

氏名・(本籍) 井上久行(滋賀県)

学位の種類 博士(医学)

学位記番号 博士(論)第146号

学位授与の要件 学位規則第4条第2項該当

学位授与年月日 平成6年3月24日

学位論文題目 ヒト膵癌組織および膵癌培養細胞の形態変化に及ぼす細胞骨格蛋白の影響

審査委員 主査 教授 服部隆則

副査 教授 小玉正智

副査 教授 細田四郎

## 論文内容要旨

### [目的]

細胞を内部から構造的に支える細胞骨格は、種々の癌細胞表現形質に関わっている。本研究は細胞骨格が膵癌細胞の種々の形態変化にどのような影響を及ぼすかを膵癌組織および膵癌培養細胞を用いて検討した。

### [方法]

1) 材料：手術的に得られたヒト膵癌組織、高分化型腺癌 5例、中分化型腺癌 3例、および低分化型腺癌 3例を対象にした。ヒト膵癌培養細胞は膵未分化腺癌由来であるPANC-1細胞を用い、10%FBSを加えたDulbecco's Modified Eagle's Medium中で37°C、5% CO<sub>2</sub> インキュベーターで継代培養し実験に供した、2) 膵癌組織のF-アクチン、ラミニン染色：膵癌組織を液体窒素で凍結し、凍結切片を作成した。3.7%パッファーホルマリンに20分間固定した。F-アクチン染色はNBD-ファロイジン、ラミニン染色は1次抗体としてマウス抗ラットラミニンモノクローナル抗体を用いて、蛍光顕微鏡で観察、撮影した。3) PANC-1細胞の細胞形態および接着能：24 ウェル プラスチックプレート(未コート)にPANC-1細胞 $\times 10^5$ 個を植え、経時的に位相差顕微鏡で観察した。48時間後に、培養液中にTPA 10ng/ml, 100ng/mlを添加し、2、6および24時間培養した。細胞をPBSで3回洗浄後、接着した細胞を2.5% Trypsin・EDTAで全部剥がしカウントした。接着細胞数の百分率を求めた。5) PANC-1細胞内骨格の染色：PANC-1細胞を35mmペトリ皿のカバーガラス上培養し、TPA 10ng/mlを添加し24時間作用させた。PBSで洗浄後-20°Cアセトンで固定し、F-アクチン、サイトケラチンおよびデスマوپラキンを染色した。F-アクチンはNBO-ファロイジンで染色した。サイトケラチンはマウス抗サイトケラチンモノクローナル抗体を、デスマゾームはマウス抗ブタデスマوپラキンのモノクローナルI+II抗体を1次抗体として用い、蛍光顕微鏡で観察、撮影した。6) PANC-1細胞のF-アクチン、サイトケラチンおよびデスマوپラキンの蛋白合成能：TPA10ng/ml処置0、2、4、6、12、17および22時間後のPANC-1細胞培養液中にセレノメチオニン100  $\mu$  Ci/mlを添加し、2時間ラベルした後、細胞を剥がし、0.5% Triton X-100、0.6M KCl、14mM  $\beta$ -mercaptoethanol、2.5mM EGTA、5mM MgCl<sub>2</sub>、1mM phenylmethylsulfonyl fluoride、10 mM HEPES、pH7.4中で細胞を溶解し、10,000gで遠心し、その沈澱物であるTriton X-100 high salt insoluble fractionを得、トリトン細胞骨格蛋白検索の試料とした。この試料を用い7.5% SDS-PAGEによるオートラジオグラフィを行った。

## [結果]

高分化型腺癌では、正常膵管上皮細胞と同様、比較的良くF-アクチン、ラミニンの染色性は保たれていたが、その分布はやや不均一であった。中分化型腺癌では全般にF-アクチン、ラミニンの染色性が低下し、分布の不均一性や不連続性が観察された。低分化型腺癌では、さらにその傾向が著明であった。TPAによりPANC-1細胞の形態変化を示し、細胞基質および細胞間接着能の低下が認められた。TPAにより細胞内アクチンケーブル、サイトケラチンフィラメントおよびデスモプラキンの染色性の減少と分布異常が観察され、特にデスモプラキーン-サイトケラチン複合体構造の破壊が観察された。TPAにより細胞内サイトケラチン、およびデスモプラキン蛋白合成が抑制されていたが、アクチン蛋白合成は抑制されなかった。

## [考察]

膵癌組織において管腔面および境界面でのF-アクチン染色性の減少や分布の変化から、膵癌における腺構造の変化にはF-アクチンが関与していることが明らかになった。また分化度低下に伴い基底膜ラミニンの染色性の低下と分布変化も同様に見られ、腺構造による組織学的分化度にF-アクチンとラミニンはともに関連性があることを示した。また、TPAによる細胞形態変化はサイトケラチンの細胞内でネットワーク形成の減少と、細胞間接着に関わるデスモプラキンの分布の異常を生じたことから、サイトケラチンの持つアンカー作用の低下が細胞形態変化の一因と考えられた。

## [結論]

膵癌細胞の形態変化には、アクチンケーブルやサイトケラチンの細胞骨格蛋白の減少と分布の異常、さらにこれらに伴う細胞接着の低下および基質へのアンカー作用の低下が関連していると考えられた。

## 学位論文審査の結果の要旨

膵癌は生物学的悪性度が高く、組織学的分化度と予後との関連も指摘されており、組織学的、細胞学的分化度を規定する因子の研究が必要になってくる。一方、細胞骨格は、癌細胞の表現形質の主なものである細胞の形態、運動性、増殖性、細胞膜の流動性の変化に深く関わっていることが知られており、従って、膵癌の細胞形態を規定する細胞骨格の研究は、細胞の分化度を探る重要なテーマである。しかし、これまでの細胞骨格の研究は、白血病細胞や悪性転換した線維芽細胞などのin vitroの研究や、固形癌では胃癌、大腸癌および肝癌の研究が多いが、膵癌に対する細胞骨格の報告が少ない。本研究は、膵癌細胞の種々の形態変化に及ぼす細胞骨格の影響についてヒト膵癌組織およびヒト膵癌培養細胞PANC-1を用いて検討したものである。得られた結果は次の通りである。

- 1) 高分化型腺癌では、正常膵管上皮細胞と同様、細胞内のF-アクチンや細胞周辺のラミニンの染色性は比較的良く保たれていたが、その分布はやや不均一であった。
- 2) 中分化型腺癌では、全般にF-アクチン、ラミニンの染色性が低下し、分布の不均一性や不連続性が観察された。低分化型腺癌では、さらにその傾向が著明であった。
- 3) 発癌のプロモーターの一つである12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate (以下TPAと略す。)を投与すると、PANC-1細胞は細胞間接着能の低下と形態変化を認めた。
- 4) TPAにより細胞内アクチンケーブル、サイトケラチンおよびデスモプラキンの減少と分布異常が観察され、特に、デスモプラキーン-サイトケラチン複合体の構造破壊が観察された。

5) TPAにより細胞内サイトケラチン、およびデスモプラキン蛋白合成が抑制されていたが、アクチン蛋白合成は抑制されなかった。

以上の結果より、膵癌組織における細胞骨格であるF-アクチンおよび基底膜への投錨作用であるラミニンは膵癌腺構築と密接に関連し、また、これに基底膜への投錨作用や細胞間接着能を担うアクチンケーブル、サイトケラチン、およびデスモゾームの変化が関連し、膵癌の分化度に応じた腺構築の形成に関与していることが示された。

本研究は、膵癌の組織構築形成能を細胞骨格の面から解明し、膵癌の生物学的悪性度を知る上で重要な基礎的データを提供したものであり、博士（医学）の学位に値するものと認める。