◆ 総 説 ◆

血管内皮細胞と癌細胞の転移

岡 田 知 子^{*1} 三 井 洋 司^{*2}

Role of Endothelial Cells in Tumor Metastasis

Tomoko OKADA^{*1} and Youji MITSUI^{*2}

Key words : endothelial cell, tumor, metastasis, interaction

1. 内皮細胞の癌細胞転移における役割

血管内皮細胞は、以前は単に物理的に活性物質の透過を制御している細胞であると考えられていたが、近年多彩な機能が知られ、特にリンパ球の帰巢 (homing) に重要な働きを示すなど、細胞間相互作用において重要性が注目されるようになって来た。そこでこの相互作用を端的に示す1つの例として内皮細胞と癌細胞の相互作用に焦点をあててみた。

癌細胞の転移はマルチステップの現象で、そのメカニズムも非常にさまざまな要因が関与するため、大変複雑である。現在のところその一連の過程は、癌細胞の1) 原発巣から周囲の組織への侵入、2) 血管内皮細胞を貫通しての近接血管内へ、またはリンパ管への侵入 (invasion)、3) 血行性またはリンパ行性に移動しての転移形成組織血管内壁への付着、4) 血管内皮細胞を貫通しての血管外組織への侵入 (extravasation)、5) 組織内での増殖、という順序で進行すると考えられている (Cascade Theory : 1, 図1)。この過程で血管壁を構成する内皮細胞と癌細胞との相互作用は、非常に重要である。すなわち癌細胞による内皮細胞の認

識と接着、内皮細胞の収縮誘導または内皮細胞の細胞外マトリクスの破壊と、癌細胞の内皮細胞間隙へのもぐり込み、さらに内皮細胞の増殖誘導と新生血管の誘導等に重要な役割を果たす。

そこで本総説では、主に癌細胞と内皮細胞との接着ということに注目して、癌細胞の転移に関わると報告されている内皮細胞との接着分子について解説し、さらに内皮細胞と癌細胞との相互作用のアクセシ系について紹介する。

2. 内皮細胞と癌細胞との相互作用に関わる接着分子

癌細胞と内皮細胞との相互作用には、癌細胞表面上の接着分子、およびそれと結合する内皮細胞表面上のレセプター分子、さらに内皮細胞表面の接着分子、およびそれと対応する癌細胞上のレセプター分子が問題となる。これらには、細胞特異性の高い分子と、各細胞に共通に存在する分子とが考えられる。また常に発現している分子と、刺激誘導によって初めて発現する分子とがある。相互作用の細胞間特異性および時間的特異性は、こうした要因で制御されている。

最近大変活発に研究されている細胞接着分子

^{*1} 通産省工業技術院化学技術研究所 [〒 305 つくば市東1-1]; Agency of Industrial Science and Technology (AIST), National Chemical Laboratory for Industry.

^{*2} 同 微生物工業技術研究所; AIST, Fermentation Research Institute.

図1 癌の転移過程

表1 主な接着分子ファミリー

- 1) インテグリンファミリー
 - $\beta 1$ インテグリン: VLA1~6
 - $\beta 2$ インテグリン: 白血球インテグリン
 - $\beta 3$ インテグリン: GpIIb/IIIa, VNR
- 2) IG スーパーファミリー
 - ICAM1,2
 - VCAM1 (INCAM-110)
 - PECAM-1
 - NCAM, MUC18
- 3) LEC-CAM (セレクチン) ファミリー
 - ELAM-1
 - GMP-140 (PADGEM)
 - LECAM-1 (MEL-14, LAM-1)
- 4) その他
 - CEA, 他

は、大きく4つのファミリーに分類される(表1). すなわち 1) α 鎖と β 鎖のヘテロダイマー構造を特徴とするインテグリンファミリー, 2) 免疫グロブリン (Ig) 様ドメインを有する免疫グロブリンスーパーファミリー, 3) レクチン様ドメイン・EGF 様ドメイン・補体結合ドメイン・膜貫通ドメイン構造を特徴とする LEC-CAM (Lectin-EGF-Complement binding Cell Adhesion Molecule) ファミリー (セレクチンファミリー), 4) その他である. 本節ではその

うち癌細胞の転移に関わる接着分子に焦点を当てて, 癌細胞表面の接着分子と内皮細胞表面の接着分子を各ファミリーに分けて紹介する.

2.1. 癌細胞表面の接着分子

2.1.1. インテグリン

インテグリンファミリーは, それぞれ共通の β 鎖をもつ (主に) 3つのサブファミリーに分類される (表2). $\beta 1$ インテグリンは, フィブロネクチン, ラミニン, コラーゲン等の細胞外マトリクスに対するレセプター群で, VLA (Very Late Antigen) 1~6を含む. $\beta 2$ インテグリンは, 白血球, 単球等の免疫担当細胞が主に有している接着分子で, 白血球インテグリンと総称される (本誌第1巻第6号, 宮坂氏の総説を参照). $\beta 3$ インテグリンには, VNR (Vitronectin Receptor: $\alpha_v\beta_3$) と, 血液凝固に関わる血小板膜糖蛋白として見つかった GpIIb/IIIa ($\alpha_{IIb}\beta_3$) がある.

それらのうち癌細胞表面において癌の転移に関わると報告されているインテグリンについて以下に詳細を紹介する. まず $\beta 1$ インテグリンに関しては, 転移性 B 16 メラノーマ (BL 6) の基底膜への接着が, $\beta 1$ サブユニットに対する抗体で阻止される²⁾ こと, このメラノーマが

表 2 代表的なインテグリンファミリー

サブファミリー	サブユニット構造	リガンド	主な機能
< $\beta 1$ インテグリン>			
VLA-1	$\alpha_1\beta_1$	コラーゲン, LM	コラーゲン, LM への接着
VLA-2	$\alpha_2\beta_1$	コラーゲン, LM	コラーゲン, LM への接着
VLA-3	$\alpha_3\beta_1$	FM, LM, コラーゲン	FN, LM, コラーゲンへの接着
VLA-4	$\alpha_4\beta_1$	FN, VCAM-1	リンパ球のホーミング
VLA-5	$\alpha_5\beta_1$	FN	FN への接着
VLA-6	$\alpha_6\beta_1$	LM	LM への接着
< $\beta 2$ インテグリン>			
LFA-1	$\alpha_L\beta_2$	ICAM-1, ICAM-2	白血球の接着
Mac-1	$\alpha_M\beta_2$	C3bi	単球, 顆粒球等の接着
p150, 95	$\alpha_X\beta_2$	C3bi	単球, 顆粒球等の接着
< $\beta 3$ インテグリン>			
VNR	$\alpha_V\beta_3$	VN, vWF, FB, FN	VN への接着
GpIIb/IIIa	$\alpha_{IIb}\beta_3$	FN, FB, VN, vWF	血小板の接着と凝集

LM: ラミニン, FN: フィブロネクチン, FB: フィブリノーゲン, VN: ビトロネクチン, vWF: フォンビルブランド因子, VCAM-1: Vascular Cell Adhesion Molecule, ICAM-1: Intercellular Adhesion Molecule-1, LFA-1: Leukocyte Function associated Antigen-1, VNR: Vitronectin Receptor

(注: $\beta_4 \sim \beta_7$ インテグリンについては, ここでは省略した。)

VLA-6 ($\alpha 6 \beta 1$) (ラミニンセプター) を有している³⁾ことから, 転移相形成への $\beta 1$ インテグリンの関与が示唆されている。さらに Chan ら⁴⁾は VLA-2 ($\alpha 2 \beta 1$) (コラーゲン・ラミニンリセプター) の $\alpha 2$ サブユニットの cDNA をヒト Rhabdomyosarcoma (横紋筋肉腫) 細胞にトランスフェクトすることによって, *in vitro* でのコラーゲンに対する接着能が上昇しただけでなく, *in vivo* での (主に肺に対する) 転移能も著しく上昇したと報告している。この著者らは, トランスフェクトした癌細胞を皮下移植した場合にも静脈内投与 (実験的転移系) した場合にも転移が起こったことから, 癌細胞の接着能の上昇は, 癌細胞が血管内から組織へ侵入する, いわゆる extravasation の過程で主に効果があるのではないかと推定している。

癌細胞と細胞外マトリクスとの接着に関しては, 数年前から注目を集めた実験がある。Gehlsen ら⁵⁾はフィブロネクチンの細胞結合部位に必要なアミノ酸配列 RGD (Arg-Gly-Asp) を含むペプチドが, メラノーマ細胞の *in vitro* 浸潤を抑制したことを報告した。また *in vivo* でも GRGDS (Gly-Arg-Gly-Asp-Ser) 配列を含むペプチドの投与により, B 16 メラノーマの

肺転移が抑制されたという報告^{6)~8)}があり, やはり extravasation の阻害が有効と考えられている。

また $\beta 3$ インテグリン (GpIIb/IIIa: $\alpha_{IIb}\beta_3$, VNR: $\alpha_V\beta_3$) に関しては, Boukerche らが $\beta 3$ サブユニットに対するモノクローナル抗体をヌードマウスに投与することによって, ヒトメラノーマの増殖が抑制されたこと⁹⁾を報告し, Albelde らは組織切片をインテグリンの各サブユニットに対する抗体で免疫染色したところ, $\beta 3$ インテグリンの $\beta 3$ サブユニットが, 良性の母斑等に比べて転移性メラノーマで特に強く発現していたと報告¹⁰⁾している。

さらに Burrows¹¹⁾ らはヒトメラノーマ細胞が IL-1 を分泌してヒト血管内皮細胞 (臍帯由来, HUVEC) 上に VCAM-1, ELAM-1, ICAM-1 を誘導し, かつ HUVEC との接着を促進することから, IL-1 分泌能の転移能への関与を示唆している。またこのメラノーマ細胞を抗 GpIIb (α_{IIb}) 抗体で処理すると, 内皮細胞との接着が抑制されることから, 内皮細胞との相互作用に $\beta 3$ インテグリンである GpIIb/IIIa が関与している可能性を示している。また GpIIb/IIIa 様の糖蛋白質が, 非転移性のメラ

ノサイトに比べて転移性メラノーマに多く発現している¹²⁾という報告もある。Fidler らは最近、メカニズムは不明だが、トロンビンの inhibitor である desulfurohirudin が、B 16 (F 10) メラノーマの実験的肺転移を抑制するという報告¹³⁾をし、 $\beta 3$ インテグリンの関与を推定している。

インテグリンファミリーの α , β 鎖 (サブユニット) のうち、どちらが癌細胞と内皮細胞との接着に必須であるかは、まだ明確でない。前述のように α 鎖に対する抗体が有効な場合と、 β 鎖に対する抗体が有効な場合とがある。

このような細胞外マトリクスに対する接着リセプターは、おそらく癌細胞の増殖や浸潤の過程で、癌細胞が組織内で自由に動き回るため、または extravasation するさい血管内皮細胞に接着しやすくするために必要だと推定される。しかし接着が強すぎても細胞の運動能は低下し転移能は抑制されるはずである。先日 La Jolla Cancer Center の E. Ruoslahti 博士の講演を聴く機会があった。博士が細胞の運動能と接着能について、接着能が高すぎても低すぎても運動能は低下するというスライドを示されたのが印象深かった。今のところ癌細胞の接着を抑制することによって癌の転移を抑制するという実験系が主に行なわれているが、癌細胞の接着をどの様にコントロールするかが今後の課題であろう。

2.1.2. Ig スーパーファミリー, その他

ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule 1) は、内皮細胞上に常時発現している (炎症性 lymphokine IL-1, TNF 等の刺激によってその出現量が増加する) 白血球に対する接着分子であるが、メラノーマ細胞の 1 つの悪性度マーカーともなっている。良性・早期のメラノーマに比べて、悪性・転移性のメラノーマに特徴的な 89 kd の膜表面糖蛋白質を単離して cDNA の cloning をしたら ICAM-1 と同一であったという報告¹⁴⁾から、ICAM-1 の発現とメラノーマ細胞の転移能との相関が推定された。さらに ICAM-1 に関しては、癌組織切片の免疫染色で、メラノーマの原発部位よりも転移部位での発現が明らかに多いという報告¹⁵⁾

もある。

一方では、ヒト転移性悪性メラノーマに特徴的な 113 kd の表面膜糖蛋白質の cDNA を cloning した結果、5 つの Ig 様ドメインを持つ NCAM (Neural Cell Adhesion Molecule) とホモロジーの高い糖蛋白 (MUC 18) だったという報告¹⁶⁾もある。

昔からよく知られている腫瘍マーカーである CEA (Carcinoembryonic Antigen) も、細胞間接着因子として作用する¹⁷⁾こと、ヒト結腸癌の肝転移相に高レベルの CEA の mRNA および CEA 蛋白の発現がみられた¹⁸⁾ことなどから、転移マーカーとなる膜表面糖蛋白として注目されてきている。

2.2. 内皮細胞表面上の接着分子

2.2.1. LEC-CAM (セレクトイン) ファミリー

内皮細胞表面には、各種の刺激によってさまざまな接着因子が出現する。まず内皮細胞をトロンビン、PMA、ヒスタミン等で刺激すると、数分で GMP-140¹⁹⁾²⁰⁾が出現し、10 分程でプラトーに達する。これはもともと活性化血小板の α 顆粒の膜蛋白質としてみつけれられた糖蛋白質; PADGEM (Platelet Activation Dependent Granule-External Membrane protein) で、活性化内皮細胞と好中球、および活性化血小板と好中球²¹⁾、単球等との接着を司る。この接着がヘパリン、フコイジンのような硫酸化多糖類で抑制されるという報告²²⁾もあり、接着に関わる糖鎖の重要性が示唆される。

また内皮細胞を IL-1 や TNF α のような炎症性の lymphokine で刺激すると、4~6 時間後をピークとして、好中球に対する接着分子 ELAM-1 (Endothelial-Leukocyte Adhesion Molecule 1)²³⁾²⁴⁾が一過性に出現する。ELAM-1 はまた、内皮細胞と好中球との接着だけでなく、単球、メモリー T 細胞サブセットとの接着をも司る。ELAM-1 のリガンドについては後述するが、この ELAM-1 に対する抗体が、ヒト結腸癌の内皮細胞に対する接着を阻止することから、内皮細胞と癌細胞との接着に、ELAM-1 が関与している可能が示唆された²⁵⁾。

またリンパ球のホーミングレセプターとして

同定された LECAM-1 (LAM-1, Mel-14 Antigen) の, 内皮細胞と白血球との接着には, ELAM-1, GMP-140 が密接に関与しているという報告²⁶⁾が最近なされた。これら LECAM-1, ELAM-1, GMP-140 は, レクチン様ドメイン・EGF 様ドメイン・補体結合ドメイン・膜貫通ドメインを持つ構造を特徴とする LEC-CAM ファミリー (セレクトインファミリー) に属する (図 2)。セレクトインファミリーは接着分子同士の, 機能的関連も明らかになりつつあり, 癌の転移に関わる可能性のある内皮細胞上の分子として注目したい。

2.2.2. Ig スーパーファミリー

セレクトインとは別に, やはり内皮細胞を IL-1 および TNF α で刺激すると, 4~6 時間後をピークとしてリンパ球に対する接着分子 VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule 1)²⁷⁾ が内皮細胞上に誘導されることが近年報告された。VCAM-1 は ICAM-1 と同様, 免疫グロブリン様ドメインを持つ Ig スーパーファミリーに属する。このリンパ球上のリガンドは $\beta 1$ インテグリンの一つ VLA-4 ($\alpha_4\beta_1$: Fibronectin レセプター) であることが判明²⁸⁾した。しかも VLA-4 に対する抗体が, VCAM-1 を介するリンパ球と内皮細胞との接着を阻止する一方で, フィブロネクチン (FN) に対する結合は阻止しないことから, VLA-4 の, VCAM-1 と結合する部位と, FN と結合する部位とは異なる事が判明した²⁸⁾。ヒト VCAM-1 遺伝子についてはその遺伝子構造や染色体上の位置も決定されている²⁹⁾。

一方で, IL-1 や TNF の刺激によって内皮細胞上に出現する 110 kd の (N-link) 糖蛋白質 INCAM-110 (Inducible Cell Adhesion Molecule-110) がメラノーマ細胞と内皮細胞との接着に関わっていることが報告²⁵⁾された。さらに B リンパ球のリンパ組織への集積メカニズムを解明する中で, B リンパ球の特定リンパ組織への集積には, B リンパ球上の VLA-4 と濾胞内樹状細胞上の INCAM-110 が関与していることから, INCAM-110 と, VLA-4 をリガンドとする VCAM-1 は, 同一であろうと推定³⁰⁾されている。

また補足になるが, 最近血小板表面や内皮細胞間隙に発現する膜糖蛋白質として, Ig スーパーファミリーの PECAM-1 (Platelet/Endothelial Cell Adhesion Molecule-1=endoCAM/CD 31)³¹⁾ という分子も見つかっている。

結局今のところ, 内皮細胞側の分子としてはまだ明確ではないにせよ, 炎症性 lymphokine で誘導される接着分子 VCAM-1, ELAM-1 が最も注目されている。

3. ELAM-1のリガンドとしての糖鎖 SialylLe^a, SialylLe^x の役割

さて ELAM-1 については前節で述べたが, 最近 ELAM-1 のリガンドは SialylLe^a (SLe^a), SialylLe^x (SLe^x) という糖鎖であるという報告がなされた³²⁾。初めに ELAM-1 に対する好中球の糖鎖リガンドは SLe^x (Sialylated lacto-N-fucopentaose III: NeuAc α 2-3 Gal β 1-

図 2 セレクトインファミリーの基本構造

4(Fuc α 1-3)GlcNAc) であるという報告^{33)~35)}がなされた。さらに ELAM-1 の cDNA をトランスフェクトした細胞の結合実験から, SLe^a (Sialylated lacto-N-fucopentaose II: NeuAc α 2-3 Gal β 1-3(Fuc α 1-4)GlcNAc) もまたリガンドであることが示された³²⁾。SLe^a や SLe^x を含むムチンが, 癌患者の血清中に多量に見いだされる³⁶⁾³⁷⁾ ことから, このような糖鎖が内皮細胞上の ELAM-1 と白血球との結

合を阻害して免疫抑制を起こす可能性が示唆されている。

$$\begin{cases} \text{SLe}^a: x=3, y=4 \\ \text{SLe}^x: x=4, y=3 \end{cases}$$

またヒト結腸癌表面の Sialyl-dimeric Le^x antigen (SLX: NeuAc α 2-3 Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-3 Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-R) の発現量が癌の悪性度, 進行度と相関することが判明した³⁸⁾。さらに SLX の発現量の違いによってこの癌細胞をセルソーターで分離し, その *in vitro* 浸潤能を調べた結果, SLX を多く発現している細胞の方が浸潤能が高い³⁹⁾ という報告がなされた。このように癌の転移における細胞表面糖鎖の重要性が強く示唆されている。

以上述べてきた各接着分子の位置付けを, 図 3 に模式的に表した。

図 3 癌の転移に関与する接着分子

図 4 *in vitro* 浸潤能アッセイ系

4. 癌細胞と内皮細胞との相互作用の アッセイ系

癌細胞の浸潤能を *in vitro* で調べるアッセイ系としては、古くからボイデンチェンバーというケモタキシスのアッセイ系が使われてきた。これは穴の開いたフィルターでウェルを仕切り、下側にケモアトラクタントを入れて上側に細胞をのせ、一定時間内にフィルターの裏側に移動する細胞数を計測する方法である。このフィルターを、細胞外マトリックスの構成成分より成るマトリゲルでコートして使う方法が、*in vitro* 浸潤能のアッセイ系として広く使われてきた。

しかしこれまで述べてきたように、癌細胞の浸潤の過程には内皮細胞との相互作用が大変重要である。そこで筆者らは *in vitro* における癌細胞と内皮細胞との相互作用のアッセイ系を確立した(図4)⁴⁰⁾⁴¹⁾。具体的には、直径8 μ mの穴のある polycarbonate フィルターを、細胞外マトリックス成分である Fibronectin, Laminin, Vitronectin 等でコートし、ヒト臍帯由来正常血管内皮細胞を一層に培養した。その上に肺に高転移性のヒト癌細胞 HT 1080 (fibrosarcoma) をを加えさらに培養し、内皮細胞間隙とフィルターとを貫通して下に落ちた細胞数を経時的に計測した。最初に内皮細胞に特異的な親和性を有する UEA-1 (Ulex europeus Agglutinin: ハリエニシダレクチン) でフィルター下の細胞を染色した結果、まったく染色されず、落ちてきた細胞が内皮細胞ではなく癌細胞であることが確認できた。さらにフィルター上の内皮細胞と癌細胞の様子を走査電子顕微鏡で観察した結果、癌細胞は内皮細胞の下にもぐり込んでいることが判明した。この系で血管内皮細胞を rTNF, rIL-1 β 等で刺激した際の、癌細胞の *in vitro* 浸潤能の変化と、前述した接着分子の関与について解析を進めている。

5. おわりに

従来、筆者らの研究室では、癌細胞由来の増殖因子と血管新生、内皮細胞のエンドセリン分

泌と平滑筋収縮^{42)~44)}、内皮細胞の表面分子と増殖因子作用⁴⁵⁾⁴⁶⁾、更に内皮細胞の血球分化等を細胞間相互作用の視点から解析してきた。一方で、以前から細胞の機能とその膜表面糖鎖との関係に注目してきた⁴⁷⁾⁴⁸⁾。たとえば岡田らは IL-2 培養細胞を、特定の糖鎖を認識するレクチンに対する親和性の差によって分離すると、レクチンに対する親和性の異なる細胞は、IL-1で刺激した内皮細胞に対する接着能や⁴⁹⁾、リンパ組織の集積性⁵⁰⁾が異なる事を示した。これは活性化内皮細胞上に出現する ELAM-1 等のリガンドが糖鎖であることであらざる。最近癌の転移に関わる癌細胞と内皮細胞との相互作用に注目して、*in vitro* における癌細胞の、内皮細胞を介した浸潤能のアッセイ系を構築した⁴⁰⁾⁴¹⁾。今後特に内皮細胞側の癌細胞に対する接着分子、および癌細胞の浸潤能を規定する分子について研究を進めたい。癌細胞と内皮細胞との相互作用の研究が、癌の転移メカニズムの解明へつながることを期待している。

文 献

- 1) Fidler, I.J. and Nicolson, G.L.: Cancer Biol. Rev., 2:1~47, 1981.
- 2) Kramer, R.H., McDonald, K.A., Crowley, E., Ramos, D.M. and Damsky, C.H.: Melanoma cell adhesion to basement membrane mediated by integrinrelated complexes. Cancer Res., 49:393~402, 1989.
- 3) Ramos, D.M., Berston, E.D. and Kramer, R.H.: Analysis of Integrin Receptors for Laminin and Type IV Collagen on Metastatic B16 Melanoma Cells. Cancer Res., 50:728~734, 1990.
- 4) Chan, B.M.C., Matsuura, N., Takada, Y., Zetter, B.R. and Hemler, M.E.: *In vitro* and *in vivo* consequences of VLA-2 expression on Rhabdomyosarcoma Cells. Science, 251:1600~1602, 1991.
- 5) Gehlsen, K.R., Argraves, W.S., Pierschbacher, M.D. and Ruoslahti, E.: Inhibition of tumor cell invasion by Arg-Gly-Asp-containing synthetic peptides. J. Cell Biol., 106:925~930, 1988.
- 6) Humphries, M.J., Olden, K. and Yamada, K.M.: A synthetic Peptide from fibronectin inhibits

- experimental metastasis of murine melanoma cells. *Science* (Washington DC), **233**: 467~470, 1986.
- 7) Saiki, I., Murata, J., Lida, J., Nishi, N., Sugimura, K. and Azuma, I.: The inhibition of murine lung metastasis by synthetic polypeptides [poly (Arg-Gly-Asp) and poly (Tyr-Ile-Gly-Arg)] with a core sequence of cell adhesion molecules. *Br. J. Cancer*, **59**: 194~197, 1988.
 - 8) Humphries, M.J., Yamada, K.M. and Olden, K.: Investigation of the biological effects of anti-cell adhesion synthetic peptides that inhibit experimental metastasis of B16-F10 murine melanoma cells. *J. Clin. Invest.*, **81**: 782~790, 1988.
 - 9) Boukerche, H., Berthier-Vergnes, O., Baily, M., Dore, J.F., Leung, L.K. and McGregor, J.L.: A monoclonal antibody (LYP18) directed against the blood platelet glycoprotein II b/III a complex inhibits human melanoma growth *in vivo*. *Blood*, **74**: 909~912, 1989.
 - 10) Albelda, S.M., Mette, S.A., Elder, D.E., Stewart, R., Damjanovich, L., Herlyn, M. and Buck, C.A.: Integrin distribution in malignant melanoma: Association of the $\beta 3$ subunit with tumor progression. *Cancer Res.*, **50**: 6757~6764, 1990.
 - 11) Burrows, F.J., Haskard, D.O., Hart, I.R., Marshall, J.F., Selkirk, S. and Poole, S.: Influence of tumor-derived interleukin on melanoma-endothelial cell Interactions *in vitro*. *Cancer Res.*, **51**: 4768~4775, 1991.
 - 12) McGregor, B.C., McGregor, J.L., Weiss, L.M., Wood, G.S., Hu, C-H., Boukerche, H. and Warnke, R.A.: Presence of cytoadhesins (IIb-IIIa-like glycoproteins) on human metastatic melanomas but not on benign melanocytes. *Am. J. Pathol.*, **92**: 495~499, 1989.
 - 13) Esumi, N., Fan, D. and Fidler, I.J.: Inhibition of murine melanoma experimental metastasis by recombinant desulfatohirudin, a highly specific thrombin inhibitor. *Cancer Res.*, **51**: 4549~4556, 1991.
 - 14) Johnson, J.P., Stade, B.G., Holzmann, B., Schwable, W. and Riethmuller, G.: De novo expression of intercellular-adhesion molecule 1 in melanoma correlates with increased risk of metastasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **86**: 641~644, 1989.
 - 15) Natali, P., Nicotra, M.R., Cavaliere, R., Bigotti, A., Romano, G., Temponi, M., and Ferrone, S.: Differential expression of intercellular adhesion molecule 1 in primary and metastatic melanoma lesions. *Cancer Res.*, **50**: 1271~1278, 1990.
 - 16) Lehmann, J.M., Riethmuller, G. and Johnson, J. P.: MUC18, a marker of tumor progression in human melanoma, shows sequence similarity to the neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **86**: 9891~9895, 1989.
 - 17) Benchimol, S., Fuks, A., Jothy, S., Beauchemin, N., Shirota, K. and Stanners, C.P.: Carcinoembryonic antigen, a human tumor marker, functions as an intercellular adhesion molecule. *Cell*, **57**: 327~334, 1989.
 - 18) Boucher, D., Cournoyer, D., Stanners, C.P. and Fuks, A.: Studies on the control of gene expression of the carcinoembryonic antigen family in human tissue. *Cancer Res.*, **49**: 847~852, 1989.
 - 19) Hattori, R., Hamilton, K.K., Fugate, R.D., Mcever, R.P. and Sims, P.J.: Stimulated secretion of endothelial von Willebrand factor is accompanied by rapid redistribution to the cell surface of the intercellular granule membrane protein GMP-140. *J. Biol. Chem.*, **264**: 7768~7771, 1989.
 - 20) Johnston, G.I., Richard, G.C. and Mcever, R.P. Cloning of GMP140, a granule membrane protein of platelets and endothelium: Sequence similarity to proteins involved in cell adhesion and inflammation. *Cell*, **56**: 1033~1044, 1989.
 - 21) Geng, J., Bevilacqua, P.M., Moore, K.L., McIntyre, T.M., Prescott, S.M., Kim, J.M., Bliss, G.A., Zimmerman, G.A. and McEver, P.R.: Rapid neutrophil adhesion to activated endothelium mediated by GMP140. *Nature*, **343**: 757~760, 1990.
 - 22) Skinner, M.P., Lucas, C.M., Burns, G.F., Chesterman, C.N. and Berndt, M.C.: GMP140 binding to neutrophils is inhibited by sulfated glycans. *J. Biol. Chem.*, **266**: 5371~5374, 1991.
 - 23) Bevilacqua, M.P., Pober, J.S., Mendrick, D.L., Cortran, R.S. and Gimbrone, M.A.: Identification

- of an inducible endothelial-leukocyte adhesion molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**: 9238~9242, 1987.
- 24) Bevilacqua, M.P., Stengelin, S., Gimbrone, M.A. and Seed, B.: Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins. *Science*, **246**: 1160~1165, 1989.
 - 25) Rice, G.E., Bevilacqua, M.P.: An inducible endothelial cell surface glycoprotein mediates melanoma adhesion. *Science*, **246**: 1303~1306, 1989.
 - 26) Picker, L.J., Warnock, R.A., Burns, A.R., Doerschuk, C.M., Berg, E.L. and Bucher, E.C.: The neutrophil selectin ELAM-1 presents carbohydrate ligands to the vascular selectins ELAM-1 and GMP-140. *Cell*, **66**: 921~933, 1991.
 - 27) Osborn, L., Hession, C., Tizard, R., Vassallo, C., Luhowskyj, S., Chi-Rosso, G. and Lobb, R.: Direct expression cloning of vascular cell adhesion molecule 1, a cytokine-induced endothelial protein that binds to lymphocytes. *Cell*, **59**: 1203~1211, 1989.
 - 28) Ellices, M.J., Osborn, L., Takada, Y., Crouse, C., Luhowskyj, S., Hemler, M. and Lobb, R.R.: VCAM-1 on activated endothelium interacts with the leukocyte integrin VLA-4 at site distinct from the VLA-4/fibronectin binding site. *Cell*, **60**: 577~584, 1990.
 - 29) Cybulsky, M.I., Fries, J.W.U., Williams, A.J., Sultan, P., Eddy, R., Byers, M., Shows, T., Gimbrone, Jr.M.A. and Collins, T.: Gene structure, chromosomal location, and basis for alternative mRNA splicing of the human VCAM1 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**: 7859~7863, 1991.
 - 30) Freedman, A.S., Munro, J.M., Rice, G.E., Bevilacqua, M.P., Morimoto, C., McIntyre, B.W., Rhynhart, K., Pober, J.S. and Nadler, L.M.: Adhesion of human B cells to germinal centers *in vitro* involves VLA-4 and INCAM-110. *Science*, **249**: 1030~1033, 1990.
 - 31) Albelda, S.M., Muller, W.A., Buck, C.A. and Newman, P.J.: Molecular and cellular properties of PECAM-1 (endoCAM/CD31): A novel vascular cell-cell adhesion molecule. *J. Biol. Chem.*, **266**: 1059~1068, 1991.
 - 32) Berg, E.L., Robinson, M.K., Mansson, O., Butcher, E.C. and Magnani, J.L.: A Carbohydrate domain common to both sialyl Le^a and sialyl Le^x is recognized by the endothelial cell leukocyte adhesion molecule ELAM-1. *J. Biol. Chem.*, **266**: 14869~14872, 1991.
 - 33) Lowe, J.B., Stoolman, L.M., Nair, R.P., Larsen, R.D., Berhend, T.L. and Marks, R.M.: ELAM-1-dependent cell adhesion to vascular endothelium determined by a transfected human fucosyltransferase cDNA. *Cell*, **63**: 475~484, 1990.
 - 34) Phillips, M.L., Nudelman, E., Gaeta, F.C.A., Perez, M., Singhal, A.K., Hakomori, S. and Paulson, J.C.: ELAM-1 mediates cell adhesion by recognition of a carbohydrate ligand, Sialyl-Le^x. *Science*, **250**: 1130~1132, 1990.
 - 35) Walz, G., Aruffo, A., Kolanus, W., Bevilacqua, M. and Seed, B.: Recognition by ELAM-1 of the Sialyl-Le^x determinant on myeloid and tumor cells. *Science*, **250**: 1132~1135, 1990.
 - 36) Magnani, J.L., Nilsson, B., Brockhaus, M., Zopf, D., Stepkowski, Z., Koprowski, H. and Ginsburg, V.: A monoclonal antibody-defined antigen associated with gastrointestinal cancer is a ganglioside containing sialylated lacto-N-fucopentaose II. *J. Biol. Chem.*, **257**: 14365~14369, 1982.
 - 37) Kannagi, R., Fukushi, Y., Tachikawa, T., Noda, A., Shin, S., Shigeta, K., Hiraura, N., Fukiida, Y., Inamoto, T., Hakomori, S. and Imura, H.: Quantitative and qualitative characterization of human cancer-associated serum glycoprotein antigens expressing fucosyl or sialyl-fucosyl type 2 chain polylactosamine. *Cancer Res.* **46**: 2619~2626, 1986.
 - 38) Hoff, S., Matsushita, Y., Ota, D.M., Cleary, K.R., Yamori, T., Hakomori, S. and Imamura, T.: Increased expression of sialyl-dimeric Le^x antigen in liver metastases of human colorectal carcinoma. *Cancer Res.*, **49**: 6883~6888, 1989.
 - 39) Matsushita, Y., Nakamori, S., Seftor, E.A., Hendrix, J.C. and Imamura, T.: Human colon carcinoma cells with increased invasive capacity obtained by selection for sialyl-dimeric Le^x

- antigen. Exp. Cell Res. **196**: 20~25, 1991.
- 40) 岡田知子, 小林美枝子, 奥野洋明, 三井洋司: 血管内皮細胞細胞を介した癌細胞の *in vitro* における浸潤能測定法の確立, 第 50 回日本癌学会総会要旨集, pp. 161, (1991)
- 41) Okada, T., Okuno, H.(Y)., Mitsui, Y.: Establishment of *in vitro* invasion assay system for tumor metastasis through the interaction of endothelial cells. Manuscript in preparation
- 42) Inoue, A., Yanagisawa, M., Takuwa, Y., Mitsui, Y., Kobayashi, M. and Masaki, T.: The human preproendothelin-1 gene; complete nucleotide sequence and regulation of expression. J. Biol. Chem., **264**: 14954~14959, 1989.
- 43) Mitsui, Y., Saida, K., Ishida, M., Imamura, T. and Kobayashi, M.: Establishment of vascular endothelial cell lines in serum-free culture and discovery of endothelin and a vasoactive intestinal contractor (VIC). Cytotechnology, **5**: S9~16, 1991.
- 44) Saida, K. and Mitsui, Y.: cDNA cloning, sequence analysis and tissue distribution of a precursor for vasoactive intestinal contractor (VIC). Biochem. Biophys. Acta, **1089**: 404~406, 1991.
- 45) Amanuma, K. and Mitsui, Y.: Hyaluronic acid synthesis is absent in normal human endothelial cells irrespective of hyaluronic acid synthetase inhibitor activity, but is significantly high in transformed cells. Biochem. Biophys. Acta, **1092**: 336~340, 1991.
- 46) Imamura, T., Tokita, Y. and Mitsui, Y.: Contact with basement membrane heparan sulfate enhances the growth of transformed vascular endothelial cells, but suppresses normal cells. Cell Struct. Funct., **16**: 225~230, 1991.
- 47) Okada, T., Ezawa, K., Imai, Y. and Osawa, T.: Enrichment of antitumor effector cell that are effective *in vivo* from spleen cells of tumor-bearing mice through the use of *Dolichos biflorus* lectin. Cancer Res., **46**: 5611~5617, 1986.
- 48) Takano, M., Okada, T., Maruyama, T., Harada, K., Imai, Y. and Osawa, T.: Two populations of mouse lymphokine-activated killer cells separated by use of soybean agglutinin. Jpn. J. Cancer Res., **80**: 1228~1237, 1989.
- 49) Okada, T., Higuchi, M., Takano, M., Maruyama, T., Imai, Y. and Osawa, T.: Anti-tumour efficacy of mouse spleen cells separated with *Dolichos Biflorus* lectin (DBA) in experimental pulmonary metastasis of B16 melanoma cells. Br. J. Cancer, **61**: 241~249, 1990.
- 50) Okada, T., Imai, Y. and Osawa, T.: *In vivo* localization of antitumor lymphocytes separated with *Dolichos biflorus* lectin. Immunol. Lett., **24**: 185~190, 1990.
-