

〔原 著〕

上皮増殖因子 (E G F) によるヒト口腔扁平上皮癌細胞の
運動能促進作用とその細胞内情報伝達経路に関する研究

河野 峰

北海道医療大学歯学部口腔外科学第二講座

(主任：有末 眞教授)

Study on enhancement of the motility of human oral squamous
cell carcinoma cells and its intracellular signal transduction
pathway with epidermal growth factor

Takashi KAWANO

Second Department of Oral and Maxillofacial Surgery,
School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido

(Chief : Prof. Makoto ARISUE)

Abstract

Enhancement effects of EGF on the motility of human oral squamous cell carcinoma(SCC) cells and the intracellular signal transduction pathway of EGF were investigated.

Five human oral SCC cells(SAS, Ca9-22, HSC-2, HSC-3, HSC-4,) were treated with EGF(1-100ng/ml) and motilities of these cells were measured with phagokinetic track assay. The EGF significantly enhanced the motilities of SAS, Ca9-22, and HSC-3 cells in a dose dependent fashion ; in this experiment(assay) the motility of SAS and HSC-2 cells was significantly higher than that of the other cells without EGF stimulation. The culture supernatants of each cell was harvested and the collected media were analyzed with immuno blotting using EGF monoclonal antibodies(MoAb). There was a large amount of EGF(7.8-15.6ng/ml) in the SAS cell medium, and the EGF-producing ability corresponded to the motility in the absence of EGF-stimulation. To show the EGF autocrine loop in SAS cells, anti-EGF MoAb, exhibiting neutralizing activity and anti-EGF receptor(EGFR) MoAb were added to the phagokinetic track assay. This MoAb treatment significantly reduced the motility. Erbstatin analog, which specifically inhibits the phosphorylation of EGFR, was added to the phagokinetic assay to

confirm the EGF autocrine stimulation through the EGF receptor. Erbstatin analog significantly reduced the motility at concentrations higher than $2\mu\text{M}$. These results indicate that EGF autocrine stimulation is due to switching through the EGFR. To show the intracellular signal transduction pathway of EGF, s-1 clone cells, the most sensitive clone for EGF stimulation, were established from Ca9-22 cells. When s-1 clone cells were treated with phorbol 12-myristate 13-acetate(PMA), the motility was enhanced like with EGF stimulation. The intracellular localization of PKC was examined with a confocal laserscan microscope. Chronological changes of localization in EGF-stimulated s-1 cells were observed following indirect immunostaining with FITC conjugated antibodies. The expression of PKC was enhanced, and translocation of PKC to the membrane area was observed at 30 minutes after EGF stimulation. To show the signal transduction of EGF-induced motility, inhibition assays of motilities were carried out using blocking agents. To inhibit tyrosine phosphorelation, the Erbstatin analog Psi-tectorigenin was used to inhibit phosphatidylinositol(PI) turnover. Calphostin C was used to inhibit protein kinase C(PKC), and Wortmannin was used to inhibit phosphatidylinositol 3-kinase(PI3K). These blocking agents were completely inhibited the motilities enhanced by EGF. The results strongly suggest that, when EGF binds to EGFR, tyrosin phosphorelation first occurs at the intracellular domain of the EGFR and that PKC is subsequently activated through the activation of PLC γ arising from erbB homodimer and/or activation of PI3K, arising from erbB3 heterodimer.

Key words : Epidermal growth factor(EGF), Oral squamous cell carcinoma, Motility, Autocrine, Signal transduction pathway

緒 言

口腔癌の治療成績は診断技術や治療法の進歩に伴い近年著しい向上を遂げてきている。しかし、癌細胞のもつ浸潤・転移能に起因して制御不能となる場合も多く存在し、治療成績向上の障害の一つとなっている。

一般に癌の転移は、癌細胞の原発巣からの遊離にはじまり、最終的に標的臓器での増殖という過程を経て成り立つと考えられており、血管内皮細胞や細胞外マトリックスに対する接着能、シェアストレスに対する抵抗性や変形能、免疫担当細胞からの逃避能、細胞運動能、細胞外マトリックス分解酵素産生能、ならびに血管新生誘導能などが、転移成立に重要な癌細胞側

因子と考えられている。特に、癌細胞の持つ運動能はその浸潤・転移において重要な働きをしていることが知られている^{1,2)}。一方、このような癌細胞の転移形質は発癌当初から備わっているわけではなく、癌細胞周囲の実質・間質細胞をはじめとする宿主正常細胞などの微小環境において、様々な増殖因子、サイトカインなどの修飾により徐々にその性格を備えていくと考えられている³⁾。

先に当教室の永易ら⁴⁾は、SHRラット由来自然発生乳癌細胞SST-2より得られた自然退縮型癌細胞ER-1を用いて、上皮増殖因子(epidermal growth factor: EGF)が癌細胞の浸潤・転移能に対して促進的に作用することをin vivo, in vitroにおいて証明し、EGFが癌プロ

グレーション因子として作用する可能性のあることを示している。また、最近になり、ヒト口腔扁平上皮癌（口腔癌）細胞は、EGF受容体を過剰発現し、EGFにより増殖は抑制されるものの細胞外マトリックス分解酵素産生促進などの浸潤転移に関わる能力が促進されることが示されてきている⁵⁻⁸⁾。さらに、口腔内環境にはEGFを多く含む唾液が存在し口腔癌細胞は常にEGFにさらされており、EGFは口腔癌細胞にとって極めて特殊な関係にある増殖因子であると考えられる。

そこで、本研究では、口腔癌細胞の浸潤・転移能に及ぼす影響を明らかにするために、癌細胞の浸潤・転移に必要な運動能に対するEGFの作用様式と細胞内シグナル伝達経路について検討した。

材料および方法

1. 培養細胞

細胞は、細胞バンク (JCRB) より供与されたヒト口腔扁平上皮癌細胞株 SAS⁹⁾, Ca 9-22^{10,11)}, HSC-2, HSC-3, HSC-4^{10,12)}細胞を用いた。また、Ca 9-22細胞より、EGFに対し最も高い運動能感受性を示すクローン s-1 細胞を限界希釈法により樹立し用いた (Table 1)。口腔扁平上皮癌細胞の培養は、10%となるように fetal bovine serum (FBS, 56°C, 30分不活化) を添加した Ham's F12 medium と Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) と

の混合培地 (D/F12培地) にて行い、37°C, 5% CO₂, 95% air 条件下で培養維持した。

2. 細胞増殖の測定

1) 標準曲線

5系のヒト口腔扁平上皮癌細胞を96穴プラスチックプレートに $2.5 \times 10^2 \sim 1 \times 10^5$ 個/ウェルまでの9段階に細胞数をふり、1%FBS添加D/F12培地200ml中にまき、5%, CO₂, 37°Cにて6時間培養後5%グルタルアルデヒド50ml/ウェル添加し30分間固定した。これを蒸留水で洗浄し完全に乾燥させ、0.1%クリスタルバイオレット50mM CAPS (pH9.4) 50ml/ウェル添加し30分間染色後、再び洗浄、乾燥させ、10%酢酸50ml/ウェル添加により可溶化し、この吸光度を波長595nmのmicroplate readerで計測し標準曲線を作成した。

2) 増殖曲線

標準曲線を参考にして、HSC-3細胞は 5×10^3 個/ウェル、他の4系は 2.5×10^3 個/ウェルの細胞を1%FBS添加D/F12培地200ml中にまき、これにヒト・リコンビナントEGF (アース, 赤穂) を0, 1, 10, 100ng/mlの濃度となるように添加し、EGF共存下にて培養を行い経時的に細胞を上記の方法にて染色し、microplate readerにて計測し標準曲線より細胞数を算出した。

3. 運動能の測定

運動能の測定はAlbrecht-BuehlerのPhagokinetic track assayに準じて行った¹³⁾。

Table 1 Human oral squamous cell carcinoma cell lines profile

Cell lines	Primary site	Culture line obtained from	Pathology
SAS	Tongue	Primary	SCC (poor) ^a
Ca9-22	Gingiva	Primary	SCC (well)
HSC-2	Oral floor	Submaxillary LN ^b	SCC (well)
HSC-3	Tongue	Juglodigastric LN	SCC (poor)
HSC-4	Tongue	Juglodigastric LN	SCC (well)

^aSCC, squamous cell carcinoma.

^bLN, lymph node.

1) 金コロイドのコート

14.5mM AuCl_4H 水溶液 (J.T.Baker Chemical, Phillipsburg, NJ) 1.8mlに36.5mM Na_2CO_3 水溶液 6 ml, 蒸留水11mlを加えガスバーナーで沸騰させ, その後0.1%ホルムアルデヒド溶液1.8mlを加え金コロイド溶液を作成した。次いで, 1%ウシ血清アルブミン (BSA) でコートした18mm×18mmのカバーガラス上に金コロイド溶液を滴下し45分間静置し金粒子をカバーガラスに付着させた。

2) Phagokinetic track assay

金コロイドをコートさせたカバーガラスをペニシリン50mg/ml, ストレプトマイシン50mg/ml, ネオマイシン100mg/mlを含むPSN抗生物質混合物 (Gibco, Grand Island, NY) 添加D/F12培地で3回洗浄し, これをPSNを含む1% FBS添加D/F12培地を入れた35mm培養皿内に静置させ, この上に各癌細胞を 2×10^3 /dish まき, CO_2 インキュベーター内で24時間培養した。このとき培地中のEGF濃度が0, 1, 10, 100ng/mlとなるようにEGFを添加した。培養終了後, カバーガラスを10%ホルマリン溶液にて30分間固定し, 蒸留水にて洗浄後, このカバーガラスをスライドガラスにマウントし標本とした。次いで, 標本上の細胞およびその軌跡を無作為に20個選択し, 画像解析装置 (Cosmozone R500 Nikon, 東京) で計測し, この平均値を運動能として評価した。

4. 増殖因子, 抗体, 薬剤による細胞の処理

1) EGF処理: 各細胞の運動能に対するEGF処理は, ヒト・リコンビナントEGF (アース) を培地に1, 10, 100ng/mlの濃度となるように, 添加し行った。

2) 抗体処理: 抗EGF抗体 (Oncogene Science, Uniondale, NY), 抗EGFR抗体 (Oncogene Science), を各々50ng/ml, 5 μg /mlの濃度となる様にPhagokinetic track assayの培地に添加し, 処理を行った。

3) 薬剤処理: Erbstatin analog (Biomol, Plymouth Meeting, PA) (0.4, 2, 10 μM), Psi-tectorigenin (MW 300, 協和メデックス, 東京) (0.5, 1, 2 μg /ml), Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (MW 616.8, Sigma, St Louis, MO) (1, 10, 100ng/ml), Calphostin C (Oncogene Science) (4, 20, 100, 500nM) ならびに Wortmannin (和光, 東京) (0.5, 5, 50nM) を用い, 各濃度となるようにs-1細胞のPhagokinetic track assayの培地に添加し行った。

5. EGFの検索

6ウェルプラスチックプレートに 5×10^5 個/ウェルの各株の癌細胞をまき, 血清非存在下で48時間培養後の培養上清を回収した。培養上清を4°C下20,000×gで遠心し, この上清200mlをサンプルとした。D/F12培地にて希釈したヒト・リコンビナントEGF (62.5~0.12ng/ml) をスタンダードとして, 得られた上清中に含まれるEGF量を, 抗EGF抗体 (Oncogene Science) を用いたイムノブロット法にて測定し比較定量した。

6. PKCの細胞内局在の検索

12ウェルHTコーティングスライドに 2.5×10^3 個/ウェル/50mlのs-1細胞をまき, 24時間培養した。その後血清非存在下で12時間培養し, EGF100ng/mlを添加し, 1, 5, 10, 30, 60分後にメタノール, アセトンで3分間, -20°Cで固定した。次いで抗PKC抗体 (生化学社, 東京) およびFITC標識抗マウスIgG抗体 (和光) を用いた間接蛍光抗体法で染色し, 細胞内PKCの局在の変化を共焦点レーザー顕微鏡 (Bio-rad, Richmond, CA) にて観察した。

7. 統計

得られたデータは, 平均±標準偏差で表示した。また有意差検定は, Student's t-testを用い, $P < 0.05$ をもって有意とした。

結 果

1. EGFが細胞増殖に及ぼす影響

5系のヒト口腔扁平上皮癌細胞 (SAS, Ca 9-22, HSC-2, HSC-3, HSC-4) に EGF を 1, 10, 100ng/ml の濃度となるように培地に添加

し, その後EGF共存下で培養し, 2日, 4日, 6日後の細胞数を計測した。全ての細胞株の増殖は, EGF添加により濃度依存的に抑制され, その傾向は培養開始後4, 6日後で顕著であった (Fig.1)。

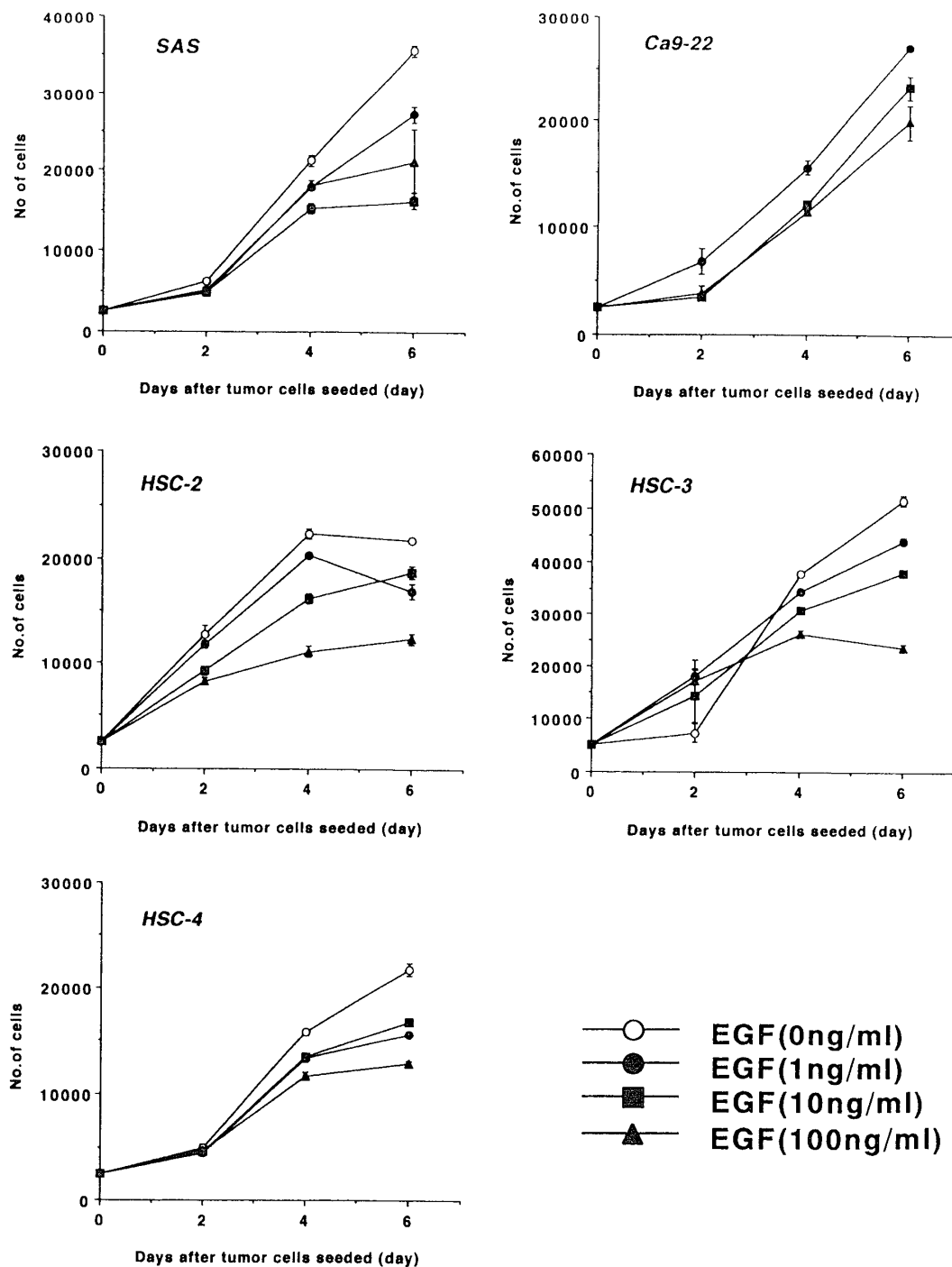


Fig. 1 In vitro growth curves of human oral squamous cell carcinoma cells in the presence or absence of EGF.

2. パラクリン様式によるEGFの細胞運動促進作用

SAS, Ca 9-22, HSC-2, HSC-3, HSC-4細胞にEGFを1, 10, 100ng/mlの濃度となるように培地に添加し, その後24時間EGF共存下で培養し, 運動能の変化を観察した。SAS, Ca9-22細胞ならびにHSC-3細胞の運動能は処理濃度依存性に有意に促進され, HSC-2およびHSC-4細胞でも有意差は認められなかったものの促進傾向が認められた。また, EGF未処理の運動能を5系の細胞株間で比較すると, SAS細胞の運動能が他の4系に比べ特に高い値を示しているのが観察された (Fig.2)。

3. 口腔癌細胞の産生・分泌するEGFの検索

EGF無添加でもSAS細胞は高い運動能を示していたことより, パラクリン様式のみならずオートクリン様式でもEGFが作用している可能性が考えられた。このため5系の口腔癌細胞 (SAS, Ca 9-22, HSC-2, HSC-3, HSC-4) の培養上清中のEGF量をイムノブロットにて検索した。SAS細胞の培養上清中には7.8~15.6ng/mlのEGFが検出され, HSC-2細胞では1.9~3.9ng/mlのEGFが検出された。一方, 他の3系では検出限界以下であった (Table 2)。以上の結果よりSAS細胞は他の4系の細胞に比べ著しく高いEGFを産生していることが示さ

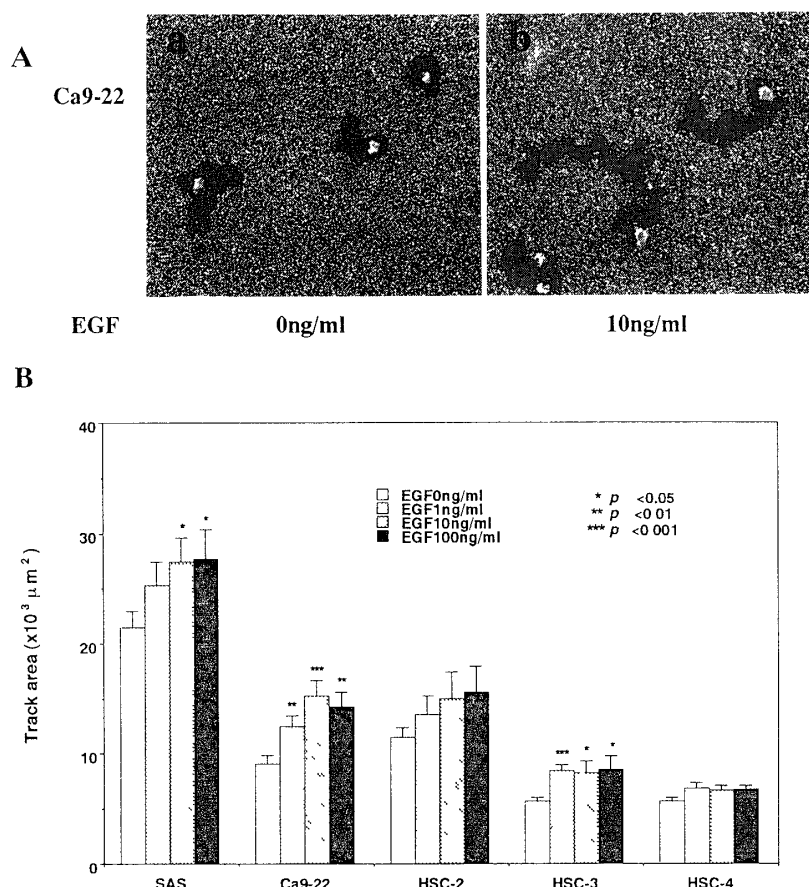


Fig. 2 Enhancement of random motility on human oral squamous cell carcinoma cells treated with EGF. In A, Ca9-22 cells were plated on colloidal gold-coated coverslips in control medium (a) supplemented with EGF(b). After 24 hr the cells were photographed under dark-field illumination and the particle-free area of at least 20 individual cells was measured. B, migrations were determined by the phagokinetic track assay as described in the text. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, or *** $p < 0.001$ as compared with each cells treated without EGF. Each bar represents the mean \pm S.E.

Table 2 EGF production by human oral squamous cell carcinoma cell lines

Cell lines	EGF ^a (ng / ml) / 2.5×10^5 cells
SAS	7.8-15.6
Ca9-22	ND ^b
HSC-2	1.9-3.9
HSC-3	ND
HSC-4	ND

^aEGF detection was performed by immunoblot assay using anti-human EGF antibody.

^bND, not detected.

れ、SAS細胞ではEGFオートクリンループによりその運動能が促進されている可能性が示唆された。

4. オートクリン様式によるEGFの運動能促進作用

SAS細胞のオートクリンループを証明するために、中和活性のある抗EGF抗体を運動能の実験系に加え、SAS細胞の運動能の変化を検討した。SAS細胞の運動能は、対照のマウスIgG処理と比較し抗EGF抗体処理により有意な低下を示した。また、EGF受容体を介して運動刺激

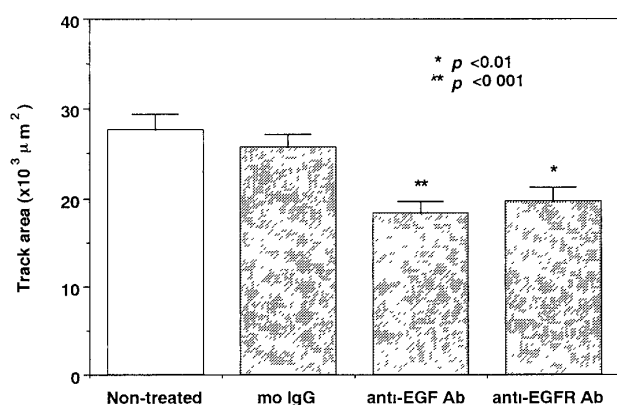


Fig. 3 Inhibitory effect of antibody to EGF or EGF receptor on phagokinesis of SAS cells. Phagokinetic track assay was performed as described in Materials and Methods. The SAS cells were treated with mouse IgG (5 μg/ml) or anti-EGF antibody (50 ng/ml) or anti-EGFR antibody (5 μg/ml). After 24 hr, the motility of 20 individual cells each group was measured. *p < 0.01, **p < 0.001 as compared with the SAS cells treated with mouse IgG by Student's t-test. Each bar represents the mean ± S.E.

の情報が伝達されていることを確認するために、EGF受容体への結合を阻害する抗EGF受容体抗体およびEGF受容体に対する基質拮抗型チロシンキナーゼ阻害剤であるErbstatin analog¹⁴⁾でSAS細胞を処理し、運動能に及ぼす影響を検討したところ、抗EGF受容体抗体および2 μM以上のErbstatin analog処理によりSAS細胞の運動能は有意に抑制された(Fig.3, Fig.4)。さらに、EGFで運動能が強く刺激されるHSC-3細胞に対する運動能の実験系に、SAS細胞の48時間培養後の培養上清を12.5~50%濃度となるように培地に添加したところ、その運動能は濃度依存性に有意に促進された(Fig.5)。以上の結果より、EGFはパラクリン様式のみならず、オートクリン様式でも口腔癌細胞の運動能を促進している可能性が示された。

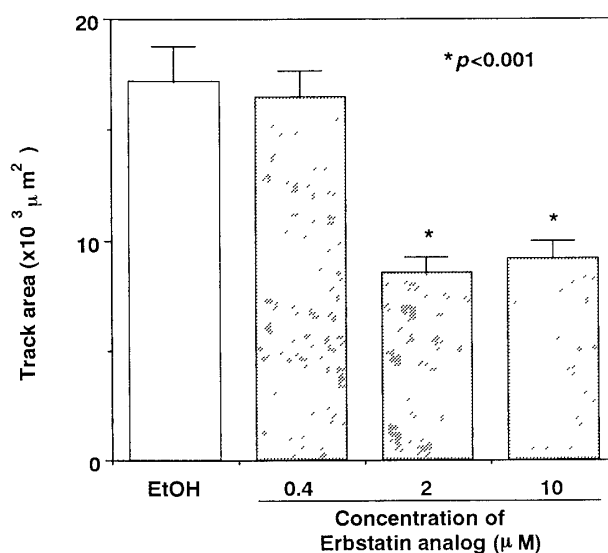


Fig. 4 Effect of tyrosin phosphorylation (EGFR) inhibitor on the basal motility of SAS cells. Phagokinetic track assay was performed as described in Materials and Methods. The SAS cells were treated with Erbstatin analog (0.4-10 μM). After 24 hr, the motility of 20 individual cells each group was measured. *p < 0.001 as compared with the SAS cells treated with 0.04% ethanol (EtOH) by Student's t-test. Each bar represents the mean ± S.E.

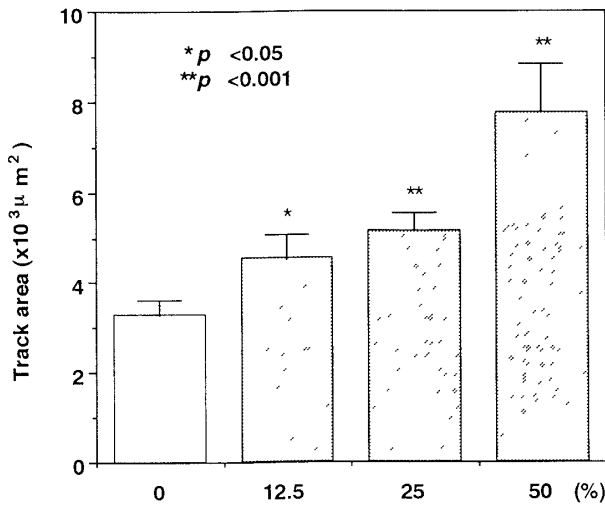


Fig. 5 Effect of medium conditioned with SAS cells on phagokinesis of HSC-3 cells. Phagokinetic track assay was performed as described in Materials and Methods. The HSC-3 cells were treated with 12.5-50% SAS cells conditioned medium. After 24 hr, the motility of 20 individual cells each group was measured. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ as compared with the HSC-3 cells treated without medium conditioned with SAS cells by Student's t-test. Each bar represents the mean \pm S.E.

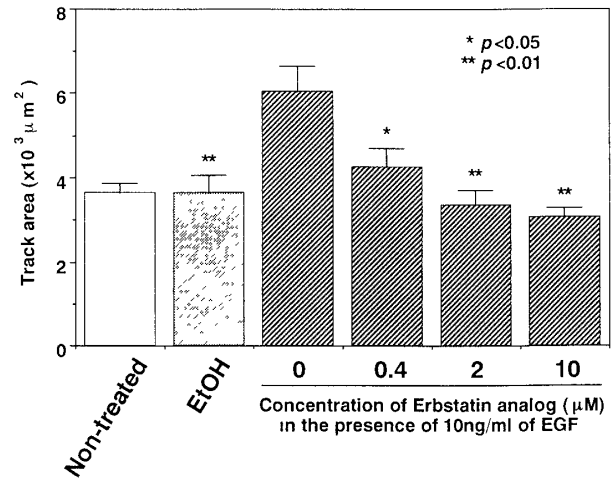


Fig. 6 Effect of tyrosin phosphorylation (EGFR) inhibitor on the stimulated motility of s-1 cells. Phagokinetic track assay was performed as described in Materials and Methods. The s-1 cells were simultaneously treated with Erbstatin analog (0.4-10 μM) and EGF (10 ng/ml). After 24 hr, the motility of 20 individual cells each group was measured. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ as compared with the s-1 cells treated without Erbstatin analog by Student's t-test. Each bar represents the mean \pm S.E.

5. EGFにより誘導される細胞運動に関与する細胞内情報伝達経路の検討

EGFによって著しく運動能が亢進されるCa 9-22細胞からEGFに対して最も高い運動能感受性を示すクローンs-1細胞を樹立した。このs-1細胞に以下の情報伝達阻害剤処理を行い、EGFによって引き起こされる細胞運動に関与する細胞内情報伝達経路の検討を行った。

1) Erbstatin analog処理による変化：EGF受容体に対する基質拮抗型チロシンキナーゼ阻害剤であるErbstatin analogを用いEGF受容体のチロシンリン酸化の関与の影響を検討した。EGFにより誘導されるs-1細胞の運動能の促進は、0.4 μMから10 μMのErbstatin analog処理により、濃度依存的に抑制され、EGFによる運動能の促進は、EGF受容体を介する情報伝達により、生じていることが示された (Fig.6)。

2) Psi-tectorigenin処理による変化：EGF受

容体が活性化された後、イノシトールリン脂質代謝を介してシグナルが伝わるか否かを検討するために、イノシトールリン脂質代謝回転 (Phosphatidylinositol turnover : PI turnover) を阻害するPsi-tectorigenin¹⁵⁾でs-1細胞を処理し運動能への影響を検討した。Psi-tectorigeninの濃度に依存してEGFによる運動能の促進作用は抑制され、2 μg/ml処理ではEGF未処理細胞の運動能とほぼ同等であった。(Fig.7)。この結果より、EGFによる運動能の促進には、phospholipase Cγ (PLCγ) を介する系が関与している可能性が示唆された。

3) PMA処理による変化：EGFによる運動能の促進にPKCが関与しているか否かを検討するために、PKCを活性化させるホルボールエステルであるPMAによるs-1細胞の運動能の変化をEGF非存在下で検討した。PMA 1 ng/mlからは100 ng/mlの処理により、s-1細胞の

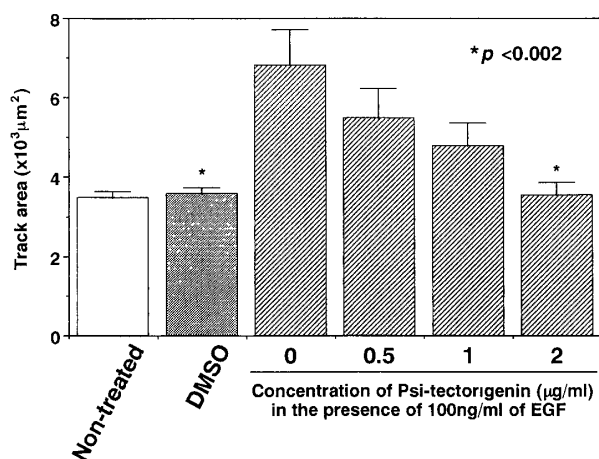


Fig. 7 Effect of signal transduction (PI-turnover) inhibitor on stimulated motility of s-1 cells. Phagokinetic track assay was performed as described in Materials and Methods. The s-1 cells were simultaneously treated with Psi-tectorigenin (0.5–2 μg/ml) and EGF (100 ng/ml). After 24 hr, the motility of 20 individual cells each group was measured. * $p < 0.002$ as compared with the s-1 cells treated without Psi-tectorigenin by Student's t-test. Each bar represents the mean \pm S.E.

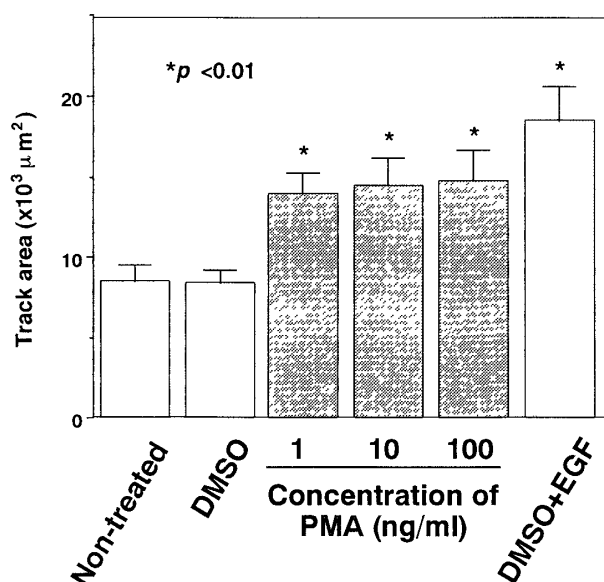


Fig. 8 Effect of signal transduction (PKC) activator on phagokinesis of s-1 cells. Phagokinetic track assay was performed as described in Materials and Methods. The s-1 cells were treated with Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (1–100 ng/ml) or EGF (100 ng/ml). After 24 hr, the motility of 20 individual cells each group was measured. * $p < 0.01$ as compared with the s-1 cells treated with 0.01% DMSO by Student's t-test. Each bar represents the mean \pm S.E.

運動能はEGF (100 ng/ml) で誘導されるのとはほぼ同等の促進を示した (Fig.8)。

4) Calphostin C処理による変化: EGFにより促進される運動能に対するPKCの作用を明らかにするために, PKCのジアシルグリセロール (DG) 結合部位に作用する微生物由来のPKC阻害剤Calphostin C¹⁶⁾でs-1細胞を処理したところ, EGFで促進される運動能はCalphostin C 20 nMから抑制され, 100, 500 nMの処理では完全に抑制され, EGFの作用は消失していた (Fig. 9)。以上の結果よりEGF受容体自己リン酸化後, PLC γ の活性化によりホスファチジルイノシトール 4, 5-二リン酸 (PIP 2) よりセカンドメッセンジャーであるホスファチジルイノシトール 1, 4, 5-三リン酸 (IP 3) とDGが産生されPKCが活性化されている可能性が示唆された。

5) Wortmannin処理による変化: PLC γ を介する以外のPKC活性化の可能性を検討する

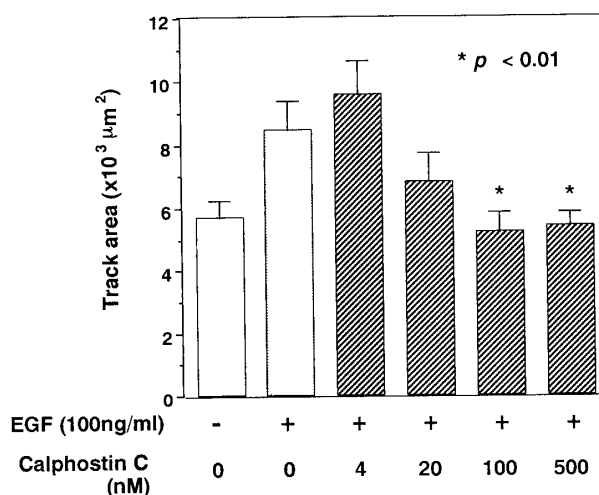


Fig. 9 Effect of signal transduction inhibitor (PKC) on stimulated motility of s-1 cells. Phagokinetic track assay was performed as described in Materials and Methods. The s-1 cells were simultaneously treated with Calphostin C (4–500 nM) and EGF (100 ng/ml). After 24 hr, the motility of 20 individual cells each group was measured. * $p < 0.01$ as compared with the s-1 cells treated without Calphostin C by Student's t-test. Each bar represents the mean \pm S.E.

ために、Phosphatidylinositol 3-kinase(PI 3 K)の阻害剤である Wortmannin¹⁷⁾でs-1細胞を

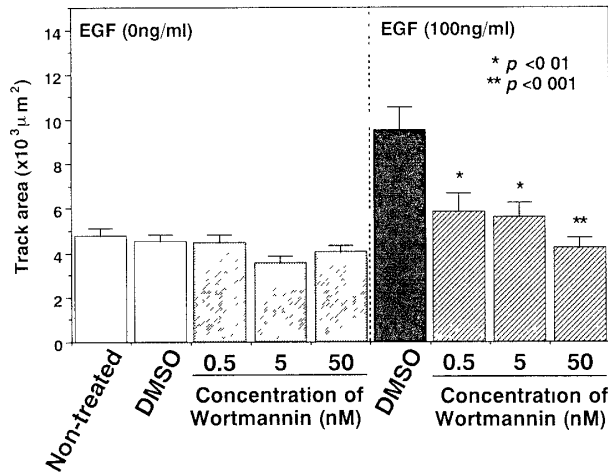


Fig. 10 Effect of signal transduction(PI3K) inhibitor on stimulated motility of s-1 cells. Phagokinetic track assay was performed as described in Materials and Methods. The s-1 cells were simultaneously treated with Wortmannin(0.5-50nM) and EGF(0ng/ml or 100ng/ml). After 24 hr, the motility of 20 individual cells each group was measured. *p<0.01, **p<0.001 as compared with the s-1 cells treated with 0.00025% DMSO by Student's t-test. Each bar represents the mean±S.E.

処理し、運動能に対するPI 3 Kを介する系の影響を検討した。Wortmanninは0.5nMから50nMの濃度でEGFによるs-1細胞の運動能の促進を有意に抑制したが、EGFで刺激していないs-1細胞の運動能には影響を及ぼさなかった(Fig.10)。このことは、EGF処理によりPLCγの活性化によるPI turnoverによりDGが産生されPKCが活性化される以外に、ホスファチジルイノシトール (PI) 代謝の新規経路であるPI 3 Kにより、PIP 2 からホスファチジルイノシトール 3, 4, 5-三リン酸 (PIP 3) が生成され、PKCが活性化される可能性が示唆された。

6. EGFによる細胞内PKC局在変化

s-1細胞をEGFで処理し、1, 5, 10, 30および60分後のPKC細胞内局在の変化を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。EGF処理1分後よりPKCの細胞質から細胞膜への移行がみられ、30分後には細胞膜への局在が最も顕著となっていた (Fig.11)。

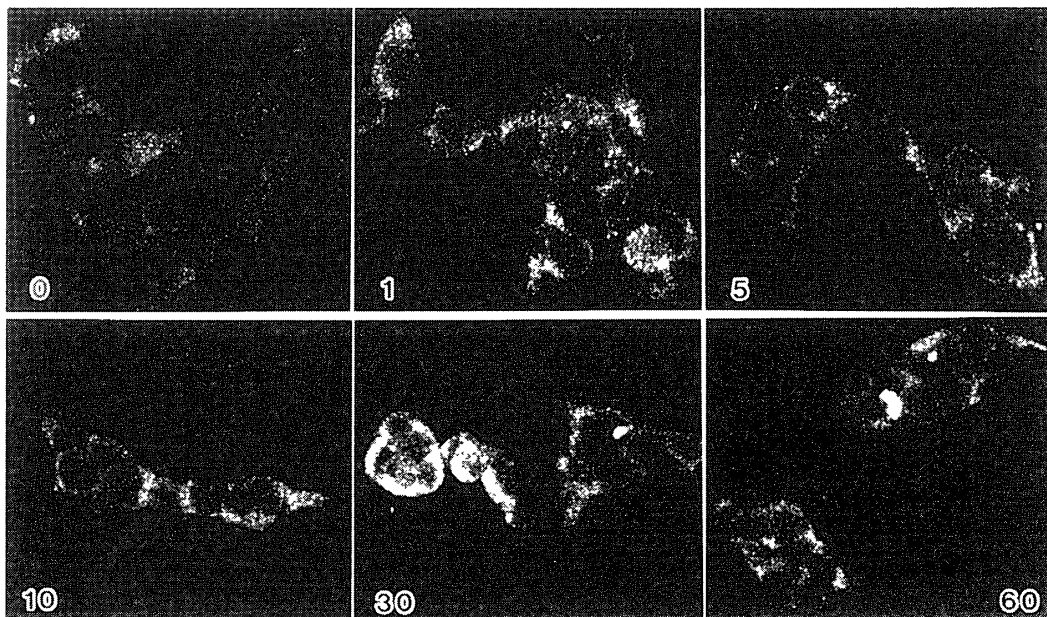


Fig. 11 Translocation of intracellular Protein kinase C in EGF-treated s-1 cells. Confocal laser scan microscopy produced optical sections through s-1 cells. When control cells (0 min) were compared with EGF treated cells (1,5,10,30,60min after addition of 100 ng/ml EGF), translocation can be observed.

考 察

転移成立のプロセスは、(1)癌細胞の原発巣からの遊離にはじまり、(2)脈管内侵入、(3)脈管内移動、(4)標的臓器の内皮への着床、(5)脈管外脱出そして(6)標的臓器での増殖といった各ステップから成ると考えられている^{18),19)}。これらの各ステップにおいて癌細胞側に必要とされる転移関連形質として、(1)ではカドヘリンの機能異常などによる細胞間接着の低下、(2)ではインテグリンなどを介したマトリックス成分に対する接着能、マトリックスメタロプロテイナーゼ(MMP)やプラスミノゲンアクチベーター(PA)、ヘパラーゼなどのマトリックス分解酵素の産生、(3)では血流などの物理的ストレスに対する抵抗性、(4)ではシアリル・ルイスx, シアリル・ルイスa, インテグリン, CD44などを介した血管内皮細胞, 基底膜に対する接着能, 血小板凝集能、(5)では(2)と同様のマトリックス分解酵素の産生、(6)では臓器由来の増殖促進あるいは増殖抑制因子に対する感受性、血管新生能などが挙げられている。このなかで、癌細胞の運動能はとりわけ(1), (2), (5)のステップで関与し、癌転移の成立過程における最も基本的な細胞生物学的性状の一つであると考えられている。また、この様な転移関連形質は発癌当初から癌細胞に備わっているわけではなく、癌細胞は周囲宿主正常細胞や、これらの細胞により産生される様々な増殖因子、サイトカイン、細胞外マトリックス成分および活性酸素などのフリーラジカルの影響を受け、その性格を変えていくと考えられている²⁰⁻²²⁾。本研究では、EGFがEGF受容体を過剰発現しているヒト口腔扁平上皮癌細胞の運動能にどのような影響を及ぼすか検討した。その結果、EGFはパラクリン様式でヒト口腔扁平上皮癌5系の培養細胞株の細胞運動能を増強することが明らかとなり、このうちSAS細胞、HSC-2細胞では自らがEGFを産

生・分泌していることが示された。また、SAS細胞ではEGF受容体を介するオートクリンループが成立し、自らが産生するEGFにより高い運動能を維持する能力を獲得していることが明らかとなった。一般に、癌細胞の運動能に及ぼすEGFの作用として、EGFはパラクリン的にヒト・グリオーマ細胞、胎児性癌細胞やラット乳癌細胞の運動能を刺激すること^{23),24)}、グリオーマ細胞のMMP-9およびMMP-2 (72kDaゼラチナーゼ)の産生を増強すること²³⁾、ヒト扁平上皮癌細胞のウロキナーゼ型PA (uPA)の産生を増強すること²⁵⁾、ヒト大腸癌細胞の細胞膜面上のuPAレセプター (uPAR)数を増加させること²⁶⁾などが、報告されている。また、EGFがヒト口腔癌細胞の転移・浸潤能に及ぼす影響として、当教室の柴田ら²⁷⁾は、今回検索したのと同じ細胞を用いて、EGFがマトリックスメタロプロテイナーゼ9 (MMP-9, 92kDaゼラチナーゼ)やPAなどのマトリックス分解酵素の産生を増強することを報告している。これらのことを考え合わせると、癌細胞を取り巻く微小環境中に存在するEGFが、EGF受容体を介したパラクリン様式のみならずオートクリン様式でも、癌細胞の運動能に加え転移・浸潤能を促進している可能性が強く示唆された。一方、本研究で、EGF非存在下でのSAS細胞の運動能は、SAS細胞が産生するEGFを中和できる量の抗EGF抗体あるいは抗EGF受容体抗体で、有意に抑制されたが、完全に静止させることはできなかった。このことは、SAS細胞がEGF以外のオートクリン様式で働く運動刺激因子を産生している可能性、あるいはレセプター・リガンドというシステムを介さずに、細胞運動を刺激する別のシグナルが関与している可能性を推察させた。また、SAS細胞はクローン細胞株ではないことより上記二つの可能性をもった細胞群が混在していることも考えられた。特にEGF受容体と結合能を持つTGF- α の場合ラット膀胱癌細胞に

TGF- α 遺伝子を導入しTGF- α を分泌させると、非導入癌細胞に比べ細胞運動能の亢進、ならびにゼラチナーゼの産生誘導が認められることが報告されていることより強くその関与が疑われた²⁸⁾。

次に、癌細胞に対する外部からのEGFによるシグナルが、そのレセプターを介し細胞内でどのような分子間連絡により情報を伝え、細胞の運動性応答を引き起こすのかを明らかにするために、運動能のアッセイ系にいくつかのプロテインキナーゼ阻害剤などを用い、EGFにより誘導される運動能の細胞内シグナル伝達経路について検討した。その結果、EGFによる細胞運動の情報伝達はEGF受容体を介したPLC γ 、PKCの活性化が重要であると考えられた。自己リン酸化したEGF受容体のリン酸化チロシンを含む特定のアミノ酸配列を認識し、その部位に結合しレセプターからシグナルを受け取る分子として、PLC γ 、GTPase activating protein (GAP)などの酵素活性をもつものと、Ash/Grb 2, Crk, Shcといったシグナル伝達においてアダプター分子として働くものが報告されている²⁹⁻³²⁾。このうちs-1細胞のEGFによる運動能増強は、まず自己リン酸化したEGF受容体にPLC γ が結合することから始まり、受容体に結合したPLC γ の活性化に伴いイノシトールリン脂質代謝産物であるPIP 2からIP 3とDGへの分解が促進され、次にその下流に位置するPKCの活性化により生じると考えられた。現在、PKCは10個の分子種からなるファミリーを形成し、分子構造と活性化機構の違いからconventional PKC(cPKC, α β I β II γ), novel PKC(nPKC, δ ϵ η θ), atypical PKC(aPKC, ξ λ)と3つのグループに大別されている³³⁾。

それぞれの活性化の機構はいずれもホスファチジルセリン (PS) によることでは共通しているが、cPKCではDG, Ca²⁺に依存し、nPKCは

DG依存, Ca²⁺非依存, aPKCはDG, Ca²⁺に非依存性である³³⁾。今回の実験で用いたPMAとCalphostin Cの性格から、EGFで誘導されるs-1細胞の細胞運動には、DG依存性のcPKCあるいはnPKCの関与が示唆された。また、今回のs-1細胞を用いた細胞内PKCのEGFによる局在の変化を検討した結果では、全てのPKCを認識する抗体を用いたため、PKCのどの分子種の活性化を介しs-1細胞の運動能が促進されているのか断定できなかったが、現在検討中の、特定の分子種に対する単クローン抗体を用いたPKCの局在変化の観察では、cPKCでなく、nPKC δ , ϵ とaPKC ξ の細胞膜への局在化が認められている(結果未発表)。以上のことより、EGF刺激後のPLC γ の活性化を介するs-1細胞の運動能亢進には、PKCファミリーが深く関与し、このうちnPKCのグループが重要な役割を果たしている可能性が高いと考えられた。

一方、PI 3-キナーゼ (PI 3 K) 阻害剤Wortmanninにより運動能の促進が抑制されたことより、PI 3 Kを介する他の経路も関与している可能性が示唆された。PI 3 Kは通常EGF受容体とは結合しないと考えられているが、p85の調節サブユニットのSH 2を利用して、EGF受容体と同じファミリーに属するErbB-3とは結合し、活性化されることが示されている³⁴⁾。また、EGF受容体はホモ二量体を形成するのみならず、ErbB-2, ErbB-3ともヘテロ二量体を形成し、それぞれのチロシンリン酸化を示すことが報告されている^{35),36)}。これらのことからs-1細胞のEGF受容体は、EGF結合後ErbB-3とヘテロ二量体を形成しErbB-3を活性化し、これによってPI 3 Kを活性化している可能性があると考えられた。今後これらの点を明らかにするために、s-1細胞表面にErbB-3の発現があるか否かを確認するとともに、EGF受容体にPI 3 Kが結合できるか否かを明らかにする必要があると考えられた。また、今回検討はしていないが、

PLC γ により産生されるIP 3は細胞内Ca²⁺放出を誘導しその後カルモジュリンキナーゼ(CaMK)を活性化することが知られている。今後この方向へ流れるシグナルについても運動能に対しどのように関与しているかを明らかにする必要があると考えられた。

癌細胞の転移能に関与する悪性形質のうち、運動能はあくまで一つの因子にすぎず、一連の転移のカスケードのなかで癌細胞が会合するさまざまな環境に適応し、転移することに対して出来るだけ都合のいいように自分とその周りの環境を変えることが出来た癌細胞が、最終的に転移巣の形成まで至ると考えられる。また、癌細胞の運動能を刺激する因子としても、多くの増殖因子、サイトカインが知られ、細胞内シグナル伝達系においては、プロテインキナーゼのみならずリン脂質代謝、サイクリックAMP、カルシウムイオンなどが相互に促進と抑制の調節をし、加えてフィードバック機構も存在するなど極めて複雑なものとなっていることが示されて来ている。今後、これらの課題に対しても検討を加えてゆく必要があると考えられた。

結 語

本研究の結果は、癌細胞を取り巻く微小環境中に存在する増殖因子EGFが、癌細胞の転移形成に必要な不可欠な癌細胞の運動能をパラクリン様式およびオートクリン様式で促進することを明らかにした。また、EGFによる細胞運動促進作用に関与する細胞内情報伝達経路として、PLC γ およびPI 3 Kを介するPKCの活性化経路が深く関与している可能性が示された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、終始懇切なご指導と御校閲を賜りました北海道医療大学歯学部口腔外科学第二講座有末眞主任教授、北海道大学医学部癌研究施設病理部門細川真澄男教授、癌研

究施設細胞制御部門守内哲也教授に深甚の謝意を表します。また、終始懇切なご指導と御校閲を賜りました北海道医療大学歯学部口腔外科学第二講座柴田敏之講師、北海道大学医学部癌研究施設細胞制御部門浜田淳一講師ならびに、本研究に対しご協力下さった教室の皆様に厚くお礼申し上げます。

文 献

1. Liotta, L. A., Rao, C. N., and Wewer, U.M.: Biochemical interactions of tumor cells with the basement membrane, *Ann. Rev. Biochem.*, 55: 1037-1057, 1986.
2. Raz, A., and Ben-Ze'ev, A.: Cell-contact and architecture of malignant cells and their relationship to metastasis, *Cancer Met. Rev.*, 6: 3-21, 1987.
3. Nicolson, G. L.: Tumor and host molecules important in the organ preference of metastasis, *Sem. Cancer Biol.*, 2: 143-154, 1991.
4. 永易裕樹, 柴田敏之, 河野 峰, 小西 亮, 奥村一彦, 有末 眞: 上皮成長因子EGFが癌細胞の浸潤, 転移能に及ぼす影響 —第一報, EGF長期間処理による悪性形質獲得の可能性—, *日口外誌*, 41: 682-689, 1985.
5. Kamata, N., Chida, K., Rikimaru, K., Horikoshi, M., Enomoto, S., and Kuroki, T.: Growth inhibitory effects of epidermal growth factor and overexpression of its receptors on human squamous cell carcinomas in culture, *Cancer Res.*, 46: 1648-1653, 1986.
6. Yamamoto, T., Kamata, N., Kawano, H., Shimizu, S., Kuroki, T., Toyoshima, K., Rikimaru, K., Nomura, N., Ishizaki, R., Pastan, I., Gamou, I., and Shimizu, N.: High incidence of amplification of the epidermal growth factor receptor gene in human squamous carcinoma cell lines, *Cancer Res.*, 46: 414-416, 1986.
7. Hayashido, Y., Shirasuna, K., et al.: Effect of epidermal growth factor on invasion of human squamous cell carcinoma cells into collagen gel, *Cancer J.*, 4: 257-261, 1991.
8. Shirasuna, K., Saka, M., Hayashido, Y., Yoshioka, H., Sugiura, T., and Matsuya, T.:

- Extracellular matrix production and degradation by adenoid cystic carcinoma cells: participation of plasminogen activator and its inhibitor in matrix degradation, *Cancer Res.*, 53:147-152, 1993.
9. 高橋喜久雄, 金沢春幸, 秋山行弘, 田崎滋子, 高原正明, 武藤寿孝, 丹沢秀樹, 佐藤研一: ヒト舌癌原発巣より得られた低分化型扁平上皮癌細胞株(SAS)の樹立, *口科誌*, 38:20-28, 1989.
 10. 鎌田伸之: 扁平上皮癌細胞におけるEGF受容体に関する研究, *日口外誌*, 33:683-700, 1987.
 11. 堀越 勝, 木村義孝, 名倉英明, 小野富昭, 伊藤秀夫: 人の歯肉癌由来の細胞株の樹立(第1報), *日口外誌*, 20:100-106, 1974.
 12. 百瀬文雄, 平田章二, 新井田俊雄, 田中信幸, 塩田重利: 3つの口腔扁平上皮癌由来細胞の性状について, *口科誌*, 35:485-496, 1986.
 13. Albrecht-Buehler, G.: The phagokinetic tracks of 3T3 cells, *Cell*, 11:395-404, 1977.
 14. Umezawa, H., Imoto, M., Sawa, T., Isshiki, K., Matsuda, N., Uchida, T., Inuma, H., Hamada, M., and Takeuchi, T. Studies on a new epidermal growth factor-receptor kinase inhibitor, erbstatin, produced by MH-435-hF3, *J Antibiot.*, 39:170-173, 1986.
 15. Nishioka, H., Imoto, M., Sawa, T., Hamada, M., Naganawa, H., Takeuchi, T., and Umezawa, K.: Screening of phosphatidylinositol kinase inhibitors from streptomycetes, *J. Antibiot.*, 43:823-825, 1989.
 16. Takahashi, I., Nakanishi, S., Kobayashi, E., Nakano, H., Suzuki, K., and Tamaoki, T.: Hypericin and pseudohypericin specifically inhibit protein Kinase C: possible relation to their antiretroviral activity, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 165:1207-1212, 1989.
 17. Yano, H., Nakanishi, S., Kimura, K., Hanai, N., Saitoh, Y., Fukui, Y., Nonomura, Y., and Matsuda, Y.: Inhibition of histamine secretion by wortmannin through the blockade of phosphatidylinositol 3-kinase in RBL-2H3 cells, *J. Biol. Chem.*, 268:25846-25856, 1993.
 18. Hynes, R. O. and Lander, A. D.: Contact and adhesive specificities in the associations, migrations, and targeting of cells and axons, *Cell*, 68:303-322, 1992.
 19. Poste, G. and Fidler, I. J.: The pathogenesis of cancer metastasis, *Nature*, 283:139-146, 1980.
 20. Stoker, M. and Gherardi, E.: Regulation of cell movement: the motogenic cytokines, *Biochim. Biophys. Acta*, 1072:81-102, 1991.
 21. Nakajima, M. and Chop, A., M.: Tumore invasion and extracellular matrix degradative enzymes: regulation of activity by organ factor, *Sem. Cancer Biol.*, 2:115-127, 1991.
 22. Okada, F., Hosokawa, M., Hamada, J.-I., Hasegawa, J., Kato, M., Mizutani, M., Ren, J., Takeichi, N. and Kobayashi, H.: Malignant progression of a mouse fibrosarcoma by host cells reactive to a foreign body (gelatin sponge), *Br J Cancer*, 66:635-639, 1992.
 23. Lund-Johansen, M., Bjerkvig, R., Humphrey, P. A., Bigner, S. H., Bigner, D. D. and Laerum, O. D.: Effect of epidermal growth factor on glioma cell growth, migration, and invasion in vitro, *Cancer Res.*, 50:6039-6044, 1990.
 24. Engstrom, W.: Differential effects of epidermal growth factor (EGF) on cell locomotion and cell proliferation in a cloned human embryonal carcinoma-derived cell line in vitro, *J. Cell Sci.*, 86:47-55, 1986.
 25. Niedbala, M. J., and Sartorelli, A. C.: Regulation by epidermal growth factor of human squamous cell carcinoma plasminogen activator-mediated proteolysis of extracellular matrix, *Cancer Res.*, 49:3302-3309, 1989.
 26. Boyd, D.: Examination of the effects of epidermal growth factor on the production of urokinase and the expression of the plasminogen activator receptor in a human colon cancer cell line, *Cancer Res.*, 49:2427-2432, 1989.
 27. 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.
 28. Gavrilovic, J., Moens, G., and Thiery, J. P.: Expression of transfected transforming growth factor α induces a motile fibroblast-like phenotype with extracellular matrix-degrading potential in a rat bladder carcinoma cell line, *Cell Regul.*, 1:1003-1014, 1990.
 29. Pawson, T., and Gish, G. D.: SH2 and SH3

- domains: from structure to function, *Cell*, 71 : 359-362, 1992.
30. Waksman, G., Kominos, D., Robertson, S. C., Pant, N., Baltimore, D., Birge, R. B., Cowburn, D., Hanafusa, H., Mayer, B. J., Overduin, M., Resh, M. D., Riso, C. B., Silverman, L., and Kuriyan, J.: Crystal structure of the phosphotyrosine recognition domain SH2 of v-src complexed with tyrosine-phosphorylated peptides, *Nature*, 358 : 646-653, 1992.
 31. Musacchio, A., Noble, M., Pauptit, R., Wierenga, R., and Saraste, M.: Crystal structure of a Src-homology 3 (SH3) domain, *Nature*, 359 : 851-855, 1992.
 32. Pawson, T., and Schlessinger, J.: SH2 and SH3 domains, *Curr. Biol.*, 3 : 434-442, 1993.
 33. Nishizuka, Y.: Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C, *Science*, 258: 607-614, 1992.
 34. Fedi, P., Pierce, J. H., Fiore, P. P. D., and Kraus, M. H.: Efficient coupling with phosphatidylinositol 3-kinase, but not phospholipase C γ or GTPase-Activating Protein, distinguishes ErbB-3 signaling from that of other ErbB/EGFR family members, *Mol. and Cell. Biol.*, 14 : 492-500, 1994.
 35. Carraway, K. L. III., and Cantley, L. C.: A new acquaintance for ErbB3 and ErbB4: a role for receptor heterodimerization in growth signaling, *Cell*, 78 : 5-8, 1994.
 36. Lemmon, M. A., and Schlessinger, J.: Regulation of signal transduction and signal diversity by receptor oligomerization, *Trends Bio. Sci.*, 19 : 459-463, 1994.