

〔原 著〕

ヒト骨肉腫細胞株の生物学的特性
—原発巣と肺転移巣より樹立された細胞株の比較—

越智 眞理

北海道医療大学歯学部口腔病理学講座

(主任：賀来 亨教授)

Characterization of human osteosarcoma cell lines
—Comparison of phenotypes of cells established
from primary and metastatic lung lesions—

Makoto OCHI

Department of Oral Pathology, School of Dentistry,
HEALTH SCIENCES UNIVERSITY OF HOKKAIDO

(Chief: Prof. Tohru KAKU)

Abstract

Osteosarcoma is a highly invasive malignant neoplasm which may metastasize to distant sites, particularly the lung. Two osteosarcoma cell lines were established from osteosarcoma tissue obtained from the proximal end of a right tibial tumor, "KIKU" cells and from the lung metastatic lesion of a 27-year-old female patient, "KIKU-M" cells. Investigations of characteristics of human osteosarcoma cell lines from primary and secondary lesions of the same patient have not previously been reported, and to characterize the KIKU and KIKU-M cells, we performed chromosome analysis, examined growth properties, calcification, alkaline phosphatase (ALP) activity, the amount of osteocalcin (BGP), and the invasive capacity. Several abnormal chromosomes not normally present in human metaphases were identified. The doubling time of KIKU-M cells was shorter than that of KIKU cells. The injection of KIKU and KIKU-M cells produced subcutaneous tumors at injection sites after the transplantation. With von Kossa staining, both cell lines showed a definite calcification in the medium without the addition of ascorbic acid and beta-glycerophosphate. Prominent osteoid formation and calcification were observed in the transplanted osteosarcoma tissue produced by the subcutaneous transplantation of both cell lines. ALP activity in KIKU cells was significantly higher than that

受付：平成7年3月30日

in KIKU-M cells and also the production of BGP increased more in KIKU cells than in KIKU-M cells.

This evidence may show that KIKU-M cells have more immature phenotypic features than KIKU cells in vitro and in vivo. Also, both cell lines were useful in studying human bone metabolism and the mechanism of differentiation and metastasis of human osteosarcoma.

Key words: Human osteosarcoma, Cell line, Primary lesion, Metastatic lung lesion

I. 緒 言

骨肉腫は一般に長管骨を含めた膝関節を好発部位とし10代に発生のピークがあり、極めて短期間に肺転移により死に至らしめる悪性度の高い腫瘍である¹⁾。1970年以前では5年生存率は約20%であったが²⁾、術前、術後の化学療法が行われるようになってから生存率の延長がみられるようになった。しかし骨肉腫は治療の困難な腫瘍の一つであり、実験に用いられることのできるモデルが待たれていた³⁾。一方、近年生体における骨代謝機構を研究する場合、多くは骨組織および骨組織由来の培養細胞の初代培養を用いて研究が行われてきた^{4,5)}。Kodamaら⁶⁾によりマウス頭蓋冠より分離され、継代可能な正常骨芽細胞由来の培養細胞株が樹立され実験に広く利用されているが、ヒト由来の正常骨芽細胞株の樹立は現在においても非常に困難であり、その報告はSV-40により形質転換したヒト胎児頭蓋骨由来の骨芽細胞株があるのみである⁷⁾。骨肉腫は腫瘍組織中に腫瘍性類骨の形成を伴うことより、腫瘍細胞は骨芽細胞の性質を保持していると考えられており、正常骨組織由来の初代培養細胞や器官培養した細胞などより10代以上の継代が可能であるため骨肉腫より樹立した培養細胞が骨代謝の研究に広く利用されている。しかしながらヒトに由来する骨肉腫細胞株は培養が困難な部類に属するため文献上10数種類の培養細胞株が報告されているに過ぎない⁸⁻²⁰⁾。その理由として骨肉腫細胞株の多くは

継代を重ねることによりその造骨性が消失してしまうことがあげられる¹⁸⁾。それ故、ヒト由来の樹立細胞株で造骨性を有する骨芽細胞様の性状を有しており、なおかつ長期間の培養、何代にもおける継代においても造骨性が維持される細胞株の出現が待たれていた。また臨床的に骨肉腫は、整形外科領域ならびに口腔領域においてもその発生頻度が比較的高い非上皮性悪性腫瘍の一つであり、その浸潤ならびに転移機能の解析は腫瘍の研究にとっては重要なテーマである。

今回、1986年に樹立に成功し、現在も安定し継代維持可能な、同一患者の原発巣と肺転移巣より別々に分離樹立された2種の骨肉腫細胞株の性状を主に生化学的ならびに組織学・免疫組織化学的に比較検討して、これら細胞株が骨代謝の研究、ヒト骨肉腫組織における類骨・骨組織の形成機序の解析、浸潤・転移に対して有用な細胞株であることを検討した。

II. 材料および方法

1. 培養細胞株および培養方法

細胞株は27歳・女性の脛骨近位端に発生した骨肉腫の原発巣と肺転移巣よりそれぞれ別々に樹立された細胞株（原発巣：KIKU株，肺転移巣：KIKU-M株）を用いた²¹⁾。培養液にはDulbecco's modified Eagle Medium（以下DMEM, ニッスイ，東京）に10% fetal bovine serum（以下FBS, Boehringer Mannheim, Germany）と、硫酸カナマイシン（明治製菓，

東京)を0.06mg/lを添加し培養した。培養条件は温度37°C,湿度100%,5%CO₂,95%空気的环境下で行い,細胞の継代はDulbecco's phosphate buffered saline(Ca, Mg, free)〔以下PBS(-),明治製菓,東京〕に0.025%trypsin(Gibco, Laboratories, Grant Island, NY)で1/8に分散継代した。また培地交換は72時間毎に行った。

2. 形態学的観察

両細胞株を培養し,細胞がコンフルエントになった状態を倒立型位相差顕微鏡(オリンパス,東京)で形態を観察した。

3. 染色体分析

この両細胞株がヒト型腫瘍細胞株であることの確認および両者の染色体形態に差があるかどうかの検索のために,対数増殖期にある両細胞株をエチジウムブロマイド最終濃度7.5μg/mlで30分処理し,さらに30分後コルセミド(0.1μg/ml)で2時間予備培養した。その後,0.1%trypsinで処理後に,0.0075M KClで37°Cにて30分間低張処理後カルノア液で10分間固定した。G分析法で標本を作成し²²⁾,分析はシオノギバイオメディカルラボラトリーズに依頼した。

4. 倍加時間の測定

両細胞株を培養55cm²の培養面積ディッシュ(Becton Dickinson Labware, Bedford, MA)に1×10⁶個両細胞株を24時間毎に,10日間0.025%trypsin処理後に,0.15%trypan blueで染色後,血球計測板(Burkerturk type, EKDS)で計測した。

5. 石灰化の確認

両細胞株の通常の培養液にて長期間培養を行い石灰化の有無を確認した。なお,確認には,位相差顕微鏡にてコロニー形成,または肉眼的に透明感のない白色斑が出現するのを認めた後,von Kossa染色法にて行った²³⁾。

6. アルカリホスファターゼの組織化学的ならびにオステオカルシンの免疫組織化学的観察

両細胞株における,アルカリホスファターゼ(以下,ALP)の局在を観察するために,Chamber Slide(Nunc Inc, Naperville, IL)に播種し,24時間後にPBSで2回洗浄後,冷アセトン30分間固定しBurstoneのアゾ色素法にてアルカリホスファターゼの組織化学染色を行った²⁴⁾。また,オステオカルシン(以下,BGP)の局在はPBSにて洗浄後,10%中性緩衝ホルマリン溶液にて30分間固定後,抗ヒトオステオカルシン・モノクロナール抗体を一次抗体として,Avidin-biotin-peroxidase complex method(以下,ABC法)を用いて免疫組織化学染色を行った²⁵⁾。

7. ALP活性の測定

P-ニトロフェニル酸を基質としたモノ・テスト(ALPote, Boehringer Mannheim, Germany)で測定した^{26,27)}。24穴組織培養用プレート(岩城硝子,千葉)に5×10⁴個/wellで播種しDMEMに10%FBSを添加し,48時間培養しPBS(-)で2回洗浄後,無血清培養液〔DMEM+0.025%albumin(FBS free)〕に交換し24時間予備培養した。

その後上清を採取し,両細胞は0.1%triton X(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)処理した後,3秒間超音波処理し細胞浮遊液を作成した。上清および細胞浮遊液の200μlを96穴ELISA plate(岩城硝子)に移し測定した。同時にDNA量をKapusinskiとSkoczylasの方法²⁸⁾に従い,4',6-diamidino-2-phenyl-indole(DAPI,Sigma)を使用して励起波長362nm,蛍光波長454nmで蛍光分析を行った。なお,標準試料の仔牛胸腺DNA(Sigma)で標準曲線を描きDNA量を求め,ALP活性はDNA当たりの比活性IU/μg of DNAで求めた。また,両細胞株の活性型ビタミンD₃[1,25(OH)₂D₃][1,α25-dihydroxyvitamin D₃,Biomol Research, Plymouth Meeting, PA]に対する応答性についても同様の方法にて検索した²⁹⁾。

8. BGPの産生量の測定

Gla型osteocalcin(GLa-Oc)測定キット(宝酒造, 京都)を使用してALP活性時に採取した培養上清を試料として測定した³⁰⁻³²)。なおBGP産生量はKapusinskiとSkoczylasの方法²⁸⁾にてDNA量を測定しDNA当たりのng/ μ g of DNAで求めた。また, 両細胞株におけるBGPの産生量についても1,25(OH)₂D₃に対する応答性についても同様の方法にて検索した。

9. ノードマウスへの戻し移植ならびに病理組織学的検索

両細胞株を 2×10^7 個の細胞浮遊液を5週齢または6週齢のノードマウス(BALB/c, nu/nu, ♀, 日本チャールズ・リバー, 神奈川)各6匹の皮下に移植した。そして皮下に発生した腫瘍の大きさをBattelle Columbus Laboratories法(短径²×長径/2)にて各換算腫瘍重量を各週ごとに測定した^{33,34})。また皮下に発生した腫瘍は担癌死直前に, 軟エックス線撮影後に屠殺し皮下腫瘍と肺および肝臓を摘出し, それぞれ10%ホルマリン, カルノア液, 冷アセトンで固定してパラフィン包埋後4 μ mの薄切切片を作製して, hematoxylin・eosin(H.E)染色, von Kossa染色で石灰化を検索した。

10. 軟エックス線撮影による腫瘍性類骨および骨形成の確認

屠殺直前の腫瘍が形成されたノードマウスを軟エックス線撮影装置(Sofron model BST 1505CX, 綜研社, 東京)で撮影し, 発生した腫瘍内に腫瘍性類骨および骨形成の確認を行った。撮影条件は管電圧55KVp, 焦点-被写体間距離15cm, 管電流5.0mA, 撮影時間30secの条件下で行った。

11. 細胞増殖能の解析

5-bromodexyuridine(以下, BrdU, Becton Dickinson Labware)³⁵と, Proliferating cell nuclear antigen(以下, PCNA, Dako Japan, 京都)²⁶⁾に対する抗体を用いてラベリング・イン

デックスならびにポジティブ・インデックスを算出し細胞株(in vitro)と腫瘍(in vivo)における細胞増殖能を検索した。

In vitroでは, DMEM+10%FBSで培養した対数増殖期の両細胞株をPBS(-)で2回洗浄後にBrdU(50 μ g/ml)添加し20分間予備培養後にカルノア液で30分間固定した。In vivoでは, 腫瘍を形成したノードマウスにBrdUを10%dimethylsulfoxide(DMSO)/salineに溶解し, 25mg/kgの割合で腹腔内に投与した。その1時間後に, 屠殺し摘出腫瘍をカルノア液で30分間固定し, 未脱灰のままパラフィン包埋後約4 μ mの薄切切片を作製した。BrdUの免疫組織化学染色はABC法で行い細胞増殖能を比較検討した。なおPCNAはIn vitro, In vivoともにBrdU同様に行った。BrdUのラベリング・インデックス, PCNAのポジティブ・インデックスの計測は, 染色後に細胞株および腫瘍一病変につき3カ所以上の任意の部位を100倍もしくは200倍の顕微鏡写真を撮影し, 写真上にてBrdUあるいはPCNA陽性細胞核数を計測し, 写真上の全細胞核数における陽性細胞株の占める割合をラベリング・インデックス, またはポジティブ・インデックスとして算出した³⁷⁾。

12. 細胞浸潤能の検討

両細胞株をMatrigelTM invasion chamber(Becton Dickinson Labware)を使用して細胞が有する浸潤能を検索した³⁸⁾。両細胞株を上室に基底膜構成成分であるマトリジェルをコートしているフィルター小孔8 μ mのトランスウェルチャンバーに 2×10^5 個播種しovernight後無血清培養液に交換して24, 48, 72時間後フィルター下面に付着した細胞を70%アルコールにて固定後ヘマトキシリンで染色し, フィルター下面に付着している細胞を顕微鏡にて接眼10倍・対物20倍にて3回計測し, その平均を細胞の計測値とし, その平均値を両細胞株が有する浸潤能とした³⁹⁾。なお, 両細胞株の無血清培養液条件

下における増殖はKapuscinskiとSkoczylasの方法²⁸⁾によりDNA量を測定し、通常の培養方法時と異なることを確認した。

13. 統計処理

それぞれの定量数量は student の t 検定 (STATISTICA/Mac) を用いて行った。

III. 結 果

1. 形態学的観察

形態学的に両細胞株は播種してからコンフルエントの状態になるまでKIKU細胞では、播種時には紡錘形を呈しており、コンフルエントになるにしたがい、その形態を多角形へと変化し骨芽細胞の形態をとってきた。KIKU-M細胞は播種後からコンフルエントの状態まで一貫して紡錘形を呈していた (Fig 1a, b)。

2. 染色体分析

両細胞株ともに複雑で異常な核型を呈しており、KIKU細胞は染色体数が43, Xで2倍体を示していた。一方、KIKU-M細胞は染色体数が78-84, 平均82XXで4倍体を示し、両者いずれもヒト型、女性の性染色体を示していた (Fig

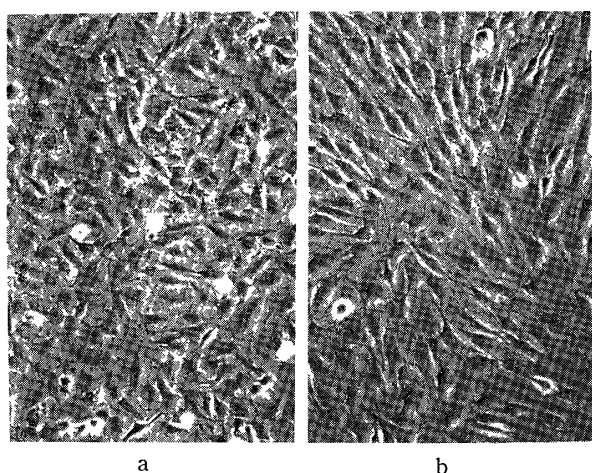


Fig 1: Phase contrast micrograph of (a) KIKU cells and (b) KIKU-M cells.
 (a) KIKU cells showed osteoblastic-like polygonal cells (X200).
 (b) KIKU-M cells showed fibroblastic-like spindle cells (X200).

2-a, b)。

3. 倍加時間の測定

倍加時間はKIKU細胞では84.0時間、KIKU-Mは47.8時間で、KIKU-M細胞の方が高い増殖

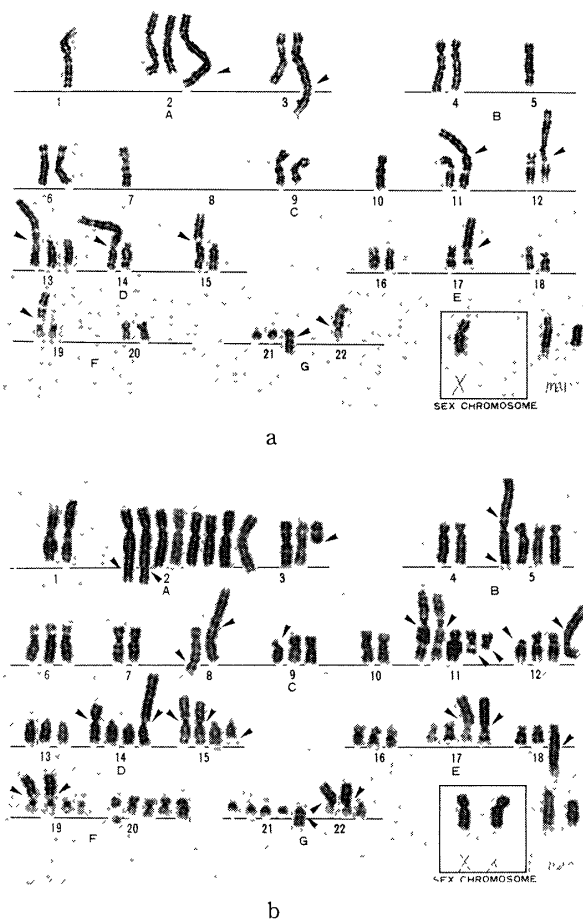


Fig 2: Representative G-band karyotype from KIKU (a) and KIKU-M cells (b)
 (a) Karyotype Mode=43, X, +add(2) (q37), add(3) (q29), -5, -7, -8x2, -10, del(11) t(1;11) (1qter->1q11::11q15->11qter), +add(12) (p10), +add(15) (p10), add(19) (p13.3), +add(21) (q22), -22, add(22) (p10), +mar, +mar
 (b) Karyotype Mode=82 (range78-84), XX, +2x4, +add(2) (q37) x2, +del(3) (q10), +5, +add(5) (p14q33), +6, add(8) (q24), add(8) (p23), +del(9) (p13), +der(11) t(1;11) (1qter->p11::11p15->11qter) x2, +del(11) (q21), +add(11) (q10), +del(12) (q10), +add(12) (p13), +13, +add(14) (p10), +add(14) (p10), +add(15) (p10) x2, del(15) (q22), +16, +add(17) (p10) x2, +add(18) (q23), +add(19) (p13.3) x2, +20x2, 20x3, +21x2, +add(21) (q22), +add(22) (p10), add(22) (p10), +mar, +mar

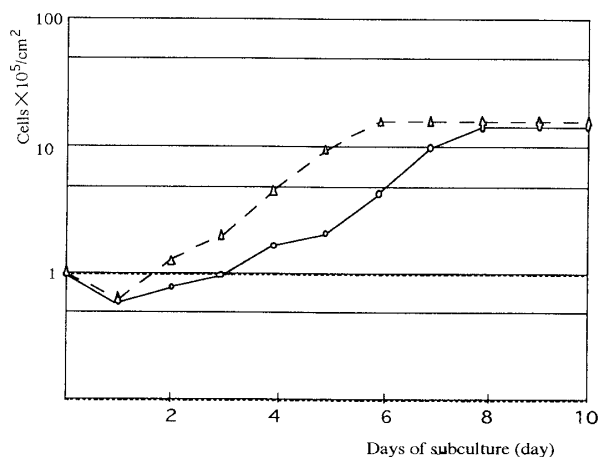


Fig 3: Growth curve for KIKU (O-O) and KIKU-M cells (Δ-Δ). Cell numbers were determined as number of cells/cm².

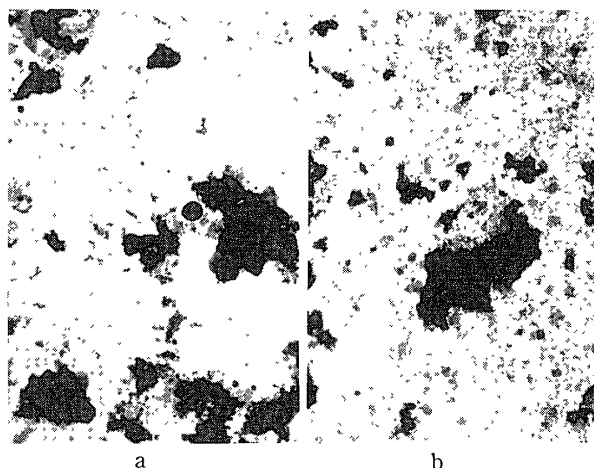


Fig 4. KIKU cells (a) and KIKU-M cells (b) with potential to form in vitro mineralized tissues. Black-brown color staining as shown in culture dishes by von Kossa staining. (a) KIKU cell culture for 46 days in DMEM+10%FBS. (b) KIKU-M cell culture for 51 days in DMEM+10%FBS.

能が認められた (Fig 3)。

4. 石灰化の確認

KIKU細胞は培養46日目に、KIKU-M細胞は培養51日目に von Kossa染色にて黒褐色の染色像が認められた。(Fig 4a, b)。

5. ALP組織化学的ならびにBGP免疫組織化学的観察

ALPの組織化学染色では、KIKU細胞の細胞

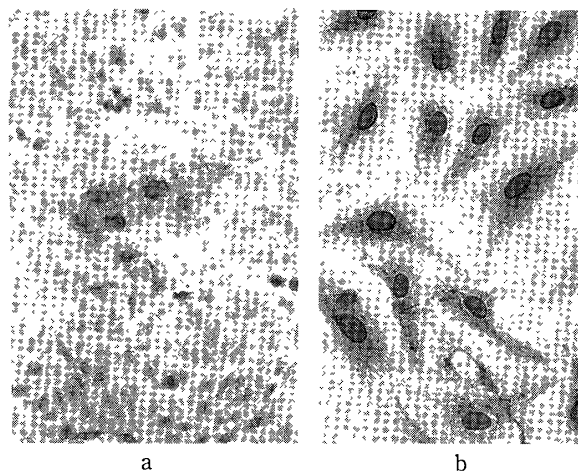


Fig 5-1): Histochemical and immunocytochemical staining of alkaline phosphatase and osteocalcin of KIKU cells in vitro. (a) Strongly positive reaction by alkaline phosphatase histochemistry (Burstone's method, X100). (b) Positive immunoreactivity by osteocalcin immunocytochemistry (ABC method, X200).

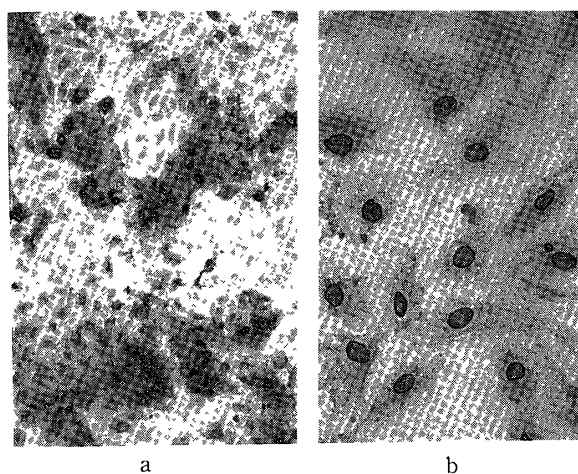


Fig 5-2): Histochemical and immunocytochemical staining of alkaline phosphatase and osteocalcin of KIKU-M cells in vitro. (a) Strongly positive reaction by alkaline phosphatase histochemistry (Burstone's method, X100). (b) Positive immunoreactivity by osteocalcin immunocytochemistry (ABC method, X200).

全体に強い染色性を示すのに対してKIKU-M細胞では細胞株の一部の細胞に、その染色像が確認されるのみであった。BGPの免疫組織化学染色では、KIKU細胞およびKIKU-M細胞とも

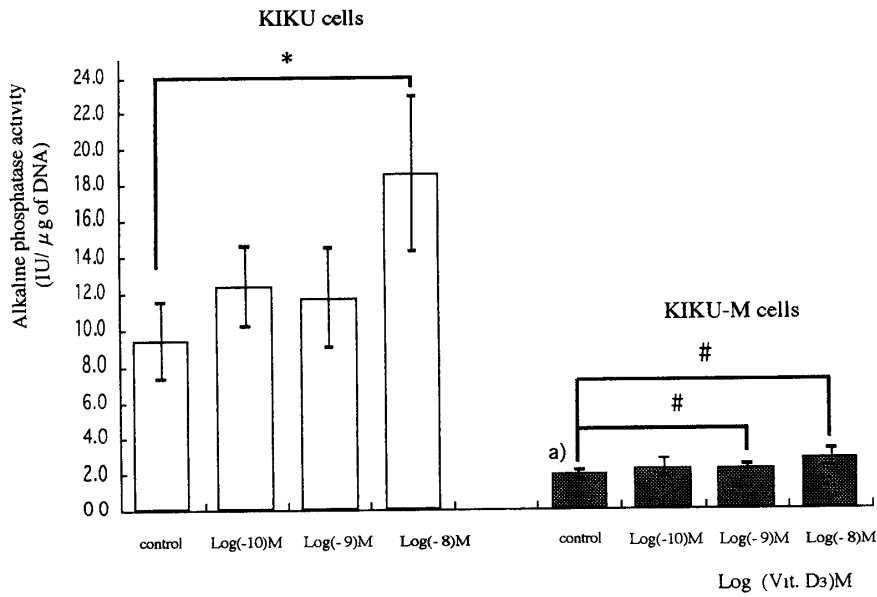


Fig 6 : Alkaline phosphatase activity in KIKU and KIKU-M cells
 The figures are mean values of six dishes with duplicate determinations.
 a) Significantly different from the value of KIKU cells cultured under control conditions ($P < 0.001$).
 * Significantly different from the value of KIKU cells cultured under control conditions ($P < 0.005$).
 # Significantly different from the value of KIKU-M cells cultured under control conditions ($P < 0.001$).

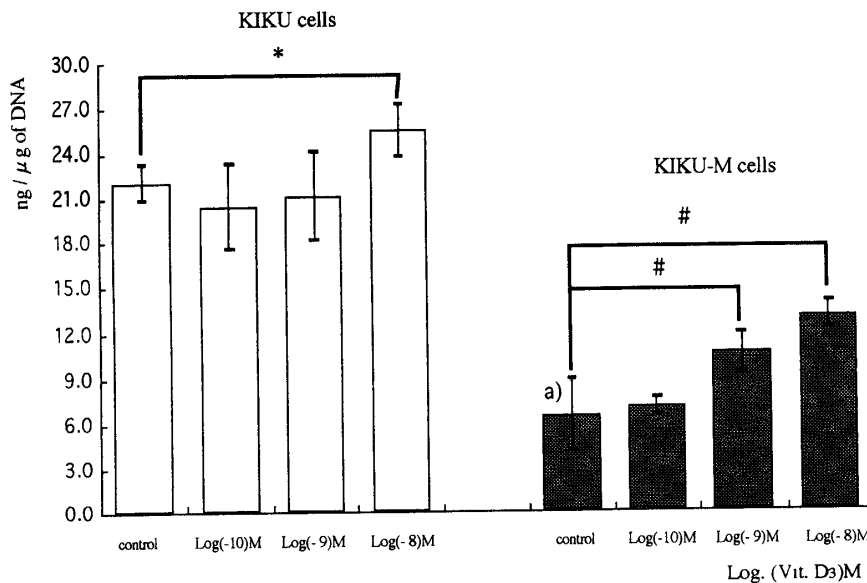


Fig 7 : Osteocalcin synthesis in the KIKU and KIKU-M cells
 The figures are mean values of six dishes with duplicate determinations.
 a) Significantly different from the value of KIKU cells cultured under control conditions ($P < 0.05$).
 * Significantly different from the value of KIKU cells cultured under control conditions ($P < 0.001$).
 # Significantly different from the value of KIKU-M cells cultured under control conditions ($P < 0.001$).

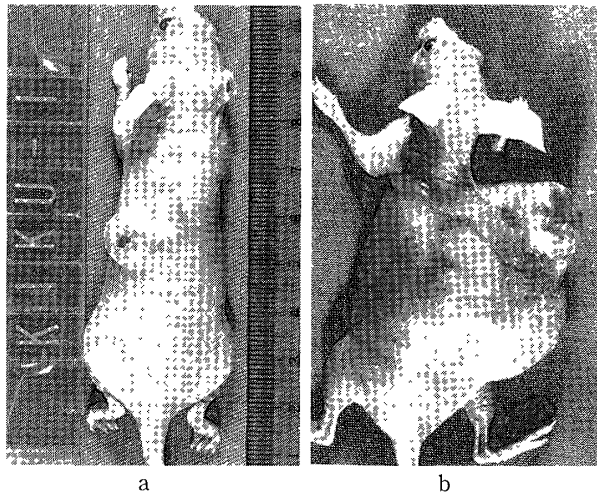


Fig 8 : Tumor formation in nude mice
(a) KIKU cells, (b) KIKU-M cells.

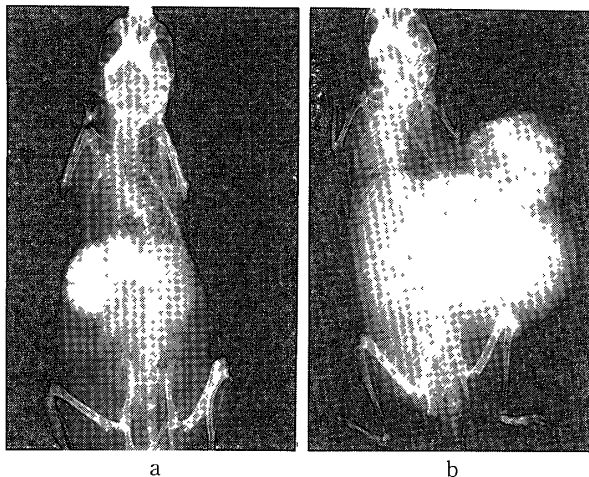


Fig 9 : Markedly abundant calcification shown by
Softex X ray photograph
(a) KIKU cells, (b) KIKU-M cells.

に細胞質内に茶褐色の細顆粒状の染色像が認められた (Fig 5-1a, b, Fig 5-2, b)。

6. ALP活性の測定

ALP活性はKIKU細胞では、 $9.84 \pm 2.25 \text{ IU} / \mu\text{g}$ of DNA, KIKU-M細胞では $1.85 \pm 0.22 \text{ IU} / \mu\text{g}$ of DNAであり、KIKU細胞の方が18%高い値が確認された。なお $1.25(\text{OH})_2\text{D}_3$ を添加した場合にALP活性はKIKUにおいては 10^{-8}M , KIKU-M細胞は 10^{-9} , 10^{-8}M 添加した際にKIKU細胞は45%, KIKU-M細胞は77%, 63%と濃度依存性に有意にALP活性の上昇が認めら

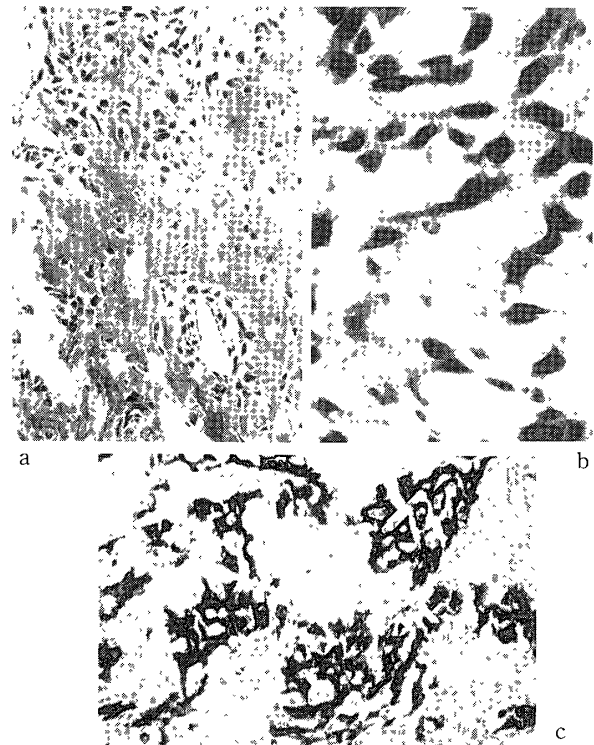


Fig 10 : Histological observations of tumor tissue
obtained from implantation of KIKU cells
into nude mice

(a) The tumor is characterized by mineralized osteoid formation and polygonal osteoblastic-like cells (Hematoxylin and eosin staining, X200).

(b) High magnification of Fig10 (a).

The tumor cells are mainly composed of polygonal osteoblastic-like cells (Hematoxylin and eosin staining, X400).

(c) The extensive mineralized osteoid is the brown color by von Kossa staining (X100).

れた (Fig 6)。

7. BGPの産生量の測定

BGPの産生量はKIKU細胞では $22.0 \pm 1.59 \text{ ng} / \mu\text{g}$ of DNAとKIKU-M細胞では $7.26 \pm 0.40 \text{ ng} / \mu\text{g}$ of DNAとKIKU細胞の方が3倍の産生量が確認された。また、 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ を 10^{-8}M 添加した際、KIKU-M細胞は 10^{-9} , 10^{-8}M 添加した際にKIKU細胞は86%, KIKU-M細胞は69%, 56%とそれぞれに有意に産生量の上昇が認められた (Fig 7)。

8. 造腫瘍性、腫瘍性類骨・骨の確認ならびに病理組織学的観察



Fig 11 Histological observations of tumor tissue obtained from implantation of KIKU-M cells in nude mice
 (a) The tumor is characterized by osteoid formation and spindle-shaped cells (Hematoxylin and eosin staining, X200)
 (b) High magnification of Fig 11 (a)
 The tumor cells are mainly composed of spindle-shaped cells (Hematoxylin and eosin staining, X400)
 (c) The extensive mineralized osteoid is seen as the brown color by von Kossa staining (X100)

KIKU細胞, KIKU-M細胞を移植した6匹のヌードマウスすべてに腫瘍形成が認められた (Fig 8a, b)。両細胞ともに軟エックス線撮影で腫瘍内石灰化像が観察された (Fig 9a, b)。また組織学的にKIKU細胞の腫瘍の腫瘍細胞は異型性の強い骨芽細胞様細胞で, 類骨および骨組織の形成が認められた。von Kossa染色像では腫瘍組織の内部に黒褐色の陽性像が認められた。KIKU-M細胞では, 腫瘍細胞は異型性の強い紡錘形細胞で, 腫瘍組織内に壊死傾向が強く, また類骨および骨組織の形成が認められた。同組織のvon Kossa染色ではKIKU細胞と同様に黒褐色の陽性像が認められた (Fig 10a, b, c

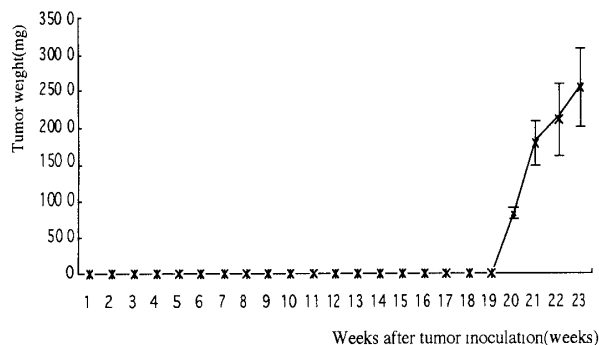


Fig 12a) Growth curve of KIKU cells transplant in nude mice

The figures are mean values of six nude mice. The results were evaluated with the Battelle Columbus Laboratories Protocol^{33,34} (The National Cancer Institute, U S A)

$$\text{Tumor weight (mg)} = (W^2 \times L) / 2$$

W width (mm) L length (mm)

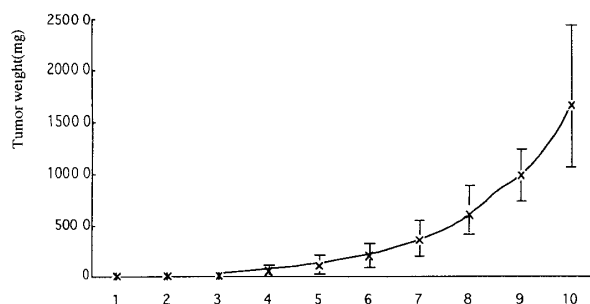


Fig 12b) Growth curve of KIKU-M cells transplant in nude mice

The figures are mean values of six nude mice. The results were evaluated in accordance with the Battelle Columbus Laboratories Protocol^{33,34} (The National Cancer Institute, U S A)

$$\text{Tumor weight (mg)} = (W^2 \times L) / 2$$

W width (mm) L length (mm)

Fig 11a, b, c)。なお, すべてのヌードマウスの肺への転移巣の形成は確認できなかった。しかし移植後の腫瘍の増殖は肉眼的に, KIKU細胞では20週目に, KIKU-M細胞では4週目に確認され, その換算重量はKIKU細胞では23週目で253.4±52.2mg (Fig 12a), KIKU-M細胞は10週目では1665.9±420.8mg (Fig 12b) と著しい差が認められた。

Table 1 BrdU labeling index (%) and PCNA positive index (%)

	KIKU cells	KIKU-M cells
BrdU labeling index ^a		
In vitro	40.0±0.13 ^c	61.0±0.07 ^d
In vivo	36.0±0.10	62.0±0.15 ^e
PCNA positive index ^b		
In vitro	57.0±0.12	67.0±0.09 ^d
In vivo	41.0±0.04	64.0±0.15 ^e

a Labeling index (%) = BrdU labeled cells / total number of cells × 100

b Positive index (%) = PCNA positive cells / total number of cells × 100

c Mean ± SD (%)

d Significantly different from the value of KIKU cells in vitro (P < 0.001)

e Significantly different from the value of KIKU cells in vivo (P < 0.001)

9. 細胞増殖の解析

In vitroにおけるBrdUラベリング・インデックスは、KIKU細胞では40.0±0.13%, KIKU-M細胞では61.0±0.07%であり、In vivoにおいてもKIKU細胞では36.0±0.10%, KIKU-M細胞では62.0±0.15%となり有意にKIKU細胞に比べKIKU-M細胞の方が高値 (p < 0.001) であった。同様にPCNAポジティブ・インデックスでは、In vitroにおいてKIKU細胞では57.0±0.12%, KIKU-M細胞では67.0±0.09%, In vivoにおいては、KIKU細胞は41.0±0.04%, KIKU-M細胞は64.0±0.15%となりBrdUラベリング・インデックスと同様KIKU細胞に比べKIKU-M細胞の方が有意に高値 (p < 0.001) であった (Table 1)。

10. 細胞浸潤能の検討

両細胞株の無血清培養液条件下における増殖はKIKU細胞では、24時間目の0.119±0.003 μg/dishから72時間目の0.180±0.048 μg/dish、KIKU-M細胞では、0.120±0.003 μg/dishから72時間目の0.218±0.043 μg/dishと無血清の培養液に交換することにより通常の培養方法によ

Table 2a) DNA content in KIKU and KIKU-M cells without FBS

Time	DNA content (μg/dish)	
	KIKU cells	KIKU-M cells
24 hrs	0.119±0.003	0.120±0.003
48 hrs	0.170±0.030	0.192±0.025
72 hrs	0.180±0.048	0.218±0.043

KIKU and KIKU-M cells were incubated for three days without FBS

Data were normalized according to the DNA content of each culture which was measured by the method of Kapuscinski and Skoczylas²⁸⁾

The results are mean values of three dishes with duplicate determinations

Table 2b) Invasion capacity of KIKU and KIKU-M cells

Time	Invasive cell (Number of penetrated cells/Matrigel invasion chamber)	
	KIKU cells	KIKU-M cells
24 hrs	10.4±3.8	11.4±4.3
48 hrs	10.6±1.7	11.6±2.4
72 hrs	46.0±6.0	72.7±11.8

#

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 < 0.001 as compared with KIKU cells (72hrs)

る細胞の増殖を抑えられることが確認できた (Table 2a)。両細胞株のマトリジェルを使用したinvasion assayにより、両細胞株は24, 48時間培養後ではマトリジェルを通過した細胞数に有意な差は認められないが、72時間後ではKIKU細胞では46.0±6.0個、KIKU-M細胞では72.7±11.8個と有意にKIKU-M細胞の方がKIKU細胞より多くの細胞がマトリジェルを通

過していた (Table 2b)。

IV. 考 察

ヒトに由来する骨肉腫細胞株の樹立は、生体において悪性度が高いにもかかわらず、その増殖が緩慢であることから株化することは他の悪性腫瘍由来の細胞株より困難とされている^{17,50)}。また、その細胞を継代し安定した細胞株が得られたとしても、その細胞株の性状を解析する段階で形態学的にも生化学的にも、骨芽細胞のphenotypeとしての指標が消失したという多くの報告がなされている^{14,17,18)}。

今回使用した骨肉腫細胞株の特徴は1986年に分離株化に成功し²¹⁾、現在においても両細胞株ともに安定した細胞増殖、造腫瘍性ならびに骨芽細胞様の性質を維持していることである。また、これら2種の細胞株は、同一患者の原発巣と肺転移巣から樹立した細胞株で、このことは悪性腫瘍の一つの大きな特徴である浸潤および転移の解析に有用な細胞株であり、癌遺伝子の発現およびその機能の解析^{40~42)}、また、骨肉腫に特有な診断マーカーの発見⁴³⁾など多彩な利用があげられる。

骨肉腫細胞株のもう一つの利用方法として副甲状腺ホルモン (PTH) に対する応答性の高い骨芽細胞様の性質を有する骨肉腫細胞株が樹立⁴⁴⁾されてから、骨吸収機構の一つに破骨細胞を活性化し骨吸収を行わせるのは骨芽細胞であり骨の吸収に促進的に作用するPTHや活性型ビタミンD₃の受容体が破骨細胞ではなく骨芽細胞からみいだされたという報告⁴⁵⁾あるいは、非コラーゲン性タンパク質であるbone morphogenetic protein (BMP), BGPが免疫組織化学的にヒトをはじめとするサル、牛、犬などの骨芽細胞を含む骨組織中にその発現が確認されている^{46~48)}。骨肉腫細胞株においてもそれらタンパク質の合成・産生が認められること^{18,20,49)}より、骨肉腫細胞株が悪性腫瘍の種々の解析に

関する研究以外にも骨代謝の研究の実験モデルとしてその利用価値が広がっている。

今回使用した本細胞株は播種してからコンフルエントの状態になるまでKIKU細胞では、播種時には紡錘形を呈しており、コンフルエントになるにしたがい、その形態を多角形へと変化した骨芽細胞の形態をとってきた。KIKU-M細胞は播種後からコンフルエントの状態まで一貫して紡錘形を呈していた。過去に樹立された骨肉腫細胞株では形態学的に紡錘形あるいは星状形の細胞がコンフルエントの状態になるにしたがい多角形の形態になるか、あるいは一貫してその形態に変化をおこさないものもあるというように樹立された細胞によりその形態は一定していないようである⁵⁰⁾。

ヒトの癌細胞の染色体は正常細胞とは異っており、染色体数は幅広い分布のものが多く、ヒト由来の骨肉腫細胞株においてはその異数性は個々の細胞により特有である。2種の細胞株においても、ヒト型を呈しているが、異常な染色体が認められており、過去に報告されたヒト骨肉腫細胞株と同様である^{10,14,15,19)}。今回の2種の細胞株は同一人物の原発巣と肺転移巣から樹立し、同一条件下にて培養されたものであるが染色体数および形態にかなりの違いが見られた。KIKU-M細胞の方が染色体数が多く、またその形態においてもKIKU細胞よりも複雑であった。同様なことは、骨肉腫における生検組織からの染色体分析を行った研究結果⁵¹⁾において、形態および染色体数が正常の症例から非常に複雑で異常の形態ならびに染色体数が認められる症例、とくに、肺に転移した骨肉腫や化学療法や放射線療法を行った症例の染色体はその形態が複雑であり、数も多くなる傾向にあるという報告がある。細胞株と生検組織との違いはあるがこれらの細胞株は分離・樹立した母組織が骨肉腫の診断後に多剤による化学療法や放射線療法を受けていることを考えるとこれら2種の

細胞株においても同様な染色体異常の結果が得られたことには矛盾しないと思われる。また、現在のところ腫瘍細胞が遠隔臓器に転移するときはheterogeneityのある原発巣のある細胞のごく一部の細胞、たとえば細胞間の接着性の減少や周囲結合織に対する蛋白分解酵素の産生が活発化している細胞が転移するのではないかと考えられている⁵²⁾。KIKU-M細胞に認められる複雑で異常な染色体数は治療法以外に原発巣より樹立されたKIKU細胞のheterogeneityにより癌細胞自身の転移能の発現の相違によるものと考えられる。

両細胞株における細胞倍加時間は、KIKU細胞は84.0時間、KIKU-M細胞では47.8時間とKIKU-M細胞の方が1.75倍高い増殖能を有していた。このことは、細胞増殖能を検索するために細胞動態の指標の一つとして細胞周期のDNA合成期(S期)に取り込まれるthymidineのanalogueであるBrdUのラベリング・インデックスとG1後期からS期にかけて合成されるDNA polymerase δ の補助蛋白であるPCNAのポジティブ・インデックスの値とも一致している。ヒト骨肉腫細胞株は一般的に38から96時間と他の悪性腫瘍から樹立された細胞株に比べると比較的長く、このことが、骨肉腫細胞株の樹立を困難にしている要因であると言われている^{17,50)}。本細胞株の増殖曲線上で細胞を播種後、その増殖は他の骨肉腫細胞株同様に緩やかな増殖が観察された。

骨芽細胞は多分化能をもつ未分化間葉系細胞が様々な増殖因子やサイトカインの影響を受け分化したものと考えられ⁵³⁾、同定する場合に、in vitroで石灰化能、ALP活性、そして骨に特異的な非コラーゲン性タンパク質であるBMP、BGPなどの産生が認められることが重要な指標となる。両細胞株を長期間にわたり通常の培養方法で行うことにより、KIKU細胞の方がKIKU-M細胞より早期に石灰化を示す von

Kossa染色像が確認できた。現在樹立報告されている骨肉腫細胞株においてもその性状は様々で、SAOS細胞²⁹⁾のように石灰化能を有していないもの、MG-63細胞⁹⁾、HOS細胞¹²⁾のように石灰化能を有するものが報告されている。しかし、このような場合はアスコルビン酸や β -グリセロリン酸を添加することにより早期に石灰化を観察している。今回使用した両細胞株はエックス線マイクロアナライザーによる石灰化の分析およびCa/P比の検索は行っていないが、前述した物質を添加しないで長期間培養し、石灰化をおこす細胞株で、このような細胞の報告は認められていない。アスコルビン酸はコラーゲンの成熟に必要な物質であり、アスコルビン酸を添加せずにマウスの骨芽細胞を培養すると細胞増殖能が低下し分化も阻害される報告がある²³⁾。近年の報告では、骨基質タンパク質は構成成分であるのみならず骨の石灰化・吸収の過程においても重要な役割を演じていることが明らかにされている⁵⁴⁾。とくに骨芽細胞はコラーゲンの産生量のみならず、I型コラーゲン $\alpha_1\alpha_2$ 鎖およびIII型コラーゲン α_1 鎖のmRNAの発現が確認されており^{20,55)}、今後、石灰化物質に対する更なる検討ならびに、コラーゲンの産生量やsubtypeの発現についての検討が必要と思われる。

臨床的に骨肉腫患者の血清ALP活性が高値をしめすことが多く、また原発巣の骨肉腫組織と転移巣の骨肉腫組織とを比較するとALP活性値は原発巣の骨肉腫組織の方が高い値を示し、統計学的にその担癌患者の予後と相関する報告がある⁵⁶⁾。生体において、ALP活性は主に骨芽細胞の細胞膜あるいはゴルジ装置に局在する同酵素によるものといわれている⁵⁷⁾。ALP活性は骨肉腫細胞株の骨芽細胞の性状を維持していることをあきらかにするうえで一つの指標と考えられる。また培養骨芽細胞でも、骨芽細胞の成熟に伴ってALP活性が上昇することが知られていることから、ALP活性は骨芽細胞の分

化を検討するために重要なマーカーであるとされている⁵⁸⁾。KIKU-M細胞ではALP活性はKIKU細胞と比べて極端に低く、またアゾ色素法による組織化学染色においては、KIKU細胞と比較してほんの一部の細胞にしかその陽性像が認められなかった。このことから両細胞株の分化状態から考えるとKIKU-M細胞はKIKU細胞に比べるとより低分化傾向を示している所見と思われる。両細胞株に共通して $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ を添加した際に濃度依存性にALP活性の上昇が認められ、とくにKIKU細胞は 10^{-8}M の $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ を添加した際に、KIKU-M細胞は 10^{-9}M 、 10^{-8}M の $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ を添加した際に有意なALP活性の上昇が確認された。活性型ビタミン D_3 は骨芽細胞株に対して分化状態を上昇させる作用を有している報告⁵⁹⁾もあり、また活性型ビタミン D_3 に対するレセプターが多くの骨肉腫細胞株にも発現していることから、骨芽細胞様細胞の性状を有していることが確認されている⁵⁹⁾。

BGPは骨芽細胞に対して特異的に認められるGla残基を有する非コラーゲン性骨基質蛋白質で、骨芽細胞により合成・分泌され骨組織に特異的な物質とされている⁶⁰⁾。BGPの発現および産生・分泌に対して、ラット骨肉腫から分離した骨芽細胞株の成熟型と未熟型では異なる結果が得られたという報告がある⁶¹⁾。両細胞株は免疫組織化学的にオステオカルシンの陽性像が確認されたが、その産生量をELISA kitを使用し測定したところBGPを分泌・産生してはいるがその量に違いが認められ、BGPを骨芽細胞の分化の指標⁶²⁾とするとALP活性と同様な結果が得られた。ヒト以外の動物から分離・樹立された骨肉腫細胞株を含めて、その性状には違いが見られる。たとえば、種々のヒト骨肉腫細胞株のALP活性は高い株もあればヒト線維肉腫細胞株と同程度の株も存在し、BGPを分泌・産生しないが $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ を添加した際に活性

化され、その産生が認められる株や、まったく反応しない株が報告されている⁶³⁾。本細胞株においては無血清培養液でALP活性およびBGP分泌・産生ともに認められ、 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ によりそれらの活性ならび分泌・産生ともに上昇が認められた。ラットおよびヒト由来の骨肉腫細胞株において、 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の添加によりI型コラーゲン α_1 鎖、BGPなどの合成が促進される報告がある^{64,65)}。これらの遺伝子の調節領域にはビタミンD反応性エレメント(VDRE)が存在することが知られており、各々の遺伝子の転写が活性型ビタミン D_3 とそのレセプターとの結合物により促進されるといわれている^{66,67)}。BGP遺伝子上ではVDREと増殖遺伝子であるAP-1(Fos)結合部位が入り組んで存在しており、AP-1結合タンパクであるFosと同様の増殖遺伝子のJunの二量体の結合が活性型ビタミン D_3 レセプター結合と競合している⁶⁸⁾。故に骨芽細胞の性格を有する骨肉腫細胞株は、 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ とそのレセプターと結合することにより、Fos, Junが減少し、細胞の増殖能が低下するとともに、AP-1結合活性が低下し、BGP遺伝子の転写が促進されることによりBGPの合成が促進増加すると考えられている^{69,70)}。これらのことより本細胞株は両者ともに分化状態には違いが認められるが、 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ を添加することよりALP活性ならびにBGP産生量が濃度依存性に上昇しており、その応答性により骨芽細胞としての性状を有していることが示唆される。

両細胞株の細胞浸潤能をマトリジェルを使用したinvasion assayによる結果では両者ともに浸潤能を有する結果が得られた。この検索では、両細胞株を通常の培養方法とは異なり、測定時には無血清の培養液に交換することにより通常の培養方法による細胞の増殖は抑えられている。この結果によりcollagen IV, laminin, heparan sulfate proteoglycan, entactinを主成分

にする再構成基底膜のマトリジェルを両細胞株が分解し、浸潤していることが示唆される。近年、癌細胞が浸潤・転移をするためには、癌細胞を取り巻くcollagen IV, fibronectin, fibrin, laminin, heparan sulfate proteoglycanなどの細胞外マトリックスを破壊することが必須のことと考えられ、細胞外マトリックスを分解する酵素を細胞自身が産生することが考えられている⁷¹⁾。その代表的酵素としてmatrix metalloproteinase (MMP)の分子量92KDaのMMP-9とserine proteaseのうちのurokinase type plasminogen activator (u-PA)の存在が注目されている^{72,73)}。今回、マトリジェルを使用している細胞浸潤能の実験において両細胞株ともにこれらの分解酵素の産生を示唆する結果が得られた。また原発巣から樹立された細胞株と転移巣より樹立された細胞株の浸潤能を比較した報告では、転移巣から樹立された細胞株の方が細胞数、分解酵素の産生量ともに強く促進されている報告がある⁷¹⁾。今回の結果に関してもKIKU-M細胞の方がKIKU細胞よりもマトリジェルを分解して浸潤した細胞数が多いことによりこれらの分解酵素の産生に違いがあると思われる。今後、両細胞株におけるMMP, u-PAなどの細胞外マトリックス分解酵素の産生についての確認ならびに、それらに対する制御因子であるtissue inhibitor of matrix metalloproteinases (TIMP)⁷⁵⁾, plasminogen activator inhibitor (PAI)⁷⁶⁾などの発現様式、そして両酵素間の相互作用についての検討が必要であると思われる。

種々の癌細胞をヌードマウスへ移植することによって腫瘍の形成が成功して以来⁷⁷⁾、移植した癌細胞の形態や機能の保存が良好で組織構造が母組織と類似した形で再現されることからin vivoの実験系で広く採用されている。ヌードマウスで生じた腫瘍はおおむね分化度が低い状態になりやすく、ことに骨肉腫細胞株においては

腫瘍の形成が全く見られないものや、たとえ腫瘍の形成が認められても細胞の継代数が多いものほど腫瘍組織内に腫瘍性類骨・骨などの形成能が消失し、線維肉腫様の組織像を呈することがある⁵⁰⁾。今回の両細胞株においては腫瘍形成の大きさには違いがあるが、移植後腫瘍の形成が確認され、その腫瘍組織内には腫瘍性類骨・骨の形成が未だに認められている。そのヌードマウスで発生した腫瘍は母組織の腫瘍形態とほぼ類似したものであった。このことは現在報告されているヒト骨肉腫細胞株のなかでも特異的なものであり、分離・樹立されてから約8年を経過した現在でもその性状に変化は認められない。しかし今回両細胞株ともにヌードマウスの皮下移植では腫瘍形成は認められたが、その発育は皮下に限局性で膨張性に増殖したのみであり、筋肉などの周辺組織への浸潤は認められず、肺などの遠隔臓器への転移は確認できなかった。このことは、ヒト由来の癌細胞がヌードマウスの皮下という異所性移植による本来細胞が有する機能が抑制されているか、もしくは癌細胞と間質細胞の相互作用がうまく作用していないかということが考えられている^{78,79)}。しかし、移植する部位においては皮下に移植した際には認められなかった癌細胞本来の性状が発現することがある。すなわち腫瘍が発生したところと同じ部位に移植するという正所性移植の可能性で、皮膚の悪性黒色腫では皮膚に、腎癌なら腎臓に、舌癌なら舌に移植することにより細胞の増殖が速やかに、そして高い確率で転移することが報告されている⁸⁰⁾。両細胞株においても正所性移植による実験で同様な結果が得られるのではないと思われる。両細胞株は原発巣と肺転移巣より樹立されている細胞株であり、細胞株は悪性腫瘍の研究にはかかせない浸潤・転移のin vitroおよびヌードマウスでの正所性移植によるin vivo実験モデルとしては有用ではないかと思われる。

V. 結 語

ヒト骨肉腫細胞株という樹立細胞株培養が困難な部類に属する樹立細胞株, それも同一患者の原発巣および転移巣から樹立された2種の細胞株の性状解析を行い, 以下の結果が得られた。

1. 原発巣から樹立された細胞株 (KIKU細胞) と同一人物の肺転移巣から樹立された細胞株 (KIKU-M細胞) では細胞形態が異なっていた。
2. 倍加時間はKIKU-M細胞のほうがKIKU細胞に比べて短かった。
3. 両細胞株の染色体分析を行った結果, 両細胞株ともにヒト型を呈していたが, 形態が異なっていた。
4. 両細胞株のALPおよびBGPの生化学的, 免疫組織化学的検索によりKIKU細胞は高分化傾向を, KIKU-M細胞は低分化傾向の性状を有していることが示唆された。
5. 両細胞株に各濃度の $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ を添加した際, 有意にALP活性値およびBGP産生量の上昇が認められたことにより, 両細胞株の分化状態は異なるが, 骨芽細胞としての性質を有していることが示唆された。
6. 両細胞株のマトリジェルでの invasion assayでは48時間目までは浸潤した細胞数に差は認められなかったが, 72時間目ではKIKU-M細胞の方が浸潤した細胞数がKIKU細胞より有意に多かった。
7. 両細胞株はヌードマウスに可移植性であり, 腫瘍内には腫瘍性類骨・骨組織の形成が認められたが, 腫瘍の増殖能および換算重量に関してはKIKU細胞と比較してKIKU-M細胞の方が大きかった。しかし皮下に移植した腫瘍の周囲組織への浸潤像および肺への転移は確認できなかった。

以上の結果より両骨肉腫細胞株は石灰化の機序の解明のみならず, ヒト骨肉腫組織にお

ける類骨・骨組織形成能の解析や浸潤・転移の解析に有用な細胞株であると思われる。

謝 辞

本稿を終わるにあたり研究遂行と御校閲を賜りました北海道医療大学歯学部口腔病理学講座賀来 亨教授に感謝の意を表すとともに, 御校閲を賜りました口腔解剖学第二講座武田正子教授, 口腔生化学講座市田篤郎教授に感謝の意を表します。また, 今回使用した貴重な細胞株をご供与ならびに終始御指導, 御教示いただきました札幌医科大学医学部整形外科講座石井清一教授, 松山敏勝講師に深甚なる感謝の意を表します。そして, 本研究に対してご理解, ご協力くださいました北海道医療大学歯学部口腔病理学講座教室員の皆様に感謝致します。

VI. 参 考 文 献

- 1)Goorin A M, Abalson H T, Freal E III Osteosarcoma fifteen years New Engl J Med 313 1637-1643, 1985
- 2)Delepine N, Delepine G, Desbois J C Osteogenic osteosarcoma a model of curable disease by multidisciplinary approach of treatment Biomed Pharmacother 44 242-248, 1990
- 3)Peck W A, Brirge S J Jr Bone cell biochemical and biological studies after enzymatic isolation Science 146 1476-1477, 1964
- 4)Binderman I, Duskin D Formation of bone tissue in culture from isolated bone cells J Cell Biol 61 427-439, 1974
- 5)Luben R A, Wong G L Biochemical characterization with parathormone and calcitonin of isolated bone cells provisional identification of osteoblasts and osteoclasts Endocrinology 99 526-536, 1976
- 6)Kodama H, Amagai Y, Sudo H, Kasai S, Yamamoto S Establishment of a clonal osteogenic cell line from newborn mouse calvaria Jpn Oral Biol 23 899-901, 1981
- 7)Chiba H, Sawada N, Ono T, Ishii S, Mori M Establishment and characterization of a simian

- virus 40-immortalized osteoblastic cell line normal human bone Jpn J Cancer Res 84 290-297, 1993
- 8) Billau A, Edy V G, Heremans H, Damme J V, Desmyter J, Georgiade J A, Desomer P Human interferon mass production in a newly established cell line MG-63 Antimicrob Agents Chemother 12 11-15, 1990
 - 9) Murray E, Provvedini D, Curran D, Catherwood B, Sussman H, Manolagas S Characterization of a human osteoblastic osteosarcoma cell line (SAOS-2) with high bone alkaline phosphatase activity J Bone Miner Res 2 231-237, 1987
 - 10) Weichselbaum R, Epstein J, Little J B A technique for developing established cells from human osteosarcoma In Vitro 12 833-836, 1976
 - 11) 浅沼和生・ヒト骨肉腫の異種移植と細胞培養—ヌードマウス可移植性株および培養細胞株(NY株, KUS株)について— 関東整災誌17 441-449, 1986.
 - 12) 山崎安朗・ヒト骨肉腫由来細胞株の樹立とその形態学的観察, 十全会医誌71 147-162, 1965.
 - 13) 高瀬武平, 真鍋昌平・骨肉腫OST株.“人癌細胞株” 大星章一, 菅野晴夫, 朝倉書店, 東京, 1975, 226-231頁.
 - 14) Yamane T Establishment and characterization of cell lines from osteosarcoma Clin Orthopaed 199 261-271, 1985
 - 15) Kubo K, Shidou M, Koizumi S, Morita K Establishment of cell lines from human osteosarcoma Proc Jpn Acad 64B 233-236, 1988
 - 16) Sekiguchi M, Asanuma K, Satomura T, Fukushima H, Fujii G, Shimada T, Fukunaga M, Ishikawa E A cultured cell line established in vitro from osteosarcoma Japan J Exp Med 53 289-292, 1983
 - 17) 関口守正: 骨肉腫の組織培養ならびに異種移植による免疫療法の基礎的研究. がん治療のあゆみ 1 146-154, 1981.
 - 18) 園部 宏, 溝淵弘夫, 真鍋由以子, 降幡睦夫, 岩田純, 曳田知紀, 喜友名 修, 谷本忠司, 岡 剛史, 大舘祐治 ヒト骨肉腫(osteoblastic type)由来細胞株, HS-OS-1の樹立とその性状, Human Cell 3 148-152, 1990.
 - 19) McAllister R M, Gardner M B, Greene A E, Bradt C, Nichols W W, Landing B L Cultivation in vitro of cells derived from a human osteosarcoma Cancer 27 397-402, 1971
 - 20) Fournier B, Price A P Characterization of a new human osteosarcoma cell line OHS-4 J Cell Biol 114 191-198, 1991
 - 21) Matsuyama T, Ohta T, Asano S, Usui M, Ishii S, Yamawaki S, Mori M Establishment and its biological analysis of human bone Gla protein producing osteogenic sarcoma cell line Proc Jpn Cancer Assoc 45 243, 1986
 - 22) 斉藤深美子: 染色体分析, 細胞培養ハンドブック, 鈴木利光編著, 初版, 中外医学社, 東京, 1993, 54-62頁.
 - 23) Bellows C G, Aubin E J, Heerche N M, Antosz E M Mineralized bone nodules formed in vitro enzymatically released rat calvaria cell population Calcif Tissue Int 38 143-154, 1986
 - 24) Greenfield M E, Alvarez I J, McLaurine A E, Oursler J M, Blair C H, Osdoby P, Teitelbaum L S, Ross P F Avian osteoblast conditioned media stimulate bone resorption by targeting multinucleating osteoclast precursors Calcif Tissue Int 51 317-323, 1986
 - 25) Ohta T, Mori M, Koshihara H, Takada J, Matsuyama T, Ishii S Immunocytochemical localization of BGP in human bones in various developmental stages and pathological conditions Virchows Arch A Pathol Anat 415 459-466, 1989
 - 26) 飯野四郎 アルカリフォスファターゼ(ALP). 日本臨牀43: 159-162, 1985.
 - 27) Rosalki S B, Foo A Y Two new method for separating and quantifying bone and liver alkaline phosphatase isoenzymes in plasma Clin Chem 30 1182-1186, 1984
 - 28) Kapuscinski J, Skoczylas B Simple and rapid fluorimetric method for DNA microassay Anal Biochem 83 252-257, 1977
 - 29) Spiess Y H, Price P A, Deftos J L, Manolagas S C Phenotype-associated change in the effect of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on alkaline phosphatase and bone Gla-protein of rat osteoblastic cell Endocrinology 118 1340-1346, 1986
 - 30) Koyama N, Ohara K, Kuroma T, Katayama M, Hino F, Kato I, Akai T A step sandwich

- enzyme immunoassay for γ -carboxylated osteocalcin using monoclonal antibody J Immunol Methods 139 17-23, 1991
- 31) Hosoda K, Eguchi H, Nakamoto T, Kubota T, Honda H, Jinda S, Hasegawa R, Kiyoki T, Shirai M Sandwich immunoassay for intact human osteocalcin Clin Chem 38 2233-2238, 1991
- 32) 塩井 厚, 西沢良記: オステオカルシン. 臨床化学 29: 1401-1404, 1993.
- 33) 丸尾幸嗣, 上山義人: 腫瘍の移植と測定方法, 人癌とヌードマウス, 下里幸雄, 玉置憲一編, 第1版, 医歯薬出版, 東京, 1979, 316-323頁.
- 34) 花谷勇治, 久保田哲朗, 山田好則, 露木 健, 中田宗彦, 松本純夫, 熊井浩一郎, 吉野肇一, 石引久弥, 阿部令彦. ヌードマウス可移植性ヒト胃, 結腸癌5株を用いた実験的化学療法—Battelle Columbus Laboratories Protocolの評価を中心に—. 日癌治 15: 1114-1120, 1980.
- 35) Gratzner H G Monoclonal antibody to 5-bromo-and 5-iododeoxyuridine a new reagent for detection of DNA replication Science 218 475-478, 1982
- 36) Bravo R, Frank R, Blundell P A, Bravo H M Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase- δ Nature 326 515-517, 1987
- 37) 賀来 亨, 中出 修, 八重樫和秀, 大内知之, 箕輪泰子, 阿部英二, 菅野秀俊, 奥山富三. DNBA塗布によるハムスター頬嚢粘膜上皮の細胞増殖とBrdUの結合. 東日本歯誌 6: 45-52, 1987.
- 38) Sasaki I, Murata J, Yoneda J, Kobayashi H, Azuma I Influence of fibroblasts on the invasion and migration of highly or weakly metastatic B16 melanoma cells Int J Cancer 56 867-873, 1994
- 39) Thompson W E, Nakamura S, Shima B T, Melchiori A, Martin R G, Salahuddin S Z, Gallo C R, Albini A Supernatants of acquired immunodeficiency syndrome-related Kaposi's sarcoma cells induce endothelial cell chemotaxis and invasiveness Cancer Res 51 2670-2676, 1991
- 40) Tsuchiya T, Endo H, Okada Y, Mai M, Sasaki T, Seiki M Expression of type-IV collagenase in human tumor cell lines that can form colonies in chick embryos Int J Cancer 56 46-51, 1994
- 41) Kailko K, Kuo A, Boyd D, Okada S S, Chines D B, Baranathan E Overexpression of urokinase receptor increase matrix invasion without altering migration in a human osteosarcoma cell lines Cancer Res 53 3109-3117, 1993
- 42) Samid D, Mandler R Human osteosarcoma transformed by *ras* new model for studies on hematogenous metastasis J Cell Biochem 69 21-28, 1989
- 43) Wada T, Uede T, Ishii S, Matsuyama K, Yamawaki S, Kikuchi K Monoclonal antibodies that detect different antigenic determinants of the same human osteosarcoma associated antigen Cancer Res 48 2273-2279, 1988
- 44) Majeska R, Rodan G A Parathyroid hormone-responsive clonal cell line from rat osteosarcoma Endocrinology 107 1494-1503, 1980
- 45) Rizzolo R, Somerman M Binding of radioiodinated parathyroid hormone to cloned bone cells Endocrinology 113 1832-1838, 1979
- 46) Poser J W, Esch F S, Lenz N C, Price P A Isolation and sequence of the vitamin K-dependent protein from human bone J Biol Chem 255 8685-8691, 1980
- 47) Hauschka P V, Carr S A, Biemann K Primary structure of monkey osteocalcin Biochemistry 21 638-642, 1982
- 48) Nakade O, Kaku T, Matsuyama T Primary structure and immunohistochemical localization of dog osteocalcin Jpn J Oral Biol 35 237-250, 1993
- 49) Yamaguchi A, Yoshiki S Isolation and characterization of novel clonal human osteosarcoma cell lines Dentistry in Japan 30 22-27, 1993
- 50) 関口守正. II各種がん細胞株の特性 骨肉腫, ヒトがん細胞株とその特性, 鈴木利光, 関口守正, 野澤志朗編著, 初版, 中外医学社, 東京, 1992, 413-416頁
- 51) Biegel J, Womer R B, Emanuel B S Complex karyotypes in series of pediatric osteosarcoma Cancer Genet Cytogenet 38 89-100, 1989
- 52) 望月洋一, 細川眞澄男: VI腫瘍の発生, 増殖, 転移, 新病理学総論, 菊地浩吉, 吉木 敬編, 第15版, 南山堂, 東京, 1993, 475-480頁.
- 53) Yamaguchi A, Kahn A J Clonal osteogenic

- cell lines express myogenic and adipocytic developmental potential *Calcif Tissue Int* 49 221-225, 1991
- 54) Young M F, Kerr I M, Ibaraki K, Heegaard A M Structure, expression, and regulation of the major noncollagenous matrix proteins of bone *Clin Orthop* 281 275-294, 1992
- 55) Chiba H, Sawada N, Iba K, Isomura H, Ishii S, Mori M A newly established cell line from normal human bone responds to 1α , 25-dihydroxyvitamin D_3 , retinoic acid and transforming growth factor- β_1 *Tumor Res* 28 41-50, 1993
- 56) Levine A M, Rosenberg S A Alkaline phosphatase level in osteosarcoma tissue are related to prognosis *Cancer* 44 2291-2293, 1979
- 57) Bernard G W Ultrastructural localization of alkaline phosphatase in initial intramembranous osteogenesis *Clin Orthop* 135 218-225, 1978
- 58) 山口 朗, 吉木周作, 須田立雄 骨芽細胞の起源と分化, 骨・カルシウム代謝の調節系と骨粗鬆症, 松本俊夫編集, 初版, 羊土社, 1994, 49-52頁.
- 59) Partridge N C, Frampton R J, Eisman J A, Michelangeli V P, Elms E, Bradley T R, Martin T J Receptors for $1,25(OH)_2$ -vitamin D_3 enriched in cloned osteoblast-like rat osteogenic sarcoma cells *FEBS Lett* 115 139-142, 1980
- 60) Nishimoto S K, Price P A Proof that γ -carboxyglutamic acid containing bone protein is synthesized in calf bone *J Biol Chem* 254 437-441, 1979
- 61) Nishimoto S K, Price P Secretion of the vitamin K-dependent protein of bone by rat osteosarcoma cells *J Biol Chem* 255 6579-6583, 1980
- 62) Price P A, Bauko S A $1, 25$ -dihydroxyvitamin D_3 increases synthesis of the vitamin K-dependent protein by osteosarcoma cells *J Biol Chem* 255 11660-11663, 1980
- 63) 山口 朗・骨芽細胞の培養とその応用, 骨・歯牙組織の病理検査法と研究技術の実際, 永井教之編, 第1版, 学際企画, 東京, 1991, 202-211頁
- 64) Bonewald F L, Kester B M, Schwartz Z, Swan D L, Khare A, Johnson L T, Leach J R, Boyan D B Effects of combining transforming growth factor β and $1,25$ -dihydroxyvitamin D_3 on differentiation of human osteosarcoma (MG-63) *J Biol Chem* 267 8943-8949, 1992
- 65) Suzuki S, Koga M, Takaoka K, Ono K, Sato B Effects of retinoic acid on steroid and vitamin D_3 receptors in cultured mouse osteosarcoma cells *Bone* 14 7-12, 1993
- 66) Kerner S A, Scott R A, Pinke J W Sequence elements in human osteocalcin gene confer gene and basal activation and inducible response to hormonal vitamin D_3 *Proc Natl Acad Sci USA* 86 4455-4459, 1989
- 67) Ozono K, Sone T, Pike W The genomic mechanism of action of $1,25$ -dihydroxyvitamin D_3 *Bone Miner Res* 6 1021-1027, 1991
- 68) Minghetti P P, Norman W A $1,25 (OH)_2$ -vitamin D_3 receptors gene regulation and genetic circuitry *FASEB J* 2 3043-3053, 1988
- 69) Owen T A, Bortell R, Yocum S A, Smock S L, Zhang M, Van Wijnen A J, Stein J L, Curran T, Lian J B, Stein G S Coordinate occupancy of AP-1 sites in the vitamin D responsive and CCAAT box elements by *Fos-Jun* in the osteocalcin Model for phenotype suppression of transcription *Proc Natl Acad Sci USA* 87 9990-9994, 1990
- 70) Schule R, Umesono K, Mangelsdorf D J, Bolado J, Pinke J W, Evans R M *Jun-Fos* and receptors for vitamin A and D recognize a common response element in the human osteocalcin gene *Cell* 61 497-504, 1990
- 71) Liotta L A, Tryggvason K Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen *Nature* 284 67-68, 1980
- 72) Okada Y, Isuchiya H, Shimizu H, Tomita K, Nakanishi I, Sato H, Seki M, Hayakawa T Induction and stimulation of 92-KDa gelatinase/type IV collagenase production in osteosarcoma and fibrosarcoma cell lines by tumor necrosis factor α *Biochem Biophys Res Comm* 171 610-617, 1990
- 73) Lavraie P E, Lu H, Mirshahi S, Soria J, Bernadou A, Kruthof E K O, Lijnen H R, Bortin P The plasminogen activation in ovarian tumors *Int J Cancer* 55 27-31, 1993
- 74) 柴田敏之, 河野 峰, 永易裕樹, 加藤元康, 小西 亮, 奥村一彦, 有末 眞, 村瀬博文 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.
- 75) Scultz R M, Silberman S, Persky B, Bajkoski
A S, Carmichael D F Inhibition by human-
recombinant-tissue inhibitor of metallo-
proteinases of human amnion invasion and lung
colonization by murine B16-F10 melanoma cells
Cancer Res 48 5539-5545, 1988
- 76) Kruihof E K O Plasminogen activator
inhibitors-a review Enzyme 40 113-121, 1988
- 77) Rygaard J, Poulsen C O Heteroplantation of
human malignant tumor to nude mice Acta Path
Microbiol Scand 77 758-760, 1969
- 78) Nakajima M, Morikawa K Influence of organ
environment on extracellular matrix degradative
activity and metastasis of human colon car-
cinoma cells J Natl Cancer Inst 82 1890-1898,
1990
- 79) Basset P, Bellocq J P, Wolf C A novel metallo-
proteinase gene specifically expressed in stromal
cell of breast carcinoma Nature 348 699-704,
1990
- 80) Fidler I J Critical factors in the biology of
human cancer metastasis Twenty-eighth G H
A Clowes Memorial Award Lecture Cancer Res
50 6130-6138, 1990