



|              |   |
|--------------|---|
| Title        | 軟骨培養細胞による血管新生阻害因子の産生とその産生細胞株の樹立   |
| Author(s)    | 白井, 栄二  |
| Citation     | 大阪大学, 1987, 博士論文  |
| Version Type |   |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/35722">https://hdl.handle.net/11094/35722</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。 |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

## 【1】

|         |                                      |
|---------|--------------------------------------|
| 氏名・(本籍) | 白 井 榮 二                              |
| 学位の種類   | 歯 学 博 士                              |
| 学位記番号   | 第 7773 号                             |
| 学位授与の日付 | 昭和62年4月9日                            |
| 学位授与の要件 | 学位規則第5条第2項該当                         |
| 学位論文題目  | 軟骨培養細胞による血管新生阻害因子の産生とその産生細胞株の樹立      |
| 論文審査委員  | (主査)                                 |
|         | 教授 鈴木不二男                             |
|         | (副査)                                 |
|         | 教授 塚 章 教授 岡田 宏 助教授 斉藤 喜八<br>講師 浦出 雅裕 |

## 論 文 内 容 の 要 旨

軟骨には通常血管がみられず、また、軟骨組織は血管の侵入に対し抵抗性を示すことが知られている。この抵抗性は軟骨をグアニジン塩酸で抽出すると消失する。これらの事実は軟骨中に血管の新生を阻害する因子が含まれていることを示唆している。しかし、今日までに同因子を軟骨組織より抽出したという報告はみられるものの、未だ完全精製には至っていない。また、軟骨細胞自身が血管新生阻害因子を産生しているか否かも明らかではない。一方、種々の培養細胞のconditioned medium (CM) を材料源として用い、生理活性物質の精製に成功したという報告は数多くみられる。従って、血管新生阻害因子を産生する細胞株を樹立することは極めて意義深い。そこで、本研究では培養軟骨細胞が血管新生阻害因子を産生し、培養液中に分泌していることを明らかにするとともに、本因子を産生する軟骨由来の培養細胞株の樹立を試みた。

まず、ウサギ肋軟骨片とウシ肺動脈血管内皮細胞 (CPAE細胞) のcocultureを試み、CPAE細胞のDNA合成に対する影響を検討したところ、ウサギ肋軟骨片とのcocultureによりCPAE細胞のDNA合成は著しく阻害された。このことは、肋軟骨組織が血管内皮細胞増殖阻害因子をin vitroで産生することを示唆している。そこで次に、CPAE細胞の増殖及びDNA合成に対するウサギ肋軟骨細胞のCMの影響を検討したところ、ウサギ肋軟骨細胞のCMはCPAE細胞の増殖及びDNA合成を著明に阻害した。ところが、同CMはB16メラノーマ細胞、Swiss 3T3細胞及びL1210細胞のDNA合成には全く影響を与えなかった。すなわち、ウサギ肋軟骨細胞のCMはCPAE細胞の増殖を特異的に阻害した。さらに、B16メラノーマ固形腫瘍による腫瘍血管の新生に対するウサギ肋軟骨細胞のCMの影響を鶏卵漿尿膜 (CAM) を用いて検討した。その結果、ウサギ肋軟骨細胞のCMは、腫瘍血管の新

生を著しく阻害すると共に、B16メラノーマ固形腫瘍の増殖も阻害した。また、ウサギ肋軟骨細胞のCMの血管内皮細胞増殖阻害活性は熱に安定であったが、プロテアーゼ処置により失活した。以上の事実はウサギ肋軟骨細胞が培養液中に血管新生阻害因子を産生することを示している。

そこで次に、本因子を産生する軟骨培養細胞株の樹立を試みた。マウス肋軟骨成長軟骨細胞の2代目の細胞を長期に培養し、その細胞層より倍加時間36時間で活発に増殖する細胞集団を分離し、株化することに成功した。以下、本細胞をMGC細胞と略す。MGC細胞はconfluentに達すると、軟骨細胞に特徴的なポリゴナルな形態を示した。ついで、軟骨細胞の分化機能の指標について検討した結果、MGC細胞はグリコサミノグリカンを活発に合成し、また、細胞内cyclic AMPレベルはウサギ肋軟骨初代培養細胞と同様、副甲状腺ホルモン添加により2分後に著明に上昇した。さらに、MGC細胞はマウス肋軟骨成長軟骨細胞と同程度の高いアルカリホスファターゼ活性を示した。以上の事実によりMGC細胞は成長軟骨細胞由来の細胞株であることが判明した。

次に、MGC細胞が血管新生阻害因子を産生しているか否かを検討した。CPAE細胞の増殖及びDNA合成に対するMGC細胞のCMの影響を検討したところ、MGC細胞のCMはCPAE細胞の増殖及びDNA合成を著明に阻害した。ところが、同CMはB16メラノーマ細胞、NRK細胞及び鶏胚線維芽細胞のDNA合成には全く影響を与えなかった。すなわち、MGC細胞のCMはウサギ肋軟骨細胞のCMと同様、CPAE細胞の増殖を特異的に阻害した。ついで、B16メラノーマによる腫瘍血管の新生に対するMGC細胞のCMの影響をCAMを用いて検討した。その結果、MGC細胞のCMはB16メラノーマによる腫瘍血管の新生を著しく阻害すると共に、B16メラノーマ固形腫瘍の増殖も阻害した。また、MGC細胞のCMの血管内皮細胞増殖阻害活性はウサギ肋軟骨細胞のCMと同様、熱には安定であったが、プロテアーゼ処置により失活した。すなわち、MGC細胞はウサギ肋軟骨細胞と同様、培養液中に血管新生阻害因子を分泌することが明らかとなった。

以上、本研究により軟骨培養細胞が血管新生阻害因子を産生することが明らかとなり、また、同因子を産生する培養細胞株を樹立することに成功した。

## 論文の審査結果の要旨

軟骨には通常血管がみられず、また、血管の侵入に対して抵抗性を示すことが知られている。したがって、軟骨より血管新生阻害因子の抽出が試みられてきたが、この因子は未だに解明されていない。

白井君はまず、幼若ウサギ肋軟骨初代培養細胞自身が血管新生阻害因子を産生し、これを培養液中に分泌することを証明した。次に、マウス肋軟骨成長軟骨細胞の2代目の細胞から軟骨細胞としての分化機能を十分保持しつつ活発に増殖しうる細胞株の樹立に成功し、これをMGC細胞と命名した。さらに、MGC細胞のconditioned mediumがin vitroにおける血管内皮細胞の増殖を強く阻害するとともに鶏卵漿尿膜上に移植したB16メラノーマの増殖および血管新生をも著明に阻害することを明らかにした。

以上のように血管新生阻害因子の産生能を保持した軟骨由来細胞株を初めて樹立することに成功した

白井君の業績は今後、基礎的な研究はもとより、抗腫瘍作用を発現しうる血管新生阻害因子の大量精製にも大きく貢献しうる価値の高い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。