



Title	ヒト卵巣癌におけるTGF $\alpha$ / EGF受容体オートクリン機構の発現とその意義
Author(s)	森重, 健一郎
Citation	大阪大学, 1992, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/38276">https://hdl.handle.net/11094/38276</a>
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=" <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> ">大阪大学の博士論文について</a>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 森 重 健 一 郎

博士の専攻分野の名称 博 士 (医 学)

学 位 記 番 号 第 1 0 3 8 2 号

学 位 授 与 年 月 日 平 成 4 年 8 月 3 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 ヒト卵巣癌における TGF $\alpha$ ／EGF 受容体オートクリン機構の  
発現とその意義

論 文 審 査 委 員 (主査) 教 授 谷澤 修

(副査) 教 授 奥山 明彦 教 授 松沢 佑次

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### 【目 的】

多くの癌で種々のオートクリン機構の発現が報告されている。なかでも transforming growth factor (TGF)  $\alpha$  /epidermal growth factor (EGF) 受容体 (EGFR) オートクリン機構の発現は、乳癌、肺癌などの癌で証明されているが、その増殖における意義については必ずしも明かではない。

卵巣癌は、婦人科領域の癌の中でも最も予後不良な疾患の1つであり、その5年生存率は、20-30%である。その増殖機構の詳細は、まだ十分には解明されていない。本研究では、ヒト卵巣癌由来の cell-line (SHIN-3) および手術時得た卵巣癌組織での TGF $\alpha$ ／EGFR オートクリン機構の発現と、この機構の増殖における意義を検討した。

#### 【方法】

- 1)  $^{125}\text{I}$ -EGF の結合能測定 : SHIN-3 は、whole cell で、卵巣癌組織は精製した膜分画で、 $^{125}\text{I}$ -EGF を用いて binding assay を行った。
- 2) EGF,TGF $\alpha$ ,EGFR mRNA の分析 : SHIN-3 細胞、卵巣癌組織より Guanidine/CsCl 法により total RNA を isolate し、さらに poly (A) $^+$ RNA とし、2  $\mu\text{g}$  の RNA を 1% agarose gel で電気泳動後、Northern blot analysis を行った。probe は、 $^{32}\text{P}$  で label した EGFR,preTGF $\alpha$ ,preproEGF の cDNA を用いた。
- 3) 卵巣癌の primary culture : 卵巣癌組織を細切し、collagenase および DNase 処理後、nylon mesh を通して primary culture を行った。培養液は RPMI 1640 (10%FCS) を用いた。この primary culture 系を用いて以下の免疫組織化学染色および増殖実験を行った。
- 4) 免疫組織化学染色 : chamber-slide 上に癌細胞を disperse し、EGFR,TGF $\alpha$ ,EGF,cytokeratin,CA125 の monoclonal 抗体を用いて ABC 法で染色を行った。
- 5) SHIN-3 細胞培養液中の TGF $\alpha$  測定 : 無血清下で 24h 培養した SHIN-3 細胞の conditioned media を回収濃縮し、抗 TGF $\alpha$  抗体を用いた sandwich-type ELISA で TGF $\alpha$  量を測定した。
- 6)  $^3\text{H}$ -thymidine 取り込み能測定 : 手術時摘出組織の primary culture では、10% FCS 下で TGF $\alpha$  および抗 TGF $\alpha$ ,

抗 EGFR 抗体を投与し24h 培養の後,  $^3\text{H}$ -thymidine の取り込みを測定した。

7) SHIN-3 細胞による増殖実験 : SHIN-3 細胞は, 無血清培養系で TGF  $\alpha$  または抗 TGF  $\alpha$  抗体を添加し, 細胞数の変化を添加後, 2, 4, 6, 8日に観察した。

### 【結 果】

- 1) Scatchard analysis の結果, SHIN-3 細胞では  $K_d = 2.9 \times 10^{-10} \text{M}$  と affinity の高い単一の binding を認め, 受容体数は  $7.7 \times 10^4 / \text{cell}$  と豊富であった。卵巣癌組織の  $^{125}\text{I}$ -EGF binding assay では, EGFR の発現率は, 35例中20例, 57%であった。組織別にみると EGFR の発現率は, serous adenocarcinoma に最も高頻度で, 74%であった。EGFR を認めた卵巣癌組織での Scatchard analysis の結果は,  $K_d = 5.0 \pm 1.0 \times 10^{-10} \text{M}$ ,  $B_{\max} = 83.3 \pm 12.0 \text{ fmol/mg protein}$  であった。
- 2) Northern analysis で, SHIN-3 細胞と EGFR を発現する卵巣癌組織 (20例) では全例 TGF  $\alpha$  と EGFR の mRNA を認めたが, EGF の mRNA は認めなかった。
- 3) 免疫化学染色により, SHIN-3 細胞, EGFR を発現する卵巣癌細胞とともに TGF  $\alpha$  と EGFR 蛋白の発現を認め, EGF の発現はみられなかった。
- 4) SHIN-3 細胞の培養液中への TGF  $\alpha$  の分泌量は ELISA の結果  $1.12 \pm 0.14 \text{ ng}/10^7 \text{ cells}/24\text{h}$  であった。  
1) 2) 3) 4) より, SHIN-3 細胞および EGFR を発現する卵巣癌組織では, EGFR に作用する growth factor は EGF ではなく, TGF  $\alpha$  であることが示唆された。そこで TGF  $\alpha$  /EGFR オートクリン機構に対する agonist (TGF  $\alpha$ ) と antagonist (抗 TGF  $\alpha$ , 抗 EGFR 抗体) を用いて, このオートクリン機構の増殖における意義を検討した。
- 5) EGFR を発現する卵巣癌の primary culture では,  $10^{-10} \text{ M}$  の TGF  $\alpha$  は, control に比べて有意な増殖促進を示さなかったが,  $10^{-9}$ ,  $10^{-8} \text{ M}$  では, 有意に増殖を促進した。一方, 抗 TGF  $\alpha$ , 抗 EGFR 抗体を投与すると dose dependent に増殖が抑制された。EGFR (-) の細胞では, TGF  $\alpha$  や抗 TGF  $\alpha$ , 抗 EGFR 抗体によって  $^3\text{H}$ -thymidine の取り込みに変化はみられなかった。
- 6) SHIN-3 細胞では, TGF  $\alpha$  による有意な増殖促進効果はみられなかった。抗 TGF  $\alpha$  抗体による増殖抑制実験では,  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$  の抗体添加で有意に増殖を抑制し,  $5 \mu\text{g}/\text{ml}$  では更に強い抑制がみられた。またこの抗体による増殖抑制効果は過剰な TGF  $\alpha$  により restoreされることから, 特異的であると思われた。

### 【総 括】

ヒト卵巣癌では, TGF  $\alpha$  /EGF R オートクリン機構が半数以上の例で発現しており, それらの例では, 癌細胞の増殖に, この機構が重要な役割を果たしていることが示唆された。

### 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

本論文は, 婦人科領域の中で最も予後不良な疾患の1つである卵巣癌の増殖機構として, TGF  $\alpha$  と EGF 受容体によるオートクリン機構が発現していることを遺伝子レベル, 蛋白レベルで明らかにしている。更に, このオートクリン機構に対する agonist (TGF  $\alpha$ ) と antagonist (抗 TGF  $\alpha$ , 抗 EGF 受容体抗体) を用いて, TGF  $\alpha$  /EGF 受容体機構が癌細胞の増殖に重要な役割を果たしていることを明らかにした。よって博士論文に値するものである。