

# AMCoR

Asahikawa Medical University Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

耳鼻咽喉科免疫アレルギー (2003.06) 21巻2号:38～39.

頭頸部扁平上皮癌におけるケモカインレセプターに関する検討

片山昭公, 荻野 武, 高原 幹, 岸部 幹, 野沢はやぶさ, 石田芳也, 野中 聡, 原渕保明

## 15. 頭頸部扁平上皮癌におけるケモカインレセプターに関する検討

○片山昭公, 荻野 武, 高原 幹, 岸部 幹, 野沢はやぶさ, 石田芳也, 野中 聡, 原渕保明

旭川医科大学耳鼻咽喉科・頭頸部外科学教室

### Expression of CXCR4 in Head and Neck Squamous cell carcinoma

Katayama A, Ogino T, Takahara M, Kishibe K, Nozawa H, Ishida Y, Nonaka S, Harabuchi Y  
Dept. of Otolaryngology, Asahikawa Medical College

#### 1. はじめに

CXCR4はケモカイン SDF-1 特異的レセプターであり、白血球や未分化造血細胞などの細胞膜上に発現している。ケモカインスーパーファミリーの中で最も強力な化学誘引物質である SDF-1 の刺激により走化性が誘導され、さらに増殖、生存が促進される。近年、乳癌の研究で明らかにされたことであるが、高転移乳癌細胞にて CXCR4 が発現し、一方そのリガンドである SDF-1 はリンパ節を始め骨、肝臓または肺などに高濃度に存在しており、乳癌細胞はこれらの臓器を循環中にトラップされ、生着することで転移巣を形成することが報告された。以後、各種癌においてケモカインレセプターの発現と転移機構の関連性が検討されてきているが、統一した見解は無くその全貌は依然として解明されていない。さらに頭頸部扁平上皮癌領域においてのケモカイン/ケモカインレセプター機構の検討の報告はいまだにない。今回、我々は頭頸部扁平上皮癌における各種ケモカインレセプター CXCR4 の発現とその走化性、浸潤能における役割について検討し興味深い知見を得たので報告する。

#### 2. 対照

材料は頭頸部扁平上皮癌細胞株で舌癌細胞株は SAS、HSC3、HSC4、TK-SM の 4 種。口腔扁平上皮癌は HSQ-89。上顎癌細胞株は IMC-3 を用いた。また、恒常的に CXCR4 を発現する陽性対照として T 細胞リンパ腫由来の Jurkat 細胞を用いた。

#### 3. 方法

##### <RT-PCR 法>

10 cm dish で 30% コンフルエントまで増殖させた細胞よりセパゾール RNA I (NAKARAI) を用い RNA を

抽出し、Message Clean kit (GeneHunter) で DNase 処理を行い精製し、MMLV リバーストランスクリプターゼ (GeneHunter) で逆転写反応して cDNA を合成した。PCR 反応は 27 塩基の CXCR4 特異的プライマー (forward 5'-ctctccaaaggaaagcgaggtggacat-3', reverse primer 5'-agactgtacactgtaggtgctgaaatca-3') にて 30 サイクル (94°C 1 分 57°C 1 分 72°C 1 分) 行った。内部標準遺伝子として  $\beta 2$  microglobulin を用いた。

##### <フローサイトメトリー>

10 cm dish で 30% コンフルエントまで培養した細胞を 1 サンプルあたり  $5 \times 10^5$  個回収し 1 次抗体は抗 CXCR4 マウス/モノクローナル抗体 (12G5 Biosystems) を 10  $\mu$ g/ml 30 分室温でインキュベートし、2 次抗体には PE 標識抗マウス/イムノグロブリン抗体 (R0480 DAKO) を一反応あたり 1.5  $\mu$ l 添加し、30 分 室温でインキュベートした。フローサイトメーターはコールター社の EPICS ELITE を使用した。

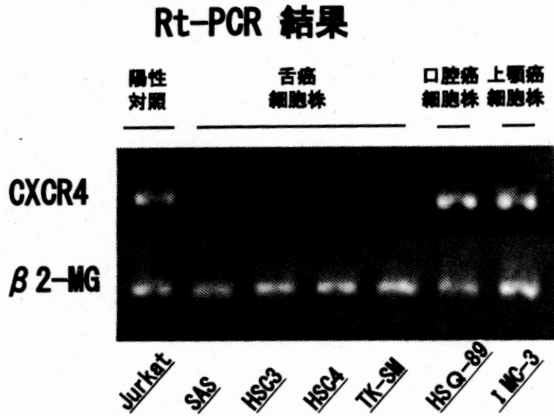
##### <Invasion Assay>

8- $\mu$ m Transwell (Coster) のメンブレン上面にマトリゲル 40  $\mu$ l で人工基底膜層を作成し、その内部に  $1 \times 10^5$  個細胞を含んだ medium を注入、200 ng/ml 濃度の SDF-1 を含んだ medium を入れた下層の 24 穴プレートに Transwell をセットし、37°C 36 時間インキュベートした。Transwell のメンブレン上層のマトリゲル層を充分除去した後、メンブレンをエタノール固定し、3 分間ヘマトキシリンで染色した。Transwell のメンブレン下層に浸潤した細胞は実体顕微鏡下で血算板を用い、16 区画 = 1 mm<sup>2</sup> あたりの平均浸潤細胞数を算出した。

#### 4. 結果

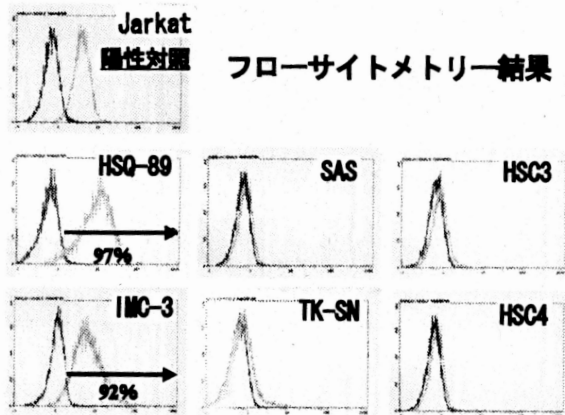
##### <RT-PCR 法>

舌癌細胞株 SAS、HSC3、HSC4、TK-SM には CXCR4 遺伝子の発現を認めなかったが、口腔癌細胞株 HSQ-89 と上顎癌細胞株 IMC-3 では CXCR4 遺伝子の明らかな発現が認められた。(下図参照)



##### <フローサイトメトリー>

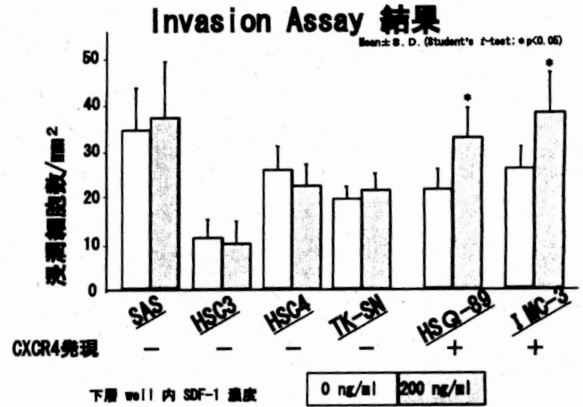
舌癌細胞株 SAS、HSC3、HSC4、TK-SM には CXCR4 タンパクの発現を認めなかったが、口腔癌細胞株 HSQ-89 と上顎癌細胞株 IMC-3 において、陽性対象である Jarkat 細胞と比較しても遜色のない CXCR4 タンパクの強い発現を認めた。(下図参照)



##### <Invasion Assay>

CXCR4 の発現を認めない舌癌細胞株 SAS、HSC3、HSC4、TK-SM では走化・浸潤性は下層 well 内の SDF-1 に影響を受けなかった。CXCR4 を強く発現し

た口腔癌細胞株 HSQ-89 と上顎癌細胞株 IMC-3 では下層ウェル内に SDF-1 を含まないものにくらべ、200ng/ml の濃度で含んでいるものが有意にメンブラン下面への浸潤細胞が多く、SDF-1 により走化・浸潤性が促進されたことが確認された。(下図参照)



#### 5. まとめ

- ・頭頸部扁平上皮癌におけるケモカインレセプター CXCR4 の発現を検討しさらにそのリガンドであるケモカイン SDF-1 が走化・浸潤性に与える影響を検討した。
- ・RT-PCR 法、フローサイトメトリーによる CXCR4 発現解析では、舌癌細胞株には発現を認めなかったが、口腔癌細胞株 HSQ-89 と上顎癌細胞株 IMC-3 において CXCR4 の発現を認めた。
- ・Invasion Assay において、CXCR4 を発現している口腔癌細胞株 HSQ-89 と上顎癌細胞株 IMC-3 において SDF-1 が有意に走化・浸潤性を促進した。

本研究により頭頸部扁平上皮癌細胞株における SDF-1/CXCR4 ケモカイン/ケモカインレセプターシステムが細胞走化・浸潤性を促進させることが証明された。今後、臨床検体を用いた *in vivo* での解析を行い、実際の頭頸部扁平上皮癌においてもこの SDF-1/CXCR4 ケモカイン/ケモカインレセプターシステムの相互作用が癌の浸潤転移に及ぼす影響を検討する予定である。