



Protein tyrosine phosphatase, SAP-1のヒト肝細胞癌における腫瘍抑制効果

長野, 秀信

(Citation)

神戸大学医学部紀要, 62(3/4):127-136

(Issue Date)

2002-03

(Resource Type)

departmental bulletin paper

(Version)

Version of Record

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/00317231>



Protein tyrosine phosphatase, SAP-1のヒト肝細胞癌 における腫瘍抑制効果

長 野 秀 信

神戸大学大学院医学系研究科生体情報医学講座外科病理学分野
(指導：伊東 宏教授)

連絡先：長野 秀信

神戸大学大学院医学系研究科応用分子医学講座

糖尿病・消化器・腎臓内科

兵庫県神戸市中央区楠町7-5-1

TEL: (078)382-5861

FAX: (078)382-2080

(平成14年1月23日受付)

【要約】

SAP-1は細胞質領域に protein tyrosine phosphatase (PTP) ドメインを1つ有し細胞外ドメインに8個のフィブロネクチンタイプⅢ様構造と多数のN-グリコシレーションサイトを有すヒト膜貫通型の PTP であり、インテグリン媒介シグナリングの負の調節因子として関係する。この脱リン酸化酵素はある種の肝癌細胞株や大腸癌細胞株に高度に発現を認めるが、正常の脾臓、大腸組織には発現を認めず、この所見の生理学的意義は不確かである。

本研究ではまず、肝細胞癌における SAP-1 の役割を、外科的切除により得たヒト肝細胞癌組織を用いてその発現について検討した。免疫組織染色とイムノブロット解析により慢性肝炎組織や肝硬変組織で正常肝組織とほぼ同等に SAP-1 発現が認められた。高分化肝癌では11例中8例 (72.7%) の肝癌組織において周囲非癌部肝組織に比較し同等ないしやや高度に SAP-1 発現を認めた。一方、中分化肝癌の13例中11例 (84.6%)、さらに低分化肝癌6例中全例において SAP-1 発現は周囲非癌部肝組織に比較し低発現であった。さらに興味深いことに低分化肝癌組織では6例中5例 (83.3%) で SAP-1 発現をほぼ認めなかった。

SAP-1 を恒常的に発現するように遺伝子導入された低分化肝細胞癌細胞株 HLF 及び HLF 細胞において形態変化や細胞遊走能の明らかな低下を認めた。

以上の結果から SAP-1 発現はヒト肝細胞癌の脱分化過程において発現抑制を受けており、この発現抑制は

肝癌の進展において非常に重要な役割を担うことが示唆された。

【緒言】

癌遺伝子と癌抑制遺伝子の種々の変化がヒトにおける多段階発癌に寄与することが知られている⁽¹⁾。Bcr-Abl や v-Src を含め様々な癌遺伝子産物がチロシンキナーゼ (PTK) 活性を有し、これら酵素の細胞内標的蛋白の異常なリン酸化により発癌が促進されていることが報告されている^(2, 3)。PTK を脱リン酸化する PTP もまた発癌に影響しており、PTP は PTK に拮抗する活性を示すことが述べられている⁽⁴⁻⁶⁾。実際、幾つかの PTP はある種の癌の進展に関与することが知られている。例えば、PTP β の発現は多くの肺癌において抑制され⁽⁷⁾、PTP γ 遺伝子は腎癌や肺癌においてしばしば欠失することが知られている^(8, 9)。

ヒト肝細胞癌 (HCC) は Rb, p53, p16, テロメラーゼといった種々の遺伝子異常の組み合わせの結果進展すると考えられている⁽¹⁰⁻¹²⁾。他の細胞においても言えることだが、肝細胞の発育・分化においても細胞蛋白のチロシンリン酸化は不可欠である⁽¹³⁾。加えて、マウスやラットの部分的肝切除後の肝再生過程で幾つかの PTP 発現が亢進している報告がある⁽¹⁴⁻¹⁶⁾。これらのことより生理学的また病理学的条件での肝細胞機能における PTP の重要性が分かる。従って PTP の機能障害は HCC の進展に寄与すると思われるが、HCC の病因となる特異的 PTP の研究は多くない^(16, 17)。

キーワード：肝細胞癌, 免疫組織染色, Protein tyrosine phosphatase, SAP-1, 脱分化, 細胞遊走能

SAP-1は膜貫通型（受容体型）PTPであり、ある種の腫瘍細胞株や大腸癌細胞株に高度に発現を認めるPTPとして同定された⁽¹⁸⁾。この酵素は受容体型PTPのクラス2サブファミリーに分類され、構造的にはPTP β やDEP-1, DPTP10Dに類似する。SAP-1はP130CasやFAKといった接着班関連基質の脱リン酸化を媒介して細胞の増殖や拡散を負に調節することが報告されている⁽²²⁾。SAP-1の酵素活性は細胞密度依存性の成長停止を示す細胞においても増大する⁽²²⁾。さらに、乳癌細胞においてSAP-1 mRNA発現は抗癌剤への反応により分化過程で増加する⁽²³⁾。これらの観察から、SAP-1は癌細胞の分化や成長停止に帰するシグナルを生じることにより腫瘍阻止因子として働くことが示唆される。しかしこのPTPの発癌における具体的な役割は未知の部分が多い。

SAP-1は正常肝で多く発現しており⁽¹⁸⁾、HCCへの移行や進展に関与している可能性が考えられた。この仮説を究明するため、種々の組織学的分化度の段階にあるヒトHCCにおけるSAP-1発現を検討した。本研究でSAP-1発現量はHCCの分化度に逆相関することを示した。さらに、低分化のHCC細胞株にSAP-1を強制発現し、細胞遊走能の顕著な低下を伴う細胞形態の変化を認めた。

【方法】

＜臨床的背景と肝組織サンプル＞

組織学的検討に際して30例の肝癌組織（外科切除肝癌組織25例と剖検肝癌組織5例）を使用した。臨床的背景を表1に示す。非癌部肝組織の30例中28例に肝硬変、2例に慢性肝炎を認めた。癌組織の分化度はEdmondson & Steiner分類に準拠した上で、高分化肝癌（WD-HCC）、中分化肝癌（MD-HCC）、低分化肝癌（PD-HCC）の3つのカテゴリーに分類し評価した⁽²⁴⁾。正常肝組織は大腸癌肝転移例の非腫瘍部肝組織より使用した。

＜免疫組織染色＞

免疫組織染色にはLarge Volume DAKO LSAB kitを使用し、既報にある家兎抗ヒトSAP-1ポリクローナル抗体又は、マウス抗ヒトSAP-1モノクローナル抗体を用いた^(22, 25)。10%緩衝ホルマリン固定パラフィン包埋ブロックから5 μ m薄切片を作製し、脱パラフィンしエタノール処理後、3% H_2O_2 にて内因性ペルオキシダーゼを不活化し、マイクロウェーブ抗原賦活処理を施行し、ブロッキング試薬で反応させた。その後一次抗体としてPBSにて50倍希釈した家兎抗ヒ

トSAP-1ポリクローナル抗体又は、200倍希釈したマウス抗ヒトSAP-1モノクローナル抗体と4℃にて一晚インキュベートし、その後50mM Tris-HClにて洗浄後、ビオチン化二次抗体と室温にて1時間インキュベートした。SAP-1発現強度を光顕にて検鏡評価し4段階にスコアリングした。

＜イムノブロッティング＞

肝組織または培養細胞サンプルは、5mM NaF, 1mM PMSF, aprotinin (10 μ g/ml), leupeptin (1 μ g/ml)を含む氷冷したRIPA buffer (20mM Tris-HCl (pH7.4), 150mM NaCl, 2mM EDTA, 0.1% SDS, 1% deoxycholate, 1% NP-40) 中でホモジナイズした。ホモジネートは4℃で15分間10000 $\times$ gにて遠沈し上清を蛋白定量後、400 μ g (肝組織) または、100 μ g (培養細胞) を7.5% SDS-polyacrylamide gelを用い電気泳動した後、エレクトロブロットした。その後フィルターを10%ミルクバッファー中でブロッキングし100倍希釈したSAP-1ポリクローナル抗体を含むT-PBS中で4℃で一晩インキュベートした。T-PBSで洗浄の後1000倍希釈したhorseradish peroxidase conjugated goat anti rabbit IgG (Amersham) を含むT-PBS中で1時間インキュベートした。その後フィルターをT-PBSで3回洗浄しECL detection system (Amersham) で発色させSAP-1のバンドを検出した^(26, 27)。

＜肝癌細胞株とSAP-1遺伝子導入＞

2種の低分化肝癌細胞株HLF, HLEは10%FBS添加DMEMにて培養した。SAP-1全長cDNAを含むpSR α プラスミドベクター1 μ g又は1 μ gのベクター⁽¹⁸⁾のみをEffectene Transfection Kit (QIAGEN)を用いトランスフェクションを行った。Kitのプロトコルに従いトランスフェクション後48時間は上述のメディアで培養し、その後G418 (600 μ g/ml) (GIBCO) 添加し培養を継続、3週間後にSAP-1恒常発現クローンを得た。SAP-1恒常発現クローンは前述に使用したポリクローナルSAP-1抗体を用い発現を確認した。各々の細胞形態は位相差顕微鏡を用い観察した。

＜遊走能アッセイ＞

QCM-Collagen I Quantitative Cell Migration Assay Kit (Chemicon)を用いプロトコルに従い遊走能につきアッセイした。24時間血清飢餓状態にした 2.5×10^5 /mlの細胞を、Collagen Iにてコートされ、8 μ m孔を有すBoyden chamber上層にて48時間培養の後、孔を通り抜け遊走した細胞を染色し抽出

バッファーにて処理の後 570nm における吸光度を測定し評価した。

<統計>

統計学的解析はMann-Whitney *U* testと Kruskal-Wallis test を用い検定し, $p < 0.05$ を統計学的有意差ありとした。

【結果】

<ヒト肝細胞癌組織における SAP-1発現>

免疫組織染色にて 30 例の肝癌サンプルにつきSAP-1発現を解析した。30 例の臨床学的背景を表 1 に, 免疫組織染色の代表例を図 1 に示す。正常肝組織の肝細胞において, SAP-1 は細胞膜に優位に発現を認め, 細胞質にも微かな発現をみた(図 1A&E)。類洞内皮細胞での発現は明瞭ではなかった。胆管細胞において中等度の発現をみた。門脈の内皮細胞では弱く発現を認めたが, 間質の細胞では認めなかった。

表 1 : 対象 30 例の臨床的背景

肝癌組織分化度	高分化肝癌 n=11	中分化肝癌 n=13	低分化肝癌 n=6
性別(男性・女性)	11/0	11/2	4/2
平均年齢(歳)	58.2(52-67)	56.1(34-72)	65.0(63-66)
HBsAg/HCVAb/アルコール	2/9/0	6/7/0	0/5/1
AFP(ng/ml)	4-303	21-19840	5117-313930
非癌部肝組織(背景肝)			
慢性肝炎	2	0	0
肝硬変	9	13	6

高分化肝癌では 11 例中 8 例 (72.7%) の肝癌組織において周囲非癌部肝組織に比較し同等ないしやや高度にSAP-1発現を認めた。(図 1B&F, 表 2)

中分化肝癌の 13 例中 11 例 (84.6%) では肝癌組織において周囲非癌部肝組織に比較し SAP-1発現は減少しており (図 1C&G, 表 2),さらに低分化肝癌 6 例中全てにおいて肝癌組織では周囲非癌部肝組織に比較し明らかな低発現であり (図 1C&G), 6 例中 5 例 (83.3%) では SAP-1発現をほとんど認めなかった(表 2)。このように SAP-1発現レベルはヒト肝癌組織において癌部組織の分化の状態に密に関連があるように思われた。

イムノプロット解析から, 非癌部においては, 慢性肝炎, 肝硬変組織における SAP-1発現量は組織的に正常な肝組織における SAP-1発現と同等のレベルを示した (図 2A)。肝癌組織においては, 免疫組織染色結果と同じく中分化肝癌, 低分化肝癌に比し高分化肝癌ではより高度に SAP-1発現が確認された (図 2B)。

表 2 : 癌組織, 非癌部肝組織での免疫組織染色による SAP-1 発現強度

	SAP-1 発現レベル			
	1+	2+	3+	4+
癌組織 (HCC)				
高分化肝癌(WD-HCC)	0	2	6	3
中分化肝癌(MD-HCC)	1	8	3	1
低分化肝癌(PD-HCC)	5	1	0	0
非癌部肝組織(non-HCC)				
慢性肝炎	0	0	2	0
肝硬変	0	2	18	8

SAP-1 発現強度は 1 (微弱), 2 (弱), 3 (中等度), 4 (強度)の 4 段階に分類し評価した。

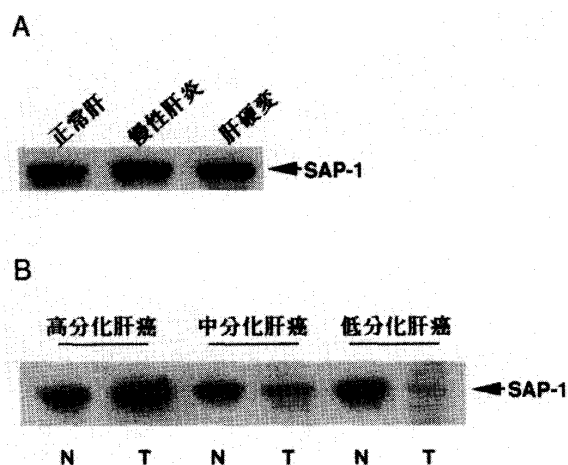


図 2. ヒト肝癌の組織学的分化度の各ステージと非癌部肝組織におけるSAP-1 発現のイムノプロット分析:A:正常肝組織と慢性肝炎, 肝硬変肝組織における SAP-1 発現。B:肝癌の組織学的分化度の各ステージと非癌部肝硬変組織における SAP-1 発現。(N:非癌部, T:癌部)

一方で, 各肝癌組織の周囲非癌部肝硬変組織においては隣接癌組織の分化度に関わりなくSAP-1 発現量は変化なく同等に認められた (図 2B)。

SAP-1 発現レベルと HCC の組織分化度の関係についてスコアリング結果を統計学的に解析した。HCC の 3 段階の分化度において, SAP-1発現量は高分化肝癌>中分化肝癌>低分化肝癌の順で減少した(高分化肝癌 vs. 中分化肝癌で $P < 0.01$, 中分化肝癌 vs. 低分化肝癌で $P < 0.01$ (図 3))。さらに, 中分化肝癌, 低分化肝癌の癌部では各々相応する周囲非癌部肝組織に比べSAP-1発現量は減少しており, この変化は低分化肝癌でより顕著に認められた(図 3)。肝癌組織の周囲非癌部肝組織における SAP-1発現量は隣接癌組織の分化度には関係なく, 有意差を認めなかった。

脱分化の過程を経てヒト肝癌が進展していくことと

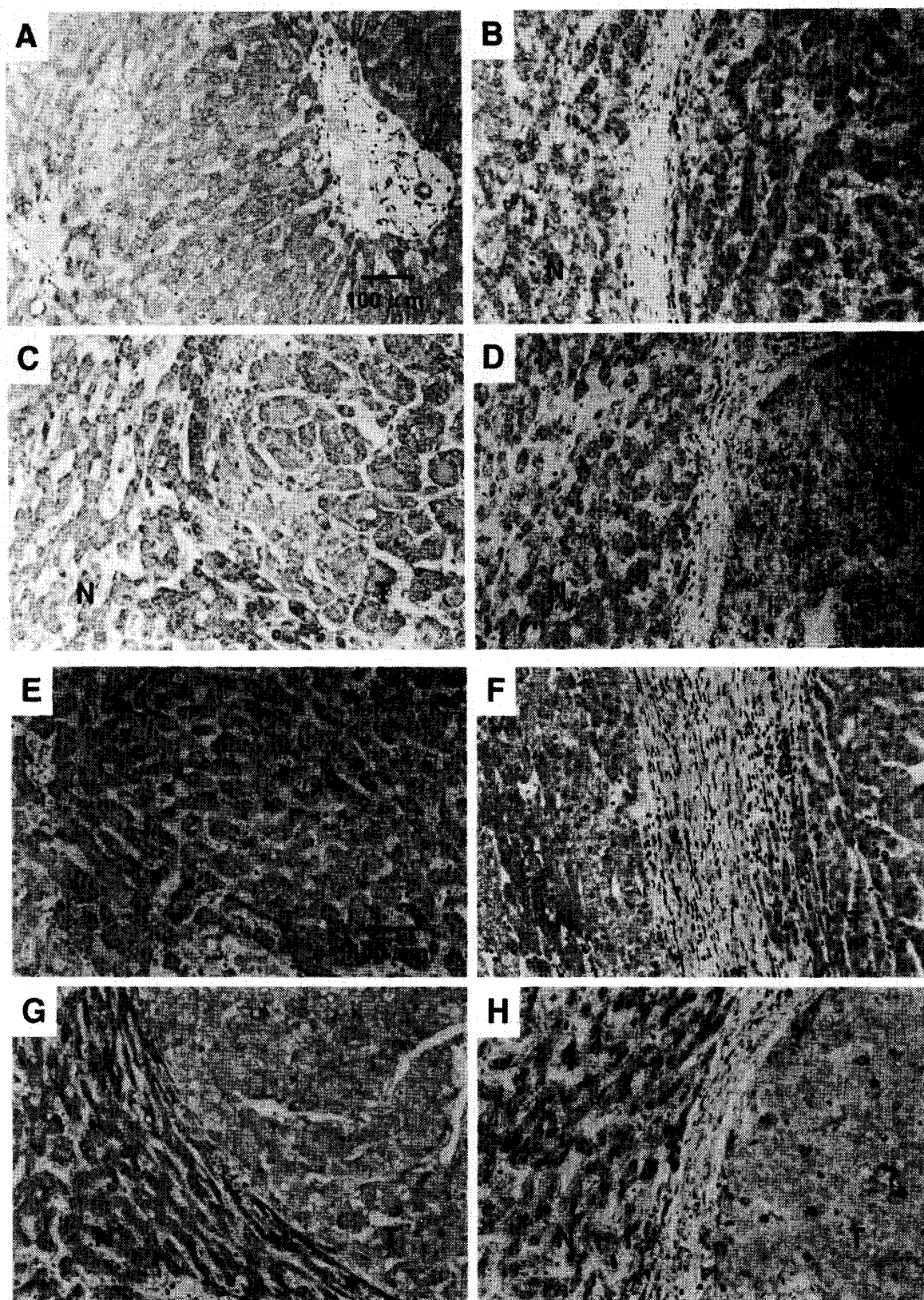


図1. 1.ヒト肝癌の組織学的分化度の各ステージにおける SAP-1発現の免疫組織染色：正常肝 (A&E)，高分化肝癌 (B&F)，中分化肝癌 (C&G)，低分化肝癌 (D&H)における SAP-1発現を示す。A-D に SAP-1 ポリクローナル抗体を，E-H に SAP-1 モノクローナル抗体を用いた代表例を提示。中分化肝癌における SAP-1 発現は周囲非癌部に比し低発現，低分化肝癌ではわずかな発現を見るのみである(D&H の右半部分)。(N:非癌部，T:癌部，倍率×100)

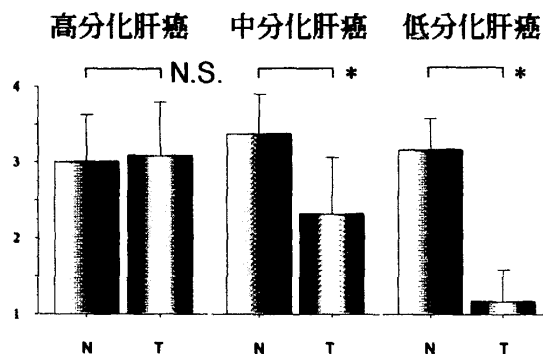


図3. ヒト肝癌 30 例の、分化度による SAP-1発現強度のスコアリング：非癌部(N)と癌部(T)でのSAP-1 発現強度を 4 段階にスコアリングし各分化度別に統計処理。データは平均±標準偏差を示す。(N.S.:有意差なし, *:P<0.01)

併せて、上記の結果から、SAP-1 発現量は腫瘍の悪性度と逆相関することを示している。

<肝癌細胞の形態と遊走能における SAP-1 発現効果>

SAP-1発現低下が転移能や浸潤能といった進行肝癌の形質に関係するかもしれないが、このことは肝癌の進行した結果かもしれないため、この可能性を検証するため、ヒト低分化肝癌細胞株の HLF, HLE にSAP-1発現ベクターを遺伝子導入した。両細胞株で内因性の SAP-1発現をほぼ認めず(図4), 両細胞株から確立された SAP-1発現クローンのうち、より高発現を有するF-SAP-CとE-SAP- δ (図4)が他の同様な表現型を有するクローンのうちから以後の検討に用いられた。通常の培養条件下で、HLF, HLEの親細胞とベクター

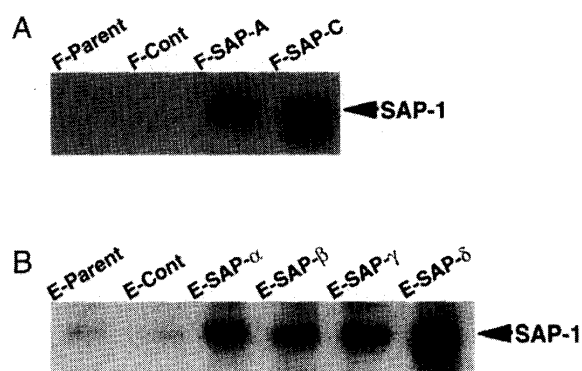


図4. 低分化肝癌細胞株へのトランスフェクションによる SAP-1 恒常発現細胞株の樹立:A,Bに非トランスフェクション HLF 親株 (F-Parent), HLE親株 (E-Parent), ベクターのみ導入 HLF 株 (F-Cont), HLE 株 (E-Cont), SAP-1 恒常発現 HLF 株(F-SAP-A, F-SAP-C), HLE 株(E-SAP- α , E-SAP- β , E-SAP- γ , E-SAP- δ) をそれぞれ示す。イムノブロッティングにより SAP-1発現を確認。

のみを導入された細胞はやや長く伸びた、紡錘形の、各細胞が緩く結びついた形状を示した (図5)。一方、SAP-1高発現クローンのF-SAP-C (図5A)と E-SAP- δ (図5B)は互いにより強く結びついてコンパクトにコロニー形成する、平たい形状を示した。このように SAP-1強制発現により肝癌細胞に形態変化を認めた。既報でもCHO細胞にSAP-1の過剰発現により同様な変化を認めている⁽²²⁾。さらに確立したSAP-1高発現クローンで、Collagen Iをコートした膜を用いた Boyden chamber assay により遊走能を検討した。HLF 細胞とベクターのみ導入 HLF 細胞と 2 種の SAP-1導入 HLF クローンをを用い、SAP-1導入 HLF クローンである F-SAP-A と F-SAP-C で非導入細胞に比較し優位差をもって遊走能が抑制されることが示された (図6)。

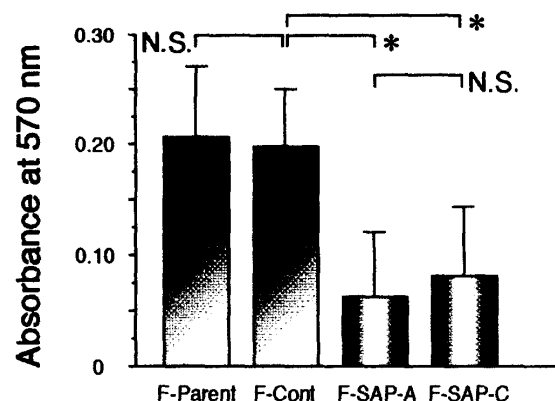


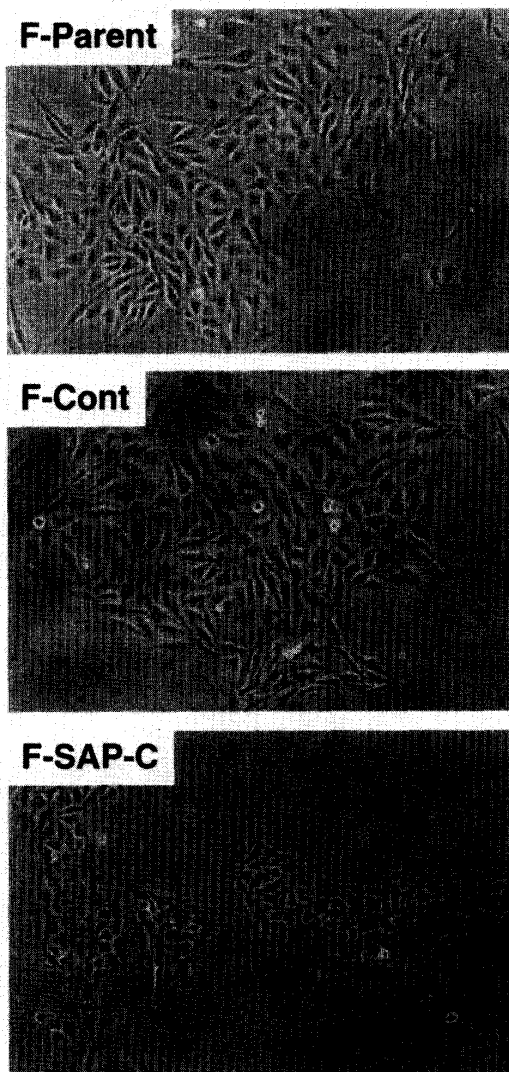
図6. SAP-1 強制発現による肝癌細胞株の遊走能に対する効果：非トランスフェクション HLF 親株 (F-Parent), ベクターのみ導入 HLF 株(F-Cont), SAP-1 恒常発現 HLF 株 (F-SAP-A, F-SAP-C) を用いた。SAP-1 恒常発現 HLF 株において有意な遊走能低下を認める。(N.S.:有意差なし, *:P<0.01 vs.control)

【考察】

ヒト肝癌の組織学的分化度が SAP-1 発現レベル減少に伴っていることを示した。高分化肝癌は一般に成長速度が緩徐で転移が殆ど認められない特徴を有すが⁽²⁹⁾, SAP-1 は高分化肝癌において最も豊富に発現する。さらに、低分化肝癌細胞に SAP-1を恒常発現させることにより明らかな遊走能の低下を伴う細胞形態の変化をみたことと、既報にもある、SAP-1 が細胞増殖を負に調節する⁽²²⁾という事実と併せてこの PTP がヒト肝癌の進展に抑制的に作用することが示唆される。

大半の低分化肝癌において SAP-1 発現が認められないことから、この蛋白がヒト肝癌の早期の段階では

A



B

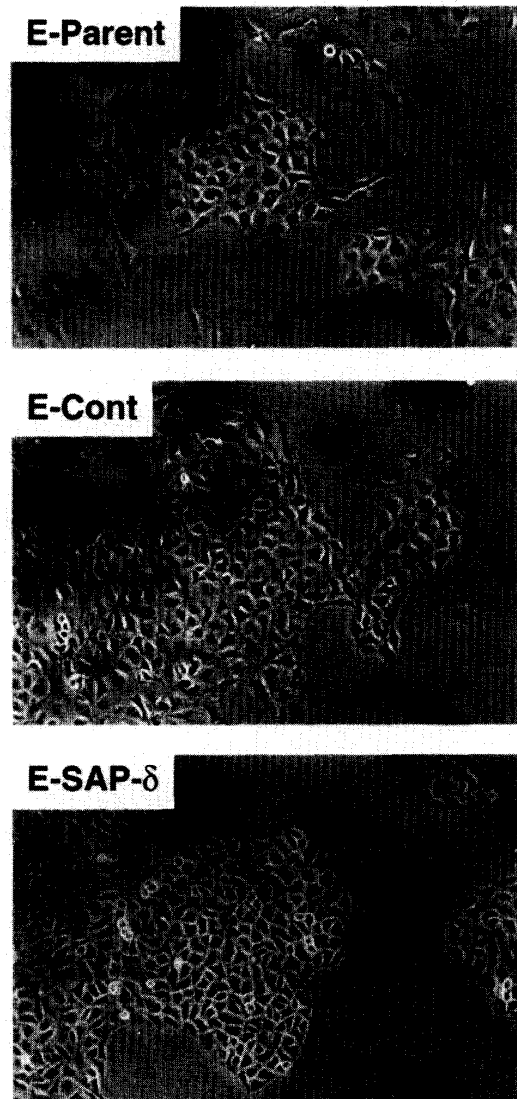


図5. SAP-1 の強制発現による肝癌細胞株の形態変化：HLF 由来株(A), HLE 由来株(B)について示す。非トランスフェクション HLF親株(F-Parent), HLE 親株(E-Parent), ベクターのみ導入 HLF 株(F-Cont), HLE 株(E-Cont), SAP-1 恒常発現 HLF 株(F-SAP-C), HLE 株(E-SAP- δ)を位相差顕微鏡を用いて観察 (倍率 $\times 100$)。SAP-1 非導入細胞は紡錘形の、各細胞が緩く結びついた形状を示し、SAP-1高発現クローンは互いにより強く結びついてコンパクトにコロニー形成する形状を示した。

なく、比較的後期の段階で発現抑制を受けていることが考えられた。このことは、SAP-1 発現が大腸癌組織には豊富で、癌周囲の非癌部大腸組織には発現が認められないとする以前の報告⁽¹⁸⁾とは矛盾するように思われたが、SAP-1 発現量は、大腸癌の進展につれて減少する⁽²⁵⁾ことが分かっており、今回の肝癌の場合と同様であった。さらに、数例ではあるが、高分化肝癌例で SAP-1 発現レベルが肝癌組織において周囲非癌部肝組織より増加していた。過去に ERK や c-MYC が低分化肝癌で発現亢進するとの報告例があるが^(30, 31),

PTP 発現をヒト肝癌の組織学的分化度との相関観点から報告した例はない。今回の結果から SAP-1 はヒト肝癌の早期の段階で誘導され、発癌の後期の段階で抑制を受ける PTP であると考えられた。構造的に SAP-1 に類似する受容体型 PTP である PTP α の発現パターンはヒト乳癌の進展過程で、SAP-1 がヒト肝癌で示すパターンと同様である。

SAP-1 の強制発現が 2 種の低分化度の肝癌細胞株の遊走能の低下を来すだけでなく形態の変化を来すことは、この PTP が肝細胞の運動性を負に調節する

ことを示唆している。もし今回報じた SAP-1 の発現抑制が単に HCC の進展の結果としてもたらされたものであるならば、SAP-1 蛋白の強制発現はこれらの細胞においてその性質に本質的な効果をもたらし得ないと考えられる。SAP-1 の発現量が HCC 進展の後期段階で減少することと併せてこれらの結果は、少なくとも部分的には SAP-1 発現抑制が、進行肝臓の転移や浸潤といった能力を強調するであろうという概念を支持するものになる。

SAP-1 が HCC 細胞の遊走において阻止的に働くメカニズムに関しては、この PTP が、細胞の遊走において重要な役割を担う P130Cas や FAK^(33, 34) の脱リン酸化を触媒作用することでインテグリン媒介シグナリングを負に調節することが報告されている⁽²²⁾。また、これらの蛋白の発現増強やチロシンリン酸化の増強が HCC 細胞を含む種々の癌細胞の遊走や浸潤活性を高めることも知られている⁽³⁵⁻³⁷⁾。よってこれら接着班関連蛋白の SAP-1 による脱リン酸化は HCC 細胞の遊走阻止につながるように思われた。

最後に、今回、SAP-1 発現レベルはヒト肝臓の組織学的分化度に密接に関連することを示した。さらに SAP-1 の強制発現により HCC 細胞の形態に変化をもたらすのみならずその遊走能力を劇的に減少させた。よって、SAP-1 がこの致死的な病気の進展に主要な役割を担っていることが示唆された。

【謝意】

この研究に際して多くのご教示を頂いた応用分子医学講座糖尿病・消化器・腎臓内科の野口哲也先生と生体情報学講座外科病理学分野の林祥剛先生に厚くお礼申し上げます。

【文献】

1. Sugimura, T.: Multistep carcinogenesis: a 1992 perspective. *Science* 258:603-607, 1992.
2. Fantl, W.J., Johnson, D.E., Williams, L.T.: Signaling by receptor tyrosine kinases. *Annu Rev Biochem* 62:453-481, 1993.
3. Cantley, L.C., Auger, K.R., Carpenter, C., Duckworth, B., Graziani, A., Kapeller, R., Soltoff, S.: Oncogenes and signal transduction. *Cell* 64:281-302, 1991.
4. Tonks, N.K.: Protein tyrosine phosphatases. *Semin Cell Biol* 4:373-377, 1993.
5. Hunter, T.: Protein kinases and phosphatases:

the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell* 80:225-236, 1995.

6. Walton, K.M., Dixon, J.E.: Protein tyrosine phosphatases. *Annu Rev Biochem* 62:101-120, 1993.
7. De Vries, L., Li R. Y., Ragab, A., Ragab-Thomas, J.M., Chap, H.: Expression of a truncated protein-tyrosine phosphatase mRNA in human lung. *FEBS Lett* 282:285-288, 1991.
8. Tsukamoto, T., Takahashi, T., Ueda, R., Hibi, K., Saito, H., Takahashi, T.: Molecular analysis of the protein tyrosine phosphatase gamma gene in human lung cancer cell lines. *Cancer Res* 52:3506-3509, 1992.
9. LaForgia, S., Morse, B., Levy, J., Barnea, G., Cannizzaro, L.A., Li, F., Nowell, P.C. Boghosian-Sell, L., Glick, J., Weston, A.: Receptor protein-tyrosine phosphatase gamma is a candidate tumor suppressor gene at human chromosome region 3p21. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:5036-5040, 1991.
10. Rogler, C.E., Chisari, F.V.: Cellular and molecular mechanisms of hepatocarcinogenesis. *Semin Liver Dis* 12:265-278, 1992.
11. Nishida, N., Fukuda, Y., Kokuryu, H., Toguchida, J., Yandell, D.W., Ikenaga, M., Imura, H., Ishizaki, K.: Role and mutational heterogeneity of the p53 gene in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 53:368-372, 1993.
12. Tahara, H., Nakanishi, T., Kitamoto, M., Nakashio, R., Shay, J.W., Tahara, E., Kajiyama, G. Ide, T.: Telomerase activity in human liver tissues: comparison between chronic liver disease and hepatocellular carcinomas. *Cancer Res* 55:2734-2736, 1995.
13. Palmer, H.J., Tuzon, C.T., Paulson, K.E.: Age-dependent decline in mitogenic stimulation of hepatocytes. Reduced association between Shc and the epidermal growth factor receptor is coupled to decreased activation of Raf and extracellular signal-regulated kinases. *J Biol Chem* 274:11424-11430, 1999.
14. Higashitsuji, H., Arii, S., Furutani, M., Imamura, M., Kaneko, Y., Takenawa, J., Nakayama, H., Fujita, J.: Enhanced expression of multiple protein tyrosine phosphatases in the regenerating mouse liver: isolation of

- PTP-RL10, a novel cytoplasmic-type phosphatase with sequence homology to cytoskeletal protein 4.1. *Oncogene* 10:407-414, 1995.
15. Saito, S., Hashimoto, N., Tokita, K., Toyoda, M., Suzuki, Y., Goldstein, B.J., Suzuki, H. Makino, H., Saito, Y.: Changes of expression of phosphotyrosine phosphatases in rat hepatocellular carcinoma induced by 3'-methyl-4-dimethylamino-azobenzene. *Biochem Biophys Res Commun* 227:406-412, 1996.
 16. Kitamura, T., Nakamura, K., Mizuno, Y., Kikuchi, K.: Gene expression of protein tyrosine phosphatases in regenerating rat liver and rat ascites hepatoma cells. *Jpn J Cancer Res* 86:811-818, 1995.
 17. Ikuta, S., Itoh, F., Hinoda, Y., Toyota, M., Makiguchi, Y., Imai, K.: Expression of cytoskeletal-associated protein tyrosine phosphatase PTPH1 mRNA in human hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol* 29:727-732, 1994.
 18. Matozaki, T., Suzuki, T., Uchida, T., Inazawa, J., Ariyama, T., Matsuda, K., Horita, K. Noguchi, H., Mizuno, H., Sakamoto, C., Kasuga, M.: Molecular cloning of a human transmembrane-type protein tyrosine phosphatase and its expression in gastrointestinal cancers. *J Biol Chem* 269:2075-2081, 1994.
 19. Krueger, N.X., Streuli, M. Saito, Saito, H.: Structural diversity and evolution of human receptor-like protein tyrosine phosphatases. *EMBO J* 9:3241-3252, 1990.
 20. Ostman, A., Yang, Q., Tonks, N.K.: Expression of DEP-1 a receptor-like protein-tyrosine-phosphatase, is enhanced with increasing cell density. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:9680-9684, 1994.
 21. Tian, S.S., Tsoulfas, P., Zinn, K.: Three receptor-linked protein tyrosine phosphatases are selectively expressed on central nervous system axons in the *Drosophila* embryo. *Cell* 67:675-685, 1991.
 22. Noguchi, T., Tsuda, M., Takeda, H., Takada, T., Inagaki, K., Yamao, T., Fukunaga, K. Matozaki, T., Kasuga, M.: Inhibition of cell growth and spreading by stomach cancer-associated protein-tyrosine phosphatase-1 (SAP-1) through dephosphorylation of p130cas. *J Biol Chem* 276:15216-15224, 2001.
 23. Keane, M.M., Lowrey, G.A., Ettenberg, S.A., Dayton, M.A., Lipkowitz, S.: The protein tyrosine phosphatase DEP-1 is induced during differentiation and inhibits growth of breast cancer cells. *Cancer Res* 56:4236-4243, 1996.
 24. Edmondson, H.A., Steiner, P.E.: Primary carcinoma of the liver: a study of 100 cases among 48,900 necropsies. *Cancer* 7:462-503, 1954.
 25. Seo, Y., Matozaki, T., Tsuda, M., Hayashi, Y., Itoh, H., Kasuga, M.: Overexpression of SAP-1, a transmembrane-type protein tyrosine phosphatase, in human colorectal cancers. *Biochem Biophys Res Commun* 231:705-711, 1997.
 26. Kameda, T., Yasui, W., Yoshida, K., Tsujino, T., Nakayama, H., Ito, M., Ito, H. et al.: Expression of ERBB2 in human gastric carcinomas: relationship between p185ERBB2 expression and the gene amplification. *Cancer Res* 50:8002-8009, 1990.
 27. Morita, Y., Hayashi, Y., Wang, Y., Kanamaru, T., Suzuki, S., Kawasaki, K., Ohta, K., Yamamoto, M., Saitoh, Y., Itoh, H., Dce, W.F.: Expression of urokinase-type plasminogen activator receptor in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 25:856-861, 1997.
 28. Doi, I., Namba, M., Sato, J.: Establishment and some biological characteristics of human hepatoma cell lines. *Gann* 66:385-392, 1975.
 29. Kim, S.R., Kang, K.B., Soh, C.G., Kim, J.H. Hayashi, Y., Hanioka, K., Itoh, Clinicopathological study of minimun-sized hepatocellular carcinoma; an approach to the definition of early hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 10:498-508, 1995.
 30. Ito, Y., Sasaki, Y., Horimoto, M., Wada, S., Tanaka, Y., Kasahara, A., Ueki, T., Hirano, T., Yamamoto, H., Fujimoto, J., Okamoto, E., Hayashi, N., Hori, M.: Activation of mitogen-activated protein kinases/extracellular signal-regulated kinases in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 27:951-958, 1998.
 31. Kawate, S., Fukusato, T., Ohwada, S., Watanuki, A., Morishita, Y.: Amplification of c-myc in hepatocellular carcinoma: correlation with clinicopathologic features, proliferative

- activity and p53 overexpression. *Oncology* 57: 157-163, 1999.
32. Ardini, E., Agresti, R., Tagliabue, E., Greco, M., Aiello, P., Yang, L.T., Menard, S., Sap, J.: Expression of protein tyrosine phosphatase alpha (RPTP α) in human breast cancer correlates with low tumor grade, and inhibits tumor cell growth in vitro and in vivo. *Oncogene* 19:4979-4987, 2000.
 33. Hanks, S.K., Polte, T.R.: Signaling through focal adhesion kinase. *Bioessays* 19:137-145, 1997.
 34. Schlaepfer, D.D., Hauck, C.R., Sieg, D.L.: Signaling through focal adhesion kinase. *Prog Biophys Mol Biol* 71:435-478, 1999.
 35. Klemke, R.L., Leng, J., Molander, R., Brooks, P.C., Vuori, K., Cheres, D.A.: CAS/Crk coupling serves as a "molecular switch" for induction of cell migration. *J Cell Biol* 140:961-972, 1998.
 36. Tamura, M., Gu, J., Takino, T., Yamada, K.M.: Tumor suppressor PTEN inhibition of cell invasion, migration, and growth: differential involvement of focal adhesion kinase and p130Cas. *Cancer Res* 59:442-449, 1999.
 37. Imamura, F., Mukai, M., Ayaki, M., Akedo, H.: Y-27632, an inhibitor of rho-associated protein kinase, suppresses tumor cell invasion via regulation of focal adhesion and focal adhesion kinase. *Jpn J Cancer Res* 91:811-816, 2000.

Tumor suppressor effect of protein tyrosine phosphatase SAP-1 in human hepatocellular carcinoma

Hidenobu Nagano^{1, 2}

¹Division of Diabetes, Digestive, and Kidney Diseases, Department of Clinical Molecular Medicine,
and ²Division of Surgical Pathology, Department of Biomedical Informatics,
Kobe University School of Medicine

ABSTRACT

SAP-1 (stomach cancer-associated protein tyrosine phosphatase-1) is a transmembrane-type protein tyrosine phosphatase that has been proposed to negatively regulate cell growth as a regulator of integrin-mediated signaling. This phosphatase is abundant in a subset of pancreatic and colorectal cancers, although the physiological significance of this observation is unclear. To examine a potential role of SAP-1 in hepatocarcinogenesis, we have here investigated the protein levels of this enzyme by examining its expression in surgically excised human hepatocellular carcinoma (HCC) specimens. Both immunohistochemical and immunoblot analyses revealed that normal liver tissue, as well as tissue affected by chronic hepatitis or cirrhosis, contained a similar substantial amount of SAP-1. The expression level of SAP-1 in 8 of 11 (72.7%) well-differentiated HCCs was similar to or higher than that observed in the surrounding non-cancerous tissue. In contrast, the abundance of SAP-1 in 11 of 13 (84.6%) moderately differentiated HCCs and in all poorly differentiated HCCs was greatly reduced compared with that in the surrounding non-cancerous tissue. Indeed, SAP-1 was almost undetectable in five of six (83.3%) poorly differentiated HCCs. Furthermore, the ectopic overexpression of recombinant SAP-1 in two poorly differentiated human HCC cell lines resulted in a morphological change with a marked reduction in migratory activity. In conclusion, these results indicate that SAP-1 expression is down-regulated during the dedifferentiation of human HCC, and that this down-regulation may play a causal role in human HCC progression.