



Title	無蛋白培地における口腔扁平上皮癌細胞株の樹立とその分泌する増殖因子について
Author(s)	平沼, 勉
Citation	大阪大学, 1996, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/39812">https://hdl.handle.net/11094/39812</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">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	平沼勉
博士の専攻分野の名称	博士（歯 学）
学 位 記 番 号	第 1 2 4 3 5 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 8 年 3 月 25 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	無蛋白培地における口腔扁平上皮癌細胞株の樹立とその分泌する増殖因子について
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 額田 純一郎

### 論 文 内 容 の 要 旨

癌細胞と正常細胞を区別し得る最大の特徴は、癌細胞が正常細胞の示す増殖制御機構を逸脱して自律的増殖能を有している点にある。従って、癌細胞の自律性増殖の仕組みを明らかにすることは癌の本質を理解することになる。昨今、TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , PDGF, EGF, FGF, IGFなどの多くの増殖因子およびその受容体の発現異常が癌細胞の増殖に密接に関与していると考えられるに至っているが、口腔癌の大多数を占める扁平上皮癌の増殖、特に自律性増殖の機構に関してはほとんど明らかにされていないのが現状である。その理由の一つとして、自律性増殖に関する検索には血清の影響を受けない無蛋白培地が必要であるにもかかわらず、一般的に扁平上皮癌細胞は血清無添加の基礎培地のみでは増殖しないことが挙げられる。従って、自律性増殖の研究には無蛋白培地で継代培養可能な細胞株の樹立が望まれる。そこで、本研究は無蛋白培地で継代培養可能な口腔由来扁平上皮癌細胞株の樹立を試み、さらにその培養上清中に存在し増殖作用を有する因子について調べたものである。

69才女性の歯肉癌患者の顎下リンパ節転移巣より採取した細胞を5%牛胎児血清を添加したDMEM:MCDB153=1:9の培地で分離し、SCCNI細胞と命名して以下の実験に供した。SCCNI細胞は免疫組織学的に、Keratin, Vimentin, Epithelial membrane antigenに対する抗体で染色され、血清添加した軟寒天培地中でのコロニー形成能を有し、ヌードマウスへの接種により扁平上皮癌を形成したことから、扁平上皮癌細胞株であることが明らかとなった。SCCNI細胞はヒト正常ケラチノサイトの既存の増殖培地を修正した血清無添加の培地で継代培養可能であった。また、この増殖培地より増殖因子やホルモンを順次除去した結果、DMEM:MCDB153=1:9の無蛋白培地でも継代培養可能であった。無蛋白培地で継代培養しても、細胞の形態やマーカー抗原の発現に変化は認められなかった。5%血清添加培地、無蛋白培地での細胞倍加時間はそれぞれ24時間、42時間であった。さらに培養上清を50%濃度で添加することにより<sup>3</sup>H-チミジンの取り込みは約5倍に増加した。また、24時間目、48時間目、72時間目の培養上清はいずれも同程度の増殖促進活性を有していた。培養上清をヘパリン親和性カラムに展開したところ、0.4-0.8 M 塩濃度溶出分画に増殖促進活性を認めた。しかし、正常皮膚由来の線維芽細胞株、顎下腺由来正常唾液腺上皮細胞への増殖促進活性は認められなかった。この分画をpH9で平衡化した強陰イオン交換カラムに展開したところ、0-0.3 M 塩濃度溶出分画に増殖促進活性を認めた。さらにこの分画をゲルろ過カラムに展開すると分子量約3万から6万程度にその増殖促進活性が認められた。そこで、これをジフェニル逆相カラムに展開し、増殖促進活性を認めた分画を12.5% SDS-PAGEに展開したところ、分子量2万5千付

近に単一バンドを認めた。このバンドは還元処理により分子量1万5千付近にシフトした。この増殖促進活性は、トリプシン処理および10mMDTT処理で失活したが、熱処理・酸処理に対して安定していた。既に樹立された口腔由来扁平上皮癌細胞株であるSCCKN細胞及びSCCTF細胞でも同様の検索を行なった結果、これらの細胞も無蛋白培地で継代可能であり、さらにその培養上清中にSCCNI細胞と同様のヘパリン親和性を有する増殖因子が存在していることが明らかとなった。

以上、口腔由来扁平上皮癌細胞株3株は、EGF, Insulin, hydrocortisoneやBPEなどの増殖因子やホルモンを添加しないMCDB153を基本とした無蛋白培地でも継代可能であることを明らかにした。この無蛋白培地の培養上清中にはヘパリン親和性を有し、酸処理および熱処理で安定、トリプシン処理および10mMDTT処理で失活する増殖因子が存在し、この増殖因子は線維芽細胞や正常上皮細胞の増殖に対しては影響を与えなかったが、扁平上皮癌細胞株には増殖効果を有していた。分子量は約2万5千程度で、還元処理によって分子量約1万5千程度にシフトし、おそらく2量体を形成していると考えられ、腫瘍の増殖に関連してヘパリン親和性を有する増殖因子は現在まで13種類が報告されているが、本因子はこれらとは異なる増殖因子であった。

### 論文審査の結果の要旨

本論文は、無蛋白培地で継代培養可能な口腔由来扁平上皮癌細胞株の樹立を試み、その培養上清中の増殖因子について検索を行なったものである。その結果、DMEM:MCDB153 = 1:9で配合した無蛋白培地で継代培養可能な口腔扁平上皮癌細胞株の樹立に成功し、培養上清よりヘパリン結合性で分子量約25kDaの増殖因子を分離した。この因子は口腔扁平上皮癌細胞の増殖を促進するが、正常細胞の増殖には影響を及ぼさず、その性質が他のヘパリン結合性の増殖因子とは異なることを明らかにした。また、他の口腔扁平上皮癌細胞株も本無蛋白培地で培養可能であり、同様の因子を培地中に分泌していることを明らかにし、口腔扁平上皮癌細胞の増殖には既知の増殖因子以外に、本因子の如き未知因子が重要な役割を果たしていることを示唆した。以上の結果は、口腔扁平上皮癌の自己増殖機構の一端を明らかにし、その解析を進める上で重要な知見となるものであり、価値のある業績と認められる。

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。