



Title	ヒト口腔癌細胞が正常ヒト線維芽細胞のコラーゲン合成に及ぼす影響
Author(s)	中原, 寛和
Citation	大阪大学, 1993, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/38072
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 ^{なか}中 ^{はら}原 ^{ひろ}寛 ^{かず}和

博士の専攻分野の名称 博 士 (歯 学)

学 位 記 番 号 第 10696 号

学 位 授 与 年 月 日 平 成 5 年 3 月 25 日

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第4条第1項該当

歯学研究科歯学臨床系専攻

学 位 論 文 名 ヒト口腔癌細胞が正常ヒト線維芽細胞のコラーゲン合成に及ぼす影響

論 文 審 査 委 員 (主査)
教 授 松矢 篤三

(副査)
教 授 雪石 聰 講 師 久保 和子 講 師 開 祐司

論 文 内 容 の 要 旨

(研究目的)

生体内において癌細胞は結合組織に囲まれて存在しており、癌細胞の形質発現、細胞動態は癌細胞固有の性格のみならず、周囲の線維芽細胞や細胞外基質との相互作用により決定される。細胞外基質を構成するコラーゲンは組織構造を維持する最も主要な構成成分であり、合成と分解によりその構造が維持されている。癌細胞の組織浸潤に際してはこのコラーゲン構築を破壊する必要があることから、コラゲナーゼを含む細胞外基質分解酵素の癌浸潤における役割が注目されてきた。一方、癌細胞が周囲結合組織の基質産生細胞に及ぼす影響についてはいまだ明らかではない。

そこで本研究では癌細胞と周囲結合組織との相互作用の一端を明らかにする目的で、in vitro において口腔癌細胞が線維芽細胞のコラーゲン産生量に及ぼす影響について検討した。

(実験方法)

1. 培養細胞

実験にはヒト口底癌細胞 KB および当教室で樹立した唾液腺癌細胞 HSG, 腺様嚢胞癌細胞 ACCS, 舌扁平上皮癌細胞 SCCTF 及び SCCKN を用いた。またヒト口腔粘膜より正常線維芽細胞と正常粘膜上皮細胞を、顎下腺より正常顎下腺上皮細胞を分離した。

2. コラーゲン合成量測定法

線維芽細胞の単層培養上に各種細胞、培養上清または細胞抽出液と $[^3\text{H}]$ -プロリンを添加して24時間培養した後、トリクロロ酢酸 (TCA) にて回収した蛋白に細菌性コラゲナーゼを作用させ、分解されたコラーゲンの放射活性を測定した。

3. 細胞外質分解酵素活性の解析

培養上清を試料とし、プラスミノーゲンを含むゼラチンを基質としたザイモグラフィーを行なうことにより、細胞外基質分解酵素活性の解析を行った。

4. コラゲナーゼ活性測定法

蛍光 (FITC) 標識コラーゲンに各試料を37℃ 2時間反応させ、エタノールで抽出した分解産物の蛍光光度を測定比較することによりコラゲナーゼ活性を算出した。

5. HSG 細胞抽出液の回収

PBS で洗浄した HSG 細胞に 0.05 M トリス緩衝液 (pH 7.4) を加え、ラバーポリスマンで回収した細胞成分を超音波破碎した後、100,000× g 40 分の遠心を行い、その上清を試料とした。

6. HSG 細胞抽出液の部分精製

線維芽細胞のコラーゲン合成を指標とし、HSG 細胞抽出液をイオン交換クロマトグラフィー (DEAE-Sephacel) およびゲルクロマトグラフィー (Sephadex G-200) に展開することにより部分精製標品を得た。

(結 果)

1. 線維芽細胞の単層培養上にいずれの癌細胞を重ねても細胞数に依存してコラーゲン産生量は低下し、細胞数 2.5×10^5 個/ウェル播種時のコラーゲン産生量を線維芽細胞単独の場合と比較すると、ACCS では 18%, HSG では 23%, KB では 30%, SCCKN では 30%, SCCTF では 52% であった。一方、正常上皮細胞を重ねてもコラーゲン産生量に変化はみられなかった。

2. HSG を除く癌細胞ではコラゲナーゼと IV 型コラゲナーゼまたはプラスミノゲンアクチベーター (tPA, uPA) の産生がみられたが、HSG ではこれらの産生はみられなかった。

3. HSG の培養上清は線維芽細胞のグリコサミノグリカン (GAG) 合成をわずかに抑制するものの、DNA 合成、非コラーゲントタンパク合成、コラゲナーゼ産生に著明な影響を及ぼさなかった。

4. 線維芽細胞に対するコラーゲン合成抑制効果は HSG 培養上清のみならず、HSG 細胞成分中にもみられ、HSG 細胞より得られた細胞抽出液をイオン交換クロマトグラフィーおよびゲルクロマトグラフィーに展開することにより、分子量 150–200 kD 相当部にコラーゲン合成抑制の最大活性画分が溶出された。

(考 察)

線維芽細胞のコラーゲン産生抑制効果は正常上皮細胞にはみられず、検討した癌細胞に特徴的にみられた、さらにコラゲナーゼ産生のみられなかった唾液腺癌細胞 HSG は線維芽細胞の増殖、タンパク合成、コラゲナーゼ産生に影響を与えることなく、コラーゲン合成を抑制した。従来より、癌細胞は浸潤に際し癌細胞自身の産生する基質分解酵素により、あるいは線維芽細胞に対してコラゲナーゼ産生を促進させることにより、周囲の細胞外基質を破壊してよく考えられてきた。本研究ではそれらの機序に加え、癌細胞が線維芽細胞のコラーゲン産生を抑制することにより、癌細胞周囲のコラーゲン量を低下させ、疎になった間質への癌細胞浸潤を容易にしている可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究は癌細胞と周囲結合組織との相互作用を明らかにすることを目的として、in vitro において口腔癌細胞が線維芽細胞のコラーゲン産生に及ぼす影響を検討したものである。その結果、線維芽細胞に対するコラーゲン産生抑制作用は正常上皮細胞にはみられず癌細胞にのみ特徴的にみられた。さらに癌細胞のなかから細胞外基質分解酵素活性のみられなかった唾液腺癌細胞 HSG について検討を加えた結果、同細胞は線維芽細胞の増殖、タンパク合成、コラゲナーゼ産生に影響を与えることなく、コラーゲン合成を抑制することが明らかにされた。

本研究は癌細胞と線維芽細胞との細胞間相互作用の一端を明らかにするとともに、癌細胞の浸潤増殖機構に関して新たな手掛かりを与えるものであり、博士 (歯学) の学位を得る資格があるものと認める。