



Title	口腔扁平上皮癌の浸潤増殖における上皮成長因子(EGF)と線維芽細胞の関与
Author(s)	林堂, 安貴
Citation	大阪大学, 1991, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3086304
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文表題

「口腔扁平上皮癌の浸潤増殖における
上皮成長因子(EGF)と線維芽細胞の関与」

所属：大阪大学歯学部口腔外科学第一講座

著者名：林堂安貴

①

論文表題

「口腔扁平上皮癌の浸潤増殖における上皮成長因子(EGF)と線維芽細胞の関与」

大阪大学歯学部口腔外科学第一講座

林堂安貴

緒 言

上皮成長因子(EGF)は雄マウス顎下腺抽出物から上皮細胞の増殖を促進する因子として精製された¹⁾。さらにヒト尿中からもヒトEGF(hEGF)が分離され²⁾、これは従来報告されていたβ-ウロガストロンと同一のものであることが確認されている³⁾。当初、EGFはヒトでは主に顎下腺腺房細胞と十二指腸ブルンネル腺細胞によって産生されていると考えられていた⁴⁾が、近年の免疫組織学的研究により甲状腺、脾や腎をはじめとする多くの臓器でのEGF産生が示唆されている^{5, 6)}。このようにEGFは全身に広く分布し、局所ホルモン様物質として自己分泌または傍分泌機構により細胞の増殖のみならず多様な役割を担っていると推測されている。

EGFの作用は細胞膜に存在する170kDaのEGF受容体を介して営まれる。EGFがEGF受容体に結合した後、受容体のチロシンキナーゼが活性化され受容体の自己リン酸化が、次いで他の蛋白質のリン酸化が誘導される⁷⁾。EGFの受容体結合後に生じる

細胞内シグナル伝達系の詳細は不明な点が多いが、EGFはNa-Kポンプの活性化や細胞膜のrufflingなどの膜変化や細胞質での糖代謝の亢進、さらに核でのDNA合成促進など、多様な生物活性を持つことが徐々に明らかにされている^{8,9}。特にEGF受容体がガン遺伝子のv-erb-B遺伝子産物と高い相同意を持つこと¹⁰や、扁平上皮癌などの悪性腫瘍に過剰発現することが報告されて¹¹⁻¹³以来、EGFやEGF受容体が細胞の癌化や癌細胞の動態にも密接に関係していると考えられている。

口腔粘膜は粘膜上皮と結合組織で構成されている。口腔粘膜上皮の増殖・分化や癌化においてもEGFが重要な役割を担っていると推測されるが、口腔粘膜におけるEGFの局在や口腔粘膜の癌化に伴うEGFやEGF受容体の発現変化についての報告はなかった。そこで著者らはまず口腔粘膜組織におけるEGFとEGF受容体の局在について免疫組織学的に検索した¹⁴。その結果EGFは上皮細胞に接した間質部に特異的に局在し、その発現は上皮の悪性化に伴って増強される所見を示した。また正常粘

膜上皮では基底細胞のみにみられたEGF受容体陽性細胞は悪性化に伴い増加し、扁平上皮癌では殆どの癌細胞がEGF受容体陽性を示した。以上の所見から口腔扁平上皮癌の増殖にEGFが重要な役割を持ち、また上皮一間葉間にはEGFを介したなんらかの作用が存在するものと推測された。そこで本研究では、コラーゲンゲル培養法を用いて口腔扁平上皮癌細胞の増殖様式に与えるEGFと線維芽細胞の影響について解析を行なった。

実験材料および方法

1. 細胞と培養

扁平上皮癌細胞として、ヒト口底癌由来のKBと当講座にて組織片培養法^{1,5)}にて樹立した舌癌由来のSCCKN及びSCCTFの3種の細胞株を用いた。線維芽細胞は外科的に切除された口腔粘膜組織から組織片培養法^{1,5)}によって得られた。各細胞はいずれも、10%ウシ胎児血清(FCS; M.A. Bioproducts, Walkersville, MD, USA)を含むDulbecco変法Eagle培地(DME; 日水製薬, 東京)を増殖培

養液として37℃, 5% CO₂気相下にて増殖させた。

継代培養は細胞が増殖飽和状態に達した時点で行なわれた。すなわち, 0.08% トリプシン(阪大微生物研究所, 大阪)と1.4% エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム(EDTA; 同仁化学研究所, 熊本)を含むリリン酸緩衝液(PBS)で15分間37℃で処理することにより単一細胞を得た。DMEにて洗浄後, 扁平上皮癌細胞は 2×10^4 個/mlに, 線維芽細胞では分割比1:3になるよう増殖培養液に浮遊させたものを培養皿に加え細胞の継代を行なった。なお, 線維芽細胞は継代10代までのものを実験に使用した。

2. 線維芽細胞のconditioned mediumの調製

増殖飽和状態の線維芽細胞を0.2% ウシ血清アルブミン(BSA ; Sigma, St. Louis, MO, USA)を含むDMEで72時間培養後, 培養上清を5000rpm, 15分間遠心しその上清を採取しconditioned medium(CM)とした。

3. EGFの定量

16mm径マルチウェル(Corning Glass Works,

Corning, NY, USA) で増殖飽和状態になった各細胞を 0.2% BSA を含む DME で培養し、培養上清中の EGF を Hayashi らの方法¹⁶⁾による 2 抗体サンドイッチ ELISA 法を用いて定量した。すなわち、96-well Immulon microtiter plate (Dynatec Laboratories, Inc., Alexandria, VA, USA) の各ウエルに $2.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ の抗 EGF F(ab')₂ (湧永製薬, 広島) を含む 0.1M 重炭酸緩衝液 (pH 10) を $100 \mu\text{l}$ 加え 37°C で 2 時間反応させた。EIA 用緩衝液 (0.01M リン酸ナトリウム, 0.15M NaCl, 1 mM MgCl₂, 0.5% BSA, 0.1% NaN₃, 0.05% Tween 20; pH 7.2) で洗浄後、各ウエルにサンプル及び標準 EGF (アース製薬, 兵庫) を $100 \mu\text{l}$ 加えた。さらに、EIA 用緩衝液で 100 倍に稀釀した β -ガラクトシダーゼ標識抗 EGF Fab' (湧永製薬) を $50 \mu\text{l}$ 加え、 37°C で 2 時間反応を行なった。EIA 用緩衝液で洗浄後、基質液 (0.15 mM 4-メチルウニベリフェリル- β -D-ガラクトシピラノシド (Serva, Heidelberg, Germany), 0.01M リン酸ナトリウム, 0.15M NaCl, 1 mM MgCl₂, 0.5% BSA; pH 7.2) $100 \mu\text{l}$ を

加え 37℃で 60 分間 反応を行なった後、 $150\mu\text{l}$ の 反応停止液 (0.5M グリシン / NaOH ; $\text{pH } 10.3$) を 加え コロナマイクロプレートリーダー (MTP-32, コロナ電気, 茨城) で 蛍光強度を測定した ($\text{Ex } 360\text{ nm}$, $\text{Em } 450\text{ nm}$).

4. 細胞の EGF結合能の測定

Heldinらの方法¹⁷⁾に準じて、扁平上皮癌細胞の EGF結合能を測定した。すなわち 5×10^4 個の細胞を 11.3mm 径マルチウェル (Costar, Cambridge, Mass., USA) に加え、4日間培養した後、氷冷下にて 0.25% BSAを含む PBSにて洗浄した。 0.25% BSAを含む DMEに各濃度の [^{125}I] EGF (ICN Radiochemicals, specific activity $115\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$) を加え $1\mu\text{g}/\text{ml}$ の EGF存在下または非存在下で 4°C にて 4時間反応させた。その後、氷冷下にて 0.25% BSAを含む PBSで 3回洗浄した。上清を除き、 $1\text{N NaOH } 400\mu\text{l}$ で細胞を溶解し ガンマカウンター (LKB-Wallac 1282 Compu-Gamma, Wallac, Finland) で 放射活性を測定した後、測定結果を Scatchard 解析した。

5. 扁平上皮癌細胞の増殖能の検討

16mm径マルチウエルに 10^4 個/mlの細胞を浮遊させた増殖培養液1mlを加えた。24時間後に各濃度のEGFを加え3日ごとに培養液の交換を行なった。7日後にニグロシンで染色し生細胞数を血球計算板にて算定した。

6. コラーゲンゲル内培養法

0.3% I型希塩酸コラーゲン溶液(高研, 東京), 5倍濃度DMEと再構成用緩衝液(0.05M NaOH, 2mg/ml NaHCO₃, 0.2M HEPES)を冷却しながらそれぞれ7:2:1の比率で混合した後, 最終濃度10%になるようにFCSを添加しコラーゲン混合液を作成した。16mm径マルチウエルに500μlのコラーゲン混合液を加え37℃でゲル化させbase layerとした。さらにその上に, 扁平上皮癌細胞 5×10^4 個/ml浮遊させたコラーゲン混合液を500μl加えゲル化させtop layerとした。ゲル上に1mlの増殖培養液を加え3日ごとに培養液を交換した。

コラーゲンゲル内の増殖細胞数の算定は培養12日目にSanfordらの方法¹⁸⁾に準じて行なった。す

なわち $1500\text{U}/\text{ml}$ コラーゲナーゼ（新田ゼラチン、大阪）にてゲルを溶解後、 $0.1M$ クエン酸/ 0.1% クリスタルバイオレット溶液にて核染色し血球計算板にて核数を算定した。

形態観察のためにコラーゲンゲルを 10% 中性ホルマリン溶液にて固定し、通常に従いパラフィン包埋した。切片をヘマトキシリン・エオジン（H-E）染色し光学顕微鏡にて検索した。

また、扁平上皮癌細胞の増殖に与える線維芽細胞の影響を検討するため、 16mm 径ウエル内で密に増殖した線維芽細胞単層上にコラーゲンゲルを作製し、さらにその上で作製されたゲル内で扁平上皮癌細胞を培養した（図1-A）。

7. 扁平上皮癌細胞の浸潤能の検討

前述の方法で 16mm 径ウエル内に作成した $500\mu\text{l}$ のコラーゲンゲル上に 2.5×10^4 個/ ml の細胞を含む増殖培養液 1ml を加え、以後3日ごとに培養液の交換を行ない12日後にゲル内部へ侵入した細胞を算定した。同時にゲルを 10% 中性ホルマリン溶液で固定後パラフィン切片を作成しH-E染色にて

形態学的検索を行なった。

なお扁平上皮癌細胞の細胞浸潤に与える線維芽細胞の影響については以下の方法にて検討した。あらかじめ16mm径ウエルで増殖飽和状態になった線維芽細胞上にゲルを作製し、そのゲル上で扁平上皮癌細胞を培養し12日後にゲル内の浸潤細胞数を算定した(図1-B)。

8. ザイモグラフィー

扁平上皮癌細胞の培養上清中の蛋白分解活性を Rocheらの方法¹⁸⁾に準じたカゼインを基質とするザイモグラフィーにて検索した。培養上清は増殖飽和状態の扁平上皮癌細胞を各濃度のEGFを添加した0.2%BSAを含むDMEで48時間培養することによって得られた。

培養上清を2.5%SDS及び10%グリセリンを含む0.0625Mトリス塩酸緩衝液(pH 6.8)になるよう調整し、0.2%ハマーステン・カゼイン(Merck, Darmstadt, Germany)及び150μg/mlのプラスミノーゲン(Sigma)を含む10%SDS-ポリアクリルアミドスラブゲルを支持体とし室温で20mAの条件

で電気泳動を行なった。泳動終了後 2.5% トリトン X-100 溶液で 1 時間洗浄した。さらに、0.1M NaCl を含むトリス塩酸緩衝液 (pH 7.6) で洗浄し、同緩衝液で 37°C で 6 時間反応させた後、0.25% クマシーブルー R 250 (Fluka, Buchs, Switzerland) を含む 7% 酢酸 / 50% メタノール溶液で染色し、10% 酢酸 / 30% メタノール溶液で脱色した。

9. 逆相ザイモグラフィー

扁平上皮癌細胞の培養上清中のプラスミノーゲンアクチベーターインヒビター (PAI) 活性を Erickson らの方法²⁰⁾に準じた逆相ザイモグラフィーにて検索した。すなわち、扁平上皮癌細胞の培養上清を 10% SDS ポリアクリルアミドスラブゲルを支持体として電気泳動を行ない、泳動終了後スラブゲルを 2.5% トリトン X-100 溶液で 1 時間洗浄した。洗浄後スラブゲルをあらかじめ以下のように調整されたフィブリン・アガロースゲル上に重ね合わせ 37°C 湿箱中で 4 時間反応させ、フィブリン・アガロースゲルを 0.1% アミドブラック (和光純薬、大阪) を含む 10% 酢酸 / 45% メタノール

溶液で染色し、10% 酢酸 / 30% メタノール溶液で脱色した。なおフィブリン・アガロースゲルはアガフィクス（和光純薬）上で 1% アガロース（フナコシ、東京）， $25\text{ }\mu\text{g/ml}$ プラスマニノゲーベン（Sigma）， 0.5U/ml トロンビン（Sigma）， 2.4 mg/ml フィブリノーゲン（Sigma）及び 0.05U/ml ウロキナーゼ（Protogen AG, Laufelfingen, Switzerland）を含む PBS をゲル化させることにより作製された。

10. 蛋白量の測定

0.1M 水酸化ナトリウム溶液で細胞を溶解した後、Bradford の方法²¹⁾で BSA を標準として細胞蛋白量を測定した。

結 果

1. 扁平上皮癌細胞のEGF結合能の測定

口腔扁平上皮癌細胞のEGFに対する応答性を検索するにあたり、まず標的細胞として用いたSCCKN, SCCTF及びKBのEGF受容体の発現を [^{125}I] EGF binding assayにて検討した。その結果、SCCKNと

KBは解離定数Kdがそれぞれ 1.4 nM と 16.5 nM の1種類の受容体を有していた。これに対し、SCCTFはKd値 0.54 nM の高親和性とKd値 4.5 nM の低親和性の2種類の受容体を有していることがわかった。細胞あたりの受容体数はSCCKNで 6.2×10^4 個、KBで 4.7×10^4 個であり、SCCTFでは高親和性 13.4×10^4 個、低親和性 81.0×10^4 個の受容体を保有していた(図2)。なお、[^{125}I]EGFの結合の経時的变化を検討したところ4時間で特異的結合(全結合-非特異的結合)が最大となつたため実験の反応時間は4時間とした。また [^{125}I]EGFの非特異的結合は添加した [^{125}I]EGFの2%未満であった。

2. 扁平上皮癌細胞の増殖能に対するEGFの影響
扁平上皮癌細胞を各濃度のEGFを含む増殖培養液で培養しその増殖細胞数を算定した。EGFは濃度依存性に扁平上皮癌細胞の増殖を抑制し、 100 ng/ml EGF添加によりSCCKNは57%, SCCTFは72%, KBは52%まで増殖が抑制された(図3)。

3. 扁平上皮癌細胞のコラーゲンゲル内での増殖

に対するEGFの影響

扁平上皮癌細胞をコラーゲンゲル内で培養し、扁平上皮癌細胞の増殖様式に与えるEGFの影響を3次元的に解析した。SCCKN, SCCTFはゲル内培養4日目頃より球形のコロニーを形成した。一方、KBはゲル内での増殖が悪く培養12日目でもコロニーを形成しなかった。SCCKN及びSCCTFのコロニー形態は培養系にEGFを添加することにより著しく変化した。すなわち、均一な大きさのコロニーが $10\text{ng}/\text{ml}$ 以上のEGFを添加することにより辺縁不整の不定型のコロニーに変化し、コロニーの切片のH-E染色所見でより明らかに認められた。EGF無添加では密な細胞集団からなる円形のコロニーが形成されるのに対し、 $10\text{ng}/\text{ml}$ のEGF添加時にはコロニーは拡張し細胞配列が疎となり、一部に周囲のコラーゲンゲルへ浸潤増殖を示唆する所見が認められた（図4）。

ゲル内の扁平上皮癌細胞の増殖細胞数を培養12日に算定した結果、EGFはゲル内においても扁平上皮癌細胞の増殖を濃度依存性に抑制すること

がわかった。EGFによる増殖抑制は10ng/ml以上の濃度で著明で、SCCKNとSCCTFの増殖は無添加時の約50～60%まで抑制された（図5）。KBはゲル内増殖が極めて悪いため、ゲル内での増殖能の判定を行なわなかった。

4. 扁平上皮癌細胞の浸潤能に対するEGFの影響

ゲル内培養の結果よりEGFがSCCKN及びSCCTFのゲルへの浸潤を促進することが示唆された。そこで、浸潤細胞数を算定するためにコラーゲンゲル上で扁平上皮癌細胞を培養しゲル内への侵入細胞数から浸潤能の評価を行なった。ゲル上培養開始後、約4日目よりゲル内への侵入細胞がみられた。培養12日目に侵入細胞数を算定すると、SCCKNでは総細胞中0.62%の細胞が、またSCCTFで1.20%，KBでは0.013%の細胞がゲル内に侵入していた。

ゲル内への侵入細胞数は10ng/ml以上のEGF添加によって増加し、10ng/mlのEGF添加では無添加の場合に比べSCCKNで32倍、SCCTFでは6.5倍まで侵入細胞数の増加がみられた（図6，7）。図8にEGF存在下あるいはEGF非存在下でSCCKNをゲル上

培養した切片の H-E 染色所見を示している。EGF無添加では細胞はコラーゲンゲル表面に密に配列し、ゲル内部への侵入細胞が少ないのに対し、10ng/mlのEGFを添加することによりゲル表面の細胞配列は疎となり、ゲル内へ多数の細胞が侵入していた。一方、ゲル内増殖が不良であったKBはコラーゲンゲルに対する浸潤能も極めて低く、EGF添加によっても細胞浸潤は促進されなかった（図6）。

5. 扁平上皮癌細胞のPA及びPAI産生とそれに対するEGFの影響

EGFがコラーゲンゲルへの細胞浸潤を促進させる一つの可能性として扁平上皮癌細胞の蛋白分解活性の亢進が考えられた。そこで扁平上皮癌細胞の蛋白分解酵素産生能とそれに対するEGFの影響をカゼインを基質とするザイモグラフィーにて解析した。扁平上皮癌細胞を無血清培養液にて48時間培養し、得られた培養上清を標品とした。SCKN及びSCCTFのプラスミノーゲン存在下のザイモグラムは100kDa, 54kDa, 33kDa附近に3本の強いlytic bandを示した。なお、スラブゲルよりプラ

スミノーゲンを除くことにより lytic band はすべて消失し、これらはいずれもプラスミノーゲンアクチベーター (PA) であることが確認された。これらの band は EGF 添加によりさらに増強されることがわかった (図 9)。なお、PA 活性が著明に促進される EGF 濃度は、SCCKN (図 10)、SCCTF (データ省略) とともに 10 ng/ml 以上であった。KB では極めて弱い lytic band を認めるのみで、これらの band は EGF 添加によっても増強されなかつた。次に扁平上皮癌細胞 3 株のプラスミノーゲンアクチベーターインヒビター (PAI) の発現をフィブリンを基質とする逆相サイモグラフィーを用いて検討した。その結果、扁平上皮癌細胞 3 株は 54 kDa 附近に PAI の band を示した。この band は SCCKN や SCCTF では極めて弱いかあるいは殆ど認められないのに対し、KB は強い PAI 活性を示唆するフィブリン非溶解 band を示した。なおこれらの PAI の band は EGF 添加によっても変化を示さなかつた (図 11)

6. 扁平上皮癌細胞のコラーゲンゲル内増殖に与

える線維芽細胞の影響

次に、扁平上皮癌細胞の増殖に対する線維芽細胞の影響を検討した。増殖飽和状態の線維芽細胞上にコラーゲンゲルを作成し、ゲル内で扁平上皮癌細胞の培養を行なった（図1-A）。SCCKNやSCCFは前述のようにコラーゲンゲル内で密な細胞集団からなる球形のコロニーを形成した。一方、これらのコロニーは線維芽細胞と混合培養することにより、EGF添加時と類似した形態変化を示した。すなわち、細胞配列は疎となり辺縁不整の拡張したコロニーに変化し、ゲルへの浸潤増殖を示唆する所見が認められた。なお、この形態変化は1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の抗EGFモノクローナル抗体（Oncogene Science Inc., Manhasset, NY, USA）を添加することにより阻止された（図12）。

7. 扁平上皮癌細胞の浸潤能に対する線維芽細胞の影響

線維芽細胞を密に増殖させたウェル上に作製したコラーゲンゲル上で扁平上皮癌細胞を培養し、浸潤能の判定を行なった（図1-B）。ゲル内部へ

の侵入細胞数は線維芽細胞と混合培養することによりSCCKNで10倍、SCCTFで2.5倍に増加した。一方、 $1\text{ }\mu\text{g/ml}$ の抗EGFモノクローナル抗体を添加することにより、線維芽細胞による細胞浸潤促進効果はそれぞれ約1/3と1/2に抑制された。なお、KBでは線維芽細胞による細胞浸潤の促進は見られなかった（図13）。

8. 扁平上皮癌細胞のPA産生に与える線維芽細胞の影響

線維芽細胞による癌細胞の浸潤促進に蛋白分解酵素が関与しているか否かを検討するため、扁平上皮癌細胞に30%濃度の線維芽細胞のCMを加え培養上清中の蛋白分解酵素活性の変化をザイモグラフィーにて検索した。その結果、CM添加によってSCCKNとSCCTFはPA産生の亢進を受けることが明らかとなった。一方、KBに対するこの効果はみられなかった（図14）。

9. 各種培養細胞のEGF産生量

口腔扁平上皮癌細胞3株と正常口腔粘膜及び口腔癌組織から分離した線維芽細胞のEGF産生能に

ついて検索した。各細胞を0.2%BSAを含むDMEで4時間培養した後、培養上清中のEGF量を測定すると、正常粘膜及び癌組織由来の線維芽細胞はいずれも、細胞蛋白1mgあたり約10~50pg/mlのEGFを産生していた。これに対し、扁平上皮癌細胞は約400~1200pg/mlと多量のEGFを培養液中に産生することがわかった（表1）。

10. SCCKNのEGF産生に対する線維芽細胞の影響

線維芽細胞との混合培養により扁平上皮癌細胞のゲルへの細胞浸潤は促進され、この促進効果は抗EGF抗体添加により抑制された。この事実から扁平上皮癌細胞の線維芽細胞との混合培養による内因性のEGFの変化が示唆されたので、SCCKNのEGF産生に対する線維芽細胞の影響について検討した。SCCKNに30%濃度の線維芽細胞のCMを加えてから1日目、2日目、4日のSCCKNの培養液中のEGF量を定量した。その結果、SCCKNの培養液中のEGF量は線維芽細胞のCMの添加により2日目で無添加時の約1.4倍、4日目で約1.8倍に増加していた（図15）。なお、SCCKNのCMを線維芽細胞に加

えても線維芽細胞のEGF産生量の増加はみられなかつた（データ省略）。

考 察

細胞の増殖や分化は細胞外基質や液性因子などの細胞間に介在する微小環境に制御されている。口腔粘膜組織は粘膜上皮と結合組織で構成されており、上皮一間葉間には細胞間物質を介した相互作用が存在し、口腔粘膜の増殖や分化に影響を与えていていると考えられる。

細胞間に介在する液性因子のなかでEGFは上皮細胞の増殖を促進させる因子として最も古くから知られているポリペプチドである¹³⁾。しかし、EGFが生体でどのような調節機構でいかなる役割を持つかについては不明な点が多い。口腔粘膜組織におけるEGFの作用や動態を理解するため、著者らはEGFとEGF受容体の局在について免疫組織学的に検索したところ、口腔粘膜上皮の悪性化に伴つてEGFとEGF受容体の発現が増強される所見を得た¹⁴⁾。特に扁平上皮癌細胞の殆どがEGF受容体陽性

を示し、癌細胞周囲の間質が抗EGF抗体によって強く染色された。上記のように免疫組織学的にはEGFは上皮細胞に近接した結合組織中に局在する所見を示し、EGF産生細胞を同定することができなかった。そこで扁平上皮癌組織より分離された培養細胞におけるEGF産生量をELISA法を用いて測定した。その結果、扁平上皮癌細胞SCCKN, SCCTF及びKBは線維芽細胞に比較して高いEGF産生能を持つことがわかった。in vivo及びin vitroで得られた所見から、扁平上皮癌組織においてEGFは主として癌細胞から產生され、癌間質に蓄積されているものと推察された。なお、このような上皮細胞によって分泌されたEGFが間質に蓄積されることを示す所見は腎組織においても報告されている⁸⁾。

EGFやEGF受容体と癌化との関連を示唆する知見は、はじめDownwardらによって得られた。彼らはトリ赤芽球ウイルスのガン遺伝子のv-erb-B遺伝子産物がEGF受容体と高い相同意を有することを示した¹⁰⁾。その後、EGFあるいはトランスフォーミングケロ

-スファクター-a (TGF-a) と EGF受容体が共に多くの悪性腫瘍において高発現することが明らかにされている^{13, 22-24}。これらは癌細胞自らが分泌した成長因子によって自律性増殖を示すという *autocrine hypothesis* を支持する所見である。本研究においても口腔扁平上皮癌細胞が高いEGF産生能を持ち、EGF受容体を発現していることが示された。しかし、最近の Kamata らの報告²⁵は EGFによるヒト扁平上皮癌細胞の自律増殖機構に疑問をなげかけている。彼らは他の細胞に増殖促進を示す濃度のEGFがヒト扁平上皮癌細胞の増殖を抑制すると報告している。この報告と同様に、今回用いた3種の口腔扁平上皮癌細胞株の単層培養下での増殖は、濃度依存性にEGFによって抑制された。

コラーゲンゲル培養法は細胞を生体に近い条件で増殖させることができ、また増殖様式を3次元的に観察することができるため、器官発生や組織分化の研究に、よく用いられている²⁶⁻²⁸。そこで、コラーゲンゲル培養法を用いて扁平上皮癌細胞の増殖様式を観察した。その結果、EGFは

単層培養時と同様にゲル内での扁平上皮癌細胞の増殖を抑制したが、その一方で、増殖様相を著しく変化させることができた。すなわち、EGF添加によってKBを除く扁平上皮癌細胞のゲルへの細胞浸潤が著明に促進されることが示された。

癌細胞の浸潤機構の解析のためにBoyden chamberを用いたin vitro実験モデルがよく用いられている²⁹⁻³¹。この方法は細胞の遊走性(chemotaxisやhaptotaxis)を判定するのに有用である。今回用いたゲル上培養法は癌細胞の浸潤を定量評価できることに加え、組織学的な検索も可能であり、癌の浸潤機構を解析する上で有用なモデルになり得る考えられた。このコラーゲンゲル内への細胞浸潤度はPA活性と極めてよく相関していた。SCCKNとSCCTFのPA産生とコラーゲンゲルへの細胞浸潤はともに1ng/ml以下のEGFではあまり影響を受けなかつたが、10ng/ml以上の濃度において顕著に促進された。また、EGFによりPA活性の促進を受けなかつたKBはEGFによるゲル内への浸潤促進も認められなかつた。このように、コ

ラーゲンゲル培養でみられる細胞浸潤は蛋白分解活性を反映しているものと考えられた。

セリンプロテアーゼであるPAは70kDaの組織型PA(tPA)とウロキナーゼ型PA(uPA)に分類される。さらに、uPAは54kDaと33kDaの高分子量及び低分子量uPAの2型に細分される^{32, 33)}。SCCKNとSCCTFは高分子量及び低分子量uPAに加えて、100kDaのuPAとPAIとの複合体³⁴⁾を産生しており、これらの活性はすべてEGF添加によって増加した。uPAは細胞の悪性転化に伴い産生が亢進されることがから、癌細胞の浸潤・転移に重要な作用を担っている蛋白分解酵素であると推測されている^{32, 35)}。uPAはtPAと同様に、血清中のプラスミノーゲンを基質とし、プラスミンを産生する^{33, 36, 37)}。プラスミンはラミニン、フィブロネクチンやプロテオグリカンなどの細胞外基質を分解する他、コラーゲナーゼやIV型コラーゲナーゼをはじめとする蛋白分解酵素を不活性型から活性型へ転換する作用を有している。コラーゲナーゼなどの蛋白分解酵素は不活性型で分泌され、生理活性を持つ

にはプラスミンによる活性化が必要であるとされている^{33, 38-40}。すなわち、PAは蛋白分解力スケードの初期酵素であり、特にuPAによる種々の不活性型酵素の活性化が癌浸潤の第一歩であると考えられる。扁平上皮癌細胞のゲルへの浸潤増殖が細胞のコラーゲン分解能に関係していることはEGFにより細胞浸潤が促進された細胞の培養上清中にヒドロキシプロリンの含有量がEGF無添加のものに比較し高いことからも示唆された（データ省略）。

一方、種々の蛋白分解酵素に対する阻害因子が生体に存在することも明らかにされている。特にPAの阻害因子であるPAIは血管内皮細胞、線維芽細胞及び平滑筋細胞などの正常細胞のみならず癌細胞においても存在することが明らかにされている⁴¹⁻⁴⁸。特に最近、癌細胞の浸潤がuPAとPAIとの相互作用によって制御を受けていることを示唆する研究結果が多数報告されている⁴⁴⁻⁴⁸。PAIの発現を逆相ザイモグラフィーで検索した結果、扁平上皮癌細胞3株全てにPAIの発現を認めた。

特にコラーゲンゲル内での増殖や細胞浸潤が極めて低かったKBでは強いPAI発現が認められ、その活性はEGF添加によっても変化を受けなかった。

SCCKN, SCCTF及びKBいずれの細胞もEGFによって増殖が抑制された。一方、KBはEGFによる細胞浸潤やPA及びPAI活性の変化を受けなかった。そこで、扁平上皮癌細胞のEGFに対する応答能の差異をEGF受容体数と結合能の差異に求めようとした。しかし、EGF受容体の数やリガンド結合能の差異でこれを説明することはできなかった。本研究で用いた扁平上皮癌細胞3株は、それぞれ異なるEGF受容体数及び結合能を示したが、増殖に対するEGFの効果は3株とも極めて類似していた。またEGFにより最も強くコラーゲンゲルへの細胞浸潤とuPA産生の促進を受けたSCCKNのEGF受容体はSCCTFに比較してEGF結合能、数ともに低いものであった。3株のうち、KBの受容体は結合能・数とも他の2株に比較し低かった。しかし、高濃度のEGFをKBに添加してもゲルへの細胞浸潤や蛋白分解酵素発現を変化させることはできなかった。

このように EGFに対する細胞の応答が、単純に細胞の EGF受容体の数や結合能と相関しないことはすでに種々の細胞系において報告されている^{47, 48)}。

リガンドである EGFが受容体に結合し、そのチロシンキナーゼが活性化を受けることはよく知られている⁷⁾。しかし以後のシグナル伝達系については不明な点が多い。EGFに対する細胞応答の差異は受容体のチロシンキナーゼ活性化以後のシグナル伝達系の違いによるものと推測される。少なくとも 3 株の EGFに対する応答性をみる限り、細胞増殖と浸潤に強く関与する蛋白分解酵素調節は別経路のシグナル支配を受けていると思われた。なお癌の浸潤と増殖の間に相関性のないことは種々の腫瘍細胞系で報告されている^{15, 49)}。

生体において癌の浸潤増殖は線維芽細胞をはじめとする種々の間質成分の影響下で行なわれている。癌細胞と間質間には成長因子を介した相互作用が存在し、互いの増殖様式に影響を与えているものと考えられる^{50, 51)}。そこで、線維芽細胞と

の共存下で扁平上皮癌細胞がいかなる増殖様式を示すかコラーゲンゲルを用いて検討した。SCCKNやSCCTFを線維芽細胞存在下で培養すると、これらの扁平上皮癌細胞はEGF添加時と同様の所見を示した。扁平上皮癌細胞のゲルへの細胞浸潤は線維芽細胞との混合培養によって促進された。さらに線維芽細胞存在下での浸潤促進効果は $1\text{ }\mu\text{g/ml}$ の抗EGF抗体の添加により抑制され、混合培養による細胞浸潤の促進に扁平上皮癌細胞あるいは線維芽細胞のいずれかの内因性のEGFの関与が示唆された。線維芽細胞から産生されるEGF量は微量であり、扁平上皮癌細胞の培養上清添加により線維芽細胞のEGF産生量は影響を受けなかった。一方、線維芽細胞の培養上清で扁平上皮癌細胞を処理するとEGF産生の促進がみられた。

以上の研究結果から生体での扁平上皮癌細胞とEGFとの関係を以下のように説明することができる。扁平上皮癌細胞は自らEGF産生能を持ち、EGF受容体を発現している。扁平上皮癌細胞のEGF分泌は線維芽細胞の液性因子によって促進される。

分泌された EGFは扁平上皮癌細胞の増殖を抑制する一方で、蛋白分解酵素産生を亢進し細胞の浸潤能を促進させる。一方、線維芽細胞との混合培養によってみられた扁平上皮癌細胞の細胞浸潤促進は過剰の抗EGF抗体によっても完全に阻止されないことから、生体における癌浸潤にはEGF以外の因子の関与も推測される。EGFが癌細胞の浸潤に強く関与することを示唆する免疫組織学的所見は胃癌や膀胱癌などにおいて報告されている^{24, 52)}。本研究で得られた上記の仮説の確認やそれらの調節機構の解明のために、多数の癌細胞株を用いたEGF及びEGF受容体と増殖、蛋白分解酵素、阻害因子及び浸潤能など互いの関係の解析や、線維芽細胞が產生するEGF產生促進因子の分離・同定が今後の研究課題と考えている。

結 語

扁平上皮癌細胞の増殖様式にEGFと線維芽細胞がいかなる影響を及ぼしているか検討し以下の結果を得た。

1. 扁平上皮癌細胞はEGF受容体を保有するとともに線維芽細胞に比較し高いEGF産生能を有していた。

2. EGFは扁平上皮癌細胞の増殖を抑制する一方で、コラーゲンゲルへの細胞浸潤を促進させた。

3. 上記の細胞浸潤促進には蛋白分解活性の亢進が関与していた。

4. 線維芽細胞は扁平上皮癌細胞の浸潤促進活性を有し、この浸潤促進においてもEGFの関与が示唆された。

稿を終えるにあたり、本研究課題を与えられ御指導を賜わった松矢篤三教授、本研究の実施に際し終始変わぬ御指導を頂いた口腔外科学第一講座白砂兼光助教授に心から謝意を表します。また、研究の円滑な進展のために特別の御配慮を頂いた口腔外科学第一講座の教室員の方々に深謝致します。

Participation of Epidermal Growth Factor (EGF) and Fibroblasts in
Invasive Growth of Oral Squamous Cell Carcinoma Cells

Yasutaka HAYASHIDO

The First Department of Oral and Maxillofacial Surgery

Osaka University Faculty of Dentistry

1-8, Yamadaoka, Suita, Osaka 565, Japan

Key words : Oral squamous cell carcinoma, Invasion, EGF,
Fibroblast, Epithelial-mesenchymal interaction

Our previous immunohistochemical study indicated increased expression of epidermal growth factor (EGF) and EGF receptor (EGFr) with epithelial malignancy of oral mucosa, and characteristic localization of extracellular EGF in the underlying connective tissue and in stroma of oral squamous cell carcinoma (SCC). These observations suggest an important biological effect of EGF on the growth of SCC cells. In this study, effects of EGF on oral SCC cell lines, SCCKN, SCCTF and KB, were thus examined. The growth of the three SCC cell lines in conventional monolayer culture decreased with addition of EGF in a concentration-dependent manner. When SCC cells were plated and cultured on type I collagen gel, some cells penetrated into the gel. The penetrating ability of the different lines varied; 0.62 % of SCCKN, 1.2 % of SCCTF and 0.013 % of KB penetrated into the gel when measured on day 12. At concentrations higher than 10 ng/ml, EGF was found to inhibit the growth but stimulate the ability of SCCKN and SCCTF cells to invade the collagen gel while such

stimulating effect of EGF was not seen in KB. The increase in number of penetrating cells into the gel by EGF was well correlated with an increase in amount of urokinase type plasminogen activator (uPA). Namely, the same concentrations (higher than 10ng/ml) of EGF led to an increase in production of uPA by SCCKN and SCCTF cells, but KB failed to demonstrate EGF induced-uPA production. Reverse fibrin-agarose zymography demonstrated the presence of plasminogen activator inhibitor (PAI) in KB while the expression of PAI was negligible in SCCKN and SCCTF. Without EGF, the increase in number of SCC cell penetrating into the collagen gels was also observed by coculturing human fibroblasts. The enhancement by fibroblasts was inhibited by co-addition of anti-EGF antibody, suggesting participation of endogenous EGF in SCC cell invasion of gel. Enzyme-linked immunosorbent assay showed that SCC cells were able to display the potential for secretion of EGF, and their secretion was enhanced by medium conditioned with human oral fibroblasts, suggesting that the fibroblasts are capable of producing a factor(s) which induces EGF secretion by SCC cells.

In conclusion, the results suggest a possible epithelial-mesenchymal interaction in EGF secretion, and a role for EGF in the regulation of invasive growth of SCC cells, which requires the production of proteinase for degradation of extracellular matrix. Studies on large number of SCC cell lines will be required to establish more precisely the mutual relationships among tumor invasiveness, EGF and EGFr expression and the level of uPA.

文 獻

- 1) Cohen, S. (1962) : Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal. *J. Biol. Chem.*, 237, 1555-1562.
- 2) Cohen, S. and Carpenter, G. (1975) : Human epidermal growth factor: isolation and chemical and biological properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72, 1317-1321.
- 3) Gregory, H. (1975) : Isolation and structure of urogastrone and its relationship to epidermal growth factor. *Nature*, 257, 325-327.
- 4) Elder, J. B., Williams, G., Lacey, E. and Gregory, H. (1978) : Cellular localization of human urogastrone/epidermal growth factor. *Nature*, 271, 466-467.
- 5) Ralli, L. B., Scott, J., Bell, G. I., Crawford, R. J., Penschow, J. D., Niall,

H. D. and Coglan, J. P. (1985) : Mouse prepro-epidermal growth factor synthesis by the kidney and other tissues.

Nature, 313, 228-231.

6) Kasselberg, A. G., Orth, D. N., Gray M. E. and Stahlman M. T. (1985) : Immunocytochemical localization of human epidermal growth factor/urogastrone in several human tissues. J. Histochem. Cytochem., 33, 315-322.

7) Ushiro, H. and Cohen, S. (1980) : Identification of phosphotyrosine as a product of epidermal growth factor-activated protein kinase in A-431 cell membranes. J. Biol. Chem., 255, 8363-8365.

8) Schlessinger, J. (1988) : The epidermal growth factor receptor as a multifunctional allosteric protein. Biochemistry, 27, 3119-3123.

9) Moolenaar, W. H., Bierman, A. J., Tilly,

B.C., Verlaan, I., Defize, L.H.K.,
Honegger, A.M., Ullrich, A. and
Schlessinger, J. (1988): A point mutation
at the ATP-binding site of the EGF-
receptor abolishes signal transduction.
EMBO J., 7, 707-710.

10) Downward, J., Yarden, Y., Mayes, E.,
Scrace, G., Totty, N., Stockwell, P.,
Ullrich, A., Schlessinger, J. and
Waterfield, M.D. (1984): Close similarity
of epidermal growth factor receptor and
v-erb-B oncogene protein sequences.
Nature, 307, 521-527.

11) Berger, M.S., Gullick, W.J., Greenfield,
C., Evans, S., Addis, B.J. and Waterfield,
M.D. (1987) : Epidermal growth factor
receptors in lung tumours. J. Pathol.,
152, 297-307.

12) Reifenberger, G., Prior, R., Deckert, M.
and Wechsler, W. (1989): Epidermal growth

factor receptor expression and growth fraction in human tumours of the nervous system. *Virchows Archiv A Pathol. Anat.*, 414, 147-155.

- 13) Perosio, P.M. and Brooks, J.J. (1989) : Expression of growth factors and growth factor receptors in soft tissue tumors. Implications for the autocrine hypothesis. *Labo. Invest.*, 60, 245-253.

- 14) Shirasuna, K., Hayashido, Y., Sugiyama, M., Yoshioka, H. and Matsuya, T. (1991) : Immunohistochemical localization of epidermal growth factor and EGF receptor in human oral mucosa and its malignancy. *Virchows Archiv A Pathol. Anat.*, 418, 349-353.

- 15) Shirasuna, K., Watatani, K., Furusawa, H., Saka, M., and Morioka, S., Yoshioka, H. and Matsuya, T. (1990) : Biological characterization of pseudocyst forming

cell lines from adenoid cystic carcinomas
of minor salivary gland origin. Cancer
Res., 50, 4139-4145.

16) Hayashi, T., Hashimoto, K. and Sakamoto,
S. (1989) : A sensitive enzyme immunoassay
for human epidermal growth factor.

Determination of hEGF in human serum and
urine and pharmacokinetics in mouse.

J. Pharmacobi-Dyn., 12, 410-415.

17) Heldin, C.-H., Westermark, B. and
Wasteson, A. (1979) : Desensitisation of
cultured glial cells to epidermal growth
factor by receptor down-regulation.

Nature, 282, 419-420.

18) Sanford, K.K., Earle, W.R., Evans, V.J.,
Waltz, H.K. and Shannon, J.E. (1951) : The
measurement of proliferation in tissue
cultures by enumeration of cell nuclei.
J. Natl. Cancer Inst., 11, 773-795.

19) Roche, P.C., Campeau, J.D. and Shaw, S.T.

(1983) : Comparative electrophoretic analysis of human and porcine plasminogen activators in SDS-polyacrylamide gels containing plasminogen and casein.

Biochim. Biophys. Acta., 745, 82-89.

- 20) Erickson, L. A., Lawrence, D. A. and Loskutoff, D. J. (1984) : Reverse fibrin autography : a method to detect and partially characterize protease inhibitors after sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis.

Anal. Biochem., 137, 454-463.

- 21) Bradford, M. M. (1976) : A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem., 72, 248-254.

- 22) Derynck, R., Goeddel, D. V., Ullrich, A., Guttermann, J. U., Williams, R. D., Bringman, T. S. and Berger, W. H. (1987) : Synthesis

of messenger RNAs for transforming growth factor α and β and the epidermal growth factor receptor by human tumors. *Cancer Res.*, 47, 707-712.

23) Mydlo, J. H., Michaeli, J., Cordon-Cardo, C., Goldenberg, A. S., Heston, W. D. W. and Fair, W. R. (1989) : Expression of transforming growth factor α and epidermal growth factor receptor messenger RNA in neoplastic and nonneoplastic human kidney. *Cancer Res.*, 49, 3407-3411.

24) Yasui, W., Hata, J., Yokozaki, H., Nakatani, H., Ochiai, A., Ito, H. and Tahara, E. (1988) : Interaction between epidermal growth factor and its receptor in progression of human gastric carcinoma. *Int. J. Cancer*, 41, 211-217.

25) Kamata, N., Chida, K., Rikimaru, K., Horikoshi, M., Enomoto, S. and Kuroki, T. (1986) : Growth-inhibitory effects of

epidermal growth factor and over-expression of its receptors on human squamous cell carcinomas in culture.

Cancer Res., 46, 1648-1653.

26) Yang, J., Richards, J., Bowman, P., Guzman, R., Emanami, J., McCormick, K., Hamamoto, S., Pitelka, D. and Nandi, S. (1979) : Sustained growth and three-dimensional organization of primary mammary tumor epithelial cells embedded in collagen gel. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 3401-3405.

27) Chen, J., Stuckey, E.C. and Berry, C.L. (1985) : Three-dimensional culture of rat exocrine pancreatic cells using collagen gels. Br. J. exp. Path., 66, 551-559.

28) Yoshizato, K., Taira, T., Yamamoto, N. and Sasaki, K. (1985) : Remodeling of collagen: an in vitro model of connective tissue. Biomedical Res., 6, 287-296.

29) Skubitz, A.P.N., McCarthy, J.B., Zhao, Q.,
Yi, X.-Y. and Furcht, L.T. (1990) :

Definition of a sequence, RYVVLPR, within
laminin peptide F-9 that mediates
metastatic fibrosarcoma cell adhesion and
spreading. *Cancer Res.*, 50, 7612-7622.

30) Orr, F.W., Millar-Book, W. and Singh, G.
(1990) : Chemotactic activity of bone
and platelet-derived TGF-beta for bone-
metastasizing rat walker 256 cells.
Invasion Metastasis, 10, 241-251.

31) Aznavoorian, S., Stracke, M.L., Krutzsch,
H., Schiffmann, E. and Liotta, L.A. (1990)
: Signal transduction for chemotaxis and
Haptotaxis by matrix molecules in tumor
cells. *J. Cell Biol.*, 110, 1427-1438.

32) Tryggvason, K., Höyhtyä, M. and Salo, T.
(1987) : Proteolytic degradation of extra-
cellular matrix in tumor invasion.
Biochim. Biophys. Acta., 907, 191-217.

33) Laiho, M. and Keski-Oja, J. (1989) :

Growth factors in the regulation of
pericellular proteolysis : a review.

Cancer Res., 49, 2533-2553.

34) Niedbala, M.J. and Sartorelli, A.C. (1989)

: Regulation by epidermal growth factor of
human squamous cell carcinoma plasminogen
activator-mediated proteolysis of
extracellular matrix. Cancer Res., 49,
3302-3309.

35) Carlsen, S.A., Ramshaw, I.A. and

Warrington, R.C. (1984) : Involvement of
plasminogen activator production with
tumor metastasis in a rat model. Cancer
Res., 44, 3012-3016.

36) Saksela, O. (1985) : Plasminogen

activation and regulation of pericellular
proteolysis. Biochim. Biophys. Acta., 823,
35-65.

37) Danø, K., Andreassen, P.A., Grøndahl-

- Hansen, J., Kristensen, P., Nielsen, L.S.
and Skriver, L. (1985) : Plasminogen
activators, tissue degradation, and
cancer. *Adv. Cancer Res.*, 44, 139-266.
- 38) Paranjpe, M., Engel, L., Young, N. and
Liotta, L.A. (1980) : Activation of human
breast carcinoma collagenase through
plasminogen activator. *Life Science*, 26,
1223-1231.
- 39) O'Grady, R.L., Upfold, L.I. and Stephens,
R.W. (1981) : Rat mammary carcinoma cells
secrete active collagenase and activate
latent enzyme in the stroma via
plasminogen activator. *Int. J. Cancer*, 28,
509-515.
- 40) Salo, T., Liotta, L.A., Keski-Oja, J.
Turpeenniemi-Hujanen, T. and Tryggvason, K.
(1982) : Secretion of basement membrane
collagen degrading enzyme and plasminogen
activator by transformed cells ; role in

- metastasis. Int. J. Cancer, 30, 669-673.
- 41) Phillips, M., Juul, A.-G. and Thorsen, S. (1984) : Human endothelial cells produce a plasminogen activator inhibitor and a tissue-type plasminogen activator-inhibitor complex. Biochim. Biophys. Acta., 802, 99-110.
- 42) Mimuro, J., Schleef, R.R. and Loskutoff, D.J. (1987) : Extracellular matrix of cultured bovine aortic endothelial cells contains functionally active type 1 plasminogen activator inhibitor. Blood, 70, 721-728.
- 43) Reilly, C.F. and McFall, R.C. (1991) : Platelet-derived growth factor and transforming growth factor- β regulate plasminogen activator inhibitor-1 synthesis in vascular smooth muscle cells. J. Biol. Chem., 266, 9419-9427.
- 44) Andreasen, P.A., Nielsen, L.S.,

- Kristensen, P., Grøndahl-Hansen, J.,
Skriver, L. and Danø, K. (1986) :
Plasminogen activator inhibitor from
human fibrosarcoma cells binds urokinase-
type plasminogen activator, but not its
proenzyme. *J. Biol. Chem.*, 261, 7644-7651.
- 45) Lucore, C.L., Fujii, S., Wun, T.-C.,
Sobel, B.E. and Billadello, J.J. (1988) :
Regulation of expression of type 1 plasmi-
nogen activator inhibitor in Hep G2 cells
by epidermal growth factor. *J. Biol. Chem.*,
263, 15845-15848.
- 46) Cajot, J.F., Bamat, J., Bergonzelli, G.E.,
Kruithof, E.K.O., Medcalf, R.L., Testuz,
J. and Sordat, B. (1990) : Plasminogen-
activator inhibitor type 1 is a potent
natural inhibitor of extracellular matrix
degradation by fibrosarcoma and colon
carcinoma cell. *Proc. Natl. Acad. Sci.*
USA, 87, 6939-6943.

- 47) Adamson, E. D. and Rees, A. R. (1981) :
Epidermal growth factor receptors.
Mol. Cell. Biochem., 34, 129-152.
- 48) Gamou, S., Kim, Y. S. and Shimizu, N. (1984)
: Different responses to EGF in two human
carcinoma cell lines, A431 and UCVA-1,
possessing high numbers of EGF receptors.
Mol. Cell. Endocrinol., 37, 205-213.
- 49) Thorgeirsson, U. P., Turpeenniemi-Hujanen,
T., Neckers, L. M., Johnson, D. W. and
Liotta, L. A. (1984) : Protein synthesis
but not DNA synthesis is required for
tumor cell invasion in vitro. Invasion
Metastasis, 4, 73-83.
- 50) Van Scott, E. J. and Reinertson, R. P. (1967)
: The modulating influence of stromal
environment on epithelial cells studied
in human autotransplants. J. Invest.
Dermatol., 36, 109-117.
- 51) DeCosse, J. J., Gossens, C. L., Kuzma, J. F.

and Unsworth, B. R. (1973) : Breast cancer : induction of differentiation by embryonic tissue. *Science*, 181, 1057-1058.

52) Neal, D. E., Marsh, C., Bennett, M. K., Apel, P. D., Hall, R. R., Sainsbury, J. R. C. and Harris, A. L. (1985) : Epidermal growth factor receptors in human bladder cancer: comparison of invasive and superficial tumours. *Lancett* I : 366-368.

脚注

大阪大学歯学部口腔外科学第一講座（主任：松矢篤三教授）

本論文の要旨の一部は第45回日本口腔科学会総会（平成3年5月、京都）、第50回日本癌学会総会（平成3年9月、東京）において発表された。

図・表の説明

図 1 線維芽細胞存在下でのコラーゲンゲル培養法

16mm径ウエル内で増殖させた線維芽細胞単層上で $500\mu l$ のコラーゲン混合液を加えゲル化させた。そのゲル上で 2.5×10^4 個の扁平上皮癌細胞を含むコラーゲン混合液または増殖培養液を加えた(A, コラーゲンゲル内培養法; B, コラーゲンゲル上培養法)

図 2 扁平上皮癌細胞のEGF受容体のScatchard解析

扁平上皮癌細胞を4日間増殖培養液で培養した後, Heldinらの方法¹⁷⁾によりEGF結合能を測定し、結果をScatchard解析した。

図 3 扁平上皮癌細胞の増殖に対するEGFの影響

16mm径ウエルに 10^4 個のSCCKN(●), SCCTF(▲)及びKB(■)を加え24時間後に各濃度のEGFを

加え培養し、7日後に増殖細胞数を算定した。値はEGF無添加時の細胞数を100%として表示した(3ウエルの平均値±標準偏差)。なおEGF無添加時のSCCKN, SCCTF及びKBの増殖細胞数はそれぞれ 28.0×10^4 個, 25.1×10^4 個及び 20.8×10^4 個であった。各扁平上皮癌細胞はEGFによって濃度依存性に増殖が抑制されている。

図4 扁平上皮癌細胞のコラーゲンゲル内培養時のコロニー形態

2.5×10⁴個のSCCKNを各濃度のEGF存在下(A, G, 0ng/ml; B, 10pg/ml; C, 100pg/ml; D, 1ng/ml; E, H, 10ng/ml; F, 100ng/ml)でコラーゲンゲル内にて12日間培養した(A-F, 位相差顕微鏡所見; G, H, パラフィン切片のH-E染色; 倍率×50)。EGF無添加では密な細胞集団よりなる球形のコロニーを形成する(A, G)のに対し, 10ng/ml以上のEGFを添加することによりコロニーは拡張し細胞配列が疎となり, 周囲のゲルに浸潤増殖を示唆する像を示している(E, F, H)。

図 5 扁平上皮癌細胞のコラーゲンゲル内増殖に
対するEGFの影響

2.5×10⁴個のSCCKN(●)及びSCCTF(▲)をコラーゲンゲル内で各濃度のEGF存在下で12日間培養した後、増殖細胞数をSanfordらの方法¹⁸⁾に準じて算定した。値はEGF無添加時の細胞数を100%として表示した(3ウエルの平均値±標準偏差)。ゲル内においても、EGFは濃度依存性に扁平上皮癌細胞の増殖を抑制し、増殖抑制は10ng/ml以上 の濃度で著明である。

図 6 コラーゲンゲルへの扁平上皮癌細胞の浸潤増殖に対するEGFの影響

コラーゲンゲル上に2.5×10⁴個の扁平上皮癌細胞を加え10ng/mlのEGF存在下あるいは非存在下で12日間培養した。12日目にゲル内部への侵入細胞数を位相差顕微鏡にて各ウエル当たり10視野算定した。視野面積(6.38mm²)と総表面積(200.96mm²)から求めたウエル当たりの侵入細胞数とコラーゲンゲルに存在する総細胞数より細胞10⁴個当たりの侵

入細胞数を算出した（3ウエルの平均値±標準偏差）。

図7 コラーゲンゲルへの扁平上皮癌細胞の浸潤増殖に対するEGF濃度の影響

コラーゲンゲル上に 2.5×10^4 個のSCCKN（●）及びSCCTF（▲）を加え各濃度のEGF存在下で12日間培養し、細胞 10^4 個当たりのゲル内への侵入細胞数を算出した。値はEGF無添加時を100%として表示した（3ウエルの平均値±標準偏差）。

図8 扁平上皮癌細胞のコラーゲンゲル上培養所見

コラーゲンゲル上で 2.5×10^4 個のSCCKNを12日間培養し、10%中性ホルマリンにて固定後、パラフィン切片を作製しH-E染色を行った（A, EGF無添加；B, EGF 10ng/ml添加；倍率×200）

図9 ザイモグラフィー

増殖飽和状態の扁平上皮癌細胞を10ng/mlのEGF

を含むあるいは含まない無血清培養液で48時間処理することによって得られた培養上清に対してプラスミノーゲン存在下(A)あるいはプラスミノーゲン非存在下(B)でカゼインを基質とするザイモグラムを行なった。SCCKN及びSCCTFは100kDa, 54kDa, 33kDaのuPA活性を示す。これらはいずれも10ng/mlのEGF添加によって増強されている。KBは極めて弱いuPA活性を認めるのみでEGF添加によっても増強されていない。

図10 扁平上皮癌細胞SCCKNのuPA産生に対するEGF濃度の影響

増殖飽和状態のSCCKNを各濃度のEGFを含む無血清培養液で48時間処理することによって得られた培養上清に対しプラスミノーゲンを含むカゼインを基質とするザイモグラフィーを行なった。10ng/ml以上のEGF添加により著明にuPA活性が促進されている。HuPA及びLuPAのレーンはそれぞれ 10^{-3} Uの高分子量ウロキナーゼ(Proteorogen AG)と低分子量ウロキナーゼ(Proteorogen AG)を泳動し

た。

図 11 逆相ザイモグラフィー

増殖飽和状態の扁平上皮癌細胞を 10 ng/ml の EGF を含むあるいは含まない無血清培養液で 48 時間培養することによって得られた培養上清に対しフィブリン・アガロースゲルを用いて逆相ザイモグラフィーを行なった。SCCKN, SCCTF 及び KB いずれも 54 kDa 附近に PAI 活性を示すフィブリン非溶解 band が認められる。KB は SCCKN 及び SCCTF に比較し強い PAI 活性を示す。なおこれらの band は EGF 添加によっても影響を受けていない。

図 12 扁平上皮癌細胞のコラーゲンゲル内での増殖に及ぼす線維芽細胞の影響

図 1-A に示したように増殖飽和状態の線維芽細胞上に作製したコラーゲンゲル内で扁平上皮癌細胞を 12 日間培養した (A, C, E, 位相差顕微鏡所見; B, D, F, H-E 染色; 倍率 $\times 50$)。線維芽細胞非存在時に観察される密な細胞集団からなる球形のコ

コロニー（A, B）は線維芽細胞との混合培養により辺縁不正の拡張したコロニーに変化した。また、周囲のコラーゲンゲルへの浸潤増殖を示唆する所見も認められる（C, D）。抗EGFモノクローナル抗体を添加することにより線維芽細胞によるコロニーの形態変化は阻止されている（E, F）。

図13 コラーゲンゲルへの浸潤増殖に対する線維芽細胞の影響

図1-Bに示したように線維芽細胞存在下で扁平上皮癌細胞をコラーゲンゲル上で12日間培養した後、細胞 10^4 個当たりのゲル内への侵入細胞を算定した（3ウェルの平均値±標準偏差）。線維芽細胞と混合培養する（+fib.）ことにより、線維芽細胞非存在下（cont.）に比較し浸潤細胞数はSCCKNで10倍、SCCTFで2.5倍に増加している。一方、抗EGFモノクローナル抗体を添加する（+fib.+anti-EGF）ことにより、細胞浸潤促進はそれぞれ約1/3と1/2に抑制されている。KBでは線維芽細胞による細胞浸潤の促進はみられない。

図 14 扁平上皮癌細胞の uPA 産生に与える線維芽細胞の影響

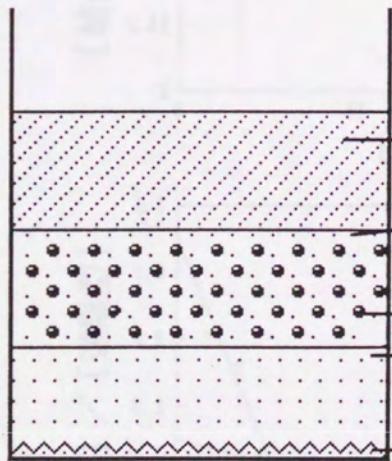
増殖飽和状態の各扁平上皮癌細胞を 30% 濃度の線維芽細胞の CM で 48 時間処理することによって得られた培養上清に対してカゼインを基質とするザイモグラフィーを行なった。線維芽細胞の CM を添加する (+) ことにより SCCKN 及び SCCTF の uPA 活性は無添加時 (-) に比較して促進されている。KB の uPA 産生は線維芽細胞の CM により影響を受けていない。なお、線維芽細胞の CM (fib. CM) 中には僅かに uPA 活性を認められるのみである。

図 15 扁平上皮癌細胞 SCCKN の EGF 産生に対する線維芽細胞の影響

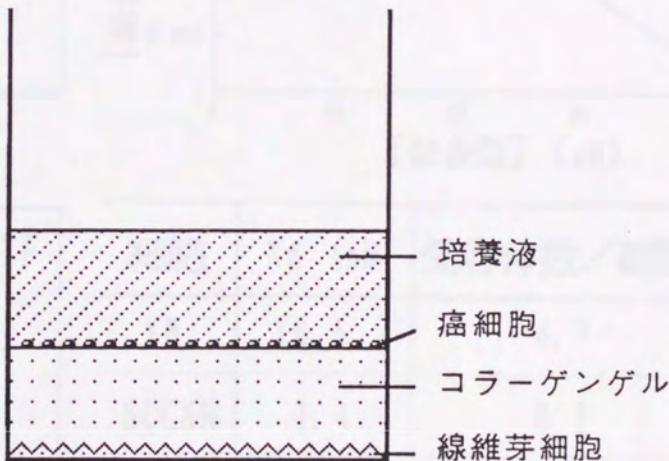
増殖飽和状態の SCCKN を 30% 濃度の線維芽細胞の CM を含む (+ CM) あるいは含まない (- CM) 無血清培養液で培養し、1 日目、2 日目、4 日目の培養上清中の EGF 量を 2 抗体サンドイッチ ELISA 法にて測定した (3 ウエルの平均値 ± 標準偏差)。

表 1

増殖飽和状態の各培養細胞を無血清培養液で48時間処理することによって得られた培養上清中のEGF量を2抗体サンドイッチELISA法にて測定した(3ウエルの平均値±標準偏差)。group 1及びgroup 2はそれぞれ正常口腔粘膜及び扁平上皮癌組織から得た線維芽細胞を示す。



A



B

図 1

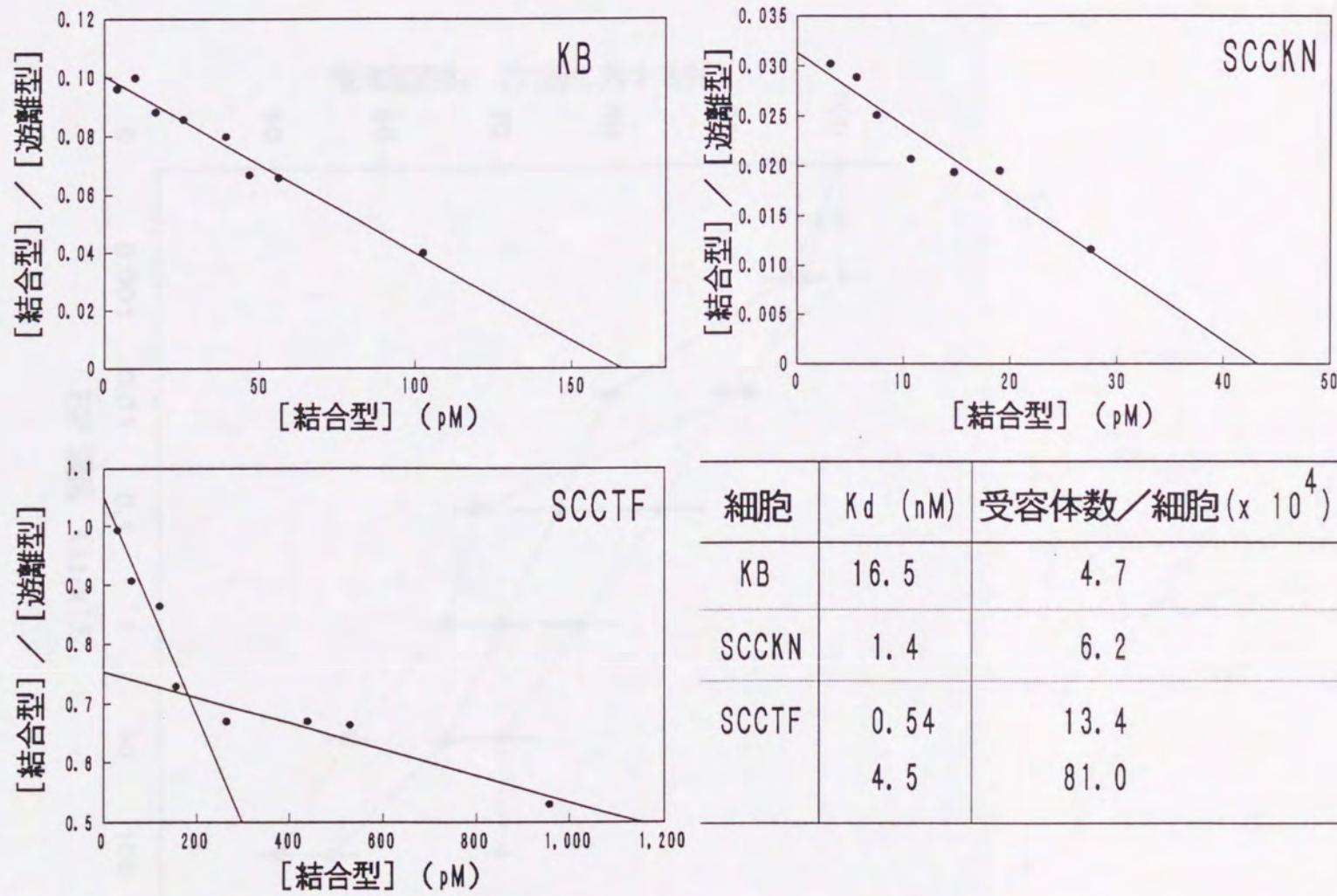
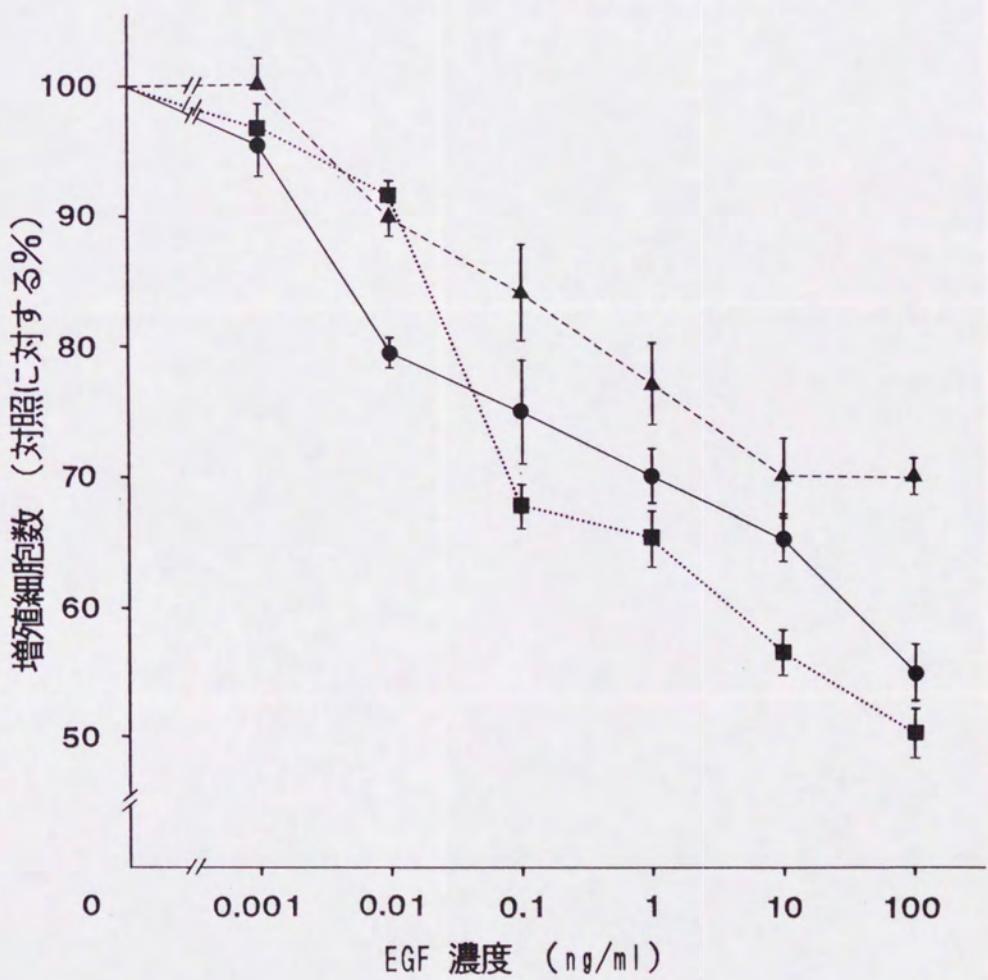


図 2



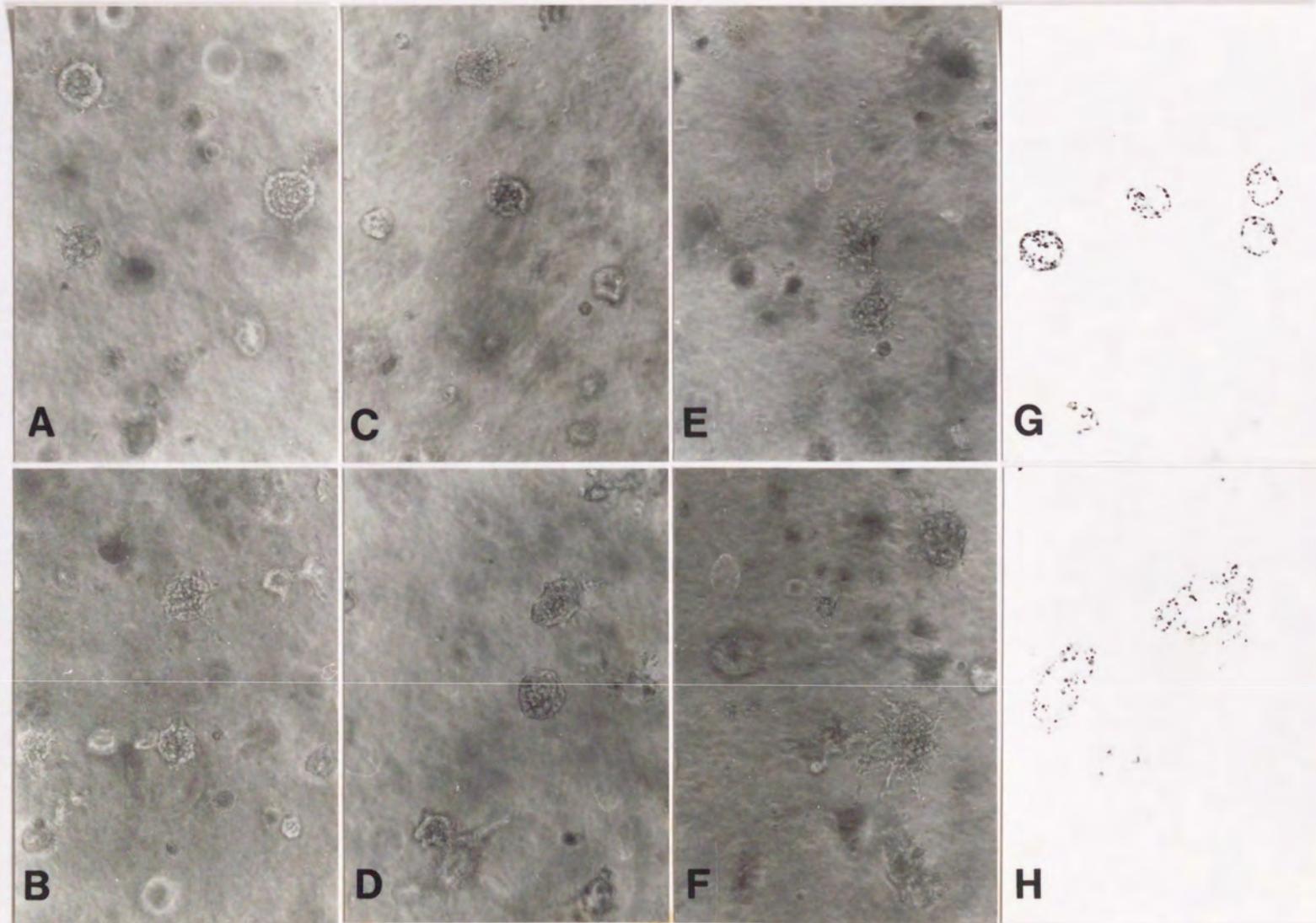


図 4

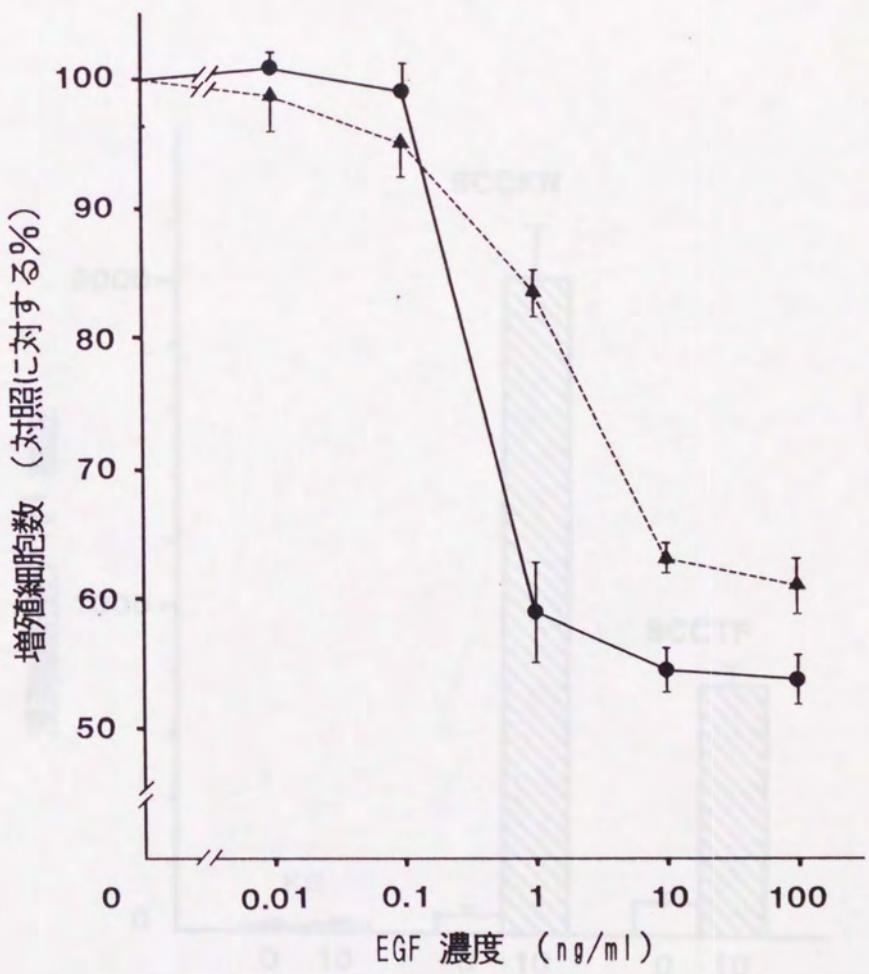
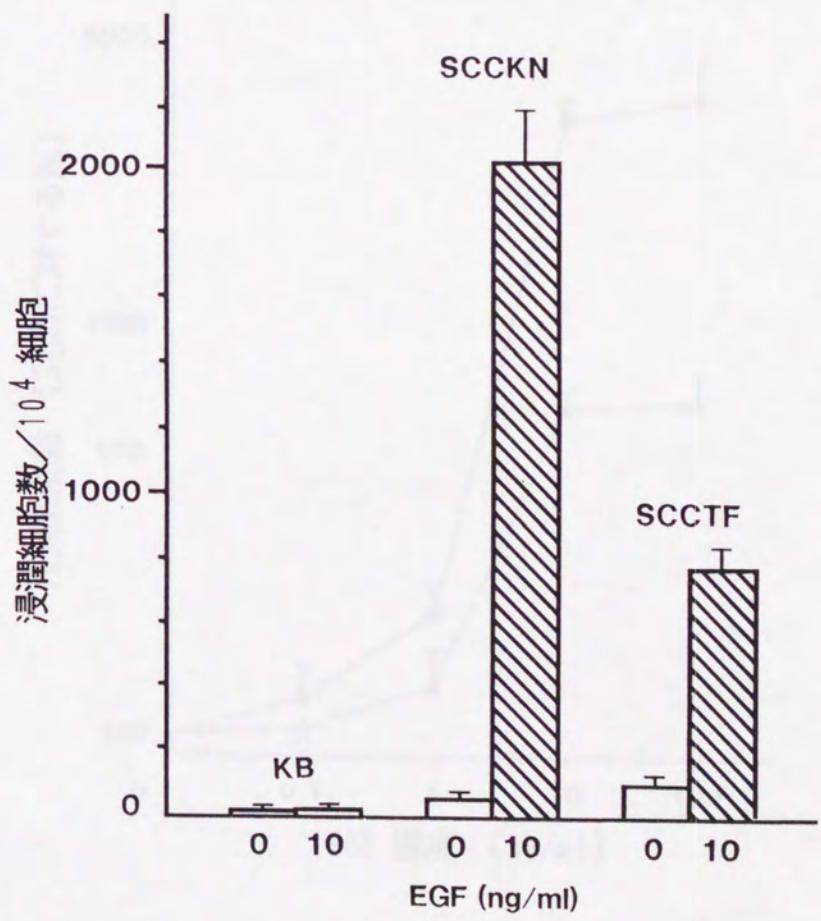


図 5 -62-



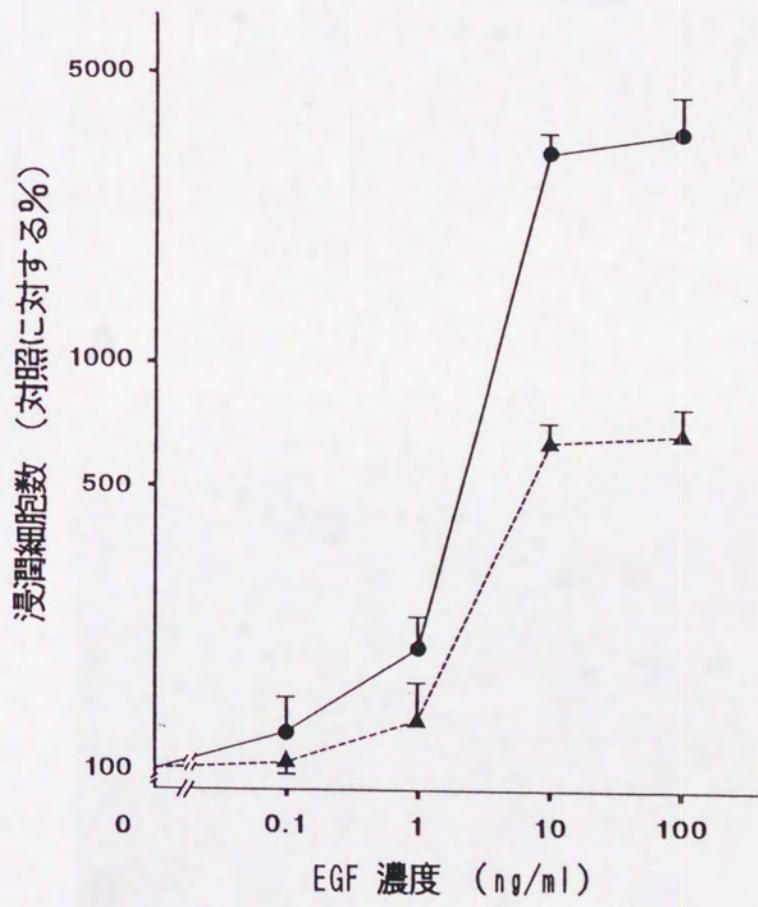


図 7



A

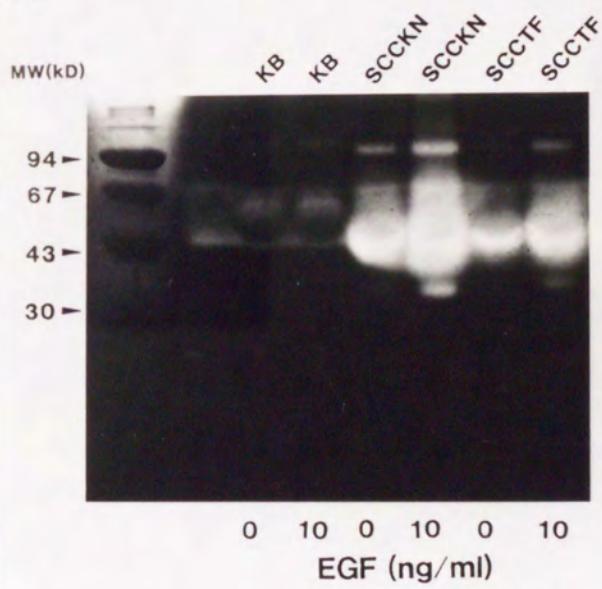


B

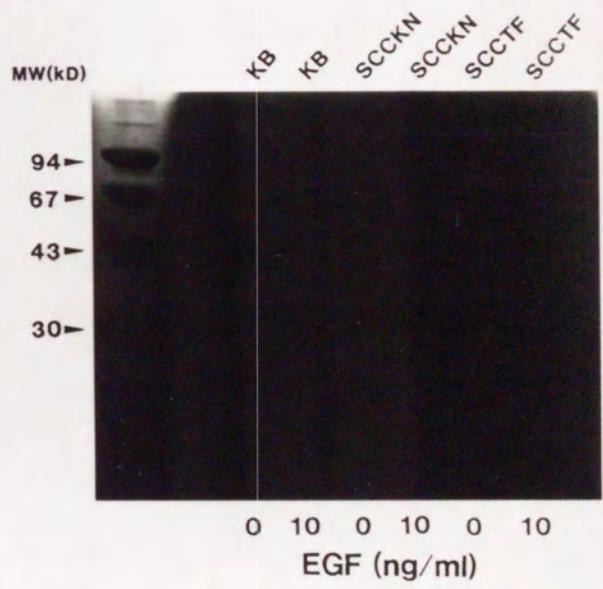
図 8

-65-

A



B



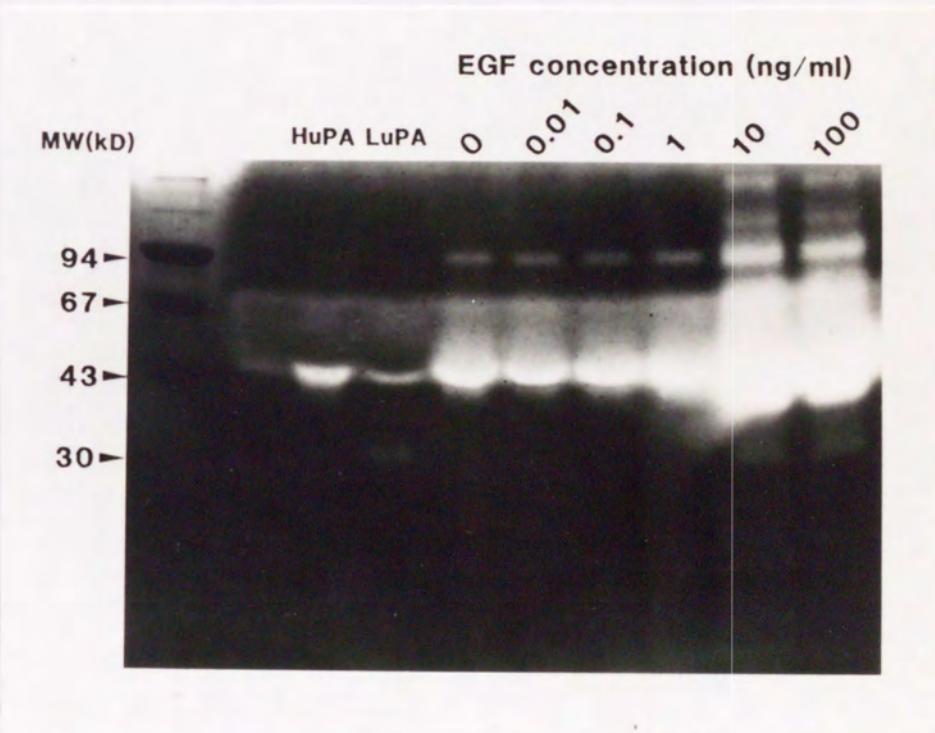


図 10
-67-

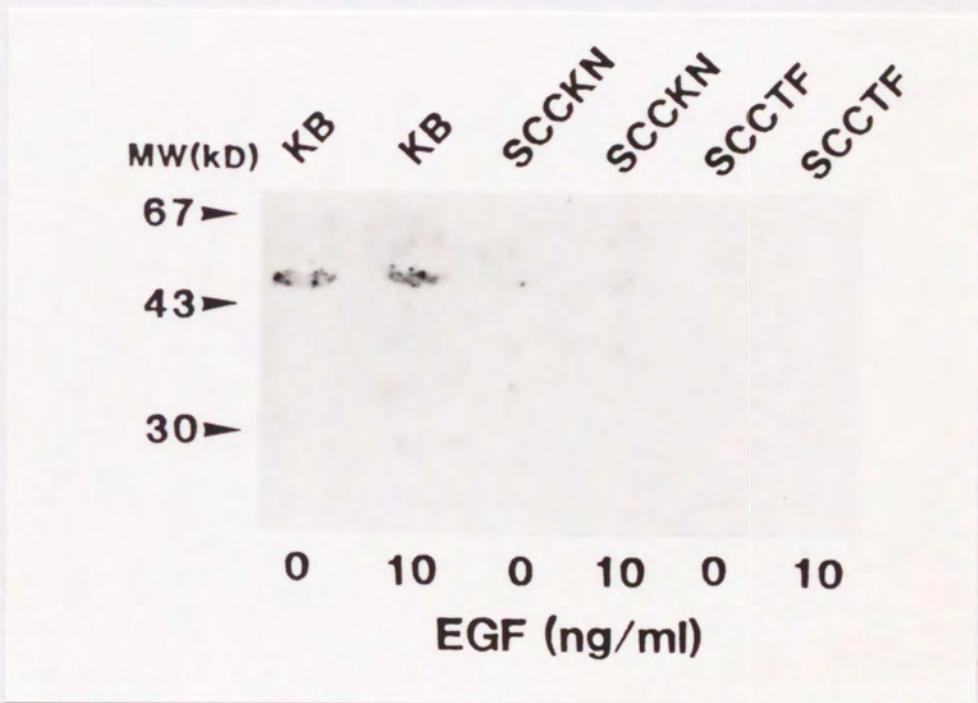
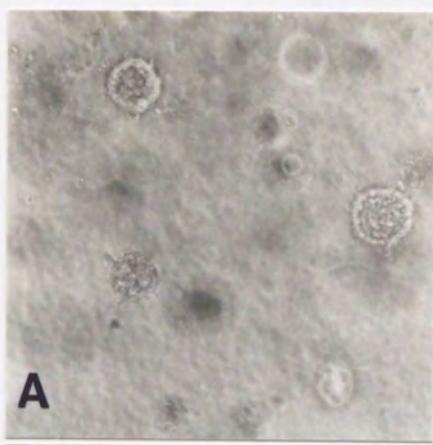
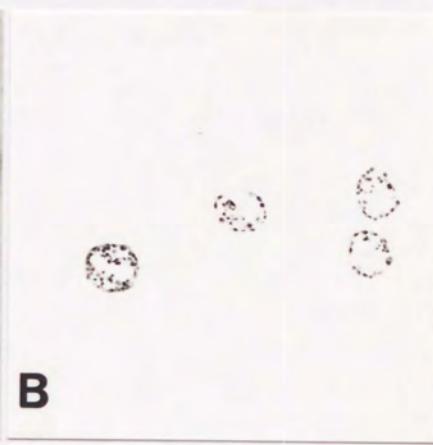


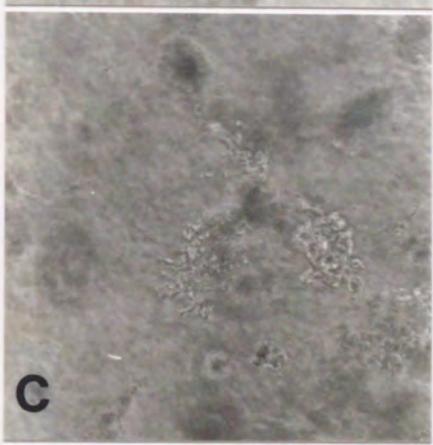
図 11



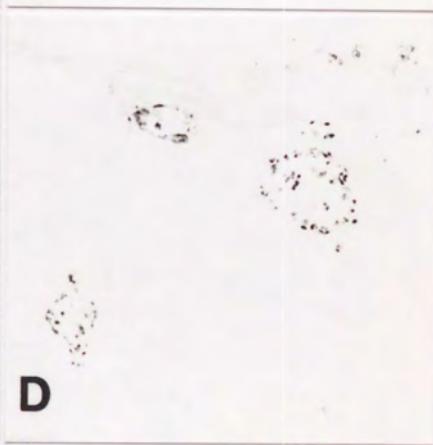
A



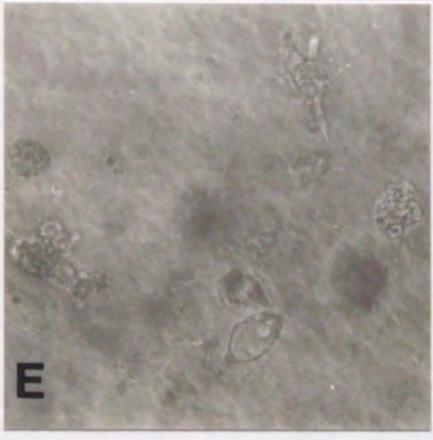
B



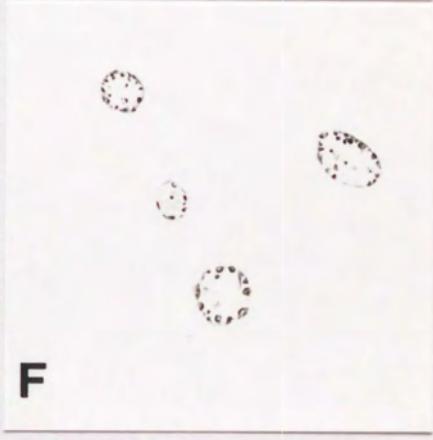
C



D



E



F

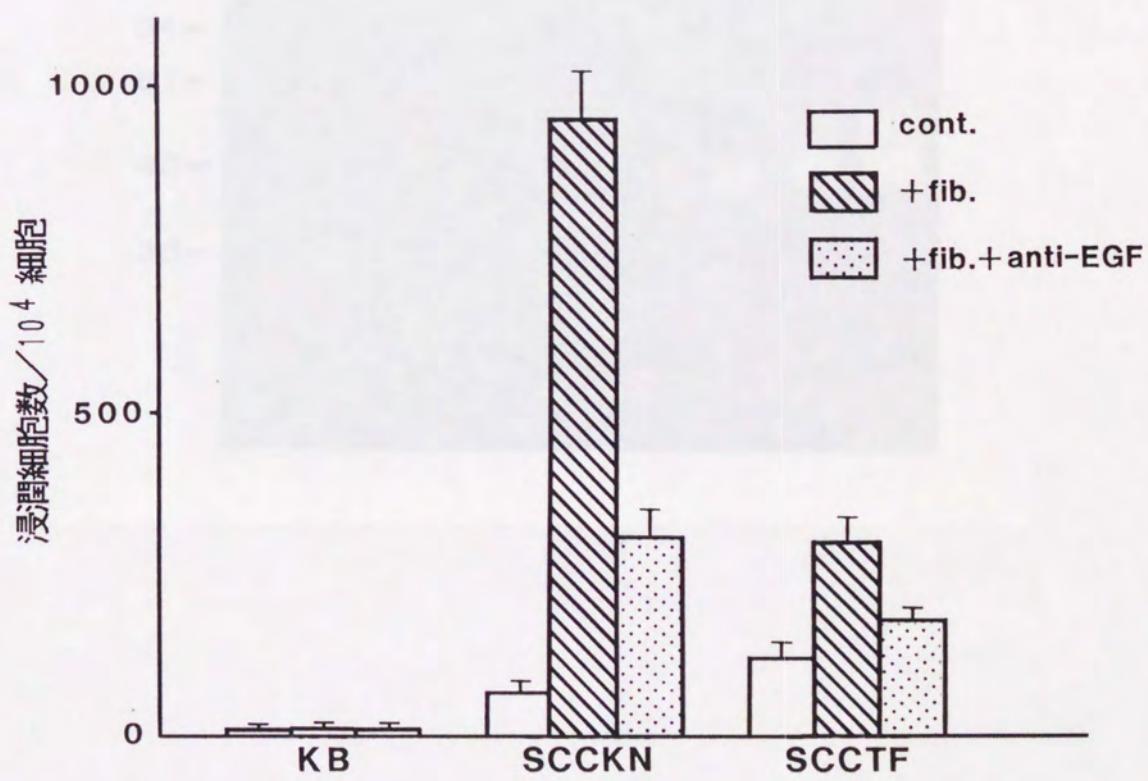


図 13

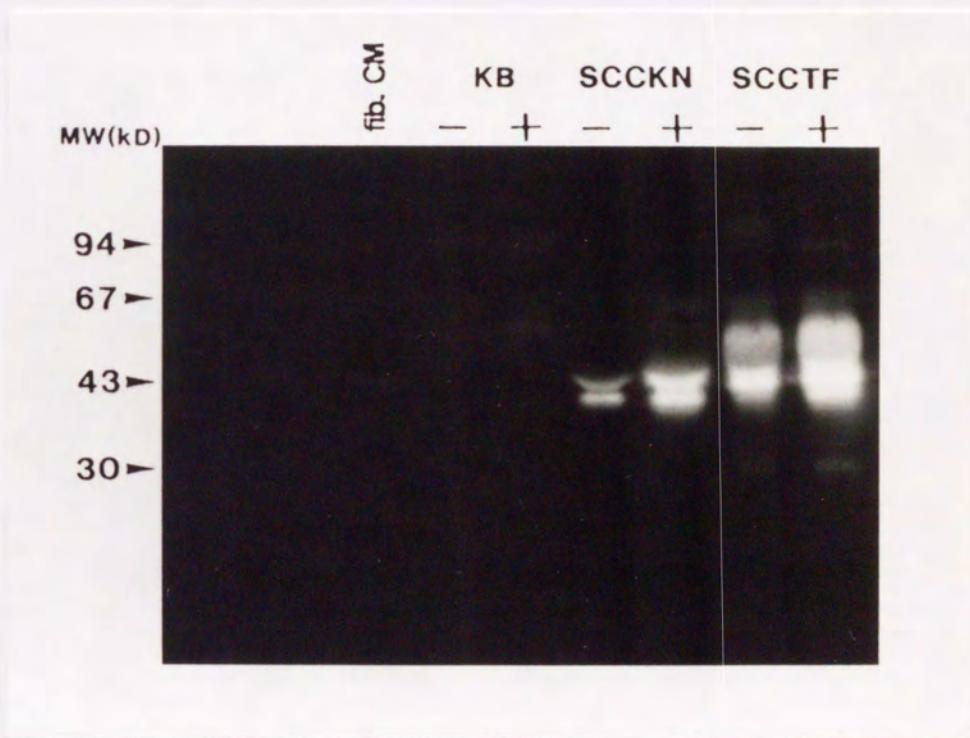


図 14 - 7/-

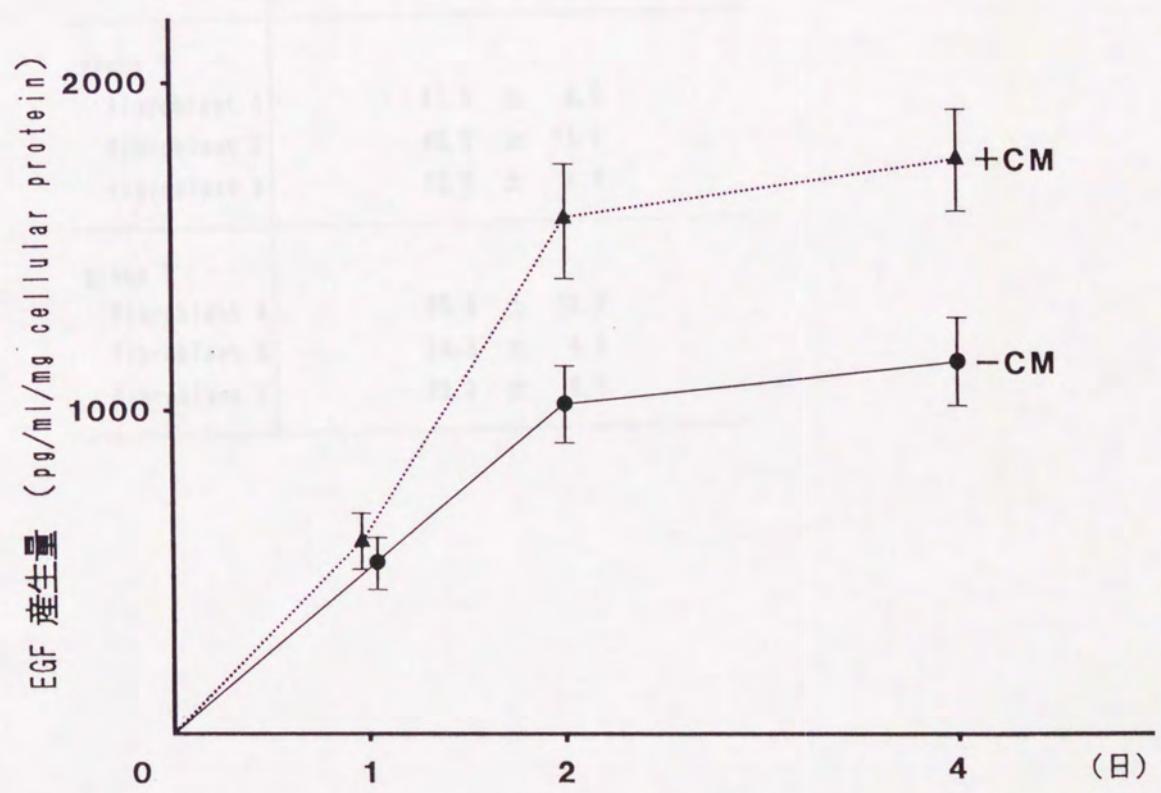


図 15

表1 各種培養細胞のEGF産生量

細胞	EGF 産生量 (pg/ml/mg cellular protein)
KB	350.6 ± 51.4
SCCKN	1210.8 ± 250.5
SCCTF	450.0 ± 80.7
group 1	
fibroblast 1	27.5 ± 8.5
fibroblast 2	40.2 ± 11.2
fibroblast 3	12.6 ± 4.4
group 2	
fibroblast 4	55.8 ± 13.8
fibroblast 5	24.8 ± 4.5
fibroblast 6	32.3 ± 9.1

