

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

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 :

0

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-ンHSG-S10の自律性増

1 -

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

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 Todaro') 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 Shirasuna®) 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' 4-1 8),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

緒言

- 2 -

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 HSG<sup>®</sup>,およびマウス線 維芽細胞株 Balb/c3T3 clone A31<sup>17</sup>, (American Type Culture)は10% CS(Cell Culuture Laboratories, Ohio, U.S.A.)と4 mML-グルタミン(和光純 薬, 大阪)を含むDME(日水製薬, 東京)にて37℃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. HS6は増殖培養液に10<sup>5</sup>個/ml浮

- 3 -

遊させ, 60mm径プラスチック皿 (Corning Glass Works, Corning, NY, U.S.A.) に 5 ml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<sup>5</sup>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 2 5 0 代 目の H S 6 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. H S 6 細胞は 10 % C S を 含む D M E 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 C S を 添加しないと数日後には 9 5 % 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 % B S A (Fraction V, Sigma, ST. Louis, U.S.A.)を添加した D M E で 4 週 間培養した後, 無血清 S F M - 10 1 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

- 4 -

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) СМの調整

以下の方法で CMを採取した. SFM-101培地に 2 × 10<sup>5</sup>個/mlの HS6-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 × gで遠沈し細胞を除去したものを CMとした. CM の濃縮のために硫安塩析を行なった. 101の CMに 最終濃度が 80% となる様に (561g/1)硫酸アンモニ

- 5 -

ウム (和光純薬)を添加し, 4 ℃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 ℃ 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℃下で101の50mMトリス緩衝液(PH8.0) 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(3.0×25cm; 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7.5ml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0.15M NaClを含むPBS(PH7.5)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.

- 6 -

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SephacrylS-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)、 テプロチニン(6.0kD;以上 Sigma)を用いた.

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1 mlの溶液を回収し,蒸留水に対して透析後,200μlのPBSに溶解し活性を測定した.
4.細胞増殖測定法

- 7 -

細胞増殖を以下の方法で算定した. すなわち 5 × 10<sup>4</sup>個/mlの細胞を16mm径のマルチウェルプレー ト (Corning)に 1 ml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<sup>4</sup> 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-a (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Montagnier<sup>18)</sup>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<sup>4</sup>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

- 8 -

養器中で 3 7 ℃ 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 E G F および T G F - a は最終濃 度が 0 ng/m l から 5 ng/m l 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 [ ${}^{3}$ 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<sup>5</sup>個の細胞を16mm径ウエルに播種し、37<sup>℃</sup> 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  $\mu$  Ci/well の[メチル- ${}^{3}$ 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<sup>5</sup>個/mlのBalb/c 3T3細胞を含む10% CS添加DMEを100µlづつ入れ、 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  $\mu$  Ci/wellの[ ${}^{3}$ H] - チミジンを添加し2時間ウパル

抗IL-1 a 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℃,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℃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℃の恒温 水中で 30分間または沸騰水中で 3 分間行った.酸

- 11 -

・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℃ 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10mMになる ように部分精製標品にDTT(和光純薬)を添加し4 ℃,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<sup>7</sup>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 M D を 用 い , 写 真 撮 影 を 行 な っ た . 10. EGF受 容 体 の 検 索

5 × 10 <sup>4</sup> 個 / m l 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

- 12 -

管あたり 2.0×10<sup>5</sup>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 [<sup>125</sup>1]-E6F (Specific activity 115µ Ci/µg, ICN)と1µg/ m1の E6Fの存在下 (非特異的結合),または非存在 下 (全結合)で4℃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 400µ Iの 0.1N Na0H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, [<sup>125</sup>1]-E6F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(全結合一非特異的結 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

 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 , H S G - S 6 と H S G - S 8 は や や 小 型 の 立 方 形 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HS6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HS6-S6で30.1時間,HS6-S10では30.4時間で 血清存在下での親株HS6の29時間に匹敵するもの であった、一方HS6-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、HS6-S10の 細胞飽和密度は7.1×10<sup>5</sup>/cm<sup>2</sup>と親株HS6の9.3× 10<sup>5</sup>/cm<sup>2</sup>に比較すると低い値を示したが、他のク ローンHS6-S6の4.6×10<sup>5</sup>/cm<sup>2</sup>やHS6-S8の2.6×10<sup>5</sup> /cm<sup>2</sup>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 H S G 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 H S G -S 1 0 は 2 2 % のコロニー 形成率を示し, H S G - S 6 の

- 14 -

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/c3T3 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/c3T3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PH3.0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%飽和硫安による塩析,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

- 15 -

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 0 Mから 1 M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 0.3 M Na C I 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 へ 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 35 kD付近に溶出した画分のうち吸着画分を0.15Mか ら 3 M NaCI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 NaCI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

- 16 -

過で 10 k D 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 , P 2 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分間の熱処理でな定で、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.

- 17 -

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, P 2 標 品 で は 抗 T G F - a 抗 体 処 理 で そ の 活 性 は 2 0 . 6 % にまで抑制を受けた. 抗 E G F 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 a F G F 様 因 子 で P 2 標 品 は T G F - a 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/c3T3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 NaCIで溶出するといった a FGFの特性を有 していた. また P 2 は熱 • 酸 • ア ル カ リ 処 理 に 比 較 的 安 定 な タ ン パ ク で , 10 m M D T T 処 理 で 失 活 す る T GFa の特性を有していた.

- 18 -

6. 親株 HSG, HSG-S10の DNA合成能に対する P1標

品, a F G F, b F G F の 効果

上記の実験から P 1 標品が a F 6 F 様因子であること が示唆された.そこで P 1 標品ならびに a F 6 F の精製 標品の親株 H S 6 ならびに H S 6 - S 1 0 の D N A 合成能に対 する影響を検討した.また a F 6 F と等電点が異なる のみで生物活性の類似している b F 6 F の効果につい ても合せて検討した.その結果,3 者の標品はい ずれも各細胞の D N A 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 a F 6 F ならびに b F 6 F は両者とも 10 n g / m l 添加 時のデータを示しているが,この濃度を 0.01 n g / m l から 1 0 0 n g / m l の範囲で変化させても同様に顕著 な D N A 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-a, EGFの効果

前述の実験結果から P 2 標品が T G F - a 様因子であることが示唆された.そこで,親株 H S G ならびにH S G - S 1 0 の細胞増殖能に対する P 2 標品ならびに T G F-

- 19 -

a と E G F 精製標品の効果について検討した. D N A 合成促進効果では親株 H S G ならびに H S G - S 1 0 に対して
P 2 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 T G F - a と E G F はともに両細胞のD N A 合成を促進させた. T G F - a では1 ng/m I の濃度で未処理の1.7~1.8倍に, E G F では10 ng/m I の濃度で未処理の1.5倍の促進効果を示した(図7).

次に16mm径ウエルに1×10<sup>4</sup>個の細胞を播種後, 0.1ng/mlから10ng/mlの濃度のTGF-a 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-a添加では無添加時の4倍に増加 した(図8A).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-a添加 群では0.1ng/mlの濃度から増加し, さらに1 ng/m l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 − 形 成 に 与 え る TGF- α と EGFの 影 響 を 検 討 し

- 20 -

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-a 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-a 添加時では0.1ng/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-a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-a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 n Mの高親和性と2.9 n Mの低親和性の 2種類のEGF受容体をそれぞれ3.5×10<sup>4</sup>/細胞と 10.0×10<sup>4</sup>/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 n Mの高親和性受容体を 9.8×10<sup>4</sup>/細胞とKd値 1.4 n Mの低親和性受容体を

- 21 -

25.7×10<sup>4</sup>/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-

a および抗 EGF中和抗体の効果

親株HSGとHSG-S10の内因性TGF-a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, 10μg/mlの抗TGF-a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 T G F - a 抗 体 に よ る P 2 標 品 活 性 の 中 和

P2標品と10µg/m1の濃度の抗TGF-a 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-a 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-a であること を強く示唆すものである.

- 22 -

SpornとTodaro''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<sup>2-5)</sup>.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°'、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内に培 養皿上より浮遊し,継代培養が困難であった、

HayashiとSato'\*'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

- 23 -

考察

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 EGF<sup>20-22)</sup> 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 H S G 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 Kato<sup>23)</sup>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 - 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-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

- 24 -

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 - 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<sup>1,7)</sup>.これに F G F や 血小板由来成長因子 (PD G F)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<sup>24-27)</sup>. そこで本研究では HS G - S 10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 T G F - β やインシュリン様成長因子 (I G F) などの 成長因子が通常不活性型で C M 中に分泌され,酸処 理によって活性型になる<sup>5.28.29</sup>)という理由によ る.しかし,HS G - S 10の C M を PH3.0 で一時的な酸処

- 25 -

理を行うとBalb/c3T3のDNA促進活性は1.9倍にま で低下した. ー方,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 I回収し, 塩析後, イオン交換カラム, ゲル濾過, へ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aF6F様物質であった.F6Fは 1974年に60spodarowicz<sup>30</sup>、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10ng/m1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<sup>31.32)</sup>. F6F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.bF6F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,aF6F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<sup>33-37)</sup>.P1は抗aF6F抗体処理

- 26 -

によりその活性は殆ど認められなくなり, Balb/c 3 T 3 の D N A 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、 へパリン親和性カラムに吸着し1 M NaCIで溶出 するといった a FGFの特性を有していた. P1標品は a F G F 精製標品と同様に親株 H S G や H S G - S 1 0 の D N A 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 a F G F 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 a F G F や b F G F 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.

a F G F と b F G F 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

- 27 -

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 <sup>44-4</sup><sup>(\*)</sup>. 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<sup>47-50)</sup>. 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<sup>40</sup>, 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-a であると考えられた. TGF-aは1978年にDeLarcoとTodaro<sup>51</sup>,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

- 28 -

して精製された. その後の研究からTGF-a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-a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<sup>29.52)</sup>. P2標品は上記のTGFa 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, 10mM 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<sup>63)</sup>. HSG-S10の 自律性増殖における「GF-a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,TGFα の精製標品は P 2 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

- 29 -

天中の増殖においてもTGF-aは5ng/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10µg/mlの抗TGF-a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-a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.

Sato<sup>14</sup>, 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Kurokawa<sup>15.</sup> <sup>16)</sup>らは10<sup>-®</sup>Mデキサメサソン添加による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

- 30 -

れた P 2 標品が E G F でなく T G F - a であることはその 活性が抗EGF抗体でなく抗TGF-a 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 E G F よ り も T GFa 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-a と EGFは 細胞表面の E G F 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 E G F に比較して T G F - a 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

- 31 -

形成能に対する作用についてはTGF-aが強力な作 用を示す<sup>5</sup>°). 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-aである<sup>57-</sup>°<sup>1)</sup>. 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-a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

- 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.
- 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-a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

- 32 -

T G F - a 様 因 子 と T G F - a 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 H S G と H S G S 1 0 の D N A 合成能は E G F の中和抗体処理では抑制されないのに対し、 T G F a 中和抗体添加により両細胞の D N A 合成は無添加時の 7 0 % から 6 0 % にまで抑制された.
- 6. HSG-S10からのTGF-a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-a抗体添加で中和され、本因子がTGF-aであることが示唆された.

以上の所見より親株 H S G ならびに H S G - S 1 0 はオー トクライン増殖機構を示し、その因子として T G Fa 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、

- 33 -

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 Adenocaracinoma 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-Sepharose 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-

- 35 -
tor- $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ), suggesting it to be TGF- $\alpha$ . 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- $\alpha$  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- $\alpha$ . These findings strongly suggest that TGF- $\alpha$ is a possible autocrine growth factor in HSG-S10 : by stimulataneously producting or co-expressing both TGF- $\alpha$  and its receptor, the cells stimulate its own growth.

- 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 a 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

\_ 37 \_

## 文 献

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

- 5) Iwamoto, A., Betran, L.M. and Digiovanni,
  J. (1991) : Evidence for autocrine/paracrine growth stimulation by transforming growth factor-α during the process of skin tumor promotion. Molecular Carcinogenesis, 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) : Isolation and characterization of differrent clones including myoepithelial-like variants from a clonal neoplastic epithelial duct cell line of human salivary gland origin. Cancer Res., 46, 1418-1426.

- 38 -

- 8) Sato, M., Azuma, M., Hayashi, Y. Yoshida,
  H., Yanagawa, T. and Yura, Y. (1987) : 5Aza-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. Cacer Res., 48, 2819-2824.

11) Shirasuna, K., Furusawa, H., Morioka, S.,

— 39 —

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. : Glucocorticoid-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.,

- 40 -

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

- 15) Kurokawa, R., Kyakumoto, S. and Ota, M. (1988) : Glucocorticoid regulated secretion 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 defined 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.

- 41 -

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-

- 42 -

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

- 43 -

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 fibroblast growth factor in hepatocarcinogenesis. 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: Isolation 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.

- 44 -

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): Patial chemical and biolog-

- 45 -

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 mitogen 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 structure of bovine brain acidic fibroblast growth factor (FGF). Biochem. Biophys. Res. Commum., 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.

- 46 -

Biochem. Biophys. Res. Commum., 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.,

- 47 -

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
  Iocalization of chondroitin sulfate and
  dermatan sulfate proteoglycans in tumor
  tissues. Br. J. Cancer, 57, 74-78.

- 48 -

- 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 factorheparan 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.

- 49 -

and Thiery, J.P. (1991) : Secreted or nonsecreted 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

- 50 -

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-neoplatic tissues. Proc.

Natl. Acad. Sci., 78, 5339-5343.

54) 增田義重, 西川克三 (1986): 腫瘍増殖因子

- 51 -

と a u t o c r i n e 説 . 代 謝 (癌 86'), 23, 73-79. 昭 和 61年.

- 55) Derynck, R. (1988) : Transforming growth factor a. Cell, 54, 593-595.
- 56) Decker, S. (1990) : Epidermal growth factor and transforming growth factor-α in-duce differential processing of the epidermal growth factor receptor. Biochem. Biophys. Res. Commum., 166, 615-621.
- 57) Rosenthal, A., Lindquist, P.B., Brigman,
  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., Bringman,
  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,

- 52 -

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 tisssue 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.

- 53 -

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. 大阪大学歯学部口腔外科学第一講座(主任教授:松矢篤三)

脚 注

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<sup>2+</sup>・Mg<sup>2+</sup>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 - dimetylammonio-1 propanesulfonate,EGF;ヒト上皮成長因子,TGFa;トランスフォーミング成長因子ーa,TGF-β; トランスフォーミング成長因子ーa,TGF-β; トランスフォーミング成長因子ーa,EGF;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-1a;インターロイキン1 - a,IL-1β;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.

- 55 -

## 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

H S G - S 1 0 (D) は 親 株 H S G (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 , H S G - S 6 (B) と H S G - S 8 (C) は や や 小 型 の 立 方 形 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[<sup>3</sup>H]-チミジンで標識した. DNA合成量は[<sup>3</sup>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,CM無添加の対照群に対する割合(%)で示した(各群 n=3).

- 56 -

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 3 T 3 の D N A 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 3 5 k D 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 N a C I 直 線 濃 度 勾 配 で 溶 出 さ せ た . 各 フ ラ ク ショ ン を B a I b / c 3 T 3 に 添 加 後 , D N A 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

- 57 -

1 × 10<sup>5</sup> 個の細胞を16mm径ウエル内で4日間培養後, P1標品, aFGF(10μg/ml), bFGF(10μg/ml)
を含む無血清培養液SFM-101で23時間培養をした.
1 時間1μCi/wellの[<sup>3</sup>H]-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-a, EGFの効果

1 × 10<sup>5</sup>個の細胞を16mm径ウエル内で4日間培養後, P2標品, T6F-a (5<sup>ng</sup>/ml), E6F (10ng/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 μ Ci/wellの[<sup>3</sup>H]-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 H S G と H S G - S 1 0 の 細胞増殖能に対する T G F - a と E G F の 効果

1 × 10<sup>4</sup>個のHSG細胞(A)あるいはHSG-S10細胞(B)

- 58 -

を 16mm径 ウェル に入れ,24時間 培養後,各種濃度の T G F - a (● ──●)および E G F (■ ⋯⋯■)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 ウェルの平 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-a と EGFの効果

1 × 10<sup>4</sup>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-a(● → )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 - 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-a 抗体と抗 EGF抗体の効果

1 × 10<sup>5</sup>個のHSG細胞(● — ● )あるいはHSG-S10

- 59 -

細胞(■ →→→●)を16mm径ウエル内で4日間培養後,
各濃度の抗TGF-a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、1µCi/wellの[<sup>3</sup>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 T G F - a 抗体による P 2 標品活性の中和 1 × 10<sup>5</sup>個の細胞を 16mm径マルチウエルプレー トに播種し、37℃で4 日間培養後、P 2 標品とそれ ぞれの中和抗体を 10 µ g/m | 濃度で同時添加し、無 血清培養液 S F M - 10 1 で 2 3 時間培養を行った後、1 µ C i / w e I I の [<sup>3</sup> H] - チミジンで1 時間標識し、T C A 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10<sup>7</sup>個の細胞を接種した時の腫瘍を形成

- 60 -

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<sup>4</sup>個 / m l 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<sup>5</sup>個 に な る よ う に 分 注 し た . 0 . 25 % B S A 添 加 S F M - 101 培 地 に 異 な る 濃 度 の [<sup>1 2 5</sup> l] - E GF

- 61 -

と 1 µ g/m l の E G F の 存 在 下 (非特異的結合),ま たは非存 在 下 (全結合) で 4 ℃, 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.



図 2 Balb/c<sub>3</sub>T<sub>3</sub>のDNA合成に対する HSG-S10培養上清(CM)の効果

0

0



培養2-4日目の上清 培養2-6日目の上清





0

0

家子

図4







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




0

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

抗体濃度(µg/m1)



	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(×10 <sup>5</sup> 個/cm <sup>2</sup> )	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

表1 分離クローン細胞の増殖特性

0

<sup>a</sup>数字は10<sup>7</sup>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
----	-----------	--------

	DNA合成化	足進活性(%)
処理	P 1	P 2
トリプシン(50µg/ml,37℃ 2時間)	9.0	13.4
トリプシン(50μg/m1)+ インヒビター(100μg/m1)	83.5	92.4
56℃,30分間	42.7	88.7
100℃,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

性用估计	DNA合成促進活性(%)		
行共饥体	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-1α抗体	100.2	105.9	
抗IL-1β抗体	89.1	93.1	
抗IL-6抗体	115.7	95.7	

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

表4 親株HSGとHSG-S10のEGF受容体の解析

.



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

2

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	
X	•	写	真	Ø	紙	数	:	5 枚
表	Ø	紙	数	:	2	枚		
別	₩	希	望	数	:	5 0	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					
	E	4	唾	液	腺	癌	細	胞株(H S G)の 無 血 清 培 養 ク ロ ー
	ン	Ø	生	物	学	的	特	性
		そ	Ø	2	:	i n	v	vivoで骨誘導能を持つサブクロ
						-	ン	H S G - S 8 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<sup>1・20</sup>.
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<sup>3-®)</sup>,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<sup>4.5)</sup>.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

- 2 -

- 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 (HS6)<sup>3</sup>)ならびに無血清培 地下で得たサブクローンHS6-S8とHS6-S10を実験 に用いた. 親株HS6および各クローンの分離過程 は既に述べた<sup>10</sup>).ウサギ肋軟骨由来軟骨細胞<sup>11)</sup> は本学部生化学講座滝川助教授より供与を受けた. HS6は10% CS(Cell Culture Laboratories, Ohio, U.S.A)を含むDME(日水製薬,東京)で,HS6-S8と HS6-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℃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.

3 -

2. GAG合成能の測定

GAG合成能を [<sup>3</sup>H] - グルコサミンおよび [<sup>35</sup>S] - 硫 酸 の C P C 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<sup>5</sup>個の細 胞を播種後, コンフルエントに達した時点で [<sup>3</sup>川-グルコサミン (Specific activity 52.7Ci/mmol; New England Nuclear)を最終濃度2µCi/mlにな るように添加し、12時間培養した. また、 [<sup>3 5</sup> S]-硫酸 (Specific activity≥ 43Ci/mgS;ICN, Biochemicals, CA, U.S.A)では最終濃度5µCi/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200µ I/well加えて細胞を溶解した. 中和後, 2 mg/mlのアクチナーゼE(1000チロシン 単位 / mg, 科研製薬, 東京), 5 mM塩化カルシュウ ムを含む 0.2Mトリス塩酸緩衝液 (PH7.8) 1.0m | を加 えて, 55℃, 12時間インキュベートした. その後, 12.5µg/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 µ 1 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 1 m l 加 え, 37℃, 1 時間インキュベートした. CPC

- 4 -

沈殿画分はメンブランフィルター(直径25mm, 孔径 0.45µm; 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<sup>5</sup> 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,30µCi/ml の[<sup>3</sup>H]-グルコサミンで12時間あるいは60µCi/ml で[<sup>3</sup><sup>5</sup>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.1 M 6 -アミノ-n-カプロン酸,1 mM フェニルメタンスルフォニルフルオライド,5 mM ベンザミジン塩酸)とグアニジン塩酸抽出液(4 M グアニジン塩酸を含む0.05 Mトリス塩酸緩衝液, PH8.0)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℃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×gで遠沈し,その上清2mlをSepharose CL-

- 5 -

2 B カ ラ ム (1.5 c m × 100 c m; 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<sup>12)</sup>の方法に準じて行った. すなわち 16mm径プラスチック皿上でコンフルエントに達し た細胞を50µg/mlアスコルビン酸を含む増殖培養 液で24時間培養後, 5µCi/ml L-[<sup>3</sup>H]-プロリン (Specific activity 21µCi/mmol; RCC Amersham, U.S.A), 50µg/mlアスコルビン酸, 64µg/mlβ-アミノプロビ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, 5mM 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℃で10分間作用させ, 1200×gで10分遠沈 した. 沈殿物を回収し, 2.5mM 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,

- 6 -

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、HCIで中和後、20 units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40µCi/mlの [35S]-メチオニン (Specific activity ≥ 1000Ci/mmol; ICN)で24時間標 識後, 1 ml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時間撹播した後, 12,500×gで20分遠心し,その上清を凍結乾燥し た.本試料に200µlのRIPA buffer(1%Triton X-100, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 150 mM 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Laemmli<sup>13)</sup>の方 法に従い5% SDS-PAGEに展開後, フルオログラフ

- 7 -

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5µ | 加え4℃, 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20µ |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Laemmli<sup>13)</sup>のsample bufferで 溶 出 し た 後,7.5% SDS-PAGEに 展 開 し, コ ダ ッ クX-Omat XAR-5 フィルム上にフルオログラフィ - 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 10<sup>7</sup>個の細

- 8 -

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Nomura<sup>1,4)</sup>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2 7℃,40分間処理し、リン酸緩衝液で洗浄後、0.2N HCI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,

- 9 --

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, 200µg/ml tRNA)をのせて 95℃で7分間heat denature処理を行った. 37℃ 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-3indolyl phosphatase, nitroblue tetrazoulium 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

H \$ 6 - \$ 8 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

- 10 -

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[<sup>3</sup>H]-グルコサミンおよび[<sup>35</sup>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, [<sup>3</sup>H]-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[<sup>35</sup>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 H S G - S 8, H S G - S 1 0 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 S e p h a r o s e C L - 2 B カ ラ ム に 展 開 し た 結 果 を 示 し て い る . H S G - S 8 お よ び 軟 骨 細 胞 は [<sup>3</sup>H] - グ ル コ サ ミ ン お よ び [<sup>3 5</sup>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 H S G - S 8 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 .

- 11 -

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[<sup>3</sup>H]-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

[<sup>3 5</sup> S] - メ チ オ ニ ン で ラ ベ ル し た コ ラ - ゲ ン タ ン パ ク を S D S - P A G E に て 分 析 し た . そ の 結 果 , 図 2 に 示 す 様 に H S G - S 8 の 細 胞 層 な ら び に そ の 上 清 か ら の サ ン プ ル に II 型 コ ラ - ゲ ン の a 」鎖 に 一 致 し た バ ン ド が 観 察 さ れ た . ま た 図 3 に 示 す 様 に H S G - S 8 の サ ン プ ル を 抗 II 型 コ ラ - ゲ ン 抗 体 で 免 疫 沈 降 さ せ る と 約 100 k D の バ ン ド が 認 め ら れ た . な お 抗 I 型 コ ラ - 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 - ル と し て 用 い た H S G -S 10 か ら の サ ン プ ル に は H S G - S 8 の 様 な コ ラ - ゲ ン

- 12 -

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). この様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

- 13 -

マ ウ ス 由 来 で あ る か を 同 定 す る た め に ヒ ト D N A に 特 異 的 な A I u プ ロ ー ブ と マ ウ ス D N A に 特 異 的 な L 1 プ ロ ー ブ を 用 い た i n 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 A I u 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 L 1 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 H S 6 - S 8 に 由 来 す る も の で は な く , マ ウ ス 間 葉 細 胞 に 由 来 し , H S 6-S 8 は i n 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<sup>4・5)</sup>.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

- 14 -

示 唆 し て い る . 唾 液 腺 腫 瘍 の 多 く は 多 量 の 細 胞 外 基質を含む特有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。 Shirasuna<sup>15)</sup>らは腺様嚢胞癌由来培養細胞を用い た研究結果から、上記の特有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、 かっ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.

- 15 -

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. Shirasuna<sup>1</sup><sup>(1)</sup> 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 Dardick'<sup>7</sup> や Milles'<sup>8</sup> 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. Shirasuna<sup>8</sup>)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 へ 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 H S G よ り 分 離 さ れ た H S G - S 8 は 極 め て 高 い 細 胞 外 基 質 産 生 能 を 有

- 16 -

していた. HSG-SB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 [<sup>3</sup>H] - グルコサミンあるいは [<sup>3</sup><sup>5</sup>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-S 8 の プ ロ テ オ グ リ カ ン を 4 M 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 [<sup>3</sup>H] - グルコサミンあるいは [<sup>35</sup>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'
<sup>®</sup>)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 - 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.Azuma<sup>2</sup><sup>o)</sup>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-ンHSG-

- 17 -

A Z A 3 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 H S G - S 8 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Baylink<sup>21)</sup>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

- 18 -

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<sup>22)</sup>. 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 胞 巣 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、 Urist<sup>23)</sup>らはラット長管骨を脱灰し, 高分子コラ - 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

- 19 -

みている. 高岡<sup>24)</sup>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Wang<sup>25)</sup>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-Bと30 %から40%の相同性を持っており,これらはTGFβファミリーであると報告している.事実, TGFβ 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2°、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 chamber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

- 20 -

することができなかった、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-SB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 - 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.

- 21 -

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.

- 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. HS0-S8は親株HS0やHS0-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.

- 22 -

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 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 室員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  $[^{3}H]$ -glycosamine and  $[^{35}S]$ -sulfate incorporation in HSG-S8 culture were 3and 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

- 24 -

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.

- 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) : Pleomorphic adenoma of the salivary gland with special references to histochemical and electron microscopic studies and biochemical 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 different clones including myoepithelial-like

- 26 -

### 文 献

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

- 27 -

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 neplastic 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

- 28 -
Suzuki, F. (1980) : Polyamine and differentiation induction of ornithine decarboxylase by parathyroid hormone is a good marker of diffentiated 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) : Clevage 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

- 29 -

- 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 myoepothelial 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-

- 30 -

structual oraganization of stromal regions. Human Pathol., 14, 798-809.

- 19) Yan, W., Nakashima, K., Iwamoto, M. and Kato, Y. (1991) : Stimulation by concanavalian 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 1,25dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> 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,

— 31 —

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., Mitosock, 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

— 32 —

by transforming growth factor- $\beta$ . 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.,
  Muthukumaran, 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-

- 33 -

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

0

.

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<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>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.

- 35 -

脚 注

## 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

30µ Ci/mlの [<sup>3</sup>H] - グルコサミンで 12時間あるい は 60µ Ci/mlの [<sup>3 5</sup>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40µCi/mlの[<sup>3 5</sup>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.Lane1:HSG-S8細胞成分、Lane2:HSG-S10細胞成分、Lane3:HSG-S8培養上清成分、Lane4:HSG-S10培養上清成分、a,(I):I型コラーゲンのa,鎖, a,(I):II型コラー
「型コラーゲンのa,2鎖, a,(I):II型コラー
ゲンのa,鎖.HSG-S8の細胞と培養上清液中には
I型コラーゲンのa,鎖に一致したバンドが観察

- 36 -

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40µCi/mlの[<sup>3 5</sup> S]-メチオニンで24 時間ラベルし, ペプシン消化後のHSG-S8(Lane1と 2)あるいはHSG-S10(Lane3と4)のサンプルを抗 I 型コラーゲン抗体(Lane1と3)および抗 II 型コラー ゲン抗体(Lane2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100kD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,×80; D×40).

- 37 -

図 5 . In situ ハイブリダイゼーション

Aluプローブ (A)あるいはL1プローブ (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1μgあたりの [<sup>3</sup>H]-グルコサミンまたは [<sup>3 5</sup> 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 ウェルの平均値±標準偏差を示す.

表 2 . コ ラ - ゲ ン 蛋 白 の 産 生 量

コラーゲン蛋白合成量をPeterkopskyと Diegelman<sup>12)</sup>の方法に準じ, [<sup>3</sup>H] - プロリンのコ ラ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ゲナーゼ 未処理の [<sup>3</sup>H] - プロリンの取り込み量で示した. 各値は各群4 ウェルの平均値±標準偏差を示す.

- 38 -











細胞株	[ <sup>3</sup> H]-グルコサミンの取り 込み量(dpm/μg蛋白)	[ <sup>35</sup> S]-硫酸の取り込み量 (dpm/µg蛋白)
HSG	45.9±2.8	4.7 $\pm$ 0.2
HSG-S8	134.8±6.8	34. $3\pm 2$ . 6
HSG-S10	78.9 $\pm$ 4.7	6. $1 \pm 0.5$

.

0

グルコサミン合成能

表1

0

## 表2 コラーゲン蛋白の産生量

[<sup>3</sup>H]-プロリンの取り込み量

0

.

細胞株	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

0

