Streptozotocin によるマウス腎腺癌高転移株の選別と その転移能および浸潤能の検討

札幌医科大学泌尿器科学教室 (主任: 熊木悦明教授)

宮尾 則臣 熊本 悦明 塚本 泰司 小谷 典之

SELECTION OF HIGHLY METASTATIC LINES FROM STREPTOZOTOCIN-INDUCED MOUSE RENAL ADENOCARCINOMA AND THEIR *IN VIVO* METASTATIC OR *IN VITRO* INVASIVE POTENTIAL

Noriomi Miyao, Yoshiaki Kumamoto, Taiji Tsukamoto and Noriyuki Otani

Department of Urology, Sapporo Medical College

(Director: Prof. Y. Kumamoto)

We selected highly metastatic lines from mouse renal adenocarcinoma (STZ-RCC) chemically induced with streptozotocin.

At eight weeks after an intrasplenic injections (IS injection) of original STZ-RCC, this procedure yielded metastatic foci in the liver, which we transplanted serially in syngeneic mice (STZ-HM1). STZ-HM1 was then injected into the spleen of a syngeneic mouse, which provided a source for further cycles of hepatic metastasis selection. Three cycles of selection for hepatic metastasis yielded a high hepatic metastasis line (STZ-HM3). Intravenous injection of the parent line (original STZ-RCC) yielded metastatic foci in the lung eight weeks later, which we also transplanted serially in syngeneic mice (STZ-PM1).

The repeated IS injection of the cells was clearly responsible for the increase in the frequency of hepatic metastasis and the number of its nodules. In particular, STZ-HM3 was revealed to have more metastatic nodules in the liver ranging from 293 to 432 (median; 368) in all five mice at eight weeks after IS injection. STZ-PM1 had a significantly higher rate of pulmonary metastasis and more pulmonary metastatic nodules after intravenous injection than the parent line. These results confirm that the parent line, STZ-RCC, has a heterogeneity in the metastatic phenotype.

In vitro invasion assay for STZ-RCC, STZ-HM1, -HM2 and -HM3 demonstrated that *in vitro* invasive potential was paralleled with *in vivo* hepatic metastasis potential. The result suggests that the invasion potential revealed by *in vitro* invasion assay is important in metastasis formation.

Key words: streptozotocin-induced mouse renal adenocarcinoma, highly metastatic clones, *in vitro* invasion assay

要旨: Streptozotocin 化学発癌で認められたマウス腎腺癌を継代化し (STZ-RCC), これより高肝転移株, 高肺転移株を選別した。

Parent line である STZ-RCC を脾臓内注射し, 8 週後に認められた肝転移巣を継代化した (STZ-HM1)。さらにこれを脾臓内注射する操作 (脾臓内注射—肝転移) を 3 回繰り返すことにより高肝転移株を選別した (STZ-HM3)。また, parent line である STZ-RCC を静脈内注射し, 8 週後に認められた肺転移巣を継代化した (STZ-PM1)。

脾臓内注射—肝転移の操作を繰り返すに従い脾臓内注射による肝転移出現率, 肝転移結節数の増加が認められた。特に, STZ-HM3 では脾臓内注射後 8 週目の観察で 5 匹中 5 匹に 293~432 個 (中央値 368 個) の肝転移巣が認められた。

STZ-PM1 では, STZ-RCC と比較し明らかに静脈内注射による肺転移出現率, 肺転移結節数の増加が

認められた。このことから parent line である STZ-RCC では転移能において heterogeneity が存在したことが確認された。

Parent line である STZ-RCC と肝転移の選別を各々 1, 2, 3 回繰り返した継代株の *in vitro* invasion assay を行ったところ、これらの脾臓内注射による肝転移能と *in vitro* 浸潤能とが平行する結果であった。このことから転移成立に際し *in vitro* invasion assay で示された浸潤能が重要な役割を果たしていることが示唆された。

キーワード：マウス腎腺癌、高転移株、浸潤能

緒 言

腎細胞癌の臨床においては、初診時すでに症例の約 30% に遠隔転移が認められている。また、根治的腎摘除術時に無転移と考えられる症例でも経過観察中に転移発生を認める症例も少なくない。このように腎細胞癌における転移は、他の悪性腫瘍と同様に臨床上的の最大の問題点である。特に腎細胞癌に対しては有効な治療薬のない現在、転移は深刻な問題点であると考えられる。そのため研究面においてもその転移形成機序の解明は治療学的にも極めて注目されているテーマと言っても過言ではない。ところが腎細胞癌の転移を研究すべき実験モデルとしては Naito ら¹⁾ のヌードマウスを用いた実験系の報告があるのみで、適当な実験系の確立を見ない。

我々は streptozotocin (STZ) 単回投与により CBA/H/T6J マウスにヒト腎細胞癌と類似した腎腺癌を発生させ、これを同系マウスで可継代化 (STZ-RCC) している²⁾。そこでこれを用いた実験モデルを作成することを目的に、STZ-RCC から的高肝転移株、高肺転移株の選別を試みた。その結果、比較的高率に転移を形成し得る肝および肺転移株を選別した。さらにこれらの一部の株に関し *in vitro* での浸潤能が高いことも証明し得たので報告する。

対象および方法

1. STZ 化学発癌によるマウス腎腺癌可継代株の細胞浮遊液作成

既報の方法でマウス腎腺癌を発生させ、これを継代化した (STZ-RCC)²⁾。継代 6 ~ 10 代目の STZ-RCC を無菌的に摘出後、機械的操作により腫瘍を細切した。これに phosphate buffer saline (Sigma Chemical Co.) を加えた後、1,000 回転 10 分間遠心した。その後上澄を捨て、0.4% tripan blue にて生細胞が 90% 以上であることを確認し、 1×10^7 個/ml の生細胞から成る細胞浮遊液を作成した。

2. 実験的転移形成

STZ-RCC から上述した方法で細胞浮遊液を作成

し、以下に述べる方法で実験的転移形成を試みた。

1) 実験的肝転移の作成

同系の CBA/H/T6J マウスを diethyl ether による麻酔下に側臥位とし左側腹部に切開を加え、腹腔より脾臓を創外に引出した。27 ゲージ針を脾尾部より刺入し、 5×10^5 個/0.05ml の細胞を移植した (脾臓内注射)。針を抜去すると同時に綿球にて刺入部を圧迫止血した。出血および穿刺部よりの移植細胞の漏れのないことを確認した後脾臓を腹腔内に戻し筋層、皮膚を縫合した。

2) 実験的肺転移の作成

同系の CBA/H/T6J マウスの尾静脈より 5×10^5 個/0.05ml の細胞を静脈内に注射した (静脈内注射)。

いずれのマウスも 8 週目に屠殺し、頭部を除く全臓器を摘出、水洗し、表在する転移結節を肉眼的に算出した。摘出した全臓器および転移結節の一部は組織学的検索に供した。同時に転移結節の一部は同系マウス背部皮下に移植した。

移植した転移結節は腫瘍の形成を認めかつ継代可能となった時点で摘出し、上述した細胞処理を加え実験的転移作成の操作を行った。以後この操作を繰り返し (転移選別)、各転移選別の段階の継代株 (図 1) を樹立するとともにこれらの転移形成能を検討した。

3. *In vitro* invasion assay

STZ-RCC ならびに肝転移の選別を行った継代株 (STZ-HM1, STZ-HM2, STZ-HM3) の細胞浮遊液を作成しこれを 10% FBS を添加した培養液 MEM D-Val modification (Sigma Chemical Co.) を用いて 1 週間 *in vitro* で培養した後、既に著者らが報告した方法に準じて *in vitro* invasion assay を行った³⁾。すなわち、24 穴 transwell cell culture chamber (Coster) を用い、upper chamber に $8 \mu\text{m}$ pore size の polyvinylpyrrolidone-free polycarbonate filter (Nomura Micro Science Co. Ltd.) を貼付した。Filter 下面を $100 \mu\text{g/ml}$ 濃度の fibronectin (Biomedical Technologies Inc.) $50 \mu\text{l}$ で、上面を $100 \mu\text{g/ml}$ 濃度の

図1 高転移株の選別の過程.

図2 STZ-HM2の脾臓内注射8週後の肝転移巣の肉眼所見.

図3 STZ-HM3の脾臓内注射8週後の肝転移巣の組織像。(×51)

Matrigel®(Collaborative Research Inc.)50 μ lで覆った。Fibronectin, Matrigel®を室温で乾燥させた後, upper chamberに上述の1週間培養した 5×10^5 個の細胞浮遊液を播種し, 37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂, 水蒸気飽和状態で8時間培養した。なお, lower chamberには0.1%BSAを加えた培養液 MEM D-Val modification 600 μ lを充滿させた。Filterを取り除き, この上面の細胞を除去した後, これを methyl alcohol で固定し hematoxylin & eosin (H-E) 染色を行い, filter 下面に浸潤した細胞数を顕微鏡下に算出した。なおこれらは全て triplicate にて行った。

4. 組織学的検討

組織学的検討は全て H-E 染色にて行った。

結 果

1. 高肝転移株の選別

1) 肝転移形成

STZ-RCCを脾臓内注射することで肝転移が認められた。この肝転移巣も同系マウスに継代可能で, これを STZ-HM1と命名した。STZ-HM1も脾臓内注射により肝転移が認められ, この肝転移巣も同系マウスに継代可能であった(STZ-HM2)。さらに STZ-HM2も脾臓内注射することにより肝転移が認められ(図2), この肝転移巣も同系マウスに継代可能であった(STZ-HM3)。なお, これらの肝転移巣は parent line である STZ-RCC と病理組織学的に同様の所見を有していた(図3)。

2) 肝転移出現率および肝転移結節数

STZ-RCC, STZ-HM1, STZ-HM2, STZ-HM3各々の脾臓内注射による肝転移出現率および転移結節数を表1に示した。肝転移出現率に関しては, STZ-RCCでは68.8%であった。肝転移の選別を1回行った株, すなわち STZ-RCC の脾臓内注射で認められた肝転移巣からの継代株である STZ-HM1では90%の肝転移出現率であった。肝転移の選別を各々2回および3回行った STZ-HM2, STZ-HM3では100%の転移出現率で, 肝転移の選別を繰り返すことにより明らかに転移出現率の増加が認められた($p < 0.05$, Kruskal-Wallis 検定)。肝転移結節数に関しても表1に示したように, 肝転移の選別を繰り返すことにより肝転移結節数の増加する傾向が認められた。さらに, 肝転移結節を100個以上有していたマウスの割合に関しては, STZ-RCC と STZ-HM1, STZ-HM2, STZ-HM3とを比較すると, 肝転移の選別をより繰り返した株でその割合は明らかに増加し($p < 0.01$, Kruskal-Wallis 検定), 特に STZ-

表 1 脾臓内注射による肝転移形成能

継代株	肝転移の選別回数	肝 転 移		
		出現頻度 (%)	肝転移巣数(中央値) [範囲]	転移巣100個以上のマウス (%)
STZ-RCC	0	11/16(68.8)	15[0-113]	1/16(6.3)
STZ-HM1	1	9/10(90.0)	81[0-382]	5/10(50.0)
STZ-HM2	2	5/5 (100)	71[17-283]	2/5 (40.0)
STZ-HM3	3	5/5 (100)	368[293-432]	5/5 (100)

(観察期間：8週間)

図 4 STZ-RCC と肝転移株の *in vitro* 浸潤能.

図 5 STZ-RCC の静脈内注射 8 週後の肺転移巣の肉眼所見。(転移巣を明確にするため肺をブアン固定している.)

HM3では全てのマウスが100個以上の肝転移結節を有していた。

3) *In vitro* invasion assay

STZ-RCC とこれを parent line とし肝転移の選別を繰り返した STZ-HM1, STZ-HM2, STZ-HM3 の *in vitro* における浸潤能を図 4 に示した。細胞播種後 4 時間目の観察では、転移の選別を 3 回行った STZ-HM3 のみで浸潤細胞の出現が観察されたが、STZ-RCC, STZ-HM1 および STZ-HM2 では浸潤細胞の出現は観察されなかった。6 時間目の観察では STZ-RCC で浸潤細胞を認めなかったが、STZ-HM1 では 10.7 ± 4.0 個 (平均 $\pm$ S.D., 以下同じ), STZ-HM2 では 3.0 ± 2.6 個の細胞浸潤が認められた。一方、STZ-HM3 では 47.3 ± 5.0 個の細胞浸潤が認められ、この株での高浸潤能が確認された (STZ-HM3 vs. STZ-HM1 あるいは STZ-HM2 ; $p < 0.01$, Student t 検定)。8 時間目の検討では、STZ-RCC で 5.7 ± 2.1 個, STZ-HM1 で 30.0 ± 4.6 個, STZ-HM2 で 33.0 ± 6.6 個, STZ-HM3 で 157.3 ± 20.0 個の浸潤細胞が見られ、転移の選別を繰り返した

株での *in vitro* における高浸潤能が示された。(STZ-HM3 vs. STZ-RCC, STZ-HM1 あるいは STZ-HM2 : $p < 0.01$, STZ-HM2 あるいは STZ-HM1 vs. STZ-RCC : $p < 0.01$, Student t 検定)。

2. 高肺転移株の選別

1) 肺転移形成

STZ-RCC の細胞浮遊液を静脈内注射することにより肺転移が認められ(図 5), 転移巣は病理組織学的にも STZ-RCC と同様の所見を呈していた(図 6), この肺転移巣も同系マウスに継代可能であった (STZ-PM1)。

2) 肺転移出現率および肺転移結節数

STZ-RCC と STZ-PM1 の静脈内注射による肺転移出現率および肺転移結節数を表 2 に示した。肺転移出現率に関しては STZ-RCC で 11.1% で STZ-PM1 では 100% であり、後者での肺転移出現率が明らかに高かった ($p < 0.01$, Kruskal-Wallis 検定)。肺転移結節数の

表 2 静脈内注射による肺転移形成能

継代株	肺転移の 選別回数	肺 転 移		
		出現頻度 (%)	肺転移単数(中央値) [範囲]	転移単100個以上の マウス(%)
STZ-RCC	0	1/9(11.1)	0[0-4]	0
STZ-PM1	1	4/4(100)	224[188-350]	4/4(100)

(観察期間：8週間)

図 6 STZ-RCC の静脈内注射 8 週後の肺転移巣の組織像。(×51)

比較においても、STZ-PM1での肺転移結節数が著明に多かった($p<0.01$, Student t 検定). 肺転移結節を100個以上有していたマウスの割合に関しても、STZ-RCCの静脈内注射では存在しなかったのに対し、STZ-PM1では全てのマウスが100個以上の転移結節を有し明らかにその割合が高かった ($p<0.01$, Kruskal-Wallis 検定).

考 察

癌の転移の成立のための具体的な過程は、①原発巣からの癌細胞の遊離および周辺組織への浸潤、②脈管内への侵入および移動、③微小脈管での捕捉あるいは着床、④微小脈管外への脱出、⑤遠隔部位での増殖、などであると考えられている⁴⁾. さらにこれらの過程は癌細胞側の因子と宿主側の因子との両方に影響されている。癌細胞側の因子としては癌細胞自身の増殖能あるいは浸潤能が、宿主側の因子としては宿主免疫、血管増生、標的臓器から分泌される成長因子があげられている⁵⁾⁶⁾.

癌の転移はこれらの複雑な過程の全てをくぐりぬけて形成されるものであり、何れかが欠如すると成立しないと考えられている。従って、高転移株を作成し、

これを研究対象とすることは転移の機構を解明する上で必要不可欠なことと考えられる。

一般に高転移株の選別方法には *in vivo* で行う場合と、*in vitro* で行う場合とがある。*In vivo* の方法で選別された高転移株としては Fidler⁷⁾の樹立したマウス melanoma である B16 F10のほか fibrosarcoma や lymphosarcoma を parent cell として樹立された株の報告がある^{8)~10)}. B16 F10は次に示す方法で選別された高転移株である。B16 melanoma を parent cell とし、これを静脈内注射して形成された肺転移結節を *in vitro* で培養した (B16 F1). その後培養した B16 F1 を同系マウスに静脈内注射し形成された肺転移結節より *in vitro* 培養株を樹立すると言う操作を10回繰り返すことにより、著明な肺転移能を有する B16 F10が樹立された。今回我々が選別した高肝転移株の STZ-HM3, 高肺転移株である STZ-PM1も、この *in vivo* での高転移株の選別法に準じた方法により樹立したことになる。

一方、*in vitro* での高転移株の選別法としては2つの方法がある。第一の方法は細胞のクローニングによる方法で、parent cell line の癌細胞集団の中から random に転移能の高いクローンを選別する方法である。この方法で選別された高転移株としては B16を parent cell とした報告¹¹⁾, fibrosarcoma を parent cell として選別した報告がある¹²⁾. 第二の方法は、先に示した具体的な転移の過程の一つをくぐりぬける能力を持つ細胞を選別する方法で、hard agarose 中での anchorage independent growth を有する細胞を選別し高転移株を選別した報告や¹³⁾, *in vitro* での浸潤能が高い細胞を選別して高転移株を樹立した報告がある¹⁴⁾.

以上のように *in vivo* または *in vitro* で高転移株を選別することが可能であることから、同一の癌細胞群の中の細胞でも同一の転移能を有しているのではなく、転移能と言う表現型に関して heterogeneity が存在する¹⁾. 今回の検討では parent line である STZ-

RCC と、肝転移の選別を施行した STZ-HM1, STZ-HM2, STZ-HM3, 肺転移の選別を施行した STZ-PM1 各々の株では各々の転移形成能に相違が認められた。このことから parent line である STZ-RCC においても転移と言う表現型で heterogeneity が存在したことが示された。今回の検討では高肝転移株選別には脾臓内注射を、高肺転移株選別には静脈内注射を用いたが、この parent line の投与法の相違も転移の臓器特異性選別に有利に働いたと考えている。

さて、癌の転移形成にはまず原発巣での増殖に続いて起こる周囲組織あるいは脈管への浸潤が転移形成の第一歩として重要な役割を果たしている¹⁵⁾。この癌細胞の浸潤は、①宿主組織の細胞外マトリックスへの癌細胞の付着、②癌細胞による細胞外マトリックスの変性、③癌細胞の宿主組織への移動、が具体的な過程と考えられている¹⁶⁾。それらを総合した癌細胞の浸潤能を判定する方法として今回の検討では Matrigel® を利用した *in vitro* invasion assay を用いた。Matrigel® は *in vivo* の基底膜の構成成分を豊富に含む *in vitro* で用いられる基底膜類似物質であり、癌細胞がこの Matrigel® を通過することは先に示した *in vivo* における浸潤を再現することになると考えられている。Albini ら¹⁷⁾ は Matrigel® を用いたこの方法において *in vitro* での浸潤能の高い癌細胞が、*in vivo* での転移性を有していることを証明している。また、他の報告でも *in vitro* invasion assay の成績が *in vivo* での転移能と良好に相関することが示されている^{18)~20)}。そこで我々も今回選別した STZ-HM1, STZ-HM2, STZ-HM3 各々の浸潤能を *in vitro* invasion assay を用いて検討した。その結果、脾臓内注射にて認められた肝転移結節の数と、*in vitro* invasion assay で判定された浸潤能とが良く相関した。このことは *in vitro* invasion assay で示された浸潤能が転移成立において重要な役割の一つを担っていることを示唆すると考えられた。

今回選別し得たマウス腎腺癌の肝および肺転移株は継代可能となっており、今後腎細胞癌の転移実験モデルになると期待している。

結 語

Streptozotocin によりマウス腎腺癌を発生させこれを継代化した (STZ-RCC)。これを parent line として高肝転移株、高肺転移株を選別し、以下の結論を得た。

1. 肝転移の選別として STZ-RCC を同系マウスに

脾臓内注射し、8週後に形成された肝転移巣を継代化し、さらにこれを脾臓内注射する操作を繰り返した。その結果、この操作を繰り返すに従い肝転移出現率、肝転移結節数の増加が認められた。特に、この操作を3回繰り返した STZ-HM3 では脾臓内注射後8週目の検討で5匹中5匹に293~432個(中央値368個)の転移巣が認められた。肺転移の選別として STZ-RCC を静脈内注射し、8週後に形成された肺転移巣を継代化し (STZ-PM1)、さらにこれを静脈内注射する操作を行った。その結果、STZ-RCC では9匹中1匹に最大4個の肺転移が認められたに過ぎないのに対し、STZ-PM1 では検討した全てに188~350個(中央値224個)の肺転移が認められた。これらのことから STZ-RCC では転移能において heterogeneity が存在したことが確認された。

2. 肝転移の選別を各々1, 2, 3回行った継代株で *in vitro* invasion assay を行ったところ、これらの脾臓内注射による肝転移能と *in vitro* 浸潤能が平行する結果であった。このことから *in vitro* invasion assay で示された浸潤能が、転移成立において重要な役割を果たしていることが示唆された。

文 献

- 1) Naito, S., von Eschenbach, A.C., Giavazzi, R. and Fidler, I.J.: Growth and metastasis of tumor cell lines isolated from a human renal cell carcinoma implanted into different organs of nude mice. *Cancer Res.*, **46**, 4109-4115, 1986.
- 2) 宮尾則臣, 熊本悦明, 塚本泰司: Streptozotocin によるマウス腎化学発癌過程の病理組織学的検討。日泌尿会誌, **82**, 1399-1407, 1991
- 3) 小谷典之, 塚本泰司, 熊本悦明, 宮尾則臣: ヒト腎細胞癌の *in vitro* 浸潤能と *in vitro* 浸潤能に対する成長因子 (EGF, TGF- β_1) の影響。日泌尿会誌, **82**, 613-619, 1991.
- 4) Fidler, I.J.: Tumor heterogeneity and the biology of cancer invasion and metastasis. *Cancer Res.*, **38**, 2651-2660, 1978.
- 5) Cavanaugh, P.G. and Nicolson, G.L.: Purification and some properties of a lung-derived growth factor that differentially stimulates the growth of tumor cells metastatic to the lung. *Cancer Res.*, **49**, 3928-3933, 1989.
- 6) Chackal-Roy, M., Niemeyer, C., Moore, M. and Zetter, B.R.: Stimulation of human prostatic carcinoma cell growth by factors present in human bone marrow. *J. Clin. Invest.*, **84**, 43-50, 1989.
- 7) Fidler, I.J.: Selection of successive tumor

- lines for metastasis. *Nature (New Biol.)*, 242, 148—149, 1973.
- 8) Suzuki, N., Wither, H.R. and Koehler, M.W.: Heterogeneity and variability of artificial lung colony-forming ability among clones from mouse fibrosarcoma. *Cancer Res.*, 38, 3349—3351, 1978.
 - 9) Kebel, R.S., Twiddy, R.R. and Robertson, D.M.: Induction of a tumor with greatly increased metastatic growth potential by injection of cells from low metastatic H-2 heterozygous tumor cells line into H-2 incompatible parental strain. *Int. J. Cancer*, 22, 583—594, 1978.
 - 10) Brunson, K.W. and Nicolson, G.L.: Selection and biologic properties of malignant variants of a murine lymphosarcoma. *J. Natl. Cancer Inst.*, 61, 1499—1503, 1978.
 - 11) Fidler, I.J. and Kripke, M.L.: Metastasis results from preexisting variant cells within a malignant tumors. *Science*, 197, 893—895, 1977.
 - 12) Kripke, M.L., Gruys, E. and Fidler, I.J.: Metastatic heterogeneity of cells from an ultraviolet light induced murine fibrosarcoma of recent origin. *Cancer Res.*, 38, 2962—2967, 1978.
 - 13) Li, L., Price, J.E., Fan, D., Zang, R., Bucana, C. D. and Fidler, I.J.: Correlation of growth capacity of human tumor cells in hard agarose with their in vivo proliferative capacity at specific metastatic site. *J. Natl. Cancer Inst.*, 81, 1406—1412, 1989.
 - 14) Poste, G., Doll, J., Hart, I.R. and Fidler, I.J.: In vitro selection of murine B16 melanoma variant with enhanced tissue-invasive properties. *Cancer Res.*, 40, 1636—1644, 1980.
 - 15) Liotta, L.A.: Tumor invasion and metastasis: Role of the basement membrane. *Am. J. Pathol.*, 117, 339—348, 1984.
 - 16) Terranova, V.P., Hujanen, E.S. and Martin, G. R.: Basement membrane and the invasive activity of metastatic tumor cells. *J. Natl. Cancer Inst.*, 77, 311—316, 1986.
 - 17) Albini, A., Iwamoto, Y., Kleinman, H.K., Martin, G.R., Aaronson, S.A., Kozlowski, J.M. and McEwan, R.N.: A rapid in vitro assay for quantitating the invasive potential of tumor cells. *Cancer Res.*, 47, 3239—3245, 1987.
 - 18) Kozlowski, J.M., McEwan, R., Keer, H., Sensibar, J., Sherwood, E.R. III, Lee, C., Grayhack, J.T., Albini, A., Martin, G.R.: Prostate cancer and the invasive phenotype: Application of new in vivo and in vitro approaches. in *Tumor Progression and Metastasis*, Nicolson, G.L. and Fidler, I.J., p. 189, Alan R. Liss Inc., New York, 1987.
 - 19) Saiki, I., Murata, J., Watanabe, K., Fujii, H., Abe, F. and Azuma, I.: Inhibition of tumor invasion by ubenix (bestatin) in vitro. *Jpn. J. Cancer Res.*, 80, 873—878, 1989.
 - 20) Saiki, I., Murata, J., Matsuno, K., Ogawa, R., Nishi, N., Tokura, S. and Azuma, I.: Anti-metastatic and anti-invasive effects of polymeric Arg-Gly-Asp (RGD) peptide, poly (RGD), and its analogues. *Jpn. J. Cancer Res.*, 81, 660—667, 1990.

(1991年6月13日受理, 特別掲載)