



Title	口腔癌細胞浸潤に与える線維芽細胞の影響：特に線維芽細胞からの癌細胞遊走促進因子の分離
Author(s)	杉浦, 剛
Citation	大阪大学, 1995, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/39086
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

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名	杉浦 剛
博士の専攻分野の名称	博士(歯学)
学位記番号	第11831号
学位授与年月日	平成7年3月23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	口腔癌細胞浸潤に与える線維芽細胞の影響 —特に線維芽細胞からの癌細胞遊走促進因子の分離—
論文審査委員	(主査) 教授 松矢 篤三
	(副査) 教授 伊集院直邦 助教授 開 祐司 講師 久保 和子

論文内容の要旨

転移性がん細胞は高い運動能と細胞外基質分解酵素産生能を持つことが広く知られている。浸潤・転移に必要不可欠であるこれらの形質はがん細胞自身の遺伝子発現に支配されており、その発現は腫瘍周囲の微小環境、すなわち宿主因子の影響を強く受ける。がん細胞と線維芽細胞間には重要な相互作用が存在するとの考えのもとに、当教室では線維芽細胞の口腔癌に与える影響が研究されてきた。その一つとして線維芽細胞が口腔癌のコラーゲンゲル内への浸潤を強く促進する所見が得られた。この所見は線維芽細胞が口腔癌の浸潤を促進する何らかの因子を産生していることを示唆している。そこで本研究では線維芽細胞の培養上清中の癌細胞遊走促進因子や細胞外基質分解酵素産生亢進因子の存在を明らかにすることにより線維芽細胞による口腔癌細胞の浸潤促進機構を明らかにしようと試みた。

(実験方法)

線維芽細胞は外科的に切除された正常歯肉から組織片培養法によって得られたものを使用した。標的細胞として腺様囊胞癌細胞 ACCS, 唾液腺癌細胞 HSG, 扁平上皮癌細胞 SCCKN, SCCTF, KB と A431 を用いた。

- 癌細胞の蛋白分解酵素活性をゼラチンまたはカゼインを基質とするザイモグラムにて検索した。
- 細胞遊走能をポアサイズ $8 \mu\text{m}$ のケモタキセルを用いた Boyden chamber の変法にて検討した。
- 増殖飽和状態の線維芽細胞を無蛋白培養液で48時間培養し得られた上清を分子量一万以下排除の限外濾過膜により濃縮した後、蒸留水にて透析し凍結乾燥した。凍結乾燥標品をゲル濾過クロマトグラフィーに展開した。

(結果)

1. 線維芽細胞培養上清が細胞外基質分解酵素産生に与える影響

各種癌細胞はプラスミノーゲンアクチベーター、72kDa 及び 92kDa ゼラチナーゼを産生している。癌細胞を線維芽細胞の無血清培養上清で48時間処理すると、それら蛋白分解酵素の産生は亢進された。なお、線維芽細胞無血清培養上清中の上記活性画分はゲル濾過クロマトグラフィーにおいて分子量200~300kDa の範囲に溶出された。

2. 線維芽細胞培養上清の癌細胞遊走に与える影響

線維芽細胞の無血清培養上清は癌細胞のケモタキシス及びケモカインシスを誘導した。

3. 癌細胞遊走促進因子の分離

癌細胞の遊走(ケモタキシスとケモカインシス)を促進する画分はゲル濾過クロマトグラフィーにおいて 50~100 kDa に溶出された。この画分をヘパリン親和性クロマトグラフィーに展開するとヘパリン吸着画分にケモタキシス

とケモカイネシス両誘導活性が、非吸着画分にはケモタキシス活性のみが溶出された。さらに非吸着画分を陰イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィーに展開し溶出させることによって線維芽細胞由来細胞遊走因子(FDMF)を得た。FDMFは、癌細胞のケモタキシスを約3倍から4倍に促進し、線維芽細胞自身の細胞遊走も約1.5倍に促進した。ヘパリン非親和性のFDMFは熱に安定で、酸処理で50%失活、アルカリ処理で失活、10nMジチオスレイト処理に安定であった。100μg/mlトリプシン及びプロテイナーゼKによる酵素処理では完全に失活した。

4. FDMFと細胞外基質蛋白による細胞遊走機序の相違

フィブロネクチン、ラミニン、コラーゲン等の細胞外基質蛋白はACCS細胞の遊走を促進したがその遊走促進は抗 β 1インテグリン抗体によって抑制された。一方、FDMFによる細胞遊走は抗 β 1インテグリン抗体で阻害されなかった。このことより本因子は細胞外基質蛋白と異なり、作用発現に β 1インテグリンを介していないことが示唆された。

5. FDMFの細胞骨格に対する作用

ACCS細胞にFDMFを24時間作用させ、抗アクチン抗体による蛍光抗体染色を行った結果、ACOS細胞のストレスファイバーの消退と細胞膜のラッフリングが認められた。

6. FDMFの作用機構の解析

本標品によるACCS細胞の遊走促進はゲニステインで阻害された。このことより、FDMFの作用機構に細胞蛋白のチロシンリン酸化が関与していることが強く示唆された。そこでFDMFを作用させたACCS細胞を可溶化し、抗フォスフォチロシン抗体でWestern blottingを行った。その結果、本標品添加により150kDa、70kDa、45kDa付近にチロシンリン酸化蛋白が検出され、その発現は添加後30分～1時間で最大となった。また、この蛋白のリン酸化はコレラ毒素同時添加では阻害されなかったが、百日咳毒素を添加することによって阻害された。本因子による細胞遊走及び細胞骨格の変化も百日咳毒素によって抑制された。

(結語)

線維芽細胞の培養上清が癌細胞の動態に与える影響を蛋白分解酵素産生と細胞遊走に着目して解析し、以下の結果を得た。

1. 線維芽細胞の培養上清より蛋白分解酵素産生亢進因子と細胞遊走促進因子が分離された。
2. 細胞遊走促進因子(FDMF)はその性状より、既知の細胞遊走促進因子とは異なる蛋白であると考えられた。
3. FDMFは百日咳毒素感受性G蛋白共役受容体を介してチロシンキナーゼを活性化し、細胞骨格系を制御して細胞の運動性を亢進させていると推察された。

論文審査の結果の要旨

本研究は線維芽細胞が口腔癌細胞の浸潤に与える影響を検討したものである。得られた知見は、線維芽細胞が口腔癌細胞の蛋白分解酵素産生亢進因子と細胞遊走促進因子を産生すること、分離された細胞遊走促進因子が既知の遊走因子と異なるタンパクであり百日咳毒素感受性G蛋白受容体を介した後チロシンキナーゼを活性化し細胞の運動を制御することを示している。癌浸潤機構における癌細胞と間質との相互作用の役割および新しい遊走因子の存在を示唆した本研究は独創性があり、癌細胞浸潤機構を理解する上で重要な価値がある。

従って、本研究者は博士（歯学）の学位を得る資格があるものと認める。