

Title	ウシ胎仔軟骨由来抗腫瘍因子に関する研究
Author(s)	榎本, 資己
Citation	大阪大学, 1987, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/35337">https://hdl.handle.net/11094/35337</a>
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、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

【4】

氏名・(本籍)	榎 本 資 己
学位の種類	歯 学 博 士
学位記番号	第 7 6 8 9 号
学位授与の日付	昭 和 62 年 3 月 26 日
学位授与の要件	歯学研究科歯学基礎系専攻 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	ウシ胎仔軟骨由来抗腫瘍因子に関する研究
論文審査委員	(主査) 教 授 鈴木不二男
	(副査) 教 授 浜田 茂幸    助教授 高野 吉郎    助教授 白砂 兼光

論 文 内 容 の 要 旨

固形腫瘍の増殖には血管造成が不可欠である。すなわち、腫瘍は発生初期には無血管の状態でゆっくりと増殖するが、直径2-3mmに達すると毛細血管内皮細胞の増殖を伴う血管の導入が生じ、この血管を介した栄養の供給により急激に増大する。

一方、軟骨は血管が乏しい組織であり、また、軟骨への悪性腫瘍の転移が稀であることから、軟骨には腫瘍の血管新生を阻止することにより、腫瘍の増殖を阻害する因子が存在することが示唆されていたが、その実体は明らかではなかった。

本研究では、ウシ胎仔軟骨より、固形腫瘍の増殖を阻害する因子；Cartilage-derived Anti-Tumor Factor (CATF) を部分精製し、その作用機作について検討した。

ウシ胎仔より軟骨を採取、細断後、1Mグアニジン塩酸溶液にて抽出した。この抽出液をアセトン分画(45-65%)した後、限外濾過により、分子量20Kから300Kの画分を得、これをCATF<sub>20-300K</sub>とした。CATF<sub>20-300K</sub>をザルコーマ180及びB16メラノーマ担癌マウスの腫瘍周囲皮下に注射すると、著明な腫瘍の増殖阻害が認められた。これに対して、腹水型の腫瘍に対するCATF<sub>20-300K</sub>の影響は認められなかった。

そこで、CATFの抗腫瘍活性の作用機作を解明するために、各種培養細胞の増殖に対するCATF<sub>20-300K</sub>の影響を検討した。

ザルコーマ180細胞、マウス線維芽細胞であるL細胞及びウシ肺動脈血管内皮細胞(CPAE細胞)をそれぞれ5、10及び20%ウシ胎仔血清(FCS)を含むEagleのMEM培地で培養した。各細胞を培養プレートに播種し、翌日よりCATF<sub>20-300K</sub>を200μg/mlの濃度で添加し、その後、2日毎に培地交換

を行い、同時にCATF<sub>20-300K</sub>を再添加し、経日的に細胞数を算定した。その結果、CATF<sub>20-300K</sub>はザルコーマ180細胞及びL細胞の増殖に全く影響を与えないが、CPAE細胞の増殖を著明に阻害することが明らかとなった。さらに、CATF<sub>20-300K</sub>は1.5 $\mu$ g蛋白/mlの濃度より、濃度依存性にCPAE細胞のDNA合成を阻害し、15 $\mu$ gの蛋白/mlの濃度ではDNA合成を50%阻害した。

次に、CATFの血管新生に対する影響を検討した。すなわち、CATFを添加したガラスフィルターにB16メラノーマの腫瘍片(約1mm<sup>2</sup>大)を置き、孵卵10日目のニワトリ受精卵の漿尿膜(CAM)に腫瘍がCAMに接するようにフィルターを移植した。この卵を5日間インキュベートした後、フィルター直下への血管新生を観察したところ(以下CAM assayと略す)、CATF<sub>20-300K</sub>50 $\mu$ g蛋白添加で血管の新生が阻害され、同時にフィルター上の腫瘍の増殖も阻害された。

以上の結果より、CATFはCPAE細胞の増殖を特異的に阻害し、また、腫瘍による血管新生を阻害することが明らかとなったので、CPAE細胞に対する増殖阻害活性を指標として、CATFの物理化学的性質の検討を行った。その結果、CATFは還元処理及びプロテアーゼ処理によりCPAE細胞増殖阻害活性が失活する熱安定な蛋白であることが判明した。

次に、CPAE細胞に対する増殖阻害活性を指標として、CATF<sub>20-300K</sub>を限外濾過によりさらに、精製した。CPAE細胞増殖阻害活性は分子量100-300K画分にのみ認められ、20-50K及び50-100K画分では認められなかった。また、100-300K画分のみが、抗腫瘍活性および血管新生阻害活性を保持していた。そこで、この分子量100-300K画分(CATF<sub>100-300K</sub>)を陰イオン交換クロマトグラフィーによりさらに精製した。10mMリン酸緩衝液(pH8.0)で平衡化したDEAE-Sepharose CL-6BカラムにCATF<sub>100-300K</sub>を添加し、非吸着画分を溶出後、0-0.35M NaCl直線濃度勾配及び0.6M NaClを含む同緩衝液にて吸着画分を溶出し、各フラクションのCPAE細胞のDNA合成阻害活性を測定したところ、0.3M NaCl付近に全活性の82%が回収された。この画分(DEAE-CATF)は0.15 $\mu$ g蛋白/mlの濃度でCPAE細胞のDNA合成を50%阻害し、その比活性はCATF<sub>100-300K</sub>の73倍に上昇した。さらに、DEAE-CATFはB16メラノーマ担癌マウスに60 $\mu$ g蛋白投与で強い抗腫瘍活性を示し、CAM assayにおいても10 $\mu$ g蛋白添加で血管新生を完全に阻止した。上記のごとく、CATFを精製した結果、CPAE細胞増殖阻害活性、抗腫瘍活性及び血管新生阻害活性がco-purifyされ、これら3者の活性に相関のあることが明らかとなった。

以上の結果より、CATFは酸性蛋白であること、また、血管内皮細胞の増殖を抑制し、腫瘍による血管新生を阻害することにより腫瘍の増殖を阻止することが示唆された。

## 論文の審査結果の要旨

軟骨には通常脈管系の導入が起こらない上に、悪性腫瘍の転移も稀であることから、抗腫瘍血管造成因子が存在すると示唆されていたが、その実体は未だに解明されていない。

榎本君は、ウシ胎仔軟骨よりマウス・B16メラノーマなどの増殖を阻害する因子(Cartilage-derived

Anti-Tumor Factor ; C A T F) の部分精製を行った。さらに, C A T F が血管内皮細胞の増殖を特異的に阻害すると共に, 鶏卵漿尿膜上に移植した B16メラノーマの増殖及び血管新生をも阻害することを明らかにした。しかし, C A T F は *in vitro* での腫瘍細胞の増殖は阻害しなかったので, C A T F の抗腫瘍作用は腫瘍細胞に対する直接的なものではなく, 血管内皮細胞の増殖を阻害することに基づくものであることを示した。

以上のように, 榎本君の論文は軟骨に存在する抗腫瘍因子の存在を明確化し, C A T F の臨床応用のための基礎を提供したばかりでなく, 内軟骨性骨化や創傷治癒の際の血管内皮細胞の役割を理解するためにも重要な手掛かりを与えたものであり, 歯学博士の学位請求に十分値するものと認める。