口腔扁平上皮癌における FGF-1 および FGF-2 の発現

明見佳子・明見能成・岡本哲治・高田和彰

Oral squamous cell carcinoma expresses fibroblast growth factor-1 (FGF-1) and FGF-2

Yoshiko MYOKEN・Yoshinari MYOKEN・Tetsuji OKAMOTO・Kazuaki TAKADA

Abstract : In this study, we examined the expression of fibroblast growth factor-1 (FGF-1) and FGF-2 in oral squamous cell carcinomas (SCC) by immunohistochemical technique using specific monoclonal antibodies. *In vitro* growing oral SCC cells expressed both FGF-1 and FGF-2 in their cytoplasm and nuclei, but no staining was observed when the cells were confluent. *In vivo*, the expression of FGF-1 and FGF-2 in 13 oral SCC cases was examined. Compared to normal oral epithelium, SCC showed a high frequency and intense staining of both FGF-1 and FGF-2. These results indicate that SCC cells express high levels of endogenous FGFs and suggest that these growth factors may contribute to cancer cell growth as part of an autocrine mechanism.

Key words : fibroblast growth factor-1 (線維芽細胞増殖因子1), fibroblast growth factor-2 (線維芽細胞増殖因子2), oral squamous cell carcinoma (口腔扁平上皮癌)

緒 言

口腔領域において発生する悪性腫瘍は97%以上を癌腫が占め、口腔粘膜上皮に由来する扁平上皮癌と唾液腺に由来する悪性唾液腺腫瘍が主たる癌腫である¹⁾。しかしながら、これら悪性腫瘍の発生機序および発生に関与する因子については不明な点が少ない。

近年、細胞増殖因子やその受容体の発現と腫瘍細胞の自己増殖能との関連が注目され、とりわけ正常細胞の悪性転換に伴って細胞増殖因子の発現が増大し同時に細胞の増殖因子要求性に異常が生じていることがあきらかにされている²⁾。また、細胞の腫瘍化に重要な役割を担う癌遺伝子産物の中には、ある種の細胞増殖因子あるいは増殖因子受容体と高いアミノ酸配列の類似性を有するものがあることが知られている³⁾。Fibroblast growth factor (FGF) は、ヘパリンに対する親和性の異なる FGF-1 と FGF-2 の2種類のポリペ

チドとして分離精製され、神経外胚葉、中胚葉および外胚葉に由来する細胞の増殖や分化を調節する因子であり³⁾、また発生の過程で細胞特異的に発現することが報告されている³⁾。一方、腫瘍細胞において、悪性度の高い腫瘍細胞での FGF の過剰発現や、FGF 遺伝子を導入してその発現を高めることにより、正常細胞の悪性形質転換が認められること^{4,5)}、さらに FGF ファミリーに属する6種類の蛋白の中には INT2 や HST のように癌遺伝子産物もあることなどより、細胞の腫瘍化とそれに伴う自己増殖機構に FGF の異常発現が関与していることが示唆されている。

そこで本研究では、ヒト口腔扁平上皮癌に関して、培養腫瘍細胞と癌組織での両 FGF の発現を免疫組織学的に検討することにより細胞の腫瘍化と FGF との関連を検討した。

材 料 と 方 法

1. 抗 FGF-1 および抗 FGF-2 モノクローナル抗体の特徴

FGF-1 の検索には、ウシ脳由来 FGF-1 を免疫源として作製したマウスモノクローナル抗体 47a⁶⁾ を、一方 FGF-2 の検索にはマウスモノクローナル抗体 bFM-1⁷⁾ (Upstate Biotechnology Inc. USA) を用いた。両抗体は中和抗体であり、活性型 FGF を認識し、

広島大学歯学部口腔外科学第一講座

(主任：高田和彰教授)

Department of Oral and Maxillofacial Surgery 1,
School of Dentistry, Hiroshima University
(Chief: Prof. Kazuaki Takada)

受付日：平成6年2月9日

表 1 扁平上皮癌の対象症例

症例	性	年齢	組織型	TNM 分類	FGF-1	FGF-2
1	M	57	高分化型	T3N0M0	+	+
2	M	55	中等度分化型	T3N2bM0	++	+
3	M	83	低分化型	T3N0M0	++	+
4	F	56	高分化型	T2N0M0	++	++
5	M	66	低分化型	T4N2cM0	+	+
6	M	67	低分化型	T2N0M0	++	++
7	M	58	高分化型	T1N0M0	++	+
8	F	64	低分化型	T3N0M0	++	++
9	F	74	低分化型	T2N0M0	+	+
10	F	50	高分化型	T2N0M0	++	++
11	F	60	高分化型	T3N0M0	++	++
12	M	40	高分化型	T4N0M0	+	+
13	M	67	高分化型	T4N0M0	+	+

染色強度：中等度 (+), 強陽性 (++)

47 α 抗体は FGF-1 の, また bFM-1 抗体は FGF-2 の FGF 受容体への結合を阻害する.

2. 培養口腔扁平上皮癌細胞での FGF の免疫組織学的検索

口腔扁平上皮癌細胞株は, 当科で樹立した Nakata 細胞⁸⁾ (以下 Nak 細胞と略す) を用いた. 腫瘍細胞の培養には RPMI1640 培地⁹⁾ とダルベッコ改変イーグル培地¹⁰⁾ (以上橋東製薬) を等量混和した培地¹¹⁾ を基礎培地とし, それぞれの培地にビルビン酸ナトリウム 110 mg/L (和光純薬), 硫酸カナマイシン 90 mg/L, アミノベンジルペニシリン 90 mg/L (明治製薬), 炭酸水素ナトリウム 2 mg/ml (和光純薬) を添加して脱イオン化および逆浸透により純化した水 (Milli-Q reagent water system, Millipore, USA) を用いて pH 7.5 に調整し, 0.2 μ m フィルター (Acrocap, Gelman Science Inc., USA) で濾過滅菌したものを使用した. さらに, ウシインスリン 10 μ g/ml, ヒトトランスフェリン 5 μ g/ml (以上 Sigma, USA), 2-メルカプトエタノール 10 μ M, 2-アミノエタノール 10 μ M, 亜セレン酸ナトリウム 10 nM (以上片山化学) を加えて培養を行った. 培養細胞に対する免疫組織学的検索はすべて室温で行った. まず細胞をコラーゲンコートした 24 ウエルプレートに 2 $\times$ 10⁴ 個/well の細胞密度で植え込み, 3 日後の対数増殖期と 6 日後の定常期の培養細胞を 1% 酢酸を含む 95% エタノールにて 30 分間固定し, 0.1% トライトン X-100 (Sigma) を含むリン酸緩衝液 (PBS) を 1 時間反応させ膜透過性を高めた後, 10% ウサギ血清 (Nichirei, Tokyo) を 30 分間反応させることにより非特異的反応をブロックした. 1 次抗体として 47 α 抗体 (3 μ g/ml) または bFM-1 抗体 (12.5 μ g/ml) を, コントロールとしては非免疫マウスイムノグロブリン (15 μ g/ml) を 60 分間反応させた. PBS で洗浄

後 1/50 倍に希釈した FITC 標識抗マウスイムノグロブリン (DAKO, USA) を 60 分間反応させ, 蛍光顕微鏡 (Nikon, Tokyo) にて観察した.

3. 正常口腔粘膜上皮および扁平上皮癌組織での FGF-1 および FGF-2 の免疫組織学的検索

本実験で用いた, 扁平上皮癌の対象症例の内訳を表 1 に示す. 扁平上皮癌は手術材料より, また正常口腔粘膜上皮は非担癌患者の手術材料より得た. 組織材料を 4°C アセトンで 24 時間固定後, パラフィン包埋を行い, 4 μ m 厚の切片を作製し, ABC 法¹²⁾ を用いて免疫組織学的検索を行った. 切片を脱パラフィン後, 1% 過酸加水素水を含むメタノールを 30 分間作用させ, 内因性ペルオキシダーゼをブロックした後, PBS で洗浄し 10% 正常ウサギ血清 (Nichirei) を 30 分間反応させることにより非特異的反応をブロックした. さらに 1 次抗体として 47 α 抗体 (3 μ g/ml), および bFM-1 抗体 (12.5 μ g/ml) を 1 時間反応させた. コントロールとしては非免疫マウスイムノグロブリン (15 μ g/ml) を用いた. PBS で洗浄後, ビオチン標識抗マウス IgG+IgA+IgM (Nichirei) を 1 時間反応させアビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ複合体 (Vector Laboratories, USA) と 30 分間反応させた. 最後に 0.03% 過酸加水素水および 0.05% 3, 3'-ジアミノベンチジン (和光純薬) を含む 50 mM トリス-HCl (pH 7.6) 緩衝液にて発色させた. なお核染はメチルグリーン (和光純薬) にて行い実験はすべて室温で行った.

結 果

1. 培養扁平上皮癌細胞における FGF-1 および FGF-2 の発現

蛍光抗体法による免疫染色の結果, 無血清培養条件

写真 1 培養扁平上皮癌細胞における FGF の発現 (×200)

- A: 増殖期における FGF-1 の発現
- B: 増殖期における FGF-2 の発現
- C: 定常期における FGF-1 の発現
- D: 定常期における FGF-2 の発現

下の扁平上皮癌 Nak 細胞では、細胞増殖期に FGF-1 が主に核周囲と細胞質に (写真 1 A), また FGF-2 は核と細胞質に (写真 1 B) 強い染色反応が認められた。一方、定常期の Nak 細胞では FGF-1 (写真 1 C), FGF-2 (写真 1 D) とともに非常に弱い染色反応が細胞質に認められるのみであった。

2. 口腔粘膜上皮および扁平上皮癌における FGF-1 および FGF-2 の発現

表 2 に 13 例の扁平上皮癌と、10 例の正常粘膜上皮の免疫染色の結果をまとめる。正常口腔粘膜上皮 10 例中 5 例で FGF-1 (写真 2 A), および FGF-2 (写真 2 B) の弱い染色反応が有棘層に認められた。一方扁平上皮癌では高分化型 (写真 3), 低分化型 (写真 4) に関わらず、両 FGF とも強い染色反応が認められた。

以上のように、扁平上皮癌は組織分化度が臨床病期にかかわらず正常粘膜上皮と比較して FGF-1 と FGF-2 の強い発現が高頻度に認められた (表 2)。

考 察

本研究において、口腔扁平上皮癌は FGF-1 と FGF-2 を正常上皮と比較して強く発現しており、これらの因子が細胞の腫瘍化とその自己増殖能に関与していることが示唆された。これまでにヒト悪性腫瘍細胞株における FGF-1 と FGF-2 の高レベルの発現が報告されており^{3,13-15)}, また 3T3 細胞に FGF-1 cDNA⁴⁾ または FGF-2 cDNA⁵⁾ を遺伝子導入し FGF の発現を増大させることにより、細胞が形質転換し自己増殖能

写真 2 正常口腔粘膜上皮における FGF の発現 (×200)
A : FGF-1
B : FGF-2

写真 3 高分化型扁平上皮癌における FGF の発現 (×200)
A : FGF-1
B : FGF-2

を獲得することが知られている。本研究において、口腔扁平上皮癌 Nak 細胞での FGF-1 と FGF-2 の発現を免疫組織学的に検討した結果、増殖期の癌細胞は FGF-1 および FGF-2 を細胞質を中心に強く発現することが判明した。しかしながら、定常期癌細胞ではその発現が著しく減弱していた。腫瘍細胞が産生する FGF-1 および FGF-2 が前立腺癌細胞¹⁶⁾、子宮癌細胞¹⁶⁾ならびに扁平上皮癌細胞¹⁵⁾において増殖期に特異的な発現を示すことが知られており、本実験の結果およびこれらの報告より腫瘍細胞の産生する FGF-1 お

よび FGF-2 は自己増殖機構の一部として腫瘍の自己増殖を助けている可能性が考えられる。

免疫組織学的検索より、正常口腔粘膜上皮では FGF-1 および FGF-2 はともに有棘層を中心に弱い染色反応が認められたのに対し、扁平上皮癌では組織学的分化度や臨床的進展度にかかわらず、すべての癌細胞で両 FGF の強い発現が認められた。Stefanik ら¹⁷⁾は悪性度が高いとされている脳腫瘍の多形グリア芽細胞腫において細胞内での FGF-1 と細胞外基質での FGF-2 の過剰発現を観察している。さらに胃癌¹⁸⁾、腎

写真 4 低分化型扁平上皮癌における FGF の発現 (×200)

A : FGF-1

B : FGF-2

表 2 扁平上皮癌および口腔粘膜上皮における FGF-1 および FGF-2 の発現

組織	総数	FGF-1				陽性率 (%)	FGF-2				陽性率 (%)
		-	±	+	++		-	±	+	++	
扁平上皮癌	13	0	0	5	8	100	0	0	8	5	100
高分化型	7	0	0	3	4		0	0	4	3	
中等度分化型	1	0	0	0	1		0	0	1	0	
低分化型	5	0	0	2	3		0	0	3	2	
口腔正常粘膜上皮	10	5	5	0	0	50	5	5	0	0	50

染色強度：陰性 (-) 弱陽性 (±) 中等度 (+) 強陽性 (++)

癌¹⁸⁾, また扁平上皮癌¹⁵⁾においても高い FGF-2 発現が認められ, とりわけ Schultz-Hector ら¹⁵⁾は増殖活性が高い扁平上皮癌での FGF-2 の過剰発現を報告している. さらに Kramer ら¹⁹⁾は FGF-2 が腫瘍細胞のプロテアーゼ産生を高めその浸潤能を増大させることを報告しており, FGF の産生と口腔領域悪性腫瘍の浸潤能との関連も示唆されている. また FGF を発現している腫瘍細胞に隣接している間質中では多数の血管新生がみられるという報告もあり^{15,17,20)}, 扁平上皮癌細胞の産生する FGF は腫瘍性血管新生にも関与していると考えられる.

以上, FGF-1 と FGF-2 は口腔扁平上皮癌の自己増殖因子として細胞の腫瘍化の重要な役割を担っていることが示唆された.

結 語

培養扁平上皮癌 Nak 細胞および 13 例の扁平上皮

癌組織と 10 例の正常口腔粘膜上皮について, FGF-1 (線維芽細胞増殖因子 1, または fibroblast growth factor-1) および FGF-2 の発現を免疫組織学的に検討し以下の結果を得た.

1. 増殖期の扁平上皮癌 Nak 細胞は FGF-1 ならびに FGF-2 を発現しており, FGF-1 は細胞質および核周囲に, FGF-2 は細胞質および核に認められた.

2. 免疫組織学的検索において, 正常口腔粘膜上皮に比べ扁平上皮癌では両 FGF の過剰発現が認められた.

引 用 文 献

- 1) Millon, R. R., Cassisi, N. J., et al. : Cancer of the head and neck. In : Derita VT, Hellman S, Rosenberg S. A., Cancer. Principles and practice of oncology, 3rd ed. Philadelphia, JB Lippincott, 1989, p 488-590.

- 2) DeLarco, J. E. and Todaro, G. J. : Growth factors from murine sarcoma virus-transformed cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 75 : 4001-4005 1978.
- 3) Burgess, W. H. and Maciag, T. : The heparin-binding (fibroblast) growth factor family of proteins. *Annu Rev Biochem* 58 : 575-606 1989.
- 4) Jaye, M., Lyall, R. M., et al. : Expression of acidic fibroblast growth factor cDNA confers growth advantage and tumorigenesis to Swiss 3T3 cells. *EMBO J* 7 : 963-969 1988.
- 5) Sasada, R., Kurokawa, T., et al. : Transformation of mouse BALB/c 3T3 cells with human basic fibroblast growth factor cDNA. *Mol Cell Biol* 8 : 588-594 1988.
- 6) Myoken, Y., Kan, M., et al. : Monoclonal antibodies against heparin-binding growth factor-1 (HBGF-1) : neutralization of biological activity and recognition of specific amino acid sequence. *Biochem Biophys Res Commun* 197 : 1450-1457 1993.
- 7) Matsuzaki, K., Yoshitake, Y., et al. : Monoclonal antibodies against heparin-binding growth factor-II/basic fibroblast growth factor that block its biological activity : Invalidity of the antibodies for tumor angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 86 : 9911-9915 1989.
- 8) Miyauchi, S., Moroyama, T. et al. : Malignant tumor cell line produce interleukin-1-like factor. *In vitro Cell Dev Biol* 24 : 753-758 1988.
- 9) Moore, G. E., Gerner, R. E., et al. : Culture of normal human leukocyte. *JAMA* 199 : 519-524 1967.
- 10) Dulbecco, R. and Freeman, G. : Plaque production by the polyoma virus. *Virology* 8 : 396-397 1959.
- 11) Sato, J. D., Kawamoto, T., et al. : Cholesterol requirement of P3-X63 Ag8. 653 and X63-Ag8. 653 mouse myeloma cells for growth *in vitro*. *J Exp Med* 165 : 1761-1766 1987.
- 12) Hsu, S.-M., Raine, L., et al. : Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques : A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 29 : 577-580 1981.
- 13) Yamamoto, N., Matsutani, S., et al. : Immunohistochemical localization of basic fibroblast growth factor in A431 human epidermoid carcinoma cells. *Histochemistry* 96 : 479-485 1991.
- 14) Wu, D., Kan, M., et al. : Characterization and molecular cloning of a putative binding protein for heparin-binding growth factors. *J Biol Chem* 266 : 16778-16785 1991.
- 15) Schultz-Hector, S. and Haghayegh, S. : β -fibroblast growth factor expression in human and murine squamous cell carcinomas and its relationship to regional endothelial cell proliferation. *Cancer Res* 53 : 1444-1449 1993.
- 16) Cattini, P. A., Nickel, B., et al. : Immunolocalization of basic fibroblast growth factor (bFGF) in growing and growth-inhibited placental cells : A possible role for bFGF in placental cell development. *Placenta* 12 : 341-352 1991.
- 17) Stefanik, D. F., Rizkalla, L. R., et al. : Acidic and basic fibroblast growth factor are present in glioblastoma multiforme. *Cancer Res* 51 : 1760-1765 1991.
- 18) Tanimoto, H., Yoshida, K., et al. : Expression of basic fibroblast growth factor in human gastric carcinomas. *Virchow Archiv [B] Cell Pathol* 61 : 263-267 1991.
- 19) Kramer, R. H., Vogel, K. G., et al. : Solubilization and degradation of subendothelial matrix glycoproteins and proteoglycans by metastatic tumor cells. *J Biol Chem* 257 : 2678-2686 1982.
- 20) Zagzag, D., Miller, D. C., et al. : Immunohistochemical localization of basic fibroblast growth factor in astrocytomas. *Cancer Res* 50 : 7393-7398 1990.