

Title	唾液腺培養細胞の腺房細胞分化におけるCEACAM1の役割と laminin gelによる唾液腺悪性腫瘍の治療
Author(s)	吉村, 奈津子
Citation	大阪大学, 2007, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/47614">https://hdl.handle.net/11094/47614</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 href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/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	吉村奈津子
博士の専攻分野の名称	博士(歯学)
学位記番号	第21048号
学位授与年月日	平成19年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 歯学研究科統合機能口腔科学専攻
学位論文名	唾液腺培養細胞の腺房細胞分化における CEACAM1 の役割と laminin 1 gel による唾液腺悪性腫瘍の治療
論文審査委員	(主査) 教授 古郷 幹彦 (副査) 教授 上崎 善規 助教授 西村 理行 講師 中澤 光博

#### 論文内容の要旨

(緒言) 唾液腺の分化過程の多くは未だ不明のままである。今回、唾液腺の分化について検討し、さらに唾液腺癌を分化させることで治療する方法を検索した。当教室において樹立されたヒト顎下腺由来腺癌細胞株 HSG は多分化能を有する細胞であり、当教室のこれまでの研究で、laminin 1 からのシグナルと 3D 培養の環境を与えると、腺房細胞に分化することがわかっている。また、c-Src dominant negative 強発現 HSG 細胞 (以下 SrcK297M とする) を同じ条件で培養しても、細胞間接着は減弱しており、腺房細胞分化がおこらないので、Src family tyrosine kinase は腺房細胞分化に関わっている。そこで、培地の Ca イオン濃度が低い状態でも腺房細胞分化をすることから、Ca イオン非依存性細胞間接着蛋白である CEACAM1 に着目した。CEACAM1 は膜貫通型で、細胞内ドメインの長いもの (CEACAM1-4L) と短いもの (CEACAM1-4S) があり、CEACAM1-4L の細胞内ドメインには、リン酸化を受ける tyrosine 残基がある。これは、Src family tyrosine kinase や SHP-1 および SHP-2 によってリン酸化が制御されており、その近傍には細胞内アクチンと間接的に結合する部位がある。その結合は Rho family の GTPase によって制御されている。腺房細胞分化の過程で細胞の核の偏芯が認められるが、これには、細胞骨格のアクチンフィラメントが関与していると考えられる。そこで、Rho family の関与についても検討した。さらに、laminin 1 gel の腫瘍抑制作用および腺房細胞分化への関与について、in vivo で検討した。

(材料と方法) ①HSG を laminin 1 gel 上で培養し、real time PCR を用いて、CEACAM1-4L と CEACAM1-4S の mRNA の発現をそれぞれ調べた。②CEACAM1-4L の cDNA において、細胞内ドメインにある 520 番目の tyrosine をコードする塩基配列 TAT に mutation を加え、phenylalanine をコードする塩基配列 TTC に置換した。この cDNA を発現ベクターに挿入して、HSG に強発現させ、CEACAM1-Y520F 細胞を樹立した。この細胞を laminin 1 gel 上で 72hr 培養し蛍光染色してその形態および CEACAM1、リン酸化チロシンの発現を共焦点顕微鏡にて検討した。また、HSG を laminin 1 gel 上、かつ 1  $\mu$ g/ml の C3 transferase (RhoA, B, C 阻害剤) を含む培養液内で 72hr 培養し同様に検討した。③胎生 13.5 日齢のマウス胎児の顎下腺原基をメンブレン上で器官培養し、顎下腺上に laminin 1 gel を添加した。それに加え、培養液に C3 transferase、PP2 (Src family tyrosine kinase 阻害剤) をそれぞれ加えたものを作製し、顎下腺原基の budding を位相差顕微鏡で観察し、評価した。④ヌードマウスに HSG を接種して腺癌を作製し、その周囲に laminin 1 gel を繰り返し注入し、腫瘍組織の変化を観察した。また、HSG、CEACAM1-Y520F、

SrcK297M をそれぞれ接種し腫瘍の体積を比較検討した。

(結果)①HSG で、CEACAM1-4L と CEACAM1-4S の mRNA の発現をみとめた。②CEACAM1-Y520F を laminin 1 gel 上で培養しても、核の偏芯はなく細胞間接着は減弱しており、腺房細胞には分化しなかった。HSG を laminin 1 gel 上で培養し、培養液に C3 transferase を加えた場合も同様の結果となった。HSG では細胞膜上に CEACAM1 とリン酸化チロシンが集積しているのに対し、CEACAM1-Y520F では CEACAM1 の集積は弱く、同部のリン酸化は抑制されていた。③マウス胎児顎下腺の器官培養において、laminin 1 gel を添加した場合 budding が促進された。また、PP2 を加えて Src family tyrosine kinase を阻害した場合も、C3 transferase を加えて Rho family を阻害した場合も budding が抑制された。④ヌードマウスの腫瘍周囲 (HSG 由来) に laminin 1 gel を注入した場合、腺癌細胞の一部が分化し腺房様組織を形成した。この腺房様組織を human salivary amylase に対する抗体で免疫染色したところ、内側の細胞に染色性を示した。CEACAM1-Y520F 由来の腫瘍では腫瘍サイズの増大が著しかった。

(結論) 本研究において、laminin 1 が培養細胞でも器官培養においても腺房細胞分化を誘導する因子であり、さらに唾液腺腫瘍を腺房様細胞に分化誘導することが示唆された。さらに、CEACAM1 がそれに関与していることを明らかにした。

### 論文審査の結果の要旨

本研究は、laminin 1 が培養細胞でも器官培養においても腺房細胞分化を誘導する因子であり、さらに唾液腺腫瘍を腺房様細胞に分化誘導することを示唆した。さらに、CEACAM1 がそれに関与していることを明らかにした。この結果は今後の唾液腺悪性腫瘍の治療に新たな試みを期待し得るものと考えられ、博士 (歯学) の学位に値するものと認める。