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

尾崎 輝彦・岡本 哲治・藪本 正文
明見 能成・高田 和彰

**Effects of epidermal growth factor and fibroblast growth
factor on the growth of normal epithelial cells and
oral cancer cells in serum-free culture and the
expression of growth factor receptor on the cells**

Teruhiko OSAKI・Tetsuji OKAMOTO・Masafumi YABUMOTO
Yoshinari MYOKEN・Kazuaki TAKADA

Abstract: We have established serum-free culture system for normal epithelial cells and cancer cells derived from oral mucosa and the salivary gland. It was found that oral cancer cells were able to grow in a serum-free medium supplemented with insulin, transferrin, sodium selenite, 2-aminoethanol and 2-mercaptoethanol designated RD5F as same as that in the medium supplemented with 10% FBS. On the other hand, normal epithelial cells were not able to grow in a serum-free medium supplemented with factors as above. Thus hormone and growth factor requirement for proliferation of normal epithelial cells were studied in a serum-free medium. It was revealed that normal epithelial cells absolutely required EGF or FGF for the growth in a serum-free culture. Furthermore, we have studied effects of EGF and FGF on the growth of oral cancer cells in a serum-free culture and expression of these factor receptors on the cell by radioligand receptor assay.

EGF stimulated growth of adenocarcinoma cells derived from the salivary gland (SAC) but inhibited that of squamous cell carcinoma (SCC) cells at the concentration which stimulate growth of other cells. FGF stimulated growth of SAC but did not have any effect on SCC cells. Furthermore, we could not find any significant differences in the expression of EGF and FGF receptors of these cells. Taken together, it was revealed that oral cancer cells exhibited lowered or lost requirement of EGF and FGF for growth compared to normal epithelial cells. These results strongly suggested the possibility that EGF and/or EGF receptor expressed in SCC cells were functionally different from that of normal epithelial cells.

Key words: epidermal growth factor (上皮成長因子), fibroblast growth factor (線維芽細胞成長因子), oral cancer cells (口腔癌細胞)

緒 言

近年, growth factor やその受容体と癌遺伝子産物との類似性^{1,2)}が報告されている. また, 正常細胞の悪性転換に伴い growth factor 要求性の変化³⁾やその受容体の異常⁴⁾に生じていることがあきらかにされている.

Todaro, Sporn らは, 腫瘍の自律増殖性は腫瘍細胞が自ら自己増殖促進因子を産生する, あるいは増殖抑制因子に対して応答異常が生じることにより発現されるという autocrine 説^{5,6)}を提唱した. しかし, 悪性腫瘍の大部分は癌腫であるにもかかわらず, この仮説はおもに線維芽細胞や肉腫細胞を用いた研究結果に基づいている. そこで癌細胞の増殖動態並びに増殖のための growth factor 要求性を理解するためにはその母細胞である正常上皮細胞を用いて比較検討する必要があると考える. しかし, 従来の培養方法では正常上皮細胞の培養は非常に困難であった. これは血清中に存在する transforming growth factor β (TGF β) が正常上皮細胞の分化を促進⁷⁾したり, platelet-derived growth factor (PDGF) が線維芽細胞の増殖を促進⁸⁾することなどによると考えられる. また, 血清中にはホルモン, growth factor や他の未知蛋白が多量に存在すること, さらに血清のロットによっても含まれる物質が異なる. したがって, 培地に血清を添加した培養方法では細胞増殖に及ぼすホルモンや growth factor の影響を検索することは困難である.

一方, Sato ら⁹⁾は血清の主たる働きは増殖にとって必要なホルモンや growth factor を細胞に供給することであるという仮説をもとに, 基礎培地に既知の growth factor やホルモンを加えた無血清培地を用いて, 動物細胞の増殖のみならず機能をも維持することに成功し無血清培養法を確立した.

そこで本研究では, 口腔癌細胞の細胞増殖動態を細胞内分泌学的¹⁰⁾にあきらかにするためにヒト口腔粘膜由来正常上皮細胞とヒト唾液腺由来正常上皮細胞, ヒト口腔由来扁平上皮癌細胞とヒト唾液腺由来腺癌細胞の無血清培養系を確立した. さらに, この系を用いて, epidermal growth factor (EGF) および fibroblast growth factor (FGF) の細胞増殖に及ぼす影響とその受容体解析を行い以下の結果を得た.

材料および方法

1. 細胞増殖因子の細胞増殖に及ぼす影響とその受容体解析

1) 無血清培地

口腔粘膜由来正常上皮細胞および唾液腺由来正常上皮細胞の培養には modified MCDB153 (m'-MCDB 153) 培地¹¹⁾を基礎培地として用いた. 口腔由来扁平上皮癌細胞

株および唾液腺由来腺癌細胞株は PRMI 1,640 medium¹²⁾ と Dulbecco's Modified Eagle medium¹³⁾ (DME, 以上極東製薬) を等量混和した培地 (以下 RD と略す)^{14,15)} を基礎培地として用いた. 培地それぞれに sodium pyruvate (片山化学) 110 $\mu\text{g/ml}$, kanamycin sulfate 90 $\mu\text{g/ml}$, aminobenzylpenicillin (以上明治製薬) 90 $\mu\text{g/ml}$, sodium bicarbonate (和光純薬) を RD に 2 mg/ml, m'-MCDB 153 に 1.2 mg/ml, HEPES (同仁化学) を RD に 15 mM, m'-MCDB 153 に 30 mM 加え, 脱イオン化および逆浸透に純化した水 (Mill-Q reagent water system, Millipore, USA) を用いて pH 7.4 に調整し, 0.2 μm フィルター (Acrocap, Gelman Science Inc., USA) で濾過滅菌したものを使用した.

口腔粘膜由来正常上皮細胞の無血清培養条件は上述の培地に, crystalline bovine insulin 10 $\mu\text{g/ml}$, human transferrin 2 $\mu\text{g/ml}$, 2-aminoethanol 10 μM (以上 SIGMA Chemical Co., USA), 2-mercaptoethanol 10 μM および sodium selenite 10 nM (以上片山化学) を加えた培地 (m'-MCDB 5F). 唾液腺由来正常上皮細胞には m'-MCDB 5F (transferrin は 5 $\mu\text{g/ml}$ とした) にさらにオレイン酸 [oleic acid (Sigma Chemical Co., USA) と fatty acid-free bovine serum albumin (Pentax, Miles laboratories, Inc. USA) を 2:1 のモル比となるように調整¹⁶⁾した] 4 $\mu\text{g/ml}$ を加えた m'-MCDB 6F 培地に牛脳抽出液を用いて初代培養を行った.

扁平上皮癌細胞と唾液腺由来腺癌細胞は RD 6F (transferrin は 5 $\mu\text{g/ml}$ とした) を用いた.

これら細胞は以上の培地を用いて, TE HER 型 CO₂ インキュベーター (平沢製作所) 中, 5% CO₂, 37°C の条件で静地培養を行った.

2) 正常細胞の分離培養方法

口腔粘膜由来正常上皮細胞は口唇口蓋裂の手術時, あるいは埋伏歯抜去時に切除した口腔粘膜より分離した. 皮下結合組織および皮下脂肪組織を可及的に除去した粘膜を 0.02% EDTA (片山化学) を含む Dulbecco's Ca, Mg free phosphate buffered saline (CMF-PBS, NaCl 8.0 g, NaHPO₄ 1.15 g, KCl 0.2 g, KH₂PO₄ 0.2 g/l, pH 7.2) 中で 30 分間処理した後, 0.05% トリプシン (Difco, USA) を含む CMF-PBS 中で 4°C 下 1 昼夜インキュベートした. 翌日 0.1% トリプシンインヒビター (type-II S, Sigma Chemical Co., USA) を含む m'-MCDB 153 培地中で, 実体顕微鏡 (オリンパス, K.K. Xr 型) 下に上皮と真皮を分離し自家製ブラシにて基底細胞を分離した¹⁷⁾. 分離細胞は I 型コラーゲン (Cell-matrix type I-A, 新田ゼラチン) コートした 60 mm 径プラスチックシャーレを用いて m'-MCDB 5F に EGF 1 nM あるいは FGF 500 pM を添加した条件で初代培養を行った.

唾液腺由来正常上皮細胞は, 腫瘍患者の頸部郭清時に

摘出した病理組織学的に正常な顎下腺より分離した。CMF-PBS および 70% エタノールで組織を消毒後細切し、コラーゲンコートした 60 mm 径プラスチックシャーレに m^1 -MCDB 6F に EGF 1 nM あるいは FGF 500 pM を添加した条件で組織片培養を開始した。

扁平上皮癌細胞株は当科で樹立した UEDA¹⁸⁾、NAKATA¹⁹⁾、Kanetsuki および外陰部由来扁平上皮癌 A431²⁰⁾ (DeLarco 博士より供与) を用いた。唾液腺由来腺癌細胞株には HSG²¹⁾ および HSY²²⁾ (徳島大学歯学部口腔外科学第 2 講座佐藤光信教授より供与) と当科で樹立した腺様嚢胞癌由来細胞株 ACC²³⁾ を用いた。

3) 無血清培養下での細胞増殖能の検索

扁平上皮癌細胞ならびに唾液腺由来腺癌細胞の増殖能を RD6F と 10% 牛胎児血清 (MA Bio-product, USA) 添加時と比較した。対数増殖期の細胞を 0.05% トリプシン、0.04% EDTA を含む CMF-PBS (トリプシン/EDTA) で分散後、コラーゲンコートした 24 ウェルプレート (Falcon, USA) に 1 ウェルあたり 2×10^4 /ml の細胞密度で植え込んだ。翌日から 24 時間ごとにコールターカウンター (Coulter Electronics, England) にてその細胞数を計測した。

4) 正常上皮細胞の増殖に及ぼす EGF ならびに FGF の影響

継代 9 代目の口腔粘膜由来正常上皮細胞および継代 3 代目の唾液腺由来正常上皮細胞を、コラーゲンコートした 24 ウェルプレートに 1×10^4 /ml の細胞密度で植え込み、各濃度の EGF (mouse EGF, Receptor Grade, Collaborative Research, Inc., USA) あるいは acidic FGF を加え、10 日後に細胞数を計測した。なお、培地は 2 日に 1 回交換し、その都度これら因子も加えた。また acidic FGF は牛脳抽出液よりヘパリンセファロースアフィニティークロマトグラフィー (Pharmacia Fine Chemical, Sweden) さらに逆相系高速液体クロマトグラフィーを用いて精製し²⁴⁾ 実験に供した。

さらに口腔粘膜由来正常上皮細胞のホルモンならびに growth factor 要求性を colony assay 法を用いて検索した。 m^1 -MCDB+insulin (I), m^1 -MCDB 153+transferrin (T), m^1 -MCDB 153+T, m^1 -MCDB 153+5F, さらに、それぞれに EGF 10 ng/ml あるいは acidic FGF 500 pg/ml を添加した条件で、コラーゲンコートした 60 mm 径プラスチックシャーレに 1,000 個の細胞を植え込み、14 日間培養後ホルマリン (和光純薬) 固定しギムザ (和光純薬) 染色を行った。

5) 口腔癌細胞の増殖に及ぼす EGF ならびに FGF の影響

扁平上皮癌細胞と唾液腺由来腺癌細胞は RD 6F の条件下、 2×10^4 /ml の細胞密度でコラーゲンコートした 24 ウェルプレートに植え込み、各濃度の EGF, acidic FGF, basic FGF (R&D System Inc., bovine brain)

を加えた。扁平上皮癌細胞は 5 日間、唾液腺由来腺癌細胞は 4 日間培養後の細胞数を計測した。

6) EGF ならびに FGF の受容体解析

EGF および FGF の [¹²⁵I] 標識は、Na [¹²⁵I] (Amersham International, USA) を用いてクロラミン T 法²⁵⁾により行った。比活性は EGF 7.25×10^4 cpm/ng, acidic FGF 1.28×10^5 cpm/ng であった。

EGF 受容体の検索は 0.2% パラホルムアルデヒド (Taab laboratories, England) で 5 分間固定した各細胞を、 2×10^4 /well の細胞密度で 96 ウェルプレート (V&P SCIENTIFIC, INC., USA) の各グラスファイバーフィルター上に接種し、RD buffer (RD, 25 mM HEPES, 1 mg/ml BSA, 0.02% Na₃, pH 7.4) で洗浄した。5 pg から 20 ng の 12 種類の [¹²⁵I] 濃度の標識された EGF を加え、最終容量を 100 μ l として 2 時間室温でインキュベートした。RD buffer で洗浄後、細胞に結合した [¹²⁵I] EGF の放射活性を総結合量としてオートウェルガンマシステム (ARC 600, Aloka) を用いて測定した。総結合量から非特異的結合量の差を特異的結合量として飽和曲線を求め Scatchard 解析²⁶⁾により受容体数ならびに解離定数を求めた。

EGF の受容体解析は、各細胞を 48 ウェルプレートに植え込み 2 日間培養した後、[¹²⁵I] acidic FGF と種々の濃度の acidic FGF を加えて 2 時間インキュベートした。3 回洗浄後、細胞に結合した放射活性をオートウェルガンマシステムを用いて測定し、Scatchard 解析を行った。

7) 口腔粘膜由来正常上皮細胞の増殖に対する EGF と FGF の働き

口腔粘膜由来正常上皮細胞をコラーゲンコートした 24 ウェルプレートに 10^4 /ml の細胞密度で植え込み、1.2 nM acidic FGF 存在下で 0~10 nM の EGF, あるいは 3 nM EGF 存在下で 0~10 nM の acidic FGF を加えて 10 日間培養後の細胞数を計測した。

結 果

1. 無血清培養下での細胞増殖能の検索

無血清培養下での扁平上皮癌細胞ならびに唾液腺由来腺癌細胞の細胞倍加時間 (T.d.) は、UEDA 30.6, NAKATA 23.9, KANETSUKI 29.9, HSG 22.2, HSY 31.9, ACC 22.0 時間であった。これらは 10% 牛胎児血清添加時の倍加時間と同等の増殖であった (図 1, 2)。ACC 細胞は無血清培養条件下に樹立され、血清添加培地での増殖は抑制された (未発表データ)。一方、正常上皮細胞は MCDB5F や MCDB6F の培養条件下では増殖できなかった。

このように口腔癌細胞は insulin, transferrin, 2-aminoethanol, β -mercaptoethanol, sodium selenite および

図 1 扁平上皮癌細胞の増殖曲線

図 2 唾液腺由来腺癌細胞の増殖曲線

図 3 口腔粘膜由来正常上皮細胞（継代9代目）の増殖に及ぼす EGF の影響

図 4 唾液腺由来正常上皮細胞（継代3代目）の増殖に及ぼす EGF の影響

写真 1 口腔粘膜由来正常上皮細胞を用いたコロニーアッセイ
insulin, transferrin, 2-aminoethanol, 2-mercaptoethanol, sodium selenite および EGF の要求性を検索した。

図 5 口腔粘膜由来正常上皮細胞（継代 9 代目）の増殖に及ぼす FGF の影響

図 6 唾液腺由来正常上皮細胞（継代 3 代目）の増殖に及ぼす FGF の影響

oleic acid を含む RD6F で増殖できるが、正常上皮細胞は 6F を含む無血清培地では増殖できないことがわかった。また、DME, Ham F12, RPMI 1640 それぞれ単独あるいはそれぞれ混合した種々の基礎培地を用いて同様の検索を行ったが、RD 培地が最もすぐれていた。

2. EGF ならびに FGF の細胞増殖に及ぼす影響とその受容体解析

1) 正常上皮細胞の増殖に及ぼす EGF ならびに FGF の影響

EGF は口腔粘膜および唾液腺由来正常上皮細胞の増殖を促進した。その最大増殖促進濃度は口腔粘膜由来正

写真 2 口腔粘膜由来正常上皮細胞を用いたコロニーアッセイ
insulin, transferrin, 2-aminoethanol, 2-mercaptoethanol, sodium selenite および FGF の要求性を検索した。

図 7 唾液腺由来腺癌細胞の増殖に及ぼす EGF の影響

常上皮細胞に対して 10 pM, 唾液腺由来正常上皮細胞に対して 3 nM であった (図 3, 4).

FGF もこれら正常上皮細胞の増殖を促進し, その最大増殖促進濃度は 1 nM であった (図 5, 6).

口腔癌細胞は RD6F の無血清培養条件下で増殖可能であったが, 正常上皮細胞は増殖できなかった. そこで同細胞の insulin, transferrin, 2-aminoethanol, 2-mercaptoethanol, sodium selenite, EGF ならびに FGF の要

求性を colony assay 法を用いて検索した. その結果, 正常上皮細胞の増殖にとって EGF あるいは FGF は必須であり, EGF および FGF 非存在下では増殖能を維持することはできないことがあきらかとなった (写真 1, 2).

2) 口腔癌細胞の増殖に及ぼす EGF の影響およびその受容体解析

唾液腺由来腺癌細胞の増殖は EGF により濃度依存的

図 8 扁平上皮癌細胞の増殖に及ぼす EGF の影響

図 9 唾液腺由来腺癌細胞の増殖に及ぼす FGF の影響

に促進され、その最大促進濃度は HSG に対して 3 nM、HSY に対して 1 nM であった (図 7)。一方、扁平上皮癌細胞の増殖は EGF により著明に抑制され、その最大抑制濃度は UEDA 1 nM、NAKATA 3 nM、KANETSUKI 3 nM であった (図 8)。この結果から、口腔由来扁平上皮癌細胞の増殖は、他細胞の増殖を促進する EGF 濃度で著明に抑制されることがあきらかとなった。

口腔由来扁平上皮癌細胞の EGF 受容体数は $1.9 \sim 3.2 \times 10^5/\text{cell}$ で、口腔粘膜由来正常上皮細胞の受容体数 $1.7 \times 10^5/\text{cell}$ とあきらかな差を認めなかった。また、いずれも親和性の異なる 2 種類の EGF 受容体を有していた (表 1)。

一方、EGF 受容体を過剰発現している²⁰⁾ことが知られている A431 細胞はこれら細胞の 10~20 倍の受容体数を有していた。この結果から、今回実験に用いた口腔由

表 1 口腔粘膜由来正常上皮細胞と口腔癌細胞の EGF 受容体数および親和性

	受容体数	親和性	
		低親和性	高親和性
UEDA	1.9×10^5	3.7×10^{-9}	9.2×10^{-11}
NAKATA	1.4×10^5	3.8×10^{-9}	1.1×10^{-10}
KANETSUKI	3.2×10^5	8.6×10^{-9}	3.7×10^{-10}
口腔由来 正常上皮細胞	1.7×10^5	9.4×10^{-9}	1.3×10^{-10}
HSG	1.4×10^5	8.0×10^{-9}	2.2×10^{-10}
HSY	6.7×10^4	9.1×10^{-9}	1.0×10^{-10}
A 431	4×10^6	2.5×10^{-9}	2.9×10^{-10}

図 10 扁平上皮癌細胞の増殖に及ぼす FGF の影響

表 2 FGF 受容体解析結果

	受容体数	親和性	
		低親和性	高親和性
A431	4.3×10^3		6.7×10^{-11}
NAKATA	2.5×10^3		4.6×10^{-12}
KANETSUKI	4.5×10^3		8.0×10^{-12}
HSG	3.9×10^3	6.0×10^{-10}	4.5×10^{-11}

来扁平上皮癌細胞には EGF 受容体の過剰発現は生じていないことがあきらかとなった。

EGF により増殖促進された HSG, HSY 細胞の EGF 受容体数も他細胞と比較して著明な差を認めなかった。また、いずれも親和性の異なる 2 種類の受容体が存在していた (表 1)。

さらに扁平上皮癌細胞の増殖抑制濃度と唾液腺由来腺癌細胞の増殖促進濃度は、それぞれの低親和性受容体の解離定数と一致していた。

3) 口腔癌細胞の増殖に及ぼす FGF の影響とその受容体解析

FGF は口腔粘膜ならびに唾液腺由来正常上皮細胞ばかりでなく、唾液腺由来腺癌細胞の増殖も促進した (図 9)。これら細胞に対する FGF の最大増殖促進濃度は 1 nM であった。一方、扁平上皮癌細胞の増殖に対して、FGF はあきらかな影響を与えなかった (図 10)。

扁平上皮癌細胞は FGF に対して応答を示さなかったことから、同細胞には FGF 受容体が存在していない可能性が考えられた。しかし受容体解析の結果、扁平上皮癌細胞は唾液腺癌細胞と同程度の FGF 受容体を有していることがあきらかとなった (表 2)。扁平上皮癌細胞

図 11 ヒト正常上皮細胞の増殖に及ぼす EGF と FGF の相互作用

には 1 種類の高親和性受容体を認めその数は $2.5 \sim 4.5 \times 10^3/\text{cell}$ であった。FGF により増殖促進される HSG 細胞には 親和性の異なる 2 種類の FGF 受容体が存在し、その数は $3.9 \times 10^3/\text{cell}$ であった。この結果から、扁平上皮癌細胞には FGF に対しても応答異常が生じていることがあきらかとなった。

4) 口腔粘膜由来正常上皮細胞の増殖に対する EGF と FGF の働き

1.2 nM の acidic FGF 存在下で EGF の増殖に及ぼす影響を検索した結果、最大増殖時の細胞数は 1.2 nM の acidic FGF 単独による細胞数と同じであった (図

11). また、同様に 3 nM の EGF 存在下で acidic FGF の影響を検索したが最大増殖時の細胞数は 3 nM EGF 単独による細胞数と同じであった。この結果から、ヒト正常上皮細胞の増殖に対して、EGF と FGF はまったく同じ働きをしていることがわかった。

考 察

本研究において、適切な基礎培地に適切なホルモンや細胞増殖因子を加えることにより腫瘍細胞のみならず正常上皮細胞をも継代維持することができることがあきらかとなった。

血清中にはホルモン、細胞増殖因子、その結合蛋白や未知の蛋白成分、コレステロールや脂肪酸などの脂質成分、糖蛋白などが存在している。今回、口腔粘膜由来正常上皮細胞の培養に用いた無血清培地の蛋白成分は、insulin, transferrin で蛋白量は 12 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であった。一方、10% 血清添加培地の蛋白量は 65~80 mg/ml であり、しかもその大部分は未知蛋白である。

正常上皮細胞は血清添加培地では継代維持が困難であった。一方血清中には TGF- $\beta^{27)}$ や数本が見出し出した TGF- β と異なる上皮細胞増殖抑制因子²⁸⁾ が存在するため、正常上皮細胞の増殖は抑制されたと考えられる。

正常上皮細胞の細胞増殖因子要求性を colony assay を用いて検討した結果、EGF と FGF はともにその増殖を促進した。しかも、それらが存在しない条件では生存できなかったことから、EGF あるいは FGF は正常上皮細胞の増殖にとって必須因子であることがあきらかとなった。

一般にヒト正常線維芽細胞を用いた検索では、細胞集団倍加数 (population doubling level, PDL) の増加とともに細胞増殖能を失っていくことが報告されている²⁹⁾。今回の実験で、口腔粘膜由来正常上皮細胞と唾液腺由来正常上皮細胞に対する、EGF と FGF の増殖促進濃度が異なった。これは口腔粘膜由来正常上皮細胞は幼若年者の口腔粘膜、唾液腺由来正常上皮細胞は老壮年者の顎下腺を用いたためと考えられた。また口腔粘膜と比較して顎下腺は高度に分化した器官であることから上皮細胞の増殖能に差が生じた可能性も考えられた。

一方、扁平上皮癌細胞や唾液腺由来腺癌細胞は RD6F の条件でも 10% 胎児血清添加時と同様の増殖を示し、その増殖にとって EGF や FGF は必須ではなかった。このことから、口腔癌細胞は正常上皮細胞と比較して EGF や FGF の要求性が低下、あるいは消失していると考えられた。

唾液腺由来腺癌細胞は、EGF や FGF に対して唾液腺由来正常上皮細胞と同じ増殖動態を示した。一方、扁平上皮癌細胞の増殖は正常上皮細胞の増殖を促進する濃度の EGF で著明に抑制され、正常細胞とは相反する応

答を示した。また、FGF は扁平上皮癌細胞の増殖に対してなんら影響を与えなかった。

このように、扁平上皮癌細胞は口腔粘膜由来正常上皮細胞と比較して、EGF および FGF に対する応答異常が生じていることがあきらかとなった。今回 EGF と FGF のヒト口腔粘膜由来正常上皮細胞への働きを詳細に検索するため、EGF あるいは FGF 単独で同細胞の継代を試みた。EGF 単独では 3 代以上継代すると細胞は膨化、elongation などの分化傾向を示し増殖能を失ってしまった。しかし、FGF 単独では増殖は遅いものの継代を重ねても敷石状の均一な細胞群の増殖を認めた (未発表データ)。また、藪本は正常マウス唾液腺上皮細胞のアミラーゼ産生を分化の指標として免疫組織学的に検索し、FGF 存在下で培養した細胞ではアミラーゼ陰性であったが、EGF 存在下で培養した細胞はアミラーゼ陽性であった²⁵⁾ ことを報告している。

一方、Rosdy³⁰⁾ は扁平上皮癌 A431 細胞に対する EGF の影響を、上皮細胞の分化の指標である cornified envelope³¹⁾ の前駆物質である involucrin³²⁾ の蓄積を指標として検索し、EGF は A431 細胞の分化を誘導したと報告している。著者らの結果ならびにこれらの報告から、EGF は正常細胞に対しては増殖のみならず分化促進にも働くが、扁平上皮癌細胞に対しては分化促進にのみ働き結果的に増殖抑制している可能性が考えられた。

扁平上皮癌細胞の増殖が EGF により抑制されるという事実^{33~36)} はすでに報告されている。そのほとんどは、A431 細胞を用いて研究された報告^{35, 36)} であり、EGF 受容体の過剰発現と EGF による増殖抑制作用は密接に関係しているとされてきた。しかし、今回実験に用いた口腔由来扁平上皮癌細胞と口腔粘膜由来正常上皮細胞の間で、EGF 受容体の数や親和性に差を見出すことはできず、扁平上皮癌細胞の EGF による増殖抑制は EGF 受容体の過剰発現だけでは説明できないことがあきらかとなった。

さらに、今回の実験結果から他細胞と比較して、扁平上皮癌細胞の EGF 受容体や FGF 受容体の受容体数、親和性に異常を認めなかったにもかかわらず EGF や FGF に対する応答異常が存在したことから、扁平上皮癌細胞には EGF 受容体および FGF 受容体の機能異常あるいは受容体以降の情報伝達系に異常が生じている可能性が示唆された。

今回、口腔粘膜由来正常上皮細胞の EGF および FGF 共存下での最大増殖時の細胞数は、それぞれ単独の最大増殖時の細胞数と同じであった。この結果から、EGF と FGF は正常上皮細胞に対して受容体は異なるが共通の情報伝達経路を介して作用している可能性が考えられた。このように異なる受容体を持つ細胞増殖因子の情報と同じ経路を介して伝達されることは他の細胞増殖因子でも見い出されており、TGF- $\beta^{37)}$ や interleukin-1³⁸⁾ が

PDGF の情報経路を介して線維芽細胞の増殖を促進していることが報告されている。したがって、扁平上皮癌細胞の EGF による増殖抑制と FGF に対する不応答は密接に関係している可能性が考えられた。

Todaro と Sporn⁵⁾らはラウス肉腫ウイルスや SV 40 ウイルスによって形質転換した線維芽細胞は EGF の要求性が低くなることから TGF- α を見出し³⁹⁾, autocrine 説⁵⁾を提唱した。Heldin ら⁴⁰⁾も腫瘍細胞の autonomic な増殖のメカニズムに同様の説明を加え、形質転換した線維芽細胞は自ら PDGF を自己増殖促進因子として産生することにより自律増殖性を獲得していること⁴¹⁾を見出ししている。

今回用いた口腔由来扁平上皮癌細胞の培養上清中に FGF 様活性を見出ししている(未発表データ)。また岡本らは A431 細胞は basic FGF 様因子を培養上清中に産生していることを報告している⁴²⁾。さらに A431 細胞には細胞膜貫通ドメインを有する TGF- α を産生しており細胞膜上に TGF- α を発現していることがあきらかにされている⁴³⁾。したがって、扁平上皮癌細胞はこれら因子を産生することにより自律増殖性を獲得しているものと考えられた。また唾液腺由来腺癌細胞は EGF や FGF によって増殖促進されたが、それらの要求性は唾液腺由来正常上皮細胞と比較してあきらかに低かった。これは同腺癌細胞が EGF⁴⁴⁾あるいは EGF 様因子⁴⁵⁾や FGF 様因子⁴⁶⁾を産生しており、唾液腺由来腺癌細胞の自己増殖促進因子として働いているためと考えられた。

以上、無血清培地を用いて、正常上皮細胞と口腔癌細胞の細胞増殖動態の違いをあきらかにした。また細胞の癌化または癌化の過程に EGF や FGF などの細胞増殖因子が深く関与していることが示唆された。さらに、これら細胞増殖因子の作用を制御することにより癌の増殖を抑制する口腔癌の内分泌的治療が可能になると考えられた。

総 括

1. ヒト口腔粘膜および唾液腺由来正常上皮細胞はそれぞれ m'-MCDB5F および m'-MCDB6F に、EGF あるいは FGF を加えた条件で継代維持が可能であった。ヒト口腔由来扁平上皮癌細胞と唾液腺由来腺癌細胞は RD6F 培地で、10% 牛胎児血清添加時と同等の増殖を示した。

2. EGF および FGF はヒト口腔粘膜由来正常上皮細胞、ヒト唾液腺由来正常上皮細胞および唾液腺由来腺癌細胞の増殖を濃度依存的に促進した。特に口腔粘膜および唾液腺由来正常上皮細胞の増殖にとって、EGF あるいは FGF は必須であった。

3. EGF は扁平上皮癌細胞の増殖を著明に抑制したが FGF は影響を与えなかった。しかし、扁平上皮癌細胞

の EGF ならびに FGF 受容体の受容体数および親和性は他細胞のそれらと比較して著明な差を認めなかった。このことから、扁平上皮癌細胞には EGF および FGF に対する応答異常が存在すると考えられた。

引用文献

- 1) Waterfield, M.D., Scrace, G.T. et al.: Platelet-derived growth factor is structurally related to the putative transforming protein p 28^{sis} of simian sarcoma virus. *Nature* 304: 35-39 1983.
- 2) Downward, J., Yarden, Y., et al.: Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erbB oncogene protein sequence. *Nature* 307: 521-527 1984.
- 3) DeLarco, J.E. and Todaro, G.J.: Growth factors from murine sarcoma virus-transformed cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 75: 4001-4005 1978.
- 4) Waldmann, T.A., Greene, W.C., et al.: Function and phenotypic comparison of human T cell leukemia/lymphoma virus positive adult T cell leukemia with human T cell leukemia/lymphoma virus negative Sezary leukemia, and their distinction using anti-Tac: Monoclonal antibody identifying the human receptor for T cell growth factor. *J Clin Invest* 73: 1711-1718 1984.
- 5) Sporn, M.B. and Todaro, G.J.: Autocrine secretion and malignant transformation of cell. *N Engl J Med* 303: 878-880 1980.
- 6) Sporn, M.B. and Roberts, A.B.: Autocrine growth factors and cancer. *Nature* 313: 745-747 1985.
- 7) Masui, T., Wakefield, L.M., et al.: Type- β transforming growth factor is the primary differentiation-inducing serum factor for normal human bronchial epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 2438-2442 1986.
- 8) Rutherford, R.B. and Ross, R.: Platelet factors stimulate fibroblasts and smooth muscle cells quiescent in plasma serum to proliferate. *J Cell Biol* 69: 196-203 1976.
- 9) Hayashi, I. and Sato, G.H.: Replacement of serum by hormones permits growth of cells in a defined medium. *Nature* 259: 132-134 1976.
- 10) Barnes, D., McKeehan, W.L., et al.: Cellular endocrinology: Integrated physiology *in vitro*. *In Vitro Cell Dev Biol* 23: 659-662 1987.
- 11) Tsao, M.C., Walthall, B.J., et al.: Clonal growth of normal human epidermal keratino-

- cytes in a defined medium. *J Cell Physiol* 110: 219-229 1982.
- 12) Moore, G.E., Gerner, R.E., et al.: Culture of normal human leukocyte. *JAMA* 199: 519-524 1967.
 - 13) Dulbecco, R. and Freeman, G.: Plaque production by the polyoma virus. *Virology* 8: 396-397 1959.
 - 14) Sato, J.D., Kawamoto, T., et al.: Cholesterol requirement of P3-X63-Ag8.653 and X63-Ag 8.653 mouse myeloma cells for growth *in vitro*. *J Exp Med* 165: 1761-1766 1987.
 - 15) Myoken, Y., Okamoto, T., et al.: An alternative method for the isolation of NS-1 hybridoma using cholesterol auxotrophy of NS-1 mouse myeloma cells. *In Vitro Cell Dev Biol* 25: 477-480 1989.
 - 16) Kawamoto, T., Sato, J.D., et al.: Development of a serum-free medium for growth of NS-1 mouse myeloma cells and its application to the isolation of NS-1 hybridoma. *Anal Biochem* 130: 445-453 1983.
 - 17) Yuspa, S.H. and Harris, C.C.: Altered differentiation of mouse epidermal cells treated with retinyl acetate *in vitro*. *Exp Cell Res* 86: 95-105 1974.
 - 18) 宮内 忍, 諸山隆正, 他: ヒトロ底癌由来細胞株 (UEDA-1) の樹立. *日口外誌* 31: 1347-1351 1985.
 - 19) Miyauchi, S., Moroyama, T., et al.: Malignant tumor cell line produce interleukin-1-like factor. *In Vitro Cell Dev Biol* 24: 753-758 1988.
 - 20) Fabricant, R.N., DeLarco, J.E., et al.: Nerve growth factor receptors on human melanoma cells in culture. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 565-569 1977.
 - 21) Shirasuna, K., Sato, M., et al.: A neoplastic epithelial duct cell line established from an irradiated human salivary gland. *Cancer* 54: 745-752 1981.
 - 22) Yanagawa, T., Hayashi, Y., et al.: Generation of cells with phenotypes of both intercalated duct-type and myoepithelial cells in human parotid gland adenocarcinoma clonal cells grown in athymic nude mice. *Virchows. Ach. [B]* 51: 185-195 1986.
 - 23) Okamoto, T., Myoken, Y., et al.: Establishment and characterization of Adenoid cystic carcinoma cell line ACC. (manuscript in preparation)
 - 24) Crabb, J.W., Armes, L.G., et al.: Characterization of multiple form of prostatropine (prostate epithelial growth factor) from bovine brain. *Biochem Biophys Res Commun* 136: 1155-1161 1986.
 - 25) Hunter, W.M. and Greenwood, F.C.: Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity. *Nature (Lond.)* 194: 495-496 1962.
 - 26) Scatchard, G.: The attractions of protein for small molecules and ions. *Ann NY Acad Sci* 51: 660-672 1949.
 - 27) Roberts, A.B., Anzano, M.A., et al.: Purification and properties of a type- β transforming growth factor from bovine brain kidney. *Biochemistry* 22: 5092-5098 1983.
 - 28) 藪本正文, 岡本哲治, 他: 正常マウス顎下腺上皮細胞の無血清培養下での株化. *日口外誌* 36: 791-801 1990.
 - 29) Hayflick, L. and Moorhead, P.S.: The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 25: 585-621 1961.
 - 30) Rosdy, M.: Opposite effects of EGF on involucrine accumulation of A431 keratinocytes and a variant which is not growth-arrested by EGF. *In Vitro Cell Dev Biol* 24: 1127-1132 1988.
 - 31) Green, H.: Terminal differentiation of cultured human epidermal cells. *Cell* 11: 405-416 1977.
 - 32) Watt, F.M. and Green, H.: Involucrin synthesis is correlated with cell size in human epidermal cultures. *J Cell Biol* 90: 738-742 1981.
 - 33) Kamata, N., Chida, K., et al.: Growth-inhibitory effects of epidermal growth factor and overexpression of its receptors on human squamous cell carcinoma in culture. *Cancer Res* 46: 1648-1653 1986.
 - 34) Ponc, M., Weerheim, A., et al.: Proliferation and differentiation of human squamous carcinoma cell lines and normal keratinocyte: Effects of epidermal growth factor, retinoid, and hydrocortisone. *In Vitro Cell Dev Biol* 24: 764-769 1988.
 - 35) Barnes, D.W.: Epidermal growth factor inhibits growth of A431 human epidermoid carcinoma in serum-free cell culture. *J Cell Biol* 93: 1-4 1982.
 - 36) Gill, G.N. and Lazar, C.S.: Increased phosphotyrosine content and inhibition of proliferation in EGF-treated A431 cells. *Nature* 293: 305-307 1982.
 - 37) Loeff, E.B., Proper, J.A., et al.: Induction of c-sis mRNA and activity similar to platelet-derived growth factor by transforming growth factor- β : A proposed model for indirect mitogenesis involving autocrine activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 2453-2457 1986.

- 38) Raines, E.W., Dower, S.K., et al.: Interleukin 1 mitogenic activity for fibroblast and smooth muscle cells is due to PDGF-AA. *Science* 20: 393-396 1989.
- 39) Todaro, G.J., DeLarco, J.E., et al.: Sarcoma growth factor and transforming peptides produced by human cells: interactions with membrane receptors. *Federation Proc* 41: 2995-3003 1982.
- 40) Heldin, C.-H. and Westermark, B.: Growth factors: Mechanism of action and relation to oncogene. *Cell* 37: 9-20 1984.
- 41) Heldin, C.-H., Wsateson, A., et al.: Interaction of platelet-derived growth factor with its fibroblast receptor. *J Biol Chem* 257: 4216-4221 1982.
- 42) Okamoto, T., Wu, D., et al.: Production of a basic EGF like growth factor by human epidermoid carcinoma cells. *In Vitro Cell Dev Biol* 23: 41 1987.
- 43) Wu, D., Wang, L., et al.: Membrane-bound transforming growth factor- α as an autocrine factor for A431 human epidermoid carcinoma cells. *Oncogene* 1991. (in press)
- 44) Sato, M., Yoshida, H., et al.: Expression of epidermal growth factor and transforming growth factor- β in a human salivary gland adenocarcinoma cell line. *Cancer Res* 45: 6160-6167 1985.
- 45) Kurokawa, R., Kyakumoto, S., et al.: Autocrine growth factor in defined serum-free medium of salivary gland adenocarcinoma cell line HSG. *Cancer Res* 49: 5136-5142 1989.
- 46) Osaki, T., Okamoto, T., et al.: Human salivary gland adenocarcinoma cells (HSG) produce a basic-FGF like growth factor as an autocrine growth factor. *Jpn J Can Res (抄)*: 185 1989.