EGF (Epidermal Growth Factor) オートクリン作用による ヒト口腔扁平上皮癌細胞の運動能促進

河野 峰・柴田敏之・永易裕樹・北所弘行
中田大地・有末 眞

Enhancement by epidermal growth factor (EGF) of motility of human oral squamous cell carcinoma cells in an autocrine manner

Takashi KAWANO・Toshiyuki SHIBATA・Hiroki NAGAYASU
Hiroyuki KITAJYO・Daichi NAKATA・Makoto ARISUE

Abstract: We studied whether epidermal growth factor (EGF) enhances the motility of human oral squamous cell carcinoma (SCC) cells in an autocrine manner. The motility of five SCC cell lines (SAS, Ca 9-22, HSC-2, -3, -4) was examined with the use of a phagokinetic track assay. The motility of SAS cells and HSC-2 cells was significantly increased without EGF stimulation as compared with the three other cell lines. Amounts of EGF in the culture supernatants of the five cell lines after 48h of culture were examined with the immunoblotting method. EGF was detected in the supernatants of SAS cells and HSC-2 cells (SAS, 8.65 ± 0.45 ; HSC-2, $2.60 \pm 1.13 \text{ ng/ml}$). SAS cells, showing the highest levels of motility and EGF production, was used for further study. When SAS cells were treated with anti-EGF antibody, anti-EGF receptor antibody, and erbstatin analog, the motility of SAS cells was significantly inhibited. Furthermore, the culture supernatant of SAS cells enhanced the motility of HSC-3 cells in a concentration-dependent fashion. These results suggest that EGF may stimulate the motility of human oral SCC cells in an autocrine manner.

Key words: oral squamous cell carcinoma (口腔扁平上皮癌), epidermal growth factor (上皮成長因子), motility (運動能), autocrine loop (オートクリン機構)

緒 言

口腔癌の治療成績は診断技術や治療法の進歩に伴い近年著しい向上を遂げてきている。しかし、癌細胞のもつ浸潤・転移能に起因する再発・転移により制御不能となる場合も多く存在し、治療成績向上の障害の一

つとなっている。このような癌細胞の浸潤・転移能は発癌当初から備わっているわけではなく、癌細胞周囲の実質・間質細胞をはじめとする宿主正常細胞などの微小環境において、さまざまな増殖因子、サイトカインなどの修飾により徐々にその性格を備えていくと考えられている¹⁾。

先にわれわれは、上皮成長因子 (Epidermal Growth Factor: EGF) に注目し、EGF がパラクリン様式に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た。その結果、EGF がヒト口腔扁平上皮癌細胞の運動能を亢進させ、マトリックスメタロプロテナーゼ-9 (MMP-9, 92kDa ゼラチナーゼ) や urokinase-

北海道医療大学歯学部口腔外科学第二講座
(主任：有末 眞教授)

Second Department of Oral Surgery, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido
(Chief: Prof. Makoto Arisue)

受付日：平成9年2月12日

type Plasminogen Activator (u-PA) などのマトリックス分解酵素の産生を増強することを見出し、EGF がヒト口腔扁平上皮癌細胞の浸潤・転移能に促進的に作用している可能性を報告した²⁾。また、この検討に於いて、EGF 無刺激でも著しく高い運動能を有する細胞株が観察された。そこで、ヒト口腔扁平上皮癌細胞がパラクリン様式のみならず、自らが EGF を産生し、その浸潤・転移能を促進する能力を獲得している可能性を推察し、今回、ヒト口腔扁平上皮癌細胞の運動能が、EGF オートクリン様式でも亢進されているか否かを検討した。

材料および方法

1. 培養細胞

細胞は、細胞バンク (JCRB) より供与されたヒト口腔扁平上皮癌細胞株 SAS³⁾、Ca 9-22^{4, 5)}、HSC-2、HSC-3、HSC-4^{4, 6)} 細胞を用いた (表 1)。また、口腔扁平上皮癌細胞の培養には、10% fetal bovine serum (FBS, 56℃, 30分不活化) を添加した Ham's F12 medium と Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) との混合培地 (D/F12培地) にて、37℃, 5%CO₂, 95%air 条件下で培養維持した。なお、今回の以下の実験は、先にわれわれが報告した結果²⁾を継続するために、EGF 刺激に対し良好な応答性が得られ、FBS の影響が比較的少ないと考えられる 1%FBS 添加 D/F-12培地を用いて検討した。

2. 細胞増殖の測定

1) 標準曲線

5系のヒト口腔扁平上皮癌細胞を96穴プラスチックプレートに2.5×10²~1×10⁵個/ウェルまでの9段階に細胞数をふり、1%FBS 添加 D/F12培地200μl中に播き、5%CO₂, 37℃にて6時間培養後5%グルタルアルデヒド50ml/ウェル添加し30分間固定した。これを蒸留水で洗浄し完全に乾燥させ、0.1%クリスタルバイオレット50mM CAPS (pH9.4) 50ml/ウェル添加し30分間染色後、再び洗浄、乾燥させ、10%酢酸50ml/ウェル添加により可溶化し、この吸光度を波長595nmのmicroplate readerで計測し標準曲線を作成した。

2) 増殖曲線

標準曲線を参考にして、HSC-3細胞は5×10³個/ウェル、他の4系は2.5×10³個/ウェルの細胞を1%FBS 添加 D/F12培地200μl中に播き、培養開始2日目、4日目の細胞を上記の方法にて染色後、microplate readerにて計測し標準曲線より細胞数を算出した。

3. 運動能の測定

運動能の測定は Albrecht-Buehler の Phagokinetic track assay に準じて行った⁷⁾。

表 1 本研究に用いたヒト口腔扁平上皮癌細胞株

細胞株	原発巣／樹立部位	分化度	文献
SAS	舌癌原発巣	低分化	5
Ca 9-22	下顎歯肉癌原発巣	高分化	6, 7
HSC-2	口底癌リンパ節転移巣	高分化	6, 8
HSC-3	舌癌リンパ節転移巣	低分化	6, 8
HSC-4	舌癌リンパ節転移巣	高分化	6, 8

この表は、文献5, 6, 7, 8より引用し作成した。

1) 金コロイドのコート

14.5mM AuCl₄H 水溶液 (J. T. Baker Chemical, Phillipsburg, NJ) 1.8ml に36.5mM Na₂CO₃ 水溶液 6ml, 蒸留水11mlを加えガスバーナーで沸騰させ、その後0.1%ホルムアルデヒド溶液1.8mlを加え金コロイド溶液を作製した。次いで、1%ウシ血清アルブミン (BSA) でコートした18mm×18mmのカバークラス上に金コロイド溶液を滴下し45分間静置し金粒子をカバーガラスに付着させた。

2) Phagokinetic track assay

金コロイドをコートさせたカバーガラスをペニシリン50mg/ml, ストレプトマイシン50mg/ml, ネオマイシン100mg/mlを含むPSN 抗生物質混合物 (Gibuco, Grand Island, NY) 添加 D/F12培地で3回洗浄し、これをPSNを含む1%FBS 添加 D/F12培地を入れた35mm 培養皿内に静置させ、この上に各癌細胞を2×10³/dish 播き、CO₂インキュベーター内で24時間培養した。培養終了後、カバーガラスを10%ホルマリン溶液にて30分間固定し、蒸留水にて洗浄後、このカバーガラスをスライドガラスにマウントし標本とした。なお各群5枚の標本をおのおの作製し、この標本より1枚ごとに無作為に細胞を20個選択し、細胞が移動することにより作られた金コロイド粒子の空隙の面積を画像解析装置 (CosmozoneR500 Nikon, 東京) で計測し、この平均値を運動能として評価の対象とした。

4. 培養上清中の EGF の検索

6穴プラスチックプレートに5×10⁵個/ウェルの各株の癌細胞をまき、血清非存在下で48時間培養後の培養上清を回収した。培養上清を4℃下20,000×gで遠心し、この上清200mlを標本とした。スタンダードとして、D/F12培地にて希釈したヒト・リコンビナント EGF (0.12~62.5ng/ml) を作製した。回収した標本中に含まれる EGF 量は、抗 EGF 抗体 (Oncogene Science) を用いたイムノブロット法を行った後、プロットの濃度を画像解析し比較定量にて算出した。なお、各標本はおのおの3本ずつ作製し、その平均にて有意差の検定を行い評価した。

図1 ヒト口腔扁平上皮癌細胞の運動能
1%FBS添加D/F-12培地にてphagokinetic track assayを行い検討した。

図2 ヒト口腔扁平上皮癌細胞の増殖能
1%FBS添加D/F-12培地にて各細胞を培養し、その細胞数の変化を検討した。

表2 ヒト口腔扁平上皮癌細胞培養上清中のEGF量

細胞株	EGF (ng/ml)/2.5×10 ⁵ 個/48時間
SAS	8.65±0.45
Ca9-22	ND ^a
HSC-2	2.60±1.13
HSC-3	ND
HSC-4	ND

a. ND: not detected

各細胞株を無血清D/F-12培地に5×10⁵個播き、48時間後の培養上清をイムノブロット法にて検索した。

5. 抗体および薬剤処理

抗EGF抗体、抗EGF受容体抗体 (Oncogene Science, Uniondale, NY) をおのおの50ng/ml, 5μg/mlの濃度となるようにPhagokinetic track assayの1%FBS添加D/F-12培地に添加し、処理を行った。特に抗EGF抗体は、本実験系におけるTGF-αの関与を否定するために、中和活性のあるものを選択し用いた。また、同様にErbstatin analog (Biomol, Plymouth Meeting, PA) を0.4, 2, 10μMの濃度となるようにPhagokinetic track assayの1%FBS添加D/F-12培地に添加し、処理を行った。なお、抗体処理では各モノクローナル抗体がマウスIgGであったため、対照としてマウスIgG (Oncogene Science, Uniondale, NY) を5μg/mlの濃度となるように培地に添加したものを用いた。

6. SAS細胞培養上清の採取および添加

SAS細胞を6穴プラスチックプレートに5×10⁵個/ウェルまき、培養開始48時間後の上清を採取し、こ

れが12.5~50%濃度となるように新鮮な1%FBS添加D/F12培地に添加した。

結 果

1. ヒト口腔扁平上皮癌細胞5系の運動能の比較

SAS, Ca9-22, HSC-2, HSC-3, HSC-4細胞5系の運動能を細胞株間で比較すると、SAS細胞の運動能が他の4系に比べて高い値を示しているのが観察された。また、HSC-2細胞の運動能はSAS細胞より低いものの、他の3系 (Ca9-22, HSC-3, HSC-4) に比べ有意に高い値を示していた (図1)。

2. ヒト口腔癌細胞の産生・分泌するEGFの検索

EGF無刺激でもSAS細胞は高い運動能を示していたことより、パラクリン様式のみならずオートクリン様式でもEGFが作用している可能性が考えられた。このため口腔癌細胞株5系 (SAS, Ca9-22, HSC-2, HSC-3, HSC-4) の培養上清中のEGF量をイムノブロットにて検索した。SAS細胞の培養上清中には8.65±0.45ng/mlのEGFが検出され、HSC-2細胞では2.60±1.13ng/mlのEGFが検出された。一方、他の3系では検出限界以下であった (表2)。

3. ヒト口腔扁平上皮癌細胞5系の増殖能の比較

5系の細胞株のEGF産生量にその増殖能が影響を及ぼしていないかを検討するために、EGFによる増殖能の比較を行った。細胞増殖の評価は、細胞数の変化を観察し行った。培養開始4日目ではHSC-3細胞の著明な増殖が観察されたが、本研究で検討した培養開始2日目 (48時間) まででは各細胞間に差は認められず、ほぼ同等の増殖状態を示していた (図2)。

図3 抗EGF抗体、抗EGF受容体抗体によるSAS細胞の運動能抑制
1%FBS添加D/F-12培地にてphagokinetic track assayを行い、各抗体処理の影響を検討した。

図4 Erbstatin analog 処理によるSAS細胞の運動能抑制
1%FBS添加D/F-12培地にてphagokinetic track assayを行い、各濃度のErbstatin analogを添加しその影響を検討した。

4. オートクリン様式によるEGFの運動能促進作用

SAS細胞のEGFオートクリン様式を証明するために、EGF受容体への結合を阻害する抗EGF受容体抗体およびEGF受容体に対する基質拮抗型チロシンキナーゼ阻害剤であるErbstatin analog⁸⁾でSAS細胞を処理し、運動能に及ぼす影響を検討したところ、抗EGF受容体抗体および2mM以上のErbstatin analog処理によりSAS細胞の運動能は有意に抑制された。

また、中和活性のある抗EGF抗体を運動能のアッセ

図5 SAS細胞培養上清添加によるHSC-3細胞の運動能増強
1%FBS添加D/F-12培地にてSAS細胞(5×10^5 個)を48時間培養し、得られた培養上清を新鮮な1%FBS添加D/F-12培地に各濃度となるように添加しphagokinetic track assayを行い検討した。

イ系に加え、培地中に存在するEGFを特異的に不活化し、SAS細胞の運動能の変化を検討したところ、SAS細胞の運動能は、抗EGF受容体抗体処理と同等の有意な低下を示した(図3、図4)。

5. SAS培養上清がHSC-3の運動能に及ぼす影響

EGFをパラクリン様式で作用させた場合、最も運動能が強く刺激されたHSC-3細胞を用い、SAS細胞の48時間培養後の培養上清を12.5~50%濃度となるように培地に添加しその運動能の変化を観察した。その結果HSC-3細胞の運動能はSAS培養上清の添加濃度を上げるにしたがって、濃度依存性に有意に促進した(図5)。

考 察

転移成立のプロセスは、癌細胞の原発巣からの遊離にはじまり、脈管内侵入、脈管内移動、標的臓器の内皮への着床、脈管外脱出および標的臓器での増殖といった各ステップからなると考えられている。このなかで、癌細胞の運動能および細胞外マトリックス分解酵素は、癌の転移成立過程で重要な要素と考えられている。先にわれわれは、EGFがEGF受容体を過剰発現しているヒト口腔扁平上皮癌細胞の運動能および細胞外マトリックス分解酵素産生をパラクリン様式に促進していることを見だし、EGFが転移成立に促進的に作用する可能性を報告した²⁾。今回の検討の結果、ヒト口

腔扁平上皮癌細胞は、自らが EGF を産生・分泌し、オートクリン様式で作用し、その運動能を高める能力を獲得していることが示され、オートクリンループによる浸潤・転移の促進が生じている可能性が示唆された。

一般に、癌細胞に及ぼす EGF の作用として、パラクリン的にヒト・グリオーマ細胞、胎児性癌細胞やラット乳癌細胞の運動能を刺激すること^{9,10)}、グリオーマ細胞の MMP-9 および MMP-2 (72kDa ゼラチナーゼ) の産生を増強すること⁹⁾、ヒト扁平上皮癌細胞のウロキナーゼ型 PA (uPA) の産生を増強すること¹¹⁾、さらにはヒト大腸癌細胞の細胞膜面上の uPA レセプター (uPAR) 数を増加させること¹²⁾ などが、報告され浸潤・転移に促進的に作用すると考えられている。また、先に、EGF をヒト口腔扁平上皮癌細胞にパラクリン的に作用させた場合、運動能のみならず、uPA、MMP-9 産生の増強が 1 ng/ml の濃度で観察されている²⁾。今回観察された SAS 細胞の産生する EGF の量は $8.65 \pm 0.45 \text{ ng/ml}$ とヒト口腔扁平上皮癌細胞の浸潤・転移能を促進するのに十分量であり、実際 EGF 単独の効果か否かは不明であるが、SAS の上清が他の細胞株 HSC-3 の運動能を濃度依存的に増強していた。また、EGF 受容体に結合能をもつ増殖因子として、EGF のみならず TGF- α が知られているが、中和活性のある抗 EGF 抗体を SAS 細胞の培地に添加し、培地中に存在する EGF を特異的に不活化したところ、その運動能は、抗 EGF 受容体抗体処理と同等の有意な低下を示していた。このことより、SAS 細胞の高い運動能は、EGF 受容体に結合能をもつ TGF- α 、EGF のうち、EGF により生じている可能性が示された。以上のことより、ヒト口腔扁平上皮癌細胞の産生する EGF が、EGF 受容体を介したオートクリン様式で癌細胞の転移・浸潤能を刺激している可能性が強く示唆された。

一方、EGF 無刺激での SAS 細胞の運動能は、SAS 細胞が産生する EGF を中和できる量の抗 EGF 抗体あるいは抗 EGF 受容体抗体で、有意に抑制されたが、完全に静止させることはできなかった。このことは、SAS 細胞が EGF 以外のオートクリン様式で働く運動刺激因子を産生している可能性、EGF 受容体または他の運動刺激因子のレセプターが Erbstatin analog で影響されない部分ですでに活性化されている可能性、あるいはレセプター・リガンドというシステムを介さずに細胞運動を刺激する別のシグナルが関与している可能性を推察させた。今後これらの課題についてさらに検討を加える必要があると考えられた。また、先にわれわれが報告した EGF 刺激による運動能促進効果の検討²⁾ において無血清 D/F-12 培地を用いた場合、EGF による運動能促進効果が著名ではなかったため、今回の検討も無血清ではなく、良好な運動能促進効果

の得られた 1%FBS を添加した培地を用いて比較検討した。現在、この無血清培地で EGF 刺激の良好な応答性が得られなかった理由として、無血清培地では細胞の活性が低下していた可能性を推察しているが、その詳細は不明であり、今後培地中に添加した FBS が、われわれの実験系にどのような影響を及ぼしているか、更に検討を加える必要があると考えられた。

癌細胞がオートクリン様式で運動能を増強する例として Liotta らの autocrine motility factor (AMF) の報告があるが¹³⁾、EGF オートクリン様式により運動能が促進される報告はない。また、ヒト口腔扁平上皮癌細胞は、先に報告したように、EGF をパラクリン的に作用しても運動能の促進が認められている²⁾。これらの点よりヒト口腔扁平上皮癌細胞は、EGF により制御される癌細胞の浸潤転移能を検討するのに有用な材料となると考えられた。

結 語

1. ヒト口腔扁平上皮癌細胞株 5 系 (SAS, Ca 9-22, HSC-2, HSC-3, HSC-4) を用い EGF 産生能と運動能を検討した結果、2 系 (SAS, HSC-2) に EGF の産生が認められ、産生能に応じた運動能の亢進が認められた。

2. 量も高い EGF 産生能と運動能を示した SAS 細胞を用い、抗 EGF 抗体、抗 EGF 受容体抗体、Erbstatin analog 処理した結果、SAS 細胞では EGF 受容体を介する EGF オートクリン機構を獲得している可能性が示された。

3. 以上の結果は、EGF がヒトの口腔扁平上皮癌細胞の浸潤・転移能をオートクリン作用により促進している可能性を示唆した。

本論文の要旨の一部は、第53回日本癌学会総会 (1994年10月 名古屋)、第39回日本口腔外科学会総会 (1994年11月 名古屋) において発表した。なお、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)、私学振興財団大学院重点特別経費の助成により行われた。

引 用 文 献

- 1) Nicolson, G.L.: Tumor and host molecules important in the organ preference of metastasis. *Sem Cancer Biol* 2: 143-154 1991.
- 2) 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及ぼす影響. *日口外誌* 40: 6-13 1994.
- 3) 高橋喜久雄, 金沢春幸, 他: ヒト舌癌原発巣より得られた低分化型扁平上皮癌細胞株 (SAS) の樹立. *口科誌* 38: 20-28 1989.
- 4) 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.
- 5) 堀越 勝, 木村義孝, 他: 人の歯肉癌由来の細胞株の樹立 (第1報). 日口外誌 20: 100-106 1974.
- 6) 百瀬文雄, 平田章二, 他: 3つの口腔扁平上皮癌由来細胞の性状について. 口科誌 35: 485-496 1986.
- 7) Albrecht-Buehler, G.: The phagokinetic tracks of 3 T 3 cells. *Cell* 11: 395-404 1977.
- 8) Umezawa, H., Imoto, M., et al.: Studies on a new epidermal growth factor-receptor kinase inhibitor, erbstatin, produced by MH 435-hF 3. *J Antibiot* 39: 170-173 1986.
- 9) Lund-Johansen, M., Bjerkvig, R., et al.: Effect of epidermal growth factor on glioma cell growth, migration, and invasion in viro. *Cancer Res* 50: 6039-6044 1990.
- 10) Engstrom, W.: Differential effects of epidermal growth factor (EGF) on cell locomotion and cell proliferation in a cloned human embryonal carcinoma-derived cell line in vitro. *J Cell Sci* 86: 47-55 1986.
- 11) Niedbala, M.J. and Sartorelli, A.C.: Regulation by epidermal growth factor of human squamous cell carcinoma plasminogen activator-mediate proteolysis of extracellular matrix. *Cancer Res* 49: 3302-3309 1989.
- 12) 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.
- 13) Liotta, L.A., Mandler, R., et al.: Tumor cell autocrine motility factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 3302-3306 1986.
-