

氏名・(本籍)	神田昌巳(北海道)
学位の種類	博士(歯学)
学位記番号	乙第38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2項該当(論文博士)
学位論文題目	ヒト骨肉腫細胞株における浸潤能とurokinase-type plasminogen activatorの作用発現について
論文審査委員	主査 教授 賀来 亨 副査 教授 武田 正子 副査 教授 田隈 泰信

論文内容の要旨

〔緒言〕

腫瘍細胞による転移成立は、細胞が原発巣からの細胞外マトリックス〔extracellular-matrix (ECM)〕の破壊による浸潤および遊離からはじまり、毛細血管やリンパ管系を介しての移動、血管内皮細胞への接着とそこからの逸脱、標的遠隔臓器での増殖などの複雑かつ多くの段階をへて成立すると言われている。そのECMの分解にはいくつかの酵素が関与しており、serine proteaseの一種であるplasminogen activator (PAs)は腫瘍細胞から放出され、ECMの構成成分中の非コラーゲン性タンパクの破壊とcollagenaseの活性化に関与していると言われている。PAsには、urokinase-type plasminogen activator (uPA)とtissue-type plasminogen activator (tPA)の2種類が存在し、そのうちでもuPAは腫瘍細胞の浸潤形成にかかわる重要な因子として注目されている。uPAの活性は、plasminogen activator inhibitorであるPAI-1により調整されている。PAI-1の作用はPAsに対するインヒビターとしてその阻害特異性が最も強いものであり、腫瘍におけるPAI-1はPAの高い発現に対する抑制因子として、がん細胞の機能制御に関与していることが近年の研究により明らかにされている。骨肉腫は、極めて短時間に肺転移により死に至らしめる悪性度の高い腫瘍であり、その骨肉腫においてもECMの破壊がPAsやmetalloproteinaseの関与が報告されている。

本研究の目的は、同一患者の原発巣と肺転移巣より別々に分離樹立された2種の骨肉腫細胞株(KIKU細胞とKIKU-M細胞)を利用してin vitro条件下のこれらの

細胞の浸潤能、ECMの破壊に対するPAsの関与、とくにuPAとPAI-1の発現について検討した。

〔材料と方法〕

使用した細胞株は当講座で性状を解析した2種の骨肉腫細胞株、すなわち、ヒトの脛骨近位端の原発巣から樹立したKIKU細胞とその肺転移巣より樹立したKIKU-M細胞を使用し、以下の項目を検索比較した。

1. uPA, PAI-1の免疫細胞化学的検索。
2. In vitro invasion assayによる細胞浸潤能。
3. Total uPA活性の定量。
4. EnzymographyによるuPA活性の観察。
5. uPAおよびPAI-1抗原量の測定。

〔結果〕

1. 両細胞株ともに抗uPA, 抗PAI-1抗体による免疫細胞化学的に陽性像が確認された。
2. 両細胞株ともに24時間目では、KIKU細胞が 57.0 ± 22.0 cells/filterに対し、KIKU-M細胞は 94.5 ± 17.0 cells/filter, 48時間では、 64.0 ± 11.0 cells/filter, KIKU-M細胞は 107.7 ± 38.3 cells/filterそして、72時間目では浸潤した細胞数はKIKU細胞では 101.8 ± 22.0 cells/filterに対して、KIKU-M細胞では 126.7 ± 22.3 cells/filterと各培養時間においても有意にKIKU-M細胞の方が多く浸潤していたことが確認された。
3. Total uPA活性は、24, 48, 72時間ともにKIKU細胞では 1.63 ± 0.43 , 1.46 ± 0.32 そして 2.28 ± 0.55 ng/

μg of DNA, それに対しKIKU-M細胞の方は 7.30 ± 3.13 , 4.20 ± 0.27 そして $5.12 \pm 1.36\text{ng}/\mu\text{g}$ of DNAとKIKU細胞よりもKIKU-M細胞の方が培養時間のCM中のすべてにおいて高い値を示した。

4. KIKU細胞およびKIKU-M細胞に分子量54kDaの位置にバンドが認められたことにより、両細胞株ともにuPA活性の存在が確認できた。しかし、KIKU細胞の方は24, 48そして72時間ともに一定したバンドが観察できたが、KIKU-M細胞は経時的にバンドが太くなりuPA活性が増加していると思われた。
5. uPA抗原量は、培養24時間目ではKIKU-M細胞は、 $1.16 \pm 0.27\text{ng}/\mu\text{g}$ of DNA, KIKU細胞は $0.92 \pm 0.17\text{ng}/\mu\text{g}$ of DNAとKIKU-M細胞の方がKIKU細胞よりも有意に高い値を示し、48と72時間目ではKIKU-M細胞は $1.15 \pm 0.22\text{ng}/\mu\text{g}$ of DNA, $1.08 \pm 0.07\text{ng}/\mu\text{g}$ of DNA, それに対しKIKU細胞は $0.89 \pm 0.11\text{ng}/\mu\text{g}$ of DNA, $0.82 \pm 0.05\text{ng}/\mu\text{g}$ of DNAとKIKU-M細胞の方がKIKU細胞よりそれぞれ有意に高い値を示した。PAI-1抗原量は24, 48時間目ではuPA抗原量と同様にKIKU-M細胞は 11.25 ± 0.98 , $6.44 \pm 0.28\text{ng}/\mu\text{g}$ of DNA, KIKU細胞は 3.34 ± 0.19 , $4.30 \pm 0.40\text{ng}/\mu\text{g}$ of DNAとKIKU-M細胞の方がKIKU株に比べ有意に高い値を示した。しかし、72時間培養後ではKIKU-M細胞は、 $4.49 \pm 0.54\text{ng}/\mu\text{g}$ of DNA, KIKU細胞は $4.99 \pm 0.72\text{ng}/\mu\text{g}$ of DNAと24, 48時間目とは逆にKIKU細胞の方がKIKU-M株よりも高い値が確認でき、両者のあいだには有意差は認められなかった。

【結 語】

同一患者の原発巣と肺転移巣より別々に分離樹立され

た2種のヒト骨肉腫細胞株を利用してin vitro条件下のこれらの細胞の浸潤能、基底膜コラーゲンもしくはECMの破壊に対するPAsの関与、とくにuPAとPAI-1の発現について検索したところ以下の結果が得られた。

1. KIKU細胞とKIKU-M細胞にも、抗uPA抗体、抗PAI-1抗体による免疫細胞化学染色で陽性像が得られた。
2. KIKU-M細胞はKIKU細胞よりマトリジェルを使用したinvasion assayで有意に多くの細胞浸潤が得られた。
3. uPA活性を測定した結果、KIKU-M細胞の方がKIKU細胞より高い値が得られた。
4. Casein enzymographyでも、KIKU-M細胞の方がKIKU細胞より強いuPA活性が確認できた。
5. uPA抗原量はKIKU-M細胞の産生量の方がKIKU細胞の産生量より有意に高い値が確認された。PAI-1抗原量は、24時間目ではKIKU-M細胞の方がKIKU細胞より有意に高い値が認められたが、72時間目ではKIKU-M細胞の方がKIKU細胞より低い値が確認された。すなわち、PAI-1抗原量は経時的にKIKU細胞では増加していたが、KIKU-M細胞は逆に減少していたことが確認された。

以上の結果より、KIKU-M細胞の方がKIKU細胞より浸潤能が高いことが示唆された。また腫瘍細胞におけるPAs活性での浸潤・転移に関しては、uPAの発現とその産生量だけでなく同時にその細胞から産生されるPAI-1発現量とその機能が細胞の浸潤に対して重要な因子となると思われた。

学 位 論 文 審 査 の 要 旨

腫瘍細胞の浸潤・転移成立は、原発巣の腫瘍細胞の一部が細胞外マトリックス〔extracellular-matrix (ECM)〕の破壊による浸潤および遊離からはじまると言われている。ECMの分解にはいくつかの酵素が関与しており、そのなかでurokinase-type plasminogen activator (uPA)は腫瘍細胞の浸潤形成にかかわる重要な因子として注目されている。一方、多くの腫瘍細胞はuPAの産生だけではなく、PAs活性を抑制するplasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1)を発現している。

本研究の目的はヒト由来の骨肉腫細胞株 (KIKU細胞とKIKU-M細胞) を使用し、PAsと腫瘍細胞浸潤能との関係を理解することにある。検索の結果、1. 抗uPA抗体、抗PAI-1抗体の免疫細胞化学染色ではKIKU細胞、

KIKU-M細胞ともに陽性像が観察された。2. マトリジェルを使用したinvasion assayでKIKU-M細胞はKIKU細胞より有意に多くの細胞浸潤が得られた。3. Total uPA活性の測定およびCasein enzymographyの結果ともに、KIKU-M細胞の方がKIKU細胞より高い活性が認められた。4. uPA抗原量はKIKU-M細胞がKIKU細胞より有意に高い産生量を示した。5. PAI-1抗原量は、24時間目と48時間目ではKIKU-M細胞の方がKIKU細胞より有意に高い値が認められたが、培養時間とともに減少し、72時間目ではKIKU-M細胞の方がKIKU細胞より低い値が確認された。

以上より、両腫瘍細胞においてもuPA抗原とPAI-1抗原ともに産生されたuPA活性に関与しているが、KIKU-

M細胞の方がKIKU細胞よりuPA抗原の産生量が多く、また、uPA活性も高かった。したがって、腫瘍細胞の浸潤能とuPA活性が高い相関を示すことが明らかになった。また、PAI-1抗原はKIKU-M細胞においては培養時間とともに減少していることから、腫瘍細胞の浸潤能に

なんらかの影響をおよぼしていることが示唆された。

以上のことより、本論文は腫瘍細胞の浸潤、転移機構の解明の一助となり、病理学および歯科医学の進歩発展に寄与するところが大きく、学位授与に値すると判定した。

氏名・(本籍)	相良昌宏(北海道)
学位の種類	博士(歯学)
学位記番号	乙第39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2項該当(論文博士)
学位論文題目	レジン接着用金合金の研究 一卑金属元素の微量添加による酸化物層の構造変化と 接着強さ一
論文審査委員	主査 教授 大野弘機 副査 教授 平井敏博 副査 教授 松田浩一

論文内容の要旨

I. 緒言

貴金属合金を大気中で高温(700~800°C)で酸化した場合、Cuが酸化し、外部酸化層と内部酸化層が形成される。そこで、本研究では、金合金にCuとともに、それ以外の卑金属を微量に添加し、酸化層の構造ならびに酸化物の種類と量を制御し、それによってさらに接着強さの大きい合金を開発することを目的とした。すなわち、内部酸化粒子を酸洗いで除去し、合金表面にミクロな凹凸を付与し、レジンとの機械的結合を強化し、また、酸洗い後の二次加熱によって、4-METAに対して親和性を有する酸化物を形成し、化学的接着力を向上させ、これらの2つの効果によって接着強さを高めることをねらいとした。さらに、高温酸化法による接着性向上の理由を明確にした。

II. 実験方法

1. 材料

ADA規格Type IV金合金に相当する成分・組成の合金(No.1)を基本として、それにNiを2%添加したもの

(No.2)、Inを2%添加したもの(No.3)、Crを2%添加したもの(No.4)を実験に使用した。接着性レジンには、4-META配合の常温重合レジンを使用した。

2. 合金の高温酸化処理および酸洗い

直径11mm、厚さ6mmの円盤状鑄型に合金を鑄造し、それを耐水研磨紙、続いてバフ研磨を施し、鏡面とした。これに2段階の加熱処理を施した。すなわち、一次加熱として800°C、20分間大気中で合金を酸化し、次にスルファミン酸溶液を用いて酸洗いをを行い、続いて二次加熱として500°C、10分間大気中で酸化した。

3. 酸化層の形態観察および元素分析

合金に2段階の加熱処理を施した後、合金表面および酸化表面に垂直な断面をSEM・X線マイクロアナライザーで分析した。

4. 酸化物の同定

一次加熱、酸洗い、二次加熱のそれぞれの段階について、X線回析で酸化物の同定を行った。さらに、二次加熱後の合金接着面を光電子分析装置で状態分析を行った。