ヌードマウス移植扁平上皮癌の増殖に対するヒト EGF の影響

力丸浩一・増原裕巳*・戸田ひとみ*

榎本昭二*・長山 勝

Effects of human EGF on the growth of human squamous cell carcinomas in athymic mice

Koichi RIKIMARU・Hiromi MASUHARA*・Hitomi TODA*

Shoji ENOMOTO*・Masaru NAGAYAMA

Abstract: Human epidermal growth factor (hEGF), which is functionally indistinguishable from murine EGF, is a potent mitogen for many types of cells and found in human tissues and body fluids, and the amount of its receptor (EGF・R) has been revealed to be elevated in human squamous cell carcinomas (SCC) including oral cancer. In order to investigate the role of hEGF and overexpressed EGF・R in the carcinogenesis of SCC, we examined the effects of hEGF on the growth of tumors implanted in athymic mice as well as *in vitro*. Although hEGF suppressed the *in vitro* growth of A 431 and ZA cells in a dose dependent manner, which were SCC cells hyperproducing EGF・R accompanied with its gene amplification, their growth in athymic mice was not affected by hEGF administered intraperitoneally. On the other hand, hEGF did not inhibit the growth of AZ521 cell either *in vitro* or *in vivo*, which was gastric cancer cell line used as a control. These results suggest that the roles of hEGF *in vivo* differ from it *in vitro* or that there may be an alternate growth mechanism via EGF・R on SCC cells.

Key words: human epidermal growth factor (ヒト上皮成長因子), oral cancer (口腔癌), squamous cell carcinoma (扁平上皮癌)

緒 言

上皮成長因子 (epidermal growth factor, EGF) は, Cohenにより雄マウス顎下腺から抽出された53個のアミノ酸よりなる分子量 6,045 のポリペプチドであり¹⁾, 試

験管内において種々の細胞の増殖を促進する²⁾. またヒト尿より胃酸分泌抑制作用を有するホルモンとして抽出されたウロガストロンは, そのアミノ酸配列, 分子構造および生物活性の類似性からヒトの EGF であると考えられている³⁾. EGF は, 細胞表面にある特異的な受容体 (epidermal growth factor receptor, EGF・R) を介して作用することが知られている. EGF・R 遺伝子は, トリ赤芽球症ウイルスの持つ癌遺伝子 *v-erbB* の細胞性相同遺伝子, *c-erbB-1* と同一であり, チロシンキナーゼをコードする一連の癌遺伝子群に属している⁴⁻⁶⁾. われわれは, 口腔癌の細胞生物学的特性に関する研究の過程において, 口腔扁平上皮癌細胞の試験管内での増殖が EGF により特異的に抑制されることを見出し, この増殖抑制が扁平上皮癌細胞における *c-erbB-1* の遺伝子増幅を伴った EGF・R の過剰発現と相関することをあきらかにした⁷⁻¹¹⁾. その後の研究により口腔癌においては, *c-erbB-1* の遺伝子増幅よりも EGF・R の発

徳島大学歯学部口腔外科第1講座
(主任: 長山勝教授)

* 東京医科歯科大学歯学部口腔外科第2講座
(主任: 榎本昭二教授)
1st Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Faculty of Dentistry, Tokushima University
(Chief: Prof. Masaru Nagayama)

* 2nd Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Faculty of Dentistry, Tokyo Medical and Dental University (Chief: Prof. Shoji Enomoto)

受付日: 平成3年9月9日

現の増加そのものの方が重要であることがあきらかとなってきた¹²⁾。

実際、口腔癌を含めヒト扁平上皮癌において EGF・R の過剰発現が高頻度に行っているとの報告も多く、この癌の発生、増殖に EGF・R の発現異常がなんらかの関与をしている可能性が示唆されている¹³⁻¹⁷⁾。

しかし、これらの研究において、EGF・R の発現様式は放射性同位元素で標識された EGF の結合能や特異抗体を用いた免疫学的手法により EGF の結合していない EGF・R を対照にしているものがほとんどであり、EGF・R が EGF と相互作用しながら癌の発生、増殖に関与しているか否かは現時点ではあきらかになってはいない。今回、われわれはヌードマウス移植腫瘍の系を用いてヒト上皮成長因子が生体内での扁平上皮癌の増殖にどのような影響を与えるかを検討した。

実験材料および方法

1. ヒト上皮成長因子

ヒト上皮成長因子 (hEGF) は、ヒト尿より精製されたものを日立化成工業 (株) より提供を受け使用した¹⁰⁾。

2. 細胞

本研究には、上皮成長因子受容体 (EGF・R) を過剰に発現しているヒト扁平上皮癌細胞株として、外陰部癌由来 A431¹⁸⁾ および口蓋腫瘍の頸部転移株より樹立した ZA¹⁹⁾ を、また対照としては胃癌細胞株 AZ 521 を使用した。A431 および AZ 521 は、JCRB 細胞バンクより供与を受けた。すべての細胞は、10% 牛胎児血清を含むダルベッコ改変イーグル培地を用いて 95% 空気、5% 炭酸ガス、37°C の条件下で、継代維持されている。

3. 培養細胞に対する hEGF の影響

それぞれの細胞を 5×10^4 個ずつコーニング社の 6 穴マルチプレートに植え込み、翌日 hEGF をそれぞれ 0.1, 1, 10, 100 ng/ml 含む培地、あるいは hEGF を全く含まない培地 3 ml に交換した。培養 4 日目に同様に培地の交換を行い、培養 6 日目に細胞をトリプシンを用いて集め 0.15% トリパンブルーによる色素排除法にて生細胞数を求めた。細胞数はそれぞれ 3 穴の平均として求めた。

4. ヌードマウス移植腫瘍に対する hEGF の影響

移植には、日本クレアより購入した 8 週齢の BALB/c 系の雌ヌードマウスを使用した。本研究においては、移植固形腫瘍の増殖に対する hEGF の影響を検討するために、あらかじめ別のマウスにおおの細胞を 1×10^7 個ずつ注射移植し、形成された腫瘍を無菌的に摘出し、これを実験対照とするマウスに移植し腫瘍の生着が確認された段階で実験を開始した。すなわち、1~2 mm 角に細切した腫瘍組織を 16 ゲージの移植針を用いて

ヌードマウスの側背部皮下に移植し、2 週間経過後肉眼的にあきらかに腫瘍の生着、増大がみられたものを実験対照とした。

マウスは、各細胞株につき 9 あるいは 10 匹ずつ 3 グループに分けた。実験開始時、すなわち 10 週齢のマウスの体重が約 30 g であったので、低濃度投与群は 30 ng (1 μ g/kg/日)、高濃度投与群は 3 μ g (100 μ g/kg/日) の hEGF をリン酸緩衝液 (PBS) 30 μ l に溶解し、14 日間連日腹腔内投与した。陰性対照としては、PBS 単独を同様に投与した。腫瘍の計測は、hEGF 投与開始日より最終投与の翌日までの 15 日間行った。腫瘍の大きさは、ノギスを用いて腫瘍の長径および短径を測定し、長径 (mm) $\times$ 短径 (mm) $\times$ 短径 (mm) $\times$ 1/2 = 腫瘍体積 (mm³) の式で求めた。

結 果

EGF・R を過剰に発現している口腔癌および外陰部癌由来扁平上皮癌細胞株、ZA, A431, ならびに胃癌細胞株 AZ 521 の試験管内増殖に対する hEGF の影響は、扁平上皮癌細胞では濃度依存的に増殖抑制作用を示したが、胃癌細胞ではほとんどその増殖に影響を与えることはなかった (図 1)。

これらの細胞の生体内増殖に対する hEGF の影響をヌードマウス移植腫瘍の系を用いて検討した。各細胞株とも移植針を用いて固形腫瘍としてマウスに移植し、腫瘍の生着を確認した後に hEGF を含む PBS あるいは PBS 単独を 14 日間連日腹腔内投与し、経日的に腫瘍の大きさを測定した。

実験開始時、すなわち移植後 14 日目における形成された腫瘍の大きさの平均は、AZ 521 が最も大きく、次いで ZA, A431 の順であった (図 2~4, D)。また同じ腫瘍を移植された動物においても個体間で、形成され

図 1 hEGF の試験管内細胞増殖における影響
hEGF の存在下で 5 日間培養した細胞数の対照 (hEGF 非存在下の細胞数) に対する百分率 (3 穴の平均 $\pm$ 標準偏差)

図 2 A431 腫瘍のヌードマウスでの増殖に対する hEGF の影響

hEGF あるいは PBS 単独を 0 日目より 14 日間腹腔内に投与した。

(A) PBS 単独投与群, (B) hEGF 30 ng/日 投与群, (C) hEGF 3 µg/日 投与群, (D) それぞれの群の平均 ± 標準誤差。

—●— PBS 単独投与群, ...○... hEGF 30 ng/日 投与群, --×-- hEGF 3 µg/日 投与群。

図 3 ZA 腫瘍のヌードマウスでの増殖に対する hEGF の影響

hEGF あるいは PBS 単独を 0 日目より 14 日間腹腔内に投与した。

(A) PBS 単独投与群, (B) hEGF 30 ng/日 投与群, (C) hEGF 3 µg/日 投与群, (D) それぞれの群の平均 ± 標準誤差。

—●— PBS 単独投与群, ...○... hEGF 30 ng/日 投与群, --×-- hEGF 3 µg/日 投与群。

図4 AZ 521 腫瘍のヌードマウスでの増殖に対する hEGF の影響

hEGF あるいは PBS 単独を 0 日目より 14 日間腹腔内に投与した。

(A) PBS 単独投与群, (B) hEGF 30 ng/日投与群, (C) hEGF 3 µg/日投与群, (D) それぞれの群の平均 ± 標準誤差。

—●—PBS 単独投与群, …○…hEGF 30 ng/日投与群, ---×--- hEGF 3 µg/日投与群。

た腫瘍の大きさかなりのバラツキが認められた。しかし、それぞれの細胞において対照群および実験群の間には、差は認められなかった(図2~4, D)。

実験開始後も腫瘍は増殖をつづけたがその程度はやはり AZ521, ZA, A431 の順に速かった。しかもそれぞれの細胞において投与された hEGF はその増殖にほとんど影響を与えなかった。すなわち、hEGF は個体当たり 30 ng/日から 3 µg/日の投与範囲ではすべての細胞株において、陰性対照とした PBS 投与群との間に形成された移植腫瘍の増殖速度でみるかぎり有意な差は認められなかった(図2~3)。

しかし、口腔癌細胞株 ZA において対照の PBS 単独投与群の 2 匹のマウスが腫瘍移植後 27 日目に死亡したが、他の群およびその他の細胞株では死亡例はみられなかった(図3A)。

考 察

癌研究の進展に伴い、癌遺伝子と呼ばれるものの一部がある種の細胞成長因子や、その特異的な受容体をコードしていることが明らかとなり、それらの異常と癌の発生や増殖との関連が示唆されてきている。EGF・R 遺伝子は、トリ赤芽球症ウイルスの持つ癌遺伝子 *v-erbB* の細胞性相同遺伝子 *c-erbB-1* であり^{5,6)}、その発現異常は口腔癌をはじめとする扁平上皮癌⁹⁻¹⁷⁾の他に、脳腫瘍^{20,21)}、乳癌²²⁾、肺癌²³⁾、膀胱癌²⁴⁾、甲状腺癌²⁵⁾などで報告されている。しかし、扁平上皮癌において過剰発現している EGF・R がこの癌の発生あるいは増殖にどのような役割を演じているかはいまだ不明のままである。本研究においてわれわれは、扁平上皮癌の生体内における増殖に対する hEGF の影響を検索する目的にて、ヌードマウス移植腫瘍の系を用いて実験を行った。マウスにおける内因性の EGF の影響を少なくするために雌のヌードマウスを用いた²⁾。また腫瘍の大きさを長径と短径の 2 方向測定により求めるためと固形腫瘍としての増殖の変化をとらえるために、ヌードマウスへの移植の際に細胞浮遊液としてではなく、あらかじめ別のマウスに形成された移植腫瘍を細切し実験に用いるマウスに再移植し、腫瘍の生着したものを対照として実験を行った。扁平上皮癌細胞 A431 および ZA は、ともに *c-erbB-1* の遺伝子増幅を伴った EGF・R の過剰発現している細胞であり¹²⁾、試験管内での増殖は hEGF により濃度依存的に抑制を受けた(図1)。しかし、今回の実験では hEGF はこれらの細胞の生体内増殖には、あきらかな影響を与えることはなかった。扁平上皮癌における EGF と EGF・R の関係の研究は主に A431 細胞を用いて行われてきており、ヌードマウスを用いた生体内増殖に及ぼす影響についてもいくつかの研究がなされている。Ginsburg ら²⁶⁾は、低濃度の EGF は A431 のヌードマ

ウスでの増殖を促進するが高濃度の EGF は影響を与えなかったと報告し、Ozawa ら²⁷⁾は、浸透圧ポンプを用いて高濃度の EGF を持続投与することにより A431 腫瘍のヌードマウスでの重量が増加したと報告している。一方、Masui ら²⁸⁾は、EGF の投与は A431 のヌードマウスでの増殖になんら影響を与えなかったと述べている。興味あることに彼らは、その実験の中で抗 EGF・R モノクローナル抗体がヌードマウス上の腫瘍の増殖を抑制することを観察しているが、その抗体が EGF の EGF・R への結合を阻害するか否かという点と、その増殖抑制効果との間には関係はなかったと報告している。最近、Amagase ら²⁹⁾は、担癌ヌードマウスにおける 5-FU や CDDP の抗癌効果が hEGF により増強されることを見出ししているが、その報告の中においても hEGF は A431 腫瘍の増殖を促進してはならず、むしろわずかではあるがそれを抑制しているようである。われわれも以前、ヌードマウスに形成させた A431 腫瘍に hEGF を直接腫瘍内に投与することにより腫瘍の成長がわずかではあるが抑制される可能性を報告した³⁰⁾。今回のわれわれの研究結果は、A431 のみならず口腔癌由来の ZA というやはり EGF・R を過剰発現した扁平上皮癌細胞においても hEGF はヌードマウスでの増殖を促進しないことを示している。

以上のように、ヌードマウスを用いた移植腫瘍の系における hEGF と EGF・R 過剰発現扁平上皮癌細胞との相互作用については、報告者によりかなりの違いがみられる。その理由はあきらかではないが、Ginsburg および Ozawa の実験では、細胞を細胞浮遊液として注射移植したのち 1 ないし 2 日後の早期より EGF の投与を開始しているのに対し、Amagase の実験では 1 ないし 2 週後より EGF の投与を開始しておりその時点ではおそらく細胞は固形腫瘍として生着しているものと思われる。われわれの系でも固形腫瘍として生着を確認後に hEGF の投与を開始しており、EGF 投与開始時における癌細胞の状態が結果に影響している可能性は否定できない。すなわち、EGF は腫瘍の増殖そのものよりも移植された癌細胞の局所への生着を促進するのかもしれない。しかし、Masui の実験では EGF は癌細胞の移植直後より投与されており、また Amagase ら³¹⁾は別の実験において hEGF がある種の癌細胞の肺転移を抑制することを報告しており、EGF が癌細胞の生着を促進するか否かは、新たな実験を行い確認をする必要があるものと思われる。また、EGF の生理的な作用があきらかとなっていないことから EGF の生体内における役割が、試験管内で観察しているものとは異なる可能性があると思われる。

EGF・R に結合するリガンドとして従来より EGF と TGF α ³²⁾ が知られていたが、最近この他に HB-EGF³³⁾ および Amphiregulin³⁴⁾ が、さらに EGF・R と

その構造が似ている *erbB-2* 遺伝子産物および EGF・R の両方に結合する物質として分子量約 30,000 の糖蛋白が同定された³⁵⁾。このことは、EGF・R のリガンドとして EGF のみを対照としていてはならないことを示唆しており、また従来より同じだといわれていた EGF と TGF α の生理活性が異なる場合があることがあきらかとなったことから、これらの物質が扁平上皮癌に対し異なった作用をする可能性は否定できない³⁶⁾。

口腔癌をはじめとする扁平上皮癌における EGF・R の発現異常の細胞生物学的および臨床的意義を明らかにするためには、試験管内ばかりでなくヌードマウスなどを用いた生体内実験系における EGF と EGF・R の相互作用をさらに検討する必要があるとともに、これら最近あきらかになった物質の扁平上皮癌細胞に及ぼす影響を検索することが肝要であると思われる。

結 語

ヌードマウス移植腫瘍の系を用いて、扁平上皮癌の生体内増殖におよぼすヒト EGF の影響を検索し、以下の結果を得た。

- 1) EGF・R を過剰発現しているヒト扁平上皮癌細胞 A431, ZA の試験管内増殖は、hEGF により濃度依存的に抑制を受けたが、ヌードマウス上での増殖はその影響を受けなかった。
- 2) 胃癌細胞 AZ521 の増殖は、試験管内および生体内ともに hEGF の影響を受けなかった。
- 3) EGF の生体内での役割が、試験管内でのものと異なることが示唆された。

稿を終えるにあたり、hEGF の供与を賜った日立化成工業株式に感謝の意を表するとともに、本研究が、文部省科学研究費一般研究 (A) 02404077 および一般研究 (C) 02807180 の助成によって行われたことを付記する。

引 用 文 献

- 1) Cohen, S.: Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal. *J Biol Chem* 237: 1555-1562 1962.
- 2) Carpenter, G. and Cohen, S.: Epidermal growth factor, *Ann Rev Biochem* 48: 193-216 1979.
- 3) Starkey, R.H., Cohen, S., et al.: Epidermal growth factor. Identification of a new hormone in human urine. *Science* 189: 800-802 1975.
- 4) Yamamoto, T., Nishida, T., et al.: The *erb B* gene of avian erythroblastosis virus is the

- src* gene family. Cell 35: 71-18 1983.
- 5) Downward, J., Yarden, Y., et al.: Close similarity of epidermal growth factor receptor and *v-erb-B* oncogene protein sequences. Nature 307: 521-527 1984.
 - 6) Ullrich, A., Coussens, L., et al.: Human epidermal growth factor receptor c-DNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells. Nature 309: 418-425 1984.
 - 7) 力丸浩一：ヒト歯肉癌の無血清培養株の樹立と、その応用に関する研究 第2報 ヒト歯肉癌由来無血清培養株 (Ca 9-22SF) に対する成長因子の影響に関する研究. 日口外誌 31: 273-279 1985.
 - 8) 力丸浩一, 鎌田伸之, 他: EGF による口腔扁平上皮癌細胞の増殖抑制に関する研究. 日口外誌 31: 699-709 1985.
 - 9) Yamamoto, T., Kamata, N., et al.: High incidence of amplification of epidermal growth factor receptor gene in human squamous carcinoma cell line. Cancer Res 46: 414-416 1986.
 - 10) Kamata, N., Chida, K., et al.: Growth-inhibitory effects of epidermal growth factor and overexpression of its receptors on human squamous cell carcinomas in culture. Cancer Res 46: 1648-1653 1986.
 - 11) 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.
 - 12) Rikimaru, K., Tadokoro, K., et al.: Gene amplification and overexpression of epidermal growth factor receptor in squamous cell carcinoma of head and neck cancer. Head and Neck: 1991 (in press).
 - 13) Hunts, J., Ueda, M., et al.: Hyperproduction and gene amplification of the epidermal growth factor receptor in squamous cell carcinomas. Jpn J Cancer Res 76: 965-969 1985.
 - 14) Ozanne, B., Shum, A., et al.: Cancer Cells 3. 1st Ed, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1985, p 41-49.
 - 15) Cowley, G.P., Smith, J.A., et al.: Increased EGF receptors on human squamous carcinoma cell lines. Br J Cancer 53: 223-229 1986.
 - 16) Weichselbaum, R.R., Dunphy, E.J., et al.: Epidermal growth factor receptor gene amplification and expression in head and neck cancer cell lines. Head and Neck 12: 437-442 1989.
 - 17) Santini, J., Formento, J.L. et al.: Characterization, quantification, and potential clinical value of the epidermal growth factor receptor in head and neck squamous cell carcinomas. Head and Neck 13: 132-139 1991.
 - 18) Fabricant, R.N., Delarco, J.E., et al.: Nerve growth factor receptor on human melanoma cells in culture. Proc Natl Acad Sci USA 74: 565-569 1977.
 - 19) Tadokoro, K., Ueda, M., et al.: Activation of oncogenes in human oral cancer cells. a novel codon 13 mutation of *c-H-ras-1* and concurrent amplifications of *c-erbB-1* and *c-myc*. Oncogene 4: 499-505 1989.
 - 20) Libermann, T.A., Nusbaum, H.R., et al.: Amplification, enhanced expression and possible rearrangement of EGF receptor gene in primary human brain tumors of glial origin. Nature 313: 144-147 1985.
 - 21) Yamazaki, H., Fukui, Y., et al.: Amplification of the structurally and functionally altered epidermal growth factor receptor gene (*c-erbB*) in human brain tumor. Mol Cell Biol 8: 1816-1820 1988.
 - 22) Flitzpatrick, S.L., Brightwell, J., et al.: Epidermal growth factor binding by breast tumor biopsies and relationship to estrogen and progesterone receptor levels. Cancer Res 44: 3448-3453 1984.
 - 23) Sakiyama, S., Nakamura, Y., et al.: Expression of epidermal growth factor receptor gene in cultured human lung cancer cells. Jpn J Cancer Res 77: 965-969 1986.
 - 24) Neal, D.E., Marsh, C., et al.: Epidermal growth factor receptors in human bladder cancer: comparisons of invasive and superficial tumors. Lancet 1: 366-368 1985.
 - 25) Kanamori, A., Abe, Y., et al.: Epidermal growth factor receptors in plasma membranes of normal and diseased human thyroid glands. J Clin Endocrinol Metab 68: 899-903 1989.
 - 26) Ginsburg, E. and Vonderhaar, B.K.: Epidermal growth factor stimulates the growth of A431 tumors in athymic mice. Cancer Letters 28: 143-150 1985.
 - 27) Ozawa, S., Ueda, M., et al.: Stimulation by EGF of the growth of EGF receptor-hyperproducing tumor cells in athymic mice. Int J Cancer 40: 706-710 1987.
 - 28) Masui, H., Kawamoto, T., et al.: Growth inhibition of human tumor cells in athymic mice by anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies. Cancer Res 44: 1002-1007 1984.
 - 29) Amagase, H., Kakimoto, M., et al.: Epidermal growth factor receptor-mediated selective cytotoxicity of antitumor agents toward human xenografts and murine syngeneic solid tumors. Jpn J Cancer Res 80: 670-678 1989.
 - 30) 力丸浩一, 中村光三, 他: 合成ヒト EGF およ

びそのフラグメントによるヒト扁平上皮癌細胞の増殖抑制 (抄). 第45回日本癌学会総会記事: 281 1986.

- 31) Amagase, H., Tamura, K., et al.: Epidermal growth factor prolongs survival time of tumor-bearing mice. *Jpn J Cancer Res* 81: 495-500 1990.
- 32) Todaro, D.J., Fryling, C., et al.: Transforming growth factors produced by certain human tumor cells. Polypeptides that interact with epidermal growth factor receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 5258-5262 1980.
- 33) Higashiyama, S., Abraham, J.A., et al.: A

heparin-binding growth factor secreted by macrophage-like cells that is related to EGF. *Science* 251: 936-939 1991.

- 34) Shoyab, M., Plowman, G.D., et al.: Structure and function of human amphiregulin; A member of the epidermal growth factor family. *Science* 243: 1074-1076 1989.
 - 35) Lupu, R., Colomer, R., et al.: Direct interaction of a ligand for the *erbB2* oncogene product with the EGF receptor and p 185^{erbB2}. *Science* 249: 1552-1555 1990.
 - 36) Derynck, R.: Transforming growth factor α . *Cell* 54: 593-595 1988.
-