



Title	A Defect in Cell-to-cell Adhesion via Integrin-Fibronectin Interactions in a Highly Metastatic Tumor Cell Line
Author(s)	阿部, 佳子
Citation	大阪大学, 1997, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41026
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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 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	阿 部 佳 子
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 3 2 8 3 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 9 年 5 月 7 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	A Defect in Cell-to-cell Adhesion via Integrin-Fibronectin Interactions in a Highly Metastatic Tumor Cell Line (高転移性癌細胞株におけるインテグリン-ファイブロンectinを介した細胞間接着の欠陥)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 瀨 岡 利 之 (副査) 教 授 宮 坂 昌 之 教 授 祖 父 江 憲 治

論 文 内 容 の 要 旨

[目的]

癌細胞は多段階の過程をへて浸潤・転移するが、Cell-CellもしくはCell-ECM接着性の調節は、その過程の中で重要な役割をはたしている。原発巣からの癌細胞の遊離過程では、カドヘリンによるCell-Cell接着の減弱が早期の癌転移に関与していることが報告されている。しかし、インテグリンのようなカドヘリン以外の接着分子の寄与については、ほとんど知られていない。そこで、インテグリンによるCell-ECM相互作用を介した細胞接着に注目し、高転移性癌細胞株におけるインテグリン発現量と接着機能を解析するために本研究を行なった。

[方法ならびに成績]

1) マウス卵巣癌細胞株OV2944の高転移性株OV-HMと低転移性株OV-LMを(C57BL/6×C3H/He)F1背部皮下に接種したところ、リンパ節転移および腹腔浸潤に明らかな差を認めた。

2) 10%ウシ胎児血清(FCS)存在培養条件下においてOV-LMは線維芽細胞様であったが、OV-HMはそのような形態を示さなかった。ファイブロンectin(FN)20 µg/mlコーティングプレート上での細胞形態にも同様の傾向が認められた。そこで、この形態の差が細胞接着性に起因するかどうかを調べるために両細胞株のFN接着性を検討した。FN 10 µg/mlをコーティングしたマイクロウェルプレートに⁵¹Crラベル細胞をまきこみ37°Cで60分間インキュベートした後、接着細胞数をγカウンターで測定したところ、OV-HMに比べOV-LMの方が強い接着性を示した。しかも接着ペプチドRGDSによる影響はOV-LMではほとんど認められなかったが、OV-HMでは濃度依存的な接着阻害が見られた。つまり、OV-HMはOV-LMに比べてFNに対するRGDS依存的接着性の弱いことが示された。

3) 両細胞株のFNレセプターインテグリンの発現をフローサイトメーターで調べた。VLA4はいずれも認められなかったがVLA5とVNRが発現しており、その量はほぼ同程度であった。両細胞株のFN接着性の違いは単純にインテグリン発現量に帰するものでないことが考えられる。

4) インテグリンを介したFN接着におけるFocal Adhesion Kinase (p125^{FAK})の活性化は接着情報伝達の重要な1ステップであることが報告されている。そこで、両細胞株のFN接着によるp125^{FAK}のリン酸化を調べた。FN 10

$\mu\text{g/ml}$ コーティングディッシュ接着60分後に 1% TritonX-100 lysis buffer を添加し、可溶化画分を得た。抗 p125^{FAK} 抗体 (2A7) で免疫沈降を行ない、7.5% SDS-PAGE で展開し、抗リン酸化チロシン抗体 (PY20) と抗 p125^{FAK} 抗体で Western blot を行なった。両細胞株とも無刺激状態で p125^{FAK} のリン酸化が認められた。OV-LM は FN 接着後にリン酸化がより強くなったが、逆に OV-HM では down regulation が認められた。一方、OV-LM の FAK 免疫沈降物量は刺激前後で変わらないのに対して OV-HM では刺激後に減少した。つまり OV-HM の p125^{FAK} リン酸化 down regulation は可溶化画分の FAK タンパク量の減少によることが示唆された。

5) 両細胞表面の FN 発現量をフローサイトメーターで比較したところ、OV-HM では OV-LM に比べて少ないことが示された。

6) 以上の結果から、OV-HM のインテグリン-FN を介した細胞凝集性は OV-LM より弱いことが考えられるため、in vitro での比較検討を行なった。各細胞株の single cell suspension を作成し、遠心分離して cell pellet を得た。37°C で 10~30 分間インキュベートした後、緩やかに resuspend した。OV-LM はインキュベート時間に相関して single cell の割合が減少し、RGDS ペプチド依存的な細胞凝集が進行するのに対して、OV-HM では変化がなかった。以上、OV-HM と OV-LM には、インテグリン-FN を介した細胞間接着性に差のあることが示唆された。

[総括]

高転移性株 OV-HM は、インテグリン-FN を介した細胞間接着性が低転移性株 OV-LM より弱いことが示された。これは FN レセプターインテグリンの発現量によるのではなく、OV-HM のインテグリンを介した FAK 活性化の異常および細胞表面 FN 発現量によることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

本論文は、癌転移におけるインテグリン-ファイブロネクチンを介した細胞間接着に関するものである。

高転移性癌細胞株はファイブロネクチン (FN) レセプターインテグリンの発現量は低転移性株と同等であるにもかかわらず、RGDS 依存的な FN への接着性は弱いことが認められた。さらに、この高転移性株の Focal adhesion kinase (p125^{FAK}) は FN 接着によりチロシンリン酸化が増強せず、FAK 活性化の異常が示唆された。また、細胞表面 FN は高転移株で減少していることも示された。in vitro における高転移株の RGDS 依存的な細胞凝集性は、低転移株より低いことも明らかとなり、これは上記の現象に起因していると考えられる。

本論文では、癌転移の初期のカスケードの中で、インテグリン-FN を介した細胞間接着が癌原発巣からの細胞の脱離に何らかの寄与をしていることが示唆され、学位論文として価値あるものと認める。