

ヒト胃癌組織におけるインテグリン：
競合的逆転写PCR法および細胞内ハイブリダイゼー
ション法による $\beta 5$ サブユニットの解析

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/9398

ヒト胃癌組織におけるインテグリン：競合的逆転写PCR法および細胞内ハイブリダイゼーション法による $\beta 5$ サブユニットの解析

金沢大学医学部医学科内科学第二講座 (主任：馬淵 宏教授)

金沢大学医学部医学科病理学第一講座 (主任：中西功夫教授)

津 川 周 三

癌転移のプロセスは複雑である。癌細胞の細胞外基質との接着、細胞間接着や遊走に重要な因子であるインテグリンは、多くの癌で悪性形質との関連性が示唆されており、それぞれの過程において重要な役割を担っている。インテグリン分子の発現の低下や亢進と、癌の浸潤性の変化とが呼応することを示す培養細胞株を用いた報告が多いなかで、インテグリンが実際に組織内でどのような役割を果たしているのかは、まだ十分に解明されていない。本研究では、胃癌組織におけるインテグリンの発現について検討し、胃癌におけるインテグリン分子種の特徴を明らかにした。胃癌細胞株5種類、進行胃癌組織30例と非癌部胃粘膜組織20例について逆転写酵素-PCR (reverse transcription-PCR, RT-PCR)法を用いてインテグリン α 鎖6種類 ($\alpha 2, \alpha 3, \alpha 4, \alpha 5, \alpha 6, \alpha v$)と β 鎖8種類($\beta 1, \beta 2, \beta 3, \beta 4, \beta 5, \beta 6, \beta 7, \beta 8$)の発現を調べた。その結果、胃癌細胞株において $\alpha 2, \alpha 3, \alpha 6, \alpha v, \beta 1, \beta 4, \beta 5, \beta 8$ が全例陽性であった。また胃癌組織を用いたRT-PCR法では $\alpha 2, \alpha 3, \alpha 5, \alpha v, \beta 6, \beta 8$ が、非癌部組織に比して有意に発現率が高かった。さらに、 $\alpha 5$ を発現する症例、および αv と $\beta 6$ を同時発現する症例ではリンパ節転移が高頻度にみられた。 $\beta 5$ インテグリンはRT-PCR法ではわずかに統計的有意差を示せなかったが($p = 0.0582$)、競合RT-PCR法においては癌部に140倍多く($p < 0.05$)、胃癌生検組織を用いた細胞内ハイブリダイゼーション法でも $\beta 5$ インテグリンは、癌部に発現が多かった($p < 0.05$)。胃癌では、細胞外基質に含まれるコラーゲン、ラミニン、フィブロネクチンあるいはビトロネクチンなどに対するレセプターとしての各種インテグリンが同時に複数発現しており、その進展・転移に寄与していると考えられた。

Key words integrins, gastric carcinoma, $\beta 5$, competitive RT-PCR, *in situ* hybridization

癌転移のプロセスは複雑であり、原発巣からの離脱に始まり、脈管内への侵入、遠隔の標的臓器への定着、そして異所性の増殖へと進行するとされている¹⁾。このとき癌細胞には、転移成立のための多くの能力が備わっていることが必須であり、組織浸潤のための優れた基質分解能と高い運動性、異常な増殖能などはもとより、血小板、免疫系細胞、血管内皮細胞など種々の細胞、または基質分に富んだ基底膜との接着反応に柔軟に対処する能力も保持していることが重要であると考えられている。

インテグリンは、2つのサブユニット (α 鎖、 β 鎖) が会合したヘテロダイマー構造をとる膜貫通型の蛋白質²⁾で、種々の上皮細胞、線維芽細胞、血管内皮細胞、リンパ球など広範に発現されている。その分子量は、 α 鎖が120~180kDa、 β 鎖が90~110kDaで、両者とも大部分が細胞外に存在し、膜貫通ドメインと、通常短い細胞内ドメインとを有している³⁾。現在少なくとも17種類の α 鎖と8種類の β 鎖が知られており、これらの様々な組み合わせにより多様なリガンド特異性をもつ20種類以上のインテグリンが存在する。インテグリンは、ラミニン、コラーゲン、フィブロネクチン(fibronectin, FN)、ビトロネクチン(vitronectin, VN)などの細胞外基質に対する受容体の役割⁴⁾

を果たし、細胞と細胞、細胞と基質との接着の他、細胞増殖、遊走、癌の進展、個体発生の調節⁵⁾、細胞内シグナル伝達⁶⁾、アポトーシス⁷⁾などに深く関与している。各々のインテグリンによってその機能が異なるため癌の進展と関連のあるインテグリンの検索が様々な方法でなされているが⁸⁾、今までのところ転移性を規定する特定のインテグリンは見付かっておらず、転移プロセスの各局面に呼応したインテグリンの動的な発現調節機構そのものが、転移成立を左右する1つの重要な鍵を握ると思われる。インテグリン分子の発現の低下や亢進と、癌の浸潤性の変化とが呼応することを示す報告⁹⁾も多いが、これまでの癌の浸潤・転移におけるインテグリンの研究は、培養細胞を使った生体外実験に基づくものが大部分であり、インテグリンが実際に生体内でどのような役割を果たしているのかは、まだ十分に解明されていないのが現状である。ヒト癌組織を使った生体内の研究が進まない大きな理由の1つに、パラフィン切片で染色可能な抗体がほとんどないことが挙げられる。そこで、優れた抗体がほぼ必須である蛋白レベルでの解析にかかわって、技術的に確立されたmRNAレベルでの解析、すなわち、逆転写酵素-PCR (reverse transcription-PCR, RT-PCR)法および競合RT-

平成10年11月27日受付、平成11年1月8日受理

Abbreviations : bp, base pair; FN, fibronectin; ISH, *in situ* hybridization; PLP, periodate-lysine-paraformaldehyde; RT-PCR, reverse transcription-PCR; VN, vitronectin

PCR法でインテグリンの発現を包括的に把握した上で、高発現のインテグリンに対しては、さらに細胞内ハイブリダイゼーション (*in situ hybridization*, ISH)法でインテグリンを検出するという解析方法がより確実であると思われる。

胃癌は我が国において最も多い悪性腫瘍の一つであり、比較的容易に内視鏡検査、内視鏡治療が可能となった現在でも、悪性新生物による死因の上位に常に位置している⁹⁾。本研究では、胃癌組織、非癌部胃粘膜組織中の各種インテグリン (α 鎖6種類, β 鎖8種類)の発現をRT-PCR法を用いて検討した。胃癌組織に高発現の $\beta 5$ インテグリンについては、競合的RT-PCR法により定量し、さらに胃癌生検組織を用いて $\beta 5$ インテグリンの局在をISH法により検索した。

材料および方法

I. 材料

1. 胃癌培養細胞株

本研究に用いたヒト胃癌細胞株は、高分化型腺癌由来 MKN-7、低分化型腺癌由来 MKN-45, SNU-16, 印環細胞癌由来 KATO-IIIおよびスキラス胃癌由来 HSC-39の計5種類である。MKN-7は福島県立医科大学病理学第二、鈴木利光教授より、MKN-45, KATO-IIIはがん研究振興財団細胞バンク(東京)より、SNU-16はAmerican Type Culture Collection (Rockville, USA)より、HSC-39は国立がんセンター実験動物管理室、柳原五吉先生より供与された。各細胞株は、10%ウシ胎児由来血清 (Gibco, Grand Island, USA), 100 U/ml ペニシリン (明治製薬, 東京), 0.1 mg/ml ストレプトマイシン (明治製薬) を添加したRPMI-1640培地 (Gibco) にて湿潤37°C, 5% CO₂の条件下で培養した。

2. 対象症例

1997年から1998年までに金沢大学がん研究所附属病院、小松市民病院および金沢市立病院にて外科的に切除された進行胃癌30症例を対象にRT-PCR法を用いてインテグリンの発現について検討した。また、1993年から1998年までに金沢大学がん研究所附属病院、小松市民病院にて経内視鏡的に採取された胃癌の生検65症例を対象に細胞内ハイブリダイゼーション法を用いて $\beta 5$ インテグリンの局在について検討した。なおこれらの臨床病理学的特徴を表1にまとめた。また病理組織学的分

Table 1. Summary of gastric adenocarcinoma cases

Characteristics	RT-PCR (n=30)	ISH (n=65)
Sex (M/F)	21/9	53/12
Age ($\bar{x} \pm SD$) (range)	62.6 \pm 10.9 (45~86)	63.3 \pm 11.0 (37~82)
Histological subtypes		
Intestinal	14	35
Diffuse	16	30
Tumor stage		
Early	0	9
Advanced	30	56
Lymph node metastasis		
Negative	6	22
Positive	24	43

M, male; F, female. The extent of tumor invasion was divided into early or advanced gastric carcinoma according to the criteria proposed by the Japanese Research Society for Gastric Cancer.

類は、本邦の胃癌取扱い規約(改訂第12版)¹⁰⁾に従った。

II. 胃癌におけるインテグリンの解析

1. RNAの抽出

胃癌培養細胞約 1×10^8 個からChomczynskiら¹¹⁾の方法にて全RNAを抽出した。また胃癌組織については、胃癌摘出手術後速やかに癌部および正常胃粘膜より5mmから10mm角の組織を採取し、直ちに液体窒素で凍結してから-80°Cの冷凍庫に保存し、後日全RNAを抽出した。

2. プライマーの設計

インテグリンサブユニットである $\alpha 2, \alpha 3, \alpha 4, \alpha 5, \alpha 6, \alpha v, \beta 1, \beta 2, \beta 3, \beta 4, \beta 5, \beta 6, \beta 7, \beta 8$ の各cDNAに特異的なプライマーを作成した。またハウスキーピング遺伝子である $\beta 2$ -ミクログロブリン、 β -アクチンについても特異的なプライマーを作成した(表2)。

3. RT-PCR法によるインテグリンmRNAの解析

RT反応は、Promega社(Madison, USA)のcDNA合成キットを用いて行った。すなわち2 μ g(胃癌細胞株の場合は1 μ g)の全RNAからオリゴd(T)₁₈をプライマーとして逆転写酵素にてcDNAを合成した。つぎにインテグリンサブユニットに対するプライマー対を用いて、Taqポリメラーゼ(宝酒造, 京都)にて特異的cDNAの増幅を行った。PCR反応は、MJ Research社(Watertown, USA)のPTC-200 DNA Engine™を使用した。至適アニリング温度をそれぞれ決定した後に、94°Cで5分間の熱変性後、94°C 30秒, 52°Cから63°C 1分, 72°C 1分30秒の3ステップを35サイクル行い、最後に72°C 7分を追加した。増幅後のPCR産物はエチジウムブロマイドを含む2%アガロースゲルで電気泳動し紫外線照射装置を用いて検出した。陽性対照として $\beta 2$ -ミクログロブリンのプライマーを用いてPCRを行い、これで $\beta 2$ -ミクログロブリンが増幅されない症例は除外した。なお、RT-PCRで検出されたバンドが特異的なバンドであることを確認するために、ゲノムDNAと全RNAを鋳型として各々のプライマーを使って同様の条件下でPCRを施行し、同じ高さにバンドが出現しないことを確認した。また、目的のPCR産物の特異性は、適当な制限酵素での切断を行い、さらに一部はダイレクトシーケンシングにより確認した。

4. 定量的RT-PCR法

胃切除標本(癌部21例, 非癌部10例)から抽出した全RNA2 μ gをもとにして合成したcDNA中の $\beta 5$ インテグリンの量を競合RT-PCR法を用いて定量した。すなわち、PCR競合鋳型合成キット、PCR MIMIC Construction Kit (Clontech, Palo Alto, USA)を用い、574塩基対(base pair, bp)からなる癌遺伝子v-erbBの制限酵素BamHI, EcoRIで切断したDNA断片より両端に $\beta 5$ インテグリンのプライマーの配列を含む240bpの競合鋳型($\beta 5$ MIMIC)を作成した。 $\beta 5$ インテグリンの競合鋳型100 attomoles/ μ lから10倍希釈を7回行った競合鋳型希釈系列と、胃切除標本から合成したcDNAの両者を等量混ぜ、 $\beta 5$ インテグリンのプライマーを用いて以下のプログラムでPCRを行った。すなわち、94°Cで5分間の熱変性後、94°Cで30秒, 59°Cで1分, 72°Cで1分30秒の3ステップを30サイクル行った。増幅されたPCR産物は、エチジウムブロマイドを含む1.6%アガロースゲルにて電気泳動し、紫外線照射装置を用いて検出した。さらに、ここで得られた結果に基づき適当な競合鋳型の10倍希釈濃度から新たに2倍希釈を7回行った希釈系列を作製して、胃切除標本から合成したcDNAと等量混ぜ再度競合RT-

PCRを施行した。PCR産物は画像解析装置バイオプロフィール (Vilber Lourmat, Paris, France) にて発光強度を測定した。β5インテグリンの強度と競合鋳型の強度の比を縦軸に、競合鋳型の濃度を横軸に取り両対数グラフにプロットし、競合鋳型の強度とβ5インテグリンの強度の比が1となる競合鋳型の値をβ5インテグリンの量と判定した。また内部標準物質β-アクチンについて、両端にβ-アクチンのプライマーの配列を含む619bpの競合鋳型 (Human β-actin PCR MIMIC) (Clontech) を用いて同様に競合RT-PCR法で定量し、β5インテグリンの量と比較した。なおPCRは、94℃で5分間の熱変性後、94℃で30秒、59℃で1分、72℃で1分30秒の3ステップを25サイクル行った。

Ⅲ. 細胞内ハイブリダイゼーション法による検討

1. β5インテグリンDNAプローブの作成

ベーリンガー・マンハイム社 (Mannheim, Germany) のPCRジゴキシゲニンプローブ合成キットを用いてジゴキシゲニンで

標識した355bpのβ5インテグリンDNAプローブを作成した。PCRにて作成したDNAプローブはあらかじめアガロースゲル電気泳動で単一のバンドであることを確認した (図1)。

2. 細胞内ハイブリダイゼーション用切片の前処置

術前検査のため経内視鏡的に採取された胃癌の生検65例の10%中性緩衝ホルマリン固定パラフィン包埋ブロックを4μmに薄切し、シランコートスライド (ダコ・ジャパン, 京都) にのせ、37℃で2時間、45℃で4時間放置し乾燥した。その内1枚は、細胞内ハイブリダイゼーションを施行した切片との形態学的対比のためHE染色を行った。脱パラフィン処理後、37℃でプロテアーゼK溶液 (和光純薬工業, 大阪) (10μg/ml) に37℃で15分間浸し、除蛋白処理を行った。リン酸緩衝生理食塩水 (phosphate buffered saline) で希釈した0.1Mグリシンにて洗浄した後、ゲノムDNAを除くためにDNase (Promega, Madison, USA) 処理 (1 U/ml) を37℃で6時間30分行った。その後、94℃1分処理してDNaseを不活化した。

Table 2. Primer sets used for RT-PCR analysis

Target cDNA	Primer sequences	Product size (bp)
α2 integrin	5'-GCATCTCAGAAGTCTGTTGCC-3' 5'-CCTGTTGTTACCTTCAGGGAG-3'	335
α3 integrin	5'-TACGTGCGAGGCAATGACCTA-3' 5'-TTTGGGGGTGCAGGATGAAGCT-3'	306
α4 integrin	5'-TGGCGTGGTACAACCTTGACTG-3' 5'-CATGCGCAACATTCTCATCCT-3'	773
α5 integrin	5'-CAGACCCCTGCTCATCCAGAAT-3' 5'-GGCATTCTTGTCACCCAGGTAC-3'	306
α6 integrin	5'-TGGAGGTACAGTTGTTGGCG-3' 5'-CTCCGTTAGGTTCCAGGGAGT-3'	253
αv integrin	5'-ATGAAACAGGAGCGAGAGCC-3' 5'-CGACAGCCACAGAATAACCC-3'	334
β1 integrin	5'-GAGAGTGCCTCTGCGGACAG-3' 5'-TCTCACACGTTTGCCCTTGAA-3'	309
β2 integrin	5'-TGTGGAACAACCCCGTGAAG-3' 5'-TGTTCCTACTGGGACTTGAGC-3'	291
β3 integrin	5'-CGTGACGAGATTGAGTCAGT-3' 5'-CCCCGGTACGTGATATTGGT-3'	377
β4 integrin	5'-CGACCACACTGCCGAGGGACT-3' 5'-TGCAGCTCACCCCGTTCA-3'	211
β5 integrin	5'-ACCATCGTGAAAGATGACCA-3' 5'-TGTTGAAGGTGAAGTCCACA-3'	355
β6 integrin	5'-GACCATCAGTGAAGAAGAAG-3' 5'-AAGTACTTGTGGATCCTCTG-3'	344
β7 integrin	5'-TACGAATCCAGTGTGAGGG-3' 5'-CACCACATTGTAGGTGTCCC-3'	274
β8 integrin	5'-CAGCATTATGTCGACCAAAAC-3' 5'-CTTGTGCAAACCTTTCAG-3'	221
β2-microglobulin	5'-ACCCCACTGAAAAAGATGA-3' 5'-ATCTTCAAACCTCCATGATG-3'	114
β-actin	5'-ATCTGGCACCACACCTTCTACAATGAGCTGCG-3' 5'-CGTCATACTCCTGCTTGTGATCCACATCTGC-3'	838

3. ハイブリダイゼーション

ハイブリダイゼーション溶液 (50%ホルムアミド, 2×SSC, 10×デンハルト溶液, 1mg/mlサケ精子DNA, 1% SDS) にジゴキシゲニン標識DNAプローブ (最終濃度0.15nM/ml) を加えた溶液を95℃で10分間処理後, 氷上で5分間急冷した. 前処置した各切片にDNAプローブ入りハイブリダイゼーション溶液 20 μ l をのせ, 42℃で一晩ハイブリダイゼーションを行った. ハイブリダイゼーション終了後, 2×SSCで15分間3回洗浄し, 引き続き, 緩衝液1 [0.1Mトリス塩酸 (pH 7.5), 0.15M塩化ナトリウム] で1分間洗浄した.

4. ハイブリッドの免疫組織学的検出

組織切片を1.5%内因性アルカリフォスファターゼブロッッキング試薬 (Boehringer Mannheim) で30分間処理し, 再度, 緩衝液1で1分間洗浄した. つぎに非特異的反応の除去のため緩衝液1に正常ヒツジ血清とウシ血清アルブミンを加えた溶液で30分間処理した. さらに, 1000倍希釈アルカリフォスファターゼ標識抗ジゴキシゲニンヒツジ抗体を室温で1時間反応させた. その後, 緩衝液1で10分間, 2回洗浄した後, 緩衝液2 [0.1Mトリス塩酸 (pH 9.5), 0.1M塩化ナトリウム, 50mM塩化マグネシウム] で10分間アルカリ化してから暗湿箱にてニトロブルーテトラゾリウム / リン酸プロモクロロインドリル溶液 (nitroblue tetrazolium salt / 5-bromo-4chloro-3indolyl phosphate) で発色した. 十分な発色を確認後, 蒸留水にて洗浄し, 反応停止液 [10mMトリス塩酸 (pH 8.0), 1mM EDTA] に浸した. 陽性対照として, mRNA全量を反映するジゴキシゲニン標識 d(T)₂₄オリゴヌクレオチドプローブ (宝酒造, 京都) を用い, これで良好な発色が得られない症例は除外した¹²⁾. 陰性対照として, ジゴキシゲニン標識陰性対照DNAプローブ (Kreatech Diagnostics, Amsterdam, Netherland) とジゴキシゲニン標識陰性対照オリゴヌクレオチドプローブ (Kreatech Diagnostics) を用い, これらのプローブで陽性所見が得られないことを確認した.

5. β 5インテグリン細胞内ハイブリダイゼーションの評価
光学顕微鏡下で標本における染色が10%未満のものを (-),

10%以上から50%未満のものを (+), 50%以上のものを (++) の3段階に分け, 癌部, 非癌部の染色性についてそれぞれ評価した. また, この3段階評価を順に0, 1, 2点とし, 陽性スコアを算出した.

IV. 統計処理

測定値はすべて平均値±標準偏差で示し, RT-PCR法による各インテグリン発現と種々の因子との相関は χ^2 検定または Fisherの直接確率計算法を用い, β 5インテグリンの定量値は Mann-WhitneyのU検定を用いて解析した. いずれも危険率5%未満をもって有意差ありと判定した.

成 績

I. 胃癌細胞株におけるインテグリンの発現

胃癌細胞株5種類 MKN-7, MKN-45, KATO-III, HSC-39および SNU-16のRT-PCR法によるインテグリンの発現を表3にまとめた. α 2, α 3, α 6, α v, β 1, β 4, β 5, β 8インテグリンはすべての細胞株において発現が認められた (図2). β 2, β 6インテグリンは, MKN-7, MKN-45, KATO-III, HSC-39の4種類で発現がみられた. α 5インテグリンは, MKN-7, MKN-45の2種類で発現がみられた. α 4, β 3インテグリンは MKN-7のみに発現を認め, β 7インテグリンは, 全使用細胞株において発現が認められなかった.

II. RT-PCR法による胃癌組織のインテグリン

胃癌組織30例, 非癌部組織20例におけるインテグリンの発現についてRT-PCR法で解析した結果を表4にまとめ, その代表例を図3に示した. β 1, β 5インテグリンは胃癌組織において全例発現を認めた. α 4, α 6, α v, β 3, β 4インテグリンは胃癌組織において80%以上の症例で発現を認め, α 2, α 5, β 6, β 8インテグリンは60%から70%, α 3インテグリンは50%の症例で発現を認めた. β 7インテグリンは, 胃癌組織, 非癌部組織ともに発現が認められなかった. また, 胃癌組織における α 2, α 3, α 5, α v, β 6, β 8インテグリンの発現は, 非癌部組織と比べて有意に発現率が高かった. β 1と複合体を形成しうる α 2, α 3, α 4, α 5, α 6インテグリンの病理組織学的因子との相関につい

Table 3. Expression of integrins examined by RT-PCR in gastric adenocarcinoma cell lines

Integrins	Cell lines				
	MKN-7	MKN-45	KATO-III	HSC-39	SNU-16
α 2	+	+	+	+	+
α 3	+	+	+	+	+
α 4	+	-	-	-	-
α 5	+	+	-	-	-
α 6	+	+	+	+	+
α v	+	+	+	+	+
β 1	+	+	+	+	+
β 2	+	+	+	+	-
β 3	+	-	-	-	-
β 4	+	+	+	+	+
β 5	+	+	+	+	+
β 6	+	+	+	+	-
β 7	-	-	-	-	-
β 8	+	+	+	+	+

+, positive; -, negative

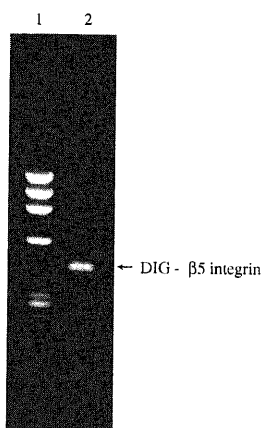


Fig. 1. Demonstration of PCR digoxigenin probe by 2% agarose gel electrophoresis. Lane 1, size markers (ϕ X174/HAE III); lane 2, Digoxigenin-labeled β 5 integrin probe.

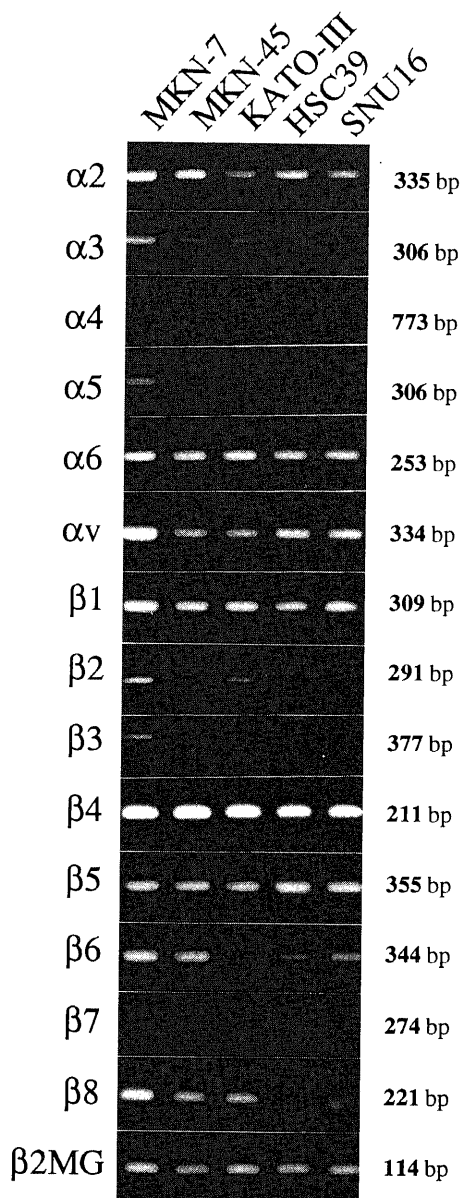


Fig. 2. RT-PCR analyses of integrins in gastric cancer cell lines MKN-7, MKN-45, KATO-III, HSC39 and SNU16. The products were identified by agarose gel electrophoresis.

て検討した. その中で, α 5 インテグリンの発現とリンパ節転移陽性例との間に有意な相関を認めた (表5). その他のインテグリンと組織型, 間質量, 浸潤増殖形態, リンパ管侵襲, 静脈侵襲とは, 相関が認められなかった. α v インテグリンおよび, α v インテグリンと複合体を形成しうる β 3, β 5, β 6, β 8 インテグリンの発現についてその相関を検討したが, α v インテグリンが発現している症例では, 同時にインテグリン β サブユニットも発現していた (表6). また, β 1 インテグリンも α v インテグリンと複合体を形成しうるインテグリンサブユニットであるが, 癌部, 非癌部いずれの症例においても β 1 インテグリンの発現がみられたため, α v と β 1 との相関は見出せなかった. 複合体を形成しない β 2, β 4, β 7 インテグリンと α v との間には, 相関はみられなかった.

次に胃癌組織において α v インテグリンと β 1, β 3, β 5, β 6 または β 8 インテグリンの両者の発現が認められる症例と病理組織学的因子との相関について検討したが, α v, β 6 インテグリンが陽性の症例は, 一例を除きすべてがリンパ節転移をきたしていた ($p = 0.0126$) (表7). また, その他のインテグリンの組合せでは組織型, 間質量, 浸潤増殖形態, リンパ管侵襲, 静脈侵襲いずれも相関が認められなかった.

III. 競合 RT-PCR による β 5 インテグリンの定量

胃癌組織 21 例, 非癌部 10 例における競合 RT-PCR の結果を表8にまとめ, その代表例を図4に示した. β 5 インテグリンの強度と競合鋳型の強度の比を縦軸に, 競合鋳型の濃度を横軸に取る対数グラフは, ほぼ直線上に位置していた (図5). 同様に β -アクチンについてもグラフを作成し, β 5 インテグリン, β -アクチンの強度と競合鋳型の強度の比が1となる時の競合鋳型の濃度 (横軸) をそれぞれの発現量とし, β 5 インテグリンの発現量を β -アクチンの発現量との比 (β 5 インテグリン/ β -アクチン) で補正した. その結果, 癌部の β 5 インテグリンは非癌部より約140倍有意に高かった (図6). また癌部における組織型, 間質量, 浸潤増殖形態, リンパ管侵襲, 静脈侵襲, リンパ節転移等との有意な相関は認められなかった.

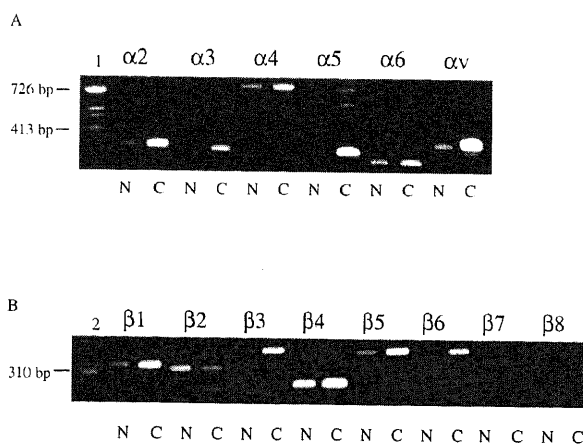


Fig. 3. RT-PCR analysis of integrins in gastric adenocarcinomas and surrounding gastric mucosa. (A) integrin α subunits; (B) integrin β subunits. Lane 1, size markers (ϕ X174/Hinfl); Lane 2, size markers (ϕ X174/HAE III); N, normal mucosa; C, carcinoma. The products were identified by agarose gel electrophoresis.

Table 4. Expression of integrins in gastric carcinomas and their surrounding mucosa by RT-PCR

Integrins	Normal (%)	Carcinoma (%)	<i>p</i> -value
$\alpha 2$	6/20 (30.0)	22/30 (73.3)	0.0025
$\alpha 3$	4/20 (20.0)	15/30 (50.0)	0.0411
$\alpha 4$	15/19 (79.0)	27/29 (93.1)	0.1966
$\alpha 5$	7/20 (35.0)	21/30 (70.0)	0.0146
$\alpha 6$	15/20 (75.0)	26/30 (86.7)	0.4542
αv	12/20 (60.0)	26/30 (86.7)	0.0445
$\beta 1$	19/20 (95.0)	30/30 (100)	0.4000
$\beta 2$	6/19 (31.6)	17/29 (58.6)	0.1040
$\beta 3$	11/17 (64.7)	22/27 (81.5)	0.1641
$\beta 4$	17/20 (85.0)	29/30 (96.7)	0.2885
$\beta 5$	17/20 (85.0)	30/30 (100)	0.0582
$\beta 6$	4/18 (22.2)	19/28 (67.9)	0.0032
$\beta 7$	0/20 (0.0)	0/30 (0.0)	
$\beta 8$	4/19 (21.1)	19/29 (65.5)	0.0015

Table 5. Correlation between expression of $\alpha 5$ integrin and LN metastasis

LN metastasis	No. of cases	$\alpha 5$ integrin		<i>p</i> -value
		-	+	
-	6	4	2	0.0492
+	24	5	19	

LN, lymph node; +, positive; -, negative.

Table 6. Correlation between expression of αv integrin and integrin β subunits

Integrin β subunit	No. of cases	αv integrin		<i>p</i> -value
		-	+	
$\beta 1$	-	1	0	0.2400
	+	49	11	
$\beta 2$	-	11	3	0.1706
	+	38	17	
$\beta 3$	-	10	4	0.0151
	+	34	6	
$\beta 4$	-	12	10	0.2399
	+	38	2	
$\beta 5$	-	12	9	0.0112
	+	38	0	
$\beta 6$	-	10	1	0.0052
	+	36	14	
$\beta 7$	-	50	38	
	+	0	0	
$\beta 8$	-	11	2	0.0204
	+	37	15	

+, positive; -, negative.

Table 7. Correlation between expression of $\alpha v \beta 6$ integrin and LN metastasis

LN metastasis	No. of cases	$\alpha v \beta 6$ integrin		<i>p</i> -value
		-	+	
-	6	5	1	0.0126
+	22	5	17	

LN, lymph node; +, positive; -, negative.

IV. 細胞内ハイブリダイゼーション法によるβ5インテグリンの発現

胃癌組織におけるβ5インテグリンの発現は、癌細胞の細胞質、特に核周囲において強く陽性像がみられた。時に核小体が陽性に染まることがあった。非癌部でも同様に染色されたが、全般的に、癌部に比し陽性細胞数は少なかった。癌部では、65例中57例(87.7%)に、非癌部では、36例中30例(83.3%)でβ5インテグリンの発現がみられた(図7)。さらに癌部と非癌部の陽性スコアを算出し比較すると、非癌部に比して癌部はβ5インテグリンが有意に高かった(表9)。β5インテグリンと組織型、深達度、間質量、浸潤増殖形態、リンパ管侵襲、静脈侵襲、リ

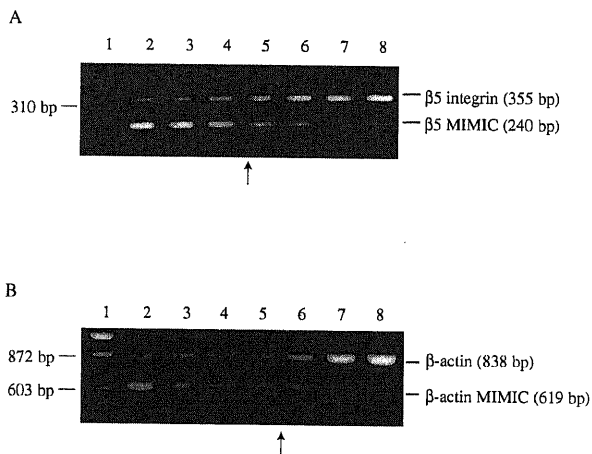


Fig. 4. (A) Quantification of β5 integrin by competitive RT-PCR. The size of the amplified target fragment and the β5-MIMIC (competitor) fragment were 355 and 240 bp, respectively. Size markers (φ X174/HAE III) are shown in lane 1. Concentrations of β5 MIMIC (attomoles/μl) are as follows: Lane 2 (5.0 × 10³); Lane 3 (2.5 × 10³); Lane 4 (1.25 × 10³); Lane 5 (6.25 × 10³); Lane 6 (3.125 × 10³); Lane 7 (1.56 × 10³); Lane 8 (7.8 × 10³). (B). Quantification of β-actin by competitive RT-PCR. The size of the amplified target fragment and the β-actin-MIMIC fragment were 838 and 619 bp, respectively. Size markers (φ X174/HAE III) are shown in lane 1. Concentrations of β-actin-MIMIC (attomoles/μl) are as follows: Lane 2 (40); Lane 3 (20); Lane 4 (10); Lane 5 (5); Lane 6 (2.5); Lane 7 (1.25); Lane 8 (6.25 × 10³). The products were identified by agarose gel electrophoresis. Arrows indicate the crossover point between the amplified target and MIMIC fragments.

Table 8. The amount of β5 integrin in gastric adenocarcinomas and their normal mucosa analyzed by competitive RT-PCR

Group of specimens	No. of cases	Amounts (attomoles/μl) of β5 integrin
Carcinoma	21	4.03 × 10 ⁻² ± 1.1 × 10 ⁻¹
Normal mucosa	10	2.85 × 10 ⁻⁴ ± 6.81 × 10 ⁻⁴ *

Results are expressed as $\bar{x} \pm SD$. * p<0.05.

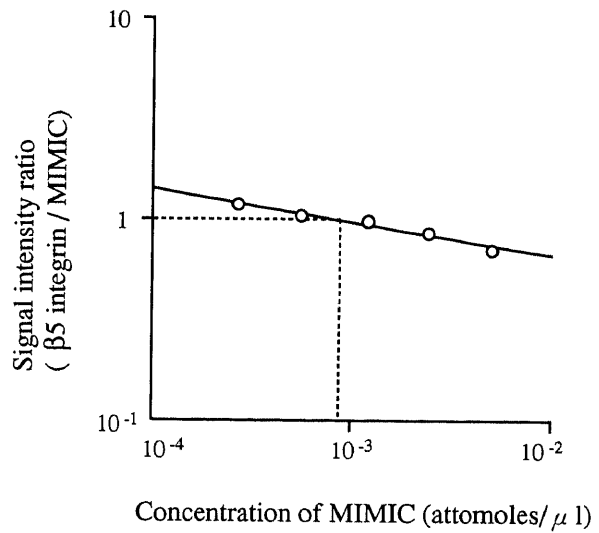


Fig. 5. The example of the quantitative determination of β5 integrin by competitive RT-PCR. The signal intensities of competitor in competitive RT-PCR product stained by etidium bromide were measured using a digital image analyser. The ratio of the amplified β5 integrin to β5-MIMIC were plotted against the concentration of the competitor used for the assay. At the point of one ratio β5 integrin and β5-MIMIC, both these amounts of β5 integrin and β5-MIMIC were regarded as equal.

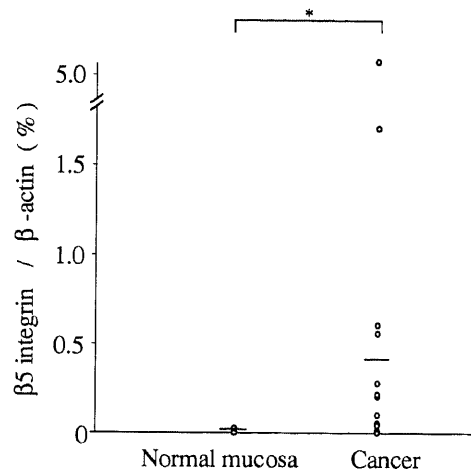


Fig. 6. The amount of β5 integrin in gastric adenocarcinomas and their normal mucosa analyzed by competitive RT-PCR. The mean β5 integrin/β-actin ratios (horizontal bar) in normal gastric mucosa and gastric adenocarcinomas were 0.0029% and 0.4%, respectively. * p<0.05.

Table 9. Positive scores of β5 integrin in gastric adenocarcinomas and their normal mucosa analyzed by in situ hybridization

Group of specimens	No. of cases	Positive scores of β5 integrin
Carcinoma	65	1.60 ± 0.632
Normal mucosa	36	1.31 ± 0.655 *

Results are expressed as $\bar{x} \pm SD$. * p<0.05.

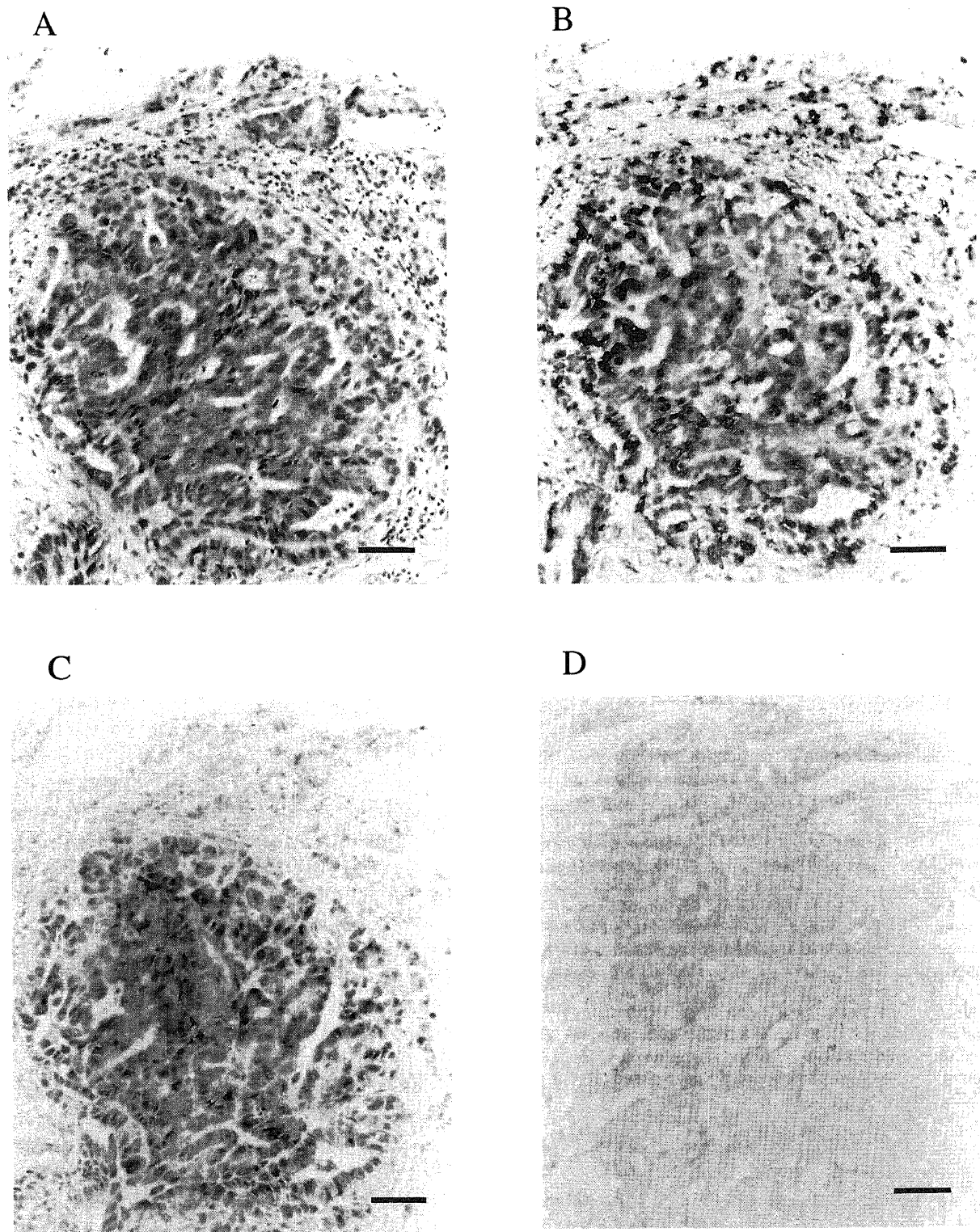


Fig. 7. A case of papillary gastric adenocarcinoma. (A) H&E. (B) $\beta 5$ integrin DNA probe. (C) Oligo d(T)₂₀ probe as positive control. (D) Negative control DNA probe. Scale bar indicates 50 μ m.

ンパ節転移との相関は認められなかった。

考 察

癌細胞の細胞外基質との接着，細胞間接着や遊走に重要な因子であるインテグリンは多くの癌で悪性形質との関連性が示唆されている。本研究では，ヒト胃癌組織，および癌巣とは十分

に離れた非癌部の胃粘膜組織の両者から RNA を抽出し各種インテグリンの発現を RT-PCR 法により検討したが，癌部においては $\alpha 2$ (VLA-2)， $\alpha 3$ (VLA-3)， $\alpha 5$ (VLA-5)， αv ， $\beta 6$ ， $\beta 8$ の発現が，非癌部と比べて発現率が高かった。Yasoshima ら¹⁹⁾は，ヒト胃癌の高肝転移株を樹立し親株と比較したところ，VLA-1，VLA-2，VLA-3，VLA-4，VLA-5 の発現がいずれも高く，VLA-6 と α

$\alpha v \beta 3$ は逆に低下していると報告しており、Yonemuraら¹⁰⁾は、胃低分化型腺癌細胞株(MKN-45)の播種モデルを用いた実験で、腹膜への高転移能をもった細胞株はVLA-2, VLA-3の発現が親株に比べて非常に高いと報告している。Nishimuraら¹⁹⁾もスキラス胃癌細胞株(OCUM-2M)の播種モデルにおいてVLA-2とVLA-3の発現増強を確認している。 $\alpha 2$ インテグリンについては、同様の報告が他の癌でもいくつかみられている。Chenら¹⁴⁾は、ヒト肺癌組織と隣接非癌部組織の $\alpha 2$ の発現をノーザンブロット法にて比較すると、肺癌組織では、非癌部組織に比べて少なくとも20倍発現が高く、Chanら¹⁷⁾も、 $\alpha 2$ を発現していないヒト横紋筋肉腫細胞株に $\alpha 2$ のcDNAを遺伝子導入しヌードマウスの尾静脈に静注すると、高率に肺転移をおこすと述べている。 $\alpha 3$ については、Nataliら¹⁸⁾は、VLA-3がメラノーマの皮膚浸潤の程度に比例して高発現し、転移巣においてもVLA-3が高率に発現していると述べている。VLA-2はコラーゲン、ラミニンをリガンドとし、VLA-3はこれに加えてフィブロネクチンもリガンドとして働くことが既に知られており²⁰⁾、胃癌においてはこれら細胞外基質のレセプターとしてのVLA-2, VLA-3の高発現が、浸潤・転移に重要な役割を担っているものと推測される。

$\alpha 5 \beta 1$ (VLA-5)は古典的なFN受容体(fibronectin receptor)で²¹⁾、癌化との関わりについては細胞株の悪性化を抑制するという報告がいくつか出されている^{21,22)}。一方で、ある種のメラノーマでは、VLA-5を発現するクローンは発現しないクローンよりもFN上でよく増殖することが示されている²³⁾。本研究では、RT-PCR法において、 $\alpha 5$ が癌部で高く、また、 $\alpha 5$ を発現する胃癌にリンパ節転移陽性例が多いことがわかった。当教室において浅田²⁴⁾も、過ヨウ素酸-リジン-パラホルムアルデヒド(periodate-lysine-paraformaldehyde, PLP)固定胃癌材料を用いて、抗 $\alpha 5 \beta 1$ ポリクローナル抗体で免疫組織化学的に検討したところ、 $\alpha 5 \beta 1$ の発現例とリンパ節転移陽性群には有意な相関があると報告している。このようにVLA-5は発現する細胞株により役割が異なるものと思われるが、胃癌組織でVLA-5が低下しているという報告は今のところない。他の癌の例を挙げると、Saitoら²⁵⁾は、免疫組織化学的検討により、膀胱癌では病期の進行と比例して原発巣、転移巣での $\alpha 5$ の発現が高いと報告している。

αv インテグリンとヘテロダイマーを形成する β サブユニットは $\beta 1, \beta 3, \beta 5, \beta 6, \beta 8$ であるが、今回のRT-PCR法による検討では胃癌組織における $\beta 3, \beta 5, \beta 6, \beta 8$ の発現は、 αv と同調していた($p < 0.05$)。なお、 $\beta 1$ については、癌ばかりでなく非癌部でもほぼ全てにおいて発現がみられた。Felding-Habermannら²⁶⁾は、 αv 欠損メラノーマ細胞はヌードマウスでの増殖能が低いが、 αv cDNAを遺伝子導入すると $\alpha v \beta 3$ を高発現し、増殖能が回復することを報告し、Leavesleyら²⁷⁾は、 $\alpha v \beta 3$ を発現せず $\alpha v \beta 5$ のみを有する腫瘍FG細胞株はVNウエル上の遊走能をもたないが、 $\beta 3$ cDNAを遺伝子導入して $\alpha v \beta 3$ を発現させると遊走能を獲得することを確認している。また、Korhonenら²⁸⁾は、腎癌凍結切片を用いた免疫組織化学的検討で、癌の悪性度が増すに従い αv インテグリンの発現が増加すると報告している。今回の検討でも、RT-PCR法にて αv インテグリンが、癌組織に高頻度に発現していた。さらに、 αv と、 β サブユニット1, 3, 5, 6, 8の両者の発現がみられる症例において各因子との相関を検討したところ、 αv と $\beta 6$ の両者の発

現がみられる胃癌症例ではリンパ節転移の頻度が有意に高いという結果が得られた($p < 0.05$)。 $\alpha v \beta 6$ インテグリンは、FNをリガンドとするインテグリン²⁹⁾で、主に上皮細胞に発現がみられる。Breussら³⁰⁾は、モノクローナル抗体を使った免疫組織学的手法と細胞内ハイブリダイゼーション法を用いた検討で、胎児、創傷治癒部位、口腔の扁平上皮癌等で $\beta 6$ インテグリンが著明に高いと報告している。とくに口腔の扁平上皮癌では、30例中27例に $\beta 6$ インテグリンの発現を認めたのに対し、正常口腔粘膜では発現を認めず、また、リンパ節転移巣において高発現が確認されており、癌の浸潤・転移と関わりがあることがうかがえる。これまでの報告と併せて、 $\beta 6$ インテグリンは原発巣と転移巣の両者に高発現し、癌転移に関わっていると推察される。

$\alpha v \beta 8$ インテグリンは、VNをリガンドとするインテグリン³¹⁾で、主に胎盤、脳、卵巣、子宮、神経系で発現が確認されているが、 $\beta 8$ は発見されてまだまもないインテグリンであり、その生体での意義についてはあまり知られていない。滝内ら³²⁾は、泌尿器癌細胞株を用いてRT-PCR法にて検討したところ、腎腫瘍細胞株、膀胱癌細胞株、睪丸癌細胞株に $\beta 8$ インテグリンの発現を確認しているが、胃癌についてはまだ報告がない。著者は、RT-PCR法において胃癌組織での $\beta 8$ インテグリンの発現が、非癌部組織と比べて有意に発現率が高いことを見出した。

$\alpha v \beta 5$ は、VNを唯一のリガンドとするインテグリン³³⁾で、種々の腫瘍細胞、線維芽細胞など広範囲に発現がみられる。今回の検討では、RT-PCR法において $\beta 5$ が、非癌部組織と比べて発現率が高い傾向がみられたが、正常組織においても比較的恒常的に発現しているため統計的な有意差は示し得なかった($p = 0.0582$)。検出感度が高いため、RT-PCR法による定性的な検討では $\beta 5$ の発現の差を見出すには限界があるようである。このため著者は、胃癌組織と非癌部組織に含まれる $\beta 5$ インテグリンの量を競合RT-PCR法で測定することにした。その結果、 β アクチンの量をコントロールにとると癌組織では非癌部組織に比して約140倍も $\beta 5$ インテグリンの発現量が多いという結果が得られた($p < 0.05$)。当教室のKawaharaら³⁴⁾のモノクローナル抗体を用いたPLP固定パラフィン胃癌切片での免疫組織化学的検討において $\beta 5$ インテグリンと $\beta 3$ インテグリンがスキラス型浸潤を呈する癌で高いと報告している。

競合RT-PCR法にて胃癌組織に $\beta 5$ インテグリンが高発現していることが確認されたので、つぎにISH法にてその局在を検討した。その結果、胃癌組織における $\beta 5$ インテグリンの発現は、癌細胞の細胞質、特に核周囲において強く陽性像がみられた。これはmRNAが、粗面小胞体の表面につくりボゾームに存在し、やはり核周囲に存在するゴルジ装置へ輸送される³⁵⁾という細胞内局在に基づくものと説明される。さらに、ISH法における非癌部と癌部の染色性を数値化して比較したところ、非癌部に比して癌部は $\beta 5$ インテグリンが有意に高い結果が得られた。これは、競合RT-PCR法により定量的に検討した結果を裏付けるものである。

結 論

5種類の胃癌培養細胞株におけるインテグリンの発現を確認の上、ヒト胃癌組織30例およびその隣接非癌組織におけるインテグリンの発現と病理学的因子との関係、胃癌組織における

$\beta 5$ インテグリンの定量, さらに胃癌生検組織における $\beta 5$ プローブを用いた細胞内ハイブリダイゼーション法による定量的解析を行い, 以下の結論を得た.

1. 胃癌培養細胞株においては, $\alpha 2, \alpha 3, \alpha 6, \alpha v, \beta 1, \beta 4, \beta 5, \beta 8$ インテグリンが陽性であった.
2. ヒト胃癌組織においては, RT-PCR法にて $\alpha 2, \alpha 3, \alpha 5, \alpha v, \beta 6, \beta 8$ インテグリンは非癌部胃組織に比べて有意に高く発現した.
3. αv インテグリンに注目してみると αv 陽性胃癌症例では, ヘテロダイマーを構成しうる $\beta 3, \beta 5, \beta 6, \beta 8$ インテグリンも高頻度に発現していた.
4. インテグリンをヘテロダイマーとしてみてみると $\alpha 5 \beta 1$ と $\alpha v \beta 6$ を発現する胃癌では, それぞれリンパ節転移が高率であった.
5. $\beta 5$ インテグリンを競合 RT-PCR法で検定すると癌部に有意に発現し, 更に ISH法にて $\beta 5$ インテグリンのシグナルが多かった.

以上より, ヒト胃癌では, 培養細胞と異なり細胞外基質に含まれるコラーゲン, ラミニン, FNあるいはVNなどに対する受容体としての各種インテグリンが同時に複数発現しており, このことがその進展・転移に寄与していると考えられた.

謝 辞

稿を終えるに臨み, ご指導とご校閲を賜りました恩師馬淵宏教授に深甚なる謝意を表します。また, 終始直接のご指導を賜りました金沢大学医学部病理学第一講座の中西功夫教授, 川島篤弘講師に心から感謝いたします。貴重な手術材料を提供して下さった金沢大学がん研究所外科部の磨伊正義教授をはじめ外科諸先生方, 小松市民病院高橋一郎副院長をはじめ外科諸先生方, 金沢市立病院外科橋爪泰夫科長をはじめ外科諸先生方に感謝いたします。さらにご支援とご協力を頂きました金沢大学医学部内科学第二講座ならびに金沢大学医学部病理学第一講座の皆様へ感謝致します。なお本論文の要旨の一部は22nd International Congress of the International Academy of Pathology (1998, Nice, France)において発表しました。

文 献

- 1) Liotta LA. Tumor invasion and metastases. Role of the extracellular matrix: Rhoads memorial award lecture. *Cancer Res* 46: 1-7, 1986
- 2) Hynes RO. Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell* 48: 549-554, 1987
- 3) Hynes RO. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 69: 11-25, 1992
- 4) Albelda SM, Buck CA. Integrins and other cell adhesion molecules. *FASEB J* 4: 2868-2880, 1990
- 5) Miyamoto S, Akiyama SK, Yamada KM. Synergistic roles for receptor occupancy and aggregation in integrin transmembrane function. *Science* 267: 883-885, 1995
- 6) Khwaja A, Rodriguez-Viciana P, Wennström S, Warne PH, Downward J. Matrix adhesion and Ras transformation both activate a phosphoinositide 3-OH kinase and protein kinaseB/Akt cellular survival pathway. *EMBO J* 16: 2783-2793, 1997
- 7) Varner JA, Cheresh DA. Integrins and cancer. *Curr Opin Cell Biol* 8: 724-730, 1996
- 8) Albelda SM. Biology of disease: role of integrins and other cell adhesion molecules in tumor progression and metastasis. *Lab Invest* 68: 4-17, 1993
- 9) 財団法人厚生統計協会編. 国民衛生の動向. 厚生指針 45: 406-438, 1998
- 10) 胃癌研究会編. 胃癌取り扱い規約改訂12版, 64-74頁, 金原出版, 東京, 1993
- 11) Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-159, 1987
- 12) 高橋 豊, 北台靖彦, 磨伊正義. 胃癌生検組織に対する, 転移関連遺伝子群の in situ mRNA hybridization による転移の予測. *消化器癌の発生と進展* 9: 37-38, 1997
- 13) Yasoshima T, Denno R, Kawaguchi S, Sato N, Okada Y, Ura H, Kikuchi K, Hirata K. Establishment and characterization of human gastric carcinoma lines with high metastatic potential in the liver: changes in integrin expression associated with the ability to metastasize in the liver of nude mice. *Jpn J Cancer Res* 87: 153-160, 1996
- 14) Yonemura Y, Endou Y, Yamaguchi T, Nojima N, Kawamura T, Fujimura T, Obata T, Kim BS, Miyazaki I, Sasaki T. Roles of VLA-2 and VLA-3 on the formation of peritoneal dissemination in gastric cancer. *Int J Oncol* 8: 925-931, 1996
- 15) Nishimura S, Chung YS, Yashiro M, Inoue T, Sowa M. Role of $\alpha 2 \beta 1$ - and $\alpha 3 \beta 1$ -integrin in the peritoneal implantation of scirrhous gastric carcinoma. *Br J Cancer* 74: 1406-1412, 1996
- 16) Chen FA, Repasky EA, Bankert RB. Human lung tumor-associated antigen identified as an extracellular matrix adhesion molecule. *J Exp Med* 173: 1111-1119, 1991
- 17) Chan BMC, Matsuura N, Takada Y, Zetter BR, Hemler ME. In vitro and in vivo consequences of VLA-2 expression on rhabdomyosarcoma cells. *Science* 251: 1600-1602, 1991
- 18) Natali PG, Nicotra MR, Bartolazzi A, Cavaliere R, Bigotti A. Integrin expression in cutaneous malignant melanoma: association of the $\alpha 3 / \beta 1$ heterodimer with tumor progression. *Int J Cancer* 54: 68-72, 1993
- 19) Ruoslahti E, Pierschbacher MD. New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science* 238: 491-497, 1987
- 20) Ruoslahti E. Integrins. *J Clin Invest* 87: 1-5, 1991
- 21) Plantefaber LC, Hynes RO. Changes in integrin receptors on oncogenically transformed cells. *Cell* 56: 281-290, 1989
- 22) Giancotti FG, Ruoslahti E. Elevated levels of the $\alpha 5 \beta 1$ fibronectin receptor suppress the transformed phenotype of Chinese hamster ovary cells. *Cell* 60: 849-859, 1990
- 23) Mortarini R, Gismondi A, Santoni A, Parmiani G, Anichini A. Role of the $\alpha 5 \beta 1$ integrin receptor in the proliferative response of quiescent human melanoma cells to fibronectin. *Cancer Res* 52: 4499-4506, 1992
- 24) 浅田康行. 胃癌におけるインテグリンの分布とその意義. *十全医会誌* 102: 291-304, 1993
- 25) Saito T, Kimura M, Kawasaki T, Sato S, Tomita Y. Correlation between integrin $\alpha 5$ expression and the malignant phenotype of transitional cell carcinoma. *Br J Cancer* 73: 327-331, 1996
- 26) Felding-Habermann B, Mueller BM, Romerdahl CA, Cheresh DA. Involvement of integrin αv gene expression in

- human melanoma tumorigenicity. *J Clin Invest* 89: 2018-2022, 1992
- 27) Leavesley DI, Ferguson GD, Wayner EA, Cheresh DA. Requirement of the integrin $\beta 3$ subunit for carcinoma cell spreading or migration on vitronectin and fibrinogen. *J Cell Biol* 117: 1101-1107, 1992
- 28) Korhonen M, Laitinen L, Yläne J, Koukoulis GK, Quaranta V, Juusela H, Gould VE, Virtanen I. Integrin distributions in renal cell carcinomas of various grades of malignancy. *Am J Pathol* 141: 1161-1171, 1992
- 29) Weinacker A, Chen A, Agrez M, Cone RI, Nishimura S, Wayner E, Pytela R, Sheppard D. Role of the integrin $\alpha v\beta 6$ in cell attachment to fibronectin: heterologous expression of intact and secreted forms of the receptor. *J Biol Chem* 269: 6940-6948, 1994
- 30) Breuss JM, Gallo J, DeLisser HM, Klimanskaya IV, Folkesson HG, Pittet JF, Nishimura SL, Aldape K, Landers DV, Carpenter W, Gillett N, Sheppard D, Matthay MA, Albelda SM, Kramer RH, Pytela R. Expression of the $\beta 6$ integrin subunit in development, neoplasia and tissue repair suggests a role in epithelial remodeling. *J Cell Sci* 108: 2241-2251, 1995
- 31) Nishimura SL, Sheppard D, Pytela R. Integrin $\alpha v\beta 8$: interaction with vitronectin and functional divergence of the $\beta 8$ cytoplasmic domain. *J Biol Chem* 269: 28708-28715, 1994
- 32) 滝内秀和, 鹿子木基二, 藤本宣正, 花房 徹, 京 昌弘, 市川靖二, 永野俊介, 福西考信, 藪元秀典, 井原英有, 島 博基, 森 義則, 生駒文彦. 泌尿器癌細胞株におけるインテグリン分子の発現. *日泌尿会誌* 85: 584-588, 1994
- 33) Smith JW, Vestal DJ, Irwin SV, Burke TA, Cheresh DA. Purification and functional characterization of integrin $\alpha v\beta 5$: an adhesion receptor for vitronectin. *J Biol Chem* 265: 11008-11013, 1990
- 34) Kawahara E, Ooi A, Nakanishi I. Integrin distribution in gastric carcinoma: association of $\beta 3$ and $\beta 5$ integrins with tumor invasiveness. *Pathol Int* 45: 493-500, 1995
- 35) Franke WW, Scheer U, Krohne G, Jarasch ED. The nuclear envelope and architecture of the nuclear periphery. *J Cell Biol* 91: 39s-50s, 1981

Integrins in Human Gastric Carcinoma Tissues : Analyses of the $\beta 5$ Subunit by Competitive Reverse Transcription-PCR and *in situ* Hybridization Shuzo Tsugawa, Departments of Medicine (II) and Pathology (I), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 — *J. Juzen Med Soc.*, **108**, 57 — 67 (1999)

Key words integrins, gastric carcinoma, $\beta 5$, competitive RT-PCR, *in situ* hybridization

Abstract

The integrin superfamily of heterodimeric transmembrane adhesion receptors mediates many cell-cell and cell-matrix interactions whose functions are believed to be critical to carcinogenesis and metastasis as well as normal morphogenesis and differentiation. However, the actual mechanisms responsible for tumorigenesis *in vivo* are not understood clearly. To investigate the expression of integrins in gastric carcinomas (GC), the author analyzed many integrins ($\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, αv , $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$, $\beta 4$, $\beta 5$, $\beta 6$, $\beta 7$ and $\beta 8$) by reverse transcription (RT)-PCR in 5 human GC cell lines, 30 surgically resected GC and 20 their adjacent normal mucosa. Expression of $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 6$, αv , $\beta 1$, $\beta 4$ and $\beta 8$ in all GC cell lines was found positive. Expression of $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5$, αv , $\beta 6$, and $\beta 8$ integrins in GC tissues was significantly increased in comparison with the surrounding gastric mucosa ($p < 0.05$). $\alpha 5$ -positive GC and $\alpha v\beta 6$ -positive GC showed higher frequency of lymph node metastases than those negative GC cases. Although $\beta 5$ expression tended to be high in GC, this was not statistically significant ($p = 0.0582$). However, analyses by competitive RT-PCR revealed that the $\beta 5$ integrin was 140-fold elevated in GC as compared to the surrounding gastric mucosa ($p < 0.05$). Furthermore, *in situ* hybridization analyses, using 65 GC biopsy cases, confirmed the significant increase in expression of the $\beta 5$ integrin ($p < 0.05$). These findings suggest that the increased expression of many sets of integrins may contribute to carcinogenesis and metastasis in GC.