上皮成長因子 EGF が癌細胞の浸潤, 転移能に及ぼす影響

—第1報, EGF 長期間処理による悪性形質獲得の可能性—

永易裕樹・柴田敏之・河野 峰

小西 亮*・奥村一彦*・有末 眞

Effects of epidermal growth factor (EGF) on the invasive and metastatic potential of tumor cells

Part 1: Possibility of malignant phenotype acquisition by long-term EGF treatment

Hiroki NAGAYASU · Toshiyuki SHIBATA · Takashi KAWANO

Akira KONISHI* · Kazuhiko OKUMURA* · Makoto ARISUE

Abstract: Tumor cells interact with host reactive cells through the processes of carcinogenesis and tumor growth. Apparently, cytokines and growth factors released from these surrounding host cells affect the malignant phenotypes of tumor cells. In this study, to elucidate the effects of epidermal growth factor (EGF) on malignant phenotype acquisition of tumor cells, we have examined the effects of EGF on the invasive and metastatic potential of regressor ER-1 cells, isolated from a spontaneously developed SHR mammary adenocarcinoma cell line.

When ER-1 cells were pretreated with EGF for 24 hours (24h EGF ER-1), invasive ability was enhanced in an *in vitro* invasion assay using rat lung endothelial cells (RLE). However, the enhancement of the invasive activity of 24h EGF ER-1 was reversible and decreased time-dependently. On day 4, the invasive activity returned to the level of non-treated ER-1 cells. However, ER-1 cells cultured in the presence of EGF for one month (1M EGF ER-1) maintained high and stable invasive ability for two months in the absence of EGF. When 24h EGF ER-1 cells (1×10^5) were intraperitoneally inoculated or intravenously injected into syngeneic SHR rats, 24h EGF ER-1 formed many tumor nodules in the mesentery or lung, as compared with non-treated ER-1 cells. However, this invasive and metastatic potential of 24h EGF ER-1 cells disappeared on day 4. Otherwise, 1M EGF ER-1 cells maintained a high invasive and metastatic potential for two months. These results suggest that EGF enhances the invasive and metastatic potential of tumor cells and that tumor cells may acquire a stable malignant phenotype by long-term EGF treatment.

Key words: epidermal growth factor (上皮成長因子), invasion (浸潤), metastasis (転移), malignant phenotype (悪性形質)

北海道医療大学歯学部口腔外科学第二講座
(主任: 村瀬博文教授)

*北海道医療大学歯学部口腔外科学第一講座
(主任: 金澤正昭教授)

Second Department of Oral Surgery, School of
Dentistry, Health Sciences University of Hokkai-

do (Chief: Prof. Hirofumi Murase)

*First Department of Oral Surgery, School of
Dentistry, Health Sciences University of Hok-
kaido (Chief: Prof. Masaaki Kanazawa)

受付日: 平成6年12月19日

緒 言

口腔癌の治療において、癌細胞のもつ浸潤能、転移能などの悪性形質は、再発、転移を招来し、治療上重大な障害となっている。しかし、癌細胞のもつ悪性形質は、発癌当初より有しているものではなく、その発生、増殖過程において、外因性の突然変異原物質や、癌細胞周囲に存在する宿主反応細胞より産生される種々の増殖因子、サイトカイン等によって促進され、獲得される可能性が明らかにされてきている¹⁻⁵⁾。これまで、われわれは、これら増殖因子、サイトカインのうち EGF に注目し、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を検討してきた。その結果、EGF の 10ng/ml 24 時間処理により、*in vitro* invasion assay による内皮細胞下への浸潤能の増強、random motility の増強、さらには細胞外マトリックス分解酵素の産生促進を生じることを認め、EGF がヒト口腔癌細胞の浸潤・転移に促進的に作用し、悪性形質の獲得をもたらす可能性のあることを報告してきた⁶⁾。しかし、EGF が癌細胞の悪性形質獲得に及ぼす影響についての十分な検討はいまだなされておらず、特に EGF が長期間作用した場合の影響についての検討はない。また、ヒト口腔癌細胞を用いた場合、その性質が発癌過程における progression の後の細胞と考えられること、*in vivo*での検討が困難であることなどより、悪性形質獲得の検討に制限があった。

そこで、今回、EGF が癌細胞の浸潤・転移能などの悪性形質獲得に及ぼす影響を明らかにするために、癌 progression 機序の解明に有用であることが報告されている⁷⁾ 高血圧自然発症ラット (SHR) 乳癌細胞 (c-SST-2) より分離された造腫瘍性、浸潤・転移能の著しく低いクローン ER-1 細胞を用いて、EGF 処理期間の違い、特に EGF 長期間処理が ER-1 細胞の造腫瘍性および浸潤・転移能獲得におよぼす影響を *in vivo*、*in vitro*において検討した。

材料と方法

1. 動物

高血圧自然発症ラット (SHR) は日本ラット株式会社より購入し、実験には 7~10 週齢の雌を用いた。

2. 細胞

腫瘍細胞は、SHR ラット自然発生乳癌細胞の培養株 (c-SST-2) を突然変異原物質 ethylmethansulfonate (250 μ g/ml) で 24 時間処理し、さらに、Oua-bain, 6-thioguanine の両者に対して耐性を示すクローンのうち造腫瘍性の極端に低下した退縮型癌細胞 ER-1 細胞を用いた⁷⁻⁹⁾。また、ラット肺血管内皮細胞 (rat lung endothelial cell: RLE 細胞) は F344 ラットの肺毛細血管より分離されたものを用いた¹⁰⁾。

3. 細胞培養

ER-1 細胞は、7% fetal bovine serum (FBS, 56 $^{\circ}$ C, 30 分不活化) を含む Eagle's minimum essential medium (MEM) 培地にて、また RLE 細胞は、1%ゼラチンでコートしたシャーレ上で 10%FBS を添加した Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 培地にて 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂, 95% air 条件下で培養維持した。

4. EGF 処理

ER-1 細胞の EGF 処理はヒトリコンビナント EGF (ヒト rEGF: 大塚製薬) を用いて、EGF 濃度が 10ng/ml となるように添加した培地で、24 時間もしくは 1 か月間培養し、EGF 処理を行った。処理した細胞は、その後、EGF 非存在下で培養し、以下の実験に用いた。

5. *In vitro* invasion assay

Akedo らの方法^{11, 12)} に準じて行った。すなわち、1%ゼラチンでコートした 60mm グリッド付きシャーレに RLE 細胞を 5 $\times$ 10⁵個撒き、これに 10%FBS 添加 DMEM 培地を加え通法にて培養し、ほぼ confluent になった時点で、一層の RLE 細胞上に、各 EGF 処理を行った ER-1 細胞をそれぞれ 5 $\times$ 10⁴個重層培養し、10%FBS 添加 DMEM 培地にて培養した。96 時間重層培養後に RLE 細胞下にもぐりこみ形成された ER-1 細胞のコロニー数を位相差顕微鏡 (CH50A, オリンパス社製) にて観察した。観察は、1つのシャーレで無作為に選んだ 2 $\times$ 2 mm のグリッド 125 区画のコロニー数を計測して行った。次に、これを単位面積 (cm²) あたりのコロニー数に換算し、同様の実験を 3 回行い、その平均値を浸潤能として評価した。なお、単層培養した RLE 細胞上で増殖している ER-1 細胞は、位相差顕微鏡下で観察すると、周囲との境界が明瞭な細胞として観察され、RLE 細胞下にもぐり込み増殖した ER-1 細胞は、周囲との境界が不明瞭なコロニーとして確認された (写真 1, 図 1)。

6. 腫瘍移植

ER-1 細胞、24 時間もしくは 1 か月間 EGF 処理した ER-1 細胞を、1 $\times$ 10⁵個、同系ラット腹腔内に移植し、15 日あるいは 50 日後に屠殺後開腹し、腸間膜、大網部に浸潤増殖した腫瘍の摘出を行い、その重量を計測し、浸潤増殖の程度を評価した。また、尾静脈内移植による人工転移の系においては、各処理 ER-1 細胞を 1 $\times$ 10⁵個の尾静脈内移植後、50 日目にラットを屠殺し、肺表面に観察される転移結節の数と肺重量を計測し評価した。

7. 統計

得られたデータは、mean $\pm$ SD で表示した。また、各群間有意差検定は、Student's *t*-test を用い、*p*<0.05 をもって有意とした。

写真1 *In vitro* invasion assay 時の位相差顕微鏡像
写真左は無処理 ER-1 細胞, 右は EGF24 時間処理後の ER-1 細胞で, RLE 細胞下にコロニー形成が認められる。

図2 EGF (10ng/ml) 24 時間処理後の細胞数

2. EGF が *in vitro* 浸潤能に及ぼす影響

1) EGF24 時間処理による変化

無処理 ER-1 細胞は, RLE 細胞下に $11.7 \pm 2.9 / \text{cm}^2$ のコロニーを形成するに過ぎなかったが, EGF24 時間処理により RLE 下に形成されるコロニーは, $42.2 \pm 9.1 / \text{cm}^2$ にまで増加し, 有意 ($p < 0.01$) な浸潤能の促進が認められた。しかし, EGF24 時間処理後, EGF 非存在下で培養し続けると経時的に $23.6 \pm 7.6 / \text{cm}^2$, $18.4 \pm 7.6 / \text{cm}^2$, $10.4 \pm 4.7 / \text{cm}^2$ と低下し, 4 日目には元の ER-1 細胞のレベルに戻り, EGF24 時間処理による浸潤能の増強は一過性の可逆的变化であることが示された (図3)。

2) EGF 長期間 (1 か月) 処理による変化

EGF 1 か月間処理し, その後, 1 か月間および 2 か月間 EGF 非存在下の状態で培養した ER-1 細胞の浸潤能は, 1 か月間 EGF 非存在下の ER-1 細胞で $38.6 \pm 5.3 / \text{cm}^2$, 2 か月間 EGF 非存在下の ER-1 細胞で $36.2 \pm 2.9 / \text{cm}^2$ と無処理 ER-1 細胞の浸潤能 $13.8 \pm 4.6 / \text{cm}^2$ と比べ有意 ($p < 0.001$) に高い浸潤能を維持していた (図4)。このことは, ER-1 細胞を 1 か月間 EGF 処理すると, 促進された浸潤能は, その後 2 か月間 EGF 非存在下の状態で培養しても, 元の無処理 ER-1 細胞のレベルに戻ることなく安定した形質として維持されることを示した。

3. EGF が ER-1 細胞の *in vivo* における造腫瘍性および浸潤, 転移能に及ぼす影響

1) 腹腔内移植における変化

無処理 ER-1 細胞を SHR ラットの腹腔内 (1×10^5 個) に移植した場合, 5 匹全例において腫瘍は自然退縮していたが, EGF24 時間処理 ER-1 細胞では 5 匹全例に腫瘍の形成が観察された。しかし, EGF24 時間処理後 4 日間 EGF 非存在下の状態で培養した ER-1 細胞は, 5 匹全例に腫瘍の形成が観察されなくなり, *in vitro* の結果と同様に可逆的で 4 日間 EGF 非存在下で

図1 *in vitro* invasion assay のシェーマ

1%ゼラチンをコートしたシャーレ上に, RLE を単層培養し, その上に癌細胞を重層培養し, 96 時間重層培養後, RLE 下にもぐり込み形成された癌細胞のコロニー数を位相差顕微鏡下にて観察した。

(図は文献 11, 12 を参考に作製した。)

結 果

1. EGF が *in vitro* 増殖に及ぼす影響

ER-1 細胞を, EGF10ng/ml で 24 時間処理し, その後 EGF 非存在下で培養し, 経日的に細胞数を観察した。

培養開始 1 日目, 2 日目においては, EGF 処理群, 無処理群に差は認められなかったが, 3 日目, 4 日目では, EGF 処理群 (50.1 ± 7.2) $\times 10^4$ 個, (66.3 ± 9.9) $\times 10^4$ 個, 無処理群では (27.6 ± 9.4) $\times 10^4$ 個, (35.0 ± 10.1) $\times 10^4$ 個と, 3 日目以降に有意 ($p < 0.05$) な細胞数の増加が認められた (図2)。

図3 EGF24時間処理 ER-1細胞の*in vitro*浸潤能の経時的変化

ER-1細胞の浸潤能は、EGF24時間処理により有意に促進された。しかし、その変化は可逆的で、EGF非存在下で培養すると ER-1細胞の浸潤能は経時的に低下し、4日目には、元の ER-1細胞と同等となった。

図4 EGF1か月間処理 ER-1細胞の*in vitro*浸潤能の変化

EGF1か月間処理した ER-1細胞は、EGF非存在下で1か月間および2か月間培養しても高い浸潤能を維持していた。

培養することによって、元の ER-1細胞の状態に戻っていた(表1)。

一方、EGF1か月間処理 ER-1細胞ではその後、1か月間 EGF非存在下で培養しても6匹中4匹、2か月間 EGF非存在下で培養しても5匹全例に腫瘍の形成が観察され、EGF1か月間処理により ER-1細胞は、その後少なくとも2か月間高い造腫瘍性を維持することが示された(表2)。また、肉眼的所見として、この EGF処理 ER-1細胞では腹水形成はせず、腸間膜、大網部に浸潤性に増殖した腫瘍の結節として観察された(写真2)。

2) 尾静脈内移植による実験的肺転移能の変化

無処理 ER-1細胞では、肺転移巣の形成は、5匹中2匹に認められ、形成されたコロニー数は 0.4 ± 0.4 個であった。これに対し、EGF24時間処理 ER-1細胞では5匹中4匹に肺転移巣の形成が認められ、コロニー数も 31.7 ± 10.4 個と有意 ($p < 0.02$) に増加していた。しかし、EGF24時間処理後4日間 EGF非存在下で培養すると、ER-1細胞の肺転移能はその頻度が6匹中2匹に低下し、コロニー数も 1.8 ± 2.4 個と低下した。

一方、EGF1か月間処理 ER-1細胞は、その後1か月間 EGF非存在下で培養しても肺転移巣の形成が全例に認められ、コロニー数も 103.7 ± 20.5 個と有意に高い値を示し、安定した形質を示していた(表3)。

表1 EGF24時間処理 ER-1 の腹腔内移植における変化

移植細胞	腫瘍の生着 (匹数)	腫瘍結節の総重量 (g) ±SD
無処理 ER-1 細胞	0/5	0
EGF24 時間処理直後 ER-1 細胞	5/5	0.28±0.2*
EGF24 時間処理 4 日目 ER-1 細胞	0/5	0

EGF (10ng/ml) 24 時間前処理し, 処理直後と処理後 4 日目の ER-1 細胞 (1×10⁵個) を腹腔内移植し, 移植 15 日目に開腹し, 腸間膜の腫瘍結節を摘出し, 重量を測定した. *P<0.02

表2 EGF 処理 1 か月処理 ER-1 細胞の腹腔内移植における変化

移植細胞	腫瘍の生着 (匹数)	腫瘍結節の総重量 (g) ±SD
無処理 ER-1 細胞	1/5	3.7±7.2
EGF1 か月処理後 1 か月目 ER-1 細胞	4/6	31.6±3.59*
EGF1 か月処理後 2 か月目 ER-1 細胞	5/5	35.0±3.52*

EGF (10ng/ml) 1 か月間処理し, 処理後 1 か月間もしくは 2 か月間 EGF 非存在下で培養された ER-1 細胞 (1×10⁵個) を腹腔内移植し, 移植後 50 日目に開腹し, 腸間膜の腫瘍結節を摘出し, 重量を測定した. *P<0.01

写真2 EGF 処理 ER-1 細胞の腹腔内移植における変化 EGF (10ng/ml) 1 か月間処理後, 2 か月間 EGF 非存在下で培養した ER-1 細胞 (1×10⁵個) を腹腔内移植し, 50 日間に開腹した. EGF 処理 ER-1 細胞は, 腸間膜に浸潤し, 著明な腫瘍結節を形成していた.

考 察

本研究で用いた ER-1 細胞は, SHR ラット自然発生乳癌細胞 (c-SST-2) より分離され, 造腫瘍性および浸潤・転移能が極端に低下した退縮型クローンとして樹立された. この ER-1 細胞 1×10⁴個を正常同系宿主に移植すると全例自然退縮するが, 大量移植 (1×10⁶個以上) あるいは, 放射線照射で免疫能を低下させた宿主に移植すると致死的増殖を示すようになる. また, この ER-1 細胞はプラスチックプレートとともに移植すると致死的増殖を示すようになり, その増殖した細胞を再び培養し, 得られた株を同系宿主に移植すると, もはやプラスチックプレートが必要とせず, 元の ER-1 細胞に比べ高い造腫瘍性, 浸潤・転移能を獲得した癌細胞に変換することが示されている⁷⁾. その原因として, プラスチックプレートによって誘発される慢性炎症により, 同部に集まる宿主反応細胞と癌細胞との直接作用, あるいは宿主反応細胞が産生する炎症性サイトカイン, 種々の増殖因子 (EGF, TGF- α , TGF- β など) を介した作用による可能性が示唆され, 癌細胞の悪性化進展モデルとして有用であることが報告されている¹³⁾. 今回検討に用いた EGF は 53 個のアミノ酸からなる分子量 6,045 の熱, 酸に安定なタンパク質として 1962 年 Cohen によって見い出され¹⁴⁾, 表皮角化細胞をはじめとする上皮由来の正常細胞の増殖や分

表3 EGF 処理による ER-1 細胞の肺転移能の変化

ER-1 細胞の EGF 処理		肺転移個体数 (匹数)	肺重量 (g±SD)	肺転移コロニー数 (Mean±SD)
EGF 処理時間	EGF 非存在下培養時間			
0 時間	0 時間	2/5	1.9±0.1	0.4± 0.4
24 時間	0 時間	4/5	1.8±0.2	31.7±10.4*
24 時間	4 日間	2/6	1.8±0.2	1.8± 2.4
1 か月	1 か月	4/4	1.9±0.3	103.7±20.5**

EGF (10ng/ml) 存在下で各時間 ER-1 細胞を培養し、その後各時間 EGF 非存在下で培養し、これらの細胞 (1×10⁵個) を SHR ラット尾静脈内移植し、50 日目に肺転移コロニー数を計測した。

*P<0.02, **P<0.001 VS 無処理 ER-1 細胞

化を促進させること以外に、癌細胞の増殖、形態的变化などにも影響を及ぼし、癌細胞の増殖、浸潤、転移能に深く関与することが明らかにされている^{15, 16)}。また、ヒト口腔扁平上皮癌細胞は、EGF 受容体を過剰に発現しており¹⁷⁾、EGF により、その浸潤、転移能が増強される可能性も示唆されてきている^{6, 18, 19)}。

本研究の結果、EGF は、ER-1 細胞の増殖を促進するとともに、*in vitro* invasion assay で評価した浸潤能を有意に促進することが示された。この EGF による ER-1 細胞の浸潤能の増強は、EGF による ER-1 細胞の増殖の促進の割合に比べ著しく高い変化を示すことより、単に ER-1 細胞の増殖性の促進によって、もたらされた結果ではなく、EGF が ER-1 細胞の RLE 細胞下への潜り込む能力を亢進することによって生じた現象であると考えられた。また、EGF24 時間処理後の ER-1 細胞は、EGF 処理直後で RLE 細胞下への浸潤能が強く促進されたが、その作用発現は一過性であり、EGF 非存在下で 4 日間培養することで元の ER-1 細胞の性格に戻っていた。しかし、EGF 1 か月間処理 ER-1 細胞は、その後 2 か月間 EGF 非存在下で培養しても安定した浸潤能の亢進が維持され、長期間 EGF 処理することにより ER-1 細胞の浸潤能が安定した形質として獲得される可能性が示唆された。

また、これら EGF 処理により *in vitro* で浸潤能の亢進した ER-1 細胞の性格を *in vivo* で検討したところ、無処理 ER-1 細胞は腹腔内移植において、浸潤性の増殖をほとんど示さないのに対し、EGF24 時間処理 ER-1 細胞では、腸間膜への強い浸潤性増殖が観察された。しかし、この現象は *in vitro* invasion assay の結果と同様に可逆的で、4 日目には元の ER-1 細胞の状態に戻っていた。一方、EGF 1 か月間処理した ER-1 細胞では、その後 2 か月間 EGF 非存在下でも高い浸潤能を示していた。さらに、EGF 処理 ER-1 細胞を腹腔内移植した場合、腹水形成は認められず腫瘍細胞は、腸間膜、大網部に浸潤し結節状に増殖していた。このことは、腹腔内移植された EGF 処理 ER-1 細胞

が腸間膜、大網部などの漿膜に浸潤しその後、増殖したと考えられた。また、尾静脈内移植による肺転移能を検討したところ、ER-1 細胞の肺転移能は、24 時間 EGF 処理により著しく増強された。また、24 時間 EGF 処理による転移能の増強は可逆的であるものの、EGF 1 か月間処理した ER-1 細胞では安定した高い肺転移能を発現していた。以上の結果は、EGF24 時間の短期間処理では浸潤・転移能の亢進は一過性であるが、1 か月間の長期間処理では、固定化した高い浸潤・転移能を EGF がもたらす可能性を示唆した。

一般に、癌細胞は転移成立過程において、原発巣からの遊離、細胞間質内の運動、脈管内侵入、移動、内皮細胞への接着、脈管外脱出、細胞間質内移動、増殖と数多くの過程を踏むことが知られている²⁰⁾。この過程のなかで癌細胞の脈管内外への侵入、脱出は、癌細胞の転移形質を規定する重要な因子であると考えられている。また、今回検討した *in vitro* invasion assay は、この脈管内皮を通過する癌細胞の能力を評価する方法として有用であることが知られている^{11, 12)}。今回の結果で EGF 処理により ER-1 細胞が *in vivo* で腸間膜、漿膜に浸潤性の増殖や、肺転移の促進といった浸潤・転移能の増強を示した理由として、*in vitro* invasion assay で示された内皮細胞間をくぐり抜ける能力の亢進、すなわち、transcellular migration 能の亢進が重要な役割をなしていると考えられた。現在、この、transcellular migration 能の亢進機序については、明渡らが、ラット腹水肝癌細胞 (AH 細胞) を用いて検討し、低分子量 G タンパク ras スーパーファミリーの一員である rho の活性化、およびこれに続く接着斑キナーゼ (focal adhesion kinase) のチロシンリン酸化が関与していることが示されてきている²¹⁾。今後、ER-1 細胞の系でも同様のシグナル伝達が生じているのか否か、検討を加える必要があると考えられた。

先に、Hamada ら⁷⁾ は、ER-1 細胞をプラスチックプレートとともに移植すると、長期間安定した悪性形質を示していることより、そのプラスチックプレート

により誘導された宿主反応細胞と癌細胞の直接的あるいは宿主反応細胞の産生する液性因子等を介して、ER-1細胞が遺伝的变化を受け悪性形質を獲得した癌細胞(ERpP細胞)に変換した可能性を明らかにしている。また、Renら²²⁾は、この悪性形質を獲得したERpP細胞に、EGF受容体の一部に相同性のあるc-erbB-2の遺伝子産物が、ER-1細胞では弱陽性であるのに対して、ERpP細胞ではよく発達した微絨毛に一致して強陽性となっていることを確認し、ER-1細胞に遺伝的变化をもたらした可能性を推察している。これらの既報告結果と今回のEGF長期間処理により、その後2か月間安定した形質を示していた結果とを考えると、EGF長期間処理によりER-1細胞がERpP細胞と同様に遺伝的变化を受け悪性形質を獲得した可能性が強く示唆された。一方、今回認められた現象が遺伝的变化ではなく、単にER-1細胞中に存在するEGFに対して感受性の高い細胞集団が長期間のEGF処理によって、選択的に増殖した結果認められた現象である可能性もあると考えられた。このため、今後、今回認められた現象の機序を明らかにするため、ER-1細胞およびEGF1か月間処理したER-1細胞のEGF受容体の発現量の変化、また、正常細胞にとっては恒常性を保つべく働くEGFが癌細胞にとって突然変異原物質となり得るかどうか等の検討を加え、明らかにしていく必要があると考えられた。

結 語

本研究で認められた現象は、癌細胞をとりまく微小環境中に存在する増殖因子EGFが、長期間作用することによって、癌細胞の悪性形質の獲得をもたらす可能性、さらには、EGFが発癌後のtumor progression因子として作用する可能性を示唆した。また、ヒト口腔癌細胞においてもER-1細胞のように浸潤・転移能の著しく低い細胞ではEGF長期間作用によりER-1細胞で認められた現象が生じ得る可能性が推察された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、終始懇切なご指導と御校閲を賜りました北海道大学医学部癌研究施設病理部門細川真澄男教授、癌研究施設細胞制御部門武市紀年教授、浜田淳一講師に厚くお礼申し上げます。

本論文の要旨の一部は第53回日本癌学会総会(1994年10月20日名古屋)、第39回日本口腔外科学会総会(1994年11月8日名古屋)において発表した。

本研究の一部は文部省科学研究費補助金(一般研究C、課題番号06672015)によった。

引 用 文 献

- 1) Nowell, P.C.: Mechanisms of tumor progression. *Cancer Res* 46: 2203-2207 1986.
- 2) Wie, W. and Heppner, G.H.: Tumor infiltrating lymphocytes of spontaneous versus transplanted mouse mammary tumors. *Cancer Immunol Immunother* 26: 257-262 1988.
- 3) Rice, G.E., Gimbrone, M.A., et al.: Tumor cell-endothelial interaction. *Am J Pathol* 133: 204-211 1988.
- 4) Breilout, F., Antonie, E., et al.: Promotion of micrometastasis of proliferation in a rat rhabdomyosarcoma model by epidermal growth factor. *J Natl Cancer Inst* 81: 702-705 1989.
- 5) Mukai, M., Shinkai, K., et al.: Potentiation of invasive capacity of rat ascites hepatoma cells by transforming growth factor- β . *Jpn Cancer Res* 85: 107-110 1989.
- 6) 柴田敏之, 河野 峰, 他: EGFがヒト口腔扁平上皮癌細胞の浸潤, 転移能におよぼす影響. *日口外誌* 40: 6-13 1994.
- 7) Hamada, J., Takeichi, N., et al.: Progression of weakly malignant clone cells derived from rat mammary carcinoma by host cells reactive to plastic plates. *Jpn J Cancer Res* 83: 483-490 1992.
- 8) Hamada, J., Takeichi, N., et al.: Inverse correlation between the metastatic capacity of cell clones derived from a rat mammary carcinoma and their intercellular communication with normal fibroblasts. *Jpn J Cancer Res* 78: 1175-1178 1987.
- 9) Okada, F., Hamada, J., et al.: Experimental approach for the investigation of tumor progression. *Jpn J Cancer Chemother* 16: 1210-1218 1989.
- 10) Nakajima, M., Weich, D.R., et al.: Degradation of basement membrane type IV collagen and lung subendothelial matrix by a rat mammary adenocarcinoma cell clones of differing metastatic potential. *Cancer Res* 47: 4869-4876 1987.
- 11) Akedo, H., Shinkai, K., et al.: Interaction of rat ascites hepatoma cells with cultured mesothelial cell layers: a model for tumor invasion. *Cancer Res* 46: 2416-2422 1986.
- 12) Ohigashi, H., Shinkai, K., et al.: *in vitro* invasion of endothelial cell monolayer by rat ascites hepatoma cells. *Jpn J Cancer Res* 80: 818-821 1989.
- 13) Xiabin, L., Nagayasu, H., et al.: Enhancement of tumorigenicity and inva-

- sion capacity of rat mammary adenocarcinoma cells by epidermal growth factor and transforming growth factor- β . Jpn J Cancer Res 84 : 1145-1149 1993.
- 14) Cohen, S.: Epidermal growth factor. Biosci Rep 6 : 1017 1986.
- 15) Lund-Johansen, M., Bjerkvig, R., et al.: Effect of epidermal growth factor on glioma cell growth, migration and invasion *in vitro*. Cancer Res 50 : 6039-6044 1990.
- 16) Boyd, D.: Examination of the effects of epidermal growth factor on the production of urokinase and the expression of the plasminogen activator receptor in a human colon cancer cell line. Cancer Res 49 : 2427-2432 1989.
- 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) Neidbala, M.J. and Sartorelli, A.C.: Regulation of epidermal growth factor of human squamous cell carcinoma plasminogen activator-mediated proteolysis of extracellular matrix. Cancer Res 49 : 3302-3309 1989.
- 19) Hayashido, K., Shirasuna, K., et al.: Effect of epidermal growth factor on invasion human squamous cell carcinoma cells into collagen gel. The Cancer Journal 4 : 257-261 1991.
- 20) Nicolson, G.L.: Cancer Metastasis Rev 7, Texas, USA, 1988, P143-188.
- 21) 明渡 均, 新貝清子, 他 : モノレイヤー浸潤モデルの開発と浸潤のシグナル伝達路解明へのアプローチ. 実験医学 12 : 1076-1081 1994.
- 22) Ren, J. Hamada, J., et al.: Correlation between the presence of microvilli and the growth or metastatic potential of tumor cells. Jpn J Cancer Res 81 : 920-926 1990.
-