原	著
---	---

転移型ヒト口腔扁平上皮癌株細胞 HSC-3, LMF 4 および LMF 5 の発現する細胞表面分子に関する研究

新 中 康 史

東京医科歯科大学歯学部顎顔面外科学講座（主任・指導：天笠光雄教授）

東京医科歯科大学歯学部生化学講座（主任・指導：佐々木 哲教授）

（1994 年 9 月 28 日 受付）

Investigations on Cell Surface Molecules Expressed by Human Oral Squamous Carcinoma Line Cells HSC-3, LMF 4 and LMF 5, with Metastatic Potential

Yasufumi Niinaka

Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Faculty of Dentistry, Tokyo Medical and Dental University

(Chief and Director : Prof. Teruo Amagasa)

Department of Biochemistry, Faculty of Dentistry, Tokyo Medical and Dental University

(Chief and Director : Prof. Satoshi Sasaki)

Production and characterization of hemidesmosome-specific mouse monoclonal antibodies 3A1 and 8A12 raised against the oral squamous carcinoma line cells were previously reported. In this study, further investigations were carried out to characterize these antigens using those cells.

Immunoaffinity-purified 3A1 antigen was identified as a 180kD glycoprotein [205kD under reduced conditions]. Acetate membrane electrophoresis of disaccharides originating from this antigen digested by chondroitinase ABC showed that this protein was associated with hyaluronate.

Immunoprecipitates by 3A1 and 8A12 antibodies were composed of two bands : 180kD and 140kD [205kD and 125kD by reduction], and were similar to integrin $\alpha 6 \beta 4$ precipitated by monoclonal anti- $\alpha 6$ subunit antibody. Immunoprecipitation-Western Blot analysis showed that the 140kD [125kD] protein precipitated by 3A1 and 8A12 was $\alpha 6$ subunit and that the 180kD [205kD] $\beta 4$ subunit. After the $\alpha 6$ subunit was immunodepleted, only the 180kD [205kD] band was immunoprecipitated by 3A1 or 8A12. Both 3A1 and 8A12 blocked the adhesion of LMF5 cells to laminin.

These data indicated that 3A1 and 8A12 recognized integrin $\beta 4$ subunit and that integrin $\alpha 6 \beta 4$ functioned as a laminin receptor on these cells. It was suggested that hyaluronan detected in the 3A1 antigen was associated with two putative hyaluronan-binding motifs in the extracellular domain of the integrin $\beta 4$ subunit.

I. 緒 言

癌浸潤・転移のメカニズムは、癌細胞塊からの離脱、基底膜の破壊および間質への浸潤、血管内への侵入・移動、血管壁への着床、血管外への脱出といった多段階過程から成り立っていると考えられている¹⁾。これらの癌の転移過程においては、細胞—細胞間接着および細胞—基質間接着を担う各種接着分子の細胞膜表面での発現量の変化、およびそれらの機能的変化が密接に関与していると考えられている^{2,3)}。

口腔領域においては、悪性腫瘍の80%以上を占める扁平上皮癌に関する研究が主要な課題となっている^{4~8)}。最近、転移リンパ節から分離した扁平上皮癌の細胞株 HSC-2, HSC-3 および HSC-4 に関する研究が報告されている^{4,5)}。これらの株細胞は、ヌードマウスにおいて腫瘍塊を形成する特徴があり、特に、HSC-3 細胞は転移能を有し、その娘細胞 LMF 4 および LMF 5 では転移能がより高いことが示されたことから、現在までに種々の研究が進められてきた^{4,6~8)}。

扁平上皮癌株細胞 LMF 4 および LMF 5 を免疫原にしたマウス・モノクローナル抗体 3 A 1, 8 A 12 および 11 A 8 は、癌細胞を認識するとともに正常上皮細胞をも認識することが明らかにされてきた^{6~8)}。また一連の研究から、11 A 8 抗体は細胞—細胞間接着部位を認識し⁷⁾、3 A 1 および 8 A 12 抗体は細胞—基質間接着部の基底膜部位を認識していることが示された^{6~8)}。3 A 1 および 8 A 12 抗体は、正常細胞においてヘミデスモソームを特異的に認識していることが免疫組織学的に示された^{7,8)}。さらに癌細胞では、形態学的極性の消失に伴い正常上皮細胞で認められたヘミデスモソーム構造も消失するが、3 A 1 および 8 A 12 抗体に認識される抗原分子の発現は維持されていることが明らかにされてきた^{7,8)}。生化学的特徴に関しては 3 A 1 抗体が認識する抗原 (3 A 1 抗原) は分子量 180 KD で、ヒアルロン酸結合能を有することが示されている⁸⁾。

一般に、ヘミデスモソームの形態は、細胞—細胞間

間接着装置であるデスモソームを半分にしたような構造をとっており^{9,10)}、ヘミデスモソームの機能は、正常上皮基底細胞固有の細胞—基質間接着装置であり、上皮基底細胞を基底膜にアンカリングする役割をもっていると考えられる^{9,10)}。また、ヘミデスモソームの構成分子は、デスモソームの構成分子とはきわめて異なっていることが明らかとなってきた^{9~11)}。最近になってヘミデスモソームを構成する分子として、分子量 500 kD の HD 1^{12,13)}、230 kD の類天疱瘡抗原 (BP-230)^{14~16)}、180 kD の類天疱瘡抗原 (BP-180)^{17~19)}、200 kD のインテグリン β 4 鎖^{20~22)} および 140 kD のインテグリン α 6 鎖^{20~23)} の 5 種が明らかにされてきている。インテグリン α 6 鎖と β 4 鎖は、ヘテロダイマーを形成し、基底膜構成分子であるラミニンを認識していると考えられている^{24,25)}。ラミニンは、IV型コラーゲン、ファイブロネクチンとともに、三次元メッシュ・ワークを構築し、癌細胞浸潤・転移のバリアーとしての基底膜を形成していると考えられている^{9~11,26)}。

本研究では、扁平上皮癌株細胞 LM 4, LMF 5 を抗原にしてつくられたモノクローナル抗体 3 A 1 および 8 A 12 の認識する抗原分子について、さらにくわしく調べてその本態を明らかにするとともに、転移能との関連について検討を試みた。

II. 実験材料および方法

1. 細胞培養

ヒト口腔扁平上皮癌株細胞 HSC-4, 低転移型ヒト口腔扁平上皮癌株細胞 HSC-3, およびその娘株細胞で高転移型の LMF 4 および LMF 5 を用いた^{4,5)}。対照としてはヒト口腔粘膜組織から分離した低継代培養ヒト正常線維芽細胞を用いた^{7,8)}。

これらの細胞は 5% Fetal Calf Serum (FCS, Gibco) を含む Dulbecco's modified Eagle's MEM (DMEM, 日水製薬) にて 5% CO₂, 37℃ の条件下で継代培養した。再現性を確保するため、すべての実験において継代は 6 週以内とした。

2. 抗体

マウス・モノクローナル抗体 3A1 および 8A12 は、既報^{7,8)}のハイブリドーマ培養上清より得たものを用いた。すなわち、10%FCS 含有 RPMI 1640 培地 (日本製薬) にてサブコンフレントに達するまで培養したのち、無血清 RPMI 1640 培地にて 2 日間培養した。培養上清は、3,000 rpm, 4℃, 10 分遠心したのち、Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) 法にてスクリーニングしたモノクローナル抗体である^{7,8)}。また、対照として用いたモノクローナル抗体 11A8 (サブクラスは IgG₁) は同様にハイブリドーマ培養上清より得たものである⁷⁾。

ラット・モノクローナル抗体 GoH3 (抗インテグリン α 6 鎖), ラット・モノクローナル抗体 439-9B (抗インテグリン β 4 鎖), ヒト・モノクローナル抗体 5E-HY-4B (抗 230 kD 類天疱瘡抗原: BP-230), 10D-HY-8B (抗 BP-230) およびヒト類天疱瘡自己抗体 (抗 BP-180) は、それぞれ Sonnenberg 博士^{21,23)}, Kennel 博士^{27,28)} および 橋本博士¹⁵⁾ らにより供与されたものを用いた。

抗 CD44 抗体はマウス・モノクローナル抗体 BU52 (Bioscience Resource Project), 抗インテグリン β 4 鎖抗体はマウス・モノクローナル抗体 3E1 (Gibco) を用いた。また、二次抗体として抗マウス、抗ラットおよび抗ヒトのウサギ IgG 抗体 (BioMaker) を用いた。

3. 3A1 および 8A12 抗原の精製

1) 細胞粗抽出液の調製

100 mm の培養ディッシュ (Falcon) でコンフレントに達した LMF4 細胞を、Dulbecco's Phosphate Buffered-Saline (PBS, pH 7.5) で 3 回洗浄後、5 ml の緩衝液 (20 mM Tris-HCl, pH 7.8, 1% Triton X-100, 135 mM NaCl, 10 mM EDTA, 2 mM Phenylmethylsulfonyl Fluoride, PMSF) を加え、氷上で 30 分間振盪溶解した。附着細胞は、ラバーポリスマンにて機械的に剝離し、さらに 30 分間振盪溶解した。細胞残渣は、10,000 rpm, 10 分, 4℃ にて遠心することにより除去し、上清を細胞粗抽出液とした⁸⁾。

2) プロテイン A カラムによる精製

LMF4 細胞由来の抗原画分は、プロテイン A セファロース (Pharmacia LKB Biotechnology) に 3A1 および 8A12 抗体を結合させたアフィニティー・クロマトグラフィー (流速 20 ml/時間, 4℃ 冷却下) にて、抗原-抗体複合体として分画した⁸⁾。すなわち、緩衝液 (High Salt Buffer: 1.5 M Glycine, pH 8.2, 3 M NaCl または Low Salt Buffer: 1 M Tris-HCl, pH 8.2, 150 mM NaCl) にて平衡化したプロテイン A セファロース・カラム (ϕ 6 × 70 mm) に、5.0 ml (100 mg/ml) の抗体を加えて抗体吸着セファロースを作成した²⁹⁾。20 ml の緩衝液を用いて非吸着体を除去したのち、抗原結合緩衝液として Tris Buffered-Saline (TBS: 50 mM Tris-HCl, pH 8.2, 150 mM NaCl) で再平衡化した。5.0 ml の LMF4 細胞粗抽出液をカラムに注入し、余剰の非結合画分を溶出したのち、緩衝液 (20 ml) にて安定化した。緩衝液 (0.1 M Glycine-HCl, pH 4.5) を用い、280 nm による連続測定 (UV-Detector model 3810, Anatech) を行い、抗原-抗体複合体として分画溶出した。溶出物は、1 M Tris-HCl (pH 8.0) にてただちに中和し、脱塩 (PD-10 カラム, Pharmacia) 後、凍結乾燥 (Dura-Dry, FTS System, Inc., USA) した。

3) G-DEAE 高速液体クロマトグラフィーによる精製

抗原-抗体複合体を、結合緩衝液 (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 6 M Urea) にて溶解して複合体を解離させ、陰イオン交換カラム G-DEAE (protein PAK, Millipore Waters Chromatography) に注入し、0-500 mM NaCl 直線濃度勾配による緩衝液 (30 分, 1 ml/分) にて 3A1 抗原のみを単離溶出 (Waters 600 Multisolute Delivery System, Millipore) した。

4. 電気泳動および Western Blot

1) Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

SDS-PAGE は、Laemmli³⁰⁾ らの方法に準じて行った。試料は、非還元あるいは 1% 2-Mer-

captoethanol で還元試料とした。各試料は、6 M Urea を含む Laemmli の SDS サンプル緩衝液 (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 1 % SDS, 10% Glycerol) にて 100°C, 5 分で変性し、5-20% 濃度勾配ゲルおよび 8 % 分離用ゲルを用い、Tris-Glycine 緩衝液 (pH 8.0) にて 125 V, 5 時間泳動した。また既知分子量マーカーとして、分子量 200 kD (Myosin), 116 kD (β -Galactosidase), 97 kD (Phosphorylase b), 67 kD (Bovine serum albumin), 45 kD (Ovalbumin), 31 kD (Carbonic anhydrase), 21 kD (Soybean trypsin inhibitor), 14 kD (Lysozyme) および 6.5 kD (Aprotinin, Bio-Rad Laboratories) を用いた。ゲルの染色は、Coomassie Brilliant Blue (CBB) によって 15 分間染色後、脱色 (5 % メタノールを含む 7.5 % 酢酸溶液) した。

2) Western Blot

Western Blot による分析は、Burnette³¹⁾らの方法に準じて行った。電気泳動展開後のゲルは、ブロッティング装置 (マリソル社) によって Glycine 緩衝液 (25 mM Tris, pH 8.7, 192 mM Glycine, 0.02% SDS, 20% Methanol) にて定電圧 30 V, 90 分通電して、Polyvinylidene difluoride (PVDF: Immobilon-P, Millipore) 膜または、ニトロセルロース膜 (BA 85, Schleicher & Schuell, Germany) に転写した。転写膜は、1 % FCS を含む TBS (pH 7.5) にて室温 30 分 2 回、または 4 °C 一晩処理した後、一次抗体と TBS 中で、室温 1 時間、または 4 °C 一晩反応させた。一次抗体 3 A 1, 8 A 12, GoH 3, 439-9 B, BU-52, 5 E-HY-4 B および類天疱瘡自己抗体は、それぞれ 1 : 500, 1 : 500, 1 : 250, 1 : 200, 1 : 500, 1 : 500 および 1 : 300 倍に希釈したものを用いた。0.05% Tween 20 を含む TBS, pH 7.4 (TB-ST) を用いて室温にて、5 分、1 回、および TBS (pH 7.4) を用いて室温、5 分、2 回洗浄後、Horse Radish Peroxidase (HRPO) により標識された二次抗体と室温、1 時間反応させた。発色は、0.2 mg/ml の 4-Chloro-1-Naphthol と 0.1% H₂O₂ にて行った。

5. コンドロイチナーゼ ABC 消化とアセテート膜電気泳動

精製した 0.5 g の 3 A 1 抗原および 3 A 1 抗体は、緩衝液 (40 mM Tris-HCl, pH 8.0, 40 mM 酢酸ナトリウム) 中で、0.5 U のコンドイチナーゼ ABC (生化学工業) にて、37°C, 15 時間反応消化させた。消化産物は脱塩 (PD-10 カラム)、凍結乾燥したのち、0.3 M 酢酸カルシウム溶液に溶解した³²⁾。アセテート膜電気泳動は、0.3 M 酢酸カルシウム溶液で平衡化させたアセテート・ニトロセルロース膜 (SEPARAX-S, 常光社) を用い、1.0 mA/cm, 2 時間の条件にて泳動した。既知標準二糖には、ヒアルロン酸、デルマタン硫酸、コンドロイチン 4 硫酸、コンドロイチン 6 硫酸由来の二糖 (生化学工業) を用いた。泳動後の膜は、0.1% 酢酸を含む 0.1% Alcian Blue (ALB) にて 15 分染色後、水洗乾燥した。

6. 免疫沈降

1) 細胞産生蛋白の標識

100 mm 培養ディッシュでサブコンフレントに達した HSC-4, HSC-3, LMF 4, LMF 5 および正常線維芽細胞の培地を除去したのち、PBS で 3 回洗浄し、5 ml の Methionine 非含有 DMEM (Gibco BRL) を加え、FCS を終量 1 % になるように加えた。その後、[³⁵S] で標識された Methionine と Cysteine の混合物 (Tran³⁵S-label, ICN Radiochemicals) を加え (終量 0.1 mCi/ml), 完全培地としたのち、37°C, 5 % CO₂ の条件下で 15 時間培養して細胞産生蛋白の標識を行った。

2) 免疫沈降反応

本反応は、すべて氷上もしくは 4 °C にて以下のごとく行った²⁹⁾。標識された培養細胞は、培地を除去し、5 ml の緩衝液 (20 mM Tris-HCl, pH 7.8, 1 % Triton X-100, 1 % Deoxycholate, 1 % Aprotinin, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, 2 mM PMSF) を加えて 30 分間振盪溶解させた。細胞残渣は、遠心 (3,000 rpm, 10 分) にて除去した。得られた細胞溶解液は、1.5 ml チューブ内で一次抗体と 1 時間反応させた。一次抗体 3 A 1, 8 A 12, GoH 3, 10 D-HY-8 B, 類天疱瘡自己抗体および

BU-52 は、それぞれ 1 : 40, 1 : 40, 1 : 20, 1 : 20, 1 : 20 および 1 : 20 なる希釈倍率とした。二次抗体と 30 分間反応させたのち、プロテイン A セファロース・ビーズを加え、1 時間振盪させた。ビーズに吸着した抗原-抗体複合体は、非特異的吸着を除去するため、緩衝液 (20mM Tris-HCl, pH 7.8, 1% Triton X-100, 0.5% Deoxycholate, 0.5 M NaCl) にて 6 回洗浄した。

3) オートラジオグラフィー

免疫沈降した抗原-抗体複合体は、SDS-PAGE により分離し、CBB 染色、固定乾燥を行った。X-OMAT RP フィルム (Eastman Kodak) をゲルに重ね 3 ~ 5 日間、-80℃ に放置し、オートラジオグラフィーを行った。

4) Immunodepletion

標識された LMF 5 細胞溶解液 (4.5 ml) に GoH 3 抗体 (1 ml, 75 mg/ml) を加え、4℃ 一晩反応させたのち、二次抗体による反応 (4℃, 1 時間) を行った。さらに反応溶液はプロテイン A セファロース・ビーズにて GoH 3 反応陽性画分を枯渇 (Immunodepletion) させた。得られた上清は、免疫沈降反応に用い、オートラジオグラフィー (7 日間) を行った。

5) 免疫沈降-Western Blot

非標識細胞抽出物よりの免疫沈降物を還元および非還元試料とし、SDS-PAGE、ニトロセルロース膜を用いた Western Blot を行い、3A1, 8A12, 3E1 および GoH 3 の各抗体を用いた染色を行った。3A1, 8A12, GoH 3 および 3E1 の各抗体は、それぞれ 1 : 500, 1 : 500, 1 : 250 および 1 : 1,000 倍希釈したものをを用いた。

7. 細胞接着阻害実験

コーティングされていない 100 mm プラスチック・ディッシュ (栄研器材) を 100 mg/ml の I 型コラーゲン、IV 型コラーゲンまたはラミニン (Collaborative Research, Inc.) で 4℃ 一晩処理してコーティングしたのち、風乾して以後の実験に供した。

1.0×10⁶個の LMF 5 細胞を、100 mg/ml の 3A1, 8A12 または 11A8 抗体と 4℃ で 30 分間前

処理したのち、各ディッシュに注入し、5%CO₂, 37℃ で 90 分間放置後、細胞数を計測して全細胞数とした。さらに、PBS にて 1 回洗浄したのち、基質に接着した細胞数を計測し接着細胞数とした。同じ実験を 3 回行い、平均を求め、標準偏差を求めた。

III. 結 果

1. 3A1 抗原のアフィニティークロマトグラフィーによる精製

プロテイン A セファロース・カラムに 3A1 抗体を抗体結合緩衝液を用いて吸着させることにより、アフィニティー・カラムを作製した。3A1 抗体のサブクラスは、IgG_{2a} に属すると報告されていることから⁷⁾、IgG_{2a} のプロテイン A へのアフィニティーを高めることが知られている Low Salt Buffer (1 M Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 8.2) を抗体結合緩衝液として用いた²⁹⁾が、3A1 抗体のプロテイン A への結合は弱かった。そこで IgG₁ のプロテイン A へのアフィニティーを高めることが知られている High Salt Buffer (3 M NaCl, 1.5 M Glycine, pH 8.2) を用いたところ、3A1 抗体はプロテイン A に結合し、細胞粗抽出画分を注入したのちも安定で、抗原-抗体複合体の回収が可能であった。

同様に、IgG_{2a} に属すると報告されている 8A12 抗体⁷⁾についてもアフィニティー・カラムの作製を試みた。8A12 抗体は Low Salt Buffer を用いた場合においてのみプロテイン A に弱いながらも結合することが確認されたが、細胞粗抽出画分の注入によりプロテイン A からの遊離が確認され、抗原-抗体複合体の回収は不可能であった。

回収した 3A1 抗原-抗体複合体の抗体は、6 M Urea を用いて変性させ、抗原から解離させた。解離した抗体を G-DEAE カラムへ吸着させ、抗原は非吸着画分として溶出し精製した。

精製した 3A1 抗原の SDS-PAGE を、図 1 A; lane 1 および lane 2 に示した。精製 3A1 抗原の分子量は、主要画分として非還元状態 (lane

図 1 A アフィニティー精製 3 A 1 抗原の分子量：lane 1, 2 は、8 % SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動の結果を示す (CBB 染色)。lane 3, 4 は、3 A 1 抗体を用いた lane 1, 2 の Western Blot を示す。lane 1, 3 は非還元、lane 2, 4 は還元を示す

図 1 B アセテート・ニトロセルロース膜電気泳動 (ALB 染色)：lane 2 は、アフィニティー精製 3 A 1 抗原をコンドロイチナーゼ ABC で消化後、消化産物を電気泳動した結果を示す。lane 1 は、対照として 3 A 1 抗体の消化産物を示す。標準二糖として、HA；ヒアルロン酸、DS；デルマタン硫酸、C4S；コンドロイチン-4-硫酸、C6S；コンドロイチン-6-硫酸由来の二糖を示す

1) で 180 kD を示し、その他 160, 130 kD の存在が示された。還元状態 (lane 2) では、205 kD が主要画分として示され、その他約 170 kD の画分

が認められた。3 A 1 抗体を用いた Western Blot は、図 1 A；lane 3 (非還元) および lane 4 (還元) に示した。3 A 1 抗原の主要画分の分子量は、非還元状態で 180 kD を示し、還元状態では 205 kD を示した。転写膜上の精製 3 A 1 抗原は、8 A 12 抗体、抗 CD 44 抗体 BU 52、抗 $\alpha 6$ 抗体 GoH 3、抗 BP-230 抗体 5 E-HY-4 B および抗 BP-180 類天疱瘡自己抗体では検出されなかったが、抗 $\beta 4$ 抗体である 439-9 B と反応した。しかし、PVDF 膜上の 3 A 1 抗原は、3 A 1 抗体では検出されなかった。

3 A 1 抗原への結合糖鎖は、コンドロイチナーゼ ABC により二糖単位まで消化させ、消化産物をアセテート・ニトロセルロース膜電気泳動することにより検出した (図 1 B)。コンドロイチナーゼ ABC 処理した精製 3 A 1 抗原からは、デルマタン硫酸 (DS)、コンドロイチン-4-硫酸 (C4S) およびコンドロイチン-6-硫酸 (C6S) は検出されなかったが、ヒアルロン酸 (HA) の二糖のみが検出された (図 1 B；lane 2)。また、抗体のみをコンドロイチナーゼ ABC 処理した対照には、ヒアルロン酸の分解産物は検出されなかった (図 1 B；lane 1)。

2. 免疫沈降

高転移型口腔扁平上皮癌株細胞 LMF 4 を用いた免疫沈降反応を図 2 に示した。3 A 1 抗体および 8 A 12 抗体による免疫沈降物は、両抗体ともに非還元状態では 180 kD と 140 kD から構成されており (図 2 A；lane 1, 2)、還元状態では、205 kD, 125 kD および 30 kD (矢印) から構成されていた (図 2 B；lane 1, 2)。これらのバンドは、非還元状態 (図 2 A；lane 3) においても、還元状態においても、抗 $\alpha 6$ 抗体 GoH 3 による免疫沈降物のバンド (図 2 B；lane 3) に近似していた。抗 $\alpha 6$ 抗体 GoH 3 による免疫沈降物には、非還元状態で 110 kD および還元状態で 130 kD の $\beta 1$ 鎖に相当するバンド^{21,33,34)}は確認されなかった。

図 3 は、口腔扁平上皮癌細胞 HSC-3, HSC-4 および正常ヒト線維芽細胞における免疫沈降による反応性について検索したものを示した。3 A 1

図2 LMF 4細胞の免疫沈降 (5-20%ゲル) : A は非還元, B は還元; lane 1 は 3 A 1 抗体による沈降物を, lane 2 は 8 A 12 抗体による沈降物を, lane 3 は GoH 3 抗体による沈降物を示す。矢印は 30 kD のバンドを示す

図3 口腔扁平上皮癌 (HSC-3 および HSC-4) および正常線維芽細胞 (Fibroblast) の免疫沈降 (5-20%ゲル) : いずれも還元; lane 1 は 3 A 1 抗体による免疫沈降物を示し, lane 2 は 8 A 12 抗体による免疫沈降物を示した。lane 3 は一次抗体を省略したネガティブ・コントロールを示す

抗原は, 図 3 ; lane 1 でみられるように, HSC-3 および HSC-4 細胞では検出されるが, 線維芽細胞では検出されないことが確認された。同様に 8 A 12 抗原は, 図 3 ; lane 2 でみられるように扁平上皮癌細胞では検出されるが, 線維芽細胞では検出されず, これまでの根岸, 指出^{7,8)}らの報告に一致していた。また, 3 A 1 抗体によって沈降されたバンド (図 3 ; lane 1) は, 8 A 12 抗体によって沈降されたバンド (図 3 ; lane 2) と同一パターンであることが, HSC-3 および HSC-4 各細胞においても示された。

高転移型扁平上皮癌細胞 LMF 5 を用いた, 抗 BP-230 抗体 10 D-HY-8 B および抗 BP-180 類天疱瘡自己抗体による免疫沈降は, 図 4 A ; lane 4 および図 4 B ; lane 4 に示した。3 A 1 抗体, 8 A 12 抗体および抗 $\alpha 6$ 抗体 GoH 3 による免疫沈降物の電気泳動パターンは, それぞれ近似していることが LMF 5 細胞においても示された。しかし, これらの泳動パターンは, 抗 BP-230

図4 LMF 5細胞の免疫沈降 (8%ゲル) : A は非還元, B は還元; それぞれ, lane 1 は GoH 3 抗体, lane 2 は 3 A 1 抗体, lane 3 は 8 A 12 抗体, A の lane 4 は 10 D-HY-8 B 抗体, B の lane 4 は類天疱瘡自己抗体による沈降物を示す。lane 5 は一次抗体を省略したネガティブ・コントロールを示す

図5 LMF5細胞の免疫沈降物の Western Blot : 各抗体による沈降物を還元 (A) および非還元 (B) にて電気泳動 (8%ゲル) し, ニトロセルロース膜に転写後, 3E1 抗体 (A) および GoH3 抗体 (B) を用いて染色した Western Blot を示す。lane 1 は一次抗体を省略したネガティブ・コントロールを示す。lane 2 は 3E1 抗体, lane 3 は 3A1 抗体, lane 4 は 8A12 抗体, lane 5 は GoH3 抗体による沈降物を示す

抗体 10D-HY-8B および抗 BP-180 類天疱瘡自己抗体による沈降物とは異なることが示された (図4A; lane 4 および図4B; lane 4)。

3. 免疫沈降-Western Blot

抗 $\alpha 6$ 抗体 GoH3, 3A1 抗体および 8A12 抗体による LMF4 細胞の免疫沈降物の Western Blot を図5に示した。抗 $\beta 4$ 抗体 3E1 (図5A) および抗 $\alpha 6$ 抗体 GoH3 (図5B) を用いて検出したものを示した。これらの抗体による免疫沈降で共通に認められた 205 kD のバンドは, いずれも抗 $\beta 4$ 抗体 3E1 反応陽性 ($\beta 4$ 鎖) であることが示された (図5A)。同様に, 3A1 抗体を用いた場合にも 205 kD のバンドはすべて 3A1 抗体反応陽性を示した。また, 125 kD のバンドはすべて抗 $\alpha 6$ 抗体 GoH3 反応陽性 ($\alpha 6$ 鎖) であった (図5B)。

4. Immunodepletion

LMF5 細胞の細胞溶解液のなかに含まれるインテグリン $\alpha 6$ 鎖を, 抗 $\alpha 6$ 抗体 GoH3 を用いて枯渇 (Immunodepletion) させたのち, 3A1, 8

図6 LMF5細胞のImmunodepletion : いずれも還元; GoH3 抗体を用いて $\alpha 6$ 鎖を除去したサンプルの免疫沈降 (8%ゲルを使用); lane 1 は GoH3 抗体, lane 2 は 3A1 抗体, lane 3 は 8A12 抗体, lane 4 は BU52 抗体による沈降物を示す。lane 5 は一次抗体を省略したネガティブ・コントロールを示す

A12 および GoH3 各抗体を用いた免疫沈降を行い, 各抗体の反応性について検討した。これらの抗体による免疫沈降物は図6に示した。抗 $\alpha 6$ 抗体 GoH3 による Precleaning により LMF5 細胞の $\alpha 6$ 鎖を枯渇させた上清には, 遊離の $\alpha 6$ 鎖とともに $\alpha 6\beta 4$ ヘテロダイマーの枯渇が示された (図6; lane 1)。3A1 抗体および 8A12 抗体による免疫沈降物に認められていた 125 kD ($\alpha 6$ 鎖) のバンドは検出されなくなったが, 205 kD ($\beta 4$ 鎖) のバンド (図5; lane 2 および lane 3) は検出された。また, 抗 CD44 抗体 BU52 と 3A1 抗原である 205 kD のバンドとの反応性は示されなかった。

5. 細胞接着阻害実験

3A1 および 8A12 抗体のインテグリン $\beta 4$ 鎖の認識性を, 細胞外基質であるラミニンを用いた

図7 LMF 5細胞の細胞外基質への接着阻害実験：ラミニン (LN), I型コラーゲン (IC), IV型コラーゲン (IVC) をコーティングしたディッシュに 1.0×10^6 個の LMF 5 細胞を 3A1 または 8A12 各抗体とともに用い, 全細胞数および接着細胞数を計測。11A8 抗体は対照として用いた。結果は%阻害で示した。一は, ± 1 S.D. を示す

細胞接着阻害実験によって検索した(図7)。3A1 および 8A12 抗体はともに, LMF 5 細胞のラミニンへの接着を 80~90% 阻害したが, I 型コラーゲンや IV 型コラーゲンに対する接着には阻害能を示さなかった。

V. 考 察

1. 3A1 抗原および 8A12 抗原について

3A1 抗原の精製は, プロテイン A セファロースを用いたアフィニティー・クロマトグラフィーにより行われ, 扁平上皮癌株細胞 LMF 4 からの精製物は, 分子量 180 kD を主要画分とした複数の分子から構成されていた。しかし, 3A1 抗体との反応性は分子量 180 kD の分子にのみ認められ, この抗原分子はヒアルロン酸結合能を有していたと報告されている⁸⁾。本研究では, 分子量 180 kD の 3A1 抗原の精製を試み, これまでに報告されてきたヒアルロン酸レセプターである CD 44 および 5 種類のヘミデスモソーム構成分子との相違について検討した。

精製された 3A1 抗原分子は, SDS-PAGE および Western Blot において非還元状態で分子量

180 kD, 還元状態で 205 kD を示した(図1)。抗 CD 44 抗体 BU-52 を用いた Western Blot では, 3A1 抗原に対し全く反応しなかった。抗 BP-230 抗体 5E-HY-4B および抗 BP-180 類天疱瘡自己抗体を用いた Western Blot でも, 3A1 抗原に対し全く反応しなかった。よって 3A1 抗原は, CD 44 や類天疱瘡抗原とは異なる分子であることが示された。また, 同様に近似の分子量を示すインテグリン $\alpha 6$ 鎖(分子量 140 kD, 還元時 125 kD および 30 kD) および $\beta 4$ 鎖(分子量 180 kD, 還元時 205 kD) である可能性については, 抗 $\alpha 6$ モノクローナル抗体 GoH 3 および抗 $\beta 4$ モノクローナル抗体 439-9B を用いた Western Blot により検討した。これらの結果, 分子量 180 kD の 3A1 抗原は, 抗 $\alpha 6$ 抗体とは反応せず, 抗 $\beta 4$ 抗体とのみ反応が認められ, 3A1 抗原はインテグリン $\beta 4$ 鎖に相当するものと考えられた。

一般に, 抗 $\alpha 6$ 抗体 GoH 3 は, $\alpha 6$ 鎖を免疫沈降させるとともにヘテロダイマーを形成する β 鎖をも共沈させることが知られている^{21,33,34)}。共沈する β 鎖としては, $\beta 1$ 鎖(分子量 110 kD, 還元時 130 kD) と $\beta 4$ 鎖が知られている^{24,35~37)}。そこで, 扁平上皮癌株細胞 HSC-4, HSC-3, LMF 4 および LMF 5 を用いて免疫沈降を行い, 抗 $\alpha 6$ 抗体 GoH 3 による共沈画分を検索したところ, 分子量 180 kD, 還元時 205 kD の分子量をもったインテグリン $\beta 4$ 鎖が共沈された(図5A)。この共沈された $\beta 4$ 鎖は, 3A1 抗原の分子量と一致するものであった(図2, 4)。さらに, 3A1 抗体による免疫沈降物のバンドは抗 $\alpha 6$ 抗体 GoH 3 抗体による免疫沈降物のバンドと共通の分子量 140 kD を呈し, インテグリン $\alpha 6$ 鎖(分子量 140 kD) の存在が確認された(図5B)。すなわち, 3A1 抗体の認識する抗原分子は, 分子量 180 kD のインテグリン $\beta 4$ 鎖であり, 分子量 140 kD の $\alpha 6$ 鎖とヘテロダイマーを形成していることを示唆するものであった。

また, モノクローナル抗体 8A12 の認識する抗原は, 扁平上皮癌株細胞 HSC-4, HSC-3, LMF 4 および LMF 5 を用いた免疫沈降実験(図

2～4), 免疫沈降—Western Blot (図5), Immunodepletion 実験 (図6) より, 3A1 抗原と同様に $\beta 4$ 鎖であることが明らかとなった。

2. 癌の浸潤・転移と $\alpha 6 \beta 4$ インテグリン

インテグリンは, α 鎖1分子と β 鎖1分子とが会合してヘテロダイマーを形成し, 細胞—細胞間接着^{38,39)}あるいは細胞—基質間接着^{39,40)}を担う膜貫通型レセプターとして機能していることが明らかになっている。現在 α 鎖として14種類, β 鎖として8種類が報告されており, このなかで $\alpha 4$ 鎖, $\alpha 6$ 鎖および αv 鎖は, α 鎖としては例外的に複数の β 鎖と会合することができ, 会合する β 鎖の種類によりサブファミリーに分類されている⁴¹⁾。

細胞の癌化に伴い, 細胞—細胞間接着を担うインテグリン $\beta 1$ サブファミリーの発現は減少し^{42～45)}, 細胞—基質間接着を担うインテグリン $\alpha 6 \beta 1$ の発現はむしろ増加する^{46,47)}ことが知られている。インテグリン $\alpha 6 \beta 1$ は, 癌細胞の浸潤初期における3段階^{1,48)}(基底膜の認識, 基底膜の破壊, 間質への浸潤)のうち, “基底膜の認識”にラミニンレセプターとして重要な役割を演じていることが知られている^{34,48,49)}。

一方, インテグリン $\alpha 6 \beta 4$ は正常上皮基底細胞の基底面のみに発現していることが知られ, 最近ヘミデスモソームに局在することが明らかになってきている^{20～22)}。癌化により, 細胞の形態的極性は消失し, ヘミデスモソーム構造も不明瞭化, 消失することが知られている^{7,8,50)}。しかしながら, $\alpha 6 \beta 4$ は基底面のみならず, 細胞—細胞間にも発現されるようになり, その発現は増強されることが, 頭頸部扁平上皮癌をはじめ^{50,51)}, 皮膚癌⁵²⁾, 乳癌⁵³⁾, 肺癌⁵⁴⁾における研究から報告されている。 $\alpha 6 \beta 4$ は大腸癌細胞においてラミニンレセプターとして機能しているが²⁴⁾, 最近遺伝子工学的手法により, ラミニンおよびラミニンのバリエーションである Kalinin のレセプターとしても機能していることが明らかにされてきた²⁵⁾。本研究における高転移型ヒト口腔扁平上皮癌株細胞 LMF 5 では, インテグリン $\alpha 6 \beta 4$ がラミニンレセプター

として機能していることが示唆された(図7)。このように, ヒト口腔扁平上皮癌においては, インテグリン $\alpha 6 \beta 1$ の発現は弱く, インテグリン $\alpha 6 \beta 4$ がラミニンレセプターとして機能することで, HSC-3, LMF 4 および LMF 5 の各細胞は, 浸潤・転移能を獲得したものと考えられた。

3. ヒアルロン酸結合能と接着分子

ヒアルロン酸は, 癌の浸潤・転移能との相関において重要な役割を担っているものとして注目されている。これまで, ヒアルロン酸をリガンドとする接着分子としての CD 44 あるいは RHAMM を異常発現する癌においては, 游走能や転移能が高まるとする報告がある^{55～62)}。

一般に, ヒアルロン酸結合モチーフは, **B**[X 7] **B** の構造を有するものと考えられている⁶³⁾。すなわち, **B** は, Arginine (**R**) または Lysine (**K**) の塩基性アミノ酸を示し, **X 7** は, 酸性アミノ酸を含まない7残基のアミノ酸で, このうち1残基以上の塩基性アミノ酸(**R**または**K**)を含むアミノ酸配列としている。この点, 3A1 抗体によってその存在が明らかとなった $\alpha 6 \beta 4$ インテグリンは, アミノ酸配列から, $\alpha 6$ 鎖²³⁾の細胞外領域に相当する 337-345 残基 **R**[WNNVKPI]**R** の結合モチーフが1箇所存在することが認められた。また, $\beta 4$ 鎖^{64,65)}の細胞外領域においては, 150-158 残基 **K**[KMGQNLA]**R** と 394-402 残基 **R**[TGSFHIR]**R** の2箇所の結合モチーフが存在することが明らかとなった。

すなわち, 本研究において3A1 抗原であるインテグリン $\beta 4$ 鎖から検出されたヒアルロン酸は, これらのモチーフを介して結合していたと考えられる。また, 結合モチーフは $\alpha 6$ 鎖および $\beta 4$ 鎖のいずれにも見い出されることから, $\alpha 6 \beta 4$ インテグリン分子はヒアルロン酸結合タンパクであることが示唆された。

4. 3A1 抗体および 8A12 抗体のエピトープについて

株細胞 LMF 4, LMF 5 を用いた 3A1 および 8A12 抗体の免疫沈降物には, $\alpha 6 \beta 4$ インテグリン構成分子 (140, 180 kD) 以外に 160 kD および

130 kD 分子の弱いバンドが認められた(図2)。これらの弱いバンドは精製 3 A 1 抗原においても確認された(図1)。これらの弱いバンドに関して、Potts³⁵⁾および Giancotti³⁶⁾らは、 α 6 鎖および β 4 鎖を認識する抗体と Ca^{2+} 依存性プロテアーゼ・インヒビターを用いたインテグリン α 6 β 4 の分子の研究から、 β 4 鎖の細胞内領域(C 末端側)が Ca -プロテアーゼの影響により部分分解を受けると報告している。したがって、3 A 1 および 8 A 12 両抗体は、 β 4 鎖(180 kD) およびその細胞内領域の部分分解を受けた β 4 鎖(160 kD および 130 kD) を認識したものと考えられ、細胞外領域(N 末端側)をエピトープとする抗体であると推定された。さらにこれらの抗体は、LMF 5 細胞のラミニンへの接着を著明に阻害したことから、インテグリン β 4 鎖のうちラミニンへの接着に重要な領域をエピトープとしている可能性が示唆された。

また、3 A 1 抗体は、ニトロセルロース膜上の、 β 4 鎖を認識したが PVDF 膜では認識しなかった。すなわち、 β 4 鎖の一次構造が有する立体構造の膜上での還元回復の程度によって抗体の親和力が異なることが示された。したがって、3 A 1 抗体の認識するエピトープは、PVDF 膜上では不安定であったが、ニトロセルロース膜では安定した親和力と構造の還元が認められ、3 A 1 抗体は少なくとも β 4 鎖の特定の一次構造の部分をエピトープとして認識していると考えられた(図1)。

一方、8 A 12 抗体は、組織学的にヘミデスモソーム構成分子を認識することがすでに明らかとなっている^{6,7)}。また本研究から 8 A 12 抗体はインテグリン β 4 鎖の認識を示したが、両転写膜上の抗原分子に対する親和性が認められなかったことから、 β 4 鎖の特定の立体構造をエピトープとして認識している可能性が考えられた。

5. 3 A 1 抗体および 8 A 12 抗体のプロテイン A へのアフィニティーについて

マウス・モノクローナル抗体のサブクラスの種類で、Harlow²⁹⁾らは、プロテイン A セファロース・アフィニティー・カラムを用い、抗体結合緩衝液として Low Salt Buffer (1 M Tris-HCl,

150 mM NaCl, pH 8.2) を用いると、IgG_{2a} および IgG_{2b} のプロテイン A へのアフィニティーは高く、IgG₃ も比較的高いが、IgG₁ のプロテイン A へのアフィニティーは低くなる。逆に、High Salt Buffer (3 M NaCl, 1.5 M Glycine, pH 8.2) を用いると、IgG₁ のプロテイン A へのアフィニティーは高くなると記載している。この点、3 A 1 抗体は、High Salt Buffer を用いることによってプロテイン A によく結合したが、Low Salt Buffer での結合は弱かった。このことから 3 A 1 抗体のサブクラスは、IgG_{2a} と報告されている⁷⁾ が、プロテイン A へのアフィニティーから、IgG₁ に属するものと考えられた。一方、8 A 12 抗体は、Low Salt Buffer でのみプロテイン A への若干の結合が確認されたことから、報告された IgG_{2a} に属する⁷⁾ と考えられた。しかし、抗原画分の付加によりプロテイン A からの 8 A 12 抗体の遊離が確認されたことから、8 A 12 抗体のプロテイン A へのアフィニティーは、抗原に対するアフィニティーよりも低いことが示された。

V. 結 論

転移型ヒト口腔扁平上皮癌株細胞 HSC-3, LMF 4 および LMF 5 の発現する分子の特徴について検討した。特に、ヘミデスモソーム特異的マウス・モノクローナル抗体 3 A 1 および 8 A 12 の認識する抗原分子の構造と性質に関して以下の結論が得られた。

1. 3 A 1 抗原および 8 A 12 抗原は、ともにインテグリン β 4 サブユニットであり、インテグリン α 6 サブユニットとヘテロダイマーを形成し、インテグリン α 6 β 4 分子として存在するものと考えられた。

2. 転移型口腔扁平上皮癌株細胞では、インテグリン α 6 β 1 の発現は弱く、強い発現を示したインテグリン α 6 β 4 が、ラミニン・レセプターとして機能していることが示された。よって HSC-3, LMF 4 および LMF 5 細胞は、機能的なインテグリン α 6 β 4 を発現することにより、浸潤・転移能を獲得していると考えられた。

3. インテグリン $\alpha 6 \beta 4$ は転移型口腔扁平上皮癌細胞において、ヒアルロン酸結合蛋白としても機能し、ヒアルロン酸結合能を有する分子を発現することにより、浸潤・転移能を高めるものと考えられた。

4. 3A1 抗体および 8A12 抗体はともにインテグリン $\beta 4$ サブユニットの細胞外領域を認識し、3A1 抗体の認識するエピトープは、特定の一次構造部分であり、8A12 の認識するエピトープは、特定の立体構造であることが示唆された。

5. 3A1 抗体のプロテイン A へのアフィニティーは高く、3A1 抗体のサブクラスはプロテイン A へのアフィニティーから IgG₁ に属し、8A12 抗体のプロテイン A へのアフィニティーは低いことが示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、終始懇篤なるご指導とご校閲を賜りました歯学部顎顔面外科学講座天笠光雄教授ならびに歯学部生化学講座佐々木 哲教授に深甚なる謝意を表します。また、終始直接親切なるご指導とご校閲を賜りました歯学部生化学講座高木 亨博士に謹んで感謝の意を表しますとともに、本研究の遂行にあたり多大なるご指導とご助言を賜りました口腔病理学講座一條秀憲博士、口腔外科学第 1 講座百瀬文雄博士ならびに根岸明秀博士に心より深謝申し上げます。あわせて本研究に際し、ご支援とご協力を賜りましたネーデルランド癌研究所 A. Sonnenberg 博士、オークリッジ国立研究所 S. J. Kennel 博士ならびに慶應義塾大学橋本 隆博士に心より深謝申し上げます。さらに、終始暖かいご支援とご助言を賜りました歯学部生化学講座、口腔外科学第 1 講座ならびに口腔病理学講座の諸先生方に厚くお礼申し上げます。

なお、本研究の要旨の一部は、第 38 回日本口腔外科学会総会（平成 5 年 10 月 21 日、新潟）において発表した。

文 献

- 1) Liotta, L. A., Rao, C. N. and Barsky, S. H. : Tumor invasion and the extracellular matrix. *Lab. Inv.* 49 : 636-649, 1983.
- 2) Guirguis, R., Margulies, I., Taraboletti, G., Schiffmann, E. and Liotta, L. : Cytokine-induced pseudopodial protein is coupled to tumor cell migration. *Nature*. 329 : 261-263, 1987.
- 3) 済木育夫, 米田純也 : 細胞接着分子と癌転移. *実験医学* 10 : 278-284, 1992.
- 4) Momose, F., Araida, T., Negishi, A., Ichijo, H., Shioda, S. and Sasaki, S. : Variant sublines with different metastatic potentials selected in nude mice from human oral squamous cell carcinoma. *J. Oral Pathol. Med.* 18 : 391-395, 1989.
- 5) Ichijo, H., Momose, F. and Miyazono, K. : Biological effects and binding properties of transforming growth factor- β on human oral squamous cell carcinoma cells. *Exp. Cell Res.* 187 : 263-269, 1990.
- 6) Negishi, A., Sashide, Y., Momose, F., Shioda, S., Takagi, T., Sasaki, S. and Segawa, A. : Production of a monoclonal antibody to oral squamous cell carcinoma—a monoclonal antibody that specifically recognizes hemidesmosome. *Jpn. Tissue Culture Society for Dent. Res.* 25 : 45-47, 1989.
- 7) 根岸明秀 : ヘミデスモソーム特異的モノクローナル抗体の作製と扁平上皮癌診断への応用. *口病誌* 57 : 86-98, 1990.
- 8) 指出 豊 : ヘミデスモソーム関連抗原の発現とその生化学的性質. *口病誌* 59 : 181-195, 1992.
- 9) Schwarz, M. A., Owaribe, K., Kartenbeck, J. and Franke, W. W. : Desmosomes and hemidesmosomes : constitutive molecular components. *Annu. Rev. Cell Biol.* 6 : 461-491, 1990.
- 10) Legan, P. K., Collins, J. E. and Garrod, D. R. : The molecular biology of desmosomes and hemidesmosomes : 'What's in a name?' *Bio Essays* 14 : 385-393, 1992.
- 11) Jones, J. C. R., Asmuth, J., Baker, S. E., Langhoffer, M., Roth, S. I. and Hopkinson, S. B. : Hemidesmosome : extracellular matrix / intermediate filament connectors. *Exp. Cell Res.* 213 : 1-11, 1994.
- 12) Hieda, Y., Nishizawa, Y., Uematsu, J. and Owaribe, K. : Identification of a new hemidesmosomal protein, HD 1 : a major, high molecular mass component of isolated hemidesmosome. 1992 *J. Cell Biol.* 116 : 1497-1506, 1992.
- 13) Owaribe, K., Nishizawa, Y. and Franke, W. W. : Isolation and characterization of hemidesmosomes from bovine corneal epithelial cells. *Exp. Cell Res.* 192 : 622-630, 1991.
- 14) Thacher, S. M., Malone, K. L., Dave, K. and

- Zhao, S. : Localization of the 230-kD bullous pemphigoid antigen in cultured keratinocytes ; formation of a prehemidesmosome. *Exp. Cell Res.* 194 : 238-247, 1991.
- 15) Hashimoto, T., Amagai, M., Ebihara, T., Gamou, S., Shimizu, N., Tsubata, T., Hasegawa, A., Miki, K. and Nishikawa, T. : Further analyses for human monoclonal anti-basement membrane zone antibodies produced by stable human hybridoma cell lines constructed with Epstein-Bar virus transformants. *J. Invest. Dermatol.* 100 : 310-315, 1993.
 - 16) Stanley, J. R., Tanaka, T., Mueller, S., Klaus-Kovtun, V. and Roop, D. : Isolation of complementary DNA for Bullous Pemphigoid Antigen by use of patient's autoantibodies. *J. Clin. Invest.* 82 : 1864-1870, 1988.
 - 17) Giudice, G. J., Emery, D. J. and Diaz, L. A. : Cloning and primary structural analysis of the Bullous Pemphigoid Autoantigen BP 180. *J. Invest. Dermatol.* 99 : 243-250, 1992.
 - 18) Li, K., Giudice, G. J., Tmai, K., Do, H. C., Sawamura, D., Diaz, L. A. and Uitto, J. : Cloning of partial cDNA for mouse 180-kDa Bullous Pemphigoid Antigen (BPAG 2), a highly conserved collagenous protein of the cutaneous basement membrane zone. *J. Invest. Dermatol.* 99 : 258-263, 1992.
 - 19) Hopkins, S. B., Riddelle, K. S. and Jones, C. R. : Cytoplasmic domain of the 180-kD Bullous Pemphigoid Antigen, a hemidesmosomal component ; molecular and cell biologic characterization. *J. Invest. Dermatol.* 99 : 264-270, 1992.
 - 20) Jones, J. C. R., Kurpakus, M. A., Cooper, H. M. and Quaranta, V. : A function for the integrin $\alpha 6 \beta 4$ in the hemidesmosome. *Cell Regulation* 2 : 427-438, 1991.
 - 21) Sonnenberg, A., Calafat, J., Janssen, H., Daams, H., Van Der Raaij-Helmer, L. M. H., Falconi, R., Kennel, S. J., Aplin, J. D., Baker, J., Loizidou, M. and Garrod, D. : Integrin $\alpha 6 \beta 4$ complex is located in hemidesmosomes, suggesting a major role in epithelial cell-basement membrane adhesion. *J. Cell Biol.* 113 : 907-917, 1991.
 - 22) Kurpakus, M. A., Quaranta, V. and Jones, J. C. R. : Surface relocation of $\alpha 6 \beta 4$ integrins and assembly of hemidesmosomes in an *in vitro* model of wound healing. *J. Cell Biol.* 115 : 1737-1750, 1991.
 - 23) Hogervorst, F., Kuikman, I., Van Kessel, A. G. and Sonnenberg, A. : Molecular cloning of the $\alpha 6$ integrin subunit ; alternative splicing of $\alpha 6$ mRNA and chromosomal location of the $\alpha 6$ and $\beta 4$ genes. *Eur. J. Biochem.* 199 : 425-433, 1991.
 - 24) Lee, E. C., Lotz, M. M., Steele, G. D. Jr. and Mercurio, A. M. : The integrin $\alpha 6 \beta 4$ is a laminin receptor. *J. Cell Biol.* 117 : 671-678, 1992.
 - 25) Niessen, C. M., Hogervorst, F., Jaspars, L. H., A. de Melker, A., Delwel, G. O., Hulsman, E. H. M., Kuikman, I. and Sonnenberg, A. : The $\alpha 6 \beta 4$ integrin is a receptor for both laminin and Kalinin. *Exp. Cell Res.* 211 : 360-367, 1994.
 - 26) Yurchenco, P. D., Cheng, Y.-S. and Colognato, H. : Laminin forms an independent network in basement membranes. *J. Cell Biol.* 117 : 1119-1133, 1992.
 - 27) Kennel, S. J., Foote, L. J. and Flynn, K. M. : Tumor antigen on benign adenomas and on murine lung carcinomas quantitated by a two-site monoclonal antibody assay. *Cancer Res.* 46 : 707-712, 1986.
 - 28) Kennel, S. J., Foote, L. J., Falconi, R., Sonnenberg, A., Stringer, C. D., Crouse, C. and Hemler, M. E. : Analysis of the tumor-associated antigen TSP-180. Identity with $\alpha 6 / \beta 4$ in the integrin superfamily. *J. Biol. Chem.* 264 : 15515-15521, 1989.
 - 29) Harlow, E. and Lane, D. : Antibodies, A Laboratory Manual. USA, 1988, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 283-318, 421-552.
 - 30) Laemmli, U. K. and Favre, M. : Maturation of the head of bacteriophage T 4. *J. Mol. Biol.* 80 : 575-599, 1973.
 - 31) Burnette, W. N. : "Western blotting" ; electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radiolabeled protein A. *Anal. Biochem.* 112 : 195-203, 1981.
 - 32) 小林淳二 : 顎関節の構造と機能に関わる基質成分. *口病誌* 59 : 105-123, 1992.
 - 33) Cooper, H. M., Tamura, R. N. and Quaranta, V. : The major laminin receptor of mouse embryonic stem cells is a novel isoform of the $\alpha 6 \beta 1$ integrin. *J. Cell Biol.* 115 : 843-850, 1991.
 - 34) Hogervorst, F., Admiraal, L. G., Niessen, C., Kuikman, I., Janssen, H., Daams, H. and Sonnenberg, A. : Biochemical characterization and tissue distribution of the A and B variants of the integrin $\alpha 6$ subunit. *J. Cell. Biol.* 121 : 179-191, 1993.
 - 35) Potts, A. J., Croall, D. E. and Hemler, M. E. :

- Proteolytic cleavage of the integrin $\beta 4$ subunit. *Exp. Cell Res.* 212 : 2-9, 1994.
- 36) Giancotti, F. G., Stepp, M. A., Suzuki, S., Engvall, E. and Ruoslahti, E. : Proteolytic processing of endogenous and recombinant $\beta 4$ integrin subunit. *J. Cell Biol.* 117 : 951-959, 1992.
 - 37) Van Waes, C., Kozarski, K. F., Warren, A. B., Kidd, L., Paugh, D., Liebert, M. and Carey, T. E. : The A 9 antigen associated with aggressive human squamous carcinoma is structurally and functionally similar to the newly defined integrin $\alpha 6 \beta 4$. *Cancer Res.* 51 : 2395-2402, 1991.
 - 38) Larjava, H., Peltonen, J., Akiyama, S. K., et al. : Novel function for $\beta 1$ integrins in keratinocyte cell-cell interactions. *J. Cell Biol.* 110 : 803-815, 1990.
 - 39) Carter, W. G., Wayner, E. A., Bouchard, T. S. and Kaul, P. : The role of integrin $\alpha 2 \beta 1$ and $\alpha 3 \beta 1$ in cell-cell and cell-substratum adhesion of human epidermal cells. *J. Cell Biol.* 110 : 1387-1404, 1990.
 - 40) Hemler, M. E. : VLA proteins in the integrin family : structures, functions and their role on leukocytes. *Annu. Rev. Immunol.* 8 : 365-400, 1990.
 - 41) Hynes, R. O. : Integrins : versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 69 : 11-25, 1992.
 - 42) Planteffaber, L. C. and Hynes, R. O. : Changes in integrin receptors on oncogenically transformed cells. *Cell* 56 : 281-290, 1989.
 - 43) Pignatelli, M., Smith, M. E. and Bodmer, W. F. : Low expression of collagen receptors in moderate and poorly differentiated colorectal adenocarcinoma. *Br. J. Cancer* 61 : 636-638, 1990.
 - 44) Pignatelli, M., Hanby, A. M. and Stamp, G. W. H. : Low expression of $\beta 1$, $\alpha 2$ and $\alpha 3$ subunits of VLA integrins in malignant mammary tumors. *J. Pathol.* 165 : 25-32, 1991.
 - 45) Zutter, M. M., Mazoujian, G. and Santoro, S. A. : Decreased expression of integrin adhesive protein receptors in adenocarcinoma of the breast. *Am. J. Pathol.* 137 : 863-870, 1990.
 - 46) Koretz, K., Shulag, P., Boumsell, L. and Moller, P. : Expression of VLA- $\alpha 2$, VLA- $\alpha 6$, and VLA- $\beta 1$ chains in normal mucosa and adenomas of the colon, and in carcinomas and their liver metastases. *Am. J. Pathol.* 138 : 741-750, 1991.
 - 47) Lin, C.-S., Zhang, K. and Kramer, R. : $\alpha 6$ integrin is up-regulated in step increments accompanying neoplastic transformation and tumorigenic conversion of human fibroblasts. *Cancer Res.* 53 : 2950-2953, 1993.
 - 48) Iwamoto, Y., Robey, F. A., Graf, J., Sasaki, M., Kleinman, H. K., Yamada, Y. and Martin, G. R. : YIGSR, a synthetic laminin pentapeptide, inhibits experimental metastasis formation. *Science*. 238 : 1132-1134, 1987.
 - 49) Sonnenberg, A., Linders, C. J. T., Modderman, P. W., Damsky, C. H., Aumailley, M. and Timpl, R. : Integrin recognition of different cell-binding fragments of laminin (P 1, E 3, E 8) and evidence that $\alpha 6 \beta 1$ but not $\alpha 6 \beta 4$ functions as a major receptor for fragment E 8. *J. Cell Biol.* 110 : 2145-2156, 1990.
 - 50) Wolf, G. T., Carey, T. E., Schmaltz, S. P., McKlatchey, K. D., Poore, J., Glaser, L., Hayashida, D. J. S. and Hsu, S. : Altered antigen expression predicts outcome in squamous cell carcinoma of the head and neck. *J. Natl. Cancer Inst.* 82 : 1566-1572, 1990.
 - 51) Kimmel, K. A. and Carey, T. E. : Altered expression in squamous carcinoma cell of an orientation restricted epithelial antigen detected by monoclonal antibody A 9. *Cancer Res.* 46 : 3614-3623, 1986.
 - 52) Tennenbaum, T., Weiner, A. K., Belanger, A. J., Glick, A. B., Hennings, H. and Yuspa, S. H. : The suprabasal expression of $\alpha 6 \beta 4$ integrin is associated with a high risk for malignant progression in mouse skin carcinogenesis. *Cancer Res.* 53 : 4803-4810, 1993.
 - 53) Kemperman, H., Wijnands, Y., de Rijk, D. and Roos, E. : The integrin $\alpha 6 \beta 4$ on TA 3/Ha mammary carcinoma cells is involved in adhesion to hepatocytes. *Cancer Res.* 53 : 3611-3617, 1993.
 - 54) Kennel, S. J., Foote, L. J. and Flynn, K. M. : Tumor antigen on benign adenomas and on murine lung carcinomas quantitated by a two-site monoclonal antibody assay. *Cancer Res.* 46 : 707-712, 1986.
 - 55) Hofmann, M., Rudy, W., Zöller, M., Tölg, C., Ponta, H., Herrlich, P. and Günthert, U. : CD 44 splice variants confer metastatic behavior in rats : homologous sequences are expressed in human tumor cell lines. *Cancer Res.* 51 : 5292-5297, 1991.
 - 56) Rudy, W., Hofmann, M., Schwartz-Albiez, R., Zöller, M., Heider, K.-H., Ponta, H. and Herrlich, P. : The two major CD 44 proteins expressed on a metastatic rat tumor cell line are derived from different splice variants : each one individually suffices to confer metastatic

- behavior. *Cancer Res.* 53 : 1262-1268, 1993.
- 57) Thomas, L., Byers, H. L., Vink, J. and Stamenkovic, I. : CD 44 H regulates tumor cell migration on hyaluronate-coated substrate. *J. Cell Biol.* 118 : 971-977, 1992.
- 58) Matsumura, Y. and Tarin, D. : Significance of CD 44 gene products for cancer diagnosis and disease evaluation. *The Lancet* 340 : 1053-1058, 1992.
- 59) Arch, R., Wirth, K., Hofman, M., Ponta, H., Matzku, S., Herrlich, P. and Zöller, M. : Participation in normal immune responses of a metastasis-inducing splice variant of CD 44. *Science* 257 : 682-685, 1992.
- 60) Günthert, U., Hofmann, M., Rudy, W., Reber, S., Zöller, M., Haubmann, I., Matzku, S., Wenzel, A., Ponta, H. and Herrlich, P. : A new variant of glycoprotein CD 44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells. *Cell* 65 : 13-24, 1991.
- 61) Yang, B., Zhang, L. and Turley, E. : Identification of two hyaluronan-binding domains in the hyaluronan receptor RHAMM. *J. Biol. Chem.* 268 : 8617-8623, 1993.
- 62) Hardwick, C., Hoare, K., Owens, R., Horn, H. P., Hook, M., Moore, D., Cripps, V., Austen, L., Nance, D. M. and Turley, E. A. : Molecular cloning of a novel hyaluronan receptor that mediates tumor cell motility. *J. Cell Biol.* 117 : 1343-1350, 1992.
- 63) Yang, B., Yang, B. L., Savani, R. C. and Turley, E. A. : Identification of a common hyaluronan binding motif in the hyaluronan binding proteins RHAMM, CD 44 and link protein. *EMBO J.* 13 : 286-296, 1994.
- 64) Hogervorst, F., Kuikman, I., von dem Borne, A. E. G. Kr. and Sonnenberg, A. : Cloning and sequence analysis of beta-4 cDNA : an integrin subunit that contains a unique 118 kd cytoplasmic domain. *EMBO J.* 9 : 765-770, 1990.
- 65) Suzuki, S. and Naitoh, Y. : Amino acid sequence of a novel integrin β 4 subunit and primary expression of the mRNA in epithelial cells. *EMBO J.* 9 : 757-763, 1990.