



Title	Oncogenic Signal-Induced Ability to Enter S Phase in The Absence of Anchorage Is The Mechanism for The Growth of Transformed NRK Cells in Soft Agar.
Author(s)	桑, 和彦
Citation	大阪大学, 1992, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/38151
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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 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

【 1 】

氏 名	桑 和 彦
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 0 3 6 1 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 4 年 6 月 30 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科生理系専攻
学 位 論 文 名	Oncogenic Signal-Induced Ability to Enter S Phase in The Absence of Anchorage Is The Mechanism for The Growth of Transformed NRK Cells in Soft Agar. (NRK 細胞の軟寒天中での足場非依存性増殖機構の解析 : 増殖因子による足場非依存性の S 期進行能の獲得)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 岡 山 博 人 (副査) 教 授 羽 倉 明 教 授 谷 口 維 紹

論 文 内 容 の 要 旨

[目 的]

正常細胞が癌化すると軟寒天中での増殖能を獲得する。この足場非依存性増殖は、癌細胞の重要な特徴の一つで、その研究は癌化そのものの解明にもつながっていくと考えられる。そこで、その解明を目的として、増殖因子により足場非依存性増殖能を獲得する培養細胞株である NRK-49F 細胞と、その変異株で増殖因子を添加しても足場非依存性増殖をしない細胞の 39-1、及び 39-3 を用い、足場非依存性増殖の解析を行なった。

[方法ならびに成績]

NRK 細胞は通常の培養条件下では、正常細胞の形態と性質を示すが、EGF (epidermal growth factor) と TGF- β (transforming growth factor- β) に曝露すると、足場非依存性増殖を行う。EGF は、単独では、通常の足場依存性の S 期進行を惹起するが、足場非依存性増殖は起こさない。我々の研究室に於いて単離された変異株細胞 39-1、39-3 は、EGF のシグナル伝達系路上に変異を持ち、その結果として、増殖因子や種々の癌遺伝子による足場非依存性増殖を行わない。また、これらの変異株の解析から、NRK では EGF のシグナルが、主な癌遺伝子 (fos, mos, ras, fms, fes, src など) のシグナルと同一の系路を共有することが示された。これらの細胞をメチルセルロースを含む培地中に浮遊させることで足場の無い状態とし、この状態での増殖因子に対する反応性と細胞周期を解析して、以下の結果を得た。

- 1) NRK では、メチルセルロース中でも軟寒天中と同様に EGF と TGF- β の存在下でのみコロニー形成が認められ、両変異株ではともにコロニー形成は認められなかった。このことより、NRK の足場非依存性増殖能の解析には軟寒天に代え、細胞の回収が容易で細胞周期の解析が可能なメチルセルロースを使用しうることが示された。
- 2) フローサイトメトリーによる解析により、NRK は、メチルセルロース中で足場を失うと細胞周期中の G1 期に停止することが示された。しかし EGF と TGF- β の存在下では増殖を継続した。足場非依存性増殖能を持たない両変異株は、ともに増殖因子の存在下でも速やかに G1 期に停止した。
- 3) G1 期に停止した NRK は EGF と TGF- β の添加で、足場の無い状態でも大多数が同調的に増殖を再開した。こ

の時のG1期からS期までの時間経過とS期に進行する細胞の割合は、足場のある状態の細胞が増殖因子に反応する時のものとほぼ一致した。EGF単独では、ほとんどの細胞はG1期に停止したままで、非同調的に一部の細胞が反応するだけであった。変異株は両者とも足場の無い状態ではEGFとTGF- β に反応することが出来ず、G1期に停止したままであった。このようにNRKは足場の無い状態でも増殖因子のシグナルに反応して、足場のある時とほぼ同様に増殖を再開する能力があることが示された。

- 4) G1期に停止したNRK細胞に足場のある状態とない状態で、EGFとTGF- β を添加した後のc-fosとc-myc遺伝子のmRNAの発現量を調べたところ、足場の無い状態でも、EGFは単独で、c-fos遺伝子の発現上昇を引き起こした。しかし、c-myc遺伝子の発現上昇は、TGF- β と同時添加したときにしか認められなかった。足場のある状態では、EGF単独で両遺伝子の発現上昇が認められた。

[総括]

NRK細胞は足場の無い状態では、G1期に停止するが、EGFとTGF- β の添加で、足場のある状態とほぼ同様の時間経過で大部分がS期へ進行した。この足場の無いときの反応は、足場非依存性増殖能を欠く2つの変異株でも認められなかった。このデータから、EGFとTGF- β によって引き起こされるシグナルは、NRKに足場が無い状態でもG1期からS期に進行できる能力を与え、これが、軟寒天中で足場非依存性増殖を行う主な機構であると考えられた。また、この機構は変異株の解析から、EGFが引き起こす通常の足場依存性増殖開始反応とは質的に異なる足場非依存性増殖に特異的なものであることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究は、正常ラット腎線維芽細胞であるNRK細胞とその癌化能欠損変異株を細胞周期制御の観点から解析し、これまで不明であった癌化に伴う足場非依存性増殖能の獲得機構に関して新しい仮説を提出した。

NRK細胞は、足場を失うと細胞周期のG1期で増殖を停止する。しかし、増殖因子EGF等による発癌刺激を与えると、足場の無い状態でも足場がある状態と変わりなくS期に進行することが判明した。更に、このS期進行は、癌化能のみが欠損した変異株や発癌活性の無い増殖因子では見られない。従って、癌化に伴う足場非依存性増殖は、過剰増殖刺激による足場依存性増殖機構の破綻ではなく、発癌刺激によって引き起こされる細胞の質的变化、即ち、足場非依存性にS期に進行できる能力の獲得によることが、本研究により示された。よって、本研究は博士(医学)の学位授与に値すると認める。