

論文内容要旨

無血清培養系を用いた口腔癌由来細胞株の
樹立ならびに機能解析

主指導教員：岡本 哲治 教授

(医系科学研究科 分子口腔医学・顎顔面外科学)

副指導教員：加藤 功一 教授

(医系科学研究科 生体材料学)

副指導教員：寺山 隆司 教授

(医系科学研究科 顎顔面解剖学)

佐藤 成紀

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

【目的】

ヒト癌由来細胞株は、癌の分子・細胞生物学的研究や癌診断・治療薬開発のためのトランスレショナル研究などに応用され、過去これら細胞株を用いることで多くの診断薬や治療薬が生み出されてきた。従来これら細胞株の樹立研究や細胞株を用いた研究は、血清を添加した培養条件で行われてきた。このような培養系では細胞の機能維持のための栄養要求性や増殖因子要求性を検討することはできないため、その細胞内分泌機能を明らかにすることは困難であった。

申請者の所属する研究室では、口腔癌の生検組織や手術切除組織より無血清培養系を用いて癌細胞株の樹立研究を行い、これら細胞株が発現・産生する細胞増殖因子、受容体およびexosomeなどの解析を通して、口腔癌細胞の特性を細胞内分泌学的に明らかにしてきた。

本研究では、無血清培養系を用いて口腔扁平上皮癌(OSCC)、口腔腺扁平上皮癌(OASCC)及び口腔原発神経内分泌癌(ONEC)組織より細胞株の樹立を行い、さらにこれら樹立細胞株の増殖因子要求性や遺伝子発現などの特性を細胞・分子生物学的に明らかにすることを旨とした。

【方法】

口腔癌の生検及び手術切除組織より無菌下に得た腫瘍組織片を、少量のRD基礎栄養培地(RD培地)(Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM)及びRPMI1640培地の1:1混合物)存在下で、2本のメスを用いて可能な限り細切したのち、RD培地で洗浄・遠心後、細切組織をRD培地にインスリン、トランスフェリン、2-アミノエタノール、亜セレン酸ナトリウム、2-メルカプトエタノール及びfatty acid-free bovine serum albumin (FAF-BSA)と結合したオレイン酸の6つに因子(6F)を加えたRD6F培地に懸濁後、explant法を用いて初代培養を行い、組織片よりoutgrowthしてきた細胞を継代維持することで細胞株を樹立した。各癌細胞株の細胞倍加時間、laminin、fibronectin、type I collagen、gelatinの接着因子の検討、染色体解析、細胞蛍光免疫染色(Nerve growth factor receptor (NGFR)、Epidermal growth factor receptor (EGFR)、S100、Nestin、Chromogranin A、CD56)、NGS transcriptome解析及びヌードマウスでの造腫瘍性の検討を行うとともに、Short Tandem Repeat (STR)解析を行った。さらに、EGF, fibroblast growth factor (FGF) -2, 5-fluorouracil (5-FU)、Cisplatin (CDDP)、Etoposide (VP-16)、Irinotecan (CPT-11)、Somatostatin (SST)、EGFRに対するモノクローナル抗体(12-93抗体)、mTOR阻害剤Everolimus及びチロシンキナーゼ阻害剤Ponatinibの各細胞株の増殖に及ぼす影響を検討するとともに、Aktのリン酸化をwestern blot法にて検討した。

【結果】

1. OSCCおよびOASCC細胞は大小異なる多角細胞が敷石状に配列して増殖した。一方ONECはdishに接着せず、neuro sphereを形成し浮遊状態で増殖した。
2. 対数増殖期における各細胞株の細胞倍加時間は、OSCC-KK: 27.8時間、OSCC-MO: 20.9時間、OSCC-OS: 27.3時間、OSCC-SM: 26.2時間、OSCC-UN: 39.1時間、OASCC-MS: 25.6時間、OASCC-HT: 30.1時間、ONEC-TS: 33.2時間であった。
3. STR解析の結果、いずれの細胞株も既存の細胞株の混入は認めず、さらにマイコプラズマ汚染もなかった。

4. 染色体数はいずれの細胞株も2倍体から3倍体にもモードを示した。
5. OSCC-KK、OASCC-HT、ONEC-TSはヌードマウスへの造腫瘍性を有していた。
6. OSCC及びOASCCはともにEGFRの高発現を認め、EGF及び抗EGFR抗体にて細胞増殖は抑制された。
7. ONECにおいては、蛍光免疫染色にてEGFRやpKRTなどの上皮系マーカーの発現を認めず、S100やNestinなどの神経系マーカーの発現を認めた。Transcriptome解析の結果、OSCC、OASCCと比較しS100やNestinなどの神経系マーカーの高発現を示し、ONEC細胞とOSCC、OASCC細胞間で明らかに異なる遺伝子発現パターンを示した。
8. 手術組織における免疫染色及び培養細胞におけるWestern blot法にて、神経内分泌腫瘍のマーカーであるChromograninA及びCD56陽性であることが示された。これら所見は確定病理診断に大きく貢献した。
9. ONECはVP-16により著明に細胞増殖が抑制され、臨床病態と一致した。
10. PonatinibおよびSunitinibはONECの細胞増殖を、OSACC、OASCCと比較してより低濃度で抑制した。さらにEverolimusは、全ての細胞株の細胞増殖を抑制した。
11. PonatinibおよびSunitinibはFGF2依存性のAktのリン酸化を抑制した。

本研究において、無血清培養法を用いて、OSCC 細胞株を 5 細胞株、OASCC 細胞株 2 細胞株、および神経内分泌癌由来細胞株を 1 細胞株樹立した。OSCC 細胞株の樹立は多く報告されているが、初代培養時から無血清培養法を用いて樹立した報告は今までにない。さらに、OASCC 由来の 2 細胞株の樹立は世界初であり、今後これら細胞株を用いた口腔腺扁平上皮癌の診断・治療法への応用が期待される。さらに、口腔原発神経内分泌癌由来細胞株の樹立報告も世界初であり同細胞株を用いることで他臓器原発神経内分泌癌細胞株との比較検討も可能となり、口腔原発神経内分泌癌の診断・治療法の開発に大きく貢献することが期待された。