

# $\alpha v \beta 5$ インテグリンを介した細胞遊走における細胞内シグナル伝達に関する実験的研究

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/2297/9195">http://hdl.handle.net/2297/9195</a>

## $\alpha\beta 5$ インテグリンを介した細胞遊走における 細胞内シグナル伝達に関する実験的研究

金沢大学医学部医学科病理学第一講座 (主任: 中西功夫教授)

今 井 哲 也

癌細胞のインテグリンを介する細胞外基質への接着と、引き続いて起こる癌細胞の遊走は癌浸潤の重要なステップとして知られている。本研究は  $\alpha\beta 5$  インテグリンを介してビトロネクチンと接着する口腔扁平上皮癌由来 OSC-19 細胞株に注目して、接着、遊走、ならびに遊走にかかわる細胞内活性化機構を検討した。遊走アッセイにはビトロネクチン被覆したトランスウェルを用いた。OSC-19 細胞はビトロネクチン上で接着はするが遊走を示さず、ホルボールミリスチートアセテート (phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA) と各種成長因子のうち上皮成長因子 (epidermal growth factor, EGF) の刺激により濃度依存性に遊走が惹起された。チロシンキナーゼ阻害剤のターホスチン 9 (tyrphostin 9) とゲニステイン (genistein) で予め細胞を処理しておく、EGF 誘導性細胞遊走は抑制され、PMA 誘導性細胞遊走は影響を受けなかった。抗リン酸化チロシン抗体を用いたイムノブロットでは、EGF 処理細胞では未処理の細胞にはなかった 170kDa のバンドが一本認められた。この蛋白質は抗 EGF 受容体抗体を用いた免疫沈降法で検出された 170kDa のバンドと分子量が同一であり、EGF 受容体の自己リン酸化蛋白質と考えられた。他のチロシンリン酸化を受ける蛋白質のバンドはこの方法では検出できなかった。EGF 処理後直ちにプロテインキナーゼ C (protein kinase C, PKC) の活性を測定すると、PMA 処理したと同程度の約 30% の活性増加が認められた。同時に、特異的 PKC 阻害剤であるカルホスチン C (calphostin C) は PMA 誘導性細胞遊走を抑制すると共に EGF 誘導性細胞遊走を抑制し、EGF 受容体のシグナルは PKC を経由すると考えられた。EGF 誘導性細胞遊走効果の経時変化を検討したところ、遊走開始までに 4 時間を要すること、24 時間前に 1 時間の EGF 処理を行っておくと即座に遊走を開始することが判明した。次に蛋白合成阻害剤であるシクロヘキシミド (cycloheximide) を投与したところ、濃度依存性に EGF 誘導性細胞遊走が阻害された。したがって、この細胞遊走には遊走関連蛋白質が新たに合成されていることが明らかとなった。PMA、EGF を投与した細胞のビトロネクチンへの接着能は未処理の細胞の接着能と変わらなかったため、 $\alpha\beta 5$  インテグリン自身が過剰発現しているのではなかった。これらの結果から EGF 誘導性の  $\alpha\beta 5$  を介した細胞遊走は、EGF が結合して活性化した EGF 受容体によってまず自己リン酸化が起こり、そのシグナルは PKC を経由して核内に達し、転写、翻訳による新たな蛋白合成を必要とするということが明らかとなった。また、非特異的 PKC 阻害剤のスタウロスポリン (staurosporine) を用いると PMA 誘導性細胞遊走効果を抑制しないばかりか EGF では逆に細胞遊走効果が増強されたので、遊走には PKC を介する以外の伝達経路が存在することが示唆された。

---

**Key words**  $\alpha\beta 5$  integrin, cell migration, EGF, tyrosine phosphorylation, PKC

---

インテグリンは  $\alpha$  鎖、 $\beta$  鎖のサブユニットから形成される異種二量体の細胞表面に発現する糖蛋白質群で、ラミニン、コラーゲン、フィブロネクチン、ビトロネクチンなど細胞外基質蛋白質に対する主要な受容体である。インテグリンは細胞を蛋白質に接着させるのみでなく、接着後に種々のシグナルを細胞内に伝達する機能を有しており、その結果細胞の機能を変化させる<sup>1)</sup>。 $\alpha$  鎖と  $\beta$  鎖の組み合わせによりインテグリンは今までに少なくとも 20 種類あることが知られており<sup>2)</sup>、それぞれ異なる蛋白質に接着し、また異なる細胞に発現するなど、異なる機能を有しているのみならず、重複して働く特徴を示している。悪性腫瘍においてはある種のインテグリンの発現量や、細胞表面における分布に変化が生じること等から、細胞の癌化や腫瘍

性と深く関係しているといわれている<sup>3)</sup>。癌浸潤には癌細胞表面のインテグリンによる細胞外基質への接着後、遊走と細胞外基質蛋白質分解酵素の分泌という二つの現象が起こることが必要であり<sup>4)</sup>、遊走という現象にはまたインテグリンによる接着が必要不可欠である。しかし、細胞接着は遊走に必要な因子ではあるが十分因子ではなく、接着以外の因子がしばしば必要となる。細胞遊走を惹起する因子としては上皮成長因子 (epidermal growth factor, EGF)、血小板由来成長因子 (platelet derived growth factor, PDGF)、インスリン様成長因子-1 (insulin-like growth factor, IGF-1)、肝細胞成長因子 (hepatocyte growth factor/scatter factor, HGF/SF)、自己分泌型運動因子 (autocrine motility factor)、腫瘍壊死因子- $\alpha$  (tumor necrosis

平成 7 年 12 月 12 日 受付, 平成 8 年 1 月 23 日 受理

Abbreviations: BSA, bovine serum albumin; CP, calphostin C; CX, cycloheximide; DG, diacylglyceride; EGF, epidermal growth factor; EGTA, ethyleneglycol bis (2-aminoethylether) tetraacetic acid; FBS, fetal bovine serum; GS, genistein; FITC, fluorescein isothiocyanate; HGF/SF, hepatocyte growth factor/scatter

factor-α, TNF-α) 等の種々のサイトカインが報告されている<sup>9-11)</sup>。また、人工産物であるホルボールミリステートアセテート (phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA) もある種の細胞で遊走させる作用があり<sup>10)</sup>、遊走におけるプロテインキナーゼ C (protein kinase C, PKC) の関与が示唆されている。

インテグリンが関与するシグナル伝達経路は Hynes<sup>11)</sup> により二大別されている。すなわちリガンドに接着したインテグリンから細胞内に伝わるシグナルで、接着後に pp60<sup>src</sup> や pp125<sup>FAK</sup> がすぐにリン酸化されることが知られており<sup>11,12)</sup>、外から内への (outside to in) シグナルと呼ばれている。これに対して、サイトカイン等はその受容体を通じてシグナルを細胞内に送り、伝達されたシグナルはさらにインテグリンに到達するという内から外への (inside to out) 逆方向のシグナル伝達経路がある。これらのシグナル伝達経路は、インテグリン種、機能、細胞種によって異なると思われるが、特に遊走に関するシグナル伝達機構については殆ど研究がなされていない。

口腔扁平上皮癌由来の OSC-19 細胞株は αvβ3 インテグリンの発現がなく αvβ5 インテグリンのみでビトロネクチンに接着することが知られており<sup>13)</sup>、単一のインテグリン種の機能を見るのに有用な細胞である。本研究では PMA や各種成長因子を与えることにより、PMA と EGF がビトロネクチン上の αvβ5 介在性の遊走を惹起することを明らかにした。さらに遊走のための細胞内シグナル伝達経路を解明するために各種酵素阻害剤を使用した遊走アッセイに加え、酵素活性測定や免疫沈降法による蛋白質検出を併せ行った。その結果、EGF 投与による EGF 受容体の自己リン酸化反応に引き続き PKC の活性化がおり、この活性化が新たな蛋白質の合成を惹起するという経路が判明したので報告する。

## 材料および方法

### I. 使用細胞

口腔扁平上皮癌由来の OSC-19 細胞株、肺扁平上皮癌由来 Calu-1、肺扁平上皮癌由来 ACC-LC-73、胃印環細胞癌由来 KATO-III、肺扁平上皮癌由来 VMRC-LCP、口腔低分化扁平上皮癌由来 HSC-3 を用いた。OSC-19 は札幌医科大学口腔外科学講座小浜源都教授より、KATO-III、VMRC-LCP、HSC-3 はがん研究振興財団細胞バンク (東京) より、Calu-1、ACC-LC-73 は愛知県がんセンター研究所超微形態学高橋隆博士より譲渡された。細胞はすべて牛胎児血清 (fetal bovine serum, FBS) (Gibco, Grand Island, NY, USA) を 10% 添加したイーグル最少必須培養液 (Eagle's minimum essential medium, MEM) (Flow laboratories, Irvine, Scotland) で継代培養した。以下すべての実験には準飽和状態の細胞を用いた。

### II. 細胞遊走アッセイ

各癌細胞株の各種リガンド上での遊走能を、8μm 孔のフィルターを装着した 24 穴のトランスウェル (Costar, Cambridge, England) を使用して計測した。リガンドとしてビトロネクチン、フィブロネクチン、I 型コラーゲンの三種を用いた。トランスウェル下槽に 10μg/ml のリガンド溶液を 250μl 満たし、上槽の底のフィルターをリガンド溶液に 37°C で 2 時間もしくは 4

℃で一晩浸漬することによってフィルター下面をリガンドで被覆した。リガンド溶液を除去後、高純度の 0.5% 牛血清アルブミン (bovine serum albumin, BSA) (Sigma, St. Louis, USA) 添加 MEM 500μl で一晩浸漬し、アッセイ直前にアッセイ用培地と交換した。遊走アッセイのための細胞は 0.2% トリプシン液によってシャーレから分散した後、トリプシンの 2 倍量の 0.1% トリプシンインヒビター (Sigma) 液 3ml を加えてトリプシンを不活性化し、弱い遠心 (800rpm, 3 分間) によって細胞を分離した。0.5% BSA 添加 MEM を加えて細胞密度を 5×10<sup>5</sup> 個/ml の濃度に調整した細胞に各種因子を添加して 37°C のウオーターバス内で 1 時間振盪、遠心分離による 2 回の細胞洗浄後、同量のアッセイ用培地 (0.5% BSA 添加 MEM) で再浮遊させた。1 槽あたり細胞浮遊液 0.1ml (5×10<sup>4</sup> 個) を上槽へ分注し、37°C の CO<sub>2</sub> インキュベーター中に静置した。16 時間から 20 時間後にフィルターの上面から下面に遊走接着した細胞を、2% エタノール添加 0.2M ホウ酸塩緩衝液 (pH9.0) に溶解した 1% クリスタルバイオレット (Sigma) で 5 分間染色し、フィルター上面を十分に洗浄した後 10% 酢酸で細胞よりクリスタルバイオレットを溶出し、波長 600nm の吸光度を EIA リーダー 2550 (Bio-Rad Lab., Richmond, USA) で測定した。ブランクとして接着リガンドの代わりに 0.5% BSA で被覆したフィルター上で同時にアッセイを行い、その測定値を差し引いて遊走細胞数の指標とした。細胞数がこの方法での検出限界以下の場合は細胞数を位相差顕微鏡で直接計測した。

細胞遊走に関する可能性のある因子として PMA (Sigma), EGF (Genzyme, Cambridge, USA), PDGF (Becton Dickinson, Bedford, USA), IGF-1 (Genzyme), HGF/SF (R&D System, USA), ケラチノサイト成長因子 (keratinocyte growth factor, KGF) (Upstate Biotechnology Incorporated, Lake Placid, USA), TNF-α (Genzyme) を用いた。また必要に応じて、これらの因子の処理をする前に、チロシンキナーゼ阻害剤のターホスチン 9 (tyrphostin 9, TP) (Biomol, Plymth Meeting, USA) で 12 時間、同ゲニステイン (genistein, GS) (和光, 大阪) で 1 時間、PKC 阻害剤のカルホスチン C (calphostin C, CP) (Biomol) で 1 時間、同スタウロスポリン (staurosporine, SP) (和光)<sup>14)</sup> で 10 分間、フォスファチジルイノシトール 3-キナーゼ (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3-K) 阻害剤のワートマンニン (wortmannin, WM) (Sigma)<sup>15,16)</sup> で 30 分間の前処理を行った。また蛋白合成阻害剤のシクロヘキシミド (cycloheximide, CX) (Sigma) は EGF と同時に投与した。

### III. 細胞接着アッセイ

24 穴プラスチックプレート (Becton Dickinson, New Jersey, USA) を 10μg/ml のビトロネクチン溶液 250μl で 37°C 2 時間被覆後、1% BSA 250μl で 4°C 一晩ブロッキングした。ビトロネクチン上での接着アッセイには EGF または PMA で処理した細胞と未処理細胞を用いた。各条件ごとに 4 穴ずつ、1 穴あたり 3×10<sup>5</sup> 個の細胞を含む 500μl の細胞浮遊液を分注し、30分、1 時間、2 時間、4 時間後に、細胞を機械的に剥がさないように、かつ十分に無血清培地で洗浄して非接着細胞を除去し、ジメチルチアゾールジフェニルテトラゾリウムブロマイド (3-

factor; IGF-1, insulin-like growth factor; KGF, keratinocyte growth factor; MBP, myelin basic protein; MEM, Eagle's minimum essential medium; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide; PBS, phosphate-buffered saline; PDGF, platelet derived growth factor; PI3-K, phosphatidylinositol

[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, MTT) アッセイ<sup>10)</sup>を行った。すなわち各ウエルに 250 $\mu$ l の 0.5% BSA 加 MEM と 5mg/ml の MTT (Sigma) 30 $\mu$ l を加え、37 $^{\circ}$ C に 3 時間静置した。接着細胞との反応により生じた色素産物を 700 $\mu$ l のジメチルスルホキシド (Sigma) で可溶化し、波長 492nm の吸光度を EIA リーダー-2550 で測定して接着細胞数の指標とした。

#### IV. PKC 活性のアッセイ

PKC に特異性が高いミエリン塩基性蛋白質 (myelin basic protein, MBP)<sup>10)</sup> を基質として使用し、PKC により [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP から MBP へ移行する放射性リン酸の量を測定することで酵素活性を評価する PKC Assay System (GIBCO BRL, Gaithersburg, USA) を使用した。細胞 3-5 $\times$ 10<sup>6</sup> を用意し、0.5% BSA 加 MEM 10ml で 1 回洗浄の後、EGF, PMA を 37 $^{\circ}$ C で 30 分間反応させた。リン酸緩衝生理食塩水 (phosphate-buffered saline, PBS) (pH7.4) 5ml で 2 回洗浄後、抽出用緩衝液 [20 mM トリス塩酸緩衝液 pH7.5, 0.5mM EDTA, 0.5mM エチレンジグリコールビスアミノエチルエーテル四酢酸 (ethyleneglycol bis 2-aminoethylether tetraacetic acid, EGTA), 0.5% トライトン X-100, 25 $\mu$ g/ml アプロチニン, 25 $\mu$ g/ml ロイペプチン] 0.5ml を加え、プラスチック製スクレイパー (Costar) を用いて機械的に細胞を剝離した。試料をダウンス型ホモジナイザーで軽くホモジネート化し 30 分間氷冷後、4 $^{\circ}$ C で 2 分間 5,000rpm の遠心分離で上清を採取した。PKC を部分精製するために洗浄用緩衝液 (20mM トリス塩酸緩衝液 pH7.5, 0.5mM EDTA,

0.5mM EGTA) による洗浄、平衡化を行った 0.5g のジエチルアミノエチルセルロース樹脂 (DE52, Whatman, Kent, England) に試料を通し、吸着した蛋白質を溶出用緩衝液 (20mM トリス塩酸緩衝液 pH7.5, 0.5mM EDTA, 0.5mM EGTA,  $\beta$ -メルカプトエタノール, 0.2M NaCl) 5ml で溶出して PKC 活性測定の試料として用いた。 [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP (6000Ci/mmol, 10mCi/ml, NEN, Wilmington, USA) を PKC 基質溶液 (20mM トリス塩酸緩衝液 pH7.5, 20mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM CaCl<sub>2</sub>, 20 $\mu$ M ATP, 50 $\mu$ M Ac-MBP) に 1 : 400 の比率で混合してその 10 $\mu$ l を、試料 25 $\mu$ l と蒸留水 15 $\mu$ l の混合液に添加して 30 $^{\circ}$ C で 5 分間反応させた。対照として、溶出用緩衝液 25 $\mu$ l と蒸留水 15 $\mu$ l の混合液に同様の操作を行った。これらの混合液 50 $\mu$ l のうち 25 $\mu$ l をホスホセルロース膜上に滴下し、即座に 1% リン酸と蒸留水でそれぞれ 2 回ずつ洗浄した。ホスホセルロース膜に吸着したリン酸化 MBP の放射活性はシンチレーションカウンター (liquid scintillation system, アロカ, 東京) で測定した。

#### V. イムノプロットによるチロシンリン酸化蛋白質の検出

未処理細胞と EGF 処理細胞を PBS 10ml で 2 回洗浄し、細胞可溶性緩衝液 (50mM HEPES, 150mM NaCl, 10% (v/v) グリセロール, 10mM EDTA, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 1% Nonidet P-40, 2mM ソジウムオルソバナデート, 1mM フェニルメタンスルホニルフルオリド, 5mM ソジウムピロホスフェート, 10 $\mu$ g/ml ロイペプチン, 10mM 6-アミノ-n-カプロイン酸) 0.7ml を加え、スクレイパーで機械的に細胞を剝離した。試料をダウンス型ホモジナイザーでホモジネート化し、数秒の遠心により上清を採

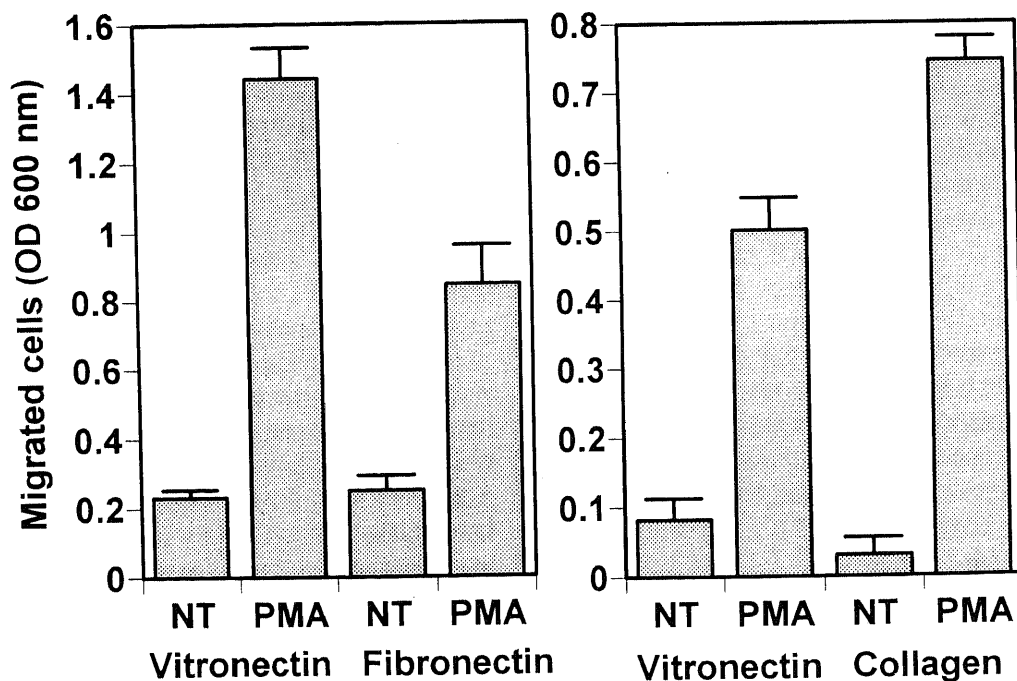


Fig. 1. Effect of PMA on the migration of OSC-19 cells. Cells were treated with 5 ng/ml of PMA for 1 hr. PMA induced the migration of OSC-19 cells on vitronectin, fibronectin and collagen type I in comparison to no treatment (NT). The data shown are  $\bar{x}$  values ( $\pm$ SE) in quadruplicate.

3-kinase; PKC, protein kinase C; PLC- $\gamma$ , phospholipase C- $\gamma$ ; PMA, phorbol 12-myristate 13-acetate; SP, staurosporine; TNF- $\alpha$ , tumor necrosis factor- $\alpha$ ; TP, tyrphostin 9; T-PBS, tween 20-supplemented phosphate-buffered saline; WM, wortmannin

取した。試料に 1/2 量の 10% トリクロロ酢酸を加え 30 分間氷冷静置後、4℃ で 20 分間 14,000rpm で遠心分離した。生じた沈殿をメルカプトエタノール添加泳動緩衝液に溶解して 7.5% ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲルで電気泳動した後、ポリフッ化ビニリデン膜 (Clear Blot Membrane-p, アトー, 東京) に 250mA で 90 分間転写した。5% 脱脂粉乳を溶解した 0.5% ツイーン 20 添加 PBS (Tween20-supplemented phosphate-buffered saline, T-PBS) に転写膜を 20 分間浸漬して非特異的反応をブロッキングした後、100 倍に希釈したマウス抗リン酸化チロシンモノクローナル抗体 (Oncogene Science, Uniondale, USA) を一次抗体として用い、室温で 1 時間反応させた。T-PBS で 10 分間の洗浄を 3 回行った後、200 倍に希釈したビオチン化抗マウス IgG 抗体 (Vector Laboratories, Burlingame, USA) を室温で 30 分間反応させた。T-PBS で 5 分間の洗浄を 5 回行い、10,000 倍に希釈したペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン (Jackson Immunoresearch Laboratories, West Baltimore Pike, USA) を室温で 30 分間反応させた。次いで T-PBS で 5 分間 5 回洗浄した後 0.05M トリス塩酸緩衝液 (pH7.6) で 0.03% に調整した 3, 3'-ジアミノベンチジン (Sigma) に 20μl の過酸化水素水を加えて発色させた。

VI. 免疫沈降法による EGF 受容体の検出

EGF 受容体蛋白質の検出には EGF で処理した細胞を PBS 10ml で 2 回洗浄後、PBS で 25 倍に希釈したビオチン化試薬 (ECL protein biotinylation module, Amersham Life Science, Buckinghamshire, England) 3ml を加え、4℃ 90 分間静置して細胞膜表面蛋白質をビオチン化した。50mM グリシン (和光) 添加 PBS 5ml で 2 回洗浄し、さらに同液 5ml 中に細胞を 15 分間浸漬した後、細胞可溶化緩衝液 1ml を加え、スクレイパーを用いて細胞層を剝離した。試料をダウンス型ホモジナイザーでホモジネートし、4℃ で 10,000rpm の遠心を 30 秒、さらに 14,000rpm の遠心を 10 分間かけて不溶成分を完全に除去した。プロテイン G に非特異的に結合する試料中の蛋白質を除去するため、予めプロテイン G セファロース (Protein G Sepharo-

se, Pharmacia Biotec, Uppsala, Sweden) 懸濁液 100μl 中に試料を加えて 4℃ で 1 時間攪拌し、2 分間 3,000rpm の遠心により非特異的蛋白質を吸着したプロテイン G セファロースを除去した。次に 10 倍希釈したマウス抗 EGF 受容体モノクローナル抗体 (Oncogene Science) 100μl を試料に加えて 4℃ で 1 時間反応後、50μl のプロテイン G セファロース懸濁液に加えて 4℃ で 30 分間攪拌した。3,000rpm で 2 分間の遠心分離によって得られた上清には、さらに 50μl のプロテイン G セファロースを加えて同じ操作を行い、同様にしてセファロースゲルを回収した。プロテイン G セファロースを 1ml の 0.1M リン酸緩衝液 pH8.0 で 15 分間 2 回洗浄した後、300μl の 0.1M グリシン塩酸緩衝液 pH2.8 により免疫複合体を溶出した。1/2 量の 10% (v/v) トリクロロ酢酸を加え 30 分間氷冷静置後、4℃ で 20 分間 14,000rpm で遠心分離した。沈殿をメルカプトエタノール添加泳動緩衝液に溶解し、イムノブロット法と同様の手順で電気泳動、ニトロセルロース膜への転写、5% (w/v) 脱脂粉乳溶液による処理を行った後、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンを室温で 30 分間反応させた。T-PBS による 5 分間 5 回の洗浄の後に化学発光試薬 (Renaissance, NEN, Boston, USA) を用いて発光させ、エックス線フィルム (X-O mat AR, Kodak, 東京) に感光させて可視化した。

VII. 蛍光抗体法

ビトロネクチン 10ng/ml をガラススライドに塗布し、細胞を 2 時間接着させた後、PBS で軽く洗浄、風乾した。1% パラフォルムアルデヒドで 10 分固定し、0.1% トライトン X に 5 分間浸漬した後、PBS で洗浄した。一次抗体として 10 倍に希釈した抗リン酸化チロシン抗体を用い、二次抗体として 10 倍に希釈したフルオレセインイソチオシアンアネート (fluorescein isothiocyanate, FITC) 標識抗マウス IgG 抗体 (Cappel, West Chester, USA) を反応させた。

成 績

I. 各種のリガンド上における各種癌細胞の遊走能

OSC-19 細胞株は未処理の場合、ビトロネクチン、フィブロネクチン、I 型コラーゲン上でほとんど遊走を示さなかったが、PMA で処理すると OSC-19 細胞はビトロネクチン上で濃度依存性に遊走を惹起した。PMA の濃度は 5ng/ml ではほぼ最大に達した。以下、PMA 処理の濃度はすべて 5ng/ml で行った。リガンドがフィブロネクチン、I 型コラーゲンの場合も同様に PMA は OSC-19 細胞の遊走を惹起した (図 1)。PMA は PKC の活性化剤として用いられる人工産物であるが、ビトロネクチン上での αvβ5 依存性遊走の活性化機構を調べるために、まず各種成長因子を投与した。その結果、EGF は濃度依存性に PMA と同様のもしくはそれ以上の遊走を惹起した (図 2)。PDGF, IGF-1, KGF, HGF/SF, TNF-α では惹起されなかった (図 3)。以下、EGF 投与後の細胞内シグナル伝達経路の検索には 10ng/ml の EGF を用いた。VMRC-LCP, HSC-3, Calu-1, ACC-LC-73 はビトロネクチン上で未処理でもよく遊走を示し、PMA 処理によっても遊走細胞は少し増えるにすぎなかった。また KATOIII は浮遊細胞であり、ビトロネクチンに接着せず、遊走も起こらなかった。これは PMA 処理によっても変わらなかった。

II. 細胞接着における PMA, EGF の効果

PMA もしくは EGF 処理による OSC-19 細胞の遊走能の獲

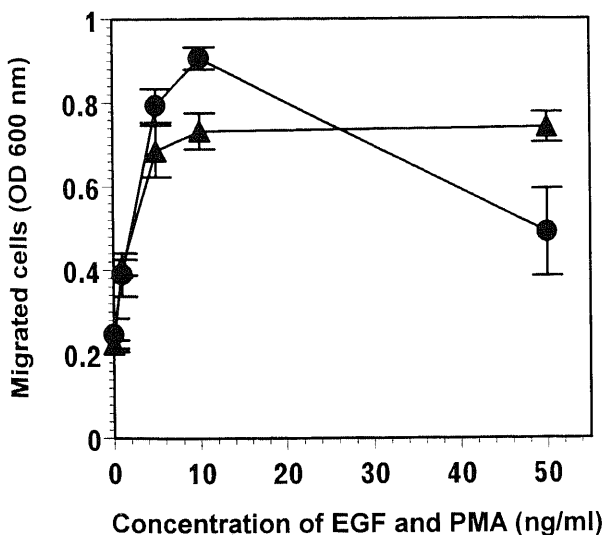


Fig. 2. Dose-dependent effects of PMA and EGF on the migration of OSC-19 cells on vitronectin. Cells were treated with PMA (▲) and EGF (●) for 1 hr. The data shown are  $\bar{x}$  values ( $\pm$ SE) in quadruplicate.

得には、ビトロネクチンへの接着能の変化が関与しているかどうかを検討するため、未処理の細胞、PMA で処理した細胞、EGF で処理した細胞について接着アッセイを行った。未処理、PMA 処理、EGF 処理のいずれの場合も接着細胞数はアッセイ開始後 2 時間でほぼ最大値に達し、経時変化の動態に三者の間

に差はなく(図 4)、PMA と EGF の細胞遊走効果は接着性の強弱とは関係がないことがわかった。

### Ⅲ. EGF のチロシンリン酸化能

EGF または PMA で処理する前にチロシンキナーゼ酵素阻害剤の TP で予め 12 時間処理した細胞では 1 $\mu$ M で EGF の遊

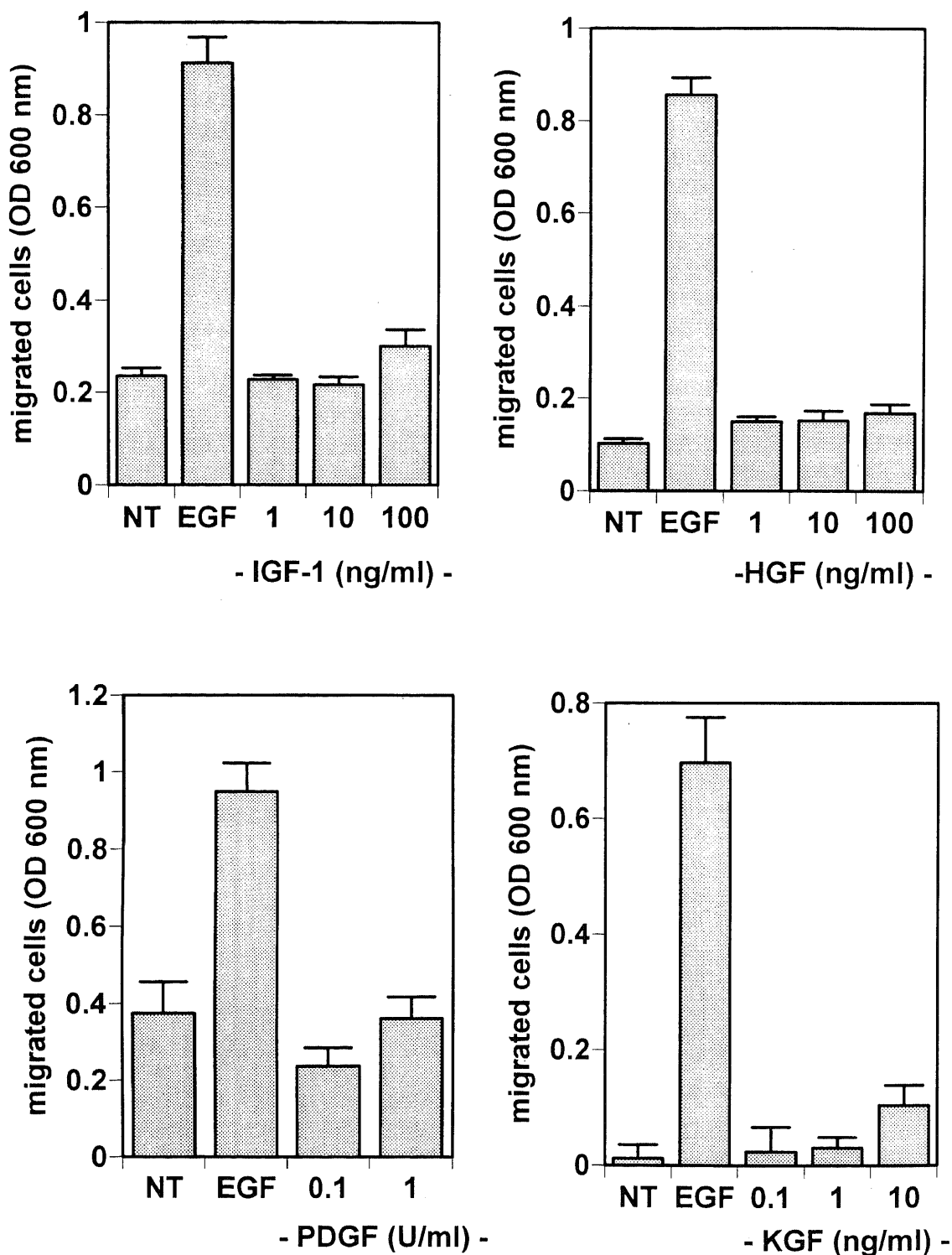


Fig. 3. Effects of growth factors on the migration of OSC-19 cells on vitronectin. IGF-1, HGF, PDGF and KGF failed to induce the migration. The data shown are the  $\bar{x}$  values ( $\pm$ SE) in quadruplicate. Cell migration ability treated with each growth factor was contrasted with that treated with EGF.

走効果が抑制された。一方、PMA によって引き起こされる遊走効果は抑制されなかった (図 5)。同様にチロシンキナーゼ阻害剤の GS を PMA, EGF 処理前に 1 時間処理すると、EGF による遊走効果は 10 μM から 100 μM までの範囲で GS 濃度依存

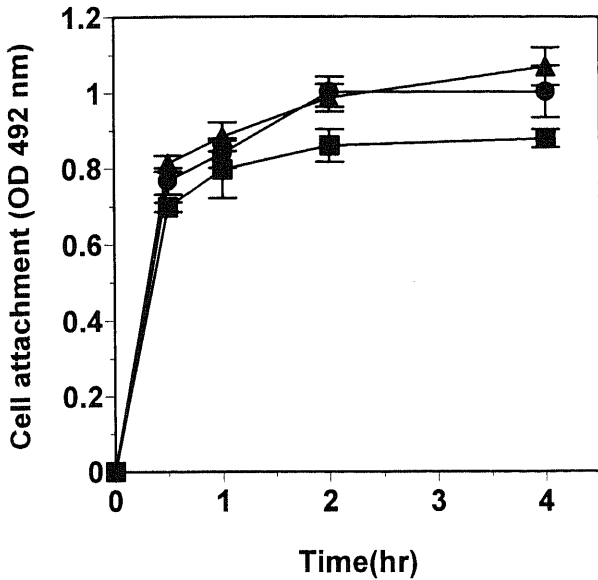


Fig. 4. Time course of the adhesion to vitronectin of OSC-19 cells. Cells were treated with 10 ng/ml of EGF (▲), 5 ng/ml of PMA (■) and control (●). All cells attached to vitronectin within 2 hr, and no kinetic changes were observed among the three conditions. The data shown are  $\bar{x}$  values ( $\pm$ SE) in quadruplicate.

性に抑制されたが、PMA による遊走効果は影響を受けなかった (図 6)。したがって、EGF の遊走に対する効果はチロシンキナーゼの活性化とある種の蛋白質のチロシン残基のリン酸化を介して行われることが明らかになったので、どの蛋白質のチロシンリン酸化が生じているのかを明らかにするために抗チロシンリン酸化抗体を用いてイムノプロットを行った。その結果、EGF 処理を行った細胞では未処理の細胞にはみられなかった 170kDa のバンドが出現した (図 7)。尚、未処理および EGF 処理細胞共に認められた複数のバンドは一次抗体を反応させずに同様に行った陰性対照でも同一の複数のバンドがみられたので非特異的の反応と判定した (図 7)。170kDa のバンドの出現時期を経時的に検討してみると、EGF1 分間処理ですでに出現し、60 分まで処理時間が長くなるにつれてバンドの濃さは増していった (図 7)。また、このバンドは EGF 濃度依存性の遊走効果 (図 2) と同様に、濃度依存性に濃さが増した (図 8)。この 170kDa のチロシンリン酸化蛋白質を同定するため、抗 EGF 受容体抗体を用いて検索した。抗 EGF 受容体抗体では通常のイムノプロットでは蛋白質を検出できなかったため、より感度の高いビオチン化蛋白質に対する免疫沈降法を用いた。細胞表面をビオチン化し、抗 EGF 受容体抗体で免疫沈降後、化学発光で可視化すると、抗リン酸化チロシン抗体で検出されたと同じ高さの 170kDa のバンドが一本検出された (図 8)。EGF で処理した細胞と未処理の細胞をガラススライド上に被覆したビトロネクタン上に接着させ、2 時間後に抗リン酸化チロシン抗体を用いて蛍光抗体法を行ったところ、未処理群では細胞辺縁の接着部に弱い点状あるいは短い線状の蛍光が認められたが (図 9)、EGF で処理するとこれに加えて細胞表面全体に強い点状あるいは小斑状の蛍光が認められた (図 9)。

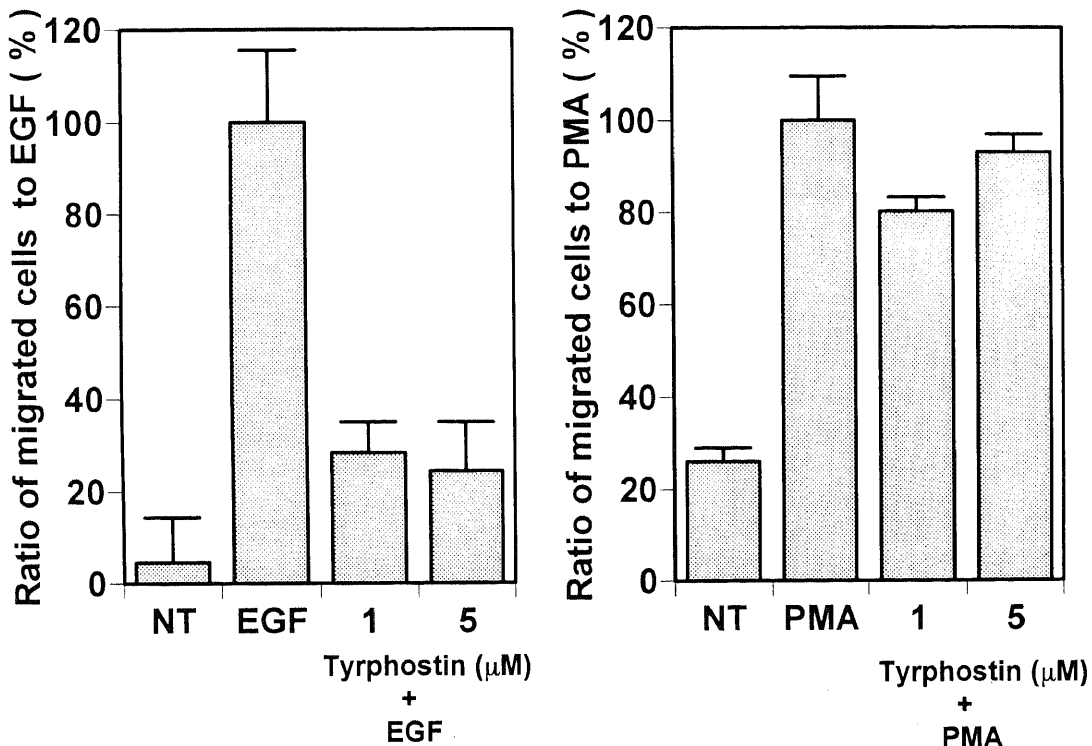


Fig. 5. Inhibitory effect of tyrphostin on EGF- or PMA-induced migration of OSC-19 cells on vitronectin. Cells were pretreated with tyrphostin for 12 hr before EGF or PMA treatment. Tyrphostin inhibited the EGF-induced migration, but did not the PMA-induced migration. The data shown are  $\bar{x}$  values ( $\pm$ SE) in quadruplicate.

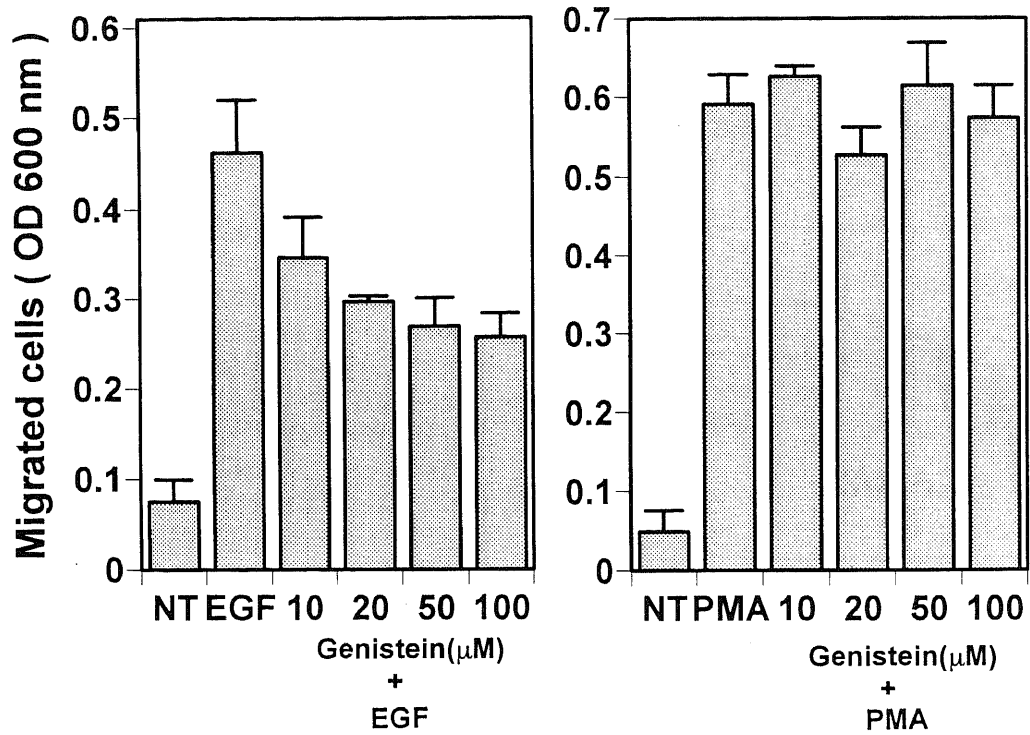


Fig. 6. Inhibitory effect of genistein on EGF- or PMA-induced migration of OSC-19 cells on vitronectin. Cells were pretreated with genistein for 1 hr before EGF or PMA treatment. Genistein inhibited the EGF-induced migration in a dose-dependent manner, and did not affect the PMA-induced migration. The data shown are  $\bar{x}$  values ( $\pm$ SE) in quadruplicate.

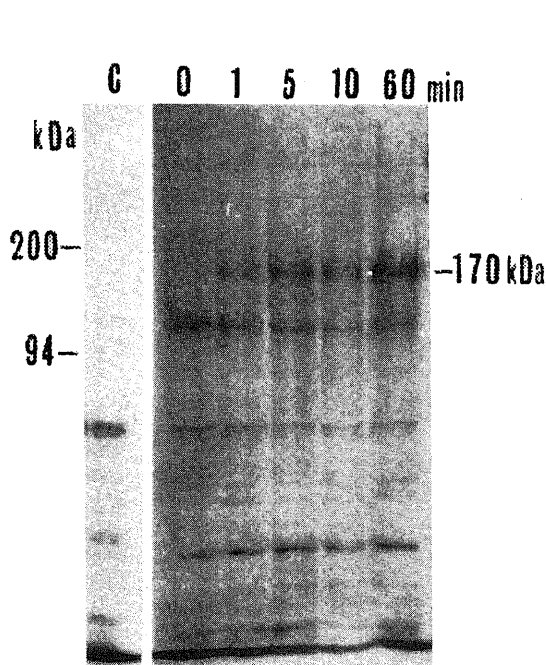


Fig. 7. Immunoblot analysis using anti-phosphotyrosine antibody for OSC-19 cells. Cells were treated with 10 ng/ml of EGF for 0, 1, 5, 10 and 60 min. A 170 kDa of phosphorylated protein appears within 1 min and the intensity of the bands gradually increased. A negative control that did not react with anti-phosphotyrosine antibody showed several non-specific bands (C).

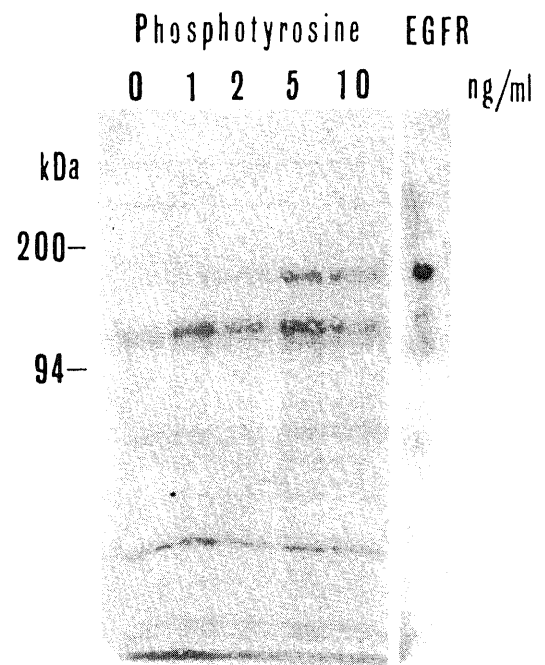


Fig. 8. Immunoblot analysis using anti-phosphotyrosine antibody and immunoprecipitation analysis using anti-EGF receptor antibody. In immunoblot analysis using anti-phosphotyrosine antibody (phosphotyrosine), OSC-19 cells were treated with EGF for 30 min at concentration of 0, 1, 2, 5 and 10 ng/ml. In immunoprecipitation analysis using anti-EGF receptor antibody (EGFR), OSC-19 cells were treated with 10 ng/ml of EGF for 30 min. 170 kDa phosphorylated proteins that has the same molecular weight as that of EGF receptor increased in a dose-dependent manner.



IV. EGF による PKC の活性化

EGF 処理または PMA 処理する前に特異的な PKC 阻害剤である CP で 1 時間処理すると、EGF の場合も、PMA の場合も共にその細胞遊走効果が 0.01 μM 以上の CP で濃度依存性に抑

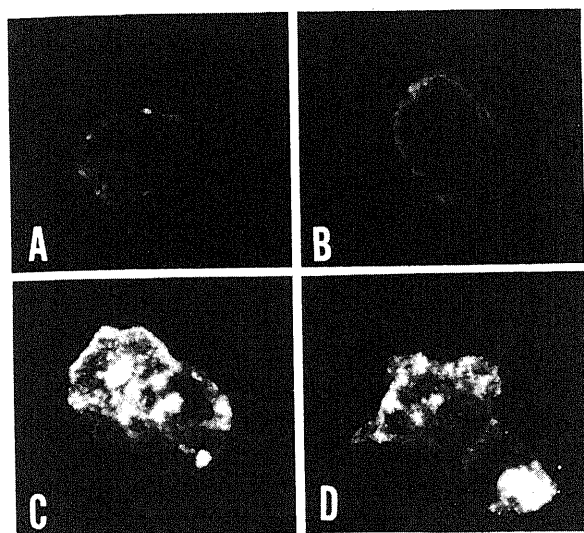


Fig. 9. Fluorescence micrographs of phosphotyrosine in EGF-treated OSC-19 cells attached to vitronectin. Weak punctate or linear fluorescence was shown at the periphery of OSC-19 cells without EGF-treatment (A and B). Punctate and small round fluorescence are shown diffusely in addition to peripheral staining in OSC-19 cells with EGF-treatment (C and D).

制された (図10). したがって EGF の細胞遊走効果のシグナルは EGF 受容体の下流にある PKC を介して伝達されると考えられたので、さらに EGF の PKC 活性化効果を検討した. EGF で処理を行った細胞の PKC 活性は未処理の場合に比較して約30% PKC 活性が増加し、PMA で処理した場合と同程度の PKC 活性化の亢進を示した (表 1). 一方、CP に較べて特異性の低い PKC 阻害剤である SP を用いたところ、CP の場合とは異なり、PMA の細胞遊走効果は影響を受けず、EGF の細胞遊走効果が逆に SP によって増強された (図11). SP が阻害している PKC 以外の酵素、すなわち PKC を介さない伝達経路の一つの可能性として、PI3-K の関与を検討した. しかし、特異的な PI3-K 阻害剤の WM での30分間の前処理によっても、EGF の効果および EGF と SP の共同効果は抑制されなかった (図12).

V. EGF による新たな蛋白合成

EGF による刺激から遊走が発現されるまでの所要時間を検討するため、比較的短時間の遊走細胞数の経時的変化を検討し

Table 1. PKC activity of OSC-19 cells treated with PMA or EGF

Treatment	PKC activity (%) ( $\bar{x} \pm SD$ , n=3, cpm/mg $\times 10^3$ )
None	183 $\pm$ 17 (100)
EGF <sup>a)</sup>	235 $\pm$ 7 (128)*
PMA <sup>b)</sup>	250 $\pm$ 15 (137)*

a) Treated with 5ng/ml PMA

b) Treated with 10ng/ml EGF

\* p<0.01 in comparison with none by Student's t test.

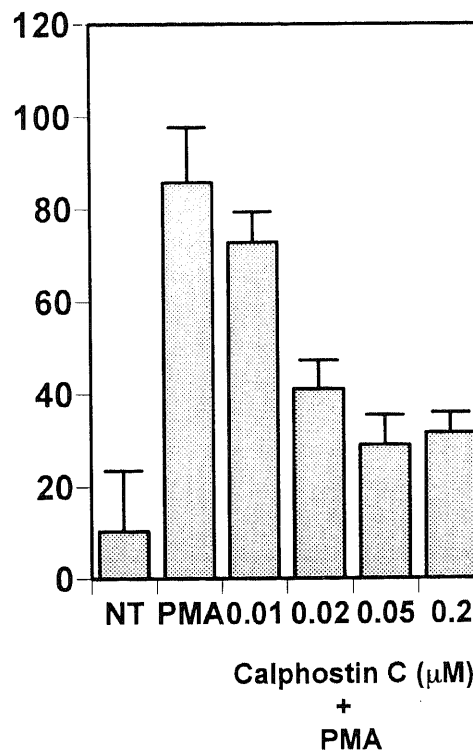
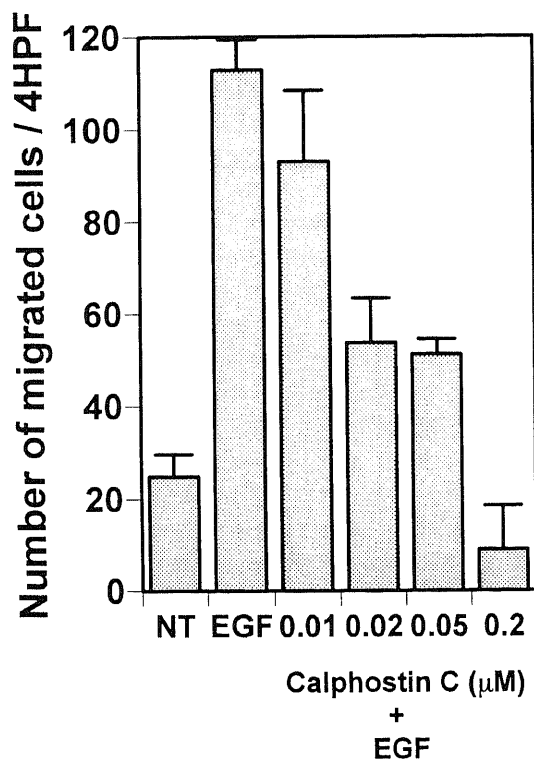


Fig. 10. Inhibitory effect of calphostin C on EGF- or PMA-induced migration of OSC-19 cells on vitronectin. Cells were pretreated with calphostin C for 1 hr before EGF or PMA treatment. Calphostin inhibited both the EGF- and PMA-induced migration in a dose-dependent manner. The data shown are  $\bar{x}$  values ( $\pm SE$ ) in quadruplicate.

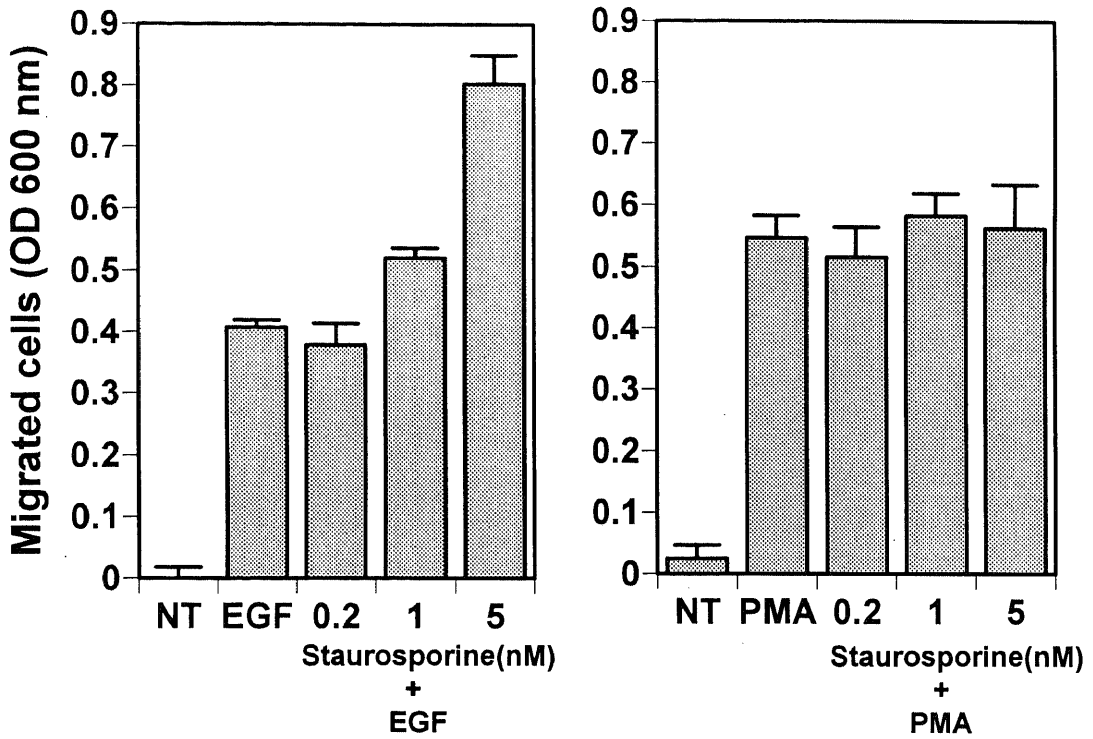


Fig. 11. Effect of staurosporine on EGF- or PMA-induced migration of OSC-19 cells on vitronectin. Cells were pretreated with staurosporine for 10 min before EGF or PMA treatment. Staurosporine used as a PKC inhibitor enhanced the effect of EGF-induced migration. The data shown are  $\bar{x}$  values ( $\pm$ SE) in quadruplicate.

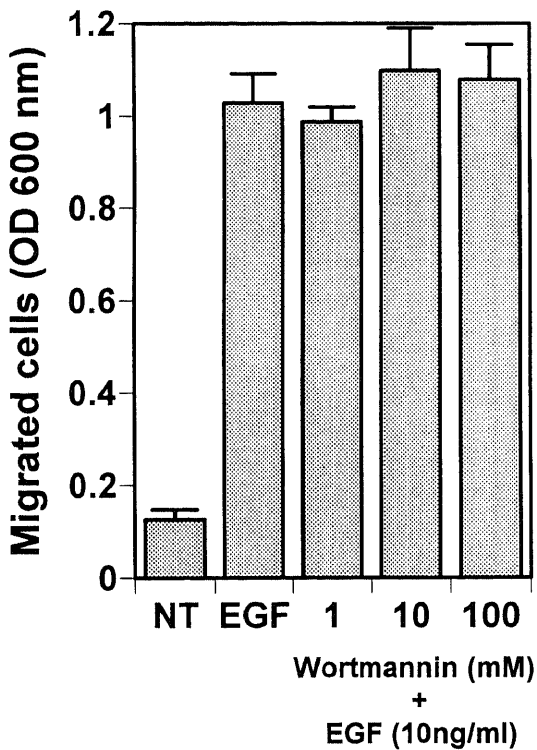


Fig. 12. Wortmannin effect on EGF-induced migration of OSC-19 cells on vitronectin. Cells were pretreated with wortmannin for 30 min before EGF treatment. The data shown are  $\bar{x}$  values ( $\pm$ SE) in quadruplicate.

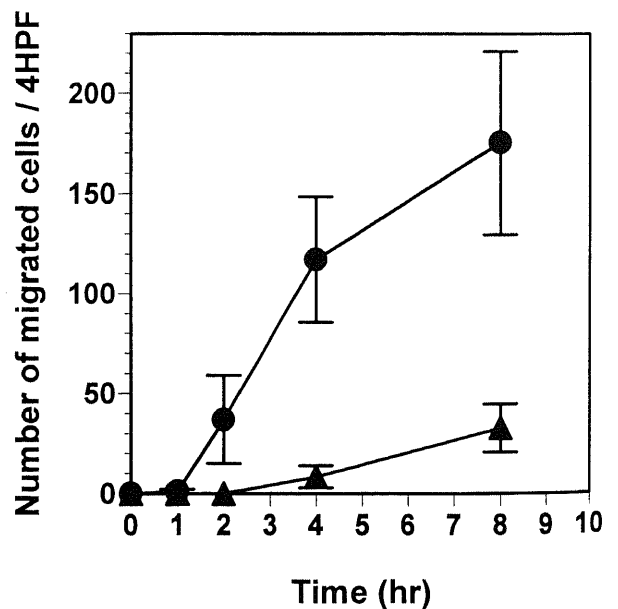


Fig. 13. Time course of migration assay of OSC-19 cells. Cells were treated with EGF 24 hr (●) before assay and those treated by EGF 1 hr (▲) before. The data shown are  $\bar{x}$  values ( $\pm$ SE) in quadruplicate.

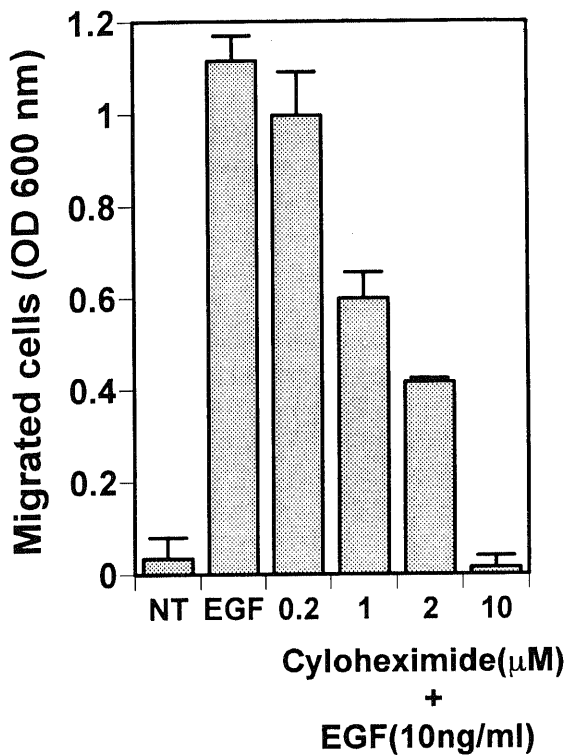


Fig. 14. Inhibitory effect of cycloheximide on EGF-induced migration of OSC-19 cells in a dose-dependent manner. Cells were dosed with cycloheximide and EGF simultaneously. The data shown are  $\bar{x}$  values ( $\pm$ SE) in quadruplicate.

たところ、EGF で処理した細胞は遊走アッセイ開始 4-8 時間後に遊走が始まり、遊走細胞は徐々に増加した。さらに遊走アッセイを行う 24 時間前に 1 時間 EGF で処理した細胞はアッセイ開始 1 時間ないし 2 時間後に急速に遊走を開始した (図 13)。両者の遊走開始時間には、EGF による刺激から遊走発現までの所要時間に相当すると推定される約 4 時間の差が認められ、このような時間の遅れは蛋白合成のために要する時間と考えられたので、蛋白合成阻害剤の CX を用いて遊走アッセイを行った。CX は EGF と同時に投与し、細胞洗浄後も CX を加えて遊走アッセイを行ったところ、EGF 誘導性の細胞遊走は CX 濃度依存性に抑制された (図 14)。

### 考 察

ビトロネクチンをリガンドとするインテグリンには avβ3 と avβ5 の二種類が存在し、特殊な例を除いて β3 と β5 サブユニットは av とのみ二量体を形成する<sup>1)</sup>。同じビトロネクチンをリガンドとしても avβ3 を介して接着する場合と avβ5 を介して接着した場合の間には形態的かつ機能的相違点がかこれまでの実験的研究によって知られている。まず第一にビトロネクチンに接着した三種の細胞株の蛍光抗体法を用いた観察において avβ3 がピンキュリン、テーリンなどの細胞骨格蛋白やアクチン線維末端と共に接着斑に局在し細胞伸展を惹起するのに対し、avβ5 では接着斑を形成せずこのインテグリンを介した細胞伸展は生じないこと<sup>10)</sup>、第二に avβ3 をもたず avβ5 のみを有する肺癌 FG 細胞株はビトロネクチン上の遊走能をもたないが、cDNA をトランスフェクトして avβ3 を発現させることに

より遊走能を獲得したこと<sup>20)</sup>である。著者が実験に用いた口腔扁平上皮癌細胞株の OSC-19 はビトロネクチン受容体として avβ3 をもたず avβ5 を有しているため<sup>10)</sup>、avβ5 インテグリンを介したビトロネクチン上の細胞遊走を検討するには最適であると考えられた。

今回著者はトランスウェルチャンバーを用いて遊走能のアッセイを行った。浸潤モデルとしてはトランスウェルの上部チャンバー下面に人工再生基底膜のマトリゲルを被覆して、下面側に移動した細胞数や再生基底膜の破壊度を評価する方法があり、生体における浸潤性をよく反映することが知られている<sup>21)22)</sup>。この実験系の特徴は癌浸潤の基質への接着、局所的な基質の溶解、細胞の移動という全段階を総合的に評価できることである。

これに対して、著者の行った遊走アッセイは特定の基質上における細胞の遊走に焦点を絞っているため、より細分化した評価方法であると考えられる。この方法を用いて検討した結果、FG 細胞と同様に avβ5 を介した OSC-19 のビトロネクチン上での遊走は生じなかったが、PMA、EGF という外的刺激を加えることによって遊走が開始された。これらの外的刺激により細胞のビトロネクチンに対する接着力自体は増強されていなかった。したがって OSC-19 細胞の avβ5 はビトロネクチンへの接着という遊走の必要条件は満たすが、その接着を足場にして遊走を惹起するには不十分な状態にあり、外的刺激に依存して遊走を開始するインテグリンであると考えられる。同様のことは肺癌由来の FG 細胞株でも報告されており<sup>10)</sup>、avβ5 依存性遊走に共通の現象である可能性がある。フローサイトメトリーでの検討では avβ3 を発現していないにもかかわらず、ビトロネクチンに接着する Calu-1 と ACC-LC-73 細胞株<sup>23)</sup>は未処理でもよく遊走したので、インテグリン種以外の他の要素も細胞遊走に関係しているのを否定できない。しかし、本研究と同じ結果を示している肺癌細胞株の FG 細胞を用いた報告では、ビトロネクチン上では avβ5 を介した外的刺激依存性の遊走が生じるのに対し、コラーゲン上では α2β1 を介した外的刺激を必要としない遊走が生じている<sup>10)</sup>。このことは、インテグリン種によって遊走のための細胞内シグナルが異なっていることを示している。

著者がコラーゲンをリガンドにして、PMA の存在下、非存在下における OSC-19 の遊走能を調べたところビトロネクチンの場合とはほぼ同様の結果となった。この違いはコラーゲンに接着するインテグリン種の違いからきていることも考えられるが、コラーゲン、フィブロネクチンを認識するインテグリンの種類はビトロネクチンに比較して数が多い。例えばコラーゲンに対しては α1β1, α2β1, α3β1, avβ3, フィブロネクチンに対しては α3β1, α4β1, α5β1, avβ1, avβ3, avβ6, avβ8 が報告されており<sup>1)</sup>、発現しているものを漏れなく検討するのは必ずしも容易なことではない。OSC-19 細胞においてもまだこれらすべてを同定するには至っていない。したがって著者がコラーゲン、フィブロネクチンに関して得た結果は複数のインテグリンの重複効果を総合的に見ている可能性がある。おそらく avβ5 と類似した特性をもつインテグリン種がいくつか存在しているであろう。

今回 OSC-19 細胞に対する外的刺激として最初に試みたのは PKC 活性化剤の PMA である。図 1 に示す如く PMA 添加によって細胞は遊走を惹起することが明らかであったので、

PKC を活性化して遊走が惹起されることは間違いないと考えられた。このため実際に生体内で PKC を活性化するのは何かを検討した。創傷治癒の際に EGF, TGF- $\alpha$  の刺激によってケラチノサイトの遊走が生じること<sup>9)</sup>, PDGF が線維芽細胞や平滑筋細胞に対して走化性を生じさせること<sup>50)</sup>, 上皮細胞に対して強力な細胞分散効果および遊走効果をもつ HGF/SF が培養細胞により同定されている<sup>7)8)24)</sup>等, 文献的に遊走を生じさせることが報告されている 6 種類の成長因子 (EGF, IGF-1, KGF, PDGF, HGF/SF, TNF- $\alpha$ ) について試みた。その結果, EGF 以外の成長因子では細胞の遊走は誘導されなかった。特定の成長因子による刺激でのみ遊走が生じた理由としては, OSC-19 細胞に各種成長因子に対する受容体が発現していなかったという可能性と, 各々の成長因子に対する受容体が遊走のためのシグナル伝達経路を有していなかったことの二つが挙げられる。

EGF による  $\alpha v\beta 5$  インテグリンを利用した遊走効果の細胞内シグナル伝達経路を解明するためにまず TP, GS という二種類のチロシンキナーゼ阻害剤を用いて遊走アッセイを行った。TP は EGF 受容体の有する自己リン酸化活性とセカンドメッセンジャーに対するチロシンキナーゼ活性を共に抑制するが, EGF の受容体への結合や受容体の二量体化, さらに受容体の細胞内取り込み, すなわちダウンレギュレーションには影響しないことが知られている阻害剤である<sup>25)~28)</sup>。さらにチロシンリン酸化反応の抑制効果は, インスリン受容体や PDGF 受容体に対するものよりも EGF 受容体に特異性が高いものである<sup>25)28)</sup>。また細胞内への TP 取り込みからチロシンリン酸化反応の抑制開始までに長時間を要することから, 阻害効果の機構は多段階であると考えられている<sup>29)</sup>。これに対して GS は ATP と競合することでチロシンリン酸化反応を抑制し, EGF 受容体の他にも多くのチロシンキナーゼを阻害する<sup>30)31)</sup>。また, チロシンリン酸化が関係しない反応に対しても抑制効果をもつことが報告されている<sup>32)</sup>。このようにその抑制効果の異なる 2 種類の阻害剤を用いることによって, より多くの情報が得られると考えられたが, その結果, どちらの阻害剤の場合も PMA による遊走効果は影響を受けず, EGF による遊走効果だけが抑制された。よって EGF による遊走発現経路にはチロシンリン酸化を必要とすると結論づけられる。さらに PKC 阻害剤の CP を用いた遊走アッセイでは, PMA による遊走効果と EGF による遊走効果が共に抑制されたこと, また PMA と EGF で処理を行った細胞では両者共未処理の細胞の約 130% の PKC 活性を有していたことから, EGF による遊走の発現は, EGF 受容体によるチロシンリン酸化反応の後に, PKC の活性化が生じることによって惹起されるものと考えられる。

EGF 受容体からのシグナルが PKC に達するまでの間にどのような蛋白質が介在し, チロシンリン酸化を受けるのかを検討したところ, 少なくとも自己リン酸化を受けた EGF 受容体がキナーゼとして働き, 遊走には必須であることがわかった。しかし本研究では恐らく測定感度のために検出できなかったと思われるが, EGF 受容体自身のリン酸化チロシン周囲に SH2 ドメインを有するセカンドメッセンジャーが集まり<sup>33)</sup>, EGF 受容体のキナーゼ活性がセカンドメッセンジャーのチロシンをリン酸化し, そのシグナルが PKC に伝わる経路があることは十分推測される。さらにチロシンリン酸化酵素阻害剤が PMA による遊走効果を抑制しなかったことから, PKC が活性化されてから遊走が発現されるまでの間にはチロシンリン酸化反応を必

要としないことは明らかであった。

1 時間前に EGF で処理した細胞と 24 時間前に処理した細胞の遊走能を経時的に比較した結果, 1 時間前に EGF で処理した細胞には遊走開始までに約 4 時間の遅れが認められた。このことは, EGF の刺激を受けてから遊走が発現されるまでの間のシグナル伝達には約 4 時間を必要とすることを示している。本研究でも示されたように EGF を投与してから EGF 受容体の自己リン酸化が起こるまでは 1 分以内, 更に PKC 活性が上昇するのは検討した範囲内では 30 分以内と短く, 細胞内のリン酸化等のシグナル伝達の反応時間は実際には極めて短い。遊走開始に 4 時間を要するという事はシグナルが核内に到達, 転写, 翻訳後新たに蛋白質が生成される経路があることを示している。実際に蛋白合成阻害剤の CX を投与した場合には EGF による遊走効果は明らかに抑制された。したがって PKC からシグナルは核内に伝達され, 転写, 翻訳を経て新たな蛋白合成につながっていることが明らかである。OSC-19 細胞の EGF による遊走効果は, ビトロネクチンに対する接着の増強ではなく  $\alpha v\beta 5$  を介した運動能の獲得であることから,  $\alpha v\beta 5$  蛋白質そのものよりむしろ他の蛋白質が産生されたと考えるべきであろう。

$\alpha v\beta 3$  が接着斑に局在して細胞伸展を惹起するのに対し,  $\alpha v\beta 5$  は接着斑を形成せず, 細胞伸展を惹起しないという一連の報告<sup>19)20)</sup>からは, ビトロネクチン受容体を介した細胞遊走において接着斑の形成や引き続いて生じる細胞伸展が有利に働いていることが考えられる。またトランスフォーミング成長因子- $\beta 1$  (transforming growth factor- $\beta 1$ , TGF- $\beta 1$ ) の刺激によってビトロネクチン上の遊走能が増強されたケラチノサイトでは, 刺激前には散在していた  $\alpha v\beta 5$  の細胞辺縁部への再配置が生じていること<sup>34)</sup>, EGF 刺激によって  $\alpha v\beta 5$  を介した遊走能を獲得した膀胱 FG 細胞では, ビトロネクチン上の細胞伸展が生じていること<sup>10)</sup>が報告されている。これらの報告は OSC-19 細胞における先に述べた新生蛋白質が  $\alpha v\beta 5$  インテグリン周囲の接着斑形成に関与している可能性を示唆するものである。接着斑に局在する蛋白質はこれまでに多数報告されている<sup>35)~43)</sup>。EGF 刺激によって新生され,  $\alpha v\beta 5$  を介した遊走を惹起する蛋白質がこれらの蛋白質に一致するのか, それとも別個の調節因子であるのかは今後の課題である。

EGF による遊走効果が特異的 PKC 阻害剤の CP で抑制されたにもかかわらず, 同じ PKC 阻害剤の SP では EGF による遊走効果が逆に増強された。このことは CP と SP の PKC 阻害のメカニズムが異なっていることによると考えられる。CP は生体内ではジアシルグリセリド (diacylglyceride, DG) が作用する PKC の調節ドメインへ競合的に結合して PKC を阻害する特異的阻害剤であるが<sup>44)</sup>, SP は他のキナーゼと構造が似ている PKC のキナーゼドメインに作用して阻害する比較的特異性の低い阻害剤である<sup>14)</sup>。従って SP はいくつかのチロシンリン酸化酵素や PKC 以外のセリン/スレオニンリン酸化酵素も阻害する<sup>45)~47)</sup>。Rosen ら<sup>21)</sup>は牛脳内皮細胞 (bovine brain endothelial cell, BBEC) を用いて, SP が PMA による PKC 依存性の遊走効果のみならず HGF/SF による PKC 非依存性の遊走効果も抑制したと報告している。また, PKC 活性化剤の PMA と PKC 阻害剤の SP が共に表皮細胞のオルニチンデカルボキラーゼ (ornithine decarboxylase, ODC) 活性化を誘導したこと<sup>48)</sup>等, PKC に対する作用そのものが純粋な抑制効果だけでは

ないと考えられる。本研究においては SP によって EGF 誘導性遊走がむしろ増強されたので、まず考えられることは PKC を介する伝達経路の他に、PKC を介さない副経路が存在するということである。この副経路の存在を確定するには、刺激を受けた EGF 受容体から次にシグナルを受け取るセカンドメッセンジャーを同定することが最も重要であると考えられる。セカンドメッセンジャーとして PLC-γ がまず挙げられる。PLC-γ は活性化された EGF 受容体によってチロシンリン酸化を受け<sup>49,50</sup>、イノシトールリン脂質に作用して DG とイノシトール 1, 4, 5-三リン酸 (inositol 1, 4, 5-triphosphate, IP<sub>3</sub>) を生じる<sup>51</sup>結果、PKC の活性化を惹起する<sup>52</sup>ことが知られている。従って PLC-γ は EGF 受容体と PKC の間に位置するメッセンジャーである可能性は十分あると考えられた。他には、活性化された EGF 受容体に結合し、ras を介した細胞増殖に関与する GRB2<sup>53,54</sup>、活性化 EGF 受容体によってチロシンリン酸化を受け、やはり ras に関係したシグナルを送ることが知られている GTPase 活性促進蛋白 (GTPase activating protein, GAP)<sup>55</sup>、活性化 EGF 受容体によってチロシンリン酸化を受け、細胞増殖に関与する SHC 蛋白<sup>56</sup>、EGF 受容体によって活性化されるという報告のある PI3-K<sup>57</sup> などがある。今回の実験方法では検出感度の問題で EGF 受容体以外のチロシンリン酸化蛋白質は検出されなかった。しかし、PI3-K に関しては、特異的で強力な阻害剤である WM<sup>58,59</sup> を用いて遊走アッセイの阻害効果を検討したところ、EGF による遊走効果も SP による遊走増強効果も WM によって抑制を受けなかったため、少なくとも PI3-K は OSC-19 細胞の遊走のシグナルには関与していないものと考えられた。

### 結 論

口腔扁平上皮癌由来の OSC-19 細胞株において αvβ5 インテグリンを介したビトロネクチン上の遊走機構について検討し、以下の結論を得た。

1. OSC-19 細胞は αvβ5 インテグリンを介してビトロネクチンに接着するが、外的刺激非存在下においては細胞の遊走は生じなかった。
2. PMA と EGF による刺激によって、αvβ5 インテグリンを介したビトロネクチン上の遊走が両者の濃度依存性に惹起された。また、PMA と EGF による刺激は OSC-19 細胞のビトロネクチンへの接着を増強しなかった。
3. チロシンキナーゼ阻害剤の TP と GS で細胞を処理すると、PMA 誘導性細胞遊走は影響を受けず、EGF 誘導性細胞遊走は抑制された。また、EGF で刺激した細胞を可溶化し、チロシンリン酸化蛋白質をイムノブロットで検出したところ、EGF 受容体の自己リン酸化と考えられる 170kDa の蛋白質が認められた。
4. 特異的 PKC 阻害剤の CP で細胞を処理すると、PMA 誘導性細胞遊走も EGF 誘導性細胞遊走も CP 濃度依存性に抑制された。また PMA で処理した細胞、EGF で処理した細胞の PKC 活性は、両者共未処理の細胞に比較して約 30% 増加していた。
5. EGF による刺激から遊走の開始までには約 4 時間を必要とした。また、蛋白合成阻害剤の CX の同時投与によって EGF 誘導性細胞遊走は CX 濃度依存性に抑制された。
6. 非特異的 PKC 阻害剤の SP で細胞を処理すると、CP

の場合とは異なり、PMA 誘導性細胞遊走は影響を受けず、EGF 誘導性細胞遊走は SP 濃度依存性に増強された。

以上の結果から、EGF 誘導性の αvβ5 インテグリンを介した細胞遊走機構は接着の増強に依存しない運動能の獲得であり、EGF が結合して活性化された EGF 受容体の自己リン酸化が PKC を活性化し、そのシグナルは核内に達し、転写、翻訳の末、新たな蛋白合成が生じるというシグナル伝達経路があること判明した。また PKC を介する以外の伝達経路の存在も示唆された。

### 謝 辞

稿を終えるにあたり、御懇篤なる御指導と御校閲を賜りました金沢大学病理学第一講座中西功夫教授、金沢大学外科学第一講座渡辺洋宇教授に深く感謝の意を表します。本研究の遂行にあたり、直接御指導、御協力頂きました金沢大学医学部保健学科河原栄助教授に厚く御礼申し上げます。また細胞株を供与して頂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敏一博士、愛知県がんセンター研究所超微形態学高橋隆博士に感謝いたします。

最後に御助言、御協力を頂きました金沢大学第一病理学教室の諸先生、技術員各位に感謝いたします。本論文の要旨は第27回日本結合組織学会総会 (1995, 横浜) において発表した。

### 文 献

- 1) Hynes, R. O.: Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*, **69**, 11-25 (1992).
- 2) Albelda, S. M.: Biology of disease: role of integrins and other cell adhesion molecules in tumor progression and metastasis. *Lab. Invest.*, **68**, 4-17 (1993).
- 3) Liotta, L. A., Rao, C. N. & Barsky, S. H.: Tumor invasion and the extracellular matrix. *Lab. Invest.*, **49**, 636-649 (1983).
- 4) Chen, J. D., Kim, J. P., Zhang, K., Sarret, Y., Wynn, K. C., Kramer, R. H. & Woodley, D. T.: Epidermal growth factor (EGF) promotes human keratinocyte locomotion on collagen by increasing the α2 integrin subunit. *Exp. Cell Res.*, **209**, 216-223 (1993).
- 5) Kundra, V., Anand-Apte, B., Feig, L. A. & Zetter, B. R.: The chemotactic response to PDGF-BB: evidence of a role for Ras. *J. Cell Biol.*, **130**, 725-731 (1995).
- 6) Bornfeldt, K. E., Graves, L. M., Raines, E. W., Igarashi, Y., Wayman, G., Yamamura, S., Yatomi, Y., Sidhu, J. S., Krebs, E. G. & Hakomori, S.: Sphingosine-1-phosphate inhibits PDGF-induced chemotaxis of human arterial smooth muscle cells: spatial and temporal modulation of PDGF chemotactic signal transduction. *J. Cell Biol.*, **130**, 193-206 (1995).
- 7) Rosen, E. M., Knesel, J. & Goldberg, I. D.: Scatter factor and its relationship to hepatocyte growth factor and *met*. *Cell Growth Differ.*, **2**, 603-607 (1991).
- 8) Tsarfaty, I., Resau, J. H., Rulong, S., Keydal, I., Fallete, D. L. & Woude, G. F. V.: The *met* proto-oncogene receptor and lumen formation. *Science*, **257**, 1258-1261 (1992).
- 9) Herlyn, M. & Malkowicz, S. B.: Biology of disease: regulatory pathways in tumor growth and invasion. *Lab. Invest.*, **65**, 262-271 (1991).

- 10) Klemke, R. L., Yebra, M., Bayna, E. M. & Cheresch, D. A.: Receptor tyrosine kinase signaling required for integrin  $\alpha v\beta 5$ -directed cell motility but not adhesion on vitronectin. *J. Cell Biol.*, **127**, 859-866 (1994).
- 11) Zachary, I. & Rozengurt, E.: Focal adhesion kinase (p125<sup>FAK</sup>): a point of convergence in the action of neuropeptides, integrins, and oncogenes. *Cell*, **71**, 891-894 (1992).
- 12) Schwartz, M. A.: Signaling by integrins: implications for tumorigenesis. *Cancer Res.*, **53**, 1503-1506 (1993).
- 13) Kawahara, E., Imai, K., Kumagai, S., Yamamoto, E. & Nakanishi, I.: Inhibitory effects of adhesion oligopeptides on the invasion of squamous carcinoma cells with special reference to implication of  $\alpha v$  integrins. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **121**, 133-140 (1995).
- 14) Tamaoki, T., Nomoto, H., Takahashi, I., Kato, Y., Morimoto, M. & Tomita, F.: Staurosporine, a potent inhibitor of phospholipid/ $\text{Ca}^{2+}$  dependent protein kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **135**, 397-402 (1986).
- 15) Yano, H., Nakanishi, S., Kimura, K., Hanai, N., Saitoh, Y., Fukui, Y., Nonomura, Y. & Matsuda, Y.: Inhibition of histamine secretion by wortmannin through the blockade of phosphatidylinositol 3-kinase in RBL-2H3 cells. *J. Biol. Chem.*, **268**, 25846-25856 (1993).
- 16) Arcaro, A. & Wymann, M. P.: Wortmannin is a potent phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor: the role of phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate in neutrophil response. *Biochem. J.*, **296**, 297-301 (1993).
- 17) Cole, S. P. C.: Rapid chemosensitivity testing of human lung tumor cells using the MTT assay. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **17**, 259-263 (1986).
- 18) Yasuda, I., Kishimoto, A., Tanaka, S., Tominaga, M., Sakurai, A. & Nishizuka, Y.: A synthetic peptide substrate for selective assay of protein kinase C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **166**, 1220-1227 (1990).
- 19) Wayner, E. A., Orlando, R. A. & Cheresch, D. A.: Integrins  $\alpha v\beta 3$  and  $\alpha v\beta 5$  contribute to cell attachment to vitronectin but differentially distribute on the cell surface. *J. Cell Biol.*, **113**, 919-929 (1991).
- 20) Leavesley, D. I., Ferguson, G. D., Wayner, E. A. & Cheresch, D. A.: Requirement of the integrin  $\beta 3$  subunit for carcinoma cell spreading or migration on vitronectin and fibrinogen. *J. Cell Biol.*, **117**, 1101-1107 (1992).
- 21) Albini, A., Iwamoto, Y., Kleinman, H. K., Martin, G. R., Aaronson, S. A., Kozlowski, J. M. & McEwan, R. N.: A rapid *in vitro* assay for quantitating the invasive potential of tumor cells. *Cancer Res.*, **47**, 3239-3245 (1987).
- 22) Parish, C. R., Jakobsen, K. B. & Coombe, D. R.: A basement-membrane permeability assay which correlates with the metastatic potential of tumor cells. *Int. J. Cancer*, **52**, 378-383 (1992).
- 23) Suzuki, S., Takahashi, T., Nakamura, S., Koike, K., Ariyoshi, Y., Takahashi, T. & Ueda, R.: Alteration of integrin expression in human lung cancer. *Jpn. J. Cancer Res.*, **84**, 168-174 (1993).
- 24) Stoker, M., Gherardi, E., Perryman, M. & Gray, J.: Scatter factor is a fibroblast-derived modulator of epithelial cell motility. *Nature*, **327**, 239-242 (1987).
- 25) Yaish, P., Gazit, A., Gilon, C. & Levitzki, A.: Blocking of EGF-dependent cell proliferation by EGF receptor kinase inhibitors. *Science*, **242**, 933-935 (1988).
- 26) Lyall, R. M., Zilberstein, A., Gazit, A., Gilon, C., Levitzki, A. & Schlessinger, J.: Tyrosine kinase inhibitors inhibit epidermal growth factor (EGF)-receptor tyrosine kinase activity in living cells and EGF-stimulated cell proliferation. *J. Biol. Chem.*, **264**, 14503-14509 (1989).
- 27) Spaargaren, M., Defize, L. H. K., Boonstra, J. & de Laat, S. W.: Antibody-induced dimerization activates the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. *J. Biol. Chem.*, **266**, 1733-1739 (1991).
- 28) Hauguel-DeMouzon, S., Csermely, P., Zoppini, G. & Kahn, C. R.: Quantitative dissociation between EGF effects on *c-myc* and *c-fos* gene expression, DNA synthesis, and epidermal growth factor receptor tyrosine kinase activity. *J. Cell Physiol.*, **150**, 180-187 (1992).
- 29) Faaland, C. A., Mermelstein, F. H., Hayashi, J. & Laskin, J. D.: Rapid uptake of tyrosine kinase inhibitor into A431 human epidermoid cells is followed by delayed inhibition of epidermal growth factor (EGF)-stimulated EGF receptor tyrosine kinase activity. *Mol. Cell Biol.*, **11**, 2697-2703 (1991).
- 30) Akiyama, T., Ishida, J., Nakagawa, S., Ogawara, H., Watanabe, S., Itoh, N., Shibuya, N. & Fukami, Y.: Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J. Biol. Chem.*, **262**, 5592-5595 (1987).
- 31) Duan, R.-D., Wagner, A. C. C., Yule, D. I. & Williams, J. A.: Multiple inhibitory effects of genistein on stimulus-secretion coupling in rat pancreatic acini. *Am. J. Physiol.*, **266** (Gastrointest. Liver Physiol., **29**), G303-G310 (1994).
- 32) Abler, A., Smith, J. A., Randazzo, P. A., Rothenberg, P. L. & Jarett, L.: Genistein differentially inhibits postreceptor effects of insulin in rat adipocytes without inhibiting the insulin receptor kinase. *J. Biol. Chem.*, **267**, 3946-3951 (1992).
- 33) Fantl, W. J., Johnson, D. E. & Williams, L. T.: Signaling by receptor tyrosine kinases. *Ann. Rev. Biochem.*, **62**, 453-481 (1993).
- 34) Zambruno, G., Marchisio, P. C., Marconi, A., Vaschieri, C., Melchiori, A., Giannetti, A. & De Luca, M.: Transforming growth factor- $\beta 1$  modulates  $\beta 1$  and  $\beta 5$  integrin receptors and induces the de novo expression of the  $\alpha v\beta 6$  heterodimer in normal human keratinocytes: implications for wound healing. *J. Cell Biol.*, **129**, 853-865 (1995).
- 35) Lazarides, E. & Burridge, K.:  $\alpha$ -Actinin: immunofluorescent localization of muscle structural protein in nonmuscle cells. *Cell*, **6**, 289-298 (1975).
- 36) Burridge, K. & Conell, L.: A new protein of adhesion plaques and ruffling membranes. *J. Cell Biol.*, **97**, 359-367 (1983).

- 37) Geiger, B.: A 130K protein from chicken gizzard: its localization at the termini of microfilament bundles in cultured chicken cells. *Cell*, **18**, 193-205 (1979).
- 38) Burridge, K. & Mangeat, P.: An interaction between vinculin and talin. *Nature*, **308**, 744-746 (1984).
- 39) Turner, C. E., Glenney, J. R. & Burridge, K.: Paxillin: a new vinculin-binding protein present in focal adhesions. *J. Cell Biol.*, **111**, 1059-1068 (1990).
- 40) Weng, Z., Taylor, J. A., Turner, C. E., Brugge, J. S. & Seidel-Dugan, C.: Detection of Src homology 3-binding proteins, including paxillin, in normal and v-src-transformed Balb/c 3T3 cells. *J. Biol. Chem.*, **268**, 14956-14963 (1993).
- 41) Turner, C. E. & Miller, J. T.: Primary sequence of paxillin contains putative SH2 and SH3 domain binding motifs and multiple LIM domains: identification of a vinculin and pp125<sup>FAK</sup> binding region. *J. Cell Sci.*, **107**, 1583-1591 (1994).
- 42) Beckerle, M. C., Burridge, K., DeMartino, G. N. & Croall, D. E.: Colocalization of calcium-dependent protease II and one of its substrates at sites of cell adhesion. *Cell*, **51**, 569-577 (1987).
- 43) Schmeichel, K. L. & Beckerle, M. C.: The LIM domain is a modular protein-binding interface. *Cell*, **79**, 211-219 (1994).
- 44) Kobayashi, E., Nakano, H., Morimoto, M. & Tamaki, T.: Calphostin C (UCN-1028C), a novel microvial compound, is a highly potent and specific inhibitor of protein kinase C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **159**, 548-553 (1989).
- 45) Nakano, H., Kobayashi, E., Takahashi, I., Tamaoki, T., Kuzuu, Y. & Iba, H.: Staurosporine inhibits tyrosine-specific protein kinase activity of Rous sarcoma virus transforming protein p60. *J. Antibiotics*, **XL** 706-708 (1987).
- 46) Meyer, T., Regenass, U., Fabbro, D., Alteri, E., Rösel, J., Müller, M., Caravatti, G. & Matter, A.: A derivative of staurosporine (CGP 41 251) shows selectivity for protein kinase C inhibition and *in vitro* anti-proliferative as well as *in vivo* anti-tumor activity. *Int. J. Cancer*, **43**, 851-856 (1989).
- 47) Rosen, E. M., Jaken, S., Carley, W., Luckett, P. M., Setter, E., Bhargava, M. & Goldberg, I. D.: Regulation of motility in bovine brain endothelial cells. *J. Cell Physiol.*, **146**, 325-335 (1991).
- 48) Yamamoto, S., Jiang, H., Nishikawa, K., Ishihara, M., Wang, J. C. & Kato, R.: Protein kinase C-dependent and -independent actions of a potent protein kinase C inhibitor, staurosporine. *Eur. J. Pharmacol.*, **227**, 113-122 (1992).
- 49) Meisenhelder, J., Suh, P.-G., Rhee, S. G. & Hunter, T.: Phospholipase C-γ is a substrate for the PDGF and EGF receptor protein-tyrosine kinases *in vivo* and *in vitro*. *Cell*, **57**, 1109-1122 (1989).
- 50) Margolis, B., Rhee, S. G., Felder, S., Mervic, M., Lyall, R., Levitzki, A., Ullrich, A., Zilberstein, A. & Schlessinger, J.: EGF induces tyrosine phosphorylation of phospholipase C-II: a potential mechanism for EGF receptor signaling. *Cell*, **57**, 1101-1107 (1989).
- 51) Majerus, P. W., Connolly, T. M., Deckmyn, H., Ross, T. S., Bross, T. E., Ishii, H., Bansal, V. S. & Wilson, D. B.: The metabolism of phosphoinositide-derived messenger molecules. *Science*, **234**, 1519-1526 (1986).
- 52) Nishizuka, Y.: The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. *Nature*, **334**, 661-665 (1988).
- 53) Lowenstein, E. J., Daly, R. J., Batzer, A. G., Li, W., Margolis, B., Lammers, R., Ullrich, A., Skolnik, E. Y., Bar-Sagi, D. & Schlessinger, J.: The SH2 and SH3 domain-containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling. *Cell*, **70**, 431-442 (1992).
- 54) Gale, N. W., Kaplan, S., Lowenstein, E. J., Schlessinger, J. & Bar-Sagi, D.: Grb2 mediates the EGF-dependent activation of guanine nucleotide exchange on Ras. *Nature*, **363**, 88-92 (1993).
- 55) Ellis, C., Moran, M., McCormick, F. & Pawson, T.: Phosphorylation of GAP and GAP-associated proteins by transforming and mitogenic tyrosine kinases. *Nature*, **343**, 377-381 (1990).
- 56) Pelicci, G., Lanfrancone, L., Grignani, F., McGlade, J., Cavallo, F., Forni, G., Nicoletti, I., Grignani, F., Pawson, T. & Pelicci, P. G.: A novel transforming protein (SHC) with an SH2 domain is implicated in mitogenic signal transduction. *Cell*, **70**, 93-104 (1992).
- 57) Carter, A. N. & Downes, C. P.: Phosphatidylinositol 3-kinase is activated by nerve growth factor and epidermal growth factor in PC12 cells. *J. Biol. Chem.*, **267**, 14563-14567 (1992).

**Experimental Study on the Intracellular Signal Transduction Induced During the  $\alpha\beta 5$  Integrin-mediated Cell Migration** Tetsuya Imai, Department of Pathology (I), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. *Juzen Med Soc.*, **105**, 172—186 (1996)

**Key words**  $\alpha\beta 5$  integrin, cell migration, EGF, tyrosin phosphorylation, PKC

#### Abstract

Attachment of carcinoma cells to extracellular matrix via integrin and the subsequent migration are known to be an important process in cancer invasion. In the present study, an intracellular activation mechanism of  $\alpha\beta 5$ -mediated migration was investigated using a OSC-19 cell line which was derived from oral squamous cell carcinoma and was able to attach to vitronectin through  $\alpha\beta 5$ . Migration assay was performed on transwell chambers coated with vitronectin. OSC-19 cells adhered to vitronectin but did not migrate except under the PMA- or EGF-stimulation. Those migrations occurred in a dose-dependent manner. Pretreatment with the tyrosine kinase inhibitors, tyrphostin 9 or genistein, blocked the EGF-induced migration, but did not affect the PMA-induced one. Immunoblotting of tyrosine-phosphorylated proteins showed a band of 170 kDa protein in the cell lysates treated with EGF using an anti-phosphotyrosine antibody. This finding was thought to be autophosphorylation of EGF receptors, because the band had the same mobility as the 170 kDa band detected by immunoprecipitation method using an anti-EGF receptor antibody. PKC activity rapidly increased more than 30% in the cytoplasm after EGF- or PMA-treatment. Treatment with calphostin C, a specific inhibitor of PKC, reduced both PMA-induced and EGF-induced cell migration, indicating that the signaling derived from EGF receptor reached PKC through the receptor autophosphorylation. Time course analysis of the EGF-induced cell migration indicated exactly a time lag of 4 hours before starting the migration when cells were pretreated with EGF 1 hour earlier, whereas EGF-pretreatment 24 hours earlier induced the cell migration immediately. Furthermore, cycloheximide blocked the EGF-induced migration in a dose-dependent manner. Thus it is suggested that de novo protein synthesis was required for the induction of the  $\alpha\beta 5$ -mediated cell migration. This effect was unlikely to be due to overexpression of  $\alpha\beta 5$  integrin itself, because neither PMA nor EGF enhanced the cells ability to adhere to vitronectin. These findings indicate that the  $\alpha\beta 5$ -dependent cell migration requires an initial autophosphorylation of the EGF receptor by EGF stimulation, followed by a signal transduction through PKC, which reaches the nucleus and induces de novo protein synthesis after the transcription and the translation. In contrast, the nonspecific PKC inhibitor, staurosporine, increased the EGF-induced cell migration rather than inhibit it, suggesting the existence of a PKC-independent pathway.