞層を透過するさまざまな段階を観察することができる(文献19より引用)。

ている方法で、Transwellなどの半透膜フィルターを装着したチャンバーを利用して行う(図2)。マトリゲルとよばれる腫瘍由来の細胞外マトリクスをフィルター(pore size $8\mu\text{m}$)にコートし、走化性物質(ケモアトラクタント)存在下、上部のコンパートメントに添加した癌細胞がマトリゲルを通過して下部のコンパートメントに到達する現象を解析する方法である¹⁸⁾。細胞をあらかじめ放射線標識しておくことで浸潤した細胞の割合が定量的に評価できる。

(2) 重層培養法

ケモインベージョン法は、細胞外マトリクスへの癌細胞の浸潤をモデル化したものであるが、実際の浸潤においては宿主細胞のバリアーを乗り越える必要がある。これをモデル化したのが、二種類の細胞を重ねて培養する本法である。宿主細胞としては血管内皮細胞¹⁹⁾や腸間膜由来の中皮細胞²⁰⁾などが用い

られるが、あらかじめこれらの細胞を培養下後、癌細胞を重層培養する(図3)。この系を用いて、癌細胞が宿主細胞層とどのように相互作用し、浸潤するかが評価できる。

(3) コラーゲンゲル法

本モデルは、コラーゲンゲルのなかに正常繊維芽細胞を組み込んだ基質を用いる *in vitro* 実験系である²¹⁾。浸潤能の低い細胞の評価も可能であるという特徴を有する。

その他のモデルとしては、培養細胞の代わりに実験動物から摘出した組織片を用いる方法も考案されている。

4. 運動能の評価モデル

癌細胞の運動能は浸潤過程において重要な因子であり、運動能と転移能の間には相関があることが知

られている²²⁾。

(1) ケモタキシス測定法

化学物質刺激下での細胞の運動には方向性に関係ない固有運動能(ケモキネシス chemokinesis)と方向性を有する運動(ケモタキシス chemotaxis)などに分類される。一般に癌細胞や周囲組織から産生される種々の物質による刺激によるケモタキシスと考えられている。ケモタキシスを引き起こす物質を走化性因子というがさまざまな増殖因子やサイトカインがこうした作用を有することが知られている。実験には、ケモインベージョン法の項で紹介した Transwell などを用い、フィルターを透過する癌細胞の数を測定し、運動能を評価する²³⁾。

(2) 金コロイド法

カバーガラス上に金コロイドを付着させ、そのうえで癌細胞を培養する。一定時間経過後、個々の細胞によって形成された運動軌跡が金コロイド粒子の欠損した部位として見られるので、これを顕微鏡により観察する方法である²⁴⁾。

5. その他の細胞レベルでのモデル

このほか、スフェロイド(multicellular spheroids)とよばれる癌細胞の集合体を用いられることもある²⁵⁾。これは微小転移を起こした病巣のモデルと考えられており、3次元で転移巣の種々の性質を解析する系として有用である。

実験動物を用いた転移モデル

実験動物を用いた転移モデルは、① 尾静脈や門脈などに癌細胞を注入する経脈管転移モデルと ② 臓器に癌細胞を注入し他臓器に転移を作製する自然転移モデルの二つに大別される。実際の転移を克服するための方策を、全身レベルで評価するのに適している。

1. 経脈管転移モデル

癌転移の主要ルートの一つである血行性転移は、すでに述べたように複雑な過程の集約のうえに成り立っている。本モデルは、原発巣を離脱した癌細胞が血管内に侵入するまでの過程をスキップし、それ

以降の過程を人工的に評価するための系であり、実験の簡便さ、再現性の高さ、評価期間の短さなどの利点を有する。

(1) 経尾静脈モデル

癌細胞を静脈内に注射するというもっとも簡単な方法である。Fidler らのグループが本法を用いてマウス B 16 メラノーマの高肺転移クローン株の作製に成功した歴史的な実験²⁶⁾以来、今日に至るまで広く用いられている。肺転移モデルがもっとも典型的な例であり、B 16-BL 6 メラノーマ細胞や Colon 26 M.3.1 結腸癌細胞などを注入することにより、肺に選択的に転移巣が形成される^{27,28)}。一定期間後、マウスをと殺し摘出した肺を固定後、転移結節数を計測する。L 5178-ML 25 リンパ腫細胞、M 5076 細網肉腫細胞を用いた場合には、肝臓および脾臓への転移モデルを作製することも可能である^{29,30)}。

(2) 経脾モデルおよび門脈内モデル

癌細胞を静脈内に投与してもほとんどが最初の通過臓器である肺に転移巣を形成するため、肝転移モデルを作製するために脾臓内あるいは門脈内に癌細胞を注入する方法が用いられる^{31,32)}。脾臓内に注入された癌細胞は脾静脈から門脈を経由して肝臓に到達し、そこで腫瘍を形成する。

2. 自然転移モデル

経脈管転移モデルにおいては、大量の癌細胞(通常は $10^4 \sim 10^5$ 個)が瞬時に血行性に投与されること、転移プロセスの前半が省略されている点において、生体内で実際に起こる転移とは大きく異なっている。以下に紹介するモデルはより自然に近いモデルとして開発されたものである。

(1) 皮下移植による転移モデル

鼠径部、背部、foot pad などの部位に癌細胞を皮下接種すると、その部位(原発巣)で腫瘍増殖が起こるとともに、血行性、リンパ行性に転移が起こり、肺やリンパ節に転移巣が形成されることが知られている。この場合には、用いる癌細胞の選択に注意を払うことが必要である^{33,34)}。また、L 1210 や P 388 などの白血病細胞を foot pad に移植した系は、リンパ節転移モデルとして利用されている^{35,36)}。

(2) 同所性移植による転移モデル

上記の皮下移植の系は、大腸癌など内臓由来の癌細胞に対してはその癌細胞が本来発生した臓器とは異なる皮下組織という部位に移植されたことを意味し、これを異所性移植という。これに対して、同所性移植はもともとの癌細胞の由来組織に移植することをさし、本モデルはこの方法に基づいて転移を評価する系として位置付けられる。Fidler らのグループにより、ヒト大腸癌細胞の高転移クローンをヌードマウスの盲腸に移植することにより、皮下移植の系では得られなかった肝転移が起こることがはじめて報告された³⁷⁾。このほか、胃癌、膵癌、膀胱癌、前立腺癌などさまざまな種類のヒトの癌に対しても、同所性移植による転移モデルが検討されている³⁸⁾。

転移モデルを用いた転移制圧アプローチの評価

以上、細胞レベルおよび実験動物を用いた転移モデルを解説した。以下にこれらのモデルを利用して、転移制圧アプローチを評価した例を、DDS 開発に関するものを中心に紹介する。

1. リンパ節転移モデルを用いた評価

微粒子や高分子は局所投与した場合には、サイズが大きいため血行性には吸収されず透過性の高い毛细リンパ管を介して吸収され、所属リンパ節に高濃度に移行する。この現象を利用すれば、微粒子や高分子キャリアを用いた抗癌剤のリンパ節選択的デリバリーが可能であり、リンパ節転移制圧のための有用なアプローチと考えられる。これまで、癌細胞の皮下投与後に形成されるリンパ節転移モデルを用いて、抗癌剤メルファラン³⁹⁾あるいはアドリアマイシン⁴⁰⁾を封入したりポソームが、またマイトマイシン C をデキストランに共有結合させた高分子プロドラッグ⁴¹⁾がすぐれたリンパ節転移抑制効果を示すことが報告されている。抗癌剤を含有したエマルションに関しても、より臨床に近い転移モデル系で評価が行われ有用性が示されている^{42,43)}。

2. 肺転移モデルを用いた評価

転移形成に重要な役割を果たしている細胞接着分

子フィブロネクチンの接着コア配列 Arg-Gly-Asp (RGD) を含むペプチドはインテグリンを介する細胞接着を阻害することで、転移抑制活性をもっていることが知られている。しかしながら、このペプチドは低分子であり *in vivo* では体内から速やかに消失してしまうため十分な効果は期待できない。これを改善する目的で高分子化修飾が試みられている。RGD 配列を繰り返し単位にもつポリペプチド poly (RGD)⁴⁴⁾やポリエチレングリコールと RGD ペプチドとの結合体⁴⁵⁾が開発され、B 16-BL 6 メラノーマの肺転移モデルを用いた実験においてすぐれた転移防止効果が得られている。一方、RGD ペプチドをセラミドに結合させた形でリポソームに組み込んだ DDS が同じく B 16-BL 6 の肺転移モデルで転移を阻害することが示されている⁴⁶⁾。

近年、さまざまな癌転移の分子機構が解明されつつあるが、その一つとして癌転移が成立する一連のプロセスにおいて種々の活性酸素種 (reactive oxygen species: ROS) が関与することが明らかになっている。Takenaga らは、スーパーオキシドアニオンを不均化する酵素 superoxide dismutase (SOD) をレシチン化し細胞膜親和性を高めた誘導体を開発し、これを静脈内投与することにより、Meth A-H 細胞の肺転移モデルにおいて、すぐれた転移抑制効果が得られることを報告している⁴⁷⁾。これは、肺転移を促進する作用を有する ROS をレシチン化 SOD が効率よく消去したためと推察している。一方、筆者らは過酸化水素分解酵素 catalase に種々の化学修飾を施した誘導体を開発し、これらが体内動態を細胞レベルで精密に制御できる種々のターゲティング型 DDS として有用であることを明らかにしている⁴⁸⁾。

これらの誘導体の効果を colon 26 結腸癌細胞の静脈内投与により作製した肺転移モデルを用いて評価した結果、ポリエチレングリコール修飾体の静脈内投与および未修飾体の皮下投与が有意に転移を抑制し、体内滞留性の改善が有効であることを見いだした⁴⁹⁾。癌細胞は自ら過酸化水素を産生し、これが浸潤に重要な役割を果たす MMP の発現を誘導することが知られており、catalase の作用機序としてこのプロセスを阻害することが考えられる。

3. 肝転移モデルを用いた評価

つぎに筆者らは、colon 26 結腸癌細胞を門脈内に投与することにより作製した肝転移モデルを用いて各 catalase 誘導体の効果を評価した。その結果、ガラクトース修飾を施し肝臓の実質細胞に発現しているアシアロ糖タンパク質レセプターを介して標的細胞内に効率よくターゲティングされるよう設計されている誘導体がすぐれた肝転移抑制効果を示すことが判明し、有用な DDS となる可能性が示された⁴⁹⁾。

最近、 α -ガラクトシルセラミドというカイメンより単離された抗腫瘍活性物質をリード化合物として開発された物質が、樹状細胞上の CD1d を介して新しく発見されたリンパ球サブセットである NKT 細胞に提示され活性化を促すというユニークなメカニズムを介して抗腫瘍効果を示すことが明らかにされている。この化合物は、B16 や colon 26 をはじめとする種々の肝転移モデルにおいて、著名な効果を示すことが報告されている。脂溶性化合物であるため、主に DMSO 溶液や界面活性剤を添加した形で腹腔内に投与する方法でこうした転移モデル実験が行われているが⁵⁰⁻⁵²⁾、DDS を適用することでさらなる効果の改善が期待できるかもしれない。

血管内皮増殖因子 vascular endothelial growth factor (VEGF) は血管新生において中心的な役割を果たしており、転移制圧の戦略において重要な標的として最近注目を集めている。Pavco らは、LLC-HM 細胞および KM12L4a 細胞の肝転移モデルの系で VEGF レセプターの mRNA に対するリボザイムが転移を有意に抑制することを示した⁵³⁾。この実験では、リボザイムは皮下に埋め込まれた浸透圧ポンプにより持続的に放出されるよう工夫している。一方、さまざまな転移モデルの系を用いて、可溶性の VEGF レセプターの遺伝子を発現させることにより VEGF の作用を減弱させる遺伝子治療の試みも行われているが⁵⁴⁻⁵⁶⁾、今後 DDS 技術の導入により発展が期待される。

文 献

- 1) Fidler IJ, Ellis LM : The implications of angiogenesis for the biology and therapy of cancer metastasis. *Cell* 79(2) : 185-188, 1994.
- 2) 癌転移のメカニズムと癌治療, 実験医学(増刊), Vol. 16-No.

- 16, 1998.
- 3) 特集 血管新生病としての癌一病態と治療, *Molecular Medicine*, Vol. 37, No. 3, 2000.
- 4) 特集 がんの浸潤と転移, 最新医学, 第 59 巻/第 9 号, 2000.
- 5) がんの浸潤・転移研究マニュアル, がん転移研究会編, 金芳堂, 1995.
- 6) Takeichi M : Cadherins in cancer : implications for invasion and metastasis. *Curr Opin Cell Biol* 5(5) : 806-811, 1993.
- 7) Aono S, Nakagawa S, Reynolds AB, Takeichi M : p120(ctn) acts as an inhibitory regulator of cadherin function in colon carcinoma cells. *J Cell Biol* 145(3) : 551-562, 1999.
- 8) Saiki I : Cell adhesion molecules and cancer metastasis. *Jpn J Pharmacol* 75(3) : 215-242, 1997.
- 9) Gilcrease MZ, Niehans G : Adhesion of aspirated tumor cells to extracellular matrix proteins : a new methodology utilizing fine-needle aspiration. *Cancer* 90(2) : 102-110, 2000.
- 10) Nicolson GL : Cancer metastasis : tumor cell and host organ properties important in metastasis to specific secondary sites. *Biochim Biophys Acta* 948(2) : 175-224, 1988.
- 11) Kannagi R : Carbohydrate-mediated cell adhesion involved in hematogenous metastasis of cancer. *Glycoconj J* 14(5) : 577-584, 1997.
- 12) Imamura T, Nakamori S, Matsushita Y, Taniuchi Y, Todoroki N, Tsuji T, Izumi Y, Kawamura Y, Hoff SD, Cleary KR et al. : Colorectal cancer metastasis determined by carbohydrate-mediated cell adhesion : role of sialyl-LeX antigens. *Semin Cancer Biol* 4(5) : 319-324, 1993.
- 13) Hejna M, Raderer M, Zielinski CC : Inhibition of metastases by anticoagulants. *J Natl Cancer Inst* 91(1) : 22-36, 1999.
- 14) Uchida M, Tsuboi H, Yamaji T, Murata N, Kohno T, Sugino E, Hibino S, Shimamura M, Oikawa T : Inhibition by 9 α -fluoromethylpregnen-20-one acetate (FMPA) against mammary carcinoma induced by dimethylbenz[a]anthracene in rats and angiogenesis in the rabbit cornea-comparison with medroxyprogesterone acetate (MPA). *Cancer Lett* 154(1) : 63-69, 2000.
- 15) Uchida S, Watanabe G, Shimada Y, Maeda M, Kawabe A, Mori A, Arai S, Uehata M, Kishimoto T, Oikawa T, Imamura M : The suppression of small GTPase rho signal transduction pathway inhibits angiogenesis *in vitro* and *in vivo*. *Biochem Biophys Res Commun* 269(2) : 633-640, 2000.
- 16) Nakamura M, Katsuki Y, Shibutani Y, Oikawa T : Dienogest, a synthetic steroid, suppresses both embryonic and tumor-cell-induced angiogenesis. *Eur J Pharmacol* 386(1) : 33-40, 1999.
- 17) Somlyo AV, Bradshaw D, Ramos S, Murphy C, Myers CE, Somlyo AP : Rho-kinase inhibitor retards migration and *in vivo* dissemination of human prostate cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 269(3) : 652-659, 2000.
- 18) Albin A : Tumor and endothelial cell invasion of basement membranes. The matrigel chemoinvasion assay as a tool for dissecting molecular mechanisms. *Pathol Oncol Res* 4(3) : 230-241, 1998.
- 19) Voura EB, Sandig M, Siu CH : Cell-cell interactions during transendothelial migration of tumor cells. *Microsc Res Tech* 43(3) : 265-275, 1998.
- 20) Mukai M, Nakamura H, Tatsuta M, Iwasaki T, Togawa A, Imamura F, Akedo H : Hepatoma cell migration through a mesothelial cell monolayer is inhibited by cyclic AMP-elevating agents via a rho-dependent pathway.

- FEBS Lett 484(2) : 69-73, 2000.
- 21) Nishimura K, Kitamura M, Miura H, Nonomura N, Takada S, Takahara S, Matsumoto K, Nakamura T, Matsumiya K : Prostate stromal cell-derived hepatocyte growth factor induces invasion of prostate cancer cell line DU145 through tumor-stromal interaction. *Prostate* 41(3) : 145-153, 1999.
 - 22) Wells A : Tumor invasion : role of growth factor-induced cell motility. *Adv Cancer Res* 78 : 31-101, 2000.
 - 23) Kamiyama T, Une Y, Uchino J, Hamada J : Hepatocyte growth factor enhances the invasion activity of human hepatocellular carcinoma cell lines. *Int J Oncol* 12(3) : 655-659, 1998.
 - 24) Murata K, Kameyama M, Fukui F, Ohigashi H, Hiratsuka M, Sasaki Y, Kabuto T, Mukai M, Mammoto T, Akedo H, Ishikawa O, Imaoka S : Phosphodiesterase type III inhibitor, cilostazol, inhibits colon cancer cell motility. *Clin Exp Metastasis* 17(6) : 525-530, 1999.
 - 25) Hamilton G : Multicellular spheroids as an *in vitro* tumor model. *Cancer Lett* 131(1) : 29-34, 1998.
 - 26) Poste G, Doll J, Hart IR, Fidler IJ : *In vitro* selection of murine B16 melanoma variants with enhanced tissue-invasive properties. *Cancer Res* 40(5) : 1636-1644, 1980.
 - 27) Shi Q, Xiong Q, Wang B, Le X, Khan NA, Xie K : Influence of nitric oxide synthase II gene disruption on tumor growth and metastasis. *Cancer Res* 60(10) : 2579-2583, 2000.
 - 28) Fujii H, Nishikawa N, Komazawa H, Orikasa A, Ono M, Itoh I, Murata J, Azuma I, Saiki I : Inhibition of tumor invasion and metastasis by peptidic mimetics of Arg-Gly Asp(RGD) derived from the cell recognition site of fibronectin. *Oncol Res* 8(9) : 333-342, 1996.
 - 29) Matsumoto Y, Saiki I, Makabe T, Yoneda J, Murata J, Kimizuka F, Ishizaki Y, Kato I, Azuma I : Inhibitory effect of antimetastatic fusion polypeptide of human fibronectin on tumor cell adhesion to extracellular matrices. *Jpn J Cancer Res* 82(10) : 1130-1138, 1991.
 - 30) Hart IR, Talmadge JE, Fidler IJ : Metastatic behavior of a murine reticulum cell sarcoma exhibiting organ-specific growth. *Cancer Res* 41(4) : 1281-1287, 1981.
 - 31) Ohnishi Y, Fujii H, Murakami K, Sakamoto T, Tsukada K, Fujimaki M, Kojima M, Saiki I : A new pseudo-peptide analogue of the Arg-Gly-Asp(RGD) sequence inhibits liver metastasis of colon 26-L5 carcinoma cells. *Cancer Lett* 124(2) : 157-163, 1998.
 - 32) Harada N, Mizoi T, Kinouchi M, Hoshi K, Ishii S, Shiiba K, Sasaki I, Matsuno S : Introduction of antisense CD 44 S CDNA down-regulates expression of overall CD 44 isoforms and inhibits tumor growth and metastasis in highly metastatic colon carcinoma cells. *Int J Cancer* 91(1) : 67-75, 2001.
 - 33) Takeda K, Fujii H, Nitta Y, Sakihara H, Nakayama K, Rikiishi H, Kumagai K : Murine tumor cells metastasizing selectively in the liver : ability to produce hepatocyte-activating cytokines interleukin-1 and/or-6. *Jpn J Cancer Res* 82(11) : 1299-1308, 1991.
 - 34) Tsuruo T, Naganuma K, Yamori T, Kawabata H, Oh-Hara T, Iida H, Tsukagoshi S, Sakurai Y : Spontaneous metastasis of highly metastatic variants of mouse tumors and the effect of drugs on the metastasis. *Gann* 75(6) : 557-563, 1984.
 - 35) Tsuruo T, Naganuma K, Iida H, Yamori T, Tsukagoshi S, Sakurai Y : Inhibition of lymph node metastasis of P 388 leukemia by bestatin in mice. *J Antibiot(Tokyo)* 34(9) : 1206-1209, 1981.
 - 36) Tsuruo T, Naganuma K, Iida H, Tsukagoshi S : Lymph node metastasis and effects of 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine, 5-fluorouracil, and their lipophilic derivatives in an experimental model system using P 388 leukemia. *Cancer Res* 40(12) : 4758-4763, 1980.
 - 37) Morikawa K, Walker SM, Jessup JM, Fidler IJ : *In vivo* selection of highly metastatic cells from surgical specimens of different primary human colon carcinomas implanted into nude mice. *Cancer Res* 48(7) : 1943-1948, 1988.
 - 38) Hoffman RM : Orthotopic metastatic mouse models for anticancer drug discovery and evaluation : a bridge to the clinic. *Invest New Drugs* 17(4) : 343-359, 1999.
 - 39) Khato J, Priester ER, Sieber SM : Enhanced lymph node uptake of melphalan following liposomal entrapment and effects on lymph node metastasis in rats. *Cancer Treat Rep* 66(3) : 517-527, 1982.
 - 40) Konno H, Tadakuma T, Kumai K, Takahashi T, Ishibiki K, Abe O, Sakaguchi S : The antitumor effects of adriamycin entrapped in liposomes on lymph node metastases. *Jpn J Surg* 20(4) : 424-428, 1990.
 - 41) Takakura Y, Matsumoto S, Hashida M, Sezaki H : Enhanced lymphatic delivery of mitomycin C conjugated with dextran. *Cancer Res* 44(6) : 2505-2510, 1984.
 - 42) Takahashi T : Emulsion and activated carbon in cancer chemotherapy. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 2(3) : 245-274, 1986.
 - 43) Tanigawa N, Satomura K, Hikasa Y, Hashida M, Muranishi S, Sezaki H : Surgical chemotherapy against lymph node metastases : an experimental study. *Surgery* 87(2) : 147-152, 1980.
 - 44) Saiki I, Murata J, Matsuno K, Ogawa R, Nishi N, Tokura S, Azuma I : Anti-metastatic and anti-invasive effects of polymeric Arg-Gly-Asp(RGD) peptide, poly(RGD), and its analogues. *Jpn J Cancer Res* 81(6-7) : 660-667, 1990.
 - 45) Maeda M, Izuno Y, Kawasaki K, Kaneda Y, Mu Y, Tsutsumi Y, Nakagawa S, Mayumi T : Amino acids and peptides. XXX. Preparation of Arg-Gly-Asp(RGD) hybrids with poly(ethylene glycol)analogs and their antimetastatic effect. *Chem Pharm Bull(Tokyo)* 45(11) : 1788-1792, 1997.
 - 46) Saiki I, Koike C, Obata A, Fujii H, Murata J, Kiso M, Hasegawa A, Komazawa H, Tsukada H, Azuma I, Okada S, Oku N : Functional role of sialyl Lewis X and fibronectin-derived RGDS peptide analogue on tumor-cell arrest in lungs followed by extravasation. *Int J Cancer* 65(6) : 833-839, 1996.
 - 47) Takenaga M, Igarashi R, Ochiai A, Mizushima Y : Effect of lecithinized superoxide dismutase(PC-SOD) on experimental pulmonary metastasis in mice. *Free Radic Biol Med* 26(9-10) : 1117-1125, 1999.
 - 48) Yabe Y, Nishikawa M, Tamada A, Takakura Y, Hashida M : Targeted delivery and improved therapeutic potential of catalase by chemical modification : combination with superoxide dismutase derivatives. *J Pharmacol Exp Ther* 289(2) : 1176-1184, 1999.
 - 49) Tamada A, Yabe Y, Nishikawa M, Yamashita F, Takakura Y, Hashida M : Therapeutic effects of catalase derivatives on liver and lung metastases of colon 26 tumor cells in mice. *Millennial World Congress of Pharmaceutical Sciences, Abstracts* 65, 2000.
 - 50) Kawano T, Cui J, Koezuka Y, Toura I, Kaneko Y, Sato H, Kondo E, Harada M, Koseki H, Nakayama T, Tanaka Y, Taniguchi M : Natural killer-like nonspecific tumor cell lysis mediated by specific ligand-activated Valpha 14 NKT cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(10) : 5690-5693, 1998.

- 51) Fuji N, Ueda Y, Fujiwara H, Toh T, Yoshimura T, Yamagishi H : Antitumor effect of alpha-galactosylceramide(KRN 7000) on spontaneous hepatic metastases requires endogenous interleukin 12 in the liver. *Clin Cancer Res* 6(8) : 3380-3387, 2000.
- 52) Nakagawa R, Motoki K, Ueno H, Iijima R, Nakamura H, Kobayashi E, Shimosaka A, Koezuka Y : Treatment of hepatic metastasis of the colon 26 adenocarcinoma with an alpha-galactosylceramide, KRN 7000. *Cancer Res* 58(6) : 1202-1207, 1998.
- 53) Pavco PA, Bouhana KS, Gallegos AM, Agrawal A, Blanchard KS, Grimm SL, Jensen KL, Andrews LE, Wincott FE, Pitot PA, Tressler RJ, Cushman C, Reynolds MA, Parry TJ : Antitumor and antimetastatic activity of ribozymes targeting the messenger RNA of vascular endothelial growth factor receptors. *Clin Cancer Res* 6(5) : 2094-2103, 2000.
- 54) Kong HL, Hecht D, Song W, Kovesdi I, Hackett NR, Yayon A, Crystal RG : Regional suppression of tumor growth by *in vivo* transfer of a cDNA encoding a secreted form of the extracellular domain of the flt-1 vascular endothelial growth factor receptor. *Hum Gene Ther* 9(6) : 823-833, 1998.
- 55) Mori A, Arai S, Furutani M, Mizumoto M, Uchida S, Furuyama H, Kondo Y, Gorrin-Rivas MJ, Furumoto K, Kaneda Y, Imamura M : Soluble Flt-1 gene therapy for peritoneal metastases using HVJ-cationic liposomes. *Gene Ther* 7(12) : 1027-1033, 2000.
- 56) Dreys J, Hofmann I, Hugenschmidt H, Wittig C, Madjar H, Muller M, Wood J, Martiny-Baron G, Unger C, Marme D : Effects of PTK 787/ZK 222584, a specific inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinases, on primary tumor, metastasis, vessel density, and blood flow in a murine renal cell carcinoma model. *Cancer Res* 60(17) : 4819-4824, 2000.