in vitro における泌尿器系悪性腫瘍に対する 上皮成長因子 (EGF) の影響

日本医科大学泌尿器科学教室 (主任: 秋元成太教授)

服部 智任 寺島 保典 原 眞 秋元 成太

IN VITRO EFFECTS OF EPIDERMAL GROWTH FACTOR (EGF) ON GROWTH OF UROLOGICAL MALIGNANT TUMOR CELLS

Tomotaka Hattori, Yasunori Terashima, Makoto Hara and Masao Akimoto

Department of Urology, Nippon Medical School

(Director: Prof. M. Akimoto)

It is well known that Epidermal Growth Factor (EGF) is a cell-regulating factor for variety of tissues in vitro including normal and malignant cells. Furthermore, Takano et al reported that a decreased expression of EGF receptor in clones of human cancer KB cell line might be one of the pleiotropic properties of multidrug-resistant cells. However, both the influence of EGF on human urological cancer cell lines and the relation between EGF receptors and sensitivities of antitumor drugs on these cell lines have not been fully described. We have studied the effects of EGF on growth of 4 transitional carcinoma cell lines of bladder (TCCaB), 1 squamous cell carcinoma cell line of bladder (SCCaB), 5 renal cell carcinoma cell lines (RCC) and 3 prostatic carcinoma cell lines (CaP), as well as the relationship between the number of EGF receptors and drug sensitivities of these cell lines in vitro against methotrexate, vinblastine, adriamycin, cisplatin and etoposide (VP16). The present results determined by the in vitro colony forming efficiency method showed that exogenous addition of EGF to cell cultures at 0.1 ng/ml stimulated the growth of SCCaB by 169.0%, and at 1 ng/ml inhibited that of RCC by 2.9%~79.1%, relative to control. The more EGF receptors by ^{125}I -EGF binding assay, the higher inhibition of VP16 on the growth of these cell lines.

These results suggested that EGF stimulated the growth of SCCaB and inhibited the growth of RCC in vitro, and we found that these phenomena were correlated with neither the number of EGF receptors nor affinities of that receptors. Furthermore, the number of EGF receptors may be correlated with the resistance of VP16 to growth-inhibitory effects.

Key words: urological cancer, epidermal growth factor, drug sensitivity

要旨: 現在までに樹立されている4つの膀胱移行上皮癌株, 1つの膀胱扁平上皮癌株, 5つの腎細胞癌株と3つの前立腺癌株を対象として, in vitro での上皮成長因子 (EGF) の影響及び EGF レセプター数とメトトレキサート, ヴィンブラスチン, アドリアマイシン, シスプラチンとエトポシド (VP16) を用いた制癌剤感受性試験の結果との間の関連について検討を行なった。

それぞれの細胞株に対する影響は, 細胞増殖の指標であるコロニー形成能の結果, EGF 濃度が0.1ng/ml では膀胱扁平上皮癌において, コントロールに対し169.0%の増殖を見た。又, 腎細胞癌では EGF 濃度1ng/ml で2.9%~79.1%のコロニー形成能であった。一方, ^{125}I -EGF を用いたレセプターアッセイの結果, EGF レセプター数の多い癌細胞株は VP16 に対して, より感受性が高かった。

今回の結果は in vitro における EGF が, 膀胱扁平上皮癌に対しその増殖を促進し, その一方で腎細胞癌ではその増殖を抑制する事が示唆された。また EGF の作用とレセプター数及びレセプターと EGF 間の親和性との間に関連はみられなかったものの制癌剤に対する感受性との間では, EGF レセプター数が VP16 に対する抵抗性と関連している可能性が推測された。

キーワード: 泌尿器系悪性腫瘍, 上皮成長因子, 制癌剤感受性

緒 言

Cohen らによって発見された上皮成長因子 (Epidermal Growth Factor, EGF)^{11,12)} は、正常上皮のみならず種々の癌細胞の増殖に多彩な影響を及ぼす事が報告されている。又、癌遺伝子のひとつである erb-B により産生される蛋白と上皮成長因子レセプター (EGF レセプター) との相似性なども証明されており、様々な点で注目されている³⁾⁻⁶⁾。

近年、EGF に限らず様々な成長因子についての癌細胞に対する作用が検討されているが、Sporn らはそれらの作用は一定ではなく、標的となる癌細胞の種類や、細胞周囲環境の違いによる異なるとする、いわゆる multifunctional effect を提唱している^{11,12)}。

又、乳癌では EGF レセプターの発現は原発巣より転移巣で頻度が高いとの報告¹⁴⁾ や EGF レセプター陽性乳癌では腋窩リンパ節転移の頻度が高い傾向にあるとする報告もみられる¹⁵⁾。その他に制癌剤に対する多剤性因子である *mdr* 1 遺伝子の発現をみることにより EGF レセプター数が減少するといった薬剤耐性との関連についての実験もみられる¹⁶⁾。

しかしながら泌尿器系悪性腫瘍に対する EGF の作用や EGF レセプターについては、いまだ充分な検討がなされているとは言えない。今回我々は *in vitro* における EGF の泌尿器系悪性腫瘍に対する影響及び EGF レセプターとの関連、加えて先に述べた制癌剤に対する耐性の点に注目し、制癌剤の感受性と EGF レセプターとの関連について検討した。

実験材料及び実験方法

1. 培養細胞及び培養方法

使用した培養細胞株は、SCaBER (膀胱扁平上皮癌)、T24, 5637, EJ-1, TCCSUP (以上、膀胱移行上皮癌)、ACHN, A498, A704, Caki2, NRC12 (以上、腎細胞癌) と PC3, DU145, TSU-Pr1 (以上、前立腺癌) である。また SCaBER, 5637, TCCSUP, ACHN, A498, A704, Caki2, PC3, DU145 は ATCC (American Type Culture Collection, 大日本製薬) より、NRC12 は免疫生物研究所より購入した。T24 と EJ-1 は Japan Cancer Research Resources Bank より、TSU-Pr1 は帝京大学泌尿器科飯泉講師より提供された。

細胞はペニシリン (100u/ml)、ストレプトマイシン (100 μ g/ml)、1mM L-グルタミン及び 50nM 2-メルカプトエタノールを含む RPMI1640 (日水製薬、東京) に 10% 牛胎児血清 (Fetal calf serum, FCS, Filtron, Australia, Lot No. 8179) を加えたものを培地として

用い、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂の条件下にて培養したものを実験に供した。

2. コロニー形成能 (Colony Forming Efficiency)

60mm 径の dish に 600~1,200 個の癌細胞を 10% FCS 加培地に浮遊させ植え込み、24 時間後、各濃度の EGF を加えた 1% FCS 加培地と培地交換を行ない、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂の条件下で 7~14 日間培養し、その後培地を捨て 10% ホルマリンで 10 分間固定の後、0.25% クリスタルヴァイオレットにて dish 上のコロニーを染色した。30 個以上の細胞よりなるコロニーを実体顕微鏡下にカウントし、コントロールに対するパーセンテージをコロニー形成能とした。又、実験は全て triplicate で 2~3 回行なった。

3. 世代時間 (Generation time)

35mm 径の dish に 10⁴ 個/dish の癌細胞を用い、コロニー形成能を求めた時と同様の方法で EGF を加え、3 日目と 7 日目にそれぞれの細胞数をコールターカウンター (Coulter electronics, Inc., U.S.A.) にてカウントした。得られたデータを以下に挙げる公式に当てはめ、世代時間を求めた¹⁷⁾。

$$\text{Generation time} = \frac{\text{Log}2(96\text{hr})}{\text{Log}(N_7/N_3)}$$

N_3 and N_7 : The number of tumor cells on day 3 and day 7

4. ¹²⁵I-EGF を用いた EGF レセプターアッセイ

Rolando Prez らの方法¹⁸⁾に若干の修正を加えた方法で行なった。即ち 24穴プレートの各ウエルに癌細胞を植え込み confluent になった所で 1% 牛胎児血清アルブミン (bovine serum albumine, BSA, Sigma, U.S.A.) 加の培地に一定量の ¹²⁵I-EGF (NEN, U.S.A.) と非標識 EGF を加え、EGF の最終濃度が 0~100ng/ml となるように培地交換を行ない 4 $^{\circ}$ C にて 2 時間放置。その後未反応の ¹²⁵I-EGF を 1% BSA 加培地にて 3 回洗浄する事で取り除き、次に 1N の NaOH で各ウエルの細胞を融解させた。γ-カウンターにて EGF レセプターと結合している ¹²⁵I-EGF のカウント行ない Scatchard プロットよりレセプター数並びに解離定数 (Kd) を求めた。

5. 制癌剤感受性試験

今回用いた制癌剤は、メトトレキセート (MTX)、ヴィンブラスチン (VBL)、アドリアマイシン (ADM)、シスプラスチン (CDDP)、エトポシド (VP16) の 5 剤であり、それぞれ濃度は MTX 0.45 μ g/ml, VBL 0.01 μ g/ml, ADM 0.04 μ g/ml, CDDP 0.2 μ g/ml, VP16

成績

では0.1 μ g/mlにて行なった。感受性試験の方法は、ほぼ Francis McGovern らの方法¹⁹⁾を用いた。具体的には、60mm 径の dish に癌細胞を300~500個、10%FCS 加培地に浮遊させ植え込み24時間後に各種制癌剤を添加した10%FCS 加培地と培地交換を行なった。またコントロールとしては制癌剤無添加の10%FCS 加培地を用いた。制癌剤と1時間接触させた後、dish より培地を取り除き Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) にて dish を3回洗浄した。再び10%FCS 加培地を dish に加え、更に6日間培養し、その後培地を捨て10%ホルマリンで10分間固定の後、0.25%クリスタルヴァイオレットにて dish 上のコロニーを染色した。30個以上の細胞よりなるコロニーを実体顕微鏡下にカウントし、コントロールに対する抑制率を求めた。

1. コロニー形成能

膀胱癌の内、移行上皮癌では EGF を加える事により増殖の軽度促進効果からやや抑制される様子がうかがえたが、特に一定の傾向はみられなかった。それに対し扁平上皮癌では、明らかに EGF 添加により増殖促進効果がみられた (図1)。

腎細胞癌では5株の全てに濃度依存性に増殖抑制効果がみられ、その作用機構に興味を持たれた。但し抑制の程度は培養細胞株によって異なっており、1ng/ml の EGF 添加によりコロニー形成能は、2.9%~79.1%と開きがあった (図2)。

最後に前立腺癌についてであるが、PC3では EGF の効果はほとんどみられないが他の2株では抑制効果がみられた (図3)。

2. 世代時間

世代時間もコロニー形成能同様に、癌細胞のいわゆる増殖の程度を反映しているものと考えられている。

まず膀胱癌であるが、コロニー形成能でみられたと同じく、膀胱扁平上皮癌で増殖促進効果がみられた (表1)。

腎細胞癌では5株の内2株に増殖抑制効果がみられたが、残りの3株に対する影響はみられなかった (表2)。

前立腺癌の増殖に対し EGF は特に影響を及ぼしていなかった (表3)。

以上の結果を表1~表3に示したが、ここで注目すべき事は先に示したコロニー形成能の結果との解離が一部の癌細胞株にみられたことである。この理由とし

図1 コロニー形成能よりみた膀胱癌に対する EGF の効果

図2 コロニー形成能よりみた腎細胞癌に対する EGF の効果

図3 コロニー形成能よりみた前立腺癌に対する EGF の効果

表1 各 EGF 濃度における膀胱癌の世代時間

Generation Time (hrs)	Control	EGF concentration (ng/ml)		
		0.1	1	10
EJ-1	29.65±0.89 [#]	27.80±0.54	27.95±0.16	32.30±0.31
T24	40.56±1.78	38.46±1.14	41.12±0.05	45.25±0.64
5637	30.04±0.80	32.60±1.00	32.96±0.05	34.03±0.55
TCCSUP	35.46±0.65	34.15±0.73	31.56±0.35**	29.92±0.48**
SCaBER	59.56±3.77	34.40±2.21**	33.59±0.16**	33.19±0.42**

[#] : mean±S.D. ** : p<0.01

表2 各 EGF 濃度における腎細胞癌の世代時間

Generation Time (hrs)	Control	EGF concentration (ng/ml)		
		0.1	1	10
ACHN	29.99±0.46 [#]	31.34±0.55	32.96±0.63	31.86±0.64
Caki2	40.02±0.60	113.06±6.94**	139.37±4.14**	197.40±46.75
A704	77.33±5.51	72.45±1.40	63.88±4.72	77.24±11.57
A498	37.53±1.00	39.57±0.72	41.26±0.08	43.97±1.78
NRC12	90.70±6.50	144.99±5.39*	207.54±26.39	214.13±5.99**

* : p<0.05, [#] : mean±S.D. ** : p<0.01

表3 各 EGF 濃度における前立腺癌の世代時間

Generation Time (hrs)	Control	EGF concentration (ng/ml)		
		0.1	1	10
PC3	35.53±1.78 [#]	37.52±0.50	37.47±0.31	37.43±1.25
DU145	51.14±0.91	50.42±1.30	48.88±2.34	44.20±0.49*
TSU-Pr1	31.20±0.77	30.03±0.53	30.14±0.12	30.99±0.14

mean±S.D. * : p<0.05

て、コロニー形成能で反応を示した癌細胞株の中に、EGF に反応しない、或いは逆の反応を示すようなサブクローンが存在し、世代時間においてはそのサブクローンの EGF に対する反応が、結果として反映したことに依りそれぞれの結果に解離が見られたものと考えられる。

3. レセプター数並びに解離定数と各癌細胞株の EGF に対する反応性との関連

レセプター数並びに解離定数を表4～表6に示した。膀胱癌では移行上皮癌である EJ-1 と扁平上皮癌の SCaBER でレセプター数がほぼ同じであるのにも関わらず、EGF による反応には大きな差がみられた。腎細胞癌では総じて膀胱癌や前立腺癌よりもレセプター数が多いようである。解離定数をみると前立腺癌で低い傾向がみられた。

又、コロニー形成能とレセプター数、世代時間とレセプター数の相関を検討したがいずれも相関はみられず、解離定数についても同様であった。従って、各癌細胞株の EGF に対する反応はレセプター数や親和性

表4 膀胱癌の EGF レセプター数並びに解離定数 EGF receptors

	Kd (nM)	Receptors/cell
EJ-1	0.4	37000 (high affinity)
	2.3	110000 (low affinity)
T24	2.2	8100
5637	0.2	6100
TCCSUP	0.5	2400
SCaBER	1.3	31000

表5 腎細胞癌のEGFレセプター数並びに解離定数EGF receptors

	Kd (nM)	Receptors/cell
ACHN	0.2	14000 (high affinity)
	1.6	42000 (low affinity)
Caki2	0.2	8700 (high affinity)
	2.4	24000 (low affinity)
A704	1.1	45000 (high affinity)
	4.0	84000 (low affinity)
A498	0.5	13000
NRC12	0.5	27000

表6 前立腺癌のEGFレセプター数並びに解離定数EGF receptors

	Kd (nM)	Receptors/cell
PC3	0.3	9100
DU145	0.2	1500 (high affinity)
	0.8	2700 (low affinity)
TSU-Pr1	0.2	20000

によって規定されるのではなく、EGFとそのレセプターが結合することにより生じた細胞内でのシグナルの違いによるものではないかと推測される。

4. 制癌剤感受性とEGFレセプターとの関連

MTX, VBL, ADM, CDDPに対する感受性とEGFレセプター数との関連をみると、それらの間には何ら相関はみられなかった。一方、図4に示す通りVP16に対する感受性とEGFレセプター数との間には正の相関がみられた。つまりEGFレセプターの数が増えるに従い、VP16に対する各癌細胞の感受性が増大した。

考 察

癌細胞の増殖機構の一つとして、種々のGrowth factorによるAutocrine或いはParacrine theoryが提唱されてから²⁰⁾、いわゆる癌の増殖におけるGrowth factorの重要性が注目されてきた。なかでもEGFについては現在まで様々な種類の癌細胞に対する効果の検討がなされている。

その他にも、EGFレセプターの発現と予後や、転移能との関係、或いは抗癌剤に対する多剤耐性遺伝子で

図4 VP16に対する感受性とEGFレセプター数との関係

あるmdr 1とEGFレセプターの発現程度との関連などが議論されている。

そこで今回我々の行なった実験であるが、主に次に挙げるような点に留意して行なった。つまり、1) EGFが泌尿器系悪性腫瘍に及ぼす作用、並びにそれらの作用とEGFレセプターとの関連、2) EGFレセプター数が制癌剤の多剤耐性遺伝子たるmdr 1と関連している可能性があることより、制癌剤に対する各癌細胞の感受性とEGFレセプター数との関連の以上2点について検討を行なった。

1)の内、まず膀胱癌についてであるが、本実験の成績からは膀胱移行上皮癌に対するEGFによる効果がわずかであるのに対し、膀胱扁平上皮癌では増殖促進効果がみられた。in vitroの結果からだけではあるが、尿中に活性型のEGFが含まれている事実と考え合わせると、膀胱扁平上皮癌の進行にEGFが関与している可能性も考えられよう。

しかしながら膀胱移行上皮癌においてもEGFレセプターのみに着目すると、正常膀胱粘膜においては、その粘膜表層にしかEGFレセプターが見られないのに対して、それら粘膜が癌化した場合、EGFレセプターの無秩序な発現が見られる事は、病理組織標本の免疫化学組織染色にて既に確認されている²¹⁾。即ち、膀胱移行上皮癌にとってEGFレセプターは癌化に伴う二次的な変化として発現してきたものとも考えられよう。

次にEGFの腎細胞癌に対する効果であるが、個々の細胞の増殖に対して、抑制的な作用がみられた。又、Leonard G. Gomellaらはin vitroでTGF-β (Trans-

forming Growth Factor- β) により腎細胞癌の増殖が抑制されることを示しており²²⁾, これらのいわゆる成長因子の腎細胞癌に対する増殖抑制の機構を明らかにする事は, 進行性腎細胞癌に対する治療法を考える上で有用であろう。

前立腺癌の増殖に対して EGF の影響は一定ではない。しかしながら EGF レセプターに注目すると, 前立腺癌同様のホルモン依存性の癌である乳癌では, その悪性度が高くなるにつれエストロゲンレセプターが消失し EGF レセプターの発現をみると報告もみられる¹⁵⁾。Jackson E. Fowler, Jr. らは前立腺癌の病理組織標本を用い, EGF レセプターに対するモノクローナル抗体で免疫化学組織染色を行なっているが, ここでは Gleason score が高いほど EGF レセプターの発現をみ, ホルモン療法を施行する事により EGF レセプターの発現頻度が高くなると報告している²³⁾。つまり前立腺癌においても悪性度が高いものや, ホルモン療法の施行によりアンドロゲンレセプターが消失し, EGF レセプターが発現してきているのではないかと想像できる。

以上膀胱癌, 腎細胞癌と前立腺癌に対する EGF の影響について述べたが, それらの影響と EGF レセプターの数や親和性との相関は何等みられなかった。これは EGF が単純な伝達物質としての因子ではなく, 標的となる細胞の周囲環境や, 細胞内の種々の因子によりその作用が決定される複雑な働きをするためであろうと想像される。

またその一方で EGF レセプターは, 先にも述べた通り細胞の癌化に伴う二次的な変化である可能性も十分に考えられる。

2) については今回全ての癌細胞株に対して制癌剤感受性試験を行なうことが出来なかったが, 得られた結果からは EGF レセプター数と VP16 に対する感受性のみに相関がみられた。即ち EGF レセプター数の少ない癌細胞株の方が VP16 に対して抵抗性であるとの結果であった。

さて VP16 に対する薬剤耐性の機構についてであるが現在のところ薬剤の能動的細胞外排出や, VP16 の標的である DNA トポイソメラーゼとの関連もあるのではないかと考えられている²⁴⁾。今回の結果からは, P-糖蛋白の様に VP16 を細胞外に排出する機構や DNA トポイソメラーゼを規定している因子と, EGF レセプター数を規定している因子とが何らかの関連を持っている可能性が示唆される。また, Takano らが述べてい

るような ADM と EGF レセプター数との直接の関連はみられなかったが, これは用いた癌細胞株に於いて *mdr 1* 遺伝子により産生される P-糖蛋白が励起されている状態であったとは必ずしも言えないことによるためかもしれない。今後, 更に様々な角度から検討を加える必要があろう。

結 語

1. 膀胱癌細胞株, 腎細胞癌株と前立腺癌株を用い, それらの増殖に対する EGF の効果を, コロニー形成能及び世代時間にて検討した。

2. 更にそれらの EGF レセプターについて¹²⁵I-EGF を用いレセプターアッセイを行なった。

3. EGF は膀胱扁平上皮癌細胞の増殖を促進したが移行上皮癌では特定の作用がみられなかった。

4. 腎細胞癌株の増殖に対しては抑制効果を示した。

5. 前立腺癌に対して EGF は影響をほとんど及ぼさないかその増殖を抑制した。

6. EGF の及ぼす影響とそのレセプター数及び解離定数の間に関連はなかった。

7. EGF レセプター数が少ない癌細胞株に於て VP16 に対する薬剤抵抗性が認められた。

今回使用した TSU-Pr1 を提供してくださった帝京大学泌尿器科講師 飯泉達夫先生並びに EJ-1, T24 の供給を受けました Japan Cancer Research Resources Bank に謝意を表します。又, 実験助手をつとめられた佐藤純子嬢に感謝致します。

本論文の要旨の一部は第76回日本泌尿器科学会総会, 第26回日本癌治療学会, 第48回日本癌学会及び第85回アメリカ泌尿器科学会にて報告した。

本研究の一部は平成元年度文部省科学研究費奨励研究(A) 01771246 によりなされたことを付記する。

文 献

- 1) Cohen, S.: Purification and metabolic effects of a nerve growth-promoting protein from snake venom, *J. Biol. Chem.*, **234**, 1129—1137, 1959.
- 2) 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.
- 3) Yamamoto, T., Nishida, T., Miyajima, N., Kawai, S., Ooi, T. and Toyoshima, K.: The *erbB* gene of avian erythroblastosis virus is a member of the *src* gene family. *Cell*, **35**, 71—78, 1983.
- 4) Downward, J., Yarden, Y., Mayes, E., Scrace,

- G., Totty, N., Stockwell, P., Ullrich, A., Schlesinger, J. and Waterfield, M.D.: Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erb-B oncogene protein sequences. *Nature*, 307, 521—527, 1984.
- 5) Ullrich, A., Coussens, L., Hatfield, J.S., Dull, T. J., Gray, A., Tam, A.W., Lee, J., Yarden, Y., Libermann, T. A., Schlessinger, J., Downward, J., Mayes, E.L.V., Whittle, N., Waterfield, M.D. and Seeburg, P.H.: Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells. *Nature*, 309, 418—425, 1984.
 - 6) 山本 雅, 柳沢亜古: erbB 関連増殖因子レセプター. 蛋白質・核酸・酵素, 31, 1052—1056, 1986.
 - 7) Cowley, G., Smith, J.A., Gusterson, B., Hendler, F. and Ozanne, B.: The amount of EGF receptor is elevated on squamous cell carcinoma. *Cancer Cells*, 1, 5—10, 1984.
 - 8) Yamamoto, T., Kamata, N., Kawano, H., Shimizu, N., Kuroki, T., Toyoshima, K., Rikimaru, K., Nomura, N., Ishizaki, R., Pastan, I., Gamou, S. and Shimizu, N.: High incidence of amplification of the epidermal growth factor receptor gene in human squamous carcinoma cell lines. *Cancer Res.*, 46, 414—416, 1986.
 - 9) Ozawa, S., Ueda, M., Ando, N., Abe, O. and Shimizu, N.: High incidence of EGF receptor hyperproduction in esophageal squamous-cell carcinomas. *Int. J. Cancer*, 39, 333—337, 1987.
 - 10) Kamata, N., Chida, K., Rikimaru, K., Horikoshi, M., Enomoto, S. and Kuroki, T.: Growth-inhibitory effects of epidermal growth factor and over expression of its receptors on human squamous cell carcinomas in culture. *Cancer Res.*, 46, 1648—1653, 1986.
 - 11) Gamou, S., Kim, Y.S. and Shimizu, N.: Different responses to EGF in two human carcinoma cell lines, A431 and UCVA-1, possessing high numbers of EGF receptors. *Mol. Cell Endocrinol.*, 37, 205—213, 1984.
 - 12) Sporn, M.B. and Roberts, A.B.: Peptide growth factors are multifunctional. *Nature*, 332, 217—219, 1988.
 - 13) Carpenter, G.: Epidermal growth factor. *Ann. Rev. Biochem.*, 48, 193—216, 1979.
 - 14) Sainsbury, J.R.C., Farndon, J.R., Sherbet, G.V., et al.: Epidermal growth factor receptors and oestrogen receptors in human breast cancer. *Lancet*, 16, 1398—1402, 1985.
 - 15) 中村隆志, 浜田雄蔵, 向田秀則, 田中 卓, 谷本雅博, 新本 稔, 服部孝雄: ヒト乳がんにおける Epidermal Growth Factor Receptor の発現と臨床病態 (Competitive Binding Assay を中心として). 癌と化学療法, 15, 2737—2741, 1988.
 - 16) Takano, H., Kohno, K., Shiraishi, N., Sato, S., Asoh, K., Yakushinji, M., Ono, M. and Kuwano, M.: Altered expression of epidermal growth factor receptor gene in a classical multidrug-resistant variant of a human cancer cell line. *KB. Jpn. J. Cancer Res.*, 80, 373—379, 1989.
 - 17) Messing, E.M. and Reznikoff, C.A.: Normal and malignant human urothelium: In vitro effects of epidermal growth factor. *Cancer Res.*, 47, 2230—2235, 1987.
 - 18) Pérez, R., Pascual, M., Macias, A., Lage, A.: Epidermal growth factor receptors in human breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.*, 4, 189—193, 1984.
 - 19) McGovern, F., Kachel, T., Vijan, S., Schiff, S., Lin, C.W. and Prout, G.R. Jr.: Establishment and characterization of a doxorubicin-resistant human bladder cancer cell line (MGH-U1R). *J. Urol.*, 140, 410—414, 1988.
 - 20) Sporn, M.B. and Todaro, G.J.: Autocrine secretion and malignant transformation of cells. *N. Engl. J. Med.*, 303, 878—880, 1980.
 - 21) Lau, J.L., Fowler, J.E. Jr. and Ghosh, L.: Epidermal growth factor in the normal and neoplastic kidney and bladder. *J. Urol.*, 139, 170—175, 1988.
 - 22) Gomella, L.G., Sargent, E.R., Linehan, W.M. and Kasid, A.: Transforming growth factor-beta inhibits the growth of renal cell carcinoma in vitro. *J. Urol.*, 141, 1240—1244, 1989.
 - 23) Fowler, J.E. Jr., Lau, J.L.T., Ghosh, L., Millis, S. E. and Mounzer, A.: Epidermal growth factor and prostatic carcinoma: An immunohistochemical study. *J. Urol.*, 139, 857—861, 1988.
 - 24) Moscow, J.A. and Cowan, K.H.: Multidrug resistance. *J.N.C.I.*, 80, 14—20, 1988.

(1990年6月5日受理)