

Title	Epidermal Growth Factor Enhances Invasive Activity of BeWo Choriocarcinoma Cells by Inducing $\alpha 2$ Integrin Expression
Author(s)	中辻, 友希
Citation	大阪大学, 2004, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/44599">https://hdl.handle.net/11094/44599</a>
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、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について〈/a〉をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

氏名	なか つか ゆき 希
博士の専攻分野の名称	博士 (医学)
学位記番号	第 18870 号
学位授与年月日	平成 16 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文名	Epidermal Growth Factor Enhances Invasive Activity of BeWo Choriocarcinoma Cells by Inducing $\alpha 2$ Integrin Expression (上皮成長因子は $\alpha 2$ インテグリンの発現を誘導することにより BeWo 絨毛癌細胞の浸潤能を亢進させる)
論文審査委員	(主査) 教授 村田 雄二  (副査) 教授 宮坂 昌之 教授 奥山 明彦

## 論文内容の要旨

## (目的)

ヒトの胎盤形成過程においてはサイトトロホプラストが分化し、子宮内膜（脱落膜）へ浸潤していく事が知られている。しかしこの現象の詳細なメカニズムは依然不明のままである。サイトトロホプラストは癌細胞にも匹敵する強い浸潤能を有するが、この浸潤能は厳密に制御されており決して無制限に浸潤し続ける事は起こらない。近年、いくつかの細胞増殖因子やサイトカイン、各種インテグリン分子が浸潤能促進あるいはその抑制に重要であることが報告されつつある。

今回、ヒト絨毛癌細胞株 BeWo を用い、絨毛細胞の機能的分化を誘導する細胞増殖因子の一つである Epidermal Growth Factor (EGF) による $\alpha 2$ インテグリン分子の発現制御ならびにその細胞浸潤能に対する影響を検討した。

## (方法)

BeWo 細胞を、1%FBS 添加 HAM's F-12 培養液で 1 nM、5 nM、10 nM EGF の存在下、非存在下にて 12 時間、24 時間、48 時間培養し、エンザイムイムノアッセイにより、培養上清中の human chorionic gonadotropin (hCG) の濃度を測定した。EGF により hCG 分泌は濃度依存性に増加し、EGF により BeWo 細胞が機能的分化していることを確認した。この細胞を用いて、10 nM EGF 添加後 24 時間の各種インテグリン分子の発現量の変化を flow cytometry 法を用いて検討した。最も著明に誘導されたのは $\alpha 2$ インテグリンであったため、10 nM EGF 添加後 24 時間までの $\alpha 2$ インテグリン mRNA の変化を northern blotting 法にて、また蛋白量の変化を western blotting 法にて検討した。次に、1 nM EGF 及び 10 nM EGF 添加後 24 時間のマトリゲルへの細胞浸潤能の変化を invasion assay を用いて検討した。invasion assay では、100  $\mu$ g/ml のマトリゲルにてコートしたトランスウェルチェンバーを用い、各々の EGF 濃度で 24 時間前処置した BeWo 細胞を 0.1%BSA 添加 HAM's F-12 培養液 500  $\mu$ l に浮遊させ 24 時間培養し、チェンバーを通過した細胞をヘマトキシリンにて染色後細胞数を測定し比較を行った。また、その浸潤能に対する抗 $\alpha 2$ インテグリン抗体による阻害実験を行った。続いて同一条件において、EGF による BeWo 細胞の接着能の変化を adhesion assay にて、遊走能の変化を boyden chamber assay にて検討した。adhesion assay においては、10  $\mu$ g/ml のコラーゲン液でコートした 96 穴プレート上に invasion assay と同様に処理した細胞を各ウェルにプレー

ティング、1時間培養し、その上清を吸引、各ウェルの底面に接着した細胞を0.04%クリスタルバイオレットにて染色し、A590を測定した。boyden chamber assayにおいては、10  $\mu$ g/mlのコラーゲン液でコートしたニトロセルロースフィルターをboyden chamberに装着し、invasion assayと同様に処理した細胞を各ウェルにプレーティングし、3時間培養後、フィルターを通過した細胞をヘマトキシリンにて染色、細胞数をカウントした。

(結果)

BeWo細胞は、EGF非存在下で既に $\alpha$ 1、 $\alpha$ 2、 $\alpha$ 5、 $\alpha$ 6、および $\beta$ 1インテグリンの発現が認められ、これらのインテグリンの内、 $\alpha$ 2インテグリンがEGFにより最も顕著に増加していた。なお、EGFと同様、絨毛細胞の分化に関与するサイトカインとされるLeukemia inhibitory factor (LIF)、Transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ )ではこのような増加は見られなかった。

$\alpha$ 2インテグリン mRNAの発現は、EGF添加後3時間で最大になり、以後徐々に減少していた。また、 $\alpha$ 2インテグリン蛋白量はEGF添加後6時間から増大し、12時間で最大となった。

invasion assayによるBeWo細胞のマトリゲルへの浸潤能は、EGFにより濃度依存性の亢進が観察され、またこれらのEGFによる浸潤能の亢進は、抗 $\alpha$ 2インテグリン抗体にて、有意に阻害された。

adhesion assayによるBeWo細胞のコラーゲンに対する接着能では、EGFによる変化は認められなかったが、boyden chamber assayによるBeWo細胞の遊走能は、invasion assayと同様に10 nM EGFにより有意に亢進することが観察され、抗 $\alpha$ 2インテグリン抗体により特異的に阻害された。

(総括)

EGFは、 $\alpha$ 2インテグリンのmRNAおよび蛋白を増加させ、BeWo細胞表面に存在する $\alpha$ 2インテグリンの発現量の増加が、BeWo細胞の浸潤能の亢進に関与していることが明らかとなった。この浸潤能の亢進には、主として、 $\alpha$ 2インテグリンを介した細胞の遊走能の亢進が寄与していることが示唆された。

### 論文審査の結果の要旨

哺乳類の胎盤における主要な構成細胞である絨毛細胞は、epidermal growth factor (EGF)をはじめとする種々の増殖因子やサイトカインにより、絨毛性ゴナドトロピンの分泌に代表される特徴ある分化を遂げることが知られている。母体と胎児の間の酸素や栄養物質の交換を可能とらしめるために、胎盤の形成に際して絨毛細胞の子宮内膜への浸潤は必須の現象であるが、その機構はいまだ十分に解明されていない。本研究では主要な細胞接着因子の一つであるインテグリンに着目して、そのEGFによる量的、機能的変化を細胞浸潤能の見地から解析を行い、各種インテグリンのなかでも特にEGFにより誘導された $\alpha$ 2インテグリンが絨毛細胞の浸潤能ならびに遊走能と密接な関係を有することを報告した。この報告は絨毛細胞の浸潤能の制御機構という未開拓の分野に新たな知見をもたらすものであり、博士(医学)の学位授与に値すると認められる。