

## トロフォブラストの浸潤に関するメカニズムの解析

東京医科大学産科婦人科学教室

弓立 環 井坂 恵一 小杉 好紀 興石 真  
白石 賢也 保坂 真 高山 雅臣

## Analysis of the Mechanism of Trophoblast Infiltration

Tamaki YUDATE, Keiichi ISAKA, Yoshinori KOSUGI, Makoto KOSHIISHI,

Kenya SHIRAISHI, Makoto HOSAKA and Masaomi TAKAYAMA

*Department of Obstetrics and Gynecology, Tokyo Medical College, Tokyo*

**概要** 正常初期絨毛において cytotrophoblast (以下 CT と略す) は間質組織に浸潤していわゆる extravillous trophoblast (以下 EVT と略す) という形態をとる。しかし、そのメカニズムは癌細胞の浸潤とは異なり厳密に管理されていると考えられるが詳細は明らかではない。そこで、トロフォブラストの浸潤に関するメカニズムを解明するために、癌の浸潤、転移に深く関与している matrix metalloproteinase 2, matrix metalloproteinase 9 (以下 MMP2, MMP9 と略す) の発現とこれら MMPs の発現を調節し上皮細胞に対して増殖抑制作用を示す Transforming growth factor  $\beta$ 1 (以下 TGF $\beta$ 1 と略す) に対する反応性を、正常妊娠 6 週絨毛由来 CT (以下初期 CT と略す)、正常妊娠 37 週絨毛由来 CT (以下満期 CT と略す) と choriocarcinoma cell line BeWo (以下 BeWo と略す) を用いて検討した。それぞれの細胞がもつ in vitro での増殖能や浸潤能を、northern blotting 法, gelatin zymography 法, および invasion assay 法を用いて解析した。

初期 CT は、満期 CT に比べ高い浸潤能を有していた。この初期 CT の浸潤能は BeWo と同じ程度であった。初期 CT は MMP2 と MMP9 の発現を認めたが、満期 CT では MMP9 のみの発現しか観察されなかった。また MMP2 を活性化する membrane type matrix metalloproteinase (以下 MT-MMP と略す) の発現が子宮間質由来細胞に認められた。このことは初期 CT が間質細胞と接触することにより MMP2 の活性化がおこり浸潤を促進すると考えられる。これらのことにより、in vivo や in vitro での浸潤能の違いは MMP2 が関与している可能性が示唆された。

BeWo では TGF $\beta$ 1 のもつ増殖抑制作用に非感受性であり増殖が抑制されず、初期 CT では TGF $\beta$ 1 のもつ増殖抑制作用に感受性が認められ増殖の抑制が観察された。

初期 CT では、TGF $\beta$ 1 を添加すると MMP2 や MMP9 の増加が観察された。そしてこの反応性は BeWo でも同様であった。

したがって初期 CT が浸潤し EVT となる機構には、MMP2 による細胞の運動能の亢進や TGF $\beta$ 1 による MMP2, MMP9 の増加が関係しているが、癌細胞のように増殖しないのは、TGF $\beta$ 1 による増殖抑制作用を優位に受けることが関与していると推測された。

**Synopsis** A cytotrophoblast (CT) infiltrates into the stroma, forming an extravillous trophoblast (EVT) in the placenta early in gestation and the phenomenon is strictly controlled, differing from the infiltration of cancer cells. The expression of matrix metalloproteinase 2 (MMP2) and matrix metalloproteinase 9 (MMP9), which deeply involve infiltrative metastasis of cancer, and the reactivity to transforming growth factor beta1 (TGF $\beta$ 1), which controls the expression of these MMPs and inhibits the growth of epithelial cells, were investigated in CT derived from villi at normal gestational week 6 (early CT) and CT derived from villi at normal gestational week 37 (full-term CT), and also the choriocarcinoma cell line BeWo (BeWo).

The ability of normal epithelial cells and BeWo cells to proliferate and infiltrate were evaluated in vitro by northern blotting, gelatin zymography, and invasion assay. It was revealed that early CT had a higher capacity for infiltration than full-term CT as well as BeWo. MMP2 and MMP9

appeared in the early CT, whereas only MMP9 was observed in the full-term CT. MMP2 and MMP9 were more abundantly observed in the early CT and the full-term CT rather than in BeWo. In uterine stroma-derived cells, membrane type matrix metalloproteinase (MT-MMP), which activates MMP2, was observed.

These results indicated that the motility of normal villous cells was higher in the early CT than in the full-term CT. The expression of MMP2 in the early CT, which was not observed in the full-term CT, was thought to be related to this difference in motility. As for the responsiveness to TGF $\beta$ 1, which is a growth inhibiting factor for epithelial cells, the villous carcinoma cell line was insensitive to the growth inhibiting effect of TGF $\beta$ 1, but the early CT was sensitive to this effect. When TGF $\beta$ 1 was added, MMP2 and MMP9 increased in the early CT. This response was also seen in BeWo. That is, it was assured that the growth capacity was not inhibited in BeWo, but was certainly inhibited in the early CT. The overall results of these evaluations indicated that the development to EVT by infiltration of the early CT was associated with the increase in the mobility of cells caused by MMP2 and the increase in amounts of MMP2 and MMP9 caused by TGF $\beta$ 1, and the predominant inhibitory effect of TGF $\beta$ 1 on the growth of normal epithelial cells could explain why normal epithelial cells do not grow as cancer cells do.

**Key words:** Cytotrophoblast • Choriocarcinoma cell line • Transforming growth factor  $\beta$ 1 • Matrix metalloproteinase 2 • Matrix metalloproteinase 9

## 緒 言

癌細胞が間質組織に浸潤するように、妊娠初期絨毛は正常細胞であるにもかかわらず子宮内膜や間質、および子宮筋層に浸潤しいわゆる EVT と いわれる形態をとる。ただその浸潤機構のメカニズムは癌細胞とは異なり、ある一定のレベルを超えないように厳重な管理下におかれていると考えられている。癌細胞の浸潤転移には、細胞外基質を破壊し進んでいくような細胞の運動性や細胞の接着性を調節する因子、また細胞自体の増殖能を亢進させる多くの因子が複雑に関与していると考えられる。そこで正常細胞がどのような機構で浸潤するのか、そしてなぜ癌細胞のように増殖しないのか、そのメカニズムを解明するために、細胞の運動性に関与し癌細胞の浸潤に深く関与している MMP2<sup>1)2)</sup>、MMP9<sup>3)</sup>の発現を検討した。一方、これら MMPs の発現を調節する作用のある液性因子に TGF $\beta$ 1がある。細胞が癌化すると、この TGF $\beta$ 1のもつ増殖抑制作用を受けなくなり<sup>4)~6)</sup>、このことが癌細胞の多段階発癌過程における一つのステップであるといわれている<sup>7)8)</sup>。この MMPs 調節能と増殖抑制能の二面性から、TGF $\beta$ 1に対する反応性を初期 CT、満期 CT および BeWo を用いて観察した。

## 材料と方法

### 1. 細胞の準備

初期 CT および満期 CT は、Kliman et al. の方法<sup>9)</sup>により妊娠 6 週人工妊娠中絶および妊娠 37 週出産例から患者の承諾を得て採取した絨毛組織より分離した。従来の方法では血球系の細胞の混入があるため、抗 LCA 抗体を吸着させた磁気ビーズを用いて血球系の細胞を分離して<sup>10)</sup>より純粋な CT を得た。絨毛癌細胞株は BeWo を用いた。間質細胞は子宮筋腫摘出時に得た非妊娠性子宮より Satyaswaroop et al. の方法<sup>11)</sup>を用いて得た。BeWo は国立衛生試験所 (JCRB 細胞 BANK) より入手した。

### 2. RT-PCR による CT の確認

この純化された細胞が本当に純粋な CT であるかどうかを検討するため、得られた CT を無血清培地 GIT を用いて 37°C、5%CO<sub>2</sub>-95%air 湿環境条件下で静置培養し 72 時間後に syncytiotrophoblast (以下 ST と略す) になるかどうかを RT-PCR を用いて E-cadherin mRNA の発現の違いを用いて検討した<sup>12)13)</sup> (表 1)。RT-PCR には 1 $\mu$ g の mRNA を用いて reverse transcriptase を使用して一本鎖 cDNA を合成しこれを PCR のプレートとして用いた。PCR は primer 1 $\mu$ M each, dNTPs(ATP, CTP, GTP, TTP) 250 $\mu$ M each,

potassium chloride 50mM, tris hydrochloride (pH 8.3) 10mM, 0.01%gelatin, 0.3unit Taq polymerase, total volume 50 $\mu$ lにて, denaturation 95°C 30s., annealing は primer の至適温度で 60s., extension 72°C 2min. を1cycleとして30 cycles, final extension 72°C 5min.にて施行した. 電気泳動は 2%アガロースゲルを用いて施行した.

### 3. in vitro での浸潤能の検討

これらの細胞の浸潤能の検討は, 細胞外基質 (matrigel matrix) がコートされた8 $\mu$ m ポアサイズ PET メンブレン (Becton Dickinson 社) を用いて in vitro での invasion assay を施行した. 2.5 $\times$ 10<sup>4</sup>個の細胞を PET メンブレン上に入れて 37°C, 5%CO<sub>2</sub>-95%air 湿環境条件下で静置培養し, 24時間後に PET メンブレンの反対側にある細胞数を算定した. 算定は triplicate で行い細胞数の平均をとった. 加えて, TGF $\beta$ 1添加による各細胞の浸潤能の変化を比較するため, 培養液に TGF $\beta$ 1を5ng/mlにて添加し, 培養液のみの群と比較した.

### 4. 造腫瘍性の検討

造腫瘍性の有無は 1 $\times$ 10<sup>6</sup>個の細胞をヌードマウスの皮下に接種して30日後に観察した.

### 5. MMP2, MMP9の蛋白レベルで発現の検討

MMP2, MMP9の蛋白レベルでの分泌能の違いを検討するため gelatin zymography 法を用いて, 各細胞の培養上清の gelatinase activity を観

察した. サンプルには 1 $\times$ 10<sup>6</sup>個の細胞の培養上清を用いた. TGF $\beta$ 1は5ng/mlにて添加した. Laemmli sample buffer without dithiothreitol をサンプルに加えて, 7.5%SDS-polyacrylamide gels containing 1mg/ml of gelatin を用いて電気泳動施行後, gel から SDS を取り除くため2.5%(v/v) Triton X-100にて30分間 incubate し, 50mM tris-HCl, pH 7.6, containing 0.2M NaCl, 5mM CaCl<sub>2</sub>, and 0.02% (w/v) Brij-35. を含む溶液を用いて37°Cで12時間, gel 内で酵素反応を行った. 反応後の gel を30%methanol/10%glacial acetic acid containing 0.5% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250溶液を用いて染色し, 30%methanol/10%glacial acetic acid 溶液にて脱色した. 脱色された部分を NIHimage にて画像化し比較した.

### 6. probe の作成

上皮細胞の増殖能の指標として c-MYC<sup>14)15)</sup>, MMP2<sup>16)</sup>, MMP9<sup>17)</sup>, mRNA 量のコントロールとして GAPDH 遺伝子<sup>18)</sup>の塩基配列をもとに PCR primer を設定した (表1). ハイブリダイズ用 probe は, RT-PCR にて増幅した目的のフラグメントを精製して pBS (sk-) に ligation し大腸菌にて増幅後 subcloning し, 得られた clone を用いて DNA を抽出し sequence を行って, この PCR fragment が目的とする遺伝子であることを確認後 hybridization に用いた.

### 7. TGF $\beta$ 1に対する反応性

ノーザンプロット法を用いて TGF $\beta$ 1に対する

表1 PCR primer pairs

MMP2	F-5-TGACATCAAGGGCATTTCAGGAGC R-5-GTCCGCCAAATGAACCGGTCCTTG
MMP9	F-5-GAGACTCTACCGGGGACGGGA R-5-CTGTATCCTTGGGGTTCCGGGCAG
MT-MMP	F-5-GGAAATGACATCTTCCTGGTGGCTG R-5-GCATTGGGTATCCATCCATCACTTGG
c-MYC	F-5-CGGGCACTTTGCACTGGAACCTTAC R-5-TCGCAGTAGAAATACGGCTGCACC
E-cadherin	F-5-TGCTCTTCCAGGAACCTCTGTG R-5-AAGGTCAGCAGCTTGAACCACC
$\beta$ -actin	F-5-CGGGAAATCGTGCGTGACATTAAG R-5-TCGTCATACTCCTGCTTGCTGATCC
GAPDH	F-5-GCATTGCCCTCAACGACCACTTTG R-5-TTGATGGTACATGACAAGGTGCGG

反応性を観察した。培養液に TGF $\beta$ 1 を 5ng/ml にて添加し 48 時間後に mRNA を抽出した。検討した遺伝子は上皮細胞の増殖能の指標として c-MYC 遺伝子の発現<sup>14)15)</sup>と mRNA 量のコントロールとして GAPDH 遺伝子の発現を観察した。これらの細胞より、oligo-dT セルロースを用いて mRNA を分離抽出した。ノーザンブロット法には 2 $\mu$ g の mRNA を用いた。mRNA を 5M formaldehyde, 30%formamide, and 1 $\times$ morpholinopropanesulfonic acid buffer に溶解し、65 $^{\circ}$ C にて 10 分間変性させた後、1% agarose gel in morpholinopropanesulfonic acid-formaldehyde buffer を用いて電気泳動を施行した。電気泳動後、20 $\times$ SSC を用いてニトロセルロースフィルターに転写した。

UV cross-linking を施行した後、50%formamide, 5 $\times$ Denhardt's solution, 25mM phosphate buffer (pH 6.5), 0.1%SDS, 100 $\mu$ g/ml of sonicated and heat-denatured salmon sperm DNA, 100 $\mu$ g/ml of yeast t-RNA, 5 $\times$ SSC を含む溶液に標識された probe を加え 42 $^{\circ}$ C, 16 時間にて hybridization を施行した。洗浄は、室温にて 3 $\times$ SSC containing 0.02%SDS で 15 分, 65 $^{\circ}$ C にて 3 $\times$ SSC containing 0.02%SDS で 15 分を 3 回, 42 $^{\circ}$ C にて 1 $\times$ SSC containing 0.02%SDS で 15 分行った。フィルターは -80 $^{\circ}$ C 下で Kodak XAR film を用いて露光した。

8. 間質細胞における MT-MMP の発現の検討  
MT-MMP は MMP2 を活性化する作用のある新しい膜貫通型の細胞膜表面にあるメタロプロテナーゼである<sup>19)</sup>。そこで MT-MMP が間質細胞で発見されているかどうかを RT-PCR にて検討した。MT-MMP<sup>19)</sup> と mRNA のコントロールとして用いた  $\beta$ -actin<sup>20)</sup> の塩基配列をもとに PCR primer を設定した (表 1)。

## 成績

### 1. RT-PCR による CT の確認

CT および CT を 72 時間培養して得た細胞 (ST) での E-cadherin mRNA,  $\beta$ -actin mRNA の発現を示す (写真 1)。E-cadherin mRNA の発現は CT のみで認められ ST ではその発現を認め

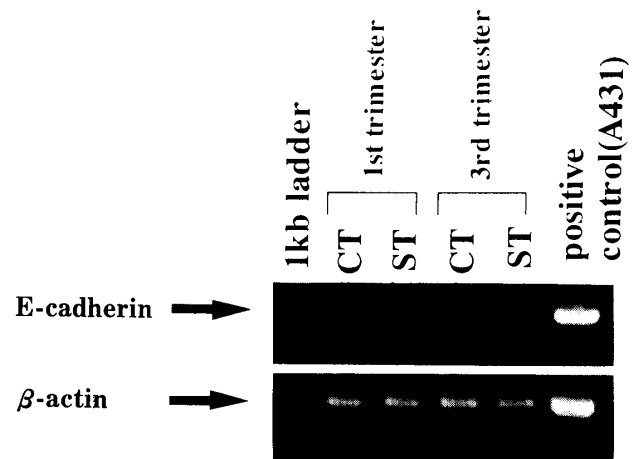
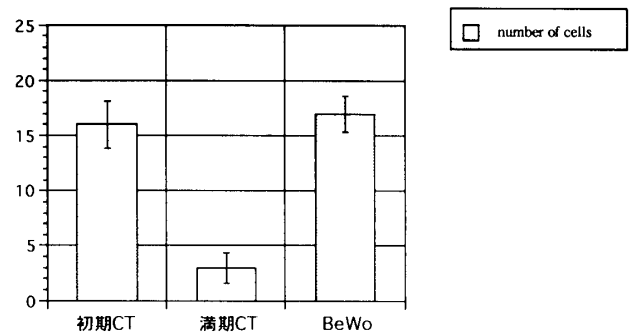
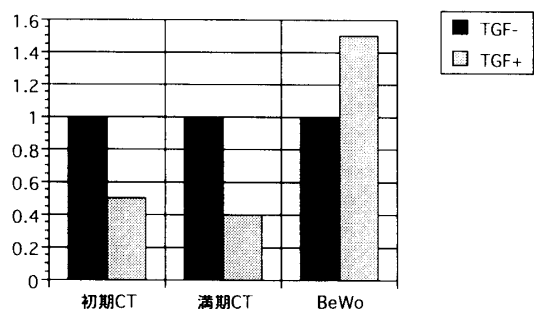


写真 1 RT-PCR による E-cadherin mRNA,  $\beta$ -actin mRNA の発現

1st trimester: 正常妊娠 6 週, 3rd trimester: 正常妊娠 37 週, 1kb ladder: マーカー, CT: cytotrophoblast, ST: CT を 72 時間培養して得た細胞, A431: epidermoid cell carcinoma cell line



1) in vitro での浸潤能の検討。浸潤してきた細胞数を triplicate にて算定した。



2) TGF $\beta$ 1 を添加したときの in vitro での浸潤能の検討。TGF $\beta$ 1 を添加していないときの浸潤してきた細胞数を 1 として比較した。

図 1 Invasion assay の結果

なかった。このことにより、得られた細胞が CT であると考えられた。

## 2. Invasion assay による浸潤能の比較(図1).

初期CTは、満期CTに比べ高い浸潤能を有し、BeWoと同程度であった。初期CTや満期CTではTGF $\beta$ 1を培養上清に添加するとその浸潤能は抑制された。一方、BeWoではTGF $\beta$ 1を培養上清に添加すると逆に浸潤能は亢進した。

## 3. 造腫瘍性の検討

初期CTや満期CTはヌードマウスに皮下接種しても造腫瘍性は認められなかった。一方、BeWoでは造腫瘍性を認めた。

## 4. 初期CT, 満期CTでのMMP2, MMP9の発現

Gelatin zymographyの結果より、初期CTで

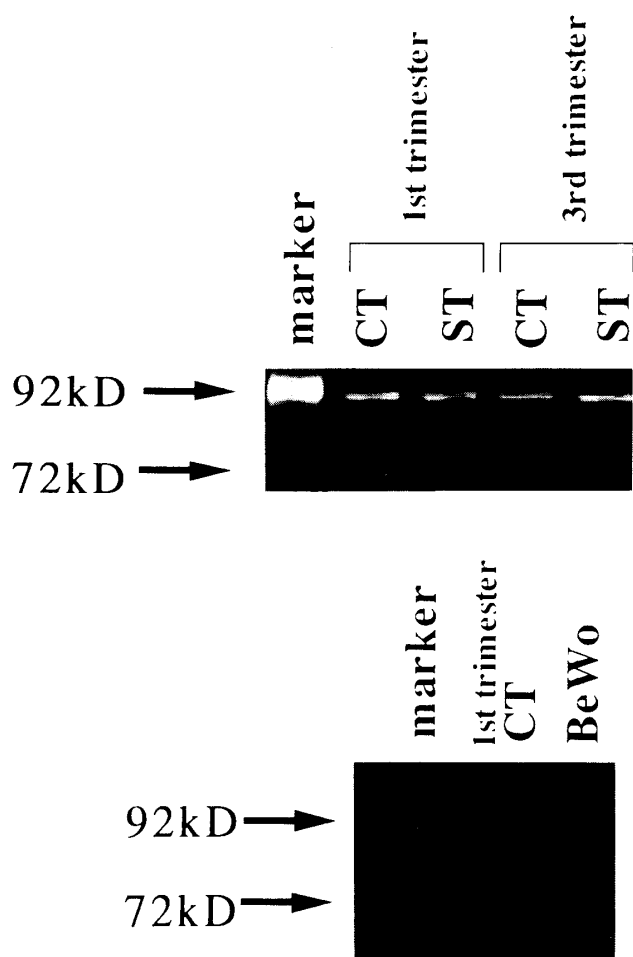


写真2 Gelatin zymographyによるgelatinase activityの検討

1st trimester: 正常妊娠6週, 3rd trimester: 正常妊娠37週, CT: cytotrophoblast, ST: CTを72時間培養して得た細胞, BeWo: choriocarcinoma cell line, 92kD: MMP9, 72kD: MMP2

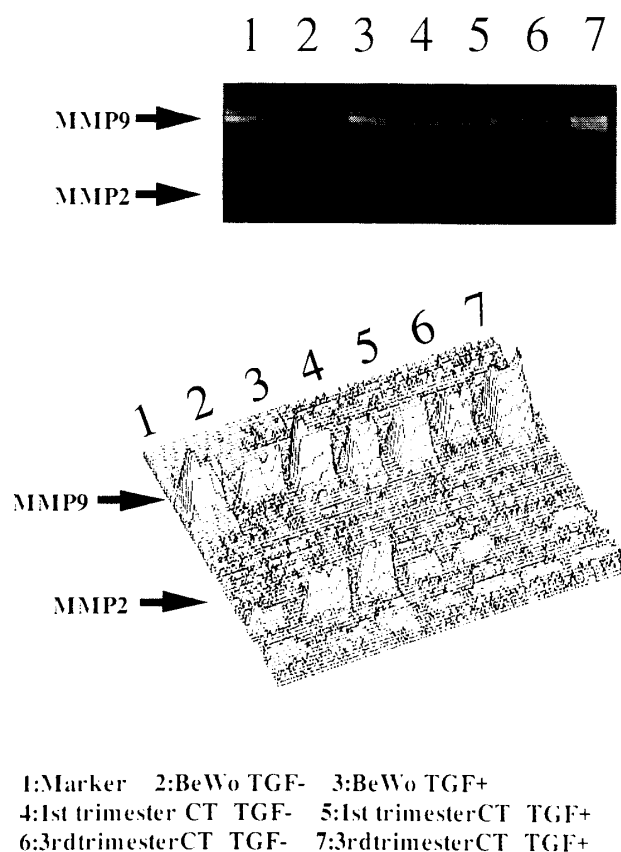
はMMP2とMMP9の両者とも強い発現が認められた。しかし満期CTではMMP9が強く発現されていたが、MMP2の発現はほとんど認められなかった(写真2)。

5. TGF $\beta$ 1添加による反応性の検討

初期CT, 満期CT, BeWoを用いたgelatin zymographyおよびノーザンブロットの結果を示す(写真3, 4)。

## 1) c-MYCの発現(増殖能の検討)

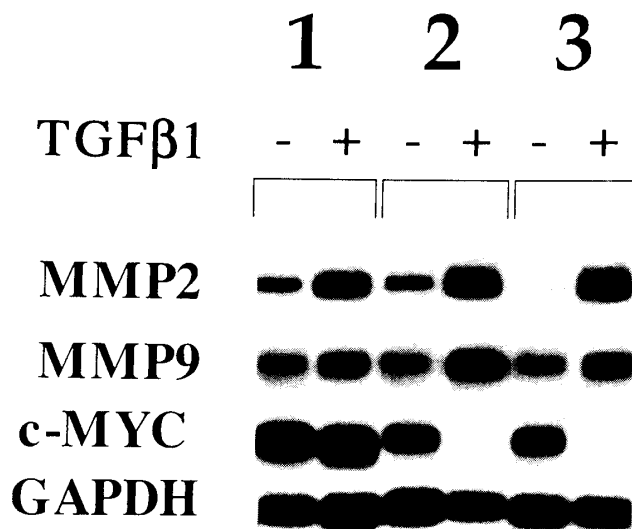
BeWoでは、TGF $\beta$ 1に対する反応性は認められず、c-MYCの発現に変化はなかった。すなわち、BeWoはTGF $\beta$ 1に対して非感受性であり、増殖は抑制されなかった。しかし、正常初期CTではTGF $\beta$ 1添加により、c-MYCの発現の低下が観察され、TGF $\beta$ 1に対して感受性が認められ、増殖



1:Marker 2:BeWo TGF- 3:BeWo TGF+  
4:1st trimester CT TGF- 5:1st trimester CT TGF+  
6:3rd trimester CT TGF- 7:3rd trimester CT TGF+

写真3 TGF $\beta$ 1添加によるgelatin zymographyを用いたgelatinase activityの検討

1st trimester: 正常妊娠6週, 3rd trimester: 正常妊娠37週, CT: cytotrophoblast, BeWo: choriocarcinoma cell line, TGF-: TGF $\beta$ 1無添加, TGF+: 5ng/ml TGF $\beta$ 1添加



### 1:BeWo

### 2:1st trimester CT

### 3:3rd trimester CT

写真4 ノーザンブロット法を用いた TGFβ1 添加による MMP2, MMP9, c-MYC, GAPDH mRNA 発現の検討

BeWo: choriocarcinoma cell line, 1st trimester: 正常妊娠6週, 3rd trimester: 正常妊娠37週, CT: cytotrophoblast, TGFβ1-: TGFβ1無添加, TGFβ1+: 5ng/ml TGFβ1添加

は抑制された。

#### 2) MMP2, MMP9の発現

一方 MMP2, MMP9は, 初期 CT, BeWo, それぞれにおいて大きな発現の違いがなかった。また, TGFβ1添加によりそれぞれの細胞で MMP2, MMP9の発現の増加が認められた。この反応性には, 初期 CT も BeWo でも違いがなかった。

#### 6. 間質細胞における MT-MMP の発現の検討

MT-MMP は間質細胞で発現されていた。

#### 考 察

##### 1. 初期 CT, 満期 CT および BeWo での浸潤能の違い

in vitro での invasion assay にて, 初期 CT と BeWo は満期 CT より高い浸潤能を有していた。このことは, 妊娠初期胎盤が妊娠後期胎盤より多くの EVT が存在することと矛盾はないと考えら

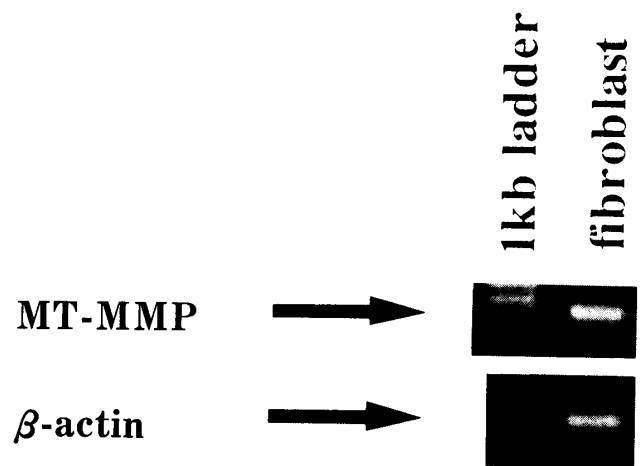


写真5 RT-PCR 法による間質細胞での MT-MMP の発現

1kb ladder: マーカー, fibroblast: 子宮体部由来間質細胞

れる。

c-MYC の発現でみる細胞の増殖能は, 初期 CT, 満期 CT および BeWo において有意な違いは認められなかった。

癌細胞の浸潤過程において蛋白分解酵素である MMP2, MMP9は重要な役割を果たしている<sup>1)~3)</sup>。初期 CT や BeWo では MMP2, MMP9の発現が認められたが, 満期 CT は MMP9の発現のみしか観察されなかった。また, 合理的なことに子宮体部由来間質細胞には MT-MMP の発現が認められた。MT-MMP は膜貫通型の蛋白分解酵素であり細胞膜表面に存在し, 従来より知られている分泌型の MMPs とは異なる。この蛋白は不活性型 (latent form) MMP2を活性型 (active form) MMP2にする機能を有している<sup>19)</sup>。このことは浸潤してきた細胞が間質細胞と接触すると, 初期 CT の分泌する MMP2が活性化され, 浸潤を促進すると考えられる。このような浸潤能の違いは他の因子も関与している可能性が考えられるが, その一つの因子として MMP2の発現が関与している可能性が示唆された。

しかし, 初期 CT と BeWo には, in vitro での浸潤能, c-MYC の発現, MMP2, MMP9の発現に有意な違いは認められなかった。そこで TGFβ1 に対する反応性の違いを検討した。

## 2. 初期CTとBeWoにおけるTGF $\beta$ 1に対する反応性の違い

TGF $\beta$ 1は、上皮系細胞に対して増殖を抑制する<sup>4)~6)</sup>。また、TGF $\beta$ 1は子宮頸癌由来細胞の運動性を亢進させるようなMMP2, MMP9発現の増加作用を有する<sup>2)</sup>。このようにTGF $\beta$ 1は細胞の浸潤転移にとって相反する二つの作用を有している。TGF $\beta$ 1は、c-MYCの発現を抑制して初期CTの増殖を抑制したが、BeWoの増殖を抑制できなかった。初期CTは、TGF $\beta$ 1に曝露されることによりMMP2, MMP9の発現が増加する。この反応性はBeWoでも同様であった。しかし、TGF $\beta$ 1を添加した時のin vitroでの浸潤能はBeWoで亢進したが、初期CTでは、浸潤能の抑制が観察された。浸潤してきた細胞が間質組織中のTGF $\beta$ 1に曝露されることにより、正常細胞はMMP2, MMP9を増殖させるが、その反応性以上に優位に増殖抑制作用を受けてしまい浸潤能が抑制されると考えられる。BeWoはこのTGF $\beta$ 1のもつ増殖抑制作用を受けず、TGF $\beta$ 1のもつMMP2, MMP9の発現増加作用を受け、より浸潤能が亢進する。このことは、BeWoが間質組織内を浸潤していく機構において合目的的であると考えられる。以上を総合すると、初期CTが浸潤しEVTとなる機構には、MMP2による細胞の運動能の亢進やTGF $\beta$ 1によるMMP2, MMP9の増加が関係しているが、癌細胞のように増殖しないのは、TGF $\beta$ 1による増殖抑制作用を優位に受けることが関与していると推測された。

### 文 献

1. Liotta LA, Tryggvason K, Garbisa S, Gehron-Robey P, Abe S. Partial purification and characterization of a neutral proteinase which cleaves type IV collagen. *Biochemistry* 1981; 20: 100-104
2. Salo T, Liotta LA, Tryggvason K. Purification and characterization of a murine basement membrane collagen-degrading enzyme secreted by metastatic tumor cells. *J Biol Chem* 1983; 258: 3058-3063
3. Wilhelm SM, Collier IE, Marmer BL, Eisen AZ, Grant GA, Goldberg GI. SV40-transformed human lung fibroblasts secrete a 92-kDa type-IV collagenase which is identical to that secreted by normal human macrophages. *J Biol Chem* 1989; 264: 17213-17221
4. Tucker RF, Shipley GD, Moses HL, Holley RW. Growth inhibitor from BSC-1 cells closely related to the platelet type beta transforming growth factor. *Science* 1984; 226: 705-707
5. Roberts AB, Anzano MA, Wakefield LM, Roche NS, Stern DF, Sporn MB. Type-beta transforming growth factor: A bifunctional regulator of cellular growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 119-123
6. Moses HL, Tucker RF, Leof EB, Coffey RJ Jr, Halper J, Shipley GD. Type-beta transforming growth factor is a growth stimulator and a growth inhibitor. In: Feramisco J, Ozanne B, Stiles C, eds. *Cancer Cells. Growth Factor and Transformation*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory 1985; 3: 65-71
7. Braun L, Durst M, Mikumo R, Gruppuso P. Differential response of nontumorigenic and tumorigenic human papillomavirus type 16-positive epithelial cells to transforming growth factor  $\beta$ 1. *Cancer Res* 1990; 50: 7324-7332
8. Woodworth CD, Notario V, DiPaolo JA. Transforming growth factors  $\beta$ 1 and 2 transcriptionally regulate human papillomavirus (HPV) type 16 early gene expression in HPV-immortalized human genital epithelial cells. *J Virol* 1990; 64: 4767-4775
9. Kliman HJ, Nestler JE, Sermasi E, Sanger JM, Strauss JF III. Purification, characterization, and in vitro differentiation of cytotrophoblasts from human term placentae. *Endocrinol* 1986; 118: 1567-1582
10. Bischof P, Friedli E, Martelli M, Campana A. Expression of extracellular matrix-degrading metalloproteinases by cultured human cytotrophoblast cells: Effects of cell adhesion and immunopurification. *Am J Obstet Gynecol* 1991; 165: 1791-1801
11. Satyaswaroop PG, Bressler RS, de la Pena MM, Gurpita E. Isolation and culture of human endometrial glands. *J Clin Endocrinol Metab* 1979; 48: 639-641
12. Coutifaris C, Kao L, Sehdev HM, Chin U, Babalola GO, Blaschuk OW, Strauss JF III. E-cadherin expression during the differentiation of human trophoblasts. *Development* 1991; 113: 767-777
13. Bussemakers MJG, Mees SGM, Van Bokhoven A, Debruyne FMJ, Schalken JA. Molecular

- cloning and characterization of the human E-cadherin cDNA. *Mol Biol Rep* 1993; 17: 123—128
14. *Pietenpol JA, Holt JT, Stein RW, Moses HL.* Transforming growth factor  $\beta$ 1 suppression of c-myc gene transcription: Role in inhibition of keratinocyte proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 3758—3762
  15. *Watt R, Stanton LW, Marcu KB, Gallo RC, Croce CM, Rovera G.* Nucleotide sequence of cloned cDNA of human c-myc oncogene. *Nature* 1983; 303: 725—728
  16. *Collier IE, Wilhelm SM, Eisen AZ, Marmor BL, Grant GA, Seltzer JL, Kronberger A, He C, Bauer EA, Goldberg GI.* H-ras oncogene-transformed human bronchial epithelial cells (TBE-1) secrete a single metalloproteinase capable of degrading basement membrane collagen. *J Biol Chem* 1988; 263: 6579—6587
  17. *Wilhelm SM, Collier IE, Marmor BL, Eisen AZ, Grant GA, Goldberg GI.* SV40-transformed human lung fibroblasts secrete a 92-kDa type IV collagenase which is identical to that secreted by normal human macrophages. *J Biol Chem* 1989; 264: 17213—17221
  18. *Tokunaga K, Nakamura Y, Sakata K, Fujimori K, Ohkubo M, Sawada K, Sakiyama S.* Enhanced expression of a glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene in human lung cancers. *Cancer Res* 1987; 47: 5616—5619
  19. *Sato H, Takino T, Okada Y, Cao J, Shinagawa A, Yamamoto E, Seiki M.* A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumor cells. *Nature* 1994; 370: 61—65
  20. *Ponte P, Ng SY, Engel J, Gunning P, Keddes L.* Evolutionary conservation in the untranslated regions of actin mRNAs: DNA sequence of a human beta-actin cDNA. *Nucleic Acids Res* 1984; 12: 1687—1696
  21. *Agarwal C, Hembree JR, Rorke EA, Eckert RL.* Transforming growth factor  $\beta$ 1 regulation of metalloproteinase production in cultured human cervical epithelial cells. *Can Res* 1994; 54: 943—949

(No. 7714 平7・11・17受付)