The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

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	大阪大学, 1992, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/37651
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

【63】

氏　　名	前山昌隆（まえやま まさたか）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学位記番号	第　10024　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％CO_2，37℃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，0.8ngの^{125}I-EGFと2.5から640ngの非標識human EGFを添加し25℃，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: 1.4nM, 29,650 sites/cell）を保有することが明らかとなった。^{125}I-EGFをIK-90 cellの培地に添加し37℃でインキュベートすると，添加10分後よりpH2.5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^{125}I－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^{32}P-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，0.11ngの^{125}I－IGF－Iと0.5 ngから500ng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：0.7nM，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^{125}I－IGF－I（200,000cpm/tube）との結合実験を行った。^{125}I－IGF－I結合は3.7ng/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500ng/tubeの濃度を必要とし，インスリンでは1,000ng/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^{125}I－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IIGF受容体と考えられた。

DSSで^{125}I－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135Kの蛋白が標識された。このバンドは150ng/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，3,000ng/tube.の非標識インスリンを添加しても完全には消失せず，^{125}I－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（10pM-10nM）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 10nM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（10pM-10nM)の添加は，100pM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，100pM IGF－Iと1.25 μg/ml IGF－I受容体抗体を同時添加すると，IGF－Iによる^{3}H-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。