Osaka University Knowledge Archive

Title	CELL-CYCLE-DEPENDENT INVASION IN VITRO BY RAT ASCITES HEPATOMA CELLS
Author(s)	岩崎, 輝夫
Citation	大阪大学, 1998, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41088
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。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【 14 】

氏　　名	岩　﨑　輝　夫（いわ さき てる お）
博士の専攻分野の名称	博　　士（医　　学）
学 位 記 番 号	第　14011　号
学位授与年月日	平成10年4月23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	CELL-CYCLE-DEPENDENT INVASION *INVITRO* BY RAT ASCITES HEPATOMA CELLS （ラット腹水肝癌の in vitro 浸潤における細胞周期依存性について）
論 文 審 査 委 員	（主査） 教 授 松田　暉 （副査） 教 授 宮坂　昌之　　教 授 門田　守人

論 文 内 容 の 要 旨

〔目　的〕

増殖している細胞は，細胞周期の進行に伴い形態学的及び生理学的に変化することが知られている。培養皿に接着依存性に増殖する細胞も，分裂前には球形となり接着が弱くなる。この様に細胞周期の過程は，細胞骨格系の構築や細胞-細胞間，細胞-細胞外基質間の相互作用，延いては癌細胞の浸潤と関連していることが示唆される。

癌細胞の細胞周期と実験的肺転移能との関係については報告されているが一定した見解は得られていない。さらに，転移のどのステップが細胞周期に関与しているか，特に浸潤との関係については不明である。その理由の一つはこれらが in vivo 実験系を用いて調べられたものであり，尾静脈投与する直前の癌細胞の細胞周期における時期と，実際に転移臓器において浸潤する際のそれとが一致しないと考えられるからである。

そこで，本研究では浸潤能測定時の細胞周期の時期が実際の浸潤時のそれをほぼ正確に反映することのできる in vitro 浸潤（transcellular migration）測定系を用いて，癌細胞の細胞周期と浸潤能との関係を明らかにすることを目的とした。

〔方　法〕

1）同調培養

ラット腹水肝癌 AH130 の高浸潤性クローン MM1 細胞（倍加時間約16時間）をアフィジコリン（DNA ポリメラーゼ α 阻害剤で early S 期に同調），ハイドロキシウレア（リボヌクレオチド・リダクターゼ阻害剤で G_1/S 期境界に同調）又はノコダゾール（チューブリン重合阻害剤でM期に同調）を添加した培地中で24時間培養して同調させた。非同調対照として，同調処理群において溶媒として含まれる同濃度の DMSO 又は PBS のみを添加した。血清非添加培地で洗浄後，阻害剤を含まない血清添加培地中に再培養し，直ちに in vitro 浸潤能解析と細胞周期解析とを同時に行った。時間経過を追った実験では同調解除後再培養0.5，3，7.5，12，24（，48，72）時間後に in vitro 浸潤能解析と細胞周期解析とを同時に行った。

2）in vitro 浸潤能測定

ラット腸間膜中皮細胞を初代培養し，単層にconfluentになった後，同調処理又は非処理MM1細胞を重層し，細胞周期阻害剤を含まない血清添加培地中で2時間共存培養し，中皮下へ浸潤したMM1細胞数を位相差顕微鏡下で測定した。

3）細胞周期解析

MM1細胞をプロピジウムイオダイドで処理しフローサイトメトリーにて解析した。

4）貪食運動能測定

金コロイドでコートしたカバーガラスを培養皿に置き，アフィジコリン処理又は非処理のMM1細胞を重層し，細胞周期阻害剤を含まない血清添加培地中で6時間培養し，貪食運動面積を測定した。

〔成　績〕

1）アフィジコリンまたはハイドロキシウレア処理の細胞周期分布と浸潤能に及ぼす影響

アフィジコリン処理によってMM1細胞はG_1/S-early S期に同調し，浸潤能は対照の約6.5倍に亢進した（$p<0.0001$）。更にアフィジコリンを前処理なしに浸潤測定系の培地中に添加したが，2時間での浸潤能の亢進は認められなかった。ハイドロキシウレア処理によってMM1細胞はG_1/S-early S期に同調し，浸潤能は対照の約1.9倍に亢進した（$p<0.01$）。

異なる作用機序によるG_1/S-early S期同調によっても浸潤能が亢進することより，浸潤能亢進がこれらの薬剤の短時間の直接的な作用によるものではなく，同調作用を介しての作用であることが示唆された。

2）アフィジコリン又はノコダゾール処理による同調からの解除後の時間経過に伴う細胞周期分布と浸潤能の変化

MM1細胞をアフィジコリンでG_1/S期境界に，ノコダゾールでM期に同調させた後，同調を解除し時間経過を追って細胞周期解析と浸潤能を測定し，浸潤能を同時点における非同調対照の浸潤能に対する％で評価した。アフィジコリン処理では，同調解除後0.5-2.5時間において，ノコダゾール処理では，7.5-9.5時間において浸潤能が最も高かった。これらの時期はいずれもG_1期からS期へ移行する細胞画分が最も多い時期に相当した。

以上より，MM1細胞はG_1/S-early S期に最も浸潤しやすいことがわかった。

3）貪食運動能

アフィジコリン処理MM1細胞の貪食運動能は対照の約2.4倍で，有意な亢進を認めた（$p<0.00001$）。

〔総　括〕

1）ラット腹水肝癌MM1細胞の腸間膜中皮細胞単層培養下への浸潤能（transcellular migration）は，細胞周期のG_1/S-early S期に最も亢進した。

2）G_1/S-early S期における浸潤能亢進の原因の一つとして，貪食運動能の亢進が考えられた。

論文審査の結果の要旨

癌細胞の細胞周期と浸潤・転移との関連性については，実験的に肺転移能との関係において投与した癌細胞がG_2期あるいはmid-S期の時に最も亢進するとの報告があるが，両者の関連については一定した見解は得られていない。さらに，転移のどのステップが細胞周期に関与しているか，特に浸潤との関係については不明である。その理由の一つはこれらがin vivo実験系を用いて調べられたものであり，実際に転移臓器において浸潤する際の細胞周期上の時期が解析できないからである。そこで，本研究では浸潤能測定時の細胞周期の時期が実際の浸潤時のそれをほぼ正確に反映することのできるin vitro浸潤（transcellular migration）測定系を用いて，癌細胞の細胞周期と浸潤能との関係を明らかにすることを目的とした。

ラット腹水肝癌AH130の高浸潤性クローンMM1細胞（倍加時間約16時間）をアフィジコリンまたはハイドロキシウレアを添加した培地中で24時間培養したところG_1/S-early S期に同調していた。同調解除後直ちにラット腸間膜中皮細胞単層培養下へのin vitro浸潤能解析を行ったところアフィジコリン処理群の浸潤能は対照の約6.5倍（p<

0.0001)に，ハイドロキシウレア処理群は約1.9倍に亢進していた($p<0.01$)。これよりMM1細胞はG_1/S-early S期に浸潤しやすいことが示唆された。次に細胞周期各期を種々の割合で含む細胞画分の浸潤能を比較するためアフィジコリン又はノコダゾール（M期に同調）で同調後，同調を解除して経時的に細胞周期解析と浸潤能測定を行った。いずれの実験においてもG_1期からS期へ移行する細胞画分が最も多い時期に浸潤能も最も亢進した。以上より，MM1細胞はG_1/S-S期に浸潤能が最も高くなっている可能性が示された。更にその要因を検討するため，金コロイド法によりG_1/S-S期におけるMM1細胞の貪食運動能を検討した結果，その亢進が示された。これらの結果は増殖，即ち細胞周期の特定の時期（G_1/S-S期）に癌細胞の浸潤能が最も亢進することを示したもので，かつin vitroとしての初めての知見である。本研究は癌の浸潤・転移の機構と防御に関して重要な知見を示したものと考え，学位に値すると考えられる。