

Title	Establishment of an osteoinductive murine osteosarcoma clonal cell line showing osteoblastic phenotypic traits
Author(s)	津田, 隆之
Citation	大阪大学, 1990, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/37151
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"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名・(本籍)	つ だ たか ゆき 津 田 隆 之
学位の種類	医 学 博 士
学位記番号	第 9 1 1 8 号
学位授与の日付	平成 2 年 3 月 24 日
学位授与の要件	医学研究科外科系専攻 学位規則第 5 条第 1 項該当
学位論文題目	Establishment of an osteoinductive murine osteosarcoma clonal cell line showing osteoblastic phenotypic traits (骨形成因子産生型マウス骨肉腫クローン細胞株の樹立)
論文審査委員	(主査) 小野 啓郎 教授 (副査) 坂本 幸哉 教授 岡田伸太郎 教授

論 文 内 容 の 要 旨

〔 目 的 〕

骨形成因子は、未分化間葉系細胞を軟骨細胞に分化誘導する生理活性物質と推定されており、骨芽細胞が産生する物質と考えられている。しかし *in vitro* の環境で骨形成因子を産生する培養細胞株は未だ報告されていない。Dunn 骨肉腫は *in vivo* において骨形成因子を産生しているが、単層培養下ではこの活性を失うとされてきた。このような Dunn 骨肉腫由来の BFO 細胞株は、1975 年に樹立され当教室で維持されてきた。この細胞は heterogeneous であったため、今回 BFO 細胞株を限界希釈法によりクローン化し、骨芽細胞の表現型を最も強く示し、骨形成因子の活性を有し、かつ *in vivo* で腫瘍形成能を持つクローン細胞株を選択し確立することを試みた。

〔 方 法 〕

BFO 細胞を 10% FBS 添加イーグル MEM 培地で培養した。confluent に達した細胞を 0.25% トリプシンにて処理して細胞浮遊液とし、限界希釈法によるクローン培養をおこなった。得られたクローンについて骨形成因子の活性、アルカリホスファターゼ(以下 Al-P)活性、PTH に対する反応性、および腫瘍形成能について検定し選別した。

① 骨形成因子の活性 3×10^7 個のクローン化した細胞を、凍結解凍にて devitalize した後遠沈ペレットとし、凍結乾燥後 ddY マウス背部筋膜下に移植した。3 週後移植片を回収し、軟 X 線像および組織像にて骨形成の有無を検索した。

② Al-P 活性 confluent に達した細胞を homogenize し、Kind-King 法にて測定し

た。基質液 (10mM phenyl phosphate) にサンプルを添加, 37°Cにて15分間反応させ, 1 μ M の phenol が生成される A1-P 活性を 1 unit とした。Lowry 法にてタンパク量を測定し, 単位タンパク量あたりの比活性を算出した。

③ PTH に対する反応性の検定 ヒト合成 PTH (1-34) 20nM を添加し 37°Cにて反応させた。5分後直ちに氷冷し, 6%トリクロル酢酸で細胞内 cAMP を抽出した。抽出液中の cAMP 量を RIA法で求め, PTH無添加の cAMP量に対する比率を求めた。

④ 腫瘍形成能 1×10^7 個の細胞を C3H マウス皮下に接種した。4週後に腫瘍形成の有無および頻度を判定した。各実験の control の細胞として, 線維芽細胞由来の 3T3 細胞株と, 骨芽細胞由来の MC3T3-E1 細胞株を用いた。

〔成績〕

① 骨形成因子の活性 えられた 7 つのクローン細胞は骨形成因子の活性を有していた。3T3 細胞と MC3T3-E1 細胞は, 骨形成因子の活性を認めなかった。

② A1-P 活性 クローン No. 1 を除く 6 つのクローン化した細胞で, 高い A1-P 活性を認めた。

③ PTH に対する反応性 クローン No. 1, No. 5, No. 6 で PTH に対して著しく反応し, cAMP 量が約 25 倍に上昇した。他のクローン化した細胞では反応が弱く, 3T3 細胞, MC3T3-E1 細胞では PTH に対して反応しなかった。

④ 腫瘍形成能 クローン No. 2, No. 3 を除く 5 つのクローンで腫瘍形成がみられた。初回接種で腫瘍形成のみられたクローンのうち継代可能な腫瘍は, クローン No. 1, No. 4, No. 6 であった。

7 つの BFO クローン細胞のなかで, 骨形成因子の活性, A1-P 活性, PTH に対する高い反応性, 継代可能な腫瘍形成能をもつクローンとして No. 6 を選択した (BFO-6)。

BFO-6 は, 単層培養下で polygonal な形態を呈する。増殖期の倍加時間は 17.2 時間であった。devitalize した BFO-6 細胞をマウス背部筋膜下に移植後 3 週にて, 異所性骨形成がみられた。in vivo で形成された腫瘍は, 腫瘍性類骨組織が観察され骨肉腫の特徴を有していた。染色体分析では, 核型は acrocentric type であり, 染色体数は 59 から 67 の間に分布していた。

〔総括〕

BFO細胞をクローン化し, 骨芽細胞の表現型を最も強く示すクローン株 BFO-6 を確立した。BFO-6 は骨形成因子の活性, 高い A1-P 活性, PTH に対する高い反応性を有している。また in vivo において腫瘍形成能があり, 継代移植可能である。この腫瘍は骨肉腫の組織像を示した。この細胞株 BFO-6 は, in vitro における骨形成因子の実験系として将来有用になるものと考えられる。

論文の審査結果の要旨

本研究は、マウス骨肉腫由来細胞をクローン培養し、骨形成因子を産生する培養細胞株を初めて樹立したものである。これまで単層培養下で骨形成因子を産生する培養細胞株は報告されておらずその意味で意義深い。この細胞株は、高いアルカリホスファターゼ活性およびPTH に対する高い反応性を有しており、骨芽細胞の特性を示した。

以上のような特性をもつ培養細胞株は、骨形成因子の研究と臨床応用に重要である。

従って本研究は、博士論文に値するものと考える。