

精巣腫瘍における転移関連遺伝子の発現と リンパ節転移との関連について

金沢大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 並木幹夫教授)

越田 潔, 小中 弘之, 加藤 浩章, 宮城 徹

江川 雅之, 打林 忠雄, 並木 幹夫

CORRELATION BETWEEN EXPRESSION OF METASTASIS-RELATED GENES AND LYMPH NODE METASTASIS IN TESTICULAR CANCER

Kiyoshi KOSHIDA, Hiroyuki KONAKA, Hiroaki KATO, Toru MIYAGI,
Masayuki EGAWA, Tadao UCHIBAYASHI and Mikio NAMIKI

From the Department of Urology, Kanazawa University School of Medicine

To investigate the factors related to lymph node metastasis of testicular germ cell tumors, we first established a seminoma orthotopic model with lymph node metastasis in SCID mice by inoculating small fragments from subcutaneous xenografts. Second, we compared the expression patterns of metastasis-related genes of the seminoma xenografts and of the TCam-2 cells which were established as a seminoma cell line from a primary testicular seminoma. Third, we immunohistochemically analyzed human germ cell tumors (25 seminomas, 17 nonseminomas) using monoclonal antibodies to CD34, VEGF, VEGF-C, Flt-4, MMP-2 and E-cadherin. Testicular seminoma xenografts grew in 32/32 (100%) of the inoculated mice, of which 15 (47%) developed macroscopic metastasis to the renal hilar lymph node. Circulating tumor cells were detectable by using a PCR assay for the human β -globin gene in 25/32 (78%) mice, although metastatic foci were not histologically evident in the visceral organs, including lungs, liver, kidneys and spleen. This may reflect the lymphophilic characteristics of the seminoma cells used. Regarding mRNA expression of metastasis-related genes, an increased expression of MMP-2 and VEGF compared with that in the s.c. xenografts was demonstrated by RT-PCR assay in the testicular seminoma xenografts. In addition, uPAR, MMP-1, MMP-2, MT1-MMP and MT3-MMP showed a stronger expression and PAI-2 a weaker expression in the seminoma xenografts than did TCam-2 cells. These results suggest a higher metastatic potential of the seminoma xenografts, especially testicular xenografts, as compared with TCam-2 cells. In the immunohistochemical study, a significant correlation was found between MMP-2 expression and lymph node metastasis, which is compatible with the results for the metastasis-related gene expression from the seminoma xenografts.

(Acta Urol. Jpn. 46 : 775-781, 2000)

Key words: Testicular cancer, Metastasis-related genes, Lymph node metastasis

Abbreviation

uPA: urokinase-type plasminogen activator.
uPAR: urokinase-type plasminogen activator receptor.
PAI-1: plasminogen activator inhibitor-1.
PAI-2: plasminogen activator inhibitor-2.
MMP-1: matrix metalloproteinase-1.
MMP-2: matrix metalloproteinase-2.
MT1-MMP: membrane-type 1 matrix metalloproteinase.
MT3-MMP: membrane-type 3 matrix metalloproteinase.
TIMP-1: tissue inhibitor of metalloproteinase-1.
TIMP-2: tissue inhibitor of metalloproteinase-2.
VEGF: vascular endothelial growth factor.
TFR: transferrin receptor.
VEGF-C: vascular endothelial growth factor C.
Flt-4: fms like tyrosine kinase 4.

緒 言

リンパ行性転移は精巣腫瘍に特徴的な転移様式として知られている。後腹膜リンパ節転移が血行性転移に先行する理由として精巣からのリンパ液の流れに基づく解剖学的因子 (anatomical mechanical factor) が寄与することが第一に考えられるが、癌細胞とリンパ節との相互作用 (seed and soil) の関与も考慮すべきである。今日では reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) 法によって種々の担癌患者の循環血液中に癌細胞の存在が証明されており精巣腫瘍も例外ではないと思われる。では果たして精巣腫瘍においてリンパ行性転移が血行性転移より優位である原因として何か特徴的な因子が捕えられるだろう

か。この点を研究の目標として今回は精巣腫瘍におけるリンパ節転移の形成にかかわる因子について実験的、臨床的検討を行った。原発巣における転移関連遺伝子の発現とリンパ節転移との関連を論じた報告は種々の癌でみられ、精巣腫瘍においても血管新生に関与する vascular endothelial growth factor (VEGF) の発現との正の相関¹⁾、あるいは細胞間接着に関与する E-cadherin の発現との逆相関²⁾などが報告されている。転移性精巣腫瘍の原発巣の多くは精巣本体に限局した腫瘍であり、例えば膀胱癌のように局所の腫瘍深達度と転移との関連づけは困難である。

さて癌転移機構の解明には有用な動物転移モデルの樹立が不可欠であることは論を待たない。近年最も適切な癌転移モデルとして考えられているのが同所移植 (orthotopic implantation) モデルである。そこでわれわれは精巣セミノーマのリンパ節転移モデルの樹立に同所移植を応用した。ヒト精巣セミノーマ細胞株の樹立はきわめて困難とされ、これまで水野ら³⁾、Kinugawa ら⁴⁾による細胞株樹立の報告がみられる

が、未だヒトセミノーマのリンパ行性転移を再現する実験モデルの報告はないものと思われる。われわれは severe combined immunodeficient (SCID) マウスにヒトセミノーマのリンパ節転移巣の細片組織を皮下移植腫瘍として継代し、この移植腫瘍片をマウス精巣に同所移植することで精巣腫瘍および後腹膜リンパ節転移モデルを確立した⁵⁾。そこで同じモデルを用いてリンパ節転移の形成にかかわる因子を探求し、臨床検体における発現様式と比較検討したのでその結果を報告する。

対象と方法

1) 動物実験モデル。

59歳、男性、セミノーマ、stage IIIA、鎖骨上リンパ節転移巣を摘出後、直ちに3mm角に細片しSCIDマウスの背部皮下に移植した⁶⁾。2カ月後、腫瘍は直径約1cmにまで増殖しそれ以降同マウス背部皮下にて継代移植を行っている。この継代移植腫瘍を2mm角に細片し、マウスの一側精巣内へ移植した。

Table 1. Oligonucleotides for RT-PCR and Southern blot hybridization

Genes	Primers and probe	Fragment size
uPA	5'-AGAATTCACCACCATCGAGA-3' 5'-ATCAGCTTCACAACAGTCAT-3' 5'-AGGCAGATGGTCTGTATAGT-3'	474
uPAR	5'-TTACCTCGAATGCATTTTCT-3' 5'-TTGCACAGCCTCTTACCATA-3' 5'-TCATCAGACATGAGCTGTGA-3'	455
PAI-1	5'-ATGGGATTCAAGATTGATGA-3' 5'-TCAGTATAGTTGAACTTGTT-3' 5'-AGAGAGCCAGATTCATCATCAAT-3'	452
PAI-2	5'-TAAGCTGTTTGGTGAGAAGT-3' 5'-TACATCATCTGTACAGGTGT-3' 5'-TAGACTTCCTAGAATGTGCA-3'	327
MMP-1	5'-GGTGATGAAGCAGCCCAG-3' 5'-CAGTAGAATGGGAGAGTC-3' 5'-AGCAGACATCATGATATCTTTTGTGTC-3'	437
MMP-2	5'-CCACGTGACAAGCCCATGGGGCCCC-3' 5'-GCAGCCTAGCCAGTCGGATTTGATG-3' 5'-TTGATGCGGTATACGAGGCCCCACA-3'	486
MT1-MMP	5'-ACCTACGTACCCACACACAG-3' 5'-AAATTCCTCCGTGTCCATCCA-3' 5'-CTACATCCGTGAGGCCCATGAGA-3'	661
MT3-MMP	5'-ATGTGCTACAGTCTGCGGAAC-3' 5'-TATCCACATCACGTTTGCCA-3' 5'-GTGGACAGAAACACAATTGAC-3'	461
TIMP-1	5'-TGCACCTGTGTCCCACCCACCCACAGACG-3' 5'-GGCTATCTGGACCCGACGGACTGCCAGGT-3' 5'-TTCACCAAGACCTACACTGTTGGCT-3'	552
TIMP-2	5'-CCGACGCCTGCAGCTGCTCCCGGTGCACCCG-3' 5'-GGAAGCTTTTATGGGTCTCGATGTGCGAG-3' 5'-ATGGCAACCCTATCAAGAGGATCCA-3'	601
VEGF	5'-GAAGTGGTGAAGTTTCATGGATGTC-3' 5'-CGATCGTTCTGTATCAGTCTTTCC-3' 5'-GAGATGAGCTTCTACAGCACAAC-3'	541
E-cadherin	5'-ACCTCTGTGATGGAGGTC-3' 5'-CCACATCGTCACTGCTACG-3' 5'-AACGTCGTAATCACCACACT-3'	544
TFR	5'-ACAGACTCTACATGTAGGAT-3' 5'-AAACCTGAAGTTGCTGGTA-3' 5'-TATCCCTCTAGCCATTCAGT-3'	415

The top row is the sense primer, the middle row is the antisense, and the bottom is the probe for Southern blot hybridization.

Table 2. Clinical stage and histology

	Stage	
	I	II, III
Seminoma	20	5
Nonseminoma	6	11
Embryonal ca: 10		
Mixed GCTs: 6		
Teratoma: 1		

経時的に腫瘍の増殖, ならびに後腹膜リンパ節転移の有無を観察した. また血液中および肝, 肺における腫瘍細胞の存在についてはヒトベータグロブリン遺伝子を標的遺伝子とした PCR 法⁷⁾にて検出を行った. さらに水野らによって樹立されたセミノーマ細胞株 TCam-2³⁾ の供与を受け 2×10^6 の細胞を一側精巣内へ注入, あるいは 10^7 の細胞を背部皮下に移植し造腫瘍能を検討した.

2) RT-PCR 法

腫瘍組織における転移関連遺伝子の発現については RT-PCR 法にて検討した. 総 RNA の抽出精製は, Chomczynski ら⁸⁾の方法に基づいて, イソゲン (ニッポンジーン, 東京) を用いて行った. RT-PCR 反応は RNA PCR キット (Perkin-Elmer Cetus, Branchburg) を用いた. すなわち 0.6 mg の総 RNA を鋳型とし, ランダムヘキサマーをプライマーとして逆転写酵素にて cDNA を合成した. 次に各 mRNA に特異的なプライマーを用い, Taq ポリメラーゼにて cDNA の断片の増幅を行った. PCR 反応には DNA サーマルサイクラー (Perkin-Elmer Cetus) を使用し熱変性を 94°C , 60秒間, アニーリングを 48°C , 90秒間, DNA 伸長を 72°C , 80秒間とし, これを 30 サイクル施行した. Table 1 に使用したプライマーの一覧を示す

3) 免疫組織化学染色

次に動物実験モデルで示された因子の発現がヒトの精巣腫瘍においてリンパ節転移と関連があるか否かについて検討することを目的にホルマリン固定組織標本を用いて免疫組織化学的解析を行った. 対象は精巣腫瘍 42 例 (Table 2) である. 免疫組織化学染色には抗 CD34 抗体 (Novocastra Laboratories), 抗 VEGF 抗体 (Santa Cruz Biotechnology), 抗 VEGF-C 抗体 (Santa Cruz Biotechnology), 抗 fms like tyrosine kinase 4 (Flt-4) 抗体 (Santa Cruz Biotechnology), 抗 matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) 抗体 (富士薬品工業), 抗 E-cadherin 抗体 (宝酒造) を用いた. キシレンにて脱パラフィンした後, 0.01 M クエン酸緩衝液 (pH 6.0) 中で 500 W, 5 分間のマイクロウェーブ処理を 3 回繰り返し抗原性の賦活化を行った. 0.3% 過酸化水素加メタノールで内因性ペ

ルオキシダーゼを失活させ, ブロッキング溶液 (DAKO) を 10 分間作用後, 一次抗体: 抗 CD34 抗体 (1:200), 抗 VEGF 抗体 (1:200), 抗 VEGF-C 抗体 (1:100), 抗 Flt-4 抗体 (1:200), 抗 MMP-2 抗体 (1:100), 抗 E-cadherin 抗体 (1:100) を 4°C 一晚静置し反応させた. ビオチン標識抗マウスあるいはウサギ IgG と反応させた後, アビジンビオチンペルオキシダーゼ複合体 (Vecstain ABD kit, Vector Laboratories) を用い 0.02% 過酸化水素加ジアミノベンチジンにて発色を行った.

4) 免疫組織化学染色の評価

腫瘍細胞巣を含む 200 倍の検鏡視野 2 カ所においてそれぞれ 200 個の細胞中の陽性細胞数を計測し, その平均を百分率で評価した. 陽性率が 10% 未満を陰性, 10% 以上を陽性と判定した. 腫瘍内血管密度については微小血管 (毛細血管, 小静脈) に位置づけられる血管の数を 200 倍の視野にて 3 カ所計測し, その平均を微小血管密度 (microvessel density: MVD) とした.

5) 統計処理法

群間での有意差検定には χ^2 検定あるいは Mann-Whitney の U 検定を行った.

結 果

ヒトセミノーマ背部皮下継代移植腫瘍は SCID マウス精巣内で増殖し 100% 腫瘍を形成した. 移植した精巣と同側の腎門部リンパ節に転移をきたし (Fig. 1, 2), その頻度は 11 週, 13 週, 15 週後においてそれぞれ 3/10 (30%), 5/12 (42%), 7/10 (70%) と経時的に増加した. 一方背部皮下移植腫瘍においては移植 16 週間後でも肉眼的に明らかな転移は認められなかった. 精巣腫瘍を形成したマウスの血液中腫瘍細胞は PCR

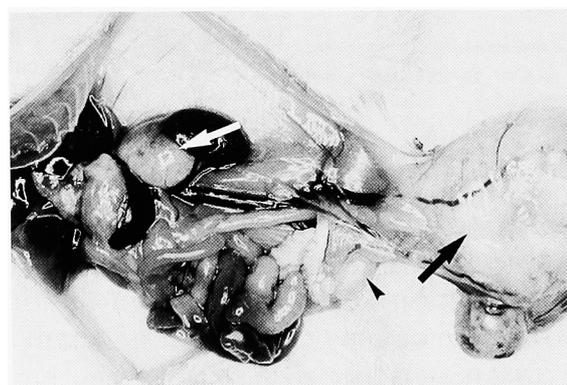


Fig. 1. Macroscopic appearance of mouse 15 weeks after orthotopic implantation of human seminoma. The black arrow indicates the seminoma xenograft in left testis, the arrow head the intact right testis, and the white arrow metastasis to the left renal hilar lymph node.

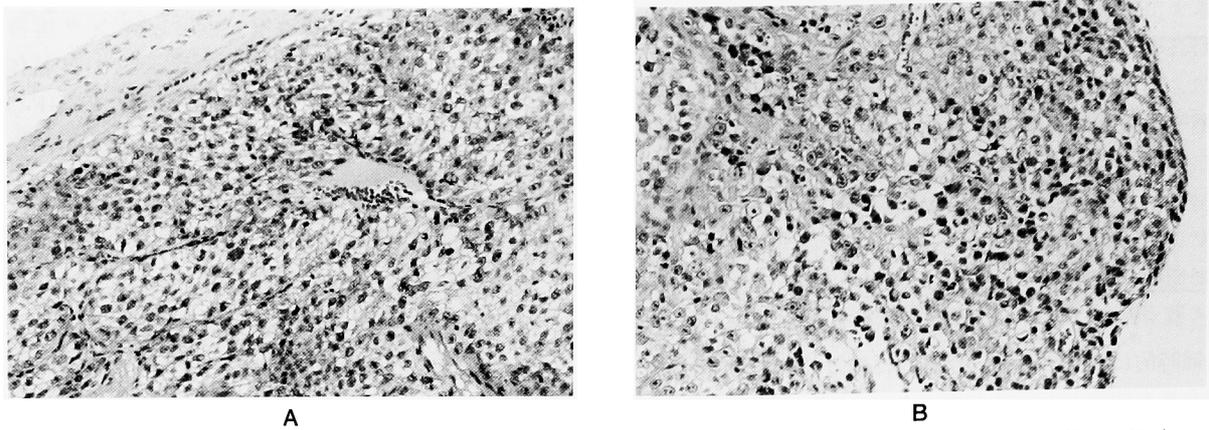


Fig. 2. Histological appearance of testicular xenograft (A, $\times 100$) and lymph node metastasis (B, $\times 100$).

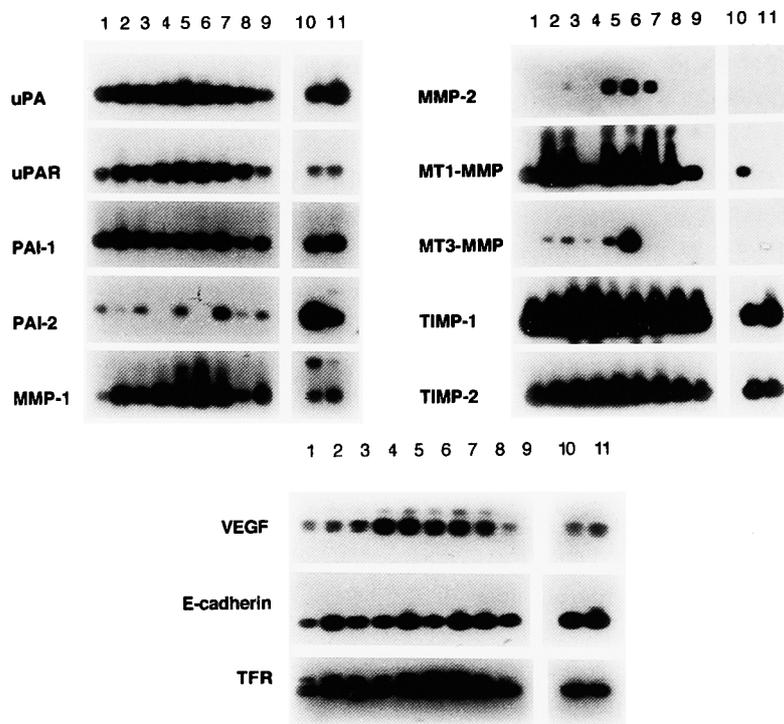


Fig. 3. Expression of metastasis-related genes in seminoma xenografts and TCam-2 cells. Lanes 1-3: s.c. xenografts of seminoma from three mice; lanes 4-6: testicular xenografts; lanes 7-9: lymph node metastases; lane 10: TCam-2 cells culture, and lane 11: s.c. xenograft of TCam-2.

法により78% (25/32) に検出され肺, 肝ではそれぞれ100% (32/32), 84% (27/32) であった. 血液中腫瘍細胞の出現は腫瘍重量に依存する傾向にあったが, リンパ節転移の有無とは必ずしも一致しなかった. リンパ節以外の実質臓器すなわち肺, 肝, 腎, 脾においては腫瘍移植後15週間の観察期間中に組織学的に明らかな転移は認められなかった. 皮下, 精巣, リンパ節において形成された腫瘍における各種転移関連遺伝子の発現を比較すると精巣腫瘍において明らかなその発現が亢進していたものは MMP-2 であった (Fig. 3). 一方 TCam-2 は皮下においては100%腫瘍を形成したが, 精巣では腫瘍は形成されずリンパ節転移も認

められなかった. 転移関連遺伝子の発現に関して TCam-2 (in vitro あるいは皮下移植腫瘍) とセミノーマ移植腫瘍との比較においては urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR), plasminogen activator inhibitor-2 (PAI-2), MMPs (MMP-1, MMP-2, membrane-type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP), membrane-type 3 matrix metallo-proteinase (MT3-MMP)) に明らかな差を認め, 一方 E-cadherin については両者とも同程度の発現が認められた (Fig. 3).

次に動物実験モデルで示された因子の発現がヒトの精巣腫瘍においてリンパ節転移と関連があるか否かに

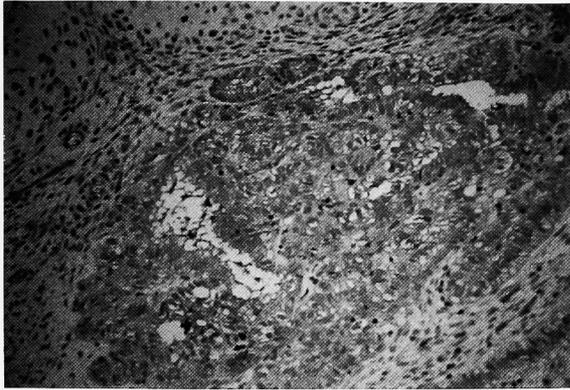


Fig. 4. Immunohistochemical staining for Flt-4. Embryonal carcinoma cells are positively stained (×40).

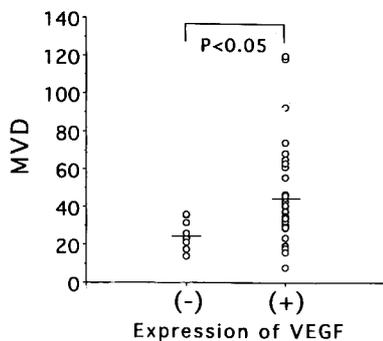


Fig. 5. Relationship between microvessel density and VEGF expression. Statistical significance of differences was evaluated with the Mann-Whitney U test.

ついて検討することを目的にホルマリン固定組織標本を用いて免疫組織化学染色を行った。転移の形成には血行性あるいはリンパ行性の2つのルートがある。原発巣ではしばしばリンパ管あるいは血管への侵襲像が組織学的に捕えられる。抗 CD34 抗体で認識されるのは微小血管内皮がおもであると考えられるが、ところによってはリンパ管内皮も陽性を示し両者の混在はある程度避けられない。一方リンパ管内皮に特異的に発現するとされる Flt-4⁹⁾ は抗 Flt-4 抗体によりリンパ管内皮における存在が示されたが染色性は必ずしも十分とはいえず、さらに腫瘍細胞自体も時に陽性を示した (Fig. 4)。したがって現在のところリンパ管と血管とを明確に区別し各々について解析することは困難である。以上のことを認識したうえで抗 CD34 抗体を用いていわゆる腫瘍内微小血管密度 (MVD) を評価した。MVD と VEGF との関連をみると VEGF の発現の有無で MVD に有意差を認め両者の相関が示唆された (Fig. 5)。しかし MVD と stage との間に相関は認められなかった (Fig. 6)。また VEGF と stage あるいは脈管侵襲と stage, さらには腫瘍のサイズ (最大径) と stage との間にも相関は認められなかった。E-cadherin については脈管内へ侵入してい

る腫瘍細胞は E-cadherin 陰性であった。また有意差はないが脈管侵襲陽性例には E-cadherin 陰性例が多い傾向にあった。しかし E-cadherin と stage との関係をみると転移の有無と E-cadherin の染色性との間には正の相関が示された (Table 3)。この一見不合理な結果の原因としてセミノーマは low stage でも陰性であることが多いのに対して、非セミノーマでは

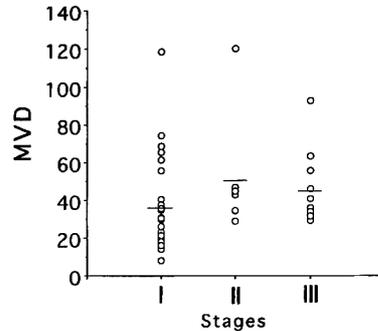


Fig. 6. Relationship between microvessel density and stages.

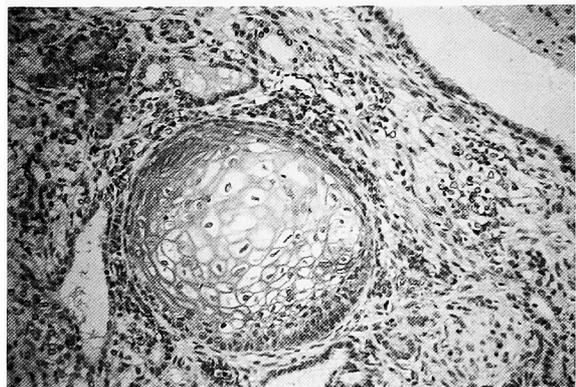


Fig. 7. Immunohistochemical staining for E-cadherin. Positive staining is indicated at the differentiated portion in a stage III case of teratocarcinoma.

Table 3. Relationship between immunohistochemical staining and lymph node metastasis

Staining		Stage		
		I	II, III	
VEGF	Negative	6	2	NS
	Positive	20	14	
VEGF-C	Negative	15	8	NS
	Positive	11	8	
Flt-4	Negative	17	6	NS
	Positive	9	10	
MMP-2	Negative	22	7	P<0.01
	Positive	4	9	
E-cad	Negative	19	6	P<0.05
	Positive	7	10	

Statistical significance of differences was evaluated by the χ^2 -test, with a p-value less than 0.05 taken as the criterion of significance. NS, not significant.

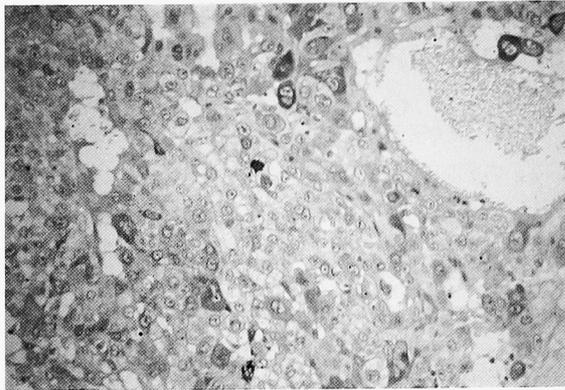


Fig. 8. Immunohistochemical staining for MMP-2. Some tumor cells are positively stained.

high stage であっても Fig. 7 に見られるごとく部分的に E-cadherin 陽性を示す症例が多いことがあげられる。今回の検討で転移との間の正の相関を示したものは MMP-2 の発現であった (Table 3)。Fig. 8 に stage III, 奇形癌の MMP-2 染色陽性例を示す。

考 察

われわれが樹立したヒトセミノーマ移植腫瘍は既に3年以上にわたり SCID マウス背部皮下で継代されている。生着率は100%であり組織学的には明るい胞体に大きな核を有する典型的なセミノーマの像を呈する⁵⁾。さらに胎盤性アルカリフォスファターゼの産生能を維持しており⁶⁾形態的にも生物学的にも依然としてセミノーマの特徴を保持しているものと思われる。一方水野らによって樹立された TCam-2³⁾も報告によれば上記の条件を満たしているが、この細胞株は原発巣より樹立されている点がわれわれの継代移植腫瘍と異なる。TCam-2 の SCID マウス背部皮下での造腫瘍能は確認されたが、精巣内では増殖をきたさなかった。これまでわれわれは数種の培養細胞を精巣に注入することで腫瘍の形成を確認しており^{10,11)}、TCam-2 が12週までの観察期間で精巣に腫瘍を形成しなかった理由は不明である。そこで TCam-2 の in vitro あるいは皮下移植腫瘍とセミノーマ移植腫瘍の転移関連遺伝子の発現を比較したところ uPAR, PAI-2, MMPs (MMP-1, MMP-2, MT1-MMP, MT3-MMP) に明らかな差が認められた。これまで uPAR の高発現と浸潤転移との関連は大腸癌¹²⁾、胃癌¹³⁾で報告されている。また PAI-2 の発現とリンパ節転移との逆相関もこれまで乳癌¹⁴⁾、肺癌¹⁵⁾で報告されておりウロキナーゼシステムにおけるこれらの所見はセミノーマ移植腫瘍の高転移能を支持するものである。さらにマトリックスメタロプロテアーゼの発現において両者間の差は顕著であり細胞外基質の分解能に大きな差があることが伺える。一方 E-cadherin の発現に

おいては両者間に差は認められず、この点はその発現の有無が浸潤転移能に深くかかわっている膀胱癌¹⁶⁾とは様相を異にしている。さらにセミノーマ移植腫瘍においては皮下から精巣に移植することで MMP-2 の発現が誘導されると共に VEGF の発現亢進が観察され、同所移植による微小環境の変化によってより高い転移能が誘導されたものと思われる。以上の動物実験モデルの結果から精巣腫瘍ことにセミノーマにおいては MMPs と VEGF の発現が転移能にかかわっている可能性が示唆された。また PCR 法による解析結果からマウス体内で循環しているセミノーマ細胞は実質臓器に転移を形成する能力はないものと判断される。一方リンパ節では15週で70%に肉眼的に明らかな転移を形成しておりいわゆる lymphophilic characteristics を反映した結果と考えられる。リンパ節に対する親和性を説明する因子は今回の解析では明らかではないが、インテグリン $\alpha v \beta 3$ や $\alpha 3 \beta 1$ などの細胞基質間接着因子のかかわりがメラノーマ¹⁷⁾、乳癌¹⁸⁾などで報告されており今後検討すべき課題である。

さて臨床材料を用いた免疫組織化学染色では MMP-2 の発現とリンパ節転移との間に相関が認められ動物実験の結果との一致をみた。しかしこれまで精巣腫瘍において報告されている MVD¹⁹⁾、VEGF¹⁾、E-cadherin²⁾ との相関は明らかにされなかった。特に E-cadherin についてはセミノーマの大部分は陰性であり、一方非セミノーマにおいては high stage 症例であってもより分化した部分は陽性となることが多く、したがって精巣腫瘍全体としては stage と正の相関を示したと考えられる。Heidenreich ら²⁾は、臨床病期 I の非セミノーマにおいて E-cadherin の発現の有無とリンパ節転移 (pathological stage II) との逆相関を報告している。今回非セミノーマ症例のみで検討すると E-cadherin 陽性は stage I で 5/6 (83%)、stage II, III で 9/11 (82%) であり明らかな相違は認められなかった。さまざまな分化度を呈する多彩な組織型を有する非セミノーマにおいては E-cadherin の発現とリンパ節転移能との解析は困難であると考えられた。

結 語

1. ヒトセミノーマ移植腫瘍モデルにおける転移巣形成の結果よりセミノーマ細胞には lymphophilic characteristics があることが示唆された。
2. 動物実験モデルならびに臨床検体を用いた検討よりマトリックスメタロプロテアーゼごとに MMP-2 の発現とリンパ節転移との関連が示唆された。

文 献

- 1) Fukuda S, Shirahama T, Imazono Y, et al.:

- Expression of vascular endothelial growth factors in patients with testicular germ cell tumors as an indicator of metastatic disease. *Cancer* **85**: 1323-1330, 1999
- 2) Heidenreich A, Sesterhenn IA, Mostofi FK, et al.: Prognostic risk factors that identify patients with clinical stage I nonseminomatous germ cell tumors at low risk and high risk for metastasis. *Cancer* **83**: 1002-1011, 1998
 - 3) 水野 裕仁, 後藤 章暢, 守殿 貞夫, ほか: ヒト精巣セミノーマ由来細胞株 TCam-2 の樹立. *日泌尿会誌* **84**: 1211-1218, 1993
 - 4) Kinugawa K, Hyodo F, Matsuki T, et al.: Establishment and characterization of a new human testicular seminoma cell line. JKT-1. *Int J Urol* **5**: 282-287, 1998
 - 5) Konaka H, Koshida K, Endo Y, et al.: Human seminoma xenograft model with regional lymph node metastasis. *J Urol* **161**: 342-348, 1999
 - 6) Koshida K, Yokoyama K, Uchibayashi T, et al.: Factors contributing to imaging of xenografts using anti-placental alkaline phosphatase monoclonal antibody. *J Urol* **157**: 1941-1945, 1997
 - 7) Endo Y, Sasaki T, Harada F, et al.: Specific detection of metastasized human cells in embryonic chicks by the polymerase chain reaction. *Jpn J Cancer Res* **81**: 723-726, 1990
 - 8) Chomczynski P and Sacchi N: Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**: 156-159, 1987
 - 9) Kaipainen A, Korhonen J, Mustonen T, et al.: Expression of the fim-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development. *Proc Natl Acad Sci* **92**: 3566-3570, 1995
 - 10) Koshida K, Endo Y, Kobayashi T, et al.: Enhanced tumorigenic and metastatic potential of an androgen-sensitive human prostate cancer cell line, LNCaP, by intratesticular inoculation in SCID mice. *Int J Oncol* **11**: 513-519, 1997
 - 11) Koshida K, Yokoyama K, Imao T, et al.: Immunolocalization of anti-placental alkaline phosphatase monoclonal antibody in mice with testicular tumor and lymph node metastasis. *Urol Res* **26**: 23-28, 1998
 - 12) Nakata S, Ito K, Fujimori M, et al.: Involvement of vascular endothelial growth factor and urokinase-type plasminogen activator receptor in microvessel invasion in human colorectal cancer. *Int J Cancer* **79**: 179-186, 1998
 - 13) Allgayer H, Heiss MM, Riesenberger R, et al.: Urokinase plasminogen activator receptor (uPAR): one potential characteristic of metastatic phenotypes in minimal residual disease. *Cancer Res* **57**: 1394-1399, 1997
 - 14) Ishikawa N, Endo Y, Sasaki T: Inverse correlation between mRNA expression of plasminogen activator inhibitor-2 and lymph node metastasis in human breast cancer. *Jpn J Cancer Res* **87**: 480-487, 1996
 - 15) Yoshino H, Endo Y, Watanabe Y, et al.: Significance of plasminogen activator inhibitor 2 as a prognostic marker in primary lung cancer: association of decreased plasminogen activator inhibitor 2 with lymph node metastasis. *Br J Cancer* **78**: 833-839, 1998
 - 16) Imao T, Koshida K, Endo Y, et al.: Dominant role of E-cadherin in the progression of bladder cancer. *J Urol* **161**: 692-698, 1999
 - 17) Nip J and Brodt P: The role of the integrin vitronectin receptor, avb3 in melanoma metastasis. *Cancer Metastasis Rev* **14**: 241-252, 1995
 - 18) Tawil NJ, Gowri V, Djoneidi M, et al.: Integrin $\alpha3\beta1$ can promote adhesion and spreading of metastatic breast carcinoma cells on the lymph node stroma. *Int J Cancer* **66**: 073-710, 1996
 - 19) Olivarez D, Ulbright T, DeRiese W, et al.: Neovascularization in clinical stage A testicular germ cell tumor: prediction of metastatic disease. *Cancer Res* **54**: 2800-2802, 1994

(Received on January 18, 2000)
 (Accepted on March 27, 2000)