

Title	扁平上皮癌細胞株の分泌するアクチビンAとその作用について
Author(s)	富永, 仰
Citation	大阪大学, 1998, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/40818">https://hdl.handle.net/11094/40818</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>〉</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	とみなが ぎょう 富永 仰
博士の専攻分野の名称	博士(歯学)
学位記番号	第 13779 号
学位授与年月日	平成10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専攻
学位論文名	扁平上皮癌細胞株の分泌するアクチビンAとその作用について
論文審査委員	(主査) 教授 松矢 篤三  (副査) 教授 浜田 茂幸 助教授 小川 祐三 講師 額田純一郎

### 論文内容の要旨

#### 【緒言】

癌細胞は種々の因子を分泌し、オートクライン・パラクライン機構を介して、癌の自律性増殖のみならず、癌周囲の細胞と複雑な相互作用を持ち、癌の形態形成、浸潤、転移を引き起こすと考えられる。たとえばEGFおよびTGF- $\alpha$ はEGF受容体を介したオートクライン機構により癌細胞の増殖を促進していることが知られている。またHGFは胃癌の増殖ならびに形態形成に重要なパラクライン機構を形成していることが明らかとなっている。このようにオートクライン・パラクライン機構の可能性を示す実験事実が集積されつつある。

当教室の平沼は無蛋白培地で継代培養可能な口腔扁平上皮癌細胞株を樹立し、その培養上清中に自己増殖因子として、分子量25kDaの蛋白を見出した。本研究では、この蛋白の同定を行ない、そのオートクライン様作用とパラクライン様作用について検討した。

#### 【研究方法】

1) 細胞と培地：口腔扁平上皮癌由来 SCCNI, SCCKN, SCCTF, 子宮頸部の扁平上皮癌由来 A431を用いた。培地は MCDB153 と DMEM と 9 : 1 の割合で混合した無蛋白培地を用いた。ヒト皮膚由来の角化細胞, ヒト顎下腺上皮細胞, ヒト多形性腺腫細胞は Okura らの方法に準じて無血清培地で培養した。線維芽細胞は歯肉から分離した細胞と, ヒト皮膚由来の NB1 RGB 細胞とを用い 10% FCS 含有の DMEM で培養した。単核球は, 成人健常者の末梢血より分離した細胞と, 外科的に切除されたリンパ節をナイロンメッシュに通して得られた細胞とを用い, 非働化した FCS 10% 含む RPMI 培地で培養した。2) 培養上清中の因子の同定：平沼の方法に準じて, 扁平上皮癌細胞の培養上清をヘパリンアフィニティーカラムに展開し, 吸着分画の 0.4~0.8M の塩化ナトリウム濃度で溶出した分画を強陰イオン交換カラムに展開し, 0.3M の塩化ナトリウムで溶出された分画をゲルろ過カラムに展開した。さらに逆相カラムに展開しアセトニトリルと蒸留水の直線濃度勾配により溶出した。得られた蛋白のアミノ酸シーケンスを調べた。3) 扁平上皮癌細胞株培養上清中のアクチビンAの発現：癌細胞の培養上清を抗インヒビン $\beta_A$ ポリクローナル抗体を用いてウエスタンブロッティング法により検討した。4) 癌および癌周囲組織におけるアクチビンAの発現：口腔扁平上皮癌組織を抗インヒビン $\beta_A$ ポリクローナル抗体で免疫組織学的に検討した。5) 培養細胞におけるアクチビンAの発現：培養細胞のアクチビンAの発現をインヒビン $\beta_A$ の cDNA プライマーを用い RT-PCR 法で検討した。6) アクチビンAによる扁平上皮癌細胞に対する作用：アクチビンAの増殖に対する影響は [ $^3\text{H}$ ] -チミジ

ンを用いて DNA 合成,あるいは細胞数の算定で検討した。癌細胞の接着に関しては,アドヒージョンアッセイを行ない,基底膜物質の発現を RT-PCR 法と免疫沈降法で解析した。7) アクチビン A による線維芽細胞に対する作用;線維芽細胞の増殖は  $[^3\text{H}]$ -チミジンを用いて DNA 合成を検討し,また  $[^3\text{H}]$ -プロリンでラベルして蛋白合成とコラーゲン蛋白合成能を測定した。8) アクチビン A による単核球およびリンパ節から得られた細胞に対する作用;単核球の増殖は DNA 合成で検討し,扁平上皮癌細胞に対する細胞障害活性は  $^{51}\text{Cr}$  を用いてクロームリリースアッセイ法にて検討した。抗 CD 4, CD 8 の抗体を用いてリンパ球のサブセットを, Propidium Iodide と Annexin V を用いて懐死とアポトーシスをフローサイトメトリーで解析した。

#### 【結果】

1. 逆相カラムで得られた 25kDa の蛋白の N 末端アミノ酸配列 18 残基がインヒビン  $\beta_A$  のそれと高い相同性を示した。
2. ウェスタンブロッティングにて扁平上皮癌細胞株 SCCNI, SCCKN, SCCTF, A431 の全ての培養上清中にアクチビン A が分泌されていることが明らかとなった。
3. 免疫組織学的には癌細胞にもインヒビン  $\beta_A$  の発現を認めたが,癌周囲の間充織にはより強い発現を認めた。
4. 正常細胞である角化細胞・顎下腺細胞・線維芽細胞においてインヒビン  $\beta_A$  の mRNA の発現がみられたが,扁平上皮癌細胞ではより強い発現を認めた。
5. アクチビン A 添加による扁平上皮癌細胞の増殖に及ぼす影響を検討したところ,細胞数は増加したが DNA 合成量には変化がなかった。一方,アクチビン A の添加によりフィブロネクチンの mRNA 発現量および培養上清中のフィブロネクチン蛋白量が増大し,癌細胞は接着能を高めた。
6. アクチビン A の添加により線維芽細胞の DNA 合成が促進し,コラーゲン合成を含む総蛋白合成も亢進した。
7. アクチビン A の添加により単核球の DNA 合成は抑制され,扁平上皮癌に対する細胞障害活性が低下した。また,リンパ球サブセットの解析ではアクチビン A 添加により CD 4 + CD 8 - の細胞数は減少したが CD 4 - CD 8 + の細胞には変化がなかった。さらに,アクチビン A を添加することにより Annexin V シングルポジティブの細胞,つまりアポトーシスを起こしている細胞は無添加の場合に比べ約 2 倍に増加した。

#### 【考察】

扁平上皮癌の培養上清中から精製した分子量 25kDa の蛋白はアクチビン A であり,複数の扁平上皮癌細胞の培養上清中に分泌されていた。扁平上皮癌細胞が分泌するアクチビン A はオートクライン的に癌細胞自身の接着能を高め,癌周囲の線維芽細胞に対して DNA 合成を促進し,癌細胞の足場となるコラーゲンなどの合成を促進させ,さらに免疫系の細胞に対してその DNA 合成と細胞障害活性を抑制しアポトーシスを誘導し,扁平上皮癌の形態形成および転移に関与していると考えられる。

#### 論文審査の結果の要旨

本論文は,口腔由来扁平上皮癌細胞株と子宮頸部由来扁平上皮癌細胞株 A431 の培養上清中に増殖因子として分離された 25kDa の蛋白を同定し,その作用を検討したものである。その結果,25kDa の蛋白はアクチビン A と推定された。アクチビン A は癌細胞の接着能を高め,線維芽細胞に対しては増殖を促進し,コラーゲンなどの蛋白合成を増大させる。また単核球に対してはその増殖,細胞障害活性を抑制し,ヘルパー T 細胞を減少させることが明らかになった。以上の結果は,扁平上皮癌が分泌するアクチビン A が癌の転移,形態形成に関与する可能性を示し重要な知見となるものである。故に,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。