

Title	Primary Human Fibroblasts Induce Diverse Tumor Invasiveness : Involvement of HGF as an Important Paracrine Factor
Author(s)	岩澤, 卓
Citation	大阪大学, 1997, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/40435">https://hdl.handle.net/11094/40435</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">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

氏 名	岩 澤 卓 <small>いわ ざわ たかし</small>
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 2 8 3 7 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 9 年 3 月 18 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	Primary Human Fibroblasts Induce Diverse Tumor Invasiveness : Involvement of HGF as an Important Paracrine Factor (初代培養線維芽細胞により誘導される腫瘍細胞浸潤：傍分泌型液 性因子としての肝細胞増殖因子の関与)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 門 田 守 人 (副査) 教 授 中 村 敏 一 教 授 高 井 新 一 郎

## 論 文 内 容 の 要 旨

【目的】 線維芽細胞は増殖、浸潤、転移といった腫瘍の進展に重要な役割を果たしていることが報告されているが、そのメカニズムは明確にはされていない。著者らは今まで線維芽細胞を含むコラーゲンゲル上で腫瘍細胞を培養する方法 (organotypic raft culture) を用い、細胞間接着因子 E-cadherin の発現が食道癌細胞の浸潤に深く関わっていることを報告してきた。一方、肝細胞増殖因子 (HGF) は線維芽細胞を含む間質細胞から主に産生され、成熟肝細胞の増殖のみならず上皮細胞の運動性を促進し、腫瘍の進展を促すことが報告されている。今回、食道癌浸潤における宿主線維芽細胞の関与について調べるために、食道癌細胞と複数の食道癌患者の切除組織から得た初代培養線維芽細胞を用いて organotypic raft culture を行い、HGF 及び E-cadherin を中心に検討した。

【方法】 食道癌細胞株 TE2NS  $1 \times 10^5$  を線維芽細胞  $1 \times 10^6$  を含むコラーゲンゲル上で培養し、15日後に固定、染色後、浸潤細胞数を数えた。TE2NS はヒト食道扁平上皮癌より樹立された細胞株のサブクローンである。初代培養線維芽細胞は、7名の食道癌切除組織の腫瘍組織と非腫瘍部粘膜下組織を消化して得、4～5継代後使用した。また、organotypic raft culture の最終3日間の培養上清中の HGF の濃度を ELISA 法により測定した。浸潤抑制試験として、抗 HGF 中和抗体  $10 \mu\text{g/ml}$  を線維芽細胞を含むゲル及び培養液中に添加した。浸潤誘導試験として、recombinant HGF (rHGF) を最高  $50 \text{ ng/ml}$  と抗 E-cadherin 抗体  $30 \mu\text{g/ml}$  を同時に、または別々に線維芽細胞を含まないゲル及び培養液に添加した。単層培養での TE2NS 細胞の運動性をみるために、 $5 \times 10^3$  の細胞を3日間培養後、rHGF を  $10 \text{ ng/ml}$  と抗 E-cadherin 抗体  $30 \mu\text{g/ml}$  を同時に、または別々に添加し、24時間培養後検鏡した。

【成績】 TE2NS 細胞は種々の初代培養線維芽細胞を含むコラーゲンゲルの中へ様々な程度で浸潤したが、線維芽細胞を含まないゲルの中へはほとんど浸潤しなかった。非腫瘍部由来の線維芽細胞は腫瘍部由来の線維芽細胞より強く浸潤を誘導し (617個 vs 318個)、7症例中3例では3倍以上の浸潤細胞数であった。また、非腫瘍部由来の線維芽細胞の中でも上下10倍以上の開きがあった。この浸潤腫瘍細胞数は、これらの培養上清中の HGF の濃度とよく相関した ( $r=0.704$ )。興味深いことに、非腫瘍部由来の線維芽細胞の2例では、腫瘍細胞により HGF の産生が促され、線維芽細胞単独で培養したときの4倍に達した。これは、腫瘍細胞が産生する傍分泌因子 (HGF inducing factor) の存在を

示唆するものである。非腫瘍部由来の線維芽細胞は腫瘍部由来の線維芽細胞より多くの HGF を産生していたが(2.91 vs. 0.54 ng/ml), これは腫瘍の局所環境が正常の線維芽細胞に HGF の産生能や HGF inducing factor に対する反応性に影響を与えた結果と考えられる。TE2NS 細胞が HGF の受容体 (c-Met) を有することはウエスタンブロッティングで確認されたが、TE2NS 細胞自身からの HGF 産生は認められなかった。HGF に対する中和抗体の添加によりこれらの浸潤は不完全ながら抑制され、HGF が浸潤に必要な因子であることが証明された。しかし、rHGF の添加では線維芽細胞を含まないゲルへの浸潤はほとんど誘導されなかった。このことから他の浸潤に関わる因子として E-cadherin の発現を免疫染色で調べたところ、浸潤部位の腫瘍細胞における発現の低下が認められた。単層培養で、TE2NS 細胞に rHGF と抗 E-cadherin 抗体を添加したところ、細胞は明かな scattering を示した。この現象は rHGF、抗 E-cadherin 抗体のいずれか一方のみの添加では認められず、腫瘍の浸潤には周囲の線維芽細胞による HGF 産生と E-cadherin の機能異常の両者が必要であることが示唆された。しかし、organotypic raft culture では rHGF と抗 E-cadherin 抗体の両者を添加しても浸潤は誘導されず、蛋白分解酵素などさらに他の因子を追求する必要がある。

【総括】 線維芽細胞の HGF 産生能は宿主によって多様であり、この HGF 産生能が腫瘍の浸潤性に影響を与える重要な因子であると考えられた。また腫瘍の浸潤には E-cadherin の異常などの他の因子も必要であることが示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

本研究は、腫瘍の浸潤メカニズムを明らかにする目的で、複数の食道癌患者由来の初代培養線維芽細胞と食道癌細胞との 3 次元 coculture (organotypic raft culture) を行って、宿主間質線維芽細胞の果たす役割を検討したものである。

それぞれの線維芽細胞は様々な程度で腫瘍細胞の浸潤を誘導し、その浸潤誘導能は線維芽細胞の肝細胞増殖因子 (HGF) 産生能と良く相関した。用いられた腫瘍細胞は HGF 受容体を持ち、その浸潤は抗 HGF 抗体によって抑制された。しかし、HGF の添加のみではこの腫瘍浸潤は再現されず、他の因子として E-cadherin の関与が免疫染色及び scattering assay によって示された。

この研究によって、線維芽細胞の HGF 産生能は宿主によって多様であり、この HGF 産生能が腫瘍の浸潤性に影響を与える重要な因子であることが示された。また腫瘍の浸潤には E-cadherin の異常などの他の因子も必要であることも示され、これらは腫瘍浸潤メカニズムを解明する上で重要な知見であり、本研究は学位に値する業績と考える。