

Cell Motility Factors Involved in the Invasiveness of Human Oral Squamous Cell Carcinoma

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	http://hdl.handle.net/2297/9304

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

金沢大学医学部医学科歯科口腔外科学講座(主任：山本悦秀教授)

原 田 博 紀

口腔扁平上皮癌における癌細胞の運動能と浸潤様式との関連を明らかにする目的で、浸潤様式の異なる3種類の口腔扁平上皮癌細胞株 (OSC20, 3型; OSC19, 4C型; HOC313, 4D型) を用いて細胞の運動能を比較検討するとともに、それらの運動能に關与する運動促進因子の発現と機能について検討した。金コロイド法を用いて細胞の運動性を測定したところ、血清存在下での運動能はHOC313細胞が最も高く、次いでOSC19細胞、OSC20細胞の順であったが、無血清培地ではHOC313細胞のみが大きな運動能を示した。この結果からHOC313細胞が運動促進因子を自ら産生していることが推測された。これらの細胞における自己分泌型運動促進因子 (autocrine motility factor, AMF) 遺伝子の発現を検討した結果、いずれの細胞でもmRNAの存在が認められたがHOC313細胞で特に強く発現していた。またAMFに対する免疫組織化学染色ではHOC313細胞のみにAMF蛋白の存在が認められ、また抗AMF抗体により運動性が抑制されたことから、HOC313細胞が自己運動促進因子としてAMFを産生していることが明らかになった。扁平上皮癌細胞がAMFを産生・分泌しているのを証明したのは本研究が初めてである。AMFレセプターのmRNAの発現はいずれの細胞にも認められたが、レセプター蛋白の存在量はHOC313細胞>OSC20細胞の順に高く、OSC19細胞では認められなかった。AMFと同一アミノ酸配列を有するグルコース6-リン酸イソメラーゼ (glucose 6-phosphate isomerase, G6PI) を作用させると、HOC313細胞とOSC20細胞は濃度依存的に運動性が亢進し、これはAMFレセプター蛋白の発現量と相応していた。分散因子/肝細胞増殖因子 (scatter factor / hepatocyte growth factor, SF/HGF) に対しては、HOC313細胞とOSC20細胞で濃度依存的な遊走性の亢進が認められた。フィブロネクチン (fibronectin, Fn) およびビトロネクチン (vitronectin, Vn) に対する遊走性はHOC313細胞で著しく、OSC20細胞では認めなかった。以上より、口腔扁平上皮癌細胞の運動能と各種運動促進因子に対する感受性は浸潤様式によって異なり、特に4D型の癌細胞は自己分泌型の運動促進因子を産生・分泌して自らの運動能を高め、周囲組織へび漫性に浸潤していくものと考えられた。

Key words autocrine motility factor, fibronectin, mode of invasion, oral squamous cell carcinoma, scatter factor

がんの特性である浸潤・転移という現象は原発巣からの腫瘍細胞の離脱にはじまり、細胞外マトリックスの破壊と周囲組織への浸潤、血管内への侵入、他臓器への着床、そしてそこでの増殖という過程を通して成立する。この一連の過程の中で腫瘍細胞の持つ運動能は、接着能、マトリックス分解能とならんでその腫瘍の浸潤能や転移能を左右する重要な形質の一つと考えられている¹⁾が、癌研究において比較的着手の遅れている分野である。最近、この運動能に關与する因子として腫瘍細胞自身が細胞外に分泌して自らの運動能を促進する自己分泌型の自己分泌型運動促進因子 (autocrine motility factor, AMF)^{2)~4)} やオートタキシン (autotaxin)⁵⁾⁶⁾、浸潤刺激因子 (invasion stimulating factor)⁷⁾⁸⁾、遊走刺激因子 (migration stimulating factor)⁹⁾¹⁰⁾、解離因子 (dissociation factor)¹¹⁾、また傍分泌型の運動促進因子として分散因子 / 肝細胞増殖因子 (scatter factor / hepatocyte

growth factor, SF / HGF)^{12)~14)}、エピタキシン (epitaxin)¹⁵⁾、肝細胞増殖因子様蛋白 (hepatocyte growth factor like protein)¹⁶⁾、C3b様因子¹⁷⁾、線維芽細胞由来運動促進因子 (fibroblast-derived motility factor)¹⁸⁾などが次々と発見され、これらの運動促進因子の発現と腫瘍細胞の浸潤・転移能との関係が次第に明らかにされつつある。また、既存のサイトカインや細胞外マトリックス成分のなかにも運動促進活性を有するものが存在し¹⁹⁾²⁰⁾、運動促進因子のAMFが増殖因子として働くことも報告されている²¹⁾。しかしながら、これらの運動促進因子の作用機序は解明されておらず、したがって運動促進因子の定義や分類は今なお確立していないのが実状である。

一方、口腔扁平上皮癌では腫瘍の発育先進部の浸潤様式が組織学的悪性度を評価する上で重要とされ、Jacobsson らの²²⁾分類を改訂したYamamotoら²³⁾の分類が口腔外科領域で広く採用

平成10年1月20日受付、平成10年4月7日受理

Abbreviations : AMF, autocrine motility factor; BSA, bovine serum albumin; Eagle's MEM, Eagle's minimal essential medium; FBS, fetal bovine albumin; Fn, fibronectin; G6PI, glucose 6-phosphate isomerase; HGF, hepatocyte growth factor; PBS, phosphate-buffered saline; RT-PCR, reverse transcription-PCR; SF, scatter factor; Vn, vitronectin

されている。YamamotoらはJacobsson分類における高度浸潤型の4型を、4C型(索状の胞巣を形成して浸潤する型)と悪性度がさらに高度な4D型(胞巣をつくらず、び漫性に浸潤する型)とに区分した。4D型の腫瘍は周辺組織へび漫性に浸潤し、早期に頸部リンパ節へ転移するため、制御が極めて困難で、予後が不良となる場合が多い。しかしながら、このような高度浸潤癌の発生機序やその生物学的特性に関してはいまだ不明な点が多く、腫瘍細胞の運動能との関連性も明らかではない。

そこで、本研究では癌細胞の運動能と浸潤様式との関連を明らかにする目的で、浸潤様式の異なる3種類のヒト口腔扁平上皮癌由来の細胞株OSC20(3型)²⁴⁾、OSC19(4C型)²⁵⁾、HOC313(4D型)²⁶⁾²⁷⁾を用いて、それぞれの細胞の運動能を比較検討した。また、これらの細胞における自己分泌型運動促進因子AMF^{28) 29)}とそのレセプター(gp78)^{28) 29)}の発現についても検討した。AMFは1986年にLiottaら²⁸⁾がヒト悪性黒色腫細胞株A2058の培養液中から運動促進因子を分離して命名したものであるが、最近、Watanabeら³⁰⁾によってその一次構造が解析され、AMFは解糖系酵素のグルコース6-リン酸イソメラーゼ(glucose 6-phosphate isomerase, G6PI)および神経栄養因子のニューロロイキン(neuroleukin)と同一であることが明らかにされている。本研究ではさらに、主として線維芽細胞から分泌され腫瘍細胞の運動を促進することが報告されている傍分泌型細胞運動促進因子のSF/HGF、および細胞外マトリックス成分で細胞運動促進活性を持つフィブロネクチン(fibronectin, Fn)^{34) 36)}とビトロネクチン(vitronectin, Vn)^{37) 39)}が口腔扁平上皮癌細胞の運動能に影響を及ぼすかどうかについても検討を行った。

材料および方法

I. 使用細胞と培養方法

実験には浸潤様式の異なる3種類のヒト口腔扁平上皮癌細胞株OSC20、OSC19、HOC313を用いた。OSC20²⁴⁾は、58歳女性の口峽咽頭癌の頸部リンパ節転移巣から得られた細胞株であり、ヌードマウスへの同所性移植により原発巣と同一の病理組織像が再現され⁴⁰⁾、浸潤様式は山本・小浜分類の3型に分類されている(図1A)。OSC19²⁵⁾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、同様にヌードマウスへの同所性移植により原発巣と同一の病理組織像が再現され⁴⁰⁾、浸潤様式は4C型に分類される(図1B)。両細胞株は札幌医科大学医学部口腔外科学講座の小浜源郁教授、横井敏一博士から恵与された。HOC313²⁶⁾²⁷⁾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あり原発巣の浸潤様式は4D型である(図1C)(徳島大学歯学部第一口腔外科学講座の力丸浩一助教授より恵与)。これらの細胞は10%ウシ胎児血清(fetal bovine serum, FBS)(United Biotechnological, Victoria, Australia)、ファンギゾン2.5 mg/l(プリストルマイヤーズ, 東京)、ペニシリン・ストレプトマイシン混合液100000単位/l(Bio Whittaker, Walkersville, USA)を添加したイーグル最小必須培地(Eagle's minimal essential medium, イーグルMEM)(日水製薬)にて5%CO₂、37℃の条件下で培養した。

II. 細胞運動能の検討

1. 金コロイド法

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)

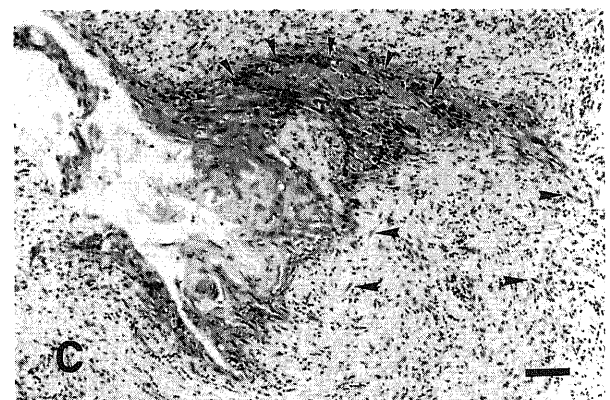
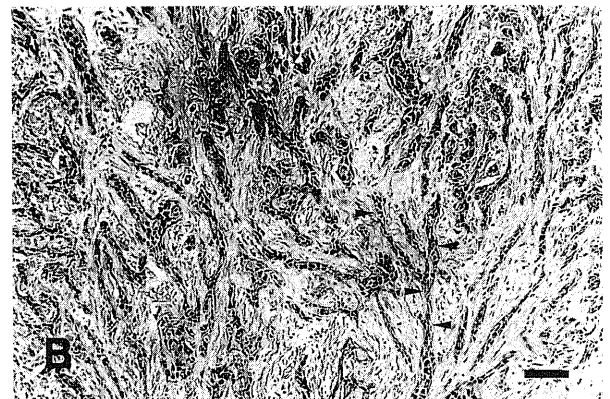
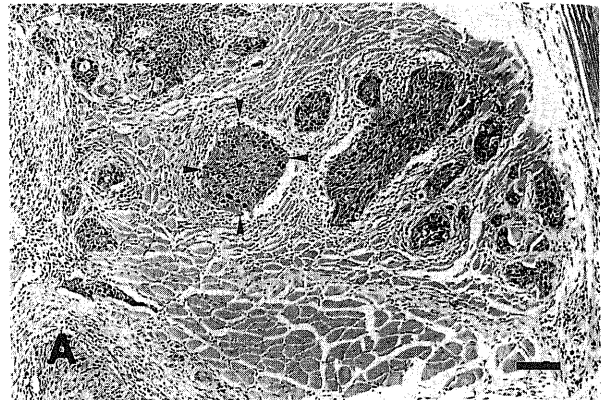


Fig. 1. Histological features of cancer cell lines employed. (A) An orthotopic implant of OSC20 cells. The cells formed the tumor nests (arrowheads) 20 days after the inoculation into the oral floor of the 6 week-old female BALB/c nu/nu mice⁴⁰⁾. The histological features were similar to those of the primary tumor. (B) An orthotopic implant of OSC19 cells. The cells formed typical cord-like tumor nests (arrowheads) after having been inoculated into the nude mice. The histological features were similar to those of the primary tumor. (C) The original tumor, from which HOC313 cells were derived. The cells showed a wide-spread invasion classified as grade 4D. They invaded diffusively into the interstitial tissue from the tumor nests (arrowheads). HOC313 cells were untransplantable in nude mice. HE stain. Scale bar indicates 100 μ m.

(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、風乾した。金コロイドは蒸留水11.0 mlに14.5 mMのAuCl₃H 1.8 mlと、36.5 mMのNa₂CO₃ 6.0 mlを加えて滅菌ビーカーに入れて加熱沸騰させると同時に、0.1%ホルムアルデヒド1.8 ml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35 mm組織培養用シャーレ(岩城硝子, 船橋)に2.0 mlずつ分注し、30分間放置してガラス面に付着させた⁴¹⁾。リン酸緩衝生理食塩水(phosphate-buffered saline, PBS)(日水製薬)で過剰な金コロイドを2回洗い流した後、新しい35 mmシャーレに入れ換え、シャーレあたり5000個の細胞を培養液2 mlに懸濁し、5.0% CO₂ 気相下、37.0℃で培養した。運動能の測定は細胞付着確認後から20時間後に無作為に約50個の細胞を抽出して写真撮影を行い、細胞1個当たりの平均運動面積を計測した。まず、10% FBS加イーグルMEM培地における各細胞の運動能を測定し、次に以下の条件での運動能の測定を行った。

1) 無血清下における運動能の測定

無血清培地として0.1% BSA加イーグルMEMを使用した。ただし、細胞の播種から1時間は10% FBS加イーグルMEMを用い、スライドグラスへの付着を確認した後0.1% BSA加イーグルMEMで3回洗浄して新しい35 mmシャーレに入れ換え、無血清培養を行った。

2) G6PIの運動促進効果の検討

AMFによる運動促進効果を検討する目的で、AMFと同一のアミノ酸配列を有するG6PI³⁹⁾を用いて運動能の測定を行った。すなわち、1, 10 または100 単位/mlのウサギG6PI (Type IV, Sigma, St.Louis, USA)を含む0.1% BSA加イーグルMEM中での各細胞の運動能を測定した。

3) 抗AMF抗体によるHOC313細胞の運動抑制効果の検討

抗マウスAMF・ウサギポリクローナル抗体³⁹⁾(群馬大学医学部整形外科学講座の渡辺秀臣講師から恵与)をMab Trap G II (Pharmacia, Uppsala, Sweden)で精製した。蛋白濃度はBio Rad プロテインアッセイ (Bio-Rad, Richmond, USA)を用いて定量した。最終イムノグロブリン濃度が8.8 µg/mlとなるように(血清1%相当量)0.1% BSA加イーグルMEMにて調整し、HOC313細胞の運動への影響を検討した。陰性コントロールには正常ウサギ血清を同様に分画し等量のイムノグロブリンを添加して使用した。

2. トランスウェル・チャンバーを用いた細胞運動能測定

8 µm孔のトランスウェル・チャンバー (Costar, Cambridge, USA)を用いて、組換えヒト-HGF (Becton Dickinson, Bedford, USA), ヒト血漿由来Fn (岩城硝子), ヒト血漿由来Vn (岩城硝子)に対する各細胞株の遊走能を測定した。すなわち、0.1% BSA加イーグルMEM培養液で、5×10⁵/mlの細胞浮遊液を調製して、上部チャンバーに5×10⁴個の細胞(100 µl)を播種し、下部チャンバーには0.5, 5, 25, 50 ng/mlのHGF, 50 µg/mlのFnまたは100 µg/mlのVnを含む0.1% BSA加イーグルMEM培養液を600 µl加えて5% CO₂気相下、37℃で9時間培養した。次いで上下チャンバーの培養液を除去し、小綿球でトランスウェルのフィルター上面を拭き、4%パラホルムアルデヒドで10分間固定の後、ギムザ染色液(武藤薬品, 東京)で5分間核染色を行って水洗乾燥した。最後にメンブレンを切り出してスライドグラスに封入した。細胞運動能の評価は、フィルター下面に移動して付着した細胞を顕微鏡NIKON OPTIPHOT-2

(ニコン, 東京)の200倍率で無作為に30視野を観察し、1視野あたりの細胞数(平均細胞数±SD)で表した。

Ⅲ. AMFおよびAMFレセプター遺伝子発現の解析

1. ポリ(A)⁺RNAの抽出

100 mm組織培養用シャーレ(岩城硝子)でサブコンフルエントとなった細胞の培養液を交換し、24時間後にQuick Prep mRNA精製キット(Pharmacia, Uppsala, Sweden)を用いてポリ(A)⁺RNAを抽出した。

2. プライマーおよびプローブの作製

HOC313細胞のポリ(A)⁺RNAを鋳型としてTOYOBO RT-PCRキット(Toyobo, 東京)によりニューロロイキン(neuroleukin)⁴²⁾⁴³⁾およびβ-アクチン(actin)⁴⁴⁾のcDNAを作製した。ニューロロイキンcDNA増幅用プライマーとして、5'-CGGCCAAGGATCCTTCTGC-3'(cDNA塩基番号710-728)と5'-CACAGAGGAGGCTGCAGATG-3'(cDNA塩基番号1721-1702), またβ-アクチンcDNA増幅用のプライマーとしては5'-GACTGCAGTGGATGATGATATCGCCGCG-3'(cDNA塩基番号43-62)に相当する配列に制限酵素Pst I認識配列を融合した)と5'-TGATCTCCTTCTGCAGCCTG-3'(cDNA塩基番号993-974)のオリゴヌクレオチドをDNA合成装置モデル392 (Applied Biosystems, California, USA)により合成し、OPCカラム(Applied Biosystems)で精製した。ニューロロイキンおよびβ-アクチンとも上記プライマーを用いた逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(reverse transcription-PCR, RT-PCR)法でそれぞれ約1 kbのcDNA断片を増幅し使用した。またAMFレセプターのプローブは2本鎖cDNA²⁹⁾(群馬大学医学部整形外科学講座の渡辺秀臣講師より供与)からヌクレオチドNo. 23~1291に相当する断片を切り出して使用した。

3. ノーザンブロットハイブリダイゼーション

ポリ(A)⁺RNA 2 µgまたは5 µgを66.7%ホルムアミド, 2.93 Mホルムアルデヒドで5分間65℃にて変性したのち急冷し、1.1 Mのホルムアルデヒドを含む1.5%アガロースゲルにて電気泳動を行った後、ハイボンドN⁺ナイロン膜(Amersham, Buckinghamshire, UK)に転写した。プレハイブリダイゼーションは50%ホルムアミド, 5×食塩-リン酸ナトリウム-エチレンジアミン四酢酸液(0.9 M NaCl, 50 mMリン酸三水素ナトリウム pH7.7, 5 mM EDTA), 5×Denhardt液(1.0%ポリビニルピロリドン, 1.0% BSA, 1.0% フィコール), 0.5% SDS, 200 µg/ml変性サケ精子DNA (Sigma)の組成よりなる15.0 mlの溶液にて42℃で4時間培養した。cDNAプローブはPrime-It IIランダムプライマーラベリングキット(Stratagene, California, USA)と、[α-³²P]デオキシシチジン三リン酸(Amersham)を用いて標識した。未反応の遊離ヌクレオチドの除去はNuc Trap プッシュカラム(Stratagene)で行った。ハイブリダイゼーションは、プレハイブリダイゼーションと同じ組成の5.0 mlの溶液に25 ngの³²P標識プローブを加えて42.0℃で20時間行った。ハイブリダイゼーション終了後、2×SSC(0.3 M NaCl, 0.03 Mクエン酸ナトリウム pH7.0), 0.1% SDSにて室温で20分間2回, 42℃で20分間2回, さらに0.1×SSC, 0.1% SDSで42℃で2回洗浄し、バイオイメージングアナライザーFUJIX BAS1000(富士フィルム, 浜松)に4時間暴露してmRNAの定量を行った。またX線フィルムを同一フィルター晒し-80℃にてオートラジオグラフィを行った。

Ⅳ. AMFおよびAMFレセプター蛋白発現の解析

蛋白レベルでのAMFの発現を免疫組織化学染色にて、AMFレセプターの発現をウェスタンブロット法にて解析した。

1. AMFの免疫組織化学染色

チャンバースライド (Nunc, Naperville, USA) にて細胞を疎な状態で3日間培養し、培養液を除去して1時間風乾の後、アセトン:メタノールの1:1溶液で1分間固定した。AMFの一次抗体には200倍希釈した抗マウスAMF・ウサギ IgG抗体を4℃で15時間反応させ、二次抗体は西洋ワサビペルオキシダーゼ標識デキストラン結合抗ウサギ IgG・ヤギ抗体ENVISION (ダコジャパン, 京都) を使用した。陰性コントロールには一次抗体として正常ウサギの血清を用いた。発色は3,3'-ジアミノベンチジン四塩酸塩 (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride) (和光純薬, 大阪) を使用した。

2. ウェスタンブロット法

100 mm 組織培養用シャーレで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5 mlの無血清イーグルMEMに交換して更に48時間培養し、PBSでリンス後10 ml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。細胞沈渣を超音波破碎後、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 緩衝液 (4% SDS, 500 mM Tris-HCl pH6.8, 2 mM EDTA pH8.0, 40% グリセロール, 0.02% ブロムフェノールブルー) を加え、1×Laemmli 緩衝液、2.5% 2-メルカプトエタノールとしたもので各細胞抽出液の蛋白濃度が等しくなるように調整し、5分間の煮沸後急冷して泳動サンプルとした。総蛋白として25 μgをSDS-PAGE後、ポリ弗化ビニリデン (polyvinylidene difluoride, PVDF) 膜 Immobilon-P (Millipore, Bedford, USA) に転写した。転写後、PVDF膜を5% スキムミルク、1% BSA, 0.5% ツイーナー20 (Bio-Rad) を含むPBS中で室温3時間ブロッキング後、抗AMFレセプター抗体³⁰⁾ (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) と反応させた。二次抗体には西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ウサギ抗ラット IgM抗体 (Zymed, San Francisco, USA) を用いた。抗原抗体反応終了後、0.5% ツイーナー20を含むPBSで15分間、6回洗浄してECL (Amersham) で発光させX線フィルムを感光させた。

V. 統計学的解析法

2群間の有為差はStudentの*t*検定を用いて判定し、測定値はすべて平均値±標準偏差 ($\bar{x} \pm SD$) で示した。

成 績

I. 金コロイド法による細胞運動能の測定

1. 血清添加培地における運動能

10% FBS加イーグルMEM培地での各細胞の運動面積は、OSC20細胞では 28.8 ± 14.1 ($\times 100 \mu\text{m}^2$) (図2A), OSC19細胞では 43.6 ± 24.6 ($\times 100 \mu\text{m}^2$) (図2B), HOC313細胞では 168.0 ± 98.1 ($\times 100 \mu\text{m}^2$) (図2C) であり、浸潤様式が高度になるに従い高い運動性を示した (図3)。

2. 無血清培地における運動能

一方、0.1% BSA加無血清のイーグルMEM培地における平均運動面積は、OSC20細胞で 16.9 ± 7.1 ($\times 100 \mu\text{m}^2$), OSC19細胞では 15.0 ± 4.4 ($\times 100 \mu\text{m}^2$) であったのに対して、HOC313細胞では 106.0 ± 52.0 ($\times 100 \mu\text{m}^2$) で、血清添加培地に比べるといずれも運動能は低下したが、HOC313細胞は無血清培地に

においても高い運動能を有していた (図4)。

II. AMFの作用と発現

1. AMFおよびAMFレセプター発現

AMF mRNAの発現を解析するため、まず、HOC313細胞ポリ(A)⁺RNAを鋳型としてRT-PCR法で増幅されたコーディング域を373 DNA シークエンサー (Applied Biosystems) で確認した

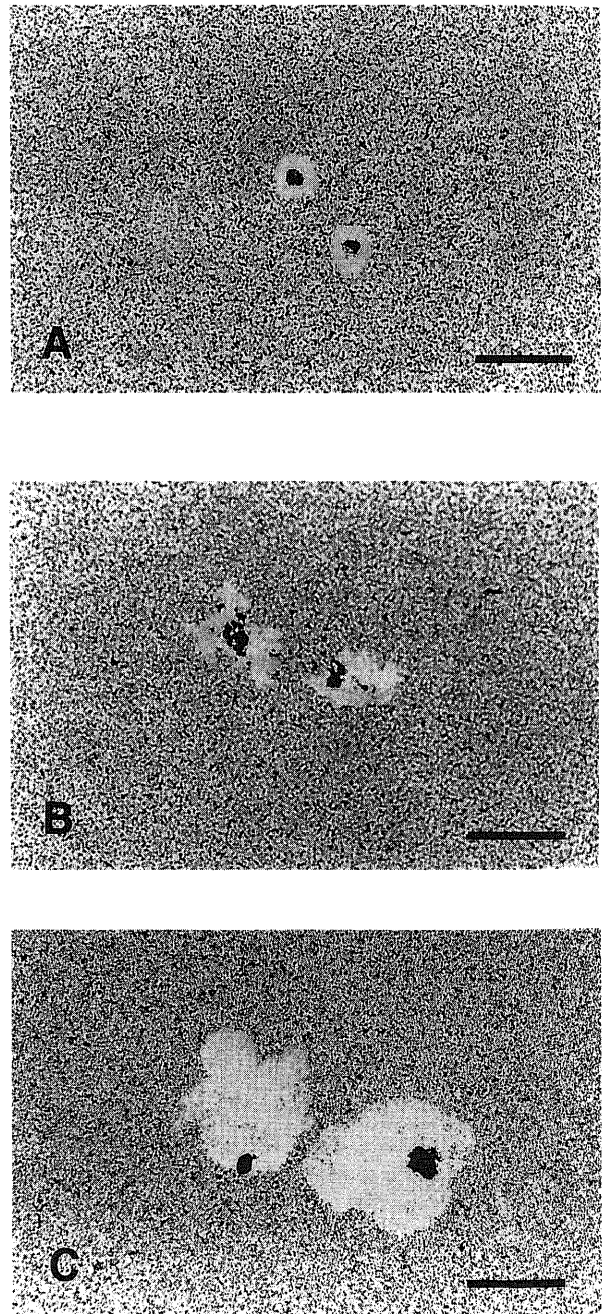


Fig. 2. Phagocytosis of tumor cells. Cells were plated on goldparticle-coated glasses and incubated in Eagle's MEM with 10% FBS. After adhesion, cells were incubated for 20 hr, and then cell motility was measured as described under Materials and Methods. (A) OSC20, (B) OSC19 cells, and (C) HOC313 cells. Typical photographs are presented. Scale bar indicates $100 \mu\text{m}$.

ところ塩基配列はヒトAMFエキソンの配列と同一であることが確認された。これをプローブとしてノーザンブロットハイブリダイゼーションを行ったところ、いずれの細胞にも2.0 kbの位置にAMF cDNAと強くハイブリダイズするバンドを認めた。また、HOC313細胞は約4.0 kbの位置にも比較的強いシグナルを認めたが、OSC20細胞とOSC19細胞では4.0 kbのバンドは検出されないかまたは微弱であった(図5A)。β-アクチンの発

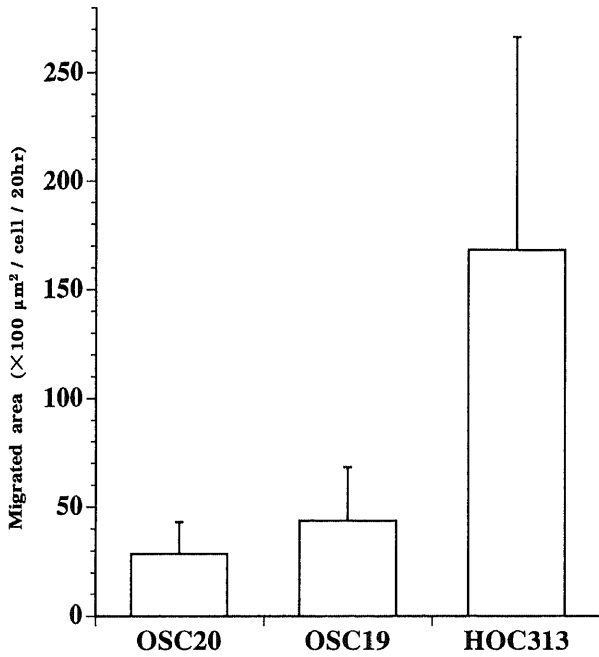


Fig. 3. Quantitative representation of tumor cell motility in media with serum. Cell motility was measured as described in the legend to Fig. 2. At least fifty individual gold particle-free areas were randomly selected and measured. Each column represents $\bar{x} \pm SD$ /cell/20 hr.

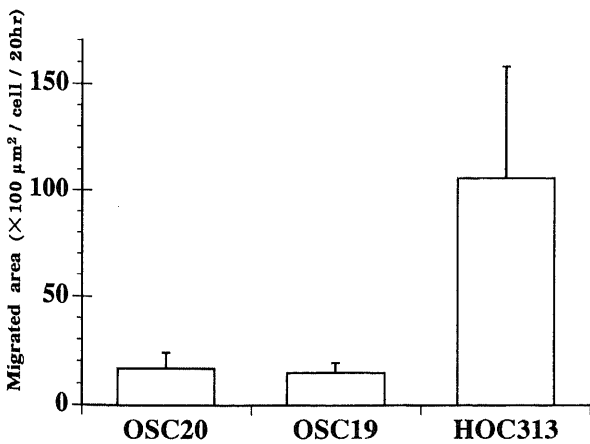


Fig. 4. Quantitative representation of tumor cell motility in serum-free media. Cells were first plated on the goldparticle-coated glasses in Eagle's MEM containing 10% FBS. After adhesion, cells were incubated in Eagle's MEM containing 0.1% BSA. Then, fifty individual phagokinetic areas were randomly selected and measured. Each column represents $\bar{x} \pm SD$ /cell/20 hr.

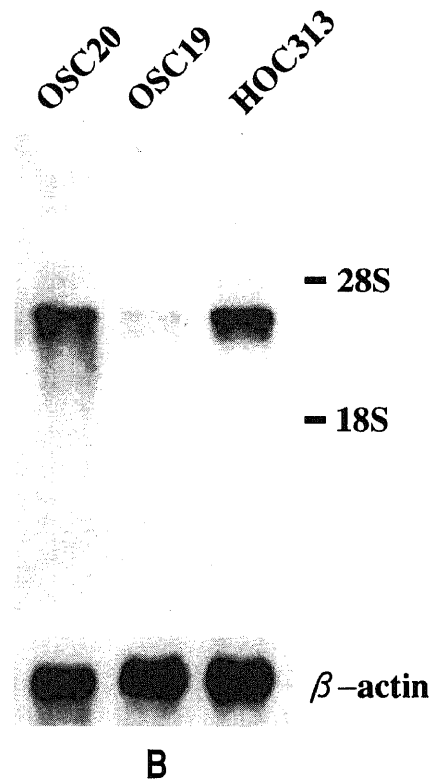
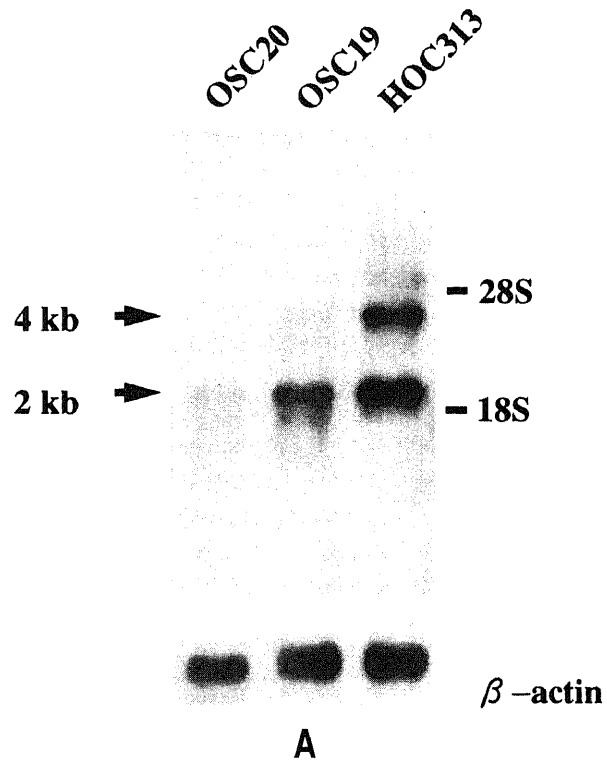


Fig. 5. Northern blot analysis of mRNA for AMF (A) and AMF receptor (B). Two μg (A) or 5 μg (B) each of poly (A)⁺ RNAs from three cancer cell lines were electrophoresed and transferred to nylon membranes. The membranes were hybridized with ³²P-labeled AMF cDNA (A) or AMF receptor cDNA (B). The membranes were rehybridized with β-action probe. 28S, 28S RNA; 18S, 18S RNA.

現量から補正し、イメージングアナライザーBAS1000にて4.0 kbのバンドを定量したところOSC20:OSC19:HOC313=100:82:429であり、無血清下での各細胞の運動能の程度の強さと類似していた。AMFレセプターmRNAの発現はHOC313細胞とOSC20細胞で強く、OSC19細胞は弱かった(図5B)。

2. AMF蛋白の発現

免疫組織化学染色により、HOC313細胞では、主として培養細胞の偽足様突起の先端部から基部にかけてAMFが顆粒状に集積して認められ、核周囲も僅かながら染色された(図6B)。一方、OSC20細胞とOSC19細胞は抗AMF抗体では染色されなかった。

3. AMFレセプター蛋白の発現

ウェスタンブロット法により、AMFレセプター(gp78)の発現はHOC313細胞は著しく高く、OSC20細胞でも僅かに検出されたが、OSC19細胞では特にバンドは認められなかった。また、150 kDaの位置にも抗AMF抗体と反応するバンドが観察され、そのシグナル強度はHOC313細胞、OSC19細胞、OSC20細胞の順であった(図7)。

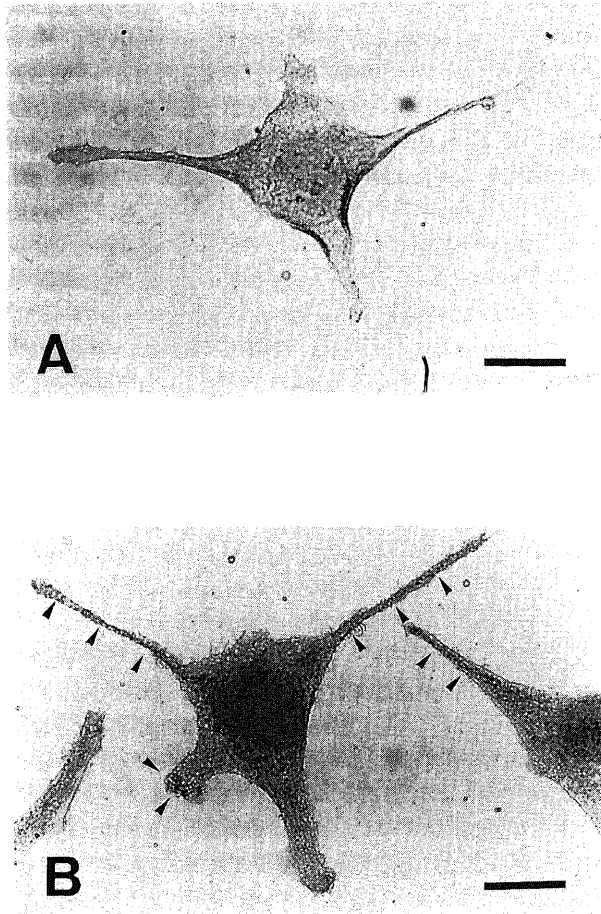


Fig. 6. Stain for AMF. (A) Negative control. Cells were treated with normal rabbit IgG. (B) AMF stain. Anti-AMF polyclonal rabbit antibody (IgG) was used as the primary antibody. AMF immunoreactivities were marked as granular particles localized in pseudopodia (arrowheads). Scale bar indicates 10 μ m.

4. G6PIの細胞運動促進作用

AMFと同一のアミノ酸配列を有するG6PIを培養液に添加したところ、HOC313細胞では濃度依存的に運動性が亢進し100単位/mlで約1.6倍となり、G6PI (AMF)の運動促進効果が確認された。しかし、G6PIに対するOSC20細胞の反応性は低く、約1.2倍の増大が認められたにすぎない。OSC19細胞に対するG6PIの運動促進効果は認められなかった(図8)。

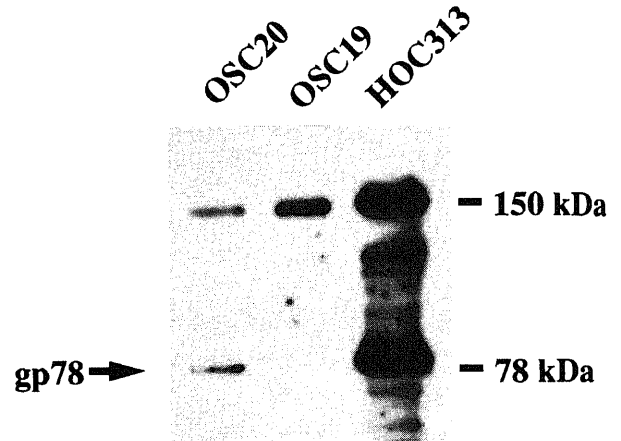


Fig. 7. Western blot analysis of AMF receptor. Cell lysates were electrophoresed on SDS-7.5% polyacrylamide gel and transferred to PVDF membrane. Immunostaining was carried out as described under Material and Methods. AMF receptor (gp78) was clearly marked in OSC20 and HOC313 but not in OSC19 cells. The nature of 150 kDa proteins that reacted with the anti-AMF receptor antibody is currently unknown.

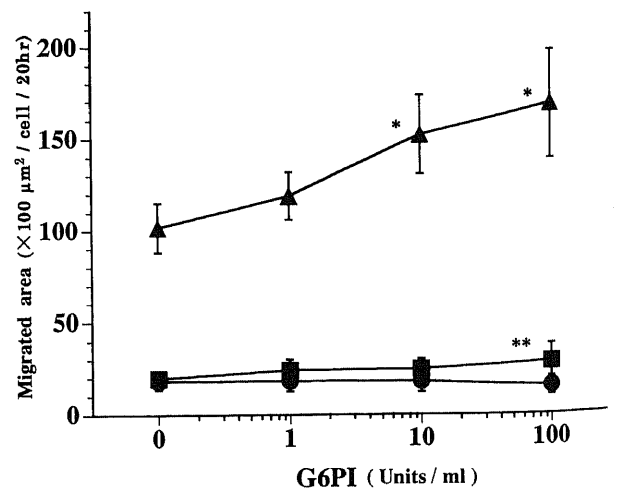


Fig. 8. Phagokinetic motility of tumor cells exposed to G6PI. Cells were plated on colloidal gold-coated glasses in Eagle's MEM containing 10% FBS, and incubated for 1 hr to adhere. Then, cells were further incubated in Eagle's MEM containing 0.1% BSA and 1, 10, or 100 Units/ml of rabbit G6PI for 20 hr. Fifty individual areas were measured at random. ▲, HOC313; ●, OSC19; ■, OSC20. * $p < 0.001$ versus control without G6PI. ** $p < 0.001$ versus control. Each point represents $\bar{x} \pm SD$ ($n=50$).

5. 抗AMF抗体による癌細胞の運動抑制

G6PI (AMF) による運動性促進が著明に認められたHOC313細胞を用い、ウサギ抗AMF抗体 IgG 分画の存在下に細胞運動能を測定したところ、HOC313細胞の平均運動面積は $46.0 \pm 11.6 (\times 100 \mu\text{m}^2)$ となり、抗体を添加しない場合の平均運動面積の $98.7 \pm 32.3 (\times 100 \mu\text{m}^2)$ と比較して50%以下に運動が抑制された。また、陰性コントロールとして正常ウサギのIgGを

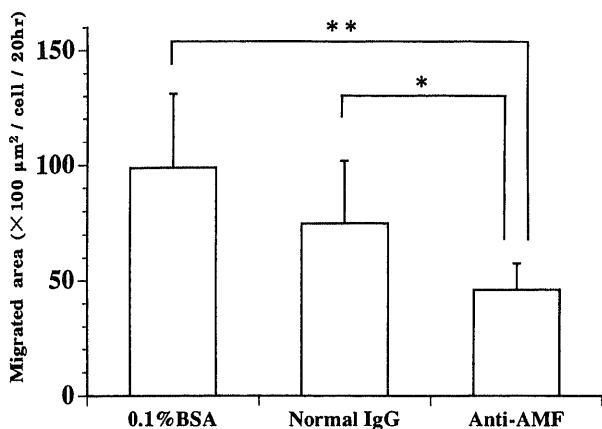


Fig. 9. Effect of anti-AMF antibody on the motility of HOC313 cells. Cell motility was assayed in Eagle's MEM containing 0.1% BSA and $8.8 \mu\text{g/ml}$ anti-AMF polyclonal antibody (IgG fraction) or equal amounts of normal rabbit IgG. * $p < 0.001$ versus control with 0.1% BSA. ** $p < 0.001$ versus normal serum. Each column represents $\bar{x} \pm \text{SD} / \text{cell} / 20 \text{hr}$ ($n=50$).

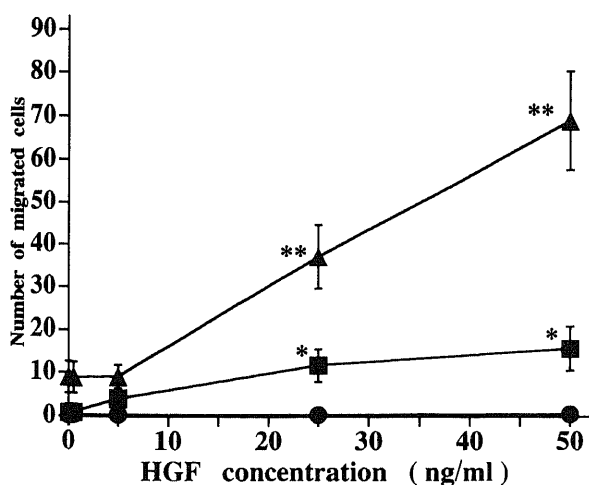


Fig. 10. Chemotaxis toward HGF. Fifty-thousand tumor cells were seeded in the upper chamber of Transwell in Eagle's MEM containing 0.1% BSA. Recombinant human HGF/SF was added in the lower chamber as a chemoattractant at concentrations of 0.5, 5, 25 or 50 ng/ml in Eagle's MEM containing 0.1% BSA. Cells were incubated for 9 hr, and then the cells that penetrated $8 \mu\text{m}$ pore-sized filter and reached the lower chamber were counted under microscope in randomly selected 30 individual fields. ▲, HOC313; ●, OSC19; ■, OSC20. * $p < 0.001$ versus control without HGF. ** $p < 0.001$ versus control. Values are presented as $\bar{x} \pm \text{SD}$ ($n=30$).

用いた場合の平均運動面積の $74.8 \pm 26.8 (\times 100 \mu\text{m}^2)$ と比較してもその60%程度に運動が抑制されていた(図9)。

III. HGF, Fn, Vnの細胞運動能促進効果

HGFに対する細胞遊走能を測定したところ、HOC313細胞とOSC20細胞の走化性はともに濃度依存性に増大し、特にHOC313細胞の遊走性亢進は顕著であった。しかし、OSC19細胞はHGFに対して反応を示さなかった(図10)。FnとVnに対

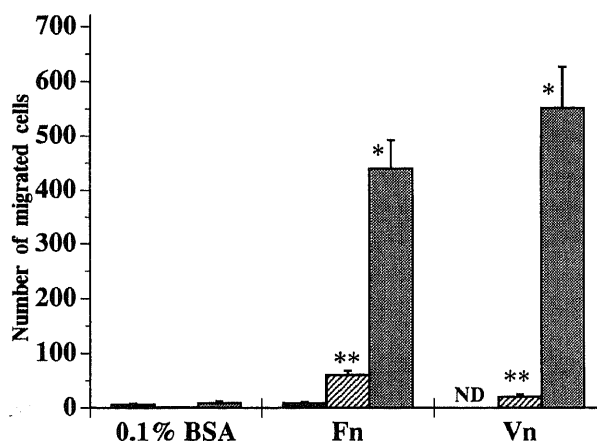


Fig. 11. Chemotaxis toward fibronectin (Fn) and vitronectin (Vn). Fifty-thousand tumor cells were seeded in the upper chamber, and $50 \mu\text{g/ml}$ of Fn or $100 \mu\text{g/ml}$ of Vn were added as chemoattractants in the lower chamber. Cells that had penetrated the $8 \mu\text{m}$ pore-sized filter were counted in randomly selected 30-fields. ▤, OSC20; ▨, OSC19; ■, HOC313. ND, not determined. Values are presented as $\bar{x} \pm \text{SD}$ ($n=30$).

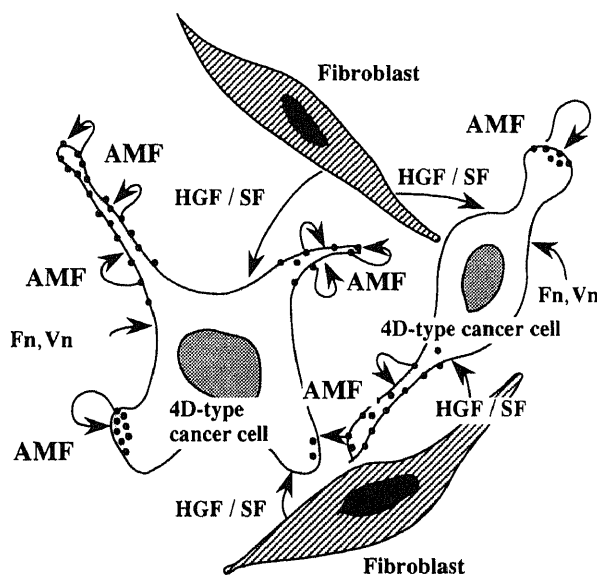


Fig. 12. A mechanism for the high motility and invasiveness of 4D-type oral squamous carcinoma cells. 4D-type cancer cells like HOC313 may migrate in response to autocrine motility factor (AMF) produced by themselves, to hepatocyte growth factor (HGF) derived from neighboring fibroblasts and to fibronectin (Fn) and vitronectin (Vn) present in the peripheral sites of the tumor nest.

する遊走性はHOC313細胞とOSC19細胞で認められた。特にHOC313細胞はいずれに対しても高い応答性を示し、多数の細胞が下層チャンパーに移行した。OSC20細胞はFn, Vnのいずれにも反応を示さなかった(図11)。

考 察

金コロイド法は、Albrecht-Beuhlerら⁴¹⁾によって最初に報告された細胞の運動能を培養系で計測する方法で、細胞の運動面積の記録により方向性を持たないケモカインシス(chemokinesis)を定量するものである。この方法で認識される腫瘍細胞の運動能はその転移能とよく相関し¹⁾、腫瘍細胞の産生する運動因子のアクセシにも活用されている。本研究において、金コロイド法で浸潤様式の異なる3種類の口腔扁平上皮癌細胞株(図1A,B,C)の運動能を測定したところ、血清存在下での運動能は、浸潤様式が高度であるほど癌細胞の運動能も高いことが示された(図2, 3)。また、HOC313細胞は無血清下でも高い運動能を有していた(図4)ことから、自己分泌型の運動促進因子を産生している可能性が示唆された。Ishisakiら²⁹⁾は、HOC313細胞がAMFレセプターを多量に発現しており、またAMFの活性を阻害する百日咳毒素を作用させることによってHOC313細胞の運動能が低下したことから、HOC313細胞の運動を促進する因子はAMFではないかと予測していた。本研究において、AMFと同一アミノ酸配列を有するG6PIを作用させたところ、4D型のHOC313細胞は濃度依存的に運動性が亢進した(図8)。さらに、抗AMF抗体によって無血清状態でのHOC313細胞の運動性が抑制された(図9)。したがって、HOC313細胞の高浸潤性の少なくとも一部は自らが産生・分泌するAMFによるものと結論された。AMFを含め自己分泌型の運動促進因子の報告はこれまでいずれも悪性黒色腫や腺癌由来のものであり、扁平上皮癌が自己分泌型の運動促進因子を産生・分泌していることを実証したのは本研究が初めてである。AMFのmRNAの発現をノーザンプロット法で検討したところ、HOC313細胞で特に強くAMF mRNAの発現が認められ、またAMFの免疫組織化学染色によってHOC313細胞のみで偽足突起部にAMF蛋白の局在が確認された(図6B)。またAMFレセプターgp78蛋白の存在量はHOC313細胞 > OSC20細胞 > OSC19細胞であり(図7)、G6PIに対するそれぞれの細胞の反応性(図8)とよく一致していた。

本研究で行ったAMF mRNAの解析では、いずれの細胞においても2.0 kbのバンドが認められたのに対して、HOC313細胞だけは4.0 kbの位置にも強いバンドを認め(図5A)、これがAMF蛋白量とよく相関していた。最近、AMF、G6PIとニューロロイキンが同じ単一遺伝子に由来する蛋白産物であることが明らかにされた³⁹⁾。Hallbookら⁴⁹⁾は、ニワトリニューロロイキンのノーザンプロットでも2.5 kbと4.0 kbの2つの位置にバンドを認め、4.0 kbのバンドは神経組織に発現しやすいと報告している。2.0 kbと4.0 kbの違いは現在のところ明らかではないが、2.0 kb mRNAはハウスキーピングな転写単位としてG6PIをコードし、4.0 kb mRNAがAMF / ニューロロイキンをコードしている可能性が考えられる。

一方、AMFレセプターの発現は、mRNAレベルではHOC313細胞とOSC20細胞で強く、OSC19細胞で弱く認められた(図5B)。蛋白レベルでは、抗AMF抗体と反応する78 kDaの蛋白(gp78)はHOC313細胞で最も多く、OSC20細胞で少な

かったが、OSC19細胞では認められなかった。マウス悪性黒色腫では、AMFレセプターの発現は高転移株のほうが低転移株より低いとの観察から、腫瘍細胞の運動能はAMFレセプターの量よりも細胞におけるレセプターの分布状態や後レセプターシグナル伝達経路の違いに関連しているのではないかの可能性も示唆されている⁴⁶⁾。しかし、本研究の結果からは、AMFレセプター蛋白の発現量がG6PIを作用させた際の各細胞の運動促進効果(図7, 8)によく相関していたことより、AMFに対する各細胞の応答性の相違はレセプター蛋白の存在量の差によるものと考えられた。ところで、宿主由来の運動促進因子としては、SF / HGFが線維芽細胞より分泌され、多くの上皮系正常細胞や癌細胞の運動性を傍分泌的に亢進させることが多く報告されている¹²⁾¹³⁾⁴⁷⁾⁴⁸⁾。またAMFは細胞に偽足形成を誘導し、その部分でラミニン受容体やFn受容体の数が増すことが知られている¹⁾。筆者は、腫瘍先進部においては周囲の線維芽細胞からの傍分泌型因子や細胞外マトリックスによる細胞運動への影響が大きいと考えられることから、トランスウェル・チャンパーを用いてこれら因子の各細胞の遊走性への影響を検討した。その結果、SF / HGFはHOC313細胞とOSC20細胞の遊走性を濃度依存的に亢進させた(図10)。これに対し、OSC19細胞の遊走性はSF / HGFにより影響を受けなかった。また、HOC313細胞はFnおよびVnにより顕著な遊走性亢進を示し(図11)、この細胞がAMFだけではなく、他の運動促進因子に対しても高い感受性を有していることが示された。4C型のOSC19細胞はAMF、SF / HGFのいずれに対しても感受性を認めなかったが、FnやVnに対して遊走性を示した(図11)。OSC19細胞は血清存在下ではOSC20細胞よりも高い運動能を示す(図3)ことを考えあわせると、生体内における4C型癌細胞の運動能は血清中に含まれる他の運動促進因子や細胞外マトリックス成分によって制御されている可能性が示唆された。一方、3型のOSC20細胞はAMFやSF / HGFの濃度に依存して若干の運動性の亢進が認められ、これらの運動促進因子に対して感受性を有していることが示された(図8, 10)。しかし、その運動能はHOC313細胞に比べて極めて低く、FnやVnに対する遊走性はほとんど認められなかった(図11)。また、血清存在下でもその運動能は3種の細胞のうち最も低く(図2, 3)、3型癌細胞は各種の運動促進因子に対して感受性が低いと考えられた。

以上の結果から、口腔扁平上皮癌では癌細胞のタイプによってその運動能が大きく異なっており、また各種の運動促進因子に対する感受性にも差があることが判明した。筆者は、このような運動能の違いが口腔扁平上皮癌の浸潤様式を左右する一因ではないかと推察する。特に高度浸潤癌の4D型の癌細胞では、AMFなどの自己分泌型運動促進因子を自ら産生・分泌して運動能を高めるとともに、ひとたび間質へ侵入すると、SF / HGF、Fn、Vnなどの正常宿主組織由来の運動促進因子によってさらに運動性が増強されるため、び慢性に深部組織へ浸潤し、早期に転移するのではないかと考えられる(図12)。今後、このような自己分泌性あるいは傍分泌性の運動促進因子を分子標的とした浸潤・転移抑制が癌治療手段の一つとなり得るものと期待される。

結 論

浸潤様式の異なる3種類の口腔扁平上皮癌由来の細胞株

(OSC20, OSC19, HOC313) を用いて細胞の運動能を比較検討するとともに、当該運動能を司ると考えられる運動促進因子につき解析した結果、以下の結論を得た。

1. 最も悪性度の高い浸潤様式4D型に分類されるHOC313細胞は、浸潤様式3型のOSC20細胞や4C型のOSC19細胞に比べて高い運動能を有していた。

2. HOC313細胞は、AMFとAMFレセプターをコードするmRNAおよびこれらの蛋白産物を強く発現しており、また、AMFの濃度に依存して運動性が亢進し、さらに抗AMF抗体により運動能が中和されたことから、HOC313細胞の高い浸潤性の少なくとも一部はこの細胞自身が産生・分泌するAMFによって担われていることが示された。

3. HOC313細胞の運動はSF / HGF, Fn, Vnによっても促進され、正常宿主組織由来の運動促進因子に対しても高い感受性を有しているものと考えられた。

4. 4C型に分類されるOSC19細胞は、AMF, SF / HGFのいずれに対しても感受性を示さなかったが、血清や、Fn, Vnにより運動性の亢進を認め、OSC19細胞の運動性は血清に含まれる他の運動促進因子や細胞外マトリックス成分によって制御されている可能性が示唆された。

5. 3種の細胞のうち最も悪性度が低い3型に分類されるOSC20細胞は、AMF, SF / HGFに対する感受性を有していたが、これら因子による運動性亢進の程度は低く、またFnやVnによる遊走亢進は認められなかった。

したがって、以上の結果から、口腔扁平上皮癌では癌細胞のタイプによってその運動能と各種の運動促進因子や細胞外マトリックスに対する感受性が異なっていることが明らかにされ、その違いが浸潤様式に反映しているものと結論された。

謝 辞

稿了を臨み、御指導と御校閲を戴きました恩師山本悦秀教授に深甚なる謝意を表します。また終始直接に懇切なる実験の御指導、御助言を戴きました金沢大学医学部生化学第二講座・山本博教授ならびに米倉秀人助教授、同歯科口腔外科学講座・熊谷茂安講師に篤く御礼申し上げます。さらに、種々御支援・御協力戴きました歯科口腔外科学講座ならびに生化学第二講座の皆様と、HOC313細胞を御提供戴いた徳島大学第一口腔外科学講座・力丸浩一助教授、OSC19・OSC20細胞を御提供戴いた札幌医科大学口腔外科学講座・小浜源郁教授ならびに横井俊一博士、抗AMF抗体をはじめ多くの貴重な材料を快く御提供戴いた群馬大学医学部整形外科学講座・渡辺秀臣講師に感謝致します。なお本論文の要旨の一部は第33回日本口腔組織培養研究会(1996年、大阪)において発表した。

文 献

- 1) Volk T, Geiger B, Raz A. Motility and adhesive properties of high- and low- metastatic murine neoplastic cells. *Cancer Res* 44: 811-824, 1984
- 2) Liotta LA, Mandler R, Murano G, Katz DA, Gordon RK, Chiang PK, Shiffmann E. Tumor cell autocrine motility factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 3302-3306, 1986
- 3) Nabi IR, Watanabe H, Raz A. Autocrine motility factor and its receptor - role in cell locomotion and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 11: 5-20, 1992
- 4) Watanabe H, Kanbe K, Chigira M. Differential purification of autocrine motility factor derived from a murine protein-free fibrosarcoma. *Clin Exp Metastasis* 12: 155-163, 1994

- 5) Stracke ML, Krutzsch HC, Unsworth EJ, Arestad A, Cioce V, Schiffmann E, Liotta LA. Identification, purification, and partial sequence analysis of autotaxin, a novel motility-stimulating protein. *J Biol Chem* 267: 2524-2529, 1992
- 6) Murata J, Lee YL, Clair T, Krutzsch HC, Arestad AA, Sobel ME, Liotta LA, Stracke ML. cDNA cloning of the human tumor motility-stimulating protein, Autotaxin, reveals a homology with phosphodiesterases. *J Biol Chem* 269: 30479-30484, 1994
- 7) Wang M, Stearns M. Isolation and characterization of PC-3 human prostatic tumor sublines which preferentially metastasize to select organs in SCID mice. *Differentiation* 48: 115-125, 1991
- 8) Wang M, Stearns M, Stearns E. Identification of the receptor for a novel Mr 78000 "invasion stimulating factor" from metastatic human prostatic PC-3 ML clones. *Cancer Res* 54: 2492-2495, 1994
- 9) Scor SL, Shor AM, Grey AM, Rushton G. Foetal and cancer patient fibroblasts produce an autocrine migration-stimulating factor not made by normal adult cells. *J Cell Sci* 90: 391-399, 1988
- 10) Grey AM, Schor AM, Rushton G, Ellis I, Schor S. Purification of the migration stimulating factor produced by fetal and breast cancer patient fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 2438-2442, 1989
- 11) Kurizaki T, Egami H, Hirota M, Akagi J, Ohmachi H, Yamamoto S, Ogawa M. Characterization of cancer cell dissociation factor in a highly invasive pancreatic cancer cell line. *Cancer* 75: 1554-1561, 1994
- 12) Stoker M, Perryman M. An epithelial scatter factor released by embryo fibroblasts. *J Cell Sci* 77: 209-223, 1985
- 13) Stoker M, Gherardi E, Perryman M, Gray J. Scatter factor is a fibroblast-derived modulator of epithelial cell mobility. *Nature* 327: 239-242, 1987
- 14) Nakamura T, Nishizawa T, Hagiya M, Seki T, Shimonishi M, Sugimura A, Tashiro K, Shimizu S. Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor. *Nature* 342: 440-443, 1989
- 15) Shimonaka M, Yamaguchi Y. Purification and biological characterization of Epitaxin, a fibroblast derived motility factor for epithelial cells. *J Biol Chem* 269: 14284-14289, 1994
- 16) Degen SF, Stuart LA, Han S, Jamison CS. Characterization of the mouse cDNA and gene coding for a hepatocyte growth factor-like protein. *Biochemistry* 30: 9781-9791, 1991
- 17) Hamada J, Cavanaugh PG, Miki K, Nicolson GL. A paracrine migration-stimulating factor for metastatic tumor cells secreted by mouse hepatic sinusoidal endothelial cells, identification as complement component C3b. *Cancer Res* 53: 4418-4423, 1993
- 18) Sugiura T, Shirasuna K, Hayashido Y, Sakai T, Matsuya T. Effects of human fibroblasts on invasiveness of oral cancer cells in vitro - isolation of a chemotactic factor from human fibroblasts. *Int J Cancer* 68: 774-781, 1996
- 19) Rosen EM, Goldberg ID. Protein factors which regulate cell motility. *In Vitro Cell Dev Biol* 25: 1079-1087, 1989

- 20) Stracke ML, Murata J, Azunavoorian S, Liotta L. The role of the extracellular matrix in tumor cell metastasis. *In Vivo* 8: 49-58, 1994
- 21) Silletti S, Raz A. Autocrine motility factor is growth factor. *Biochem Biophys Res Commun* 194: 446-457, 1993
- 22) Jacobsson PA, Eneroth GM, Killander D, Moberger G, Martensson B. Histologic classification and grading of malignancy in carcinoma of the larynx. *Acta Radiol* 12: 1-7, 1973
- 23) Yamamoto E, Miyakawa A, Kohama G. Mode of invasion and lymph node metastasis in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Head Neck* 6: 938-947, 1984
- 24) 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
- 25) 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
- 26) 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
- 27) Tadokoro K, Ueda M, Ohshima T, Fujita K, Rikimaru K, Takahashi N, Enomoto S, Tsuchida N. Activation of oncogenes in human oral cancer cells; a novel codon 13 mutation of c-H-ras-1 and concurrent amplifications of c-erbB-1 and c-myc. *Oncogene* 4: 499-505, 1989
- 28) Raz A, Ben-Zeev A. Modulation of the metastatic capability in B16 melanoma by cell shape. *Science* 221: 1307-1310, 1983
- 29) Nabi IR, Raz A. Cell shape modulation alters glycosilation of a metastatic melanoma cell-surface antigen. *Int J Cancer* 40: 396-402, 1987
- 30) Nabi IR, Watanabe H, Raz A. Identification of B16-F1 Melanoma autocrine motility-like factor receptor. *Cancer Res* 50: 409-414, 1990
- 31) Silletti S, Watanabe H, Hogan V, Nabi IR, Raz A. Purification of B16-F1 melanoma autocrine motility factor and its receptor. *Cancer Res* 51: 3507-3511, 1991
- 32) 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: 13442-13448, 1991
- 33) Watanabe H, Takehana K, Date M, Shinozaki T, Raz A. Tumor cell autocrine motility factor is the neuroleukin / phosphohexose isomerase polypeptide. *Cancer Res* 56: 2960-2963, 1996
- 34) Murata J, Saiki I, Yoneda J, Azuma I. Differences in chemotaxis to fibronectin in weakly and highly metastatic tumor cells. *Jpn J Cancer Res* 83: 1327-1333, 1992
- 35) McCarthy JB, Furcht LT. Laminin and fibronectin promote the haptotactic migration of B16 mouse melanoma cells in vitro. *J Cell Biol* 98: 1474-1480, 1984
- 36) Akiyama SK, Olden K, Yamada KM. Fibronectin and integrins in invasion and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 14: 173-189, 1995
- 37) Hayman EG, Pierschbacher MD, Ohgren Y, Ruoslahti Erkki. Serum spreading factor (vitronectin) is the cell surface and in tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 4003-4007, 1983
- 38) Basara ML, McCarthy JB, Barnes DW, Furcht LT. Stimulation of haptotaxis and migration of tumor cell by serum spreading factor. *Cancer Res* 45: 2487-2494, 1985
- 39) Umezawa K, Asakura S, Jin Y, Matsuda M. Localization of vitronectin and fibronectin receptors on cultured human glioma cells. *Brain Res* 659: 23-32, 1994
- 40) Kawashiri S, Kumagai S, Kojima K, Harada H, Yamamoto E. Development of a new invasion and metastasis model of human oral squamous cell carcinomas. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 31: 216-221, 1995
- 41) Albrecht-Buehler G, Lancaster RM. A quantitative description of extension and retraction of surface protrusions in spreading 3T3 mouse fibroblasts. *J Cell Biol* 71: 370-382, 1976
- 42) Gurney ME, Heinrich SP, Lee MR, Yin H. Molecular cloning and expression of neurotrophic factor for spinal and sensory neurons. *Science* 234: 566-574, 1986
- 43) Gurney ME, Apatoff BR, Spear GT, Baumel MJ, Antel JB, Bania MB, Reder AT. Neuroleukin, A Lymphokine product of lectin stimulated T cells. *Science* 234: 574-581, 1986
- 44) Ponte P, Ng SY, Engel J, Gunning P, Kedes L. Evolutionary conservation in the untranslated regions of actin mRNAs; DNA sequence of a human beta-actin cDNA. *Nucleic Acids Res* 12: 1687-1696, 1984
- 45) Hallbook F, Persson H, Barbany G, Ebendal T. Development and regional expression of chicken Neuroleukin (Glucose-6-phosphate isomerase) messenger RNA. *J Neurosci Res* 23: 142-151, 1989
- 46) 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: 2699-2705, 1991
- 47) Jiang WG, Hallett MB, Puntis MCA. Hepatocyte growth factor / scatter factor, liver regeneration and cancer metastasis. *Br J Surg* 80: 1368-1373, 1993
- 48) Rosen EM, Meromsky L, Setter E, Vinter DW, Goldberg ID. Purified scatter factor stimulates epithelial and vascular endothelial cell migration. *Proc Soc Exp Biol Med* 195: 34-43, 1990

Cell Motility Factors Involved in the Invasiveness of Human Oral Squamous Cell Carcinoma Hiroki Harada, Department of oral and maxillofacial surgery, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 - J. Juzen Med Soc., **107**, 163 - 173 (1998)

Key words autocrine motility factor, fibronectin, mode of invasion, oral squamous cell carcinoma, scatter factor

Abstract

The present study was conducted to clarify the mechanism that determines the mode of invasion of human oral squamous cell carcinomas. Three cell lines derived from human oral squamous cell carcinomas with different modes of invasion were assayed for their ability to migrate or invade in vitro. The cell lines employed were HOC313, OSC19 and OSC20 cells, which respectively derive from oral tumors of the highest (grade 4D), high (grade 4C) and moderate (grade 3) invasiveness. A phagokinesis assay with gold particles demonstrated that, among the three cell lines, the rate of migration in serum-containing media was ranked in the following order: HOC313 \gg OSC19 $>$ OSC20. In serum free media, HOC313 cells also exhibited a high motility rate, whereas OSC19 and OSC20 cells migrated to much lesser extents, suggesting that the HOC313 cells produce motility factors that act on themselves in an autocrine manner. Next, the nature of this activity was investigated. Northern blot analysis revealed that the gene coding for autocrine motility factor (AMF) was extremely strongly expressed in HOC313 cells; two prominent hybridizing bands were detected at 2.0 and 4.0 kb. On the other hand, OSC19 cells expressed the 2.0 kb mRNA species at a low level, and OSC20 cells had barely detectable amounts of AMF mRNA. AMF proteins were clearly marked by immunohistochemical staining with anti-AMF antibodies in HOC313 cells, but not in OSC19 and OSC20 cells; the immunoreactivity was localized in pseudopodia in a granular pattern. mRNA encoding AMF receptor was detected at a high level in HOC313 and OSC20 cells, and at a low level in OSC19 cells. In Western blotting, AMF receptor proteins (gp78) were detected at a high level in HOC313 cells, at a low level in OSC20 cells, and not at all in OSC19 cells. Relative amounts of the AMF and AMF receptor proteins in three cell lines were well correlated with their motility rates. The migration of HOC313 cells in serum-free media was markedly blocked by anti-AMF antibodies. Further, exogenously added glucose 6-phosphate isomerase, which is known to have the same amino acid sequence as AMF, stimulated HOC313 cell motility in a dose-dependent manner. These results indicate that AMF would at least partly account for the high motility of HOC313 cells, and this is the first demonstration that squamous carcinoma cells produce an autocrine factor that induces their own motility. The present study also established the effects of hepatocyte growth factor (HGF) / scatter factor (SF) and extracellular matrix components such as fibronectin and vitronectin on the chemotaxis of the oral squamous carcinoma cells. HGF / SF stimulated in a dose dependent manner the HOC313 cell migration through 8 μ m pore sized filter to the highest extent. OSC20 cells exhibited a moderate migration toward HGF / SF, while OSC19 cells did not respond to it. Fibronectin and vitronectin were also found to stimulate the migration of HOC313 cells. The migration of OSC19 cells was much less affected by fibronectin and vitronectin, and OSC20 cells failed to respond at all. The results obtained suggest that for human oral squamous cell carcinomas, the greater they express AMF and its receptor, and the higher their responsiveness to paracrine HGF / SF and to extracellular matrix components like fibronectin and vitronectin the more invasive they become. The present study would thus seem to explain the basis of the invasion and metastasis of oral squamous cell carcinomas. These motility factors can therefore be regarded as potential molecular targets in future treatments of these still life-threatening oral cancers.