



ESTABLISHMENT OF HUMAN ORAL-CANCER CELL
LINES(KOSC-2 AND -3) CARRYING p53 AND C-myc
ABNORMALITIES BY GENETICIN TREATMENT(癌関連遺伝
子p53およびc-mycの異常を有する口腔癌由来細胞株…

稲垣, 俊郎

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1994-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲1264

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1001264>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・（本籍）	稲垣俊郎（兵庫県）
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学位記番号	博い第893号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与の日付	平成6年3月31日
学位論文題目	ESTABLISHMENT OF HUMAN ORAL-CANCER CELL LINES (KOSC-2 AND-3) CARRYING <i>p53</i> AND <i>C-myc</i> ABNORMALITIES BY GENETICIN TREATMENT (癌関連遺伝子 <i>p53</i> および <i>c-myc</i> の異常を有する口腔癌由来細胞株 (KOSC-2, -3) の Geneticin 処理による樹立)
審査委員	主査 教授 島田桂吉 教授 前田盛 教授 天津睦郎

論文内容の要旨

【緒言】

現在、癌治療法と疾患の生物学的理解が充分でないことを反映して、臨床上の癌生存率は一定に留まろうとしている。In vitro における細胞学的な知見においても細胞株の樹立の困難さ（6～28％）から樹立株が少ない。とりわけ、口腔癌由来の樹立株は1950年代の Eagle の KB細胞に代表されるが、極めて少なく充分な癌に対する知見が得られていない。ヒト由来長期培養株の樹立は、癌細胞自身の in vitro での増殖力が大切で、多数例について培養を行い、偶然樹立株が得られることが多かった。この細胞株樹立の際の主障害となる線維芽細胞の混入を取り除くことにより、目的とする細胞株を効果的に樹立できると考えられる。

一方、癌関連遺伝子、とりわけ癌抑制遺伝子である *p53* の異常は、大腸、肺、脳、卵巣をはじめさまざまな種類の癌で見つかっており、ヒト由来の癌における解明のキーとして *ras* 同様に国際的な研究努力がなされている。今回、無血清培地（GIT）および抗生剤（Geneticin）を用いて、混在する線維芽細胞を選択的に除去し、目的とする癌細胞の単離に成功し、その細胞生物学的特性および癌関連遺伝子に関し分子生物学的解析を行った。

【実験材料および方法】

1) 初代培養および Geneticin 処理

樹立材料は、51歳の男性で口腔底癌由来、もう1例は、72歳の女性、下顎歯肉癌由来の口腔扁平上皮癌であり、ともに頸部リンパ節転移巣組織でヌードマウス背部皮下移植腫瘍株を用いた。初代培養には合成無血清GIT培地、継代培養には10％FCS加RPMI 1640培地を用い、線維芽細胞の選択的剥離には Geneticin を適宜使用した。腫瘍摘出後、細切の後、分散した細胞をプラスチックシャーレに植え込み、CO₂ Incubator 中で静置培養を行った。初代培養中は、静置5日目より5.0 μg/ml のファンギゾンを追加し、2～3日毎に培地交換を行い、その間優勢増殖を示した線維芽細胞の剥離には Geneticin 100 μg/ml を2日暴露し培地交換を行った。

2) 光顕および電顕像の観察

光顕像は、倒立位相差顕微鏡で観察し、電顕像は、直接 Lab-Tek chamber スライドに培養された細胞を常法に従いエポン包埋し、観察は、1200 EX (日本電子, 東京) で行った。

3) 細胞成長曲線および軟寒天中コロニー形成

樹立継代細胞株 2 種 (KOSC-2, KOSC-3) について, RPMI1640+20% FCS による細胞増殖能を比較した。対数増殖期にある細胞をトリプシン-EDTA で処理後, 35mm シャーレ上 1×10^5 細胞ずつ植えこみ, 培養 1 日目より 9 日目まで, 2 日毎にトリパンブルー染色で生細胞数のみを, Turk の血球計算板にて算出し, 増殖曲線を作成した。また, コロニー形成率は 0.3 % 軟寒天中での増殖を観察し, 3 週間後のコロニー数をカウントした。なお, 径 $60 \mu\text{m}$ 以上をコロニーとした。

4) 造腫瘍能の検索

BALB/cA Jcl-nu 系列のヌードマウス背部皮下に 1×10^7 個の細胞を移植し, pathogen-free の状態で維持し, 径 1 から 2 cm になった腫瘍を摘出し, 組織学的観察に供した。

5) 染色体分析

培養細胞を, コルセミドで M 期に同調させ, KCl 処理の後, G-banding を行い, 核型分析を行った。

6) 免疫染色

シャーレ上の細胞およびヌードマウス移植後腫瘍のパラフィン包埋材料を用い, LSAB 法で, ketatin, vimentin および p53 抗体である CM-1, および Pab 240, c-myc 抗体である 9 E10 を用い染色を行った。

7) DNA および RNA 検索

ゲノム DNA の抽出はフェノール・クロロフォルム法により, RNA の抽出はグアニジン法によった。プローブとして, p53 cDNA 1.3 kb, C-myc cDNA 0.9 kb, H-ras cDNA 0.68 kb のものを用い, サザンおよびノーザンブロッティングは, 常法に従った。

8) p53 DNA の PCR およびダイレクトシーケンス

オリゴヌクレオチドプライマーを DNA 合成装置で作成し, エクソン 5, 7, 8 の領域を DNA 増幅装置で増幅し (PCR), SUPREC-2 で精製の後, 蛍光法シーケンス自動装置により塩基配列を解析した。

【結 果】

1) 細胞株樹立と Geneticin 処理

初代培養は, KOSC-2, KOSC-3 とともに GIT 培地での初代培養 5 日目頃より多角形の上皮細胞の増殖が見られ, それとともに線維芽細胞の増殖も見られた。

KOSC-3 に関しては継代 4 日目頃より線維芽細胞の消退がみられた。コロニー法によるクローニング後, 順調な経過で現在まで約 1 年を経過し, 継代 135 代である。一方, KOSC-2 株は初代培養当初より多数の線維芽細胞の混在が見られ, 線維芽細胞増殖優位を呈し腫瘍細胞が消滅したため, 凍結保存した細胞を回復して樹立を試みた。回復時は, 腫瘍細胞優位の状態だったが, その後の継代数 2 ~ 3 回の間は線維芽細胞増殖優位となったため Geneticin ($100 \mu\text{g}/\text{ml}$; 2 日) を使用することにより線維芽細胞のみを剥離し, 腫瘍細胞の単離に成功した。限界希釈法にてクローンを単離し, 現在凍結株回復後継代 90 代である。

2) 樹立株の形態学的特徴および細胞増殖

培養細胞の生物学的特性として、増殖曲線より算出した倍加時間は、KOSC-2、-3それぞれ18.7、21.0時間で、コロニー形成率は、0.012、0.017%と低値であった。形態学的特徴は、大小不同、異型核を有する多稜系の細胞が敷石上に配列し、一部 pile up する傾向が見られた。また、超微形態像としては、異型核に複数の核小体が見られ、細胞質や膜には、Desmosome、Microvilli、Tonofilament の存在が確認された。

3) 染色体分析

ヌードマウス経由樹立株のため、G-banding による染色体核型分析によりヒト由来の確認を行なった。染色体数はそれぞれモード75および57の異数性を呈し、欠失、転座等複雑な異常がみられた。

4) 癌遺伝子検索

c-myc 遺伝子は、DNAの増幅は両細胞株ともなかったものの、KOSC-3細胞は、mRNAの過剰発現が見られた。H-ras 遺伝子は、両株とも発現に大差はなかった。

5) 癌抑制遺伝子 p53 遺伝子検索

制御酵素 Bgl II を用いた RFLP 分析では、ともに一方のアレルの決失である Loss of Heterozygosity (LOH) が見られた。ダイレクトシーケンスの結果 KOSC-3 細胞のコドン248に C (シトシン) から T (チミン) への点突然変異が確認されたものの、KOSC-2 細胞は、検索した限りでは見つからなかった。免疫染色でも、KOSC-3 にのみ陽性所見が見られた。

【考 察】

ヒト癌細胞の細胞株を樹立することは、基礎的、臨床的研究の材料としての意義が大きい。すなわちヒトの癌の細胞レベルでの再現性のある実験系が得られることにその意義がある。しかしながら、現在でもなお細胞株樹立のための線維芽細胞除去についての効果的な方法が確立されていない。本研究では、モノクローナル抗体作成のためのハイブリドーマの成長に好適な培地であると言われている無血清 G I T 培地と、遺伝子工学の実験における薬剤耐性マーカーを有する選択試薬である Geneticin の両者を用いた効果的な樹立法を考案し、自験例の適用に成功した。選択的剥離の至適濃度は100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であることが、著者による別の実験により確認されている。

一方、癌化は、異なった数種の遺伝子によるマルチヒットであると言われている。とりわけ癌遺伝子と癌抑制遺伝子の両面を持つ p53 は、口腔領域では、喫煙と飲酒にかかわる重要な遺伝子であることが報告されている。また、c-myc 遺伝子は、細胞増殖および臨床的には予後との関連が重要視されている遺伝子である。今回、樹立された細胞株の一方の KOSC-3 は、その両遺伝子において mRNA の過剰発現が見られ、点突然変異も、同じ組織型の食道癌などで多く見られるプリン-ピリミジン変異ではなく、ピリミジン-ピリミジン変異であったことは、興味深いところであろう。さらに、LOH が両株に見られたということでは、Vogelstein らが報告しているように、癌化に p53 の異常がなんらかの関与があったことが推測される。また、ヒト乳頭腫ウイルス (HPV) が p53 遺伝子の不活化に関与していることが報告されているため、我々の樹立細胞においても、コンセンサス PCR プライマーを用い、代表的な 9 タイプの検出を試みたところいずれも陰性だったため、樹立株に関しては HPV の関与した癌化ではないことが示唆された。また、p53 と c-myc の直接的な相互作用は未だ不明であるが、今後これらの樹立株を用い、その相互作用を検討する予定である。

【結 語】

- 1) 初代培養に効果的な一方法(G-G法)を考案し、2つの口腔扁平上皮癌由来の細胞株(KOSC-2, KOSC-3)の樹立に成功した。
- 2) 樹立株の癌関連遺伝子の検索では、p53の異常(LOH)は両細胞に見られたが、p53点突然変異およびp53, c-mycのmRNA過剰発現はKOSC-3細胞株にのみ見られた。
- 3) これらの樹立株は、p53遺伝子とc-myc遺伝子の相互作用を明らかにする上で有用な細胞である。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

研究目的

口腔癌治療法の研究には口腔癌由来細胞株を樹立することが必須である。局所環境の影響を強く受ける口腔癌では、従来より細胞培養が極めて難しいとされている。

申請者はその培養にあたって主障害となる宿主共存線維芽細胞の効果的排除法を検討して、有用な口腔癌由来細胞株を樹立し、それを用いて細胞生物学的特性の大きいと考えられている口腔癌細胞における癌関連遺伝子について、分子生物学的検索を行うことを目的に本研究に着手した。

実験材料および方法

口腔扁平上皮癌(口腔底癌および歯肉癌の2種類の臨床材料)の頸部リンパ節転移巣組織をヌードマウス背部皮下に移植し、増殖させた癌組織を材料とした。初代培養には合成無血清GIT培地、継代培養には10%FCS加RPMI1640培地を用いた。初代培養中に優勢に増殖してくる線維芽細胞を選択的に剥離排除するために、Penicillin G製剤であるGeneticinを培地内に100 μ g/ml濃度で注入して線維芽細胞を排除、癌細胞の単離増殖に成功した。樹立した2種類の培養細胞株をKOSC-2およびKOSC-3と命名し、それぞれの細胞株において、細胞増殖曲線とコロニー形成率から両株の細胞増殖能の比較検討、Giemsa-bandingによる染色体の核型分析、癌関連遺伝子c-myc, Ha-rasおよびp53について、免疫染色はLSAB法、DNA抽出はフェノール・クロロフォルム法、RNA抽出はグアニジン法で行い、癌関連遺伝子の発現、異常、相互関係などを検索した。また、細胞および組織レベルでの検討は顕微鏡および顕微鏡像で観察した。

研究結果と評価

実験結果を総括すると以下ようになる。

1. 培養中、線維芽細胞が優勢に増殖し、目的とする腫瘍細胞が死滅する現象に対しては、薬物耐性マーカーを有するGeneticin 100 μ g/mlをメディアウム内で2日間細胞に接触させることにより、線維芽細胞を選択的に排除でき、癌細胞の単離、継代培養に成功する結果が得られた。現在、口腔底癌由来のKOSC-2では90代、歯肉癌由来のKOSC-3では135代まで継代されている。
2. 培養細胞の増殖能については倍加時間(速度)、コロニー形成率ともに低値で、細胞の増殖能はゆるやかであることが示唆された。
3. Giemsa-bandingによる染色体の核型分析では、染色体数はそれぞれモード75および57の異数性を示した。また、欠失、転座等の異常が認められた。
4. 癌遺伝子c-mycのDNAにおける増幅はKOSC-2, 3の両株ともみられなかったが、KOSC-3にはmRNAの過剰発現が認められた。Ha-rasについては両株とも発現程度に有意差はない。癌化および癌抑制の両面をもち、口腔領域では特に喫煙と飲酒に強く関連が疑われる

p53遺伝子の検索では、両株ともアレルの欠失（LOH）がみられ、癌化にp53の異常が関与していることが推測されたが、KOSC-3のみにp53点突然変異がみられ、p53およびc-mycもKOSC-3のmRNAで過剰に発現しているのに対し、KOSC-2ではこれらの所見はみられなかった。

今回の研究から、口腔癌細胞におけるp53とc-mycの相互関係を解明する道が開かれた意義は高く評価される。

本研究は口腔癌細胞の分子生物学的特性を明らかにする上で必須である有用な細胞培養法を確立し、従来十分でなかった口腔癌における癌関連遺伝子についての研究を一層推進する道を開くことに重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は博士（医学）の学位を得る資格があると認める。