前立腺癌細胞における転写因子 NF κ B の活性化と 細胞接着分子の発現制御

名古屋市立大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 郡健二郎教授)

戸 澤 啓 一

ACTIVATION OF NUCLEAR FACTOR- κ B AND CONTROL OF THE EXPRESSION OF CELL ADHESION MOLECULES IN HUMAN PROSTATE CANCER CELLS

Keiichi Tozawa

Department of Urology, Nagoya City University School of Medicine

(Chief: Prof. K. Kohri)

(Purpose) Cell adhesion molecules (CAMs) have been considered to play key roles in cancer metastasis through binding of cancer cells to the endothelial cells or matrix. We have found that constitutive expression of E-selectin, ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) and VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) on the cell surface of prostate cancer cell lines, PC-3 LNCaP, and DU145. In an attempt to explain the highly metastatic potential of these cells, we investigated expression of CAMs. Since these expressed CAMs are known to be regulated by a transcription factor NF κ B. We have examined if NF κ B is activated in these prostate cancer cell lines.

(Material and Method) Expression of E-selectin, ICAM-1, Sialyl-Lewis X, LFA-1 (lymphocyte function-associated antigen-1), integrin α 4, and integrin β 1 were examined by indirect immunofluorescent staining and Western blotting using specific monoclonal antibodies. We then examined whether pro-inflammatory cytokines known to stimulate NF κ B, IL-1 and TNF, could drive the nuclear translocation of NF κ B. Ten ng/ml of recombinant human IL-1 β or TNF α was added to the cell culture and the CAMs level, as well as nuclear translocation of NF κ B, was examined.

(Results) The staining levels of ICAM-1, VCAM-1, and integrin β 1 were highly elevated in PC-3 and DU145. In surprising, NF κ B was retained in the cytoplasm (as an inactive form) and not detectable in the nucleus (active form) as demonstrated by immunofluorescence. Although time-dependent expression of these molecules were explored, the level of ICAM-1 and VCAM-1 on the cell surface were unchanged. However, nuclear translocation of NF κ B could be induced.

(Conclusion) These observations indicate that while the signaling pathway to NF κ B is intact, it is not directed to induction of its target CAM genes. It is possible that other transcription factors might be involved in these cells and that they might to be constitutively stimulated during the carcinogenesis of prostate cancer.

Key words: cell adhesion molecule, NF κ B, prostate cancer

要旨: (目的)細胞接着分子は癌細胞と血管内皮細胞および細胞外基質との接着という過程を通して癌の転移において非常に重要な役割を演じている。前立腺癌細胞株 LNCaP, PC-3, および DU145 の高転移能と血管内皮細胞上に発現している細胞接着分子との関連を明らかにするため本研究を行った。さらにこれら細胞接着分子遺伝子の発現制御を行っていると考えられる転写因子 NF κ B の発現, 活性化についても検討した。

(方法)前立腺癌細胞株を用いて, E-selectin, ICAM-1, VCAM-1, Sialyl-LewisX, LFA-1, integrin α 4, β 1 の各細胞接着分子に対するモノクローナル抗体および NF κ B に対するポリクローナル抗体による免

疫蛍光染色, フローサイトメトリー, Western blotting を行った. また血管内皮細胞を用い前立腺癌細胞3株との単層細胞接着アッセイおよび各細胞接着分子に対するモノクローナル抗体による細胞接着阻害実験を行った.

(結果, 結論)前立腺癌細胞株においてE-selectin, ICAM-1, VCAM-1の発現が認められ, 特にICAM-1が血管内皮細胞との接着に重要な役割を果たしていると考えられた. また, この発現はNF κ B以外の転写因子により制御されており, これら細胞接着分子の構成的発現が高い転移能に結びついていることが示唆された.

キーワード: 細胞接着分子, 転写因子 NF κ B, 前立腺癌

緒 言

癌の浸潤, 転移は非常に複雑な過程から成り立っているが, その過程にさまざまな細胞接着分子が関与していることが知られている¹⁾²⁾. 細胞間接着を担っているのは主にカドヘリン分子であり, その結合蛋白質であるカテニンとともにカドヘリン-カテニン複合体を形成し, 接着機能を果たしている. この複合体の異常によって癌細胞がバラバラな状態となり, 浸潤や転移をおこしやすくなる³⁾⁴⁾. また癌細胞が標的臓器において転移巣を形成するためには癌細胞と血管内皮細胞との接着が重要なステップとなる. この機序は白血球が炎症部位へ集積する機構と部分的に類似している可能性がある. 具体的には脈管内を遊走する白血球が血管内皮細胞上の selectin を介する rolling (緩やかな接着状態)により十分に減速した後に, ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) および VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) と integrin との間の sticking (強固な接着) が起こることが細静脈を用いた in vivo の実験で示されており⁵⁾⁶⁾, この接着には各段階のモデルが考えられている⁷⁾. しかしこの接着機構に関与する接着分子は癌細胞の種類により少しずつ異なっており, 必ずしも白血球と同様のモデルを考えることには問題があり, 癌種により異なるモデルを考える必要があると思われる. そこで個々の癌における細胞接着分子の発現を検討することが血管内皮細胞との接着モデルを明らかにし, さらに血行性転移機構の解明につながると考えられる. 一方この2~3年の間に, E-selectin, ICAM-1, VCAM-1などの接着分子の遺伝子発現が転写因子 NF κ B (nuclear factor- κ B) により制御されていることが明らかとなってきた^{8)~13)}. 今回の実験では前立腺癌の転移メカニズムの解明を目的として, 3種類の前立腺癌細胞の LNCaP, PC-3, および DU145 と血管内皮細胞株を用い細胞接着分子の発現ならびに NF κ B による発現制御についての検討を行った.

対象と方法

(1) 細胞株

ヒト前立腺癌細胞株 PC-3, DU145 とヒト悪性黒色腫細胞株 WM266-4 は American Type Culture Collection (ATCC, USA) より供与を受け実験に使用した. ヒト肺小細胞性未分化癌細胞 QG90 は愛知県がんセンター, 小川博士より供与を受け実験に使用した. ヒト前立腺癌細胞株 LNCaP は大日本製薬ラボラトリーブログダツ (株) より購入し実験に使用した. ヒト血管内皮細胞株 HUVEC (human umbilical vein endothelial cells) は当大学分子医学研究所分子遺伝部門においてヒト臍帯静脈より採取し樹立した細胞株である. 培養液は LNCaP, WM266-4, HUVEC には RPMI1640 medium (Gibco BRL) に10%または15% fetal bovine serum (FBS) (Gibco BRL) を加えたものを, DU145, QG90 には MEM medium (Gibco BRL) に10%FBS を加えたものを使用した. PC-3 には DMEM medium (Gibco BRL) に10%FBS を加えたものを使用した.

(2) 抗細胞接着分子抗体, 抗 NF κ B 抗体およびサイトカイン

recombinant interleukin 1 β (IL-1 β) は大塚製薬中央研究所より供与を受け実験に使用した. E-selectin, ICAM-1, VCAM-1, Sialyl Lewis X, LFA-1 (lymphocyte function-associated antigen-1), integrin α 4 および β 1 に対するモノクローナル抗体は CAMFOLIO (USA) より, NF κ B の p65 と p50 に対するポリクローナル抗体 (抗ヒト家兎抗体) は SANTA CRUZE (USA) より購入した. 2次抗体には FITC 標識家兎抗マウス IgG またはロダミン標識やぎ抗家兎 IgG (CAPPEL, USA) を用いた.

(3) 免疫蛍光染色

Lab-Tek チェンバースライド (Nunc Co.) 上で細胞を semi-confluent (約70から80%スライド上を占める状態) となるまで培養しアセトンで10分間固定した(一

20°C). phosphate buffer saline (-) (PBS (-))にて3回洗浄した後、1次抗体を加え37°Cで1時間 incubate した。0.05%トリトン X100-PBSにて3回洗浄後、2次抗体を加え37°Cで20分 incubate した。再度 PBS (-)にて3回洗浄しマウントした後、蛍光顕微鏡で観察した。1次抗体、2次抗体とも3%bovine serum albumin (BSA) 含有 PBS にて1:100に希釈して実験に使用した。

(4) ウェスタンブロット

各細胞株それぞれ 10^6 cellsをRIPA buffer (20mM Tris-HCl, SDS 0.1%, Triton X100 1%, sodium deoxycholate 1%)に溶解し、12,000rpm, 30分, 4°Cで遠心した後、上清を採取しタンパク質を調整した。抽出分画は10%sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electro-phoresis (SDS-PAGE)にて泳動後、gelをnitrocellulose膜 (BIO-RAD, USA)に transfer し、1次抗体との反応後、WESTERN BLOT KIT (Kirkegaard & Perry Labo. Inc. Gaithersburg, MD)を用いて染色した。

(5) フローサイトメトリー

各培養細胞株 (10cm 径 Dish 1 枚) を0.5 mMEDTA/0.05%トリプシンで処理した後、PBS 5ml

に懸濁して4°C, 5分間185.6G (1,000rpm)で遠心した。細胞をPBSに懸濁し1次抗体80 μ lを加え氷上で1時間反応させた。PBSで2回洗浄した後、2次抗体80 μ lを加え氷上で30分間反応させた。さらに細胞をPBSで2回洗浄しPBS 1mlに懸濁後、ナイロンメッシュ (孔径, 100 μ m)を通しFalcon 2050チューブに懸濁液を移しFACScan (Becton Dickinson 社製)にて細胞表面抗原の解析を行った。

(6) 細胞培養上清中 IL-1, TNF 濃度

各癌細胞株の継代後2日目 (培養液交換前)の培養上清を採取し、IL-1 β , TNF α 測定キット (大塚製薬 (株))を用いたELISA法にてIL-1 β およびTNF α 濃度を測定した。

(7) 単層細胞接着アッセイ

10ng/mlのIL-1 β でそれぞれ30分, 1時間, 4時間刺激した48穴プレート上のsemi-confluentのHUVCEに各癌細胞 (1×10^5 cells/200 μ l/well)を加え20分間, 37°Cで培養した。この時、非特異的接着を防ぐため120rpmでローテーションした。その後RPMI 1640にて3回の洗浄を行い、各群とも中心部の10視野における接着した癌細胞数を直接、顕微鏡にて数え、平均 $\pm$ 標準誤差を算出した。

Fig. 1 Expression of cell adhesion molecules on prostate cancer cell lines and QG90 by immunofluorescent staining using specific monoclonal antibodies. Expression of E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1 were highly elevated before stimulation with IL-1 β .

Fig. 2 Expression of ICAM-1 on prostate cancer cell lines and WM266-4 by FACScan. The cell surface levels of ICAM-1 were high in all cell lines.

Fig. 3 Expression of NF κ B, E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1 on prostate cancer cell lines by Wester blotting. ICAM-1, VCAM-1 and NF κ B were strongly expressed on prostate cancer cell lines.

(8) 細胞接着阻害実験

混合培養する30分前に50ng/mlのE-selectin, ICAM-1, VCAM-1に対するモノクローナル抗体を癌細胞培養上清に加え,単層細胞接着アッセイを行った.

各群の有意差の検定には Welch の t 検定を用いた.

結果

(1) 細胞接着分子の発現

細胞表面の細胞接着分子の発現は蛍光抗体法, ウエ

Table 1 Expression of cell adhesion molecules on HUVEC and cancer cell lines

	HUVEC		QG90		WM266-4		PC-3		DU145		LNCaP	
	Control	after IL-1 β stimulation	Control	after IL-1 β stimulation	Control	after IL-1 β stimulation	Control	after IL-1 β stimulation	Control	after IL-1 β stimulation	Control	after IL-1 β stimulation
E-selectin	—	++	—	+	±	+	+	+	+	+	±	±
ICAM-1	±	+	—	—	+	+	++	++	++	++	±	±
VCAM-1	±	+	—	—	±	±	+	+	+	+	±	±
Sialyl-Lewisx	±	±	±	+	+	+	±	±	+	+	±	±
LFA-1	—	—	—	±	±	±	±	±	+	+	—	—
Integrin α 4	—	—	—	±	±	±	±	±	±	±	+	+
Integrin β 1	±	±	±	+	±	±	+	+	+	+	+	+

++ : strongly stained   + : stained   ± : equivocal   — : not stained

Fig. 4 Induction of cancer cells-HUVEC adhesion by IL-1 β . HUVEC were treated with 10ng/ml IL-1 β 30min-4h. Prostate cancer cells were added and incubated for 20min at 37°C with rotation (120rpm). The number of cancer cells adhered to HUVEC monolayer was counted. Standard error bars were obtained from the results of three independent experiments.

Table 2 Concentration of IL-1 β and TNF α in culture medium

	IL-1 β (pg/ml)	TNF α (pg/ml)
QG90	0.52	<0.5
WM266-4	1.44	<0.5
DU145	<0.25	<0.5
LNCaP	<0.25	<0.5
PC3	4.27	<0.5

スタンプロット, FACSscan により確認した. HUVEC 上では TNF α あるいは IL-1 β の刺激により E-selectin が 4 時間, ICAM-1 が 8 時間, VCAM-1 が 12 から 24 時間をピークに発現が誘導された. 一方, PC-3, DU145 においては TNF α あるいは IL-1 β 未刺激の状態 ICAM-1 の発現が強く E-selectin, VCAM-1 も若

干の発現を認めた. しかし LNCaP ではこれら細胞接着分子の発現は弱く TNF α あるいは IL-1 β 刺激を加えてもその発現は誘導されなかった. コントロールとした他の癌細胞株 QG90, WM266-4 では WM266-4 で ICAM-1 の発現が強く認められた以外は E-selectin, VCAM-1 の発現は見られなかった (Fig. 1, 2, 3). さらに E-selectin, ICAM-1, VCAM-1 のリガンドについては DU145 が E-selectin のリガンドである sialyl Lewis X と ICAM-1 のリガンド LFA-1 を発現しており, PC-3, DU145, LNCaP すべての前立腺癌細胞株が integrin β 1 を発現していた (Table 1).

尚, FACSscan では 0.5mM EDTA/0.05% トリプシン処理により E-selectin, VCAM-1 の抗原性が失われた可能性があり E-selectin, VCAM-1 は認められなかった.

(2) 血管内皮細胞に対する接着能

HUVEC への接着能について細胞株別に比較すると, IL-1 β 未刺激の状態では QG90 に比べ 3 種の前立腺癌細胞株の接着細胞数は有意に多かった ($p < 0.05$). しかし IL-1 β 刺激後 30 分, 1 時間と経過し接着細胞数が時間依存的に増加するにしたがい QG90 との差がなくなり 4 時間でほぼプラトーに達した (Fig. 4).

(3) 培養上清中 $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ 濃度

$\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ とも低値あるいは検出感度以下であったが PC-3 のみ 4.27pg/ml と高い値を示した (Table 2).

(4) 抗接着分子抗体による接着阻害効果

各癌細胞株と HUVEC の接着における細胞接着分子の重要性を検討する目的で抗接着分子抗体による接着阻害実験を行った. QC90 は抗 E-selectin 抗体で, PC-3, DU145 は抗 ICAM-1 抗体にて有意な接着阻害効果が認められた ($p < 0.05$ (Fig. 5)).

(5) 転写因子 $\text{NF}\kappa\text{B}$ の発現と活性化

$\text{NF}\kappa\text{B}$ (p65, p50) に対するポリクローナル抗体を用いたウェスタンブロットでは実験に用いたすべての細胞株で発現が確認された (Fig. 3). また蛍光染色では p65 サブユニットは $\text{IL-1}\beta$ 未刺激の状態で細胞質に存在し (不活性化状態) $\text{IL-1}\beta$ 刺激後 30 分後には核への移動 (活性化状態) が認められた. p50 サブユニットは $\text{IL-1}\beta$

刺激前よりも核にも存在し $\text{IL-1}\beta$ 刺激により核での染色が若干増強した (Fig. 6).

考 察

細胞接着分子は癌の浸潤, 転移において重要な役割を果たしている. 今回, この中で特に血管内皮細胞との接着機構に関与すると考えられる細胞接着分子の発現様式を前立腺癌細胞株を用いて検討した. さらにこれらの接着分子の発現を promote すると考えられる転写因子 $\text{NF}\kappa\text{B}$ に着目しその活性化についても検討を加えた. 今回の研究で判ったことを要約すると以下のようなになる.

1. 前立腺癌細胞株では血行性転移より得られた PC-3 と DU145 はよく似た培養分子の発現パターンを示したが, リンパ節転移より得られた LNCaP は異なる発現パターンを示した. 2. 血管内皮細胞への接着能はサイトカイン未刺激では前立腺癌細胞株が他の癌細胞株より有意に高く, サイトカイン刺激後はサイトカ

Fig. 5 Contribution of three cell adhesion molecules, E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1, to the adhesion of cultured prostate cancer cells to $\text{IL-1}\beta$ -activated HUVEC. All prostate cancer cells exhibited a significant inhibition of adhesion by treatment with the anti-ICAM-1 antibodies. Bars, SD.

Fig. 6 Nuclear translocation of NF κ B. IL-1 β (10ng/ml) was added for the indicated period before PC-3 cells were fixed for immuno-staining.

イン刺激後は差がなくなった。3. 前立腺癌細胞株と血管内皮細胞の接着において中心的な役割をはたしているのは ICAM-1 であると考えられた。4. 前立腺癌細胞株 3 種は NF κ B を発現しておりサイトカインによる活性化 (細胞質から核への移動) も正常に認められた。

前立腺癌は発見時すでに遠隔転移していることもしばしばで、ホルモン療法に反応しなくなった再燃癌は特に治療に難渋する。著者は前立腺癌の転移機構を解明することが早期の転移阻止につながると考え、高転移能を有する前立腺癌細胞株、即ちリンパ節転移由来の LNCaP、骨転移由来の PC-3、脳転移由来の DU145 について血管内皮との接着への関与が推察されている細胞接着分子の発現についての検討を行った¹⁴⁾¹⁵⁾。またコントロールの癌細胞株としてはすでに血管内皮細胞との E-selectin 依存性の接着機構が明らかになりつつある肺小細胞性未分化癌細胞株 QG90¹⁶⁾¹⁷⁾、ICAM-1 を強く発現している悪性黒色腫細胞株 WM266-4¹⁸⁾を用いた。前立腺癌細胞株における細胞接着分子の発現

パターンをみると特に ICAM-1 の発現が強かったが血管性転移株 (PC-3, DU145) とリンパ性転移株 (LNCaP) で発現強度、パターンの相違がみられたことは転移モデルを考えるうえで大変興味深い。

さらにこの前立腺癌細胞株 3 株の高い高転移能と血管内皮細胞との接着能との間に相関があるか検討してみたところ、サイトカイン未刺激では QC90 より明らかに HUVEC への接着能は高かった。これは恒常的に発現している E-selectin, ICAM-1, VCAM-1 によると考えられる。しかしサイトカイン刺激後は QC90 上にも E-selectin が、HUVEC 上に E-selectin, ICAM-1, VCAM-1 が誘導されてくるため接着細胞数で徐々に差がなくなってくることが推察された。

E-selectin が培養癌細胞の血管内皮細胞への接着に重要な役割を果たしていることは Sialyl Lewis X 発現変異大腸癌細胞株を用いて行われた Matsushita ら¹⁹⁾の接着実験によって明らかにされている。しかしこの実験では E-selectin は血管内皮細胞上に発現して

おり癌細胞上はリガンドである Sialyl Lewis X が発現していた。今回の実験結果では前立腺癌細胞上にも E-selectin が存在することが示された。E-selectin が rolling に関与するのに対し sticking において重要な役割を果たすことが推測されているのが ICAM-1 である。ICAM-1 については消化器系の癌、メラノーマなどの発現がすでに報告されており血行性転移への関与が推察されている²⁰⁾。今回の実験で前立腺癌においても ICAM-1 が強く発現しており、さらに抗体による接着阻害効果ももっとも高かったことより、ICAM-1 が血行性転移において重要な意義をもつことが証明された。

また E-selectin, ICAM-1, VCAM-1 は IL-1, TNF などのサイトカイン刺激により誘導されることから各細胞上清中の IL-1 β , TNF α 濃度を ELISA 法にて測定したが PC-3 で IL-1 β 濃度が若干高かった以外はすべて低値であった。この結果のみで autocrine 機構による細胞へのサイトカインによる恒常的刺激を否定することはできないが細胞接着分子の発現誘導には最低 0.1~1ng/ml の IL-1 β , TNF α 濃度は必要と考えられることよりその可能性は低いと考えられた。

さらにこれらの細胞接着分子の発現誘導を転写因子のレベルで考えてみた。転写因子 NF κ B は κ B 配列 (GGGRNNYYCC) と呼ばれる DNA に結合し、その制御下の遺伝子の発現を誘導する。 κ B 配列を持つ遺伝子には、IL-2 受容体の α 鎖や β インターフェロン等に代表される免疫系の受容体やサイトカインが多いことから²¹⁾、NF κ B は生理的に重要な因子として注目されている。NF κ B は 50K (P50) と 65K (P65) の 2 種類の蛋白質からなるヘテロ二量体であり休止期の細胞では細胞質に存在し、I κ B との複合体として存在する。サイトカインなどの細胞外からのシグナルに反応し I κ B がリン酸化される NF κ B から離れることにより NF κ B は活性化された核内に移行し転写活性をあらわす²²⁾ (Fig. 7)。E-selectin, ICAM-1, VCAM-1 遺伝子はいずれもプロモーター領域に κ B 配列を持ち NF κ B により発現制御がなされていると考えられている^{8)~13)}。今回、前立腺癌細胞株において E-selectin, ICAM-1, VCAM-1 の発現が認められたことから NF κ B が活性化された状態にあることを予測したが実際には NF κ B は細胞質に存在し不活性型で存在していた。NF κ B はさまざまな生理活性物質の遺伝子発現を制御しており特に血管内皮細胞において IL-1 β , TNF α で活性化され細胞接着分子の発現を誘導

Fig. 7 Activation of NF κ B. Upon stimulation by signals such as cytokines I κ B is separated from NF κ B and NF κ B then moves into nucleus where it activates target genes.

することがよく知られている。今回、IL-1 β , TNF α 刺激により NF κ B が活性化されるにもかかわらず、E-selectin, ICAM-1, VCAM-1 の発現レベルに変化がみられなかったことより、前立腺癌細胞では核内において NF κ B が κ B 配列に結合できないなんらかの機序 (inhibitor, mutation など) が存在する可能性が推察される。さらに、前立腺癌細胞株においては E-selectin, ICAM-1, VCAM-1 の発現誘導は NF κ B のみによるものではなく他の転写因子の関与が強く示唆されたのである。

近年、癌の浸潤、転移を様々なサイトカイン、細胞接着分子の遺伝子発現に関与している転写因子レベルでアンチセンス等を用いて抑制しようとする試みがなされ、すでに動物実験ではその効果が報告されている^{23)~25)}。したがって癌細胞上に発現し転移に関与している接着分子とその遺伝子発現を調節している転写因子を解明することは癌の治療に新しい局面を展開することとなる。今回、細胞接着分子の遺伝子発現ならびに発現誘導に関わる転写因子 NF κ B について前立腺癌細胞株における特徴を捉えることができた。これらの知見は近い将来の前立腺癌の遺伝子治療に役立つものと確信する。

結 語

1) 3 種類の前立腺癌細胞株 (PC-3, DU145, LNCaP) を用いて前立腺癌の血行性転移に関与すると思われる細胞接着分子の発現様式を検討した。

2) 前立腺癌細胞株では E-selectin, ICAM-1, VCAM-1 が発現しており特に ICAM-1 の発現が強

かった。また血管内皮細胞との接着においても ICAM-1が主要な役割を演じていることが推察された。

3) E-selectin, ICAM-1, VCAM-1はいずれもプロモーター領域に κ B 配列を持ちその遺伝子の発現誘導は転写因子 NF κ B の制御を受けていると考えられているが前立腺癌細胞株では他の転写因子の関与も考えられた。

稿を終えるにあたり、御指導ならびに御校閲を賜った恩師郡健二郎教授、本学医学研究所分子遺伝部門岡本 尚教授に深く感謝します。なお、本論文の要旨は第83回日本泌尿器科学会総会にて発表した。

文 献

- 1) Albelda, S.M.: Biology of disease: Role of integrins and other cell adhesion molecules in tumor progression and metastasis. *Lab. Invest.*, **68**, 4—17, 1993.
- 2) Fidler, I.J.: Selection of successive tumor lines for metastasis. *Nature (New Biol.)*, **242**, 148—149, 1973.
- 3) Takeichi, M.: Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science*, **251**, 1451—1455, 1991.
- 4) Siozaki, H., Tahara, H., Oka, H., Miyata, M., Kobayashi, K., Tamura, S., Iihara, K., Doki, Y., Hirano, S., Takeichi, M. and Mori, T.: Expression of immunoreactive E-cadherin adhesion molecules in human cancers. *Am. J. Pathol.*, **139**, 17—23, 1991.
- 5) Ley, K., Gaetgens, P., Fennie, C., Singer, M.S., Lasky, L.A. and Rosen, S.D.: Lectin-like cell adhesion molecule 1 mediates leukocyte rolling in mesenteric venules in vivo. *Blood*, **77**, 2553—2555, 1991.
- 6) Von Andorian, U.H., Chambers, J.D., McEvoy, L. M., Bargatze, R.F., Arfors, K.E. and Butcher, E. C.: Two-step model of leukocyte-endothelial cell interaction in inflammation: Distinct roles for LECAM-1 and the leukocyte β 2 integrins in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **88**, 7538—7542, 1991.
- 7) Butcher, E.C.: Leukocyte-endothelial cell recognition: Three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell*, **67**, 1033—1036, 1991.
- 8) Schindler, U. and Baichwal, V.R.: Three NF κ B binding sites in the human E-selection gene required for maximal tumor necrosis factor alpha-induced expression. *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 5820—5831, 1994.
- 9) Neish, A.S., Williams, A.J., Palmer, H.J., Whitley, M.Z. and Collins, T.: Functional analysis of the human vascular cell adhesion molecule 1 promoter. *J. Exp. Med.*, **176**, 1583—1593, 1992.
- 10) Voraberger, G., Schafer, R. and Stratowa, C.: Cloning of human gene for intercellular adhesion molecule 1 and its 5'-regulatory region. *J. Immunol.*, **147**, 2777—2786, 1991.
- 11) Montgomery, K.F., Osborn, L., Hession, C., Tizard, R., Goff, D., Vassallo, C., Tarr, P.I., Bomsztyk, K., Lobb, R., Harlan, J.M. and Pohlman, T.H.: Activation of endothelial leukocyte adhesion molecule 1 (ELAM-1) gene transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **88**, 6523—6527, 1991.
- 12) Whelan, J., Ghersa, P., Huijsduijnen, R.H., Gray, J., Chandra, G., Talabot, F. and DeLamarter, J.F.: An NF κ B-like factor is essential but not sufficient for cytokine induction of endothelial leukocyte adhesion molecule 1 (ELAM-1) gene transcription. *Nuc. Acids Res.*, **19**, 2645—2653, 1991.
- 13) Ledebur, H.C. and Parks, T.P.: Transcriptional regulation of intercellular adhesion molecule-1 gene by inflammatory cytokines in human endothelial cells. *J. Biol. Chem.*, **270**, 933—943, 1995.
- 14) Olea, N., Sakabe, K., Soto, A.M. and Sonnenschein, C.: The proliferative effect of "anti-androgens" on the androgensensitive human prostate tumor cell line LNCaP. *Endocrinology*, **126**, 1457—1463, 1990.
- 15) Carruba, G., Pavone, C., Macaluso, P., Mesiti, M., d'Aquino, A., Vita, G., Sica, G. and Castignetta, L.: Morphometry of in vitro systems: An image analysis of two human prostate cancer cell lines (PC 3 and DU145). *Path. Res. Pract.*, **185**, 704—708, 1989.
- 16) Kinjo, M., Oka, K., Naito, S., Kohga, S., Tanaka, K., Oboshi, S., Hayata, Y. and Yasumoto, K.: Thromboplastic and fibrinolytic activities of cultured human cancer cell lines. *J. Biol. Chem.*, **268**, 26790—26795, 1993.
- 17) Tozawa, K., Sakurada, S., Kohri, K. and Okamoto, T.: Effects of anti-NF κ B reagents in blocking adhesion of human cancer cells to vascular endothelial cells. *Cancer Res.*, **55**, 4162—4167, 1995.
- 18) Martin-Padura, I., Mortarini, R., Lauri, D., Bernasconi, S., Sanchez-Madrid, F., Pariani, G., Mantovani, A., Anichini, A. and Dejana, E.: Heterogeneity in human melanoma cell adhesion to cytokine activated endothelial cells correlates with VLA-4 expression. *Cancer Res.*

- 51, 2239—2241, 1991.
- 19) Matsushita, Y., Nakamori, S., Seftor, E.A., Hendrix, M.J.C. and Irimura, T.: Human colon carcinoma cells with increased invasive capacity obtained by selection for sialyl-dimeric Lex antigen. *Exp. Cell Res.*, **196**, 20—25, 1991.
  - 20) 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. U.S.A.*, **86**, 641—644, 1989.
  - 21) Kawakami, K., Scheidereit, C. and Roeder, R.: Identification and purification of a human immunoglobulin enhancer-binding protein (NF κ B) that activates transcription from human immunodeficiency virus type 1 promoter in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **85**, 4700—4704, 1988.
  - 22) Baeuerle, P.A.: The inducible transcription activator NF κ B: Regulation by distinct protein subunits. *Biochem. Biophys. Acta*, **1072**, 63—80, 1991.
  - 23) Higgins, K.A., Perez, J.R., Coleman, T.A., Dorshkind, K., McComas, W.A., Sarmiento, U.M., Rosen, C.A. and Narayanan, R.: Antisense inhibition of p65 subunit of NF κ B blocks tumorigenicity and causes tumor regression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **90**, 9901—9905, 1993.
  - 24) Kitajima, I., Shinohara, T., Bilakovics, J., Brown, D.A., Xu, X. and Nerender, M.: Ablation of transplanted HTLV-1 Taxtransformed tumors in mice by antisense inhibition of NF κ B. *Science*, **258**, 1792—1795, 1992.
  - 25) Sokoloski, J.A., Sartorelli, A.C., Rosen, C.A. and Narayanan, R.: Antisense oligonucleotides to the p65 subunit of NF κ B block CD11b expression and alter adhesion properties of differentiated HL-60 granulocytes. *Blood*, **82**, 625—632, 1993.

(1996年1月8日受付, 6月19日受理, 特別掲載)