

〔原 著〕

Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K) は 口腔扁平上皮癌細胞の浸潤突起形成を制御している

木下 隆二, 奥村 一彦, 中村 公則, 金澤 正昭

北海道医療大学歯学部口腔外科学第一講座

(主任: 金澤 正昭教授)

Phosphatidylinositol 3-kinase regulates formation of invadopodia, promoting invasion in oral squamous cell carcinoma cells

Ryuji KINOSHITA, Kazuhiko OKUMURA,
Kiminori NAKAMURA, and Masaaki KANAZAWA

1st Department of oral and maxillofacial surgery, School of dentistry,
Health Sciences University of Hokkaido

(Chief: Prof. Masaaki KANAZAWA)

Abstract

Aggressively invasive human oral squamous cell carcinoma cells as SAS-H1 have the ability to extend membrane protrusions, invadopodia, into the extracellular matrix. These structures are associated with sites of active matrix degradation. The amount of membrane protrusions has been shown to correlate directly with the invasive potential. Immunofluorescent staining using mAb phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K) p85 α shows that the PI3-K p85 regulatory subunit is predominantly associated with invadopodia, corresponding to the areas where fibronectin / gelatin degradation occurs. We demonstrate that PI3-K inhibitors (wortmannin and LY294002) blocks local extracellular matrix degradation and formation of invadopodia. The SAS-H1 cells were sheared from the surface of a gelatin matrix to isolate invadopodia. The PI3-K p85 regulatory subunit and PI3-K p110 α catalytic subunit were co-immunoprecipitated as a complex from invadopodia by Western blotting. PI3-K activity was higher in the invadopodia fraction than in the cell body fraction. These findings suggest that PI3-K has a direct role in the regulation of invadopodia activity.

Key words: phosphatidylinositol 3-kinase, oral squamous cell carcinoma cells, invadopodia.

I. 緒 言

臨床的に頸部所属リンパ節および遠隔転移のみられない, いわゆるStage I, IIの口腔扁平上皮癌の治療成績は, 近年の癌治療法の進歩により著明に向上している. しかし, 比較的早期の癌で, 治療後に原発巣が十分に制御されているにも関わらず, 予期せぬ後発頸部転移などによって治療に難渋する症例がみられる. このため浸潤転移の有無は予後を決定する重要な因子となることから, 浸潤転移の制御機構の解析は急務と考えられる.

近年, 各種の癌遺伝子解析法が開発され, その一つとして固形癌の染色体の変異を検出できるcomparative genomic hybridization法があり, 本法による染色体全領域のコピー数の異常が報告されている¹⁾. 口腔扁平上皮癌では本法によって, 3q25-28, 5p, 8qなどの領域で高頻度のコピー数の増加が検出されている²⁻⁴⁾. なかでも, 3q26-27領域の異常が共通して認められている⁵⁾. この染色体領域には癌遺伝子としてPIK3CA遺伝子が位置しており, 細胞増殖, アポトーシス, 細胞接着および正常細胞の癌化にかかわるphosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K)の触媒蛋白質p110 α をコードしていることが知られている⁶⁻⁸⁾.

PI3-Kは, その調節蛋白質であるp85と触媒蛋白質であるp110 α から構成されており, とくに, p110 α はPI3-K活性化に重要な役割を担っている. 一方, 癌の浸潤転移は, 癌細胞の基底膜を主とする細胞外基質への接着, これに続く各種プロテアーゼによる基質の分解, 脈管内への侵入などの一連の過程を経ると考えられている⁹⁾. すでに, 奥村ら¹⁰⁾は肺血管内皮細胞層下への癌細胞の潜り込みを指標としたin vitro浸潤アッセイにより, PI3-K活性化を特異的に阻害するwortmaninnとLY294002が, 癌細胞の浸潤を抑制することを見出し, 癌細胞の接着と運動

性シグナルにはPI3-Kの活性化が必要であることを報告している. しかし, このPI3-Kが浸潤転移機構の初期段階でどのような役割を担っているかは, まだ明らかにされていない.

そこで, 著者は初期浸潤過程における基底膜の分解に際しての, 癌細胞の挙動を観察できるin vitro基質分解/浸潤アッセイによりPI3-Kの役割を検討した(図1).

II. 材料と方法

1. 培養細胞

高浸潤性癌細胞SAS-H1を実験に用いた¹¹⁾. この細胞は, ヒト舌扁平上皮癌の原発巣より樹立したSAS細胞から, 限界希釈法により得られたクローンを, ラット肺血管内皮細胞層下への癌細胞の潜り込みを指標としたin vitro浸潤アッセイで選択したものである. なお, SAS-H1細胞の継代培養は, 10%牛胎児血清(FBS, ICN Biomedicals, Inc. Aurora, Ohio, U.S.A.), ペニシリンGカリウム (100U/ml)と硫酸ストレプトマイシン(100mg/ml)を添加したDMEM/F-12培養液(Gibco BRL, Gland Island, NY, U.S.A.)を用い, 37°C, 5%CO₂を含む空気で満たしたインキュベーター中で行った.

2. 試薬

PI3-K活性化の特異的阻害剤としてwortmaninn(和光純薬)とLY294002(Biomol Res. Lab.)を用いた. プロテインAキナーゼ阻害剤にはKT57200(Calbiochem), プロテインCキナーゼ阻害剤にはCalphostin C(協和メデイクス), ミオシン軽鎖キナーゼ阻害剤としてML7(Calbiochem), チロシンキナーゼ阻害剤にはGenistein(Sigma), チロシン脱リン酸化阻害剤としてorthovanadate(Sigma)を使用した. ゼラチン粉末として, 熱変性化牛タイプIコラーゲン(Sigma)を用いた.

さらに、Fluorescein isothiocyanate (FITC) にはResearch Organics Inc. (OH, U.S.A.) のものを使用した。アクチン線維を特異的に染色するローダミン標識ファロイジンは、Molecular probes (OR, U.S.A.) のものを使用した。

3. 情報伝達阻害剤による処理

後述するFITC標識フィブロネクチン・ゼラチンコートカバースリップを挿入し、2mlの10%FBS添加DMEM/F-12培養液で満たした。この35mm径培養皿に、SAS-H1細胞を105個/ml播種し、120分経過して細胞がカバースリップに付着したことを確認後、DMEM/F-12培養液で3回洗浄し血清非添加DMEM/F-12培養液中で各種情報伝達阻害剤により30分処理した。その後、新しい10%FBS添加DMEM/F-12培養液に交換して24時間経過後、カバースリップを回収し試料とした。

なお、阻害剤の溶解液としてDimethyl sulfoxide (DMSO)を使用した。この溶解液は細胞の性状に影響をおよぼさないことが確認されている。

4. *In vitro* 基質分解/浸潤アッセイ(図1)

(1) FITC標識フィブロネクチンの調製

Chenらの方法に準じて行った¹²⁾。すなわち、1 mlの0.5mg ヒト血漿フィブロネクチン(Becton Dickinson Labware, Bedford, MA)

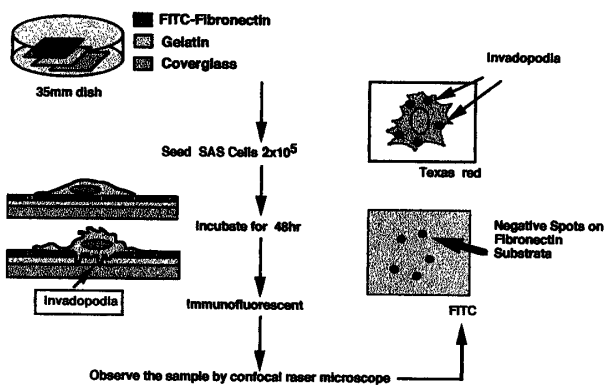


図1 *in vitro* フィブロネクチン基質分解/浸潤アッセイの概略

含有ホウ酸塩緩衝液(0.075M NaClを含む0.17 M ホウ酸緩衝液 pH9.3)を透析チューブに充填し、これを200mlの6 mg FITC含有ホウ酸塩緩衝液で、室温、90分インキュベートし、FITCを標識した。

その後、余剰なFITC除去のためPBSで4°C、3日間透析し、さらに、50%グリセリン溶液で4°C、一昼夜透析した。なお、すべての行程は暗所で行った。

(2) FITC標識フィブロネクチン・ゼラチンコートカバースリップの作製

15×15mm²のガラス製カバースリップ上に、加温・溶解した2.5%ゼラチンと2.5%ショ糖を含むリン酸塩緩衝液(PBS, pH7.4)を滴下し、室温で乾燥、0.5% グルタルアルデヒド含有PBSで架橋・固定の後、PBSで6回洗浄した。

さらに、このカバースリップ上にPBS40倍希釈FITC標識フィブロネクチン600mlを滴下し、室温、60分インキュベートした。その後、70%エタノールを加え室温、15分インキュベートし、次に、このカバースリップをDMEM/F-12培養液で満たした35mm径培養皿に挿入し、4°Cで暗所に保存した。

(3) 免疫蛍光染色

FITC標識フィブロネクチン・ゼラチンコートカバースリップを挿入した培養皿に、2 mlの10%FBS添加DMEM/F-12培養液を注入した。これにSAS-H1細胞を10⁵個/ml播種し、この細胞がカバースリップに付着したことを確認後、新しい10%FBS添加DMEM/F-12培養液に交換し、6、12、24、48時間後にカバースリップを回収した。

これらのカバースリップを、4%パラホルムアルデヒド添加PBSで室温、10分固定した。次に、これに0.1% TritonX-100による細胞膜透過性亢進処理を加えた後、30倍希釈ローダミン標識ファロイジンにより室温、30分インキュベートしアクチン線維を染色した。

また、一部のカバースリップは10%FBS添加DMEM/F-12培養液で18時間培養した後、上記の固定と細胞膜透過性亢進処理を施し、PI3-K調節蛋白質p85を認識する抗p85 α モノクローナル抗体(250倍希釈:B-9, Santa Cruz Biotech., Inc., CA, U.S.A.)およびチロシンリン酸化蛋白質を認識する4G10抗体(250倍希釈:UBI, NY, U.S.A.)を一次抗体として、室温、60分反応させた。次に、2次抗体としてローダミン標識抗マウスG抗体(200倍希釈:Cappel, NC), またはローダミン標識抗ウサギIgG抗体(200倍希釈:Cappel, NC)を用い室温、60分反応させた後、このカバースリップをProLong antifade kit (Molecular Probes, OR, U.S.A.)により封入処理した。

なお、観察には、MRC-1024共焦点レーザー顕微鏡(Bio Rad, CA, U.S.A.)を用いた。

(4)基質分解/浸潤能の測定

画像解析装置(XL-500, Olympusabio, 東京, 日本)でSAS-H1細胞によるフィブロネクチン・ゼラチン基質分解領域の面積を算出した。また、フィブロネクチンの分解が認められた細胞数を、MRC-1024共焦点レーザー顕微鏡(Bio Rad, CA, U.S.A.)で400倍率の視野で5か所にわたり計測し、浸潤能を評価した。

5. 細胞画分の調製(図2)

Muellerら¹³⁾の方法に準じてSAS-H1細胞の細胞体画分とゼラチン基質画分を回収した。すなわち、15 cm径培養皿に加温・溶解した2.5%ゼラチンと2.5%ショ糖を含むリン酸塩緩衝液(PBS, pH7.4)を満たした。その後、余剰の液を吸引除去して培養皿底面にゼラチン基質の薄層を形成させ、これを0.5%グルタルアルデヒド含有PBSで架橋・固定した後、DMEM/F-12培養液で3回洗浄した。

以上のようにして調整されたゼラチン薄層膜面にSAS-H1細胞を 8×10^7 個播種し、10%FBS

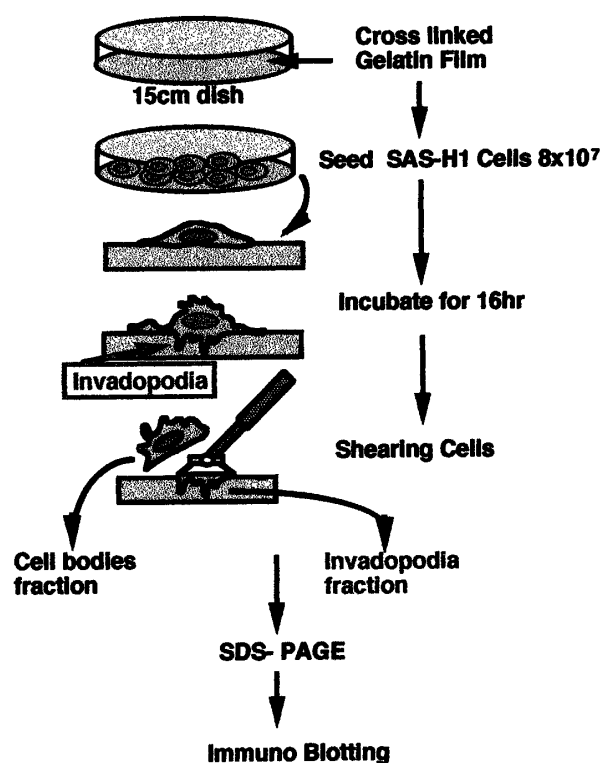


図2 細胞画分の調整法の概略

添加DMEM/F-12培養液で16時間培養し、氷冷した150 mM NaCl含有 Tris-HCl緩衝液(TBS, pH7.4)で3回洗浄した。その後、細胞膜と細胞骨格安定化のためshearing buffer (10 mM MOPS, pH6.8, 100 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 0.3 M sucrose, 1 mM Na₃VO₄, 0.2 mM PMSF, 0.02 % NaN₃)で洗浄した。次に、新しいshearing buffer 5 mlをこの培養皿に満たし、ゼラチン基質面上に付着している細胞をL字型のパスツールピペットで静かにトレースして、shearing bufferと共に回収した。なお、この際、回収を終えたゼラチン基質表面から細胞が完全に除去されているか否かを位相差顕微鏡で確認した。この回収液から $\times 800$ g, 4°C, 5分の遠心分離により細胞を得た。この細胞は1 mlの1.3% Triton X-114含有shearing bufferで4°C, 15分インキュベートして、蛋白質を可溶化し細胞体画分とした¹⁴⁾。

次に、細胞除去後のゼラチン基質面を10mlのshearing bufferで3回洗浄した後、培養皿に1mlの1.3% Triton X-114含有shearing buffer

を満たし、スクレッパーを用いてゼラチン基質とともに回収し、4°C、15分インキュベートし、蛋白質を可溶化しゼラチン基質画分を得た¹⁴⁾。

その後、細胞体画分とゼラチン基質画分から界面活性剤 Triton X-114を除去するため、37°C、5分インキュベートした後、×10000 g、室温、5分の遠心分離を行い、上層の蛋白質を含む水溶成分から蛋白質のみ回収するため、70%濃度になるようにエタノールを添加し、-20°C、120分インキュベートし、その後、×12000 g、4°C、20分間の遠心分離を行った。

6. 抗p85ポリクロナール抗体による免疫沈降産物の調製

細胞体画分とゼラチン基質画分から、70%エタノール沈殿により得られた蛋白質を、500 mlの免疫沈降緩衝液(50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 50 mM NaCl, 0.005% deoxycholate, 1% NP-40, 1 mM vanadate, 50 mM NaF, 2 mM PMSF, 2 mg/ml leupeptin, 2 mg/ml aprotinin)に溶解した。この溶解液に5 mlの抗p85ポリクロナール抗体(UBI, NY, U.S.A.)を加え、4°C、16時間反応させた後、これにブロテインA-アガロース(UBI, NY, U.S.A.)を加えて、4°C、60分混和し、遠心分離により回収したアガロースビーズを免疫沈降緩衝液で洗浄し、以下の実験に供した。

7. ウェスタンブロッティング

上記で得られたアガロースビーズに、20mlのLaemmliのSDS-sample bufferを添加して、100°C、5分処理し、7.5% SDS-PAGEにより展開し、PVDF膜(Millipore Co., MA, USA)に転写した。

この転写膜をブロックエース液(大日本製薬、東京、日本)で、室温、120分ブロッキングした後、抗p85ポリクロナール抗体(1000倍希釈)で、室温、60分インキュベートした。次いで、この

転写膜をPBSで洗浄した後、HRP標識抗ウサギIgG抗体(10000倍希釈:Cappel, NC)と室温、60分反応させ、ECLウエスタンブロッティング検出システム(Amersham International)により蛋白質を検出した。

また、同一の転写膜をPI3-K触媒蛋白質p110 α の抗C末端p110 α ポリクロナール抗体(2000倍希釈: Santa Cruz Biotech., Inc., CA, U.S.A.)で、室温、60分インキュベートした後、PBSで洗浄し、上記のHRP標識抗ヤギIgG抗体(Cappel, NC)と反応させ、蛋白質の発現について検討した。

8. PI3-K活性の測定

SAS-H1細胞のPI3K活性は、Ninomiyaら¹⁵⁾のin vitroキナーゼアッセイを準用し測定した。すなわち、さきに調製したアガロースビーズに、100mlのphosphatidylinositol kinase buffer(40mM Tris-HCl, pH7.4, 0.5 mM EGTA, 0.1mg/ml phosphoinositides (Sigma, MO, U.S.A.), 5 mM MgCl₂, 1 mM Ci [g-32P] ATP(NEG502A: 3000 Ci/mmol; NEN, MA, U.S.A.))を加え、30°C、10分インキュベートした後、470mlのメタノール/クロロホルム/6% HClO₄液(30:15:2)で反応を停止させた。次に、150mlのクロロホルムと同量の1% HClO₄を混和した後、クロロホルム飽和0.5M NaCl・1% HClO₄液により脂質を抽出した。

抽出した脂質を、Silica Gel 60プレート(Merck)上にスポットし、クロロホルム/メタノール/アセトン/酢酸/水(7:5:2:2)中で薄層クロマトグラフィーを行った後、Kodak X-Omatによるオートラジオグラフィーを施行した。

9. 統計処理

各実験は3回実施し、得られたデータを平均値±標準偏差で表示した。統計学的有意差は

全てMann-Whitney検定を用いて $p < 0.01$ をもって有意差ありと判定した。

III. 結 果

1. 基質分解/浸潤アッセイを用いたSAS-H1細胞の基質分解能

FITC蛍光標識フィブロネクチン・ゼラチン基質でコートしたカバースリップ上にSAS-H1細胞を播種して, 10%FBS添加DMEM/F-12培養液で120分培養し細胞が基質に接着したことを確認し, 新しい10%FBS添加DMEM/F-12培養液に交換した後の経時的な変化を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。その結果, 細胞が基質に接着後6時間経てから, フィブロネクチンが分解して蛍光が失われた直径0.4から0.6 μm の黒点が観察された。同時にこのカバースリップ上の細胞に, アクチン線維と特異的に結合するローダミン標識ファロイジンで染色すると, 先のフィブロネクチンが分解されて生じた黒点に一致してアクチン線維が凝集していた(図3-A, B)。12時間では, フィブロネクチンの局所分解がさらに進行していることが観察され(図3-C, D), 24時間では, 蛍光標識フィブロネクチンの分解により生じた黒く抜けた領域がさらに拡大していた(図3-E, F)。一方, フィブロネクチン・ゼラチン基質をコートしていないカバースリップ上に, 細胞を播種・接着後24時間経過したものにはローダミン標識ファロイジン染色を行い観察したが, アクチン線維の凝集する細胞突起はみられなかった。

なお, フィブロネクチン・ゼラチン基質分解領域の面積を画像解析装置により算出すると, 6時間では $7 \pm 2.5 \mu\text{m}^2/\text{cell}$, 12時間で $8.5 \pm 3.2 \mu\text{m}^2/\text{cell}$, 24時間で $27 \pm 4.5 \mu\text{m}^2/\text{cell}$, 48時間後には $32 \pm 2.5 \mu\text{m}^2/\text{cell}$ と時間の経過とともに基質分解が進行することが確認された(図4)。

また, 細胞接着6, 24, 48, 72時間を経過した試料について, フィブロネクチンの分解を示

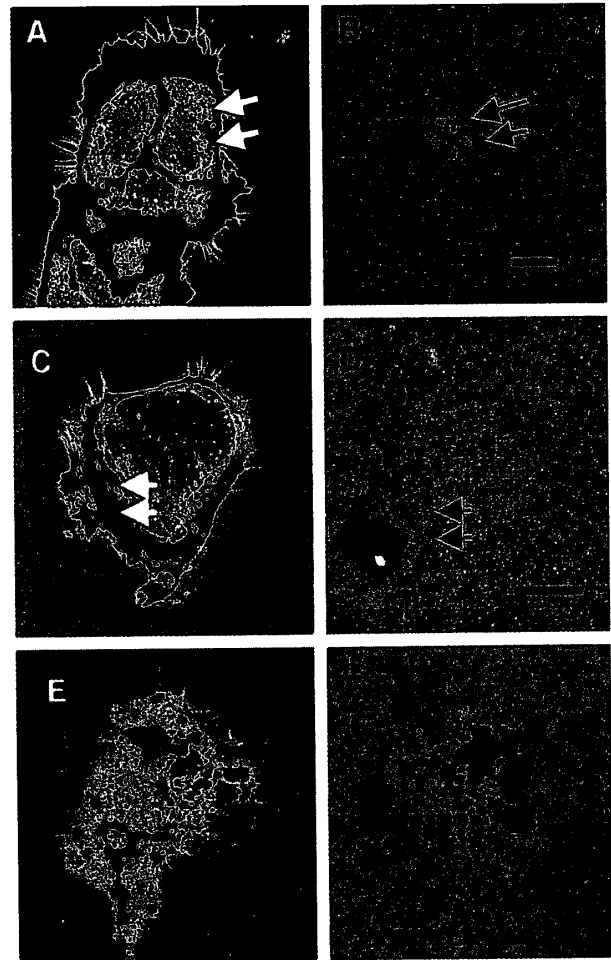


図3 *in vitro* フィブロネクチン基質分解 / 浸潤アッセイによる経時的変化。FITC蛍光標識フィブロネクチン・ゼラチン基質上で培養したSAS-H1細胞は, フィブロネクチン基質を分解して蛍光が失われた領域が観察され, 経時的にその領域が拡大した(赤矢印)。また, 分解領域に一致してアクチン線維が凝集した浸潤突起(白矢印)がみられた。A, C, E: ローダミンファロイジン染色, B, D, F: FITC標識フィブロネクチン基質, A, B: 細胞接着後6時間, C, D: 細胞接着後12時間, E, F: 細胞接着後24時間。bar: 10 μm

した細胞数も, 時間の経過とともに増加していた(図5)。

2. SAS-H1細胞の基質分解/浸潤能に対する情報伝達阻害剤の影響

FITC蛍光標識フィブロネクチン・ゼラチン基質をコートしたカバースリップ上に播種・接着したSAS-H1細胞を, 各種の情報伝達阻害剤で処理した後, 10%FBS添加DMEM/F-12培養液で24時間培養し, 共焦点レーザー顕微鏡で観

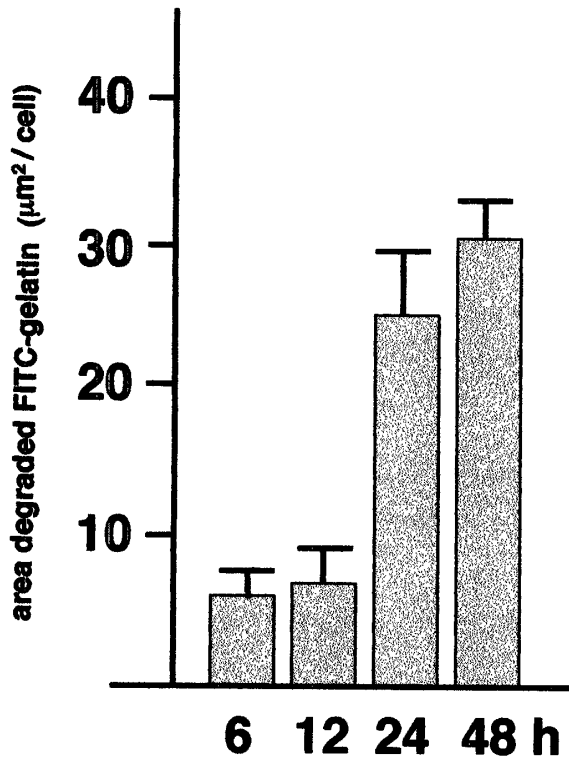


図4 FITC標識フィブロネクチン・ゼラチン基質分解面積の経時的変化

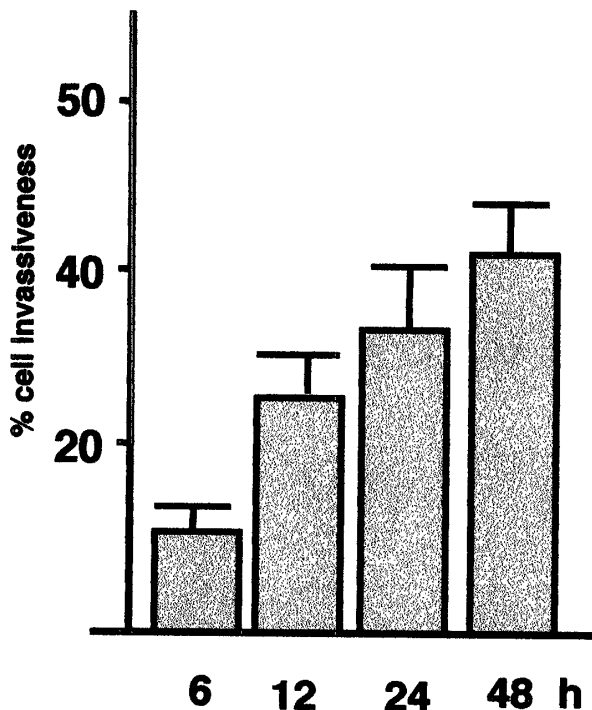


図5 FITC標識フィブロネクチン・ゼラチン基質への浸潤細胞数の経時的変化

察した。

その結果, KT5720, Calphostin C およびML7で処理したSAS-H1細胞では, 阻害剤で処理を

行わなかったSASH-1細胞と同様に基質分解と浸潤突起の形成がみられ, 基質分解を示す細胞数も同等であった(図6, 7, 8).

これに対して, wortmanninとLY294002で処理したSASH-1細胞では, 濃度依存性に基質分解と浸潤突起の形成がみられる細胞数が減少する傾向がみられた(図9-A, B).

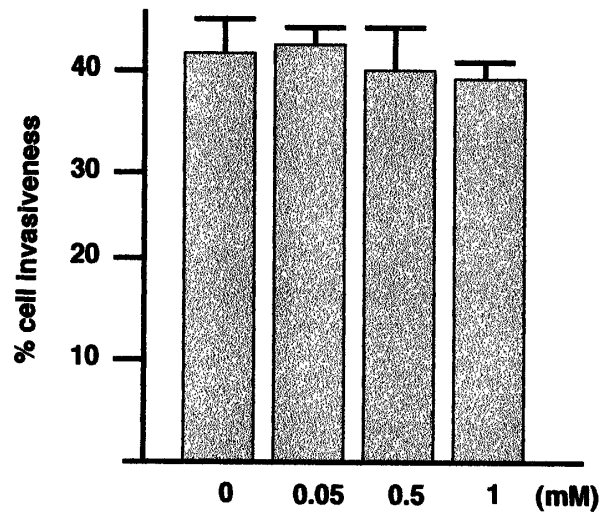


図6 プロテインキナーゼA阻害剤KT5720による浸潤細胞数への影響

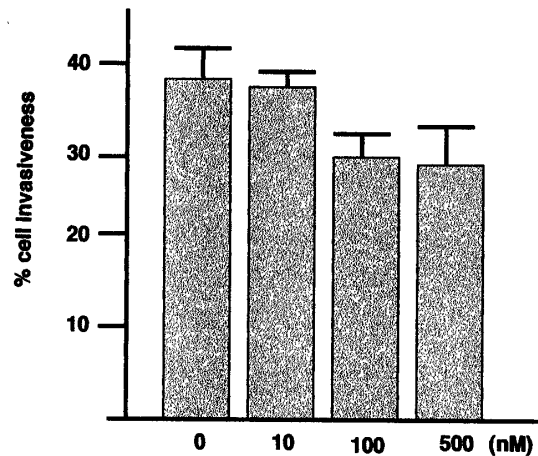


図7 プロテインキナーゼC阻害剤Calphostin Cによる浸潤細胞数への影響

さらに, Genisteinまたは orthovanadateで処理したSASH-1細胞でも, 同様な所見が得られ, とくに1または10 μg/ml濃度のGenisteinで処理した細胞でこの傾向が著明であった(図10-A, B).

3. PI3-K蛋白質とチロシンリン酸化蛋白質の

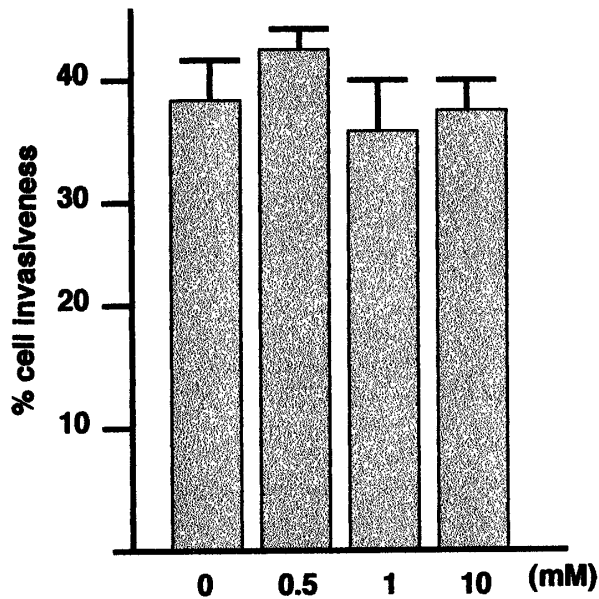


図8 ミオシン軽鎖キナーゼ阻害剤ML7による浸潤細胞数への影響

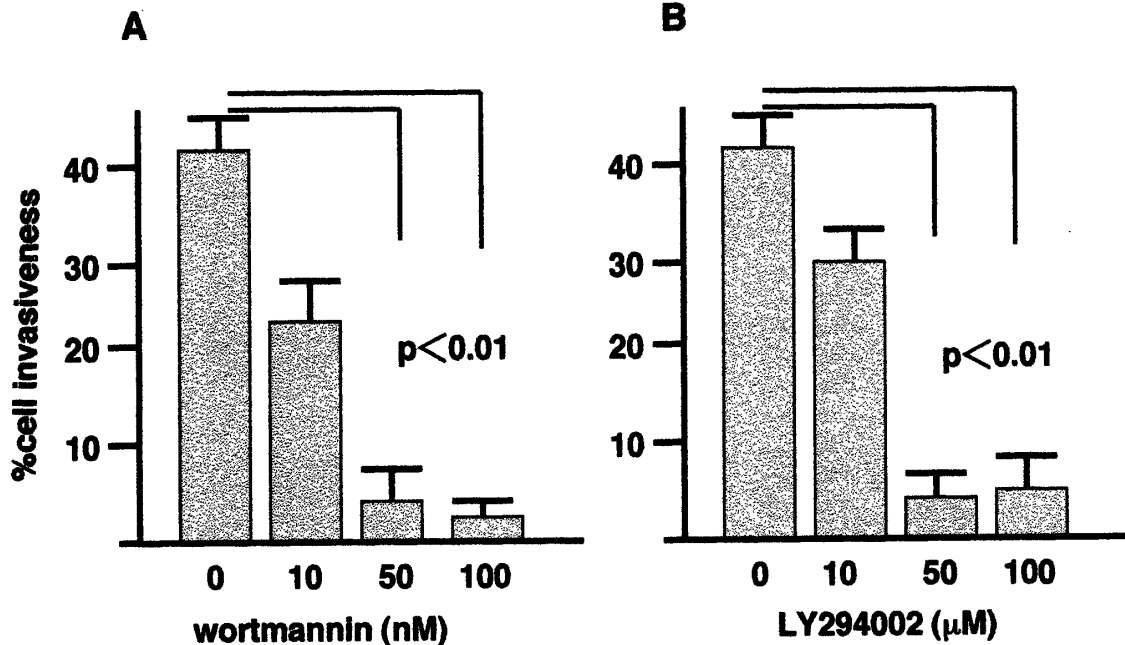


図9 PI3-K阻害剤による浸潤細胞数への影響

た。その結果、チロシンリン酸化蛋白質の局在はPI3-K調節蛋白質p85が局在する浸潤突起(図12-A)とともに基質上の接着斑にも認められた(図12-B)。

4. 各細胞画分によるPI3-K蛋白質の発現

まず、ゼラチン基質上に播種したSAS-H1細胞を、16時間培養した後、L字型パスツールピ

浸潤突起における局在

FITC蛍光標識フィブロネクチン・ゼラチン基質でコートしたカバースリップ上に播種したSAS-H1細胞について、抗p85 α モノクローナル抗体を用いた間接蛍光抗体法により観察を行った。その結果、フィブロネクチンが分解してFITCの蛍光が失われた領域に一致して、PI3-K調節蛋白質p85が局在する浸潤突起が認められた(図11-A)。しかし、wortmannin処理後のSAS-H1細胞では、PI3-K調節蛋白質p85が細胞質内にび慢性にみられ、同時にFITC蛍光標識フィブロネクチンの分解もみられなかった(図11-B)。

次に、ゼラチン基質上で培養したSAS-H1細胞を4G10抗体間接蛍光抗体法によって観察し

ペットでトレースしshearing bufferとともに回収した。なお、回収後のゼラチン基質表面の位相差顕微鏡像から、細胞が完全に除去されていることを確認した。また、培養皿に残存するゼラチン基質のローダミン標識ファロイジン染色により、ゼラチン基質中には侵入した浸潤突起が確認された。このことから、培養皿に残存しているゼラチン基質中には細胞体はなく、浸

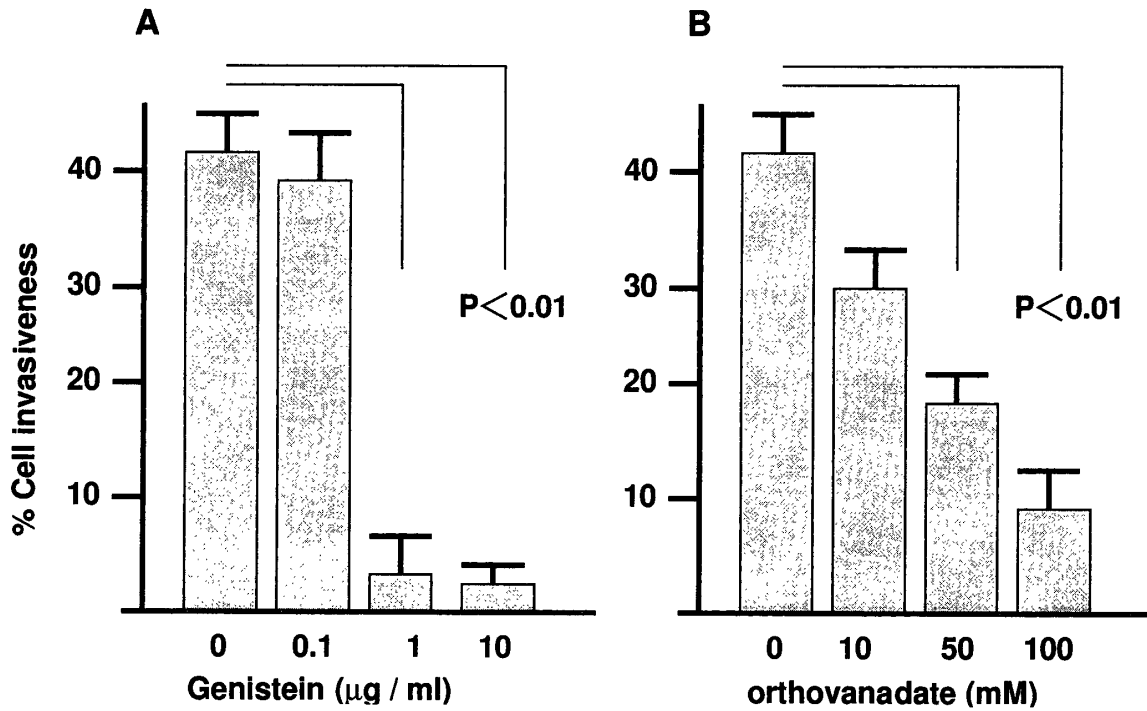


図10 チロシンキナーゼ阻害剤Genistein (A)とチロシン脱リン酸化阻害剤orthovanadate (B)による浸潤細胞数への影響

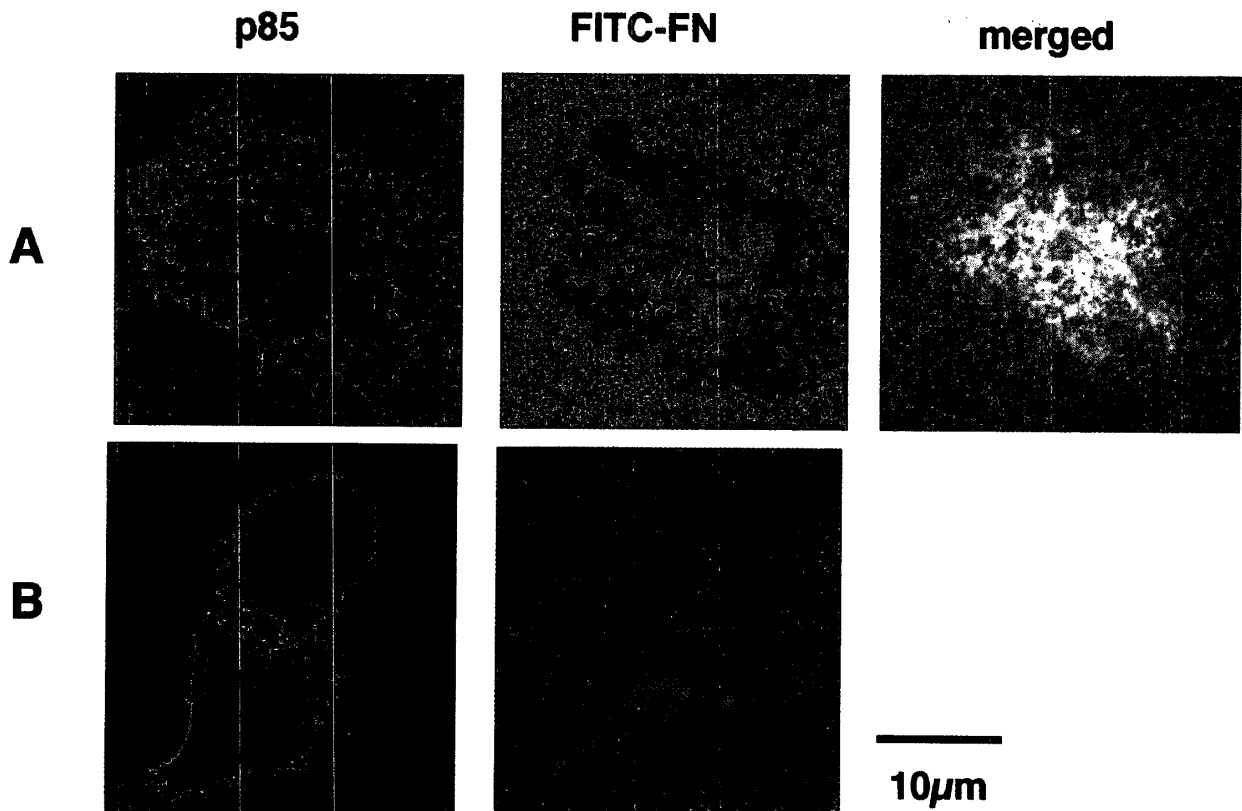


図11 FITC標識フィブロネクチン・ゼラチン基質でのPI3-K制御蛋白質p85の局在. A: 未処理細胞では, 抗p85 α モノクローナル抗体で染色される浸潤突起が観察された(p85), 同時にフィブロネクチン基質の分解により蛍光が失われた領域を認めた(FITC-FN). p85 α が局在する浸潤突起とフィブロネクチン基質分解領域の重ね合わせ画像(merged) B: 100 nM wortmannin処理細胞では, p85 α が細胞質にび漫性の局在を示した(p85), 同時にフィブロネクチン基質の分解は生じていなかった(FITC-FN)

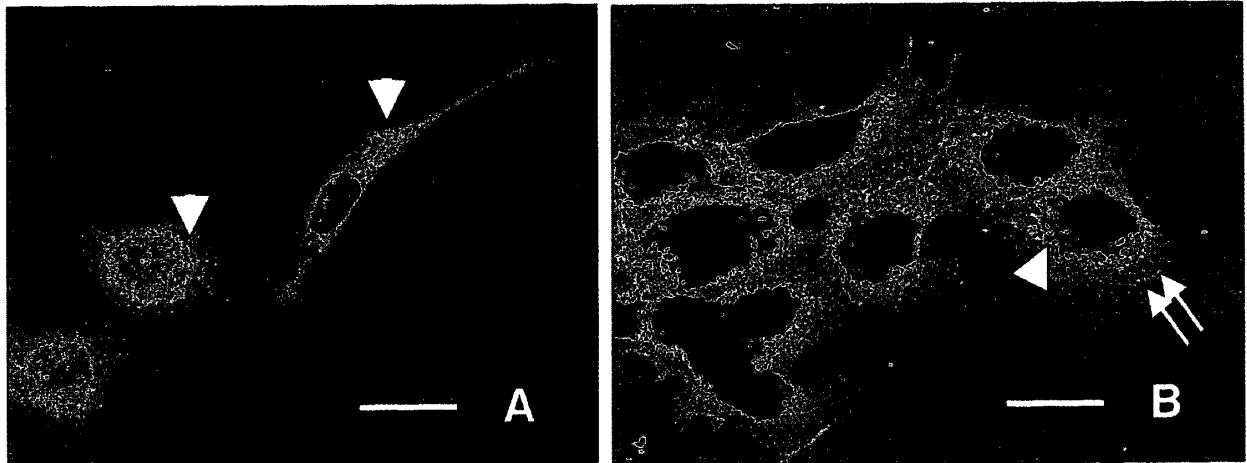


図12 ゼラチン基質上での, A: 抗p85 α モノクローナル抗体染色によるPI3-K制御蛋白質p85の局在(矢尻)とB: 抗リン酸化チロシン抗体4G10染色によるチロシンリン酸化蛋白質の局在(矢印: 接着斑), bar: 50 μ m

潤突起のみ存在していることが確認された(図13).

そこで, ゼラチン基質上で培養したSAS-H1細胞の細胞体画分とゼラチン基質画分を上記の方法で分離回収し, 抗p85ポリクローナル抗体により免疫沈降産物を得て, この沈降産物を, 抗p85ポリクローナル抗体および抗C末端p110 α ポリクローナル抗体でウェスタンブロットした。その結果, p85は細胞体画分とゼラチン基質画分の両方に発現したが, wortmanninで処理したSASH-1細胞では, 細胞体画分にのみp85が認められた。さらに, 抗p85ポリクローナル抗体による免疫沈降産物を, 抗p110 α 抗体でウェスタンブロットしたところ, p110 α は細胞体およびゼラチン基質の両画分に認められた。なお, wortmanninで処理した細胞では, 細胞体画分にわずかにp110 α をみるのみであった(図14)。

5. 各細胞画分におけるPI3-K活性

ゼラチン基質上で培養したSAS-H1細胞について, 細胞体画分とゼラチン基質画分のPI3-K活性をin vitroキナーゼアッセイで検討した。その結果, 細胞体画分よりもゼラチン基質画分に有意に高いphosphatidylinositol 3, 4, 5-triphosphate (PIP3)産生が認められた。しかし, wortmannin処理後のSASH-1細胞では, ゼラ

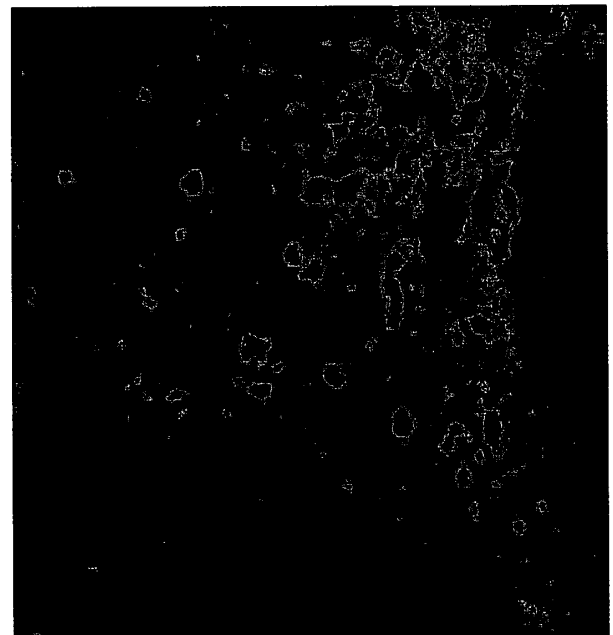


図13 細胞体画分を取り除いた後の, グルタルアルデヒドで架橋したゼラチン基質におけるローダミンファロイジン染色所見

チン基質画分のPIP3産生は認められず, わずかに細胞体画分にPIP3産生がみられるのみであった(図15)。

IV. 考 察

口腔扁平上皮癌の浸潤転移機構の解析により, 癌細胞の細胞運動性が浸潤転移を左右する重要な因子であることが報告されている^{11,16,17}。また, ヒト舌扁平上皮癌細胞から得られた高浸潤性癌細胞における検討から, 癌細胞の接着と運動性のシグナル分子の一つが, PI3-Kである

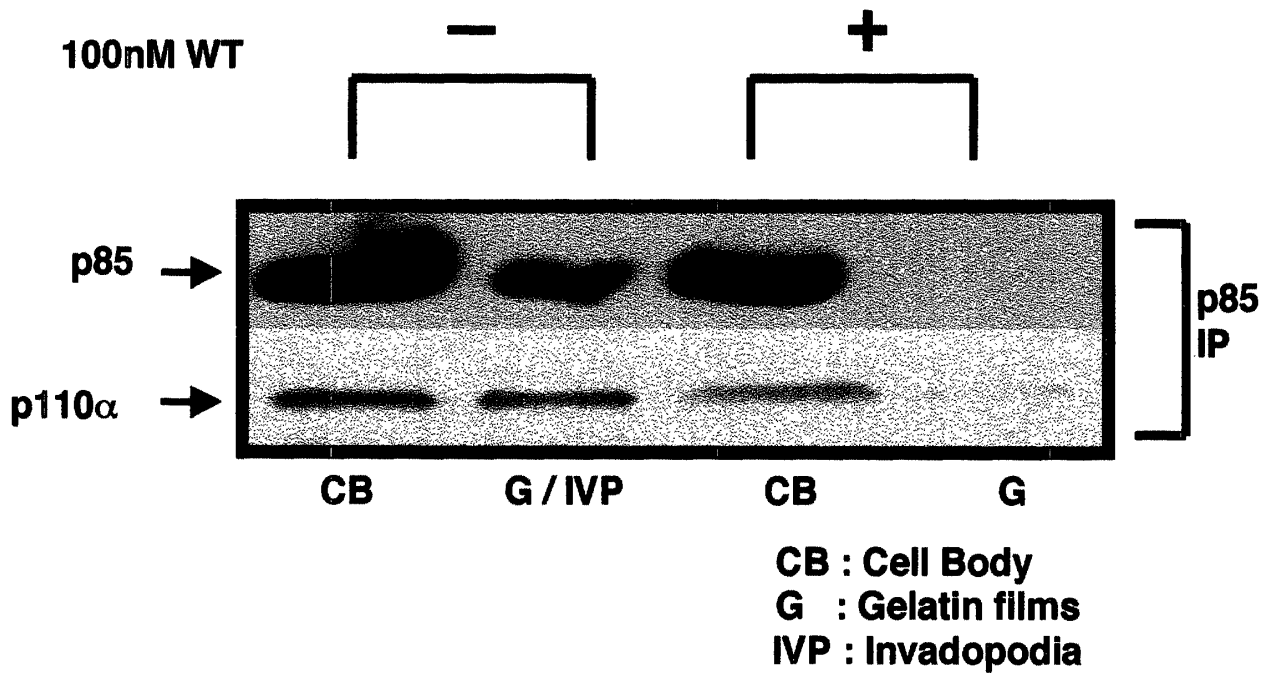


図14 各細胞画分における抗p85ポリクロナール抗体による免疫沈降産物 (p85 IP) におけるウエスタンブロットでの検討. P13-K制御蛋白質p85と共沈してきたP13-K触媒蛋白質p110αの発現. WT: wortmannin

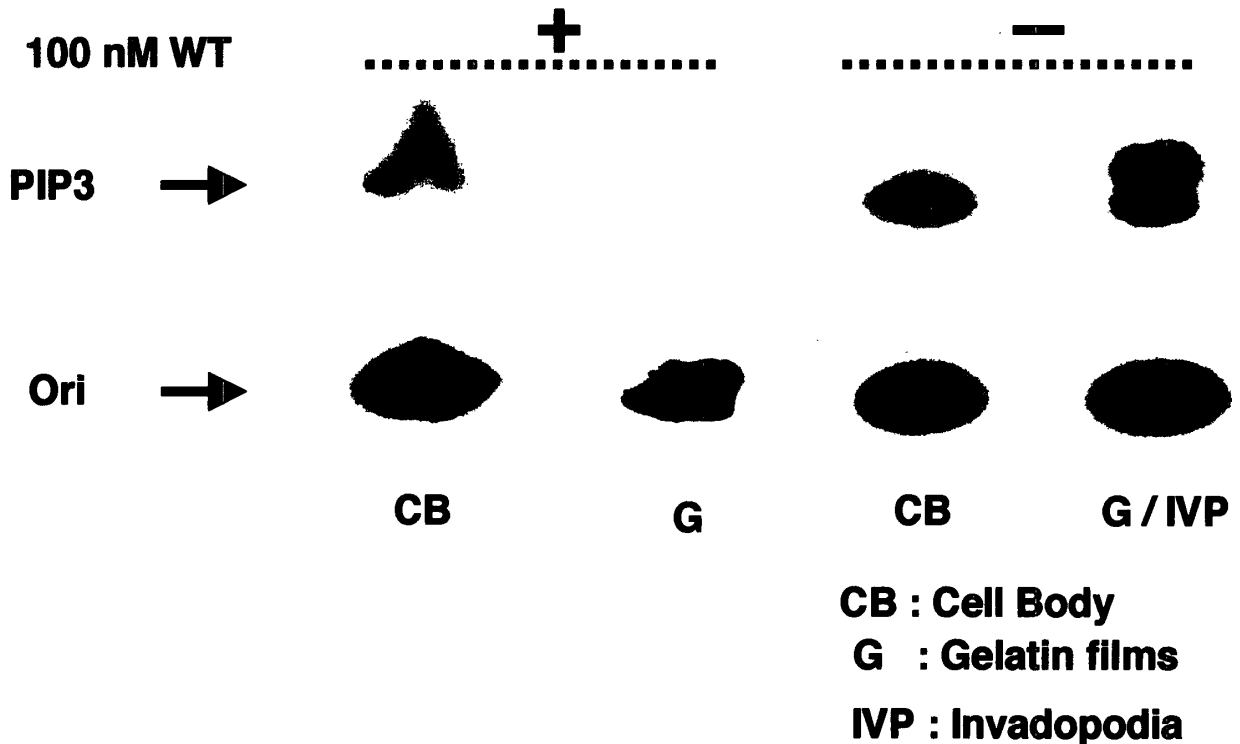


図15 各細胞画分の抗p85ポリクロナール抗体による免疫沈降産物におけるPI3-K活性化. wortmaninn処理細胞では, ゼラチン基質画分で活性は検出されず, 細胞体画分にわずかにPIP3産生がみられた. 一方, 未処理細胞の両画分でPI3-K活性が認められたが, 細胞体画分に比べてゼラチン / 浸潤突起画分においてPIP3産生の増加が示された. PIP3: phosphatidylinositol 3, 4, 5 - triphosphate, Ori: origin, WT: wortmannin

ことが明らかにされている⁹⁾. PI3-Kは, 細胞膜に存在する脂質を基質とした細胞内シグナル分子として知られている. PI3-Kを構成する調節

蛋白質p85は, 血小板由来増殖因子 (PDGF) や上皮増殖因子 (EGF) のレセプターに結合して, PI3-Kのもう一方の構成要素である触媒蛋白質

p110 α の活性化をきたして, phosphatidylinositol 3, 4bisphosphate (PIP2)やPIP3を産生し, 様々な細胞機能を制御していることが報告されている¹⁸⁾. しかし, このPI3-Kが浸潤転移機構の初期段階でどのような役割を担っているかは, 未だ明らかにされていない.

癌の浸潤転移機序における最初のステップとして, 癌細胞の基底膜通過が必要不可欠の要素である. 基底膜は, 上皮組織と結合組織の境界に存在する細胞外基質として知られており, フィブロネクチン, ラミニン, タイプIVコラーゲン, ヘパラン硫酸, プロテオグリカンなどから構成されている¹⁹⁾. さらに, 癌細胞の基底膜下への浸潤は, 癌細胞の基底膜への接着, 基底膜基質の分解, そして遊走の過程を経ると考えられる¹⁰⁾.

そこで本研究では, ヒト高浸潤性舌扁平上皮癌細胞SAS-H1について, 基底膜構成成分であり細胞外基質であるフィブロネクチンを用いた *in vitro* 基質分解/浸潤アッセイにより, 癌細胞の初期浸潤過程におけるPI3-Kの役割について検討した.

1. 高浸潤性ヒト舌扁平上皮癌細胞SASH-1について

本研究で用いたSASH-1細胞の親株であるSAS細胞は, 頸部リンパ節および肺転移を継発した低分化型舌扁平上皮癌(T₂N₀M₀)患者の原発巣から樹立した細胞である.

一般に, 癌の原発巣を構成する細胞はheterogeneousな集団であり, 原発巣から遊離し浸潤転移する悪性度の高い細胞が潜在的に存在していると考えられている. Okumuraら¹¹⁾は限界希釈法で, SAS細胞からいくつかのクローンを得て肺血管内皮細胞層下への潜り込みを指標に選択し, 浸潤能の異なる細胞を得ており, その一つが, 今回用いた高浸潤能を有するSAS-H1細胞である. Muramatsuら¹⁶⁾は, この浸潤能の

異なる細胞を用いて, 細胞内のsuperoxide dismutase活性と細胞の運動性を検討し, 高浸潤性SAS-H1細胞は活性酸素に暴露されると細胞内SOD活性の低下により細胞運動を促進し浸潤能が亢進することを報告している.

本研究でもSASH-1細胞は, 前述のように癌細胞の初期浸潤過程の観察に有用であることが知られた.

2. *In vitro* 基質分解/浸潤アッセイについて

Chenら²⁰⁾は, ラウス肉腫ウイルスで形質転換した浸潤性を有するトリ胚性線維芽細胞やヒトの転移性癌細胞株を, フィブロネクチン・ゼラチン基質をコートしたカバースリップ上に播種・接着させ培養し, 限局性の基質分解とともにアクチン線維を含む細胞突起がゼラチン内に侵入することを観察し, とくにゼラチン内に侵入した細胞突起を浸潤突起と命名した. また, Chenら¹²⁾はこのアッセイが, 基底膜基質への浸潤にスポットを当てた癌細胞の初期浸潤過程の観察に有用であると報告している.

本研究でも, 本アッセイを用いて高浸潤性舌扁平上皮癌細胞SAS-H1について観察したところ, フィブロネクチンの局所分解とともに浸潤突起の形成がみられたことから, 本アッセイの応用は適切であったと考えられる.

3. *In vitro* 基質分解/浸潤アッセイによるSAS-H1細胞の初期浸潤過程の観察と浸潤能について

Chenらは²⁰⁾, ラウス肉腫ウイルスで形質転換したトリ胚性線維芽細胞において本アッセイを用いた. その結果, この線維芽細胞はカバースリップ上の基質に接着し, その6時間後にはフィブロネクチン基質の局所分解をきたし, ゼラチンに侵入して浸潤突起を形成し, その後24時間経過して, さらに基質分解領域を拡大したと報告している. また, 彼らはウイルス非感染

性線維芽細胞でも同様の実験を行い、この形質転換を生じていない細胞では基質との接着面に接着斑を形成するのみで、基質の局所分解を認めなかったと報告している。

このことから、癌化した細胞では基質の分解とともに浸潤突起の形成がみられることが特徴的であると考えられる。そこで、本研究でもSAS-H1細胞を用いて、*in vitro*基質分解/浸潤アッセイを行い、共焦点レーザー顕微鏡により観察した。その結果、FITC蛍光標識フィブロネクチン基質の分解部分が黒点として観察され、さらに、この領域に一致して凝集したアクチン線維が観察されたことから、ゼラチン内に侵入した浸潤突起が形成されていることが確認された。また、培養時間の経過とともに、フィブロネクチン基質の分解領域が拡大することから、高浸潤性SAS-H1細胞では、ゼラチン内に侵入した浸潤突起の細胞膜上で、効率よく多量のプロテアーゼが産生・分泌されることによって基質の分解が生じ、ゼラチン内への浸潤突起の伸長・侵入が惹起されることが示唆された。

4. 基質分解活性と浸潤突起形成を制御するシグナル分子について

SugiuraとBerditchevski²¹⁾は、浸潤突起と類似する細胞突起の形成機序を、ヒト乳癌細胞を用い再構成基底膜構成成分マトリゲルの三次元培養法で検討した。その結果、プロテインキナーゼA、プロテインキナーゼCおよびミオシン軽鎖キナーゼに対する阻害剤では、基質分解能を有するマトリックスメタロプロテアーゼ-2 (MMP-2) の産生と細胞突起の形成を阻止することができなかったが、PI3-K活性化の阻害剤であるLY294002では、MMP-2の産生と細胞突起の形成が抑制されたと報告している。

本研究でもSAS-H1細胞において、wortmanninとLY294002では基質分解活性と浸潤突起形成が抑制されたが、プロテインキナーゼA、プロ

テインキナーゼCおよびミオシン軽鎖キナーゼに対する阻害剤では、抑制されなかった。このことから、基質分解活性と浸潤突起形成を制御しているシグナルは、PI3-Kであることが示唆された。

Muellerら¹³⁾は、本研究と同じ基質分解/浸潤アッセイを用いて、ラウス肉腫ウイルスで形質転換したトリ胚性線維芽細胞を、チロシンキナーゼの特異的阻害剤であるGenistein処理し、基質分解活性と浸潤突起の形成が抑制されると報告している。また、Nakaharaら²²⁾も同じアッセイで浸潤能を示したヒトメラノーマ細胞の免疫染色で、浸潤突起にチロシンリン酸化蛋白質の局在を認めた。また、この細胞をチロシンキナーゼ阻害剤で処理することにより、基質分解活性と浸潤突起形成が抑制されることを示し、チロシンキナーゼによる蛋白質リン酸化が基質分解活性と浸潤突起形成を制御するシグナルに関与していることを示唆した。

SugiuraとBerditchevski²¹⁾も、チロシンキナーゼ阻害剤Genisteinとチロシン脱リン酸化阻害剤orthovanadateによって、癌細胞が浸潤能を示す際に出現する細胞突起の形成が阻止されたと報告している。本研究からも、この2つの阻害剤によりSAS-H1細胞の基質分解活性と浸潤突起形成が抑制されたことから、チロシンリン酸化レベルの変化が、基質分解活性と浸潤突起形成に関与していることが示唆された。すなわち、癌細胞の基質への浸潤過程をみると、まず細胞が基質に接着し、それに続くゼラチン内への浸潤突起の侵入はチロシンキナーゼにより、さらに浸潤突起が形成されていない基質面と接している細胞膜では基質からの接着解除がチロシン脱リン酸化によって惹起されることが示唆された。

5. 浸潤突起におけるPI3-K調節蛋白質p85の凝集とPI3-Kの活性化について

Gillhamら²³⁾は, green fluorescent protein (GFP) 融合蛋白質p85を用いて生細胞におけるPI3-Kの局在変化について検討し, その結果, p85はEGF刺激により細胞質から細胞膜上のEGFレセプターに移行するが, このp85の移行はチロシンリン酸化阻害剤tyrphostinで阻止されたと報告している. Reifら²⁴⁾は, PI3-Kが低分子量GTP結合蛋白質RacやRhoの上流シグナルとして位置して, 細胞膜上でみられる葉状突起や接着斑ならびにストレスファイバーの形成を制御すると報告している. さらに, Nakaharaら²²⁾は, 浸潤突起にチロシンリン酸化を惹起するシグナル分子としてRho制御蛋白質p190 Rho GAPが局在し, 浸潤突起の形成を制御すると報告している. さらに, Bowdenら²⁵⁾は, ヒト乳癌細胞の初期浸潤過程でみられる浸潤突起という構造体に, プロテインキナーゼCファミリーPKC μ とコルタクチンおよびパキシリンの複合体をはじめ, さまざまなシグナル分子が集合し, 癌細胞の浸潤を制御することを示唆している.

本研究では, SAS-H1細胞のPI3-K蛋白質およびチロシンリン酸化蛋白質による免疫蛍光染色で, PI3-K調節蛋白質p85は浸潤突起に局在していることが明らかとなった. しかし, この細胞をwortmanninで処理すると浸潤突起が形成されず, p85は細胞質内にびまん性にみられるのみであった. このことから, 細胞質内のp85は浸潤突起を形成するとともに, その部に移行することが示唆された. また, SAS-H1細胞の浸潤突起を含むゼラチン基質画分の抗p85抗体免疫沈降産物中にp85を認めたが, wortmanninで処理したSAS-H1細胞には, p85がみられなかった. なお, 同じ免疫沈降産物の抗p110 α 抗体によるウエスタンブロットイングで, PI3-Kを活性化する触媒蛋白質p110 α の共沈がみられた. 従って, p85とp110 α は浸潤突起でも結合していることが明らかとなった.

次に, *in vitro* キナーゼアッセイにより, 各細胞画分の抗p85抗体免疫沈降産物におけるPI3-K活性を検討した. その結果, 細胞体画分よりも浸潤突起を含むゼラチン基質画分で有意に高いPIP3の産生が確認されたが, このことは, 浸潤突起でPI3-K活性化が生じていることを示すものであることから, 浸潤突起形成を制御している可能性を示唆した.

6. 基質分解活性と浸潤突起の関係について

Ellerbroekら²⁶⁾は, PI3-K活性化阻害剤LY294002によりヒト卵巣癌細胞の浸潤が抑制されるとともに, 癌細胞膜上に局在するproMMP-9の発現も低下すると報告し, PI3-Kがプロテアーゼによる基質分解活性を制御していることを示唆した.

本研究でも, SAS-H1細胞は, PI3-K活性化阻害剤により, その基質分解活性と浸潤突起の形成が抑制されたことから, PI3-Kは浸潤突起の形成に関与するばかりでなく, 癌細胞のプロテアーゼ産生をも制御している可能性が推測された.

また, Muellerら²⁷⁾は, ラウス肉腫ウイルスで形質転換したトリ胚性線維芽細胞の基質分解/浸潤アッセイで, 基質分解部位の浸潤突起にインテグリン β 1の凝集を認め, インテグリンによるプロテアーゼ産生・分泌の直接的制御を示唆した. Nakaharaら²⁸⁾は, ヒトメラノーマ細胞の基質分解に際して, 接着レセプターである α 6 β 1インテグリンを介した浸潤突起へのプロテアーゼの凝集がみられると報告し, インテグリンが局所の基質分解活性を制御していることを示唆した. さらに, ヒトメラノーマ細胞の浸潤突起における膜結合型のセリン型プロテアーゼであるseparase²⁹⁾とMMP-2²⁰⁾, およびMMP-2レセプターである膜型MMP1(MT1-MMP)³¹⁾の局在が報告され, 浸潤突起が細胞外基質の局所分解活性を制御していることを示唆してい

る。最近に至り、ヒトメラノーマ細胞の浸潤突起には $\alpha 3\beta 1$ インテグリンとseparaseが複合体を形成して存在していることが報告された³²⁾。これらのことから、基質からのシグナルはインテグリンを介して複合体を形成しているプロテアーゼに直接的にシグナル伝達を行い、即座に基質分解活性を発揮すること推測され、浸潤突起という場がシグナル分子にとって、効率の良

いフレームワークを提供していることが推測される。

これらのことから、本研究で検討した、高浸潤性ヒト舌扁平癌細胞SAS-H1のプロテアーゼによる基質分解活性と浸潤突起の形成は、PI3-Kによって制御されることが示唆された(図16)。

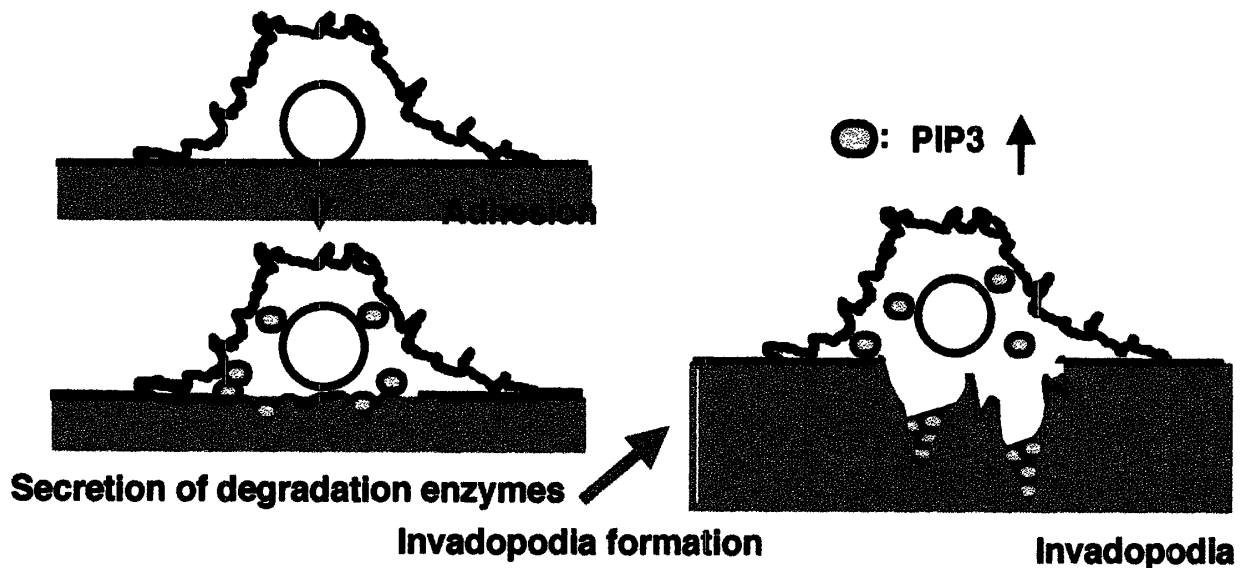


図16 PI3-K活性化による基質分解活性と浸潤突起の形成。高浸潤性舌扁平上皮癌細胞SAS-H1は、基質に接着した後、PI3-K活性化により基質分解と浸潤突起の形成が生じる

7. PI3-Kのシグナル伝達阻害剤による口腔扁平上皮癌治療法の臨床応用について

癌治療に際して、従来から化学療法薬が用いられ一応の治療効果がみられるが、これら薬剤はDNAを標的とした殺細胞効果を狙ったものであり、造血器障害を始めとする副作用の問題もあり、これ以上の治療成績の向上は期待できないと考えられている。近年、分子生物学的研究の進歩にともない癌細胞の細胞特性が次々と明らかにされ、癌細胞の増殖、浸潤転移などを担う細胞内シグナル、増殖因子レセプター、転写因子、血管新生因子等を修飾する分子を標的とした分子標的薬による治療法の開発がなされつつある³³⁾。

本研究から、SAS-H1細胞の基底膜基質への浸潤に際してみられる基質分解と浸潤突起形成

は、PI3-Kによって制御され、PI3-Kのシグナル伝達阻害剤が、初期浸潤を阻止するのに有効であることが明らかとなり、今後PI3-K阻害剤およびその誘導体による浸潤転移抑制を含めた新しい癌治療法の可能性が示唆された。

V. 結 語

in vitro 基質分解/浸潤アッセイを用い、高浸潤性舌扁平上皮癌細胞SAS-H1の初期浸潤過程におけるPI3-Kの役割について検討し、以下の結果を得た。

- 1) SAS-H1細胞は、カバースリップ上にコートされたフィブロネクチン・ゼラチン基質に接着後、基質を分解するとともに浸潤突起を形成して基質内に侵入する所見が得られた。
- 2) SAS-H1細胞を各種情報伝達阻害剤で細胞を

処理し、基質分解活性と浸潤突起の形成を制御するシグナル分子について検討した。その結果、SAS-H1細胞はPI3-K阻害剤により、濃度依存性に基質分解活性と浸潤突起の形成が抑制され、PI3-Kが癌細胞の基質への浸潤能を促進するシグナル分子であることが示唆された。

- 3) また、チロシンキナーゼおよびチロシンリン酸化阻害剤でも、この細胞の基質分解活性と浸潤突起の形成が抑制されたことから、チロシンリン酸化レベルの変化も浸潤能促進シグナルとして関与することが示唆された。
- 4) SAS-H1細胞の免疫蛍光染色により、PI3-K調節蛋白質p85とチロシンリン酸化蛋白質が浸潤突起に凝集している所見が得られた。
- 5) さらに、抗p110 α 抗体によるウエスタンブローディングで、浸潤突起を含むゼラチン基質画分にPI3-K触媒蛋白質p110 α が認められたことから、浸潤突起中でPI3-Kの活性化が生ずることが推察された。
- 6) SAS-H1細胞から得られた各画分のPI3-Kの活性化を検討した結果、細胞体画分に比べ浸潤突起を含むゼラチン画分で有意に高いPIP3の産生がみられたことから、PI3-Kは活性化されていることが示唆された。
- 7) 本研究から、PI3-Kはヒト高浸潤性舌扁平上皮癌細胞SAS-H1の初期浸潤過程で、基質分解活性と浸潤突起形成を制御していることが示唆され、PI3-Kのシグナル伝達阻害剤を応用した分子標的薬による、口腔扁平上皮癌治療法の開発・発展の可能性が示された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究で用いた基質分解・浸潤アッセイについて御教示頂いた大阪大学大学院歯学研究科顎口腔病態制御学講座口腔外科学第1教室 中原和寛先生に深謝いたします。また、本研究に対して御助言と論文の

御校閲を頂きました北海道医療大学歯学部口腔解剖学第1講座 矢嶋俊彦教授と北海道医療大学歯学部口腔生化学講座 田隈泰信教授に深謝いたします。

文 献

1. Knuutila, S., Bjorkqvist, A-M., Autio, K. et al.: DNA copy number amplifications in human neoplasms. Review of comparative genomic hybridization studies. *Am. J. Pathol.* 152 : 1107-1123, 1998.
2. Komiyama, T., Matsumura, K. and Tsuchida, N.: Comparison of DNA copy numbers in original oral squamous cell carcinomas and corresponding cell lines by comparative genomic hybridization. *Jpn. J. Cancer Res.* 88 : 476-483, 1997.
3. Okafuji, M., Ita, M., Hayatsu, Y. et al.: Identification of genetic aberrations in cell lines from oral squamous cell carcinomas by comparative genomic hybridization. *J. Oral Pathol. Med.* 28 : 241-245, 1999.
4. Okafuji, M., Ita, M., Oga, A. et al.: The relationship of genetic aberrations detected by comparative genomic hybridization to DNA ploidy and tumor size in human oral squamous cell carcinomas. *J. Oral Pathol. Med.* 29 : 226-231, 2000.
5. Gollin, S. M.: Chromosomal alterations in squamous cell carcinomas of the head and neck : Window to the biology of disease. *Head Neck* 23 : 238-253, 2001.
6. Volinia, S., Hiles, I., Ormondroyd, E. et al.: Molecular cloning, cDNA sequence, and chromosomal localization of the human phosphatidylinositol 3-kinase p110a (PIK3CA) gene. *Genomics* 24 : 472-477, 1994.
7. Shayesteh, L., Lu, Y., Kuo, W-L., Baldocchi, R. et al.: PIK3CA is implicated as an oncogene in ovarian cancer. *Nat. Genet.* 21 : 99-102, 1999.
8. Ma, Y-Y., Wei, S-J., Lin, Y-C., Lung, J-C. et al.: PIK3CA as an oncogene in cervical cancer. *Oncogene* 19 : 2739-2744, 2000.
9. Liotta, L. A.: Tumor invasion and metastasis—role of the extracellular matrix : Rhoads Memorial Award lecture. *Cancer Res.* 46 : 1-7, 1986.
10. 奥村一彦, 小西 亮, 山下知己, 他: 高浸潤性舌扁

- 平上皮癌細胞株SAS-H1の血清刺激によるPI3K活性化を介した細胞接着と細胞運動の検討。日口外誌45 : 655-665, 1999.
11. Okumura, K., Konishi, A., Tanaka, M. et al.: Establishments of high-and low-invasion clones derived from a human tongue squamous-cell carcinoma cell line SAS. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 122 : 243-248, 1996.
 12. Chen, W-T., Yeh, Y. and Nakahara, H.: An in vitro cell invasion assay : Determination of cell surface proteolytic activity that degrades extracellular matrix. *J. Tissue Culture Methods* 16 : 177-181, 1994.
 13. Mueller, S. C., Yeh, Y. and Chen, W-T.: Tyrosine phosphorylation of membrane proteins mediates cellular invasion by transformed cells. *J. Cell Biol.* 119 : 1309-1325, 1992.
 14. Bordier, C.: Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution. *J. Biol. Chem.* 256 : 1604-1607, 1981.
 15. Ninomiya, N., Hazeki, K., Fukui, Y. et al.: Involvement of phosphatidylinositol 3-kinase in Fcg receptor signaling. *J. Biol. Chem.* 269 : 22732-22737, 1994.
 16. Muramatsu, H., Kogawa, K., Tanaka, M. et al.: Superoxide dismutase in SAS human tongue carcinoma cell line is a factor defining invasiveness and cell motility. *Cancer Res.* 55 : 6210-6214, 1995.
 17. 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.
 18. Carpenter, C. L. and Cantley, L. C.: Phosphoinositide kinases. *Curr. Opin. Cell Biol.* 8 : 153-158, 1996.
 19. Werb, Z.: ECM and cell surface proteolysis : Regulating cellular ecology. *Cell* 91 : 439-442, 1997.
 20. Chen, W-T., Olden, K., Bernard, B. A. et al.: Expression of transformation-associated protease (s) that degrade fibronectin at cell contact sites. *J. Cell Biol.* 98 : 1546-1555, 1984.
 21. Sugiura, T. and Berditchevski, F.: Function of α 3 β 1-Tetraspanin protein complexes in tumor cell invasion. Evidence for the role of the complexes in production of matrix metalloproteinase 2 (MMP-2). *J. Cell Biol.* 146 : 1375-1389, 1999.
 22. Nakahara, H., Mueller, S. C., Nomizu, M. et al.: Activation of β 1 integrin signaling stimulates tyrosine phosphorylation of p190Rho GAP and membrane-protrusive activities at invadopodia. *J. Biol. Chem.* 273 : 9-12, 1998.
 23. Gillham, H., Golding, M. C. H.M., Pepperkok, R. et al.: Intracellular movement of green fluorescent protein - tagged phosphatidylinositol 3 - kinase in response to growth factor receptor signaling. *J. Cell Biol.* 146 : 869-880, 1999.
 24. Reif, K., Nobes, C. D., Thomas, G. et al.: Phosphatidylinositol 3 - kinase signals activate a selective subset of Rac / Rho - dependent effector pathways. *Curr. Biol.* 6 : 1445-1455, 1996.
 25. Bowden, E. T., Barth, M., Thomas, D. et al.: An invasion- related complex of cortactin, paxillin and PKC η associates with invadopodia at sites of extracellular matrix degradation. *Oncogene* 18 : 4440-4449, 1999.
 26. Ellerbroek, S. M., Halbleib, J. M., Benavidez, M. et al.: Phosphatidylinositol 3 - kinase activity in epidermal growth factor - stimulated matrix metalloproteinase - 9 production and cell surface association. *Cancer Res.* 61 : 1855-1861, 2001.
 27. Mueller, S. C. and Chen, W-T.: Cellular invasion into matrix beads: localization of β 1 integrins and fibronectin to the invadopodia. *J. Cell Sci.* 99 : 213-225, 1991.
 28. Nakahara, H., Nomizu, M., Akiyama, S. K. et al.: A mechanism for regulation of melanoma invasion. Ligation of α 6 β 1 integrin by laminin G peptides. *J. Biol. Chem.* 271 : 27221-27224, 1996.
 29. Monsky, W. L., Lin, C-Y., Aoyama, A. et al.: A potential marker protease of invasiveness, separase, is localized on invadopodia of human malignant melanoma cells. *Cancer Res.* 54 : 5702-5710, 1994.
 30. Monsky, W. L., Kelly, T., Lin, C-Y. et al.: Binding and localization of Mr 72,000 matrix metalloproteinases at cell surface invadopodia. *Cancer Res.* 53 : 3159-3164, 1993.
 31. Nakahara, H., Howard, L., Thompson, E. W. et al.: Transmembrane / cytoplasmic domain-mediated membrane type 1 - matrix metalloprotease docking to invadopodia is required for

- cell invasion. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94 : 7959-7964, 1997.
32. Mueller, S. C., Gherzi, G., Akiyama, S. K. et al.: A novel protease - docking function of integrin at invadopodia. J. Biol. Chem. 274 : 24947-24952A, 1999.
33. 上田 裕, 西條 長宏: シグナル伝達阻害剤 癌と化学療法 28 : 591-600, 2001.