

氏名・(本籍)	田中真樹(北海道)
学位の種類	博士(歯学)
学位記番号	甲第48号
学位授与の日付	平成9年3月21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	Transfection of Antisense Cu-Zn Superoxide Dismutase c-DNA Promotes Motility and Metastasis of Murine Fibrosarcoma Cells (Cu-Zn superoxide dismutase antisense c-DNA導入によるマウス腫瘍細胞の運動能および転移能の促進)
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

### 目 的

superoxideを初めとする活性酸素は、生体内で好気性呼吸の副産物として常に産生され一般に、酸素傷害を生じ有害とされている。ほとんどの生物は細胞内にこれらの活性酸素を消去する機構を備えている。なお、癌病巣においては、浸潤した好中球やマクロファージから活性酸素が多く産生され、様々な影響を及ぼしていると考えられる。すなわち、活性酸素が高濃度に存在した場合、癌細胞に対して殺細胞性に作用すると考えられるが一方、殺細胞を生じないような濃度では、活性酸素によって癌細胞の浸潤能および転移能が増強するとの報告もある。一方、由崎らはsuperoxideの消去酵素の一つであるCu-Zn Superoxide dismutase (SOD) をマウスに投与したところ、癌の転移が抑制されたこと、さらにその機序は、superoxideによる浸潤能効果をSODが抑制することによると報告している。これらのことから本研究ではSODが、癌細胞の浸潤能ひいては転移能を規定する因子の一つであることを想定してマウス肉腫細胞(Meth A)由来、低転移クローン(ML-01)および高転移クローン(MH-02)の細胞内SOD活性を比較した。さらに、ML-01にCu-Zn SODのantisense c-DNAを導入することにより、細胞内のSODの活性を変化させた場合の腫瘍細胞の浸潤能および転移能の変化を検討した。

### 材料および方法

1) Cells: murine methylcholanthrene induced A fibrosarcoma (Meth A) からFelderらの方法により茂木らが樹立した、高転移クローン(MH-02)および低転移クローン(ML-01)を用いた。2) Intracellular SOD Activity: OberleyとSpitzらの方法に準じてNBT法にて測定した。3) Plasmids: neo耐性遺伝子を含むVector(pRc/CRV)及びmouse Cu-Zn SOD c-DNAをligation反応によりantisense方向に挿入されているpRc-AS-mSODを得た。4) DNA Transfection and Clonal Selection: lipofection法にて、低転移クローン(ML-01)にpRc-AS-mSODを遺伝子導入しML-AS、Vectorのみを導入しML-neoを得た。G418にてselectionを行いML-AS1-5クローン、ならびにML-neoクローンを得た。5) Detection of Cu-Zn SOD Antisense and Neomycin Resistance Gene: ML-AS1-5クローンおよびML-neoクローンからDNAを抽出しCu-Zn SODおよびneo primerを用いてPCR法にて確認した。6) Western Blotting analysis: 阪大、谷口直之先生より供与を受けた抗rat Cu-Zn SODおよびrat Mn-SOD抗体を用いて施行した。また、発現量をdensitometric assayにより検討した。7) In vivo Tumor Growth: BALB/c mice皮下に細胞を投与し7日と14日の腫瘍径を測定した。8) Migra-

tion assay・<sup>125</sup>IUDRでラベルした細胞をTranswell double chamberに加え、12時間後にfilterを通過した細胞をgamma counterにて測定した。9) Experimental Pulmonary Metastasis・BALB/c mice尾静脈から細胞を投与し、2週間後に屠殺し肺を摘出後、肺転移結節数を算定した。

## 結 果

1) MH-02, ML-01の転移能と細胞内SOD活性: MH-02はML-01と比較して約4倍の転移能を認めた。ML-01のCu-Zn SOD活性は、MH-02の約3倍であった。Mn-SOD活性は両者で有意な差を認めなかった。つまり転移能と細胞内Cu-Zn SOD活性は、逆相関関係にあった。

2) PCR Analysis: ML-AS1-5クローンは、Cu-Zn SOD antisense c-DNA sequenceに一致する445bpのbandを認めた。またML-neoおよびML-AS1-5クローンはneo resistance geneに相当する、417bpのbandを認めた。

3) ML-ASクローン, ML-neoの細胞内SODレベル: ML-ASクローンのCu-Zn SOD活性はML-neoと比較して、約1/2・1/4と有意に抑制されていた。Mn-SOD活性は有意な差を認めなかった。Western Blotting analysisにより検討した結果、ML-ASクローン, ML-neoは抗rat Cu-Zn SODおよび抗rat Mn-SOD抗体により蛋白の発現を確認した。densitometric assayによる検討では、ML-ASクローンのCu-Zn SOD発現量はML-neoと比較して、約1/2-1/4と有意に抑制されていた。Mn-SOD発現量には有意な差を認めなかった。

4) ML-ASクローン, ML-neoのmigration・ML-ASクローンは、ML-neoと比較して有意に運動能が高かった。

さらにHPX+XODによるsuperoxide発生系で、ML-ASは1.3-1.8倍と運動能が促進したがML-neoでは変化を認めなかった。

5) in Vivo growth・ML-ASクローンとML-neoの間でgrowthには有意な差は認められなかった。

6) Experimental Pulmonary Metastasis・ML-ASクローンは、ML-neoと比較し2.1-4.5倍の肺転移結節を認めた。

## 考 察

腫瘍細胞は原発巣ならびに血中で、腫瘍細胞自身あるいは単球や好中球から産生されたsuperoxideに接触し転移形成の過程に影響を与えられられる。superoxideを消去する酵素である細胞内Cu-Zn SODの活性が高いML-01, ML-neoは細胞内外で発生したsuperoxideを十分に消去しsuperoxideによる作用を受けないことから、浸潤能および肺転移能が低い。しかし、MH-02やantisense Cu-Zn SOD導入細胞ML-ASの細胞内Cu-Zn SOD導入細胞ML-ASの細胞内Cu-Zn SOD活性は低く、superoxideを消去できないため浸潤能および肺転移能が高いと考えられる。

## 結 語

細胞内Cu-Zn SOD活性を測定したところML-01はMH-02の3倍であった。antisense c-DNA導入により低転移クローン (ML-01) 浸潤能ならびに肺転移能が増強した。以上のことから、細胞内SOD活性すなわちsuperoxideが浸潤能および転移能を規定する重要な因子の一つであることが示された。

## 学 位 論 文 審 査 の 要 旨

癌の転移には、腫瘍細胞および宿主側のさまざまな因子が関与していることは周知の事実である。なかでも、superoxideをはじめとする活性酸素は一般的には癌細胞に対して障害的に作用するとされているが、癌の転移に対しては促進的に作用することが知られている。そして、superoxideの消去酵素であるCu-Zn superoxide dismutase (SOD) をマウスに投与すると癌の転移が抑制されたとの報告がある。そこで、著者は、SODが癌細胞の運動能ひいては転移能を規定する因子の一つであることを想定し、マウス肉腫細胞 (MethA) 由来、低転移クローン (ML-01) および高転移クローン (MH-02) の細胞内に於けるCu-Zn SOD活性を検討した。さらに、ML-01にCu-Zn SOD antisense cDNAを遺伝子導入した際の、腫瘍細胞の運動能および転移能の変化を検討し、以下の結

果を得た。

1. ML-01はMH-02に比しCu-Zn SOD活性が有意に高かった。すなわち、転移能と細胞内Cu-Zn SOD活性の間には逆相関関係を認めた。

2. ML-01にantisense Cu-Zn SOD cDNAを遺伝子導入して得られたML-ASと、vectorのみを導入したML-neoのCu-Zn SOD活性を比較するとML-ASは、有意にその活性が抑制されており、細胞運動能はML-neoに比しML-ASで亢進していた。

3. HPX/XODによって産生したsuperoxideを作用させると、ML-ASの運動能は促進されたが、ML-neoでは変化を認めなかった。

4. マウス尾静脈からML-ASおよびML-neo細胞を静注し、肺への転移を検討したところ、ML-neoに比し、ML

-ASは明らかに高い転移能を示した。

5. 以上の所見から本研究では, MethA細胞はantisense Cu-Zn SOD cDNA遺伝子導入により細胞運動能が亢進され, その結果転移能が増強されることが証明された。また, 細胞内のSODは, 腫瘍細胞の運動能と転移能を規定する重要な因子の一つであることが推察された。

上述の如く本研究は, 遺伝子導入という新技術を応用した癌の転移に関する基礎的研究であるが, 臨床的に癌治療の予後を最も大きく左右する因子である転移の制御に資するところが大きく, 審査の結果, 本論文は学位授与に値するものと判定した。

氏名・(本籍)	横山 雄一 (北海道)
学位の種類	博士 (歯学)
学位記番号	甲 第49号
学位授与の日付	平成9年3月21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	身体運動時のクレンチングに関する研究
論文審査委員	主査 教授 平井 敏博 副査 教授 坂口 邦彦 副査 助教授 太田 勲

## 論文内容の要旨

### 1. 目的

最大筋力を発揮するような身体運動に上下顎歯の「くいしはり」, すなわち「クレンチング」が随伴することは, 従来より経験的に知られていた。この身体運動時のクレンチングの発現に関しては, その発現に個人差があること, 発現時の下顎位の変化が身体運動能力に影響を及ぼす可能性があることが報告されている。しかし, その発現様相や発現機構, ならびに身体運動におけるその役割については, 未だ不明な点が多い。

そこで, 今回, 顎口腔系機能と身体運動機能との関連を明らかにするための基礎的資料を得ることを目的として, 肘関節屈曲運動時および膝関節伸展運動時の下顎位と身体運動の主動筋および顎口腔系諸筋群の筋活動ならびに筋活動開始時期について分析し, さらに, クレンチングの有無が身体運動能力に及ぼす影響についても検討した。

### 2. 方法

被験者は, 顎口腔系に異常を認めない。個性正常咬合を有する男性15名 (平均年齢 26.5±2.1歳) である。筋

電図の導出は, 銀-塩化銀表面電極を左右の咬筋, 側頭筋前部, 胸鎖乳突筋および右側の顎二腹筋前腹, 上腕二頭筋, 大腿直筋に, 筋線維の走行に一致させ, 筋腹中央部に電極間距離20mmで貼付し, 双極誘導にて行った。

身体運動として, 被験者の肘関節および膝関節が90°になるように上肢および下肢を固定し, 光刺激をトリカーとして5秒間の最大筋力を発揮するような肘関節屈曲運動と膝関節伸展運動を行わせた。なお, 本試行を5分間のインターバルをおいて6回行わせた。また, 身体運動に随伴する非意識的なクレンチングが認められた者に対しては, 意識的な開口を, また, クレンチングが認められなかった者に対しては, 意識的な噛みしめを行うように指示を与えて, 同様の施行を6回行わせた。さらに, 顎口腔系諸筋群の筋活動量の指標を得るために, 運動を行わない状態での5秒間の意識的な最大噛みしめを行わせた。

筋電図はマルチテレメータシステム, 下顎位はマンティブラーキネシオグラフ, 肘関節屈曲および膝関節伸展筋力はロードセルとウェイングインシケータからなる測定装置により同時に記録した。なお, 各データは, サーマルアレイコーダによるモニタリング下にてデータ・レ