

Promotion of collagen production by human fibroblasts with gastric cancer cells in vitro

著者	内藤 恭久
雑誌名	浜松医科大学学報. 学位授与記録
巻	4
ページ	48-50
発行年	1987-03-18
URL	http://hdl.handle.net/10271/1303

doi: 10.1007/BF02890304

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	医博論第 26号	学位授与年月日	昭和62年 3月18日
氏名	内藤 恭久		
論文題目	Promotion of collagen production by human fibroblasts with gastric cancer cells in vitro (組織培養における胃癌細胞による人線維芽細胞のコラーゲン産生促進)		

医学博士 内藤 恭久

論文題目

Promotion of collagen production by human fibroblasts with gastric cancer cells in vitro

(組織培養における胃癌細胞による人線維芽細胞のコラーゲン産生促進)

論文の内容の要旨

〔目的〕

スキルス胃癌(硬性胃癌)は胃壁全層にわたる顕著なコラーゲン線維の増生によって、胃全体は平板状に線維性の肥厚と硬化をきたし、胃内腔は狭小化してleather bottle状の外観を呈する。本症の病理発生には不明な点が多く、なかでもコラーゲン線維の形成機序は全く不明である。すなわち、本線維の増生を胃癌細胞によってもたらされた個体の結合組織性の反応とみるか、胃癌細胞自体の活発な合成によるものとするかは未だ議論的である。

本研究では、これらの点を明らかにすることはスキルス胃癌の形成機序を解明する鍵であると考え、新たに考案した双子培養瓶を用いて胃癌細胞と線維芽細胞とを混合培養し、コラーゲン合成の態度を定性と定量の両面から検討した。

〔材料と方法〕

人胃癌細胞にはスキルス胃癌を含めた3株を、対照には人子宮頸癌由来のHeLa・S3を置いた。線維芽細胞は人正常皮膚由来の2株(4-8代)を用いた。培養方法は両細胞の直接混合培養法と双子培養瓶による双子培養法(間接混合培養法)とを行った。実験開始時の細胞播種数は胃癌細胞 1.0×10^5 cells/ml、線維芽細胞 2.0×10^4 cells/mlの割合であった。培養期間は30日間までとした。コラーゲン線維の観察は、アザン染色法と鍍銀染色法による光顕標本と通常の透過型電顕標本とを用いた。また、コラーゲンの定量はKivirikkoらの方法によるhydroxyprolineの測定とPeterkofskyらの方法による ^3H -prolineの取り込みとによった。

〔結果〕

1) コラーゲン線維の観察

コラーゲン線維の出現は、直接混合培養系と双子培養系の線維芽細胞群が培養3-5日目、単独培養系の線維芽細胞群が10-12日目であった。一方、双子培養系の胃癌細胞と単独培養系の胃癌細胞群では、ともに培養30日間を通してコラーゲン線維は観察されなかった。また、光顕的に見た本線維の量は直接混合培養系と双子培養系の線維芽細胞群が単独培養系の線維芽細胞群に比してより多く、線維も幾分太かった。細胞シート面上に形成されるコラーゲン線維は好銀性の網工を呈するreticular fiberで、その分布はほぼ均一であった。また、電顕的には本線維はdensityの高い細線維の束からなり、明瞭な横溝模様は認められなかった。

2) コラーゲンの定量

双子培養系の線維芽細胞群におけるhydroxyproline量で表わされるコラーゲン合成量はいずれも単独培養系の線維芽細胞群のものより有意に高値を示した。また、双子および単独培養系の胃癌細胞群ではともに極めて低いコラーゲン合成値を示した。更に、単独培養時における ^3H -prolineの取り込みでみた線維芽細胞群と胃癌細胞群のコラーゲン合成量は、それぞれ線維芽細胞群が10%前後、胃癌細胞群が2%前後となり、前者でより高い値を得た。

〔考察および結語〕

通常、コラーゲンは間質細胞によって合成されると考えられているが、Greenら(1965)が上皮細胞

性悪性細胞由来のHeLa細胞でも極めて少量ではあるがコラーゲン合成のあることを報告して以来、多数の研究者が肝臓や胃などの癌細胞でも同様の報告をしている。しかし、癌組織に見られる間質コラーゲンの由来が癌細胞によるとする確証的な知見はまだない。

本研究では、スキルス胃癌細胞を含む胃癌細胞が線維芽細胞のコラーゲン合成を顕著に促進することを *in vitro* で定性と定量の両面から明確にした。この結果はスキルス胃癌の組織学的態度を勘案すると、胃癌細胞の産生する何らかの因子が線維芽細胞の顕著なコラーゲン合成を誘起する可能性を強く示唆しており、本症の病理発生を解明するための重要な手がかりを得たと考えられる。

論文審査の結果の要旨

コラーゲンは主として線維芽細胞によってつくられるが、上皮細胞(肝細胞、HeLa細胞、乳癌細胞)によっても少量がつくることが報告されている(Sakakibaraら、1978; Greenら、1965; Resalら1978)。

また、Takeuchi(1976)はスキルス胃癌のコラーゲンが癌細胞自体によってつくられていることを報告している。これから、1) スキルス胃癌の細胞が実際にどの程度コラーゲンの生成に寄与しているか、2) 癌細胞が直接あるいは間接的に線維芽細胞を刺激はしないかという問題が生じる。この点でスキルス胃癌由来細胞株(KATO-Ⅱ)が、線維芽細胞のムコ多糖(グリコサミノグリカン)生成を刺激するという辻(1982)の報告は興味もたれる。申請者はスキルス胃癌におけるコラーゲン線維の形成機序におけるこの二つの問題に着目し、各種癌細胞を用い、以下の方法で比較検討を行った。

〔方法〕癌細胞としてはKATO-Ⅱ、胃の線維由来細胞株であるMKN-28と-45、線維芽細胞株としては正常皮膚由来のHSF-1と-2、胃癌細胞の対照群としてHeLa細胞(S3株)を用いた。

癌細胞と線維芽細胞の混合培養には直接混合培養法と間接培養法を用いている。後者には双子培養びんを用い、細胞は通過しえないが液体は通過しうる隔壁を設けている。

コラーゲン線維の光学的観察には鍍銀染色法とアザン染色法を用い、超薄切片の電子顕微鏡観察にはウラン染色を行っている。

ヒドロキシプロリンの定量はKivirikkoら(1968)の方法で、コラーゲン合成の測定はトリチウム標識プロリンとコラゲナーゼを用いるPeterkovskyら(1971)の方法でそれぞれ行っている。

〔結果〕直接混合培養(KATO-Ⅱ/HSF-1)ではHSF-1の単独培養に較べ約1週間早くコラーゲン線維が観察されている。前者の場合、線維の数も多く直径も大きい(30日培養)。MKN-28/HSF-1およびMKN-45/HSF-1の系でも同様の結果が得られている。しかし、癌細胞単独ではいずれの場合もコラーゲン線維は観察されない。間接培養でも同様の結果が得られている。

コラーゲン線維は癌細胞巢どうしの間には見られるが、巢内には見出されない。また、電子顕微鏡観察ではコラーゲン線維は約0.1 μ m径の多数の原線維からできている。

ヒドロキシプロリンの定量は形態学的観察を裏付けている。すなわち、単独培養より混合培養(間接)した場合の線維芽細胞一生成物に、はるかに多い(2~2.5倍、21日培養)。相手の癌細胞はどれでもよいが、MKN-45は他に較べて刺激効果が多少低い。線維芽細胞ではプロリンを取り込んだタンパク質の約10%がコラーゲンであるのに対し、他の癌細胞では1~2%にすぎない。これはヒドロキシプロリンの定量結果と対応している。

以上のように、本研究は癌細胞が線維芽細胞のコラーゲン生成を刺激する液性因子を放出していることを初めて示したものであり、高い評価に値する。

また、以下の諸点について試問がなされた。

1. スキルス癌が硬いことの内容
2. コラーゲン以外の線維成分の関与
3. コラーゲン生成刺激の可逆性
4. ヒドロキシプロリンの構造と定量法
5. 用いたコラゲナーゼ
6. 本研究のコラーゲンの型
7. 線維芽細胞の増殖因子

8. 分泌因子の正体
9. 間接混合培養法とその隔壁について
10. 比較に用いた癌細胞の特徴について
11. スキルス癌の発生する器官とその内容

これらの質疑に対する申請者の応答はおおむね適切であった。以上から本論文は医学博士の学位論文としてふさわしいものであることを全委員が一致して判定した。

論文審査担当者	主査	教授	藤田	道也				
	副査	教授	吉村	敬三	副査	教授	白澤	春之
	副査	教授	藤瀬	裕	副査	助教授	金子	栄蔵