

氏名・(本籍)	永 易 裕 樹 (北海道)
学位の種類	博 士 (歯学)
学位記番号	甲 第26号
学位授与の日付	平成6年3月19日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 (課程博士)
学位論文題目	Epidermal growth factor (EGF) による 退縮型癌細胞ER-1の浸潤, 転移能の促進に関する研究
論文審査委員	主 査 教 授 村 瀬 博 文 副 査 教 授 市 田 篤 郎 副 査 教 授 賀 来 亨

論 文 内 容 の 要 旨

緒 言

口腔癌の治療において、癌細胞のもつ浸潤能、転移能は、その程度によって再発、転移などを招来し、治療上重大な障害となっている。最近になり、この癌細胞の浸潤、転移能などの悪性形質は、発癌当初より有しているものではなく、その発生、増殖の過程において、周囲正常細胞より放出される種々の増殖因子によって促進され、悪性形質として獲得されている可能性が示されて来ている。また、口腔扁平上皮癌細胞は、上皮成長因子 (Epidermal growth factor: EGF) 受容体を過剰に発現しており、EGFによりその浸潤、転移能が増強される可能性も示唆されて来ている。しかし、EGFが癌細胞の悪性化におよぼす影響についての詳細な検討は少なく不明な点も多い。そこで、高血圧自然発症 (SHR) ラットに自然発生した乳癌細胞 (c-SST-2) より分離された造腫瘍性、転移能の低いクローンER-1細胞を用いて、EGFがER-1細胞の造腫瘍性および浸潤転移能獲得におよぼす影響を検討した。

材料と方法

動物: SHRラットは日本ラット(株)より購入し、7~10週齢の雌を実験に用いた。

細胞: 腫瘍細胞は、SHRラット自然発生乳癌細胞 (c-SST-2) の培養株を突然変異原物質 ethylmethansulfonate で処理し、得られたクローンのうち造腫瘍性の極端に低下したER-1細胞を退縮型癌細胞として用いた。また、ラット肺血管内皮細胞 (rat lung endothelial cell: RLE) はF344ラットの肺胞毛細血管

より分離された細胞株を用いた。

細胞培養: ER-1細胞は、7%牛胎児血清を含むMEM培地にて、またRLEは10%牛胎児血清を含むDMEM培地にて37°C, 5%CO₂, 95%air条件下で培養維持した。

EGF処理: EGF処理は、培養中のER-1細胞にEGF濃度が10ng/mlとなるようにヒトr-EGFを培地に添加し、24時間、1カ月間培養を行った。また、1カ月間EGF処理したER-1細胞は、その後、1カ月間あるいは2カ月間EGF非存在下で培養し、実験に用いた。

in vitro invasion assay: 1%ゼラチンでコートしたグリッド付きシャーレにRLEを単層培養し、その上にEGF処理ER-1細胞を重層培養し、96時間後にRLE下にもぐりこみ、形成されたコロニー数を計測し、これを単位面積 (cm²) あたりのコロニー数に換算し、浸潤能を評価した。

Chemo-invasion assay: トランスウェルチャンバー (小孔8μm) を用いて、フィルター上面には基底膜構成成分であるマトリゲルをコートし、下室にRLEの培養上清を入れ、上室にはEGF処理ER-1細胞を入れ72時間後、フィルター下面に浸潤した細胞数を計測し、走化能の変化を評価した。

in vivoにおける浸潤, 転移能: ER-1細胞およびEGF処理ER-1細胞 (1×10⁵個) を、同系ラット腹腔内、または尾静脈内移植し、移植50日後にラットを屠殺し、腹腔内腫瘍と、肺転移結節を観察した。

Zymography: EGF処理ER-1細胞の培養上清をゼラチンを基質とするzymographyを行い、細胞外マトリックス分解酵素の検索を行った。

EGF binding assay: [¹²⁵I] EGFを用いて、EGF 1カ月

間処理ER-1細胞に結合するEGFと遊離EGFの放射活性をガンマカウンターにて測定し、スキッチャード解析を行いEGF結合能と受容体数を検索した。

EGF受容体mRNAの検索：通法のフェノール抽出法により、ER-1細胞およびEGF 1カ月間処理ER-1細胞からRNAを抽出し、ラットEGF受容体に対するプライマーを用いて通法の、RT-PCR法にてmRNA発現量の変化を検索した。

結 果

1. EGFが細胞増殖におよぼす影響

ER-1細胞は、EGF24時間処理により、無処理ER-1細胞に比べ培養開始3日目から有意な細胞数の増加が認められた。

2. EGFがER-1細胞のin vitro浸潤能および走化能におよぼす影響

in vitro invasion assayにおいて、RLEに対する浸潤能を調べた結果、無処理ER-1細胞は極わずかな浸潤能を示すのに対して、EGF24時間処理により有意 ($P < 0.001$) な浸潤能の促進が確認された。しかし、EGF24時間処理による浸潤能の促進は可逆的でEGF非存在下で培養し続けると経時的に低下し、4日目には元のER-1細胞の状態となった。一方、ER-1細胞をEGF 1カ月間処理すると、促進された浸潤能は、1カ月および2カ月間EGF非存在下で培養しても決して元のER-1細胞のレベルに戻ることなく高い浸潤能を維持していた。また、トランスウエルチャンバーを用いたchemo-invasion assayにおいてもEGF24時間処理ER-1細胞では一過性の走化能の促進を示すのに対し、EGF 1カ月間処理ER-1細胞ではその後1カ月走化能の亢進を認めた。

3. EGF処理がin vivo浸潤、転移能におよぼす影響

無処理ER-1細胞は、腹腔内および尾静脈内移植において、ほとんど浸潤性増殖を示さないのに対し、EGF24時

間処理ER-1細胞では腹腔内の強い浸潤性増殖、肺転移能が観察された。しかし、このような性格はin vitroの結果と同様に可逆的で4日目には元のER-1細胞の状態に戻っていた。一方、EGF 1カ月間処理ER-1細胞ではその後2カ月間高い浸潤、転移能を維持していた。

4. EGFがER-1細胞のゼラチナーゼ産生におよぼす影響

EGF24時間処理ER-1細胞では、ゼラチナーゼ産生に変化は認めなかったが、EGF 1カ月間処理ER-1細胞では、その産生が亢進していた。

5. EGFによるEGF受容体数と結合能の変化

スキッチャード解析の結果、ER-1細胞は、高親和性受容体 1.2×10^5 個、低親和性受容体 4.0×10^5 個を発現していた。しかし、ER-1細胞とEGF 1カ月処理ER-1細胞を比較してもEGF受容体数および結合能に差は認められなかった。

ER-1細胞およびEGF 1カ月間処理ER-1細胞において、EGF受容体mRNAは、同等に発現されていた。

考 察

本研究の結果、EGFがER-1細胞の浸潤、転移能を有意に促進することがin vivo, in vitroにおいて明らかとなった。また、EGF長期間処理によって、これら浸潤、転移能の増強は、安定した形質として維持されることも明らかとなった。一方、EGF処理によるEGF受容体の発現量は、膜面、mRNAレベルともに変化していなかったことより、今回、明らかとなった現象は、EGFに感受性を示す細胞の単純な選択によって生じている可能性は少ないと考えられた。以上のことより、癌細胞をとりまく微小環境中に存在する内在性因子の一つである増殖因子EGFが、癌細胞の悪性化進展に深く関与する可能性が明らかとなった。

学 位 論 文 審 査 の 要 旨

口腔癌の治療において、癌細胞のもつ浸潤能、転移能は、その程度により再発、転移を招来し、治療上重大な障害となっている。癌細胞の浸潤、転移能などの悪性形質は、その発生、増殖過程において、周囲正常細胞より放出される種々の増殖因子によって促進される可能性がある。特に、上皮成長因子(EGF)は、表皮角化細胞をはじめとする上皮由来の正常細胞の増殖や分化を促進させること以外に、癌細胞の増殖、浸潤、転移能に深く関与することが明らかにされて来ている。しかし、EGFが癌細胞の浸潤、転移などの悪性形質におよぼす影響につ

いての詳細な検討は少なく不明な点も多いままとなっており、その機序解明は、意義あるものと考えられる。

そこで、高血圧自然発症(SHR)ラットに自然発生した乳癌細胞(c-SST-2)より分離され、造腫瘍性、転移能の低いクローンER-1細胞を用いて、EGFがER-1細胞の造腫瘍性、浸潤転移能獲得に及ぼす影響を検討した。

その結果、癌細胞を取巻く微小環境中に存在する内在性因子である増殖因子のEGFが、癌細胞の悪性化進展に深く関与する可能性を示すとともに、EGFが発癌のtumor progression因子として、genetical作用する可

能性を示唆したものである。

以上の審査結果について、本審査委員会は本論文が歯

科医学の進歩発展に寄与するところ大であり、博士（歯学）の学位授与に値すると判定した。

氏名・(本籍)	河野英司(北海道)
学位の種類	博士(歯学)
学位記番号	乙第16号
学位授与の日付	平成6年3月19日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当(論文博士)
学位論文題目	ヒト歯槽骨由来細胞の 増殖・分化に関する研究
論文審査委員	主査 教授 五十嵐 清 治 副査 教授 市田 篤 郎 副査 教授 矢嶋 俊 彦

論文内容の要旨

1 目 的

従来の正常ヒト骨芽細胞の培養系研究モデルはほとんどが軟骨内骨化により生じる軟骨性骨由来のものであるのに対し、顎骨は膜内骨化による膜性骨であり、細胞レベルにおいても軟骨性骨とは異なる性格を有していると考えられる。したがって、顎骨や歯槽骨における代謝や種々の形成異常を理解するためには、顎骨・歯槽骨由来の細胞を用いた培養実験系を確立する必要があると思われる。

そこで著者は、ヒト歯槽骨由来骨芽細胞培養系研究モデルを確立することを目的に、正常なヒトの下顎歯槽骨より細胞を分離培養し、その細胞の骨芽細胞様分化形質マーカーについて検索した。

II 実験材料および方法

1. 細胞の分離・培養

本実験に供した細胞は、①21歳女性の下顎左側半埋伏智歯の遠心部皮質骨、②13歳男性の「56 間完全埋伏過剰歯の頬側皮質骨、および③海綿骨、④16歳女性の下顎左側半埋伏智歯周囲の海綿骨の4つの正常ヒト下顎歯槽骨骨片から、Robey and Termineの方法に準じて分離・培養した。すなわち骨片を1.5%コラゲナーゼで37°C、60分間酵素処理した後、ハサミで1mm角程度に細切し、24穴(ウェル)組織培養プレートに移植した。移植骨片の培養は、10%ウシ胎児血清(FBS)、50 μg/ml L-アスコ

ルビン酸(AsA)、および抗生物質を添加したダルベッコ変法イーグル培地(D-MEM)を用い、5%CO₂-95%空気、37°Cの湿潤環境下で行った。約2~4週間の培養後、骨片より遊走した細胞を0.25%トリプシンで浮遊させ回収し、2.7×10⁴個/cm²の細胞密度で継代培養した。約1週間に1回の割合でさらに継代培養をくり返し、得られたヒト歯槽骨由来細胞(HAB cells)を以後の実験に用いた。

対照群として用いたヒト歯根膜線維芽細胞(HPLF)は、神奈川歯科大学口腔生化学教室・斎藤滋教授より供与を受けた。

2. ALP活性の測定

HAB cellsおよびHPLFを96ウェル培養プレートに2.7×10⁴個/cm²の細胞密度で播種し、培養24時間後より100nMデキサメタゾン(Dex)、または5 nM 1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃(D₃)を添加し、培養5日後のアルカリホスファターゼ(ALP)活性を測定した。ALP活性の測定はLowryら、およびPuzasらの方法を基とした久保および川瀬の変法に従った。

また、Dex添加時および非添加時のALP活性の経時的変化を培養19日目まで観察した。

3. PTHに対する細胞内cAMPの応答性

HAB cellsおよびHPLFを6ウェル培養プレートに前述の細胞密度で播種し、培養24時間後から100nM Dexの添加・非添加条件下で培養した。培養10日目に、20nM副甲状腺ホルモン(PTH)または100 μMホルスコリンを添