

# 口腔扁平上皮癌における自己分泌型運動促進因子発現に関する研究(第1報) 各種癌細胞株の運動能及び浸潤能の検討

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/4540">http://hdl.handle.net/2297/4540</a>

# 口腔扁平上皮癌における自己分泌型運動促進因子 発現に関する研究

## 第1報：各種癌細胞株の運動能および浸潤能の検討

金沢大学大学院医学系研究科がん医科学専攻細胞浸潤学  
(旧講座名：歯科口腔外科)  
(主任：山本悦秀教授)

宮 田 就 弘

自己分泌型運動促進因子 (autocrine motility factor, AMF) により促進される癌細胞の運動能がヒト口腔扁平上皮癌の浸潤におよぼす作用を検討した。3種の癌浸潤様式の異なるヒト口腔扁平上皮癌由来細胞株であるOSC-19細胞、OSC-20細胞、およびHOC313細胞について、各々の細胞運動能を血清添加及び無血清培養液の環境下にて測定した。また、それらのAMFおよびAMFレセプター (gp78) 蛋白の発現を検索した。その結果、最も浸潤性の高い浸潤様式4D型の細胞株HOC313細胞のみが、無血清下においても高度の運動能を有し、かつAMFとAMFレセプター (gp78) 蛋白を発現していた。さらに傷つけアッセイ法ではHOC313細胞の運動能はAMFの中和抗体により抑制することが可能であった。一方、コラーゲン・ゲルを用いた三次元培養浸潤モデルにおいても、中和抗体を用いてHOC313細胞の浸潤を抑制することが可能であった。以上の結果より、口腔扁平上皮癌の浸潤能はAMFによる細胞運動能の亢進により獲得されており、AMFが口腔扁平上皮癌の浸潤においては促進因子として作用していることが示された。

**Key words** autocrine motility factor, mode of invasion, human oral squamous cell carcinoma

口腔癌の発生率は全癌患者の約7.4%とされ、組織型ではその大多数を扁平上皮癌が占めている<sup>1)</sup>。口腔扁平上皮癌の5年生存率は年々向上しつつあり、現在では60~80%に達してきているが、いまだ高度浸潤癌の予後は悪く臨床的に重要な課題となっている<sup>2)</sup>。Jakobssonら<sup>3)</sup>の分類を改良したYamamotoら<sup>4)</sup>は癌浸潤様式細分類と生存率との関連で、低浸潤性の1, 2型における5年生存率は91.0%, 中等度浸潤性の3型では78.2%であったのに対し、高度浸潤性の4C型では51.3%, さらに最も浸潤能が高い4D型では28.6%にすぎず、生存率との明瞭な相関性があったことを報告している<sup>5)</sup>。このように口腔癌の治療成績の向上には、高度浸潤癌における癌の浸潤およびそれに引き続く転移の機序の解明が望まれるが、癌細胞が高度の浸潤能を獲得する要因についてはいまだ不明な点が多い。一般に癌細胞の浸潤能は、多種多様な因子の複合的な作用により獲得されていると考えられるが、近年癌細胞の運動能と悪性度との関係が注目されている<sup>6)</sup>。癌細胞の運動能は様々な環境因子により刺激され、その主なものとして、増殖因子<sup>7)~9)</sup>、サイトカイン<sup>10)</sup>、細胞外マトリックスの構成成分<sup>11)12)</sup>、凝固・線溶系に属する分子<sup>13)</sup>があげられる。これらの因子は間接的に癌細胞の運動性を高めていることが知られている。一方、癌細胞自身が産生・分泌し、自らの運動性を刺激する因子は基本的には

周囲の環境に左右されず自律的な細胞運動能を有すると考えられる。自己分泌型運動促進因子 (autocrine motility factor, AMF) は、1986年にLiottaら<sup>14)</sup>により報告されたヒトA2058メラノーマ細胞の培養上清中より同定されたケモカキシスおよびケモカインを刺激するサイトカインである。AMFの発現は固形癌の多くに認められ胃癌、直腸癌や肺癌においては、その発現と転移や予後との間に相関が認められている。また口腔領域では、高度浸潤性の口腔扁平上皮癌細胞株であるHOC313細胞で高いAMFの発現が報告されており<sup>15)</sup>、口腔扁平上皮癌の浸潤においてAMFが重要な役割を担っている可能性がある。

そこで今回著者は、AMFによる癌細胞の運動能と口腔扁平上皮癌の浸潤との関係に焦点をあて、以下の研究をおこなった。実験には癌浸潤様式の異なる症例より樹立された3種のヒト口腔扁平上皮癌由来細胞株を用いて、各細胞の運動能およびそれらが発現するAMFおよびAMFレセプター<sup>16)</sup>について検索した。また実際の癌細胞の運動能とAMFの関係を検索するために、傷つけアッセイ法において、AMFの作用を阻害することにより運動能の抑制を試みた。さらに、癌細胞の浸潤時においてAMFがいかに関与しているのかを検討するために、コラーゲン・ゲルを用いた三次元培養浸潤モデルを用いて、AMFの作用を阻害することで各細胞株のコラーゲン・ゲルへの浸潤を

平成13年11月29日受付, 平成14年2月6日受理

Abbreviations : AMF, autocrine motility factor; BSA, bovine serum albumin; E-MEM, Eagle's minimal essential medium; FBS, fetal bovine serum; HOSCC, human oral squamous cell carcinoma; PVDF, polyvinylidene difluoride; PHI, phosphohexose isomerase

阻止できるのか否かを検討した。

### 材料および方法

#### I. 使用細胞

実験には癌浸潤様式の異なる3種のヒト口腔扁平上皮癌由来の細胞株であるOSC-20細胞、OSC-19細胞およびHOC313細胞を用いた。これらの細胞株の由来とその癌浸潤様式については、OSC-20細胞<sup>17)</sup>は58歳女性の口咽頭癌の頸部リンパ節転移巣から得られた細胞株で、癌浸潤様式は3型、またOSC-19細胞<sup>18)</sup>は61歳男性の舌癌の頸部リンパ節転移巣から得られた細胞株で、癌浸潤様式は4C型である。両細胞株ともヌードマウスへの同所性移植により原発巣と類似の病理組織像が再現されている。さらにHOC313細胞<sup>19)</sup>は51歳女性の下顎歯肉から口底におよぶ扁平上皮癌の頸部リンパ節転移巣から得られた細胞株で、癌浸潤様式は4D型である。なお本細胞株のみ実験動物には不可移植性とされている。これらの細胞は10%ウシ胎児血清 (fetal bovine serum, FBS)、ファンギゾン2.5 mg/l (プリストルマイヤーズ, 東京) を添加したイーグル最小必須培地 (Eagle's minimal essential medium, E-MEM) (日本製薬) にて5% CO<sub>2</sub>, 37℃の条件下で培養し、対数増殖期にあるものを実験に使用した。

#### II. 金コロイド法による細胞運動能の検討

25×25 mmのカバーガラス (松浪硝子, 大阪) をジエチルエーテル:エタノールの1:1溶液で洗浄して火炎滅菌を行った後、1.0%ウシ血清アルブミン (bovine serum albumin, BSA) (Miles, Kankakee, USA) に浸漬し、次いでエタノールで脱水してBSAを固着した後に風乾して使用した。金コロイドは蒸留水11.0mlに14.5mMのAuCl<sub>4</sub>H 1.8mlと、36.5mMのNa<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 6.0mlを加えて滅菌ビーカーに入れて加熱煮沸させると同時に、0.1%ホルムアルデヒド1.8mlをただちに加え混和後、BSA処理済みカバーガラスの入った35mm組織培養用シャーレ (岩城硝子, 船橋) に2.0mlずつ分注し、30分間放置してガラス面に付着させた。PBSで過剰な金コロイドを2回洗い流した後、各癌細胞を培養液にて3000個/mlの濃度に調整したものを金コロイドをコーティングしたシャーレに2ml分注した。血清添加の培養液として10% FBS加E-MEM培養液を使用し、無血清培養は、これにFBSを添加しないものを使用した。細胞を37℃, 5% CO<sub>2</sub> インキュベーター中で20時間培養し、運動能の測定として無作為に50個の細胞を抽出して写真撮影を行い、細胞1個あたりの運動面積をNIH imageにて計測し、平均運動面積を計測した。

#### III. ウエスタンブロット法によるAMFおよびAMFレセプター-蛋白発現の解析

##### 1. AMF蛋白の発現解析

10cmの組織培養用シャーレにて、各癌細胞をコンフルエントの状態まで培養した。無血清E-MEMを10ml添加して、37℃, 5% CO<sub>2</sub> インキュベーター中で48時間培養した。次に培養上清を採取し、遠心式ろ過ユニット (ミリポア, 日本ミリポア) にて12時間遠心濃縮を行った。得られたサンプルに等量の5% 2-メルカプトエタノール添加2×Laemmli電気泳動試料液 (4% SDS, 500mM Tris-HCl pH6.8, 2mM EDTA pH 8.0, 40%グリセロール, 0.02% ブロムフェノールブルー) を加え、2.5% 2-メルカプトエタノール添加1×Laemmli電気泳動試料液とした。これを36℃のウオーターバスにて30分間温浴した後、SDS-PAGEを行い、ポリ弗化ビニリデン (polyvinylide

difluoride, PVDF) 膜 (アトー, 東京) に転写した。転写後、PVDF膜を5%スキムミルク, 1% BSA, 0.5% Tween-20 (Bio-Rad, California, USA) を含むPBS中で12時間ブロッキング後、一次抗体としてPBSにて300倍に希釈した抗AMF抗体 (岐阜薬科大学衛生学教室・羽賀新世講師より恵与) と12時間反応させた。次に二次抗体として、PBSにて1000倍に希釈した西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗ウサギIg抗体NA934 (アマシヤム, 東京) を1時間反応させ、抗原抗体反応終了後、0.5% Tween-20を含むPBSで15分間、6回洗浄した後に、ペルオキシダーゼ染色DABキット (ナカライテスク株式会社, 京都) にて発現を可視化した。

##### 2. AMFレセプター蛋白の発現

10cmの組織培養用シャーレにてコンフルエントの状態に達した各細胞をPBSで3回洗浄した後に5mlの無血清E-MEMに交換して更に48時間培養し、PBSで洗浄後10mlのPBSを加えてセルスクレイパーで剥離し遠心分離を行った。細胞沈渣を超音波粉砕後、一部を用いてBio-Radプロテインアッセイで蛋白定量し、残りの懸濁液に等量の5% 2-メルカプトエタノール添加2×Laemmli電気泳動試料液を加え、2.5% 2-メルカプトエタノール添加1×Laemmli電気泳動試料液とした。これを36℃のウオーターバスにて30分間温浴してSDS-PAGEを行い、PVDF膜に転写した。転写後、PVDF膜を5%スキムミルク, 1% BSA, 0.5% Tween-20を含むPBS中で12時間ブロッキング後、一次抗体として抗AMFレセプター抗体 (ラットモノクローナルIgM: 群馬大学医学部整形外科学講座・渡辺秀臣講師より恵与) をPBSにて200倍に希釈し12時間反応させた。次に二次抗体として、PBSにて1000倍に希釈した西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗ウサギ抗ラットIgM抗体 (Zymed, SanFrancisco, USA) を1時間反応させた。抗原抗体反応終了後、0.5% Tween-20を含むPBSで15分間、6回洗浄した後にペルオキシダーゼ染色DABキットにて発現を可視化した。

#### IV. 傷つけアッセイ (wound healing) 法によるHOC313細胞の運動能抑制実験

組織培養用の35mmシャーレにおいて、10% FBS加E-MEM培養液にてHOC313細胞をサブコンフルエントの状態まで培養した。次に、クリスタルチップを用いて、シャーレの底面に幅1mmの線を引いた。剥がれた細胞を取り除くために、無血清のE-MEM培養液にて2回洗浄を行った。抗AMF抗体を100μg/mlの濃度になるように調整した無血清E-MEM培養液を2ml添加し、これを実験群とし、また、無血清E-MEM培養液のみを2ml添加したものを対照群とした。37℃, 5% CO<sub>2</sub> インキュベーター中で20時間培養し、形成された溝中に認められる遊走してきた癌細胞数を位相差顕微鏡下にて計測し対照群と比較した。これらのデータはMann-WhitneyのU検定にて統計処理を行った。

#### V. 三次元浸潤モデルにおけるHOC313細胞の浸潤抑制実験

癌細胞の浸潤培養基質をコラーゲン・ゲル培養キット (新田ゼラチン, 大阪) にて作成した。すなわち、0.3% ブタ腱由来酸可溶性コラーゲン溶液と、10倍濃度のE-MEM培地、および再構成用緩衝液 (260mM NaOH, 200mM HEPESを含む50mMのNaOH溶液) をそれぞれ8:1:1の割合で水中にて攪拌し混合させた。ただちに組織培養用35mmシャーレに3mlのこのコラーゲン混合溶液を加え、ゲル化させるために37℃, 5% CO<sub>2</sub> イン

キュベーター中で1時間放置した。コラーゲン溶液のゲル化を確認した後、無血清 E-MEM 培養液にて HOC313 細胞を  $2 \times 10^6/\text{ml}$  の濃度に調整したものをゲルの上面に 0.5ml 添加し全体に行き渡るように攪拌した。癌細胞がゲル表面に沈降するまで 3 時間放置し、シャーレに無血清 E-MEM を 2ml 添加し、細胞

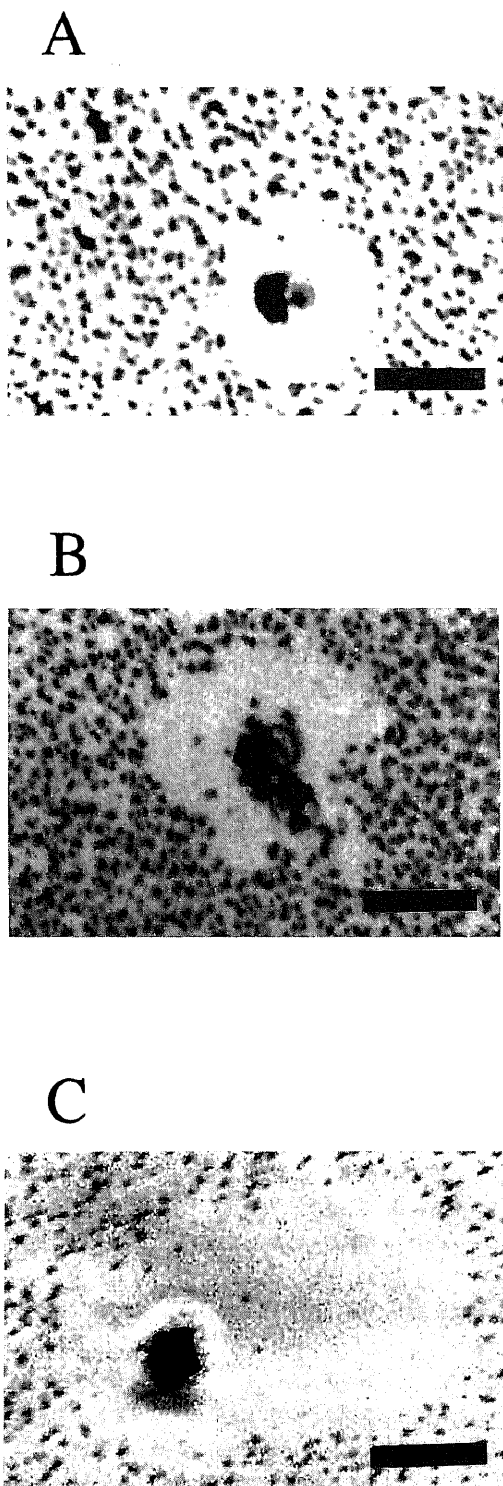


Fig. 1. Phagokinetic track motility assay of tumor cells in the culture medium with serum. (A) OSC20, (B) OSC19, HOC313. Scale bar indicates 50  $\mu\text{m}$ .

をゲル表面に付着させるために 37°C, 5%  $\text{CO}_2$  インキュベーター中において 12 時間培養した。その後、位相差顕微鏡にて癌細胞の発育を確認後、実験群には無血清 E-MEM 中に抗 AMF 抗体を 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度に調整した培養液を 3 ml 添加した。対照群には、抗体が添加されていない無血清 E-MEM を 3ml 添加した。実験群と対照群共に培養液は 2 日毎に交換し、10 日間培養を行った。その後、10%ホルマリン溶液にてゲルを固定し、パラフィン包埋した後に 4  $\mu\text{m}$  の切片を作成した。薄切切片をシランカップリング処理されたスライドガラスに付着、乾燥させ、HE 染色を行い、透徹標本を作成した。その後、光学顕微鏡にて浸潤した癌細胞の観察および写真撮影を行った。浸潤した癌細胞の評価方法として、ゲル表層で重層し増殖している癌細胞の基底面からゲル内へ浸潤した癌細胞数を計測し、対照群と比較して Mann-Whitney の U 検定にて統計処理を行った。

## 成 績

### I. 金コロイド法による口腔扁平上皮癌細胞の細胞運動能の測定

10% FBS 加 E-MEM 培地での各細胞の運動面積は、OSC-20 細胞では  $(28.7 \pm 4.4) \times 100 \mu\text{m}^2$ , OSC-19 細胞では  $(52.3 \pm 10.6) \times 100 \mu\text{m}^2$ , HOC313 細胞では  $(171.4 \pm 32.3) \times 100 \mu\text{m}^2$  であり、浸潤様式が高度の細胞株ほど高い運動能を有していた。また無血清 E-MEM 培地での各細胞の運動面積は、OSC-20 細胞では  $(18.1 \pm 3.6) \times 100 \mu\text{m}^2$  (図 1 A), OSC-19 細胞では  $(18.2 \pm 2.4) \times 100 \mu\text{m}^2$  (図 1 B), HOC313 細胞では  $(110.8 \pm 21.2) \times 100 \mu\text{m}^2$  (図 1 C) であり、血清添加培地での結果と比較すると、いずれの細胞株においても運動能は低下していた。しかしながら、HOC313 細胞では無血清の状況下においても他の細胞株の約 5 倍の運動能を示し、依然として高度の運動能を有していた(図 2)。

### II. ウェスタンブロット法による AMF および AMF レセプター蛋白の発現

OSC-20 細胞および OSC-19 細胞には、AMF および AMF レセ

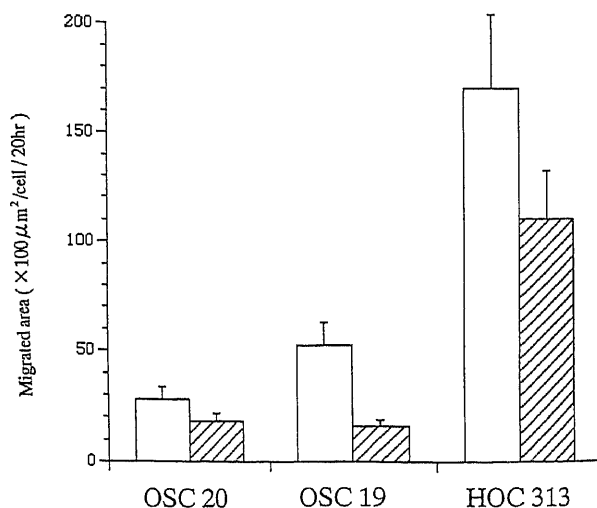


Fig. 2. Quantitative representation of tumor cell motility in culture medium with (□) or without serum (▨) condition. Cell motility was measured by phagokinetic track motility assay using gold colloid particles.

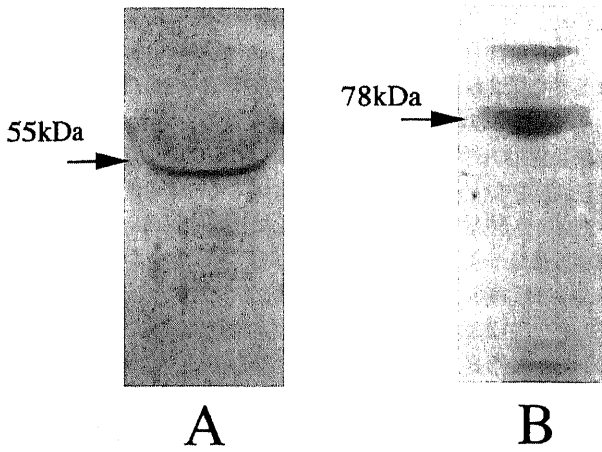


Fig. 3. Western blot analysis of AMF and gp78 (AMF receptor). Among three different malignant cell lines of OSC-20, OSC-19, and HOC313 cells, only HOC313 cells expressed the AMF (A) and gp78 (B).

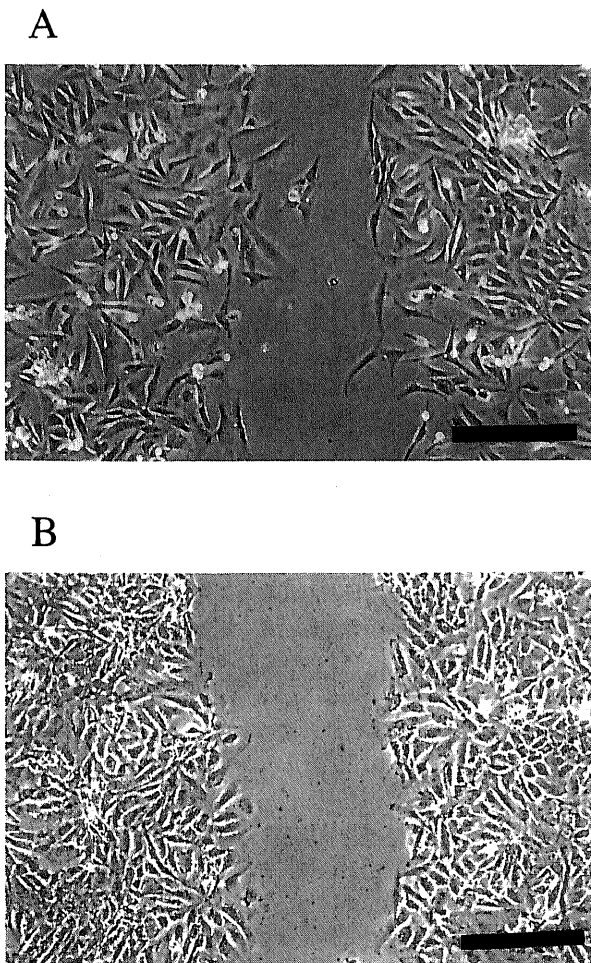


Fig. 4. Wound healing assay of HOC313 cell. (A) As a control group, HOC313 cells were cultured in E-MEM many tumor cells moved well to the scratch. (B) As an experiment group, HOC313 cells were cultured in E-MEM containing anti-AMF antibody most tumor cells didn't move to the scratch. Scale bar indicates 50  $\mu$  m.

プター蛋白のいずれの発現もウエスタンブロット法においては認められなかった。HOC313細胞においてAMF蛋白は分子量55kDa (図3 A) に、そしてAMFレセプター蛋白の発現は78kDaの位置に発現を認めた(図3 B)。

Ⅲ. 傷つけアッセイ法における抗AMF抗体による細胞運動抑制

抗AMF抗体を用いて、AMFの作用を中和することによりHOC313細胞の運動能を抑制したところ、形成された溝に遊走した癌細胞数は、対照群では(28 $\pm$ 4)個/mm<sup>2</sup>(図4 A)、抗体添加群においては(12 $\pm$ 3)個/mm<sup>2</sup>(図4 B)であり、有意差(p<0.05)をもって遊走細胞数は低下した。

Ⅳ. 三次元浸潤モデルにおける抗AMF抗体による浸潤抑制

抗AMF抗体を用いてAMFの作用を中和することにより、HOC313細胞の運動能を抑制してコラーゲン・ゲルへの浸潤能

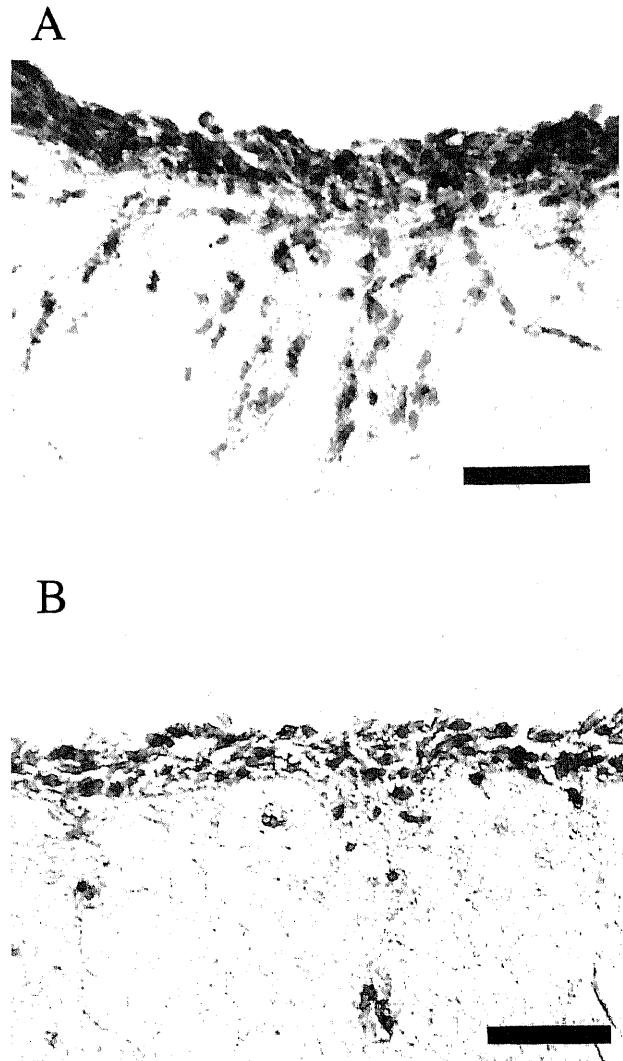


Fig. 5. Three dimensional invasion model of HOC313 cells on collagen gel matrix. As a control group, HOC313 cells were cultured in E-MEM, a lot of tumor cells were invaded deeply to the collagen matrix (A). As an experiment group, HOC313 cells were cultured in the condition of E-MEM containing anti-AMF antibody, a few of tumor cells invaded to the matrix (B). Scale bar indicates 50  $\mu$  m.

を検討したところ、ゲル基質へ浸潤した細胞数は対照群では(26±4)個/mm<sup>2</sup>(図5A)、抗体添加群では(7±3)個/mm<sup>2</sup>(図5B)であり、有意差(p<0.05)をもって浸潤細胞数は低下した。すなわち、三次元浸潤モデル上で癌細胞の運動能を抑制することにより癌細胞のコラーゲン・ゲルへの浸潤は抑制された。

### 考 察

AMFは癌細胞の産生する運動・増殖因子として報告された分子量55kDaのポリペプチドである。その後の検索により、AMFは細胞内解糖系酵素であるフォスフォヘキソースイソメラーゼ(phosphohexose isomerase, PHI)、また神経成長因子であるニューロロイキン(neuroleukin, NLK)と同じ構造を持つことが明らかにされた<sup>20)</sup>。正常細胞においても広く存在するこの酵素が、癌化に従って細胞外分泌される理由は明らかではないが、AMFは単一遺伝子から産生される多面的な発現を示す酵素であるとNiinakaら<sup>21)</sup>は報告している。そして、AMFは分子量78kDaのAMFレセプター(gp78)に結合することで細胞反応を引き起こす<sup>16)22)23)</sup>。そのシグナル伝達経路として、百日咳毒素感受性のG蛋白の活性化<sup>24)</sup>、イノシトールリン酸の産生<sup>25)</sup>、加えてレセプターのリン酸化<sup>16)</sup>、プロテインキナーゼCの活性化<sup>26)27)</sup>により細胞内骨格であるアクチンフィラメント(actin filament)の伸張を促進することで運動能を促進すると考えられている。また、Torimuraら<sup>28)</sup>は肝細胞癌由来細胞株における検索で、AMFによる運動能の促進にはRhoとMEK1/MEK2の活性の亢進も関与すると述べている。加えて、AMFは活性化型インテグリンβ1サブユニットの発現を亢進させることで細胞外マトリックスとの接着を促進し、マトリックス・プロテアーゼ-2の発現を亢進することにより基質分解を促進させ浸潤を促進するとも報告しており、AMFが他の浸潤促進因子との相互作用も有していることを示唆している。癌とAMF/PHIについても、その密接な関連を示す多数の報告がある。血清中の亢進したPHI活性では腫瘍マーカーとして、結腸・直腸癌、乳癌、肺癌、腎臓、胃・腸癌において有用であり、かつ転移との関連も明らかにされている<sup>29)~34)</sup>。また、臨床組織におけるAMFの発現として、肺癌の免疫染色法による検索の結果、AMFの発現と予後との間に有意な相関が認められている<sup>35)</sup>。また、AMFレセプターの発現に関しても、その発現と予後との間に有意な相関が胃癌と直腸癌、食道扁平上皮癌において認められている<sup>36)~38)</sup>。さらに大腸癌においては接着分子であるE-カドヘリンの発現との逆相関も確認されており<sup>39)40)</sup>、癌とAMFの密接な関係が明らかにされている。癌細胞株を用いた検索では、AMFはHT-1080<sup>41)</sup>、Gc-4PFマウス線維肉腫<sup>42)</sup>の細胞培養上清中から検出されている。B16-F1悪性黒色腫細胞においては、AMFの濃度依存的に細胞運動能が亢進すると報告されており<sup>43)</sup>AMFが細胞運動能に大きく関わっていることが示されている。モロニーマウス肉腫ウイルスを導入したMDCK(Madin-Darby Canine Kidney)細胞では、AMFレセプターの発現の増加とE-カドヘリンの減少、および細胞運動能の増大が認められ<sup>44)</sup>、癌化に伴う一連の遺伝子異常により、AMF遺伝子が発現されることが示唆されている。口腔領域の検索においては、1994年にIshisakiら<sup>45)</sup>は今回の実験でも使用したHOC313細胞において、百日咳毒を作用させることで運動能の抑制を認めたことより、AMFが運動能に関与している可能性を示した。原田<sup>15)</sup>は、癌浸潤様式の異なる症例より樹立し

たヒト口腔扁平上皮癌細胞株において、最も高度の運動能を有するHOC313細胞が、AMFのmRNAを多量に産生していることを明らかにした。しかしながら、AMF蛋白の発現については未だ不明である。今回著者は、癌浸潤様式の異なる症例より樹立した3種類の口腔扁平上皮癌細胞株を用いてAMFが細胞運動能および浸潤におよぼす影響を検討した。はじめに、異なる浸潤能を有する細胞株の平面における細胞運動能を金コロイド法により測定した。その結果として浸潤能が高い細胞株ほど細胞運動能は亢進しており、最も高浸潤性の4D型細胞株であるHOC313細胞では他の細胞の3~5倍の運動能を有していた。また興味深いことに、他の細胞では無血清培養下ではその運動能が極端に低下するのに対してHOC313細胞では高い運動能を維持していた。この結果より、4D型細胞株においては自己分泌様式の運動促進因子が働いているため、細胞運動能は培養液中の血清蛋白の有無に殆ど影響されないものであると推測された。次に、この推測を確認する目的で蛋白の発現をウエスタンブロット法により検索した。その結果としてAMF蛋白とAMFレセプター蛋白の両方をHOC313細胞のみが発現しており、これらの作用によりHOC313細胞の高度の運動能が保持されている可能性が示唆された。そこで、AMFにより運動能が亢進しているならば、その作用を阻害することで運動能の抑制が可能であろうとの仮説に基づき、中和抗体にてAMFの作用を阻害し、HOC313細胞の運動能の変化を傷つけアッセイ法において検討した。その結果、中和抗体添加群においては有意に運動能の抑制が認められた。以上の結果より、HOC313細胞が獲得している高度な運動能はAMFの作用であることが立証された。次に、AMFの作用による運動能と癌細胞の浸潤との関係を検索するために、AMFによる運動能を抑制することで浸潤を抑制することが可能か否かを検討した。その際にはコラーゲン・ゲル<sup>46)</sup>を培養基質に用いた三次元培養浸潤モデルを使用した。この三次元培養浸潤モデルは細胞本来の立体的な形態での培養が特徴であり、より生体に近い環境の再現を可能とする。実際にマウス乳腺上皮細胞を用いた実験で、通常のシャーレ内での単層培養では肝細胞増殖因子(hepatocyte growth factor, HGF)の作用に反応しない細胞が、三次元培養モデルにおいては反応を示したとする報告がある<sup>47)</sup>。また、児島<sup>48)</sup>は口腔扁平上皮癌から樹立した細胞株をコラーゲン・ゲルにおいて培養を行ったところ、線維芽細胞をゲル基質に包埋したものにのみ浸潤像が観察された。一般的には本モデルにおいて浸潤像を再現するにはゲル基質に線維芽細胞を混入する必要がある。しかしながら、今回用いた浸潤様式4D型のHOC313細胞では、線維芽細胞の有無に関わらず浸潤像が観察されたことより、HOC313細胞の有する浸潤能の主たるものは自己分泌様式によるものであることが示唆された。三次元培養浸潤モデルを用いた浸潤抑制実験の結果では、抗AMF抗体を培養液に添加し運動能を抑制することで、HOC313細胞の基質への浸潤の抑制が可能であった。この結果は、AMFの作用による癌細胞の運動能の増大が浸潤を亢進していることを示しており、口腔扁平上皮癌の浸潤過程においてAMFは重要な浸潤促進因子であることが明らかになった。また、最も高浸潤性の癌浸潤様式4D型口腔扁平上皮癌においてもAMFによる運動能を抑制することでその浸潤が抑制されることが本研究で明らかにされたことから、最近臨床で問題となっている高度浸潤癌の治療に新たな展開が期待される。

## 結 論

AMFにより促進される癌細胞の運動能が口腔扁平上皮癌の浸潤能におよぼす影響について検討する目的で、口腔扁平上皮癌の細胞株を用いて実験を行ったところ以下の結論を得た。

1. 金コロイド法による口腔扁平上皮癌細胞の細胞運動能の測定にて、10% FBS加E-MEM培地での各細胞の運動面積は、OSC-20細胞では $(28.7 \pm 4.4) \times 100 \mu\text{m}^2$ 、OSC-19細胞では $(52.3 \pm 10.6) \times 100 \mu\text{m}^2$ 、HOC313細胞では $(171.4 \pm 32.3) \times 100 \mu\text{m}^2$ であり、浸潤様式が高度の細胞株ほど高い運動能を有していた。また無血清E-MEM培地での各細胞の運動面積は、OSC-20細胞では $(18.1 \pm 3.6) \times 100 \mu\text{m}^2$ 、OSC-19細胞では $(18.2 \pm 2.4) \times 100 \mu\text{m}^2$ 、HOC313細胞では $(110.8 \pm 21.2) \times 100 \mu\text{m}^2$ と血清添加培地での結果と比較するといずれの細胞株においても運動能は低下していた。しかしながら、HOC313細胞では無血清の状況下においても他の細胞株の約5倍の運動能を示し、依然として高度の運動能を有していた。

2. OSC-20細胞およびOSC-19細胞には、AMFおよびAMFレセプター蛋白のいずれの発現もウエスタンブロット法においては認められず、HOC313細胞のみ両蛋白を発現していた。AMF蛋白の発現は分子量55kDa、AMFレセプター蛋白の発現は78kDaの位置に発現を認めた。

3. 抗AMF抗体を用いてAMFの作用を中和することによりHOC313細胞の運動能を抑制したところ、形成された溝に遊走した癌細胞数は抗体添加群においては $(12 \pm 3)$ 個/mm<sup>2</sup>であり、対照群の $(28 \pm 4)$ 個/mm<sup>2</sup>と比較して有意差 ( $p < 0.05$ ) をもって低下し癌細胞の運動能を抑制することが可能であった。

4. 抗AMF抗体を用いてAMFの作用を中和することによりHOC313細胞の運動能を抑制してコラーゲン・ゲルへの浸潤能を検討したところ、ゲル基質へ浸潤した細胞数は、抗体添加群では $(7 \pm 3)$ 個/mm<sup>2</sup>であり、対照群の $(26 \pm 4)$ 個/mm<sup>2</sup>と比較して有意差 ( $p < 0.05$ ) をもって低下した。すなわち、三次元浸潤モデル上で癌細胞の運動能を抑制することにより癌細胞のコラーゲン・ゲルへの浸潤は抑制された。

以上の結果より、口腔扁平上皮癌の浸潤能はAMFによる運動能の亢進に依存していることが示唆され、さらに、運動能を抑制することで高度浸潤癌の浸潤を抑制することが可能であった。また、自己分泌型運動促進因子が口腔扁平上皮癌の浸潤促進因子であることが明らかとなった。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、当研究の御指導、御校閲を賜りました恩師・山本悦秀教授、研究中、常に御助言、御指導をいただいた川尻秀一博士に深く感謝致します。さらに、本研究の遂行にあたり御協力を頂きました当講座の中川清昌助教授をはじめとする医局の諸先生方に感謝の意を表します。また、貴重な御助言を賜り、加えて実験材料を快く供与して下さった群馬大学医学部整形外科講座渡辺秀臣講師、岐阜薬科大学衛生学教室羽賀新世講師に感謝いたします。

## 文 献

- 1) AICR. Food, nutrition and the prevention of cancer: a global perspective. Washington, D.C: American Institute for Cancer Research 1997
- 2) 田中 伸幸, 出張 裕也, 荻 和弘, 山口 晃, 須田 善行, 小浜 源都. 機能的頸部郭清術施行例の臨床的検討. 日

口外誌 46: 655-658, 2000

- 3) Jacobsson PA, Eneroth GM, Killander D, Moeberger G, Martensson B. A histological classification and grading of malignancy in carcinoma of the larynx. *Acta Radiol* 12: 1-8, 1973
- 4) Yamamoto E, Kohama G, Sunakawa H, Iwai M, Hiratuka H. Mode of invasion, bleomycin sensitivity, and clinical course in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Cancer* 51: 2175-80, 1983
- 5) Yamamoto E, Kohama G, Hiratuka H, Kumagai S. Role of preoperative chemotherapy for oral cancer from the viewpoint of mode of invasion. *J Oral Maxillofac Surg* 6: 113-121, 1994
- 6) Abraham MT, Kuriakose MA, Sacks PG, Yee H, Chiriboga L, Bearer EL, Delacure MD. Motility-related proteins as markers for head and neck squamous cell cancer. *Laryngoscope* 111(7): 1285-9, 2001
- 7) Gherardi E. Growth factors and cell movement. *Eur J Cancer* 27(4): 403-5, 1991
- 8) Wong AS, Leung PC, Auersperg N. Hepatocyte growth factor promotes in vitro scattering and morphogenesis of human cervical carcinoma cells. *Gynecol Oncol* 78 (2): 158-65, 2000
- 9) Pienta KJ, Isaacs WB, Vindivich D, Coffey DS. The effects of basic fibroblast growth factor and suramin on cell motility and growth of rat prostate cancer cells. *J Urol* 145(1): 199-202, 1991
- 10) Arihiro K, Oda H, Kaneko M, Inai K. Cytokines facilitate chemotactic motility of breast carcinoma cells. *Breast Cancer* 7(3): 221-30, 2000
- 11) Thomas GJ, Lewis MP, Whawell SA, Russell A, Sheppard D, Hart IR, Speight PM, Marshall JF. Expression of the alphavbeta6 Integrin Promotes Migration and Invasion in Squamous Carcinoma Cells. *J Invest Dermatol* 117(1): 67-73, 2001
- 12) Bowersox JC, Sorgente N. Chemotaxis of aortic endothelial cells in response to fibronectin. *Cancer Res* 42(7): 2547-51, 1982
- 13) Yu J, Moon A, Kim HR. Both platelet-derived growth factor receptor (PDGFR)-alpha and PDGFR-beta promote murine fibroblast cell migration. *Biochem Biophys Res Commun* 282(3): 697-700, 2001
- 14) Liotta LA, Mandler R, Murano G, Katz DA, Gordon RK, Chiang PK, Schiffmann E. Tumor cell autocrine motility factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 3302-6, 1986
- 15) 原田 博紀. 浸潤様式との関連から見たヒト口腔扁平上皮癌細胞の運動促進因子の解析. *十全医会誌* 107: 163-173, 1998
- 16) Watanabe H, Carmi P, Hogan V, Raz T, Silletti S, Nabi IR, Raz A. Purification of human tumor cell autocrine motility factor and molecular cloning of its receptor. *J Biol Chem* 266: 13442-8, 1991
- 17) Yokoi T, Hirata S, Nishimura F, Miyakawa A, Odajima T, Kohama G, Mochizuki Y. Some properties of a newly established human cell line derived from a oral squamous carcinoma. *Tumor Res* 25: 93-103, 1990
- 18) Yokoi T, Homma H, Odajima T. Establishment and characterization of OSC19 cell line in serum-and protein-free culture. *Tumor Res* 24: 1-17, 1988

- 19) Ishisaki A, Oida S, Momose F, Amagasa T, Rikimaru K, Ichijo H, Sasaki S. Identification and characterization of autocrine motility factor-like activity in oral squamous cell carcinoma cells. *Int J Cancer* 59: 783-788, 1994
- 20) Watanabe H, Takehana K, Date M, Shinozaki T, Raz A. Tumor cell autocrine motility factor is the neuroleukin/phosphohexose isomerase polypeptide. *Cancer Res* 56: 2960-3, 1996
- 21) Niinaka Y, Paku S, Haga A, Watanabe H, Raz A. Expression and secretion of neuroleukin/phosphohexose isomerase/maturation factor as autocrine motility factor by tumor cells. *Cancer Res* 58(12): 2667-74, 1998
- 22) Nabi IR, Watanabe H, Raz A. Identification of B16 F1 Melanoma autocrine motility-like factor receptor. *Cancer Res* 50: 409-14, 1990
- 23) Silletti S, Watanabe H, Hogan Victor et al. Purification of B16-F1 Melanoma Autocrine Motility Factor and Its Receptor. *Cancer Res* 51: 3507-11, 1991
- 24) Watanabe H, Nabi IR, Raz A. The relationship between motility factor receptor internalization and the lung colonization capacity of murine melanoma cells. *Cancer Res* 51(10): 2699-705, 1991
- 25) Kohn EC, Liotta LA, Schiffmann E. Autocrine motility factor stimulates a three-fold increase in inositol trisphosphate in human melanoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 166(2): 757-64, 1990
- 26) Silletti S, Timar J, Honn KV, Raz A. Autocrine motility factor induces differential 12-lipoxygenase expression and activity in high- and low-metastatic K1735 melanoma cell variants. *Cancer Res* 54(22): 5752-6, 1994
- 27) Timar J, Silletti S, Bazaz R, Raz A, Honn KV. Regulation of melanoma-cell motility by the lipoxygenase metabolite 12-(S)-HETE. *Int J Cancer* 55(6): 1003-10, 1993
- 28) Torimura T, Ueno T, Kin M, Harada R, Nakamura T, Kawaguchi T, Harada M, Kumashiro R, Watanabe H, Avraham R, Sata M. Autocrine motility factor enhances hepatoma cell invasion across the basement membrane through activation of beta1 integrins. *Hepatology* 34(1): 62-71, 2001
- 29) Baumann M, Brand K. Purification and characterization of phosphohexose isomerase from human gastrointestinal carcinoma and its potential relationship to neuroleukin. *Cancer Res* 48(24 Pt 1): 7018-21, 1988
- 30) Baumann M, Kappl A, Lang T, Brand K, Siegfried W, Paterok E. The diagnostic validity of the serum tumor marker phosphohexose isomerase (PHI) in patients with gastrointestinal, kidney, and breast cancer. *Cancer Invest* 8 (3-4): 351-6, 1990
- 31) Filella X, Molina R, Jo J, Mas E, Ballesta AM. Serum phosphohexose isomerase activities in patients with colorectal cancer. *Tumour Biol* 12(6): 360-7, 1991
- 32) Patel PS, Raval GN, Rawal RM, Patel GH, Balar DB, Shah PM, Patel DD. Comparison between serum levels of carcinoembryonic antigen, sialic acid and phosphohexose isomerase in lung cancer. *Neoplasma* 42(5): 271-4, 1995
- 33) Bodansky, O. Serum phosphohexose isomerase in cancer. II. As an index of tumor growth in metastatic carcinoma of the breast. *Cancer (Phila.)* 7: 1200-1226, 1954
- 34) Shwarz, M. K. Laboratory aids to diagnosis: enzyme. *Cancer (Phila.)* 37: 542-548, 1976.
- 35) Takanami I, Takeuchi K, Naruke M, Kodaira S, Tanaka F, Watanabe H, Raz A. Autocrine motility factor in pulmonary adenocarcinomas: results of an immunohistochemical study. *Tumour Biol* 19(5): 384-9, 1998
- 36) Hirono Y, Fushida S, Yonemura Y, Yamamoto H, Watanabe H, Raz A. Expression of autocrine motility factor receptor correlates with disease progression in human gastric cancer. *Br J Cancer* 74(12): 2003-7, 1996
- 37) Yelian FD, Liu A, Todt JC, Lei J, Qureshi F, Jacques SM, Deppe G, Raz A. Expression and function of autocrine motility factor receptor in human choriocarcinoma. *Gynecol Oncol* 62(2): 159-165, 1996
- 38) Maruyama K, Watanabe H, Shiozaki H, Takayama T, Gofuku J, Yano H, Inoue M, Tamura S, Raz A, Monden M. Expression of autocrine motility factor receptor in human esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 64(5): 316-21, 1995
- 39) Otto T, Birchmeier W, Schmidt U, Hinke A, Schipper J, Rubben H, Raz A. Inverse relation of E-cadherin and autocrine motility factor receptor expression as a prognostic factor in patients with bladder carcinomas. *Cancer Res* 54(12): 3120-3, 1994
- 40) Otto T, Bex A, Schmidt U, Raz A, Rubben H. Improved prognosis assessment for patients with bladder carcinoma. *Am J Pathol* 150(6): 1919-23, 1997
- 41) Silletti S, Raz A. Autocrine motility factor is a growth factor. *Biochem Biophys Res Commun* 194(1): 446-57, 1993
- 42) Watanabe H, Kanbe K, Chigira M. Differential purification of autocrine motility factor derived from a murine protein-free fibrosarcoma. *Clin Exp Metastasis* 12(2): 155-63, 1994
- 43) Silletti S, Watanabe H, Hogan V, Nabi IR, Raz A. Purification of B16-F1 melanoma autocrine motility factor and its receptor. *Cancer Res* 51(13): 3507-11, 1991
- 44) Simard D, Nabi IR. Inverse relation of autocrine motility factor receptor and E-cadherin expression following MDCK epithelial cell transformation. *Biochem Biophys Res Commun* 219(1): 122-7, 1996
- 45) Ishisaki A, Oida S, Momose F, Amagasa T, Rikimaru K, Ichijo H, Sasaki S. Identification and characterization of autocrine-motility-factor-like activity in oral squamous-cell-carcinoma cells. *Int J Cancer* 59(6): 783-8, 1994
- 46) Yang J, Nandi S. Growth of cultured cells using collagen as substrate. *Int Rev Cytol* 81:249-286, 1983
- 47) Sasaki M, Enami J. Mammary fibroblast-derived hepatocyte growth factor and mammogenic hormones stimulate the growth of mouse mammary epithelial cells in primary culture. *Endocr J* 46(3): 359-66, 1999
- 48) 児島 伸也. 口腔扁平上皮癌の浸潤能に関する実験的研究. *十全医会誌* 101: 266-281, 1992



**Tumor Invasion and Autocrine Motility Factor in Oral Squamous Cell Carcinoma. Part1: In Vitro Study of Cell Motility and Invasion** Narihiro Miyata, Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Graduate School of Medical Science, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 — J. Jusen Med Soc., **111**, 106 — 113 (2002)

**Key words** autocrine motility factor, mode of invasion, human oral squamous cell carcinoma

**Abstract**

Autocrine motility factor (AMF) is a tumor-derived Mr 55,000 cytokine that has been identified as a specific motility-modifier of its cells. I examined how the motility accelerated by AMF is related to the tumor invasion of human oral squamous cell carcinoma (HOSCC). Three different malignancy's cell lines established from human oral squamous cell carcinomas were used in this experiment. The tumor cell motility were measured, and the AMF protein and AMF receptor (gp78) were detected by using those cell lines. As a result, HOC313 cells, classified grade 4D by mode of invasion, had the highest cell movement and expressed the AMF and the AMF receptor (gp78). Furthermore the neutralization antibody of the AMF blocked the movement ability of HOC313. In an invasion suppression experiment using the invasion model made of collagen gel to which the neutralization antibody of AMF was added, the tumor invasion of HOC313 was decreased with significant correlations compared with control groups. These results showed that the tumor invasion was accelerated by the cell motility induced by the AMF, and it was cleared that the AMF is the promotion factor of tumor invasion of HOSCC.