

原

著

## 有棘細胞癌細胞の移動能に対する epidermal growth factor の影響

新潟大学医学部皮膚科学教室（主任：伊藤雅章教授）

山 本 洋 子

Effect of Epidermal Growth Factor on Migration  
Activity of Squamous Cell Carcinoma Cell.

Yoko YAMAMOTO

*Department of Dermatology,  
Niigata University School of Medicine  
(Director: Prof. Masaaki ITO)*

To investigate the effect of epidermal growth factor (EGF) on cell migration of squamous cell carcinoma (SCC) cells, migration, adhesion and spreading activity, organization of focal adhesion and actin stress fiber, integrin expression, and tyrosin phosphorylation of focal adhesion kinase (FAK) of a cell line were examined on type IV collagen in the presence of various concentrations of EGF. The cell line that was separated from an established cell line of SCC in uterine cervix, CaSki, expresses  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 6$ ,  $\beta 1$  and  $\beta 4$  integrins, and was used in this study. Wound assay demonstrated that EGF increased the migration activity at 1 and 10 ng/ml, whereas it completely blocked the migration at 100 ng/ml. Blocking antibodies against  $\alpha 3$ ,  $\alpha 6$  and  $\beta 1$  integrins inhibited the migration in the absence of EGF, whereas antibodies against not only these integrins but also  $\alpha 2$  inhibited it in the presence of 10 ng/ml EGF. Flowcytometry showed that EGF increased the expression of  $\alpha 2$  and  $\alpha 6$  integrins in a dose dependent manner. Attachment assay revealed that EGF decreased the adhesion activity to type IV collagen in a dose dependent manner. Morphological examinations showed that EGF inhibited the spreading at 10 and 100 ng/ml, and that the growth factor did not alter the organization of focal adhesions and actin stress fibers at 1 and

Reprint requests to: Yoko YAMAMOTO,  
Department of Dermatology,  
Niigata University School of Medicine,  
Asahimachi-dori 1,  
Niigata City, 951-8510, Japan

別刷請求先：〒951-8510 新潟市旭町通1番町  
新潟大学医学部皮膚科学教室 山本 洋子

10 ng/ml, whereas it increased it at 100 ng/ml. Immunoprecipitation and immunoblot assays showed that EGF did not alter tyrosin phosphorylation level of FAK at any concentrations examined. These findings suggest that the EGF-mediated promotion of the migration at 1 and 10 ng/ml is related with the modulation of  $\alpha 2$  integrin function and expression, and the inhibition of the adhesion, whereas EGF-mediated inhibition of the migration is related with the modulation of organization of actin stress fiber and focal adhesion, and that alteration in a tyrosin phosphorylation level of FAK is not always accompanied with an increase in the migration activity.

Key words: epidermal growth factor, migration activity, adhesion activity, integrin, focal adhesion kinase, Squamous cell carcinoma  
上皮増殖因子, 移動能, 接着能, インテグリン, 有棘細胞癌

## 1. は じ め に

有棘細胞癌 (squamous cell carcinoma ; SCC) の組織では, epidermal growth factor (EGF) の受容体とそのリガンドである EGF および transforming growth factor- $\alpha$  の発現が高度であり, 食道および口腔内の SCC の組織ではこれらの発現が高度であるほど, 腫瘍の浸潤, 転移は促進されると報告されている<sup>1)-3)</sup>. 腫瘍細胞の浸潤には, 細胞外基質への接着, マトリックスメタロプロテアーゼなどのプロテアーゼによるその破壊および移動が重要な役割を果たす<sup>4)</sup>. 基質への接着は細胞移動に必要であり, それに対する細胞表面レセプターであるインテグリンを介して行われる<sup>5)</sup>. インテグリンの基質への結合とインテグリンの凝集によりシグナル伝達が生じ, それに引き続いてインテグリンと細胞骨格蛋白が集積し, focal adhesion が形成される<sup>6)</sup>. この focal adhesion の形成は細胞接着, 伸展および移動に関連した重要な現象である<sup>5)</sup>. 一方, インテグリンからのシグナルは, さらに focal adhesion kinase (FAK)-Grb2 経路あるいはフォスファチジルイノシトール, プロテインキナーゼ C 経路で Ras, mitogen-activated protein (MAP) kinase を経て核に伝えられて最終的には細胞の増殖や遺伝子発現を引き起こす<sup>5)</sup>. このシグナル伝達系には growth factor からのそれと共通する部分が多いため, growth factor の刺激は focal adhesion の形成を介して細胞接着, 伸展および移動などの機能を修飾する可能性があると思われる. 実際に, platelet-derived growth factor (PDGF), hepatocyte growth factor (HGF) および EGF は FAK のチロシン・リン酸化とこれらの機能の修飾することが示された<sup>7)-10)</sup>. 腫瘍細胞におい

て, growth factor によるマトリックスメタロプロテアーゼ活性の増強は多数報告されているが<sup>11)-13)</sup>, growth factor による移動能亢進の報告は比較的少なく, メカニズムの詳細は不明である<sup>8)</sup>.

今回我々は, ヒト SCC 細胞のモデルとして, ヒト SCC 組織の腫瘍細胞と同じインテグリンを発現する癌細胞株 CaSki-K をヒト子宮頸部扁平上皮癌由来細胞株から分離した. SCC の移動能に対する growth factor の影響およびそのメカニズムを検討するために, この CaSki-K の IV 型コラーゲン上での 0, 1, 10, 100 ng/ml の各濃度の EGF 添加による移動能の変化を調べたところ, CaSki-K の移動能は, 1 および 10 ng/ml の EGF の存在下では増強し, 100 ng/ml の EGF の存在下では抑制された. 移動能に関与する因子として, インテグリンの種類と発現の変化, 接着能, 伸展能, focal adhesion と細胞骨格の変化, FAK のリン酸化の変化に対する EGF の影響を検討した.

## 2. 材 料 と 方 法

### 1) 材 料

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), 牛胎仔血清 (Fetal bovine serum ; FBS), 移動能阻害実験に用いた抗インテグリン  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 6$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 4$  マウスモノクローナル抗体は Gibco BRL 社 (Grand island, New York, USA), フローサイトメトリーに用いた抗インテグリン  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 6$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 4$  モノクローナル抗体は Immunotech 社 (Maeseille, France), 牛胎盤由来 IV 型コラーゲンは Koken 社 (高研, 東京), ヤギ抗マウス IgG-セファロース 4B は Zymed 社 (San Francisco, California, USA),

horseradish peroxidase (HRP) 標識のリン酸化チロシンに対するマウスモノクローナル抗体 (PY20) は Amersham 社 (Buckinghamshire, England), focal adhesion kinase (FAK) に対するマウスモノクローナル抗体とウサギ抗体は Upstate Biotechnology 社 (Lake Placid, New York, USA), HRP 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体と FITC 標識ウサギ抗マウス IgG 抗体は DAKO 社 (Glostrup, Denmark), TRITC 標識ファロイジンは Sigma 社 (St. Louis, Missouri, USA), ビンキュリンに対するマウスモノクローナル抗体は ICN 社 (Aurora, Ohio, USA) より購入した。

## 2) 細胞とその培養方法

ヒト子宮頸部扁平上皮癌由来細胞株 CaSki (American Type Culture Collection 社 (Rockville, Maryland, USA) より購入) を 2 回の limiting dilution により,  $\alpha 6$  および  $\beta 4$  インテグリンがともに陽性の CaSki-K と, ともに陰性の CaSki-N とに分離し, CaSki-K を実験に使用した。フローサイトメトリーのパターンから, この CaSki-K は  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 6$ ,  $\beta 1$  および  $\beta 4$  陽性で,  $\alpha 6$  はおそらく  $\beta 4$  とヘテロダイマーを形成していると考えられる。CaSki-K は, 10% FBS を含む DMEM 液で継代し, 実験の48時間前より無血清培地で培養した。

## 3) 細胞の移動能と抗インテグリン抗体による阻害実験の方法

20  $\mu$ g/ml の IV 型コラーゲンにて 4℃で一晩コートした 24 穴プレートに, CaSki-K 細胞を各ウェルに  $7 \times 10^5$  cells ずつ加え, subconfluent になるまで 37℃の 5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で無血清培地で 10 時間培養した。イエローチップでウェルの中央部の細胞を帯状にはがしたのち, はがれた細胞を含む培養上清を取り除き, 0, 1, 10, 100 ng/ml の各濃度の EGF を含む無血清培地を加えた。ひっかけ直後と 4 時間後各々の写真を撮影し, 無細胞部の面積の差を画像解析ソフトの NIH image により解析し, 面積の縮小率 migration index を以下の式により求めることにより細胞の移動能を比較した (wound assay; 図 1)。migration index =  $[(S1 - S2) / S1] \times 100 (\%)$ ; S1 は引っかけ直後の無細胞部の面積を, S2 は 4 時間後の無細胞部の面積を示す。インテグリン阻害抗体の効果の検討では, 0 ないし 10 ng/ml の EGF を含む無血清培地に各インテグリン阻害抗体を最終的に 20 分の 1 の濃度となるよう加えた。それぞれの migration index を求め, 阻害抗体非添加時の migration index を 100% とし,

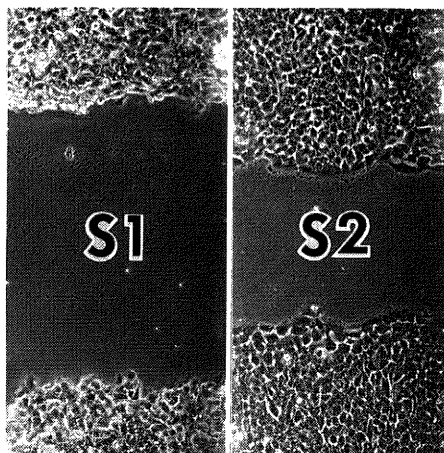


図 1 wound assay

CaSki-K 細胞の移動能における EGF の影響は wound assay を用いて測定した。IV 型コラーゲン上に CaSki-K を 10 時間 subconfluent となるよう培養した。イエローチップの先端でひっかけてウェルの中央部の細胞を帯状に除去したのち, EGF あるいは抗インテグリン抗体を含む培地を加えて, 4 時間培養した。細胞除去直後とその 4 時間後の無細胞部分の面積から縮小率を求めた。

阻害抗体添加時の相対的移動能を算出した。

## 4) 接着能の測定方法

20  $\mu$ g/ml の IV 型コラーゲンにて 4℃で一晩コートした 96 穴プレートに, 0, 1, 10, 100 ng/ml の各濃度の EGF を含む無血清培地で調整した細胞懸濁液を各ウェルに  $5 \times 10^4$  cells ずつ加え, 37℃の 5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内に 30 分間静置したのち, 非接着とともに培養上清を取り除いた。接着した細胞を冷アセトンメタノールで固定後, 1%クリスタルバイオレット溶液で染色した。5%SDS で溶解したのち回収し, 590 nm の吸光度を測定した。EGF 非存在下で一晩接着させた時の吸光度を 100% とし, 各実験における細胞接着率を算出した。

## 5) 伸展能の測定方法

20  $\mu$ g/ml の IV 型コラーゲンにて 4℃で一晩コートした 24 穴プレートに, 0, 1, 10, 100 ng/ml の各濃度の EGF を含む無血清培地で調整した細胞懸濁液を各ウェルに  $5 \times 10^5$  cells ずつ加えて 37℃の 5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 30 分間あるいは 90 分間伸展させた。冷アセトンメタノールで固定後, 1%クリスタルバイオレット

溶液で染色し、それぞれ約 800 個の細胞を顕微鏡下で数え、伸展した細胞数の比率を計算した。

#### 6) フローサイトメトリーによるインテグリン発現量の検討

25cm<sup>2</sup> フラスコに CaSki-K 細胞を subconfluent となるよう培養し、0, 1, 10, 100 ng/ml の各濃度の EGF を 24 時間添加した。1 mM EDTA/0.05 % トリプシンで処理したのち細胞を 5 % FBS を含む PBS 液 (5 % FBS-PBS) に浮遊させた。5 % FBS-PBS で 2 回洗浄したのち、抗インテグリン  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 6$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 4$  モノクローナル抗体 (1  $\mu$ g/ml) と氷冷しながら 1 時間反応させ、5 % FBS-PBS で 2 回洗浄してからさらに FITC 標識 2 次抗体 (50 倍希釈) と氷冷中で 1 時間反応させた。再び PBS で 2 回洗浄したのち、室温にて 30 分間 70 % エタノールで固定した。フローサイトメトリーで (Becton Dickinson 社 (Mountain View, California, USA) 製 FACSscan にて解析)、平均蛍光強度を求めることによりインテグリン発現量を比較した。

#### 7) 細胞の形態観察

20  $\mu$ g/ml の IV 型コラーゲンにて 4 °C で一晩コートした 35mm ディッシュに、CaSki-K 細胞を  $7 \times 10^4$  cell ずつ加え、無血清培地で 10 時間培養した後、0, 1, 10, 100 ng/ml の各濃度の EGF を含む無血清培地に換えた。90 分間のインキュベーション後、4 % パラホルムアルデヒドで 20 分間固定し、0.5 % トリトン X-100 溶液で処理した。PBS で洗浄後 10  $\mu$ g/ml の ビンキュリンに対するマウスモノクローナル抗体と室温で 30 分間反応後、FITC 標識ウサギ抗マウス IgG 抗体 (10  $\mu$ g/ml) と TRITC 標識ファロイジン (6.7  $\mu$ g/ml) との混合液と室温で 30 分間反応させた。これらの標本は、共焦点レーザー顕微鏡 (Carl Zeiss 社 (Oberkochen, Germany) 製) で観察した。

#### 8) イムノブロットングと免疫沈降法

20  $\mu$ g/ml の IV 型コラーゲンにて 4 °C で一晩コートした 100 mm ディッシュに、subconfluent となるよう  $1 \times 10^7$  cells の細胞を一晩無血清培地で培養した後、0, 1, 10, 100 ng/ml の各濃度の EGF を 20 分間添加した。1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> を含む氷冷 PBS で 2 度ディッシュを洗浄したのち、細胞を氷冷 lysis buffer (50 mM Tris/HCl, pH 7.5, 1 % Nonidet P-40, 0.25 % sodium deoxycholate, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1  $\mu$ g/ml aprotinin, 1  $\mu$ g/ml pepstatin, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 mM NaF) で溶解し、回収した。さらに氷冷中で 30 分間攪拌したのち、

18,000 回転で遠心して不溶物を除去し、上清を回収した。各可溶性蛋白を一定濃度に調製した後、SDS 資料調製用バッファー (125 mM Tris-HCl, pH 6.8, 6 % SDS, 40 % ショ糖, 0.02 % ブロムフェノールブルー, 6 % 2-メルカプトエタノール) を加え、100 °C で 5 分間加熱した。各レーン 10  $\mu$ g の蛋白を 5 ~ 10 % SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) で分離した後、PVDF メンブランに転写して、1 % BSA を含む TBS-0.1 % Tween20 で 4 °C で一晩ブロッキングを行った。0.1  $\mu$ g/ml の HRP 標識のリン酸化チロシンに対するモノクローナル抗体溶液中で、メンブランを室温で 1 時間反応させた後、標識蛋白は ECL ウェスタンブロットング検出システム (Amersham 社製) を用いて検出した。

免疫沈降法を組み合わせた実験では、可溶性蛋白の濃度を 750  $\mu$ g/ml に調製した後、ヤギ抗マウス IgG-セファロース 4B を加えて 4 °C で 1 時間 30 分振盪しながら反応させたのち、13,000 回転で 2 分間遠心を行い、ブレキアールを行った。回収した上清に FAK に対するモノクローナル抗体を加え、4 °C で 4 時間 30 分振盪しながら反応させた後、ヤギ抗マウス IgG-セファロース 4B を加えて 4 °C で 2 時間振盪しながら反応させ、15,000 回転で 2 分間遠心してセファロース 4B に結合した免疫複合体を回収した。HRP 標識 PY20 ないしウサギ抗 FAK ポリクローナル抗体と HRP 標識ヤギ抗ラビット IgG 抗体 (3000 倍希釈) を用いて、上述した方法でウェスタンブロットを行った。

### 3. 結 果

#### 1) EGF による移動能の変化

1 ng/ml および 10 ng/ml の EGF 存在下で移動能は亢進し、それぞれ非添加時に比べ 1.5 倍および 2 倍となった。しかし、100 ng/ml の EGF 存在下ではむしろ移動能は抑制され、ほとんど移動しなかった (図 2)。

#### 2) 抗インテグリン抗体による移動能の阻害効果

EGF 非存在下での移動能は、抗  $\alpha 3$  インテグリン抗体存在下で 58 %, 抗  $\alpha 6$  インテグリン抗体存在下で 21 %, 抗  $\beta 1$  インテグリン抗体存在下で 42 %, それぞれ阻害されたが、抗  $\alpha 2$  インテグリン抗体による阻害は認められなかった。EGF 存在下での移動能は、抗  $\alpha 2$  インテグリン抗体により 34 %, 抗  $\alpha 3$  インテグリン抗体により 60 %, 抗  $\alpha 6$  インテグリン抗体により 30 %, 抗  $\beta 1$  インテグリン抗体により 46 %, それぞれ阻害された (図 3)。以上の結果は EGF 非存在下での細胞移動には  $\alpha 3 \beta 1$

と  $\alpha 6 \beta 4$  インテグリンが, EGF 存在下では  $\alpha 3 \beta 1$  と  $\alpha 6 \beta 4$  インテグリンに加えて  $\alpha 2 \beta 1$  インテグリンも関与していることを示し, EGF の有無により利用するインテグリンに差があることを示唆した.

### 3) フローサイトメトリーによるインテグリン発現量の検討

$\alpha 3$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 4$  インテグリンの発現量に大きな変化はなかったが,  $\alpha 2$  と  $\alpha 6$  インテグリンの発現は濃度依存性に亢進し, 10 ng/ml の EGF 存在下ではそれぞれ 45% および 27% の増加を示した. (表 1)

### 4) EGF による接着能の変化

接着能は, 1 ng/ml の EGF の存在下ではほとんど変化は認められなかった. 10 ng/ml と 100 ng/ml の EGF の存在下では著明に低下し, EGF 無添加時と比較して, 10 ng/ml の EGF の存在下では約 1/3, 100 ng/ml の EGF の存在下では約 1/4 の接着率となった (図 4).

### 5) EGF による伸展能の変化

1 ng/ml の EGF の存在下では, 30 分後の伸展能には変化はなかったが, 90 分後には伸展した細胞数の割合は EGF 無添加のものに比べて 20% の増加を認めた. 10 ng/ml の EGF の存在下では, 30 分後に伸展した細胞数の割合は EGF 無添加のものに比べて約 1/2 に減少し, 90 分後に伸展した細胞数の割合は EGF 無添加のものに比べて約 2/3 に減少した. 100 ng/ml の高濃度の EGF の存在下では, 30 分後, 90 分後ともに伸展能

は著明に低下して, 収縮した円形の細胞が大半を占め, 伸展した細胞数の割合は EGF 無添加のものに比べて約 1/5 に減少した (図 5).

### 6) EGF による細胞骨格と focal adhesion の変化

0, 1 および 10 ng/ml EGF の存在下ではストレ

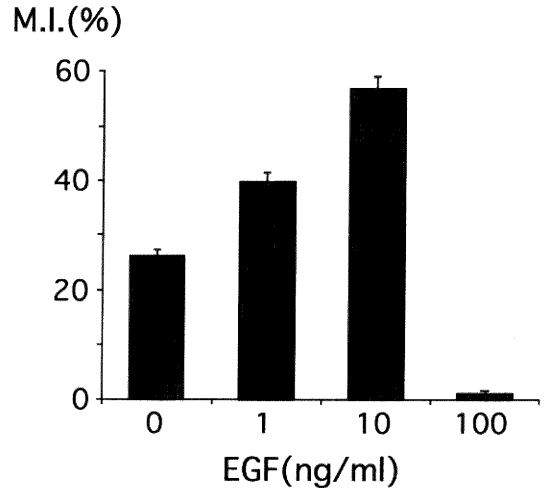


図 2 移動能に対する EGF の影響

0, 1, 10, 100 ng/ml の各濃度の EGF を含む培地を加えて, 4 時間後の migration index を測定した. 測定値は 6 ウェルの migration index の平均値とし, SD 値を誤差線で示した.

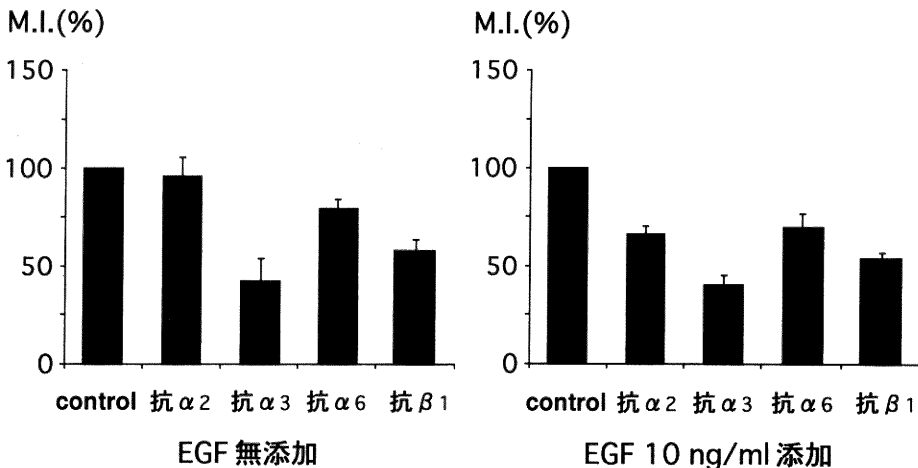


図 3 抗インテグリン抗体による移動能の阻害効果

10 ng/ml の EGF 添加時と EGF 無添加時における抗インテグリン抗体による移動能を測定. 抗体非添加時の migration index を 100 % とし, 阻害抗体添加時のそれを算出した. 測定値は 6 ウェルの平均値とし, SD 値を誤差線で示した.

表 1 EGF によるインテグリン発現量の変化

EGF (ng/ml)	0	1	10	100
$\alpha 2$	49.8* (100%)	58.3 (117.1%)	72.5 (145.6%)	91.1 (183.0%)
$\alpha 3$	220.7* (100%)	228.8 (103.7%)	211.9 (96.0%)	163.6 (74.1%)
$\alpha 6$	38.7* (100%)	40.1 (103.6%)	49.2 (127.9%)	51.7 (133.6%)
$\beta 1$	52.6* (100%)	62.6 (119.0%)	60.1 (114.3%)	65.3 (124.1%)
$\beta 4$	26.5* (100%)	28.4 (107.2%)	29.6 (111.7%)	30.9 (116.6%)

\* ; 平均蛍光強度

CaSki-K 細胞を subconfluent となるよう培養し, 0, 1, 10, 100 ng/ml の各濃度の EGF 存在下で24時間添加した. 1 mM EDTA/0.05 %トリプシンで処理したのち細胞を 5 %FBS を含む PBS 液 (5 %FBS-PBS) に浮遊させた. 抗インテグリン  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 6$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 4$  モノクローナル抗体と氷冷中で 1 時間反応させ, さらに FITC 標識 2 次抗体 (50 倍希釈) と氷冷中で 1 時間反応させた. 室温にて30分間70%エタノールで固定してからフローサイトメトリーで解析し, 平均蛍光強度を求めることにより細胞表面のインテグリン発現量を比較した.

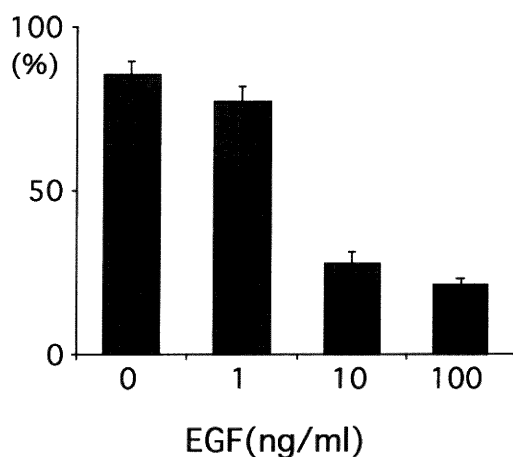


図 4 接着能に対する EGF の影響

0, 1, 10, ないし 100 ng/ml の各濃度の EGF の存在下で30分後に接着した細胞を固定, 染色 (attachment assay) 後, 590 nm で吸光度を測定. EGF 非存在下で一晩で接着した細胞のそれを 100 % とし, 各実験の接着率を算出した.

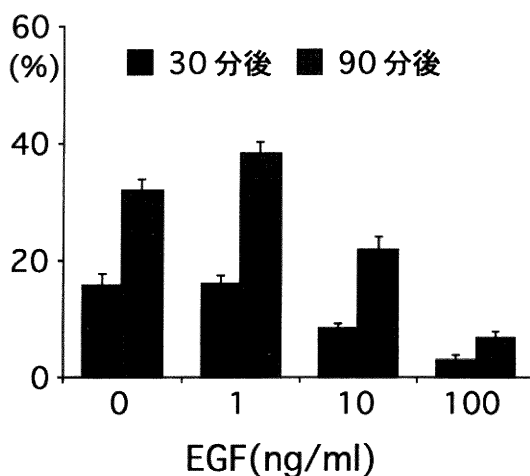


図 5 伸展能に対する EGF の影響

0, 1, 10, 100 ng/ml の各濃度の EGF 存在下で30分間あるいは90分間伸展させた後, 固定, 染色後, 約 800 個ずつの細胞を顕微鏡下で数え, 伸展した細胞数の比率を計算した.

スファイバーの形成が悪く, 伸展細胞では細胞辺縁のごく一部 (図 6・f 矢尻部) に認められるのみであった. ビンキュリンは, 伸展細胞ではその辺縁に環状ないし少数の短い針状配列をしたのに対し, 伸展不良細胞では細

胞底面に小さな環状配列をしていた. 100 ng/ml EGF 存在下では, 伸展細胞の割合は著しく低下しただけではなく, 伸展細胞もその程度は小さかった. 伸展細胞では細胞底面全体にアクチンストレスファイバーが形成さ

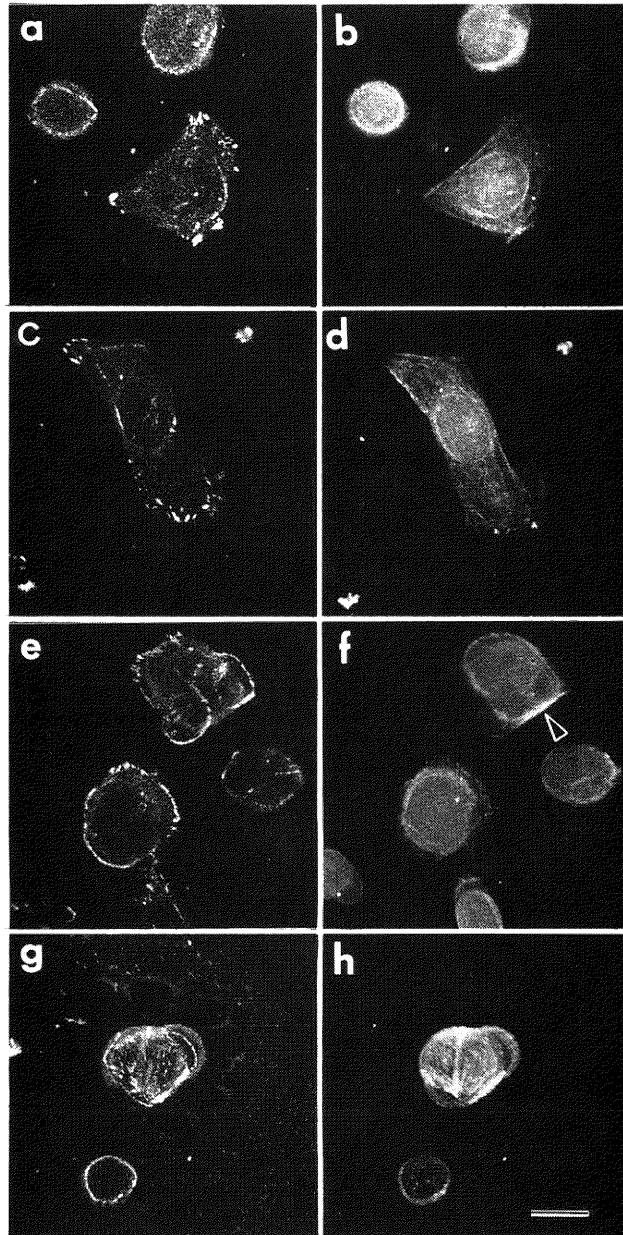


図 6 細胞骨格と focal adhesion 形成に対する EGF の影響

10時間接着させた後、0 (a, b), 1 (c, d), 10 (e, f), 100 (g, h) ng/ml の各濃度の EGF を含む無血清培地を添加し、90分間培養した。固定後、ビンキュリンをマウスモノクローナル抗体と FITC 標識ウサギ抗マウス IgG 抗体で (a, c, e, g), アクチンを TRITC 標識ファロイジンで (b, d, f, h) 染色したのち共焦点レーザー顕微鏡で観察した。矢尻はアクチンストレスファイバーを示す。スケールは  $5\mu\text{m}$  を示す。

れ、ビンキュリンはその両端に短い針状に配列していた。伸展不良細胞では低濃度の EGF 存在下と同様に、細胞底面に小さな環状配列をしていた。

#### 7) EGF によるチロシンリン酸化の変化

細胞の可溶性蛋白のウェスタンブロッティングでは、各濃度の EGF 添加後10分、20分(図 7-A)、30分において EGF receptor と思われる 170 kd 付近の蛋白のチロシン・リン酸化は EGF 添加により濃度依存性に亢進したが、FAK と思われる 125 kd 付近の蛋白は EGF 無添加時にすでに高度にリン酸化されており、EGF 添加によるリン酸化の亢進はなかった。抗 FAK 抗体で免疫沈降した蛋白のウェスタンブロッティングでもこの結果は確認され(図 7-B上段)、EGF 添加による FAK の蛋白量の変動も認められなかった(図 7-B下段)。

### 4. 考 案

基質上の細胞の移動パターンは、random migration と haptotactic migration の2種に分類される。haptotactic migration は、濃度勾配のある細胞外基質上を濃度の低い方から高い方へ移動するような一定の方向性をもつ運動であるのに対し、random migration は、均一な細胞外基質上での運動のように一定の方向性をもたない運動である。今回我々の行った wound assay は均一な濃度の細胞外基質上での運動であり、random migration に属すると考えられる。細胞は移動する際、まず進行方向に糸状仮足および葉状仮足とよばれる先導端の胞体の一部を突出させて、基質に接着する。次いで後縁部の接着をはずし、先端の接着点を支点としてこれを収縮反応により胞体を前端部に引きよせる<sup>14)15)</sup>が、このとき細胞の先端でのインテグリンを介する接着と後縁部でのインテグリンを介する接着の解除とが同時に行われていることになる。haptotactic migration における移動能には細胞先端でのインテグリンとの接着力が、random migration には細胞後縁での接着力が決定因子となると考えられている<sup>16)</sup>。

今回の実験では、細胞移動に対する EGF の効果は、低濃度(1と10 ng/ml)と高濃度(100 ng/ml)では異なり、低濃度では亢進、高濃度では逆に抑制効果を示した。その作用濃度の違いはアクチンストレスファイバーと focal adhesion の分布にも著しい違いを生じたことから、PDGF と同様に高濃度と低濃度では細胞骨格系に対する作用に質的な違いが存在し、とくに EGF 100 ng/ml における細胞移動の抑制効果に関係してい

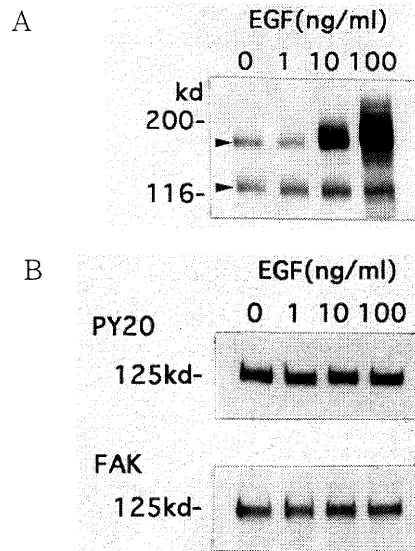


図7 EGF によるチロシンリン酸化の変化  
A; 無血清培地で一晚 subconfluent となるよう接着させておいた細胞に、0, 1, 10, 100 ng/ml の各濃度の EGF を37℃で10, 20, 30分間添加したのち lysis buffer を用いて細胞を溶解した。図は EGF 添加20分の結果を示す。同量の蛋白(各レーンにつき10 $\mu$ g をアプライ)を含むよう調整した細胞溶解液を5~10%SDS-PAGE で分離し、リン酸化チロシンに対するモノクローナル抗体(PY20)を用いてウェスタンブロッティングを行った。矢尻は、125 kd 付近と170 kd 付近の蛋白のチロシンリン酸化を示す。

B; 上記と同様にして、得られた可溶性蛋白を FAK に対するモノクローナル抗体を用いて免疫沈降を行った後、リン酸化チロシンに対するモノクローナル抗体(PY20)あるいは FAK に対するウサギポリクローナル抗体を用いてウェスタンブロッティングを行った。

ることが示唆された。

random migration は、細胞接着の強さに関連し、適当な接着の強さの時に最大となる<sup>16)-18)</sup>。つまり、細胞接着が強すぎても、また弱すぎても細胞移動は低下する。接着能の実験結果から EGF 添加により濃度依存性に細胞接着が低下しているが、この接着能の低下が EGF 1 および10 ng/ml における細胞移動の亢進に直接関連すると思われる。細胞の接着は細胞表面のインテグリンを介して行われるもので、インテグリンの基質



(リガンド) への結合によりインテグリンの凝集, インテグリンと細胞骨格蛋白の focal adhesion への集積が起こり, 細胞の接着, さらには伸展, 移動につながる. 細胞接着を決定する因子として 1) 細胞外基質濃度, 2) 細胞表面のインテグリン・レセプター数, 3) インテグリンと細胞外基質との親和性, 4) インテグリンの focal adhesion への集積および 5) 細胞骨格とインテグリンの連結の強さが挙げられる<sup>5)</sup>. 今回の実験では IV 型コラーゲン濃度は一定であるので, その他の 4 つの因子が細胞接着低下に関係する可能性があると考えられる.

阻害抗体を用いた細胞移動実験は, EGF 非存在下での移動能には  $\alpha 3 \beta 1$  と  $\alpha 6 \beta 4$  インテグリンが, EGF10 ng/ml 存在下ではそれらに加え  $\alpha 2 \beta 1$  インテグリンも関与することを示す. つまり,  $\alpha 2 \beta 1$  インテグリンは EGF 非存在下では移動能には関与せず, EGF 添加により初めて細胞移動に関与する. それに対し  $\alpha 3 \beta 1$  インテグリンは EGF 添加に無関係に常に細胞移動に関わっている. EGF の添加による  $\alpha 2 \beta 1$  インテグリンの発現の亢進とともに, EGF の添加によるこのインテグリンの細胞移動の機能への新たな参加がそれによる細胞移動の亢進の主な原因であると考えられ, 過去の報告と一致する<sup>19)20)</sup>. EGF の添加による  $\alpha 2 \beta 1$  インテグリンの機能変化のメカニズムは不明である. 今回はインテグリン抗体を使用した免疫組織化学的な検討はしていないが,  $\alpha 2 \beta 1$  インテグリンは  $\alpha 3 \beta 1$  インテグリンと共に focal adhesion に共存する<sup>5)</sup>. このことから, EGF の添加により増加した  $\alpha 2 \beta 1$  インテグリンが新たに focal adhesion に集積し, 基質である IV 型コラーゲンへの結合に参加したことや, 後述するように両インテグリンのリガンド親和性が低下し, 基質に結合している  $\alpha 2 \beta 1$  インテグリンの割合が変わったという可能性も考えられる.

$\alpha 6 \beta 4$  インテグリンはヘミデスモゾーム部の細胞膜に存在し, 中間径フィラメントであるケラチンと連結し, 安定した接着の形成に関与していると考えられている. しかし, このインテグリンは糸状仮足および葉状仮足でアクチンと連結し, ラミニン-1 上における細胞移動にも関わっていることが, 最近明らかとなった<sup>21)</sup>. IV 型コラーゲンは  $\alpha 6$  インテグリンの本来のリガンドではないにも関わらず, このインテグリンに対する阻害抗体により細胞移動が低下した原因は不明であるが, この抗体により  $\alpha 6 \beta 4$  インテグリンを介した糸状仮足および葉状仮足の機能が障害されたのかもしれない.

蛍光色素標識 IV 型コラーゲンとフローサイトメトリー

を用いてインテグリンのリガンドに対する親和性について検討を試みたが, 親和性が低すぎるため検討できなかった (未発表データ). 最近, Ras および Raf-1 経路で活性化された MAP kinase はインテグリンのリガンド親和性を低下させることによりインテグリンの機能を低下させ, 実際にフィブロネクチン基質の会合や細胞伸展が抑制されることが明らかとなった<sup>22)</sup>. EGF receptor の活性化はその下流で Ras および Raf-1 の活性化を生じることから, 細胞接着の低下は, EGF 添加により Ras および Raf-1 の活性化, ついで MAP Kinase の活性化を生じ, それによりインテグリンのリガンド親和性が低下したためかもしれない.

移動には focal adhesion とアクチンストレスファイバーの形成と分解というダイナミックな動きが必要である<sup>14)</sup>. 一般に安定した接着ではそのダイナミックな動きが少ないと考えられ, 形態的に両構造の形成がよく, 細胞伸展が良好である. これに対し, 盛んに移動する細胞ではそれらがダイナミックに動いていると考えられ, 形態的にはその構造の形成は悪く<sup>16)</sup>, 紡錘形となることが多い<sup>8)</sup>. 今回の免疫組織化学による形態的な検討では, EGF 無添加と比較すると EGF を添加することにより細胞の伸展率が変化し, とくに EGF 10 ng/ml で低下したことは, 細胞移動が亢進したと関連した変化であると考えられる. 形態的に紡錘形の細胞がなかったのは EGF 添加後に観察した時間が早すぎたからかもしれない. 伸展良好の細胞も, 円形の伸展不良細胞も focal adhesion の形成は良好であった. focal adhesion の形成にはインテグリンのリガンドへの結合と凝集, さらにそこへの FAK, パキシリンおよびテーリンなどの蛋白の凝集およびそれに関連したシグナル伝達系の活性化が必要であるとされている<sup>5)</sup>. このことから, focal adhesion へのインテグリンの集積は良好であると考えられるが, 今回はインテグリンの focal adhesion への集積の程度への EGF の影響についての検討はしていない. 細胞骨格とインテグリンとの結合の強さについては, 今回の免疫組織化学的手法では検討不可能であるが, focal adhesion とアクチンストレスファイバーの形成から判断すれば, EGF の影響は少ないのかもしれない.

次に, EGF 100 ng/ml 存在下では細胞移動はほぼ完全に抑制されたことから, 高濃度 EGF による細胞移動抑制効果について検討する. 今回示さなかったが, MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay (別名 colorimetric

assay) による検討により, EGF の細胞毒性がその原因である可能性は否定的である。細胞接着は EGF 10 ng/ml よりも 100 ng/ml でより低下したことから, EGF 100 ng/ml 存在下では細胞接着力が細胞移動に最適な程度よりも低下したため細胞移動が低下した可能性はある。しかし両濃度での細胞接着率の差は小さく, 細胞接着の低下だけで細胞移動が全く停止してしまうとは考えにくい。形態的な検討では, この濃度の EGF 存在下ではアクチンストレスファイバーおよび focal adhesion の形成はむしろ亢進し, その分布は細胞辺縁主体から細胞底面全体へと変化した。このことから, 高濃度の EGF 存在下では, 非常に安定した focal adhesion が形成され, これが細胞移動の停止の原因のひとつと考えられる。一般的に, focal adhesion および細胞骨格の形成の程度は細胞伸展の程度と相関する<sup>16)</sup>。しかし高濃度 EGF 存在下では両構造の形成が亢進したにもかかわらず, 細胞伸展はむしろ低下した。このことは両構造の形成が有効に細胞伸展に結びついていないためと考えられ, その機能の低下が示唆される。つまり, 細胞進展や細胞移動に必要な focal adhesion とアクチンストレスファイバーの形成と分解という一連の過程が作動しなくなったのかもしれない。PDGF の場合, 3T3 細胞の細胞骨格系への作用が低濃度と高濃度では異なり, 高濃度ではアクチンストレスファイバーが障害されることが報告されている<sup>7)</sup>。EGF も高濃度の場合, その機能が低下し細胞移動の停止につながった可能性も示唆される。

FAK のチロシン・リン酸化は focal adhesion およびアクチンストレスファイバーの形成に関与し, 細胞伸展, 細胞接着および細胞移動を調節するものと考えられる<sup>5)23)</sup>。growth factor や神経ペプチドのシグナル伝達系には, インテグリンを介したシグナル伝達系と共通する部分があり, 実際に EGF や PDGF 添加により FAK のチロシン・リン酸化の亢進が<sup>7)9)10)</sup>, HGF 添加により FAK のチロシン・リン酸化, 細胞伸展および細胞移動が亢進した<sup>8)</sup>ことが報告されている。しかし, 今回の結果では EGF 添加により FAK のチロシン・リン酸化の亢進は起こらなかったにもかかわらず, 1 および 10 ng/ml の EGF 存在下では細胞移動の亢進が, 100 ng/ml の EGF 存在下では focal adhesion およびアクチンストレスファイバーの形成が亢進した。このことは, これらの現象に関連するシグナル伝達系には, FAK のチロシン・リン酸化を介さない系路が存在することを示唆する。最近, FAK がアダプター

蛋白として働き, それに Src と Cas が結合し, 前者が後者をチロシン・リン酸化させることで活性化し, 細胞移動を亢進させることが示された<sup>24)</sup>。EGF は FAK のチロシン・リン酸化を亢進させることなく, この Cas のチロシン・リン酸化を亢進させ, 結果的に細胞移動の亢進を引き起こしているのかもしれない。

## 謝 辞

本稿を終えるにあたり, 御校閲を賜りました伊藤雅章教授, 直接御指導頂きました風間隆講師, 写真を作製して頂きました今井隆郎技官, フローサイトメトリーによる解析を行って頂きました金田美奈子さん, 井藤ヒロミさんに深謝いたします。

## 参 考 文 献

- 1) Ozawa, S., Ueda, M., Ando, N., Shimizu, N. and Abe, O.: Prognostic significance of epidermal growth factor receptor in esophageal squamous cell carcinomas. *Cancer*, **63**: 2169~2173, 1989.
- 2) Mukaida, H., Toi, M., Hirai, T., Yamashita, Y. and Toge, T.: Clinical significance of the expression of epidermal growth factor and its receptor in esophageal cancer. *Cancer*, **68**: 142~148, 1991.
- 3) Shirasuna, K., Hayashido, Y., Sugiyama, M., Yoshioka, H. and Matsuya, T.: Immunohistochemical localization of epidermal growth factor (EGF) and EGF receptor in human oral mucosa and its malignancy. *Virchows Archiv. A. Pathol. Anat.*, **418**: 349~353, 1991.
- 4) Stetler-Stevenson, W.G., Aznavoorian, S. and Liotta, L.A.: Tumor cell interactions with the extracellular matrix during invasion and metastasis. *Annu. Rev. Cell Biol.*, **9**: 541~573, 1993.
- 5) Gumbiner, B.M.: Cell Adhesion: The molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell*, **84**: 345~357, 1996.
- 6) Miyamoto, S., Teramoto, H., Coso, O.A., Gutkind, J.S., Burbelo, P.D., Akiyama, S.K. and Yamada, K.M.: Integrin function: Molecular hierarchies of cytoskeletal and signaling molecules. *J. Cell Biol.*, **131**: 791~805, 1995.
- 7) Rankin, S. and Rozengurt, E.: Platelet-derived growth factor modulation of focal adhesion kinase (p125<sup>FAK</sup>) and paxillin tyrosin phosphorylation in

- Swiss 3T3 cells. Bell-shaped dose response and cross-talk with bombesin. *J. Biol. Chem.*, **269**: 704~710, 1994.
- 8) **Matsumoto, K., Matsumoto, K., Nakamura, T. and Kramer, R.H.:** Hepatocyte growth factor/scatter factor induces tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase (p125<sup>FAK</sup>) and promotes migration and invasion by oral squamous cell carcinoma cells. *J. Biol. Chem.*, **269**: 31807~31813, 1994.
  - 9) **Abedi, H., Dawes, K.E. and Zachary, I.:** Differential effects of platelet-derived growth factor BB on p125 focal adhesion kinase and paxillin tyrosin phosphorylation and on cell migration in rabbit aortic vascular smooth muscle cells and Swiss 3T3 fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, **270**: 11367~11376, 1995
  - 10) **Brunton, V.G., Ozanne, B.W., Paraskeva, C. and Frame, M.C.:** A role for epidermal growth factor receptor, c-Src and focal adhesion kinase in an *in vitro* model for the progression of colon cancer. *Oncogene*, **14**: 283~293, 1997.
  - 11) **Kerr, L.D., Holt, J.T. and Matrisian, L.M.:** Growth factors regulate transin gene expression by c-fos-dependent and c-fos-independent pathways. *Science*, **242**: 1424~1427, 1988.
  - 12) **Colige, A.C., Lambert, C.A., Nusgens, B.V. and Lapiere, C.M.:** Effect of cell-cell and cell-matrix interactions on the response of fibroblasts to epidermal growth factor *in vitro*. *Biochem. J.*, **285**: 215~221, 1992.
  - 13) **Shima, I., Sasaguri, Y., Kusukawa, J., Nakano, R., Yamana, H., Fujita, H., Kakegawa, T. and Morimatsu, M.:** Production of matrix metalloproteinase 9 (92-kDa gelatinase) by human oesophageal squamous cell carcinoma in response to epidermal growth factor. *Br. J. Cancer*, **67**: 721~727, 1993.
  - 14) **Lauffenburger, D.A. and Horwitz, A.F.:** Cell migration: A physically integrated molecular process. *Cell*, **84**: 359~369, 1996.
  - 15) **Mitchinson, T.J. and Cramer, L.P.:** Actin-based cell motility and cell locomotion. *Cell*, **84**: 371~379, 1996.
  - 16) **Huttenlocher, A., Ginsberg, M.H. and Horwitz, A.F.:** Modulation of cell migration by integrin-mediated cytoskeletal linkages and ligand-binding affinity. *J. Cell Biol.*, **134**: 1551~1562, 1996.
  - 17) **Duband, J.L., Dufour, S., Yamada, S.S., Yamada, K.M. and Thiery, J.P.:** Neural crest cell locomotion induced by antibodies to  $\beta 1$  integrins. A tool for studying the roles of substratum molecular avidity and density in migration. *J. Cell Sci.*, **98**: 517~532, 1991.
  - 18) **DiMilla, P.A., Stone, J.A., Quinn, J.A., Albelda, S.M. and Lauffenburger, D.A.:** Maximal migration of human smooth muscle cells on fibronectin and type IV collagen occurs at an intermediate attachment strength. *J. Cell Biol.*, **122**: 729~737, 1993.
  - 19) **Chen, J.D., Kim, J.P., Zhang, K., Sarret, Y., Wynn, K.C., Kramer, R.H. and Woodley, D.T.:** Epidermal growth factor (EGF) promotes human keratinocyte locomotion on collagen by increasing the  $\alpha 2$  integrin subunit. *Exp. Cell Res.*, **209**: 216~223, 1993.
  - 20) **Fujii, K., Dousaka-Nakajima, N. and Imamura, S.:** Epidermal growth factor enhancement of HSC-1 human cutaneous squamous carcinoma cell adhesion and migration on type 1 collagen involves selective up-regulation of  $\alpha 2\beta 1$  integrin expression. *Exp. Cell Res.*, **216**: 261~272, 1995.
  - 21) **Rabinovitz, I. and Mercurio, A.M.:** The integrin  $\alpha 6\beta 4$  functions in carcinoma cell migration on laminin-1 by mediating the formation and stabilization of actin-containing motility structures. *J. Cell Biol.*, **139**: 1873~1884, 1997.
  - 22) **Hughes, P.E., Renshaw, M.W., Praff, M., Forsyth, J., Keivens, V.M., Schwartz, M.A. and Ginsberg, M.H.:** Suppression of integrin activation: A novel function of a Ras/Raf-initiated MAP kinase pathway. *Cell*, **88**: 521~530, 1997.
  - 23) **Sankar, S., Mahooti-Brooks, N., Gang, H. and Madri, J.A.:** Modulation of cell spreading and migration by pp125<sup>FAK</sup> phosphorylation. *Am. J. Pathol.*, **147**: 601~608, 1995.
  - 24) **Cary, L.A., Han, D.C., Polte, T.R., Hanks, S.K. and Guan, J.L.:** Identification of p130<sup>Cas</sup> as a mediator of focal adhesion kinase-promoted cell migration. *J. Cell Biol.*, **140**: 211~221, 1998.

(平成10年 2 月 9 日 受付)