

# ヒト口腔扁平上皮癌細胞株 OS-F の樹立と口腔癌の浸潤機序に関する研究

佐野倫三

## Establishment of Cell Line (OS-F) Originating from Human Oral Squamous Cell Carcinoma and A Study of Invasion Mechanism on Oral Cancer

Rinzo Sano

(平成10年9月30日受付)

### 緒言

ヒト悪性腫瘍由来の細胞株には、子宮頸癌から Gey ら<sup>1)</sup> の樹立した HeLa 細胞株を始めとし、各種臓器由来の悪性腫瘍から樹立された数多くの株化細胞が報告されている。口腔領域の悪性腫瘍から樹立された細胞株としては、Eagle ら<sup>2)</sup> の樹立した KB 細胞株が有名で、本邦では堀越ら<sup>3)</sup> の報告した Ca9-22 細胞株など、現在までに十数種の細胞株<sup>4-18)</sup> が報告されている。ヒト癌由来細胞株は、ヒトの生体内では検討の困難な実験のモデルとして、癌の生物学的研究や癌治療の基礎的研究などに応用されている。しかし、さらに新しい生物学的特性の証明された細胞株の樹立とそれらの組み合わせにより癌領域の不明な点が解明されるものと期待される。癌細胞の浸潤や転移は、口腔外科領域においても日常的に遭遇する臨床病態で、その制御は癌患者の予後を決定する一大因子であり、癌の浸潤や転移の抑制は癌の臨床や研究における重要な課題の一つである。癌の浸潤、転移の過程における必須因子として、癌細胞自体の運動能<sup>19)</sup> や他組織との接着性、また癌細胞自体あるいは周囲正常細胞の産生する細胞外基質分解酵素による周囲の細胞外基質の破壊などに関与することが知られ、近年、癌浸潤における細胞外基質分解酵素の関連は、特に注目されている因子の一つである。この癌浸潤時に、細胞外基質の破壊に重要な機能を持つものとして、serin proteinase (SP) の中には plasminogen activator (PA)、また metalloproteinase (MP) の中では、基底膜の破壊などに関連する matrix

metalloproteinase (MMP) が重要視されている。PA には、urokinase-type PA (uPA) と tissue-type PA (tPA) の2種類が存在するが、癌組織の悪性形質との関連がより重要視されているのは uPA であり、乳癌、大腸癌、胃癌、肝癌などの細胞株にその発現が報告されている<sup>20)</sup>。頭頸部癌細胞でも uPA の発現は確認されており、これらの癌細胞と uPA の関連が検討されている<sup>21)</sup>。一方、MMP には、癌の浸潤や転移と関係するとされる数種類がこれまでに報告されており<sup>22-26)</sup>、口腔領域の癌では、その内、MMP-2 や MMP-9 などが関連すると報告がみられる<sup>27-29)</sup>。しかし、現在までの報告では、uPA と MMP のどちらか一方のみに焦点を置いた検索が多く、これらを同時に検索した報告例は少ない。

そこで本研究では、まず、口腔扁平上皮癌由来細胞株 OS-F を独自に樹立し、その生物学的性状を検索するとともに、OS-F を含む口腔扁平上皮癌細胞株12株を用いて、これら癌細胞の浸潤様相に関するモデル実験として、まず、癌細胞の自己運動能、コラーゲン内侵入能を検討し、さらに各細胞株における細胞外基質分解酵素である uPA と MMP の浸潤に対する関与を検討するための実験を行った。

### 材料と研究方法

#### I. OS-F の樹立とその生物学的性状の検索

##### 1. 検索材料

樹立した OS-F 株の母組織症例は、口底癌 (T2N1M0, 女性, 46歳) で、病理組織学的には中等度分化型の扁平上皮癌であった。60 Gy の術前照射後、外科手術を施行されたが、後に再発した。再発病巣の2回目の外科手術時に切除した癌組織 (図1) を培養材料として初代培養し、継代して樹立した OS-F 株の生物学的性状

広島大学歯学部口腔外科学第二講座 (主任: 石川武憲教授) 本論文の要旨は平成8年4月の口腔科学会総会において発表した。

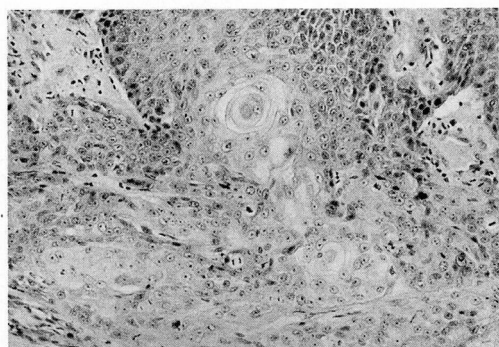


図1 OS-Fの母組織の病理組織像 (H.E.染色, ×150)。

を検索した。

ウエスタン・プロット法およびサザン・プロット法でOS-Fを検索したが、ヒューマンサイエンス研究資源バンク (HSRRC) より購入した口腔扁平上皮癌細胞株の、KB, HO-1-u-1, HO-1-N-1, Ca9-22, HSC-2, HSC-3 および HSC-4 の計8株についても併せて検討した。

## 2. 研究方法

### (1) 細胞培養法

初代培養は explant culture 法で行い、培養液は10% FCS (Boehringer Mannheim) を含有する Eagle's MEM (ニッスイ, 以下 EMEM) を用い、37°C の5% CO<sub>2</sub>-incubator 中で静置培養し、3日毎に培養液を交換した。継代培養は、PBS で0.1%トリプシンと0.02% EDTA として調整した液で分散したものを培養し、継代可能となったものを OS-F と命名した。

### (2) 透過型電子顕微鏡 (TEM) による観察法

10 cm 径のプラスチックシャーレ中で confluent の状態に増殖した培養細胞を、セルスクレイパーにより回収して遠沈し、この細胞ペレットを観察試料とした。これを4%パラホルムアルデヒド含有の0.1M リン酸緩衝液と4%オスミウム酸で固定後、エポキシ樹脂に包埋した試料を、透過型電子顕微鏡 (日立製作所 H-500, 以下 TEM) で観察した。

### (3) 細胞倍加時間の算定法

継代9代目と28代目の細胞を、直径3.5 cm のプラスチックシャーレに  $5 \times 10^4$  個播種し、10% FCS を含んだ EMEM により培養を開始した。細胞数は、24時間毎に3シャーレを1群として、その生細胞数を13日目まで算定し、増殖曲線を描記して倍加時間と飽和密度を算出した。

### (4) プラスチックシャーレ中のコロニー形成数の算定法

6 cm 径のプラスチックシャーレに100個または200個の単離細胞を播種して、培養10日目にギムザ染色し、細

胞数が30個以上のコロニー数を位相差顕微鏡下で算定した。

### (5) 軟寒天内コロニー形成数の算定法

6 cm 径のプラスチックシャーレに0.5%寒天 (DIFCO agar noble) 培地を支持層とし、これに  $10^4$  または  $10^5$  個の単離細胞を混入した0.33%寒天培地を重層して培養した。培養14日目に、細胞数が30個以上のコロニー数を位相差顕微鏡下で算定した。

### (6) 染色体数の算定法

3.5 cm 径のプラスチックシャーレ上に培養した対数増殖期の細胞の培地に、0.1 μg/ml のコルセミドを加えて2時間培養し、分裂中期に同調した。細胞を0.1%トリプシンと0.02% EDTA を含む PBS で分散した後、0.075M 塩化カリウムで低張処理し、カルノア液で固定した。細胞浮遊液をスライドガラス上で風乾後、ギムザ染色した。染色後、100個の細胞につき染色体数を算定した。

### (7) ノードマウスにおける造腫瘍能の検索法

4週齢の BALB/C nu/nu メス6匹の側背部皮下に、32代目の  $10^7$  個の OS-F のペレットを移植し、形成した腫瘍を4週後に切除し、通法によりパラフィン包埋した切片標本で観察した。腫瘍を形成したノードマウスについては、リンパ節、肺、肝などの臓器へ転移の有無があるか否かを検索した。

### (8) p53 の発現に関する免疫組織化学染色法

OS-F の母組織およびノードマウスに形成した腫瘍は、通法によるホルマリン固定・パラフィン包埋切片を作製し、また、培養細胞はメタノールとアセトンの等量混合液で固定し、これらについて酵素抗体間接法で検索した。すなわち、脱パラフィン化した組織切片あるいは固定培養細胞を0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-メタノール溶液に浸漬し、内因性ペルオキシダーゼ活性を除去した後、マイクロウエーブ処理を行い、希釈した正常血清により非特異的活性を除外し、一次抗体を反応させた。続いて、希釈二次抗体を反応させ、DAB (Diamino-benzidine tetrahydrochloride) で発色させ、メチルグリーンにより対比染色を行った。一次抗体としては、抗ヒト p53 ポリクロナール抗体 (CM-1, Novocastra) を使用した。

### (9) サザン・プロットによる p53 遺伝子の検索法

継代した各細胞株から、フェノール・クロロホルム法により DNA を抽出した。次いで、DNA を制限酵素 (*EcoRI*) で完全に消化し<sup>30)</sup>、その10 μg をアガロースゲルで電気泳動し、ニトロセルロース・メンブレンフィルターに転写し、p53 の cDNA (ヒューマンサイエンス研究資源バンク, HSRRB) を<sup>32</sup>P で標識し、これをプローブとしてハイブリダイゼーションを行った。

洗浄後、X線フィルム上でオートラジオグラフィーを行った<sup>31)</sup>。

#### (10) ウェスタン・ブロットによる p53 タンパクの検索法

継代した各細胞株から、NP-40 を含む緩衝液を用いてタンパクを抽出した<sup>32)</sup>。次いで、50  $\mu\text{g}$  のタンパクを SDS-ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、ニトロセルロース・メンブレンフィルターに転写した。一次抗体として抗ヒト p53 抗体 (CM-1, Novocastra) を作用させ、免疫複合体の検出には ECL kit (Amersham) を用い、X線フィルムに感光させた。

#### (11) 塩基配列決定法による p53 遺伝子領域の検索法

OSF から フェノール・クロロホルム法により DNA を抽出した。次いで、p53 遺伝子の exon5, 6, 7, 8 に対する各特異的プライマーを用いて PCR 法で増幅し、PCR 産物を低融点アガロースで電気泳動して、目的とする DNA を Wizard PCR prep (Promega) で回収した。回収した PCR 産物を <sup>32</sup>P でラベルしたセンスプライマーと CircumVent<sup>TM</sup> Thermal Cycle Dideoxy DNA Sequencing kit (New England Biolabs) を用いて、ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、X線フィルム上でオートラジオグラフィーを行った。

## II. 各種ヒト口腔扁平上皮癌細胞株の *in vitro* における運動能と浸潤能に及ぼす細胞外基質分解酵素の検索

### 1. 検索材料

ヒト口腔扁平上皮癌由来細胞株として、上記の OSF に KB, HO-1-u-1, HO-1-N-1, CA9-22, HSC-2, HSC-3, HSC-4, H357, H376, KN, さらに当講座で樹立した KON を加えた計12種類の樹立株について検索した。これらの細胞は、10% FCS (Boehringer Mannheim KK.) を含んだ Dulbecco 変法 Eagle's MEM (ニッスイ, 以下 DMEM) を用い、37°C で 5% CO<sub>2</sub>-incubator 中で培養したものである。

### 2. 研究方法

#### (1) 小孔通過能の検索法

8  $\mu\text{m}$  のポア径を有するケモタキセル (クラボウ) を gelatin でコーティングした後、24穴 マルチプレートを用い、各セル内に 10<sup>5</sup> 個の細胞を播種した。37°C, 5% CO<sub>2</sub> 存在下で24時間培養した後に、セルを PBS で洗浄した。洗浄したフィルム表面の細胞を綿棒で掃拭し、小孔を通過して裏面に移動した細胞をギムザ染色し、細胞数を算出した。通過能の判定は、通過細胞数が 0~1 未満を (-), 1~10 未満を ( $\pm$ ), 10~10<sup>2</sup> 未満を (+), 10<sup>2</sup>-10<sup>3</sup> 未満を (++) , 10<sup>3</sup> 以上を (+++) とした。

#### (2) コラーゲンゲル内への細胞侵入能の検索法

0.3% の I 型希塩酸コラーゲン溶液 (高研), 5 倍濃度 DMEM と再構成用緩衝液 (22 mg/ml NaHCO<sub>3</sub>, 0.2M HEPES) を冷却しながら、これらをそれぞれ 7:2:1 の比率で混合した液を作製した後、最終濃度が 10% となるように FCS を添加した培養液を作成した。1.6 cm 径の 24穴マルチプレートに 500  $\mu\text{l}$  のコラーゲン混合液を加え、37°C でゲル化させた。5 $\times$ 10<sup>4</sup> 個/ml の細胞密度となるように 10% FCS 添加 DMEM に浮遊させ、ゲル上に加え、37°C の 5% CO<sub>2</sub>-incubator 中で 3 週間培養した。培養後コラーゲンゲルを 10% 中性緩衝ホルマリン溶液で固定後、パラフィン包埋し、通法によりその切片に HE 染色を施して観察した。コラーゲンゲル内への細胞侵入能の判定は、切片中の侵入胞数が、1 未満を (-), 1~10<sup>2</sup> 未満を ( $\pm$ ), 10<sup>2</sup>~10<sup>3</sup> 未満を (+), 10<sup>3</sup>~10<sup>4</sup> 未満を (++) , 10<sup>4</sup> 以上を (+++) とした。

#### (3) RT-PCR 法による細胞外基質分解酵素関連遺伝子の検索法

Glass MAX RNA Microisolation Spin Cartridge System (GIBCO BRL) により、各細胞から total RNA を抽出した。この total RNA 1  $\mu\text{g}$  を鋳型とし、First-Strand cDNA Synthesis kit (Pharmacia Biotech) を用いて cDNA を合成した。次いで、合成した cDNA 溶液 (2  $\mu\text{l}$ ) と、uPA, uPA reseptor (uPA-R), PA inhibitor (PAI)-1, PAI-2, MMP-1, MMP-2, MMP-9, tissue inhibitor of MMP (TIMP)-1 および TIMP-2 に対する特異的なプライマーを用い、PCR 法によって各遺伝子の mRNA の発現を検討した。なお、使用したプライマーおよび PCR の条件は、Takino ら<sup>33)</sup> と Onisto ら<sup>34)</sup> の方法に準じた。

#### (4) Gelatin zymography による培養上清中の PA および MMP 活性の検索法

口腔扁平上皮癌細胞株が培養上清中に分泌する PA および MMP の活性を検討する上で、腫瘍間質の主成分である I 型コラーゲンの存在の有無が、これら細胞外基質分解酵素の活性に与える影響を知る必要がある。このため、各細胞株をシャーレ中培養群と I 型コラーゲンゲル上培養群の 2 群に分けて、gelatin を基質とする zymography<sup>35,36)</sup> で比較検討した。

3.5 cm 径のシャーレを用い、シャーレ中培養群と I 型コラーゲンゲル上培養群の各細胞株を 10% FCS 含有 DMEM で培養し、増殖飽和状態になった時点で PBS により十分に洗浄して、血清成分を除去した。洗浄後、培養液を無血清 DMEM (1 ml) に変更して 24 時間培養し、培養上清を回収した。なお、回収した各培養上清は、シャーレ中の細胞数を算定することにより細胞 10<sup>5</sup> 個の培養に相当する量を算出して使用した。この培養

上清を用い、PA活性の検索には0.2% gelatin および  $150 \mu\text{g/ml}$  の plasminogen (Sigma) を含む 8% SDS-ポリアクリルアミドゲルにより、また、MMP活性の検索には、0.2% gelatin (和光純薬) を含む 8% SDS-ポリアクリルアミドゲルにより、 $4^\circ\text{C}$ 、20 mA の条件で電気泳動し、ゲルを0.2%トリトン X-100 溶液で1時間洗浄し、PA活性は、0.15M NaCl と 0.02%  $\text{NaN}_3$  を含むトリス塩酸緩衝液 (pH7.5) 中で、また、MMP活性は、0.15M NaCl, 0.05M  $\text{CaCl}_2$  および、0.02%  $\text{NaN}_3$  を含むトリス塩酸緩衝液 (pH7.5) 中で、 $37^\circ\text{C}$  で12時間反応させ、0.25%クマシール R250 (片山化学) を含む7%酢酸/50%メタノール溶液で染色した後、10%酢酸溶液で脱色し検索した。

## 結 果

### 1. OS-F の樹立とその生物学的性状

1. ヒト口底扁平上皮癌由来細胞株 OS-F の樹立  
OS-F は、継代培養20代を越えても、細胞増殖能の低下を示さず、現在、継代100代を越えているが、*in vitro* で増殖を続けている。

### 2. OS-F の形態的特徴

位相差顕微鏡像では、敷石状配列を呈する類円形や多角形の細胞が主体をなしていた (図2)。

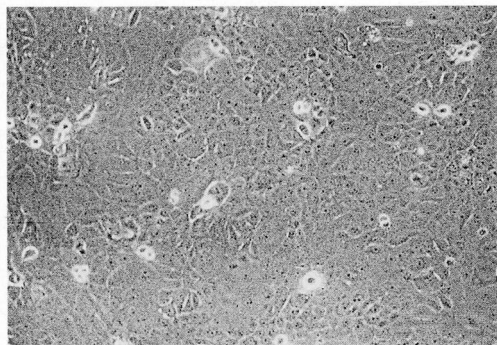


図2 OS-F の位相差顕微鏡像(継代35代目,  $\times 100$ )。

TEM 像では、細胞間にトノフィラメントの侵入を示すデスマゾーム結合を備えた上皮細胞が観察された (図3)。

### 3. OS-F の増殖能

継代9代目と28代目の細胞について増殖曲線を描記し (表1)、細胞倍加時間を算定したところ、9代目で36時間、28代目で22時間の倍加時間を示し、継代数の増加につれて倍加時間が短縮した。また、28代目 OS-F の飽和密度は、 $1.5 \times 10^5/\text{cm}^2$  であった。

プラスチックシャーレ中でのコロニー形成数は、OS-F の100個の播種で  $17.1 \pm 6.5$  個、また200個では  $64.8 \pm 1.1$

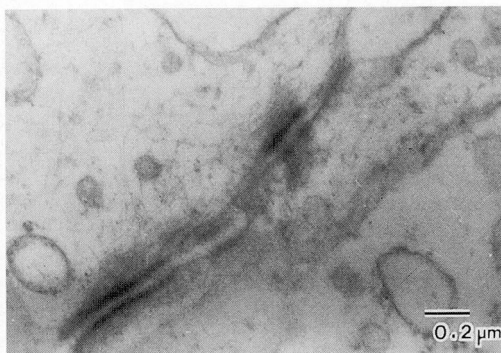
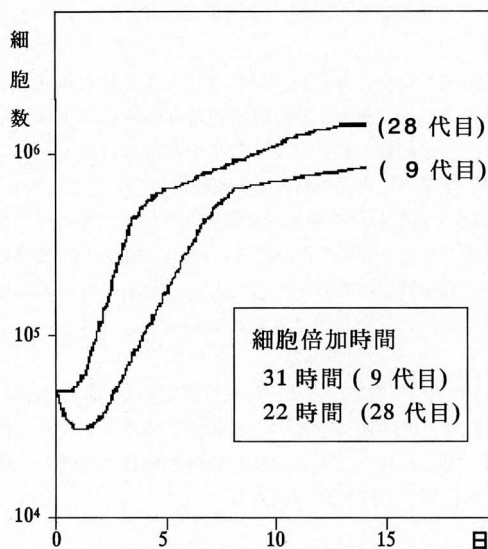


図3 OS-F の TEM 像。  
デスマゾームの存在が見られる。

表1 OS-F の増殖曲線



個であった (表2)。

軟寒天内コロニー形成能については、100個および200個の播種でも、コロニーの形成は不明瞭であり、細胞数が30個以上の集塊となっているコロニーはみられなかった。

ヌードマウスへの細胞ペレットの移植による造腫瘍能をみると、腫瘍は移植3週目までは小豆大まで徐々

表2 プラスチックシャーレ中に plating した細胞数とコロニー形成数

細胞数/シャーレ	コロニー形成数 (個)
100	$17.1 \pm 6.5$
200	$64.8 \pm 1.1$

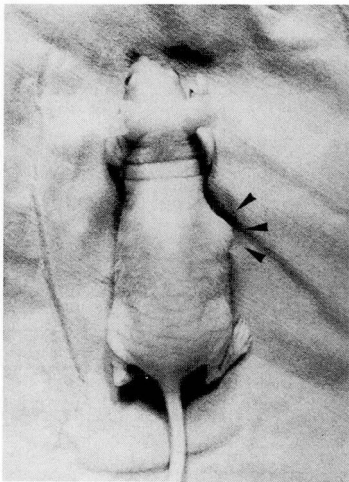


図4 スードマウスの側背部皮下に移植したOS-Fにより形成した腫瘤（移植後28日目）。

に増大したが、4週目以降にはほとんど増大傾向を示さなかった（図4）。移植後12週目の腫瘤のHE像では、腫瘍組織に角化を示す部位も部分的にはみられたが、全般的に角化傾向の低い組織像を示したことから、OS-Fを採取した再発癌母組織と同様に、中等度分化型扁平上皮癌と診断した（図5）。また形成された腫瘍周囲は線維性組織で被包されており、腫瘍細胞が周囲組織に浸潤している像はみられなかった。

#### 4. OS-Fの染色体数

100個の細胞につき染色体数を算定したが、染色体数は42から90の間に分布し、最頻値は68本であり、3倍体と考えられた。正常な細胞の染色体数と比較して明らかに増加していた（図6）。

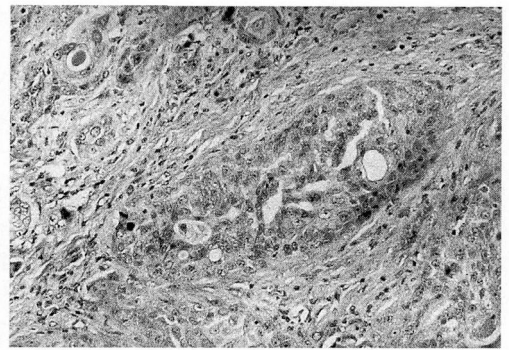


図5 スードマウスに移植・形成した腫瘍組織像（H.E染色，×150）。

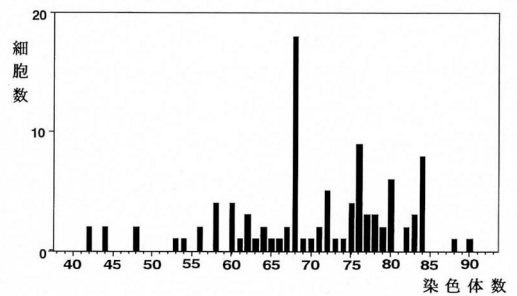


図6 OS-Fの染色体数 histogram.

#### 5. OS-Fの癌関連遺伝子

p53の発現を免疫組織化学的に検索したところ、再発癌組織、ヌードマウスへの移植により形成した腫瘍組織、および培養細胞（OS-F）の全てに陽性所見を示した（図7）。さらに、OS-Fを含む口腔扁平上皮癌8株について、p53をサザン・プロット法とウエスタン・プロット法で検索したが、サザン・プロット法では、全

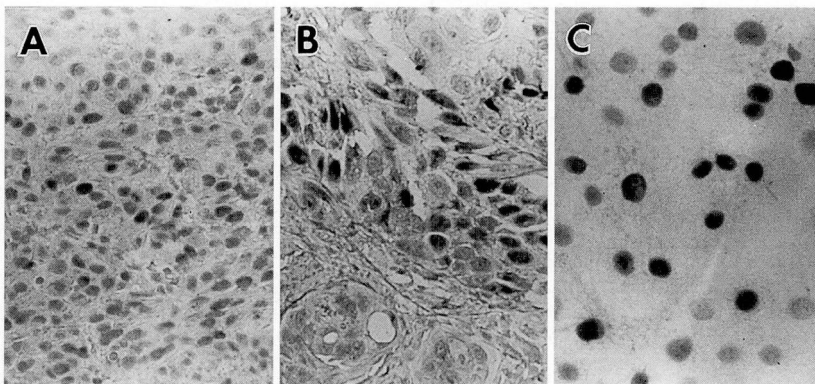


図7 OS-Fにおけるp53の免疫組織化学的染色像。

A: OS-Fの母組織の組織（×320），B: スードマウスへ移植し，形成した腫瘍（×350），C: 培養細胞（×320）。



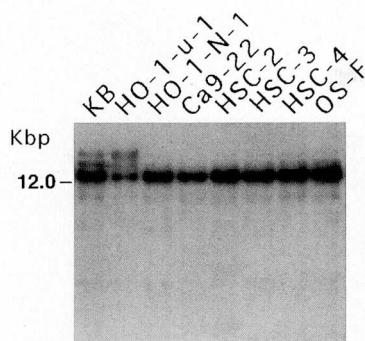


図8 各種口腔扁平上皮癌細胞株における P53 遺伝子の発現。

$^{32}\text{P}$ ・p53 cDNA をプローブとして、EcoRI で切断した DNA を用いたサザン・プロットによる分析。

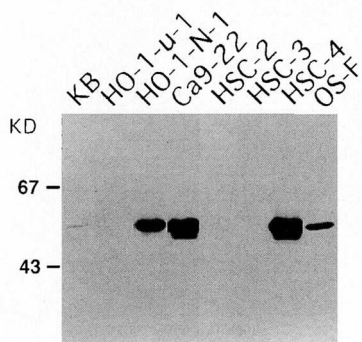


図9 各種口腔扁平上皮癌細胞株における P53 タンパクの異常蓄積。

抗ヒト p53 抗体を用いたウエスタン・プロットによる分析。バンドは p53 タンパクの異常蓄積を示す。

細胞株の 15 kbp 付近にバンドを認め、遺伝子の増幅や欠失などの所見は特に検出できなかった (図8)。一方、ウエスタン・プロット法では、OS-F, HO-1-N-1, Ca9-22, HSC-4 に同タンパクの異常蓄積を示すバンドが認められた (図9)。なお、塩基配列決定法による検索では OS-F において p53 遺伝子領域の exon5, 6, 7, 8 に遺伝子変異は見られなかった。

## II. 各種ヒト口腔扁平上皮癌細胞株の *in vitro* における運動能と浸潤能に及ぼす細胞外基質分解酵素の影響

### 1. 細胞運動能

小孔を通過した細胞数の多寡により細胞の運動能を判定した。OS-F を含む口腔扁平上皮癌細胞株12株のうちで通過能の高い細胞株には、KB, H357, H376, KN, OS-F があり、中間的な細胞株は、HO-1-N-1, HSC-2, HSC-3, KON, HO-1-u-1, また低い細胞株は、Ca9-22, HSC-4 であった (表3)。

### 2. コラーゲンゲル内への侵入能

OS-F を含む口腔扁平上皮癌細胞株12株のうち、侵入能の高い細胞株は H376 で、中間的な細胞株は H357, HSC-2, HSC-3, HO-1-N-1, Ca9-22, KON, また低い細胞株は、HSC-4, OS-F, HO-1-u-1, KN, KB であった (表4)。この結果と細胞運動能を比較すると、KB, HO-1-u-1, KN, OS-F 以外の細胞株でほぼ相関していた。次に、コラーゲンゲルへの各細胞株の侵入様式を分類すると、非侵入型、上皮脚型および散在型の3型に分類できた (図10)。これらの多くの細胞株は散在型の侵入様式を示した (表5)。また、侵入様式と各細胞株の由来癌組織における分化度と対比すると、高分化型由来細胞でも、散在型の侵入様式を示す細胞株が多かった (表6)。

表3 各種口腔扁平上皮癌細胞株における小孔通過能の比較

KB	H357	H376	KN	OS-F	HO-1-N-1	HSC-2	HSC-3	KON	HO-1-u-1	Ca9-22	HSC-4
+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++	+	±	-

$10^5$  個の細胞を播種して、通過細胞数が 0 ~ 1 未満を (-), 1 ~ 10 未満を (±), 10 ~  $10^2$  未満を (+),  $10^2$  ~  $10^3$  未満を (++) ,  $10^3$  以上を (+++) とした。

表4 各種口腔扁平上皮癌細胞株のコラーゲンゲル内侵入能の比較

H376	HSC-2	HSC-3	H357	HO-1-N-1	Ca9-22	KON	OS-F	KB	HO-1-u-1	HSC-4	KN
+++	++	++	++	+	+	+	±	±	-	-	-

コラーゲンゲル内に侵入した細胞数が、1 未満を (-), 1 ~  $10^2$  未満を (±),  $10^2$  ~  $10^3$  未満を (+),  $10^3$  ~  $10^4$  未満を (++) ,  $10^4$  以上を (+++) とした。

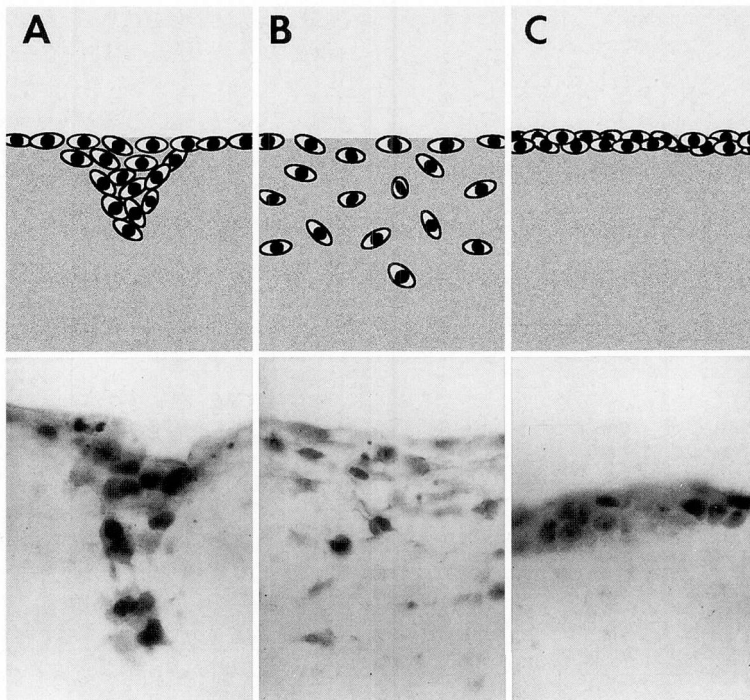


図10 I型コラーゲンゲルへの細胞侵入様式の種類(上段)とその代表例(下段, ×380).  
A: 上皮脚型 (OS-F), B: 散在型 (H376), C: 非侵入型 (HO-1N-1)。

表5 各種口腔扁平上皮癌細胞株のコラーゲンゲル内侵入様式

cell line	侵入様式
Ca9-22	散在型
HSC-2	散在型
HSC-3	散在型
HSC-4	散在型
H357	散在型
H376	散在型
KON	散在型
HO-1-N-1	上皮脚型
OS-F	上皮脚型
KB	非侵入型
HO-1-u-1	非侵入型
KN	非侵入型

3. 細胞外基質分解酵素uPA関連遺伝子の mRNA レベルでの発現

RT-PCR 法による PA に関連する uPA, uPA-R, PAI-1, PAI-2 の検索結果から, uPA は OS-F を含む口腔扁平上皮癌細胞株12細胞株のうち, KB と Ca9-22 を除く細胞株に比較的高い発現を示した。uPA-R はほとんどの株で発現しており, 中でも, KB, HO-1-N-1, Ca9-22, H357, H376, OS-F は比較的高い発現を示した。uPA の

表6 各種口腔扁平上皮癌細胞株の小孔通過能を中心とした各種性状

小孔通過能	cell line	collagen gel 侵入能	侵入様式	由来癌組織の分化型
強	H376	+++	散在型	高度
	H357	++	散在型	高度
	OS-F	±	上皮脚型	中等度
	KB	-	非侵入型	低度
	KN	-	非侵入型	中等度
中	HSC-2	++	散在型	高度
	HSC-3	++	散在型	低度
	HO-1-N-1	+	上皮脚型	高度
	KON	+	散在型	中等度
	HO-1-u-1	-	散在型	低度
弱	Ca9-22	+	散在型	高度
	HSC-4	±	散在型	高度

インヒビターである, PAI-1 は, KB, HO-1-u-1, HSC-3, HSC-4, KN を除く株では比較的高い発現を示し, また, PAI-2 は, KB, HO-1-u-1, HSC-2, KN 除く細胞株には発現が比較的高かった (図11)。

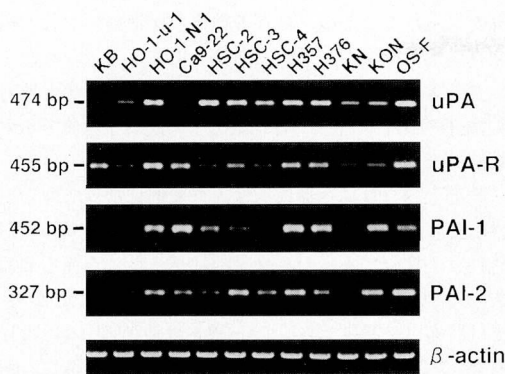


図11 各種口腔扁平上皮癌細胞株におけるuPA関連遺伝子のmRNA発現。

RT-PCR法による分析。(ethidium bromide 染色)

PCRの条件: denature (D), 94°C, 90 sec.; annealing (AN), 48°C, 120 sec; extension (E), 72°C, 120 sec.; 30 cycles → D, 94°C, 60 sec.; AN, 58°C, 120 sec.; E, 72°C, 300 sec.; 2 cycles.

#### 4. 細胞外基質分解酵素 MMP 関連遺伝子の mRNA レベルでの発現

RT-PCR法によるMMPに関連するMMP-1, MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2の検索結果から, MMP-1は上記12細胞株のうち, HSC-2, HSC-3, H357に比較的高く発現し, MMP-2は, HO-1-N-1, HSC-2, H357, H376, KONで比較的高い発現を示した。一方, MMP-9は, HO-1-N-1, HSC-2, HSC-3, KONでのみ発現が見られた。MMPのインヒビターであるTIMP-1は, 全細胞株に発現していたが, その発現状態は低く, TIMP-2は, HO-1-u-1, HSC-3, HSC-4, KN, KONを除く株で比較的高い発現を示した(図12)。

#### 5. 細胞外基質分解酵素 PA の活性

上記12細胞株を用いてgelatin zymographyによりPA活性を検索したところ, シャーレ中培養群では, 分子量約54KDの高分子型uPAの活性を示すlytic bandが, KBとCa9-22を除く株では, 比較的強く認められた。33Dの低分子型uPAは, HSC-2, HSC-3, H376に極くわずかに認められるのみであった。一方, I型コラーゲンゲル上培養群では, 高分子型uPA活性は, シャーレ中培養群でlytic bandの認められた細胞株でより高レベルに発現した。また, 低分子型uPA活性は, シャーレ中培養群で活性を示した細胞株でより強いlytic bandを示し, またHO-1-N-1, HSC-4, H357, KN, KON, OS-Fでもlytic bandが新たに出現した(図13)。

#### 6. 細胞外基質分解酵素 MMP の活性

上記と同じ12株でgelatin zymographyによりMMP活性を検索したが, シャーレ中培養群では, 分子量約

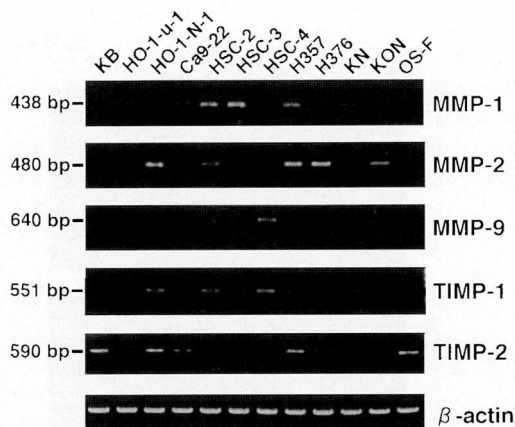


図12 各種口腔扁平上皮癌細胞株におけるMMP関連遺伝子のmRNA発現。

RT-PCR法による分析。(ethidium bromide 染色)

PCRの条件: D, 94°C, 90 sec.; AN, 48°C, 120 sec; E, 72°C, 120 sec.; 30 cycles → D, 94°C, 60 sec.; AN, 58°C, 120 sec.; E, 72°C, 300 sec.; 2 cycles.

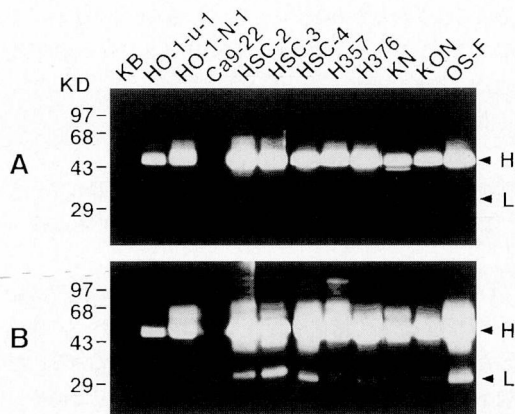


図13 各種口腔扁平上皮癌細胞株におけるuPA活性。

Gelatin zymography (plasminogen 添加)による分析。

A: シャーレ上培養群, B: コラーゲンゲル上培養群, H: 高分子量uPA, L: 低分子量uPA。

各レーンでは,  $10^5$ 個細胞数の培養時に相当する培養液上清量を電気泳動した。

92KDのMMP-9はHSC-2に, また, 約62KDのMMP-2はH376にlytic bandを示した。その他の細胞株では不明瞭であった。一方, I型コラーゲンゲル上培養群では, MMP-9がHSC-2でlytic bandが増強を示したことに加えて, HSC-3, HSC-4, H376にも認められた。また, MMP-2はH376で増強した他に, HO-1-N-1, KONでも認められた。シャーレ中培養群ではほとんど



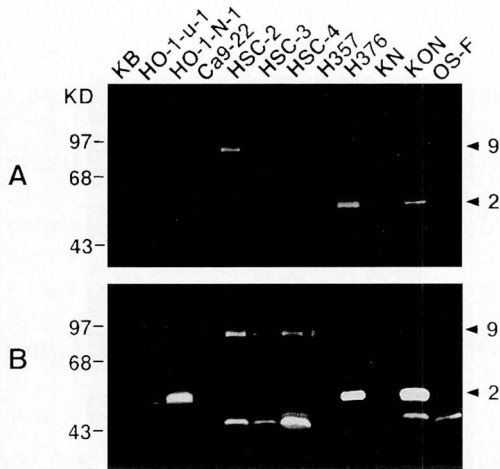


図14 各種口腔扁平上皮癌細胞株におけるMMP活性。Gelatin zymography による分析。  
A: シャーレ上培養群, B: コラーゲンゲル上培養群, 2: MMP-2, 9: MMP-9  
各レーンでは,  $10^5$  個細胞数の培養時に相当する培養液上清量を電気泳動した。

認められなかったMMP-1と思われるlytic bandが, I型コラーゲンゲル上培養群では, HSC-2, HSC-3, HSC-4, KON, OS-Fに出現した(図14)。

## 考 察

### I. OS-Fの樹立とその生物学的性状に関して

#### 1. ヒト口腔扁平上皮癌由来樹立細胞株OS-Fに関して

OS-Fは, 継代培養20代を越えても増殖能の低下は見られず *in vitro* で増殖を維持し続けているため, 株化した細胞と考えられる。現在まで報告されている口腔扁平上皮癌由来細胞株の樹立のうちで, OS-Fと同様に口底癌由来の細胞株は数株<sup>2, 12, 17, 18)</sup>に見受けられたが, その大多数の腫瘍宿主が男性例由来であったのに対し, OS-Fは女性例であり, 性差の面から検討される実験系に用いられて役立つ可能性がある。OS-Fの形態的特徴は, 位相差顕微鏡下で上皮細胞様の敷石状配列を呈する細胞が主体をなし, TEM像でも, 上皮性細胞に特有な細胞間にデスマゾーム結合を有しており, またその由来組織などから扁平上皮の性格を保持した細胞と考えられた。

#### 2. OS-Fの増殖能に関して

OS-Fの細胞倍加時間は, 9代目が36時間, 28代目が22時間であり, 多くの口腔扁平上皮癌由来細胞株の倍加時間が, 17時間から40時間の間に分布<sup>2, 4, 5, 7, 9, 11-18)</sup>していることから, そのほぼ中間的な増殖速度を持つ細胞と考えられた。継代数の増加につれて倍加時間に短

縮が見られたことは, 培養の継代数が進むにつれ本細胞株の形質転換が亢進した結果であると考えられた。

プラスチックシャーレ中でのコロニー形成数も他の細胞株の報告<sup>5, 7, 9, 16-18)</sup>と比較して中間的な数値を示す細胞株であった。

軟寒天内コロニー形成能は, 一般的に培養細胞の悪性転換の指標に用いられているが, OS-Fのコロニー形成能は不明瞭であった。文献的に見ると, 百瀬らの報告したHSC-3<sup>12)</sup>でも同様の傾向がみられたことから, 悪性腫瘍由来細胞であってもOS-Fは他の細胞株とは異なり, 寒天中での増殖能力は極めて低い細胞株に分類されると考えられた。ヌードマウス側背部皮下への移植により造腫瘍能が確認されたが, 4週目以降にはほとんど増大傾向を示さなかったことから, 増殖能は低い細胞群に入ると考えられた。移植により形成した腫瘍組織は, OS-Fの母組織(再発癌)と類似した組織像を示したことから, 採取した母組織の性格を保持し続けている可能性は現在も残っていると思われるが, *in vitro*での継代によりさらに変化や転換していく可能性のあることも否定できない。

#### 3. OS-Fの染色体数に関して

癌細胞の染色体数は文献的に, 2倍体から4倍体の範囲にある場合が多い<sup>3, 5, 7, 9-18)</sup>。OS-Fの染色体数は3倍体で, 上記の一般的範囲内にあり, 染色体数の明らかな増加は, 本培養細胞OS-Fが癌細胞の性質を有していることを示すものと考えられた。

#### 4. OS-Fの癌関連遺伝子に関して

癌細胞においてp53は, 現在までに数多くの検索がなされており, 口腔扁平上皮癌細胞株についても遺伝子変異を検索した報告が見られる<sup>37)</sup>。OS-Fでのp53でも, 免疫組織化学的に陽性所見が認められた。OS-Fを含む口腔扁平上皮癌8株における本実験で, ウェスタン・ブロット法により, OS-F, HO-1-N-1, Ca9-22, HSC-4に同タンパクの異常蓄積を示すバンドが認められたことから, p53の遺伝子領域に変異の存在することが考えられた。塩基配列決定法で, OS-Fにおけるp53遺伝子領域のexon 5, 6, 7, 8について変異の有無を検索したが, 同領域に遺伝子変異が見られなかったことから, exon 5, 6, 7, 8以外の領域に変異が存在する可能性がある。

### II. *in vitro*におけるヒト口腔扁平上皮癌細胞の運動能と浸潤能に及ぼす細胞外基質分解酵素の影響に関して

#### 1. 細胞運動能に関して

ケモタキセルの小孔通過能の検討から, 被験細胞群は通過能の高い細胞株, 中間的な細胞株, 低い細胞株

に分類できた。これらは、各細胞株の自己運動能を反映する結果と考えられた。細胞運動能と浸潤・転移能を比較した例では、Volkらのマウス黒色種由来細胞(19)やPartinらの前立腺癌細胞<sup>38)</sup>において、細胞運動能は浸潤・転移能と相関があるとの報告もあり、この点からヒト口腔扁平上皮癌細胞においても細胞細胞自身の運動能の差が、癌細胞の浸潤能に影響する可能性がある。

## 2. I型コラーゲンゲルへの細胞侵入能に関して

I型コラーゲンゲルへの侵入能の検討から、細胞侵入能の高い細胞株、中間的な細胞株、および低い細胞株に分類できた。この結果は、一部の例外を除き、前述の小孔通過能と相関する細胞株が多く存在したことから、コラーゲンゲル内侵入能は細胞自身の運動能が影響していることを推定させるものであった。次に、コラーゲンゲルへの細胞侵入様式に違いの生じることは、一般的に各細胞株の細胞自体の分化度が反映されると考えられ、すなわち、上皮脚型は正常口腔粘膜上皮の形態に類似し比較的分化度が高く、散在型は細胞間接着が弱く細胞塊を形成しない分化度の低い形態を反映するものと考えられた。高分化型や中等度分化型由来細胞でも、散在型の侵入様式を示す細胞株があったことは、*in vitro*で継代を繰り返すことにより、高分化型由来細胞も、より未分化な細胞形質に転換した結果であろうと推定された。上皮脚型の侵入様式を示す細胞株には、OS-FとHO-1-N-1があったが、これらは中等度もしくは高分化型の癌細胞由来であり、由来母組織の性格を保持している結果と考えられた。非侵入型の細胞株に関して、KBやKNのごとく、小孔通過能が高いにもかかわらず、ゲル内に侵入しない細胞株もある。これは、Volkらの指摘するように腫瘍細胞の*in vitro*の運動能と*in vivo*における浸潤・転移能とは必ずしも一致しない場合のある<sup>19)</sup>ことを示す結果と考えられ、またこれと同様に、ゲル内侵入に際しても、細胞自体の運動による単なる物理的侵入因子だけでなく、細胞外基質破壊などの他の因子も必要であることが考えられる。

## 3. 癌浸潤に関与する細胞外基質分解酵素に関して

### (1) 細胞外基質分解酵素 uPA の関与に関して

uPAの発現は種々の癌細胞株にみられているが<sup>32,38)</sup>、本研究で行なったRT-PCR法による検索でも、多くの細胞株でuPAが発現しており、一部の細胞株を除いて前述のコラーゲンゲル内侵入能と相関する細胞株が多かった。uPA-Rも多くの細胞株で発現しており、uPAの発現に相関する細胞株も見られたが、ゲル内侵入能との相関性は明確ではなかった。一方、uPAのインヒビターであるPAI-1とPAI-2に関して、uPAとuPA-R

の発現が一部相関している細胞株も見られたが、ゲル内侵入能との相関性は明確でなかった。これらの事象より今回検索したPA関連遺伝子の中では、uPAの発現が中心となっている可能性が考えられた。

Gelatin zymographyによるPA活性の検索から、uPAの活性は、前述のRT-PCR法での結果とはほぼ相関していることが示された。また、シャーレ中培養群に対してI型コラーゲンゲル上培養群におけるuPAの活性が増強していたが、この結果とuPAがuPA-Rとインテグリンを介した情報伝達系に関係しているというWerbの報告<sup>40)</sup>から考えると、癌細胞が、細胞周囲に存在するI型コラーゲンをインテグリンなどの接着分子を介して認識し、そのシグナルの刺激によりuPAの分泌・活性化が促進されたと推察される。

### (2) 細胞外基質分解酵素MMPの関与に関して

RT-PCR法によるMMP関連遺伝子の検索から、MMP-1、MMP-2、MMP-9のいずれも、ゲル内侵入能に対して相関性は明確でなかった。また、MMPのインヒビターであるTIMP-1とTIMP-2に関しても同様の結果であった。能崎ら<sup>39)</sup>は、強いuPAの発現を示す細胞株ではMMP-2やMMP-9も相関して発現する傾向のある細胞株が多いと報告しているが、本実験のmRNAレベルでは、uPAとMMPにその様な相関傾向は見られなかった。

Gelatin zymographyによるMMP活性の検索から、MMP-1、MMP-2、MMP-9のいずれも、一部の細胞株で前述のRT-PCR法による結果と相関性が見られたが、大多数の細胞株ではその相関性は不明瞭であった。また、シャーレ中培養群に対してI型コラーゲンゲル上培養群では、MMP-1、MMP-2、MMP-9の各活性の増強傾向を示す細胞株も見られたが、一部の細胞株では、増強傾向が不明瞭なものもあった。これらMMP活性の増強は、Blasiらの示したuPAがMMPなどの細胞外基質分解能の活性化に関与するという報告<sup>41)</sup>からしても、前述したと同様にI型コラーゲンの存在により、まずuPAが増強され、引き続いてMMPが増強された可能性があるかと推定された。

プロテアーゼは、SP,MP,cystine proteinase,aspartate proteinaseに大別される。このうち、癌との関連が重要視されている細胞外基質分解酵素には、前述した様に、SPに含まれるuPAとMPに含まれるMMPがあり、細胞外基質の破壊に重要な機能を持っている。口腔扁平上皮癌細胞株の分泌するPAおよびMMPの活性を検討する上で、腫瘍間質の主成分であるI型コラーゲンの存在の有無が、これら細胞外基質分解酵素の活性に与える影響を知る必要がある。このため、各細胞株をシャーレ中培養群とI型コラーゲンゲル上培養群の2

群に分けて、gelatinを基質とするzymographyで比較検討したが、uPAの基質となる成分にはplasminogen, fibronectin, hepatocyte growth factorなどが報告<sup>40)</sup>されているが、本実験で使用したI型コラーゲンに関しては、uPAの基質となるという報告は現在まで見られない。このことを上記の点と総合して考えると、癌細胞浸入時には、まず癌細胞が間質成分であるI型コラーゲンをインテグリンなどの細胞接着分子を介して認識し、続いて、主としてuPAが分泌・活性化される。その後、MMPなどのI型コラーゲンを基質とする細胞外基質分解酵素の分泌・活性化が起こることにより、I型コラーゲンゲルの分解と細胞浸入に至るというカスケードが考えられる。

## 結 論

ヒト口腔扁平上皮癌細胞株OS-Fを樹立して、その生物学的検索を行い、癌細胞の実験的モデルの一つに加えた。同時に、OS-Fを含む口腔扁平上皮癌由来細胞株12株を用いて、癌細胞の浸潤機序に影響を及ぼす因子を検索し、以下の結論を得た。

1) OS-Fの生物学的性状は、位相差顕微鏡やTEM像から上皮細胞の性格を保持していた。また倍加時間やシャーレ中のコロニー形成数から、OS-Fは他の口腔扁平上皮癌細胞株と比較しても平均的な増殖能を示した。しかし、OS-Fの軟寒天培養系でのコロニー形成能は極めて不明瞭であった。ヌードマウス側背部皮下へ移植するとOS-Fは造腫瘍能を示したが、その*in vivo*の増殖能も比較的低かった。一方、染色体数の増加所見はOS-Fが悪性腫瘍形質を有する癌細胞株であることを示唆した。

2) OS-Fにおいてp53免疫組織化学的およびウエスタン・ブロット法による検索結果から、遺伝子領域に変異の生じている可能性が示された。しかし塩基配列決定法ではp53 exon5, 6, 7, 8には変異が認められず、これら以外のp53領域に変異をきたしていると推察された。

3) 癌浸潤に関する因子を検索したが、細胞運動能の高い細胞株でI型コラーゲンゲル内への侵入能と相関するものが多く、細胞自体の運動能は癌浸潤に影響する因子の一つであることが示唆された。しかし、他の因子と複合的に作用している可能性が推察された。各細胞株のコラーゲンゲル内侵入様式と由来癌組織の分化度との関係を検討したが、由来癌組織の分化度が高い細胞株であっても、*in vitro*での継代培養が進むことによって、より未分化な形質に転換することが推察された。

4) 腫瘍間質の主成分であるI型コラーゲンの存在

はuPAの活性を明らかに増強した。したがって、癌細胞自身がインテグリンなどの接着分子を介してI型コラーゲンを認識し、そのシグナルによりuPAの分泌・活性化を増強し、さらに、MMPなどの細胞外基質分解酵素の分泌・活性化を二次的に増強するようなカスケードが存在すると示唆された。

以上の結果を総合すると、増殖能の比較的低いOS-Fは、現状では形態的に由来扁平上皮癌細胞の形質を保持し、かつp53遺伝子領域の変異が示唆された。浸潤能に影響を及ぼす因子として、癌細胞自体の運動能に加え、uPAを中心とする細胞外基質分解酵素が考えられた。I型コラーゲンの存在によってuPAの活性が明瞭に増強され、かつMMPもやや増強傾向が見られた。このことは、uPAは直接的にI型コラーゲンを分解するのではなく、uPAが分泌・活性化されることにより、他の細胞外基質分解酵素を活性化してコラーゲンゲルを分解する可能性を示唆している。さらに、各種の口腔扁平上皮癌の樹立細胞株では、継代により細胞性状の変異やポテンシャルに継代的転換の生じている可能性が強く示唆された。これらの違いを十分に考慮して、OS-Fを含めたヒト口腔扁平上皮癌細胞株を各種病態の解明に対する実験モデルに利用すべき点も再確認された。

## 謝 辞

本研究に際して、終始御懇篤なる御指導を賜りました広島大学歯学部口腔外科学第二講座 石川武憲教授に心から感謝の意を表します。また、本論文の作成に当たり、御教示、御校閲を賜りました本学口腔病理学講座二階宏昌教授ならびに本学口腔生化学講座加藤幸夫教授に深甚なる謝意を表します。

さらに本研究の遂行および論文の作成に当たり、御指導、御助言を賜った本学歯学部口腔外科学第二講座 杉山 勝助教授に謹んで御礼を申し上げますとともに、御支援を戴きました本学歯学部口腔外科学第二講座 田中浩二講師、原田 直講師を始めとする諸先生方に感謝いたします。

## 文 献

- 1) Gey, G.O., Coffman, G.W, Kubicek, M.T.: Tissue culture studies of proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epitherium. *Cancer Res.*, **12**, 264-265, 1952.
- 2) Eagle, H.: Propagation in a fluid medium of a human epidermoid carcinoma, strain KB. *Proc Soc Exp Biol Med.*, **89**, 362-364, 1955.
- 3) 堀越 勝, 木村義孝, 名倉英明, 小野富昭, 伊藤秀夫: 人の歯肉癌由来の細胞株の樹立(第1報).

- 日口外誌 20, 10-16, 1974.
- 4) Moore, A.E., Sabachewsky, L., Toolan, H.W.: Culture characteristics of four permanent lines of human cancer cells. *Cancer Res.*, **15**, 598-605, 1955.
  - 5) 臼田篤伸, 道 健一, 松浦正朗, 結城勝彦, 増尾勝巳, 小浜源郁, 清水正嗣, 上野 正: 下顎歯肉扁平上皮癌の頸部リンパ節転移巣よりえられた新細胞株 (HSC-1) について. *口科誌* **24**, 61-74, 1975.
  - 6) 石田 稔: 人癌細胞の培養—上顎歯肉癌由来の細胞株について—. *日耳鼻*. **81**, 588-603, 1978
  - 7) Okabe, T., Sato, N., Kondo, Y., Asano, S., Ohsawa, N., Kosaka, K., Ueyama, Y.: Establishment and characterization of a human cancer cell line that products human colonystimulating factor. *Cancer Res.*, **38**, 3910-3917, 1978.
  - 8) Nishihira, T., Kasai, M.: Characteristics of two cell lines (TE-1 and TE-2) derived from human squamous cell carcinoma of the esophagus. *Gann*, **70**, 575-584, 1979.
  - 9) 小池正夫, 五木田利明: ヒト歯肉癌由来の細胞株 (MK-1) の樹立とその性状. *日口外誌* **26**, 1481-1489, 1980.
  - 10) 小松正隆, 浦出雅裕: 著明な角化傾向をもつ上顎扁平上皮癌由来株化細胞の樹立. *日口外誌* **29**, 1243-1248, 1983.
  - 11) 宮内 忍, 諸山隆正, 阪本知二, 岡本哲治, 高田和彰: ヒト口底癌由来細胞株 (Ueda-1) の樹立. *日口外誌* **31**, 1347-1351, 1985.
  - 12) 百瀬文雄, 平田章二, 新井田俊雄, 田中信幸, 塩田重利: 3つの口腔扁平上皮癌由来細胞株の性状について. *口科誌* **35**, 85-95, 1986.
  - 13) 宮内 忍, 諸山隆正, 高田和彰: 頬粘膜扁平上皮癌細胞株によるインターロイキン-1様物質の産生. *日口外誌* **34**, 7-14, 1988
  - 14) 高橋喜久雄, 金沢春幸, 秋山行弘, 田崎滋子, 高原正明, 武藤寿孝, 丹沢秀樹, 佐藤研一: ヒト舌癌原発巣より得られた低分化型扁平上皮癌細胞株 (SAS) の樹立. *口科誌* **38**, 20-28, 1989.
  - 15) 古屋 誠: フィブロネクチンを産生するヒト舌扁平上皮癌由来細胞株の樹立とその性状. *日口外誌* **36**, 868-880, 1990.
  - 16) 池本公亮: ヒト口腔扁平上皮癌細胞株 (KGK) の樹立とその性状. *日口外誌* **39**, 367-378, 1993.
  - 17) 小原 勝, 安井 淳, 石川武憲: ヒト口腔扁平上皮癌細胞株 (KON) の樹立とその性状. *日口外誌* **41**, 19-25, 1995.
  - 18) 林 英司, 力丸浩一, 里村一人, 中村孝三郎, 布袋屋智明, 倉郷貴敏, 長山 勝: 4種のヒト口腔癌細胞株の樹立とその性状. *口科誌* **44**, 47-54, 1995.
  - 19) Volk, T., Geiger, B., Raz, A.: Motility and adhesive properties of high and low-metastatic murine neoplastic cells. *Cancer Res.*, **44**, 811-824, 1984.
  - 20) Quax, P.H.A., Leeuwen, R.T.J., Verspaget, H.W., Verheijen, J.H.: Protein and messenger RNA levels plasminogen activators and inhibitors analyzed in 22 human tumor cell lines. *Cancer Res*, **50**, 1488-1494, 1990.
  - 21) Glayman, G., Wang, S.W., Nicolson, G.L., El-Naggar, A., Mazar, A., Henkin, J., Blasi, F., Goepfert, H., Boyd, D.D.: Regulation of urokinase-type plasminogen activator expression in squamous-cell carcinoma of the oral cavity. *Int. J. Cancer*, **54**, 73-80, 1993.
  - 22) Collier, I.E., Wilhelm, S.M., Eisen, A.Z., Marmer, B.L., Grant, G.A., Sertzer, J.L., Kronberger, A., He, C., Bauer, E.A., Goldberg, G.I.: H-ras oncogene-transformed human bronchial epithelial cells (TBE-1) secrete a single metalloproteinase capable of degrading basement membrane collagen. *J. Biol. Chem.*, **263**, 6579-6587, 1988.
  - 23) Miyazaki, K., Hattori, Y., Umenishi, F., Yasumitsu, H., Umeda, M.: Purification and characterization of extracellular matrix-degrading metalloproteinase, matrin (pump-1) secreted from human rectal carcinoma. *Cancer Res.*, **50**, 7758-7764, 1990.
  - 24) Wilhelm, S.M., Collier, I.E., Marmer, B.L., Eisen, A.Z., Gerant, G.A., Goldgerg, G.I.: SV40-transformed human lung fibroblasts secrete a 92-KDa type IV collagenase which is identical to that secreted by normal human macrophages. *J. Biol. Chem.*, **264**, 17213-17221, 1989.
  - 25) Okada, A., Bellocq, J.P., Rouyer, N., Chenard, M.P., Rio, M.C.: Chambon, P., Basset, P. Membrane-type matrix metalloproteinase (MT-MMP) gene is expressed in stromal cells of human colon, breast, and head and neck carcinomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 2730-2734, 1995.
  - 26) Tanaka, M., Sato, H., Takino, T., Iwata, K., Inoue, M., Seiki, M.: Isolation of a Mouse MT2-MMP gene from along cDNA library and identification of its product. *FEBS Letters.*, **402**, 219-222, 1997.
  - 27) Kusukawa, J., Sasaguri, Y., Shima, I., Kameyama, T., Morimatsu, M.: Expression of matrix metalloproteinase-2 related to lymph node metastasis of oral squamous cell carcinoma. A clinicopathologic study. *Am. J. Clin. Pathol.*, **99**, 18-23, 1993.
  - 28) Kawata, R., Shinomiya, T., Yasuda, N., Takenaka, H., Murakami, Y.: Matrix metalloproteinase-2 concentrations in squamous cell carcinoma of the head and neck and its clinical significance. *日耳鼻* **99**, 299-305, 1996.
  - 29) Matozaki, T., Sakamoto, C., Matsuda, K., Suzuki, T., Konda, Y., Nakao, O., Wada, K., Uchida, T., Nishisaki, H., Nagao, M., Kasuga, M.: Missense mutation and a deletion of the p53 gene in human gastric cancer. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **182**, 215-223, 1992.

- 30) Charous, S.J., Stricklin, G.P., Nanney, L.B., Netterville, J.L., Burkey, B.B.: Expression of matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinase in head and neck squamous cell carcinoma. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.*, **106**, 271–278, 1997.
- 31) Yoshida, K., Yokozaki, H., Niimoto, M., Ito, H., Ito, M., Tahara, E.: Expression of TGF- $\beta$  and procollagen type I and type III in human gastric carcinomas. *Int. J. Cancer*, **44**, 394–398, 1989.
- 32) Yasui, W., Ayhan, A., Kitadai, Y., Nishimura, K., Yokozaki, H., Ito, H., Tahara, E.: Increased expression of p34cdc2 and its kinase activity in human gastric and colonic carcinomas. *Int. J. Cancer*, **43**, 36–41, 1993.
- 33) Takino, N.M., Endo, Y.: Relationship between expression of plasminogen activator system and metastatic ability in human cancers. *Int. J. Oncol.*, **8**, 97–105, 1996.
- 34) Onisto, M., Garbisa, S.: Reverse transcription-polymerase chain reaction phenotyping of metalloproteinase and inhibitors involved in tumor matrix invasion. *Diagn. Mol. Pathol.*, **2**, 74–80, 1993.
- 35) Kawahara, E., Okada, Y., Nakanishi, I., Iwata, K., Kojima, S., Kumagai, S., Yamamoto, E.: The expression of invasive behavior of differentiated squamous cell carcinoma cell line evaluated by an in vitro invasion model. *Jpn. J. Cancer Res.*, **84**, 409–418, 1993.
- 36) Roche, P.C., Campeau, J.D., Shaw, S.T.: Comparative electrophoretic analysis of human and porcine plasminogen activators in SDS-polyacrylamide gels containing plasminogen and casein. *Biochim. Biophys. Acta.*, **745**, 82–89, 1983.
- 37) Sakai, E., Tsuchida, N.: Most human squamous cell carcinomas in the oral cavity contain mutated p53 tumor-suppressor genes. *Oncogene*, **7**, 927–933, 1992.
- 38) Partin, A.W., Schoeniger, J.S., Mohler, J.L.: Fourier analysis of cell motility: Correlation of motility with metastatic potential. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 1254–1258, 1989.
- 39) 能崎晋一, 山本悦秀: 頭頸部扁平上皮癌由来細胞の転移能に関わる細胞外基質分解酵素の発現. 口腔組織培養研究会誌 **5**, 23–28, 1996.
- 40) Werb, Z.: ECM and cell surface proteolysis: Regulating cellular ecology. *Cell*, **91**, 439–442, 1997.
- 41) Blasi, F., Verde, P.: Urokinase-dependent cell surface proteolysis and cancer. *Semin. Cancer Biol.*, **1**, 117–126, 1990.