

肺癌におけるMUC4ムチン発現の解析

その他の言語のタイトル	Analysis of MUC4 mucin expression in lung cancer
著者	花岡 淳, 紺谷 桂一, 澤井 聡, 藤野 昇三, 大久保 岩男
雑誌名	滋賀医科大学雑誌
巻	16
ページ	17-26
発行年	2001-02
URL	http://hdl.handle.net/10422/106

肺癌における MUC4 ムチン発現の解析

花岡 淳¹⁾, 紺谷 桂一¹⁾, 澤井 聡¹⁾, 藤野 昇三¹⁾,
大久保岩男²⁾

1) 滋賀医科大学第二外科

2) 滋賀医科大学第二生化学

Analysis of MUC4 mucin expression in Lung Cancer

Jun HANAOKA¹⁾, Keiichi KONTANI¹⁾, Satoru SAWAI¹⁾, Shozou FUJINO¹⁾
Iwao OHKUBO²⁾

1) Second Department of Surgery, Shiga University of Medical Science

2) Department of Medical Biochemistry, Shiga University of Medical Science

Abstract: MUC4 mucin, which was cloned from human tracheo-bronchial mucosa cDNA library, has been reported to be abundantly expressed in lung cancer. Although expression levels of MUC4 mRNA in several cancer cells have been examined, biological characteristics of MUC4 protein have not been investigated because of no available antibodies for this mucin. In this study, we prepared antisera from rabbits immunized with MUC4 core peptides synthesized according to the sequences of the MUC4 tandem repeat. Despite of its high hydrophobicity and beta-sheet structures, the obtained antisera showed specific reactivities with MUC4 core. Lung cancer tissues from 27 cancer patients were examined for MUC4 protein expression by an immunohistochemical study using the antisera. Sixty-seven % of the tumors were demonstrated to express MUC4 protein. MUC4 mRNA expressions in the cancer tissues were examined by Northern hybridization using oligonucleotide probes whose sequences were corresponding to those of the MUC4 tandem repeat. Seventy-two % of the tumors showed high levels of MUC4 mRNA expression. Overall, the MUC4 protein expression was elevated in lung cancer tissues because of the increase in its mRNA expression and deglycosylation on its core. There was no correlation between clinical factors of the patients and their MUC4 expression. These data suggest that MUC4 mucin is abundantly expressed in lung cancer cells and that antigenic determinants sufficiently immunogenic to elicit anti-MUC4 immunity exist within the MUC4 tandem repeat. MUC4 is expected to be useful as a target antigen in immunotherapy for lung cancer.

Key words: MUC4, lung cancer, antisera, deglycosylation, target antigen

Received September 29, 2000; Accepted after revision November 17, 2000

Correspondence : 滋賀医科大学第二外科 花岡 淳 〒520 2192 大津市瀬田月輪町

はじめに

ムチンは分泌上皮細胞や腺細胞から分泌される高分子糖蛋白であり、粘膜の保護や潤滑作用など重要な役割を担っている^{5,10,22}。現在までに9種類の上皮性ムチンが同定されており^{14,24}、これらは共通の構造的特徴を有している。その特徴とはコア蛋白上にセリン、スレオニンに富む保存された配列の繰り返しドメインが存在し、それらアミノ酸残基からO-linkageを介して複雑で長い糖側鎖が結合していることである^{5,10,22}。

Porchetら^{7,20}によって気管気管支粘膜のcDNAライブラリーよりクローニングされたMUC4ムチンは、16アミノ酸配列の繰り返しドメインを有している。MUC4ムチンは、現在までにNorthern blot法や*in situ* hybridization法によりmRNAレベルで肺癌をはじめ膵癌、大腸癌などに高発現していることが報告されてきた^{3,4,16,18,19,23,28}。しかし、肺癌におけるMUC4蛋白発現とmRNA発現の相関性あるいは癌化に伴う修飾糖鎖の変化についての検討はいまだなされていない。既に同定された9種類のムチン蛋白のうちMUC1ムチンに関する研究は数多くなされてきた。同蛋白は多くの癌組織に過剰に発現するだけでなく、癌化に伴う脱糖鎖によってコア蛋白上の抗原エピトープが露出することがわかっている。その結果、MUC1ムチンは宿主免疫系に認識され抗腫瘍免疫応答が誘導されると考えられている^{6,11,12,13,15,19,23,25,26}。したがって、MUC1ムチンと類似構造を持つMUC4ムチンでも分子上に免疫原性の高い抗原エピトープが存在する可能性は否定できない。

今回我々は、MUC4コア繰り返し配列に従った24

アミノ酸長のオリゴペプチドを作成し、これで家兎に免疫することによりMUC4コア特異的抗血清を得た。この抗血清を用いて切除した肺癌組織におけるMUC4蛋白発現を解析するとともに、MUC4 mRNA発現との比較検討を行った。さらにMUC4発現と肺癌患者の臨床所見との相関についての解析も行った。

対象及び方法

組織標本

当施設において手術を施行した原発性肺癌患者29例より肺癌組織および腫瘍近傍正常肺組織を得た。肺癌患者の組織型の内訳は腺癌18例、扁平上皮癌7例、腺扁平上皮癌1例、大細胞癌2例、小細胞癌1例であった。なお切除組織を本研究に用いる旨を十分患者に説明し、インフォームドコンセントの得られた患者の材料のみを使用した。

核酸プローブおよびペプチド合成

Figure 1にPorchetらによってクローニングされたMUC4コア繰り返し部分の塩基とアミノ酸配列を示した²⁰。この配列に従い33塩基の核酸プローブをAmersham Pharmacia Biotechに依頼合成した。また繰り返し配列の前後に4アミノ酸を付加した24アミノ酸長合成ペプチドをKurabo Bio Medicalに依頼合成した。MUC4コア部分の親水性および3D構造は解析ソフトGENETYX-MAC 8.0を用いて行った。

抗MUC4抗体の精製

keyhole limpet haemocyanin (KLH) 結合 MUC4

Tandem Repeat Sequence

(ACT TCC TCA GTA TCC ACA GGC CAC GCC ACC TCT CTT CCT GTC ACC GAC)_n
 Thr Ser Ser Val Ser Thr Gly His Ala Thr Ser Leu Pro Val Thr Asp)_n

Oligonucleotide Probe

5'-GGT GAC AGG AAG AGA GGT GGC GTG GCC TGT GGA-3'

Oligopeptide

Pro Val Thr Asp
 Thr Ser Ser Val Ser Thr Gly His Ala Thr Ser Leu Pro Val Thr Asp
 Thr Ser Ser Val

Fig. 1. MUC4コア繰り返し部分の塩基とアミノ酸配列。

ペプチド200 μ gをComplete Freund Adjuvant(CFA)で溶解し,得られた乳濁液を3匹の雌家兔(New Zealand White)に免疫した.初回免疫後,3週間毎に同量のペプチドをIncomplete Freund Adjuvant(IFA)で溶解し計3回の追加免疫を行った.最終免疫より1週間後に採血を行い,遠心にて血液細胞を除去した後抗血清を得た.得られた抗血清はMUC4ペプチドをFormyl-Cellulofine(生化学工業)に固定化したaffinity chromatographyによって精製し,Centricon Spin Column(Amicon, Inc., Beverly, MA)で遠心濃縮した.

Spot test

1~100 μ g/mlに段階希釈したMUC4ペプチド溶液1 μ lを予め0.1%gelatinでcoatしたnitrocellulose membrane(Life Technologies, Grand Island, NY)上に滴下した後,paraformaldehydeで80 $^{\circ}$ Cで1時間加熱固定した.メンブレンをPBS-Tween20で洗浄しブロッキング処理を行った後,1,000倍希釈ウサギ血清と室温で2時間反応させた.PBS-Tween20で洗浄後,1,000倍希釈ビオチン化抗ウサギIg抗体(Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA)と室温で1時間反応させ,さらにavidin-biotin-peroxidase complex(Vector laboratories Inc.)を結合させた.洗浄後0.2mg/ml 3,3'-diaminobenzidine(Kirkegaard & Perry Laboratories Inc., Gaithersburg, MD)/0.005% H₂O₂溶液中で発色を行った.

免疫組織化学

肺癌患者より切除した正常肺および肺癌組織を4% paraformaldehyde, 0.5% glutaraldehyde, 0.2% picric acidを含む0.1Mリン酸緩衝液(pH 7.4)で2時間(4 $^{\circ}$ C)固定した後,glutaraldehydeを含まない同液で24時間(4 $^{\circ}$ C)後固定を行った.15% sucroseで数日間(4 $^{\circ}$ C)保存した後,10% gelatinに包埋しCryostatで15 μ mの厚さの切片を作成した.0.3% Triton-X100を含む0.1Mリン酸緩衝液に4日以上浸漬した切片を10%正常ヤギ血清で1時間ブロッキング処理を行った.洗浄後,10,000倍希釈抗MUC4抗体と4 $^{\circ}$ C,4日間反応させた.2次抗体として1,000倍希釈ビオチン化抗ウサギIg抗体と室温で2時間振盪反応させた後,avidin-biotin-peroxidase complexに室温で90分間浸漬した.洗浄後,0.2mg/ml

3,3'-diaminobenzidine, 0.006% H₂O₂で発色を行った.切片はスライドガラスに張り付け,その後hematoxylineで核染色を行った.

Southern blot 解析

健常者末梢血リンパ球および正常BALB/cマウス脾細胞をlysozymeを含むlysis bufferに浮遊させ,室温で10分間反応させた後,phenol-chloroform溶液を加え15,000回転10分間遠心しgenomic DNAを抽出した.得られたDNAはTris-HCl/EDTA(TE)液に溶解し,agarose gel電気泳動を行った.分離DNAを転写したnitrocellulose membraneを6xSSC,0.4% SDS,100 μ g/mlサケ精子DNAを含むpre-hybridization溶液中で42 $^{\circ}$ Cで3時間振盪後,[³²P]ATPでラベルしたMUC4プローブを含む同溶液中で42 $^{\circ}$ Cで18時間hybridizationを行った.メンブレンを6xSSC/0.2% SDS溶液で30分間室温で洗浄後,65 $^{\circ}$ Cの同溶液で5分間ずつ3回洗浄した.乾燥後,メンブレンをRX-U Fuji medical X-ray filmに-80 $^{\circ}$ Cで6日間露出した.

Northern blot 解析

肺癌患者の正常肺および肺癌組織よりISOGEN(Nippon Gene Inc., Tokyo, Japan)を用いたguanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction methodによりRNAを抽出した.抽出RNA 20 μ gをformaldehydeを含む0.9% agarose gelで電気泳動を行った.泳動後のゲルはRNAの分解の有無および相対量を確認する目的で,ethidium bromide染色を行いUVトランスイルミネーター下に観察した.RNAをnitrocellulose membraneに転写し,前述の如く[³²P]ATPでラベリングしたMUC4プローブでhybridizationを行った.

統計解析

2群間の統計処理はt検定で行い,危険率p<0.05をもって統計的有意とした.

結 果

家兔抗血清のMUC4特異性と抗体価

MUC4ペプチド免疫家兔から得られた血清の

MUC4ペプチドに対する免疫反応性を spot test で解析した。免疫前ウサギ血清はいずれも MUC4ペプチドに反応性を示さなかったのに対し、免疫後のウサギ血清はすべて MUC4ペプチドおよび KLH に対して強い反応性が認められた (Fig. 2)。

正常肺および肺癌組織における MUC4 蛋白発現

正常肺および肺癌組織における MUC4 蛋白発現を、家兔抗血清を用いた免疫組織化学法で解析した。正常肺組織では細気管支上皮細胞の管腔側のみが弱く染色された (Fig. 3A)。それに対し肺癌組織では、多くの癌細胞の細胞質がびまん性に強く染色された (Fig. 3B)。500個の腫瘍細胞数を数え、染色陽性細胞数が10%以上の症例を陽性例とした場合、27例中18例 (66.7%) が MUC4 蛋白発現陽性であった。免疫組織化学的検査で認められた抗血清の反応が MUC4 特異的の反応であることを確かめる目的で、抗血清を段階希釈したペプチドと予め反応させ、その後免疫染色を行った。20ng/ml のペプチドを添加することにより反応は著明に抑制され (Fig. 3B, 3C)、前反応ペプチド濃度を 2 μg/ml まで増量することにより、反応は完全に抑制された (data not shown)。以上より得られた家兔抗血清は MUC4 コアペプチドを特異的に認識することが確認された。

正常肺および肺癌組織における MUC4 mRNA 発現

³²P ラベル MUC4ヌクレオチドプローブをヒト末梢血リンパ球あるいはマウス脾細胞 genomic DNA と反応させた。ヒト DNA では EcoR I で切断した際、30kbp と25kbp のフラグメントが、また Hind III で切断した際には21kbp と16kbp のフラグメントが MUC4 プローブとハイブリダイズした (Fig. 4)。それに対しマウス DNA とはハイブリダイズしなかった。

肺癌患者正常肺および肺癌組織における MUC4 mRNA 発現を Northern hybridization 法にて検討した。陽性症例では、肺癌組織におけるシグナル強度は近傍正常肺組織のものと比較して明らかに増強していた (Fig. 5)。シグナルは分泌型ムチンに特徴的とされている polydisperse signal を呈していた。肺癌症例29例中21例 (72.4%) で MUC4 mRNA の強発現が認められた。また、一部の正常肺組織の

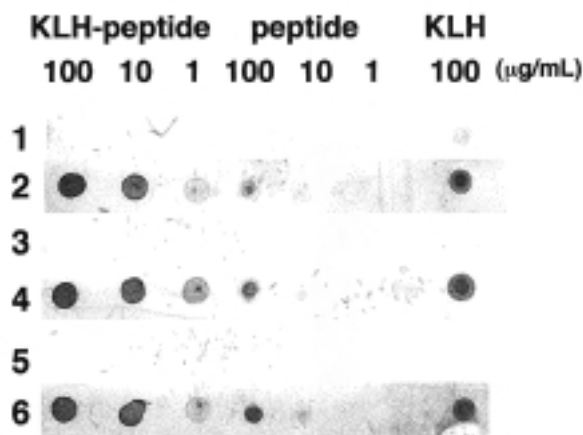


Fig. 2. 家兔抗血清と MUC4ペプチドとの反応。Lane 1, 3, 5: 家兔1, 2, 3免疫前血清, Lane 2, 4, 6: 免疫後血清。

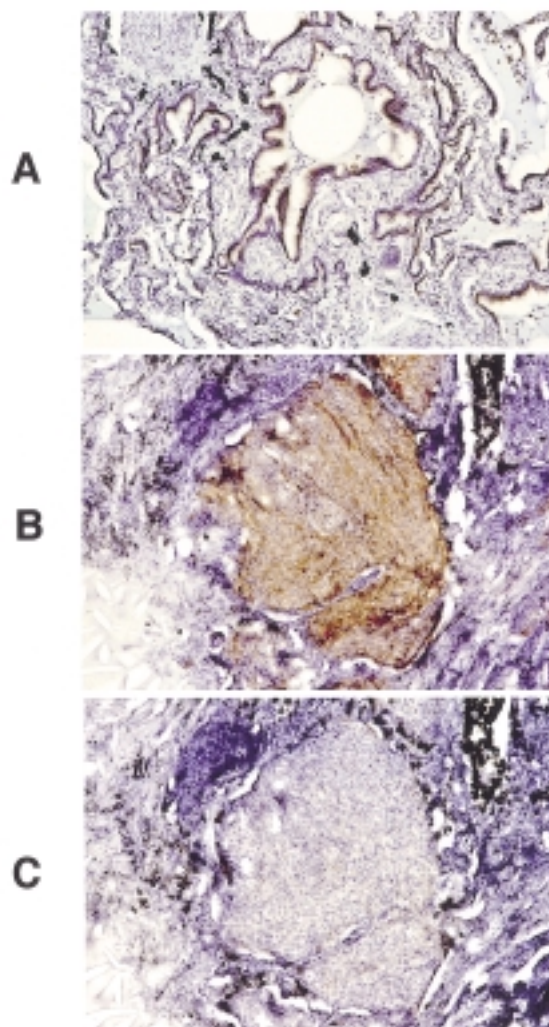


Fig. 3. 肺癌患者の正常肺と肺癌組織の免疫組織化学法。正常肺組織 (A), 肺癌組織 (B; 扁平上皮癌), 予め家兔抗血清と20ng/ml の合成ペプチドを反応させた後、免疫染色した肺癌組織 (C; 扁平上皮癌)。

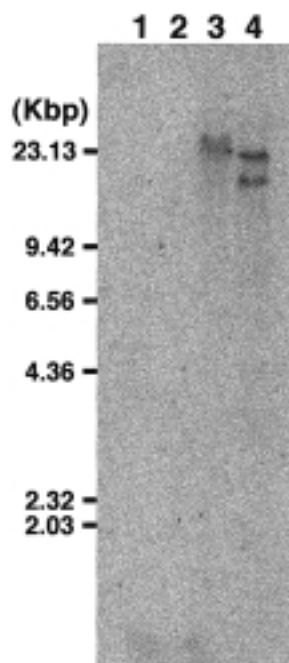


Fig. 4. Southern blot 解析. マウス脾細胞 (Lane 1, 2) とヒト末梢血リンパ球 (Lane 3, 4) genomic DNA を EcoR I (Lane 1, 3) と Hind III (Lane 2, 4) で切断した後, MUC4 プローブと hybridization した.

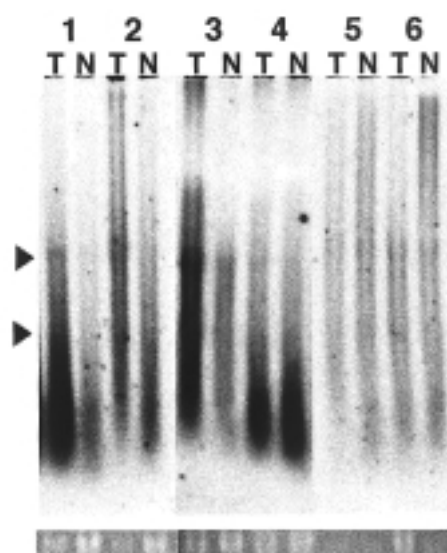


Fig. 5. Northern blot 解析. 肺癌組織 (T) と近傍正常肺組織 (N) の MUC4 mRNA 発現を比較した (Lane 1, 3: 腺癌, Lane 2, 4 ~ 6: 扁平上皮癌; Lane 1 ~ 3: 陽性例, Lane 4 ~ 6: 陰性例).

mRNA にも MUC4の発現が認められたが、陽性例に比べ相対的に低いレベルであった。MUC4 mRNA 発現と蛋白発現の比較が可能であった症例は19例あり、そのうち16例で mRNA と蛋白発現が一致していた。残り3症例中2例では mRNA の発現を認めるものの蛋白発現は認められず、1例は蛋白発現のみ確認できた。

肺癌患者の臨床所見と MUC4発現の関係

Table 1に肺癌組織型別の MUC4発現を示した。MUC4蛋白および mRNA 発現は、肺腺癌症例ではそれぞれ53.8%と77.8%、肺扁平上皮癌症例ではそれぞれ66.7%と71.2%であり、両組織間に統計学的有意差は認められなかった。他の組織型では全例 MUC4の発現が認められたが、症例数が少ないためその組織特異性の評価は行い得なかった。Table 2に MUC4発現と臨床病期、T因子およびN因子との関係を示した。各因子と MUC4発現の間には有意な相関関係は認められなかった。

考 察

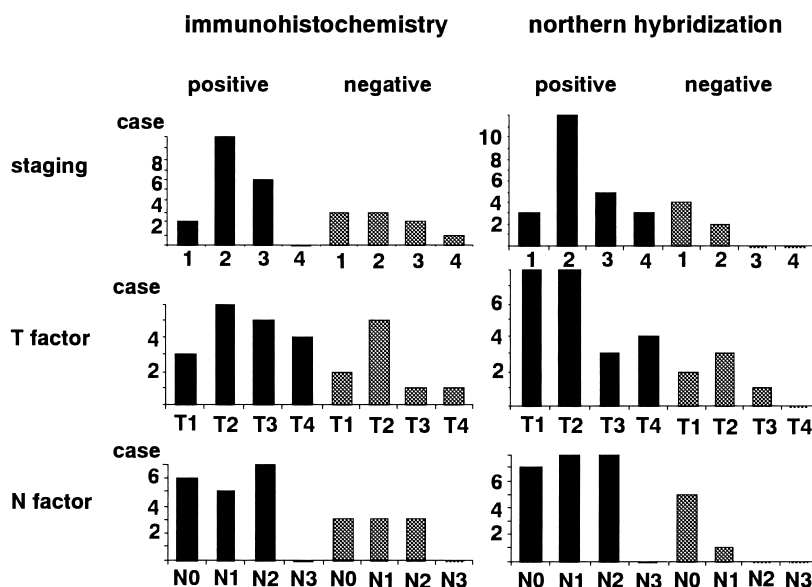
気管気管支粘膜の cDNA ライブラリーよりクローニングされた MUC4ムチンは、そのコア蛋白上に7つのセリンあるいはスレオニンを含む保存された16アミノ酸配列からなる繰り返しドメインを有している^{7, 20}。このセリンおよびスレオニンより O-linkage を介して長く複雑な糖側鎖が伸長してコア蛋白部分が被覆されている。MUC4ムチン1分子中にこの繰り返し配列は300回以上繰り返されており、そこから伸長する豊富な糖鎖のために約900kDaの高分子量糖蛋白となる。これらの構造的特徴から、従来の方法では MUC4ムチンの分離・抽出は非常に困難と考えられており、さらにその蛋白解析を行うのに有用な抗体を作成したという報告もいまだない。

ムチンは細胞の癌化に伴い過剰発現されることが報告されてきた^{3, 4, 6, 15, 16, 18, 19, 23, 28}。MUC4ムチンにおいても同様の報告が散見されるが、有用な抗体が存在しないために mRNA レベルでの解析のみが行われてきた^{3, 4, 16, 18, 19, 23, 28}。したがって MUC4特異的抗体を作成し、これを用いて蛋白についての解析を行うことは、癌細胞の生物学的・免疫学的特性を知る上でも非常に重要であると考えられる。我々

Table. 1 MUC4発現と肺癌組織型との関係

	Immunohistochemistry positive		northern blotting positive
adenocarcinoma	7/13 (53.8%)	n.s.	14/18 (77.8%)
squamous cell carcinoma	6/9 (66.7%)		5/7 (71.2%)
adenosquamous carcinoma	3/3 (100%)		1/1 (100%)
small cell carcinoma	1/1 (100%)		1/1 (100%)
large cell carcinoma	1/1 (100%)		2/2 (100%)
	18/27 (66.7%)		23/29 (79.3%)

Table. 2 MUC4発現と臨床所見との関係



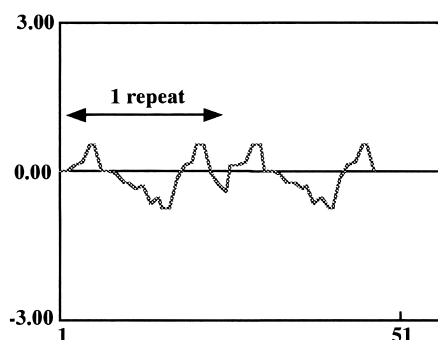
は MUC4 コア蛋白の繰り返し配列に従って合成した 24 アミノ酸長のペプチドを家兎に免疫することによって抗血清を作成した。得られた抗血清は spot test および immunoabsorption test¹⁾ で MUC4 コアペプチドに特異的に反応することが確認され、蛋白解析を行うのに有用な MUC4 抗体をはじめて作成することに成功した。

MUC4 コア上の繰り返しドメインの蛋白構造を調べるために、同部のアミノ酸配列を解析ソフト GENETYX-MAC8.0 を用いてコンピューター解析を行った。3D 構造は大部分が β シート構造であり、両端部は強い疎水性を示していた (Fig. 6)。さらに 1 リピート 16 アミノ酸のうち 7 つがセリンあ

るいはスレオニンであり、同部より O-linkage を介して糖側鎖が伸びていると考えられる。以上の結果より、同部位は抗原性が弱くこの部位に対する抗体が容易に作成されとは考え難かった。しかしながら免疫家兎すべてに特異的抗体が誘導できたことは驚くべきことであった。1 つの繰り返し配列ドメインに含まれる個々の抗原エピトープだけでは十分な抗原性を有しないが、同配列が多数繰り返されることで全体としてその抗原性が高くなり免疫系に認識されるようになる可能性が考えられた。

現在までに MUC4 ムチンは mRNA レベルで種々の臓器癌に発現することが報告されてきた^{3, 4, 16, 18, 19, 23, 28)} が、特に膵癌、肺癌で高発現して

Hydrophobicity Plot



3-D structure of MUC4 core tandem repeat

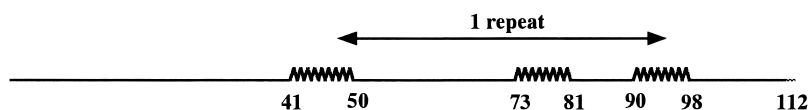


Fig. 6. MUC4コア繰り返し配列部分の親水性と3 D構造解析.

いる。肺癌ではNorthern blot法で解析した肺癌細胞株12例中7例¹⁶⁾, *in situ* hybridization法で解析した肺癌切除組織8例中7例⁴⁾にMUC4 mRNA発現レベルが上昇していたと報告されている。肺癌では, Yu²⁸⁾らがすべての肺癌細胞株および肺癌組織の1/3でMUC4 mRNAの発現を認めたと報告をしている。Seregini²³⁾らは18例中17例の肺癌患者で, 正常肺組織に比べ肺癌組織のMUC4 mRNA発現レベルが上昇していたと報告している。今回検討でも72.4%の肺癌症例で腫瘍組織のMUC4 mRNAレベルが上昇しており, 蛋白レベルでは66.7%の症例で発現陽性であった (Fig. 3, 5)。

MUC4 mRNAと蛋白発現を同時に解析し得た症例のうち80%でmRNAと蛋白発現が一致していた。しかし他の2症例ではMUC4 mRNAが高発現しているにもかかわらず, 蛋白発現は認められなかった。このmRNA発現と蛋白発現の間の解離の原因として, MUC4抗体により認識されるコア蛋白上の抗原エпитープが糖鎖によりマスクされていた可能性が考えられる。実際, 我々は肺癌細胞株のMUC4蛋白発現をFACS解析した際も, mRNA発現陽性細胞株であるにもかかわらずMUC4蛋白が検出されなかった。しかしこれらの細胞をあらかじめ4% paraformaldehyde固定後sialidase処理を行うことによって, はじめて蛋白を検出することが可能となった (data not shown)。一方で, ほとんどの肺癌組織ではsialidase処理なしにMUC4蛋白が検出されたという結果から, 肺癌組織で発現される

MUC4ムチン上では糖鎖形成不全が起こっておりコア蛋白部分が露出していたと考えられる。

これまでに臓器癌におけるムチンのmRNA発現をNorthern blot法で解析した報告では, MUC4をはじめとするいくつかのムチンでsmear patternのシグナルを呈することが示されてきた^{3, 16, 18, 19, 23, 28)}。このシグナルは従来のRNA抽出法やhybridizationの過程で生じたMUC4 RNAのdegradationによるものと考えられている。実際, 我々はRNA電気泳動後に28S, 18S ribosomal RNAを観察すると, RNAの抽出過程ではdegradationが起こっていないことを確認した (Fig. 5)。最近, RNA degradationを最小限に防止するための手法が開発され⁸⁾。その手法によって調整されたMUC4 RNAを解析すると, 11~20 k baseの5つの異なったサイズのRNAとして同定された⁸⁾。我々が用いた従来の手法ではMUC4のように極端に長いRNAはdegradationに陥り, 結果としてNorthern blot法で認められるようなsmear patternを呈したものと思われる。

ムチンが腺細胞より分泌される粘液の主要構成成分であることから, MUC4 mRNAの発現解析も主に腺組織由来の臓器癌で行われてきた^{3, 4, 16, 18)}。腺癌以外の組織型に対する検討は, わずかに肺癌で行われているのみである。Ngyuyen¹⁸⁾らは肺腺癌, 扁平上皮癌および腺扁平上皮癌組織において正常肺組織より有意にMUC4 mRNA発現レベルが上昇していたこと, 腺癌と扁平上皮癌組織で発現頻度および発現レベルに差がなかったことを報告している。

今回の我々の解析でも同様の結果が得られ、腺癌だけでなく扁平上皮癌にも高発現していることが明らかとなった。数多くのムチン蛋白の中では MUC1 ムチンが現在までに最もよく解析がすすんでおり、特に同分子が上皮系細胞のみならず血球系細胞などの非上皮性細胞にも広く分布⁹⁾しているという報告は興味深い。MUC1 ムチンも細胞の悪性化に伴い過剰発現されるが、その発現は腺癌だけでなく肺扁平上皮癌¹⁸⁾などの上皮系の腫瘍組織さらには骨髄腫細胞²⁷⁾でも認められ免疫治療の標的腫瘍抗原になることが報告されている。このことから MUC4 ムチンが腺組織以外の組織の悪性化に伴って異所性過剰発現されている可能性が示唆され、今後の解析の課題であると考えられる。

現在までに癌細胞におけるムチン蛋白の過剰発現が癌の進展や癌患者の予後に逆相関することが報告されてきた^{2, 17, 21)}。また MUC4 ムチンにおいてもその mRNA 発現が肺癌の組織型や分化度と相関することが報告されている^{18, 28)}。これらの報告からムチン蛋白が癌の進展に対して何らかの生物学的意義を有していることが示唆される。しかし本研究では MUC4 発現と肺癌の組織型をはじめ臨床所見との間に相関関係は得られなかった。予後との関係については肺癌患者の経過観察期間が十分でないため行い得なかった。今後、検討を行うつもりである。

結 論

本研究では、MUC4 コア蛋白に対する特異的抗体を作成し肺癌組織における MUC4 蛋白発現をはじめて解析するとともに、MUC4 mRNA 発現との比較検討を行った。MUC4 蛋白は肺癌組織に高発現しており、これは mRNA レベルでの発現増加と糖鎖の形成不全によりコア蛋白が露出するためと考えられた。MUC4 発現と臨床所見との間に相関関係は認められなかった。以上より、MUC4 ムチンは腫瘍抗原として臨床応用される可能性が示唆された。

文 献

1) Abe H, Tooyama I, Renda T, Ersparmer V,

Kimura H: Production of antiserum to [D-Ala²]deltorphin I and its immunohistochemical application to the mouse brain. *NeuroReport* 3: 669-72, 1992.

2) Allan SG, Hay MA, McIntyre, Leonard RCF: Prognosis in small cell carcinoma of the lung-Relationship to human milk fat globule 2 (HMFG2) antigen and other small cell associated antigens. *Br J Cancer* 56: 485-8, 1987.

3) Balague C, Gambus G, Carrato C, Porchet N, Aubert JP, Kim YS, Real FX: Altered Expression of MUC2, MUC4, and MUC5 Mucin Genes in Pancreas Tissues and Cancer Cell Lines. *Gastroenterology* 106: 1054-61, 1994.

4) Balague C, Audie J.P, Porchet N, Real FX: In Situ Hybridization Shows Distinct Patterns of Mucin Gene Expression in Normal, Benign, and Malignant Pancreas Tissues. *Gastroenterology* 109: 953-64, 1995.

5) Basil R, Stanley E, Lamont JT: Mucin Biophysics. *Annu Rev Physiol* 57: 635-57, 1995.

6) Burchell J, Gendler S, Taylor-Papadimitriou J, Girling A, Lewis A, Millis R, Lamport D: Development and characterization of breast cancer reactive monoclonal antibodies directed to the protein core of the human milk mucin. *Cancer Res* 47: 5476-82, 1987.

7) Crerpin M, Porchet N, Aubert JP, Degand P: Diversity of the peptide moiety of human airway mucins. *Biorheology* 27: 471-84, 1990.

8) Debailleul V, Laine A, Huet G, Mathon P, d'Hooghe MC, Aubert JP, Porchet N: Human mucin genes MUC2, MUC3, MUC4, MUC5AC, MUC5B, and MUC6 express stable and extremely large mRNA and exhibit a variable length polymorphism. *J Biol Chem* 273: 881-90, 1998.

9) Delsol G, Gatter KC, Stein H, Erber WN, Pilford KAF, Zinne K, Meason DY: Human lymphoid cells express epithelial membrane antigen: implications for diagnosis of human neoplasms. *Lancet* 2: 1124-9, 1984.

10) Forstner JF, Forstner GG: Gastrointestinal

- Mucus, in Johnson LR, Alpers DH, Christensen J, Jacobson ED, Walsh JH (ed): Physiology of the gastrointestinal tract, Vol 2, 3rd ed, pp1255-83, New York, Raven Press, 1994.
- 11) Gendler SJ, Taylor-Papadimitriou J, Duhig T, Rothbard J: A highly immunogenic region of a human polymorphic epithelial mucin expressed by carcinoma is made up of tandem repeats. *J Biol Chem* 263: 12820-3, 1988.
 - 12) Gendler SJ, Cohen EP, Craston A, Duhig T, Johnstone G, Barnes D: The locus of the polymorphic epithelial mucin (PEM) tumor antigen on chromosome 1q21 shows a high frequency of alteration in primary human breast tumors. *Int J Cancer* 45: 431-5, 1990.
 - 13) Gendler SJ, Lancaster CA, Taylor-Papadimitriou J, Duhig T, Peat N, Burchell J, Pemberton L: Molecular cloning and expression of human tumor-associated polymorphic epithelial mucin. *J Biol Chem* 265: 15286-93, 1990.
 - 14) Gendler SJ, Spicer AP: Epithelial Mucin Genes. *Annu Rev Physiol* 57: 607-34, 1995.
 - 15) Ho SB, Shekels LL, Toribara NW, Kim YS, Lyftogt C, Cherwitz DL, Niehans GA: Mucin gene expression in normal, preneoplastic, and neoplastic human gastric epithelium. *Cancer Res* 55: 2681-90, 1995.
 - 16) Hollingsworth MA, Strawhecker JM, Caffrey TC, Mack DR: Expression of MUC1, MUC2, MUC3 and MUC4 Mucin mRNA in Human Pancreatic and Intestinal Tumor Cell Lines. *Int J Cancer* 57: 198-203, 1994.
 - 17) Kuan SF, Byrd JC, Basbaum CB, Kim YS: Characterization of quantitative mucin variants from a human colon cancer cell line. *Cancer Res* 47: 5715-24, 1987.
 - 18) Nguyen PL, Niehans GA, Cherwitz D, Kim YS, Ho SB: Membrane-Bound (MUC1) and Secretory (MUC2, MUC3, and MUC4) Mucin Gene Expression in Human Lung Cancer. *Tumor Biol* 17: 176-92, 1996.
 - 19) Ogata S, Uehara H, Chen A, Itzkowitz SH: Mucin Gene Expression in Colonic Tissues and Cell Lines. *Cancer Res* 52: 5971-8, 1992.
 - 20) Porchet N, Nguyen VC, Dufosse J, Audie JP, Guyonnet-Duperat V, Gross MS, Denis C, Degand C, Bernheim A, Aubert JP: Molecular cloning and chromosomal localization of a novel human tracheo-bronchial mucin cDNA containing tandemly repeated sequences of 48 base pairs. *Biochem Biophys Res Commun* 175: 414-22, 1991.
 - 21) Reis CA, David L, Seixas M, Burchell J, Sobrinho-Simoes M: Expression of fully and under-glycosylated forms of MUC1 mucin in gastric carcinoma. *Int J Cancer* 79: 402-10, 1998.
 - 22) Rose MC: Mucins: structure, function, and role in pulmonary diseases. *Am J Physiol* 263 (Lung Cell Mol Physiol 7): L413-29, 1992.
 - 23) Seregini E, Botti C, Lombardo C, Cantoni A, Bogni A, Cataldo I, Bombardieri E: Pattern of Mucin Gene Expression in Normal and Neoplastic Lung Tissues. *Anticancer Res* 16: 2209-14, 1996.
 - 24) Shankar V, Pichan P, Eddy RL Jr, Tonk V, Nowak N, Sait SN: Chromosomal localization of a human mucin gene (MUC8) and cloning of the cDNA corresponding to the carboxy terminus. *Am J Respir Cell Mol Biol* 16: 232-41, 1997.
 - 25) Siddiqui J, Abe M, Hayes E, Shani E, Kufe D: Isolation and sequencing of a cDNA coding for the human DF3 breast carcinoma-associated antigen. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 85: 2320-3, 1988.
 - 26) Swallow DM, Gendler SJ, Griffiths B, Corney G, Taylor-Papadimitriou J, Bramwell ME: The human tumor-associated epithelial mucins are coded by an expressed hypervariable gene locus PUM. *Nature* 328: 82-4, 1987.
 - 27) Takahashi T, Makiguchi Y, Hinoda Y, Kakiuchi H, Nakagawa N, Imai K, Yachi A: Expression of MUC1 on myeloma cells and induction of HLA-unrestricted CTL against MUC1 from a multiple myeloma patient. *J Im-*

munology 153: 2102-9, 1994.

- 28) Yu CJ, Yang PC, Shew JY, Hong TM, Yang SC, Lee YC, Lee LN, Luh KT, Wu CW: Mucin mRNA Expression in Lung Adenocarcinoma Cell Lines and Tissues. *Oncology* 53: 118-26, 1996.