

# 口腔扁平上皮癌細胞の浸潤能とヴィトロネクチンレセプターの機能・発現に関する実験的研究

|       |  |
|-------|--|
| メタデータ | 言語: jpn<br>出版者:<br>公開日: 2017-10-04<br>キーワード (Ja):<br>キーワード (En):<br>作成者: 今井, 一志<br>メールアドレス:<br>所属: |
| URL   | <a href="http://hdl.handle.net/2297/8472">http://hdl.handle.net/2297/8472</a>                      |

## 口腔扁平上皮癌細胞の浸潤能とヴィトロネクチンレセプターの機能・発現に関する実験的研究

金沢大学医学部歯科口腔外科学講座 (主任：山本悦秀教授)

今井 一志

3種類の口腔扁平上皮癌由来の細胞株 (HSC-3, 低分化型; OSC-19, 高分化型; KB, 未分化癌) を用いて癌細胞の浸潤と接着の関係を検討した。トランスウェルチャンバーを使用して細胞浸潤能実験を行ったところ, HSC-3 細胞が最も高浸潤性で, 次いで OSC-19, KB 細胞の順であった。またこれらの浸潤は以下の細胞接着ペプチド, すなわち HSC-3 細胞はイソロイシン-リジン-バリン-アラニン-バリン (isoleucine-lysine-valine-alanine-valine, IKVAV) とアルギニン-グリシン-アスパラギン酸-バリン (arginine-glycine-aspartic acid-valine, RGDV), OSC-19 細胞はアルギニン-グリシン-アスパラギン酸-セリン (arginine-glycine-aspartic acid-serine, RGDS), チロシン-イソロイシン-グリシン-セリン-アルギニン (tyrosine-isoleucine-glycine-serine-arginine, YIGSR) と RGDV, KB 細胞は RGDV で抑制された。HSC-3 細胞と OSC-19 細胞はフィブロネクチン (fibronectin, Fn), ラミニン, ヴィトロネクチン (vitronectin, Vn), I 型およびIV型コラーゲンによく接着したが, KB 細胞は Fn と Vn にわずかに接着するのみであった。RGDV ペプチドで細胞を処理すると Fn, Vn への接着細胞数の減少がみられた。HSC-3 細胞と OSC-19 細胞では  $\alpha v \beta 3$  インテグリンが Vn との接着部位および細胞質突起の浸潤先端部に免疫組織化学的に証明された。免疫沈降法を用いてインテグリンの発現の有無を検討したところ, HSC-3 細胞と OSC-19 細胞ともに  $\alpha v, \beta 3, \alpha 5, \beta 1$  サブユニットを発現していたが,  $\alpha v$  は HSC-3 細胞,  $\alpha 5$  は OSC-19 細胞に強く発現していた。 $\alpha 5 \beta 1$  インテグリンはマトリゲルへの浸潤過程において HSC-3 細胞および OSC-19 細胞の細胞膜にび浸性に発現されており, 更に Fn 上で培養した場合, OSC-19 細胞では  $\alpha 5 \beta 1$  を常時認めたが, HSC-3 細胞では長時間培養した場合にのみ陽性であった。以上より,  $\alpha v \beta 3$  インテグリンは細胞外マトリックスに対する機能的レセプターとして口腔扁平上皮癌細胞の浸潤先端部に局在している可能性が示唆された。

**Key words** vitronectin receptor, squamous cell carcinoma, integrin, invasion

癌細胞の浸潤は基質との接着, 基質の分解, 細胞の移動など段階的に起こる複雑な現象である<sup>1)</sup>。とくに癌細胞と細胞外マトリックス (extracellular matrix, ECM) との接着は癌細胞が間質へ浸潤する際の重要なステップである。ECM は化学的構造の面からラミニン (laminin, Ln), フィブロネクチン (fibronectin, Fn), I 型およびIV型コラーゲン, ヴィトロネクチン (vitronectin, Vn), エラスチン, プロテオグリカンなどにより構成され, 癌細胞はその細胞接着ドメインに接着する。これらのドメインに対するレセプターは  $\alpha$  および  $\beta$  サブユニットから成るインテグリン<sup>2)</sup> であり, 現在少なくとも12種類の  $\alpha$  サブユニットと9種類の  $\beta$  サブユニットの組み合わせにより20種類が存在し, 正常細胞の生理的機能の発現・保持のみならず腫瘍の進展や転移に深く関係すると考えられている<sup>3)</sup>。実際にどのインテグリンが腫瘍細胞の浸潤・転移と関連しているかを知るため, 様々な実験系を用いた検討がこれまでなされてきた<sup>4-7)</sup>。このうち, メラノーマにおいては Vn レセプターである  $\alpha v \beta 3$  インテグリン (vitronectin receptor, VnR) の発現が腫瘍の進展と

密接に関連することが指摘されている<sup>8)</sup>。しかしながら, 扁平上皮癌細胞などについては未だ不明のままである。また, 一方でインテグリンはその種類の差異とともに細胞表面での局在が細胞の ECM への接着能に影響する<sup>9)</sup> ことが証明されており, 腫瘍細胞が発現するインテグリンの種類と局在を知ることは癌細胞浸潤のメカニズムの解明のみならず, 浸潤の抑制に指針を与えるものとして大きな意義を持つと考えられる。

一方, 口腔扁平上皮癌の臨床において, Yamamoto ら<sup>10)11)</sup> は腫瘍の浸潤様式が所属リンパ節への転移形成率や患者の予後と密接に関連することを報告してきた。そこで当講座では1989年以来これら口腔癌の浸潤の機構を解明し, 治療成績の向上に資することを目的として基礎的ならびに臨床的研究を系統的に行ってきた。その一環として本研究では口腔扁平上皮癌細胞の浸潤に中心的役割を果たすインテグリンを知るため, 3種類の細胞株 (HSC-3, OSC-19, KB) を用いて多面的に検討を行った。その結果, 浸潤能力のある HSC-3 や OSC-19 は ECM タンパク質との接着能が高く, Vn 由来のペプチド, アルギニン-グ

平成5年9月1日受付, 平成5年9月27日受理

Abbreviations: ECM, extracellular matrix; FITC, fluorescein-isothiocyanate; Fn, fibronectin; FnR, fibronectin receptor; IKVAV, isoleucine-lysine-valine-alanine-valine; Ln, Laminin; RGD, arginine-glycine-aspartic acid; RGDS, arginine-glycine-aspartic acid-serine; RGDV, arginine-glycine-aspartic acid-threonine; RGDV,

リシン-アスパラギン酸-バリン (arginine-glycine-aspartic acid-valine, RGDV) で浸潤が阻害された。また VnR が浸潤方向の細胞膜とくに周囲基質中に伸びた細胞質突起に沿って発現する傾向を示した。以上の結果より、浸潤方向の細胞膜への VnR の発現が口腔扁平上皮癌細胞の周囲組織中への浸潤に密接に関連している可能性が示唆されたので、ここに報告する。

### 材料および方法

#### I. 腫瘍細胞株

口腔扁平上皮癌由来の細胞株、OSC-19, HSC-3, KB の3種類を使用した。OSC-19 細胞は札幌医科大学口腔外科学講座小浜源教授より供与された高分化型扁平上皮癌細胞株<sup>12)</sup>であり、低分化型扁平上皮癌細胞株である HSC-3 細胞<sup>13)</sup>と未分化癌細胞株である KB 細胞<sup>14)</sup>は財団法人がん研究振興財団細胞バンク(東京)より提供を受けた。

#### II. 細胞接着ペプチド

アルギニン-グリシン-アスパラギン酸 (arginine-glycine-aspartic acid, RGD), アルギニン-グリシン-アスパラギン酸-セリン (arginine-glycine-aspartic acid-serine, RGDS), アルギニン-グリシン-グルタミン酸-セリン (arginine-glycine-glutamic acid-serine, RGES) は Bachem 社 (Torrance, CA, USA) 製のものを使用し, RGDV, チロシン-イソロイシン-グリシン-セリン-アルギニン (tyrosine-isoleucine-glycine-serine-arginine, YIGSR), アルギニン-グリシン-アスパラギン酸-スレオニン (arginine-glycine-aspartic acid-threonine, RGDT) は Peninsula Laboratories 社 (Belmont, CA, USA) 製のものを用いた。イソロイシン-リジン-アラニン-バリン (isoleucine-lysine-valine-alanine-valine, IKVAV) はペプチド研究所(大阪)へ依頼し作製したものを使用した。

RGDS は Fn, YIGSR は Ln B1 鎖, IKVAV は Ln A 鎖, RGDV は Vn, RGDT は I 型コラーゲン  $\alpha 1$  鎖の細胞接着ドメイン由来のアミノ酸配列であり, RGD はインテグリンに対する多くのリガンドに共通した配列である。RGES は接着活性を持たないコントロールペプチドとして使用した。

#### III. 細胞浸潤能と浸潤阻害実験

各細胞株の浸潤能は Ln, N 型コラーゲン, Vn, ヘパラン硫酸プロテオグリカン, エンタクチンを含む人工再構成基底膜であるマトリゲル (Becton Dickinson Labware, Bedford, MA, USA) で上部チャンバーを被覆した 12 $\mu$ m 孔のトランスウェルチャンバー (Coster, Cambridge, MA, USA) を用いて計測した。即ち, 10% 胎児ウシ血清 (Gibco, Grand Island, NY, USA) を添加したイーグル MEM 培養液 (Flow Laboratories, Irvine, Scotland) でマトリゲルを 500 $\mu$ g/ml に調整し, 150 $\mu$ g のマトリゲルを無菌下 23°C で風乾後  $2 \times 10^5$  個の細胞を含んだ 400 $\mu$ l の上記培養液を上部チャンバーに, 下部チャンバーには 1.5ml の同液を加えた。37°C で 17 時間培養後, マトリゲルを通過して下部チャンバー内に浸潤した細胞を 5,000rpm で 4 分間遠心分離して採取した。採取した浸潤細胞数は下記の蛍光アッセイ<sup>15)</sup>にて測定した。浸潤阻害実験には 0.6 $\mu$ mol の細胞接着ペプチドを腫瘍細胞とともに上部チャンバーに入れて同様に浸潤細胞数を測定した。

#### IV. 浸潤細胞数の測定 (蛍光アッセイ)

採取した細胞を 0.01M リン酸緩衝液, pH7.4 で洗浄し, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2M ホウ酸, 1.2mM 4-メチルウンベリフェルルフォスフェイト (Sigma, St. Louis, MO, USA) を含む溶液に浮遊させ, 37°C で 3 時間培養した。細胞膜表面のアルカリホスファターゼの作用により生じた 4-メチルウンベリフェロンの蛍光強度を 850 形分光光度計 (日立, 東京) にて計測した。励起波長と蛍光波長はそれぞれ 345nm, 447nm とした。また細胞浸潤能測定において細胞接着ペプチドを添加しなかった群の浸潤細胞数を 100% 浸潤とし, 各ペプチド添加群の浸潤細胞数の割合を算定した。

#### V. 細胞接着および接着阻害実験

1 $\mu$ g の Ln, Vn, Fn, I 型および N 型コラーゲン, ウシ血清アルブミン (和光, 大阪) を 96 ウェルマイクロプレート (Falcon Products, Oxnard, CA, USA) に 4°C で一晩静置し被覆した。各基質については Vn と Fn はヒト血清から<sup>16)15)</sup>, I 型および N 型コラーゲンはヒト胎盤<sup>16)17)</sup> から, マウス Ln は Engelbreth-Holm-Swarm 腫瘍<sup>18)</sup> からそれぞれ精製したものを用いた。1 $\times 10^5$  個の細胞を 100 $\mu$ l の無血清培養液 SFM 101 (日本, 東京) 中に加え, 基質上で 37°C 2 時間培養した。培養後, 非接着細胞を洗浄して除き各プレートに 100 $\mu$ l の無血清培養液と 5mg/ml に調製した 3-(4, 5-メチルチアゾール-2-イル)-2, 5-ジフェニルテトラゾリウムブロマイド (Sigma) を 10 $\mu$ l 加え, 37°C で 4 時間培養した。培養後生じた色素産物を 100 $\mu$ l のジメチルサルフォキシドで可溶化し, 492nm の吸光度を EIA リーダー 2550 (Bio-Rad Lab., Richmond, CA, USA) で測定して接着細胞数を求めた。

接着阻害実験では 0.3 $\mu$ mol の RGDS あるいは RGDV ペプチドを混和した  $1 \times 10^5$  個の細胞を 23°C で 1 時間培養後, Vn あるいは Fn を被覆したマイクロプレート上で 2 時間培養し細胞接着実験と同様の操作を行った。

#### VI. 免疫組織化学的検索

無血清培養液 1ml 中に  $0.6 \times 10^5$  個の OSC-19 細胞および HSC-3 細胞を調整し, Fn および Vn をそれぞれ 10 $\mu$ g 被覆したスライドガラス上で 1 時間あるいは 24 時間培養した。培養後, 接着した細胞を 1% パラホルムアルデヒドで固定し, 0.1% トライトン X-100, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1mM CaCl<sub>2</sub> を含む 0.01M リン酸緩衝液で細胞を 3 分間 23°C で処理した。次にインテグリンあるいはビンキュリンに対する抗体を加えて 23°C で 1 時間, 更にフロロスセイン-イソチオシアン酸 (fluorescein-isothiocyanate, FITC) 標識 2 次抗体を加えて 23°C で 1 時間反応させた。抗- $\alpha 5 \beta 1$  インテグリン (fibronectin receptor, FnR) および抗 VnR ポリクロナール抗体は Dr. B. E. Vogel (La Jolla Cancer Research Foundation, La Jolla) より供与され, 抗ビンキュリン モノクロナール抗体は Bio Maker 社 (Rehovot, Israel) 製のものを使用した。抗 VnR, FnR, ビンキュリン抗体の希釈倍率はそれぞれ 100, 100, 20 とした。また FITC 標識抗ウサギ IgG と FITC 標識抗マウス IgG (Cappel, West Chester, PA, USA) はともに 20 倍で使用した。

#### VII. 電子顕微鏡学的観察

細胞浸潤能実験における培養 1, 4, 17 時間での細胞の形態を

arginine-glycine-aspartic acid-valine; RGES, arginine-glycine-glutamic acid-serine; Vn, vitronectin; VnR, vitronectin receptor; YIGSR, tyrosine-isoleucine-glycine-arginine; 電顕, 電子顕微鏡

電子顕微鏡 (電顕) にて観察した。細胞は2.5%グルタルアルデヒドで10分間4℃で固定した。また免疫電顕用に上記培養4時間目の OSC-19 細胞および HSC-3 細胞を1%パラホルムアルデヒドで5分間23℃で固定し、0.1%トライトン X-100, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1mM CaCl<sub>2</sub>を含む 0.01M リン酸緩衝液で3分間処理した。細胞を抗 FnR, 抗 VnR 抗体 (1000倍希釈) あるいは正常ウサギ血清 (Dako, Glostrup, Denmark) と4℃で2時間反応させ、続いて1/2カルノフスキー固定液で10分間固定した。2次抗体は15nm 金コロイド標識抗ウサギ抗体 (Janssen, Olsen, Belgium) を使用し4℃で2時間反応させた。透過型および免疫電顕用の試料は1% OsO<sub>4</sub>で後固定し Epon 812 で包埋した。超薄切片を作製後、5%酢酸ウラニールおよび6.5%クエン酸

鉛で染色し日立 H-500 電子顕微鏡 (日立), (75kV) で観察した。

Ⅶ. 免疫沈降法によるインテグリンの検出

細胞膜表面のタンパク質をラクトペルオキシダーゼ-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>法<sup>19)</sup>により<sup>125</sup>Iで標識した。即ち、5×10<sup>7</sup>個の HSC-3 細胞あるいは OSC-19 細胞に50μl のラクトペルオキシダーゼ (Calbiochem, La Jolla, CA, USA), 10μl の0.5M リン酸緩衝液, pH7.0, 37MBq の Na<sup>125</sup>I (Amersham, Buckinghamshire, England), 40μl の30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を加え30℃で8分間、さらに23℃で10分間培養した。培養後5ml の0.02% NaN<sub>3</sub>, 2mM KI を含む0.01M リン酸緩衝液で洗浄し、55.8g で5分間遠心分離し上清を除いた。標識された細胞を5ml の25mM Tris-HCl, pH7.4, 2% NP-40, 100mM NaCl, 1mM CaCl<sub>2</sub>で可溶化した。またプロ

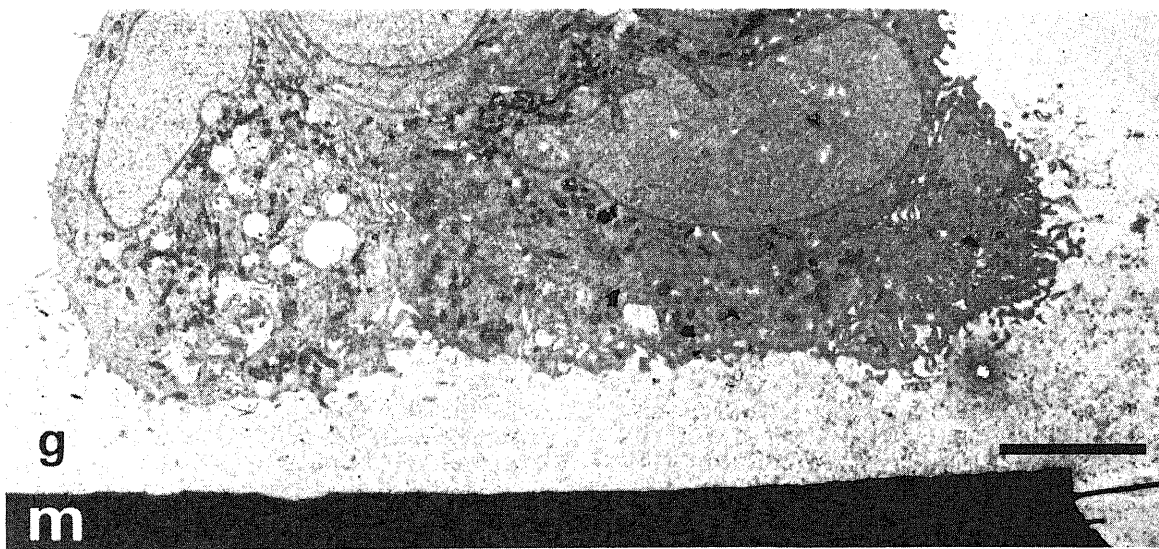


Fig. 1. Ultrastructure of OSC-19 cells in an in vitro assay at 4 hr. Cells in cluster in the upper chamber of transwell membrane (m) show ruffling cell surface with the extension of cell projections into matrigel (g), indicating the direction of invasion. Bar indicates 5 μm.

Table 1. Effects of synthetic peptides on carcinoma cell invasion

| Synthetic peptide <sup>a)</sup> | Invasion value (mean±SD, %) <sup>b)</sup> in carcinoma cell lines of |             |            |
|---------------------------------|--|-------------|------------|
|                                 | HSC-3  | OSC-19      | KB         |
| RGD                             | 89.3±10.8  | 90.2± 5.4   | 91.0±2.0   |
| RGDS                            | 83.5±12.6  | 77.7± 7.8** | 86.8±1.8   |
| YIGSR                           | 89.3± 8.0  | 67.3± 2.1** | 87.4±2.2   |
| IKVAV                           | 68.8± 8.6*   | 91.3± 5.6   | 97.0±7.0   |
| RGDV                            | 62.5±12.8**  | 72.7± 7.9** | 71.1±2.6** |
| RGDT                            | 77.2±12.6  | 88.0±12.2   | 88.2±1.5   |
| RGES                            | 87.6± 4.8  | 96.2± 8.3   | 87.2±2.3   |

A volume of 500 μl of cell suspension (2×10<sup>5</sup> cells) with 0.6 μmol of each synthetic peptide was incubated on matrigel in the upper chamber for 17 hr. After incubation cells penetrated into the lower chamber including cells adhering to the roof of the upper chamber were collected by trypsinization and counted by the fluorometric assay.

a) RGD, arginine-glycine-aspartic acid; RGDS, arginine-glycine-aspartic acid-serine; YIGSR, tyrosine-isoleucine-glycine-serine-aspartic acid; IKVAV, isoleucine-lysine-valine-alanine-valine; RGDV, arginine-glycine-aspartic acid-valine; RGDT, arginine-glycine-aspartic acid-threonine; RGES, arginine-glycine-glutamic acid-serine.

b) Ratio (%) of the number of the penetrated cells in the presence of each synthetic peptide to that in the absence of any synthetic peptides. Statistical analysis compared with percentage in the presence of RGES peptide is performed by one way analysis of variance followed by contrast statements; \*p<0.05, \*\*p<0.01.

テアーゼインヒビターとして 1mM ジイソプロピルフルオロスフェイト, 2mM フェニルメチルサルフォニルフルオリド, 10mM 6-アミノ-n-カプロイックアシド, 1 $\mu$ g/ml ロイペプチン, 1mM n-エチルマレイミド, 10 $\mu$ g/ml アプロチニンを加えた。試料を 4℃ で 20 分間 27,000g で遠心分離し, 上清を抗 FnR あるいは抗 VnR 抗体と氷温で 1 時間反応させた。その後試料をプロテイン G セファロース (Pharmacia-LKB, Uppsala, Sweden) に通し, プロテイン G と結合した免疫複合体を 0.1M



Fig. 2. Ultrastructure of OSC-19 cells in an invasion assay at 17 hr. Cells are migrating into the pore of the transwell membrane (m) with elongated cytoplasmic extension along the surface of the membrane. Bar indicates 2  $\mu$ m.

グリシン-HCl で流出させた。流出画分を非還元状態で 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, オートラジオグラフィーで分子量を確認した。

#### IX. 統計学的検討

細胞浸潤阻害実験における各ペプチドの浸潤抑制効果の差を Statistical Analysis System (金沢大学総合情報処理センター) を用いた一元配置分散分析およびシェッフェの多重比較法にて検討した。

### 成 績

#### I. 各癌細胞の浸潤能

初めに OSC-19 細胞を用いて細胞浸潤能実験モデルにおける浸潤細胞数の経時的変化 (4, 8, 16, 24, 48 時間) を検討したとこ

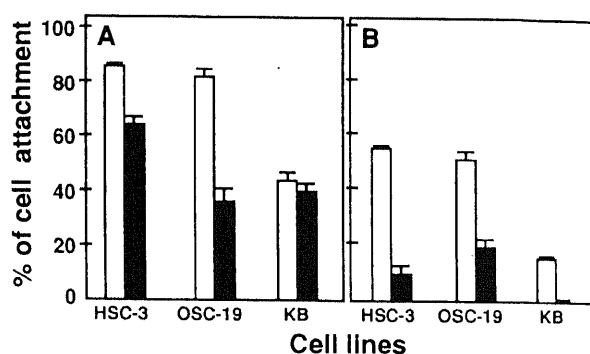


Fig. 3. Inhibitory effect of RGDS and RGDV peptides in an attachment assay on intact Fn (A) and Vn (B). Cells ( $1 \times 10^5$  cells/well) were pretreated with synthetic peptides (0.3  $\mu$ mol/well) for 60 min, incubated on each substrate for 2 hr. Number of attached cells without any peptide treatments are set to be 100%. The data shown in this figure are the mean values ( $\pm$ SD) of triplicate determinations. Open box, carcinoma cells cultured with RGDS peptide. Closed box, carcinoma cells cultured with RGDV peptide.

Table 2. Attachment assay of carcinoma cell lines on intact extracellular matrix proteins

| Substrate <sup>a)</sup> | Attachment value (mean $\pm$ SD, %) <sup>b)</sup><br>in carcinoma cell lines of |                 |                |
|-------------------------|---|-----------------|----------------|
|                         | HSC-3   | OSC-19          | KB             |
| Fn                      | 16.2 $\pm$ 6.6  | 18.8 $\pm$ 16.5 | 18.0 $\pm$ 9.8 |
| Ln                      | 28.8 $\pm$ 4.3  | 23.0 $\pm$ 12.9 | 3.1 $\pm$ 1.2  |
| Vn                      | 27.8 $\pm$ 4.0  | 37.7 $\pm$ 6.0  | 14.3 $\pm$ 0.6 |
| Collagen type I         | 27.8 $\pm$ 2.4  | 25.1 $\pm$ 11.1 | 4.1 $\pm$ 2.0  |
| Collagen type IV        | 27.9 $\pm$ 2.5  | 23.2 $\pm$ 11.5 | 8.7 $\pm$ 1.0  |
| BSA                     | 9.3 $\pm$ 16.1  | 0.1 $\pm$ 0.2   | 0.0 $\pm$ 0.0  |

Cell suspension ( $1 \times 10^5$  cells/ 100  $\mu$ l of serum-free medium) was incubated on the microplate coated with each purified intact protein. After removing of non-adherent cells, the resting adherent cells was counted.

a) Fn, fibronectin; Ln, laminin; Vn, vitronectin; BSA, bovine serum albumin.

b) The percentage of cells adhering on substrate-coated plates after washing out of non-adherent cells.

る、16時間までは急速に増加し、その後24時間まではゆっくりと増加を示した。しかし24時間から48時間の間に再び急速な増加が見られた。これは浸潤細胞の下部チャンパー内での増殖によると考えられた。以上の結果をふまえて本実験の培養時間を17時間と設定した。また、インテグリンの発現は細胞密度により異なることが知られている<sup>20)</sup>ため、次に浸潤能の測定を行う前の培養シャーレ上での細胞密度の違いによる浸潤細胞数の差をOSC-19細胞を用いて検討した。低密度 ( $0.6 \times 10^4 \pm 0.3 \times 10^4$  個/cm<sup>2</sup>) に調整した細胞は最も高い浸潤能 ( $10,718 \pm 2,053$  個) を示した。中等密度 ( $4.5 \times 10^4 \pm 0.7 \times 10^4$  個/cm<sup>2</sup>) の細胞は  $9,350 \pm 2,748$  個、高密度 ( $7.5 \times 10^4 \pm 1.0 \times 10^4$  個/cm<sup>2</sup>) の細胞は  $6,383 \pm 2,442$  個それぞれ浸潤した。そこで本研究においては浸潤能の最も高かった低密度培養下で調整した細胞を用いることとした。また、浸潤細胞数の平均値±SDは細胞株間で異なっていた。即ち、HSC-3細胞が最も高浸潤性 ( $40,833 \pm 10,544$  個) であり、次いでOSC-19細胞 ( $10,718 \pm 2,053$  個)、KB細胞 ( $7,760 \pm 2,963$  個) の順であった。

II. 浸潤時の癌細胞の形態学的変化

浸潤能実験におけるOSC-19細胞およびHSC-3細胞の培養後1, 4, 17時間目の形態変化を電顕的に観察した。培養1時間目ではHSC-3細胞、OSC-19細胞の多くが細胞周囲に無数の短い細胞質突起を放射状に伸ばしていた。4時間目にはOSC-19細胞はしばしば互いに接触し、数個の細胞よりなる集団を形成しながらゲル中に浸潤していた。浸潤先端部の細胞膜は凹凸が激しく特徴的な波打った細胞質突起をマトリゲル中に伸ばしていた(図1)。HSC-3はOSC-19と同様の像を示したが、OSC-19細胞に比べ細胞集団は少なく孤立性にマトリゲル中および12μmの孔に浸潤していた。17時間目にはマトリゲルはほとんど消失しており、多くの細胞が上部チャンパーの膜に接

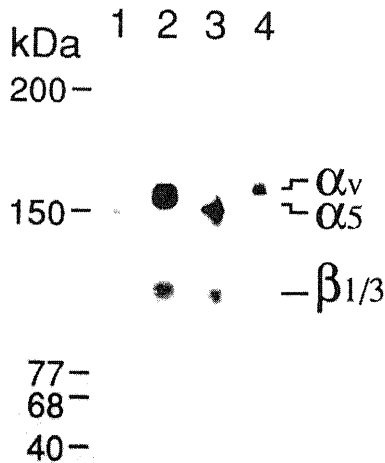


Fig. 4. Immunoprecipitation analysis of integrin subunits expressed on squamous carcinoma cell lines. Lysates of <sup>125</sup>I-labeled HSC-3 (lanes 1 and 2) and OSC-19 cells (lanes 3 and 4) are immunoprecipitated with anti-α5β1 integrin (lanes 1 and 3) and -αvβ3 integrin polyclonal antibody (lanes 2 and 4). Samples are analyzed on a SDS-PAGE (7.5% acrylamide) under non-reducing condition.

着・伸展しながら孔の中へ侵入していた(図2)。

III. 細胞接着ペプチドによる浸潤の阻害

今回用いたペプチドは表1に示すように様々な浸潤抑制効果を発揮した。接着ペプチド非添加群の浸潤細胞数を100%とし、各ペプチド添加群の浸潤細胞数の割合をRGESペプチド添加群の割合と比較した場合Fn由来のRGDSはOSC-19細胞以外では抑制効果は低く、Ln由来のYIGSRはOSC-19細胞を、またIKVAVはHSC-3細胞のみを有意に抑制した。Vn由来のRGDVペプチドのみが全ての細胞の浸潤を共通して抑制した。I型コラーゲン由来のRGDTは抑制効果を示さず、また、単独では機能せずレセプターの特異性に必要な情報を持たないと考えられているRGDペプチドも有意差がみられなかった。

IV. ECM構成タンパク質への接着

Fn, Ln, Vn, I型およびIV型コラーゲンへの細胞の接着能は表2に示すように、KB細胞を除いてHSC-3細胞とOSC-19細胞がこれらのECMタンパク質とよく接着した。細胞浸潤阻害

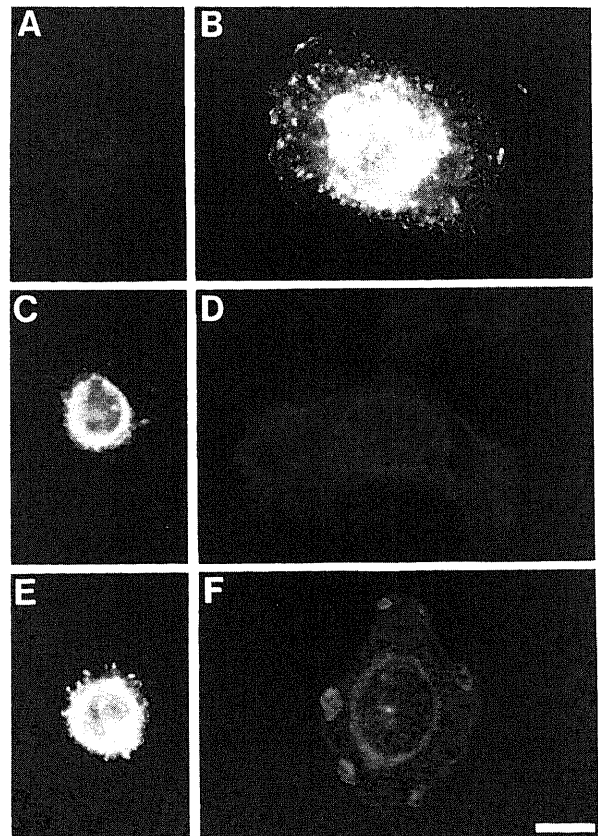


Fig. 5. Immunofluorescent microscopic demonstration of integrin α5β1 or αvβ3 of HSC-3 cells of Fn or Vn substrate using polyclonal antibodies. Cells were cultured for 1 hr (A, C, and E) and 24 hr (B, D, and F) in serum-free condition. α5β1 integrin is not detected on Fn substrate at 1 hr (A), contrasted to fibrillar and punctate organization of α5β1 integrin on well-spreading cells cultivated on Fn substrate for 24 hr (B). αvβ3 integrin appears to show a dot-like staining pattern at peripheral surfaces of non-spreading cells on both Fn (C) and Vn (E) at 1 hr. At 24 hr αvβ3 integrin is not detected in the spreading cell on Fn (D), whereas on Vn αvβ3 integrin shows concentration to huge rivet-like pattern of spreading cells (F). Bar indicates 25 μm.

実験において異なる Ln 由来のペプチドで抑制された HSC-3 細胞と OSC-19 細胞はともに Ln タンパク質へはよく接着した。KB 細胞は接着能の低い細胞であったが、ECM タンパク質のうち Fn へは比較的接着した。HSC-3 細胞と OSC-19 細胞はともに Vn にもよく接着した。浸潤能阻害実験で Vn 由来の細胞接着ペプチド (RGDV) が有効であったので、このペプチドが細胞接着をどの程度阻害するのかを検査するため、接着阻害実験を行った。その結果 RGDV の方が Vn と Fn の両基質に対する接着を RGDS よりも効果的に抑制した (図 3)。

#### V. 基質上でのインテグリンの発現

HSC-3 細胞および OSC-19 細胞の VnR と FnR の発現と局在を Vn および Fn の基質を用いて観察した。Fig. 4 に示すように両細胞とも VnR および FnR を細胞表面に発現していた

が、VnR は HSC-3 細胞で FnR は OSC-19 細胞でより強く発現していた。蛍光抗体法でみると Fn を基質とした HSC-3 細胞は培養 24 時間目の伸展した細胞で不連続な線状または小斑状に FnR が陽性であったが、培養 1 時間目の非伸展細胞では FnR は陰性であった (図 5 A および B)。Fn 基質上の OSC-19 細胞では FnR は伸展細胞では線状および小斑状にみられ、非伸展細胞では線状に染色された。Fn 基質上での VnR は両細胞とも非伸展細胞の縁にドット状に染色されたが、伸展細胞では認められなかった (図 5 C および D)。一方、HSC-3 を Vn の基質で培養した場合には VnR は非伸展細胞の縁にドット状にみられ、伸展細胞ではリベット状に陽性となった (図 5 E および F)。Vn 基質上での FnR は HSC-3 細胞においては非進展および伸展細胞ともに陰性であったが、OSC-19 細胞では伸展細胞

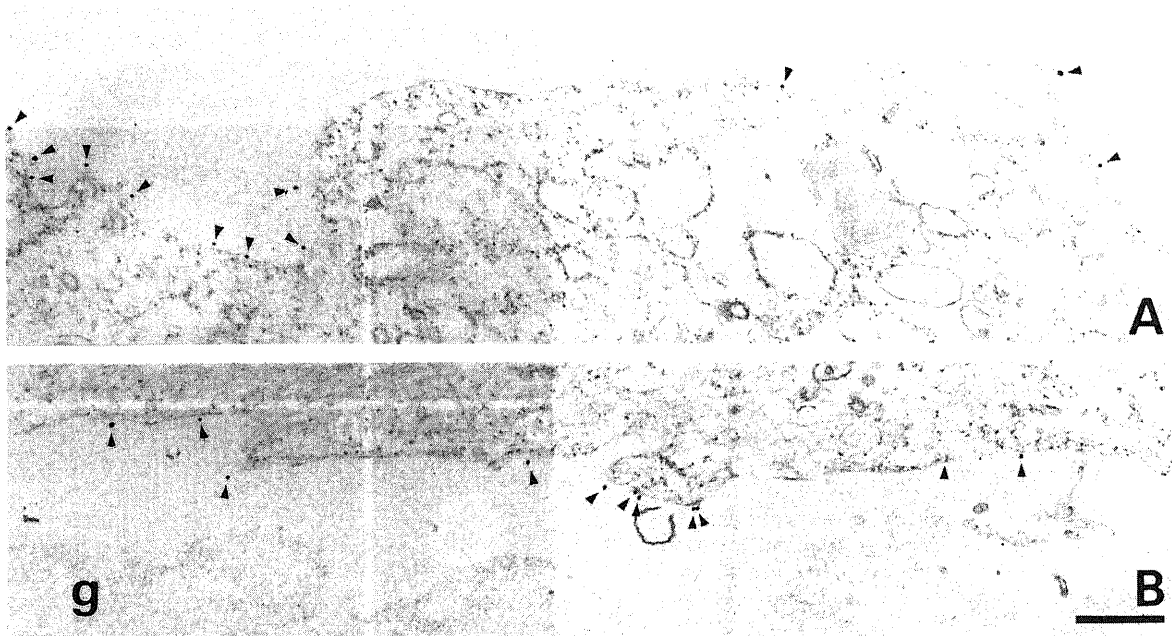


Fig. 6. Ultrastructural localization of  $\alpha 5 \beta 1$  integrin on OSC-19 cells in an invasion assay at 4 hr.  $\alpha 5 \beta 1$  integrin is diffusely expressed on their cell surface regardless of invasive direction in matrigel (g). Arrowheads show the distributions of  $\alpha 5 \beta 1$  labeled with 15 nm gold-conjugated antibodies, B represents cell process towards invasion and A represents the opposite. Bar indicates 500 nm.

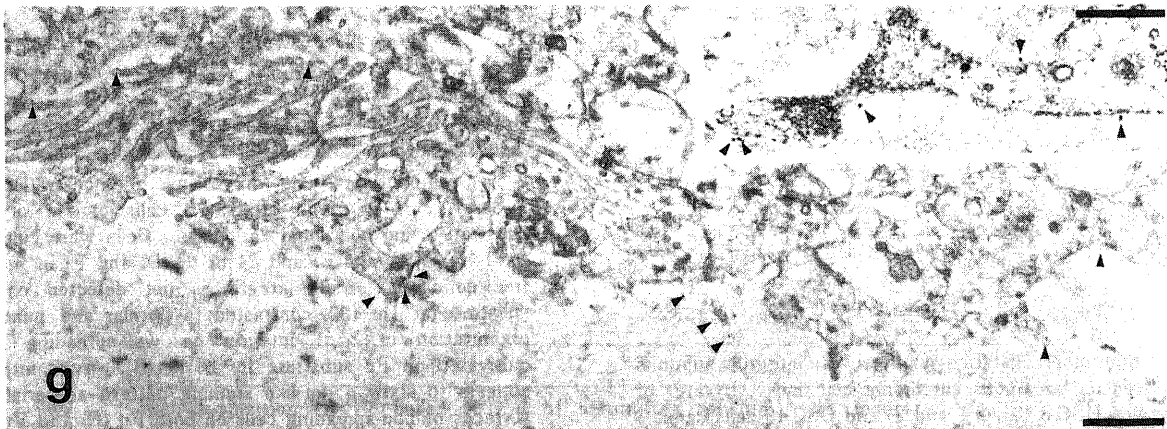


Fig. 7. Distribution of  $\alpha v \beta 3$  integrin on OSC-19 cells in an invasion assay at 4 hr. Colloid gold particles (15 nm in size) are localized at the invasion active site on cell projections extending into the gel (g). The particles are rarely seen at the free surface of cells. Bar indicates 1  $\mu$ m. Inset, high power view of the cell projections labeled with the gold particles. Bar indicates 500 nm.

の辺縁に小斑状に陽性となった。これは OSC-19 細胞が自ら分泌した Fn に対して接着したためと考えられる。ビンキュリンは伸展細胞では HSC-3 細胞、OSC-19 細胞共に Fn および Vn 基質上で細胞辺縁に小斑状に陽性であったが、非伸展細胞では陰性であった。

#### VI. 浸潤細胞におけるインテグリンの局在

HSC-3 細胞および OSC-19 細胞がマトリゲル中に浸潤している際の VnR と FnR の電顕的局在を検討した。FnR は細胞膜にび漫性にみられ明らかな偏在は示さなかった (図 6)。しかし VnR はマトリゲルに接する細胞膜、とくにマトリゲル中に伸びた細胞質突起に沿って発現していた (図 7)。

### 考 察

インテグリンは生理的条件下で細胞-基質の相互作用に重要な役割を果たしているのみならず、細胞の癌細胞への形質転換に伴いある種のインテグリンの発現が増幅され、癌細胞浸潤および転移を引き起こす要素になるとされている<sup>3)</sup>。本研究は、3種類の口腔扁平上皮癌細胞株におけるインテグリンの発現と再構成基底膜であるマトリゲルへの浸潤の関連を検討したものである。今回用いたトランスウェルチャンバーとマトリゲルによる浸潤モデルは癌細胞が備える浸潤能をよく再現していることが、近年多くの研究者により報告されている<sup>7,23,24)</sup>。今回行った浸潤能の測定において低分化型扁平上皮癌細胞である HSC-3 細胞は最も浸潤性が高く、これに高分化型の OSC-19 細胞が継ぎ KB 細胞は浸潤能が最も低かった。細胞接着能についても HSC-3 細胞と OSC-19 細胞は ECM タンパク質によく接着したが、KB 細胞はこれらタンパク質に対する接着性が低かった。既に Kawahara ら<sup>25)</sup>が報告したように OSC-19 細胞はヌードマウスに移植された場合皮下組織中へ浸潤し、またコラーゲンゲル中へも浸潤する能力を持つ細胞である。しかし、KB 細胞はヌードマウスでは膨張性に発育し、コラーゲンゲル中へは浸潤せず、浸潤能力が極めて低いことが明らかとなっている。今回の結果もこれとよく一致していた。従って、これらの癌細胞の浸潤性は ECM タンパク質に対する接着性ととくにそのレセプターであるインテグリンによる細胞-基質の接着性に重大な関連があると考えられる。

今回の細胞浸潤能およびその阻害実験において最も注目されることは、Vn 由来の RGDV ペプチドのみが全ての細胞株のマトリゲルへの浸潤を共通して有意に抑制したことである。一般に RGD 配列を含む様々なオリゴペプチドは細胞-基質の接着に異なった拮抗作用を持つことが知られている<sup>26)-29)</sup>。たとえば Hirano ら<sup>26)</sup>はこれらのペプチドの接着阻害活性は RGD 配列のアスパラギン酸に続くアミノ酸の種類に依存すると報告している。今回用いた RGDV, RGDS, RGDT ペプチドの中で RGDV が最も抑制効果が高く、バリンの存在が口腔扁平上皮癌細胞の発現するインテグリンと細胞接着ペプチドの親和性を高め、競合的に RGDV 細胞接着ドメインの ECM との接着を阻害しているものと推定される。このことは Fn および Vn への接着がともに RGDS よりも RGDV ペプチドで抑制されたことから裏付けられる。KB 細胞の接着阻害実験では両ペプチドにより著明に阻害されたように見えるが、実際には KB 細胞の ECM タンパク質への接着能が極めて低いために洗浄の過程でほとんど脱落したためであった。従って、RGDV ペプチドに対する細胞側の主なインテグリンである  $\alpha$ V インテグリンが浸潤

と密接に関係しているように見える。事実、高浸潤性の HSC-3 細胞が中浸潤性の OSC-19 細胞に比べ  $\alpha$ V インテグリンを強く発現していた。 $\alpha$ V インテグリンファミリーは  $\alpha$ V $\beta$ <sub>3</sub>,  $\alpha$ V $\beta$ <sub>1</sub>,  $\alpha$ V $\beta$ <sub>5</sub>,  $\alpha$ V $\beta$ <sub>6</sub> などにより成るが、このうち VnR である  $\alpha$ V $\beta$ <sub>3</sub> は RGD 配列を持つ多くのタンパク質、すなわち Vn, Fn, Ln, フィブリノーゲン, von Willebrand 因子, トロンボスポンジン, オステオポンチンに接着するインテグリンである<sup>8)</sup>。おそらく広範な基質特異性を持つ VnR の発現は癌細胞浸潤に好都合に働くのであろう。VnR の発現がメラノーマ細胞の浸潤性に大きく関連することは、既に報告されている。例えば  $\alpha$ V サブユニットの cDNA をメラノーマ細胞にトランスフェクトすると悪性度が著しく増すこと<sup>30)</sup>, VnR の発現は腫瘍の進展<sup>31)</sup>および細胞の遊走能の促進<sup>32)</sup>と密接に関わっていることなどである。本研究では HSC-3 細胞および OSC-19 細胞の細胞表面に  $\alpha$ V サブユニットが発現していることが免疫沈降法によって証明された。とくに最も高い浸潤性を持つ HSC-3 細胞では VnR が著明に発現され、中等度の浸潤性であった OSC-19 細胞は  $\alpha$ V サブユニットとともに FnR の発現が顕著であった。一般に FnR の発現は悪性あるいはトランスフォームした細胞の腫瘍性と逆相関する傾向が知られている<sup>33,34)</sup>。今回、VnR と FnR に注目して扁平上皮癌細胞の接着性、浸潤性について検討を加えたが、腫瘍細胞は浸潤時に複数のインテグリンを重複して発現している可能性が高い。HSC-3 細胞と OSC-19 細胞の浸潤は RGDV 以外の YIGSR, IKVAV, RGDS ペプチドでも阻害されている。YIGSR, IKVAV は Ln の細胞接着ドメイン, RGDS は Fn の細胞接着ドメインであり、これらと接着するインテグリンの総和が浸潤の側面を反映しているものであろう。この中で VnR が最も関連の深いインテグリンと考えられる。

インテグリンの細胞表面での局在は一般に細胞の形質により変化すると考えられている。例えば FnR はフォーカルコンタクトを形成する細胞-Fn 接着部位に集合し<sup>35)</sup>、悪性細胞においては集合性を失いしばしば細胞表面にび漫性に発現する<sup>9)</sup>。また腫瘍細胞でのインテグリンの局在は浸潤性によっても異なることが考えられる。そこで蛍光抗体法および免疫電顕を用いて FnR と VnR の HSC-3 細胞および OSC-19 細胞での局在を検討した。その結果、VnR は Fn を基質として 24 時間培養した場合を除き、HSC-3 細胞および OSC-19 細胞の細胞辺縁に発現されることが確認された。しかし、FnR はそのリガンドである Fn 基質に対しても HSC-3 細胞では培養 1 時間目の非伸展細胞に発現しなかった。従って、VnR が Vn と Fn の双方に対するレセプターとして発現・機能していると考えられる。免疫電顕においては FnR は腫瘍細胞膜にび漫性に発現しているのに対し、VnR の発現は浸潤方向の細胞膜に偏在する傾向があった。とくに癌細胞の浸潤先端部の細胞質突起<sup>36)</sup>に類似している波状の構造に抗 VnR 抗体に反応した金コロイドをみることができた。今回の浸潤能実験においては機能的レセプターである VnR とマトリゲルに含まれている Vn との接着が浸潤に貢献したものと推定される。このことが RGDV ペプチドが癌細胞のマトリゲルへの浸潤を共通して抑制した最大の原因であろう。機能的レセプターが明らかな局在を持つことは VnR がラット破骨細胞のポドゾームと骨との接着部位間に偏在するという報告<sup>37,38)</sup>によっても裏付けられる。以上今回の研究から、低分化で高浸潤性の口腔扁平上皮癌細胞は VnR の発現の上昇と



FnR 発現の低下を特徴としており、とくに VnR が機能的レセプターとして浸潤先端部に発現していることが示唆された。

### 結 論

3種類の口腔扁平上皮癌由来の細胞株 (HSC-3, OSC-19, KB) の浸潤性とインテグリンの関係を検討し以下の結論を得た。

1. マトリゲルを通過する腫瘍細胞の浸潤能は HSC-3 > OSC-19 > KB 細胞の順であり、この浸潤は Vn 由来の RGDV ペプチドで抑制された。

2. HSC-3 細胞は Vn レセプターである VnR を多量に発現し、OSC-19 細胞は Fn レセプターである FnR を著明に発現していた。

3. 免疫組織化学的に腫瘍細胞の VnR は Vn および Fn の両基質に対するレセプターとして発現されることが確認された。

4. マトリゲル中へ浸潤している腫瘍細胞では VnR は浸潤先端部の細胞膜に局在傾向を示していたが、FnR は腫瘍細胞膜にび漫性に発現していた。

以上より、口腔扁平上皮癌細胞の浸潤能は多くの基質に接着しうる VnR の発現とくに浸潤先端部での発現と関連していることが強く示唆された。従って、将来的には細胞接着ペプチドによって腫瘍細胞の浸潤を抑制しようという可能性が考えられた。

### 謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導と御校閲を賜りました金沢大学歯科・口腔外科学講座 山本悦秀教授ならびに金沢大学第一病理学講座 中西功夫教授に深く感謝の意を表します。また御指導・御助言を戴きました金沢大学第一病理学講座 河原 栄講師に厚く御礼申し上げます。また OSC-19 細胞を御提供いただきました札幌医科大学口腔外科学講座 小浜源都教授ならびに横井俊一博士、抗インテグリン抗体を供与して下さいました Dr. Bruce E. Vogel (La Jolla Cancer Foundation, USA) に感謝致します。最後に本研究を行うにあたり御協力頂きました歯科・口腔外科学講座ならびに第一病理学講座の諸先生、技術員各位に感謝致します。尚、本論文の要旨の一部は第25回日本結合組織学会総会(1993年、大阪)において発表した。

### 文 献

- 1) Liotta, L. A., Rao, C. N. & Barsky, S. H.: Tumor invasion and the extracellular matrix. *Lab. Invest.*, **49**, 636-649 (1983).
- 2) Hynes, R. O.: Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*, **69**, 11-25 (1992).
- 3) Albelda, S. M.: Biology of disease: role of integrin and other cell adhesion molecules in tumor progression and metastasis. *Lab. Invest.*, **68**, 4-17 (1993).
- 4) Poste, G., Doll, J., Hart, I. R. & Fidler I. J.: In vitro selection of murine B16 melanoma variants with enhanced tissue-invasion properties. *Cancer Res.*, **40**, 1636-1644 (1980).
- 5) Liotta, L. A., Lee, W. C. & Morakis, D. J.: New methods for preparing large surface of intact human basement membrane for tumor invasion studies. *Cancer Lett.*, **11**, 141-147 (1980).
- 6) Mignatti, P., Robbins, E. & Rifkin, D. B.: Tumor

invasion through the human amniotic membrane: requirement for a proteinase cascade. *Cell*, **47**, 487-498 (1986).

7) Repesh, L. A.: A new in vitro assay for quantitating tumor cell invasion. *Inv. Meta.*, **9**, 192-208 (1989).

8) Cheresh, D. A.: Structure, function and biological properties of integrin  $\alpha v \beta 3$  on human melanoma cells. *Cancer Meta. Rev.*, **10**, 3-10 (1991).

9) Humphries, M. J., Mould, A. P. & Yamada, K. M.: Matrix Receptors in Cell Migration. *In* J. A. McDonald & R. P. Mecham (eds.), *Receptors for Extracellular Matrix*, 1st ed., P. 195-253 Academic Press, San Diego, 1991.

10) Yamamoto, E., Kohama, G., Sunakawa, H., Iwai M. & Hiratsuka, H.: Mode of invasion, Bleomycin sensitivity, and clinical course in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Cancer*, **51**, 124-129 (1983).

11) Yamamoto, E., Miyakawa, A. & Odajima, T.: Mode of invasion and lymph node metastasis in squamous cell carcinoma of the oral cavity, *Head Neck Surg.*, **47**, 938-947 (1984).

12) Yokoi, T., Homma, H. & Odajima, T.: Establishment and characterization of OSC-19 cell line in serum-and protein-free culture. *Tumor Res.*, **24**, 1-17 (1988).

13) Momose, F., Araida, T., Negishi, A., Ichijo, H., Shioda, S. & Sakai, S.: Variant sublines with different metastatic potentials selected in nude mice from human oral squamous cell carcinomas. *J. Oral Pathol. Med.*, **18**, 391-395 (1989).

14) Eagle, H.: Propagation in a fluid medium of a human epidermoid carcinoma, strain KB. *Pro. Sco. Exp. Biol. Med.*, **89**, 362-364 (1955).

15) Huschtscha, L. I., Lucibello, F. & Bodmer, W.: A rapid micro method for counting cells "in situ" using a fluorogenic alkaline phosphatase enzyme assay. *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, **25**, 105-107 (1989).

16) Yatohgo, T., Izumi, M., Kashiwagi, H. & Hayashi, M.: Novel purification of vitronectin from human plasma by heparin affinity chromatography. *Cell Struct. Funct.*, **13**, 281-292 (1988).

17) Kawahara, E., Schiroo, M., Nakanishi, I. & Migita, S.: The role of fibronectin in the development of experimental amyloidosis. *Am. J. Pathol.*, **134**, 1305-1314 (1989).

18) Minamoto, T., Ooi, A., Okada, Y., Mai, M., Nagai, Y. & Nakanishi, I.: Desmoplastic reaction of gastric carcinoma: a light-and electron-microscopic immunohistochemical analysis using collagen type-specific antibodies. *Hum. Pathol.*, **19**, 815-821 (1988).

19) Ueda, Y. & Nakanishi, I.: Immunohistochemical and biochemical studies on the collagenous proteins of human osteosarcomas. *Virchow Arch. [B] Cell Pathol.*, **58**, 79-88 (1989).

20) Kleinman, H. K., McGarvey, M. L., Liotta, L. A., Robey, P. G., Tryggvason, K. & Martin, G. R.: Isolation and characterization of type IV procollagen, laminin, and heparan sulfate proteoglycan from the EHS sarcoma.

- Biochemistry, 21, 6188-6193 (1982).
- 21) Sonnenberg, A., Jannsen, H., Gogervorst, F., Calafat, J. & Hilgers, J.: A complex of platelet glycoprotein Ic and IIa identified by a rat monoclonal antibody. *J. Biol. Chem.*, 262, 10376-10383 (1987).
  - 22) Larjava, H., Pletonen, J., Akiyama, S. K., Yamada, S. S., Gralnick, H. R., Uitto, J. & Yamada, K. M.: Novel function for  $\beta 1$  integrin in keratinocyte cell-cell interaction. *J. Cell Biol.*, 110, 803-815 (1990).
  - 23) Albin, A., Iwamoto, Y., Kleinman, H. K., Martin, G. R., Anderson, S. A., Kozlowsky, J. M. & McEwan, R. N.: A rapid in vitro assay for quantitating the invasive potential of tumor cells. *Cancer Res.*, 47, 3239-3245 (1987).
  - 24) 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).
  - 25) Kawahara, E., Okada, Y., Nakanishi, I., Iwata, K., Kojima, S., Kumagai, S. & Yamamoto, E.: The expression of invasive behavior of differentiated squamous carcinoma cell line evaluated by an in vitro invasion model. *Jap. J. Cancer Res.*, 84, 409-418 (1993).
  - 26) Kouns, W. C., Hadvary, P., Haering, P. & Steiner, B.: Conformational modulation of purified glycoprotein (GP) IIb-IIIa allows proteolytic generation of active fragments from either active or inactive GP IIb-IIIa. *J. Biol. Chem.*, 267, 18844-18851 (1992).
  - 27) Kouns, W. C., Kirchhofer, D., Hadvary, P., Edenhofer, A., Weller, T., Pfenninger, G., Baumgartner, H. R., Jennings, L. K. & Steiner, B.: Reversible conformational changes induced in glycoprotein IIb-IIIa by a potent and selective peptidomimetic inhibitor. *Blood*, 80, 2539-2547 (1992).
  - 28) Hirano, Y., Kando, Y., Hayashi, T., Goto, K. & Nakajima, A.: Synthesis and cell attachment activity of bioactive oligopeptides: RGD, RGDS, RGDV, and RGDT. *J. Biomed. Mater. Res.*, 25, 1523-1534 (1991).
  - 29) Chen, C. S. & Hawiger, J.: Reactivity of synthetic peptide analogs of adhesive proteins in regard to the interaction of human endothelial cells with extracellular matrix. *Blood*, 77, 2200-2206 (1991).
  - 30) Felding-Habermann, B., Mueller, B. M., LC romer-dahl, C. A. & Cheresh, D. A.: Involvement of integrin  $\alpha v$  gene expression in human melanoma tumorigenicity. *J. Clin. Invest.*, 89, 2018-2022 (1992).
  - 31) Nip, J., Shibata, H., Loskutoff, D. J., Cheresh, D. A. & Brodt, P.: Human melanoma cells derived from lymphatic metastases use integrin  $\alpha v \beta 3$  to adhere to lymph node vitronectin. *J. Clin. Invest.*, 90, 1406-1413 (1992).
  - 32) Leavesley, D. I., Ferguson, G. D., Wayner, E. A. & Cheresh, D. A.: Requirement of the integrin  $\beta 3$  subunit for carcinoma cell spreading or migration of vitronectin and fibrinogen. *J. Cell Biol.*, 117, 1101-1107 (1992).
  - 33) Plantefaber, L. C. & Hynes, R. O.: Changes in integrin receptors on oncogenically transformed cells. *Cell*, 56, 281-290 (1989).
  - 34) Giancotti, F. G. & Ruoslahti, E.: Elevated levels of the  $\alpha 5 \beta 1$  fibronectin receptor suppress the transformed phenotype of Chinese hamster ovary cells. *Cell*, 60, 849-859 (1990).
  - 35) Dejana, E., Colella, S., Conforti, G., Abbadini, M., Gaboli, M. & Marchisio, P. C.: Fibronectin and Vitronectin regulate the organization of their respective Arg-Gly-Asp adhesion receptors in cultured human endothelial cells. *J. Cell Biol.*, 107, 1215-1223 (1988).
  - 36) Kramer, R. H., Bersch, K. G. & Wong, J.: Invasion of reconstituted basement membrane matrix by metastatic human tumor cells. *Cancer Res.*, 46, 1980-1989 (1986).
  - 37) Lakkakorpi, P. T., Horton, M. A., Helfrich, M. H., Karhukorpi, E. K. & Vaanaen, H. K.: Vitronectin receptor has a role in bone resorption but does not mediate tight sealing zone attachment of osteoclasts to bone surface. *J. Cell Biol.*, 115, 1179-1186 (1991).
  - 38) Lakkakorpi, P. T., Helfrich, M. H., Horton, M. A. & Vaanaen, H. K.: Spatial organization of microfilaments and vitronectin receptor,  $\alpha v \beta 3$ , in osteoclasts. *J. Cell Sci.*, 104, 663-670 (1993).

**Experimental Study on Functional Expression of Vitronectin Receptor in Cell Invasion of Oral Squamous Carcinoma Cells** Kazushi Imai, Department of Oral Surgery, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med Soc., 102, 635—644 (1993)

**Key words** vitronectin receptor, squamous cell carcinoma, invasion, integrin

#### Abstract

We studied invasion-related adhesion events in vitro using three squamous carcinoma cell lines (HSC-3, poorly-differentiated type; OSC-19, well-differentiated type; and KB cells, undifferentiated type). An in vitro invasion assay by transwell chamber revealed that HSC-3 cells were most invasive, OSC-19 cells moderately invasive and KB cells less invasive, and that there was unambiguous inhibition of cell invasion into the lower chamber through basement membrane matrices (matrigel) by synthetic peptides, i.e., IKVAV and RGDV for HSC-3; RGDS, YIGSR and RGDV for OSC-19; RGDV for KB cells. Both HSC-3 and OSC-19 cells adhered well to intact proteins including fibronectin, laminin, vitronectin, collagen type I and IV, and KB cells weakly adhered only to fibronectin and vitronectin. Pretreatment with RGDV peptide in an attachment assay reduced the binding ability of these cells to fibronectin and vitronectin. Immunofluorescent and electron microscopic examinations on HSC-3 and OSC-19 cells showed that  $\alpha v \beta 3$  integrin was positive in attachment sites to vitronectin and at invasion active sites of their cell processes. Immunoprecipitation analysis of integrin subunits showed that both cells expressed  $\alpha v$ ,  $\beta 3$ ,  $\alpha 5$  or  $\beta 1$  subunit, and intensely  $\alpha v$  for HSC-3 and  $\alpha 5$  for OSC-19 cells.  $\alpha 5 \beta 1$  integrin was diffusely expressed on whole cell surfaces of HSC-3 and OSC-19 cells during invasion through matrigel, and detected constantly in OSC-19 cells and appeared later in HSC-3 cells cultured on fibronectin. Therefore, it is suggested that  $\alpha v \beta 3$  integrin was expressed as a functional receptor for extracellular matrix at a site of the invasion front of squamous cell carcinoma of the oral cavity.