

〔原 著〕

上皮成長因子EGFによる退縮型癌細胞ER-1の

浸潤，転移能の促進に関する研究

永易 裕樹

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)

Enhancement of invasive capacity and metastatic potential on regressor tumor cell ER-1 by treatment with epidermal growth factor(EGF)

Hiroki NAGAYASU

Second Department of Oral Surgery

HEALTH SCIENCES UNIVERSITY OF HOKKAIDO

(Chief Prof. Hirofumi MURASE)

abstract

Tumor cells always interact with host reactive cells in the process of carcinogenesis and tumor growth. Likewise, malignant phenotypes of tumor cells are affected by cytokines and growth factors released from surrounding host reactive cells. This study examined the effects of epidermal growth factor(EGF) on tumorigenicity, invasive ability and the 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(10ng/ml) for 24hours(24h EGF ER-1), the invasive ability was enhanced in *in vitro* invasion assay using rat lung endothelial cells(RLE). The invasion activity enhanced by EGF was reversible fashion and decreased to the level of non-treated ER-1 cells on day 4. However, ER-1 cells cultured in the presence of EGF for one month (1M EGF ER-1) kept a high invasive ability for two months. In *in vivo* pulmonary metastasis and intraperitoneal inoculation experiments, ER-1 cells treated with EGF were found many tumor nodules in the lung and mesenterium as compared with non-treated ER-1 cells. 24h EGF ER-1 cells showed a temporary enhancement of invasive abilities and metastatic potentials, but 1M EGF ER-1 cells showed a fixed malignant phenotype for two months. In EGF binding activity assay and analysis of EGF receptor number, there were no differences between ER-1 cells and 1M EGF ER-1 cells. No change was observed in the expression of EGF receptor mRNA between ER-1 cells and 1M EGF ER-1 cells by RT-PCR. These results strongly suggest that long term EGF treatment may convert regressor ER-1 cells to progressor cells and

受付：平成6年9月30日

本論文の要旨は日本癌学会総会（平成5年10月5日）にて発表した。

that this may cause genomic alteration to ER-1 cells. The study indicates that EGF may play an important role in the acquisition of malignant phenotypes of tumor cells.

Key words invasion, metastasis, EGF, malignant phenotype, regressor tumor cell

I. 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、転移などを招来し、治療上重大な障害となっている。最近になり、この癌細胞の浸潤、転移能は、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、外因性の変異原物質以外に、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来ている¹⁻⁵⁾。特に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た上皮成長因子(Epidermal growth factor EGF)⁶⁾は、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来ている。また、口腔扁平上皮癌細胞は、EGF受容体を過剰に発現しており⁷⁾、EGFにより、その浸潤、転移能が増殖される可能性も示唆されて来ている⁸⁾。しかし、EGFが癌細胞の浸潤、転移などの悪性形質におよぼす影響についての詳細な検討は少なく不明な点も多いままとなっている。

そこで、EGFが癌細胞の悪性形質におよぼす影響を検討するために、高血圧発症ラット(SHR)に自然発生した乳癌細胞(c-SST-2)より分離され、造腫瘍性、転移能の低いクローンER-1細胞を用いて、EGF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検討した。

II. 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erthyl-methansulfonate(250 μ g/ml)で24時間処理し、さらに、Ouabain, 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^{9,10)}。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。¹¹⁾

3. 細胞培養

ER-1細胞は、7% fetal bovine serum (FBS, 56°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%gelatinでコートしたシャーレ上で10%FBSを添加したDulecco's modified Eagle's medium (DMEM)培地にて37°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となるように培地に添加し、24時間、もしくは1カ月間のEGF処理を行った。また、EGF1カ月間処理したER-1細胞の一部は、その後、1カ月間あるいは2カ月間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 5×10^5 個を撒きこれに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 5×10^4 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 2×2 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(cm^2)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¹³⁾。

6. Chemo-invasion assay

トランスウェルチャンバー(フィルター小孔 $8 \mu\text{m}$)を用いたinvasion assayは、次のように行った。上室のフィルター上面に基底膜構成成分であるマトリゲルをコートし、下室には、100 mmシャーレにconfluentに増殖したRLE細胞(2×10^7 個)を無血清DMEM培地10mlで24時間培養した後の培養上清を入れ、上室にはER-1細胞、EGF24時間処理ER-1細胞を4日間EGF非存在下で、培養したER-1細胞、EGF1カ月間処理した後に1カ月間EGF非存在下で培養したER-1細胞をそれぞれ 2×10^4 個入れ、72時間培養後、フィルター下面に浸潤した細胞を10%ホルマリンにて固定後、ギムザ染色を行い、顕微鏡下でフィルター下面付着した全細胞数を計測した。同様の実験を3回行い、その平均値をもって、RLE細胞の産生する走化因子に対する反応性として評価した。

7. In vivoにおける浸潤、転移能

ER-1細胞、24時間もしくは1カ月EGF処理したER-1細胞を、 1×10^5 個、同系ラット腹腔内に

移植し、50日後に屠殺開腹し、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 1×10^5 個、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数と肺重量を計測した。

8. Zymography

無処理ER-1細胞およびEGF24時間処理ER-1細胞、EGF24時間後4日間EGF非存在下で培養したER-1細胞、EGF48時間処理のER-1細胞、EGF1カ月間処理した後に1カ月間EGF非存在下で培養したER-1細胞を各々 2×10^5 個、無血清DMEM培地(2 ml)にて48時間培養し、その培養上清を回収し、2:1(v/v)でサンプルバッファー(0.1875M Tris-HCL, pH6.8, 30% glycerol, 0.00375% Bromphenol Blue, SDS)と混合し検体とした。次にゼラチン(G2625; Sigma. MO)を2% Sodium dodecyl sulfate (SDS)に溶解し、7.5% acrylamideでcopolymerizeさせた(ゼラチン最終濃度1 mg/ml)ゲルを作製し、これに検体を $45 \mu\text{l/lane}$ 入れ、Laemmli法¹⁴⁾に従い電気泳動を行った。電気泳動終了後、ゲルをRinsing Buffer(50mM TrisHCL; 2.5% TritonX-100, 0.05% sodium azide)に入れ、rocker platform上で3時間浸漬した。その後ゲルを、incubation buffer(50mM TrisHCL 0.15M NaCl, 10mM CaCl₂, 0.05% sodium azide)で37°Cで24時間培養を行い、0.05% Coomassie Blueにて染色を行った。尚、酵素活性はゲル上の透明なbandで評価した¹⁵⁾。

9. EGF binding assay

ER-1細胞およびEGF1カ月間処理ER-1細胞を24穴プレートに 1×10^5 /well撒き、24時間培養後、Hanks液で2回洗浄し、無血清DMEM培地(1.5ml)に撒いた。ここに、EGF20mM/well添加し、ブロッキングを行い、^[125I]EGFの非特

異的結合を測定した。次に $[^{125}\text{I}]$ EGFを加え、EGF受容体のインターナリゼーションを防ぐために 4°C の条件下で1時間培養を行った。その後、培養上清と細胞を回収し、細胞を1 N NaOHにて細胞を溶解し、遊離EGFと結合EGFの放射活性をガンマカウンターにて測定し、スキャッチャード解析を行いEGF結合能とEGF受容体数を検索した¹⁶⁾。

10. EGF受容体mRNAの検索

guanidine thiocyanate/phenol/chloroform法により、ER-1細胞とEGF処理ER-1細胞からRNAを抽出した。総量5 mgのRNAを、600Uの murine Molony leukemia transcriptase (BRL) 150 pmolの random hexamerで逆転写(reverse transcription, RT)した。ラットEGF受容体に対する primer (3 primer 5 CTGT ACGTCCATTGACATGT-3, 5 primer 5 TCAACAACCTGTGAAGTCGTC-3)は、DNA synthesizer (Applied Biosystems)にて合成したものを用いた¹⁷⁾。このprimerで、逆転写し、得られたcDNAをpolymerase chain reaction (PCR)法にて増幅した。PCR法の増幅は、合成されたcDNAに50mM KCL, 10mM Tris-HCL, 1.5mM MgCl_2 , 0.01% gelatin, 0.2mM deoxynucleotide triphosphate, primer, 2.5U Taq polymeraseを加え、混合し、その上に、50 μl の mineral oilを滴下し、 94°C 30分、 55°C 30分、 72°C

2分で30サイクルにて行った。増幅後、7 mlのサンプルを2 % agarose gelにて電気泳動を行い、ethidium bromideで発色させ、EGF受容体 mRNAの解析を行った。尚、用いたサンプルの総RNA量を確認するために、ラットの house keeping geneであるGAPDHを対照として用いた。

ER-1細胞とEGF処理ER-1細胞から抽出したRNAの逆転写を行い、GAPDH primerで得られたcDNAのPCRを行い、同時に検索した。

11. 統計

得られたデータは、 $\text{mean} \pm \text{SD}$ で表示した。また、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。

III. 結 果

1. ER-1細胞の増殖性におよぼすEGFの影響

ER-1細胞を、EGF 10 ng/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、2日目、3日目では、EGF処理群 $(11.6 \pm 1.6) \times 10^4$ 個、 $(15.2 \pm 2.2) \times 10^4$ 個、無処理群では $(9.2 \pm 1.8) \times 10^4$ 個、 $(12.9 \pm 3.6) \times 10^4$ 個と、3日目以降には有意 ($p < 0.05$) な細胞数の増加が認められた (Fig. 1)。

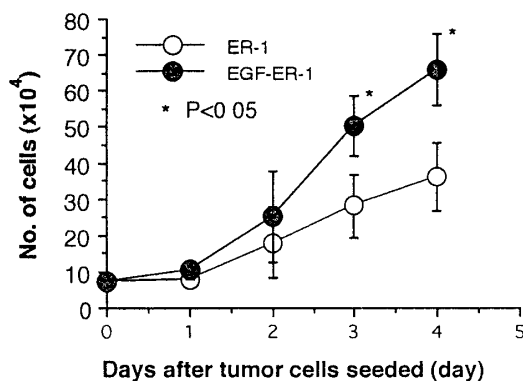


Fig 1 In vitro growth curves of regressor ER-1 cells in the presence and absence of EGF pretreatment (10ng/ml)

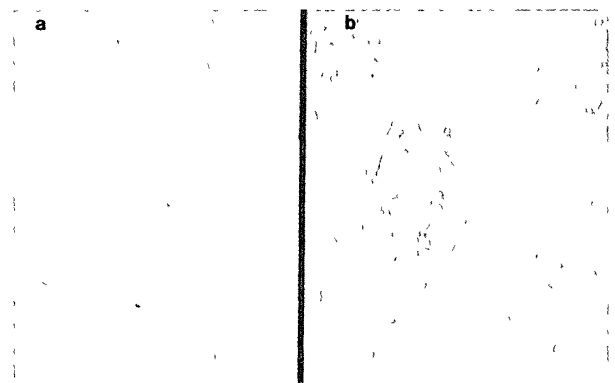


Fig 2 Microscopic imaging of co-culture of regressor ER-1 cells and endothelial cells (a), EGF-treated ER-1 and endothelial cells (b)

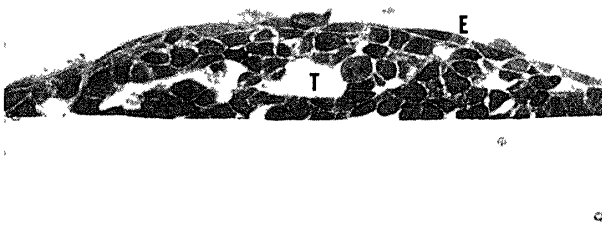


Fig 3 A vertical section of the invaded EGF-treated ER-1 cell(T) show invasion and growth under the endothelial cell(E)

Table 1

Invasive capacity of ER-1 cells into RLE when ER-1 cells were treated with EGF for 24 hours

Treatment with EGF	No. of penetrating colonies/cm ² ± SD
None	11.7 ± 2.9
24hours ^a	26.6 ± 2.8 *

a ER-1 cells were pretreated with EGF (10ng/ml) for 24 hours and tested by in vitro invasion assay

* p<0.01 as compared with the non-treated group, by Student's t-test

2. ER-1細胞のin vitroの浸潤能におよぼすEGFの影響

単層培養したRLE細胞下にもぐり込み増殖したER-1細胞は、位相差顕微鏡下で観察すると、周囲との境界が不明瞭なコロニーとして確認され (Fig.2(b)), RLE細胞上で増殖しているER-1細胞は周囲との境界が明瞭な細胞として観察された (Fig.2(a))。また、縦断面でみると単層培養したRLE細胞下にもぐり込み増殖したER-1細胞は一層のRLE細胞下に細胞集団として認められた (Fig.3)。

ER-1細胞の浸潤能をin vitro invasion assayにおけるコロニー数で調べた結果、無処理ER-1細胞は、RLE細胞下に11.7±2.9/cm²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26.6±2.8/cm²にまで増加し、有意(p<0.01)な

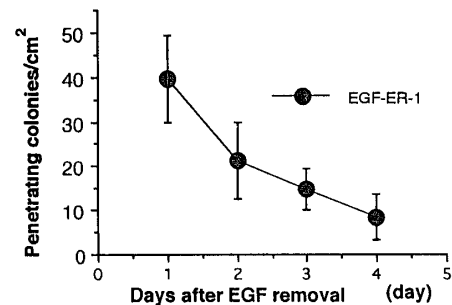


Fig 4 Reversibility of the invasive capacity on regressor ER-1 cells by pretreatment with EGF (10ng/ml) for 24 hours

Table 2

Invasive capacity of ER-1 cells into RLE when ER-1 cells were treated with EGF for one month

Treatment with EGF	No. of penetrating colonies/cm ² ±SD
None	13.8 ± 4.6
1M EGF ER-1(1M-free) ^a	38.6 ± 5.3*
1M EGF ER-1(2M-free) ^b	36.2 ± 2.9*

a ER-1 cells were pretreated with EGF (10ng/ml) for one month and then cultured with EGF-free media for one month.

b. EGF treated ER-1 cells were cultured with EGF free media for 2 months before the assay

* p<0.001 as compared with non-treated group, by Student's t-test

浸潤能の促進が認められた (Table 1)。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21.2±9.8/cm², 14.6±4.7/cm², 8.3±5.2/cm²と低下し、4日目には元のER-1細胞のレベルに戻っておりEGF24時間処理による浸潤能の増強は一過性の可逆的変化であることが示された (Fig.4)。一方、EGF 1カ月間処理し、その後、1カ月間および2カ月間EGF非存在下の状態で培養したER-1細胞の浸潤能は、1カ月間EGF非存在下のER-1細胞で38.6±5.3/cm², 2カ月間EGF非存在下のER-1細胞で36.2±2.9/cm²と無処理ER-1細胞の浸潤能13.8±4.6/cm²と比べ有意(p<0.001)に高い浸潤能を維持していた (Table 2)。このことは、ER-1細胞を1カ月間EGF処理すると、その促進された浸潤能は、その後2カ月間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

Table 3

Enhanced effects of EGF on <i>in vitro</i> invasive capacity of ER-1 cells		
Period of EGF treatment		In vitro invasive capacity
Culture in the presence of EGF	Culture in the absence of EGF	No. of penetrated cells/filter Mean \pm SD (Matrigel) ^a
0 hour	0 hour	4.0 \pm 1.0
24 hours	0 hour	13.5 \pm 3.5*
24 hours	4 days	5.5 \pm 2.1
1 month	1 month	30.8 \pm 9.1*

^a Tumor cells were placed on Matrigel™-coated membranes of Transwell™ chambers. These chambers were incubated for 3 days and the cells attached to the lower surface of the membranes were counted under a microscope.

* $P < 0.01$ as compared with non-treated group, by Student's *t*-test

Table 5

Tumorigenicity of regressor ER-1 cells after treatment with EGF for one month		
Treatment with EGF	No. of rats with tumor No. of rats used	Mean tumor weight \pm SD (g)
None	1/5	3.7 \pm 7.2
1M EGF ER-1(1M-free) ^a	4/6	31.6 \pm 3.59*
1M EGF ER-1(2M-free) ^b	5/5	35.0 \pm 3.52*

^a ER-1 cells were pretreated with EGF (10ng/ml) for one month and then cultured with EGF-free media for one month

^b EGF treated ER-1 cells cultured with EGF-free media for two months

All rats were killed 50 days after the tumor inoculation

* $P < 0.01$ as compared with non-treated group, by Student's *t*-test

ることなく安定した形質として，獲得される可能性を示した。

3. EGFがER-1細胞のRLE細胞培養上清に対する走化性におよぼす影響

トランスウェルチャンバーを用いたchemo-invasion assayにおいて，無処理ER-1細胞は，RLE細胞に対する浸潤能と同様に，RLE細胞培養上清に対して5.5 \pm 4.6個/filterと極めてわずかな走化能しか示さなかった。しかし，EGF24時間処理ER-1細胞では13.5 \pm 3.5個/filterと，無処理ER-1細胞と比し，有意に高い走化能の促進が確認された。さらに，EGF24時間処理により促進されたER-1細胞の走化能の促進は，EGF

Table 4

Tumorigenicity of regressor ER-1 cells after treatment with EGF for 24 hours		
Treatment with EGF	No. of rats with tumor no. of rats used	Mean tumor weight (g) \pm SD
None	0/5	0
24 hours ^a	5/5	0.28 \pm 0.2
24 hours(4 days-free) ^b	0/5	0

^a ER-1 cells pretreated with EGF(10ng/ml) for 24 hours

^b ER-1 cells pretreated with EGF for 24 hours and then cultured with EGF-free media for 4 days

All rats were killed at 15 days after tumor inoculation

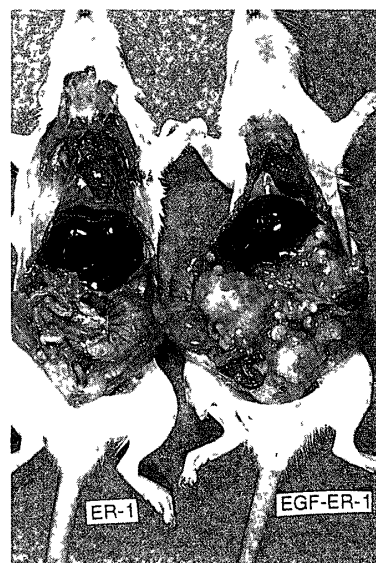


Fig 5 Tumorigenicity of regressor ER-1 cell and ER-1 cells treated with EGF for one month in SHR rats. The regressor ER-1 cell were found to have regressed spontaneously. In the case of ER-1 cells treated with EGF for a month, tumors developed in the peritoneum.

非存在下で4日間培養すると，元のER-1細胞のレベルに戻り，RLE細胞に対する浸潤能と同様にEGF24時間処理では一過性に可逆的変化を示した。一方，EGF 1カ月間処理ER-1細胞ではその後1カ月間EGF非存在下の状態で培養しても30.8 \pm 9.1個/filterの走化能の促進を示し，安定した形質を保っていた (Table3)。

4. EGFのER-1細胞のin vivoにおける造腫瘍性および浸潤，転移能におよぼす影響

1) 腹腔内移植における変化

無処理ER-1細胞をSHRラケットの腹腔内に移植した場合，5匹全例において腫瘍の形成が観察されなかったが，EGF24時間処理ER-1細胞

Table 6

Artificial metastasis by regressor ER-1 cells after treatment with EGF

Period of EGF treatment		Metastasis in lung		
Culture in the presence of EGF	Culture in the absence of EGF	Incidence ^d	Lung weight (g \pm SD)	No. of colonies in lung (Mean \pm SD)
0 hour	0 hour	2/5	1.9 \pm 0.1	0.4 \pm 0.4
24 hours ^a	0 hour	4/5	1.8 \pm 0.2	31.7 \pm 10.4*
24 hours ^b	4 days	2/6	1.8 \pm 0.2	1.8 \pm 2.4
1 month ^c	1 month	4/4	1.9 \pm 0.3	103.7 \pm 20.5**

a ER-1 cells pretreated with EGF (10ng/ml) for 24 hours

b ER-1 cells pretreated with EGF (10ng/ml) for 24 hours and then cultured in EGF-free media for 4 days

c ER-1 cells pretreated with EGF (10ng/ml) for one month and then cultured in EGF-free media for another month

d ER-1 cells treated with or without EGF were injected into the tail veins of SHR rats

* $p < 0.02$, ** $p < 0.001$ as compared with non-treated group, by Student's t -test

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。(Table 4)。一方、EGF 1カ月間処理ER-1細胞ではその後、1カ月間EGF非存在下で培養しても6匹中4匹、2カ月間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、EGF 1カ月間処理ER-1細胞は、少なくとも2カ月間高い造腫瘍性を維持していた。(Table 5)。肉眼的所見においては、無処理ER-1細胞は腹腔内に腫瘍は認めないが、EGF 1カ月間処理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多数観察された(Fig. 5)。

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匹にしか認められず、形成されたコロニー数も 0.4 ± 0.4 個であったのに対し、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、一過性の変化を示した。一方、EGF 1カ月間処理ER-1

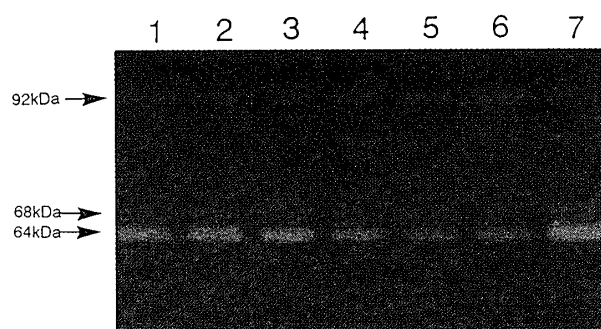


Fig 6 Gelatinase activity of regressor ER-1 cells by the treatment with EGF - The cells were incubated with or without EGF and the conditioned media were collected after 48 hours. Thirty μ l conditioned media from ER-1 cells or EGF-treated ER-1 variants were electrophoresed gelatin containing gel. Lane1, ER-1 cells, Lane2, 3, pretreatment with EGF (10, 50ng/ml) for 24 hours, Lane4, pretreatment with EGF (10ng/ml) for 24 hours and then cultured in EGF-free media for 4 day, Lane 5, 6, treatment with EGF (10, 50ng/ml) during the assay, Lane, 7, ER-1 cells were pretreated with EGF for one month and then were cultured in EGF-free media for one month

細胞は、その後1カ月間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(Table 6)。以上の結果は、*in vivo*, *in vitro*においてもER-1細胞の造腫瘍性、浸潤転移能は、EGF24時間処理では一過性の可逆的な亢進を示すが、EGF 1カ月間処理では、これら悪性形質が固定化される可能性が示唆された。

5. EGF処理によるER-1細胞のゼラチナーゼ活性の検索

ゼラチンを基質としたzymographyによるゼラチナーゼ活性を解析した結果、ER-1細胞は、培養上清中に92 KDa (matrix metalloproteinase-9・MMP-9)、68,64kDa (MMP-2)のゼラチナーゼを産生、分泌していた。また、EGF24時間処理ER-1細胞、EGF24時間処理後に4日間EGF非存在下で培養したER-1細胞、あるいはEGF48時間、処理ER-1細胞のゼラチナー

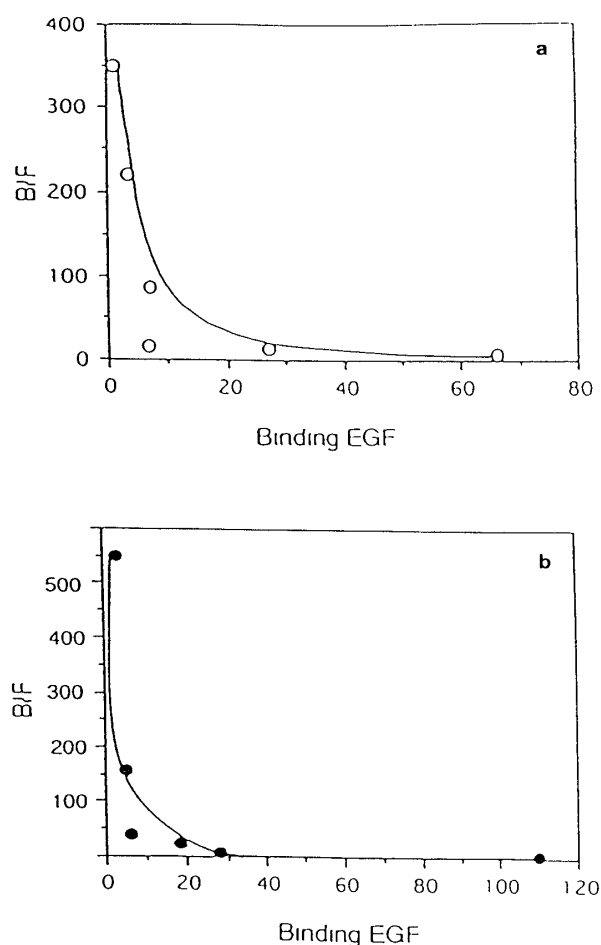


Fig 7 Binding activity of $[^{125}\text{I}]$ EGF to regressor ER-1 cells(a) and 1month EGF-treated ER-1 cells(b)

ゼの産生は無処理ER-1細胞と同等であった。しかし、EGF 1 カ月間処理し、その後 1 カ月間 EGF 非存在下で培養した ER-1 細胞においては、無処理 ER-1 細胞と比べ、MMP-2 のゼラチナーゼの産生増強が認められた (Fig 6)。

6. EGF 処理による ER-1 細胞の EGF 受容体数と結合能におよぼす影響

ER-1 細胞および EGF 1 カ月処理 ER-1 細胞に発現される EGF 受容体の細胞あたりの数と EGF 結合能を $[^{125}\text{I}]$ EGF を用いた結合試験にて検索した。得られたデータをスキャッチャード解析した結果、無処理 ER-1 細胞は、高親和性受容体 1.2×10^5 個/cell, 低親和性受容体 4.0×10^5 個/cell を発現していた。また、EGF 1 カ月間処理し、その後 1 カ月間 EGF 非存在下で培養した

Table 7

EGF receptor number on ER-1 variants

Cells	High affinity receptor/cell	Kd	Low affinity receptor/cell	Kd
ER-1	1.2×10^5	0.04	4.0×10^5	1.4
24h EGF treatment ER-1	5.5×10^4	0.22	2.1×10^5	4.5
24h EGF ER-1(4 days free)	9.8×10^4	0.05	5.0×10^5	1.3
1M EGF treatment ER-1	1.3×10^5	0.13	2.7×10^5	2.5

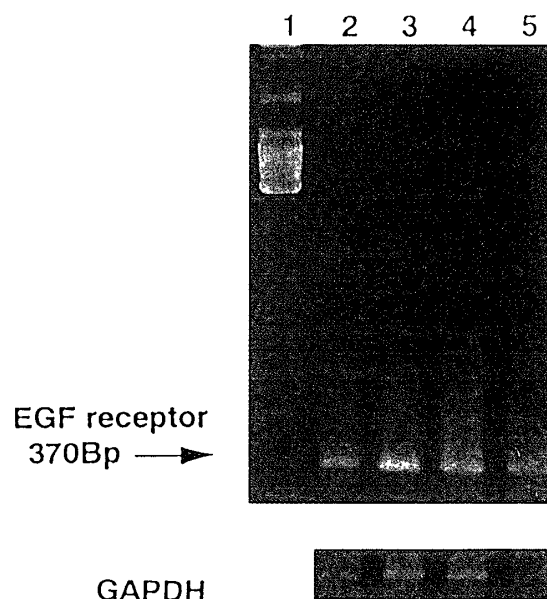


Fig 8 Expression of mRNA for EGF receptor on regressor ER-1 cells and EGF-treated ER-1 cells variants Total RNA isolated from ER-1 cells and variants were analysed by RT-PCR After 30 cycle amplification, samples were applied on agarose gel Expected sizes of DNA fragments for EGF receptor and GAPDH m RNA was amplified as a control Lane 1 marker, Lane 2 ER-1 Lane 3 ER-1 pretreated with EGF (10ng/ml) for 24 hours, Lane 4 ER-1 pretreated with EGF for 24 hours and then cultured in EGF-free media for 4days, Lane 5 ER-1 cells pretreated with EGF for one month and then were cultured in EGF-free media for one month

ER-1 細胞においても、高親和性受容体 1.3×10^5 個/cell, 低親和性受容体 2.7×10^5 個/cell 発現しており、ER-1 細胞を比べても EGF 受容体の数および、その結合能に有意な差は認められなかった (Fig. 7, Table 7)。

7. EGF 処理による ER-1 細胞の EGF 受容体 mRNA 発現におよぼす影響

RT-PCR 法により、ER-1 細胞、EGF 24 時間処

理ER-1細胞, EGF24時間処理後に4日間EGF非存在下で培養したER-1細胞, および1カ月間EGF処理後1カ月間EGF非存在下で培養したER-1細胞におけるEGF受容体mRNA発現の解析を行った結果, 各細胞間でEGF受容体mRNAレベルにおいて, EGFの処理期間にかかわらず同等に370BpにEGF受容体mRNAが発現されていた。尚, EGF24時間処理ER-1細胞, EGF24時間処理後に4日間EGF非存在下で培養したER-1細胞でのEGF受容体mRNAの発現が高いように見えるが, GAPDHでみた総mRNAも高いため, 相殺すると, 各細胞間でEGF受容体mRNAの発現に差は認められなかった。この結果より, EGF長期間処理によりEGF受容体mRNAのup regulationのないことが確認された(Fig.8)。

IV. 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である。ER-1細胞 1×10^4 個を正常同系宿主に移植すると自然退縮するが, 大量移植(1×10^6 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。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を必要とせず, 元のER-1細胞に比べ高い造腫瘍性, 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¹⁸⁾。その原因としては, 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)の働きによる可能性が示唆されて来ている^{8,18)}。また, 胃癌細

胞においてEGFおよびTGF- α は, 増殖因子として働くのみならず, EGF受容体の発現, 細胞外基質分解酵素の産生を誘導し, 悪性化を進展する報告がなされている¹⁹⁾。そこで, 本研究において増殖因子のうち特にEGFに注目し, EGFによるER-1細胞の悪性形質獲得に及ぼす影響を検討した。

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の割合は, 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時間処理した時のER-1細胞は, EGF処理直後で造腫瘍性および浸潤, 転移能が強く促進されるが, 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, EGF1カ月間処理ER-1細胞は, その後2カ月間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た可能性が示唆された。これらEGF処理により*in vitro*で浸潤能の亢進したER-1細胞を*in vivo*で検討したところ, 無処理ER-1細胞は腹腔内および尾静脈内移植において, ほとんど浸潤性の増殖を示さないのに対し, EGF24時間処理ER-1細胞では, 腹腔内の強い浸潤性増殖, 肺転移巣の形成が観察された。しかし, このような性格は*in vitro* invasion assayの結果と同様に可逆的なもので, 4日目には元のER-1細胞の状態に戻っていた。一方, EGF1カ月間処理したER-1細胞では, その後2カ月間EGF非存在下でも高い浸潤, 転移能を示していた。特に, 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、増殖することを示唆した。以上の結果は、*in vitro* invasion assayの結果が極めて良く*in vivo*の結果を反映することを示すとともに、ER-1細胞は24時間の短期間のEGF処理では一過性の浸潤能の亢進を示し、1カ月間の長期間のEGF処理では、固定化した高い浸潤能を獲得する可能性を示唆すると考えられた。

次に、EGF処理により亢進するER-1細胞の浸潤能獲得機序を検討するために、*in vitro* invasion assay時に用いたRLE細胞の培養上清を用いてこの上清に対するEGF処理ER-1細胞の走化能の変化を検討した。その結果、EGF24時間処理ER-1細胞の走化能は無処理ER-1細胞に比べ有意に増強されていたが、EGF処理後、経時的に走化能の亢進は認められなくなり、EGF処理後、4日目では元のER-1細胞の状態に戻っていた。一方、EGF 1カ月間処理ER-1細胞では、その後、2カ月間高い走化能の増強を示していた。この結果は、先に述べた*in vivo*, *in vitro*におけるEGFによる浸潤、転移能の促進現象と極めて良く相関を示していた。また、今回結果は示していないがEGF処理によるER-1細胞のrandom motilityを金コロイド法にて検討したところ、EGF処理ER-1細胞のrandom motilityは、いずれの処理によっても変化しておらず、今回得られた走化能の変化は、単なるrandom motilityの亢進によって生じた現象ではなく、RLE細胞培養上清中に含まれる液性因子に対して、EGF処理ER-1細胞の感受性が亢進された結果生じたものと考えられた。今後は、このRLE細胞の培養上清中に含まれる液性因子の同定および、癌細胞側の受容体などの解析が必要と考えられた。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、血管内侵入、血管内移動、血管内皮細胞への接着、血管外脱出、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。この過程のなかで癌細胞の産生する細胞外基質分解酵素は、細胞間質内移動、血管内外への侵入、脱出時に必須なものと考えられ、癌細胞の転移形質発現を規定する重要な因子であると考えられている。また、この癌細胞が産生する細胞外基質分解酵素の産生は種々の増殖因子、サイトカインによって影響をうけ、グリオーマ、扁平上皮癌、大腸癌細胞では、EGFは、ゼラチナーゼ(MMP-2, MMP-9)、ウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベーター(uPA)またはuPAレセプターの発現を促進することが報告されている²⁰⁻²³⁾。特に近年、細胞外マトリックス分解酵素のうちMMP-9は、細胞外マトリックスの構成成分であるコラーゲンIV, Vを分解し、またMMP-2は、コラーゲンIV, Vおよびフィブロンectinを分解する酵素として、癌細胞の浸潤、転移に深く関与する重要な酵素であることが注目されて来ている²⁴⁻²⁵⁾。そこで、EGFによるER-1細胞のMMPの産生量の変化を検討したところ、ER-1細胞はEGF無処理でもMMP-2, -9の産生を示し、EGF24時間処理では、その産生に変化は認められなかった。一方、EGF 1カ月間処理したER-1細胞ではMMP-2の産生が増強されていた。この結果は、EGF24時間処理ER-1細胞の浸潤能の亢進には、MMPの関与は認め難いが、EGF 1カ月間処理したER-1細胞浸潤能の亢進には深く関与し、これが、EGF長期間処理後の安定した浸潤、転移能の維持に関与している可能性が考えられた。今後、細胞外マトリックス分解酵素がEGFによりER-1細胞の浸潤、転移能に関与する可能性を検討するために、プラスミノゲンアクチベーター、カテプシン類やヘパラーゼなどの他のマトリックス分解酵素、さらには、TIMP-1, TIMP-2, PAI-1, PAI-2などのインヒビターの存在様式などを詳細に検討す

る必要があるものと考えられた。

先に、Hamadaら¹⁸⁾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、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作用あるいは宿主反応細胞の産生する液性因子を介して、長期間安定した悪性形質を示していることより、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。Renら²⁵⁾は、このERpP細胞を用いて、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て、宿主反応細胞の直接作用あるいは、宿主反応細胞の産生する増殖因子、サイトカインを介した作用により癌細胞に遺伝的变化をもたらしたと推察している。

今回の結果において、特にEGF 1カ月間の長期間処理により、ER-1細胞の浸潤、転移能は安定した形質を示し、ER-1細胞自体がEGFにより形質変換した結果生じた現象であると強く考えられる。しかし、ER-1細胞は元々クローンではあるが、ER-1細胞中に存在するEGFに対して感受性の高いごくわずかな細胞集団が存在し、これが長期間のEGF処理によって、選択的にその細胞集団が増殖し今回の結果となった可能性も考えられた。そこで、ER-1細胞およびEGF 1カ月間処理したER-1細胞のEGF受容体の発現量の変化を検討したが、膜面レベルにおけるEGF結合能、受容体数ともに差はなく、EGF受容体mRNAレベルにおいてもその発現量に変化は認められなかった。このことより、今回、明らかとなった現象は、そのようなER-1細胞の中にEGFに対して感受性を示す細胞集団が存在し、長期間のEGF処理により選択的にその細胞集団が増殖した結果生じた現象であるという可能性は少ないと考えられた。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検討するために、今回結果は示していないが、EGF処理により癌細胞が6-TGに対する薬剤耐性を獲得するか否かを検索した。ER-1細胞は6-TGに対して耐性をすでに獲得しているため、6-TGに感受性を示す親株のc-SST-2を用いて、EGF処理により突然変異株を生むか否かをみたところ、無処理c-SST-2では6-TG添加培地でコロニーの形成がなされなかったが、c-SST-2をEGF1カ月間処理を行ったところ、 3×10^4 個の癌細胞から6-TG添加培地で71個のコロニーの形成が確認された。これらのことよりEGFが、癌細胞にとって悪性形質を獲得する様は遺伝的变化をもたらし得る可能性を強く示唆した。

EGF処理によりER-1細胞に生じた遺伝的变化としての考えを支持することの一つに、EGF受容体そのものに変化が及んだことが考えられる。グリオーマ細胞では、EGF受容体内のリガンド結合部にmutation, deletionがあると常に自己リン酸化が起こり過剰なシグナルが伝わるという報告がなされている²⁶⁾。今回の結果において、ER-1細胞とEGF 1カ月間処理ER-1細胞では、EGF受容体数およびEGF受容体mRNAの発現ともに両細胞間で差がなかったことより、長期間のEGF処理によって、EGF受容体本体にmutationが起こりリン酸化、脱リン酸化機構が正常に働かずER-1細胞にとって、悪性形質発現にかかわる過剰なシグナル伝達が起こった可能性も推察される。また、田原¹⁹⁾は、胃癌細胞において、EGFが作用したとき、その癌細胞において、EGF受容体の発現を促し、EGF, TGF- β を自ら産生するようになり、オートクリン増殖因子として働き、悪性形質を獲得することを報告している。このことより、ER-1細胞を長期間処理したとき、反応性に自己を刺激する因子の産生、例えば、EGFやTGF- β など、あるいは他の増殖因子を自らの産生機構が活性化し、

オートクリンループで悪性形質を確得した可能性も考えられた。しかし、現在のところ、その遺伝的変化の可能性を証明する結果は得られておらず、今後、解明すべき問題であると考えられた。

癌細胞の浸潤、転移能などの悪性形質は、発癌当初より有しているのではなく、癌細胞における悪性形質のgenetical,あるいはepigeneticalな獲得には、宿主反応細胞との直接接触,または、宿主反応細胞から産生される種々の液性因子,すなわち、増殖因子,サイトカイン,各種タンパク分解酵素^{27,28)}や活性酵素などの生体内微小環境因子が関与していると考えられる²⁹⁾。そのうちEGFは、癌細胞の悪性形質獲得に働くことが強く示唆された。

V. 結 語

本研究の結果は、癌細胞をとりまく微小環境中に存在する内在性因子である増殖因子のEGFが、癌細胞の悪性化進展に深く関与する可能性を示すとともに、EGFが発癌後のtumor progression因子として、geneticalに作用する可能性を示唆したものである。

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医療大学歯学部口腔外科学第二講座村瀬博文主任教授、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、北海道医療大学歯学部口腔病理学講座賀来亨教授、北海道医療大学歯学部口腔生化学講座市田篤郎教授、に深甚の謝意を表します。また、終始懇切なご指導と御校閲を賜りました北海道医療大学歯学部口腔外科学第二講座柴田敏之講師、北海道大学医学部癌研究施設細胞制御部門兵田淳一講師ならびに、本研究に対しご協力くださった教室の皆様へ厚くお礼申し上げます。

VI. 文 献

- 1) Nowell, P C Mechanisms of tumor progression *Cancer Res* , 46 ,2203-2207,1986
- 2) Wie, W and Heppner, G H Tumor infiltrat-

- ing lymphocytes of spontaneous versus transplanted mouse mammary tumors *Cancer Immunol Immunother* , 26 ,257-262,1988
- 3) Rice, G E , Gimbrone, M A and Bevilacqua, M P Tumor cell-endothelial interaction *Am J Pathol* , 133 ,204-211, 1988
- 4) Breilout, F , Antonie, E , Lascaux, V , Roland, Y and Poupon, M F 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 , Komatsu, K and Akedo, H Potentiation of invasive capacity of rat ascites hepatoma cells by transforming growth factor- β *Jpn J Cancer Res* , 85 ,107-110, 1989
- 6) Cohen, S Epidermal growth factor *Biosci Rep* , 6 ,1017 1986
- 7) 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
- 8) Xiaobin, L , Nagayasu, H , Hamada, J , Hosokawa, M and Takeichi, N Enhancement of tumorigenicity and invasion capacity of rat mammary adenocarcinoma cells by epidermal growth factor and transforming growth factor- β *Jpn J Cancer Res* , 84 ,1145-1149, 1993
- 9) Hamada, J , Takeichi, N and Kobayashi, H 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
- 10) Okada, F , Hamada, J , Hasegawa, J , Takeichi, N , Hosokawa, M and Kobayashi, H Experimental approach for the investigation of tumor progression *Jpn J Cancer Chemother* , 16 ,1210-1218, 1989
- 11) Nakajima, M , Weich, D R , Belloni, P N , and Nicolson, G L 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
- 12) Akedo, H , Shinkai, K , Mukai, M , Mori, Y , Tateishi, R , Tanaka, K , Yamamoto, R and Morishita, T Interaction of rat ascites hepatoma cells with cultured mesothelial cell layers

- a model for tumor invasion *Cancer Res* , 46, 2416-2422, 1986
- 13) Ohigashi, H , Shinkai, K , Mukai, M , Ishikawa, O , Imaoka, S , Iwanaga, T and Akedo, H *In vitro* invasion of endothelial cell monolayer by rat as cites hepatoma cells *Jpn J Cancer Res* , 80, 818-821, 1989
 - 14) Laemmli, U K Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 *Nature*, 227, 680-685, 1970
 - 15) Nakajima, M , Lotan, D , Baig, M M , Caralero, R M , Wood, C W , Hendrix, M J C and Lotan, R Inhibition by retinoic acid of type IV collagenolysis and invasion through reconstituted basement membrane by metastatic rat mammary adenocarcinoma cells *Cancer Res* , 49, 1698-1706, 1989
 - 16) Carpenter, G *Methods in Enzymology*, ed L Brinbaumer, B W O, Malley, Academic Press, New York, Vol 109, p 101, 1985
 - 17) Petch, L A , Harris, J , Raymond, V W , Blansband, A , Lee, D C and Earp, H S A truncated, secreted form of the epidermal growth factor receptor is encoded by an alternatively spliced transcript in normal rat tissue *Molecular and Cellular Biol* , 10, 2973-2982, 1990
 - 18) Hamada, J , Takeichi, N , Okada, F , Ren, J , Li, X , Hosokawa, M and Kobayashi, H 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
 - 19) 田原栄一：ヒト胃癌の発生, 増殖, 進展—分子病理学的アプローチ—*日病会誌* 81, 21-49, 1992
 - 20) Lund-Johansen, M , Bjerkvig, R and Humphrey, P A Effect of epidermal growth factor on glioma cell growth, migration and invasion *in vitro* *Cancer Res* 50, 6039-6044, 1990
 - 21) 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
 - 22) Boyd, D , Examination 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
 - 23) Duffy, M J , The role of proteolytic enzymes in cancer invasion and metastasis *Clin Exp Metastasis* , 10, 145-155, 1992
 - 24) Wooley, D E , Collagenolytic mechanisms in tumor cell invasion *Cancer Metastasis Rev* , 3, 361-372, 1984
 - 25) Ren, J , Hamada, J , Okada, F , Takeichi, N , Morikawa, K , Hosokawa, M, and Kobayashi, H Correlation between the presence of microvilli and the growth or metastatic potential of tumor cells *Jpn J Cancer Res* , 81, 920-926, 1990
 - 26) Yamazaki, H , Ohba, Y , Tamaoki, N , and Shibuya, M A deletion mutation within the ligand binding domain is responsible for activation of epidermal growth factor receptor gene in human brain tumor *Jpn J Cancer Res* , 81, 773-779, 1990
 - 27) Dabbous, M K , North, S M , Haney, L and Nicolson, G L , Macrophage and lymphocyte potentiation of syngenic tumor cell and host fibroblast collagenolytic activity in rats *Cancer Res* , 48 6832-6836, 1988
 - 28) Assoian, R K , Komoriya, A , Meyers, C A , Miller, D M and Sporn, M B Transforming growth factor- β in human platelets *J Biol Chem* , 258, 7155-7160, 1983
 - 29) Okada, F , Hosokawa, M , Hamada, J , Hasegawa, J , Kato, M , Mizutani, M , Ren, J , Takeichi, N and Kobayashi, H Malignant progression of a mouse fibrosarcoma by host cell reactive to a foreign body (gelatin sponge) *Br J Cancer* , 66, 635-639, 1992