加を認めた。このインターロイキン1βはエピネフリン分泌の持続に関与したものと推察している。

以上の事から，三叉神経領域に電気刺激，すなわち侵害性刺激を10秒与えると，副腎髄質機能の影響が持続し，さらにそれに伴い循環機能にも影響を及ぼすことを示唆している。

よって，本論文は審査の結果，歯科麻酔学の発展に寄与するところ大であり，学位論文に値すると判定した。

氏名・(本籍)	**北所弘行**（北海道）
学位の種類	博士（歯学）
学位記番号	甲第73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	**Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor(HGF/SF)によるヒト口腔扁平上皮癌細胞の浸潤シグナルの検討** **—特に低分子量GTP結合蛋白質Rhoの関与について—**
論文審査委員	主査　教授　有末　眞 副査　教授　賀来　亨 副査　教授　田隈泰信

論文内容の要旨

I．緒　　言

口腔癌細胞の持つ浸潤・転移能は，癌治療の予後を左右する重要な因子と考えられている。また，この癌細胞の浸潤・転移能は，周囲環境を構成する宿主細胞が産生する様々なサイトカインによって促進されることも明らかとなってきている。今回，検討に用いた肝細胞増殖因子（Hepatocyte Growth Factor，別名Scatter Factor：HGF/SF）は，当初，肝細胞の増殖促進作用を有するサイトカインとして見出され，その後，上皮系細胞の分散運動を促す作用を有すること，近年，宿主線維芽細胞が産生するHGF/SFがパラクリン的に癌細胞に作用し，その浸潤能を促進する現象が報告され注目を集めている。しかしながら，HGF/SFがヒト口腔扁平上皮癌細胞に対し，どのような影響を及ぼすかについては不明な点が多いままとなっている。

一方，低分子量GTP結合蛋白質Rhoは近年アクチン細胞骨格を制御し，細胞の運動や接着などを調節しているキーレギュレーターとして注目され，また，細胞接着斑構成成分であるFAK（Focal Adhesion Kinase）などの制御に深く関与し，細胞運動能に極めて重要な役割を担っていることが示されてきている。そこで，本研究では，HGF/SFがヒト口腔扁平上皮癌細胞の浸潤・転移能に及ぼす影響とそのシグナル伝達におけるRhoの役割について検討した。

II．方法および結果

1．HGF/SFが口腔癌細胞の浸潤能に及ぼす影響

*in vitro*浸潤アッセイにより3系のヒト口腔癌細胞（SAS，Ca9-22，HSC-3）のHGF/SF（10ng/mℓ）刺激による浸潤能の変化を検討したところ，いずれの癌細胞も1.3～2倍の浸潤能の促進が認められた。また，Matrigel™を用いたBoyden chamber法にて口腔癌細胞のHGF/SFによる再構成基底膜通過能への影響を検討した結果，SAS細胞のみ1.4倍の亢進が認められた。つぎに，HGF/SF刺激に最も高い反応性を示したSAS細胞を用い，HGF/SF処理濃度が及ぼす影響を検討したところ，濃度依存的に浸潤能の亢進が認められた。

2．HGF/SFが口腔癌細胞の運動能に及ぼす影響

phagokinetic track assayにより3系の口腔癌細胞の

HGF/SF刺激による運動能の影響を検討したところ，SAS細胞のみに1.5倍の運動能の促進が認められた。また，SAS細胞のHGF/SF処理濃度による影響を検討したところ，HGF/SF濃度依存的にSAS細胞の運動能の促進が認められた。以上の結果より，以下のHGF/SF刺激による浸潤シグナルの解析は，HGF/SF刺激に最も高い反応性を示したSAS細胞を用いて行った。

3．C3酵素処理によるSAS細胞の浸潤能，運動能の変化

Rhoの特異的阻害剤であるC3酵素処理SAS細胞のHGF/SF刺激による浸潤能および運動能の変化を*in vitro*浸潤アッセイおよびphagokinetic track assayにより検討した。C3酵素処理によりHGF/SF非刺激SAS細胞の浸潤能，運動能はともに有意に抑制された。また，HGF/SF刺激による促進効果もC3酵素処理により完全に消失した。

4．HGF/SF刺激がSAS細胞のHGF受容体（c-Met）およびFAK^{p125}のチロシンリン酸化に及ぼす影響

HGF/SF刺激によるSAS細胞のHGF受容体およびFAK^{p125}のチロシンリン酸化の変化を免疫沈降法およびウエスタン・ブロティング法により検索した。その結果，HGF受容体およびFAK^{p125}のチロシンリン酸化はHGF/SF刺激により亢進していた。また，FAK^{p125}のチロシンリン酸化は経時的に亢進しているのが観察された。

5．C3酵素処理がSAS細胞のFAK^{p125}チロシンリン酸化に及ぼす影響

HGF/SF刺激によるHGF受容体のチロシンリン酸化後のシグナルがFAK^{p125}に伝達される課程で，Rhoが関与することを明らかにするためにC3酵素処理によるHGF/SF刺激後のFAK^{p125}のチロシンリン酸化の変化を免疫沈降法およびウエスタン・ブロティング法により検討した。その結果，C3酵素処理SAS細胞にHGF/SF刺激を加えると，C3酵素非処理SAS細胞に比べてFAK^{p125}のチロシンリン酸化は減弱しているのが観察された。このことは，HGF/SF刺激のシグナル伝達においてFAK^{p125}の上流にRhoが存在する可能性を示唆した。

6．HGF/SF刺激によるSAS細胞のRhoの変化

HGF/SF刺激によるSAS細胞のRhoの蛋白量の変化を抗RhoA抗体と抗RhoGDI抗体を用いたウエスタン・ブロッティング法により検索した結果，RhoGDIの蛋白量に比べRhoの蛋白量が経時的に細胞可溶化分画中に増加しているのが観察された。

7．HGF/SF刺激がSAS細胞のRhoのmRNAに及ぼす影響

HGF/SF刺激によるSAS細胞のRhoの変化をRT-PCR法によりmRNAの検索した結果，RhoのmRNAの発現に経時的変化は認められなかった。

8．HGF/SF刺激がSAS細胞のRhoの細胞内局在に及ぼす影響

HGF/SF刺激によるSAS細胞のRhoの細胞内局在変化を抗RhoA抗体を用いた免疫組織化学染色後，共焦点レーザー顕微鏡で観察した。HGF/SF刺激前では，Rhoは核周囲に局在し，HGF/SF刺激により核より細胞膜へ経時的にトランスロケーションするのが認められた。

III．結　　論

1．HGF/SFは，ヒト口腔扁平上皮癌細胞（SAS，Ca9-22，HSC-3）の浸潤能を有意に促進した。また，このうちSAS細胞では，運動能も有意に促進した。

2．SAS細胞をC3酵素処理したところ，HGF/SF刺激による浸潤能および運動能の促進効果は消失した。

3．HGF/SF刺激によりSAS細胞のHGF受容体（c-Met）およびFAK^{p125}のチロシンリン酸化が亢進しているのが観察された。また，C3酵素処理によりFAK^{p125}のチロシンリン酸化が減弱するのが観察された。

4．HGF/SF刺激によるSAS細胞のRhoの変化を検討したところ，経時的に蛋白量が増加するのが観察された。一方，mRNAの変化は観察した限り認められなかった。

5．HGF/SF刺激によるRhoの細胞内局在の変化を検討したところ，SAS細胞の核周囲に局在していたRhoが刺激による細胞膜に移行する像が観察された。

以上のことより，HGF/SFによるSAS細胞の浸潤シグナルは，HGF受容体のチロシンリン酸化を介したFAK^{p125}のチロシンリン酸化により伝達され，その制御にRhoが深く関与している可能性が示唆された。また，RhoはHGF/SF刺激により核周囲より細胞膜に移行し，その制御に関与していると推察された。

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因子の一つであり，この細胞生物学的性状は，癌細胞を取り巻く微小環境により修飾されることが明らかとなってきている。肝細胞増殖因子（HGF/SF）は，癌—間葉相互作用を媒介し，癌細胞の運動能を促進する増殖因子として知られており，ヒト口腔癌においてもHGF/SFに対する受容体の過剰発現がみられ，口腔癌の悪性化進展にHGF/SFの関与が重要視されているが，不明な点が

多い。そこで，HGF/SFがヒト口腔扁平上皮癌細胞に及ぼす影響と浸潤シグナルの検討を行った。

口腔癌3系（SAS，Ca9-22，HSC-3）の培養株細胞の浸潤能は，HGF/SF刺激により有意に促進され，運動能は，SAS細胞で有意に促進されることが示された。そこで，浸潤シグナルの解析は，HGF/SF刺激に最も高い反応性を示したSAS細胞を用いて行った。その結果，SAS細胞の運動能の促進にRhoが関与していること，HGF/SF刺激の細胞内シグナルはHGF受容体（c-Met）を介し，FAK^{p125}を活性化し伝達される可能性，ならびにFAK^{p125}の上流にRhoが存在し，シグナル伝達の制御に関与していることを示唆した。また，SAS細胞ではRhoは常に産生され，そのRhoがHGF/SF刺激により細胞可溶性分画中に移動する可能性が強いこと，さらにHGF/SF刺激後，Rhoは細胞膜に移行し活性化されている可能性が推察された。

これらのことより，HGF/SFによるSAS細胞の浸潤シグナルは，HGF受容体のチロシンリン酸化を介したFAK^{p125}のチロシンリン酸化により伝達され，その制御にRhoが深く関与している可能性が示唆された。また，RhoはHGF/SF刺激により核周囲より細胞膜に移行し，その制御に関与していると推察された。

以上の結果より，本論文は，SAS細胞の浸潤・転移能がHGF/SFにより促進されていること，ならびにそれに関与するシグナル伝達機構の一端を明らかにした点で意義があり，さらにこのことは，ヒト口腔扁平上皮癌細胞の悪性形質を獲得する機序の解明に寄与するところ大であり，審査の結果，学位授与に値すると判定した。

氏名・（本籍）	**小　山　宏　樹**（北海道）
学位の種類	博　士（歯学）
学位記番号	甲　第74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	**フェニトインおよびフェニトイン誘導体が正常ヒト骨芽細胞に及ぼす作用** **—特にBMP産生に及ぼす作用について—**
論文審査委員	主　査　教　授　賀　来　　亨 副　査　教　授　田　隈　泰　信 副　査　教　授　武　田　正　子

論　文　内　容　の　要　旨

（緒　　言）

抗てんかん薬，フェニトインは，歯科領域では歯肉増殖症を引き起こす薬物として知られているが，一方でin vitroおよびin vivoにおいてosteogenicな作用を有するとの報告がなされており，その骨形成促進剤としての可能性が指摘されている。その作用機序として骨芽細胞におけるTGF-β1の産生上昇が挙げられているが，フェニトインがオステオカルシンの産生を促進するのに対し，TGF-βは抑制的に働くなど，TGF-βのみでは説明できない部分も残されている。本研究は，フェニトインがオステオカルシンの強力な産生促進因子として知られており，TGF-βスーパーファミリーに属するBone morphogenetic proteins（BMPs）の産生に及ぼす影響を調べ，BMPsがフェニトインのosteogenicな作用における関わりについて明らかにすることを目的に計画された。加えてin vitroにおいて種々のフェニトイン誘導体が，フェニトインと同様のosteogenicな作用を有しているか否かについても検討した。

（方　　法）

I　フェニトインがBMPsの遺伝子の発現およびタンパ