

Title	ヒトKB癌細胞由来サイトカインによる末梢血Tリンパ球のCD26(DPPIV)発現抑制
Author(s)	田中, 仁
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/42827
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。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏 名	田 中 ひとし 仁
博士の専攻分野の名称	博 士 (歯 学)
学 位 記 番 号	第 1 5 9 0 1 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 1 3 年 2 月 2 8 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	ヒト KB 癌細胞由来サイトカインによる末梢血 T リンパ球の CD26 (DPP IV) 発現抑制
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 村 上 伸 也 講 師 額 田 純 一 郎

論 文 内 容 の 要 旨

口腔癌患者血清中のジペプチジルペプチダーゼ (DPP) IV 活性は健常人に比べ有意に低下し、病態を反映して変動することから、口腔癌のマーカーエンザイムとして有用であると考えられるが、活性低下の機序は明らかにされていない。

本酵素が活性化 T リンパ球に発現する CD26 であること、口腔癌患者では末梢血 CD26 陽性細胞数が減少していることから、癌細胞由来リンパ球活性化抑制因子が、DPP IV (CD26) の発現を低下させる一因となっていることが推測される。一方、リンパ球活性化を抑制する癌細胞由来のサイトカインとして TGF- β 1、GM-CSF、IL-6 が報告されているが、これらが口腔癌細胞から産生され、リンパ球 CD26 の発現に影響を与えるか否かは明らかにされていない。そこで本研究では、ヒト口底癌由来 KB 培養癌細胞 (KB 細胞) と正常ヒトリンパ球の無血清同時培養系を用いて、TGF- β 1、GM-CSF および IL-6 のリンパ球活性化と CD26 発現への影響を検討した。

リンパ球は、健常人の末梢血より比重遠心法で分離した。培養には無血清培地 (SFM-101) に PHA を添加したものをを用いた。同時培養法は、24 穴マルチプルウェルプレートにメンブレンカルチャーインサートを挿入し、下槽に KB 細胞を、上槽にリンパ球を同時培養した。培養後、リンパ球数の算定、リンパ球抽出液および培養上清中の DPP IV 活性を Kato らの方法で蛍光測定した。その結果、健常人リンパ球単独培養に比べ培養 5 日目のリンパ球数は、35% 減少し ($p < 0.05$)、リンパ球抽出液の DPP IV 活性で 49%、リンパ球培養上清中の DPP IV 活性は 35% 低下した ($p < 0.05$)。次に、KB 細胞培養上清添加によるリンパ球の増殖と DPP IV 活性への影響を検討するため、KB 細胞培養上清または分子量ごとに分画した KB 細胞培養上清をリンパ球培養液中に添加し、リンパ球数の算定と DPP IV 活性を測定した。KB 細胞培養上清 30% 添加群のリンパ球の増殖は、非添加群に比べ 35% 低下し、リンパ球抽出液の DPP IV 活性は 27%、培養上清中の DPP IV 活性では 38% それぞれ低下した ($p < 0.05$)。また、KB 細胞培養上清の各分画のうち 8-30kDa の分画添加群のリンパ球の増殖は非添加群に比べ 28% 低下した ($p < 0.05$)。培養上清の DPP IV 活性では 22% 低下 ($p < 0.05$) した。リンパ球抽出液中の DPP IV 活性では有意差はないものの、8% 低下した。KB 細胞培養上清中のリンパ球活性化を抑制するサイトカイン、TGF- β 1、GM-CSF、IL-6 の定量は ELISA 法で行った。その結果、5 日目の KB 細胞培養上清中に 88.67pg/ml の TGF- β 1、7.33pg/ml の GM-CSF、13.11pg/ml の IL-6 が検出された。サイトカインおよび中和抗体添加によるリンパ球の増殖と DPP IV 活性の変化を調べるため、リンパ球培養液中に TGF- β 1、GM-CSF、IL-6 を添加し、リンパ球の増殖と DPP IV 活性への影響

を検討するとともに、KB 細胞培養上清を30%添加した実験系に各々の中和抗体を添加しその作用を明らかにした。リンパ球培養液中に TGF- β 1、GM-CSF、IL-6 を添加し培養すると、TGF- β 1 添加群では濃度依存性にリンパ球数、DPP IV 活性の低下が認められた。さらに KB 細胞培養上清を30%添加した実験系に活性型 TGF- β 1 の中和抗体を添加したところ、濃度依存性に非添加群の64.5%までリンパ球増殖の回復がみられ、リンパ球抽出液および培養上清中の DPP IV 活性の抑制もそれぞれ72.2%、42.1%まで回復した。しかしながら抗 GM-CSF、抗 IL-6 抗体では変化はみられなかった。次に KB 細胞培養上清分画中のリンパ球活性化抑制因子についてさらに検討するため、KB 細胞培養上清中の8-30kDa 分画をヘパリン・セファロースゲルにて80に分画したのち、各々の分画をリンパ球培養液中に添加し、リンパ球数の算定と DPP IV 活性を測定した。その結果、TGF- β 1 を含む分画にてリンパ球の増殖抑制とリンパ球抽出液および培養上清中の DPP IV 活性の低下が認められ ($p < 0.05$)、TGF- β 1 を含まない分画においても、リンパ球の増殖抑制 ($p < 0.05$) が認められた。なお、統計学的な有意差はなかったものの、リンパ球抽出液および培養上清中の DPP IV 活性も低下した。

以上の結果から、口腔癌細胞に由来する活性型 TGF- β 1 がリンパ球の活性化と CD26 (DPP IV) の発現を抑制し、これが口腔扁平上皮癌患者血清 DPP IV 活性を低下させる一因であることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

本論文は、口腔癌細胞から産生されたサイトカインが T リンパ球 DPP IV (CD26) の発現に影響を与えるかを明らかにすることを目的とし、口腔癌培養細胞とリンパ球の無血清同時培養法を用いて検討したものである。

本研究は、口腔癌細胞由来活性型 TGF- β 1 が T リンパ球 CD26 発現抑制の一因であることを明らかにしており、口腔癌患者血清中の DPP IV 活性低下機序を解明する上で、また血清 DPP IV 活性を口腔癌のマーカーとして用いる上で極めて重要な知見を与えるものである。したがって、博士 (歯学) の称号を与えるに値するものと認める。