



|              |                                                                                                                                                 |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title        | AUTOCRINE AND PARACRINE MOTILITY FACTORS AND THEIR INVOLVEMENT IN INVASIVENESS IN A HUMAN ORAL CARCINOMA CELL LINE                              |
| Author(s)    | Hasina, Rifat                                                                                                                                   |
| Citation     | 大阪大学, 1999, 博士論文                                                                                                                                |
| Version Type |                                                                                                                                                 |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/41534">https://hdl.handle.net/11094/41534</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           | HASINA RIFAT                                                                                                                                                                        |
| 博士の専攻分野の名称    | 博 士 (歯 学)                                                                                                                                                                           |
| 学 位 記 番 号     | 第 1 4 5 5 0 号                                                                                                                                                                       |
| 学 位 授 与 年 月 日 | 平成11年3月25日                                                                                                                                                                          |
| 学 位 授 与 の 要 件 | 学位規則第4条第1項該当<br>歯学研究科歯学臨床系専攻                                                                                                                                                        |
| 学 位 論 文 名     | AUTOCRINE AND PARACRINE MOTILITY FACTORS AND<br>THEIR INVOLVEMENT IN INVASIVENESS IN A HUMAN<br>ORAL CARCINOMA CELL LINE<br>(ヒト口腔扁平上皮癌株におけるオートクライン、パラクライン運動<br>促進因子およびそれら因子の浸潤への関与) |
| 論 文 審 査 委 員   | (主査)<br>教 授 作 田 正義<br><br>(副査)<br>教 授 伊集院直邦    講 師 米原 典史    講 師 村上 伸也                                                                                                               |

## 論 文 内 容 の 要 旨

### 研究目的

癌の臨床的特性の1つに転移形成があり、口腔扁平上皮癌もその例外ではない。口腔扁平上皮癌の治療対応においては、原発巣の制御はかなりの程度まで可能となってきたが、口腔癌の予後を大きく左右する因子は転移形成の制御にかかっているのが現状である。これまで当教室で行われてきた臨床的研究の結果、所属リンパ節転移の有無は、原発巣の大きさのみによるのではなく、むしろそれぞれの癌細胞が持つ腫瘍生物学的特性に起因することがわかってきた。そこで本研究は、このような悪性度の高い腫瘍における浸潤・転移の機序を、特に腫瘍と宿主線維芽細胞との相互作用に焦点を絞り、解析することを目的とした。

### 研究方法

1) IF細胞の樹立と培養：口腔扁平上皮癌患者より得られた癌組織を用い、Explant outgrowth法にて扁平上皮癌培養細胞株(IF細胞)を確立した。IF細胞は10%仔ウシ胎児血清(FBS)含有 $\alpha$  MEM培地中にて継代培養を行った。2) 細胞培養液(CM)：IF細胞を10% FBS- $\alpha$  MEM中で48時間培養し、60%–70% confluentになった時、serum free FBS- $\alpha$  MEMに交換し、24時間培養したCMを使用した。3) Cell Scattering Assay：MDCK腎上皮細胞またはGB-d1胆嚢癌細胞を10% FBS-DMEM中で $2.5 \times 10^3$ 個/cm<sup>2</sup>播種し24時間培養後、癌細胞のCMや各種成長因子、抗体を添加し、更に24時間培養後、形態的变化を顕微鏡下で撮影した。4) HGFの測定：培養上清中のHGF濃度はELISA法にて測定した。5) *in vitro* Migration Assay：8  $\mu$ mの孔の開いた膜付きトランスウェルチャンバーの上室に、癌細胞を $5 \times 10^4$ 個/cm<sup>2</sup>播種し、24時間培養した。エタノール固定後、H&E染色を施し、孔を通過し膜下面に達した細胞数を顕微鏡下でカウントした。6) *in vitro* Invasion Assay：マトリゲルをコートした8  $\mu$ mの孔付きトランスウェルチャンバーの上室に癌細胞 $1 \times 10^5$ 個/cm<sup>2</sup>を播種し、24時間培養後、膜下面に達した細胞数を上記と同様にカウントした。また、Type I collagenゲル中にIF細胞 $5 \times 10^5$ 個/mlを播種し、7日間培養した後、形態的变化を顕微鏡下で撮影した。

### 研究結果

MDCKおよびGB-d1細胞は、IF-CM添加によりscattering活性を示し、その活性は抗TGF- $\alpha$ または抗TGF- $\beta$

1 抗体により、部分的に抑制されたが、抗 HGF 抗体では抑制されなかった。IF 細胞の migration 活性は、TGF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$  1 また HGF により濃度依存的に促進され、IF-CM 中の migration 活性は、抗 TGF- $\alpha$  および抗 TGF- $\beta$  抗体の同時添加によりほぼ完全に中和された。また、ヒト線維芽細胞による HGF 産生は IF-CM 濃度依存的に促進され、IL-1 受容体アンタゴニストで完全に抑制されたことより、IF 細胞は線維芽細胞による HGF 促進因子として、IL-1 を産生していることが判明した。即ち、IF 細胞の運動性は、TGF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$  1 によるオートクライン運動促進因子と線維芽細胞が産生する HGF によるパラクライン運動促進因子により制御されていることが明らかになった。

次に、マトリゲルをコートしたトランスウェルを用いた *in vitro* Invasion Assay の結果、TGF- $\alpha$  または TGF- $\beta$  1 は明らかな浸潤活性を示さなかったが、HGF のみが強い浸潤活性を示した。また、線維芽細胞の CM 中の浸潤活性も、抗 TGF- $\alpha$  抗体または抗 TGF- $\beta$  抗体では抑制できなかったが、抗 HGF 抗体の添加により抑制された。さらに、IF 細胞の浸潤性をコラーゲンゲル基質中の培養下で調べると、非添加、TGF- $\alpha$  または TGF- $\beta$  1 を添加したものは囊胞様構造の非浸潤性を示したのに対し、線維芽細胞の CM または HGF を添加したものは細胞間接着がなくなり、浸潤性を示していた。すなわち、HGF は IF 細胞の基底膜やコラーゲンへの浸潤を促進する活性を有していることが明らかとなった。IF 細胞の増殖に対する各因子の影響では、TGF- $\alpha$ 、HGF は弱い促進、TGF- $\beta$  1 は抑制を示した。

以上の研究結果から、臨床的に悪性度の高い IF 細胞においては、宿主線維芽細胞と相互作用しながら、細胞運動活性や浸潤活性を持ついくつかの因子を、オートクラインあるいはパラクラインに、巧みに利用しながら腫瘍微小環境下で高い浸潤、転移能が調節されている機序の一端が示された。

#### 論文審査の結果の要旨

癌の特徴である癌細胞の浸潤・転移機構を解明する目的で、癌細胞と宿主線維芽細胞との相互作用に焦点を絞り、癌細胞の運動促進因子を検討した。

まず、本実験の目的に適合した実験モデルを作成した。すなわち、口腔扁平上皮癌から浸潤・転移性の高い細胞株を作成した。その後、この細胞を用いた運動促進因子の解析を行った。

その結果、本細胞は TGF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$  1 によるオートクライン運動促進因子と、本細胞が産生する IL-1 によって線維芽細胞から産生される HGF によるパラクライン運動促進因子により制御されていることが明らかとなった。

さらにこの HGF は癌細胞株の基底膜やコラーゲンへの浸潤を促進する活性を有していることを明らかにした。

以上の結果は口腔癌の浸潤・転移機構を解明する上で極めて重要なデータを提供したものであり、博士（歯学）の学位を取得する資格があるものと認める。