

学位論文審査の要旨

ヒドロキシアパタイト（以下HAPと略す）は、組織刺激性や免疫反応がないため、生体親和性に優れ、高い骨伝導能を有することから注目されている。HAPは、焼成温度の違いにより、その可溶性および機械的強度などの物理化学的性質に差異が生ずる。とくにHAPの可溶性は、低温度焼成の場合に大きくなると考えられ、組織の生理作用を活性化させ、骨の新生を促進すると考えられる。そこで、本研究では、低温度焼成HAPの可溶性に着目し、高温度焼成HAPを比較対照群として、可溶性と骨形成能の関係を明らかにすることを目的とした。すなわち、高温度焼成HAPとして、焼成温度1,250°Cで合成された顆粒（以下SHAPと略す）と、SHAP表面上に、湿式でHAPをコーティングし、150°Cで焼成したコーティングHAP顆粒（以下CHAPと略す）の2種類をそれぞれ雑種成犬の下顎骨に作創した骨欠損部に埋入し、両群の新生骨の形成過程について、X線学的ならびに組織学的に検討した。

その結果、埋入後7日では、CHAP群では頬舌側皮質骨の内・外側面および皮質骨断端部の一部に新生骨が認められた。埋入後14日では、CHAP群では頬舌側皮質骨内側面に近接したHAP顆粒間隙に新生骨が認められたが、SHAP群では埋入後7日の所見と差異を認めなかった。埋入後14日、30日、60日および90日まではCHAP群で、SHAP群に比べて新生骨の形成が活発にみられたが、埋入後120、180日になると、両群間での新生骨の形成に差を認めなかった。

本研究から、高温度焼成HAP顆粒に低温度焼成HAPをコーティングしたものは、機械的強度の要求される骨欠損部位の架橋材として、埋入早期において骨形成を促進する有用な人工骨補填材料となることが示唆された。

以上の結果から、本論文は、歯科医学の進歩発展に寄与するところが大きく、審査の結果、学位授与に値すると判定された。

氏名・(本籍)	河野 峰 (北海道)
学位の種類	博士(歯学)
学位記番号	甲 第36号
学位授与の日付	平成8年3月22日
学位授与の要旨	学位規則第5条1項該当(課程博士)
学位論文題目	上皮増殖因子(EGF)によるヒト口腔扁平上皮癌細胞の運動能促進作用とその組胞内情報伝達経路に関する研究
論文審査委員	主査 教授 金澤正昭 副査 教授 市田篤郎 副査 教授 賀来 亨

論文内容の要旨

I. 緒 言

癌細胞の運動能は、癌の浸潤・転移において必要不可欠な細胞生物学的性状の一つである。また、癌細胞を取り巻く微小環境中には様々な増殖因子やサイトカインが

存在し、これが癌細胞の運動能をはじめとする悪性形質の発現を修飾していると考えられている。本研究で検討したヒト口腔扁平上皮癌(口腔癌)細胞は、上皮増殖因子(Epidermal growth factor: EGF)に対する受容体(EGFR)を過剰発現していることが知られ、口腔内環境

にはEGFを多く含む唾液が常に存在している。そこで、EGFに着目し、EGFがヒト口腔癌細胞の運動能に及ぼす影響、その作用様式を検討した。さらに、作用機序を明らかにするために、口腔癌細胞の細胞内情報伝達経路についての検討を行った。

II. 材料と方法

細胞：5系の口腔癌細胞株(SAS, CA9-22, HSC-2, HSC-3, HSC-4,)とCa9-22より樹立したクローンs-1細胞を用いた。

運動能の測定：運動能の測定はAlbrecht BuehlerのPhagokinetic track assayに準じて行った。ウシ血清アルブミンと金コロイドをコートしたカバーガラス上に癌細胞(2×10^3 /dish)をまき、CO₂インキュベーター内で24時間培養後、顕微鏡下でカバーガラス上の細胞およびその軌跡を観察し、この面積を画像解析装置で計測し、運動能を評価した。

細胞の処理：各口腔癌細胞は、ヒト・リコンビナントEGF, 抗EGF抗体, 抗EGFレセプター抗体, Erbstatin analog, Psitectorigenin, Phorbol12-Myristatel3-Acetate (PMA), Calphostin CならびにWortmanninにより処理を行った。処理は、細胞をまくのと同様に各々をアッセイ系に添加して行い、運動能の変化を観察した。

EGFの検索：6ウェルプラスチックプレートに 5×10^5 個/ウェルの各株の癌細胞をまき、血清非存在下で48時間培養後の培養上清中に含まれるEGFを、抗EGF抗体を用いたイムノプロット法にて測定した。

細胞内PKCトランスロケーションの検索：12ウェルHTコーティングスライドに 2.5×10^3 個/ウェルのs-1細胞をまき、24時間培養後血清非存在下で12時間培養した後、EGF (100ng/ml) を添加し、1, 5, 10, 30, 60分後にメタノール, アセトンで固定し、抗プロテインキナーゼC (PKC) 抗体およびFITCラベル抗マウスIgG処理し、細胞内PKCの局在を共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。

III. 結果

1. パラクリン様式によるEGFの運動能促進作用：口腔癌5系の培養株細胞をEGFで処理すると、SAS, Ca9-22ならびにHSC-3の運動能は処理濃度依存性に有意に促進され、他の2系でも促進傾向がみられた。また、EGF未処理の対照群の運動能を5系の細胞株間で比較すると、SASの運動能が他の4系に比べ有意に高い値を示していた。

2. 口腔癌細胞の産生・分泌するEGFの検索：EGF無添

加でも高い運動能を示すSASの培養上清中に7.8~15.6 ng/ml/ 2.5×10^5 細胞のEGFがイムノプロット法にて検出されたのに対し、運動能の低い他の4系ではHSC-2でSASの1/4程度のEGFが認められた以外は検出限界以下であった。

3. オークリン様式によるEGFの運動能促進作用：中和活性のある抗EGF抗体を運動能のアッセイ系に加え検討した。その結果SASの運動能は対照群に比較すると有意に低下した。さらに、EGFRを介して運動刺激の情報が伝達されていることを確認する目的で、EGFRへの結合を阻害する抗EGFR抗体およびEGFRのチロシンリン酸化阻害剤であるErbstatin analogでSASを処理し、運動能を検討したところ、これらの抗体および薬剤はSASの運動能を抑制した。また、SASの培養上清は、Ca9-22あるいはHSC-3細胞の、運動能を有意に促進した。

4. EGFにより誘導される細胞運動に関する細胞内情報伝達経路の検討：EGFに応答性の高いCa9-22細胞をクローニングし、EGF高感受性クローンs-1細胞を樹立し、これをEGFによって引き起こされる細胞運動に関する細胞内情報伝達経路についての検討に用いた。Erbstatin analogあるいはPIターナーオーバーを阻害するPsitectorigeninでs-1細胞を処理したところ、EGFによる運動能の変化は消失し、EGF未処理細胞と同等であった。次に、EGF非存在下でs-1細胞にPMAを添加しPKCを活性化させたところ、EGFで誘導されるのと同様の運動能の促進が認められ、逆にPKC活性を阻害するCalphostin Cで処理したところ、EGFで促進される運動能は消失した。また、PKCを活性化する別の情報伝達系の機能ドメインの1つであるPhosphatidyl inositol3-kinase (PI3-キナーゼ)の阻害剤Wortmannin処理したところ、同様にEGFによるs-1細胞の運動能の促進は抑制された。

5. EGFによるPKCトランスロケーションの観察：s-1細胞にEGFを処理し、1, 5, 10, 30および60分後のPKC細胞内局在の変化を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。EGF処理1分後より細胞内PKCは細胞質から細胞膜へ移行しているのが観察され、EGFによるPKCの活性化が推察された。

IV. 考察

本研究の結果、EGFはヒト口腔扁平上皮癌5系の培養細胞株にパラクリン様式で作用し、細胞運動性を増強すること、このうちの1系SASは自らがEGFを産生・分泌し、オートクリン様式で作用し、運動能を高めていることが明らかとなった。また、EGFによる細胞運動の情報伝達はEGFRを介したPLC γ , PKCの活性化による経路

により生じていると考えられた。一方、PI3-キナーゼ阻害により運動能の促進が抑制されたことよりPI3-キナーゼを介する他の経路も関与している可能性が示唆された。以上、癌細胞を取り巻く微小環境中に存在するEGFが癌細胞の転移形成に必要な不可欠な癌細胞の運動

能をパラクリン様式およびオートクリン様式で促進すること、さらに、EGFによる細胞運動促進作用に関与する細胞内情報伝達経路として、PLC γ およびPI3-キナーゼを介するPKCの活性化経路によって生じている可能性が示唆された。

学 位 論 文 審 査 の 要 旨

癌細胞の運動能は、癌の浸潤・転移において必要不可欠な細胞生物学的性状の一つである。癌細胞周囲の微小環境中には様々な増殖因子やサイトカインが存在し、癌細胞の運動能などの悪性形質発現を修飾することが知られている。ヒト口腔扁平上皮癌細胞は、上皮増殖因子(EGF)に対する受容体を過剰発現し、EGFを多く含む唾液と常に接する環境下にある。そこで、EGFが口腔癌細胞の運動能に及ぼす影響に着目し、その作用様式と細胞内情報伝達経路の検討を行った。

研究結果は以下の如くである。

1. EGFがヒト口腔扁平上皮癌細胞の運動能に及ぼす影響。
 - (1) 口腔癌 5 系の培養株細胞のうち 3 系の運動能は EGF処理濃度依存性に有意に促進され、他の 2 系においても促進傾向が認められた。
 - (2) EGF未処理のSAS細胞の運動能が他の 4 系に比べ有意に高く、SAS細胞の培養上清中にはEGFが検出された。
 - (3) 抗EGF抗体、抗EGFR抗体およびチロシンリン酸化阻害剤処理でも、SAS細胞の運動能は抑制された。
 - (4) 以上の結果から、EGFは 5 系のヒト口腔扁平上皮

癌細胞株に対しパラクリン様式で作用し、この中の 1 系SAS細胞に対してはオートクリン様式でも作用し、運動能を増強することが明らかとなった。

2. EGF高感受性クローンs-1細胞の、EGFによる運動能促進に関わる細胞内情報伝達経路の検討。

- (1) s-1細胞にチロシンリン酸化阻害剤、イノシトールリン脂質代謝回転阻害剤、プロテインキナーゼC (PKC) 阻害剤と、ホスファチジルイノシトール 3 キナーゼ (PI3K) 阻害剤で処理すると、EGFによる運動能の促進作用は消失した。
- (2) 共焦点レーザー顕微鏡による観察では、s-1細胞をEGFで処理するとPKCが細胞質から細胞膜へ移行することが確認された。
- (3) これらのことから、EGFによる運動能の促進はEGF受容体の活性化後PLC γ 、PKCの活性化による細胞内情報伝達経路と、別のPI3K活性化を介する経路によるPKC活性化によっても誘導される可能性が示唆された。

以上の結果から、本論文は、口腔癌治療の進歩発展に寄与するところが大きく、審査の結果、学位授与に値すると判定した。