



## A Growth Inhibitor of Rat Hepatocytes Synthesized by a Rat Hepatoma Cell line, FF101

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-30 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 北原, 大文 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10271/996">http://hdl.handle.net/10271/996</a>

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 143号	学位授与年月日	平成 5年 3月26日
氏 名	北 原 大 文		
論文題目	<p>A Growth Inhibitor of Rat Hepatocytes Synthesized by a Rat Hepatoma Cell line, FF101                      (ラット肝癌細胞株 FF101 によって産生される肝細胞増殖抑制因子)</p>		

医学博士 北 原 大 文

論文題目

A Growth Inhibitor of Rat Hepatocytes Synthesized by a Rat Hepatoma Cell line,  
FF101

(ラット肝癌細胞株 FF101によって産生される肝細胞増殖抑制因子)

論 文 の 内 容 の 要 旨

【目的】

われわれは初代培養より無血清、無蛋白培地で増殖するラット肝癌細胞株 (FF101) を樹立し、FF101細胞が autocrine factor である新しい増殖因子 (FF101 derived growth factor ; FF-GF) を産生していることを報告してきた。

今回 FF101細胞はその発生臓器である肝臓に対しては抑制的に働く別の因子 (FF101 derived growth inhibitor ; FF-GI) をも産生していることが判明し、FF-GIの部分的精製と増殖抑制機序の検討を行った。

【方法】

- 1) 培養上清の処理：FF101細胞を $2 \times 10^5$ /10ml (RPMI 1640) の条件で2日間培養後培養上清を回収し1000倍に濃縮したのち、ゲル濾過 (superose 12) にて抑制活性を有する分画 (FF-GI) を得た。
- 2) 肝細胞の DNA 合成の測定：コラゲナーゼ灌流法にてラット肝実質細胞を単離後ウィリアムズE培地で培養を開始し、24時間後にインシュリン、上皮成長因子 (epidermal growth factor : EGF) およびサンプルを添加し、48-52時間の $[^3\text{H}]$ チミジンの取込を測定した。
- 3) FF-GI の作用機序の検討：①細胞障害性； $[^3\text{H}]$ ロイシンを用いた肝細胞の蛋白合成能測定と、位相差顕微鏡による観察を行なった。②作用時期；肝細胞培養24時間目にインシュリン、EGF を添加し、その後0-6、6-12、12-18、18-24時間の期間のみ FF-GI を添加し、DNA 合成能を測定した。③アミノ酸分解作用；培地に FF-GI を添加し、添加直後と24時間後でアミノ酸組成を測定した。
- 4) FF-GI の他の細胞株に及ぼす影響：ラット肝癌細胞株 (AH66)、ヒト赤白血病細胞株 (K562) を1% FBS 加 RPMI 1640 で培養し、FF-GI 添加24時間後の DNA 合成を測定した。
- 5) FF-GI の物理化学的性質：FF-GI をトリプシン (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  37°C 2h)、ジチオスレイトール (DTT ; 65mM 20°C 1h)、熱 (100°C 5-30min)、酸 (1N酢酸 4°C 20h) で処理し肝細胞に対する増殖抑制活性の変化を測定した。

【結果】

- 1) FF101培養上清の肝細胞 DNA 合成に対する影響：インシュリン+EGF により増加した肝細胞の DNA 合成は、FF101培養上清によって濃度依存性に抑制された。
- 2) FF-GI の部分精製：FF101培養上清をゲル濾過で分画すると、肝細胞の DNA 合成抑制活性はNa17分画の高分子域 (分子量20万以上) とNa38分画の低分子域 (FF-GI：分子量1万以下) に認められた。

- 3) FF-GI の作用機序：①細胞障害性：FF-GI は肝細胞の蛋白合成能を障害せず、また肝細胞の形態学的変化を生ぜず、細胞障害性はないと考えられた。②FF-GI の作用時期：IRI、EGF を添加後12-18時間に主に作用し、それ以外の時期には DNA 合成抑制作用はほとんどみられなかった。③アミノ酸分解作用：培地のアミノ酸組成は FF-GI によって変化せず、FF-GI はアミノ酸分解酵素ではないことが確認された。
- 4) FF-GI の他の細胞株に及ぼす影響：AH66やK562に対し増殖抑制作用なし。
- 5) FF-GI の物理化学的性質：トリプシ、DTT 処理にて失活するが、熱、酸処理には比較的安定であった。

#### 【結論】

今回われわれはラット肝癌細胞株 (FF101) が正常ラット肝細胞の増殖を抑制する因子 (FF-GI) を産生していることを発見した。この FF-GI はその作用機序、物理化学的性質の検討より、TGF- $\beta$ をはじめとする既知の肝細胞抑制因子とは別のものである可能性が高いと考えられた。

以上より FF101細胞は自己の増殖を促進する FF-GF を産生すると同時に正常の肝細胞に対しては抑制的に働く FF-GI を産生する特殊な細胞株であり、癌の増殖機序を解明する上で有用なモデルといえる。

### 論文審査の結果の要旨

本研究は共同研究者の松田らにより発見された自己増殖因子 (FF-GF) を産生するラット肝癌細胞株 FF101がラット正常肝細胞 DNA 合成を抑制する新しい物質 (FF-GI) も産生していたという事実を明らかにしたものである。

審査委員会で申請者により口頭発表された論文内容は次のように審査、評価された。

1. FF101は初代培養より無血清、無蛋白質培地で4年余に渡り培養されていたものである。この細胞培養の上清1000倍濃縮を superose-12カラムを用い、ゲル濾過することによって初代正常肝培養細胞の DNA 合成を抑制する分子量20万以上と1万以下の新しい物質をみつけ、1万以下の抑制物質を FF-GI とした。

このものはトリプシン、ジチオスレイトールおよび100°C30分で処理した場合失活するが、100°C15分、1規定酢酸20時間では比較的安定な物質である。しかし、量的に収集されていないので、これ以上の物理化学的性質を明らかにしていない。

2. FF-GI の作用機序について：

①培養細胞株の AH66 (ラット肝癌細胞) と K562 (ヒト赤芽球白血病細胞) の2株のみの検討ではあるが、DNA 合成抑制は見られなかった。初代培養正常肝細胞の DNA 合成のみに作用すると判断された。

②これは正常肝細胞の蛋白合成能を障害せず、形態変化もひきおこさないものである。

③細胞周期に対する作用時期を検討したところ、インシュリン、上皮細胞増殖因子 (EGF) を添加後

12-18時間に主として作用し、それ以外の時期には DNA 合成抑制は殆どみられなかった。このことは今迄の抑制物質 TGF- $\beta$  と異なるもので新しいものと判断された。

④アミノ酸分解作用はないことも確認された。

以上より FF101細胞は自己増殖を促進する FF-GF を産生すると同時に、正常肝細胞に対しては抑制的に働く FF-GI を産生する特殊な細胞株であって、癌の増殖機序を解明・理解する上で有用なモデルになり得ると高く評価された。

また、審査過程中、発表に関連して次の点が質疑・応答された。

1. ラット正常肝細胞の何%が DNA 合成を抑制されるか
2. どうして腫瘍細胞には働かないのか
3. DNA 合成抑制は細胞膜レセプタを介してか、それとも細胞内に進入してからか
4. どうしてジチオスレイトールで失活するか、この物質の DNA 合成抑制の機序は
5. この細胞の腫瘍形成時における病理形態は
6. in vivo でこの物質は作用するか
7. 抑制作用から癌の治療を考えたことはないか
8. この物質は正常肝細胞以外の正常細胞の DNA 合成を抑制するか
9. この抑制物質に対する抗体を作製したか

以上の質問に対する申請者の解答は概ね適切であり、研究内容も博士（医学）の学位授与に相応しいものと審査委員全員一致で判定した。

論文審査担当者 主査 教授 吉 田 孝 人

副査 教授 佐 野 基 人      副査 教授 吉 見 輝 也

副査 助教授 中 村 達      副査 助教授 室 博 之