

Title	子宮内膜癌細胞の増殖におけるEGFとIGF-Iの役割
Author(s)	前山, 昌隆
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/37651
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

氏 名	前 山 昌 隆
博士の専攻分野 の 名 称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 0 0 2 4 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 4 年 2 月 4 日
学 位 授 与 の 要 件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学 位 論 文 名	子 宮 内 膜 癌 細 胞 の 増 殖 に お け る EGF と IGF-I の 役 割
論 文 審 査 委 員	(主 査) 教 授 北 村 幸 彦 (副 査) 教 授 西 宗 義 武 教 授 谷 澤 修

論 文 内 容 の 要 旨

〔 目 的 〕

子宮内膜癌の増殖における増殖因子の役割については不明な点も多い。本研究においては増殖因子による子宮内膜癌の増殖制御の一端を明らかにするため、ヒト子宮内膜癌細胞 IK-90 を用いて、上皮成長因子 (EGF) ならびにインスリン様成長因子 (IGF-I) 受容体の発現とこれら増殖因子が IK-90 cell の増殖に及ぼす影響について検討を行った。

〔 方法と成績 〕

〈細胞培養〉 高分化型ヒト子宮内膜癌樹立細胞株である IK-90 cell は、5%牛胎児血清 (FCS) を含む Eagle's MEM を培地として 5% CO₂, 37°C で培養を行い、0.25% トリプシンを用いて 2 週間毎に継代した。その後、charcoal 処理をした 1% FCS を含む Eagle's MEM を培地として細胞培養を行い、以下の各実験に供した。

〈EGF 受容体〉 Well あたり 5×10^5 個の IK-90 cell を plating させて 48 時間培養したのち、0.8 ng の ¹²⁵I-EGF と 2.5 から 640 ng の非標識 human EGF を添加し 25°C, 3 時間でインキュベートすると、その Scatchard プロットは直線を示し、IK-90 cell は単一の EGF 受容体 (Kd: 1.4 nM, 29,650 sites/cell) を保有することが明らかとなった。¹²⁵I-EGF を IK-90 cell の培地に添加し 37°C でインキュベートすると、添加 10 分後より pH 2.5 の NaCl で抽出される acid-sensitive binding (cell surface binding) は低下するのに対し、acid-resistant binding (intracellular binding) の増加が認められた。したがって、EGF による EGF 受容体の速やかな internalization が示唆された。

EGFを1日-5日間細胞に添加したのち¹²⁵I-EGFと4℃, 3時間でインキュベートしたが, cell surface bindingはEGF添加により有意に抑制された。このことから, EGFによるEGF受容体のdown-regulationが示唆された。

次にEGF受容体のNorthern blot analysisを行った。Cellular RNAを抽出後, EGF受容体のcDNAである³²P-pF7とhybridizeしオートラジオグラフィを行った結果, 10 Kbpと5.6 Kbpのサイズを有するEGF受容体mRNAが検出された。したがって, IK-90 cellはEGF受容体のみならずその遺伝子も発現することが明らかとなった。

<IGF-I受容体> IGF-I受容体測定においては, IGF-I結合蛋白の影響を除外するため浮遊細胞を用いて結合実験を行った。Tube当り 8×10^5 個のIK-90 cellを結合実験用メディウム1 mlに浮遊させ, 0.11 ngの¹²⁵I-IGF-Iと0.5 ngから500 ngの非標識IGF-Iを添加し, 16℃, 3時間でインキュベートすると, そのScatchardプロットは直線を示し, IK-90 cellは単一のIGF-I結合部位(Kd:0.7 nM, 15,000 sites/cell)を保有することが示された。IGF-I受容体はIGF-Iのみならず, 低親和性ながらIGF-IIやインスリンとも結合することが報告されている。したがって, IK-90 cellにおいて認められたIGF-I結合部位がIGF-I受容体であるか否かについて検討を加えた。種々の濃度の非標識IGF-I, IGF-II, インスリンならびにプロインスリンと¹²⁵I-IGF-I(200,000 cpm/tube)との結合実験を行った。¹²⁵I-IGF-I結合は3.7 ng/tubeの濃度のIGF-Iにより50%抑制されたが, IGF-IIによる50%の結合抑制には500 ng/tubeの濃度を必要とし, インスリンでは1,000 ng/tubeの高濃度でも50%抑制はみられなかった。プロインスリンは¹²⁵I-IGF-I結合をまったく抑制しなかった。これらの成績より, IK-90 cellのIGF-I結合部位はタイプI IGF受容体と考えられた。

DSSで¹²⁵I-IGF-IとIK-90 cellを架橋し, 還元下でSDS-PAGEを行い, オートラジオグラフィで解析した結果, 分子量135 Kの蛋白が標識された。このバンドは150 ng/tubeの非標識IGF-Iの添加によって完全に消失したが, より高濃度, 3,000 ng/tubeの非標識インスリンを添加しても完全には消失せず, ¹²⁵I-IGF-IとタイプI IGF受容体 α -subunitとの複合体と考えられた。

<細胞増殖> 1% FCS存在下, 対数増殖相にあるIK-90 cellの倍加時間は48時間であったが, EGF(10 pM-10 nM)の添加は濃度依存性にその倍加時間を延長させた。その結果, EGF 10 nMでは添加5日後に, 1 nMでは添加7日後に細胞増殖は有意に抑制された。IGF-I(10 pM-10 nM)の添加は, 100 pM以上の濃度において添加3日後よりIK-90 cellの増殖を有意に促進した。一方, 100 pM IGF-Iと1.25 μ g/ml IGF-I受容体抗体を同時添加すると, IGF-Iによる³H-thymidineの取り込みは有意に抑制された。

[総括]

子宮内膜癌樹立細胞IK-90は機能的なEGFとIGF-I受容体を保有するとともに, EGFは細胞増殖に対して抑制的に, IGF-Iは促進的に作用することを明らかにした。EGF受容体については, 内膜癌細胞におけるその遺伝子発現を初めて確認した。本研究において, 増殖因子であるEGFと

IGF-Iは子宮内膜癌細胞が保有するそれぞれの受容体を介して内膜癌の増殖を制御する可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

子宮内膜癌の増殖における増殖因子の役割については不明な点も多い。本研究においてはヒト子宮内膜癌樹立細胞IK-90を用いて、IK-90 cellが機能的なEGFとIGF-I受容体を保有するとともに、EGFは細胞増殖に対して抑制的に、IGF-Iは促進的に作用することを明らかにした。EGF受容体については内膜癌細胞におけるその遺伝子発現を初めて確認した。同時に増殖因子であるEGFとIGF-Iは子宮内膜癌細胞が保有するそれぞれの受容体を介して内膜癌の増殖を制御する可能性が示唆された。

これらは増殖因子による子宮内膜癌の増殖制御の一端を明らかにしたものであり、博士(医学)の学位を授与する価値があると思われる。