



Title	Cancer cell contact causes oscillatory and polarized rise of cytoplasmic ionized calcium concentration in human umbilical vein endothelial cells
Author(s)	辻, 慶久
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43826
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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について 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 つじ 慶 久

博士の専攻分野の名称 博 士 (医 学)

学 位 記 番 号 第 1 7 6 9 8 号

学 位 授 与 年 月 日 平成 15 年 3 月 25 日

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第 4 条第 1 項該当

医学系研究科外科系専攻

学 位 論 文 名 Cancer cell contact causes oscillatory and polarized rise of cytoplasmic ionized calcium concentration in human umbilical vein endothelial cells
(ヒト臍帯静脈血管内皮細胞における癌細胞接触刺激に伴う細胞内遊離カルシウム濃度の変化)

論 文 審 査 委 員 (主査)

教 授 門田 守人

(副査)

教 授 高井 義美 教 授 祖父江憲治

論 文 内 容 の 要 旨

【目 的】

血管内皮細胞 (EC) が癌細胞に接触すると形態変化が生じ、いわゆる開裂現象が起こる。しかし、癌細胞の接着刺激がどのような機序で EC の開裂現象を起こすかについては解明されていない。一方、細胞接触により EC の細胞内遊離カルシウム濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) が一過性に上昇することが報告されている。本研究では、開裂現象における $[Ca^{2+}]_i$ 動態の関与を明らかにすることを目的として癌細胞接触により生じる EC の形態変化と $[Ca^{2+}]_i$ 動態を経時的空間的に同時解析した。

【方 法】

EC にはヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) を、癌細胞にはヒト乳癌細胞株 MCF7 を用いた。合成細胞接着基質 MATRIGEL® (Becton Dickinson) を塗布したカバーガラス上に HUVEC を培養し、MCF7 細胞浮遊液を加えて刺激した。共焦点レーザー顕微鏡 (LSM) を用い、開裂現象及び $[Ca^{2+}]_i$ 動態を観察した。 $[Ca^{2+}]_i$ 測定には蛍光カルシウム指示薬 Fluo-3 を用い、開裂現象は微分干渉法 (DIC) により観察した。また、比較対照として MCF7 細胞培養上清 (CM)、マウス melanoma 細胞株 BL6、ヒト繊維芽細胞細胞株 WI38、ヒト好中球についても同様の検討を行った。

【成 績】

MCF7 細胞接触による HUVEC の開裂現象は接触部位周囲のみで認められた。 $[Ca^{2+}]_i$ の上昇は、MCF7 細胞の接触部位より始まり、HUVEC 細胞全体に wave として伝播した。さらにこの wave は隣接する HUVEC 細胞へも伝播した。MCF7 細胞が接触した HUVEC 細胞ではこの $[Ca^{2+}]_i$ の上昇は繰り返し生じ、oscillation として観察された。一方、CM 添加による開裂現象は細胞全体にわたり、diffuse に認められた。また、 $[Ca^{2+}]_i$ の上昇を認めたものの、HUVEC 細胞内及び細胞間における wave の伝播は認めなかった。細胞接触による $[Ca^{2+}]_i$ の変化は

paraformaldehyde 固定した MCF7 では認められず、また非特異的 calcium channel blocker である Ni^{2+} によっても抑制されなかった。このような細胞接触による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の変化は他の培養細胞株 (BL6、WI38) により惹起されたが、ヒト好中球では認めなかった。

【総括】

癌細胞接触部位で生じる局所的な EC の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇が細胞内及び細胞間に wave として繰り返し伝播することが明らかとなった。また、癌細胞の接触部位周囲でのみ開裂現象が認められることから、EC の開裂現象と $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇との密接な関連性が考えられた。この現象は生細胞の接触を必要とすることから接触刺激伝達には癌細胞表面分子の energy 依存的な活性が必要なこと、さらには Ni^{2+} により抑制されなかったことから、局所的な $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇及びそれに引き続く wave の伝播が Ca^{2+} の細胞内流入ではなくイノシトール 1、4、5 三リン酸 (IP_3) 依存性である可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

血管内皮細胞 (EC) が癌細胞に接触すると形態変化が生じ、いわゆる開裂現象が起こることが知られている。本研究では、EC の開裂現象における $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 動態の関与を明らかにすることを目的として、癌細胞接触により生じる EC の形態変化と $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 動態を共焦点レーザー顕微鏡を用いて経時的、空間的に解析し、以下の知見が得られた。

(1)癌細胞が接触した EC は開裂した。(2)癌細胞に接触した EC では局所的な $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇が生じ、それが細胞内、さらには細胞間に $[\text{Ca}^{2+}]_i$ wave として伝播した。さらに $[\text{Ca}^{2+}]_i$ oscillation として繰り返し観察された。(3)EC における $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の変化は固定化細胞では生じず、また、 Ca^{2+} channel blocker (Ni^{2+}) でも阻害されなかった。

以上の結果から、EC における $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 変化は、生細胞の接触を必要とする energy 依存的なもので、 Ca^{2+} influx ではなく、 Ca^{2+} mobilization によるものであり、さらにこの $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 変化は開裂現象と密接な関連性を持つことが強く示唆された。

本研究は、癌細胞の浸潤過程における宿主細胞側のシグナル伝達解明の一端となり、さらには癌の浸潤、転移を阻止する治療法の開発に寄与するものであり、学位に値するものと認める。