

下顎実験床を装着し、習慣性咀嚼側咀嚼時と非習慣性咀嚼側咀嚼時の下顎運動と舌運動を、電気的下顎運動測定装置と汎用超音波診断装置を用いて観察・記録し、非装着時のそれと比較、検討した。

得られた結果は、論文およびその要旨に記載されている通りであるが、申請者は、良好な咀嚼機能を営むためには舌運動と下顎運動の協調性が不可欠であることを客観的に確認した。また、舌運動の障害が下顎運動の障害を惹起し、結果的に咀嚼機能の低下に繋がることを示唆

した。さらに、上下的舌運動距離と咀嚼ストローク数との相関係数と咀嚼効率との間に有意な正の相関が認められたことから、咀嚼運動（咀嚼時の下顎運動）時における舌運動の解析が咀嚼機能評価法に利用できること、さらに、各個人における習慣性咀嚼側と非習慣性咀嚼側の判別に本法の利用が有用であることを示唆した。

本研究によって得られたこれらの結果は、歯科補綴学ならびに関連諸学科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。

氏名・(本籍)	萩野 司 (北海道)
学位の種類	博士(歯学)
学位記番号	甲 第68号
学位授与の日付	平成11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	細胞内TNFは口腔癌細胞のTNFアポトーシスシグナルに対して抵抗性因子として働いている
論文審査委員	主査 教授 金澤 正昭 副査 教授 矢嶋 俊彦 副査 教授 賀来 亨

論文内容の要旨

【目的】

周知の如く、腫瘍細胞とくに悪性腫瘍細胞は自律性の発育を示し、浸潤性増殖さらには転移を来し、生体を死に至らしめる。

一方、生体内には、これらの細胞に対して拮抗的に作用する物質も産生され、その一つとしてマクロファージ/単球に由来するサイトカインであるTNF(腫瘍壊死因子:Tumor Necrosis Factor)が挙げられる。このTNFは、細胞内の活性酸素産生能を高め、その結果生ずる多量の活性酸素が細胞を傷害することにより抗腫瘍活性を発揮するといわれている。

しかしながら、TNFに対して非感受性、すなわち耐性を有する腫瘍細胞が存在することも知られ、これらの細胞では、その細胞内に存在するTNF(endogenous TNF、以下enTNF)が、細胞傷害作用に関与する活性酸素の消去系であるMnSODを誘導し、外因性のTNFに対して防

御因子として働くことが報告されている。

さて、近年のTNFの細胞傷害性の本質は、caspaseを介したアポトーシスであることが報告されているが、アポトーシスとenTNFの関連についてはいまだ必ずしも明らかでない。

そこで本研究では、口腔癌治療の一助となすべく、口腔扁平上皮癌細胞の、TNFによるアポトーシス誘導作用に対してenTNFがどのような機序により抵抗性に働いているか検討した。

【材料】

1. 細胞

対象として、5種類のヒト口腔癌細胞株、T.T(食道原発扁平上皮癌の下顎骨転移)、HSC-3(舌癌転移リンパ節扁平上皮癌)、Ca9-22(歯肉原発扁平上皮癌)、BSC-OF(口底部原発基底細胞様扁平上皮癌)、SAS(舌原発扁平上皮癌)を用いた。

2. ヒトrecombinant tumor necrosis factorおよびその抗体

ヒトrecombinant TNF (以下rhTNF, 2.37×10^6 U/mg) および抗rhTNFポリクローナル抗体 (家兎) は旭化成工業株式会社より供与を受けた。なお, TNF活性は細胞傷害性試験でL-M細胞に対し50% cytotoxicityを示す濃度を1 unit (U) とした。

3. プラスミド

TNF発現ベクターであるpcDV-TNFおよびG418耐性遺伝子をコードするpSV2neoは旭化成工業株式会社より供与を受けた。

【方 法】

1. 細胞傷害性の判定法

5種類のヒト口腔癌細胞株とpTNF Δ proを組み込んだT.T細胞のin vitroにおけるrhTNFに対する感受性は, 標的細胞を 1×10^5 /mlに調節し, その100 μ lを96well培養プレートに0.01から1000 U/ml濃度のrhTNF溶液100 μ lを加え, 37度, 5% CO₂にて48時間培養した際のcell survivalを, dye-uptake法で測定した。

2. MnSOD活性の測定法

Oberleyらの方法に準じ, NBT法により測定した。

3. enTNFの発現量の測定法

enTNFの発現量は, 細胞をFITC標識抗TNFで処理し, その発光強度をFluoroscanにて測定した。

4. 遺伝子導入法

非分泌型TNF発現ベクター (pTNF Δ pro) の遺伝子導入はlipofection法により行った。安定なpTNF Δ pro遺伝子導入細胞は20 μ gのpTNF Δ proと1.5 μ gのpSV2neoを同時に遺伝子導入したT.T細胞を, 300 μ g/mlのG418でセレクトした。

5. アポトーシスの判定法

アポトーシスの検出は, 細胞からDNAを抽出して2.5% agarose gel電気泳動を行い, DNAラダーフォーメーションにより行った。

6. caspase 3 (CPP32) 活性の測定法

100 ng/mlのTNFで2時間処理した細胞に蛍光標識した基質を添加し, CPP32により発する蛍光波長をFluoroscanにて測定した。

【結 果】

1. 各種ヒト口腔扁平上皮癌細胞株のTNF感受性

TNF感受性には細胞間で差異が認められ, T.T > BSC-OF > HSC-3 > Ca9-22 > SASの順に高かった。

2. 各種ヒト口腔扁平上皮癌細胞株のMnSOD活性とenTNFの発現

TNFに最も高感受性のT.T細胞のMnSOD活性は, 3.9 U/mg proteinと低値で, 最も低感受性であるSAS細胞のMnSOD活性は14.7 U/mg proteinと高値であり, その他のTNF低感受性である細胞のMnSOD活性もT.T細胞のそれに比し高値であった。また, enTNFの発現については, T.T細胞では, TNF抵抗性細胞のSAS細胞に比べ, 約1/2と低値を示した。

3. TNF遺伝子導入クローンのenTNFの発現

TNFに高感受性であるT.T細胞に, 非分泌型TNFの発現ベクターであるpTNF Δ proを導入し, 3つのクローンT.T Δ pro1, 2および3を得た。これらのクローンのenTNFについて検討したところ, 親細胞およびneo遺伝子導入クローンに比べ, TNF遺伝子導入クローンでは高値を示した。

4. enTNF高発現クローンのTNF感受性

次に, これらのクローンのTNF感受性を, TNF 1 U/mlの濃度と比較すると, 親細胞およびneo遺伝子導入細胞のcell survivalはそれぞれ47.9%, 48.4%であったのに対し, enTNF発現クローンT.T Δ pro1, 2および3では91-98%とTNFに対して抵抗性を示した。

5. enTNF高発現クローンのMnSOD活性の変化

T.T細胞にpTNF Δ proを遺伝子導入した結果, 親細胞およびneo遺伝子導入クローンに比べ, enTNF高発現クローンでは, 細胞内MnSOD活性が4.4倍から6.6倍に増加していた。

6. アポトーシスの検討

T.T細胞およびそのneo遺伝子導入細胞をTNF処理すると, ラダーフォーメーションが観察されたが, enTNF高発現クローンでは, ラダーは著明に減弱していた。さらに, TNFにより惹起されるT.T細胞のアポトーシスは, caspase 1の阻害剤 (YVAD-CMK) およびcaspase 3 (CPP32) の阻害剤 (DEVD-CHO) により抑制された。

7. enTNF高発現クローンのcaspase 3 (CPP32) 活性

TNF処理によりT.T細胞のCPP32活性は上昇した。一方, enTNF高発現クローンにおいても, この活性は抑制されなかった。

【結 語】

1. 細胞内TNF (enTNF) は, TNF誘導アポトーシスに対して抵抗性因子として働くことが示唆された。
2. enTNFは, caspaseの下流で作用し, 活性酸素 (OFR) を消去するMnSODを誘導し, アポトーシスを回避していることが推察された。

学位論文審査の要旨

周知の如く、腫瘍細胞とくに悪性腫瘍細胞は自律性の発育を示し、浸潤性増殖さらには転移を来し、生体を死に至らしめる。一方、生体内では、これらの細胞に対して拮抗的に作用する物質も産生され、その一つとしてマクロファージ/単球に由来するサイトカインであるTNF（腫瘍壊死因子：Tumor Necrosis Factor）が挙げられている。しかしながら、TNFに対して耐性を有する腫瘍細胞もあり、これらの細胞では、外来性のTNFにより細胞内に産生される活性酸素が細胞内のTNF（endogenous TNF, 以下enTNF）により消去される。しかし、このようなTNFに対する防御シグナルと、カスパーゼを介したアポトーシスシグナルとの関連については、いまだ不明である。そこで萩野は、口腔癌治療の一助となすべく、口腔扁平上皮癌細胞株T.T, HSC-3, Ca9-22, BSC-OFおよびSAS細胞のTNFによるアポトーシス誘導作用に対してenTNFが抵抗性因子として働いているか否か、また、その際のアポトーシスシグナルが、どのような機序で抵抗性因子として作用しているかについて検討し、以下の結果を得た。

1. 各細胞のうち、T.T細胞はその他の細胞に比し、enTNFの発現量およびMnSOD活性が低く、TNF感

受性が高かった。

2. T.T細胞に、非分泌型TNF遺伝子の発現ベクターであるpTNF Δ proを導入して得た3つのenTNF高発現クローン細胞は、MnSOD活性が親細胞T.TやT.Tneo遺伝子導入細胞と比較して高く、TNFに抵抗性を示し、アポトーシスが抑制された。

3. なお、親細胞T.Tのアポトーシスに際しては、caspase 3の活性が上昇することから、アポトーシスシグナルはcaspase 3を介していることが知られた。さらに、enTNF高発現クローンでもcaspase 3活性が上昇しているにもかかわらず、アポトーシスが抑制されたことから、enTNFにより誘導されたMnSODはcaspase 3の下流で作用し、活性酸素を消去するであろうことが推察された。

以上の如く、enTNFは、口腔癌細胞のTNFアポトーシスシグナル伝達経路中のcaspase 3の下流で作用し、TNFアポトーシスシグナルに対して抵抗性因子として働くことが確認されたことから、本研究は歯科医学発展に寄与するところが大きく、審査の結果、学位授与に値するものと判定した。