



Title	癌細胞の浸潤実験系の確立と浸潤抑制因子の検索
Author(s)	新貝, 清子
Citation	大阪大学, 1988, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/36490
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名・(本籍)	新	貝	清	子
学位の種類	薬	学	博	士
学位記番号	第	8330	号	
学位授与の日付	昭和63年9月13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	癌細胞の浸潤実験系の確立と浸潤抑制因子の検索			
論文審査委員	(主査)			
	教授	岩田平太郎		
	(副査)			
	教授	近藤	雅臣	教授 三村 務 教授 三浦 喜温

論文内容の要旨

転移は原発巣からの癌細胞の遊離、近傍正常組織への浸潤、遠隔臓器への定着、増殖など複雑な段階を経て成立する。転移の初期の段階である浸潤を抑制することが出来れば、ひいては転移の阻止につながるものと考えられる。本研究の目的は浸潤に関与する因子を検索しその抑制を図ることである。しかし従来、浸潤の程度は形態学的に評価されてきたにすぎない。浸潤に関与する因子、並びにこれを抑制する因子を検索するためには、浸潤を定量的に評価できる簡便な実験方法が必要である。そこで、in vitro で癌細胞の浸潤を定量的に評価できるモデル系を開発した。

ラット腹腔に移植されたラット腹水肝癌細胞(AH細胞)は、腸間膜に浸潤し、更に血管壁を通過して血液中に遊出する。AH細胞が漿膜細胞層下に侵入し腸間膜内で増殖する過程は、腹腔内に移植されたこの癌細胞の周辺組織への浸潤を表している。AH細胞が腸間膜に浸潤するためには、まず漿膜細胞に付着しその下に潜り込むことが必要である。

そこで、この過程をin vitro で観察するために、腸間膜から漿膜細胞を分離し培養した。正常ラットの腸間膜をトリプシンで消化して得られた漿膜細胞を培養すると、それらはシャーレ上で単層、敷石状に広がって、増殖した。そこで、シャーレ上をほぐすまで増殖した培養漿膜細胞の細胞層上にAH細胞を重層培養した。重層後6-7時間でAH細胞は漿膜細胞層下に潜り込んで増殖し始め、約、22時間の世代時間を経てコロニーを形成する。侵入の過程を時間を追って観察すると癌細胞は1個ずつ潜り込んで増殖することが確かめられた。即ちコロニーの1つずつは潜り込んだAH細胞1個ずつから形成されたことがわかった。したがって、コロニー数は潜り込んだAH細胞数に対応する。

このコロニー(浸潤性コロニーと名付ける)の数を計測し、AH細胞集団の浸潤能力に対応させた。

このような方法で測定すると腹腔で継代しているAH細胞のin vitro浸潤能は 104 ± 53 colonies/cm²であった。このAH細胞を培養し、クローニングしin vitroの浸潤能が約10倍高い、高浸潤性のクローン(CI-30)を得た。CI-30は腹腔に移植すると、腹膜に強く浸潤し、腹膜内に多くの浸潤性腫瘤を形成すると共に、傍胸腺、縦隔洞リンパ節にも転移して腫瘤を形成する。腹腔で継代しているin vitro浸潤能の低いAH細胞を移植すると浸潤の程度は少なく、腹膜内の浸潤性腫瘤の形成も見られない。これらは、in vitroの浸潤能が、in vivoでの浸潤の程度をよく反映していて、筆者の開発したin vitroでの浸潤能測定系の有用性を示唆するものと思われる。

このin vitroの浸潤モデル系を用いてAH細胞のin vitro及びin vivoの浸潤を強く抑制する物質をラット正常肝より抽出した。即ちラット正常肝を酸/エタノールで抽出後、抽出液にエーテル/エタノールを加えて得た沈澱を酢酸で可溶化し、分子量3500-10⁴の分画を得た。この分画(0.8-4 µg/ml)はin vitroでの浸潤能を60-90%阻害した。阻害活性は酸性(塩酸0.2N), 100°C, 20分の処理、又は蛋白分解酵素による処理で失活した。

癌細胞を前もってこの抑制因子(Invasion Inhibiting Factor: IIF)で処理したのち、IIFを除き漿膜細胞層に重層しても浸潤は同程度に阻害された。このことからIIFは癌細胞に直接結合して作用したものと考える。更に癌細胞から分離した細胞膜と、IIFをincubateするとIIFは細胞膜に結合することがわかった。IIFは浮遊培養での増殖を全く阻害しなかった。又癌細胞が漿膜細胞層下に侵入した後の増殖(コロニー形成)をも阻害しなかった。これらのことからIIFはAH細胞の増殖を阻害せず侵入の過程を選択的に阻害することが予想された。

AH細胞を重層して6時間後、漿膜細胞層下に侵入したAH細胞数(未だコロニー形成に至らない細胞数)を計測すると、IIFはAH細胞の侵入を阻害することが明らかになった。又、侵入に先行するAH細胞の偽足形成を伴う細胞運動はIIFの存在によって強く阻害されていることがわかった。 10^{-7} M $\sim 10^{-8}$ Mのコルヒチンや0.1 ~ 1 µg/mlサイトカラシンBはいずれもAH細胞のin vitro浸潤を阻害した。

上記のように、IIFがin vitroでのAH細胞の浸潤を阻害することがわかったが、in vivoでの浸潤に対しても有効であるかどうかを調べた。高浸潤性細胞(CI-30)を腹腔移植するときに酸/エタノール抽出液または部分精製IIFを同時に注入すると、11例中8例に於いて浸潤性腫瘤の形成やリンパ節への転移を全く認めなかった。浸潤性腫瘤の形成をみた残りの3例の浸潤性腫瘤の平均重量は0.18g/ratで、IIFを注射しなかった対照群(3.5g/rat)に比べ、約1/10以下に抑制されていた。

筆者の開発した浸潤実験系は操作が簡単で、この系によって測定されたin vitro浸潤能はin vivoにおけるこの癌細胞の浸潤の程度をよく反映している。更に、浸潤の程度を数量的に表現出来るので、浸潤に関与する因子の検索、並びに浸潤を抑制する因子を生化学的に追求するのに適している。

IIFはin vitroばかりでなく、AH細胞のin vivoに於ける浸潤をも抑制しうることがわかった。浸潤を阻止する物質が生体内に存在することは極めて興味深い。我々は別に、IIFと同様の活性がヒト肝にも存在することを見いだしているが、この様な活性が他の臓器にも存在するかどうか、又癌転移の臓器特異性に関連するのかどうかは今後の研究課題である。この因子の完全精製を行い、生化学的、物理

化学的性質を調べるのが急務ではあるが、IIF は新しい抗浸潤、転移物質として価値があるものと思われる。又、筆者の開発した培養実験系は、他の抗浸潤、転移物質をスクリーニングするのにも適切なモデル系であると考ええる。

論文の審査結果の要旨

本論文は *in vitro* で癌細胞の浸潤を定量的に評価できるモデル系を開発しこの系を用いて浸潤を抑制する因子を検索発見したもので薬学博士の称号を授与するに値するものである。