OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	ヒト唾液腺癌細胞株(HSG)の無血清培養クローンの生物学的特性 その1 : サブクローンHSG-S10の自律性増殖機構の解析 その2 : in vivo で骨誘導能を持つサブクローンHSG-S8の細胞特性
Author(s)	吉岡, 秀郎
Citation	大阪大学, 1992, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3087915
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【14】

氏名	吉岡秀郎（よしおかひでお）
博士の専攻分野の名称	博士（歯学）
学位記番号	第10227号
学位授与年月日	平成4年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 歯学研究科　歯学臨床系専攻
学位論文名	**ヒト唾液腺癌細胞株（HSG）の無血清培養クローンの生物学的特性** **その1：サブクローンHSG－S10の自律性増殖機構の解析** **その2：in vivoで骨誘導能を持つサブクローンHSG－S8の細胞特性**
論文審査委員	（主査） 教授　松矢　篤三 （副査） 教授　作田　正義　　助教授　小川　裕三　　講師　平地　慶行

論文内容の要旨

ヒト腺癌細胞株（HSG）は顎下腺から樹立された細胞株で，唾液腺腫瘍の増殖や分化調節機構を理解するための実験モデルとして数多くの研究に用いられている。それらの研究の結果，介在部導管上皮細胞に類似した形態を示すHSGが唾液腺を構成する各種細胞に分化することが明らかにされているが，HSGの増殖機構についての研究は少ない。HSGは通常血清添加培地で継代培養が行なわれており，成長因子の精製やオートクライン機構の解析のためには無血清培地での実験系が必要である。そこで無血清培地可増殖クローンの数株を分離した。そのクローンの1つHSG-S10は無血清培地で親株HSGの血清添加培地での増殖能に匹敵する能力を保持していた。そこでHSG-S10を用いて，同細胞の産生する成長因子を同定すると共にオートクライン機構の解析を行なった。一方，HSG-S8は高い細胞外基質産生能を有するクローンであり，唾液腺腫瘍に特徴的な間質形成機序を理解するための有用な系と考えられたので，その細胞特性について解析を加えた。

1．無血清培養クローンの分離：HSGは通常10%仔牛血清を含む培地で維持されている。この培地中の血清濃度を減少させ，細胞を最終的に無血清培地SFM-101に移した。5代継代培養後，無血清培養クローンを単一細胞プレート法によって分離し，無血清培養クローンの細胞増殖能を測定した。親株HSGと同じ性状を示すHSG-S10の増殖パラメーターの値は血清存在下の親株に匹敵し，無血清培養クローン中最も高い増殖能を有していることがわかった。

2．HSG-S10の自律性増殖機構の解析：HSG-S10の培養上清からイオン交換クロマトグラフィーさらにゲル濾過を用いて成長因子の部分精製を行なった。標的細胞として用いたBalb／c3T3のDNA合成促進活性はゲル濾過で35kD付近に溶出した画分と10kD付近に溶出した画分に認められた。次に

35kD 付近に溶出した画分をヘパリン親和性カラムに展開すると，その活性は 0.9-1.1M の塩濃度でカラムより溶出され，この画分をP1標品とした。ゲル濾過で 10kD 付近に溶出された活性はヘパリン親和性カラムに吸着せず，非吸着画分に活性を認めたのでこの吸着画分を濃縮してP2標品とした。定性試験や各種成長因子の特異抗体を用いた中和試験の結果よりP1標品は線維芽細胞成長因子（aFGF）様物質，P2標品はトランスフォーミング成長因子（TGF-α）様物質であることがわかった。そこで次に，親株HSG とHSG-S10 の細胞増殖能に対するP1標品とP2標品，さらに aFGF と TGF-α 精製標品の効果を検討した。その結果，P1標品並びに aFGF は親株 HSG とHSG-S10 の DNA 合成能を促進させなかった。一方，P2標品並びに TGF-α は両細胞の細胞増殖を著明に促進させるのみならず，無血清軟寒天中のコロニー形成率をも促進させた。また親株 HSG と HSG-S10 の DNA 合成能は抗 TGF-α 抗体添加によって抑制された。なお，親株 HSG および HSG-S10 は上皮成長因子（EGF）受容体を強く発現していた。さらに HSG-S10 の受容体数および結合能はともに親株HSG に比べ高かった。以上の所見より親株 HSG ならびに HSG-S10 の増殖機構にオートクライン因子として TGF-α が関与していることが強く示唆された。

3．HSG-S8 の細胞特性：HSG-S8 は高い細胞外基質産生能をもち，[^{3}H] - グルコサミンの取り込み量で親株の 3 倍，[^{35}S] - 硫酸では 7 倍の取り込み量を示した。さらに Sepharose CL-2B カラムを用いたプロテオグリカンの分析結果より HSG-S8 は軟骨型高分子プロテオグリカンを産生していることがわかった。[^{3}H] - プロリンのコラーゲン蛋白への取り込み量を測定すると HSG-S8 の産生する総蛋白の17.1%がコラーゲン蛋白であった。[^{35}S] - メチオニンで標識したコラーゲン蛋白をラジオオートグラフィーで検出したところ α_1(Ⅱ) 鎖に一致したバンドが認められ，さらに免疫沈降法によってこのバンドがⅡ型コラーゲンであることが確認された。HSG-S8 細胞をヌードマウスに移植すると腺癌胞巣に接して軟骨並びに骨組織の形成が見られた。In situ ハイブリダイゼーションの結果，この軟骨・骨組織はマウス間葉組織に由来することがわかった。以上より HSG-S8 は軟骨基質に近似した細胞外基質を産生するとともに，in vivo でマウス間葉細胞を軟骨や骨へ分化させる能力を有していることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

本論文は，ヒト顎下腺由来腺癌細胞株（HSG）から分離した無血清培地可増殖クローン 2 株の細胞生物学的特性について解析したものである。その 1 つのクローン（HSG-S10）を用いて成長因子の分離・精製が試みられ，酸性線維芽細胞成長因子（aFGF）様物質とトランスフォーミング成長因子α（TGF-α）様物質の 2 種の成長因子が同定された。さらに，HSG-S10 細胞の増殖機構の解析によって本細胞の自律性増殖にTGF-αを介したオートクライン機構が関与していることが強く示唆された。一方のクローン（HSG-S8）については以下の細胞特性が明らかにされた。HSG-S8細胞が軟骨型高分子プロテオグリカン，Ⅱ型コラーゲンを含む軟骨細胞に近似した細胞外基質産生能を有し，ヌードマウス移植腫瘍

癌内にマウス間葉組織に由来する軟骨や骨組織を形成することが示唆された。

本研究は唾液線腫瘍の増殖機構ならびに腫瘍内にみられる異所性骨組織の形成機序を理解するために大きな示唆を与えた。よって，本研究者は博士（歯学）の学位を得るに十分な資格があるものと認める。