# 口腔扁平上皮癌細胞の浸潤能に関する実験的研究


| メタデータ | 言語: jpn<br>出版者:<br>公開日: 2017-10-04<br>キーワード (Ja):<br>キーワード (En):<br>作成者: 児島, 伸也<br>メールアドレス:<br>所属: |
| --- | --- |
| URL | http://hdl.handle.net/2297/8316 |

金沢大学十全医学会雑誌　第101巻　第2号　266－281 (1992)

# 口腔扁平上皮癌細胞の浸潤能に関する実験的研究

金沢大学医学部歯科口腔外科学講座（主任：山本悦秀教授）
児　島　伸　也

（平成4年2月1日受付）

扁平上皮癌細胞の浸潤機序を知る目的で，実験的癌浸潤モデルを開発した．マウス胎児線維芽細胞 (3T3 細胞) を組み込んだコラーゲンゲル上に口腔扁平上皮癌由来の3種の細胞 (KB 低分化型; OSC-19 高分化型; OSC-20 中等度分化型) をそれぞれ重層培養し，ゲル内への浸潤動態を形態学的ならびに生化学的に比較検討した．対照としてはコラーゲンゲルのみの基質の上に癌細胞を培養するものを用い，三種の癌細胞株の性状についてはヌードマウスへの移植実験で確認した．3T3 細胞を組み込むと OSC-19 と OSC-20 細胞は早期にゲル内へ侵入・浸潤した．これに対し，対照群や KB 細胞ではゲル内への浸潤性は乏しかった．浸潤性の OSC-19 や OSC-20 細胞は KB 細胞に比べて増殖活性は低く，ラミニン産生量は少なかったが，フィブロネクチンを多量に産生・分泌し，基底膜成分 (ラミニン，Ⅳ型コラーゲン) が沈着するという特徴を示した．電顕的にも断続的な基底膜を確認した．しかし，浸潤先端部では，Ⅳ型コラーゲンやラミニンの沈着は陰性で，電顕的にも基底膜を欠いていた．基質分解酵素 (matrix metalloproteinase, MMP) についてゼラチンサブストレートゲルを用いたザイモグラフィーで各培養上清を検討すると，72kDa, 92kDa, 95kDa および 50-55kDa のバンドを見，イムノブロットで 72kDa ゼラチナーゼ (MMP-2), 92kDa ゼラチナーゼ (MMP-9), コラゲナーゼ (MMP-1) を確認した．また，95kDa ゼラチナーゼは 3T3 細胞由来であり，これらの酵素は 3T3 細胞を取込むことで増強した．ゼラチン分解活性とコラーゲン分解活性をアッセイすると，前者は 3T3 細胞を組込んだ OSC-19, OSC-20 細胞に高値で，後者は OSC-20 細胞に高値であった．MMP の局在をみると，MMP-2 はすべての細胞に散在性に，MMP-9 はとくに OSC-19 細胞の浸潤部近傍細胞に限局していた．また MMP-1 は OSC-20 細胞の浸潤細胞に認められた．従って，扁平上皮癌の基質への浸潤能はフィブロネクチンによる基質への接着と基質分解酵素とくに MMP-9 と MMP-1 がそれぞれ関与していることが強く示唆された．

**Key words** oral squamous cell carcinoma, invasion model, basement membrane, matrix metalloproteinase

口腔領域悪性腫瘍をその組織型から見ると大半が扁平上皮癌である．近年その治療成績は飛躍的に向上したが，不幸な転帰をとる症例も少なくない．Yamamoto ら[1)2)]は，Jacobsson ら[3)]の癌浸潤様式分類を改定・細分類し，び慢性に浸潤する 4C, 4D 型の症例に転移形成が多く，予後不良例が集中したことを報告してきた．したがって，これら癌細胞の浸潤機序を解明することは口腔領域のみならず他領域を含む扁平上皮癌の治療成績に資するところ極めて大きいものと考える．

一般に，生体内における癌細胞の悪性形質，すなわち癌細胞の浸潤，転移という能力は，癌細胞と正常細胞[4)]，癌細胞とそれを取り囲む間質組織との相互作用のほか，ナチュラルキラー細胞やマクロファージなどの免疫担当細胞による防御機構，血管内皮細胞および血小板との接着相互作用やさらにには物理的，解剖学的条件等，いくつもの要因に影響されている．そこで，まず癌細胞の浸潤・転移機序の解明のためにはモデル実験系の確立が有用と考えられている．この目的に沿ったいくつかの実験モデルが既に報告されている[5)~10)]．これら多くの実験モデルでは生体内の状態を必ずしも正確に反映していないという批判もある．しかし，癌細胞の環境を単純化し，個々の癌細胞の性格を比較して比較的短期間に浸潤能の検索が行える[10)]等の利点があることは間違いない．生体を用いる実験系として，Fusenig ら[11)]や Boukamp ら[12)]はヌードマウスの背部に形成した肉芽組織上に癌細胞を移植し，その浸潤増殖能を検定する方法を報告した．また，同様な方法として鶏卵漿尿膜法[5)6)]，鶏心臓上[7)]の癌細胞培養などが知られている．生体を利用しないものとしてはコラーゲンゲル[8)]や再構成基底膜[9)10)]に癌細胞を浸潤，通過させる浸潤モデルが代表的である．最近，松本[13)]はコラーゲンゲル内に線維芽細胞を包埋した基質を用いた口腔扁平上皮癌細胞の浸潤モデル実験系を作成し，このモデルにおいては原発巣の組織像および浸潤増殖像が比較的良好に反映されたことを報告した．これは，線維芽細胞が常在する真皮を想定した生体内の反応に近いモデルであるが，実際にはヒト線維芽細胞を一定の条件で入手し難いという問題があり，定量実験には向いていない．そこで著者は常に同一条件で利用できる間質細胞として，性質のよく知られたマウス胎児線維芽細胞由来の 3T3 細胞を選び，これをゲル内に組み込んだ浸潤モデルを作製し，

Abbreviations: ABC, avidin-biotin peroxidase complex; BSA, bovine serum albumin; DAB, diaminobenzidine hydrochloride; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; EHS, Engelbreth-Holm-Swarm; FCS, fetal calf serum; H. E, hematoxylin and eosin; MEM, Eagle's minimum essential medium; MMP,

この基質上で3種類の癌細胞を培養した．本研究は，これら3種類の癌細胞について，この培養系モデルを用いて基底膜成分の局在と産生量，基質分解酵素の産生，基質分解酵素産生細胞の同定などの浸潤動態について精査し，浸潤機序について比較検討したものである．

## 材料および方法

### Ⅰ．実験に用いた細胞

3種類の口腔扁平上皮癌細胞株を用いた．KB 細胞[14]は原発巣より，OSC-19[15][16]，OSC-20[17]細胞はそれぞれ頸部リンパ節転移巣より株化されたものである．なお，KB 細胞は JCRB 細胞バンクより，OSC-19 細胞と OSC-20 細胞はそれぞれ札幌医科大学口腔外科学講座，横井敏一博士により樹立された細胞株を供与された．またコラーゲンゲル内へ組み込む線維芽細胞としては JCRB 細胞バンクより入手したマウス胎児由来の Swiss 3T3 細胞を用いた．以上の細胞は10％牛胎児血清 (fetal calf serum, FCS) を加えたイーグル最小必須培地 (Eagle's minimum essential medium, MEM, Flow Laboratories, Irvine, Scottland) で継代培養し，必要に応じて実験に用いた．

### Ⅱ．癌細胞のヌードマウスへの移植

癌細胞移植のために用いたヌードマウス（日本クレア社，東京，BALB/C-nu/nu，6週齢，雌）は本学動物実験施設内の Laminor Flow Iso-Rack (室温25±2℃，湿度50±5％) 中で飼育した．飼料および飲料水としては固形飼料（固形 CRF-1，日本チャールスリバー，厚木市，神奈川）と水道水をそれぞれ自由摂氏として供与した．以下の移植実験は全て無菌的に行った．3種の癌細胞 $1\times10^7$/ml の浮遊液 1ml をヌードマウスの側腹部皮下組織に移植した．移植後1週間目に形成された腫瘤をエーテル麻酔下に摘出した．

### Ⅲ．癌細胞の増殖能の検定

MEM に10％ FCS を添加した培養液を用い，直径 100mm のプラスチックシャーレ (Falcon, NJ, USA) 上で継代培養を行い，3種類の癌細胞の増殖曲線を描出した．すなわち，継代を行っている癌細胞を0.2％トリプシン液にて分散し，MEM/FCS 中で細胞密度が $1\times10^5$/ml となるように調整した．この 2ml を 35mm 径シャーレに加え5％ $CO_2$，37℃の条件で培養し，24時間毎にトリプシン液にて分散し，Bürker-Türk 型血球計算盤を用いてトリパンブルー染色に不染の生細胞数を算定した．実験は各癌細胞ごとに3回行った．

### Ⅳ．浸潤モデル作製および培養方法

1．実験群：線維芽細胞組み込み基質上での癌細胞培養

癌細胞の浸潤基質としてコラーゲンゲルを用い，その調整法は Wren ら[18]の方法に従った．すなわち豚腱由来の0.3％組織培養用Ⅰ型コラーゲンの酸性溶液（新田ゼラチン，cell matrix-type 1-A：希塩酸コラーゲン溶液 pH 3.0）を使用時に再構成用緩衝液（2.2％重炭酸ナトリウムおよび0.05N水酸化ナトリウムを含む 200mM HEPES 緩衝液）と10倍濃度の MEM をそれぞれ8：1：1の比で混合した．この混合したコラーゲン溶液中に4℃にて 3T3 細胞を $3\times10^6$個/2ml の濃度に混合し，うち 2ml を 35mm シャーレに移し $CO_2$インキュベーター中に30分間静置することによりゲル化させた．コラーゲンゲル中の 3T3 細胞の活動性を維持するために，10％ FCS 加 MEM を 2ml 重層し，$CO_2$インキュベーターに一晩置き，翌日に 3T3 細胞の突起コラーゲンゲル中によく伸びていることを位相差顕微鏡で確認した後，各々のシャーレ内のゲル上に3種類の癌細胞を重層した．癌細胞数は1シャーレあたり $2\times10^6$とした．癌細胞の重層後 $CO_2$インキュベーターに2時間静置し，癌細胞がコラーゲンゲルに接着したことを確認後，シャーレの底に接着しているゲルを小スパーテルを用いて機械的に浮遊させた．メディウムを吸引後，10％ FCS 加 MEM を 2ml 加えて浮遊培養した（図1）．同様のメディウム交換を2日毎に行った．培養条件は5％ $CO_2$，37℃である．

2．対照群

対照として 3T3 細胞を組み込まないコラーゲンゲルを用いた．すなわちコラーゲンゲル溶液をそのままゲル化させ，3種類の癌細胞を重層，浮遊させ，培養した．その他は全て実験群と同様とした．

### Ⅴ．組織学的観察

ヌードマウスに形成された癌腫瘤および培養4日，8日，14日後の培養組織は3分割し，各々の組織片に異なる固定を施行した．光顕的観察用には4％パラホルムアルデヒドまたはメタカルンで固定し，エタノール系列で脱水後パラフィン包埋を行った．パラフィン切片に対して通常のヘマトキシリン－エオジン (hematoxylin and eosin, H. E) 染色または後述の免疫染色を施した．電顕用には2.5％グルタールアルデヒド溶液および2％四酸化オスミウム酸にて固定を行った．エタノール系列による脱水，エポン樹脂 (Epok 812，応研，東京) 包埋後超薄切片に酢酸ウラニルとクエン酸鉛で染色し電顕的に観察した．

### Ⅵ．免疫組織化学的検索

1．基底膜成分

培養組織切片およびヌードマウスの腫瘤の組織切片に対して基底膜の主要構成成分であるラミニン，Ⅳ型コラーゲンの局在をストレプトアビジン・ビオチン・ペルオキシダーゼ・コンプレックス法[19]にて検索した．まず，4％パラホルム固定またはメタカルン固定したパラフィン切片をヒストクリア (Histo-Clear, Natoinl Diagnostics, Somerville, NJ, USA) で脱パラフィン後，内因性ペルオキシダーゼ活性を阻止するために0.3％過酸化水素および0.1％アジ化ナトリウムに10分間浸漬させた．

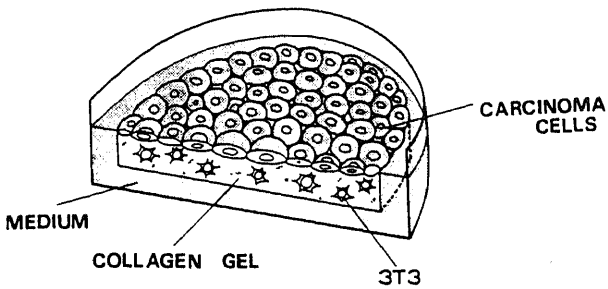


Fig. 1. Schematic representation of an invasion model. Carcinoma cells are overlayered on a viable 3T3 cell-embedded collagen gel. The collagen gel are floating in the culture medium in a 35mm dish.

matrix metalloproteinase; PBS, phosphate buffered saline; SDS, sodium dodecyl sulfate; TPBS, tween 20 supplemented phosphate buffered saline

次いで冷リン酸緩衝生理食塩水 (phosphate buffered saline, PBS) で10分間3回洗浄後，1次抗体の非特異的反応を阻止する目的で2次抗体作製動物の正常血清 (10倍希釈) を30分間反応させた．ひき続きラット抗ヒトラミニンモノクロナール抗体 (Immunotech, Marseille, France) およびマウス抗ヒトⅣ型コラーゲンモノクロナール抗体 (資生堂，東京) を各々100倍，1倍希釈して4℃で一晩反応させた．冷 PBS で10分間3回洗浄後，ラミニンに対してはビオチン化ウサギ抗ラット IgG 抗体 (Vector Laboratories, CA, USA)，Ⅳ型コラーゲンに対してはビオチン化ウマ抗マウス IgG 抗体 (Vector Laborarories) を200倍希釈して用い，室温で30分間反応させた．冷 PBS で10分間3回洗浄後ビオチン化ストレプトアビジン (Jackson Immunoresearch Laboratories, PA, USA) を室温30分間反応させた．次いで冷 PBS で10分間3回洗浄した後にジアミノベンジジン (diaminobenzidine hydrochloride, DAB, Sigma, MO, USA) に0.01%過酸化水素水を加え，10分間恒温槽37℃中で反応，発色させた．流水水洗後ヘマトキシリンで核染色を行い，脱水・透徹・封入した．なお，ラミニン，Ⅳ型コラーゲンに対して，脱パラフィン後0.4%ペプシン (Sigma) で20分間前処理を行った．

2．基質分解酵素産生細胞の同定

基質分解酵素であるマトリックスメタロプテナーゼ (matrix metalloproteinase, MMP)-1 (コラゲナーゼ)，MMP-2 (72kDa ゼラチナーゼ)，MMP-3 (ストロモライシン)，MMP-9 (92kDa ゼラチナーゼ) の産生細胞を同定するために，金沢大学医療技術短期大学部岡田保典博士より供与された4種のマウスモノクロナール抗体：抗ヒト MMP-1 抗体，抗ヒト MMP-2 抗体，抗ヒト MMP-3 抗体および抗 MMP-9 抗体を用いて免疫染色を行った．これらの4種の酵素を細胞内小器官に貯留させる目的で培養細胞に対してモネンシン処理を行った．すなわち培養液中に2μMのモネンシンを加えて3時間培養し，この間モネンシンの細胞内への移行を容易にするためシャーレを3回軽く振盪した．培養細胞を4%パラホルムアルデヒドで一晩固定した後，エタノール系列で脱水してパラフィン包埋を行った．パラフィン切片に対しては上記と同様のストレプトアビジン・ビオチン・ペルオキシダーゼ・コンプレックス法を用いて免疫染色を行った．抗 MMP-1 抗体，抗 MMP-2 抗体，抗 MMP-3 抗体，抗 MMP-9 抗体は各々500倍，4000倍，1000倍，500倍に希釈して用いた．

Ⅶ．基底膜成分の定量

癌細胞による基底膜成分産生量の定量のために，培養上清中のラミニン，Ⅳ型コラーゲンおよびフィブロネクチン量をエンザイムイムノソルベントアッセイ (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 法のサンドイッチ法を用いて測定した．なお，メディウムに添加した血清の影響を排除するため以下のような培養方を用いた．10% FCS 添加 MEM で培養した細胞を培養上清採取の2日前より無血清メディウム，ニッスイ SFM-101 (ニッスイ，東京) 2ml に0.1mM アスコルビン酸[20]，0.2%ラクトアルブミンとなるようそれぞれ添加し，培養4日目，8日目，14日目の培養液を採取した．採取した培養液を1000r. p. m，5分間遠心分離してその上清を定量に供した．

ELISA 法の測定には96穴プレート (Nunc, Roskilde, Denmark) を用いた．抗ヒトラミニンモノクロナール抗体 (Calbiochem, Corp., CA, USA)，抗ヒトⅣ型コラーゲンモノクロナール抗体 (資生堂)，抗ヒトフィブロネクチンモノクロナール抗体 (Calbiochem, Corp.) をそれぞれ別のプレートの各ウェルに100μlずつ分注し，4℃で一晩プラスチックプレートに吸着させた．0.5%ツイーン20加 PBS (tween 20 supplemented phosphate buffered saline, TPBS) で各ウェルを洗浄後，非特異的反応を防ぐため1%牛血清アルブミン (bovine serum albumin, BSA) 各ウェルに100μlずつ分注して4℃で一晩反応させた．TPBS で洗浄後，既知濃度のヒトラミニン (10μg/ml)，ヒトⅣ型コラーゲン (10μg/ml)，ヒトフィブロネクチン (2μg/ml) の $2^1$ 倍から $2^9$ 倍までの希釈系列を作製して，各100μlを各々の抗原が対応する抗体を吸着させたプレート上の各ウェルに分注した．同時に未知試料である培養上清の希釈系列を各プレートの各ウェルに注入した．37℃，2時間反応させた後 TPBS で洗浄し，既知の試料および未知の試料を反応させたウェルに各々対応する抗ヒトラミニンポリクロナール抗体 (E-Y Laboretories, CA, USA)，抗ヒトⅣ型コラーゲンポリクロナール抗体 (ADVANCE，東京)，抗ヒトフィブロネクチンポリクロナール抗体 (DAKO, Glosrup, Denmark) を100μlずつ分注し，37℃で1時間反応させた．次いで TPBS で各ウェルを洗浄した後にアルカリホスファターゼ標識抗ウサギ IgG 抗体 (×500) を全てのウェルに100μlずつ分注して37℃，30分間反応させた．TPBS で洗浄後10%ジエタノールアミン5mlにアルカリホスファターゼ基質錠剤 (SIGMA 104) 1錠を溶かした基質溶液を100μlずつ全てのウェルに分注し96穴専用の分光光度計 (Biorad, CA, USA) を用いて波長 405nm の吸光度を測定した．両対数表上で既知濃度の標準曲線を描き，その直線部を未知濃度の算出に用いた．用いた抗体の希釈倍率は抗ラミニンモノクロナール抗体が3000倍，抗Ⅳ型コラーゲンモノクロナール抗体が1000倍，抗フィブロネクチンモノクロナール抗体が3000倍，抗ラミニンポリクロナール抗体が500倍，抗Ⅳ型コラーゲンポリクロナール抗体が500倍，抗フィブロネクチンポリクロナール抗体が1000倍である．

それぞれの基底膜成分の培養上清中の量がマウス由来の3T3 細胞ではなく，ヒト由来の癌細胞による産生を反映していることを確認する目的で以上のアッセイ系を用いて，フィブロネクチンアッセイ系はヒト血漿，マウス血漿，FCS を比較，ラミニンアッセイ系ではヒトラミニンとマウス Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) 腫瘍由来ラミニンを比較，Ⅳ型コラーゲンアッセイ系ではヒトⅣ型コラーゲンとマウス EHS 腫瘍由来Ⅳ型コラーゲンを比較検討した．以上のヒトフィブロネクチンは河原栄博士[21]より，ヒトⅣ型コラーゲンは上田善道博士[22]より，マウス EHS 腫瘍由来ラミニンとⅣ型コラーゲンは岡田保典博士より供与された．

Ⅷ．SDS-ゼラチンサブストレートゲル電気泳動法

Hibbs ら[23]の方法に従い，0.2%ゼラチンとドデシル硫酸塩 (sodium dodecyl sulfate, SDS) を含むポリアクリルアミドゲル (8%アクリルアミド) を作製した．培養上清液を非還元状態4℃で電気泳動した．ゲルを2.5% Triton X-100 (Sigma) 液で洗浄後0.15M 塩化ナトリウム ($NaCl_2$) と10mM 塩化ナトリウム ($CaCl_2$) を加えた50mM トリス塩酸緩衝液 (pH7.5) で37℃で一晩反応させた後にクーマシー青 (coomasie brilliant blue R250) で染色し，ゼラチンの分解パターンを調べた．

Ⅸ．基質分解酵素活性のアッセイ

培養上清中に含まれるゼラチン分解酵素とコラーゲン分解酵素をそれぞれ Gawston ら[24]と Harris ら[25]の方法に従ったゼラ

チナーゼ活性とコラゲナーゼ活性をアッセイすることで検定した．ゼラチナーゼ活性は1.0mM $NH_2$-Ph-Hg-Ac の存在下で，また，コラゲナーゼ活性は1.5mM の $NH_2$-Ph-Hg-Ac の存在下でッセイした．1単位のゼラチナーゼ，コラゲナーゼ活性は岡田保典博士より分与された [$^{14}$C]コラーゲン，[$^{14}$C]ゼラチンを37℃において1分間に 1 μg 分解することを意味する．

X．イムノブロット

培養上清中の MMP を3種のモノクロナール抗体を用いてイムノブロットで同定した．泳動に用いる抗原量を増すために，採取した培養上清400μlに1/2量の100% (w/v) トリクロロ酢酸を加え4℃で30分間静置後，生じた沈澱を泳動に用いた．沈澱をメルカプトエタノールを加えた泳動緩衝液に溶かし，

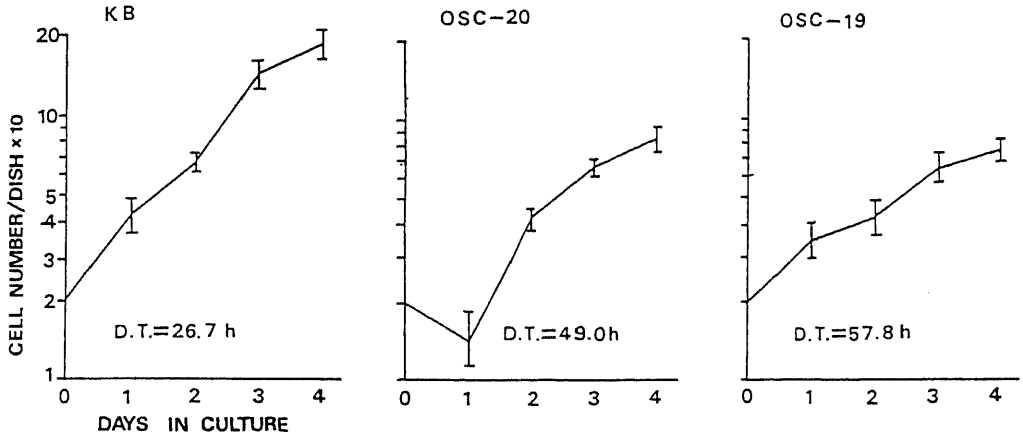


Fig. 2. Growth curves of carcinoma cell lines (KB, OSC-19 and OSC-20) on the plastic dishes. D. T.; doubling time.

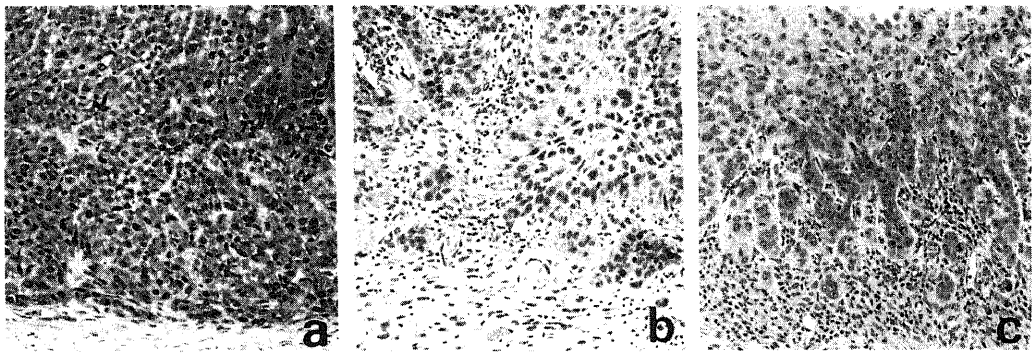


Fig. 3. Photomicrograph of carcinoma cells grown in the subcutaneous tissue of nude mice. KB cells (a) show expansive growth without stromal reaction by fibroblasts. OSC-19 (b) and OSC-20 (c) cells show invasive growth with fibroblastic reaction and inflammatory cell infiltration. a, b, c×120.

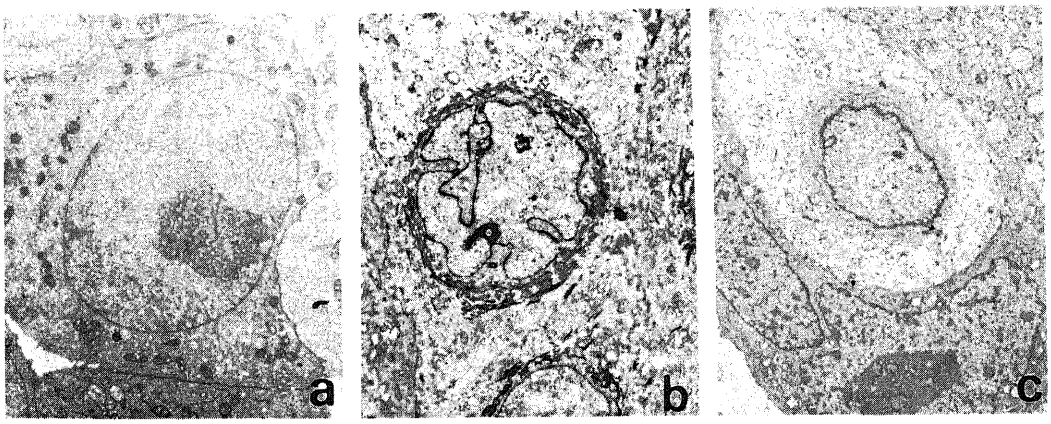


Fig. 4. Electron micrographs of carcinoma cell lines grown in the subcutaneous tissue of nude mice. KB cells (a) are provided by poorly developed cytoplasmic filaments and specialized attachment apparatus. OSC-19 cells (b) have abundant tonofilaments and desmosomes showing the character of well differentiated squamous cell carcinoma. OSC-20 cells (c) are moderately differentiated squamous cell carcinoma characterized by tonofilament bundles in a perinuclear area and desmosomes. a, b, c×1,200.

SDS-8％ポリアクリルアミドゲルにて泳動後，ニトロセルロース膜に転写した．ニトロセルロース膜に対する免疫染色はアビジン・ビオチン・ペルオキシダーゼ・コンプレックス (avidin-biotin-peroxidase complex, ABC) 法で行った．一次抗体として2000倍に希釈した抗 MMP-1 抗体，抗 MMP-2 抗体，抗 MMP-9 抗体を用い，二次抗体には200倍に希釈したビオチン化ウマ抗マウス IgG 抗体 (Vector Laboratories) を室温30分間反応させた．TPBS で洗浄後アビジン・ビオチン・コンプレックス (Vector Laboratories) を30分間反応洗浄後 DAB 反応を行った．

## 成　　績

### Ⅰ．浸潤モデルに用いた癌細胞株の性状

実験に用いた3種類の癌細胞の増殖曲線は図2に示すようにそれぞれの倍加時間は KB 細胞26.7時間，OSC-19 細胞，57.8時間，OSC-20 細胞49時間であった．

ヌードマウスに移植した癌細胞の形態では，KB 細胞は分裂像が散見され，核小体が目立ち，細胞質が乏しい類円形細胞の形態を示し，充実性に増殖し，角化や細胞間橋は認められなかった．周囲の組織に対し圧排性に発育し，間質反応は少なく低分化型で間質成分に乏しい癌細胞であった (図3a)．

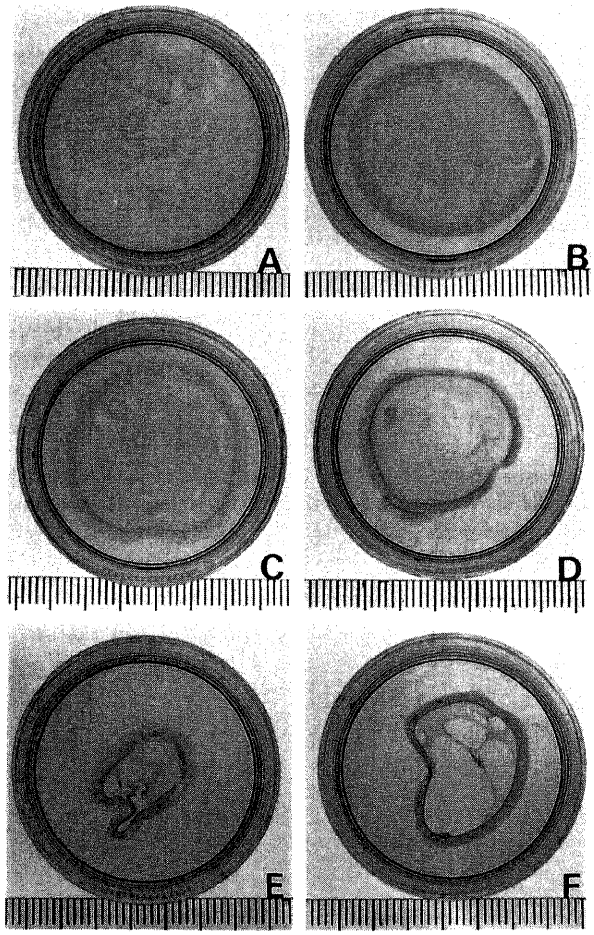


Fig. 5. Photographs of macroscopic shape of collagen gels after 8 days in culture, showing an intact collagen gel in a control group of KB cells (A), minimal contraction of collagen gels in a cotrol group of OSC-19 cells (C) and an experimental group of KB cells (B), moderate contraction in an experimental group of OSC-19 cells (D), severe contraction in control and experimental groups of OSC-20 cells (E, F). Measure scale indicates millimeter.

OSC-19 細胞は多角化で角化を営む細胞であり敷石状の配列と癌真珠の形成が特徴であった．また，腫瘍周辺部で浸潤性の増殖を示し，好中球とリンパ球の浸潤と腫大した線維芽細胞の反応を伴っていた (図3b)．

OSC-20 細胞は多角形，細胞間橋および角化傾向をみる腫瘍細胞であり，腫瘍周辺部では軽度の線維芽細胞の反応と炎症細胞の浸潤が見られた (図3c)．

電顕的には，髄様に増殖する KB 細胞間には細胞間接着装置の発達は弱く，稀にデスモゾーム様結合が見られるのみであった (図4a)．細胞質内にはフリーリボゾームが多く，中間径フィラメントは少なく，稀に張原線維様構造が認められた．OSC-19 細胞では大部分の細胞が張原線維を有し，特に癌真珠形成部の角化細胞では核周囲に高電子密度の張原線維束が取り巻いていた (図4b)．細胞間には強固なデスモゾーム結合が多数形成されていた．間質に接する細胞は断続的ではあるが明瞭な基底膜が形成されており，ヘミデスモゾームの形成を伴っていた．OSC-20 細胞でも多くの張原線維が形成されていたが，個々の細胞内でのその量は OSC-19 細胞に比べ少なくなかった (図4c)．デスモゾーム結合は少ないが，明瞭に認められた．間質面にはヘミデスモゾーム様構造に面して基底膜構造が僅かに形成されていた．

### Ⅱ．癌細胞の基質内浸潤

1．肉眼的所見

培養8日目の各対照群および実験群におけるコラーゲンゲルの収縮状態を図5に示す．KB 細胞の対照群ではゲルは収縮せず，3T3 細胞包埋群では若干収縮して培養8日目でその直径の約90％であった．OSC-19 細胞では 3T3 細胞を組み込まない場合でも収縮を示し，約80％の収縮を示した．3T3 細胞を組み込むことによって更に強い収縮を示し，径は約60％となった．OSC-20 細胞では 3T3 細胞の有無に関係なくゲルは溶解し，4日目でゲル中心部は完全に消失した．そこで OSC-20 細胞数を $5\times10^5$ に減少した8日目を，また $1\times10^5$ の数で14日目までゲルを観察した．

2．光顕的所見

1）対照群

KB, OSC-19, OSC-20 の3種類の癌細胞は各々，コラーゲンゲル単独の基質においても重層増殖を示した．KB, OSC-19 細胞とも培養14日目で癌細胞とコラーゲンゲルとの境界に浅い凹凸が見られたがゲル内への明らかな侵入像は観察されなかった．また，OSC-20 ($2\times10^6$個) においては培養8日目にはコラーゲンゲルが溶解消失し，以後観察がおこなえず標本が得られなかった．そこでコラーゲンゲルの崩壊を避けるために，癌細胞数を $1\times10^5$ 個に減らして培養した．この培養では8日目以後癌細胞に接してコラーゲンゲルが一部融解するに留まった．

2）実験群

i．KB 細胞 (KB＋3T3)

KB 細胞は，コラーゲンゲル上で増殖し，14日目には8～10層に多層化した．細胞形態は細胞質の乏しい類円形の細胞で細胞配列の極性は認められなかった．細胞間結合は弱く，しばしば表層の細胞が塊状に遊離，剝脱，または一部壊死に陥っているのが認められた．基質内の 3T3 細胞は類円形で均等分布を

示し，細胞突起は伸ばしていなかった．培養4日，8日，14日において，癌細胞とコラーゲンゲルの接触面は部分的に波状で1～数個の細胞集団が基質に落ち込んでいるに過ぎなかった(図6A)．3T3 細胞と癌細胞が接着し，癌細胞が基質内に細胞突起を伸ばしている像はきわめて稀であった．

ii．OSC-19 細胞 (OSC-19 +3T3)

OSC-19 細胞は培養8日目ではゲル中心部付近で2～3層の増殖に過ぎなかった．ゲル辺縁部では5～10層と肥厚し，さらに連続的にゲル側面に広がっていた(図6B)．このような重層部では細胞は表層に向って扁平化し，重層扁平上皮としての分化

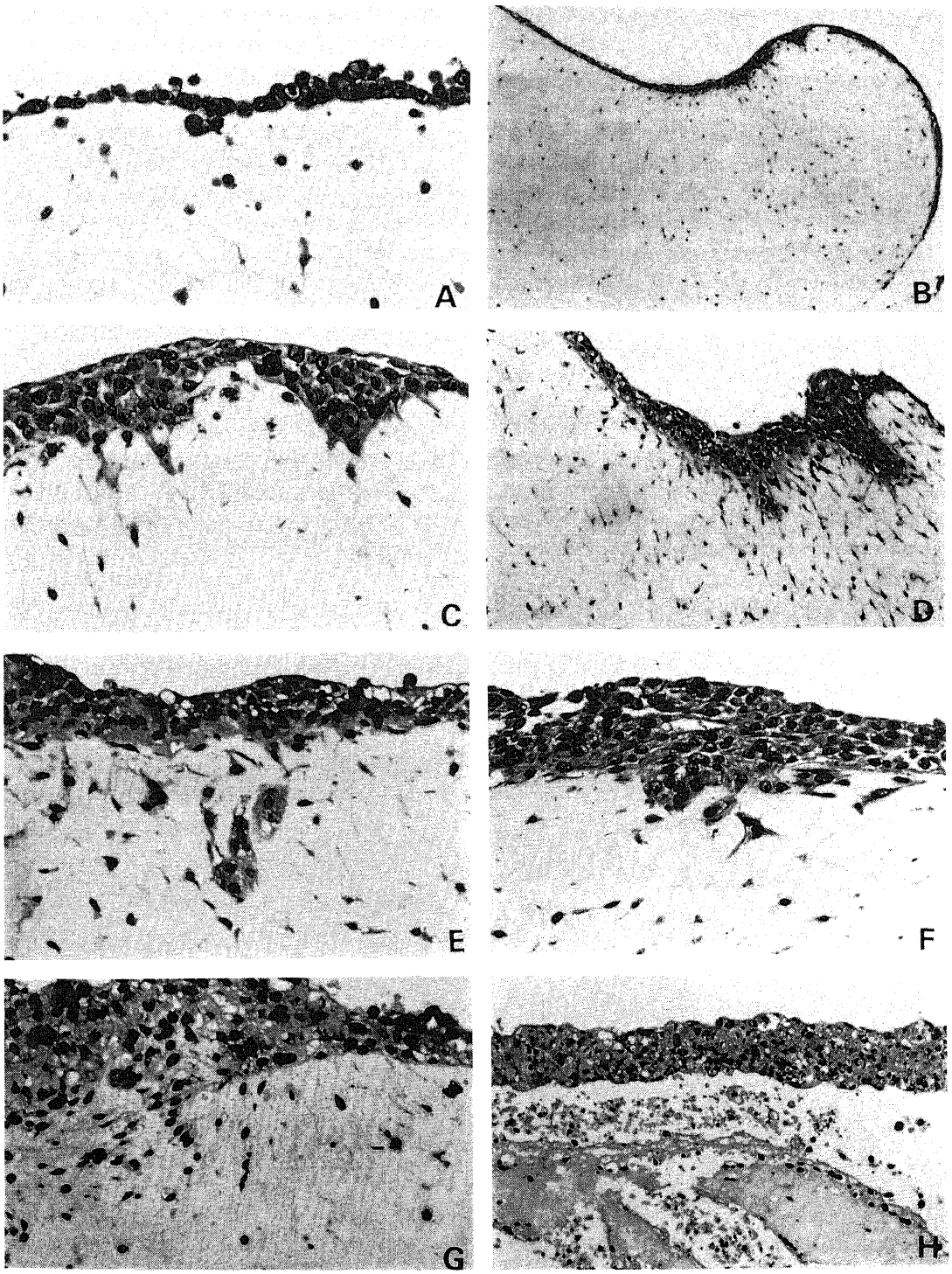


Fig. 6. Photomicrographs of KB cells (A), OSC-19 cells (B-F) and OSC-20 cells (G, H) on 3T3 cell-embedded collagen gels. KB cells (A) show no definite invasion into the substrate with round 3T3 cells. Lower (B) and higher (C) magnifications of OSC-19 cells show irregular or wedge-shaped invasion particularly in the peripheral zone of collagen gels. Invasion patterns of OSC-19 cells (D-F) are characterized by cellular extension of OSC-19 cells into the collagen gels and associated spindle-shaped 3T3 cells. Marked degradation of collagen gels of OSC-20 cells (G. H) are shown. A×240, B×240, C×44, D×120, E×240, F×240, G×240, H×240.

傾向を示し，同時に基底部の細胞はゲル内への浸潤を示した(図6B-F)．培養14日目では癌細胞基底部はとくに凹凸不整で，癌細胞は楔状あるいは索状に基質内へ突起を伸ばし，基質内の多数の紡錘形の 3T3 細胞と接触していた (図6C-F)．これに対しゲル中心部では 3T3 細胞は円形細胞で濃縮核をもち，細胞密度も低かった．

iii．OSC-20 細胞 (OSC-20+3T3)

OSC-20 細胞では $2\times10^6$ 個培養の場合 4 日目において既に OSC-19 細胞 8 日目と同様の浸潤形態と 3T3 細胞の反応が認められた．8 日目ではゲルは殆ど溶解，消失して光顕的な観察を行うことができなかったので OSC-20 細胞の数を $5\times10^5$ に減らして培養した．この場合は実験群の 8 日目で初めて同様の癌細胞のゲル内への侵入をみた (図 6G) が，14日目で実験群，対照群ともにゲルは完全に溶解した (図6H)．さらに OSC-20 細胞の

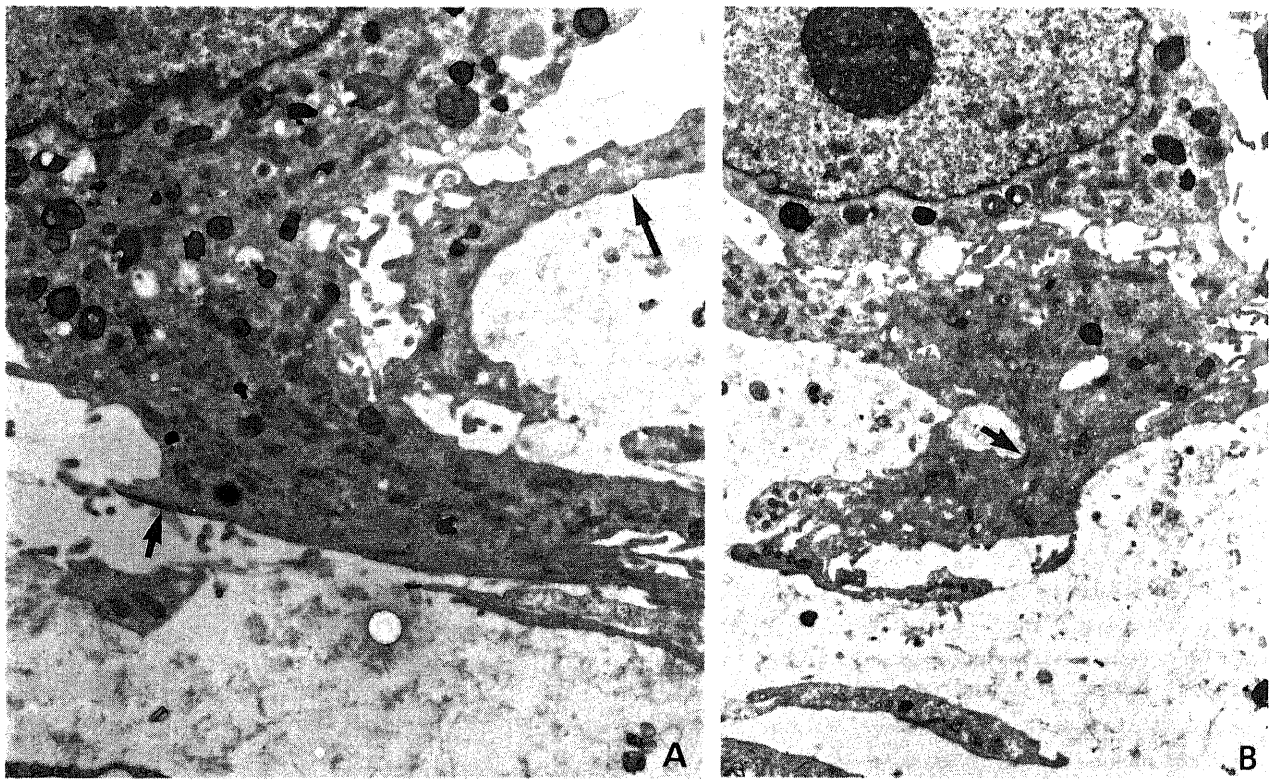


Fig. 7. Electron micrographs of invading OSC-19 cells. Invading OSC-19 cells (A, B) extend their processes toward the underlying 3T3 cells or they express bundles of actin filaments (short arrows) beneath the cytoplasmic membrane and focal basement membrane-like densities (long arrow). A×2,400, B×1,800.

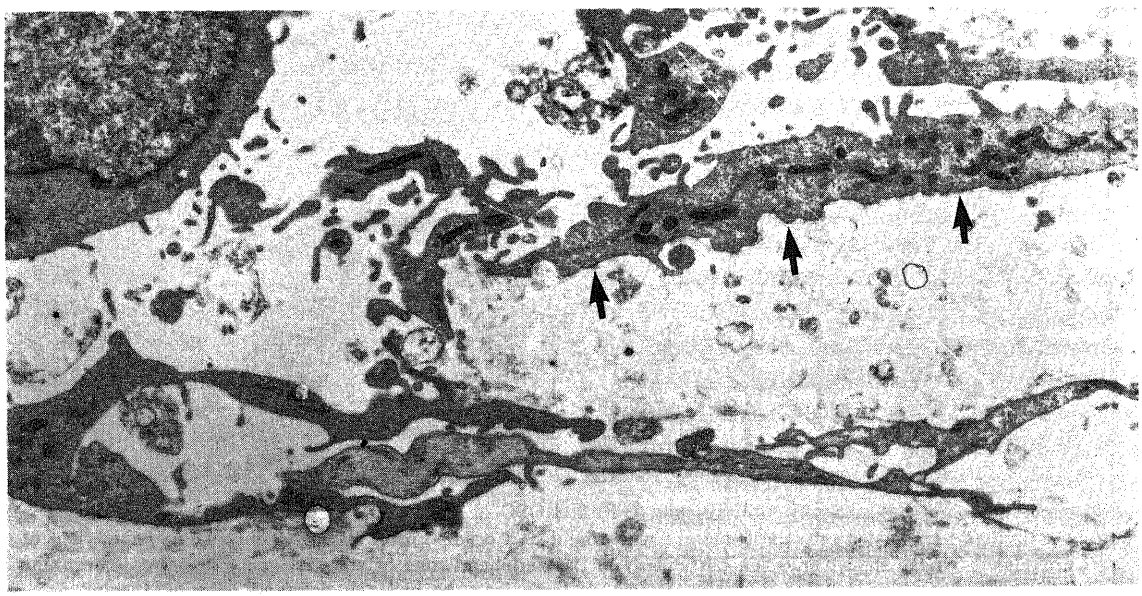

Fig. 8. Electron micrographs of OSC-19 cells 21 days in culture. Apparent continuous basement membrane (arrows) is formed in OSC-19 cells adjacent to invasion front. ×2,500.

数を $1\times10^5$ に減らした場合は14日目で初めて前述のような浸潤像を認めることができた．注目されることは OSC-20 細胞に接するゲルはきわめて溶解しやすいことであり，このゲル融解部位には必ずしも 3T3 細胞の変化を伴っていないことであった．

3．電顕的所見

対照群の KB 細胞はヌードマウスの場合と同様にリボゾーム，ミトコンドリア，ゴルジ装置以外の細胞内小器官の発達に乏しく，中間径フィラメンは殆ど認められなかった．細胞間結合も極めて弱く多くの細胞は周囲に小さな偽足を伸ばし，しばしば細胞間が離開する傾向にあった．細胞は時に互いに 20 μm 程度に近接していたが，細胞質の裏打ち構造など特別の接着装置は形成されていなかった．デスモゾーム様結合が稀に認められた．癌細胞のゲル接触面でも強固な細胞の接着装置は形成されておらず，ゲル面に対しても小さな偽足を伸ばしているにすぎなかった．実験群の KB 細胞は対照群とほぼ同じ細胞形態をとっていたが，僅かにデスモゾーム様結合が多い傾向にあった．ゲルに接する面では時に被覆小胞 (coated vesicle) がみられ，また細胞に接して電子密度の高い絮状物質が付着していた．明らかな基底膜の形成はみられなかった．

OSC-19 細胞は扁平で細長い突起を伸ばしてゲルに接着していた．対照群の OSC-19 細胞は 4 日目で小さな偽足をゲルとの接着面や細胞周囲に伸ばし，互いに接着していた．培養 8 日目より OSC-19 細胞は，ゲル面に平面的に接着したが，21日目までは明らかな基底膜やヘミデスモゾームは形成されていなかった．実験群の OSC-19 細胞は 4 日目で既に明らかなデスモゾーム結合が認められた．ゲル面の偽足は対照群より明らかに少なく概して平面的に接着していた．接着面の細胞質にはヘミデスモゾーム様の高電子密度の裏打ち構造が認められ，そこにはしばしばマイクロフィラメントが集束していた．裏打ち構造に面して僅かに絮状物質が認められたが，これが基底膜とは判定できなかった．8 日目，14日目では癌細胞は多数のデスモゾーム結合をしていた．細胞質内には少量ではあるが明らかな張原線維とゲル面には不連続な基底膜をみた (図 7A) 不連続な基底膜を有する癌細胞に隣接する癌細胞は細長い細胞突起をゲル内に伸ばしていた (図 7A, B)．細胞突起の基部ではゲルに接する面にアクチンフィラメントの束状構造が注目された (図 7A, B)．また，癌細胞が伸ばす細胞突起の方向には必ず 3T3 細胞が随伴し，しばしば癌細胞と 3T3 細胞の突起が接していた (図7A)．さらに21日目までの培養でみると，対照群に比べ大部分の基底面の癌細胞は連続性の基底膜形成が見られた (図 8)．

**Ⅲ．基底膜成分の検討**

1．基底膜成分の沈着

ラミニン，Ⅳ形コラーゲンの基底膜成分の沈着を免疫組織学的に観察した．KB 細胞ではラミニンの沈着は対照群，実験群共に培養14日目まで認められなかった．Ⅳ形コラーゲンは培養 8 日目でゲル上に重層増殖する最下層の細胞と基質との境界部 (基底膜領域) に連続性をもった線状の沈着が見られた．なお，Ⅳ形コラーゲンは 4 %パラホルム固定で同定できず，メタカルン固定でのみ陽性に染色された．しかし対照群ではメタカルン固定標本においてもⅣ形コラーゲンは陰性であった．基質内へ包埋した 3T3 細胞にはラミニン，Ⅳ形コラーゲン共陰性であった．OSC-19 細胞ではラミニンとⅣ形コラーゲンは培養 8 日目にはゲル辺縁部で多層性癌細胞の基底膜領域に線状または不連続の沈着を認めたが，中心部ではこれらの沈着は見られなかった (図9A, B)．とくに癌細胞が，基質内へ侵入し，これに対応するような紡錘形の 3T3 細胞が近接している部位に一致して強陽性であった．対照群では何れの時期においても陽性所見

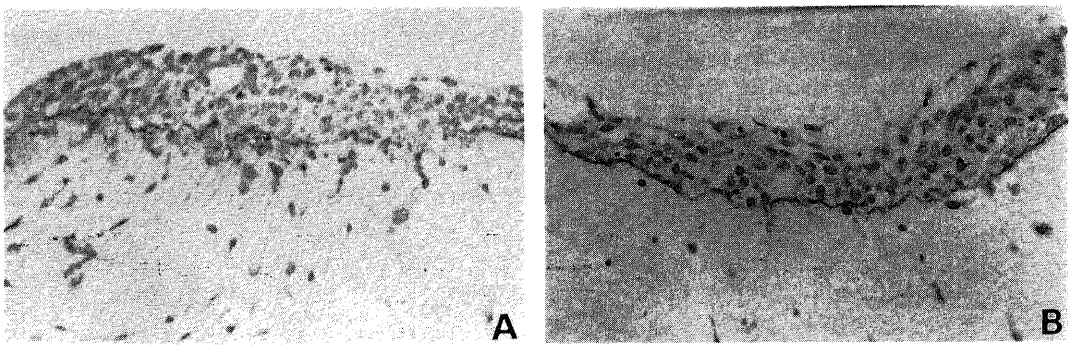


Fig. 9. Immunostaining for laminin (A) and type Ⅳ collgen (B) in OSC-19 cells 8 days in culture. Note discontinuity of basement membrane components, laminin and Ⅳ collagen, at the site of invasion. A, B×120.

Table 1. Summary immunostaining for basement membrane components

| | KB | | | | | | OSC-19 | | | | | | OSC-20 | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | CONT | | | +3T3 | | | CONT | | | +3T3 | | | CONT | | | +3T3 | | |
| | 4 | 8 | 14 | 4 | 8 | 14 | 4 | 8 | 14 | 4 | 8 | 14 | 4 | 8 | 14 | 4 | 8 | 14 |
| LAMININ | − | − | − | − | − | − | − | − | − | − | + | + | − | − | − | − | − | − |
| IV COLLAGEN | − | − | − | − | + | + | − | − | − | − | + | + | − | − | − | − | − | − |
| BM | − | − | − | − | − | − | − | − | − | − | − | + | − | − | − | − | − | − |

Abbreviations: KB, KB cells; OSC-19, OSC-19 cells; OSC-20, OSC-20 cells; CONT, control group; +3T3, 3T3 cell-supplemented experimental group; BM, basement membrane by electron microscopy. Numericals 4, 8 and 14 indicate days in culture. Symbols: −, negative; +, positive.

は認められなかった．OSC-20 細胞では対照群，実験群ともにラミニン，Ⅳ形コラーゲンの沈着を証明できなかった．上記免疫染色の結果ならびに電顕的に確認された基底膜形成の有無を表1にまとめて示した．

2．培養上清中の基底膜成分量

今回のアッセイ系における検出度と交叉反応を確認したところ，マウス由来のフィブロネクチンとⅣ型コラーゲンおよびウシ由来のフィブロネクチンは全く検出できなかった．マウス由来のラミニンはヒト由来のラミニンと同程度に反応した．検出限界はラミニンで 40ng，Ⅳ型コラーゲンで 5ng，フィブロネクチンで 1ng であった．各癌細胞が培養上清中に産生・分泌する基底膜成分の定量では，図10に示すように基底膜成分ごとに著しい相違が認められた．基底膜成分の定量結果を三元配置分散分析および二元配置分散分析後 Scheffe の多重比較法により検定した結果，以下の項目で有意差 ($p<0.05$) が認められた．ラミニン量は KB 細胞で最も多く，OSC-20 細胞で最も少なかった．フィブロネクチン量は OSC-19 細胞で最も多く，KB 細胞で最も少なかった．また，ラミニン，Ⅳ型コラーゲンはそれぞれ KB 細胞，OSC-19 細胞，OSC-20 細胞で対照群より実験群で多かった．

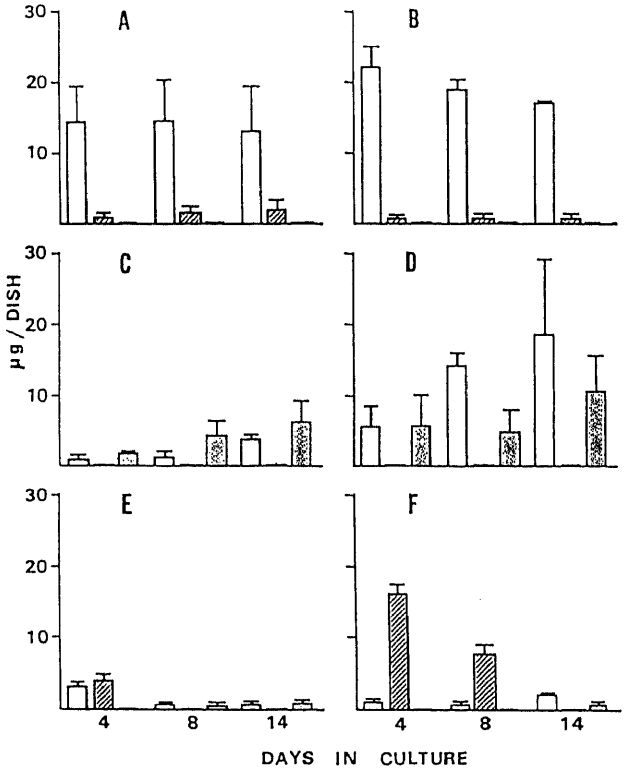


Fig. 10. Content of laminin (blank), type Ⅳ collgen (shaded) and fibronectin (dotted) in KB cells (A), KB+3T3 cells (B), OSC-19 cells (C), OSC-19+3T3 cells (D), OSC-20 cells (E) and OSC-20+3T3 cells (F) in conditioned culture media. Mean and standard deviation in triplicate.

Ⅳ．基質分解酵素の検討

1．培養上清中の基質分解酵素

ゼラチンサブストレートゲルのザイモグラフィーで培養上清に含まれる酵素を調べてみると，癌細胞の種類や，3T3 細胞の有無によって異なるバンドが見られた (図11)．3T3 細胞を含まない対照群の KB, OSC-19, OSC-20 細胞ならびに 3T3 細胞単独培養上清のすべてに 72kDa の位置にゼラチン分解活性が見られた．この 72kDa ゼラチン分解活性は全ての実験群で増強した．ザイモグラムで 95kDa の位置にゼラチン分解活性を示すバンドが OSC-19 と OSC-20 細胞の実験群で目立った．同一バンドは 3T3 細胞単独培養上清に明瞭にみられるのに対し，癌細胞単独培養では認められなかった．92kDa のバンドは KB, OSC-19, OSC-20 の対照群および実験群のすべてにおいて極く薄くみとめられた．この 92kDa のバンドは 3T3 細胞単独培養の場合には認められなかった．また，OSC-20 細胞では KB細胞や OSC-19 細胞では見られない MMP-1 (コラゲナーゼ) に相当する 50～55kDa の複数のバンドが見られた．

次にこれらの酵素活性を定量する目的で，MMP-1 と MMP-9 の総和と考えられるゼラチン分解活性と MMP-1 の活性と考えられるコラーゲン分解活性を定量した．その結果は図12に示す通りである．三元配置分散分析および二元配置分散分析後の Scheffe の多重比較法により有意差検定を行ってみると，ゼラチン分解活性は対照群では KB, OSC-19, OSC-20 の順

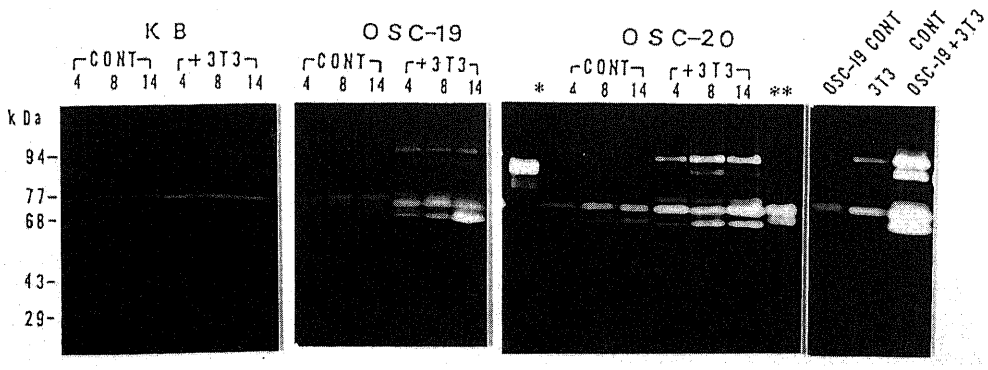


Fig. 11. Zymograms using gelatin substrate-acrylamide gel (8%) electrophoresis of conditioned culture media of KB, OSC-19 and OSC-20 cells with or without 3T3 cells in collagen gels. As a control conditioned media of 3T3 cells embedded in collgen gel without carcinoma cells are used. Numerals above (4, 8 and 14) indicate days in culture. A sample of lane * is 92kDa gelatinase as acontrol and a lane ** is 72kDa gelatinase. Bands of 72kDa are recognized in all samples, and those of 72kDa are much intenser in 3T3-supplemented groups (3T3) than in control groups (CONT) in KB, OSC-19 and OSC-20 cells. In experimental groups (+3T3) of OSC-19 and OSC-20 cells, gelatinolytic activity is shown at 95kDa, which is not recognizable in control groups (CONT) but in only 3T3 cells as a control (3T3 CONT). Faint bands of 92kDa are shown in all cells.

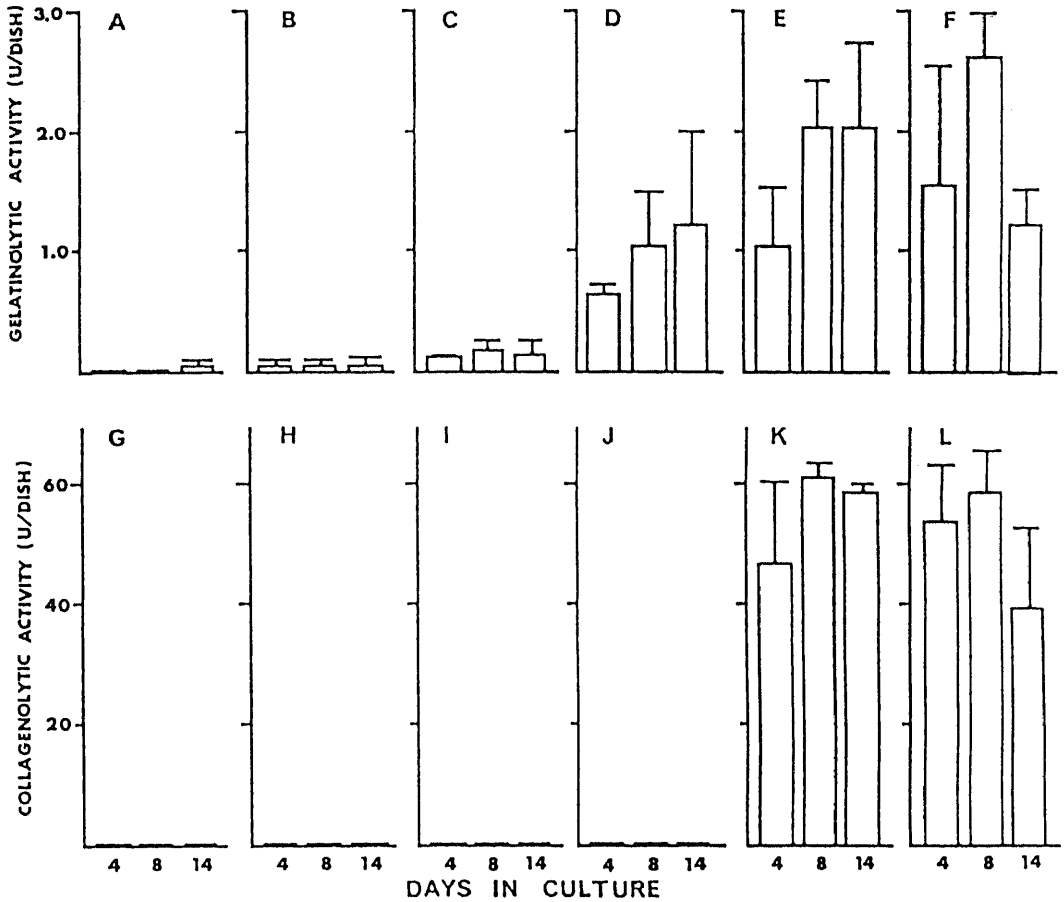


Fig. 12. Gelatinolytic activity and collagenolytic activity in conditioned culture media. A and G, KB cells; B and H, KB+3T3 cells; C and I, OSC-19 cells; D and J; OSC-19+3T3 cells; E and K, OSC-20 cells; F and L, OSC-20+3T3 cells.

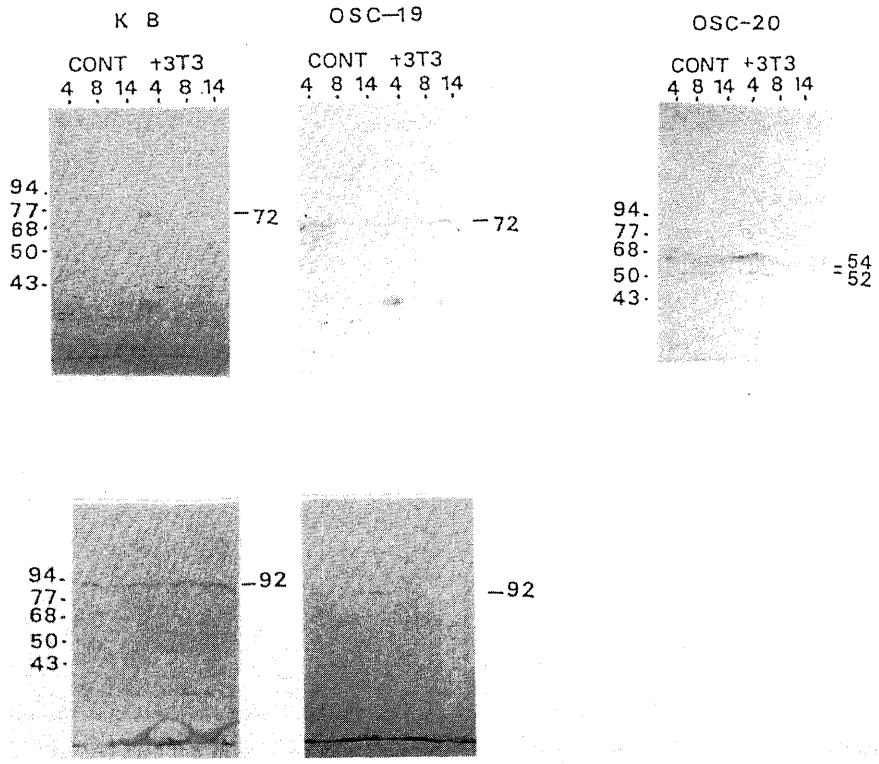


Fig. 13. Western blotting of conditioned media using anti-MMP-2 antibody for KB and OSC-19 cells, and anti-MMP-9 for KB and OSC-19 cells, and anti-MMP-1 antibody for OSC-20 cells. MMP-2 (72kDa) and MMP-9 (92kDa) are positive in KB and OSC-19 cells. MMP-1 (54-52kDa) is positive in OSC-20 cells.

番に有意に高かった ($p<0.05$). KB と OSC-19 細胞では対照群に比べて実験群の方が有意に高かった ($p<0.05$). コラーゲン分解活性は KB と OSC-19 細胞では見られず, OSC-20 細胞でのみ対照群でも実験群でも極めて大きい活性がみられた. とくに, ゼラチン分解活性と違って実験群と対照群の間に有意差がなかった.

各対照群および実験群の培養上清に含まれる基質分解酵素を同定するために 72kDa ゼラチナーゼ (MMP-2), コラゲナーゼ (MMP-1), および 92kDa ゼラチナーゼ (MMP-9) に対するモノクロナール抗体を用いてイムノブロットを行った. 図13に示すように MMP-2 と MMP-9 は KB と OSC-19 細胞に, MMP-1 は OSC-20 細胞に明瞭に認められた.

2. 基質分解酵素産生細胞

KB 細胞では MMP-2 陽性細胞が散見されたが, 陽性細胞に特定の局在は見られなかった. また対照群と実験群との間に差異はなかった (図14A). MMP-1, MMP-3 およびMMP-9 の陽性細胞は認められなかった.

OSC-19 細胞では MMP-9 の陽性細胞の局在が極めて特徴的であった. MMP-9 陽性細胞は少数ではあったが, ゲル面に接する癌細胞に陽性であり, とくに実験群でゲル内へ侵入している細胞およびその近傍細胞に陽性であったのが注目された (図14C, D). MMP-2 陽性細胞は MMP-9 陽性細胞に比べその数は多いが特定の局在傾向は見られなかった (図14 B). MMP-1, 3 の明らかな陽性細胞は観察されなかった.

OSC-20 細胞では対照群および実験群で MMP-1 および MMP-3 陽性細胞が多く認められた. 陽性細胞はゲルに接着する細胞に好発し, 特にゲルの溶解後に落ち込んだと思われる癌細胞塊の基底部で顕著であった (図14 E, F). MMP-2, 9 の陽性

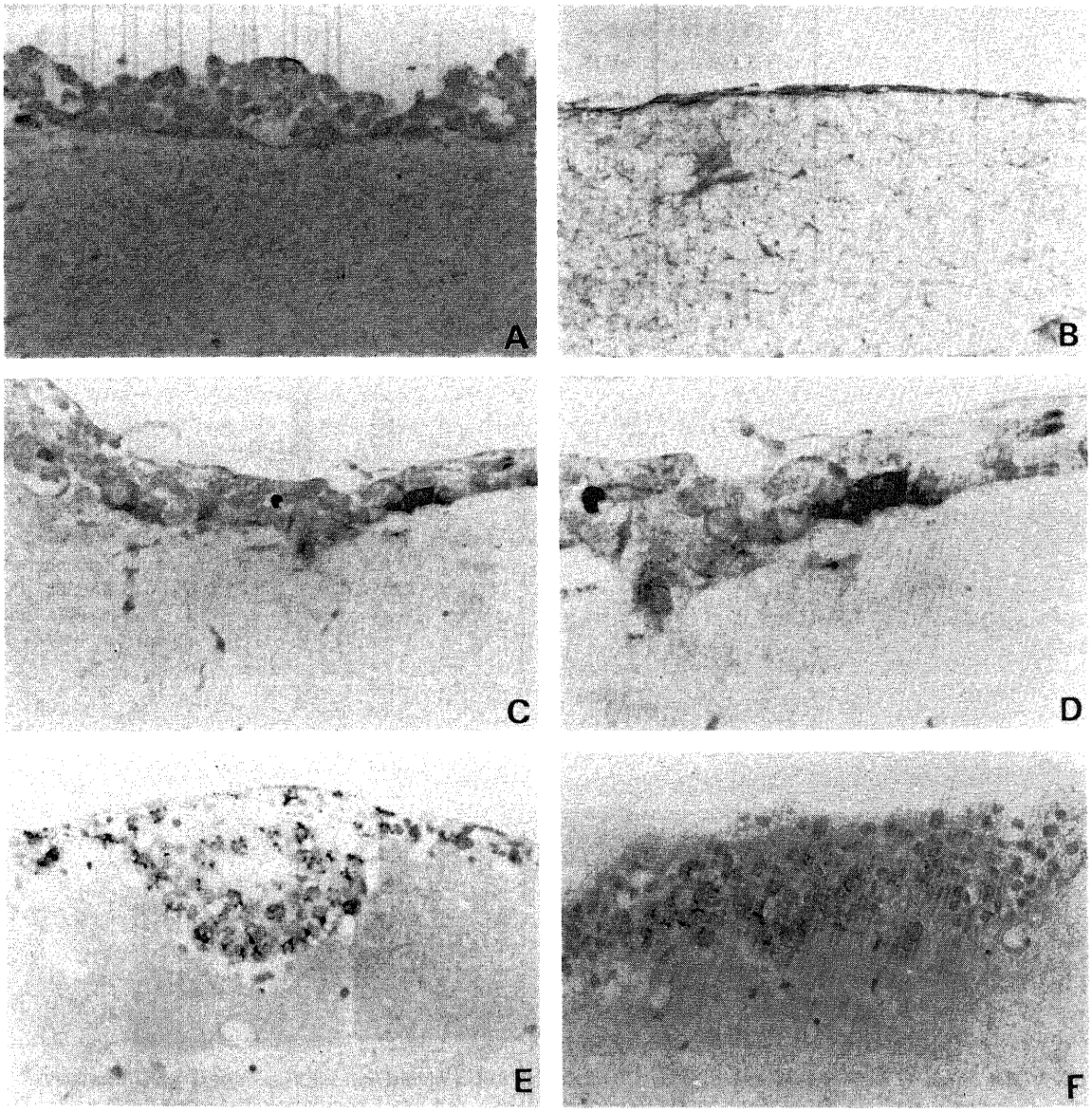


Fig. 14. Immunostaining for MMP-1, MMP-2 and MMP-9. MMP-2 is randomly positive in KB cells (A), and in OSC-19 cells (B). MMP-9 is positively stained in OSC-19 cells overlying the substrate (C, D). Distribution pattern of the positive cells for MMP-2 and MMP-9 is different. MMP-1 is positive in invading OSC-20 cells (E, F). A×240, B×120, C×240, D×480, E×240, F×240.

細胞は観察されなかった．

## 考　　察

癌細胞の浸潤モデルについては，これまで種々のモデルが考案されている[5)~10)]．このうち浸潤基質としてⅠ型コラーゲンを用いた癌浸潤モデルは基質が生体の成分であるという利点がある．すなわち一般的に癌細胞が浸潤する間質の主成分は間質の骨組みとして存在する線維性のⅠ型コラーゲンであるからである．Schor ら[8)]はコラーゲンゲル上に悪性黒色腫細胞を重層したところ悪性黒色腫細胞はコラーゲンゲル内へ侵入浸潤するのみならずその浸潤細胞数は対照として用いた線維芽細胞より多いと報告した．その後，松本[13)]は基質としてさらにコラーゲンゲル内にヒト線維芽細胞を包埋して癌細胞の浸潤能を観察した．その結果対照として用いたコラーゲンゲルのみの基質に比べ，癌細胞は細胞を封入した基質内へ早期に浸潤を開始することが分かった．このことは，癌細胞単独でもゲル内へ浸潤増殖することができるが，線維芽細胞の存在，おそらく線維芽細胞が産生する何らかの因子が癌細胞の浸潤能を高めることを示唆している．また，このモデルはコラーゲンゲルのみを用いたモデルよりも，より生体内の反応に近いのみならず，生体内で起こる癌細胞と線維芽細胞間との相互作用を解析し得る可能性を秘めている．今回著者はヒト線維芽細胞の代りにマウス胎児線維芽細胞由来である 3T3 細胞を用いて浸潤モデルを作成した．より生体内反応に近い条件としてヒト線維芽細胞を用いるべきかもしれないが，一定条件の線維芽細胞を常時調整することはかなり難しい．これに対して 3T3 細胞は半永久的に継代可能であり，継代を繰り返しても同じ細胞性格を有し，再現性のある実験や定量的実験に都合が良いと考えられたからである．実際には松本[13)]の実験に用いたヒト線維芽細胞の30倍量の 3T3 細胞をゲル内に組み込むことが必要であったが，少なくとも再現性があって培養21日まで癌細胞の浸潤形態を追跡し，順化培養液を分析しうるという点で有用なモデルと判定した．とくに OSC-19 細胞では 3T3 細胞を組み込むことで早期に浸潤を開始したので，この条件下で起る浸潤能に関連する動的変化を解析しうると考えられた．

今回解析に用いた三種の扁平上皮癌細胞株は分化形態，増殖能，間質反応およびコラーゲンゲルの基質への浸潤能という点でそれぞれ異なっていた．KB 細胞は低分化癌で，増殖活性は高く，間質反応が弱く，ゲルへの浸潤能が低い．これに対して OSC-19 細胞と OSC-20 細胞は分化型扁平上皮癌で増殖活性はむしろ低く，間質反応を伴い，ゲル内へ浸潤する性格を持っている癌細胞であった．OSC-19 細胞と OSC-20 細胞との差異はあとで考察するように，OSC-20 細胞が特にコラゲナーゼ (MMP-1) とストロムライシン (MMP-3) を大量に産生・分泌し，基質のコラーゲンを容易に溶かす性格を保有していた点である．そこでまず形態分化，細胞増殖，間質反応の有無という観点から，きわめて対照的な KB 細胞と OSC-19 細胞を比較して浸潤能について考察する．癌細胞の悪性形質として一般に，高い細胞増殖活性，細胞異型性すなわち未分化性，浸潤・転移性格があげられる．KB 細胞には前二者が備わっているにも拘らず，今回の浸潤モデルにおいて浸潤能はむしろ低かった．従って未分化で増殖活性が高い癌細胞は必ずしも高い浸潤能を保有しているわけではないかも知れない．事実 Nöel ら[26)]は悪性度の高い腫瘍細胞が再構成基底膜を通過できなかったと報告している．このことは浸潤・転移能はもっと別の細胞形態たとえば細胞接着能，細胞運動能，基質分解能などが複雑に組み合わされて発揮されて成立するものと考えることができよう．最近 Liotta ら[27)28)]は細胞礎質への癌細胞浸潤の機序として 3 段階説を提唱した．すなわち，a）細胞表面のレセプターを介する細胞外マトリックスへの接着，b）局所おける基質分解酵素によるその成分の分解，c）引き続いた腫瘍細胞の運動の各段階があるというものである．浸潤，転移に関与する因子としてフィブロネクチンとラミニンを代表とする接着性糖タンパクとそのレセプターは近年特に注目されている[29)]．本実験モデルにおいて細胞のコラーゲンゲル基質への接着能ということから KB 細胞と OSC-19 細胞のフィブロネクチンとラミニンの動態を注目してみると，KB 細胞はラミニンを産出・分泌し，OSC-19 細胞はフィブロネクチンを産出・分泌するという特徴があった．ラミニンはA鎖と B1, B2 鎖から成る 400kDa 巨大糖蛋白質で基底膜を構成するのみならず，細胞接着，上皮成長因子様ドメインをもって細胞増殖や細胞分化に深く関わる多機能糖蛋白である[30)31)]．一方，フィブロネクチンは$\alpha$鎖と$\beta$鎖からなる 2 量体の 450kDa の糖蛋白であり細胞やコラーゲンなどと接着能を有し，とくにレセプターを介して細胞の基質への接着に関与している[29)32)]．また，フィブロネクチンによって基質に接着した細胞は進展，運動能を獲得し，細胞移動を活発化させると言われている[32)]．本実験でみられるように，フィブロネクチンは基質への浸潤能を示す OSC-19 細胞でとくに産生・分泌されたことは扁平上皮癌細胞の浸潤性とこの接着性蛋白とは深い関係があると考えるべきであろう．しかしながら，免疫組織学的にヒト癌組織の癌浸潤先端部では間質のフィブロネクチンが消失すると報告されている[33)]．また，細胞膜上のフィブロネクンチンレセプターは浸潤癌で減弱，消失するとも報告されている[34)]．正常の表皮細胞はラミニンもフィブロネクチンも産生しうること[35)]などを考えると，分化型の OSC-19 細胞が産生するフィブロネクンチンはⅠ型コラーゲン基質に接着し，癌細胞の浸潤，移動を容易にさせるように補佐していると考えられる．

本浸潤モデルにおいて OSC-19＋3T3 細胞実験群においてのみラミニン，Ⅳ型コラーゲンの沈着と基底膜の形成をみた．Ⅳ型コラーゲンは浸潤の際の障壁[30)]となると思われるのに，浸潤能を示す OSC-19 細胞のみに基底膜が部分的にせよ形成されるのはどのように説明すべきであろうか．腫瘍における基底膜の有無に関しては，Barsky ら[36)]は乳腺や表皮の良性上皮性腫瘍や上皮内癌では基底膜は連続性に保たれているが，浸潤癌では基底膜が消失すると報告している．一方，Gusterson ら[37)]は浸潤性の扁平上皮癌細胞にも連続性の基底膜が保持されていることを示し，基底膜の有無は浸潤性と直接の関係はないと推定している．しかしながら，一般的には大腸癌[38)39)]，子宮内膜癌[40)]，肺扁平上皮癌[41)]，口腔扁平上皮癌[42)]等の浸潤癌のうち低分化癌には基底膜が断裂または消失すると言われている．また，Dingenans ら[41)]は大型の腫瘍細胞塊周囲のみならず極めて小さい集団や，さらには孤立性の腫瘍細胞にさえも基底膜は形成されるが，この現象は，むしろ浸潤における一時的な浸潤休止状態と説明している．すなわち，癌細胞は浸潤の途中で一旦，浸潤休止状態となりその時点で基底膜を形成するようになるというものである．本実験モデルにおいては OSC-19＋3T3 細胞群において 8 日目より基底膜成分であるラミニンおよびⅣ型コラーゲンを基底膜領域に沈着し，電顕的にも14日目に断続的基

底膜の形成を確認した．浸潤能を示す OSC-19 細胞において基底膜成分を沈着，形成するのは OSC-19 細胞が持つ固有の性質なのかも知れない．KB 細胞はラミニンもⅣ型コラーゲンも産生・分泌しているにも拘らず基底膜領域には沈着しないこと，また OSC-19 細胞では培養上清にⅣ型コラーゲンを分泌せず，直ちに沈着してしまうと思われるからである．さらに，電顕的ならびに免疫組織学的には浸潤先端部には基底膜は陰性であることも上記の考えを支持している．

本浸潤モデルの最大の特徴は培養上清における各種成分の測定と基質との接着，浸潤を同時に観察できることである．このうち Liotta ら[27)28)]の提唱している浸潤の第二段階である基質蛋白分解酵素 (MMP) の分泌・活性化について，ザイモグラフィー，ゼラチンおよびコラーゲン分解活性の定量，イムノブロットによる同定を経時的に三種の癌細胞株について行った．その結果，MMP-2 (72kDa ゼラチナーゼ) は KB 細胞，OSC-19 細胞，OSC-20 細胞ならびに 3T3 細胞から産生・分泌されていること．MMP-1 (コラゲナーゼ) と MMP-3 (ストロモライシン) は OSC-20 細胞がとくに産生・分泌していること，MMP-9 (92kDa ゼラチナーゼ) は KB 細胞，OSC-19 細胞，おそらく OSC-20 細胞が産生・分泌していること，95kDa ゼラチナーゼは 3T3 細胞単独培養と実験群に同定されることから 3T3 細胞由来であることが分かった．Liotta ら[27)28)]は浸潤・転移に血管などの基底膜を破壊するⅣ型コラゲナーゼの重要性を指摘しているが，この酵素は現在では MMP-2 (72kDa ゼラチナーゼ), MMP-3 (ストロムライシン), MMP-9 (92kDa ゼラチナーゼ) の総称である．このうち癌細胞が産生・分泌するⅣ型コラゲナーゼとして知られているのが MMP-2 と MMP-9 である[43)]．とくに MMP-9 は ras-オンコジーンを導入した 3T3 細胞で MMP-9 を発現し[44)]，高転移性株では低転移性株よりその産生量が多い[45)46)]ということで最も浸潤，転移に関係するとされている．著者のゼラチンサブストレートゲルを用いたザイモグラムからは 92kDa ゼラチナーゼよりも 72kDa ゼラチナーゼの方が量的には多かったが，免疫染色で確認されたように 72kDa ゼラチナーゼ陽性癌細胞はびまん性分布を示すのに対して，92kDa ゼラチナーゼは浸潤部付近の癌細胞で発現することが分かった．このことは，72kDa ゼラチナーゼより 92kDa ゼラチナーゼが浸潤局所で働くという可能性を示唆している．それぞれの MMP の基質特異性をみてみると，MMP-2 はゼラチンやⅣ型コラーゲンの他にⅤ型コラーゲン，フィブロネクチンを分解する[43)]．MMP-9 はゼラチンやⅣ型コラーゲンに加えて線維性コラーゲンの主体となるⅠ，Ⅳ型コラーゲンを分解することが最近報告された[43)47)]．とくに，最近，仲[47)]は MMP-9 は $\alpha$ 2 鎖のテロペプチドを分解すると報告している．テロペプチドを切断されたコラーゲンは37℃でゼラチンに変性するので[48)]，この酵素がもつゼラチン分解活性でさらに低分子のフラグメントに分解すると推測している[47)]．従って MMP-9 は MMP-1 ほどのコラーゲン分解活性は示さないが，本実験の基質であるⅠ型コラーゲンを分解できると思われる．

OSC-20 細胞群ではゼラチン分解活性のみならずコラーゲン分解活性がきわめて高かった．基質としてのⅠ型コラーゲンは対照群において早期に溶解し，重層する癌細胞を減少させてやっと観察を続けた程である．既に述べてきたようにこの OSC-20 細胞は MMP-1 (コラゲナーゼ) を大量に産生・分泌するきわめて特異な細胞株であった．とくに基質内に落込んだ癌細胞集団の基質面に接して MMP-1 陽性癌細胞が多く，このコラゲナーゼが基質分解おそらくは浸潤に関与していると十分推定しうるものであった．MMP-1 は主に線維性のⅠ，Ⅱ，Ⅲ型コラーゲンを分解し，炎症時には好中球などの炎症細胞や線維芽細胞から分泌され，組織破壊や組織の修復に大きな役割を果たしている[43)]．癌浸潤の場合においてもコラゲナーゼは何らかの役割を果たしていると漠然と言われてきたが[49)]，最近ある種の癌細胞株で MMP-1 (コラゲナーゼ) を産生・分泌すると報告されており[50)51)]．コラーゲン分解活性は KB 細胞にも OSC-19 細胞にもほとんど検出されず，OSC-20 細胞の対照および実験群にのみ認められることや，その活性は対照群と実験群の間に有意差がないことなどから，OSC-20 細胞株は MMP-1 を産生する特異な細胞株と思われる．

OSC-19 細胞や OSC-20 細胞が基質へ浸潤している場合には組込まれた 3T3 細胞が近接し，紡錘形の形態をとっていることが注目された．3T3 細胞を組込むことにより早期に癌細胞は浸潤を開始することや 3T3 細胞の形態変化，さらに本研究で示されたフィブロネクチンの産生増加や，ゼラチン分解活性の増強，72kDa ゼラチナーゼや 92kDa ゼラチナーゼの上昇は癌細胞が 3T3 細胞から何らかのメッセージをうけて活性化されることを示すものと思われる．3T3 細胞においても 95kDa ゼラチナーゼの分泌を癌細胞と共存して増加させること等，癌細胞と間質細胞との間に密接な相互関係があるものと推定されるが，これらの解明については今後の課題であろう．

## 結　　論

扁平上皮癌の浸潤能を解析するために，実験的癌細胞浸潤モデルを開発し，KB 細胞，OSC-19 細胞，OSC-20 細胞の基質への侵入に伴う動的変化を追跡し，以下の結論を得た．

1．三種の癌細胞株の性状について，増殖能の検定とヌードマウスへの移植実験で確認すると，KB 細胞は低分化型で増殖活性が高く低浸潤性，OSC-19 と OSC-20 細胞は分化型で増殖活性は低いが浸潤能は高いという特徴を示した．

2．3T3 細胞を組込んだⅠ型コラーゲンゲル基質に三種の口腔扁平上皮癌由来細胞株を重層培養すると，OSC-19 細胞と OSC-20 細胞は早期に基質内へ浸潤したが，KB 細胞およびコラーゲンゲルのみの基質上の OSC-19 細胞は低い浸潤性を示した．OSC-20 細胞はコラーゲンゲルをきわめて早期に溶解する細胞株であった．

3．OSC-19 細胞の浸潤部ではしばしば癌細胞と線維芽細胞との近接像が認められた．同部位で線維芽細胞は紡錘形を呈することおよび癌細胞の細胞突起には基底膜が欠損し，Ⅳ型コラーゲンやラミニンの沈着は陰性であった．

4．培養上清にはラミニン，Ⅳ型コラーゲン，フィブロネクチンを検出することができた．このうちとくに KB 細胞はラミニンを OSC-19 細胞はフィブロネクチンを産生・分泌した．ラミニン，Ⅳ型コラーゲン値は 3T3 細胞を組込むことにより上昇した．また免疫組織学的に OSC-19 細胞により明瞭にラミニン，Ⅳ型コラーゲンの沈着と電顕的に基底膜の形成をみた．

5．ゼラチンサブストレートゲル電気泳動とイムノブロットで培養上清の基質分解酵素を検討した結果，三種の癌細胞は 72kDa ゼラチナーゼ (MMP-2), 92kDa ゼラチナーゼ (MMP-9) を，OSC-20 細胞はコラゲナーゼ (MMP-1) を産生・分泌し，95kDa ゼラチナーゼは 3T3 細胞が産生していることが分かっ

た．さらにこれらの酵素は 3T3 細胞および癌細胞との共存で増強した．

6．ゼラチン分解活性 (MMP-2 と MMP-9 の和) とコラーゲン分解活性 (MMP-1) をみると 3T3 細胞を組み込むことによって OSC-19 と OSC-20 細胞のゼラチン分解活性が上昇した．コラーゲン分解活性は OSC-20 細胞で常時高値であった．癌細胞の MMP-2 の免疫局在は散在性，MMP-9 のそれは浸潤部の細胞に認められた．

以上，本実験モデルにおいては，扁平上皮癌の浸潤能に最も深く関与する因子は基質への接着を高めるフィブロネクチンと基質分解に寄与する MMP-9 または MMP-1 であることが強く示唆される．これらは 3T3 細胞との共存で増強されることから癌細胞と間質細胞との相互関係で修飾されているものと推定される．

## 謝　　辞

稿を終えるにあたり，御指導，御校閲を賜った金沢大学歯科口腔外科学教室山本悦秀教授，金沢大学第一病理学教室中西功夫教授に深甚の謝意を捧げます．本研究の遂行にあたり，直接御指導，御協力いただきました第一病理学教室河原栄講師に心より深謝いたします．細胞株を供与頂いた札幌医科大学口腔外科学教室の小浜源郁教授，横井敏一博士に深謝いたします．また御支援いただいた金沢大学医療技術短期大学部の岡田保典助教授ならびに金沢大学歯科口腔外科学教室熊谷茂宏講師に深謝いたします．さらに，統計学的検討について御教示頂いた金沢大学衛生学教室の橋本和夫教授に感謝いたします．

最後に御助言，御協力をいただきました金沢大学歯科口腔外科学教室および金沢大学第一病理学教室各位に厚く御礼申しあげます．本論文の要旨は第36回日本口腔外科学会総会 (1991年，大阪) において発表した．

## 文　　献

1) **Yamamoto, E., Kohama, G., Sunakawa, H., Iwai, M. & Hiratsuka, H.**: Mode of invasion, bleomysin sensitivity, and clinical course in squamous cell carcinoma of the oral cavity. Cancer, **51**, 124-129 (1983).

2) **Yamamoto, E., Miyakawa, A. & Kohama, G.**: Mode of invasion and lymph node metastasis in squamous cell carcinoma of the oral cavity. Head Neck, **6**, 938-947 (1984).

3) **Jacobsson, P. A., Eneroth, G. M., Killander, D., Moeberger, G. & Martensson, B.**: A histologic classification and grading of malignancy in carcinoma of the larynx. Acta Radiol., **12**, 1-8 (1973).

4) **Easty, G. C., Haemmerli, G., Easty, D. M. & Starauli, P.**: Interaction between normal epethelial and squamous carcinoma cells in monolayer culture. Cancer Res., **42**, 4248-4255 (1982).

5) **Armstrong, P. B., Quigley, J. P. & Sidebottom, E.**: Transepithelial invasion and intramesenchymal infiltration of the chick embryo chorioallantois by tumor cell lines. Cancer Res., **42**, 1826-1837 (1982).

6) **Ossowski, L.**: In vivo invasion of modified chorioallantoic membrane by tumor cells: the role of cell surface-bound urokinase. J. Cell. Biol., **107**, 2437-2445 (1988).

7) **Mareel, M., Kint, J. & Meyvisch, C.**: Methods of study of the invasion of malignant C3H-mouse fibroblasts into embryonic chick heart in vitro. Virchows Arch. B Cell Pathol., **30**, 95-111 (1979).

8) **Schor, S. L., Schor, A. M., Winn, B. & Rushton, G.**: The use of three-dimensional collagen gels for the study of tummor cell invasion in vitro: Experimental parameters influencing cell migration into the gel matrix. Int. J. Cancer, **29**, 57-62 (1982).

9) **Kramer, R. H., Bensch, K. G. & Wong, J.**: Invasion of reconstituted basement membrane matrix by matastatic human tumor cells. Cancer Res., **46**, 1980-1986 (1986).

10) **Albini, A., Iwamato, Y., Kleinman, H. K., Martin, G. R., Aaronson, S. A., Kozlowski, J. M. & McEwan, R. N.**: A rapid in vitro assay for quantitating the invasive potential of tumor cells. Cancer Res., **47**, 3239-3245 (1987).

11) **Fusenig, N. E., Breitkreutz, D., Dzarlieva, R. T., Boukamp, P., Bohnert, A. & Tilgen, W.**: Growth and differentiation characteristics of transformed keratinocytes from mouse and humann skin in vitro and in vivo. J. Invest. Dermatol., **81**, 168-175 (1983).

12) **Boukamp, P., Rupniak, H. T. R. & Fusenig, N. E.**: Environment modulation of the expression of differentiation and malignancy in six human squamous cell carcinoma cell lines. Cancer Res., **45**, 5582-5592 (1985).

13) **松本堅太郎**：口腔扁平上皮癌細胞の浸潤モデル実験系に関する研究．日口外誌，**35**, 870-883 (1989).

14) **Eagle, H.**: Propagation in a fluid medium of a human epidermoid carcinoma, strain KB. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **89**, 362-364 (1955).

15) **Yokoi, T., Yamaguchi, A., Odajima, T. & Furukawa, K.**: Establishment and characterization of a human cell line derived from a squamous cell carcinoma of the tongue. Tumor Res., **23**, 43-57 (1988).

16) **Yokoi, T., Homma, H. & Odajima, T.**: Establishment and characterization of OSC-19 Cell line in serum-and protein-free culture. Tumor Res., **24**, 1-17 (1988).

17) **Yokoi, T., Hirata, S., Nishimura, F., Miyakawa, A., Odajima, T., Kohama, G. & Mochizuki, Y.**: Some propertied of a newly established human cell line derived from a oral squamous carcinoma. Tumor Res., **25**, 93-103 (1990).

18) **Wren, F. E., Schor, A. M., Schor, S. L. & Grant, M. E.**: Modulation of smooth muscle cell behavior by platelet-derived factors and the extracellular matrix. J. Cell. physiol., **127**, 297-302 (1986).

19) **Garcia, R. L., Coltrera, M. D. & Gown, A. M.**: Analysis proliferative grade using anti-PCNA/cyclin monoclonal antibodies in fixpd, embedded tissues. Comparison with flow cytometric analysis. Am. J. Pathol., **134**, 733-739 (1989).

20) **Murad, S., Tajima, S., Jonson, G. R., Sivarajah, A. & Pinnell, S. R.**: Collagen synthesis in cultured human skin fibroblasts: Effect of ascorbic acid and its analogs. J. Invest. Dermatol., **81**, 158-162 (1983).

21) **Kawahara, E., Shiroo, M. Nakanishi. I. & Migita, S.**: The role of fibronectin in the development of experimental amyloidosis. Am. J. Pathol., **134**, 1305-1314 (1989).

22) **Ueda, Y. & Nakanishi, I.**: Immunohistochemical and

biochemical studies on the collagenous proteins of hmman osteosarcomas. Virchows Arch. B Cell Pathol., **58**, 79-88 (1989).

23) **Hibbs, M. S., Hasty, K. A., Seyer, J. M., Kang, A. H. & Mainardi, C. L.**: Biochemical and immunological characterization of the secreted forms of human neutrophil gelatinase. J. Biol. Chem., **260**, 2493-2500 (1985).

24) **Gawston, T. E. & Barrett, A. J.**: A rapid and reproducible assay for collagenase using [1-$^{14}$C] acetylated collagen. Anal. Biochem., **99**, 340-345 (1979).

25) **Harris, E. D. & Krane, S. M.**: An endopeptidase from rheumatoid synovial tissue culture. Biochem. Biophys. Acta, **258**, 566-576 (1972).

26) **Nöel, A. C., Callē, A., Emonard, H. P., Nusgens, B. V., Simar, N. L., Foidart, J., Lapiere, C. M. & Foidart, J. M.**: Invasion of reconstitute basement membrane matrix is not correlated to the malignant ,metastatic cell phenotype. Cancer Res., **51**, 405-414 (1991).

27) **Liotta, L. A., Rao, C. N. & Barsky, S. H.**: Tumor invasion and the extracellular matrix. Lab. Invest., **49**, 636-649 (1983).

28) **Liotta, L. A.**: Tumor invasion and metastases-Role of extracellular matrix: Rhoads memorial award lecture. Cancer Res., **46**, 1-7 (1986).

29) **Hynes, R. O.**: Integrins: A family of cell surface receptors. Cell, **48**, 549-554 (1987).

30) **Timpl, R.**: Structure and biological activity of basement membrane proteins. Eur. J. Biochem., **180**, 487-502 (1989).

31) **林 利彦**：ラミニン．生体の科学，**39**, 275-279 (1988).

32) **林 正男**：フィブロネクチンと細胞，発生，神経，蛋白質・核酸・酵素，**29**, 1964-1980 (1984).

33) **D'Ardenne, A. J. & Barnard, N. J.**: Paucity of fibronectin in invasive lobular carcinoma of breast. J. Pathol., **157**, 219-224 (1989).

34) **Peltonen, J., Larjava, H., Jaakkola, S., Gralnick, H., Akiyama, S. K., Yamada, S. S. Yamada, K. M. & Uitto, J.**: Localization of integrin receptors for fibronectin. collagen, and laminin in human skin. J. Clin. Invest., **84**, 1916-1923 (1989).

35) **Clark, R. A. F., Nielsen, L. D., Howell, S. E. & Folkvord, J. M.**: Human keratinocytes that have not terminally differentiated synthesize laminin and fibronectin but deposit only fibronectin in the pericellular matrix. *In* A. H. Reddi (ed.), Extracellular Matrix: Structure and Function, 1st ed., p247-261, Alan R. Liss, Inc., New York, 1985.

36) **Barsky, S. H., Siegal, G. P., Jannotta, F. & Liotta, L. A.**: Loss of basement membrane components by invasive tumors but not by their benign counterparts. Lab. Invest., **49**, 140-147 (1983).

37) **Gusterson, B. A., Warburton, M. J., Mitchell, D., Kraft, N. & Hancock, W. W.**: Invading squamous cell carcinoma can retain a basal lamina. Lab. Invest., **51**, 82-87 (1984).

38) **Forster, S. J., Talbot, I. C. & Critchley, D. R.**: Laminin and fibronectin in rectal adenocarcinoma: Relationship to tumor grade, stage and metastasis. Br. J. Cancer, **50**, 51-61 (1984).

39) **Forster, S. J., Talbot, I. C. Clayton, D. G. & Critchley, D. R.**: Tumor basement membrane laminin in adenocarcinoma of rectum: An immunohistochemical study of biological and clinical significance. Int. J. Cancer, **37**, 813-817 (1986).

40) **Stenbäck, F., Risteli, J., Risteli, L. & Wasenius, V. M.**: Basement membrane laminin and type Ⅳ collagen in endometrial adenocarcinoma: Relation to differentiation and treatment. Oncology, **42**, 370-376 (1985).

41) **Dingenans, K. P.**: What's new in the ultrastructure of tumor invasion in vivo ? Pathol. Res. Pract., **183**, 792-808 (1988).

42) **熊谷茂宏，児島伸也，加藤隆三，藤元栄輔，中川清昌，山本悦秀，河原 栄，中西功夫**：口腔粘膜癌の基底膜に関する免疫病理組織学的検討．癌の臨床，**37**, 25-32 (1991).

43) **Woessner, J. F.**: Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. FASEB. J., **5**, 2145-2154 (1991).

44) **Ballin, M., Gromez, D. E., Shiha, C. C. & Thorgeirsson, V. P.**: Ras oncogene mediated induction of a 92kDa metalloproteinase; Strong correlation with the malignant phenotype. Biochem. Biophys. Res. Commun., **154**, 832-838 (1988).

45) **Nakajima, M., Morikawa, K., Febra, A., Brcane, C. D. & Fidler, I. J.**: Influence of organ environmental on extra cellular matrix degradative and metastasis of human colon carcinoma cells. J. Natl. Cancer Inst., **82**, 1890-1898 (1990).

46) **Kimura, Y., Hashimoto, N., Higashi, T., Watanabe, A. & Tsuji, T.**: Elevation of serum type Ⅳ collagen-degrading enzyme in hepatocellular carcinoma with metastasis. Clin. Biochem., **23**, 135-138 (1990).

47) **仲 克巳**：骨吸収における matrix metalloproteinase 9 (92kDa ゼラチナーゼ/Ⅳ型コラゲナーゼ)．その性質と破骨細胞での局在に関する研究．十全医会誌，**100**, 948-961 (1991).

48) **Maciewicz, R. A. & Etherington, D. J.**: A comparison of four cathepsin (B, L, N and S) with collagenolytic activity from rabbit spleen. Biochem. J., **256**, 433-440 (1988).

49) **中島元夫，& Nicolson, G. L.**：メタロプロティナーゼと癌転移．実験医学，**7**, 542-550 (1989).

50) **Moll, U. M., Lane, B., Zucker, S., Suzuki, K. & Nagase, H.**: Localization of collagenase at the basal plasma membrane of a human pancreatic carcinoma cell line. Canceer Res., **50**, 6995-7002 (1990).

51) **He, C., Wilhelm, S. M., Pentland, A. P., Marmer, B. L., Grant, G. A., Eisen, A. Z. & Goldberg, G. I.**: Tissue cooperation in a proteolytic cascade activating human interstitial collagenase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **86**, 2632-2636 (1989).

**Experimental Study of Invasive Activity of Oral Squamous Cell Carcinoma**

Shinya Kojima, Department of Oral Surgery, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920

—J. Juzen Med Soc., **101**, 266—281 (1992)

**Key words** oral squamous cell carcinoma, invasion model, basement membrane, matrix metalloproteinase

**Abstract**

A new invasion model was devised in order to elucidate an invasion mechanism of oral squamous cell carcinoma. Three kinds of oral squamous cell carcinoma cell lines (KB, poorly differentiated type; OSC-19, well differentiated type; OSC-20, moderately differentiated type), whose characters were examined in transplants in nude mice, were cultured on collagen gel in which Swiss 3T3 cells derived from a mouse fetal fibroblast were embedded, and morphological and biochemical changes of invading carcinoma cells were investigated. OSC-19 and OSC-20 cells readily invaded 3T3 cell-embedded collagen gels, , as compared with control groups without 3T3 cells or KB. Invasive OSC-19 and OSC-20 cells were characterized by lower proliferating activity, lower production of laminin than KB cells, much higher secretion of fibronectin deposition of basement membrane components (laminin and type Ⅳ collagen), and basement membrane formation by electron micrography. At an invasion front, however, immunohistochemical type Ⅳ collagen and laminin, and the basement membrane disappeared. As to matrix metalloproteinase (MMP), zymography using gelatin substrate gel showed several bands of 72kDa, 92kDa, 95kDa and 50-55kDa. By western blotting, 72kDa gelatinase (MMP-2), 92kDa gelatinase (MMP-9), collagenase (MMP-1) were detected. These enzymes were enhanced by a supplement of 3T3 cells or cancer cells. Gelatinolytic activity and collagenolytic activity were assayed, and the former was detected in OSC-19 and OSC-20 cells and the latter was found in OSC-20 cells. By immunohistochemical analysis, MMP-2-positive cells were scattered in all cell lines with no preferential localization, and it was noted that the positivity for MMP-9 was localized in invading OSC-19 cells and their adjacent cells. MMP-1 was positive in invading OSC-20 cells. These results strongly suggest that the invasive activity of squamous cell carcinomas is well-correlated with cell-matrix adhesion by fibronectin and with degradation of the matrix by metallopoteinase, especially MMP-9 and MMP-1.