The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	肺小細胞癌培養株の神経線維様突起形成 : 100kDタンパクチロシンリン酸化の関与について
Author(s)	立花, 功
Citation	大阪大学, 1994, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/38966
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

【52】

氏　　名	立花　功（たちばな いさお）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学位記番号	第　11290　号
学位授与年月日	平成6年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科内科系専攻
学位論文名	**肺小細胞癌培養株の神経線維様突起形成：100 kD タンパクチロシンリン酸化の関与について**
論文審査委員	（主査） 教　授　岸本　忠三 （副査） 教　授　祖父江憲治　　教　授　田中亀代次

論文内容の要旨

【目的】

肺癌は，扁平上皮癌，腺癌，小細胞癌および大細胞癌に大別されるが，それらの発生母地ならびに分化機構はいまだ明らかでない。とくに早期から浸潤・転移を示し，肺癌のなかでもっとも予後の悪い肺小細胞癌（small cell lung cancer, SCLC）は，他の組織型の肺癌と異なり，神経内分泌細胞としての特徴を示すことから，その発生には神経外胚葉由来組織の分化機構が強く関与していると考えられる。

SCLCは，細胞外基質蛋白の存在下で培養されると，時として線維性突起を形成する。本研究では，SCLCの線維性突起がニューロフィラメントを有する神経線維と同等であるか否かを検討し，さらにこの突起形成に細胞の接着・増殖・分化に関与するFocal adhesion kinase（$pp125^{FAK}$）のリン酸化がどのように関与するか検討した。

【方法】

SCLCおよび神経芽細胞種培養株における突起形成の誘導

腫瘍細胞は，SCLC培養株としてLC6，神経芽細胞種培養株としてIMR32を用いた。組織培養非処理96穴プレートを，ウシ血清アルブミン（BSA）またはフィブロネクチン（FN）で一晩コーティングし，これにトリプシン処理後の腫瘍細胞浮遊液を加え，ウシ胎児血清（FCS）添加または非添加の条件で培養した。4日間培養後，検鏡にて突起形成を観察し，突起形成細胞を算定した。

免疫細胞染色

上記のように培養し突起を形成した腫瘍細胞を100%エタノールで固定し，マウス抗ニューロフィラメント200kD抗体，FITC結合抗マウスIg抗体を反応させ，蛍光顕微鏡下で観察し，突起内部のニューロフィラメントの有無を検討した。

腫瘍細胞のBSA，FNへの接着試験

BSAまたはFNでコーティングした96穴プレートに腫瘍細胞を加え，1.5時間培養した。接着しない細胞を浮遊させ吸引除去し，MTTを加えて5時間反応させた。540nmでの吸光度を測定し，腫瘍の接着率を定量化した。また抗β1インテグリン抗体存在下で同様の接着試験を行い，接着率の抑制度によって，接着現象における腫瘍細胞表面β1インテグリンの関与を検討した。

ウェスタンブロッティングによるチロシンリン酸化タンパクの検出

上記のように培養し突起を形成した腫瘍細胞のタンパク画分を，1％PMSF，1％Na_3VO_4，1％NP-40を含む細胞溶解用緩衝液で可溶化した。SDS-PAGEでタンパクを泳動分離した後，PVDFメンブレンに転写した。マウス抗リン酸化チロシン抗体，続いてアルカリフォスファターゼ結合抗マウスIgG抗体を反応させ，さらに基質を加えて発色させた。

【成績】

LC 6およびIMR 32は，FCS添加の条件で培養された場合，FNの存在下で線維性突起を形成した。しかしFCS無添加の場合は，FNが存在しなくても両者は同様の突起を形成した。免疫細胞染色によってこれらの突起には，抗ニューロフィラメント200 kD抗体が結合することが判明した。

LC 6とIMR 32は接着試験の結果，FNには強く接着したがBSAにはほとんど接着しなかった。またこれらのFNへの接着は抗β1インテグリン抗体で強く抑制され，少なくともFN存在下での突起形成にはβ1インテグリンを介する細胞接着が重要であると考えられた。

最近，NIH3T3などの線維芽細胞が，インテグリンを介してFNなどの細胞外基質蛋白に接着し細胞形態を変化させる時に，接着斑に存在する分子量125 kDのタンパクがチロシンリン酸化を受けることが明らかとなった。Focal adhesion kinase（$pp125^{FAK}$）と呼ばれるこのタンパクは，ある種の細胞の癌化・接着・増殖・分化に関わっているとされる。LC 6，IMR 32における突起形成にこの$pp125^{FAK}$が関わっているか否かを，抗リン酸化チロシン抗体を用いたウェスタンブロッティングにより検討したところ，これらの腫瘍細胞では突起の形成の有無に関係なく，125 kDのタンパクがチロシンリン酸化を受けることが判明した。一方125 kDタンパクとは別に，突起を伸展させる条件，すなわちFN上で培養した時あるいはFCS非存在下で培養した時には，100 kDのタンパクがチロシンリン酸化により活性化されることが明らかとなった。このタンパクのチロシンリン酸化は，同じ条件下での非小細胞肺癌では認められなかった。

【総括】

一部のSCLCが，神経線維と同等の抗原性を有する線維性突起を形成しうること，この現象には100 kDタンパクのチロシンリン酸化が関与していることを示した。これらは神経芽細胞腫によって示されるものとすべて同等であり，SCLCが神経外胚葉由来組織の分化機構を強く保持していることを示している。

論文審査の結果の要旨

SCLCは，電顕上dense core granuleの存在すること，L-dopa decarboxylase（DCC）・neuron-specific enolase（NSE）・creatine kinase BB（CK-BB）活性が高値を示すこと，また種々のホルモンやニューロペプチドを産生することが分かっており，神経内分泌腫瘍としての特徴を有することが知られている。

本研究においてはこれらの事実に加えて，SCLC培養株が培養条件によっては神経線維様の突起を形成すること，さらにその突起形成メカニズムに神経芽細胞腫培養株との共通性のあることが明らかにされ，SCLCの発生に神経外胚葉由来組織の分化機構が強く関与していることがさらに支持された。また本研究では，SCLCと神経芽細胞腫の突起形成に伴う，100 kDタンパクのチロシンリン酸化が明らかにされた。このタンパクのチロシンリン酸化は，広く神経系細胞の分化機構にも関わっている可能性があり興味深い。

以上，本研究はSCLCの発生・分化機構のみならず，神経系細胞の分化にも新たな知見を加えたものであり，学位の授与に値すると考えられる。