



Title	7種類の婦人科癌細胞株の樹立
Author(s)	加納, 英男
Citation	大阪大学, 1994, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/38705">https://hdl.handle.net/11094/38705</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="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

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

氏名	加納英男
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第11056号
学位授与年月日	平成6年2月1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	7種類の婦人科癌細胞株の樹立
論文審査委員	(主査)教授 谷澤修 (副査)教授 羽倉明 教授 木谷照夫

### 論文内容の要旨

#### 「目的」

新たな婦人科癌の細胞株を樹立し、それらについて癌遺伝子の解析を行うとともに、特徴的な形質をもつ細胞株を見いだすことを目的とした。

#### 「方法ならびに成績」

- (1) 細胞株の樹立：昭和61年より6年間の微研病院婦人科における症例から樹立を試みた。手術材料を使っての分散培養法、癌性胸水中浮遊細胞の培養、そしてヌードマウス移植腫瘍からの細胞培養系確立の3種類の方法によった。その結果、樹立に成功した癌は子宮頸部癌2例（扁平上皮癌・腺癌）子宮体部癌4例（高分化型腺癌・低分化型腺癌・腺扁平上皮癌）そして卵管癌1例（腺癌）の計7例であった。樹立した細胞は10%FCS添加 RPMI1640を培地とし、37°C5%CO<sub>2</sub>の条件下で維持した。
- (2) 癌遺伝子の解析・HPV DNAの検出
  - (a) サザンプロット法による癌遺伝子増幅の検出：各細胞からフェノール・クロロホルム法によって高分子量DNAを抽出し分析に供した。DNAを制限酵素にて切断後ゲル電気泳動し、フィルターにプロットした後、<sup>32</sup>PラベルしたK-ras, c-myc, erb-B2の各プローブを用いてハイブリダイゼーション後オートラジオグラフィーをおこなった。フィルムはデシントメーターにかけて遺伝子増幅レベルを測定した。
  - (b) PCR-Dot Blot Hybridization法によるK-ras codon12における点突然変異の検出：PCRによって増幅したDNAをナイロンフィルターにドットプロットし、K-ras codon12の各種変異プローブとハイブリダイゼーションを行った。
  - (c) PCR-SSCP and PCR-Direct Sequencing法によるp53 geneにおける点突然変異の検出：<sup>32</sup>P-end-labeled primerを使ったPCR法によってp53 geneのexon 5～8を増幅した。PCR産物を熱処理のうえ電気泳動しオートラジオグラフィーを行った。SSCPにてmobility shiftを示したものについては、これをtemplateとしてPCRを行いdideoxy法にてsequencingを行った。

(d) サザンプロット法による HPV DNA の検出：高分子量 DNA を  $Pst$ + あるいは  $Ban$ I で切断後、電気泳動しフィルターにプロットした。まず、HPV-58 DNA プローブを使用し low stringency にてスクリーニング後、HPV のタイピングをおこなった。以上の解析の結果、癌遺伝子の増幅については内膜低分化腺癌において erb-B2 の 3 倍の増幅が認められた。点突然変異に関しては K-ras codon12 はすべての株で wild type であったが p53 においては内膜腺扁平上皮癌で mobility shift が認められ sequencing により、この変異は codon239 における AAC→GAC の点突然変異であることが確認された。また、頸部扁平上皮癌株において HPV18 の DNA が検出された。

(3) IL- 6 の分析：各細胞をマルチウェルに培養しコンフルエントになった時点で培地を RPMI1640 に変え、さらに 36 時間培養し conditioned medium を得た。さらに、IL- 1  $\alpha$  1 ng/ml あるいは LPS 1  $\mu$ g/ml を添加した培地でも同様に実験した。そして ELISA 法（検出限界 3.13 pg/ml）によって各 medium の IL- 6 濃度を測定した。また、ヌードマウス (ICR nu/nu 5 w $\pm$ ) 背部皮下に細胞を移植し、60 日後に採血して赤血球数、白血球数をカウントした。以上の検討の結果、7 株中 4 株において IL- 6 の分泌があることが判明し、ことに子宮頸部扁平上皮癌株では 1120 pg/ $10^5$  cells/36h と高い分泌能が認められた。また、各細胞の IL- 1  $\alpha$  および LPS に対する反応性は、両者に反応するもの、IL- 1  $\alpha$  のみに反応するもの、両者に反応のないものの 3 型にわかれた。なお、子宮頸部扁平上皮癌株を移植したヌードマウスにおいては著明な白血球增加が確認された。

#### 「総括」

新たな婦人科癌細胞株を 7 株樹立した。樹立に成功した癌は子宮頸癌 2 例、子宮体癌 4 例、卵管癌 1 例である。これら樹立株細胞について K-ras, c-myc, erb-B2 の増幅を調べたところ子宮体部低分化型腺癌由来の細胞において erb-B2 の 3 倍の増幅が認められた。また、K-ras および p53 の点突然変異を調べたところ、子宮体部腺扁平上皮癌由来の細胞において p53 の codon239 に AAC→GAC の変異が認められた。さらに、各細胞の IL- 6 産生を調べたところ、HPV18 型 DNA の検出された子宮頸部扁平上皮癌由来の細胞において 1120 pg/ $10^5$  cells/36h と多量の産生が認められた。本細胞株の由來した症例は、22 才の若年頸癌であったが、熱発を主訴とし著明な炎症所見を呈していたことから、腫瘍の産生する IL- 6 の臨床所見との関連が推察された。

#### 論文審査の結果の要旨

本論文は新たな婦人科癌細胞株の樹立報告であるのみならず、それら 7 種類の癌細胞株の癌遺伝子・癌抑制遺伝子・HPV 遺伝子の解析を行うことによって、婦人科癌における遺伝子異常の一端を明らかにしたものである。さらに、臨床的観察をもとに IL- 6 産生能の高い細胞株の存在を見いだすとともに各細胞の IL- 6 産生動態の検討を行い、婦人科癌と IL- 6 に関する新たな知見を得たもので、婦人科癌研究として価値ある内容であり、学位の授与に値すると考えられる。