

Establishment of a rat hepatoma cell line in serum-free medium without supplements from primary culture

メタデータ	言語: jpn 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-23 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 松田, 裕子 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/901

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 48号	学位授与年月日	昭和62年 3月26日
氏名	松田裕子		
論文題目	Establishment of a rat hepatoma cell line in serum-free medium without supplements from primary culture (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の樹立とその特性)		

Establishment of a rat hepatoma cell line in serum-free medium
without supplements from primary culture

(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の樹立とその特性)

論文の内容の要旨

〔はじめに〕

癌細胞によって産生される増殖促進因子の研究は、癌の増殖機序を解明する上できわめて重要である。一般に培養細胞は培地中の血清もしくは種々の成長因子、ホルモン等の存在下に維持可能である。しかしそれら諸因子の添加を必要としない癌細胞株、とくに初代培養より無血清無蛋白の条件で増殖する株が存在するならば、その細胞は自らの増殖に必要な因子を産生している可能性が高く、かつ培養上清の検討も容易であり、増殖因子の解析には理想的な細胞株と思われるが、今日までそのような細胞株の報告はない。今回われわれは初代培養より無血清無蛋白培地で増殖可能なラット肝癌細胞株(FF101)の樹立に成功し、その特性について検討を行った。FF101は癌の増殖機序とくに癌細胞が産生する増殖因子の解明に有用と思われる。

〔方法〕

16週齢の純系雄性ドンリュウラットに、3'-Me-DAB(0.06%)含有飼料を5ヶ月間摂取させ作製した肝癌組織を無菌的に採取し、細切したのち0.25%トリプシン処理にて遊離肝癌細胞をえた。培養はRPMI-1640単独で行い、初代培養は細胞数 2.5×10^6 個/flaskで開始した。培養38日目に継代可能となり、初回のクローニングでえられた10系のうち最も増殖速度の大きい1系を再クローニングし、えられた11系のうちの1系をFF101とし、その形態学および蛋白化学的特性について検討を加えた。

〔成績〕

細胞は位相差顕微鏡上、単層シート状で上皮様形態をとり、HE染色にても細胞の大小不同が著しく核の大きさ、形態ともに不均一で核小体も多数みられた。また粘液様物質の産生が著名で印環様細胞も認められた。またPAS染色、Alcian blue染色にて陽性を示し、肝特異酵素であるtyrosine aminotransferase, glucose-6-phosphataseの染色でも陽性であった。染色体は60から73の高3倍体領域に分布し、Gバンド分析では $4q-$, $11p+$ の構造異常が確認された。RPMI-1640単独の無血清無蛋白の条件下でdoubling timeは78時間であった。移植性は4週齢の純系ドンリュウラットを用いて検討したが、皮下移植(1×10^7 個)では腫瘍形成が認められ10週間で全例癌死した。腹腔内移植(5×10^7 個)では大量の血性腹水が貯留し2週間で全例死亡した。なお皮下移植にて得られた腫瘍は肝細胞癌と粘液産生の著明な胆管癌の混合型の組織像を示した。培養上清を1,000倍濃縮し電気泳動による解析を行った。SDS-PAGEでは α -fetoproteinの濃いバンドと、ほかに分子量2万5千から12万の領域に十数本のバンドが認められた。しかし免疫電気泳動では抗正常ラット血清抗体に対する明らかな沈降線は認められなかった。

〔考察〕

ラットのDAB肝癌から新しい肝癌細胞株(FF101)の作成に成功した。FF101は初代培養より無血清無蛋白培地にて樹立されたはじめての細胞株であり、自己の増殖に必要な何らかの因子を産生している可能性が高い。培養上清中にも正常血清蛋白とは異なる多数の蛋白成分が認められており、予備実験ではこ

の培養上清は他の細胞株(K-562)に対して増殖促進的に作用した。増殖因子をはじめ癌の増殖機序を解明してゆく上で、FF101の樹立の意義は高いと考えられる。

論文審査の結果の要旨

肝臓の特性を研究するために肝細胞の培養株を樹立することは重要であり、今迄にもその試みがなされ、動物及びヒト由来肝癌細胞の培養株の樹立がなされてきた。

申請者は肝癌細胞を純粋に無血清無蛋白培地で初代より培養し、その特性を研究することを目的にしてラットの肝癌細胞株(FF101)の樹立に成功し、主論文の結果と、引き続き実施した研究成果からの諸点を主張した。

1) ラットの肝癌細胞を初代より無血清無蛋白培地で培養し、クローニングを単細胞培養により2回繰り返して実施し、肝癌細胞培養株を樹立した例は世界で初めてである。

2) このFF101株と名付けた細胞株は、酵素学的、粘液様物質産生、形態的及び染色体分析などの結果から多形性を示した。又同系ラットへの移植後の腫瘍形成、全例腫瘍死等より悪性肝腫瘍細胞であった。

3) この細胞株は病理組織学的に肝細胞癌と粘液産生の著名な胆管癌の混合型を示し、この細胞の由来、2回のクローニングを実施したにもかかわらず混合型を示す機序等、肝組織の分化に関する研究をする材料として有用性を提示した。

4) FF101株細胞から自己増殖因子を産生しているという仮説の下に、 α -fetoproteinの産生能等を検討しながらこの培養細胞の増殖曲線の解析、及びRPMI-1640合成培地のみでは増殖できない各種細胞(K562、YAK-1、マウス初代形質細胞腫細胞、腹水肝癌AH66、ヒト臍帯静脈内皮細胞等)に対する培養上清の増殖効果を検討した。その結果、培養上清中には、肝癌細胞及び血管内皮細胞を維持・増殖させる因子が含まれており、初代より無血清無蛋白培地で培養可能であったのはAutocrine Systemが成立したからであろうと考えた。

以上、実験の方法及び結果などについて申請者より説明がなされた。本研究は肝癌細胞の特性、肝細胞の分化、肝癌細胞から分泌される各種因子、特に細胞の維持・増殖に関する因子及びそれを受ける細胞膜レセプター等の研究の基礎を築いたものとして、各委員から本研究に対し高い評価が与えられた。

次いで審査委員より、次のような質問がなされた。

1. 自動的に培養上清を新しい培養液で置換しながらFF101細胞を培養したらどうなるか。
2. FF101細胞膜には増殖因子と反応するレセプターが存在するのか。
3. どうして単細胞から樹立された細胞株なのに移植すると混合型になるのか。
4. 2回のクローニングを実施した際に、確かにSingle cell cultureであったか。
5. このFF101細胞の起源はどの細胞からか。
6. 濃縮した培養上清を電気泳動で流した後PAS染色したか。
7. 今迄に報告された血管増殖因子と比較したか。
8. ラットの正常細胞の染色体数は何本か。

上記の質問に対し、申請者の回答は、おおむね満足すべきものであった。以上の結果、審査委員全員、本研究論文は学位授与に値するものと判断した。

論文審査担当者	主査	教授	吉田孝人			
	副査	教授	藤田道也	副査	教授	吉見輝也
	副査	助教授	吉澤浩司	副査	講師	中村達