

〔原 著〕

肝細胞増殖因子(HGF/SF)によるヒト口腔扁平上皮癌細胞の
浸潤シグナルの検討

—特に低分子量GTP結合蛋白質Rhoの関与について—

北所弘行

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 of invasive signal transduction of human oral squamous cell
carcinoma cell lines by hepatocyte growth factor / scatter factor
—Especially the relation of small GTP binding protein Rho—

Hiroyuki KITAJO

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

(Chief Prof Makoto ARISUE)

Abstract

To observe the effect of Hepatocyte growth factor / scatter factor (HGF/SF) on the invasion and metastasis of human oral squamous cell carcinoma (SCC) cells, the invasive ability and internal signal transduction were examined. The invasive ability of tumor cells (SAS, HSC-3, Ca9-22) was enhanced dose-dependently by HGF/SF stimulation, and C3 exoenzyme which is a specific inhibitor of Rho activation significantly reduced the invasive ability of SAS cells. The HGF/SF stimulation enhanced the tyrosin phosphorylation of HGF receptors (c-Met) and focal adhesion kinase (FAK^{p125}) of SAS cells, and C3 exoenzyme completely inhibited the activation of FAK^{p125}. It was observed that Rho protein located around the nuclear area translocated to the membrane area and subsequently increased in the cytolysate, following HGF/SF stimulation.

These results suggest that the activation of FAK^{p125} caused by phosphorylation of c-Met may enhance the HGF/SF, inducing invasive ability and that Rho protein possibly regulates the

受付・平成11年9月29日

activation of FAK^{P125} through the translocation itself

Key words Hepatocyte growth factor, Intracellular signal transduction, Invasion, Small GTP binding protein, Oral squamous cell carcinoma

緒 言

口腔癌細胞の持つ浸潤・転移能は、癌治療の予後を左右する重要な因子と考えられている。また、この癌細胞の浸潤・転移能は、周囲環境を構成する宿主細胞が産生する様々なサイトカインや増殖因子によって促進されることも明らかとなってきている。今回、検討に用いた肝細胞増殖因子 (Hepatocyte growth factor, 別名 Scatter factor : HGF/SF) は、当初、肝細胞の増殖促進作用を有するサイトカインとして見出され¹⁻⁴⁾、その後、上皮系細胞に対して増殖促進⁵⁻⁸⁾や運動促進^{6,9-11)}、形態形成^{12,13)}、さらに口腔領域では、歯胚の形態形成に関与していること¹⁴⁾などさまざまな生物学的活性を有するサイトカインであることが解明されてきた。また、近年、宿主線維芽細胞が産生するHGF/SFがパラクリン的に癌-間質相互作用のメディエーターとして癌細胞に作用し、その浸潤・転移能を促進する現象¹⁵⁻²¹⁾や腫瘍血管新生²²⁾などの癌の悪性化に関与していることが報告され注目を集めている。さらに、浸潤・転移を起こす癌細胞ではHGF受容体 (c-Met) が過剰発現していることが知られ^{23,24)}、口腔癌においてもc-Metが過剰発現していることが最近明らかとなってきた²⁵⁾。しかしながら、HGF/SFがヒト口腔扁平上皮癌細胞に対し、どのような影響を及ぼすかについては不明な点が多いままとなっている。一方、癌細胞のもつ運動能は、浸潤・転移に必要な不可欠なものであり、近年、低分子量GTP結合蛋白質Rhoが、アクチン細胞骨格を制御し、細胞の運動や接着などを調節しているキーレギュレーターとして注目され、癌細胞の

浸潤に関与していることが明らかになっている^{26,27)}。また、Rhoは細胞接着斑構成成分であるFAK (Focal adhesion kinase) などの制御に深く関与し、細胞運動能に極めて重要な役割を担っていることが示されている^{27,28)}。

そこで、本研究ではHGF/SFがヒト口腔扁平上皮癌細胞の浸潤・転移能に及ぼす影響とそのシグナル伝達におけるRhoの役割について検討した。

実験材料および方法

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SAS細胞²⁹⁾、Ca9-22細胞³⁰⁾、およびHSC-3細胞³¹⁾の3系を用いた (表1)。また、ラット肺血管内皮細胞 (RLE細胞) は、F344ラットの肺毛細血管より分離されたものを用いた。

表1 ヒト口腔扁平上皮癌細胞株

細胞株	原発巣と培養樹立部位	分化度
SAS	舌癌原発巣	低分化
Ca9-22	下顎歯肉原発巣	高分化
HSC-3	舌癌リンパ節転移巣	低分化

この表は、文献29, 30, 31より引用し作成した。

2. 細胞培養

口腔癌細胞およびRLE細胞を10%の牛胎仔血清 (FBS : 56°C, 30分不活化) および抗生物質ペニシリンGカリウム100u/ml (萬有製薬, 東京), 硫酸ストレプトマイシン100μg/ml (明治製薬, 東京) を含むDulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 培地 (日水製薬, 東京) にて37°C, 5%CO₂, 95%air条件下で培養維持した。

3. 細胞処理

1) HGF/SF刺激

口腔癌細胞のHGF/SF刺激は、ヒト・リコンビナントHGF/SF (rhHGF: R&I SYSTEMS, Mineapolis, MN, USA)を用い、無血清DMEM培地に0~50ng/mlとなるように添加し、24時間培養し行った。

2) C3酵素処理

Rhoの特異的阻害剤であるC3酵素 (SEIKAGAKU, 東京)による口腔癌細胞の処理は、C3酵素7.5 μ g/mlの濃度となるように無血清DMEM培地に添加し、72時間培養し行った。

4. *in vitro*浸潤アッセイ

明渡ら³²⁾の方法に準じた重層培養法により行った。1%ゼラチンでコートした20mmグリッド付60mm dishにRLE細胞を 5×10^5 個播種し、これに10%FBS添加DMEM培地を加え通法にて培養し、dishの底面にconfluentとなり敷石状となった状態で、HGF/SF10ng/mlで24時間刺激した口腔癌細胞 5×10^4 個をRLE細胞層上に播種し、96時間重層培養した。培養終了後、10%ホルマリンにて固定し、RLE細胞層下に浸潤した口腔癌細胞のコロニー数を位相差顕微鏡 (OLYMPUS, 東京)にて観察し計測した。計測方法は、20mmグリッドマス5区画を無作為に選択してコロニー数を計測し、これを単位面積 (cm²) 当りの浸潤癌細胞数として算出し、浸潤能を評価した。

5. ケモタキシスアッセイ

Albiniら³³⁾の方法に準じたケモタキシスアッセイを行った。8 μ m poreのトランスウェルチャンバー (Coster, Cambridge, England)の上室フィルター面にDMEM培地にて30倍希釈したMatrigel™ (Collaborative, 東京)を100 μ l加え (Matrigel 30 μ g/chamber filter), クリーンベンチ内に静置し一晩風乾した。DMEM培地200 μ lにてMatrigel™を1時間膨潤させ、チャンバー上室にHGF/SF 10ng/mlで24時間刺激

した口腔癌細胞 (2×10^5 個/ml) 100 μ lを加え、また、60mm dishにRLE細胞を 2×10^5 個播種し、confluentに増殖した状態で5mlの無血清DMEM培地にて24時間培養した培養上清600 μ lをチャンバー下室に加え、72時間培養した後、10%ホルマリンにて1時間固定した。つぎに、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い、フィルター上面に付着している細胞を除去した後、フィルター下面に付着している細胞を観察した。観察は、位相差顕微鏡下にて1フィルター当たり3視野を無作為に選び、その細胞数を算出し基底膜通過能を評価した。

6. 細胞運動能の評価

口腔癌細胞の運動能の測定は、Albrecht-BuehlerのPhagokinetic track assayに準じて行った³⁴⁾。35mm dishに1% Bovine serum albumin (BSA)でコートしたカバーガラス (18mm \times 18mm)を静置し、さらに金コロイド溶液 (14.5mM AuCl₄H水溶液, 36.5mM Na₂CO₃水溶液, 0.1%ホルマリン水溶液)を加えて静置し、カバーガラス上を金コロイドでコートした後、カバーガラスをDMEM培地にて3回洗浄した。カバーガラスをdish底面に置いた後、HGF/SF10ng/mlで24時間刺激した口腔癌細胞 (2×10^3 個/dish)を播種し、CO₂インキュベーター内で48時間培養した。培養終了後、10%ホルマリンにて1時間固定し、スライドガラスにマウントし、顕微鏡下で標本の細胞を観察した。細胞の運動軌跡は、金コロイドが癌細胞によって貪食された欠損部として観察され、その欠損部の面積を画像解析装置 (XL500; Olympusabio, 東京)で無作為に20個を計測し、その平均値を運動能として評価した。

7. 免疫沈降法およびウエスタン・ブロッティング法

1) サンプル作製

SAS細胞 2×10^6 個を35mm dishに播種し、24時間培養後、培養液を無血清DMEM培地に交換

し4時間培養した。SAS細胞をDMEM培地にて2回洗浄後、無血清DMEM培地にHGF/SF10ng/mlを添加し経時的に細胞を回収し、氷冷phosphate-buffered saline (PBS)で1回洗浄後、modified RIPA buffer (Tris-HCl: 50 mM pH7.4, NP-40: 1%, Sodium deoxycholate: 0.25%, DMSF: 1 mM, Loipeptin: 1 μ g/ml, Na₃VO₄: 1 mM, Aprotinin: 1 μ g/ml) 200 μ lにて細胞を氷上で可溶化し、3,000 rpm 5分間冷却微量遠心機(4°C)にて遠心分離し、細胞溶解液の上清をサンプルとした。

2) 免疫沈降法

細胞溶解液のサンプルにリコンビナント・プロテインAアガロース (Upstate Biotechnology; UBI, Newyork, NY, USA) 50 μ lを加え、4°Cで一晩攪拌した。その後、14,000rpmで5分間遠心分離を行い、上清を免疫沈降用サンプルとした。サンプルをPBSを用いて1 μ g/ μ lに調整後、一次抗体として抗FAK (p125) 抗体 (UBI) 5 μ gまたは抗Metモノクローナル抗体 (UBI) 5 μ g, 二次抗体としてラビット抗マウスIgG抗体 (UBI) 5 μ gを加えて4°Cで一晩攪拌した。その後、さらにリコンビナント・プロテインAアガロース100 μ l加えて4°Cで2時間攪拌した。免疫複合体を形成したサンプルを14,000rpmで5分間遠心分離し、免疫複合体ビーズとした。免疫複合体ビーズを氷冷PBSにて4回洗浄後、免疫複合体ビーズに2 \times Laemmli sample bufferを加えて2倍希釈した後5分間煮沸し、14,000rpmで5分間遠心分離を行い、上清を電気泳動用サンプルとしてSodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) に用いた。

3) ウェスタン・ブロッティング法

サンプルに2 \times Laemmli sample bufferを加えて2倍希釈し5分間煮沸後、14,000rpmで5分間遠心分離を行い、上清を電気泳動用サンプルとして7.5~15% SDS-PAGEを行った。アク

リルアミドゲル中の蛋白質をニトロセルロース膜 (Clear Blot Membrane- ρ TM: アトー, 東京) に転写 (50V, 121mA, 1時間) し、ニトロセルロース膜をBlock AceTM液 (雪印, 札幌) にて室温で60分間ブロッキングを行った。0.05%のTween20を含むPBS (PBS-T) にてニトロセルロース膜を60分間洗浄した後、一次抗体として抗ホスホチロシン抗体 (UBI) 1 μ g/ml, または抗Met抗体 1 μ g/ml, 抗RhoAポリクローナル抗体 (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) 10 μ g/ml, 抗RhoGDIポリクローナル抗体 (Santa Cruz Biotechnology) 3 μ g/mlと4°Cで一晩反応させた。さらに、PBS-Tにてニトロセルロース膜を60分間洗浄後、二次抗体としてHorseradish peroxidase (HRP) 標識抗マウスIgG抗体 (Amersham, 東京) 1 μ g/ml, またはHRP標識抗ラビットIgG抗体 (Amersham) 1 μ g/mlと室温で1時間反応させた。PBS-Tにてニトロセルロース膜を60分間洗浄後、ECLTM (Amersham) とニトロセルロース膜を室温で1分間反応させ、Highper-film ECLTM (Amersham) に露光させた。

8. 共焦点レーザー顕微鏡観察

SAS細胞 5×10^5 個を60mm dishに播種し、24時間培養後、培養液を無血清として4時間培養した。SAS細胞をDMEM培地にて2回洗浄後、無血清DMEM培地にHGF/SF10ng/mlを添加し経時的に刺激した。細胞をPBS-Tにて1回洗浄後、3.7%ホルムアルデヒド-PBSにて30分間細胞の固定を行った。PBS-Tにて5分間洗浄後、0.1% TritonX-PBSにて3分間処理し、PBS-Tにて5分間洗浄後、1% BSA-PBSにて室温で1時間ブロッキングを行った。PBS-Tにて5分間洗浄後、一次抗体として抗RhoAモノクローナル抗体 (Santa Cruz Biotechnology) 10 μ g/mlを用いて4°Cで一晩反応させた。つぎに、PBS-Tにて60分間洗浄後、二次抗体としてFluorescein isothiocyanate (FITC) 標識抗マ

ウスIgG抗体 (Santa Cruz Biotechnology) 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を用いて室温で1時間反応させ、免疫蛍光染色を行った。PBS-Tにて細胞を60分間洗浄後、共焦点レーザー स्क्यान顕微鏡 (Confocal Laser Scanning Microscope: CLSM, Leica TCS 4D, Leica, 東京)を用いて、励起レーザー波長488nm, 蛍光波長530nmにて観察した。

9. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

SAS細胞を10cm dishに 5×10^6 個播種し、Subconfluentになった状態で、培養液を無血清として4時間培養した後、細胞をHGF/SF10 ng/ml刺激した。細胞をPBSにて洗浄後、TRIzol Reagent (GIBCO BRL, 東京)を用いてTotal RNAを抽出した。Total RNA量は、吸光度計BioSpec-1600 (島津, 京都)を用いて計測した。Total RNAからOLIGO(dt) (GIBCO BRL)および逆転写酵素 (M-MLV Reverse Transcriptase: GIBCO BRL)にてc-DNAを作成し、PCR Reagent System (GIBCO BRL)を用いてサーモライン テンプレートロニック サーマルサイクラー (THERMOLYNE, 東京)にて増幅を行った。PCRプライマーは、Human RhoA (GIBCO BRL)を用い、25サイクル (94°C 1min, 50°C 1min, 72°C 1min)を行った。PCR産物を2%アガロースゲル (0.01%エチジウムブロマイド) (岩井化学薬品, 東京)で電気泳動後、トランスイルミネーター (フナコシ, 東京)で観察した。また、Total RNAの指標として、ハウスキーピング遺伝子であるGAPDHを用いた (表2)。

表2 PCR primers

Human RhoA	
5'primer	5'-ATGCGGTTAATTTTGAAGTG-3'
3'primer	5'-CTAGAAAGAAGCAAGAAGTT-3'
Human GAPDH	
5'primer	5'-CAAGATGGTGAAGGTCGGTGT-3'
3'primer	5'-GGGTTTCTTACTCCTTGGAGG-3'

10. 統計

得られた結果は、平均値 \pm 標準偏差で表示した。また、有意差検定は、Student-t検定を用い、 $p < 0.01$ をもって有意とした。

結 果

1. HGF/SFが口腔癌細胞の浸潤能に及ぼす影響

口腔癌細胞をHGF/SF 10ng/mlで24時間刺激し、ラット肺血管内皮細胞を用いた *in vitro* 浸潤アッセイにてHGF/SF刺激による口腔癌細胞の浸潤能の影響を検討した結果、いずれの口腔癌細胞も1.3~2倍の浸潤能の促進を有意に認めた (図1)。また、MatrigelTMを用いたBoyden chamber法にてHGF/SFによる口腔癌細胞の再構成基底膜通過能への影響を検討した結果、SAS細胞のみ1.4倍の有意な亢進が認められたが、他2系の口腔癌細胞に有意な差は認められなかった (図2)。そこで、HGF/SF刺激に最も高い浸潤能の亢進を示したSAS細胞を用いて、HGF/SF刺激濃度 (1, 5, 10, 50ng/ml)のの違いによる影響を検討した結果、SAS細胞

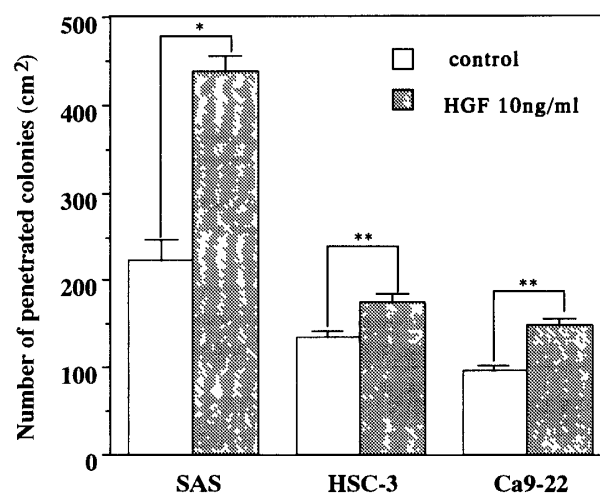


図1 HGF/SFによるヒト口腔扁平上皮癌細胞の血管内皮細胞層下への浸潤能の影響
ヒト口腔扁平上皮癌細胞をHGF/SF 10ng/mlにて24時間刺激した後、*in vitro*浸潤アッセイを行い検討した。

* $p < 0.001$ ** $p < 0.01$

胞では, *in vitro* 浸潤アッセイにて濃度依存的に浸潤能の有意な促進が認められた (図3)。

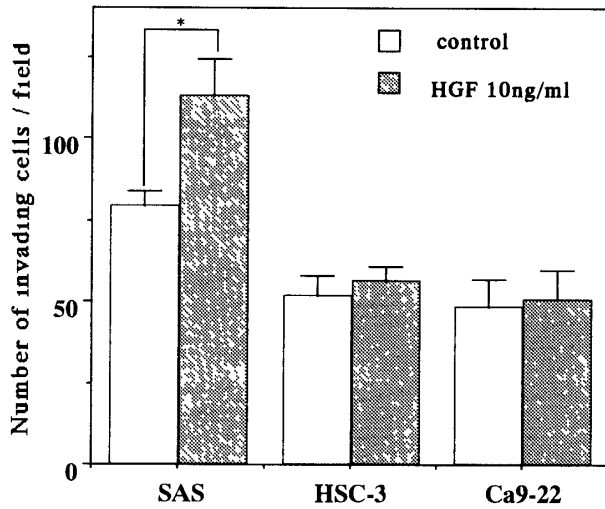


図2 HGF/SFによる口腔扁平上皮癌細胞の再構成基底膜通可能への影響

ヒト口腔扁平上皮癌細胞をHGF/SF 10ng/mlにて24時間刺激した後, ケモタキシス アッセイを行い検討した。なお, チャンバーフィルターをMatrigel (30 μ g/Filter) にてコートして行った。

* p<0.001

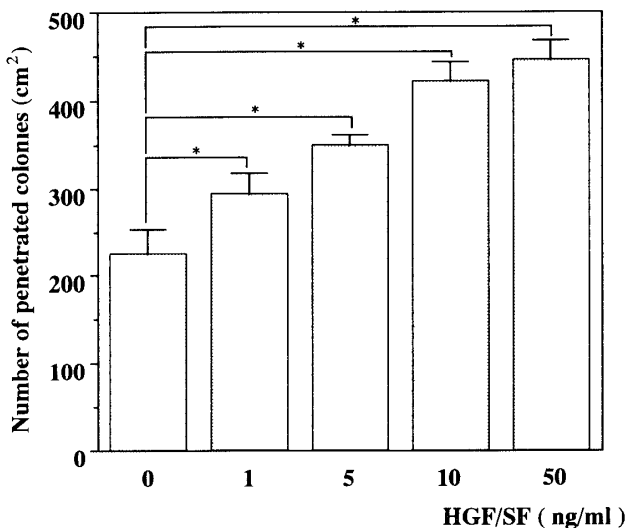


図3 HGF/SFによるSAS細胞の血管内皮細胞層下への浸潤能

SAS細胞をHGF/SF各濃度にて24時間刺激した後, *in vitro* 浸潤アッセイを行い検討した。

* p<0.01

2. HGF/SFが口腔癌細胞の運動能に及ぼす影響

phagokinetic track assayにてHGF/SF刺激による口腔癌細胞の運動能の影響を検討した結果, SAS細胞のみに1.5倍の運動能の亢進が有意に認められたが, 他2系の口腔癌細胞に有意な差は認められなかった(図4)。そこで, HGF/SF刺激に最も高い浸潤能の亢進を示したSAS

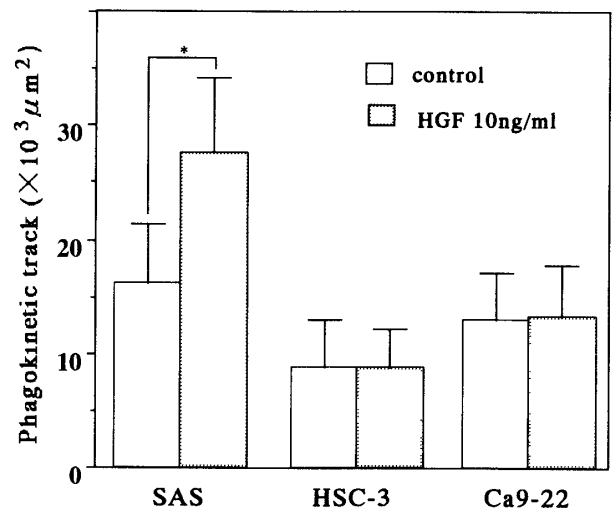


図4 HGF/SFによるヒト口腔扁平上皮癌細胞の運動能への影響

ヒト口腔扁平上皮癌細胞をHGF/SF 10ng/mlにて24時間刺激した後, phagokinetic track assayを行い検討した。

* p<0.01

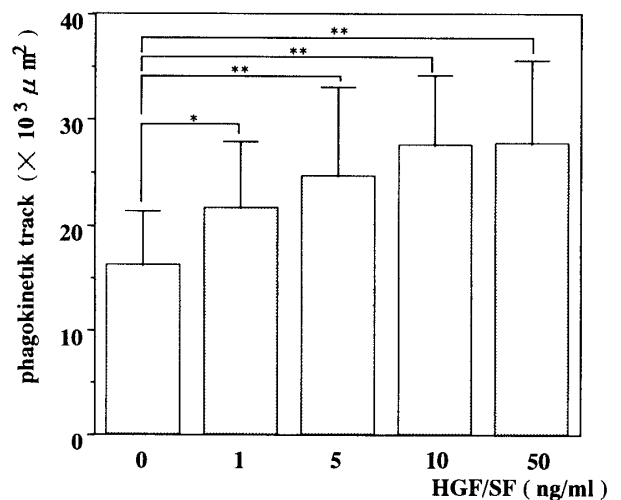


図5 HGF/SFによるSAS細胞の運動能への影響
SAS細胞をHGF/SF各濃度にて24時間刺激した後, phagokinetic track assayを行い検討した。

* p<0.05 ** p<0.01

細胞を用いて、HGF/SF刺激濃度(1, 5, 10, 50ng/ml)の違いによる影響を検討した結果、SAS細胞の運動能は、濃度依存的に有意に亢進するのが観察された(図5)。

3. C3酵素処理によるSAS細胞の浸潤能・運動能の変化

HGF/SFによる口腔癌細胞の浸潤能の促進にRhoが関与するか否かを検討するために、Rhoの特異的阻害剤であるC3酵素処理によるSAS細胞のHGF/SF刺激による浸潤能および運動能への影響を検討した。HGF/SF刺激により亢進したSAS細胞の浸潤能は、C3酵素処理により有意に抑制された(図6)。また、HGF/SF非刺激のSAS細胞をC3酵素処理したところ、この運動能も有意に抑制された(図7)。これらの結果より、SAS細胞のHGF/SFによる運動能の亢進メカニズムに、Rhoが関与していることが示唆された。また、SAS細胞はHGF/SF非刺激においてもRhoが関与し、その運動能が亢進されている可能性が示唆された。

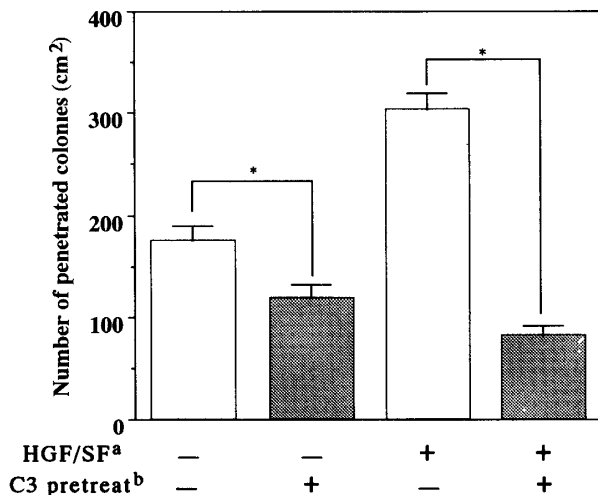


図6 C3酵素処理によるHGF/SF刺激されたSAS細胞の血管内皮細胞層下への浸潤能抑制

C3酵素処理したSAS細胞をHGF/SF 10ng/mlにて24時間刺激した後、*in vitro*浸潤アッセイを行い検討した。

a HGF/SF 10ng/ml 24時間刺激

b C3酵素7.5μg/ml 72時間処理

* p<0.001

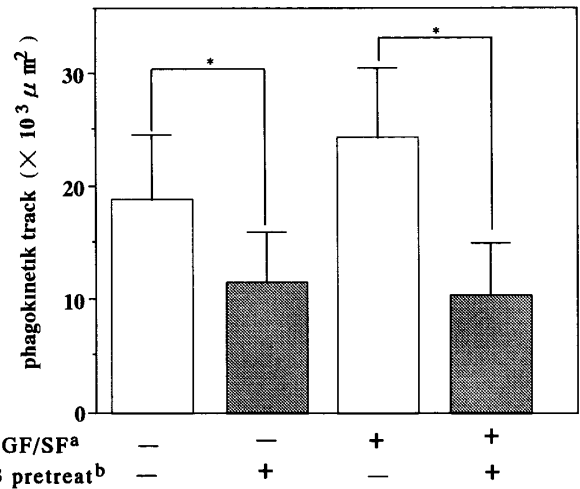


図7 C3酵素処理によるSAS細胞の運動能抑制

C3酵素処理したSAS細胞をHGF/SF 10ng/mlにて24時間刺激した後、phagokinetic track assayを行い検討した。

a HGF/SF 10ng/ml 24時間刺激

b C3酵素7.5μg/ml 72時間処理

* p<0.01

4. HGF/SF刺激がSAS細胞のHGF受容体(c-Met)およびFAK^{p125}のチロシンリン酸化に及ぼす影響

FAK^{p125}が、HGF/SFによるSAS細胞の浸潤能に関与しているか否かを検討した。SAS細胞をHGF/SF10ng/mlで刺激した後、HGF受容体であるc-MetおよびFAK^{p125}のチロシンリン酸化を免疫沈降法とウエスタン・ブロッティング法により検討した結果、HGF/SF刺激後5分よりc-Metのチロシンリン酸化の亢進が認められた(図8A)。また、FAK^{p125}のチロシンリン酸化は、HGF/SF刺激後30分をピークとする経時的な亢進が認められた(図8B)。これらの結果よりHGF/SF刺激の細胞内シグナルは、SAS細胞のHGF受容体(c-Met)を介し、FAK^{p125}を活性化し伝達される可能性が示唆された。

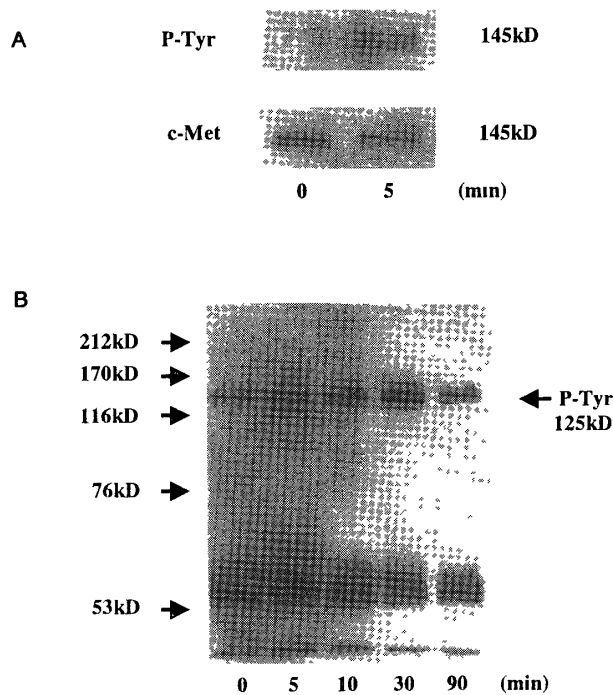


図8 SAS細胞におけるHGF/SFによるHGF受容体(c-Met)およびFAK^{p125}のチロシンリン酸化への影響

A HGF/SF受容体(c-Met)のチロシンリン酸化
抗Met抗体を用いた免疫沈降法を行った後、抗ホスホチロシン抗体および抗Met抗体を用いたウエスタンブロッティングを行い検討した。

P-Tyr チロシンリン酸化
B HGF/SF 10ng/ml刺激によるSAS細胞のFAK^{p125}のチロシンリン酸化
抗FAK抗体を用いた免疫沈降法を行った後、抗ホスホチロシン抗体を用いたウエスタンブロッティングを行い検討した。

5. C3酵素処理がSAS細胞のFAK^{p125}チロシンリン酸化に及ぼす影響

HGF/SF刺激によるHGF受容体のチロシンリン酸化後のシグナルがFAK^{p125}に伝達される過程で、Rhoが関与するか否かを明らかにするためにHGF/SF刺激後のFAK^{p125}チロシンリン酸化のC3酵素処理による変化を免疫沈降法とウエスタン・ブロッティング法により検討した。その結果、HGF/SF刺激によるSAS細胞のFAK^{p125}のチロシンリン酸化の亢進は、C3酵素処理により減弱されるのが観察された(図9)。この結果より、HGF/SF刺激の細胞内シグナル伝達においてFAK^{p125}の上流にRhoが存在し制

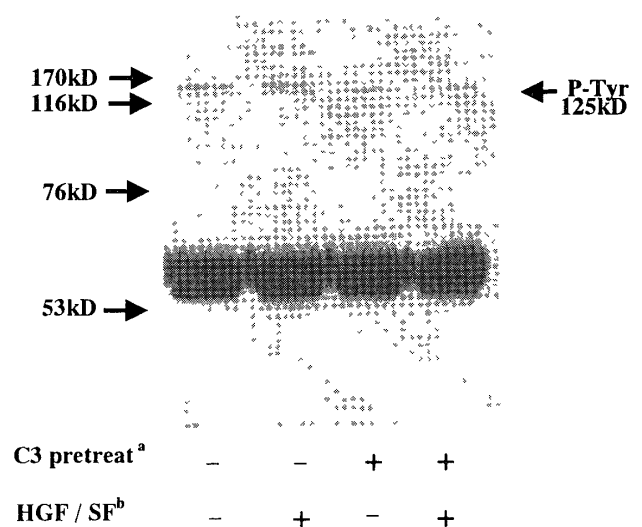


図9 C3酵素処理SAS細胞におけるFAK^{p125}のチロシンリン酸化への影響

抗FAK抗体を用いた免疫沈降法を行った後、抗ホスホチロシン抗体を用いたウエスタンブロッティングを行い検討した。

P-Tyr チロシンリン酸化 a C3酵素7.5μg/ml 72時間処理 b HGF/SF 10ng/ml 30分刺激

御している可能性が示唆された。

6. HGF/SF刺激によるSAS細胞のRhoの変化

HGF/SF刺激後のSAS細胞を経時的に回収し、可溶化後、この上清中に含まれるRhoの蛋白質質量の変化をウエスタン・ブロッティング法にて観察した。その結果、Rhoが不活性型から活性化型に変換する際に抑制的に作用するGDP解離抑制蛋白質(RhoGDI)に変化は認められなかったが、RhoサブファミリーであるRhoAは、HGF/SF刺激後30分をピークとして経時的に可溶化分画中に増加するのが認められた(図10)。

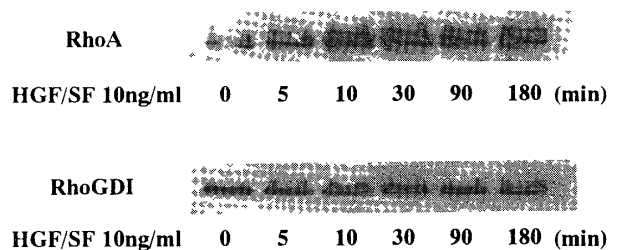


図10 SAS細胞におけるHGF/SF刺激によるRhoの変化

抗RhoA抗体および抗RhoGDI抗体を用いたウエスタンブロッティングを行い検討した。

7. HGF/SF刺激がSAS細胞のRhoのmRNAに及ぼす影響

SAS細胞をHGF/SF10ng/ml刺激した後、経時的にRNAを回収し、RhoのmRNAをRT-PCRにより増幅しその変化を検索した。その結果、SAS細胞のRhoのmRNAの発現は、観察した24時間では変化が認められなかった。また、SAS細胞のRhoのmRNAの発現は、HGF/SF非刺激の状態においても発現されており、常時Rhoが産生されている可能性が示唆された(図11)。なお、PCRサイクル数(25, 30, 35サイクル)を変化させても同様の結果が観察された。

8. HGF/SF刺激がSAS細胞のRhoの細胞内局在に及ぼす影響

HGF/SF刺激によるSAS細胞のRhoの細胞内局在変化を抗RhoA抗体を用いた免疫蛍光染色後、共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。Rhoは、HGF/SF刺激前では、核周囲に局在し、HGF/SF刺激により核周囲より細胞膜へ経時的にトランスロケーションするのが認められた(図12)。この結果は、HGF/SF刺激によるRhoの蛋白質量が細胞可溶化分画において増加する現象と相関しており、細胞可溶化分画中のRhoの蛋白質量の増加は、核周囲から細胞質側への局在変化によるものと推察された。

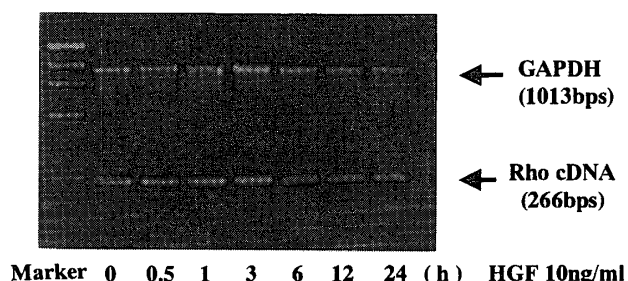


図11 SAS細胞におけるHGF/SFによるRho mRNAへの影響

SAS細胞をHGF/SF 10ng/ml刺激を行い、Total RNAを抽出して逆転写し、c-DNAを作製した後、PCRを25サイクル(94°C 1mn, 72°C 1mn)行いRho mRNAを検討した。

Marker ΦX174-Hae III digest

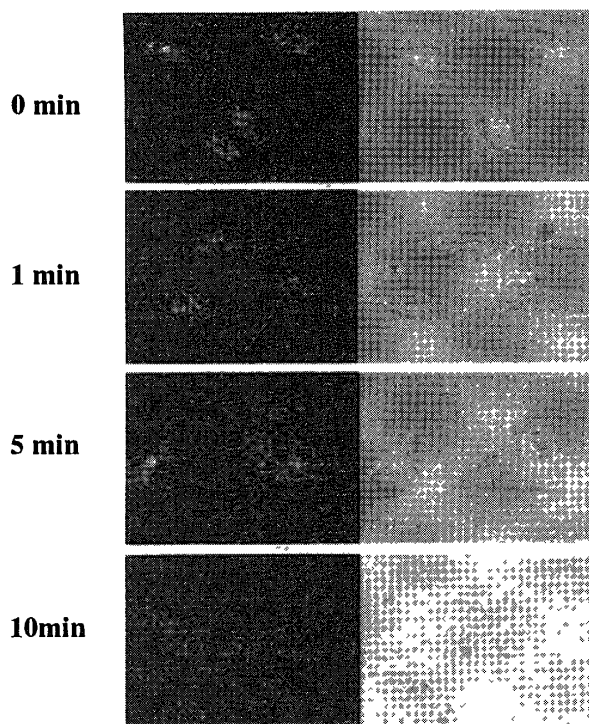


図12 SAS細胞におけるHGF/SFによるRhoの局在変化

SAS細胞をHGF/SF 10ng/ml刺激し、抗RhoA抗体を用いた免疫蛍光染色を行いRhoの局在変化を共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。左側は共焦点レーザー顕微鏡像、右側は微分干渉像を示した。

考 察

癌転移の成立は、癌細胞の原発巣からの遊離にはじまり、脈管内移動、標的臓器への着床、脈管外脱出そして標的臓器での増殖といった一連の過程を経て成り立つと考えられている。このなかで、癌細胞の浸潤能・運動能などはとりわけ重要な役割を果たしていると考えられている。また、このような癌細胞の浸潤能・転移能は、発癌当初から癌細胞に備わっているわけではなく、発育の過程において、宿主正常細胞やそれらによって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ならびに活性酸素などのフリーラジカルなどの影響を受けて獲得されることが明らかにされてきている。最近になり、癌細胞から産生・分泌されて

いるTGF α , TGF β およびIL-1などは, 癌細胞周囲の線維芽細胞に作用してそのHGF/SF mRNAレベルを上昇し, HGF/SFの分泌を促進しているとの報告があり^{16,17)}, HGF/SFが癌-間葉相互作用をメディエートする重要な因子であることが明らかにされてきている。特に, 今回の研究に使用したヒト口腔扁平上皮癌細胞は, IL-1を分泌し, そのIL-1が線維芽細胞のHGF/SF mRNAレベルを上昇させ, 線維芽細胞のHGF/SFの産生量を促進していることが示されてきている¹⁶⁾。そこで本研究では, HGF/SFがヒト口腔扁平上皮癌細胞の浸潤能・転移能に及ぼす影響を明らかにするために, その浸潤シグナルの検討を行った。

本研究において3系のヒト口腔扁平上皮癌細胞にHGF/SF刺激を加えたところ, *in vitro*浸潤アッセイにおいて3系とも有意な浸潤能の促進が認められ, このうちSAS細胞では, phagokinetic track assayにおける運動能の有意な亢進とMatrigelTMを用いたBoyden chamber法にて再構成基底膜通過能の有意な亢進が観察された。さらに, SAS細胞をHGF/SF刺激した場合, 濃度依存的に浸潤能と運動能が連動して亢進され, 今回結果には示していないが, HGF/SF刺激によるSAS細胞の基質接着性に変化が認められなかったことより, SAS細胞の浸潤能の亢進は, 主として細胞運動能の亢進により生じている可能性が高いと推察された。そこで, 本研究では, 以下SAS細胞を用いてHGF/SF刺激による浸潤シグナルの検討を行った。

HGF/SFによる多様な生物活性は, すべてc-met癌原遺伝子でコードされる蛋白質であるHGF受容体(c-Met)にHGF/SFが結合し, このチロシンリン酸化により伝達されることが明らかとなっている^{35,36)}。一方, 最近, 細胞増殖, 細胞運動, 細胞形態および細胞分裂などには, 細胞骨格の機能が大きく関与し注目されている。Focal adhesion kinase(FAK)は, 細胞接着

斑に局在するチロシンキナーゼであり, FAKおよびそのリガンドであるパキシリンのチロシンリン酸化が, 細胞骨格の編成と癌細胞の細胞運動に重要であることが示されてきている²⁷⁾。また, FAKは転移を来した癌患者の原発腫瘍を試料としたウエスタン・ブロッティング法によりFAKの蛋白レベルが転移を起こさなかった腫瘍よりも転移を起こした腫瘍の方で上昇していたことより, 癌の転移マーカーとなりうるとの報告もなされている³⁷⁾。本研究の結果, HGF/SF刺激により, SAS細胞のc-Metのチロシンリン酸化が認められたことより, c-Metの活性化により, その下流にシグナルが伝達されていると考えられた。また, c-Metの活性化に伴い, FAKのチロシンリン酸化の亢進が認められたことより, HGF/SFはSAS細胞においてc-Metを介してFAKを活性化している可能性が示唆された。なお, 結果では示していないが, FAKのHGF/SF刺激0~90分間に蛋白量の変化は認められなかった。

近年, 低分子量GTP結合蛋白質であるRhoは, 細胞運動の基盤にある細胞内のアクトミオシン系を介して, 細胞運動^{27,28,38)}, 細胞接着^{38,39)}, 細胞質分裂の制御⁴⁰⁾, 癌細胞の浸潤・転移^{26,27)}および転写調節^{41,42)}に関係していることが示されている。また, Rhoはポツリヌス菌の産生する菌体外酵素(C3酵素)により, そのエフェクター領域であるアスパラギン酸残基を特異的にADPリボシル化されることによって機能を阻害されることが明らかにされている⁴³⁾。明渡ら²⁷⁾は, ラット腹水肝癌細胞(rat ascites hepatoma cell: AH細胞)をリゾフォスファチジン酸(lysophosphatidil acid: LPA)で刺激するとFAKのチロシンリン酸化の亢進を認め, C3酵素にて前処理したAH細胞では, そのチロシンリン酸化を認めず, また癌細胞の浸潤も阻止されたことよりRhoの下流にFAKが位置することを示唆している。またRankinら⁴⁴⁾は, Swiss 3

T3細胞では、ボンベジンやエンドセリンによりFAKとパキシリンのチロシンリン酸化が亢進するが、C3酵素処理したSwiss 3T3細胞ではFAKとパキシリンのチロシンリン酸化が抑制されたことより、Rhoの下流にFAKおよびパキシリンが位置することを示唆している。本研究でヒト口腔扁平上皮癌細胞においても、C3酵素処理によりSAS細胞のHGF/SF刺激による浸潤能と運動能の亢進が抑制された。またHGF/SF非刺激のSAS細胞をC3酵素処理することによってもその浸潤能と運動能が抑制されるのが観察された。さらに、C3酵素処理により、SAS細胞のFAK^{P125}のチロシンリン酸化が減弱するのが観察された。これらの結果より、SAS細胞のHGF/SF刺激による浸潤能と運動能の亢進にRhoが深く関与し、RhoはFAK^{P125}の活性化を制御している可能性が示唆された。さらに、SAS細胞ではHGF/SF非刺激でもC3酵素処理により、その浸潤能、運動能が抑制されたことより、他の因子によりRhoが恒常的に活性化されている可能性が示唆された。すなわち、SAS細胞はEpidermal growth factor (EGF)⁴⁵⁾やTransforming growth factor- β (TGF- β)⁴⁶⁾を産生し、オートクリンループにてその浸潤能、運動能が亢進されていることより、これらの増殖因子のシグナルがRhoを介して行われている可能性が推察された。

Rhoは、不活性型のGDP結合型Rhoから活性型のGTP結合型Rhoに変換することによって活性化し、不活性型のGDP型Rhoは、一般にRhoGDIというGDP解離抑制蛋白質とRho-RhoGDI複合体として存在し、この複合体が解離することより、SmgGDS、DblなどのGDP/GTP交換反応促進活性をうけてGTP結合型に変換し、標的蛋白質に結合して、その蛋白質を活性化することが明らかとなっている⁴⁷⁾。また、GTP結合型Rhoは、その後GTPase活性促進蛋白質 (GAP) の作用によりGDP型Rhoとなり、

再びRhoGDIと複合体を形成するサイクルによって作用することが示されてきている⁴⁷⁾。そこで本研究では、HGF/SF刺激後のRhoの変化を明らかにするために、HGF/SF刺激後のSAS細胞を経時的に回収し、可溶化後、この上清中に含まれるRhoおよびRhoGDIの蛋白量と、SAS細胞のRhoのmRNA量の変化を検討した。その結果、RhoGDIの蛋白量に変化は認められなかったが、RhoサブファミリーであるRhoAが細胞可溶化分画中にHGF/SF刺激後5分より増加するのが観察された。また、RhoのmRNAはHGF/SF非刺激においても発現されており、その発現量はHGF/SF刺激後観察した24時間一定していた。以上の結果より、HGF/SF刺激によりRhoが産生され、細胞可溶化分画中にRho蛋白質が増加するのではなく、RhoのmRNAが恒常的に一定に発現されていたRT-PCR法の結果と考えあわせると、SAS細胞ではRhoが常に産生され、そのRhoがHGF/SF刺激により細胞可溶化分画中に移動した可能性が強いと推察された。腎上皮細胞 (MDCK細胞) や神経細胞などを用いた諸家らの報告⁴⁸⁻⁵¹⁾でも、Rhoは静止期には細胞質に存在し、活性期には細胞膜に移動することが観察されている。そこで、抗RhoA抗体を用いた免疫蛍光染色後、共焦点レーザー顕微鏡にてSAS細胞におけるHGF/SF刺激後のRhoの局在変化を観察したところ、Rhoが核周囲より経時的に細胞膜に局在変化しているのが観察された。この結果より、HGF/SF刺激後SAS細胞のRhoは細胞膜に移行し活性化されている可能性が推察された。しかしながら、RhoGDIの蛋白量に変化が認められなかった点や今回結果には示していないが、C3酵素処理によりRhoの蛋白量が減少する現象がSAS細胞で観察されており、また、Rhoの作用様式およびヌクレオチド非結合型RhoのようにRhoGDIが結合しないRhoの存在が示される⁵²⁾などRhoの存在様式自体に不明な点がまだ

多くあり、今後さらに検討を進める必要があると考えられた。また、本研究ではSAS, Ca9-22, HSC-3細胞の3系の培養株を用い、HGF/SFによる浸潤・転移能の促進とそのシグナル伝達を検討したが、SAS細胞のみがin vitro浸潤アッセイ、Matrigel™を用いたBoyden chamber法にて浸潤能の有意な促進とPhagokinetic track assayによる運動能の有意な促進を示し、他の2系ではHGF/SFにより、SAS細胞の様な促進効果は観察されなかった。この理由として、HGF/SF受容体(c-Met)の発現量の違い、FAK, Rhoなどの細胞内シグナル伝達系の違いなどが推察されるが、その比較検討は本研究では行っておらず、今後さらに検討が必要であると考えられた。特に、SAS細胞の浸潤・転移能が、HGF/SFにより促進されるシグナル伝達がある程度解明された現在、これを基にHGF/SFにより反応性の低い他の系の細胞株との相違を比較検討することは、ヒト口腔扁平上皮癌細胞がSAS細胞の様な悪性形質を獲得する機序の一端を明らかにする可能性があると考えられ、その検討が今後の重要な課題であると考えられた。

結 論

1. HGF/SFは、ヒト口腔扁平上皮癌細胞(SAS, Ca9-22, HSC-3)の浸潤能を有意に促進した。また、このうちSAS細胞では運動能も有意に促進した。
2. SAS細胞のC3酵素処理により、HGF/SF刺激による浸潤能および運動能の促進効果は消失した。
3. HGF/SF刺激によりSAS細胞のHGF受容体(c-Met)およびFAK^{P125}のチロシンリン酸化が亢進し、C3酵素処理によりFAK^{P125}のチロシンリン酸化が減弱した。
4. HGF/SF刺激によりSAS細胞のRhoの蛋白量は、経時的に増加したが、mRNAには変化

は認められなかった。

5. SAS細胞のRhoの細胞内局在は、HGF/SF刺激により核周囲より細胞膜に移行する像が観察された。

以上のことより、HGF/SFによるSAS細胞の浸潤シグナルは、HGF受容体のチロシンリン酸化を介したFAK^{P125}のチロシンリン酸化により伝達され、その制御にRhoが深く関与している可能性が示唆された。また、RhoはHGF/SF刺激により核周囲より細胞膜に移行し、その制御に関与していると推察された。

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助教授、口腔外科学第一講座奥村一彦講師ならびに本研究に対しご協力くださった教室の皆様に厚くお礼申し上げます。

参 考 文 献

1. Nakamura T, Nawa K and Ichihara A Partial purification and characterization of hepatocyte growth factor from serum of hepatectomized rats, *Biochem Biophys Res Commun*, **122** 1450-1459, 1984.
2. Nakamura T, Teramoto H and Ichihara A Purification and characterization of a growth factor from rat platelets for mature parenchymal hepatocytes in primary cultures, *Proc Natl Acad Sci USA*, **83** 6489-6493, 1986.
3. Nakamura T, Nawa K, Ichihara A, et al Purification and subunit structure of hepatocyte growth factor from rat platelets, *FEBS Lett*, **224** 311-316, 1987.
4. Nakamura T, Nishizawa T, Hagiya M, Seki T, et al Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor, *Nature*, **342** 440-443, 1989.

5. Igawa T, Kanda S, Kanetake H, et al Hepatocyte growth factor is a potent mitogen for cultured rabbit renal tubular epithelial cells, *Biochem Biophys Res Commun*, **174** : 831-838, 1991.
6. Matsumoto K, Hashimoto K, Yoshikawa K, et al Marked stimulation of growth and motility of human keratinocytes by hepatocyte growth factor, *Exp Cell Res*, **196** : 114-120, 1991.
7. Rubin JS, Chan A M, Bottaro DP, Burgess WH, et al A broad-spectrum human lung fibroblast-derived mitogen is a variant of hepatocyte growth factor, *Proc Natl Acad Sci USA*, **88** : 415-419, 1991.
8. Morimoto A, Okamura K, Hamanaka R, et al Hepatocyte growth factor modulates migration and proliferation of human microvascular endothelial cells in culture, *Biochem Biophys Res Commun*, **179** : 1042-1049, 1991.
9. Furlong RA, Takehara T, Taylor WG, et al Comparison of biological and immunochemical properties indicates that scatter factor and hepatocyte growth factor are indistinguishable *J Cell Sci*, **100** : 173-177, 1991.
10. Konishi T, Takehara T, Tsuji T, et al Scatter factor from human embryonic lung fibroblasts is probably identical to hepatocyte growth factor, *Biochem Biophys Res Commun*, **180** : 765-773, 1991.
11. Weidner KM, Arakaki N, Hartmann G, et al Evidence for the identity of human scatter factor and human hepatocyte growth factor, *Proc Natl Acad Sci USA*, **88** : 7001-7005, 1991.
12. Montesano R, Matsumoto K, Nakamura T, et al Identification of fibroblast-derived epithelial morphogen as Hepatocyte growth factor, *Cell*, **67** : 901-908, 1991.
13. Tsarfaty I, Resau JH, Rulong S, et al The met proto-oncogene receptor and lumen formation, *Science*, **257** : 1258-1261, 1992.
14. Tabata MJ, Kim K, Liu J, et al Hepatocyte growth factor is involved in the morphogenesis of tooth germ in murine molars, *Development*, **122** : 1243-1251, 1996.
15. Matsumoto K, Date K, Shimura H, et al Acquisition of invasive phenotype in gallbladder cancer cells via mutual interaction of stromal fibroblasts and cancer cells as mediated by hepatocyte growth factor, *Jpn J Cancer Res*, **87** : 702-710, 1996.
16. Matsumoto K, Date K, Ohmichi H, et al Hepatocyte growth factor in lung morphogenesis and tumor invasion role as mediator in epithelium-mesenchyme and tumor-stroma interactions, *Cancer Chemother Pharmacol*, **38** : 42-47, 1996.
17. Nakamura T, Matsumoto K, Kiritoshi A, et al Induction of hepatocyte growth factor in fibroblasts by tumor-derived factors affects invasive growth of tumor cells In vitro analysis of tumor-stromal interactions, *Cancer Res*, **57** : 3305-3313, 1997.
18. Weidner KM, Hartmann G, Naldini L, et al Molecular characteristics of HGF-SF and its role in cell motility and invasion, *EXS*, **65** : 311-328, 1993.
19. Sunitha I, Meighen DL, Hartman DP, et al Hepatocyte growth factor stimulates invasion across reconstituted basement membranes by a new human small intestinal cell line, *Clin Exp Metastasis*, **12** : 143-154, 1994.
20. Matsumoto K, Matsumoto K, Nakamura T, et al Hepatocyte growth factor / scatter factor induces tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase (p125FAK) and promotes migration and invasion by oral squamous cell carcinoma cells, *J Biol Chem*, **269** : 31807-31813, 1994.
21. Jeffers M, Rong S and Woude GF Hepatocyte growth factor/scatter factor-met signaling in tumorigenicity and invasion/metastasis, *J Mol Med*, **74** : 505-513, 1996.
22. Rosen EM, Lamszus K, Latterra J, et al HGF/SF in angiogenesis, *Ciba Found Symp*, **212** : 215-226, 1997.
23. Yamashita J, Ogawa M, Yamashita S, et al Immunoreactive hepatocyte growth factor is a strong and independent predictor of recurrence and survival in human breast cancer, *Cancer Res*, **54** : 1630-1633, 1994.
24. Ichimura E, Maeshima A, Nakajima T, et al Expression of c-met/HGF receptor in human non-small cell lung carcinomas in vitro and in vivo

- and its prognostic significance, *Jpn J Cancer Res* **87** 1063-1069, 1996.
25. Marshall DD and Kornberg LJ Overexpression of scatter factor and its receptor (c-met) in oral squamous cell carcinoma, *Laryngoscope*, **108** 1413-1417, 1998.
 26. Yoshioka K, Imamura F, Shinkai K, et al Participation of rho p21 in serum-dependent invasion by rat ascites hepatoma cells, *FEBS Lett*, **372** 25-28, 1995.
 27. Imamura F, Shinkai K, Mukai M, et al Rho-mediated protein tyrosine phosphorylation in lysophosphatidic-acid-induced-tumor-cell invasion, *Int J Cancer*, **65** 627-632, 1996.
 28. Garcia LJ, Rosado JA, Gonzalez A, et al Cholecystokinin-stimulated tyrosine phosphorylation of p125FAK and paxillin is mediated by phospholipase C-dependent and -independent mechanisms and requires the integrity of the actin cytoskeleton and participation of p21rho, *Biochem J*, **327** 461-472, 1997.
 29. 高橋喜久雄, 金沢春幸, 秋山行弘, 他: 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.
 30. 堀越 勝, 木村義孝, 名倉英明, 他: 人の歯肉癌由来の細胞株の樹立(第一報), *日口外誌*, **20** 100-106, 1974.
 31. 百瀬文雄, 平田章二, 新井田俊雄, 他: 3つの口腔扁平上皮癌細胞株の性状について, *口科誌*, **35** 485-496, 1986.
 32. Akedo H, Shinkai K, Mukai M, et al Interaction of rat ascites hepatoma cells with cultured mesothelial cell layers a model for tumor invasion, *Cancer Res*, **46** 2416-2422, 1986.
 33. Albini A, Iwamoto Y, Kleinman, HK, et al A rapid in vitro assay for quantitating the invasive potential of tumor cells, *Cancer Res*, **47** 3239-3245, 1987.
 34. Albrecht-Buehler G The phagokinetic tracks of 3T3 cells, *Cell*, **11** 395-404, 1977.
 35. Komada M and Kitamura N The cell dissociation and motility triggered by scatter factor / hepatocyte growth factor are mediated through the cytoplasmic domain of the c-met receptor, *Oncogene*, **8** 2381-2390, 1993.
 36. Weidner KM, Sachs M and Birchmeier W The met receptor tyrosine kinase transduces motility, proliferation, and morphogenic signals scatter factor / hepatocyte growth factor in epithelial cells, *J Cell Biol*, **121** 145-154, 1993.
 37. Owens LV, Xu L, Craven RJ, et al Overexpression of the focal adhesion kinase (p125FAK) in invasive human tumors, *Cancer Res*, **55** 2752-2755, 1995.
 38. Takaishi K, Sasaki T, Kato M, et al Involvement of rho p21 small GTP-binding protein and its regulator in the HGF-induced cell motility, *Oncogene*, **9** 273-279, 1994.
 39. Takaishi K, Sasaki T, Kotani H, et al Regulation of cell-cell adhesion by rac and rho small G proteins in MDCK cells, *J Cell Biol*, **139** 1047-1059, 1997.
 40. Kishi K, Sasaki T, Kuroda S, et al Regulation of cytoplasmic division of xenopus embryo by rho p21 and its inhibitory GDP/GTP exchange proteon (rhoGDI), *J Cell Biol*, **120** 1187-1195, 1993.
 41. Coso OA, Chiariello M, Yu JC, et al The small GTP-binding protein rac1 and cdc42 regulate the activity of the JNK/SAPK signaling pathway, *Cell*, **81** 1137-1146, 1995.
 42. Minden A, Lin A, Claret FX, et al Selective activation of the JNK signaling cascade and c-jun transcriptional activity by the small GTPases rac and cdc42Hs, *Cell*, **81** 1137-1146, 1995.
 43. Narumiya S and Morii N Rho gene products, botulinum C3 exoenzyme and cell adhesion, *Cellular Signal*, **5** 9-19, 1993.
 44. Rankin S, Morii N, Narumiya S, et al Botulinum C3 exoenzyme blocks the tyrosine phosphorylation of p125FAK and paxillin induced by bombesin and endothelin, *FEBS Lett*, **354** 315-319, 1994.
 45. 河野 峰, 柴田敏之, 永易裕樹, 他 EGF(Epidermal growth factor)オートクリン作用によるヒト口腔扁平上皮癌細胞の運動能促進, *日口外誌*, **44** 16-21, 1998.
 46. 奥村一彦, 小西 亮, 田中真樹, 他 培養ヒト口腔扁平上皮癌細胞の浸潤における Transforming growth factor- β 1(TGF- β 1)のオートクリン作用, *日口外誌*, **42** 962-968, 1996.

47. Sasaki T and Takai Y The rho small G protein family-rho GDI system as a temporal and spatial determinant for cytoskeletal control, *Biochem Biophys Res Commun* , **245** : 641-645, 1998.
48. Adamson P, Paterson HF and Hall A Intracellular localization of the p21rho proteins, *J Cell Biol* , **119** : 617-627, 1992.
49. Bokoch GM, Bohl BP and Chuang T H Guanine nucleotide exchange regulates membrane translocation of Rac / Rho GTP- binding proteins, *J Biol Chem* , **269** : 31674-31679, 1994.
50. Kranenburg O, Poland M, Gebbink M, et al Dissociation of LPA-induced cytoskeletal contraction from stress fiber formation by differential localization of RhoA, *J Cell Sci* , **110** : 2417-2427, 1997.
51. Karnam P, Standaert ML, Galloway L, et al Activation and translocation of rho (and ADP ribosylation factor) by insulin in rat adipocytes, *J Biol Chem* , **272** : 6136-6140, 1997.
52. Ueda T, Kikuchi A, Ohga N, et al Purification and characterization from bovine brain cytosol of a novel regulatory protein inhibiting the dissociation of GDP from and the subsequent binding of GTP to rho B p20, a ras p21-like GTP-binding protein, *J Biol Chem* , **265** : 9373-9380, 1990.