



Title	ABROGATION OF LUNG METASTASIS OF HUMAN FIBROSARCOMA CELLS BY RIBOZYME-MEDIATED SUPPRESSION OF INTEGRIN α 6 SUBUNIT EXPRESSION
Author(s)	山本, 弘志
Citation	大阪大学, 1997, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/40487
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	山 本 弘 志
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 3 2 6 5 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 9 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 名	ABROGATION OF LUNG METASTASIS OF HUMAN FIBROSARCOMA CELLS BY RIBOZYME-MEDIATED SUP- PRESSION OF INTEGRIN α_6 SUBUNIT EXPRESSION (インテグリン α_6 発現抑制による肺転移制御に関する研究)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 早 川 徹 (副査) 教 授 高 井 新 一 郎 教 授 宮 坂 昌 之

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

癌の浸潤、転移において、基底膜と腫瘍細胞の相互作用は決定的な過程であると考えられている。VLA-6 ($\alpha_6\beta_1$) インテグリンは、基底膜の主要接着分子であるラミニンを特異的に認識することから、癌の浸潤、転移に重要な役割を演じていることが推定されている。そこで、VLA-6 インテグリンの腫瘍の浸潤、転移における役割を明らかにするために、ヒト線維肉腫細胞 HT1080 のインテグリン α_6 鎖の発現をリボザイム法により抑制し、*in vitro* での接着能および浸潤能、また、*in vivo* での転移能への影響を検討した。

【方法ならびに成績】

- (1) インテグリン α_6 mRNA を標的として切断するハンマーヘッド型リボザイムを合成し pBlue-script に組み込んだ。また、ヒトインテグリン α_6 cDNA を別に pBlue-script に組み込んだ。T7 RNA polymerase により *in vitro* でリボザイム RNA と基質であるインテグリン α_6 RNA を転写させ両 RNA を混合し、リボザイムの特異的切断能を確認した。
- (2) リボザイムの合成遺伝子を pAB 発現ベクターを用いてヒト線維肉腫細胞 HT1080 に強制発現させた。フローサイトメトリーでインテグリン α_6 の発現が低下した stable transfectant を選別した。このリボザイム遺伝子を HT1080 に導入することにより、インテグリン α_6 の発現が約 70% 低下した変異細胞 (1A-6, 2B-6) が得られた。これらの変異細胞の他のインテグリン ($\alpha_2\beta_1$, $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$, β_3 サブユニット) の発現をフローサイトメトリーで調べたところ、リボザイムにより影響を受けていないことが確認された。また、変異細胞の mRNA レベルでの発現抑制を確認するためにノーザンブロットを行った。変異細胞ではインテグリン α_6 mRNA の発現は対照に比べ約 80% 抑制されていた。
- (3) 変異細胞の接着能を調べるため、ラミニンまたはフィブロネクチンをコートした well を用いて *in vitro* adhesion assay を行った。変異細胞ではラミニンに対する接着能は、対照に比べ有意に低下していたが、フィブロネクチンに対する接着能には差が見られなかった。
- (4) *In vitro* での浸潤能を調べるために、マトリゲルを用いた invasion assay を行った。変異細胞では、対照に比べ有意に浸潤能が低下していた。
- (5) 培養皿に一定数の細胞をまき、24 時間ごとに細胞数を計測することにより *in vitro* での増殖速度を調べた。対照の

細胞と変異細胞（1 A-6, 2 B-6）で増殖速度に大きな差はなかった。

(6)ヌードマウスの尾静脈より 1×10^6 個の細胞を注入し、3週後に肺転移の有無を観察した。対照群では、29匹中22匹に多数の肺転移巣が見られたのに対し、変異細胞（1 A-6）では、23匹中肺転移は全く見られず、また他のクローン（2 B-6）では、12匹中1匹に肺転移を認めるのみであった。

【総括】

(1)遺伝子発現抑制の方法として、リボザイム法は有用であることが示された。

(2)リボザイムによりインテグリン α_6 の発現が抑制された細胞では、*in vitro*でのラミニンへの接着能、マトリゲルでの浸潤能が低下していることが示された。

(3)インテグリン α_6 の発現を低下させることにより、実験動物での肺転移を抑制できることが明らかにされた。

(4)腫瘍の浸潤、転移過程においてインテグリン α_6 が、重要な役割を演じていることが示され、腫瘍の肺転移抑制の標的と成りうることを示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究は、VLA-6 ($\alpha_6\beta_1$) インテグリンの腫瘍の浸潤、転移における役割を明らかにするために、ヒト線維肉腫細胞 HT1080 のインテグリン α_6 鎖の発現をリボザイム法により抑制し、*in vitro*での接着能および浸潤能、また、*in vivo*での転移能への影響を検討したものである。その結果、今回作製したハンマーヘッド型リボザイムは、インテグリン α_6 mRNA を *in vitro*, *in vivo*において特異的に切断し、インテグリン α_6 鎖の発現を抑制する方法として有用であることが示された。また、リボザイムによりインテグリン α_6 の発現が抑制された細胞では、*in vitro*でのラミニンへの接着能、マトリゲルでの浸潤能が低下していることが示された。さらに、実験的肺転移の系により、インテグリン α_6 の発現を低下させることで肺転移を抑制できることが明らかにされた。

このように本研究は、腫瘍の浸潤、転移過程においてインテグリン α_6 が、重要な役割を演じていることを明らかにし、癌転移制御に新たな進歩をもたらすものであり、学位に値するものと評価される。