



Title	Suppression of transformed phenotypes of human fibrosarcoma cells by overexpression of recombinant fibronectin
Author(s)	赤松, 大樹
Citation	大阪大学, 1997, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/40974
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	赤 松 大 樹
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 3 4 3 7 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 9 年 11 月 4 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	Suppression of transformed phenotypes of human fibrosarcoma cells by overexpression of recombinant fibronectin (フィブロネクチン強制発現によるヒト線維肉腫細胞の転換形質の抑制)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 松 田 暉 (副査) 教 授 門 田 守 人 教 授 宮 坂 昌 之

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】細胞の形質転換に際して、細胞外マトリックス（以下 ECM）中のフィブロネクチン（以下 FN）量が減少することが知られているが、この現象が細胞の増殖能等の形質変化にどのように影響するかは明らかになっていない。今回の実験では、ECM 中の FN 量の変化が腫瘍細胞の悪性形質に及ぼす影響を解析するために、ヒトの腫瘍株に FN を強制発現させて検討した。

【方法】

1) FN 高発現細胞株の樹立

ヒト線維肉腫細胞株 HT1080 に血漿型 FN の cDNA 全長および細胞接着ドメインを欠失した FN (以下 miniFN) の cDNA を含む発現ベクターをリン酸カルシウム共沈法により導入した。培養液中に分泌される FN および miniFN 量をウエスタンプロット法により半定量し、FN および miniFN 高発現細胞株を選択、分離した。

2) 間接蛍光抗体法による細胞外マトリックスの染色

親株の HT1080 細胞、FN 発現細胞および miniFN 発現細胞をそれぞれ 10% FN-depleted FCS (FN を除去した牛胎児血清) を含む培地中で confluent の状態まで培養し、ウサギ抗ヒト FN 抗体を用いた間接蛍光染色法により FN 線維を染色した。

3) 細胞遊走能の検討

各細胞を subconfluent に培養した後、細胞の monolayer にスクレイパーで 1 mm 幅の線を引いた。洗浄後、10% FN-depleted FCS を含む培地中で 8 時間培養し固定、染色した。顕微鏡下に 1 mm 長の無細胞領域に進入している細胞数を数えた。

4) in vitro 細胞増殖

10% FN-depleted FCS を含む培地中に各細胞を 1×10^5 /dish になるように播種し、毎日培地を交換しながら 1 日毎に固定しトルイジンブルーで染色した。染色した細胞を 1% SDS 2 ml で溶解し 595 nm の吸光度を測定して細胞数を評価した。

5) 軟寒天培地中のコロニー形成能

0.33%の寒天を含む軟寒天培地に各細胞を植えて生じたコロニー数を計測し, 足場非依存性の増殖能を評価した。また培地中に RGD ペプチドおよび FN の細胞接着ドメインに対する mAb を添加して細胞増殖における細胞接着ドメインの役割を検討した。

6) *in vivo* 腫瘍増殖

各細胞 2×10^6 を $200 \mu\text{l}$ の無血清培地に懸濁し, 4週齢のメス BALB/c-*nu/nu*マウスの背部皮下に注入した。経時に腫瘍径を計測し腫瘍体積を算出した。

7) 腫瘍組織の免疫染色

マウスから切除した腫瘍の凍結切片を1次抗体に抗ヒト FN mAb を用いて免疫組織染色を行い分泌 FN の組織内局在を検討した。

【成績】

- 1) FN 高発現株では, より発達した FN マトリックスを形成し, 細胞形態はより伸展し線維芽細胞様になった。
- 2) FN 高発現株では, 細胞遊走能は低下していた。miniFN 発現株では遊走能低下は認められなかった。
- 3) FN 高発現株では *in vitro* での細胞増殖および軟寒天培地中でのコロニー形成能が抑制されたが, miniFN では腫瘍増殖は抑制されなかった。また, FN 強制発現による軟寒天培地中でのコロニー形成能の抑制効果は, FN の細胞接着ドメインに対する抗体および RGD ペプチドの添加により阻害された。
- 4) ヌードマウスの皮下注射による *in vivo* での腫瘍増殖も FN 高発現株では抑制されていた。また免疫組織染色にて, この腫瘍組織の間質にヒト FN が蓄積されているのが認められた。

【総括】

- 1) ヒト線維肉腫細胞株 HT1080 に FN cDNA を transfection して FN 高発現株を樹立した。
- 2) FN 高発現株では, 発達した FN マトリックスを形成し細胞遊走能, *in vitro* および *in vivo* での腫瘍増殖が抑制された。FN による増殖抑制効果は FN の細胞接着ドメインを介することが示唆された。

論文審査の結果の要旨

細胞を化学物質や発ガンウイルスで形質転換した際に, 細胞外マトリックスの主要な構成タンパク質の1つであるフィブロネクチン (FN) 量が減少することが知られている。FN は強い細胞接着活性を有し, 細胞の接着, 遊走, 増殖に関与するが, 形質転換に伴う FN の減少が腫瘍細胞の形質の変化にどのように影響するかは未だ明らかになっていない。本研究では, 細胞外マトリックス中の FN 量の変化が腫瘍細胞の悪性形質に及ぼす影響を直接的に解析することを目的とした。ヒト線維肉腫細胞株 HT1080 にヒト血漿型 FN の cDNA 全長および細胞接着ドメインを欠失した FN であるミニフィブロネクチン (miniFN) の cDNA を含む発現ベクターを導入後, 培養液中の組換えタンパク質を定量し, これより FN および miniFN 高発現細胞株を選択, 分離した。FN 高発現細胞では発達した FN マトリックスを形成し, 細胞遊走能, *in vitro* および *in vivo* での腫瘍増殖が共に抑制された。FN による増殖抑制効果は, miniFN 発現細胞では認められず, また細胞接着ドメインに対する mAb および GRGDSP ペプチドによって阻害されたことから, この効果は細胞接着ドメインを介することが示唆された。本研究は, 腫瘍細胞の細胞外マトリックス中 FN 量の変化自体が細胞の遊走能, 増殖能等に影響を与える可能性のあることを FN 高発現細胞株を用いて直接的に示したものである。これは, 腫瘍細胞と細胞外マトリックスの相互作用の研究における新しい知見であり, 学位の授与に値するものと考える。