歯肉癌によって引き起こされる下顎骨浸潤

——特に破骨細胞誘導サイトカインの役割——

柴原孝彦・野間弘康・野村武史
高木 亮・横尾恵子・原田耕志*
岡本正人*・佐藤光信*

Bone invasion by gingival squamous cell carcinoma

—— Focus on role of osteoclast-activated cytokines ——

SHIBAHARA Takahiko・NOMA Hiroyasu・NOMURA Takeshi
TAKAGI Ryo・YOKOO Keiko・HARADA Kouji*
OKAMOTO Masato*・SATO Mitsunobu*

Abstract: Invasion of the mandible by lower gingival squamous cell carcinoma is an important clinical problem. A previous study suggested that bone destruction associated with carcinoma invasion was mediated by osteoclasts rather than by carcinoma cells. However, the mechanisms involved remain unclear. This study focused on the role of various cytokines in activating osteoclastic bone resorption. We microscopically examined 38 specimens of lower gingival carcinoma and classified them into an invasion group (23 cases) and noninvasion group (15 cases). The specimens were examined immunohistochemically with antibodies to parathyroid hormone-related protein (PTHrP), tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-1 α , 1 β , 6, 11, 18, and TGF- β . In the invasion group, the numbers of PTHrP, TNF- α , IL-6, and IL-11 positive cells were significantly higher than those in the noninvasion group ($P < 0.01$). Expression of IL-1 α , 1 β , 18 and TGF- β positive cells did not differ significantly between the groups. Our results strongly suggest that invasion of the mandible by lower gingival cancer is mediated by osteoclasts. Various cancer-derived cytokines, including PTHrP, TNF- α , IL-6, and IL-11, play important roles in bone invasion by lower gingival squamous cell cancers.

Key words: squamous cell carcinoma (扁平上皮癌), bone invasion (骨浸潤), bone resorption (骨吸収), histopathological study (病理組織学的検討), osteoclast activated cytokine (破骨細胞誘導サイトカイン)

緒 言

口腔扁平上皮癌は強い局所浸潤能を有しており、顎骨浸潤の有無は臨床の上では重要な問題点の1つとなっている¹⁾。一般的に術前に腫瘍の進展・病態を検討する方法として、下顎歯肉癌の場合はX線像などの画像検査から顎骨吸収様式を推測でき、術前の生検から病理組織学的に腫瘍の分化度や浸潤様式を解析することができる。しかし腫瘍

の骨浸潤の深達度や骨浸潤の様相については切除標本の詳細な病理検査によらねばならない^{2, 3)}。したがって、口腔癌と骨浸潤の関係を明確にするためには、癌細胞の骨浸潤能を検索する新たな診断法の確立が必要である。

近年、癌の骨浸潤、骨転移における骨破壊は、癌細胞により直接引き起こされるよりも、破骨細胞を介して起こっているとの報告^{4, 5)}があり、癌の骨浸潤、骨転移において破骨細胞性骨吸収能が重要な役割を演じていることが示され

東京歯科大学口腔外科学第1講座
(主任：野間弘康教授)

*徳島大学歯学部第2口腔外科学講座
(主任：佐藤光信教授)

The First Department of Oral and Maxillofacial
Surgery, Tokyo Dental College (Chief: Prof. NOMA

Hiroyasu)

*The second Department of Oral and Maxillofacial
Surgery, Tokushima University School of Dentistry
(Chief: Prof. SATO Mitsunobu)

受付日：2002年2月20日

採択日：2002年12月17日

表1 免疫染色で用いた一次抗体

PTHrP	マウス抗ヒト PTHLP モノクローナル抗体	(CALBIOCHEM 社製)	1/200 希釈
TNF- α	ゴート抗ヒト TNF- α ポリクローナル抗体	(R&D 社製)	1/200
IL-1 α	ラビット抗ヒト IL-1 α ポリクローナル抗体	(ENDOGEN 社製)	1/200
IL-1 β	ラビット抗ヒト IL-1 β ポリクローナル抗体	(ENDOGEN 社製)	1/200
IL-6	ゴート抗ヒト IL-6 ポリクローナル抗体	(Santa Cruz 社製)	1/100
IL-11	ゴート抗ヒト IL-11 ポリクローナル抗体	(Santa Cruz 社製)	1/300
IL-18	ゴート抗ヒト IL-18 ポリクローナル抗体	(Santa Cruz 社製)	1/300
TGF- β	ラビット抗ヒト TGF- β ポリクローナル抗体	(Santa Cruz 社製)	1/200

VECTASTAIN ABC kit (Vector Laboratories Inc. U.S.A) を使用

た⁶⁻⁹⁾。

そこで本研究では、下顎歯肉癌症例を病理組織学的に顎骨浸潤性の群と非浸潤性の群に分けて、臨床的な指標と骨浸潤の関係や、腫瘍細胞における各種の破骨細胞誘導サイトカインの発現にどのような相違があるかを検討した。

対 象 症 例

1992年から1999年の8年間に東京歯科大学口腔外科学第1講座において病理組織学的に下顎歯肉扁平上皮癌と診断された症例のうち、腫瘍切除と同時に下顎骨切除(176例)を行い²⁾、その手術標本のなかから免疫組織学的検査が施行できた症例を対象とした。

対象症例は、男性22例、女性16例の計38例であり、年齢は45歳～79歳、平均62.1歳であった。頭頸部癌取り扱い規約によるTNM分類では、T2:14例、T3:6例、T4:18例、N0:7例、N1:21例、N2b:8例、N2c:2例であり、すべてM0であった。術前治療として、30例にPeplomycin(10～30mg、平均22.5mg)が投与されていた。

切除範囲については、術前治療によって腫瘍範囲が縮小した場合でも、全例、初診時の所見に基づいて切除を行った。当科において、下顎骨切除は以下の選択基準に従って行った。画像所見で下顎骨の吸収や破壊が明らかでないが、骨膜へ進展し下顎骨との癒着が認められたもの、または下顎骨の吸収や破壊を認めるが下顎管に及んでいないものに対しては辺縁切除術を行った。画像所見で下顎管に達する下顎骨の吸収や破壊が認められた症例に対しては区域切除術、一侧の下顎管がすべて含まれたものは半側切除術を選択した²⁾。

方 法

1. 下顎骨浸潤の病理組織学的判定と臨床的な指標

手術切除標本より脱灰 Hematoxylin-Eosin (以下 H-E) 染色標本作製し、光学顕微鏡的に腫瘍と骨との連続性を

主体に検討した。すなわち、10%ギ酸溶液にて脱灰後、10%中性ホルマリン溶液で再固定を行い、通法に従って脱脂脱水・パラフィン包埋後、4～8 μ mの切片を作製し、H-E染色後に病理組織学的検討を行った。

判定は、癌細胞が顎骨内に索状・点状に浸潤し歯肉状の骨吸収像を示すものを顎骨浸潤群、癌細胞が顎骨に近接しているが浸潤性の骨吸収の所見は認められないものを顎骨非浸潤群とした。

また、臨床的指標として性、年齢、原発腫瘍の大きさ、リンパ節転移の有無、病理組織学的判定として分化度と浸潤様式について検討した。

2. X線画像による骨吸収様式の分類

術前に歯科用X線写真とパノラマX線写真を用いて、骨吸収の様式³⁾を観察した。腫瘍に接した下顎骨の辺縁が比較的平滑で周囲に骨硬化が認められるものを圧迫型、辺縁が不明瞭で不規則なものを破壊型として、骨吸収様式を2型に分類した。

3. 骨吸収に関連するサイトカインの免疫組織学的染色

切除標本から破骨細胞誘導サイトカインの発現を免疫組織学的染色を用いて解析した。検索したサイトカインは副甲状腺ホルモン関連蛋白(PTHrP)、腫瘍壊死因子(TNF)- α 、インターロイキン(IL)-1 α 、IL-1 β 、IL-6、IL-11、IL-18、Transforming Growth Factor(TGF)- β の8種類である(表1)。

検索部位はH-E染色検査と同様に腫瘍と顎骨との境界部とした。免疫組織学的染色は以下の手順に従った。ホルマリン固定後アルコールで脱脂、10%イオン交換樹脂脱灰法に準じて脱灰後、切り出しをしてパラフィン包埋を行った。薄切切片を作製後に脱パラフィンし、蒸留水で5分間水洗を行った。薄切標本は3%過酸化水素水で室温5分間浸漬し、内因性ペルオキシダーゼを除去した後、0.04%クエン酸溶液でマイクロウェーブを7分間行った。そしてpH7.4リン酸緩衝液(PBS)で10分間洗浄後、10%ヤギ正常血清により30分間室温で非特異反応をブロッキングし

写真1 顎骨浸潤性の下顎歯肉癌の病理組織像 (H-E 染色, 弱拡大)
癌細胞が顎骨内に索状に浸潤し掘歯状の骨吸収像を示す (左図).
腫瘍胞巣の浸潤は著しく, 顎骨内へ著明に浸潤している (右図).

た. 一次抗体は8種類の破骨細胞関連サイトカインの抗体を希釈し, 4℃で over night 反応させた. 次いでビオチン標識マウス IgG, IgA, IgM 抗体からなる二次抗体を37℃で30分間反応させた. その後 HRP-ストレプトアビジン VECTASTAIN ABC kit (Vector Laboratories Inc. U.S.A) で37℃, 30分間浸した. 発色は0.05%過酸化水素水加3, 3ジアミノベンチジン4塩酸塩トリス塩酸緩衝液による呈色反応を行い, Mayer の Hematoxylin による対比染色を行い, 400倍の顕微鏡下で薄切標本を観察した.

標本において腫瘍細胞の細胞質に染色性が発現したものを抗体陽性細胞と評価した. また, 陰性コントロールとして一次抗体の代わりに PBS のみで処理したものをを用い, これを各標本と対比させ, 明らかな染色性が得られたものを陽性と判定した.

それぞれの標本に対して, 顎骨との境界部を無作為に10視野選択し, おおの100個の腫瘍細胞のうちの抗体陽性細胞数を計測した. そして Gratas ら¹⁰⁾の方法に準じて評価をした. すなわち, 抗体陽性細胞数の割合 (%) を labeling index として表し, 陽性細胞の発現を認めないもの (labeling index が0) を (-), labeling index が1~15を(±), 16~25を(+), 26~50を(++), 51~100を(+++)と判定した.

4. 対象症例の5年生存率

下顎骨浸潤の有無と予後について, Kaplan-Meier 法を用いて生存率解析を行った.

なお, 有意差検定には student-t 検定 ($p < 0.01$) または生存率の検定には Logrank 検定を使用した.

結 果

1. 下顎骨浸潤の病理組織学的判定と臨床的な指標との関係

おおのの手術標本を鏡し, 顎骨浸潤の有無を病理組織学的に確認して顎骨浸潤群と顎骨非浸潤群の2群に分類した.

その結果, 顎骨浸潤 (写真1) は23例, 顎骨非浸潤 (写真2) は15例であった. 各群の臨床所見の内訳と臨床的指標を比較検討した結果を表2に示す. 両群の性, 年齢, 腫瘍の大きさ, 所属リンパ節への転移の比較では顎骨浸潤群と顎骨非浸潤群で有意差は認めなかった. また, 従来からいわれている腫瘍の分化度と浸潤様式でも両群間に有意差は認めなかった.

2. X線画像による骨吸収様式の分類

術前のX線像で骨吸収像がみられたもの22例 (全症例の58%) のなかには病理組織学的に骨浸潤のなかったもの3例 (顎骨非浸潤群の20%) が認められた. 骨吸収の様式では, 破壊型骨吸収群16例はすべて病理組織学的にも下顎骨浸潤が認められたが, 圧迫型骨吸収群6例のうち3例は病理組織学的に下顎骨非浸潤であった.

また, X線像で骨吸収が認められなかった16例 (全症例38例の42%) のなかでも4例 (顎骨浸潤群の17.4%) に病理組織学的に下顎骨浸潤が認められた (表3).

3. 骨吸収関連サイトカインの免疫組織化学的染色

各種サイトカインの抗体陽性細胞の出現は骨周囲のみならず, 骨から離れた部位の腫瘍細胞にも観察された (写真3). IL-18を除く7種類のサイトカインに関する免疫組織学的染色では, 少数の標本において染色性の判定が不能で

写真2 顎骨非浸潤性の下顎歯肉癌の病理組織像 (H-E 染色, 弱拡大)
 癌細胞が顎骨に近接しているが浸潤性骨吸収の所見は認められない (左図).
 腫瘍胞巣は骨膜下で顎骨周囲に沿って浸潤しているが, 顎骨内にはおよんでいない (右図).

表2 顎骨の浸潤性と臨床的な指標との関係

臨床的指標		顎骨浸潤群 (%)	顎骨非浸潤群 (%)
性別	男性	10 (43.5)	12 (80.0)
	女性	13 (56.5)	3 (20.0)
平均年齢 (62.1歳)		64.0歳	59.0歳
腫瘍の大きさ (> 4 cm)		14 (60.9) NS	9 (60.0)
pN (+)		6 (26.1) NS	7 (46.7)
分化度	高分化型	20 (87.0) NS	12 (80.0)
	中分化型	2 (8.7) NS	3 (20.0)
	低分化型	1 (4.3) NS	0 (0)
山本・小浜の分類			
1型		0 (0)	4 (26.6)
2型		3 (13.0)	0 (0)
3型		14 (61.0)	9 (60.0)
4c型		5 (21.7)	1 (6.7)
4d型		1 (4.3)	1 (6.7)

NS: 有意差なし (student t-test)

あったため, おおのの検索結果から除外した.

PTHrP, IL-6, TNF- α , IL-11の labeling index は, 顎骨非浸潤群と比較して顎骨浸潤群において増加していた (表4). 顎骨非浸潤群における PTHrP, IL-6, TNF- α , IL-11の各染色陽性率は, (-) が最も多かったが, (±) から (++++) までの各数値間には有意差は認められなかった. 次に, これら4種のサイトカインの染色結果を染色陰性と陽性に大別し, 顎骨浸潤群と非浸潤群における染色陽性率の差異を比較検討した. その結果, いずれのサイトカインにおいても顎骨浸潤群の陽性率は非浸潤群に比べて有意に

表3 X線像による骨吸収様式と顎骨浸潤との関係

術前のX線像		顎骨浸潤群 (23例)	顎骨非浸潤群 (15例)
骨吸収 (+)	22例	19*	3
	(破壊型骨吸収 16例)	16*	0
	(圧迫型骨吸収 6例)	3	3
骨吸収 (-)		4*	12

* 顎骨非浸潤群と比較し有意差あり ($p < 0.01$, student t-test)

($p < 0.01$) 高値を示した. また, 顎骨非浸潤群における染色陰性率は, IL-6 と IL-11が64.3%, PTHrPが60%と高値を示し, TNF- α が46.2%と低値であったが, 染色陽性率との間に有意差は認められなかった (表5).

IL-18, IL-1 α , TGF- β , IL-1 β の染色陽性率は, 顎骨浸潤群と非浸潤群との間に有意差はみられなかった. 各群における IL-18, IL-1 α , TGF- β , IL-1 β 抗体陽性細胞数の発現状態には, 有意差は認められなかった (表6).

4. 対象症例の5年生存率

顎骨非浸潤群と顎骨浸潤群の生存率の比較では, 有意差は認めなかった (図1).

考 察

口腔癌が顎骨に近接した口腔粘膜に発生した場合, 顎骨の切除範囲を決定する際の明確な指標はなく, 画像診断や術前生検の病理組織学的検査に委ねることが多い.

Totsuka ら^{1, 11)} はX線像のみでの診断には限界があり,

写真3 顎骨浸潤症例における各サイトカインの発現（免疫組織化学的染色，弱拡大）

- a: PTHrP（+，骨組織内に腫瘍細胞が浸潤しているが，細胞質の発現は少ない）
 b: TNF- α （++，腫瘍胞巣を形成し，多数の腫瘍細胞内で反応がみられる）
 c: IL-6（+++，浸潤先端部の腫瘍細胞で，細胞質に強い反応を認めた）
 d: IL-11（+++，骨組織に近接したほとんどの腫瘍細胞で，細胞質に強い反応を認めた）

表4 PTHrP, IL-6, TNF- α , IL-11のLabeling Index

PTHrP			IL-6		
	顎骨浸潤群 (%)	顎骨非浸潤群 (%)		顎骨浸潤群 (%)	顎骨非浸潤群 (%)
—	0 (0)	9 (60.0)	—	0 (0)	8 (57.1)
±	1 (4.8)	3 (20.0)	±	2 (8.7)	2 (14.3)
+	7 (33.3)	2 (13.3)	+	12 (52.2)	1 (7.2)
++	6 (28.6)	1 (6.7)	++	5 (21.7)	3 (21.4)
+++	7 (33.3)	0 (0)	+++	4 (17.4)	0 (0)
total	21 (100)	15 (100)	total	23 (100)	14 (100)

TNF- α			IL-11		
	顎骨浸潤群 (%)	顎骨非浸潤群 (%)		顎骨浸潤群 (%)	顎骨非浸潤群 (%)
—	0 (0)	6 (46.1)	—	1 (4.7)	9 (64.3)
±	0 (0)	6 (46.1)	±	5 (23.8)	2 (14.3)
+	5 (23.8)	0 (0)	+	9 (42.9)	3 (21.4)
++	10 (47.6)	1 (7.8)	++	4 (19.1)	0 (0)
+++	6 (28.6)	0 (0)	+++	2 (9.5)	0 (0)
total	21 (100)	13 (100)	total	21 (100)	14 (100)

数値は標本数（各群の総標本数に対する比率）を示す。
 顎骨非浸潤と比較し有意差なし（student t-test）

表5 顎骨浸潤に関与するサイトカインの発現率

	PTHrP		TNF- α	
	(-)	($\pm$) ~ (+++)	(-)	($\pm$) ~ (+++)
顎骨浸潤群 (%)	0 (0)	21 (100)*	0 (0)	21 (100)*
顎骨非浸潤群 (%)	9 (60.0)	6 (40.0)	6 (46.2)	7 (53.8)

	IL-6		IL-11	
	(-)	($\pm$) ~ (+++)	(-)	($\pm$) ~ (+++)
顎骨浸潤群 (%)	0 (0)	23 (100)*	1 (4.5)	21 (95.5)*
顎骨非浸潤群 (%)	9 (64.3)	5 (35.7)	9 (64.3)	5 (35.7)

数値は標本数 (各群の総標本数に対する比率) を示す.

*顎骨非浸潤と比較し有意差あり ($p < 0.01$ student t-test)

表6 IL-18, IL-1 α , TGF- β , IL-1 β の Labeling Index

IL-18			IL-1 α		
	顎骨浸潤群 (%)	顎骨非浸潤群 (%)		顎骨浸潤群 (%)	顎骨非浸潤群 (%)
-	3 (13.0)	0 (0)	-	1 (4.8)	2 (13.3)
$\pm$	2 (8.7)	1 (6.7)	$\pm$	3 (14.3)	0 (0)
+	9 (39.2)	1 (6.7)	+	8 (38.1)	6 (40.0)
++	6 (26.1)	7 (46.6)	++	7 (33.3)	5 (33.4)
+++	3 (13.0)	6 (40.0)	+++	2 (9.5)	2 (13.3)
total	23 (100)	15 (100)	total	21 (100)	15 (100)

TGF- β			IL-1 β		
	顎骨浸潤群 (%)	顎骨非浸潤群 (%)		顎骨浸潤群 (%)	顎骨非浸潤群 (%)
-	5 (23.8)	4 (26.7)	-	3 (14.3)	3 (20.0)
$\pm$	8 (38.1)	2 (13.3)	$\pm$	1 (4.8)	2 (13.3)
+	7 (33.3)	7 (46.7)	+	7 (33.3)	3 (20.0)
++	1 (4.8)	2 (13.3)	++	6 (28.6)	6 (40.0)
+++	0 (0)	0 (0)	+++	4 (19.0)	1 (6.7)
total	21 (100)	15 (100)	total	21 (100)	15 (100)

数値は標本数 (各群の総標本数に対する比率) を示す.

顎骨非浸潤と比較し有意差なし (student t-test)

腫瘍の下顎骨浸潤範囲を正確に予測するための新しい診断手法の開発が必要であると述べている. 本研究からも, X線像で骨吸収像がみられた症例のなかに術後の検索で病理組織学的に骨浸潤のなかったものがあり, また反対に, X線像で骨吸収が認められなかった症例でも病理組織学的に顎骨浸潤がみられた場合があった. われわれも, 顎骨浸潤を正確に評価するための診断法の確立が必要と考えている²⁾.

そこで, 本研究では顎骨吸収に関与する因子は何か, 破骨細胞誘導サイトカインが重要な役割を演じている, とい

う仮定のもとで, どのような破骨細胞誘導サイトカインが候補となるか免疫組織学的な検討を行った. また, 従来からいわれている臨床的予後不良因子と下顎骨浸潤についての関連性についても比較検討を行った.

その結果, 臨床的指標と下顎骨浸潤の間には予想に反して関連性は認められなかった. 顎骨浸潤群と顎骨非浸潤群の5年生存率では有意差はみられなかったが, 顎骨浸潤群でやや低い傾向にあった.

浸潤した癌組織と骨との境界に正常部位と比べ, 多数の破骨細胞が存在することが報告され^{12, 13)}, 癌細胞の骨浸潤

図1 Kaplan-Meier 法による顎骨浸潤群と顎骨非浸潤群の生存率

において破骨細胞による骨吸収が重要な役割を演じていることが判明している。特に破骨細胞関連サイトカインのIL-6が破骨細胞の誘導、活性化を介して骨吸収を促進することが知られている^{14, 15)}。さらに、ある種の癌細胞は破骨細胞関連サイトカインを産生し、癌細胞の増殖のみならず癌悪液質や癌由来高カルシウム血症の起因物質となることが判明している¹⁶⁾。癌細胞が産生したサイトカインが、破骨細胞による骨吸収に関与していることが報告された^{5, 13, 17, 18)}。本研究においても下顎歯肉扁平上皮癌細胞の下顎骨浸潤に、PTHrP, TNF- α , IL-6およびIL-11の発現が強く関与している可能性が示唆された。これらは破骨細胞の誘導、分化に促進的に働く破骨細胞誘導サイトカインとして知られている^{14, 17~19)}。すなわち口腔扁平上皮癌の顎骨浸潤に破骨細胞性骨吸収が重要な役割を担っている可能性が高いと考えられた。

IL-1 α , IL-1 β ならびにTGF- β の発現においては、下顎骨浸潤群と下顎骨非浸潤群との間に差異は認められなかった。また、骨芽細胞を活性化し骨添加に働くことが報告^{20, 21)}されているIL-18においても期待された逆相関関係はみられなかった。

今後サイトカインの相互関係を解析することにより、口腔癌細胞における顎骨浸潤のメカニズムを明らかにし、臨床的治療指針の確立、または新たな治療法の応用が可能であるか検討していく予定である。

結 論

1. 臨床的な指標と下顎骨浸潤の間に有意な関係は認められなかった。

2. 下顎骨浸潤群においてPTHrP, TNF- α , IL-6およびIL-11の著明な発現増強が認められ、これらのサイトカインが下顎歯肉扁平上皮癌の下顎骨浸潤に強く関与していると思われる。

3. IL-1 α , IL-1 β , IL-18およびTGF- β の発現は下顎骨浸潤と非浸潤症例の間で有意差は認められなかった。

4. 癌細胞における破骨細胞誘導サイトカインの発現および破骨細胞性骨吸収が、下顎骨浸潤に重要な役割を担っている可能性が示唆された。

引 用 文 献

- 1) Totsuka, Y., Usui, Y., et al.: Mandibular involvement by squamous cell carcinoma of the lower alveolus: analysis and comparative study of histologic and radiologic features. *Head Neck* 13: 40-50 1991.
- 2) 柴原孝彦, 野間弘康, 他: 下顎骨切除法別にみた下顎歯肉扁平上皮癌の顎骨浸潤に関する臨床・病理組織学的検討. *日口外誌* 48: 129-134 2002.
- 3) 平賀三嗣: 下顎歯肉扁平上皮癌の顎骨浸潤に関する臨床的ならびに病理組織学的検討. *岩医大歯誌* 21: 136-152 1996.
- 4) Semba, I., Matsuchi, H., et al.: Histomorphometric analysis of osteoclastic resorption in bone directly invaded by gingival squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 25: 429-435 1996.
- 5) Yoneda, T., Williams, P., et al.: Suramin suppresses hypercalcemia and osteoclastic bone resorption in nude mice bearing a human squamous cancer. *Cancer Res* 55: 1989-1993 1995.
- 6) Yoneda, T., Nakai, M., et al.: Neutralizing antibodies to human interleukin 6 reverse hyper-

- calcemia associated with a human squamous carcinoma. *Cancer Res* 53: 737-740 1993.
- 7) Takenawa, J., Kaneko, J., et al.: Enhanced expression of interleukin-6 in patient human renal cell carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 83: 1668-1672 1991.
 - 8) Lu, C. and Vickers, M.F.: Interleukin 6: A fibroblast derived growth inhibitor of human melanoma cells from early but not advanced stages of tumor progression. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 9215-9219 1992.
 - 9) Manolagas, S.C. and Jilka, R.L.: Bone marrow, cytokines, and bone remodeling. *N Engl J Med* 332: 305-311 1995.
 - 10) Gratas, C., Tohma, Y., et al.: Up-regulation of Fas (APO-1/CD95) ligand and down-regulation of Fas expression in human esophageal cancer. *Cancer Res* 58: 2057-2062 1998.
 - 11) Totsuka, Y., Usui, Y., et al.: Results of surgical treatment for squamous carcinoma of the lower alveolus: segmental vs. marginal resection. *Head Neck* 13: 114-120 1991.
 - 12) Okamoto, M., Hiura, K., et al.: Mechanism for bone invasion of oral cancer cells mediated by interleukin-6 in vitro and in vivo. *Cancer* 89: 1966-1975 2000.
 - 13) Kawamata, H., Nakashiro, K., et al.: Possible contribution of active MMP 2 to lymph-node metastasis and secreted cathepsin L to bone invasion of newly established human oral-squamous-cancer cell lines. *Int J Cancer* 70: 120-127 1997.
 - 14) Okamoto, M., Lee, C., et al.: Interleukin-6 as a paracrine and autocrine growth factor in human prostatic carcinoma cells in Vitro. *Cancer Res* 57: 141-146 1997.
 - 15) Okamoto, M. and Oyasu, R.: Effect of transfected interleukin-6 in non-tumorigenic and tumorigenic rat urothelial cell lines. *Int J Cancer* 68: 616-621 1996.
 - 16) Uemura, Y., Nakata, H., et al.: Regulation of granulocyte colony-stimulating factor and parathyroid hormone related protein production in lung carcinoma cell line OKa-C-1. *Jpn J Cancer Res* 91: 911-917 2000.
 - 17) Ash, C.S., Nason, R.W., et al.: Prognostic implications of mandibular invasion in oral cancer. *Head Neck* 22: 794-798 2000.
 - 18) Braunschweiger, P.G., Jones, S.A., et al.: Potentiation of mitomycin C and proflomycin antitumor activity in solid tumor models by recombinant human interleukin 1 α . *Cancer Res* 51: 5454-5460 1991.
 - 19) Nakano, Y., Kobayashi, Y., et al.: Expression of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 in oral squamous cell carcinoma. *Jpn J Cancer Res* 90: 858-866 1999.
 - 20) Horwood, N.J., Elliott, J., et al.: IL-12 alone and in synergy IL-18 inhibits osteoclast formation in vitro. *J Immunol* 15: 4915-4921 2001.
 - 21) Makiishi-Shimobayashi, C., Tsujimura, T., et al.: Interleukin-18 up-regulates osteoprotegerin expression in stromal/osteoblastic cells. *Biochem Biophys Res Commun* 281: 361-366 2001.