

Title	無血清培地で増殖するヒトメラノーマ細胞の樹立とその特性
Author(s)	濱田, 傑
Citation	
Issue Date	
oaire:version	
URL	https://hdl.handle.net/11094/33243
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について ご参照 ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名・(本籍)	はま 濱	だ 田	すく 傑
学位の種類	歯	学	博 士
学位記番号	第	5 6 2 8	号
学位授与の日付	昭和 57 年 3 月 25 日		
学位授与の要件	歯学研究科 歯学臨床系専攻 学位規則第 5 条第 1 項該当		
学位論文題目	無血清培地で増殖するヒトメラノーマ細胞の樹立とその特性		
論文審査委員	(主査) 教授	宮崎	正
	(副査) 教授	作田	正義 助教授 石田 武 講師 加藤 幸夫

論 文 内 容 の 要 旨

一般に、動物細胞の培養には、培養液中に血清の添加が必須であるが、血清は種々の複雑な因子を含む上に化学的組成も不均一であるため、培養細胞自身の産生物質や、細胞のホルモン・薬剤に対する反応などを解析する上で障害となっている。それゆえに、従来より無血清培地で動物細胞を培養しようという努力がなされてきたが、ホルモンなどの蛋白質を全く添加せずに、動物細胞を長期間培養したという報告は少ない。一方、培養癌細胞では増殖に対する血清要求度が低いこと、また、ある種の癌細胞が自ら成長因子を産生しているという最近の報告から、ある種の癌細胞では無血清培地でも継代増殖可能であろうと考えられる。

本研究では、ヒトメラノーマ培養細胞 MEC を用いて、0.5%牛血清アルブミン (BSA) を含む BM (2mM L-グルタミンおよび重曹を含むイーグルの MEM 培地) にて、培地交換のみで約 1 カ月間培養馴化することにより、同培地で浮遊状態で増殖する細胞 BSA-MEC を樹立した。さらに、この細胞を BSA も含まない BM 中で約 2 カ月間培養馴化することにより、無蛋白の BM でも継代増殖可能な sf-MEC を樹立した。sf-MEC を RPMI 1640 培地で培養すると、10% 仔牛血清添加 BM 中で増殖する親細胞 MEC に匹敵する、1 週間で 5~6.5 倍となる増殖を示し、その細胞飽和密度は親細胞の 1.5 倍に達した。これらの細胞はすでに 30 代 8 カ月以上の長期にわたり、浮遊状態で旺盛な増殖を続けている。

BSA-MEC および sf-MEC の生物学的特性を MEC と比較すると、両無血清培養細胞は MEC と同様に、そのホモジネート中に、メラニン産生に特異的に関与するチロジナーゼの活性を有しており、細胞質中には電子顕微鏡的にメラノゾームが観察された。さらに、ヌードマウスでの造腫瘍性を検索すると、 10^6 個の細胞を接種した場合には、両無血清培養細胞とも MEC と同様に腫瘍を形成したが、 10^5

個の細胞を接種した場合には、MECおよびBSA-MECが腫瘍を形成したのに対し、sf-MECは腫瘍を形成しなかった。ゆえに、sf-MECの造腫瘍性が低下していることが明らかとなった。sf-MECにより形成された腫瘍では、MEC、BSA-MECによる腫瘍に比較して、少数のより未熟なメラノゾームが認められたのに対して、レトロウイルスの発現が著明であった。また、両無血清培養細胞による腫瘍からは、再び無血清のまま細胞を培養することができた。

これらの樹立された無血清培養細胞BSA-MECおよびsf-MECが、自ら増殖促進因子を産生しているか否かを、その培養上清につき、DNA合成および軟寒天培地中でのコロニー形成を指標として検索した。BSA-MECの対数増殖期にあたる培養4日目の上清(BSA-CM)を、24時間BMのみで培養した標的細胞の培地に添加すると、初代培養正常細胞である、ヒト線維芽細胞pHF、ラット胎児線維芽細胞pRaEF、株化癌細胞である、ヒト子宮頸癌由来のHeLa、親細胞MEC、およびBSA-MEC自身に対するDNA合成促進活性が認められた。さらに、軟寒天培地中に標的細胞を接種し、同時にBSA-CMを添加すると、Hepd、MECおよびBSA-MEC自身に対する軟寒天培地中でのコロニー形成促進活性が認められた。しかし、pHF、pRaEFにコロニーを形成させることはできなかった。BSA-CMを経時的に採取して、DNA合成促進活性ならびに軟寒天培地中でのコロニー形成促進活性の経時変化を調べると、両活性はBSA-MECの細胞増殖と共に培養7日目まで、同様のパターンをとりながら徐々に上昇した。sf-MECの培養上清(sf-CM)についても同様に検索を行うと、培養1日目に採取したsf-CM中には、pHF、MECさらにsf-MEC自身に対するDNA合成促進活性が認められた。しかし、軟寒天培地中でのコロニー形成促進活性の存在は明らかにされなかった。sf-CM中のDNA合成促進活性の経時変化を、pHFを標的細胞として検索すると、BSA-MECの場合とは異なり、1日目に最大値を示し、以後減少した。培養2日目に採取したsf-CMを透析膜で透析すると、pHFに対するDNA合成促進活性が上昇することより2日目以降のsf-CM中に、pHFに対するDNA合成抑制因子が存在していることが示唆された。しかし、sf-MEC自身のDNA合成はこの因子により影響されなかった。

以上の結果より、メラニン産生能および造腫瘍性を保持しながら、無血清培地で長期間継代増殖可能なBSA-MECおよびsf-MECは、その培養上清中に増殖促進因子を産生しており、自らもまたその因子に対する感受性を有していることが明らかとなった。このことから、無血清培養細胞の細胞増殖には、自らの産生した増殖促進因子によるauto-stimulationが関与していることが示唆された。

論文の審査結果の要旨

本研究は、ヒトメラノーマ細胞を用いて無血清培地で増殖可能な細胞系を樹立することにより、培養癌細胞の増殖機構の一端を明らかにしようとしたものである。本研究により樹立された細胞は、メラニン産生能および造腫瘍性を保持しながら長期間無血清培地で継代増殖可能であり、培養上清中に増殖促進因子を産生していることが明らかにされた。さらに、この細胞自身もその因子に対する感受性を有していることから、無血清培地での細胞増殖には自らの産生した増殖促進因子によるauto-st-

imulation が関与していることが示唆された。以上の結果は、癌細胞の増殖機構に対して重要な知見を与えるものであり、樹立されたこの細胞は血清の混入のない単純な系で細胞の特性を解析するための優れた実験系を供するものである。したがって、本論文は歯学博士の学位に十分値するものと認める。