

舌癌の原発巣と頸部リンパ節転移巣から樹立した 培養細胞の生物学的性状

信 森 剛

Biological Characteristics of Two New Cell Strains Isolated from a Primary Squamous Cell Carcinoma of the Tongue and a Nodal Metastasis

Takeshi Nobumori

(平成15年1月15日受付)

緒 言

口腔癌の治療成績の向上のためには原発巣の制御に加えて転移巣を制御することが重要であり、この問題の解決のためには臨床的研究のみならず基礎的研究成果の蓄積が必要である。同一個体の原発巣および転移巣に由来する癌細胞株を樹立し、両者の性状を比較解析することは転移メカニズムをはじめとする種々の口腔癌の基礎的研究に有用であると考えられる。同一患者からの腫瘍の原発巣と転移巣各々に由来して樹立された細胞株には、頭頸部領域では、舌癌と頸部リンパ節転移巣から林ら¹⁾の樹立したMO-T, MO-N1, MO-N2, 同じく舌癌と頸部リンパ節転移巣からEastyら²⁾の樹立したHN-6, HN-6n1, HN-6n2や、上顎洞癌と頸部リンパ節転移巣から與田ら³⁾の樹立したOKK-TKp, OKK-TKmなどが報告されており、原発巣と転移巣とでは、その生物学的性状が異なっていると考えられている。しかし、その樹立株はまだ少ないため、生物学的特性の証明されたさらに新しい細胞株の樹立とそれらの組み合わせによって、転移関連因子の不明な点が解明されるものと期待される。

癌細胞の転移は、原発巣で増殖した癌細胞が、原発巣から遊離し、脈管内へ侵入・移動して、遠隔臓器の毛細管内や基底膜へ接着し、脈管外へ逸脱し、標的臓

器での増殖という過程をとり、転移が成立することが推定されている⁴⁾。そこで、同一患者の舌癌の原発巣と上頸部リンパ節転移巣から分離した各培養細胞を樹立し、各過程において作用すると考えられる諸因子を両細胞株で比較することから、どのような性状を発現する細胞が、転移に関連する働きを示すかを検索した。

すなわち、本研究では、樹立した両細胞を用いて、それらの増殖能、栄養要求性、細胞間接着能、細胞浸潤能、細胞外基質との接着能、細胞外基質産生能などを比較検討した。

実験材料と実験法

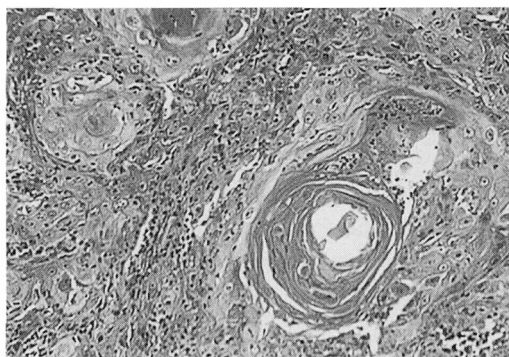
1. 細胞培養材料

本研究に使用した細胞は、以下の患者の手術時に得た組織(図1)を初代培養した。

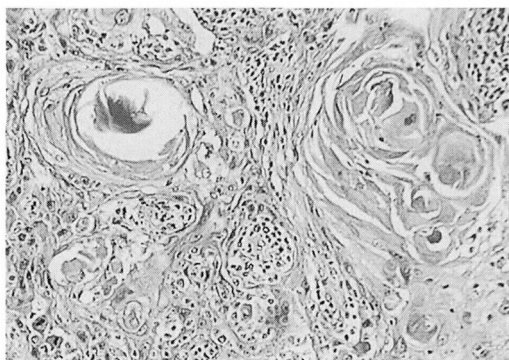
患者は69歳の女性で、左側舌根部の疼痛と潰瘍形成を主訴として、平成12年8月31日に当科を受診した。口腔内所見として、左側舌根部に3.1 cm幅、2.2 cm高径の潰瘍形成を認め、周囲に硬結を触知した。左顎下リンパ節は小指頭大に腫大していたが、可動性で圧痛等は認められなかった。舌根潰瘍形成部を中心として試験切除を行った結果、高分化型扁平上皮癌の組織診断が得られ、同年9月20日、舌の部分切除および左側上頸部郭清術を施行した。なお手術によって得られた顎下リンパ節は、病理組織学的に扁平上皮癌転移巣であった。術後、化学療法(Cisplatin+5-FU)施行した後、同年10月20日、軽快退院させた。以後、外来で経過観察中であるが術後2年経過した現在まで、再発傾向は認めていない。

広島大学大学院歯学研究科歯学臨床系(口腔外科学第二)専攻(指導:石川武憲教授)

本論文の要旨の一部は、第46回日本口腔外科学会総会(2001年10月,鹿児島市),第27回頭頸部腫瘍学会(2002年6月,千葉市),第39回日本口腔組織培養学会(2002年11月,福岡市)において発表した。



(A) 舌扁平上皮癌原発巣



(B) 頸部リンパ節転移巣

図1 培養母組織のH-E像(×200)

2. 実験法

1) 細胞培養法

可及的に細切した組織片を、仔牛血清 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) を10%含有するように調整した Dulbecco 変法 Eagle 培地 (Nissui Pharmaceutical Co., Ltd., Tokyo Japan) に、0.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ hydrocortisone, 10 ng/ml cholera toxin, 100 U/ml と penicillin G (Meijiseika K.K. Tokyo, Japan), 0.05 mg/ml streptomycin (Meijiseika K.K.) (以下 P/S) を添加した培養液に浮遊させ、35 mm 径プレートに播種し、通法により⁵⁾ MMC 処理した mouse 3T3細胞で feeder layer を敷き、37°C、5% CO₂ の条件下にて静置培養し、3日毎に培養液を交換した。遊出する線維芽細胞は、Mg⁺⁺、Ca⁺⁺ 不含リン酸緩衝液 (PBS) を 0.08%トリプシンと0.02%EDTA として調整した液で 37°C、約3分間処理を繰り返すことで除去した。位相差顕微鏡で癌細胞の増殖性を確認した後に、培養液を無血清の Epilife (Sigma Chemical Co.) (P/S 添加) に変更した。増殖因子としては epidermal growth factor

(EGF), transferrin, insulin, hydrocortisone, bovine pituitary extract (BPE) を含有する keratinocyte supplement (Sigma Chemical Co.) を、各増殖因子の最終濃度が 0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 0.18 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 0.2%となるよう添加した。その後 Epilife が販売中止となったため、基礎培地を Keratinocyte basal medium (KBM) (Clonetics, MD, USA) (P/S 添加) に変更した。細胞がサブコンフルエント状態となった培養4ヶ月目以降に、PBS を0.1%トリプシンと0.02% EDTA として調整した液で分散した細胞を継代培養し、原発巣由来の細胞を KK-p, 転移巣由来の細胞を KK-m と命名した。尚、以下の実験には keratinocyte supplement を添加した KBM で培養した細胞を用いた。

2) 細胞増殖能の検索

i) 播種時の細胞密度の細胞増殖能への変化の検索

24穴 multiplate を用い、1穴あたり300個、600個、1200個、6000個、15000個の細胞密度で両細胞を播種し、3日毎の培地交換で16日間培養して2日おきに細胞数を測定。得られた細胞数を基に細胞増殖曲線を描記し、細胞倍加時間を算出した。

ii) Growth Factor の細胞増殖能への変化の検索

0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ EGF, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ transferrin, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ insulin, 0.18 $\mu\text{g}/\text{ml}$ hydrocortisone, 0.2% BPE (いずれも Clonetics, MD, USA) を各々単独に KBM に添加した培地を用い、24穴 multiplate で1穴あたり約5000個の細胞密度で播種し、3日毎の培地交換で13日間培養して2日おきに測定し、得られた細胞数を基に細胞増殖曲線を描記し、細胞倍加時間を算出した。

3) Flowcytometry による EGF receptor と insulin receptor の検索

トリプシンで分散させた約 10^7 個の細胞を PBS で洗浄、遠沈により細胞ペレットを作り、これに1次抗体として抗 insulin receptor 抗体または抗 EGF receptor 抗体 (いずれも BD Pharmingen, San Diego, CA, USA) を 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で20分間作用させた。PBS で洗浄後、2次抗体として FITC 結合抗マウス IgG 抗体 (Sigma Chemical Co.) を 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で20分間作用させた。PBS で再び洗浄後、同液 1 ml 中に再浮遊させ、70 μm ナイロンメッシュで細胞塊を除去して FACSCalibur (Beckton Dickinson Immunocytometry systems, USA) で分析した。対照として1次抗体の代わりに PBS を用いて同様の処理を行った細胞を用いた。尚、洗浄および抗体の希釈に使用した PBS は、全て氷冷したものをを用い、抗体は氷冷下で作用させた。

4) 細胞間接着因子の蛋白発現の検索

継代した両細胞株から、溶解用緩衝液 [50 mM Tris-HCl (pH7.4), 125 mM NaCl, 0.1% Nonidet P-40

(Sigma Chemical Co.), 5 mM EDTA, 0.1M NaF, 10 $\mu\text{g/ml}$ leupeptin (Sigma Chemical Co.), 0.1 $\mu\text{g/ml}$ trypsin inhibitor (Sigma Chemical Co.), 50 $\mu\text{g/ml}$ phenylmethylsulfonyl fluoride (WAKO Biochemicals, Osaka, Japan)] を用いて抽出した蛋白の濃度を Bovine serum albumin (BSA) を規準として Bradford protein assay (BIO-RAD Laboratories, Hercules, CA, USA) により測定した。各蛋白 50 μg を 10% SDS-polyacrylamide gel に泳動し、その後、ニトロセルロース膜に転写した。ブロッキングは、5% ミルク含有 PBS buffer (137 mM NaCl, 8.1 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 2.68 mM KCl, 1.47 mM KH_2PO_4) で行い、一次抗体を作用させた後に、二次抗体によって各一時間、室温で処理した。ECL Western blotting detection system (Amersham, UK) を用いて X 線フィルム上で感光し、細胞間接着分子 E-cadherin, α -catenin, β -catenin の発現を検索した。尚、一次抗体には抗ヒト E-cadherin 抗体、抗ヒト α -catenin 抗体、抗ヒト β -catenin 抗体 (BD Transduction Laboratory, USA) を用い、二次抗体としては peroxidase 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体 (MBL, Nagoya, Japan) を、全て 1:1000 の希釈倍率で使用した。発現量を比較すべく、検出バンドの density を Kodac digital science で測定後に、一次抗体に抗 α -tubulin 抗体 (Zymed, San Francisco, CA, USA) を用いたバンドの黒化度を内蔵コントロールとして、発現量を数値化した。

5) 細胞浸潤能の検索

24穴 multiplate の Biocoat Matrigel invasion chamber (Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) の cell culture insert (pore size 8 μm) 上室に、500 μl の KBM に浮遊させた 10^4 個の細胞を播種し、下室には 1 ml の KBM を入れた。24 または 48 時間後に、1 視野あたりの小孔を通過した細胞数を 100 倍の拡大率の鏡検下で算定し、3 穴の平均値を浸潤細胞数として両細胞の浸潤能を比較した。

6) Type I collagen gel 内への細胞浸潤様式の検索

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_3 , 0.2M HEPES) を、冷却しながら 7:2:1 の比率で混合した液を作成した後、最終濃度が 10% となるように FCS を添加した。24穴 multiplate に上記のコラーゲン混合液を 1 穴 500 μl 加え、37°C でゲル化させた。5 $\times 10^4$ 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 1 ml ずつ加え、37°C, 5% CO_2 の条件下で 2 日おきの培地交換で 3 週間培養した。培養後コラーゲンを 10% ホルマリン溶液で固定後、パラフィン包埋し、1 個のブロックにつき 10

枚の垂直断の HE 染色標本でコラーゲン内への浸潤様式を観察した。

7) RT-PCR 法による細胞外基質分解酵素関連遺伝子発現の検索

RNeasy Mini Kit (QUIAGEN, Germany) を用いて、各細胞から total RNA を抽出した。この total RNA を鋳型として First-Strand cDNA Synthesis Kit (Pharmacia-LKB, Sweden) を用いて cDNA を合成した。次いで、合成した cDNA の 5 μg に matrix metalloproteinase (MMP)-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-9, MMP-10, MMP-11, tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1, TIMP-2, urokinase plasminogen activator (uPA), urokinase plasminogen activator receptor (uPAR), plasminogen activator inhibitor (PAI)-1, PAI-2 に対する特異的なプライマー (表 2~4) を用い、Programmable thermal controller (MJ Research Inc., Watertown, MA, USA) で PCR 反応を行った。増幅された PCR 産物を 1.5% 寒天ゲルで電気泳動した後、エチジウムブロマイドで染色し、紫外線照射下で検出した。なお、プライマーの設計および PCR の条件は Takino ら⁶⁾, Onisto ら⁷⁾, および Zhiwen ら⁸⁾ の方法に準じた。

8) 各種細胞外基質への接着能の検索

各濃度の 4 種の細胞外基質 [type IV collagen, fibronectin, laminin, vitronectin (いずれも Sigma Chemical Co.)] で 96 穴 multiplate を 4°C で 12 時間処理後、熱変性させた BSA (0.5 mg/ml) を含有する PBS で 1 時間の表面処理をした。その後 growth factor 非添加の KBM で 10^5 個/ml の割合になるよう調整した細胞浮遊液を 1 穴あたり 100 μl ずつ加え、37°C で 3 時間培養後、PBS で 3 回洗浄して非接着細胞を除去した後に、接着細胞数を hexisaminidase 活性を指標に算出した。細胞接着能は、播種した細胞数に対する接着細胞数の割合で評価した。

9) Integrin family の蛋白発現の検索

細胞-細胞外基質間接着分子である integrin のサブユニットのうち、 $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5$, αV , $\beta 1$, $\beta 3$, $\beta 4$ の各蛋白の発現量を、抗 integrin $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5$, αV , $\beta 1$, $\beta 3$, $\beta 4$ 抗体 (いずれも BD Transduction Laboratory, USA) を用いて前述した方法で、Western blot 法により比較定量した。

10) 細胞外基質産生量の検索

i) ウロン酸定量によるグリコサミノグリカン産生量の検索

細胞が産生する細胞外基質のうち、プロテオグリカンを構成するグリコサミノグリカンを、carbazole 発色反応によるウロン酸定量法⁹⁾ で検索した。60 mm 径の

シャーレに播種した細胞が約 250×10^4 個の高密度、または約 20×10^4 個の低密度になった後、2 mg/ml の pronase 溶液をシャーレ1枚につき7 ml 加え、 56°C 、2時間インキュベートし完全に細胞を溶解した。溶解液 100 μl に氷冷した硫酸 (0.95% ほう酸ナトリウム含有) 2.5 ml を加え15分間沸騰させた後、室温まで冷却し、氷冷したエタノール (0.125% carbazole 含有) 100 μl を加え10分間沸騰後、室温まで冷却。最後に、反応液を 530 nm で吸光度測定し、glucronolactone により作成した標準曲線をもとにウロン酸量を算出した。

ii) Type I collagen, fibronectin の蛋白発現の検索

Type I collagen, fibronectin の産生量は、抗 type I collagen 抗体 (Polysciences Inc., Warrington, PA), 抗 fibronectin 抗体 (BD Transduction Laboratory, USA) を用い、前述した Western blot 法により比較定量した。

実験結果

1) KK-p と KK-m の形態的特徴

位相差顕微鏡像 (図2) では、KK-p と KK-m の両細胞とも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おり、KK-p と比較すると KK-m は大きさや形態ともに不均一性を示した。両細胞とも現在継代40代を越えているが、形態・増殖力ともに安定している。

2) 細胞増殖能

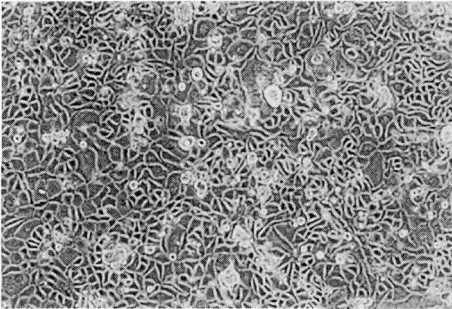
i) 播種時の細胞密度の細胞増殖能への影響

細胞増殖能は、300個/穴の極低密度播種時では KK-m の細胞倍加時間 (20時間) は KK-p (48時間) よりも短かったが、600個/穴の播種では、ほぼ同様となり、それ以上の高密度培養時には、KK-p は KK-m よりも増殖が速かった (図3)。

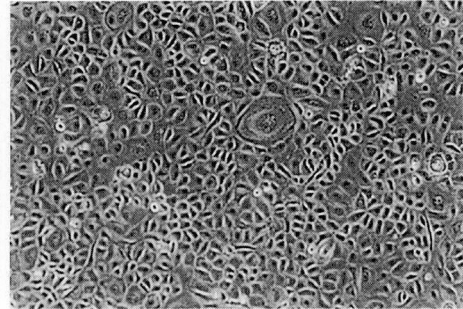
ii) Growth factor の細胞増殖能への影響

細胞増殖能を倍加時間で表すと、growth factor 無添

KK-p

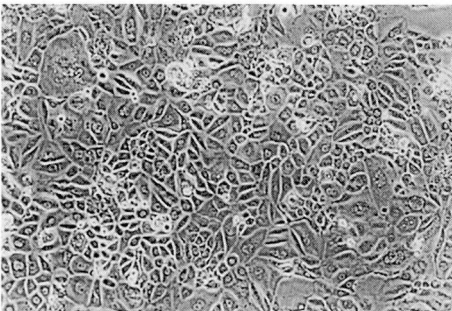


(A) 初代

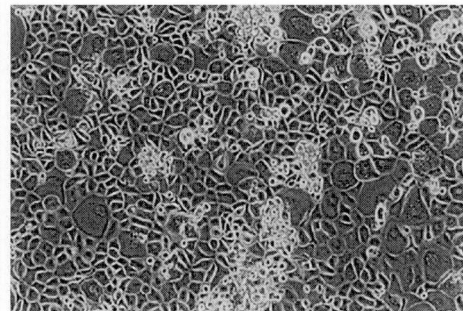


(B) 継代35代目

KK-m



(C) 初代



(D) 継代36代目

図2 培養細胞の位相差顕微鏡像 ($\times 100$)

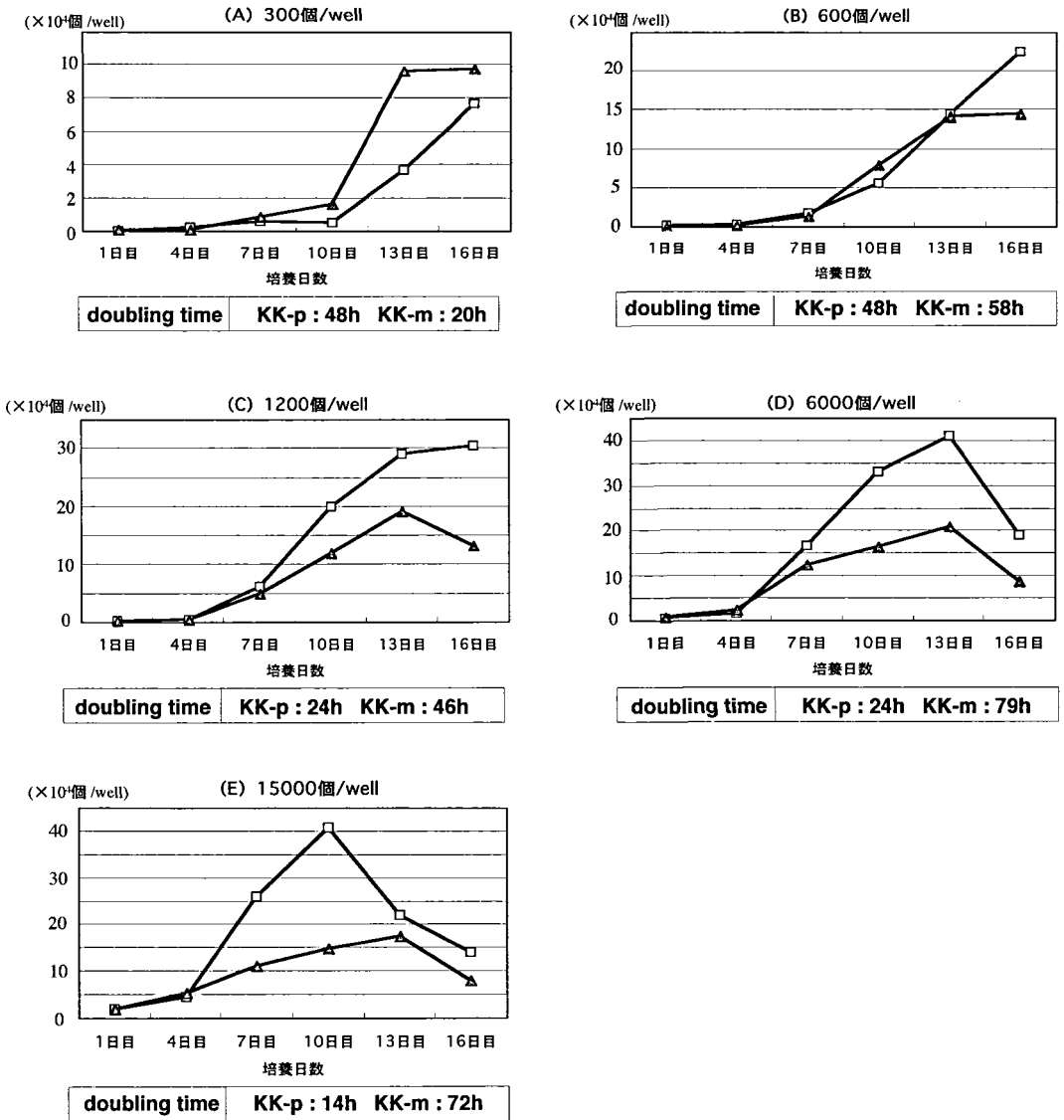


図3 各播種密度における細胞増殖能
 24-well multiplate に KK-p (□), KK-m (△) を、それぞれ300個/well (A), 600個/well (B), 1200個/well (C), 6000個/well (D), 15000個/well (E) の各密度に播種し、16日間培養。播種翌日から3日毎に細胞数を計測した。

加の KBM では KK-p は96時間、KK-m は増殖しなかった。EGF 0.2 μg/ml 添加時には KK-p は96時間、また KK-m は増殖しなかった。Transferrin 5 μg/ml 添加時には両細胞とも増殖しなかった。Insulin 5 μg/ml 添加時の倍加時間は、KK-p は53時間、KK-m は96時間であった。Hydrocortisone 0.18 μg/ml 添加時には両細胞とも増殖しなかった。BPE 0.2%添加時の倍加時間は、KK-p は73時間、KK-m は121時間であった(図4)。

3) EGF receptor と insulin receptor の発現
 一次抗体なしの対照と、一次抗体を作用させた細胞の各々のピークに相当する蛍光強度の差から発現量を評価した。両細胞ともに EGF receptor, insulin receptor の発現がみられ、いずれも KK-p に比較して、KK-m では高発現していた(図5-1, 5-2)。

4) 細胞間接着因子の蛋白発現
 両細胞とも E-cadherin, α-catenin, β-catenin の発現

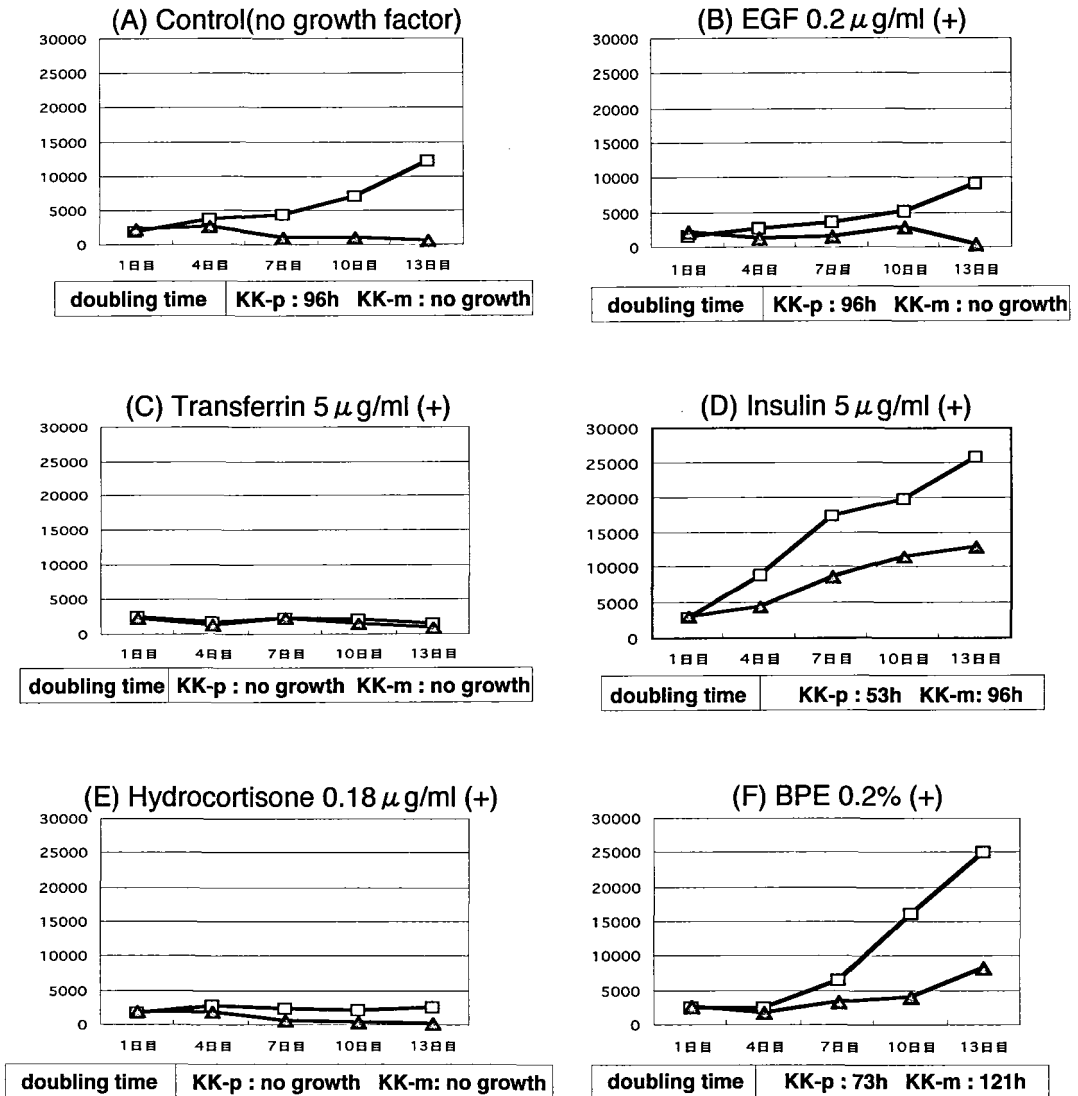


図4 各成長因子単独添加時の細胞増殖能

24-well multiplate に KK-p (□), KK-m (△) を、それぞれ5000個/well の細胞密度で播種し、13日間培養。播種翌日から3日毎に細胞数を計測した。各培養液に単独に添加した成長因子と濃度を以下に示す。(A) 成長因子非添加, (B) 0.2 μ g/ml EGF, (C) 5 μ g/ml transferrin, (D) 5 μ g/ml insulin, (E) 0.18 μ g/ml hydrocortisone, (F) 0.2% BPE.

がみられ、いずれの蛋白も KK-p に比較すると、KK-m で減弱していた (図 11-1)。

5) 細胞浸潤能

Matrigel に浸潤して小孔を通過した細胞 (図 6) の数を100倍の鏡検下で算定した結果、KK-p は24時間後 0.83 ± 1.17 個, 48時間後 5.0 ± 2.55 個で、KK-m は24時間後 8.67 ± 4.97 個, 48時間後 22.8 ± 5.45 個であった (表 1)。いずれの場合も、KK-m の浸潤細胞数が多く、

Student t 検定で有意差を認めた (24時間後: $p = 0.0037$, 48時間後: $p = 0.0002$)。

6) Type I collagen gel 内への細胞浸潤様式

切片1枚につき、KK-p は2~3カ所、KK-m は4~5カ所の浸潤像がみられた。KK-p は細胞間の連続性を保持しつつ、比較的浅い上皮脚型の浸潤様式であったのに比較して、KK-m は細胞間接着が失われ、比較的深い散在型の浸潤様式を示した (図 7)。

(1) EGF receptorの発現

(2) Insulin receptorの発現

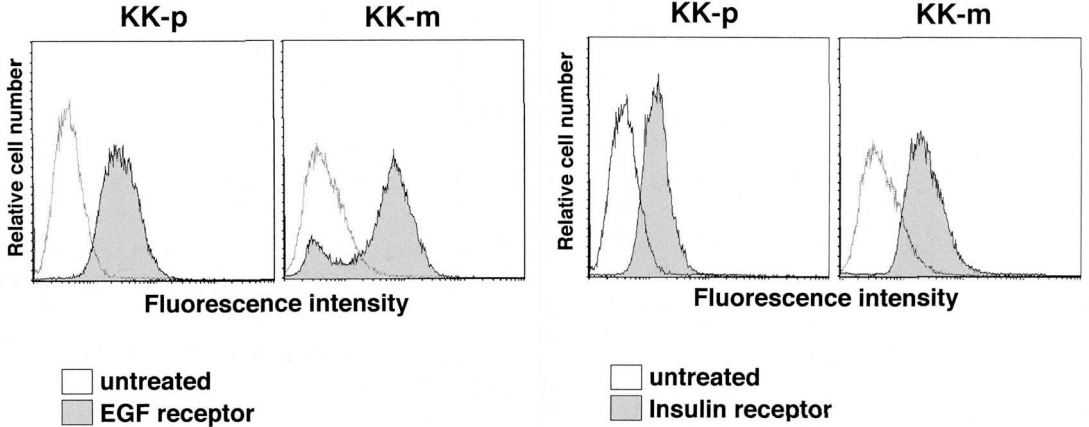
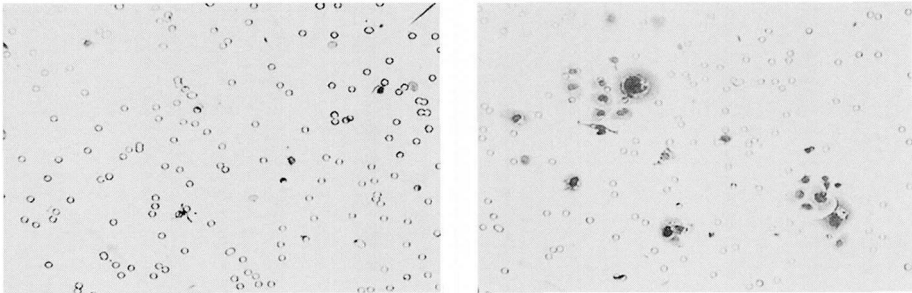


図5 Flowcytometryによる増殖因子受容体発現

10⁷個の細胞に一次抗体として抗 EGF receptor (1) あるいは抗 insulin receptor (2), 二次抗体として FITC 結合抗マウス IgG 抗体をそれぞれ20分間作用させ, Flowcytometry で分析. 一次抗体の代わりに PBS で同様の処理を行った細胞 (各グラフ左方) を対照として用い, 蛍光強度の差を発現量として評価.



(A) KK-p

(B) KK-m

図6 浸潤細胞の H-E 染色像 (48h, ×200)

表1 浸潤細胞数

Time	Cell	KK-p	KK-m	p value
24 hr		0.83 ± 1.17	8.67 ± 4.97	0.0037
48 hr		5.0 ± 2.55	22.8 ± 5.45	0.0002

(Cells/Field)

24穴 multiplate の BD Biocoat™ Matrigel™ Invasion Chamber の cell culture insert (Pore size: 8 μm) 上に, 10⁴/well の細胞密度で細胞播種. 24又は48時間後に100倍の拡大率の鏡検下で1視野あたりの小孔を通過した細胞数を算定. 浸潤細胞数は, 3穴の平均とした. いずれの場合も KK-m の浸潤細胞数が多く, Student t 検定で有意差を認めた.

7) 細胞外基質分解酵素関連遺伝子の発現

今回検索した細胞外基質分解酵素関連遺伝子のうち, 両細胞ともに MMP-1, MMP-3, TIMP-1, TIMP-2 の発現を認めた. また, uPA は KK-m のみに, そのインヒビターである PAI-2 は両細胞で発現を認めた (図8~10).

8) 各種細胞外基質への接着能

表5に示す各数値は接着細胞数の割合の3穴の平均値で, いずれの基質に対しても, KK-p の接着細胞数は, KK-m に比較してやや多い傾向を示した.

9) Integrin family の蛋白発現

今回検索したサブユニットは, α3 は両細胞とも発

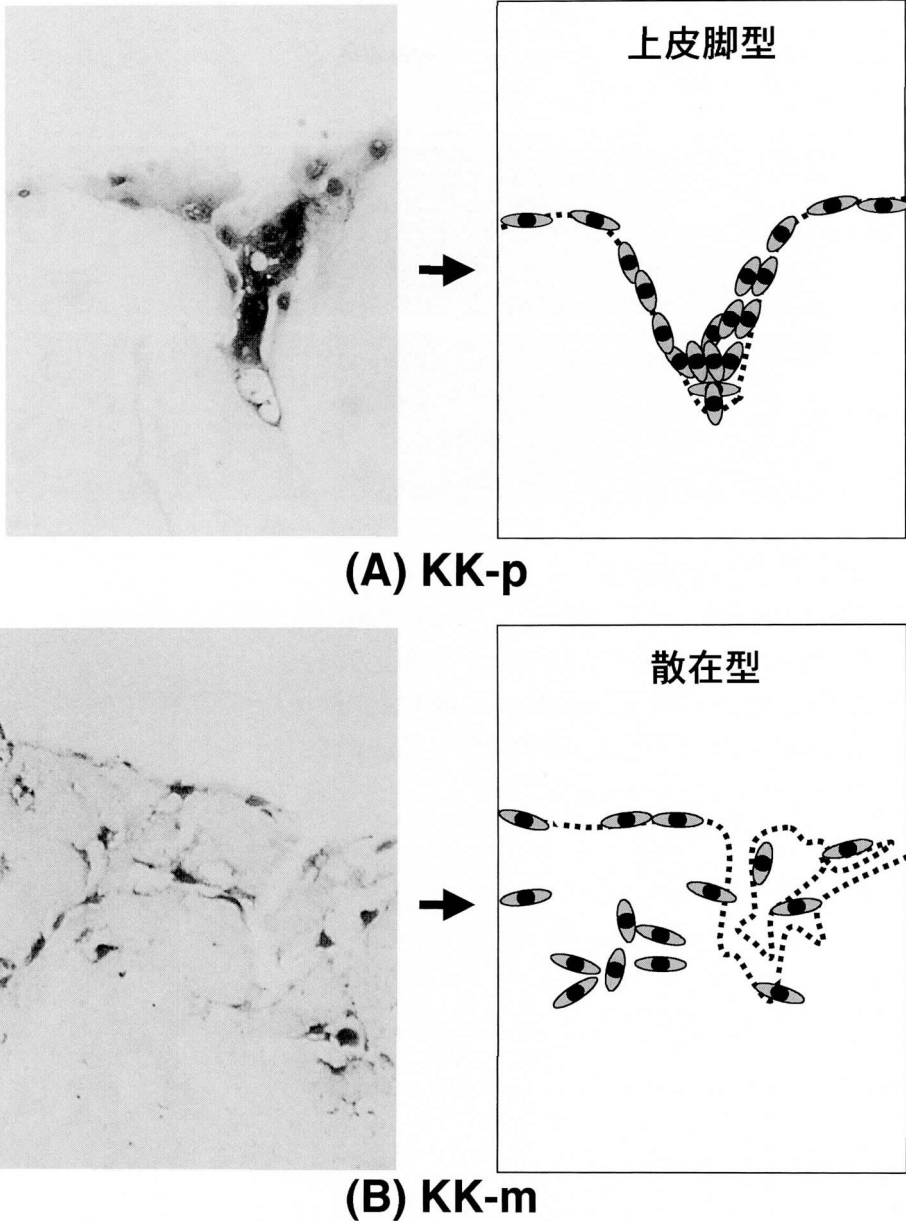


図7 Type I collagen gel 中への細胞浸潤様式

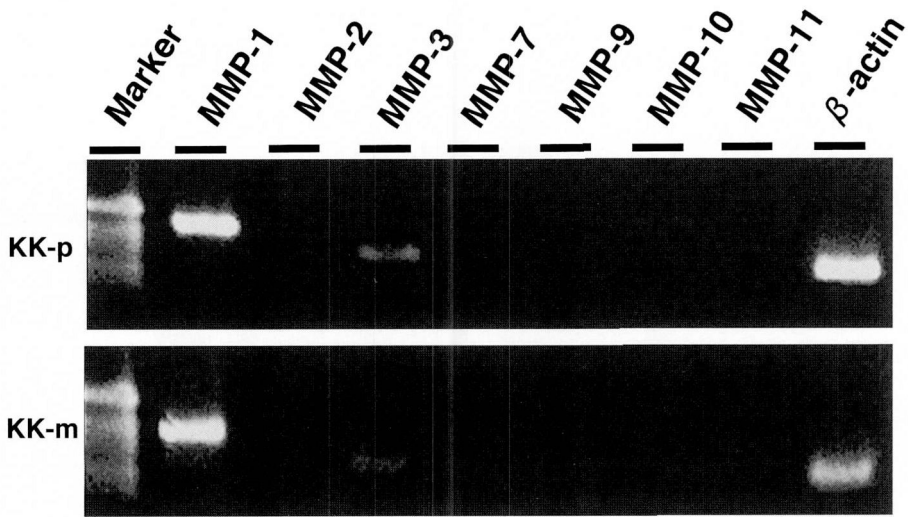
10% FCS 添加 DMEM 1 ml 中に 5×10^4 個の細胞を浮遊させ、24穴 multiplate に1穴500 μ l ずつ作成した Type I collagen gel 上に播種し、3週間培養後、固定・パラフィン包埋した gel を1個につき10枚の垂直断切片を作成し、gel 内への浸潤様式を200倍の鏡検下で観察。図左は浸潤細胞の写真で、図右は各々の模式図。

現しておらず、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 5$ 、 αV 、 $\beta 1$ 、 $\beta 3$ 、 $\beta 4$ は両細胞とも発現を認めた。 $\alpha 2$ 、 $\alpha 5$ は両細胞ともほぼ同程度の発現量であり、 αV 、 $\beta 1$ 、 $\beta 3$ 、 $\beta 4$ は、KK-p に比較して KK-m においてやや減弱していた (図 11-2, 11-3)。

10) 細胞外基質産生量

- i) ウロン酸定量によるグリコサミノグリカン産生量の評価

低密度播種時のグリコサミノグリカン産生量は両細胞ともほぼ同様であったが、高密度播種時は KK-p に



PCR Program

Denature : 94°C, 60sec ; Annealing : 58°C, 90sec ;

Extension : 72°C, 120sec 30cycles

Denature : 94°C, 60sec ; Annealing : 58°C, 120sec ;

Extension : 72°C, 300sec 2cycles

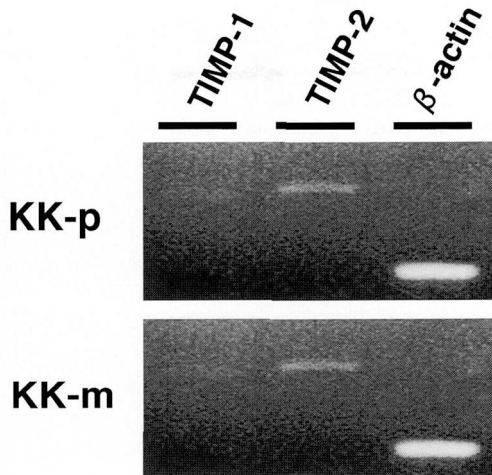
図8 MMPs の mRNA 発現 (RT-PCR)

各細胞から抽出した 8 μ g の total RNA を鋳型として、逆転写酵素により cDNA の合成後に、表2に示すプライマーで PCR 反応。

表2 MMPs のプライマー

Gene	Primer
MMP-1 (438 bp)	S,5'-AGATGTGGAGTGCCTGATGT-3' A,5'-AGCTAGGGTACATCAAAGCC-3'
MMP-2 (400 bp)	S,5'-CACTGAGGGCCGCACGGAT-3' A,5'-CTTGATGTCATCCTGGGACA-3'
MMP-3 (311 bp)	S,5'-AGAGGTGACTCCACTCACAT-3' A,5'-GGTCTGTGAGTGAGTGATAG-3'
MMP-7 (373 bp)	S,5'-GGTCACCTACAGGATCGTATCATAT-3' A,5'-CATCACTGCATTAGGATCAGAGGAA-3'
MMP-9 (288 bp)	S,5'-ACGGGCTCCTGGCACACG-3' A,5'-CGTCCCGGTGTAGAGTC-3'
MMP-10 (470 bp)	S,5'-GTCACTTCAGCTCCTTTTCCT-3' A,5'-ATCTTGCGAAAGGCGGAACT-3'
MMP-11 (449 bp)	S,5'-TGGGTGTACGACGGTGAAAA-3' A,5'-CATGGGTCTCTAGCCTGATA-3'
β -Action (295 bp)	S,5'-TCACCCACACTGTGCCATCTACGA-3' A,5'-CAGCGGAACCGCTCATTGCCAATGG-3'

S: sense A: antisense



PCR Program

Denature : 94°C, 60sec ; Annealing : 58°C, 90sec ;

Extension : 72°C, 120sec 30cycles

Denature : 94°C, 60sec ; Annealing : 58°C, 120sec ;

Extension : 72°C, 300sec 2cycles

図9 TIMPs の mRNA 発現 (RT-PCR)

各細胞から抽出した 8 μ g の total RNA を鋳型として、逆転写酵素により cDNA の合成後に、表 3 に示すプライマーで PCR 反応。

表 3 TIMPs のプライマー

Gene	Primer
TIMP-1 (551 bp)	S,5'-TGCACCTGTGTCCCACCCACCCACAGAGGT-3' A,5'-GGCTATCTGGGACCGCAGGGTCTGCCAGGT-3'
TIMP-2 (590 bp)	S,5'-CCGACGCTGCAGCTGCTCCCCGGTGCACCCG-3' A,5'-AGGCCTGTTATGGGTCTCGATGTCGAG-3'
β -Actin (295 bp)	S,5'-TCACCCACACTGTGCCCATCTACGA-3' A,5'-CAGCGGAACCGCTCATTGCCAATGG-3'

S: sense A: antisense

比較して KK-m が約 4.6 倍の高値を示した (表 6)。

ii) Type I collagen と fibronectin の蛋白発現

Type I collagen および fibronectin の産生量は、Western blot 法を用いてそれぞれの蛋白レベルでの発現量で評価した。いずれにおいても KK-p に比較して KK-m において強発現していた (図 11-4)。

考 察

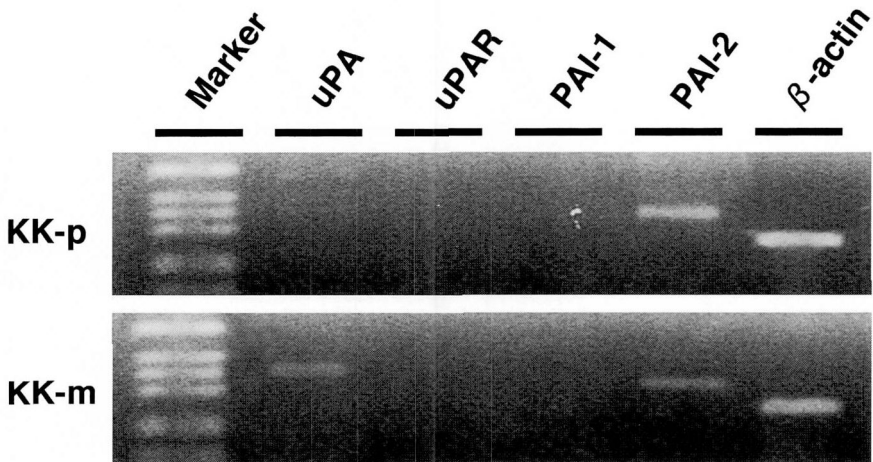
1) KK-p と KK-m の樹立について

両細胞株の由来組織は術前に化学療法・放射線療法ともに施されていないため、細胞の性状を検討する上

でこれらによる修飾を考慮する必要がないと考えられる。KK-p に比較して KK-m が大きさ・形態ともに不均一という形態的な差異は、林ら¹⁾が樹立した MO-T, MO-N1, MO-N2 と同様の傾向であった。なお、由来組織の形質をより強く保持していることを期待して、本実験には継代 10~20 代程度の比較的継代数の少ない細胞を用いた。

2) 細胞増殖能について

極低密度に播種した場合を除いては、KK-m に比較して KK-p の倍加時間は短縮していたことから、原発



PCR Program

**Denature : 94°C, 90sec ; Annealing : 48°C, 120sec ;
 Extension : 72°C, 120sec 30cycles**
**Denature : 94°C, 60sec ; Annealing : 58°C, 120sec ;
 Extension : 72°C, 300sec 2cycles**

図10 uPA 関連因子の mRNA 発現 (RT-PCR)

各細胞から抽出した 8 μ g の total RNA を鋳型として, 逆転写酵素により cDNA の合成後に, 表 4 に示すプライマーで PCR 反応.

表 4 uPA 関連因子のプライマー

Gene	Primer
uPA (474 bp)	S,5'-AGAATTCACCACCATCGAGA-3' A,5'-ATCAGCTCACAACAGTCAT-3'
uPAR (455 bp)	S,5'-TTACCTCGAATGCATTTCCT-3' A,5'-TTGCACAGCCTCTTACCATA-3'
PAI-1 (452 bp)	S,5'-ATGTGATTCAAGATTGATGA-3' A,5'-TCAGTATAGTTGAACTTGTT-3'
PAI-2 (327 bp)	S,5'-TAAGCTGTTTGGTGAGAAAGT-3' A,5'-TACACTATCTGTACAGGTGT-3'
β -Actin (295 bp)	S,5'-TCACCCACACTGTGCCATCTACGA-3' A,5'-CAGCGGAACCGCTCATTGCCAATGG-3'

S: sense A: antisense

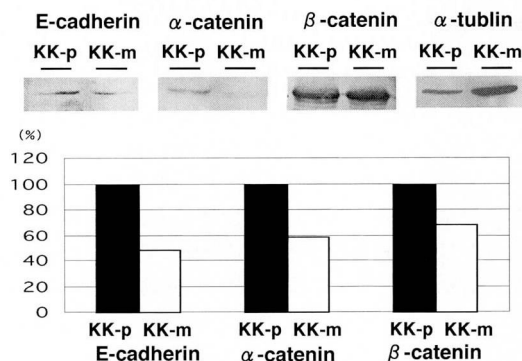
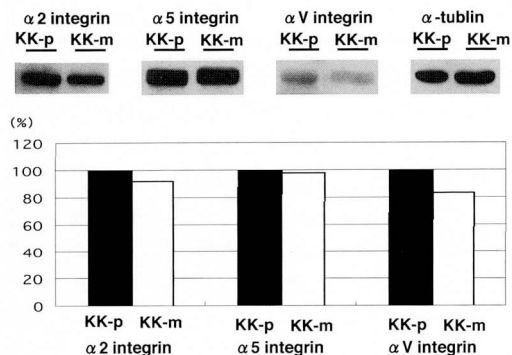
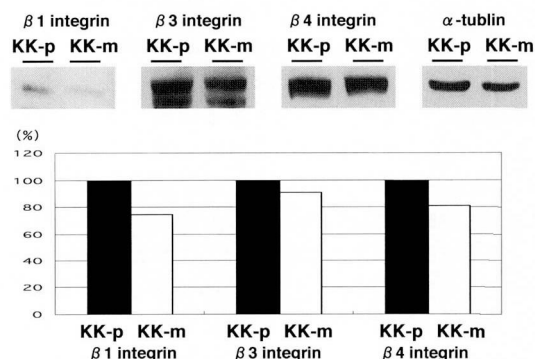
表 5 各種細胞外基質への接着能

ECM*	Cell	KK-p	KK-m
Type IV Collagen (100 μ g/ml)		23.3 \pm 4.2	18.6 \pm 9.6
Fibronectin (100 μ g/ml)		41.2 \pm 9.6	29.5 \pm 5.1
Laminin (100 μ g/ml)		27.5 \pm 5.2	26.0 \pm 3.2
Vitronectin (50 μ g/ml)		10.0 \pm 2.7	4.9 \pm 2.1

ECM*: extracellular matrix (%)

接着細胞数を hexisamidase 活性を指標に算出, 細胞接着能は, 播種した細胞数に対する接着細胞数の割合で評価.

* 各数値は 3well の平均値.

(1) E-cadherin、 α 、 β -cateninの発現(2) Integrin α subunitsの発現(3) Integrin β subunitsの発現

(4) Type I collagen、Fibronectinの発現

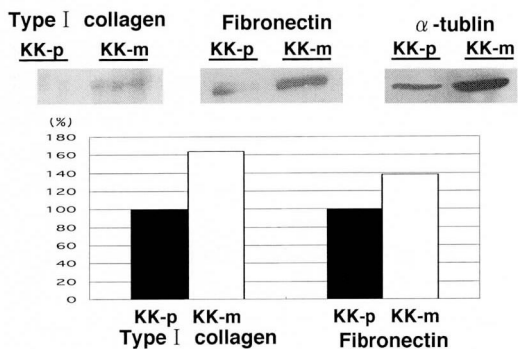


図11 Western blotting による蛋白発現の検索

50 μg の細胞抽出物を10% SDS-PAGE で分離し、セルロース膜に電氣的に転写してブロッッキング後、一次抗体、二次抗体をそれぞれ室温で1時間作用させた。下段のグラフは、検出したバンド(上段)の黒化度を測定し、 α -tubulinの黒化度を内在性コントロールとして各蛋白の発現量を比較定量し、KK-pの発現量を100%としてグラフ化したもの。

表6 グリコサミノグリカン産生量

Cell Density	Cell	
	KK-p	KK-m
high	0.22	1.01
low	8.1	7.41

($\times 10^{-4}$ $\mu\text{g}/\text{Cell}$)

60 mm 直径シャーレで培養した細胞が高密度(KK-p: 約 230×10^4 個, KK-m: 約 250×10^4 個) または、低密度(KK-p: 約 15×10^4 個, KK-m: 約 20×10^4 個) 時の細胞1個あたりのグリコサミノグリカン産生量を、carbazole 発色反応でウロン酸量を測定して定量。

巣形成細胞は腫瘍塊を形成するべく、より速い増殖力を要するものと考えられる。一方、リンパ節転移巣を形成する場合は、ごく少数の細胞がリンパ節にトラッ

プされたような状態下でも増殖が可能である、すなわち細胞数や細胞間の接触到に依存しない増殖能が必要であるものと推測される。

3) 細胞の栄養要求性について

細胞増殖において、EGF 単独添加は弱く抑制的に、transferrin, hydrocortisone 単独添加は強く抑制的に、また insulin, BPE 単独添加は促進的に作用するという傾向は両細胞ともに共通していたが、増殖因子非添加時に比較すると、insulin, BPE 単独添加による倍加時間の短縮は、KK-p よりも KK-m の方が強かった。

これら増殖因子の受容体のうち insulin receptor, EGF receptor の発現を flowcytometry で検索した結果、細胞増殖は insulin に強く依存していたにもかかわらず、insulin receptor は両細胞とも比較的低発現で両細胞間の発現差は少なかった。低濃度の insulin は

insulin receptor を介して、高濃度の insulin は IGF (insulin-like growth factor)-I receptor を介して受容されるという報告¹⁰⁾ から考察すると、今回添加した insulin が高濃度 (5 $\mu\text{g/ml}$) であったことから、主に IGF-I receptor によって受容された可能性が高い。

また、両細胞の細胞増殖には EGF は必須でないにもかかわらず、EGF receptor は両細胞ともに比較的高発現しており、KK-p よりも KK-m に、より強い発現がみられた。これについては、癌細胞では多くの場合 EGF receptor の機能異常をきたしており¹¹⁻¹⁴⁾、その場合、EGF receptor が過剰発現しているにもかかわらず EGF が細胞の増殖を抑制するとの報告¹⁵⁻¹⁹⁾ から、本細胞においても、EGF receptor は成長因子としては正常に機能していないと考えられる。また、乳癌において、原発巣よりも転移巣に EGF receptor をもつ割合が高いとの Sainsbury らの報告²⁰⁾ や、EGF と EGF receptor を介した作用が細胞間接着や細胞外基質の分解に影響を与えているとの報告²¹⁻²⁶⁾ から、EGF receptor が、KK-m の悪性形質 (細胞間接着力の低下、高浸潤能の獲得など) の発現に関与している可能性が示唆される。

4) 細胞間接着因子 (E-cadherin, α -catenin, β -catenin) の蛋白発現について

癌細胞を含めて、上皮細胞における細胞間接着には、接着帯に存在する E-cadherin が大きな役割を演じていることが明らかにされている^{27,28)}。E-cadherin はその細胞内裏打ち蛋白である catenin を介して actin などの細胞骨格に結合し強固な細胞間接着能を持つ²⁹⁻³¹⁾。EGF receptor と E-cadherin はともに細胞膜の接着帯 (adherens junction) に存在する³²⁾ ことが知られており、EGF receptor を介するシグナル伝達が、 β -catenin のチロシン領域をリン酸化することで E-cadherin の発現・機能を減弱させることが報告されている³³⁾。KK-p に比較して KK-m で cadherin family の蛋白発現が減弱していたことと、前述の flowcytometry の結果と併せ考えると、KK-m で高発現していた EGF receptor が、cadherin family の発現および機能を阻害した可能性が高く、その結果、細胞間接着の弱い細胞が原発巣から遊離して転移巣形成に働いたものと考えられる。

5) 細胞浸潤能について

Matrigel を用いた in vitro invasion assay の結果、KK-p に比較して KK-m は高い浸潤能を有した。また、type I collagen gel 中への侵入様式は、細胞間の連続性を維持して上皮脚型を呈した KK-p に比較して KK-m は散在型の浸潤様式であった。これらの結果は、KK-m の運動能の方が高いことに起因するとも考えられる。

しかし、細胞が浸潤する際に直接作用する細胞外基質分解酵素関連因子の mRNA 発現は両細胞間では差を認めず、KK-m でのみ発現のあった uPA も、その活性発現に必要な³⁴⁾ uPAR の発現を認めなかった。また今回データに示していないが、浸潤過程で特に重要とされる MMP-2、 $9^{35-37)}$ の活性を gelatin zymography を用いて検索した結果、両酵素の活性を認めなかった。以上の結果から、これらの細胞株では、in vitro invasion には細胞外基質分解酵素は関係せず、むしろ細胞間接着の減弱によって細胞単位での運動が容易になったことで、小孔通過能が上がり、type I collagen gel 中へは散在しつつ浸潤した^{38,39)} ものと推察される。

6) 細胞外基質への接着について

生体組織は個々の組織に特有の細胞と、それらの細胞を規則的に固定、接着させる細胞外基質から構築されている。細胞外基質の成分として種々のタイプの collagen などの線維性構造蛋白質、fibronectin, laminin, vitronectin などの細胞接着性糖蛋白質、および多様な多糖類、プロテオグリカンなどが存在する。細胞と細胞間基質は、 α 、 β の 2 種類のサブユニットが非共有結合で会合するヘテロ二量体である integrin を介して接着している。現在、integrin は少なくとも 17 種の α 鎖、8 種の β 鎖が同定されているが、その α 、 β 鎖の組み合わせにより、基質特異性の異なる多様な分子群が形成されている^{40,41)}。各種の基質への接着能の違いと integrin の発現差の検索の結果、検討した 4 種類の細胞外基質の全てに対して KK-p の方が高い接着能を示し、integrin ($\alpha 2, 5, v, \beta 1, 3, 4$) は KK-m でやや減弱していた。この結果から、少なくとも本細胞系では、転移巣形成における基質への接着能は重要でないと考えられる。

転移の過程において細胞外基質は、細胞の移動を阻害するものとして分解される必要のある一面、標的臓器での増殖の足場として必要であるという二つの観点から考えられなければならない。遠隔転移をきたしやすい腺様嚢胞癌の細胞株において、癌細胞が分泌する蛋白分解酵素は宿主側の細胞外基質を分解するが、自身が産生する細胞外基質は分解しないとの報告⁴²⁾などを考慮すると、癌細胞自身が産生する細胞外基質は足場として利用されるものと考えられる。この観点から、KK-p と KK-m 両細胞自身が産生する細胞外基質 (プロテオグリカン、type I collagen, fibronectin) の産生量を定量した。その結果、いずれの産生量も KK-p に比較して KK-m が高かったことから、転移巣形成細胞は、細胞外基質を産生して標的臓器での増殖の足場を作る能力が重要であると考えられた。

結 論

舌扁平上皮癌患者の原発巣および転移リンパ節からそれぞれ KK-m と KK-p の両細胞株を樹立した。この両細胞の生物学的特性を比較検討し、リンパ節転移細胞の性状に関して以下の結果を得た。

KK-m は KK-p に比較して、

1. 細胞間接着因子の発現が弱い、
2. 細胞浸潤能が高い、
3. 細胞外基質の産生能が高い、

などの性状を有する細胞であることが判明し、KK-m の有するこれらの生物学的性状が転移巣形成に重要な役割を示すと考えられた。さらに、これらの細胞株は、舌扁平上皮癌の浸潤や転移の機序解明に有用な細胞モデルとなる可能性のあることが強く示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、研究の遂行に終始懇切なるご指導とご校閲を賜った広島大学大学院医歯薬学総合研究科顎口腔頸部医学講座(旧 口腔外科学第二)石川武憲教授に深甚なる謝意を表すとともに、貴重なご助言、ご校閲を賜った本研究科・探索医学講座(旧 口腔生化学)加藤幸夫教授と本研究科・先進医療開発科学講座(旧 口腔病理学)高田 隆教授に深謝いたします。

さらに本研究の遂行および論文の作成にあたり、ご指導、ご助言を賜りました本学顎口腔頸部医学講座(旧 口腔外科学第二)杉山 勝助教授、同講座の諸先生方に感謝いたします。

最後に、私を支えてくれた家族に心から感謝します。

文 献

- 1) 林 英司, 布袋屋智朗, 中西弘彰, 桃田幸弘, 中野孝三郎, 藤澤健司, 長山 勝: 同一患者から樹立した3種の口腔癌細胞とその性状. *日口外誌* 43, 789-796, 1997.
- 2) Easty DM, Easty GC, Carter RL, Monaghan P, Pittam MR, James T.: Five human tumour cell lines derived from a primary squamous carcinoma of the tongue, two subsequent local recurrences and two nodal metastases. *Br J Cancer* 44, 363-70, 1981.
- 3) 與田順一, 山中 昇, 齊藤匡人, 寒川高男, 田村真司, 川口隆明: 上顎癌原発巣およびリンパ節転移巣由来細胞株の生物学的特性. *日耳鼻* 97, 419-429, 1994.
- 4) Elisa C, Rodrigo F, Lance A.: General mechanisms of metastasis. *CANCER Supplement* 80, 1529-1536, 1997.
- 5) Blacker KL, Williams ML, Goldyne M.: Mitomy-

cin C-treated 3T3 fibroblasts used as feeder layers for human keratinocyte culture retain the capacity to generate eicosanoids. *J Invest Dermatol* 89, 536-9, 1987.

- 6) 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.
- 7) Onisto M, Garbisa S, Caenazzo C, Freda MP, Di Francesco C, Nitti D, Liotta LA, Stetler-Stevenson WG.: Reverse transcription-polymerase chain reaction phenotyping of metalloproteinases and inhibitors involved in tumor matrix invasion. *Diagn Mol Pathol* 2, 74-80, 1993.
- 8) Zhiwen L, Anna I, Julius K.: Expression and activity of matrix metalloproteinases in human malignant mesothelioma cell lines. *Int J Cancer* 91, 638-643, 2001.
- 9) Dische Z, Rothschild C.: Two modifications of the carbazole reaction of hexuronic acids for the differentiation of polyuronides. *Anal Biochem* 21, 125-30, 1967.
- 10) Flier JS, Usher P, Moses AC.: Monoclonal antibody to the type I Insulin-like growth factor (IGF-I) receptor blocks IGF-I receptor-mediated DNA synthesis: clarification of the mitogenic mechanisms of IGF-I and insulin in human skin fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 83, 664-8, 1986.
- 11) 尾崎輝彦, 岡本哲治, 藪本正文, 明見能成, 高田和彰: 口腔由来正常上皮細胞および口腔癌細胞の無血清培養下での増殖に及ぼす EGF, FGF の影響ならびにこれら細胞における受容体解析. *日口外誌* 37, 1454-1464, 1991.
- 12) Ponc M, Weerheim A, Kempenaar J, Boonstra J.: Proliferation and differentiation of human squamous carcinoma cell lines and normal keratinocytes: effects of epidermal growth factor, retinoids, and hydrocortisone. *In Vitro Cell Dev Biol* 24, 764-70, 1988.
- 13) Barnes DW.: Epidermal growth factor inhibits growth of A431 human epidermoid carcinoma in serum-free cell culture. *J Cell Biol* 93, 1-4, 1982.
- 14) Gill GN, Lazar CS.: Increased phosphotyrosine content and inhibition of proliferation in EGF-treated A431 cells. *Nature* 293, 305-7, 1981.
- 15) Kamata N, Chida K, Rikimaru K, Horikoshi M, Enomoto S, Kuroki T.: Growth-inhibitory effects of epidermal growth factor and overexpression of its receptors on human squamous cell carcinomas in culture. *Cancer Res* 46, 1648-53, 1986.
- 16) 力丸浩一, 鎌田伸之: EGF による口腔扁平上皮癌の増殖抑制に関する研究. *日口外誌* 31, 699-709, 1985.

- 17) 鎌田伸之: 扁平上皮癌細胞における EGF 受容体に関する研究. 日口外誌 33, 683-700, 1987.
- 18) Partridge M, Gullick WJ, Langdon JD, Sherriff M.: Expression of epidermal growth factor receptor on oral squamous cell carcinoma. *Br J Oral Maxillofac Surg* 26, 381-9, 1988.
- 19) Yamamoto T, Kamata N, Kawano H, Shimizu S, Kuroki T, Toyoshima K, Rikimaru K, Nomura N, Ishizaki R, Pastan I.: High incidence of amplification of the epidermal growth factor receptor gene in human squamous cell carcinoma cell line. *Cancer Res* 46, 414-416, 1986.
- 20) Sainsbury JR, Farndon JR, Sherbet GV, Harris AL.: Epidermal-growth-factor receptors and oestrogen receptors in human breast cancer. *Lancet* 1, 364-366, 1985.
- 21) 柴田敏之, 河野 峰, 永易裕樹, 加藤元康, 小西亮, 奥村一彦, 有末 眞, 村瀬博文: EGF がヒト口腔扁平上皮癌細胞の浸潤転移能に及ぼす影響. 日口外誌 40, 6-13, 1994.
- 22) Singletary SE, Baker FL, Spitzer G, Tucker SL, Tomasovic B, Brock WA, Ajani JA, Kelly AM.: Biological effect of epidermal growth factor on the in vitro growth of human tumors. *Cancer Res* 47, 403-6, 1987.
- 23) Laiho M, Keski-Oja J.: Growth factors in the regulation of pericellular proteolysis: a review. *Cancer Res* 49, 2533-53, 1989.
- 24) Niedbala MJ, Sartorelli AC.: Regulation by epidermal growth factor of human squamous cell carcinoma plasminogen activator-mediated proteolysis of extracellular matrix. *Cancer Res* 49, 3302-9, 1989.
- 25) Lund-Johansen M, Bjerkvig R, Humphrey PA, Bigner SH, Bigner DD, Laerum OD.: Effect of epidermal growth factor on glioma cell growth, migration, and invasion in vitro. *Cancer Res* 50, 6039-44, 1990.
- 26) Yoshida K, Tsujino T, Yasui W, Kameda T, Sano T, Nakayama H, Toge T, Tahara E.: Induction of growth factor-receptor and metalloproteinase genes by epidermal growth factor and/or transforming growth factor-alpha in human gastric carcinoma cell line MKN-28. *Jpn J Cancer Res* 81, 793-8, 1990.
- 27) Takeichi M.: Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science* (Washington DC) 251, 1451-1455, 1991.
- 28) Shiozaki H, Tahara H, Oka H, Miyata M, Kobayashi K, Tamura S, Iihara K, Doki Y, Hirano S, Takeichi M.: Expression of immunoreactive E-cadherin adhesion molecules in human cancers. *Am J Pathol* 139, 17-23, 1991.
- 29) Nagafuchi A, Takeichi M.: Cell binding function of E-cadherin is regulated by the cytoplasmic domain. *EMBO J* 7, 3679-84, 1988.
- 30) Ozawa M, Ringwald M, Kemler R.: Uvomorulin-catenin complex formation is regulated by a specific domain in the cytoplasmic region of the cell adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci USA* 87, 4246-50, 1990.
- 31) Nagafuchi A, Takeichi M, Tsukita S.: The 102 kd cadherin-associated protein: similarity to vinculin and posttranscriptional regulation of expression. *Cell* 65, 849-57, 1991.
- 32) Fukuyama R, Shimizu N.: Detection of epidermal growth factor receptors and E-cadherins in the basolateral membrane of A431 cells by laser scanning fluorescence microscopy. *Jpn J Cancer Res* 82, 8-11, 1991.
- 33) Shiozaki H, Kadowaki T, Doki Y, Inoue M, Tamura S, Oka H, Iwazawa T, Matsui S, Shimaya K, Takeichi M.: Effect of epidermal growth factor on cadherin-mediated adhesion in a human oesophageal cancer cell line. *Br J Cancer* 71, 250-8, 1995.
- 34) Kwaan HC.: The plasminogen-plasmin system in malignancy. *Cancer Metastasis Rev* 11, 291-311, 1992.
- 35) Liotta LA.: Tumor invasion and metastases-role of the extracellular matrix: Rhoads Memorial Award lecture. *Cancer Res* 46, 1-7, 1986.
- 36) Liotta LA, Tryggvason K.: Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen. *Nature* 284, 67-68, 1980.
- 37) Liotta LA, Rao CN, Barsky SH.: Tumor invasion and the extracellular matrix. *Lab Invest* 49, 636-49, 1983.
- 38) Kadowaki T, Shiozaki H, Inoue M, Tamura S, Oka H, Doki Y, Iihara K, Matsui S, Iwazawa T, Nagafuchi A.: E-cadherin and alpha-catenin expression in human esophageal cancer. *Cancer Res* 54, 291-6, 1994.
- 39) Matsui S, Shiozaki H, Inoue M, Tamura S, Doki Y, Kadowaki T, Iwazawa T, Shimaya K, Nagafuchi A, Tsukita S.: Immunohistochemical evaluation of alpha-catenin expression in human gastric cancer. *Virchows Arch* 424, 375-81, 1994.
- 40) Hynes RO.: Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell* 48, 549-54, 1987.
- 41) Hynes RO.: Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 69, 11-25, 1992.
- 42) Shirasuna K, Saka M, Hayashido Y, Yoshioka H, Sugiura T, Matsuya T.: Extracellular matrix production and degradation by adenoid cystic carcinoma cells: participation of plasminogen activator and its inhibitor in matrix degradation. *Cancer Res* 53, 147-52, 1993.