

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	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

①

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

LION FILE

大阪大学歯学部口腔外科学第一講座

吉岡 秀郎

原著

原稿総紙数：62枚

図・写真の紙数：11枚

表の紙数：4枚

別冊希望数：50部

連絡先

吉岡秀郎

大阪大学歯学部口腔外科学第一講座

〒565 吹田市山田丘1-8

06-876-5711 (内線2257)

論文表題：

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

所属：大阪大学歯学部口腔外科学第一講座

著者名：吉岡秀郎

緒言

細胞の増殖や分化は種々の成長因子によって調節されている。特に自律性増殖を特徴とする癌細胞の増殖機構に関して Sporn と Todaro¹⁾ はオートクライン仮説を提唱した。これは癌細胞がある種の成長因子を産生するとともにその受容体を保有しており、自己の分泌した因子によって自律性増殖を営むという説である。この説は現在、多くの研究者から広く支持されている²⁻⁵⁾。ヒト腺癌細胞株 (HSG) は顎下腺から Shirasuna⁶⁾ らによって分離・確立された細胞株で、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がなされている。その結果、唾液腺介在部導管上皮細胞に類似した形態を示す HSG が分化誘導剤添加や反復クローニングなどによって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⁷⁻¹³⁾。しかし HSG の増殖機構に関する研究は少なく¹⁴⁻¹⁶⁾、特にオートクライン機構に関しては不明な点が多い。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血清中の種々の因子の影響が無視できる無血清培地での実験系が必要である。そこでHSGから無血清培養クローンを分離し、そのサブクローンの産生する成長因子を同定するとともに自律性増殖機構について解析を行なった。

実験材料ならびに実験方法

1. 細胞及び培養方法

ヒト顎下腺由来腺癌細胞株 HSG⁶⁾およびマウス線維芽細胞株 Balb/c3T3 clone A31⁷⁾ (American Type Culture) は 10% CS (Cell Culture Laboratories, Ohio, U.S.A.) と 4 mM-グルタミン (和光純薬, 大阪) を含む DME (日水製薬, 東京) にて 37°C に調整した 5% 炭酸ガス培養器中で培養された。継代培養のために細胞を最終濃度 0.08% トリプシン (阪大微生物病研究会, 大阪) と 1.4% EDTA (同仁化学研究所, 東京) を含む PBS (PH7.2) で採取し、次に 200×g で 5 分間遠沈し、得られた細胞沈渣を PBS で 2 回洗浄した。HSG は増殖培養液に 10⁵ 個/ml 浮

遊させ，60mm径プラスチック皿（Corning Glass Works, Corning, NY, U.S.A.）に5ml入れ増殖させた。培地交換は3日毎に行い6日目に継代培養を行った。一方，Balb/c3T3は 3×10^5 個/mlに培養液で浮遊させ，90mm径プラスチック皿（Coning）に15ml入れ培養し，細胞を密に増殖させないように3日毎に継代培養した。

2. 無血清培養クローンの分離

継代250代目のHSGから以下の過程で無血清培地可増殖クローンを分離した。HSG細胞は10%CSを含むDMEで培養するとプラスチック皿上によく接着し旺盛な細胞増殖を示す。しかし培地中にCSを添加しないと数日後には95%の細胞がシャーレ面より剥がれ培養液中に浮遊し継代培養が不可能であった。そこで約4ヶ月かけて培地中の血清濃度を10%から0.1%に暫減し，0.1%BSA(Fraction V, Sigma, ST. Louis, U.S.A.)を添加したDMEで4週間培養した後，無血清SFM-101培地（日水製薬，東京）に馴化した。無血清SFM-101培地下で5代継代培養を行なった後，単一細胞プレート法によりク

ローニングを行なった。すなわちEDTA-トリプシン溶液にて採取した細胞を増殖培養液中で単一細胞浮遊液としたものを96ウェルマルチプレート(Corning)に各ウェル1細胞になるように分注した。その後、直ちに各ウェルを倒立顕微鏡にて観察し、確実に1細胞が浮遊しているウェルをマークした。このようにして増殖した細胞のうち確実に単一細胞から増殖したクローンを10個分離し、この中よりHSG-S6, HSG-S8, HSG-S10の3株を選び実験に用いた。

3. HSG-S10の培養上清(CM)からの増殖因子の部分精製

1) CMの調整

以下の方法でCMを採取した。SFM-101培地に 2×10^5 個/mlのHSG-S10を浮遊させ、90mm径のプラスチック皿に15mlで分注し、翌日培養液を交換した。培養2日から6日目の培養上清を採取後、 $200 \times g$ で遠沈し細胞を除去したものをCMとした。CMの濃縮のために硫酸塩析を行なった。10lのCMに最終濃度が80%となる様に(561g/l)硫酸アンモニ

ウム (和光純薬) を添加し, 4 °C 下で静置した. 24 時間後, 塩析した画分を遠沈と濾過により採取した. これを最小量の蒸留水に溶解したものを 4 °C 下で 100 倍量の蒸留水で透析した後, 凍結乾燥した. 透析膜は Spectropore 6 (分子量 cut off 3500; Spectrum Medical Industries, Houston, U. S. A) を用いた.

2) イオン交換クロマトグラフィー

1) によって得られた試料を最小量の蒸留水に溶解後, 4 °C 下で 10 l の 50 mM トリス緩衝液 (PH 8.0) に対し 48 時間透析し, 同緩衝液にて平衡化した DEAE-Sephacel カラム (3.0 × 25 cm; Pharmacia, Uppsala, Sweden) に展開した. 非吸着画分を溶出後, 吸着画分を 0 M から 1 M の NaCl 直線濃度勾配下で溶出し, 1 チューブあたり 7.5 ml の溶液をフラクションコレクター (Gilson, France) を用いて回収した. 各フラクションのサンプルを 0.15 M NaCl を含む PBS (PH 7.5) で透析後検体とし, Balb/c 3T3 に対する DNA 合成促進活性を測定した.

3) ゲルクロマトグラフィー

2)にて活性を有する画分を凍結乾燥後, PBSに溶解した. その試料をPBSで平衡化したSephacryl S-100HRカラム(1.5×95cm; Pharmacia)に展開した. 溶出は10ml/hで行い, チューブあたり1.5mlの溶液を回収し, 各フラクションの活性を測定した. 分子量マーカーとしてブルーデキストラン(2000kD), BSA(67kD), 卵白アルブミン(47kD), 炭酸脱水酵素(29kD), チトクロームC(12.4kD), アプロチニン(6.0kD; 以上 Sigma)を用いた.

4)ヘパリン親和性クロマトグラフィー

3)の活性画分を回収し, 蒸留水で透析し, 凍結乾燥後, 0.15 M NaClおよび0.05% CHAPS(和光純薬)を含む25mM トリス緩衝液 (PH7.5)に溶解した. その試料を同緩衝液で平衡化したHeparin-Sepharose CL-6Bカラム(1.0×3.5cm; Pharmacia)に展開した. 非吸着画分を溶出後, 吸着画分を0.15Mから3.0MのNaCl直線濃度勾配下で溶出を行い, チューブあたり1mlの溶液を回収し, 蒸留水に対して透析後, 200 μ lのPBSに溶解し活性を測定した.

4. 細胞増殖測定法

細胞増殖を以下の方法で算定した。すなわち 5×10^4 個/mlの細胞を16mm径のマルチウェルプレート (Corning) に1mlずつ分注し、それぞれの培養液中で培養した。その後、経時的に生細胞数を算定し、片対数グラフで細胞倍加時間を求め、細胞増殖が停滞に達した時の細胞数より細胞飽和密度を算定した。また細胞増殖に与える増殖因子の効果を算定するために細胞を16mm径ウエルに 1×10^4 個ずつ播種した。24時間培養後、各濃度のEGF(アース製薬, 兵庫)およびTGF- α (湧永製薬, 広島)を含む無血清培養液に交換した。さらに培養開始3日後再度それぞれの培地を交換し、7日目の生細胞数を測定した。

次に増殖因子の軟寒天中でのコロニー形成能に与える影響をMacphersonとMontagnier¹⁸⁾の方法に準じて行った。すなわち35mm径プラスチック皿 (Corning) に0.6%の寒天(Difco, Michigan, U.S.A)を含む培養液を支持層とし、その上に単離した標的細胞を 1×10^4 個/mlに浮遊させた0.3%の寒天を含む培養液を重層し硬化させた。5%炭酸ガス培

養器中で37℃にて2週間培養後，位相差顕微鏡で10個以上からなる細胞集落をコロニーとして，その数を算定した．なおEGFおよびTGF- α は最終濃度が0 ng/mlから5 ng/mlになるように軟寒天中に添加した．

5. DNA合成能の測定

細胞のDNA合成能は $[^3\text{H}]$ -チミジンのTCA不溶画分への取り込み量を指標として測定した．すなわち 1×10^5 個の細胞を16mm径ウエルに播種し，37℃で4日間培養後，試験サンプルを含む無血清培養液SFM-101で23時間培養を行った後， $1 \mu\text{Ci/well}$ の $[\text{メチル-}^3\text{H}]$ -チミジン (Specific activity 2.0 Ci/mmol; ICN Biomedicals, CA, U.S.A.)を添加し，1時間のパルスラベルを行なった．またサンプルのBalb/c3T3のDNA合成促進活性算定のために，96ウエルマルチプレートに 1×10^5 個/mlのBalb/c3T3細胞を含む10%CS添加DMEを $100 \mu\text{l}$ ずつ入れ，細胞を密に増殖させた．0.4%CS添加DMEで2日間培養後，試験サンプルを添加し22時間培養後， $0.1 \mu\text{Ci/well}$ の $[^3\text{H}]$ -チミジンを添加し2時間のパル

抗 IL-1 α 抗体 (大日本製薬, 大阪), 抗 IL-1 β 抗体 (大塚製薬, 徳島), 抗 IL-6 抗体 (本学医学部内科学第 3 講座, 岸本忠三教授より供与) である。培養上清からの部分精製標品に PBS で 50 倍に希釈した抗体を添加し 37 $^{\circ}$ C, 1 時間反応させた。抗体処理標品の Balb/c3T3 の DNA 合成促進活性を測定し, 抗体未処理標品に対する比活性を算定した。

7. 部分精製標品の物理・化学的性状の解析

3. で得られた部分精製標品に対し, 以下の処理を行い, Balb/c3T3 細胞に添加してその DNA 合成能を測定し, 未処理対照に対する比活性を算出した。トリプシン処理のために最終濃度が 50 μ g/ml となるようにトリプシン (Sigma) を添加した標品を 37 $^{\circ}$ C の恒温槽中で 2 時間インキュベートした。処理後, 大豆トリプシンインヒビター (Sigma) を 100 μ g/ml となるように添加し反応を停止させた。対照として予めトリプシンとトリプシンインヒビターとの混合液を室温で 30 分間前処理したものを先の濃度で標品に添加した。熱処理は 56 $^{\circ}$ C の恒温水中で 30 分間または沸騰水中で 3 分間行った。酸

・アルカリ処理のためにサンプルを1 M 酢酸または0.2 M トリス塩酸緩衝液 (PH9.0) で24時間, 4 °Cにて透析後, 蒸留水で再度透析した. またジチオスレイトール (DTT) 処理は最終濃度が10 mMになるように部分精製標品にDTT (和光純薬) を添加し4 °C, 24時間反応させた後, 蒸留水で透析し標的細胞に添加した.

8. 細胞のヌードマウスへの移植

無血清培養クローン細胞の造腫瘍性を検討するために3~4週齢雌ヌードマウス (Balb/c nu-nu, 日本エスエルシー, 静岡) を用いた. EDTA-トリプシン溶液により採取した 10^7 個の細胞を0.1 mlのPBSに浮遊させてヌードマウス背部皮下に接種した.

9. 光学顕微鏡による単層培養形態の観察

培養細胞の観察には日本光学社製位相差顕微鏡ダイアフォトMDを用い, 写真撮影を行なった.

10. EGF受容体の検索

5×10^4 個/mlの細胞をプラスチック皿上で密に増殖させた後, EDTA溶液で細胞を浮遊させ, 試験

管あたり 2.0×10^5 個になるように分注した。氷冷下にて 0.25% BSA 添加 PBS で 2 回洗浄後, 0.25% BSA 添加 SFM-101 培地に異なる濃度の [^{125}I]-EGF (Specific activity $115 \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$, ICN) と $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ の EGF の存在下 (非特異的結合), または非存在下 (全結合) で 4°C でインキュベートした。その後、氷冷下にて 0.25% BSA 添加 PBS で 3 回洗浄し, 上清を除き細胞を $400 \mu\text{l}$ の 0.1N NaOH に溶解し, ガンマカウンター (LKB-Wallac 1282 CompuGamma, Wallac, Finland) で放射活性を測定した。なお, [^{125}I]-EGF との結合の経時的変化を検討したところ 4 時間で最も特異的結合 (全結合 - 非特異的結合) が最大となったため, 実験の培養時間は 4 時間とした。

結果

1. 得られた無血清クローン細胞の単層培養形態
無血清培養クローン HSG-S6, HSG-S8, HSG-S10 の位相差顕微鏡像を図 1 に示した。HSG-S10 は親株 HSG と同様に細胞の疎な部分では比較的長い細

胞形態を示し，密に増殖すると敷石状の形態を呈するのに対し，HSG-S6とHSG-S8はやや小型の立方形態を示していた。

2. 無血清クローン細胞の細胞増殖特性

各クローン細胞の増殖パラメータを表1にまとめた。それぞれの数値は親株HSGでは10%CSを含むDME培地での，また各クローンでは無血清培地SFM-101での測定結果を示している。細胞倍加時間はHSG-S6で30.1時間，HSG-S10では30.4時間で血清存在下での親株HSGの29時間に匹敵するものであった。一方HSG-S8では49.3時間と上記クローンに比較して遅い増殖速度を示した。HSG-S10の細胞飽和密度は $7.1 \times 10^5 / \text{cm}^2$ と親株HSGの $9.3 \times 10^5 / \text{cm}^2$ に比較すると低い値を示したが，他のクローンHSG-S6の $4.6 \times 10^5 / \text{cm}^2$ やHSG-S8の $2.6 \times 10^5 / \text{cm}^2$ に比較すると高い値を示した。

血清添加の軟寒天中で69%と高いコロニー形成能をもつ親株HSGは血清無添加では全くコロニーを形成しなかった。無血清軟寒天培地中でHSG-S10は22%のコロニー形成率を示し，HSG-S6の

11.3% , また HSG-S8 の 4.5% に比較して高い値を示した。なお 3 つのクローンの血清添加軟寒天中のコロニー形成率は 58% から 65% と同条件下での親株 HSG とほぼ同じ値を示した。また各無血清クローンは親株 HSG と同様にヌードマウス移植での造腫瘍性を示した。

3. HSG-S10 の CM による Balb/c 3T3 DNA 合成能の促進効果

成長因子の分離・同定に際して、無血清培地下で最も高い増殖能を有する HSG-S10 を選んだ。本クローンの培養上清中の成長因子について Balb/c 3T3 を標的細胞として検討した。まず HSG-S10 の培養 2 - 4 日目の CM を添加すると Balb/c 3T3 の DNA 合成能は無添加時の 3.7 倍に、培養 2 - 6 日目の CM を添加で無添加時の 4.9 倍に促進された。なお CM を pH 3.0 で一時的に酸処理を行うとその DNA 合成促進活性は 2.8 倍と 1.9 倍とにまで低下した (図 2)。そこで、培養 2 - 6 日目の HSG-S10 の上清を 101 回収し、さらに 80% 飽和硫酸による塩析、透析、凍結乾燥を行ったサンプルより成長因子の部分精製

を試みた。

4. 成長因子の部分精製

まず上記サンプルをイオン交換クロマトグラフィーに展開すると総タンパクの1.3%が非吸着画分に流出したが、この画分にはBalb/c3T3のDNA合成促進活性は存在しなかった。吸着画分をNaCl濃度0Mから1Mの直線濃度勾配下にてカラムより溶出させるとDNA合成促進活性を示す画分は0.25Mから0.3M NaClの範囲に溶出された(図3)。次に、図3の横線で示す活性画分を脱塩した後、このサンプルをゲルクロマトグラフィーに展開した。その結果、35kD付近に溶出する画分と10kDに溶出する2つの画分にBalb/c3T3のDNA合成促進活性を認めた(図4)。次に、この2つの画分をヘパリン親和性クロマトグラフィーに展開した。ゲル濾過で35kD付近に溶出した画分のうち吸着画分を0.15Mから3M NaClの直線濃度勾配下でカラムより溶出させるとDNA合成促進活性は0.9Mから1.1M NaClの範囲に溶出した(図5)。図5の横線で示した画分をP1標品とし、以下の実験に用いた。またゲル濾

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，非吸着画分に活性が現われたのでこの非吸着画分を濃縮し，P2標品として以下の研究に用いた．

5. P1とP2標品の物理・化学的性状と特異抗体による中和試験

先のP1，P2標品の物理・化学的性状の解析を行い，その結果を表2に示した．トリプシン処理によりP1標品のDNA合成促進活性は9.0%，またP2では13.4%に低下した．P1標品は56℃30分間の熱処理で42.7%に活性が低下し，100℃，3分間処理で失活した．また酸処理で35.6%，アルカリ処理では48.3%と活性は低下した．この様にP1標品は酸・アルカリ処理に不安定な物質であることがわかった．一方，P2標品は56℃，30分間の熱処理で安定で，100℃，3分間の熱処理ではその活性は52.3%に低下した．P2標品は酸・アルカリ処理では安定性を示したが，10mM DTT処理によりその活性は20.5%まで低下した．なおP1は10mM DTT処理で76.8%と比較的安定であった．

次に P1 標品と P2 標品がいかなる成長因子であるかを検討するために各種成長因子の中和抗体を用いて中和試験を行った。その結果、P1 標品の DNA 合成促進活性は抗 aFGF 抗体処理により 18.7% に抑制を受けたが、他の抗体処理ではその活性は 86.1% から 122.9% と著明な抑制を受けなかった。一方、P2 標品では抗 TGF- α 抗体処理でその活性は 20.6% にまで抑制を受けた。抗 EGF 抗体処理で 75.8%、他の抗体処理でも 85.8% から 105.9% とその活性は顕著な抑制を受けなかった(表 3)。以上より P1 標品は aFGF 様因子で P2 標品は TGF- α 様因子であることが示唆された。この P1 および P2 標品の中和試験の結果は先の定性試験の結果と一致するものであった。即ち P1 は Balb/c 3T3 の DNA 合成能を 8 倍以上増強する等電点 8 以下の熱・酸・アルカリ処理に不安定なタンパクで、ヘパリン親和性カラムに吸着し 1 M NaCl で溶出するといった aFGF の特性を有していた。また P2 は熱・酸・アルカリ処理に比較的安定なタンパクで、10 mM DTT 処理で失活する TGF- α の特性を有していた。

6. 親株 HSG, HSG-S10 の DNA 合成能 に対する P1 標品, aFGF, bFGF の 効果

上記の実験から P1 標品が aFGF 様因子であることが示唆された。そこで P1 標品ならびに aFGF の精製標品の親株 HSG ならびに HSG-S10 の DNA 合成能に対する影響を検討した。また aFGF と等電点が異なるのみで生物活性の類似している bFGF の効果についても合わせて検討した。その結果、3 者の標品はいずれも各細胞の DNA 合成能に対して 1.0 倍から 1.13 倍と著明な促進効果を与えなかった(図 6)。なお、図 6 の aFGF ならびに bFGF は両者とも 10 ng/ml 添加時のデータを示しているが、この濃度を 0.01 ng/ml から 100 ng/ml の範囲で変化させても同様に顕著な DNA 合成促進効果は認められなかった(データ省略)。

7. 親株 HSG と HSG-S10 の細胞増殖能 に対する P2 標品, TGF- α , EGF の 効果

前述の実験結果から P2 標品が TGF- α 様因子であることが示唆された。そこで、親株 HSG ならびに HSG-S10 の細胞増殖能に対する P2 標品ならびに TGF-

α と EGF 精製標品の効果について検討した。DNA 合成促進効果では親株 HSG ならびに HSG-S10 に対して P2 標品の部分精製標品は約 1.8 倍の促進効果を示した。また TGF- α と EGF はともに両細胞の DNA 合成を促進させた。TGF- α では 1 ng/ml の濃度で未処理の 1.7 ~ 1.8 倍に、EGF では 10 ng/ml の濃度で未処理の 1.5 倍の促進効果を示した (図 7)。

次に 16 mm 径 ウェルに 1×10^4 個の細胞を播種後、0.1 ng/ml から 10 ng/ml の濃度の TGF- α あるいは EGF を含む無血清培地に交換し、培養 7 日目の生細胞数を算定した。その結果、親株 HSG の細胞数は 5 ng/ml の EGF 添加により無添加時の約 2 倍になり、同じ濃度の TGF- α 添加では無添加時の 4 倍に増加した (図 8 A)。一方、HSG-S10 の細胞数は 5 ng/ml の EGF 添加により無添加時の 2.6 倍になり TGF- α 添加群では 0.1 ng/ml の濃度から増加し、さらに 1 ng/ml 添加により無添加時の 6.1 倍にまで増加した (図 8 B)。

次に、HSG および HSG-S10 の無血清軟寒天中のコロニー形成に与える TGF- α と EGF の影響を検討し

た。その結果、親株 HSG は EGF を添加してもコロニーを形成しなかったが、5 ng/ml の TGF- α の添加によって 8.3% の細胞がコロニーを形成するようになった (図 9 A)。EGF は HSG-S10 に対してもコロニー形成促進活性を示さなかった。一方、TGF- α 添加時では 0.1 ng/ml から HSG-S10 のコロニー形成率は上昇し、5 ng/ml 濃度でそのコロニー形成率は 38% にまで増加した (図 9 B)。

8. 親株 HSG ならびに HSG-S10 の EGF 受容体の解析

EGF と TGF- α は共に細胞表面の EGF 受容体を介して生物活性を示すことがよく知られている。前述の実験結果より TGF- α 添加により親株 HSG ならびに HSG-S10 の細胞増殖能ならびに無血清軟寒天中でのコロニー形成能が増強されたので両細胞の EGF 受容体の解析を行った (表 4)。その結果、親株 HSG は Kd 値 0.45 nM の高親和性と 2.9 nM の低親和性の 2 種類の EGF 受容体をそれぞれ 3.5×10^4 /細胞と 10.0×10^4 /細胞有していた。一方、無血清培養クローン HSG-S10 は Kd 値 0.36 nM の高親和性受容体を 9.8×10^4 /細胞と Kd 値 1.4 nM の低親和性受容体を

25.7 × 10⁴/細胞保有しており，その親和性ならびにその受容体数は親株 HSG に比べて増強していた。

9. 親株 HSG と HSG-S10 の DNA 合成能に対する抗 TGF- α および抗 EGF 中和抗体の効果

親株 HSG と HSG-S10 の内因性 TGF- α の存在を検討するため中和抗体添加による DNA 合成能の変化を調べた。その結果，両細胞の DNA 合成能は EGF の中和抗体処理では著明な影響を認めないのに対し，10 μ g/ml の抗 TGF- α 中和抗体を添加すると HSG および HSG-S10 の DNA 合成は無添加時の 70% から 60% にまで抑制された (図 10)。

10. 抗 TGF- α 抗体による P2 標品活性の中和

P2 標品と 10 μ g/ml の濃度の抗 TGF- α あるいは抗 EGF の中和抗体を同時添加し，親株 HSG，HSG-S10 の DNA 合成能を測定した。その結果，P2 標品の DNA 促進活性は抗 EGF 抗体によって中和されないのに対し，抗 TGF- α 抗体添加によって親株 HSG の DNA 合成能は 32% に HSG-S10 では 27% にまで低下した (図 11)。すなわち，これは P2 標品が TGF- α であることを強く示唆するものである。

考 察

SpornとTodaro¹⁾によって提唱されたオートクライン仮説は広く支持され、種々の成長因子による癌細胞の自律性増殖が報告されている²⁻⁵⁾。当教室でヒト顎下腺から樹立された介在部導管上皮細胞株(HSG)はヌードマウスへの移植によって梁状腺癌を形成する腺癌細胞株である⁶⁾。このHSG細胞にもある種の成長因子を介したオートクライン機構が存在していると考えられる。そこでHSG細胞の増殖機構を解明するためにまず、無血清培地可増殖クローンの分離を試みた。HSGは通常10%CSを含むDMEで培養されているがこの培地中の血清濃度を急に下げると殆どの細胞が数日以内に培養皿上より浮遊し、継代培養が困難であった。

HayashiとSato⁷⁾はラット下垂体由来のホルモン産生腫瘍GH3細胞を培養する際、培養液中の血清濃度を下げ、血清に代りうる各種のホルモンや増殖因子を添加した。この作業を繰返し、トランスフェリン、ソメトマジンAと他の3種類の因子を組合せた無血清培地でGH3細胞を培養すること

に成功した。そこで多くの細胞に対して増殖促進効果を持つことが知られているEGF²⁰⁻²²やインシュリン、トランスフェリンを無血清培地に加えてHSGを培養してみたがこの条件では継代培養ができなかった。さらにKanとKato²³らの方法に準じ、細胞接着蛋白として知られているフィブロネクチンやI型コラーゲンを付着させたプラスチック皿上の培養を試みたが、無血清培地可増殖クローンの分離に成功しなかった。そこで数ヶ月かけて培地中の血清濃度を10%から0.1%まで徐々に減少させ、さらに4週間0.1%BSAを含むDMEで馴化を行いその後、ハイブリドーマの無血清培養に用いられているSFM-101培地が最もHSGの無血清培地として適していたのでこの培地に移した。次に単一細胞プレート法でクローニングを行い、長期培養可能な無血清培養クローン3株(HSG-S6, HSG-S8, HSG-S10)の分離に成功した。この3株はいずれもヌードマウス移植にて造腫瘍性を示し、その組織像は梁状腺癌を呈していた。さらに各クローンの増殖パラメータを測定するとHSG-S10は各ク

ローン中最も高い細胞増殖能を有していた(表1)。すなわちHSG-S10は無血清培地での細胞倍加時間が30.4時間で血清存在下の親株HSGの29時間に匹敵するものであり、軟寒天培養液中においても約20%の細胞がコロニーを形成した。

ヌードマウス由来の線維芽細胞株Balb/c3T3を密に増殖させた後、培地中の血清濃度を0.4%まで下げると接触阻止現象を示す¹⁷⁾。これにFGFや血小板由来成長因子(PDGF)をはじめとする種々の成長因子を添加するとその細胞増殖能は著明な促進を受けるため、Balb/c3T3は成長因子を精製する際の標的細胞としてよく用いられている²⁴⁻²⁷⁾。そこで本研究ではHSG-S10の培養上清中に存在する成長因子を同定するためにBalb/c3T3を標的細胞として用いた。成長因子の精製の最初のステップとして酸抽出法が一般的に行われている。これはTGF- β やインシュリン様成長因子(IGF)などの成長因子が通常不活性型でCM中に分泌され、酸処理によって活性型になる^{3, 28, 29)}という理由による。しかし、HSG-S10のCMをPH3.0で一時的な酸処

理を行うと Balb/c3T3 の DNA 促進活性は 1.9 倍にまで低下した。一方, native な条件下で回収した HSG-S10 の CM は DNA 合成能を無添加時の 4.9 倍にまで促進させる活性を認めた。故にこの条件下で CM を 10 1 回収し, 塩析後, イオン交換カラム, ゲル濾過, ヘパリン親和性カラムに展開すると 2 種類の成長因子の存在を認めた。

その 1 つ P1 標品は aFGF 様物質であった。FGF は 1974 年に Gospodarowicz³⁰⁾ によりウシ脳下垂体より抽出された成長因子であり, Balb/c3T3 や血管内皮細胞を含む殆どの中胚葉系細胞に対し増殖促進活性を持つ。通常 10 ng/ml の濃度で実験に用いられ酸性条件や 60℃ 以上の熱処理で失活する^{31, 32)}。FGF はヘパリン親和性クロマトグラフィーで効率よく精製できる。bFGF は等電点 9.6, 分子量 16,000, アミノ酸 146 個, ヘパリン親和性カラムより 1.6-1.8M の NaCl 濃度で溶出し, aFGF は等電点 5~7, 分子量 16,000, アミノ酸 140 個, ヘパリン親和性カラムより 0.9-1.1M の NaCl 濃度で溶出する単鎖のポリペプチドである³³⁻³⁷⁾。P1 は抗 aFGF 抗体処理

によりその活性は殆ど認められなくなり, Balb/c 3T3のDNA合成能を8倍以上増強する等電点8以下の熱・酸・アルカリ処理に不安定なタンパクで, ヘパリン親和性カラムに吸着し1 M NaClで溶出するといったaFGFの特性を有していた. P1標品はaFGF精製標品と同様に親株HSGやHSG-S10のDNA合成能に著明な促進効果を与えず, 腫瘍細胞自身の増殖に対するaFGF様因子の関与を示すことができなかった. 現在のところaFGFやbFGFは中胚葉系細胞の増殖や分化に重要な役割を担うと考えられている. 特に血管内皮細胞の増殖や遊走の調節にaFGFやbFGFが強く関与することがよく知られており, 腫瘍が産生するFGF様因子も腫瘍血管誘導因子としての役割を持つと推察される^{33, 38-40}. また唾液腺腫瘍は多量の細胞外基質を含む特有な間質の形成を特徴としているが⁴¹⁻⁴³, これは産生されたFGFが腫瘍細胞周囲の間葉細胞の増殖を促進させた結果かもしれない.

aFGFとbFGFには細胞外に分泌されるためのシグナル配列がなく, 合成されたタンパクは主として

細胞内に留るか，ヘパラン硫酸などのプロテオグリカンに結合して存在していると考えられている⁴⁴⁻⁴⁶⁾。一方，HSG-S10と同様に，ヒト扁平上皮癌由来のA431細胞，ヒト胆管細胞癌由来のHuCC-T1細胞，シオノギ癌由来樹立細胞株SC-3細胞が培地中にFGF様因子を産生分泌しているという報告がある⁴⁷⁻⁵⁰⁾。これらの腫瘍細胞によって分泌されるFGF様因子がシグナル配列を持っているのか，また新しいFGFファミリーの1つであるかについては今後の興味ある研究課題となるであろう。またHuCC-T1細胞はHSG-S10と同じくFGF様因子を産生し培地中にも放出するが，培地にFGFを添加しても増殖促進効果を認めないという報告もあり⁴⁹⁾，HSG-S10が培地中に分泌するaFGF様因子の生物学的意義の解明については今後研究が必要である。

他の1つP2標品はTGF- α であると考えられた。TGF- α は1978年にDeLarcoとTodaro⁵¹⁾がマウスRNA肉腫ウイルス(MuSV)によって形質転換したマウス3T3細胞の無血清培養上清から正常腎由来の線維芽細胞株NRKの軟寒天中での増殖促進因子と

して精製された。その後の研究から TGF- α は EGF に極めて類似した活性を有するポリペプチドであり、EGF と共通の受容体を介してその生物活性が発現されることが明らかにされている。TGF- α は酸・熱処理に比較的安定な蛋白で、EGF と同様に分子内に 3 つの S-S 結合を持ち、還元剤で S-S 結合を切断すると失活する^{29, 52)}。P2 標品は上記の TGF- α の特性を有しており、熱・酸・アルカリ処理に比較的安定なタンパクで、10 mM DTT 処理で失活した。

オートクライン機構の立証のために用いられている基準は 1) 成長因子を培地に添加しなくても自律性増殖できること、2) ある成長因子の産生分泌とその受容体の発現、3) その成長因子の培地への添加により増殖促進効果が認められること、4) その成長因子の効果抑制物質(中和抗体など)の培地への添加による増殖抑制、である⁵³⁾。HSG-S10 の自律性増殖における TGF- α の関与は上記項目の全ての条件を満たすことで示された。すなわち、TGF- α の精製標品は P2 の部分精製標品と同様に親株 HSG や HSG-S10 の DNA 合成能を促進し、無血清軟寒

天中の増殖においてもTGF- α は5 ng/ml濃度で親株HSGのコロニー形成率を8.3%, HSG-S10で38%にまで促進した。親株ならびにHSG-S10はEGF受容体を強く発現しており, HSG-S10の受容体は親和性や数において親株HSGに比べて増強されていた。さらに10 μ g/mlの抗TGF- α 抗体添加でDNA合成は無添加時の70%から60%にまで抑制をうけた。以上の結果から, TGF- α は親株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関与することが示唆された。

Sato¹⁴⁾らはHSGをローラボトルで血清を含まないDMEで3日間培養し, その培養上清から1M酢酸条件下でのゲル濾過によってTGF- β とEGFを分離したと報告をしている。しかし彼らはTGF- β やEGFがHSG細胞に対し, どのような増殖効果を示すかについて明らかにしていない。またKurokawa¹⁵⁾らは 10^{-8} Mデキサメサゾン添加によるHSGの増殖抑制と46kDのEGF様活性物質の産生低下とが相関することから, HSGの自律性増殖に内因性EGFが強く関与していると報告している。本研究で得ら

れた P2 標品が EGF でなく TGF- α であることはその活性が抗 EGF 抗体でなく抗 TGF- α 抗体によって中和されることによって示唆される。著者は 2 抗体サンドイッチ ELISA 法を用いて親株 HSG, HSG-S10 の CM 中の EGF を定量を試みたが, EGF 量は 5 pg/ml の検出限度以下であった。また抗 EGF 抗体による HSG や HSG-S10 の DNA 合成抑制効果は著明ではなく, 内因性 EGF が増殖に関与しているとしてもその程度は極めて軽度であると思われた。さらに HSG 細胞およびそのクローン細胞の増殖に EGF よりも TGF- α がより強く関与していることは両因子の単層培養上あるいは軟寒天中での細胞増殖に対する活性の強さの差異から明らかである。TGF- α と EGF は細胞表面の EGF 受容体を介して非常によく似た生物活性を示し, 上皮細胞や線維芽細胞の増殖や新生児マウスの成長を促進させ, これらの作用力価は同等であるとされている^{54, 55}。しかし標的細胞によっては EGF に比較して TGF- α がより強力に作用する場合がある。また *in vitro* における細胞の悪性形質転換や腫瘍原性の指標であるコロニー

形成能に対する作用についてはTGF- α が強力な作用を示す⁵⁰⁾。癌化に伴うEGF受容体の過剰発現が種々の腫瘍において報告されているが、多くの場合それらに伴う成長因子の過剰発現はEGFではなくTGF- α である⁵⁷⁻⁶¹⁾。これらの腫瘍と同様に唾液腺上皮細胞においても癌化に伴ってTGF- α とEGF受容体が共発現し、自律性増殖能を獲得すると推察される。

結語

1. ヒト唾液腺癌細胞株(HSG)より無血清培地SFM-101で培養可能なクローンHSG-S6, HSG-S8, HSG-S10を分離した。無血清培養クローン中HSG-S10は最も高い細胞増殖能を有していた。
2. HSG-S10の培養上清中から成長因子の部分精製を行なった結果、aFGF様因子とTGF- α 様因子の存在を認めた。
3. HSG-S10からのaFGF様因子ならびにaFGFの精製標品は親株HSGならびにHSG-S10のDNA合成に対する影響を与えなかったが、HSG-S10からの

TGF- α 様因子と TGF- α の精製標品は両細胞の細胞増殖能を強く増強させた。

4. 親株 HSG と HSG-S10 は高親和性と低親和性の EGF 受容体を保有しており, HSG-S10 の EGF 受容体は親和性ならびに数において親株 HSG に比べて増強していた。
5. 親株 HSG と HSG-S10 の DNA 合成能は EGF の中和抗体処理では抑制されないのに対し, TGF- α 中和抗体添加により両細胞の DNA 合成は無添加時の 70% から 60% にまで抑制された。
6. HSG-S10 からの TGF- α 様因子の DNA 促進活性は抗 EGF 抗体によって中和されないのに対し, 抗 TGF- α 抗体添加で中和され, 本因子が TGF- α であることが示唆された。

以上の所見より親株 HSG ならびに HSG-S10 はオートクライン増殖機構を示し, その因子として TGF- α が関与していることが強く示唆された。

稿を終えるにあたり, 本研究課題与えられ御指導を賜わった松矢篤三教授, 本研究の実施に際し,

終始変わらぬ御指導をいただいた口腔外科学第一講座白砂兼光助教授に心から謝意を表します。また培養上清の部分精製に際し、御指導いただいた予防歯科学講座常光旭教授に厚く御礼申し上げますと共に、研究の円滑な進展のために特別な御配慮をいただいた口腔外科学第一講座の教室員の方々に深謝します。

Biological Characterization of Subclones Isolated in Serum-free Medium from Human Salivary Adenocarcinoma Cell Line (HSG).

1 : Autocrine Mechanism of Cell Growth in HSG-S10 Culture.

Hideo YOSHIOKA

The First Department of Oral Maxillofacial Surgery

Osaka University Faculty Of Dentistry

1-8, Yamadaoka, Suita, Osaka 565, Japan

Key words : Salivary gland tumor, Autocrine mechanism, TGF- α ,
aFGF

Several subclones were isolated in serum-free medium SFM-101 from human salivary adenocarcinoma cell line (HSG). Of these, HSG-S10 cells grew even in serum-free medium at comparable rate to that of parent HSG in medium with serum. Thus, this clone was analyzed for autocrine growth factor. Two growth factors, which were mitogenic on Balb/c 3T3 cells, were isolated from serum-free medium conditioned with HSG-S10 by a combination of DEAE-Sephacryl anion exchange chromatography and Sephacryl S-100HR Gel chromatography. One of these, P1 had extremely high affinity for heparin and was eluted with 1M NaCl solution. Its activity was relatively unstable to heating at 56°C and treatment with alkaline and acid, and inactivated by treatment with trypsin or antibody to acidic fibroblast growth factor (aFGF), suggesting that this is identical with aFGF. Another factor, P2, was acid-, alkaline- and heat-stable, but inactivated by treatment with trypsin, dithiothreitol or antibody to transforming growth fac-

tor- α (TGF- α), suggesting it to be TGF- α . On HSG-S10 and parent HSG, the P2 was mitogenic but P1 as well as aFGF was not. The expression of epidermal growth factor (EGF) receptor was in HSG and its clone, and their number and affinity were more striking in HSG-S10. The addition of TGF- α to culture enhanced both anchorage-dependent and -independent growth of HSG-S10 and HSG cells. The growth of these cells was inhibited by addition of antibody to TGF- α . These findings strongly suggest that TGF- α is a possible autocrine growth factor in HSG-S10 : by simultaneously producing or co-expressing both TGF- α and its receptor, the cells stimulate its own growth.

文献

- 1) Sporn, M.B. and Todaro, G.J. (1980) :
Autocrine secretion and malignant transformation of cells. N. Engl. J. Med., 303, 878-880.
- 2) Kaplan, P.L., Anderson, M. and Ozanne, B. (1982) : Transforming growth factor(s) production enables cells to grow in the absence of serum. Proc. Natl. Acad. Sci., 79, 485-489.
- 3) Ohmura, E., Okada, M., Onoda, N., Kamiya, Y., Murakami, H., Tushima, Y. and Shizume, K. (1990) : Insulin-like growth factors I and transforming growth factor α as autocrine growth factors in human pancreatic cancer cell growth. Cancer Res., 50, 103-107.
- 4) Cook, P.W., Pittelkow, M.R. and Shipley G.D. (1991) : Growth factor-independent proliferation of normal human neonatal

keratinocytes: production of autocrine-
and paracrine-acting mitogenic factors.
J. Cell. Physiol., 146, 277-289.

- 5) Iwamoto, A., Betran, L.M. and Digiovanni,
J. (1991) : Evidence for autocrine/para-
crine growth stimulation by transforming
growth factor- α during the process of
skin tumor promotion. Molecular Carcino-
genesis, 4, 52-60.
- 6) Shirasuna, K., Sato, M. and Miyazaki, T.
(1981) : A neoplastic epithelial duct cell
line established from an irradiated human
salivary gland. Cancer, 48, 745-752.
- 7) Shirasuna, K., Watatani, K., Sugiyama, M.,
Morioka, S. and Miyazaki T. (1986) : Isola-
tion and characterization of different
clones including myoepithelial-like vari-
ants from a clonal neoplastic epithelial
duct cell line of human salivary gland ori-
gin. Cancer Res., 46, 1418-1426.

- 8) Sato, M., Azuma, M., Hayashi, Y., Yoshida, H., Yanagawa, T. and Yura, Y. (1987) : 5-Aza-cytidine induction of stable mioepithelial and acinar cells from a human salivary intercalated duct cell clone. *Cancer Res.*, 47, 4453-4459.
- 9) Shirasuna, K., Morioka, S., Watatani, K. and Sugiyama, M. (1986) : Different expression of alkaline phosphatase in subclones of human neoplastic salivary duct cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 138, 625-630.
- 10) Shirasuna, K., Morioka, S., Watatani, K., Hayashido, Y., Furusawa, H., Sugiyama, M., Okura, M. and Matsuya, T. (1988) : Growth inhibition and differentiation of human salivary adenocarcinoma cells line by medium conditioned with normal human fibroblasts. *Cancer Res.*, 48, 2819-2824.
- 11) Shirasuna, K., Furusawa, H., Morioka, S.,

- Watatani, K. and Matsuya, T. (1989) :
Different contents of glycosaminoglycans
in a human neoplastic salivary duct cell
line and its subclone with a myoepithelial
phenotype. Virchows Archiv B, 57, 175-180.
- 12) Hatakeyama, S., Kurokawa, K., Satoh, M.,
Suzuki, A., Ota, O. and Shirasuna, K.
(1987) : Glucocorticoid - induced growth
inhibition of human neoplastic salivary
gland duct cell line (HSG). Acta Pathol.
Jpn., 37(4), 587-595.
- 13) Hatakeyama, S., Sashima, M., Shirasuna,
K., Satoh, A. and Suzuki, A. : Glucocor-
ticoid-induced growth inhibition with
enhanced expression of ductal epithelium
of human salivary gland adenocarcinoma
cells transplanted into athymic nude mouse.
Cancer, 62, 716-722.
- 14) Sato, M., Yoshida, H., Hayashi, Y.,
Miyakami, K., Bando, T., Yanagawa, T.,

Yura, Y., Azuma, M. and Ueno, A. (1985) :
Expression of epidermal growth factor and
transforming factor and transforming
growth factor- β in a human salivary gland
adenocarcinoma cell line. *Cancer Res.*, 45,
6160-6167.

15) Kurokawa, R., Kyakumoto, S. and Ota, M.
(1988) : Glucocorticoid regulated secre-
tion of epidermal growth factor in the
human salivary gland adenocarcinoma cell
line. *J. Endocr.*, 116, 451-455.

16) Kurokawa, R., Kyakumoto, S. and Ota, M.
(1989) : Autocrine growth factor in de-
fined serum-free medium of human salivary
gland adenocarcinoma cell line HSG. *Cancer
Res.*, 49, 5136-5142.

17) Gospodarowicz, D. and Moran, J. (1974) :
Effect of a fibroblast growth factor,
insulin, dexamethasone, and serum on the
morphology of Balb/c3T3. *Proc. Natl. Acad.*

Sci., 71, 4648-4652.

- 18) Macpherson, L. and Montagnier, L. (1964)
: Agar suspension culture for selective assay of cells transformed by polyoma virus. *Virology*, 23, 291-294.
- 19) Hayashi, I. and Sato, G. (1976) :
Replacement of serum by hormones permits growth of cells in a defined medium. *Nature*, 259, 132-134.
- 20) Cohen, S. (1962) : Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal. *J. Biol. Chem.*, 237, 1555-1562.
- 21) Cohen, S. and Carpenter, G. (1975) :
Human epidermal growth factor : Isolation and chemical and biological properties. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 72, 1317-1321.
- 22) Mullin, J.M. and McGinn, M.T. (1988) :
Epidermal growth factor-induced mitogene-

sis in kidney epithelial cells (LLC-PK1).
Cancer Res., 48, 4886-4891.

23) Kan, M. and Yamane, I. (1985) : Fibroblast products adsorb to the culture substrate and stimulate growth of human umbilical vein endothelial cells. J. Cell. Physiol., 124, 125-130.

24) Antoniades, H.N., Stathakos, D. and Scher, C.D. (1975) : Isolation of a cationic polypeptide from human serum that stimulates proliferation of 3T3 cells. Proc. Natl. Sci. Acad., 72, 2635-2639.

25) Deuel, T.F., Huang, J.S., Proffitt, R.T., Baenziger, J.U., Chang, D. and Kennedy, B. B. (1981) : Human platelet-derived growth factor. J. Biol. Chem., 256, 8896-8899.

26) Klagsbrun, M. and Shing, Y. (1985) : Heparin affinity of anionic and cationic capillary endothelial cell growth factors: Analysis of hypothalamus-derived growth

- factors and fibroblasts growth factors.
Proc. Natl. Acad. Sci., 82, 805-809.
- 27) Shimoyama, Y., Gotoh, M., Ino, Y.,
Sakamoto, M., Kato, K. and Hirohashi, S. :
Characterization of high-molecular-mass
forms of basic fibroblast growth factor
produced by hepatocellular carcinoma cells
: Possible involvement of basic fibro-
blast growth factor in hepatocarcinogene-
sis. Jpn. J. Cancer Res., 82, 1263-1270.
- 28) Robberts, A.B., Lamb, L.C., Newton, D.L.,
Sporn, M.B., DeLarco, J.E. and Todaro, G.J.
(1980) : Transforming growth factors: Iso-
lation of polypeptides from virally and
chemically transformed cells by acid /
ethanol extraction. Proc. Natl. Acad. Sci.,
77, 3494-3498.
- 29) Marquardt, H. and Todaro, G.J. (1982) :
Human transforming growth factor. J. Biol.
Chem., 257, 5220-5225.

- 30) Gospodarowicz, D. (1974) : Localization of a fibroblast growth factor and its effect alone and with hydrocortisone on 3T3 cell growth . Nature, 249, 123-127.
- 31) Gospodarowicz, D., Bialecki, H. and Greenburg, G. (1978) : Purification of the fibroblast growth factor activity from bovine brain. J. Biol. Chem., 253, 3736-3743.
- 32) Gospodarowicz, D., Hirabayashi, K., Giguere, L. and Tauber, J.P. (1981) : Factors controlling the proliferative rate final cell density, and life span of bovine vascular smooth muscle cells in culture. J. Cell Biol., 89, 568-578.
- 33) Gospodarowicz, D., Massoglia, S., Cheng, J., Lui, G. M. and Bohlen, P. (1985) : Isolation of pituitary fibroblast growth factor by fast protein liquid chromatography (FPLC): Partial chemical and biolog-

- ical characterization. J. Cell. Physiol.,
122, 323-332.
- 34) Thornton, S.C., Mueller, S.N. and Levine,
E.M. (1983) : Human endothelial cells: use
of heparin in cloning and long-term serial
cultivation. Science, 222, 623-625.
- 35) Maciag, T., Mehlman, T. and Friesel, R.
(1984) : Heparin binds endothelial cell
growth, principal endothelial cell mito-
gen in bovine brain. Science, 225, 932-935.
- 36) Esch, F., Ueno, N., Baird, A., Hill, F.,
Denorory, L., Ling, N., Gospodarowicz, D.
and Guillemin, R. (1985) : Primary struc-
ture of bovine brain acidic fibroblast
growth factor (FGF). Biochem. Biophys. Res.
Commun., 133, 554-562.
- 37) Uhlrich, S., Lagente, O., Lenfant, M.
and Courtois, Y. (1986) : Effect of
heparin on the stimulation of non-vascular
cells by human acidic and basic FGF.

Biochem. Biophys. Res. Commun., 137, 1205-1213.

- 38) Jaye, M., Howk, R., Burgess, W., Ricca, G. A., Chiu, I.M., Ravera, M.W., O'Brien, S.J., Modi, W.S., Maciag, T. and Drohan, W.n. (1986) : Human endothelial cell growth factor : Cloning nucleotide sequence, and chromosome localization. Science, 233, 541-545.
- 39) Sato, Y. and Rifkin, D.B. (1988) : Autocrine activities of basic fibroblast growth factor : Regulation of endothelial cell movement, plasminogen activator synthesis, and DNA synthesis. J. Cell. Biol., 107, 1199- 1205.
- 40) Mignatti, P., Tsuboi, R., Robbins, E. and Rifkin, D.B. (1989) : In vitro angiogenesis on the human amniotic membrane : Requirement for basic fibroblast growth factor-induced proteinases. J. Cell Biol.,

108, 671-682.

- 41) Toida, M., Takeuchi, J., Hara, K., Sobue, M., Tsukidate, K., Goto, K. and Nakashima, N. (1984) : Histochemical studies of intercellular components of salivary gland tumors with special reference to glycosaminoglycan, Laminin and vasucular elements. *Virchows Archiv A*, 403, 15-26.
- 42) Toida, M., Takeuchi, J., Hara, K., Sobue, M., Tsukidate, K., Asano, S., Fukatsu, T. and Nakashima, N. (1985) : Histochemical studies on pseudocysts in adenoido cystic carcinoma of the human salivary gland. *Histochem. J.*, 17, 913-924.
- 43) Fukatsu, T., Sobue, M., Nagasaka, T., Ohiwa, N., Fukata, S., Nakashima, N. and Takeuchi, J. (1988) : Immunohistochemical localization of chondroitin sulfate and dermatan sulfate proteoglycans in tumor tissues. *Br. J. Cancer*, 57, 74-78.

- 44) Shirasuna, K., Furusawa, S., Watatani, K. and Matsuya, T. (1989) : Different contents of glycosaminoglycans in a human neoplastic salivary duct cell line and its subclone with a myoepithelial phenotype. *Virchows Arch. (B)*, 57, 175-180.
- 45) Ingber, D.E. and Folkman, J. (1989) : Mechanochemical switching between growth and differentiation during fibroblast growth factor stimulated angiogenesis in vitro : Role of extracellular matrix. *J. Cell Biol.*, 109, 317-330.
- 46) Saksela, O. and Rifkin, D.B. (1990) : Release of basic fibroblast growth factor-heparan sulfate complexes from endothelial cells by plasminogen activator-mediated proteolytic activity. *J. Cell Biol.*, 110, 767-775.
- 47) Jouanneau, J., Gavrilovic, J., Caruelle, D., Yaye, M., Moens, G., Caruelle, J.P.

and Thiery, J.P. (1991) : Secreted or non-secreted forms of acidic fibroblast growth factor produced by transfected epithelial cells influence cell morphology, motility, and invasive potential. Proc. Natl. Acad. Sci., 88, 2893-2897.

48) Masuda, Y., Yoshitake, Y. and Nishikawa, K. (1987) : Secretion of DNA synthesis factor (DSF) by A431 cells that can grow in protein-free medium. Cell Biol. Int. Rep., 11, 359-365.

49) Masuda, Y., Yoshitake, Y. and Nishikawa, K. (1988) : Growth control of A431 cells in protein-free medium : Secretory products do not affect cell growth. In Vitro Cell. Dev. Biol., 2, 893-899.

50) Matsuzaki, K., Yoshitake, Y., Miyagiwa, M., Mineura, M., Tanaka, M., Sasaki, H. and Nishikawa, K. (1990) : Production of basic fibroblast growth factor-like factor by

- cultured human cholangiocellular carcinoma cells. *Jpn. J. Cancer Res.*, 81, 345-354.
- 51) Yamanishi, H., Nonomura, N., Tanaka, A., Nishizawa, Y., Terada, N., Matsumoto, K. and Sato, B. (1991) : Proliferation of Shionogi carcinoma 115 cells by glucocorticoid induced autocrine heparin-binding growth factor(s) in serum-free medium. *Cancer Res.*, 51, 3006-3010.
- 52) DeLarco, J.E. and Todaro, G.J. (1978) : Growth factors from murine sarcoma factors virus-transformed cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 75, 4001-4005.
- 53) Roberts, A.B., Anzano, M.A., Lamb, L.C., Smith, J.M. and Sporn, M.B. (1981) : New class of transformed growth factors potentiated by epidermal growth factor : Isolated from non-neoplastic tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 78, 5339-5343.
- 54) 増田義重, 西川克三 (1986) : 腫瘍増殖因子

と autocrine 説 . 代謝 (癌 86'), 23, 73-79. 昭和 61 年 .

- 55) Derynck, R. (1988) : Transforming growth factor α . Cell, 54, 593-595.
- 56) Decker, S. (1990) : Epidermal growth factor and transforming growth factor- α induce differential processing of the epidermal growth factor receptor. Biochem. Biophys. Res. Commun., 166, 615-621.
- 57) Rosenthal, A., Lindquist, P.B., Bringham, T.S., Goeddel, D.V. and Derynck, R. (1986) : Expression in rat fibroblasts of a human transforming growth factor- α cDNA results in transformation. Cell, 46, 301-309.
- 58) Derynck, R., Goeddel, D., Ullrich, A., Gutterman, J.U., Williams, R.D., Bringham, T.S. and Berger, W.H. (1987) : Synthesis of messenger RNAs for transforming growth factor α and β and the epidermal growth receptor by human tumors. Cancer Res., 47,

707-712.

- 59) Mydlo, J.H., Michaeli, J., Cordon-Cardo, C., Goldenberg, A.S., Heston, W.D.W. and Fair, W.R. (1988) : Expression of transforming growth factor α and epidermal growth factor receptor messenger RNA in neoplastic and non-neoplastic human kidney. *Cancer Res.*, 49, 3407-3411.
- 60) Perosio, P.M. and Brooks, J.J. (1989) : Expression of growth factors and growth factor receptors in soft tissue tumors. : Implications for the autocrine hypothesis. *Labo. Invest.*, 60, 245-253.
- 61) Ekstrand, A.J., James, C.D., Cavenee, W.K., Selinger, B., Pettersson, R.F. and Collins, V.P. (1991) : Genes for epidermal growth factor receptor, transforming growth factor α , and epidermal growth factor and their expression in human gliomas in vivo. *Cancer Res.*, 51, 2164-2172.

62) Hofer, D.r., Sherwood, E.R., Bromberg, W.
D., Mendelsohn, J. and Lee, C. (1991) :
Autonomous growth of androgen-indepedent
human prostatic carcinoma cells: Role of
trans-forming growth factor α . Cancer
Res., 51, 2780-2785.

脚注

大阪大学歯学部口腔外科学第一講座（主任教授：松矢篤三）

本論文で使用した略語を以下に示す。

DME；ダルベッコ変法イーグル培地，MEM；イーグル最小必須培地，CS；仔牛血清，EDTA；エチレンジアミン四酢酸，PBS； Ca^{2+} ・ Mg^{2+} を含まないリン酸緩衝液，TCA；トリクロロ酢酸，BSA；ウシ血清アルブミン，CHAPS；3-dimethylammonio-1-propanesulfonate，EGF；ヒト上皮成長因子，TGF- α ；トランスフォーミング成長因子- α ，TGF- β ；トランスフォーミング成長因子- β ，aFGF；酸性線維芽細胞成長因子，bFGF；塩基性線維芽細胞成長因子，IL-1 α ；インターロイキン1- α ，IL-1 β ；インターロイキン1- β ，IL-6；インターロイキン-6，CM；培養上清；

本論文の要旨は第49回日本癌学会総会（平成2年7月，札幌），第35回日本口腔外科学会総会（平成2年10月，岡山）において一部発表した。

図・表の説明

図 1 . 親株 HSG と無血清培養クローンの単層培養形態

HSG-S10 (D) は親株 HSG (A) と同様に細胞の疎な部分では比較的長い細胞形態を示し, 密に増殖すると敷石状の形態を呈するのに対し, HSG-S6 (B) と HSG-S8 (C) はやや小型の立方形態を示していた。(倍率 200 倍)

図 2 . HSG-S10 の CM による Balb/c3T3 DNA 合成能の促進効果

密に増殖した Balb/c3T3 を DME で一度洗浄後, 0.4 % CS を含む DME に培養液を交換し, 24 時間培養した。標的細胞にあらかじめ採取した HSG-S10 の培養 2 - 4 日の CM と培養 2 - 6 日の CM を添加し, 22 時間培養後, 2 時間 [³H]-チミジンで標識した。DNA 合成量は [³H]-チミジンの TCA 不溶画分への取り込み量を指標として測定し, CM 無添加の対照群に対する割合 (%) で示した (各群 n=3)。

図 3 . イオン交換クロマトグラフィー

濃縮した HSG-S10CM サンプルをイオン交換カラムに展開して，吸着画分を破線で示す NaCl の直線濃度勾配にて溶出後，分画したサンプルを Balb/c 3T3 に添加して DNA 合成能を測定した（各群 n=3）。

図 4 . ゲルクロマトグラフィー

図 3 の横線で示す画分を集めてゲルクロマトグラフィーに展開後，分画したサンプルの Balb/c 3T3 の DNA 合成促進活性を測定した（各群 n=3）。

図 5 . ヘパリン親和性クロマトグラフィー

ゲル濾過で 35kD 付近に溶出した画分を回収しヘパリン親和性カラムに展開後，吸着画分を破線で示す NaCl 直線濃度勾配で溶出させた。各フラクションを Balb/c 3T3 に添加後，DNA 合成能を測定した（各群 n=3）。

図 6 . 親株 HSG と HSG-S10 の DNA 合成能に対する P1 標品，aFGF，bFGF の効果

1 × 10⁵個の細胞を16mm径ウエル内で4日間培養後, P1標品, aFGF(10 μg/ml), bFGF(10 μg/ml)を含む無血清培養液SFM-101で23時間培養をした. 1時間1 μCi/wellの [³H]-チミジンで標識し, TCA不溶画分への取り込み量を測定し, 試験サンプル無添加の対照群に対する割合(%)を算定した

図7. 親株HSGとHSG-S10のDNA合成能に対するP2標品, TGF-α, EGFの効果

1 × 10⁵個の細胞を16mm径ウエル内で4日間培養後, P2標品, TGF-α(5 ng/ml), EGF(10 ng/ml)を含む無血清培養液SFM-101コンフルエントで23時間培養した. 1時間1 μCi/wellの [³H]-チミジンで標識し, TCA不溶画分への取り込み量を測定し, 試験サンプル無添加の対照群に対する割合(%)を算定した(各群 n=3).

図8. 親株HSGとHSG-S10の細胞増殖能に対するTGF-αとEGFの効果

1 × 10⁴個のHSG細胞(A)あるいはHSG-S10細胞(B)

を16mm径ウエルに入れ,24時間培養後,各種濃度のTGF- α (●—●)およびEGF(■……■)を含む無血清培養液に交換した.4日後再度培地を交換し,7日目に生細胞数を測定した.各値は4ウエルの平均±標準偏差を示す.

図9. 親株HSGとHSG-S10のコロニー形成能に対するTGF- α とEGFの効果

1×10^4 個のHSG細胞(A)あるいはHSG-S10細胞(B)をそれぞれの濃度のTGF- α (●—●)およびEGF(▲……▲)を含む無血清軟寒天中で2週間培養した.位相差顕微鏡により,10個以上からなる細胞集落をコロニーとし,その数を求めた.各値はコロニー数/接種した細胞数(%)±標準偏差を示すのサンプル無添加の対照群に対する割合で求めた(各群n=3).

図10. 親株HSGとHSG-S10のDNA合成能に対する抗TGF- α 抗体と抗EGF抗体の効果

1×10^5 個のHSG細胞(●—●)あるいはHSG-S10

細胞 (■■) を 16mm 径 ウェル 内 で 4 日 間 培 養 後 , 各 濃 度 の 抗 TGF- α 抗 体 (A) あ る い は 抗 EGF 抗 体 (B) を 含 む 無 血 清 培 養 液 SFM-101 で 23 時 間 培 養 を 行 っ た . 1 μ Ci/well の [3 H]-チ ミ ジ ン で 1 時 間 標 識 し , TCA 不 溶 画 分 へ の 取 り 込 み 量 を 測 定 し た . 値 は 試 験 サ ン プ ル 無 添 加 の 対 照 群 に 対 す る 割 合 (%) で 表 し た .

図 11. 抗 TGF- α 抗 体 に よ る P2 標 品 活 性 の 中 和

1 \times 10⁵ 個 の 細 胞 を 16mm 径 マ ル チ ウ ェ ル プ レ ー ト に 播 種 し , 37 $^{\circ}$ C で 4 日 間 培 養 後 , P2 標 品 と そ れ ぞ れ の 中 和 抗 体 を 10 μ g/ml 濃 度 で 同 時 添 加 し , 無 血 清 培 養 液 SFM-101 で 23 時 間 培 養 を 行 っ た 後 , 1 μ Ci/well の [3 H]-チ ミ ジ ン で 1 時 間 標 識 し , TCA 不 溶 画 分 へ の 取 り 込 み 量 を 測 定 し た . 値 は 中 和 抗 体 未 処 理 の 対 照 群 に 対 す る 比 活 性 (%) で 算 定 し た (各 群 n=3) .

表 1 . 分 離 ク ロ ー ン 細 胞 の 増 殖 特 性

* 数 字 は 10⁷ 個 の 細 胞 を 接 種 し た 時 の 腫 瘍 を 形 成

したマウス/実験したマウスを示す。

表 2 . 部分精製標品の物理・化学的性状

HSG-S10CMの部分精製標品P1およびP2に対し, 上記処理を行い, Balb/c3T3細胞に添加してそのDNA合成能を測定し, 未処理対照に対する比活性を算出した(各群 n=3)。

表 3 . 部分精製標品に対する各種成長因子の特異抗体による中和試験

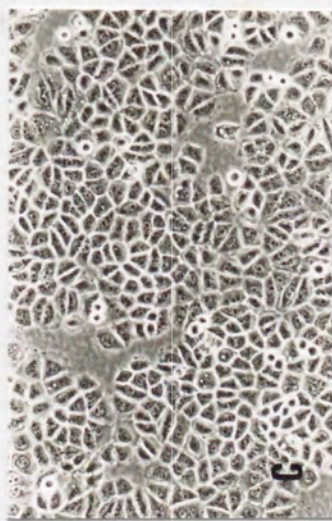
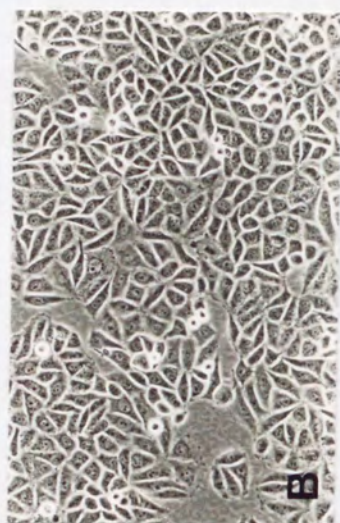
部分精製標品P1およびP2に上記の中和抗体処理を加え, そのBalb/c3T3に対するDNA合成能を測定し, それぞれを未処理対照群に対する比活性(%)を算定した(各群 n=3)。

表 4 . 親株HSGとHSG-S10のEGF受容体の解析

5×10^4 個/mlの細胞をプラスチック皿上で密に増殖させた後, EDTA溶液で細胞を浮遊させ, 試験管あたり 2.0×10^5 個になるように分注した。0.25% BSA添加 SFM-101培地に異なる濃度の [^{125}I]-EGF

と $1 \mu\text{g/ml}$ の EGF の存在下（非特異的結合），または非存在下（全結合）で 4°C ，4 時間インキュベートした．その後，細胞成分を回収し放射活性を測定し，Scatchard 解析を行った．

18



19

図2 Balb/c₃T₃のDNA合成に対する
HSG-S10培養上清(CM)の効果

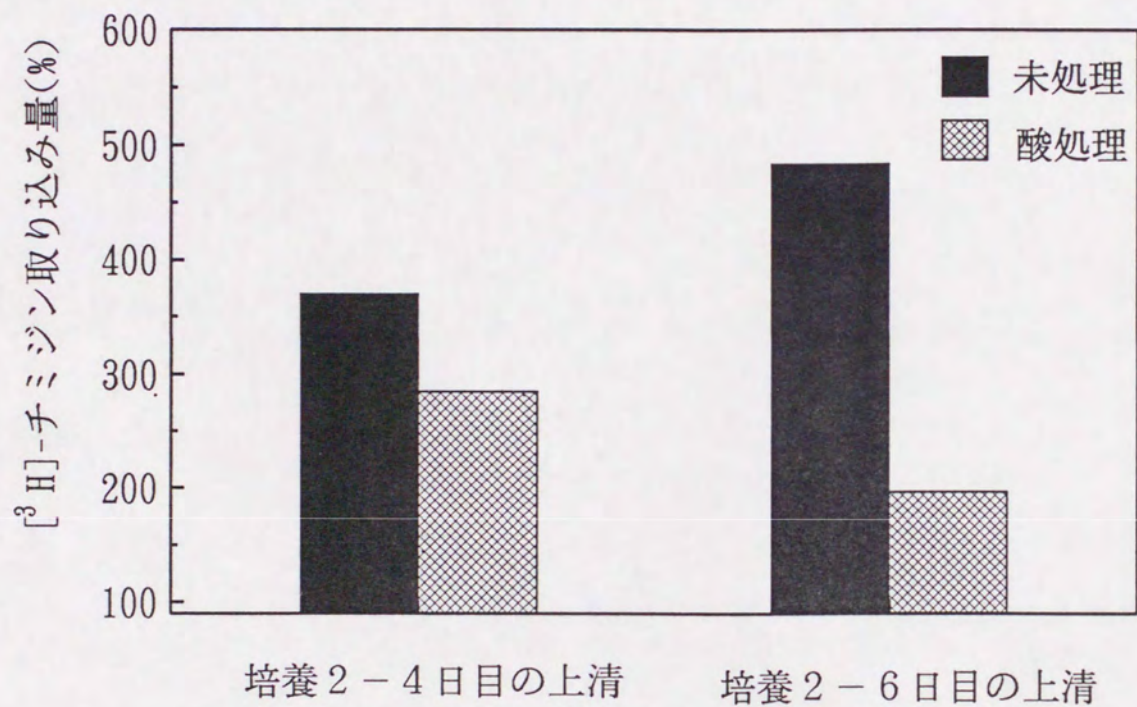


図3

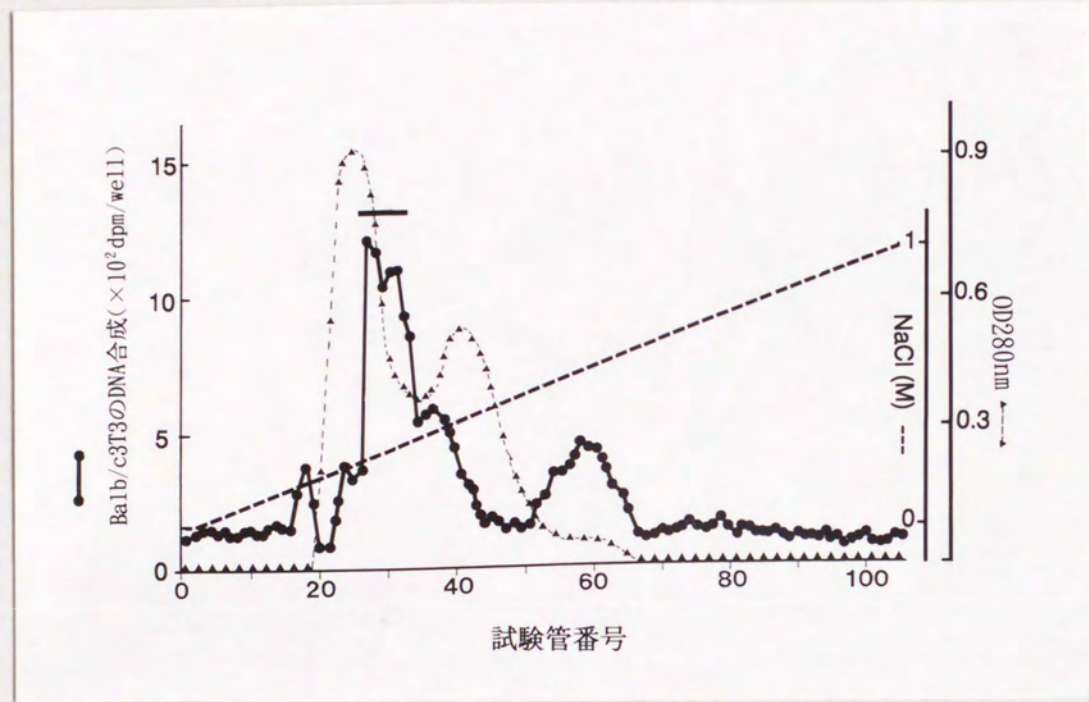


図3

図4

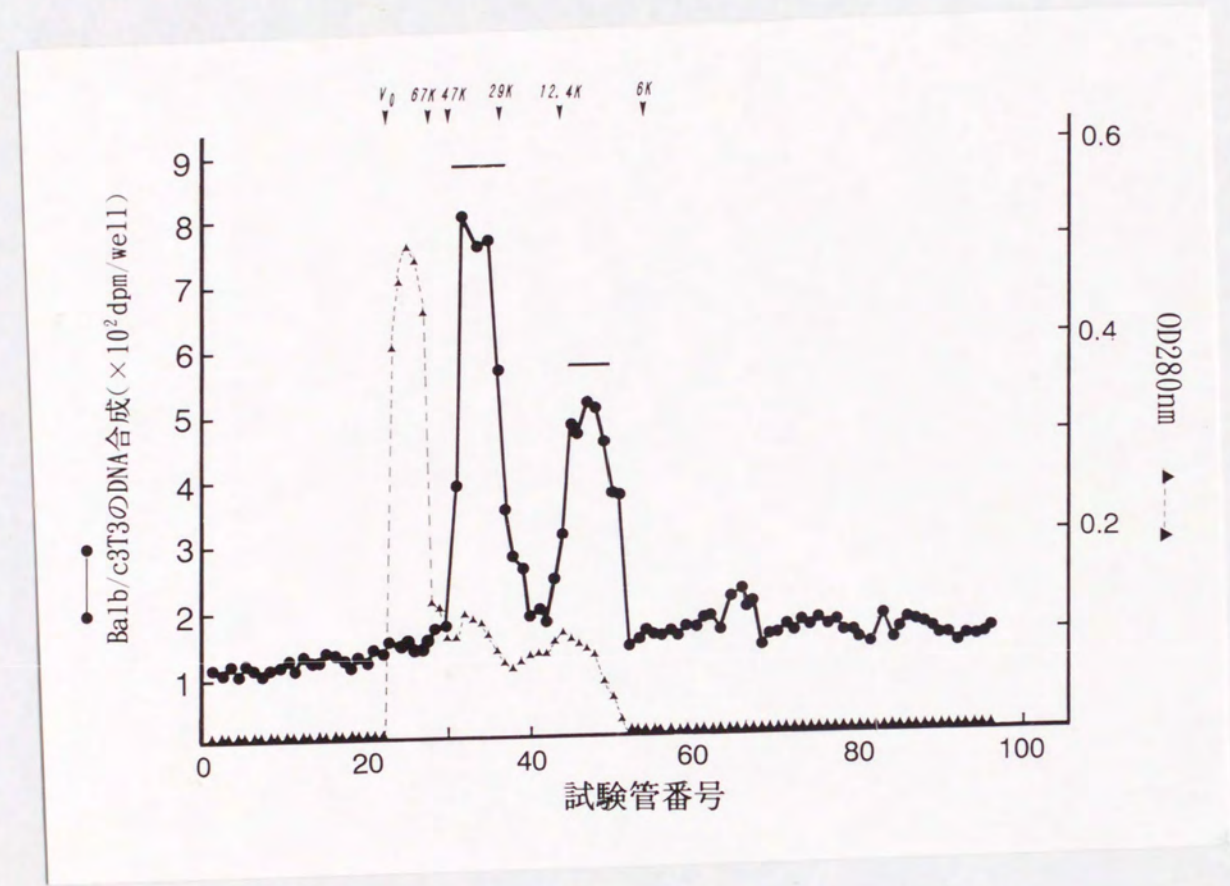


図4

図5

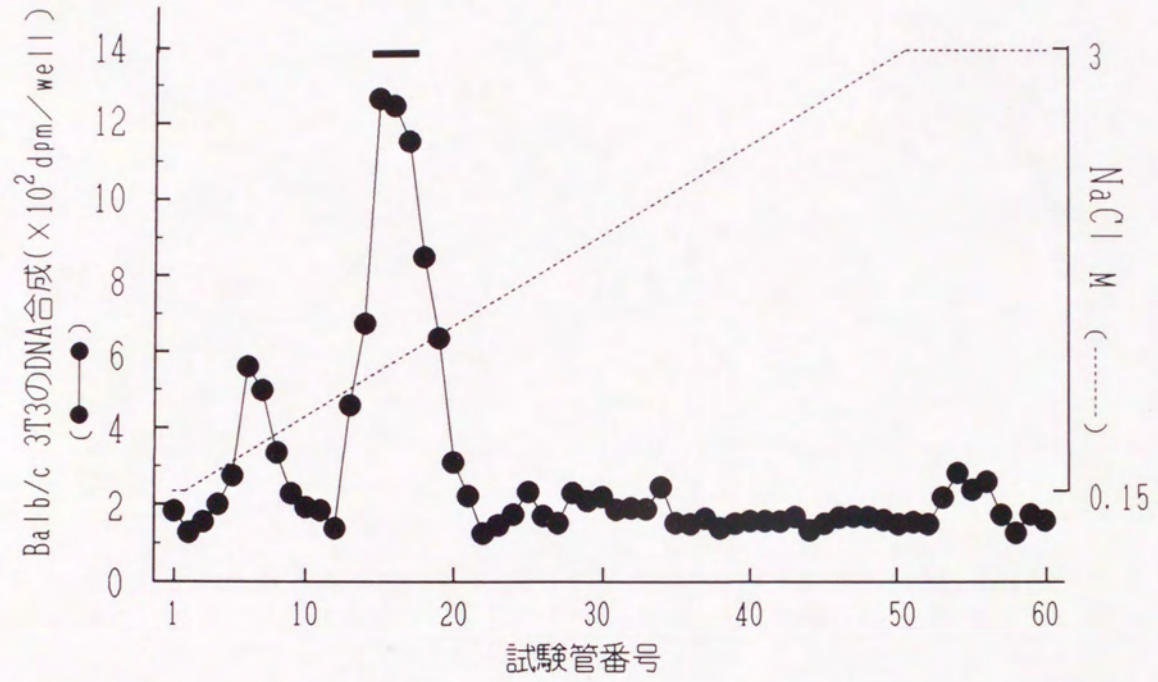


図5

図6 親株HSGとHSG-S10のDNA合成能に
対するP1標品, aFGF, bFGFの効果

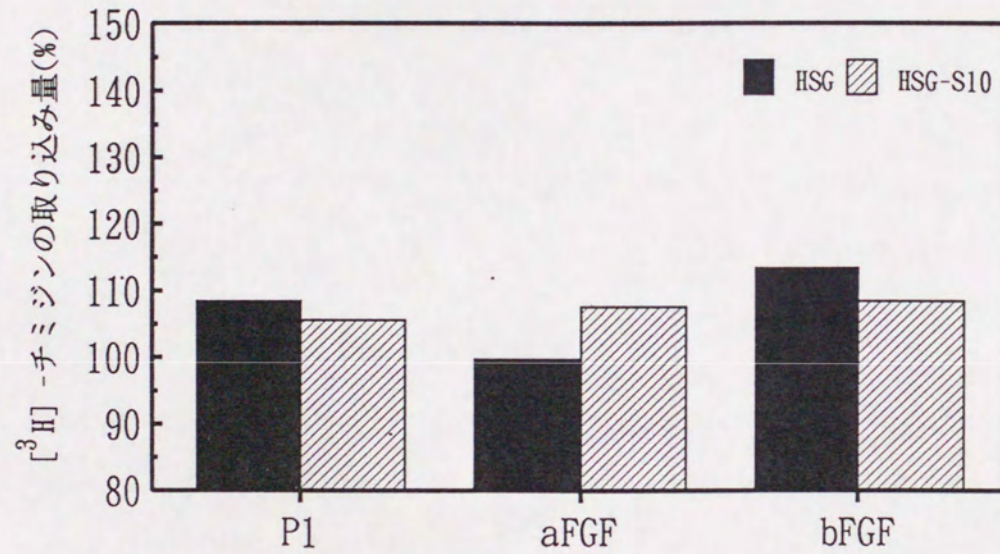


図7 親株HSGとHSG-S10のDNA合成能に
対するP2標品, TGF- α , EGFの効果

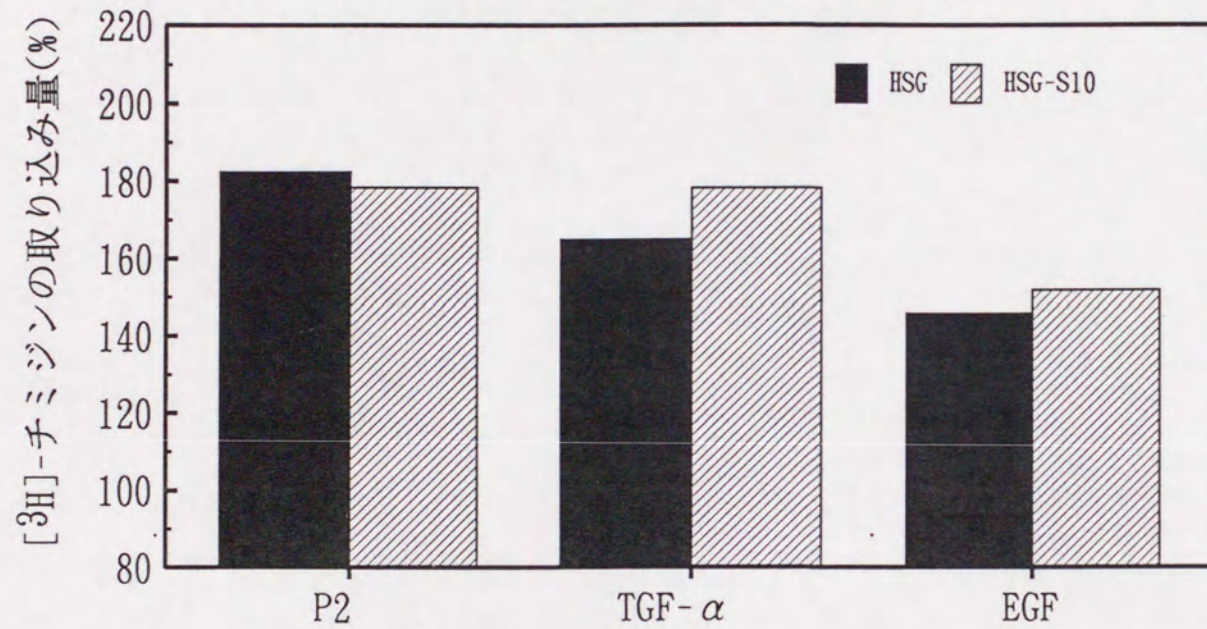


図8 親株HSGとHSG-S10の細胞増殖能
に対するTGF- α とEGFの効果

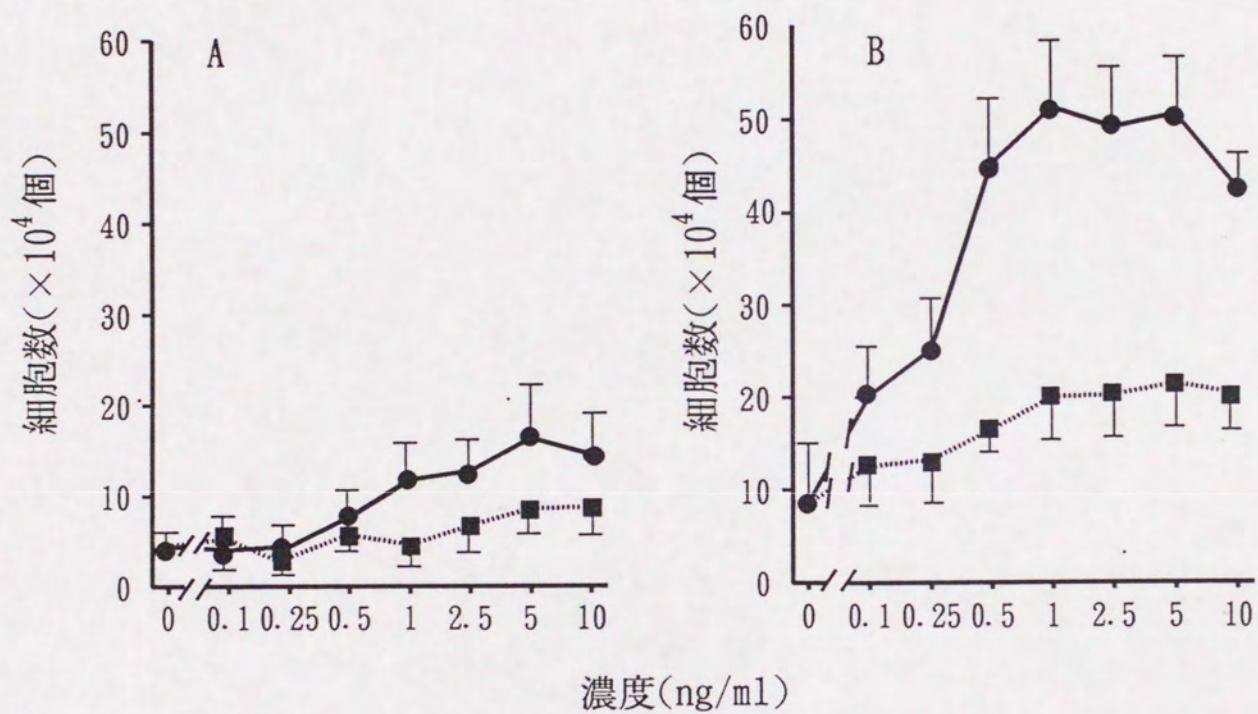


図9 親株HSGとHSG-S10のコロニー形成能に
対するTGF- α とEGFの効果

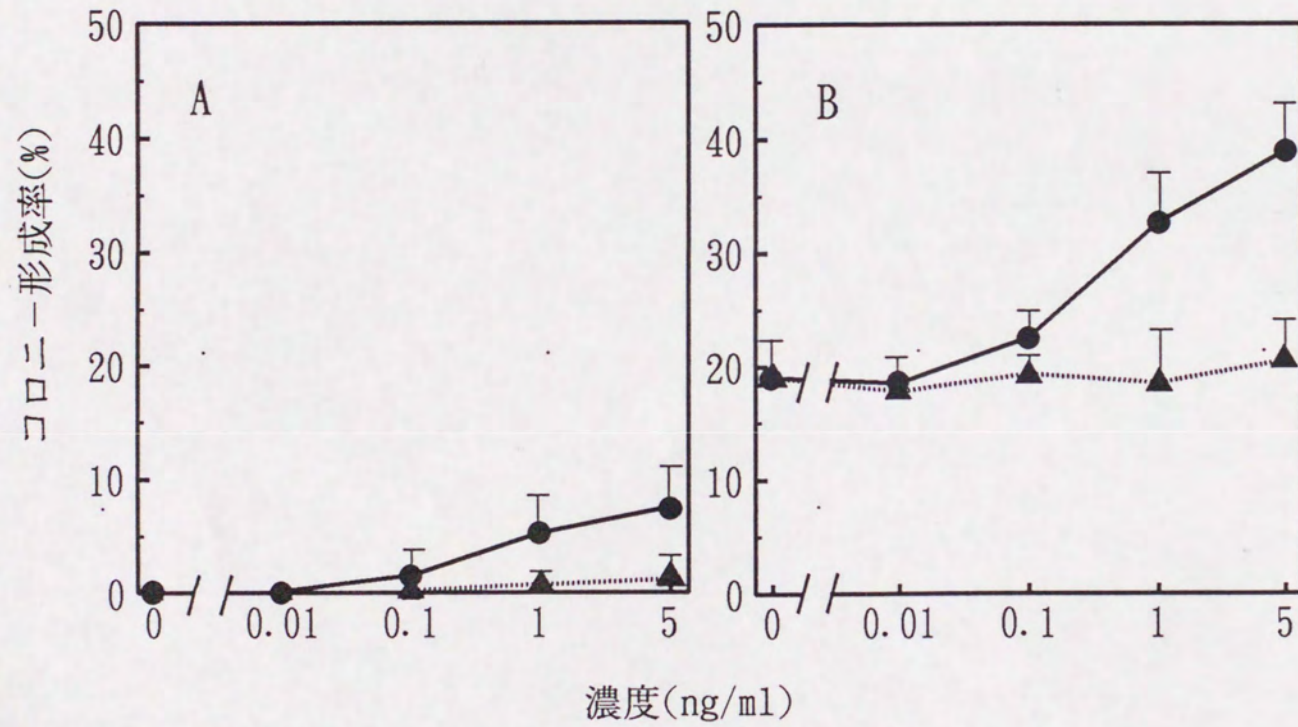


図10 親株HSGとHSG-S10のDNA合成能に対する
抗TGF- α 抗体と抗EGF抗体の効果

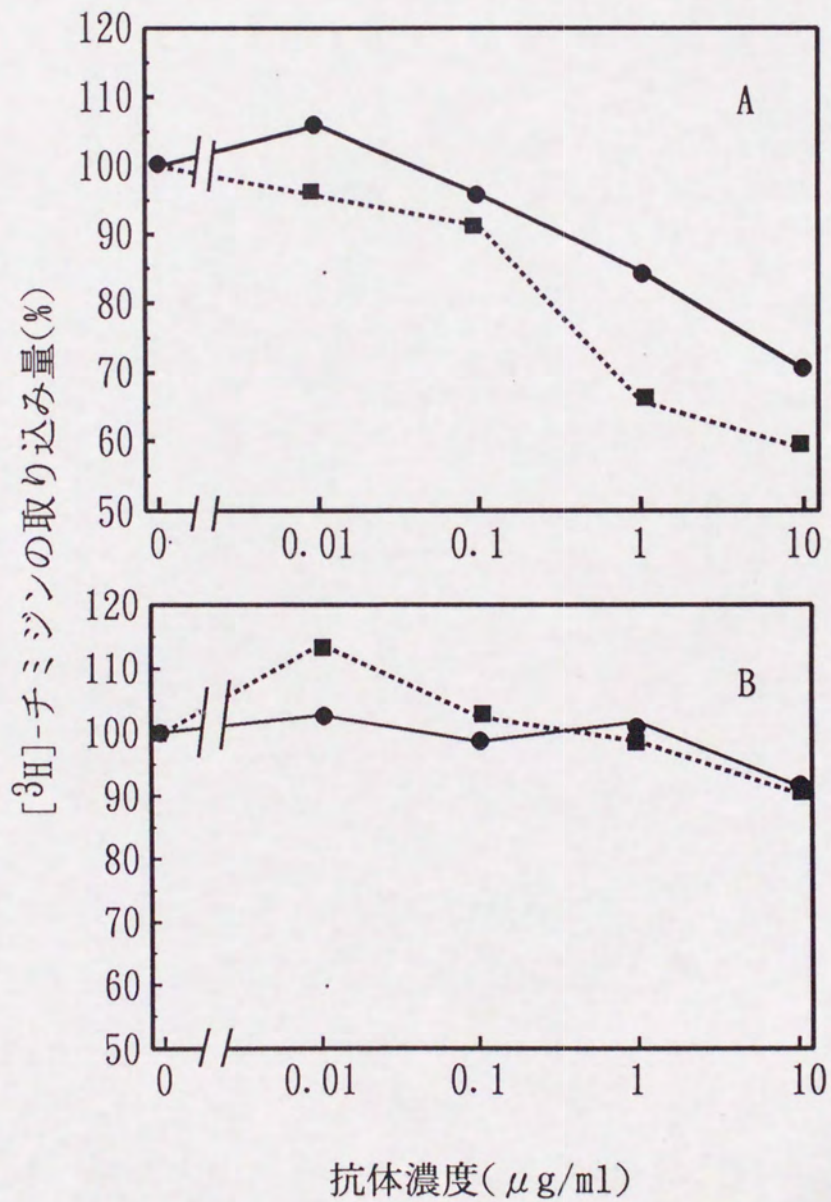


図 1 1 抗TGF- α 抗体によるP2標品活性の中和

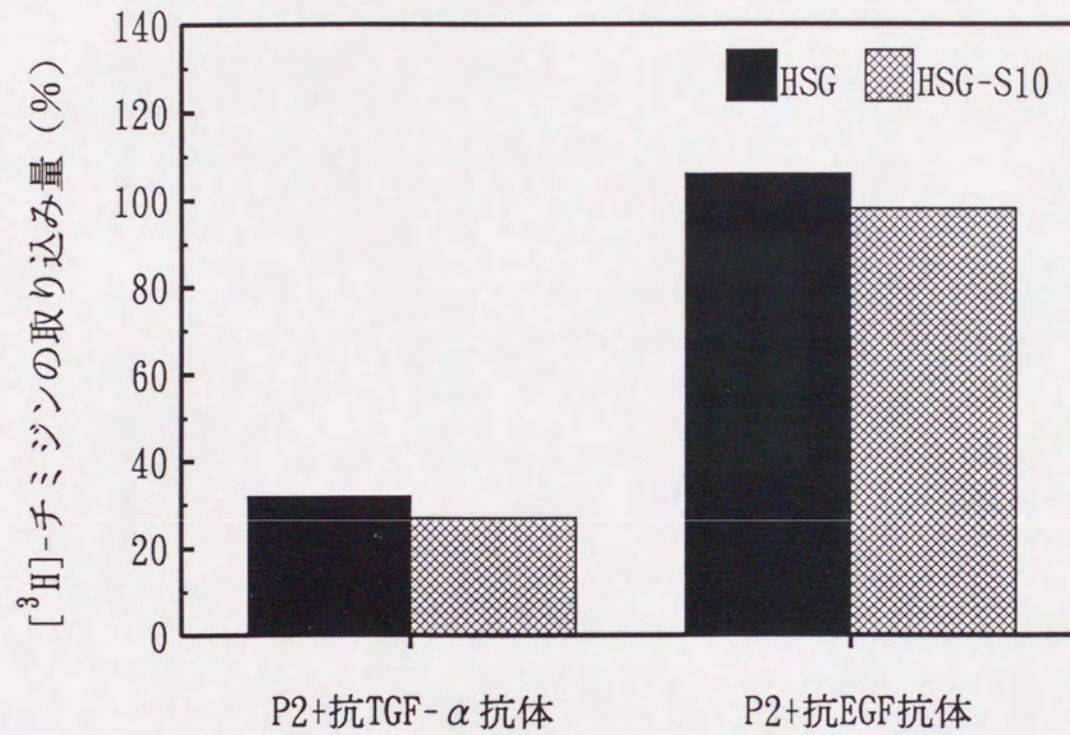


表1 分離クローン細胞の増殖特性

	HSG	HSG-S6	HSG-S8	HSG-S10
細胞倍加時間(時間)	29.0	30.1	49.3	30.4
細胞飽和密度($\times 10^5$ 個/cm ²)	9.3	4.6	2.6	7.1
軟寒天中のコロニー形成率(%)	69.0	11.3	4.5	22.0
ヌードマウスでの造腫瘍性	^a 8/8	8/8	7/8	8/8

^a 数字は 10^7 個の細胞を接種した時の腫瘍を形成したマウス/実験したマウスを示す.

表2 部分精製標品の物理・化学的性状

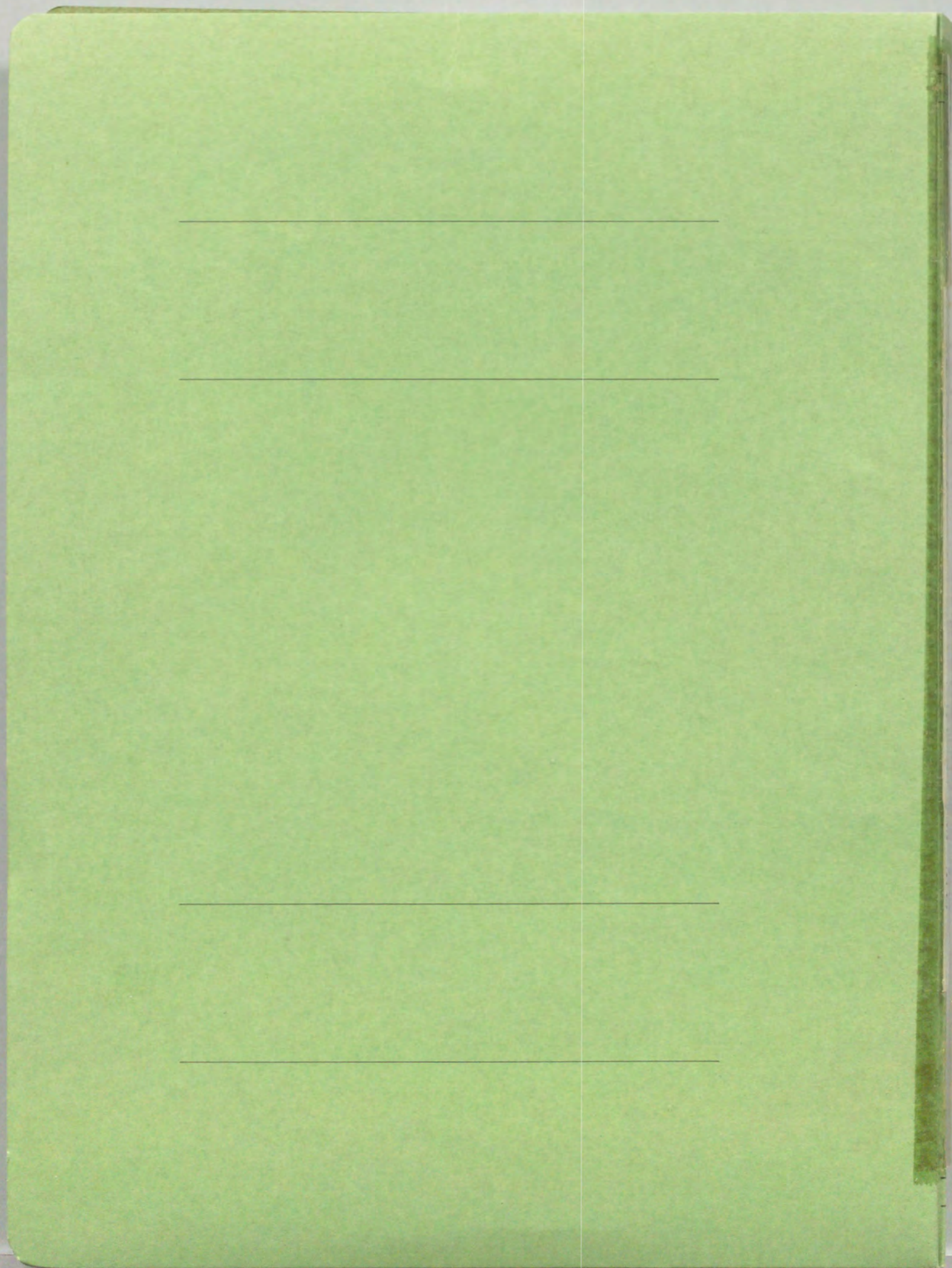
処理	DNA合成促進活性 (%)	
	P 1	P 2
トリプシン(50 μ g/ml, 37°C 2時間)	9.0	13.4
トリプシン(50 μ g/ml)+ インヒビター(100 μ g/ml)	83.5	92.4
56°C, 30分間	42.7	88.7
100°C, 3分間	5.7	52.3
酸(PH=2, 24時間)	35.6	83.5
アルカリ(PH=9, 24時間)	48.3	84.7
DTT 10mM	76.8	20.5

表3 部分精製標品に対する各種成長因子の特異抗体による中和試験

特異抗体	DNA合成促進活性 (%)	
	P 1	P 2
抗EGF抗体	122.9	75.8
抗TGF- α 抗体	90.6	20.6
抗TGF- β 抗体	86.1	85.8
抗aFGF抗体	18.7	97.3
抗IL-1 α 抗体	100.2	105.9
抗IL-1 β 抗体	89.1	93.1
抗IL-6抗体	115.7	95.7

表4 親株HSGとHSG-S10のEGF受容体の解析

細胞株	高親和性		低親和性	
	Kd値(nM)	受容体数 (10^4 /細胞)	Kd値(nM)	受容体数 (10^4 /細胞)
HSG	0.45	3.5	2.9	10.0
HSG-S10	0.36	9.8	1.4	25.7



2

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2 : In vivoで骨誘導能を持つサブクローンHSG-S8の細胞特性

LION FILE

大阪大学歯学部口腔外科学第一講座

吉岡 秀郎

原著

原稿総紙数：37枚

図・写真の紙数：5枚

表の紙数：2枚

別冊希望数：50部

連絡先

吉岡秀郎

大阪大学歯学部口腔外科学第一講座

吹田市山田丘1-8

電話番号：06-876-5711(内線2257)

論文表題

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2：in vivoで骨誘導能を持つサブク
ローンHSG-S8の細胞特性

所属：大阪大学歯学部口腔外科学第一講座

著者名：吉岡秀郎

緒言

唾液腺腫瘍は多彩な病理組織像を呈し，多量の細胞外基質を含む特有な間質の形成を特徴としている．特に唾液腺腫瘍の中で最も発生頻度の高い多形性腺腫は線維腫様，粘液腫様，軟骨様，さらに骨様の間葉系組織をも含むことを特徴としており，以前は混合腫瘍であると考えられていた^{1, 2)}．最近の研究から唾液腺腫瘍の多彩な組織像は唾液腺腫瘍の stem cell である上皮細胞が多様な分化を示すことに起因すると考えられる様になったが，未だ上記の軟骨や骨様成分の由来については全く明らかにされていない．

当教室で樹立されたヒト顎下腺由来腺癌細胞株 (HSG) は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広く解析が進められており³⁻⁵⁾，現在まで HSG から単細胞クローニングや分化誘導剤添加によって唾液腺を構成する種々の形質を有する細胞が分離されてきた^{4, 5)}．しかし，上記間葉系成分を含む唾液腺腫瘍の特徴的な間質形成の機序を明らかにするのに適したクロー

ーンの分離に未だ成功していなかった。今回分離した無血清培地可増殖クローンの1つ HSG-S8が *in vitro* で高い基質産生能と *in vivo* で骨誘導能を有していたので、その細胞生物学的特性について解析を行った。

実験材料ならびに実験方法

1. 細胞および培養法

ヒト唾液腺癌細胞株 (HSG)³⁾ならびに無血清培地下で得たサブクローン HSG-S8と HSG-S10を実験に用いた。親株 HSGおよび各クローンの分離過程は既に述べた¹⁰⁾。ウサギ肋軟骨由来軟骨細胞¹¹⁾は本学部生化学講座滝川助教授より供与を受けた。HSGは 10% CS (Cell Culture Laboratories, Ohio, U.S.A) を含む DME (日水製薬, 東京) で、HSG-S8と HSG-S10は無血清培地 SFM-101 (日水製薬) で、また軟骨細胞は 10% FBS (Gibco, NY, U.S.A) を含む DME で 37°C に調整した 5% 炭酸ガス培養器中で培養して実験に供した。

2. GAG合成能の測定

GAG合成能を [^3H]-グルコサミンおよび [^{35}S]-硫酸のCPC沈殿画分への取り込み量により測定した。すなわち16mm径プラスチック皿(Corning Glass Works, Corning, NY, U.S.A)上に 1×10^5 個の細胞を播種後, コンフルエントに達した時点で [^3H]-グルコサミン (Specific activity 52.7 Ci/mmol; New England Nuclear) を最終濃度 $2 \mu\text{Ci/ml}$ になるように添加し, 12時間培養した。また, [^{35}S]-硫酸 (Specific activity $\geq 43 \text{Ci/mgS}$; ICN, Biochemicals, CA, U.S.A) では最終濃度 $5 \mu\text{Ci/ml}$ になるように加え, 6時間培養した。培養終了後, 0.1N NaOH を $200 \mu\text{l/well}$ 加えて細胞を溶解した。中和後, 2mg/ml のアクチナーゼ E (1000チロシン単位/mg, 科研製薬, 東京), 5mM 塩化カルシュームを含む 0.2M トリス塩酸緩衝液 (PH7.8) 1.0ml を加えて, 55°C , 12時間インキュベートした。その後, $12.5 \mu\text{g/ml}$ のコンドロイチン硫酸とヒアルロン酸 (和光純薬) を含む溶液を $40 \mu\text{l}$ 加え, さらに 1% CPC (東京化成工業, 東京) を含む 0.02M の食塩水を 1ml 加え, 37°C , 1時間インキュベートした。CPC

沈殿画分はメンブランフィルター（直径25mm，孔径 $0.45\mu\text{m}$ ；東洋濾紙，東京）上で回収した後，液体シンチレーションカウンター（LKB-1215 RACK-BETA, Wallac, Finland）にて放射活性を測定した。

3. Separose CL-2Bカラムを用いたプロテオグリカンの分析

1×10^5 個の細胞を35 mm径プラスチック皿（Corning）に入れ，密に増殖させた後， $30\mu\text{Ci/ml}$ の $[^3\text{H}]$ -グルコサミンで12時間あるいは $60\mu\text{Ci/ml}$ で $[^35\text{S}]$ -硫酸で6時間ラベルを行った。その後，培養上清を回収し，細胞層にプロテアーゼ阻害剤（ 0.01M EDTA, 1M 6-アミノ-n-カプロン酸， 1mM フェニルメタンсульフォニルフルオリド， 5mM ベンザミジン塩酸）とグアニジン塩酸抽出液（ 4M グアニジン塩酸を含む 0.05M トリス塩酸緩衝液， $\text{pH}8.0$ ）を加えた（以上，和光純薬製）。また予め回収した上清サンプルには2倍濃度の抽出液をサンプルと同液量加えて， 4°C 下で24時間かけてプロテオグリカンを抽出した。抽出したサンプルを $1200 \times g$ で遠沈し，その上清 2ml をSepharose CL-

2Bカラム (1.5 cm × 100 cm; Pharmacia, Uppsala, Sweden) に グアニジン塩酸抽出液で流速 6 ml/h で展開した。各 2 ml の溶出画分を回収し、放射活性を測定した。

4. コラーゲンタンパク合成能測定

コラーゲンタンパク合成能の測定を Peterkopsky と Diegelman^{1,2)} の方法に準じて行った。すなわち 16 mm 径プラスチック皿上でコンフルエントに達した細胞を 50 μg/ml アスコルビン酸を含む増殖培養液で 24 時間培養後、5 μCi/ml L-[³H]-プロリン (Specific activity 21 μCi/mmol; RCC Amersham, U.S.A), 50 μg/ml アスコルビン酸, 64 μg/ml β-アミノプロピオニトリルフマル酸を含む増殖を含む培養液で 24 時間培養した。細胞および培養上清を 1 N NaOH にて採取し中和後、5 mM L-プロリン, 0.4% タンニン酸を含む 10% TCA (以上、和光純薬製) を 4 °C で 10 分間作用させ、1200 × g で 10 分遠沈した。沈殿物を回収し、2.5 mM L-プロリン, 0.2% タンニン酸を含む 5% TCA にて懸濁させ、1200 × g で 10 分遠沈した。この操作を 3 回繰返した後、

エタノール／ジエチルエーテル（3：1）で洗浄後、再度タンパク質を沈殿させた。沈殿物を0.1N NaOHで溶解し、HClで中和後、20unitsコラゲナーゼ（EC3.4.24.3, type VII；Sigma, ST. Louis, U.S.A）を含むあるいは含まない1.2mM HEPES緩衝液（PH7.2）を加え、37℃で2時間処理後、10% TCAで沈殿させ、その上清の放射活性を液体シンチレーションカウンターにて測定した。

5. コラーゲンの分析

培養細胞を40 μ Ci/mlの[³⁵S]-メチオニン（Specific activity \geq 1000Ci/mmol；ICN）で24時間標識後、1mlの0.5M酢酸溶液を加えポリトロンでホモジナイズした。次いで4℃で24時間攪播した後、12,500 \times gで20分遠心し、その上清を凍結乾燥した。本試料に200 μ lのRIPA buffer（1% Triton X-100, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 150mM NaCl, 0.02% sodium azideを含む50mMトリス塩酸緩衝液, PH7.0）（以上、和光純薬製）を加え、沈殿を可溶化した。試料の一部をLaemmli¹³⁾の方法に従い5% SDS-PAGEに展開後、フルオログラフ

ィーを行った。SDS-PAGE展開時，マーカーとしてI型～IV型コラーゲン（高研，東京）を用いた。また本試料に抗ヒトI型コラーゲンポリクローナル抗体（Chemicon International, Inc., U.S.A），抗ウシII型コラーゲンモノクローナル抗体（コラーゲン技術研修会，東京）を5 μ l加え4 $^{\circ}$ C，24時間反応させた後，RIPA bufferで膨潤させたプロテインA Sepharose (Pharmacia)を20 μ l加え，さらに2時間室温でインキュベートした。その後，プロテインA SepharoseビーズをRIPA bufferで4回洗浄し，さらにPH8.4に調整したRIPA bufferで1回洗浄した。プロテインA Sepharoseビーズに結合したタンパク質をLaemmli¹³⁾のsample bufferで溶出した後，7.5% SDS-PAGEに展開し，コダックX-0mat XAR-5フィルム上にフルオログラフイーを行った。

6. 細胞のヌードマウスへの移植腫瘍の形態観察 とin situ ハイブリダイゼーション

3～4周齢の雌ヌードマウス（Balb/c nu-nu，日本エスエルシー，静岡）の背部皮下に10⁷個の細

胞を0.1mlのPBSに浮遊させて接種した。形成された腫瘍組織を10%ホルマリン溶液にて固定後，通法によりパラフィン包埋を行い，組織切片を作製した。ヘマトキシリン-エオジン染色後，日本光学製生物顕微鏡オプチフォトXFを用いて写真撮影を行った。

また移植腫瘍組織中の各種組織成分がヒト由来かマウス由来かを同定するためにNomura¹⁴⁾らの方法に準じ，*in situ* ハイブリダイゼーションを行った。4%パラホルムアルデヒド(和光純薬)で固定後，パラフィン包埋した腫瘍組織から6 μ mの厚さの切片を作製し，ポリ-L-リジン(Sigma)でコートしたスライドガラス上に付着させた。脱パラフィン後，10 μ g/mlのProteinase K(Sigma)で27 $^{\circ}$ C，40分間処理し，リン酸緩衝液で洗浄後，0.2N HClで10分さらに0.1Mトリエタノールアミン(和光純薬)で2分間前処理を行った。さらに脱水処理後，切片上にジゴキシゲニン標識デオキシウリジン三リン酸を用いたランダムプライムシステム(Boehringer Mannheim Biochemica, Mannheim,

Germany)で標識したヒトDNAに特異的なAluプローブあるいはマウスDNAに特異的なL1プローブ(以上本学医学部病理学講座野村助教授から供与を受けた)を含む hybridization buffer (50%ホルムアミド, 1 mM EDTA, 0.6M NaCl, 10mM ジチオスレイトール, 0.04% Ficoll, 0.04% ポリビニルピロリドン, 0.04% 牛血清アルブミン, 0.25% SDS, 10% デキストラン硫酸, 200 μ g/ml tRNA)をのせて95°Cで7分間 heat denature 処理を行った。37°Cで18時間でハイブリダイゼーションを行った後, 数回洗浄後, 抗ジゴキシゲニン抗体を添加し, アルカリ性ホスファターゼと 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphatase, nitroblue tetrazolium salt(以上, Boehringer Mannheim社製)の発色反応によりシグナルの検出を行った。

結果

1. GAG合成能

HSG-S8を無血清培地にて培養すると, その培養液は徐々に粘性を増し, 本細胞が多量の粘液様物

質を産生することが示唆された。そこで HSG-S8 の GAG 合成能を [^3H]-グルコサミンおよび [^{35}S]-硫酸の CPC 沈殿画分への取り込み量を指標に測定し、その結果、 [^3H]-グルコサミンの取り込み量で HSG-S8 は親株の 2.9 倍、HSG-S10 は 1.7 倍であった (表 1)。また [^{35}S]-硫酸の取り込み量で HSG-S8 は親株 HSG の 7.3 倍、HSG-S10 は 1.3 倍を示した。以上の結果より HSG-S8 が高い GAG 合成能を有していることが明らかとなった。

2. プロテオグリカンの分析

図 1 は HSG-S8, HSG-S10 およびウサギ肋軟骨由来軟骨細胞から抽出したプロテオグリカンモノマーを Sepharose CL-2B カラムに展開した結果を示している。HSG-S8 および軟骨細胞は [^3H]-グルコサミンおよび [^{35}S]-硫酸で標識したどちらのサンプルにおいてもそのプロテオグリカンモノマーは同様の溶出パターンを示し、高分子量のピークとして観察された。すなわち HSG-S8 がいわゆる軟骨型高分子プロテオグリカンを産生していることが示唆された。

3. コラーゲンタンパク合成能

細胞外基質の主要な構成成分であるコラーゲンの合成能を [^3H]-プロリンのコラーゲンタンパクへの取り込み量を指標に測定した。HSG-S8は親株HSGやHSG-S10に比較して高いタンパク合成能を持ち、総タンパク合成量の17.1%がコラーゲンタンパクであった(表2)。一方、親株HSGならびにHSG-S10のコラーゲン合成量は1.7%から3.1%とHSG-S8に比べて低いものであった。

4. コラーゲンの分析

[^3S]-メチオニンでラベルしたコラーゲンタンパクをSDS-PAGEにて分析した。その結果、図2に示す様にHSG-S8の細胞層ならびにその上清からのサンプルにII型コラーゲンの α_1 鎖に一致したバンドが観察された。また図3に示す様にHSG-S8のサンプルを抗II型コラーゲン抗体で免疫沈降させると約100kDのバンドが認められた。なお抗I型コラーゲン抗体では特異的な沈降バンドはみられなかった。またコントロールとして用いたHSG-S10からのサンプルにはHSG-S8の様なコラーゲン

タンパクを検出することはできなかった。以上より HSG-S8 は軟骨基質中に多く含まれる II 型コラーゲンを産生していることが明らかとなった。

5. HSG-S8 のヌードマウス移植腫瘍組織の形態観察

HSG-S8 をヌードマウスに移植し、形成された腫瘍組織を H・E 染色後、その組織像を観察した。その結果、HSG-S8 は *in vivo* で親株 HSG や他の無血清培養クローンと同じく腺癌胞巣を形成した (図 4A)。また移植後 6 日目には多量の間葉組織が腺癌胞巣内に侵入する像がみられ (図 4B)、さらに移植後、14 日目には腺癌胞巣に接した部分に軟骨を伴う骨形成が認められた (図 4C)。さらに移植後 20 日目の組織では軟骨は消失し、骨の形成は著明となった (図 4D)。このような軟骨や骨組織の形成は HSG-S8 を移植した時に特異的に起こるもので、親株 HSG や他の無血清培養クローンでは認められなかった。

6. *In situ* ハイブリダイゼーション

先の実験でヌードマウス移植腫瘍組織中にみられた軟骨および骨組織がヒト由来であるか、また

マウス由来であるかを同定するためにヒトDNAに特異的なAluプローブとマウスDNAに特異的なL1プローブを用いたin situ ハイブリダイゼーションを行った。その結果、腺癌胞巣を形成する細胞はAlu配列のシグナルを、またマウス間葉細胞に加えて軟骨や骨細胞はL1配列のシグナルの発現を認めた(図5)。すなわちヌードマウス移植腫瘍組織中にみられた軟骨および骨組織はHSG-S8に由来するものではなく、マウス間葉細胞に由来し、HSG-S8はin vivoでマウス間葉細胞を軟骨や骨細胞に分化させる能力を有することが示唆された。

考察

ヒト顎下腺由来腺癌細胞株(HSG)は超微構造ならびに唾液腺マーカー抗原の発現から介在部導管上皮の性状を有しており、反復クローニングや分化誘導剤添加により筋上皮細胞や腺房細胞など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^{4, 5)}。以上の研究結果はHSGが多分化能を持つ唾液腺のstem cellであることを強く

示唆している。唾液腺腫瘍の多くは多量の細胞外基質を含む特異的な間質形成を特徴としている。例えば腺様嚢胞癌の間質は基底膜物質やムコ多糖を含む豊富な細胞外基質から成り、しばしば嚢胞様腔を形成し、結果として篩状構造をとる。

Shirasuna¹⁵⁾らは腺様嚢胞癌由来培養細胞を用いた研究結果から、上記の特異的な間質は腫瘍細胞自身が多量の細胞外基質を産生することによって形成されることを示した。また高い細胞外基質産生能は基底/筋上皮細胞の特性であると述べている。一方、多形性腺腫は上皮細胞に加えて線維腫様、酸性ムコ多糖を含む粘液腫様、軟骨さらに骨などの間葉系組織成分とで構成される腫瘍である。従来から本腫瘍の間葉系組織成分の由来については論議されているが、未だ明らかにされていない。かつては混合腫瘍と考えられていた本腫瘍が近年多形性腺腫と称される様になったごとく、本腫瘍は唾液腺腫瘍の stem cell (おそらくは介在部導管上皮前駆細胞) が多様な分化を示すことによって多彩な組織像をとると考えられるようになった。

特に腫瘍中の筋上皮細胞は上記の間葉成分の由来に強く関与し、唾液腺腫瘍に特有な組織構築に重要な役割を成すと考えられている。Shirasuna¹⁶⁾らは多形性腺腫より分離した筋上皮細胞が *in vivo* で多量の細胞外基質を産生したと報告している。また Dardick¹⁷⁾ や Milles¹⁸⁾ らは多形性腺腫の電子顕微鏡的観察によって筋上皮細胞から軟骨様組織への移行がみられることから軟骨様組織は筋上皮細胞の *metaplasia* の結果、形成されると推察している。Shirasuna¹⁶⁾ らは HSG 細胞系を用いた研究で筋上皮細胞へ分化したクローンは親株に比較してヘパラン硫酸を豊富に含む、高い GAG 産生能を持つと報告している。しかしその筋上皮細胞クローンの GAG 産生量も親株の 2 倍程度であった。今まで述べた様に唾液腺腫瘍は細胞外基質を豊富に含む特有な間質形成を特徴にしているにもかかわらず、現在まで分離したクローンの細胞外基質産生量は低いものであった。

無血清培養クローンの 1 つとして HSG より分離された HSG-S8 は極めて高い細胞外基質産生能を有

していた。HSG-S8の培養上清は培養3日目頃より粘性が増し、本細胞が粘液物質を培養液中に多量に産生することが示唆された。HSG-S8のGAG合成能を $[^3\text{H}]$ -グルコサミンあるいは $[^{35}\text{S}]$ -硫酸の取り込み量で算定すると前者では親株の約3倍、後者では約7倍の取り込み量を示した。さらにHSG-S8のプロテオグリカンを4Mグアニジン抽出液で抽出し、Sepharose CL-2Bのゲル濾過に展開すると $[^3\text{H}]$ -グルコサミンあるいは $[^{35}\text{S}]$ -硫酸で標識したどちらのサンプルにおいてもウサギ軟骨細胞と同じ溶出パターンを示し、HSG-S8が軟骨型高分子プロテオグリカン¹⁹⁾を産生していることが明らかとなった。またHSG-S8は高いタンパク合成能を有し、その17.1%がコラーゲンタンパクであった。この値は線維芽細胞や腺様嚢胞癌細胞のコラーゲン合成能に匹敵するものである¹⁵⁾。さらにコラーゲン分析の結果より、HSG-S8が軟骨細胞に特徴的なII型コラーゲンを産生することがわかった。Azuma²⁰⁾らはHSGに分化誘導剤5-azacytidineを添加することによって腺房細胞様クローンHSG-

AZA3を分離し，さらにこのクローンを活性型ビタミンD₃で処理した結果，軟骨様細胞に分化したと報告している．しかしこの軟骨様細胞が軟骨型高分子プロテオグリカンの産生能を有するのか，また*in vivo*で軟骨や骨を形成するかについては明らかにされていない．HSG-S8は軟骨型高分子プロテオグリカンとII型コラーゲン産生能など軟骨細胞の特性を有していた．しかし，形態的には軟骨細胞でなく，上皮細胞形態を保持していた．また多くの病理学者が唾液腺腫瘍中の軟骨様物質の前駆細胞と考えている筋上皮細胞の性状をも有していなかった．一方，HSG-S8をヌードマウスに接種すると腺癌形成に加えて軟骨や骨組織の形成がみられた．さらに*in situ*ハイブリダイゼーションの結果よりHSG-S8の移植腫瘍組織中に認める軟骨および骨組織はマウス間葉細胞に由来することがわかった．軟骨や骨の形成機序については不明な点が多いが，FarleyとBaylink²¹⁾は骨組織の起源について以下の様に述べている．多分化能を持った未分化間葉細胞はまず骨原性と血液原性の性格

を持つ間葉細胞に分れ，次に骨原性の細胞は軟骨細胞や骨芽細胞に分化する．一方，血液原性の細胞はマクロファージを経て破骨細胞に分化する．骨形成過程は①間葉組織から直接骨が形成される膜性骨化と②最初，軟骨組織として原基が形成された後に骨組織に置換する軟骨内骨化の2つに分けることができる．前者は頭蓋骨の形成時に，後者は四肢の長管骨に代表される発生様式である²²⁾．HSG-S8による異所性の骨誘導は軟骨内骨化に相当する．すなわち本クローン移植後6日目から腺癌細胞巢内に血管を含む間葉細胞の侵入がみられ，14日目頃には軟骨を伴う骨の形成がみられた．この所見はある種の骨誘導物質の接種によって起こる骨形成様式と非常によく似ている．すなわち，Urist²³⁾らはラット長管骨を脱灰し，高分子コラーゲンを中心としたbone matrixをラット筋肉内に移植すると異所性に新たに軟骨や骨が誘導されることを報告し，bone matrix中に含まれる骨誘導物質をbone morphogenetic protein(BMP)と名付けた．その後，多くの研究者がBMPの精製を試

みている。高岡²⁴⁾らはマウスDunn骨肉腫から4M
グアニジンで抽出したサンプルより22kDのBMPの
純化に成功した。その後、WozneyとWang²⁵⁾は4
種類のBMP(BMP-1, BMP-2A, BMP-2B, BMP-3)のcDNAを
クローニングし、BMP-2A, BMP-2B, BMP-3のアミ
ノ酸配列は骨基質中に多量に含まれるTGF- β と30
%から40%の相同性を持っており、これらはTGF-
 β ファミリーであると報告している。事実、TGF-
 β 自体も頭頂骨や長管骨への局所投与によって骨
形成を促進させる²⁶⁾。その他の骨誘導因子とし
て最近種々の因子が報告されている²⁷⁻²⁸⁾がその
中には既知の因子と同一である因子^{27, 28)}も含ま
れており、BMPやその他の因子の骨誘導機序に関
して不明な点が多い。著者はHSG-S8による骨誘導
機序を検討するため、細胞をdiffusion cham-
ber内に封入してマウスの腹腔内に移植したり、
HSG-S8の培養上清を濃縮したサンプルあるいは細
胞のホモジネートをヌードマウスやラット筋肉内
に移植することによって骨誘導を試みた。しかし
ながら、それらのいずれにおいても骨形成を誘導

することができなかつた。骨形成がみられるのは常に生細胞を移植した時のみである。以上の結果は HSG-S8 の上清中に分泌される液性因子、あるいは細胞外基質単独では骨を誘導できないことを示唆しているのかもしれない。すなわち移植腫瘍内での軟骨や骨は HSG-S8 細胞とヌードマウス間葉細胞との相互作用によって形成されたものと推察される。以上の様に無血清培養クローン HSG-S8 細胞は軟骨に近似した細胞外基質を産生するとともにヌードマウス間葉細胞を軟骨や骨に分化させる能力を有することが明らかとなった。すくなくとも、本実験系から唾液腺腫瘍の成り立ちをみた場合、唾液腺腫瘍細胞は間葉系細胞が産生する細胞外基質に類似した基質成分を産生する能力を持つものの直接軟骨細胞や骨細胞に分化する能力はないと結論された。本クローンは今後、唾液腺腫瘍中の軟骨や骨組織の形成機序を解明するための有用なモデルになると考えている。

結語

ヒト顎下腺由来腺癌細胞株(HSG)より分離された無血清培養クローンの1つHSG-S8の細胞特性を解析し,以下の知見を得た.

1. HSG-S8は高いGAG合成能を有し,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.
2. HSG-S8は親株HSGやHSG-S10に比較して高いタンパク合成能を持ち,総タンパク合成量の17.1%がコラーゲンタンパクで,さらに軟骨基質に多く含まれるII型コラーゲンを産生していることが明らかとなった.
3. HSG-S8をヌードマウスに移植して形成された腫瘍組織中には腺癌胞巣に接した部分に軟骨や骨組織の形成が認められた.さらにこの軟骨や骨組織は*in situ*ハイブリダイゼーションの結果からHSG-S8に由来するものではなく,マウス間葉細胞に由来することがわかった.すなわちHSG-S8は*in vivo*でマウス間葉細胞を軟骨や骨に分化させる能力を有することが示唆された.

稿を終えるにあたり本研究課題を与えて頂き、御指導を賜わった松矢篤三教授、本研究の実施に際し終始変らぬ御指導を頂いた口腔外科学第一講座白砂兼光助教授に心から謝意を表します。また貴重なウサギ肋軟骨由来軟骨細胞を供与して頂きました本学部生化学講座滝川正春助教授、*in situ*ハイブリダイゼーション法の実施に際し、御指導頂きました本学医学部病理学講座野村慎太郎助教授に深謝します。最後に研究の円滑な進展のために特別な御配慮を頂いた口腔外科学第一講座の教室内の方々に厚く御礼申し上げます。

Biological Characterization of Subclones Isolated in Serum-free
Medium from Human Salivary Adenocarcinoma Cell Line (HSG).

2 : Characterization of HSG-S8 with ability to induce ectopic
bone formation.

Hideo YOSHIOKA

The First Department of Oral Maxillofacial Surgery

Osaka University Faculty Of Dentistry

1-8, Yamadaoka, Suita, Osaka 565, Japan

Key words : Salivary gland tumor, Extracellular matrix, Ectopic
bone formation, Type II collagen

A subclone HSG-S8, established in serum-free medium from human salivary adenocarcinoma cell line (HSG), has a unique phenotype. This clone displayed the potential for abundant production of extracellular matrix. The amounts of [³H]-glycosamine and [³⁵S]-sulfate incorporation in HSG-S8 culture were 3- and 7 fold greater than those of parent HSG, respectively. Compared to parent HSG, HSG-S8 cells were able to produce much greater amount of collagenous and noncollagenous proteins in which 17% was collagen. These matrices produced by HSG-S8 included type II collagen and high molecular proteoglycans similar to those produced by chondrocytes. Moreover, inoculation of HSG-S8 cells into nude mice resulted in an adenocarcinoma with the formation of cartilage and bone. The mouse origin of cartilage and bone in the tumor tissue was demonstrated by in situ

hybridization using Alu and L1 probes. These findings suggest that a new clone HSG-S8 is able to produce cartilage-type matrix and to induce differentiation of mouse mesenchymal-type cells into chondrocytes and osteocytes.

文献

- 1) Doile, L. E., Lynn, J. A., Panopio, I. T.,
and Crass, G. (1968) : Ultrastructure of
the chondroid region of benign mixed tumor
of salivary gland. *Cancer*, 22, 225-233.
- 2) Takeuchi, J., Sobue, M., Yoshida, M.,
Esaki, T. and Katoh, Y. (1975) : Pleomor-
phic adenoma of the salivary gland with
special references to histochemical and
electron microscopic studies and biochem-
ical analysis of glycosaminoglycans in
vivo . *Cancer*, 36, 1771-1789.
- 3) Shirasuna, K., Sato, M. and Miyazaki, T.
(1981) : A neoplastic epithelial duct cell
line established from an irradiated human
salivary gland. *Cancer*, 48, 745-752.
- 4) Shirasuna, K., Watatani, K., Sugiyama, M.,
Morioka, S. and Miyazaki, T. (1986) :
Isolation and characterization of differ-
ent clones including myoepithelial-like

- variants from a clonal neoplastic epithelial duct cell line of human salivary gland origin. *Cancer Res.*, 46, 1418-1426.
- 5) Sato, M., Azuma, M., Hayashi, Y., Yoshida, H., Yanagawa, T. and Yura, Y. (1987) : 5-Azacytidine induction of stable myoepithelial and acinar cells from a human salivary intercalated duct cell clone. *Cancer Res.*, 47, 4453-4459.
- 6) Shirasuna, K., Morioka, S., Watatani, K., Sugiyama, M. (1986) : Different expression of alkaline phosphatase in subclones of human neoplastic salivary duct cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 138, 625-630.
- 7) Shirasuna, K., Morioka, S., Watatani, K., Hayashido, Y., Furusawa, H., Sugiyama, M., Okura, M. and Matsuya, T. (1988) : Growth inhibition and differentiation of human salivary adenocarcinoma cell line by

medium conditioned with normal human fibroblasts. *Cancer Res.*, 48, 2819-2824.

8) Shirasuna, K., Furusawa, H., Morioka, S., Watatani, K. and Matsuya, T. (1989) : Different contents of glycosaminoglycans in a human neoplastic salivary duct cell line and its subclone with a myoepithelial phenotype. *Virchows Archiv B*, 57, 175-180.

9) Hatakeyama, S., Kurokawa, K., Satoh, M., Suzuki, A., Ota, O. and Shirasuna, K. (1987) : Glucocorticoid - induced growth inhibition of human neoplastic salivary duct cell line (HSG). *Acta. Pathol. Jpn.*, 37(4), 587-595.

10) 吉岡秀郎 (1992) : ヒト顎下腺由来腺癌細胞株(HSG)の無血清培養クローン生物学的特性. その1 :サブクローンHSG-S10の自立性増殖機構の解析, 投稿中.

11) Takigawa, M., Ishida, H., Takano, T. and

- Suzuki, F. (1980) : Polyamine and differentiation induction of ornithine decarboxylase by parathyroid hormone is a good marker of differentiated chondrocytes. Proc. Natl. Acad. Sci., 77, 1481-1485.
- 12) Peterkopsky, B. and Diegelman, R. (1971) : Use of a mixture of proteinase-free collagenase for the specific assay of radioactive collagen in the presence of other proteins. Biochemistry, 10, 988-994.
- 13) Laemmli, U.K. (1970) : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227, 680-685
- 14) Nomura, S., Hogan, B.L.M., Wills, A.J., Heath, J.K. and Edwards, D.R. (1989) : Development expression of tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) RNA. Development, 105, 575-583

- 15) Shirasuna, K., Watatani, K., Furusawa, H., Saka, M., Yoshioka, H. and Matsuya, T. (1990) : Biological characterization of pseudocyst-forming cell lines from adenoid cystic carcinoma of minor salivary gland origin. *Cancer Res.*, 50, 4139-4145.
- 16) Shirasuna, K., Sato, M. and Miyazaki, T. (1980) : A myoepithelial cell line established from a human pleomorphic adenoma arising in minor salivary gland. *Cancer*, 45, 297-305.
- 17) Dardick, I., Norstrand, A.W.P.V. and Phillips, M.J. (1982) : Histogenesis of salivary gland pleomorphic adenoma (mixed tumor) with an evaluation of the role of the myoepithelial cell. *Human Pathol.*, 13, 62-75
- 18) Dardick, I., Norstrand, A.W.P.V. Jeans, M.T.D., Rippstein, P. and Edwards, V. (1983) : Pleomorphic adenomas II : Ultra-

structural organization of stromal regions.
Human Pathol., 14, 798-809.

- 19) Yan, W., Nakashima, K., Iwamoto, M. and Kato, Y. (1991) : Stimulation by concanavalin A of cartilage-matrix proteoglycan synthesis in chondrocyte culture. J. Biol. Chem. 265, 10125-10131.
- 20) Azuma, M., Kawamoto, H., Kassai, Y., Yanagawa, T., Yoshida, H. and Sato, M., (1989) : Induction of cells with a chondrocyte-like phenotype by treatment with 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in a human salivary adenocarcinoma cell line. Cancer Res., 49, 5435-5442.
- 21) Farley, J.R. and Baylink, D.J. (1982) : Purification of a skeletal growth factor from human bone. Biochemistry, 21, 3502-3507.
- 22) 須田立雄, 小澤英浩, 高橋栄明 (1985) :
骨の科学. 1版, 医歯薬出版, 東京, 68-70,

昭和60年.

- 23) Urist, M.R., Iwata, H., Ceccoti, P.L., Dorfman, R.L., Boyd, S.D., McDowell, M. and Chien, C. (1973) : Bone morphogenesis in implants of insoluble bone gelatin. Proc. Natl. Acad. Sci., 70, 3511-3515.
- 24) Takaoka, K., Yoshikawa, H., Shimizu, N., Ono, K., Amitani, K., Nakata, Y. and Sakamoto, Y. (1981) : Purification of a bone-inducing substance (osteogenic factor) from a murine osteosarcoma. Biomed. Res., 2, 466-471.
- 25) Wozney, J.M., Rosen, V., Celeste, A.J., Miosock, L.M., Whitters, M.J., Kriz, R.W., Hewick, R.M. and Wang, E.A. (1988) : Novel regulations of bone formation molecular clones and activities. Science, 242, 1528-1534.
- 26) Noda, M. and Camilliere, J.J. (1989) : In vivo stimulation of a bone formation

by transforming growth factor- β .

Endocrinology, 124, 2991-2994.

- 27) Seyden, S.M., Andrea, T.C.T., Thompson, Y., Rosen, D.M. and Piez, K.A. (1985) : Purification and characterization of two cartilage-inducing factors from bovine demineralized bone. Proc. Natl. Acad. Sci., 82, 2267-2271.
- 28) Betz, H., Nathan, R.W., Rosen, D.W., Armstrong, R.M., Thompson, A.Y., Segarini, P.R., Matews, M.C., Dasch, J.R., Piez, K.A. and Seyden, S.M. (1989) : Purification and characterization of a unique osteo inductive factor from bovine bone. J. Biol. Chem., 264, 20805-20810.
- 29) Luiten, F.P., Cunningham, N.S., Ma, S., Muthukumar, N., Hammonds, R.G., Nevins, W.B., Wood, W.I. and Reddi, A.H. (1989) : Purification and partial amino acid sequence of osteogenin, a protein initiat-

ing bone differentiation. J. Biol. Chem.,
264, 13377-13380.

脚注

大阪大学歯学部口腔外科学第一講座（主任教授：松矢篤三）

本論文に使用した略号を以下に示す。

CS；仔牛血清，FBS；牛胎児血清，DME；ダルベッコウ変法イーグル培地，EDTA；エチレンジアミン四酢酸，GAG；グリコサミノグリカン，CPC；塩化セチルピリジニウム，PBS； Ca^{2+} ， Mg^{2+} を含まないリン酸緩衝液，SDS；sodium dodesyl sulfate，TCA；トリクロロ酢酸，SDS-PAGE；SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動，TGF- β ；トラスフォーミング成長因子

本論文の要旨の一部は第49回日本癌学会総会（平成2年7月，札幌），第35回日本口腔外科学会総会（平成2年10月，岡山），第50回日本癌学会総会（平成3年9月，東京），第36回日本口腔外科学会総会（平成3年10月，大阪）において発表した。

図・表の説明

図 1 . Sepharose CL-2Bによるプロテオグリカンの溶出パターン

30 μ Ci/mlの [3 H]-グルコサミンで12時間あるいは60 μ Ci/mlの [35 S]-硫酸で6時間標識後, 抽出したプロテオグリカンをグアニジン塩酸液で平衡化したSepharose CL-2Bカラムに流速6 ml/hで展開し, 2 mlずつ分画したサンプルの放射活性を測定した.

図 2 . SDS-PAGEによるコラーゲンの分析

培養細胞を40 μ Ci/mlの [35 S]-メチオニンで24時間ラベルし, ペプシン消化後, 5% SDS-PAGEに展開しフルオログラフィーを行った. Lane 1: HSG-S8細胞成分, Lane 2: HSG-S10細胞成分, Lane 3: HSG-S8培養上清成分, Lane 4: HSG-S10培養上清成分. $\alpha_1(I)$: I型コラーゲンの α_1 鎖, $\alpha_2(I)$: I型コラーゲンの α_2 鎖, $\alpha_1(II)$: II型コラーゲンの α_1 鎖. HSG-S8の細胞と培養上清液中にはII型コラーゲンの α_1 鎖に一致したバンドが観察

された。

図 3 . 免疫沈降法を用いたコラーゲンの分析

培養細胞を $40 \mu\text{Ci/ml}$ の $[^3\text{S}]$ -メチオニンで 24 時間ラベルし, ペプシン消化後の HSG-S8 (Lane 1 と 2) あるいは HSG-S10 (Lane 3 と 4) のサンプルを抗 I 型コラーゲン抗体 (Lane 1 と 3) および抗 II 型コラーゲン抗体 (Lane 2 と 4) で免疫沈降を行なった。HSG-S8 のサンプルに抗 II 型コラーゲン抗体で免疫沈降される約 100 kD のバンドを認める。

図 4 . HSG-S8 のヌードマウス移植腫瘍組織の形態観察

HSG-S8 は *in vivo* で親株 HSG と同様に腺癌胞巣を形成する (A, 移植後 10 日目)。移植後 6 日目 (B) には多量の間葉組織が腺癌胞巣内に侵入する像を認め, さらに移植後 14 日目 (C) には腺癌胞巣に接した部分に軟骨を伴う骨が形成され, 移植後 20 日目の組織 (D) では軟骨組織は消失し, 骨の形成はさらに著明となっている (A, B, C, $\times 80$; D $\times 40$)。

図 5 . In situ ハイブリダイゼーション

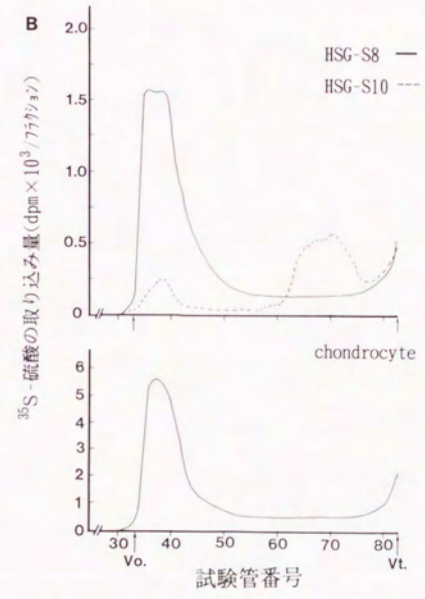
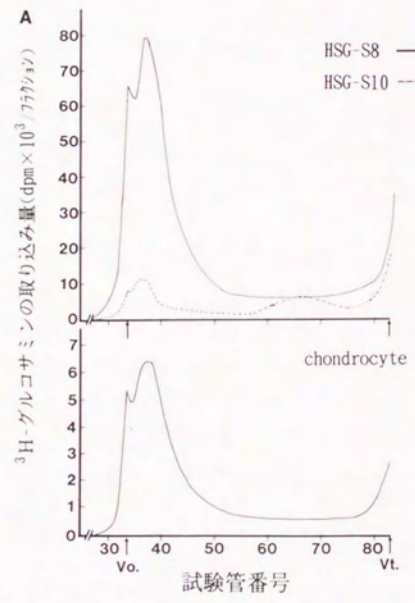
Aluプロローブ (A)あるいはL1プロローブ (B)を用いて in situ ハイブリダイゼーションを行った。腺癌胞巣を形成する細胞はAlu配列のシグナルをまた、マウス間葉細胞に加えて軟骨や骨細胞はL1配列のシグナルの発現を認めた (A, B × 40)。

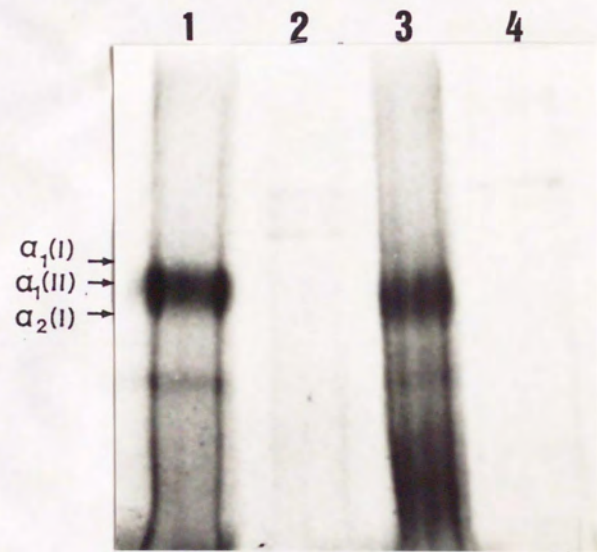
表 1 . GAG合成能

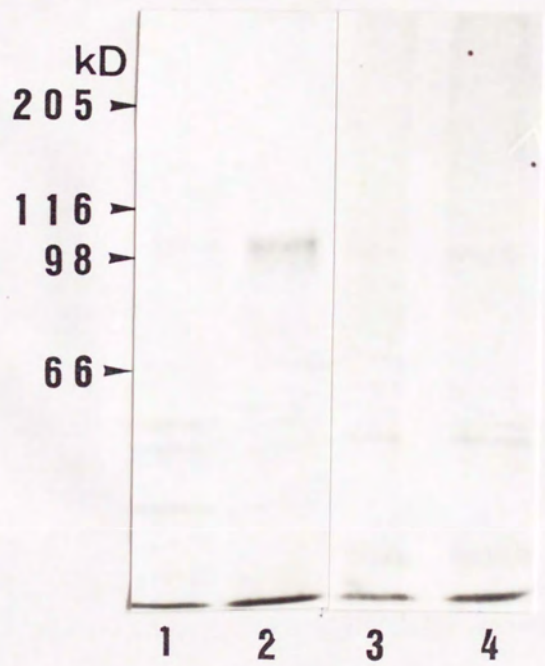
GAG産生量を細胞タンパク 1 μ gあたりの [3 H]-グルコサミンまたは [35 S]-硫酸のCPC沈殿画分への取り込み量を指標として測定した。各値は各群4ウエルの平均値 ± 標準偏差を示す。

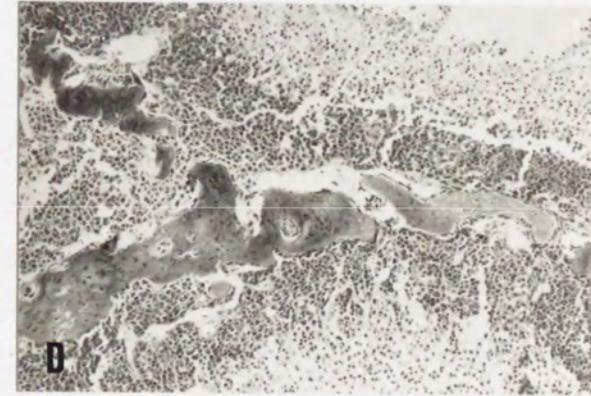
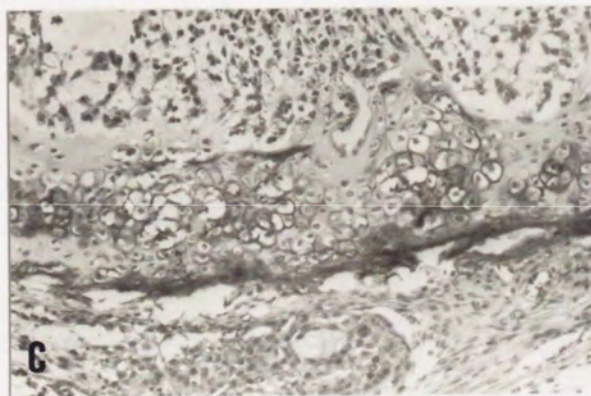
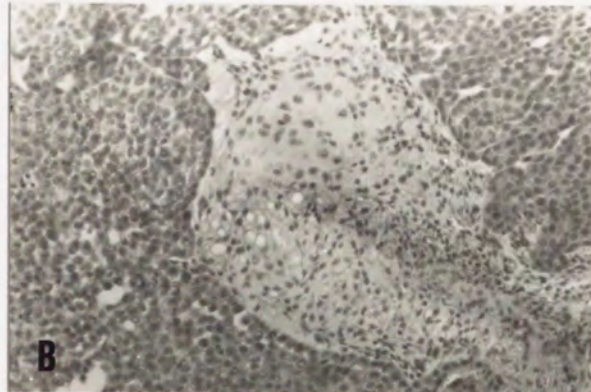
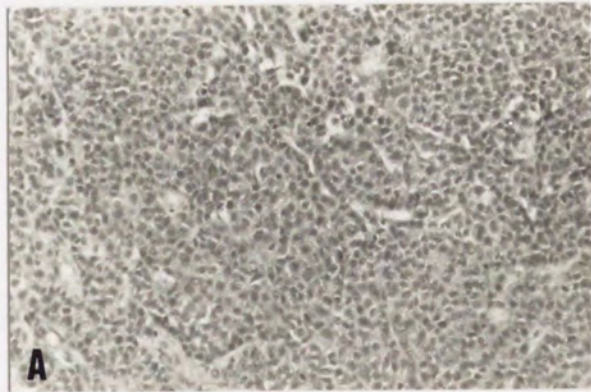
表 2 . コラーゲン蛋白の産生量

コラーゲン蛋白合成量を Peterkopsky と Diegelman^{1,2)}の方法に準じ、 [3 H]-プロリンのコラーゲナーゼで消化された画分への取り込み量を指標として測定した。総蛋白合成量はコラーゲナーゼ未処理の [3 H]-プロリンの取り込み量で示した。各値は各群4ウエルの平均値 ± 標準偏差を示す。









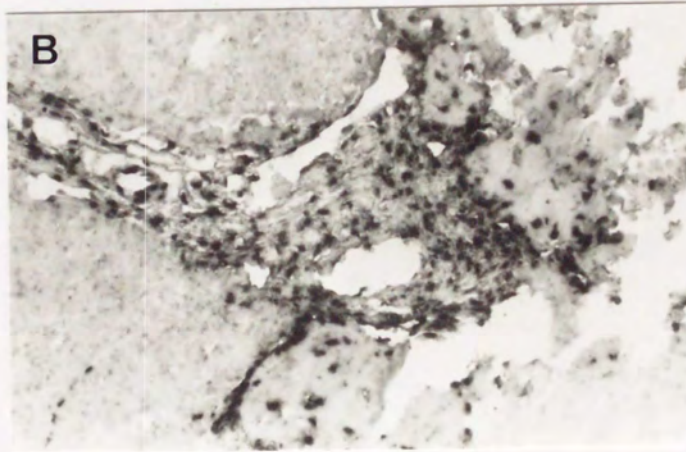
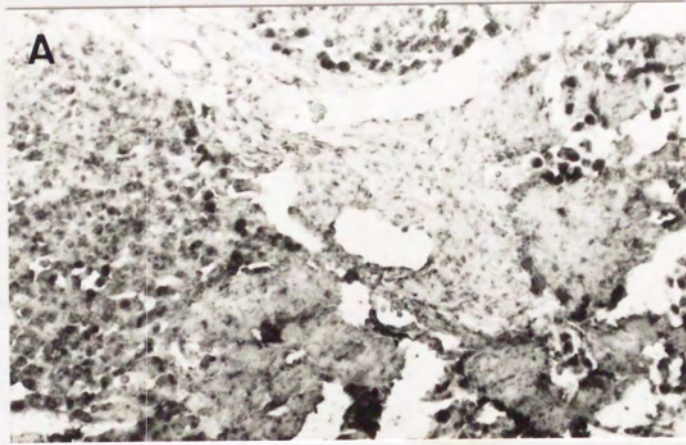


表1 グルコサミン合成能

細胞株	[³ H]-グルコサミンの取り 込み量(dpm/μg蛋白)	[³⁵ S]硫酸の取り込み量 (dpm/μg蛋白)
HSG	45.9±2.8	4.7±0.2
HSG-S8	134.8±6.8	34.3±2.6
HSG-S10	78.9±4.7	6.1±0.5

表2 コラーゲン蛋白の産生量

細胞株	[³ H]-プロリンの取り込み量		
	コラーゲン蛋白(dpm)	総蛋白(dpm)	コラーゲン蛋白/総蛋白(%)
HSG	2,166 ± 55.3	69,837 ± 1,751	3.1
HSG-S8	20,775 ± 882.3	121,248 ± 2,057	17.1
HSG-S10	1,118 ± 64.8	66,596 ± 1,653	1.7



4 903331 100363

