

平成 14 年度 卒業論文

癌細胞と間質細胞の相互作用を標的にした 抗テネイシン抗体の効果に関する研究

指導教官　日下部 守昭
丸山 静香
菅原 英美

生命工学技術科
医薬品開発コース 3 班

004-0011 天谷
004-0045 小栗
004-0169 藤丸
004-0175 松原

目次

1、序論	3
2、目的	4
3、材料および方法	
3-1、使用試薬	5
3-2、使用機器	5
3-3、使用器具	5
3-4、細胞	5
3-5、動物	5
3-6、A357 の継代	6
3-7、マウス胎仔線維芽細胞の調整法	6
3-8、凍結細胞の解凍	7
3-9、線維芽細胞を 12 ウェルプレートに蒔く	7
3-10、マイトマイシン C 処理	8
3-11、マイトマイシン C 処理 1 日後、A375 のフィーダーとの共培養	8
3-12、ELISA	9
3-13、直接接着共培養	10
3-14、分離共培養	10
4、結果	11
5、考察	13
6、個人考察	14
7、参考文献	18
8、図	19
9、謝辞	26
10、和文要旨	27
11、英文要旨	28

1、序論

癌治療の基本的な考え方は大きく分けて3つある。1つ目は、癌が発生した臓器ごと切り捨ててしまう治療(外科的切除)。2つ目は、外科手術できない臓器の癌(例えば脳腫瘍を脳ごと切除は出来ないし、造血組織の癌である白血病の臓器である骨髄は全身にあるので切除できない)、また他の場所にまで広がってしまった癌など、これら外科切除不能の癌を、薬や放射線で叩いて、なるべく小さく・弱く・おとなしくする治療(抗癌剤治療法・放射線法)。3つ目は、免疫力を高めて癌を治そうとする治療(BRM治療)や遺伝子治療などである。

このような基本的な考え方から、現在までの近代医学の癌治療の第一選択肢は、手術が可能な癌なら外科的療法である。そして、手術ができない癌、再発癌、転移癌、また外科的療法の補助として、二次的に抗癌剤療法がある。

抗癌剤療法とは、毒性の強い薬(化学物質)を使って癌細胞を殺してしまおうとする治療法である。抗癌剤が攻撃しようとする癌細胞は、もともと自分の細胞なので、癌細胞を攻撃すると同時に、必ず正常細胞も攻撃することになり、この正常細胞への攻撃が、身体に何らかのダメージを起こしたもののが副作用と呼ばれているものである。つまり、抗癌剤を強くし、癌細胞を強く叩こうとすればするほど、それだけ正常細胞もダメージを受けることになる。また、結果としてこの副作用が患者のQOL(生活の質)を低下させてしまう。そのため、副作用が少ないと考えられる抗癌剤の開発がより多くの人を救うようになるのである。

そこで、本研究では、癌細胞の増殖・転移に重要な働きをしている細胞外マトリックスのテネイシンと周辺組織(間質細胞)との相互作用に着目して、それを阻害する抗テネイシン抗体の効果に関する研究を行った。

2、目的

本実験の目的は、癌細胞の増殖に関与しているテネイシンに着目し、癌細胞一周囲間質細胞間相互作用を標的にした抗癌剤の開発を標的に、腫瘍成長過程における癌細胞と間質細胞相互作用を抗テネイシン抗体によって阻害できるか否かを実験検証することである。そのため、癌細胞と胎仔線維芽細胞間の共培養系を用いて、胎仔線維芽細胞および抗テネイシン抗体が腫瘍細胞の増殖およびテネイシン発現に及ぼす影響を解析した。

3、材料および方法

3-1 <使用試薬>

牛胎仔血清 (SIGMA)、D M E M : ダルベッコ変法イーグル培地 (SIGMA)、PBS (-) (シグマアルドリッヂジャパン)、L-グルタミン (日本製薬株式会社)、ペニシリン-ストレプトマイシン溶液 (SIGMA)、NaHCO₃ (GIBCO)、70%アルコール(Wako)、マイトイシン C (SIGMA)、DMSO、トリプシン-EDTA (GIBCO)、セルカウントキット : Takara Premix WST-1 Cell Proliferation Assay System、2N 硫酸、炭酸緩衝液、ラットモノクローナル抗テネイシン抗体(3-6、8C9、ビオチン化 16-29)、ペルオキシダーゼ標識アビジン、オルソフェニレンジアミン

3-2 <使用機器>

CO₂インキュベーター、オートクレーブ、アスピレーター、ウォーターバス、-80°Cディープフリーザー、プレートリーダー(450nm,490nm フィルター)、プレートウォッシャー、遠心機、倒立顕微鏡、スターラー、倒立顕微鏡、電子天秤、デジタルカメラ、血球計算盤、ピペットマン (200, 1000)

3-3 <使用器具>

無菌シャーレ (10cm)、マルチウェルプレート (12, 24 ウエル)、遠心管 (50ml、15ml)、マイクロチューブ、注射器、マイレックスフィルター、セラムチューブ (1.8ml)、ピペットチップ、ゴムキャップ、ELISA 用 96 ウエルプレート、メスピペット (1ml、5ml、10ml)、パストールビペット、三角フラスコ、ビーカー、メスシリンドー、試薬ビン、スターラーパー、葉さじ、葉包紙、アルミ箔、テフロンプレート、解剖道具 (ピンセット、ハサミ、エーテルコーン、コッヘル、両刃剃刀、虫ピン)、解剖台、バット、ポリビーカー、キムワイプ、ライター、洗ビン、吸引ビン

3-4 <細胞>

腫瘍細胞は A375 (ヒト黒色腫細胞株) を用い、10%牛胎仔血清 (FCS) とペニシリン-ストレプトマイシン (SIGMA) を含む、Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, SIGMA)、37°C・5%CO₂ の条件下で培養した。

線維芽細胞はマウスの胎生 14 日目の胎仔から調整した。初代培養株を用いた。

3-5 <動物>

本実験では財団法人動物繁殖研究所動物飼育施設において繁殖・飼育された BALB/cA-CSA を用いた。餌および水は自由に与えた。交配前日に雌雄を同居させ、翌日に膣栓が発見された日を妊娠 0 日として計算した。胎仔は胎生 14 日で用いた。

3-6 <A375 の継代>

80%サブコンフルエントの A375 培養シャーレ（10センチ）の培養液を吸引除去し、PBS(−)を4～5ml入れ培養液を洗浄した後、PBS(−)を吸引除去した。0.05%トリプシン−EDTA を1ml入れ、細胞の消化状況を顕微鏡下で観察する。細胞が剥がれかかったら、トリプシンをアスピレーターで吸引除去し、シャーレをしっかりと持って叩き、細胞をはがした。培地を5mlくらい入れ、ピペッティングによって回収したら15mlチューブに移し、1500rpm、10min遠心した。（遠心を待つ間にシャーレに10mlずつ培地を分注しておくとよい。）上清を吸引除去し、チューブの細胞塊をタッピングして良くほぐした後、3mlの培地を加え細胞懸濁液を作製し、3枚のシャーレ（10センチ）に蒔き、各シャーレには新たに7mlずつの10%FCS 含 DMEM を加えた。37°C・5%CO₂ インキュベーターで培養した。

3-7 <マウス胎仔維芽細胞の調整法>

全ての操作はクリーンベンチ内で無菌的に行った。

無麻酔下でマウスを頸椎脱臼で淘汰した後、70%アルコールの中に尾までひたし、地肌まで十分アルコール滅菌した。これをクリーンベンチ内に用意した滅菌済みアルミホイルの上に取り出した。マウスの体についているアルコールをアルコール綿で拭き取るが、毛ば立つほどはふき取らず作業中に乾燥させてはならない。腹部正中の皮膚をピンセットでつまみ、はさみでV字に切れ目を入れ、傷の左右をつまんでマウスの体の前後方向に皮膚を引き裂き、腹部の筋肉を露出させた。この時、腹の中は無菌状態であるため、毛の部分には触れないように注意する。腸管には決して傷をつけないように注意しながら腹部筋肉層に切れ目を入れて腹腔を開放した。下腹部に子宮頸管を確認したら、これをピンセットでつまんで固定し、子宮頸管のほぼ中央をハサミで切り、子宮を上に持ち上げ、子宮広間膜を切り離しながら、卵巣が露出するまで吊り上げ、卵管部分で卵巣と切り離した。この間、子宮を下に落したり、置いたりすると汚染されるので注意した。PBS(−)の入ったシャーレ内に胎仔を子宮ごと移し軽く振って洗浄し、清浄 PBS(−)の入ったシャーレに移し、子宮壁などに付着した血液などの汚れを取り除いた。清浄 PBS(−)の入ったシャーレ内で、子宮をハサミで切り開いて胎仔を露出し、同時に胎仔の匹数を数えた。子宮壁を切開するときは胎仔を傷つけないように注意しながら、ハサミの片方を子宮内から壁に沿って挿入しながら切り開いた。羊膜を切開して胎仔を摘出し同時に胎盤から切り離した。その後、清浄 PBS(−)の入った別のシャーレに、胎仔を移し、各胎仔の頭部を切り離した後、胸・腹部の内臓をピンセットでつまみ出し、四肢と体壁のみにした。これを再び清浄 PBS(−)の入った別のシャーレに移し血液を洗浄した。これを滅菌したテフロン板の上に取り出し、両刃かみそりを割ってコッヘルではさんだものでドローッとした状態になるまでチョッピングし、ミンチにした。50ml（または15ml）チューブに PBS(−)を20ml入れて、その中にミンチをいれ、蓋をしてこれを振ってミンチされた組織を攪拌した後、自然

に組織片が沈殿するまで暫く放置した。沈殿後、パストールピペットを付けたアスピレーターを用いて、上清を吸引除去した。この時、液面の表面に落ちたカビの胞子や埃を吸うためピペットの先端をチューブの壁に沿って回すように液を吸った。更に新しい PBS (-) を 20ml 入れて再懸濁し、自然沈殿させた後、再度上清を吸引除去した。この作業を PBS(-) が濁らなくなるまで 5 回位繰り返した。

液が透明になったら 1500rpm、3 分間遠心して組織小片を遠沈した。上清を吸引除去後、0.05% トリプシン-EDTA を 20ml 入れて軽く搖す懸濁後、37°C・5% CO₂ インキュベーターで 10 分酵素消化した。組織を自然沈殿させ、上清を吸引除去した後、30ml の 10% FCS 培地を加え、酵素を失活させた。組織小片が単一細胞になるようピッティングを数回行った後、1500rpm、5 分遠心し、細胞を沈殿させた。上清を吸引除去し、チューブを強くタッピングしてペレットを解し、チューブに 10% FCS 含 DMEM 培地を 12ml~13ml 入れピッティングをし、細胞懸濁液を作製した。これを暫く放置し、未消化の組織片を自然沈殿させた後、上清をピペットで吸い、培養用のシャーレにまいた。CO₂ インキュベーターで 1 時間培養した。この時、まだ浮遊している細胞をピペットで吸って新しいシャーレに移し、続けて培養した。既に付着した細胞に 10% FCS 含 DMEM 培地を 10ml~13ml 入れ、~~培養本筋けた~~ 80% 位コンフルエントになったら、トリプシン-EDTA 処理後、細胞を回収して、10% DMSO と 10% FCS を含んだ DMEM 培地に懸濁して、バイセルを用いて細胞を凍結し保存した。必要量だけ使用時に解凍して用いた。

3-8 <凍結細胞の解凍>

凍結した細胞の入ったセラムチューブを 37°C ウォーターバスで迅速に解凍した。セラムチューブの中の細胞液を 1.5 ml 遠心チューブに移した。細胞液と同量の 10% FCS 含 DMEM 培地を 1 滴ずつ徐々に加え DMSO を徐々に希釗した。1000rpm、3 分間遠心した後、上清を吸引除去した。沈殿を指ではじいてタッピングし、細胞塊を良くほぐし、これに 10% FCS 含 DMEM 培地を加え細胞懸濁液を調整した。予め同培地を分注したシャーレに細胞液を入れ、37°C・CO₂ インキュベーターで培養した

3-9 <線維芽細胞を 12 ウェルプレートに蒔く>

10cm シャーレでサブコンフルエントになった線維芽細胞を 12 ウェルプレートに蒔く時は、その面積比から 12 ウェルプレートの 1 ウェルに 10cm シャーレ一枚分の 1/16 分の 1 を分注する。実際には 12 ウェルのうち 9 ウェルに線維芽細胞をまくため、9 ウェル × 4 枚 = 36 ウェル分の細胞を用意する。つまりサブコンフルエントの 10cm シャーレを 3 枚用意する。

10cm シャーレにサブコンフルエントの線維芽細胞を用意し、培養液をアスピレーターで吸引除去した。PBS(-) を 5ml ほどいれて培養液を洗浄後、吸引除去し、トリプシン-EDTA を 3 ml 入れ、倒立顕微鏡下で細胞の消化の程度を観察した。細胞が剥がれかけてほぼ全体の

細胞が丸くなつた時、酵素液を吸引除去し、シャーレをしっかりと持ち、横から強く叩いて細胞をはがした。10%FCS 含 DMEM 培地を 5ml 入れ、細胞をピペッティングして細胞を回収し、細胞懸濁液を 50ml チューブに回収した。1000rpm、5 分間の遠心後、上清を吸引除去した。遠沈した細胞をほぐすためチューブをタッピングし、48ml の 10%FCS 含 DMEM 培地に再懸濁し、1ml ずつまいた。37°C・CO₂ インキュベーターで一晩培養した。

3-10 <マイトイシン C 処理>

マイトイシン C は 2mg の試薬の入ったビンに 4ml の PBS (-) を加え、よくピペッティングし、1ml ずつ分注（1 本 500 μg/ml になる）し、冷凍保存した。マイトイシン C の使用時の濃度は 10 μg/ml で用いた。使用液としては、この 1ml に 44ml の無血清 DMEM 培地を加え、マイレックスでろ過滅菌後、5ml の FCS を加えたものを調整した。

調整したマイトイシン C 液を線維芽細胞の入った各ウェルに 2ml ずつ入れ、37°C・5% CO₂ インキュベーターで 4 時間反応させた。上清を吸引除去し、10%FCS 含 DMEM 培地を 2ml くらいずつ入れて細胞の表面を洗った。（この操作を 3 回繰り返した）3 回目が洗い終わったら、培地を 2ml ずつ入れ 37°C・CO₂ インキュベーターに入れて一晩培養した。この細胞をフィーダーとして以下の実験を行つた。

3-11 <マイトイシン C 処理 1 日後、A375 のフィーダーとの共培養>

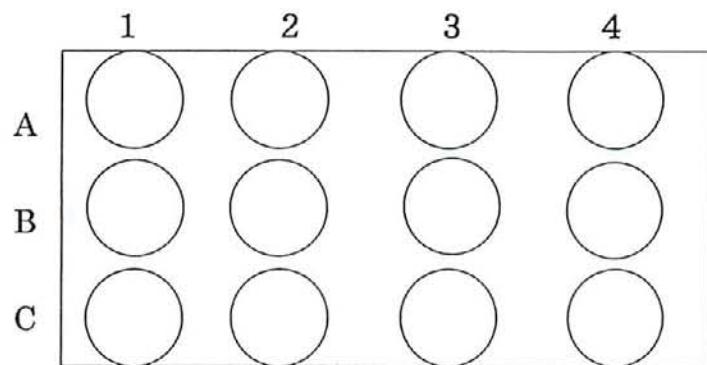
10cm シャーレにサブコンフルエントの A375 を用意し、上清をアスピレーターで吸引除去した。PBS (-) で培養液を洗浄しトリプシ-EDTA を 3 ml 入れ倒立顕微鏡で細胞の消化の様子を観察する。細胞がシャーレから剥がれ始めほぼ丸くなるが表面から離れない状態で、アスピレーターで吸引除去し、シャーレをしっかりと持ち、横から強く叩いて細胞をはがした。10%FCS 含 DMEM 培地を 5ml 入れ、ピペッティングし、細胞懸濁液を 50ml チューブに移した。1000rpm、5 分間遠心し、上清を吸引除去した。チューブをタッピングし細胞の塊をほぐし、5ml の 10%FCS 含 DMEM 培地に懸濁した。その細胞数を血球計算盤で計測し、2.5X10³ 細胞/ml になるように培地を添加し細胞濃度を調整した。この溶液を 2 ml づつ 12 ウェルプレートの各ウェルに分注した。9 ウェルに A375 をまくため、9 ウェル×4 枚=36 ウェル分の細胞を用意した。さらに、9 ウェルのうち 3 ウェルには抗体を添加するため 3 ウェル×4 枚=12 ウェル分に抗体を最終濃度 10 μg/ml になるように添加した。抗体のストック溶液の濃度は 1.5mg/ml のものを用いた。その後、37°C・CO₂ インキュベーターで培養した。

3-12 <ELISA法>

本サンドイッチ ELISA 法では、培養液中の腫瘍由来のヒトテネイシンのみをヒトテネイシン特異的に認識する抗体を用いて検出した。まず、0.05Mの炭酸緩衝液(pH9.6)を用いて最終濃度 10 μg/ml に調整した抗ヒトテネイシン抗体液（8C9）を各ウェルに 50 μl ずつ分注し、37°Cで 2 時間反応させ、8C9 抗体液を吸引除去し、プレートウォッシャーを用いて 0.05%Tween20 を含んだ PBS(-)で洗浄後、ブロッキングバッファー（1%BSA および 5% 正常ヤギ血清を含んだ PBS(-)）を 100 μl づつ分注し、37°Cで 1 時間反応させ、同様に洗浄した。培養時にサンプリングしておいた培養上清をサンプルとし、50 μl づつ分注し、37°Cで 1 時間反応させ、同様に洗浄した。その後、ブロッキング液にて最終濃度 5 μg/ml に調整したビオチン化抗ヒトテネイシン抗体液（16-29）を 50 μl づつ分注し、37°Cで 1 時間反応させ、同様に洗浄した。3,000 倍に希釈したペルオキシダーゼ標識アビジン液を 50 μl づつ分注し、37°Cで 1 時間反応させ、同様に洗浄した。その後、OPD 発色液を 50 μl 分注し、15 分程反応させて発色を確認したら、2N の硫酸を 25 μl づつ文注して発色を止め、プレートリーダー（OD490nm、参照波長 OD655nm）で測定した。

3-13 <直接接触共培養>

BALB/cA-CSA マウスの胎生 14 日齢の胎仔から線維芽細胞の初代培養細胞を 10cm シャーレに調整した。細胞が 10cm シャーレでサブコンフルエントになったら 12 ウェルプレートに均等に蒔いた。培養後 1 日目に、10 μg/ml のマイトイシン C で処理し線維芽細胞の増殖を止めた後、さらに 1 日後、A375 細胞を線維芽細胞上に共培養した。3 列目には最終濃度 10 μg/ml 抗テネイシン抗体加えた。



- 1 . . . Feederのみ
- 2 . . . Feeder+A375
- 3 . . . Feeder+A375+Ab
- 4 . . . A375

というように、一つのプレートで 4 種類の培養を行った。A375 を共培養開始したから、1, 3, 5, 7 日目に細胞数をカウントし、同時に培養上清を回収した。

3-14 <分離共培養>

上記の方法に従って、調整した線維芽細胞をパーミアブルサポート内にまき、一日目に同様にマイトマイシン C 処理をして細胞増殖を停止させた。一日後、同様に調整した A375 細胞を蒔いたウェルにこの線維芽細胞をいれて共培養を開始した。一部には $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 濃度の抗テネイシン抗体を添加した。培養後 1、3、5、7 日目に Takara Premix WST-1 Cell Proliferation Assay System を用いて、細胞の増殖を測定した。同時に培養液を保存した。

7 日目の細胞培養液が回収された時点で、保存しておいた培養液とともに、ヒトテネイシン含量を ELISA（サンドイッチ法）によって測定した。

4、結 果

＜マウス胎仔線維芽細胞およびヒト色素上皮細胞（A375）の培養＞

直接接着共培養の為、線維芽細胞を胎仔から取り出した後、12ウェルプレートにまき込み、1日培養したものである。細胞は接着後進展してプレートに広がっている。細胞の形態は様々であるが、上皮性の細胞がコロニーを形成することは無かった。Fig.1の写真はマイトイシンC処理前の細胞像である。一方、Fig.2に見られるように、A375細胞の単独培養では培養一日では個々の細胞が独立して接着しておりコロニーの形成を観察できなかった。細胞の広がりも大きくないうが巻き込んだ細胞の殆どが接着していることが観察できた。

＜直接接着共培養における細胞像と抗テネイシン抗体添加の影響＞

Fig.3に示すように線維芽細胞上に巻き込まれたA375は線維芽細胞間にコロニーを形成していることが観察できる。線維芽細胞は、単独培養時よりもその細胞質を広げ膜の様にウェルの表面を覆っているが、コロニーを形成したA375細胞は敷石状に接着していることが分かる。このコロニーと線維芽細胞の境界においてはやや紡錘形をした線維芽細胞が接着していることが観察できる。コロニー内のA375細胞間は特に密着している様子も無く細胞間隙が光って見える。しかし、抗テネイシン抗体を添加すると（Fig.4）とA375のコロニーの形態はやや影響を受けていた。各細胞間の間隙が蜜になり、無添加時に観察できた細胞間隙は消失していた。更に、丸く小型の細胞が増えていることが分かる。

＜分離共培養における培養細胞像＞

Fig.5は分離共培養において胎仔線維芽細胞パーミアブルサポート上で培養したものを行きシリン染色して撮影したものである。線維芽細胞はパーミアブルサポート上に数層の層を形成していることがわかる。また、殆どの細胞核がしっかりした形状を保っており培養期間中細胞が健康であったことを示している。

＜直接接觸共培養の細胞増殖とヒトテネイシン発現＞

- Fig.6のグラフに示すように、A375のみを1日目から7日目まで培養したところ順調に増加し続けた（○印）。また、A375と線維芽細胞の直接接着共培養では、A375の増殖は有意ではないが抑制されていた（◇印）。しかし、抗テネイシン抗体を添加すると（◆印）有意に細胞増殖を抑制することが示された（ $p < 0.0091$ ）。線維芽細胞の増殖は、本培養期間内ではマイトイシンC処理により抑制されていた（□印）。一方、A375は培養時にTNを発現することが知られており、今回の実験においてもA375は培養3日以後急激にTN発現量を増加させていった（○印）。共培養した場合、培養5日目で有意に（ $p < 0.0001$ ）TN量の増加を観察できた。培養7日目でも共培養によってTN

発現の増強が観察できた（◇印； $p < 0.0002$ ）。一方、これらの共培養に抗体を添加すると培養 3 日目までは顕著な変化を観察できないものの、培養 5 日目になると共培養のみ（◇印）に比べそのテネイシン発現量は減少する傾向を示した。しかし、単独培養に比べれば有意な増強を観察できた（◆印； $p < 0.006$ ）。面白いことにこの抗体の抑制は培養 7 日目では特に顕著に表われ、共培養にもかかわらず、抗体添加することでテネイシン発現量は単独培養レベルにまで抑制されていた（◆印）。線維芽細胞単独培養ではヒトテネイシンは検出されなかった（□印）。

＜分離共培養の細胞増殖とテネイシン発現＞

- 直接接着培養で見られた、共培養による細胞増殖抑制が細胞密度の向上による栄養障害に起因するか否かを検定する為、パーミアブルサポートを用いた分離共培養を行った。Fig.8 に見られるように、分離培養でも培養後 7 日目に A375 細胞の増殖は有意に抑制（◇印； $p < 0.0001$ ）されることが分かった。更に、これに抗体を添加すると更に有意な増殖抑制が観察できた（◆印と◇印間で $p < 0.0001$ ）。また、線維芽細胞のみの細胞増殖は、マイトイマイシン C 処理によって停止されていた（□印）。一方、Fig.9 に示すように、テネイシンの発現は単独培養（○印）に比べて、共培養では有意に発現の増強が見られた（◇印； $p < 0.0001$ ）。しかし、テネイシン抗体の添加群では、共培養そのものがテネイシン発現を単独培養に比べて増強（◆印； $p < 0.0001$ ）はさせるものの、その増強効果を抗体が有意に抑制した（◆印と◇印間で $p < 0.0085$ ）。また、線維芽細胞単独培養ではヒトテネイシンは検出されなかった（□印）。

5、考察

A375（ヒト黒色腫細胞株）と Feeder(線維芽細胞)を共培養すると Feeder の出す何らかの因子の影響を受けて、A375 の増殖が抑制されるが、テネイシンの発現量は増加する。つまり、Feeder の出す何らかの因子は、癌細胞の増殖を抑制するがテネイシンの発現を促進する働きがあると考えられた。

Feeder+A375 を共培養したのに抗体（3-6）を入れたものは、Feeder+A375 のみの共培養と比べ、細胞増殖率も低く、テネイシン発現量も低い。よって抗体は、A375 の出すテネイシンに反応してテネイシン発現機構に影響しテネイシン発現を抑制したと考えられる。これにより癌細胞が GF (Growth Factor) 感受性を失ったため細胞の増殖が抑制されたのではないかと考えられる。

また、直接接着共培養と分離共培養の2つの培養方法で試した結果、両方とも Feeder と A375 の共培養において細胞の増殖率は増加し、テネイシン発現量は低下している。この結果より線維芽細胞由来の因子が A375 に影響を持つ場合、細胞間の直接の接触は必要なく、培養液を介して作用していることがわかった。つまり、線維芽細胞の出す因子は、液性因子であることが示唆された。

そして、本実験におけるテネイシン量の測定には ELISA (サンドイッチ法) を用いたがこのとき第一層に固定する抗体に抗ヒトテネイシン抗体 (8C9) を、2次抗体として同じく抗ヒトテネイシン抗体 (16-29) のビオチン化抗体を用いた。これらの抗体はヒトテネイシンを特異的に認識するがマウスのテネイシンを認識しないため、マウス線維芽細胞由来の TN は認識されず、共培養における検出テネイシンは全て癌細胞が発現したヒト由来テネイシンであることが示された。

本実験結果が示すように、腫瘍の成長環境においてテネイシンの働きを阻害できたことは、本抗体が、癌転移抑制剤としての可能性を持っていることを示唆していると考えられる。しかしながら、当初考えていた線維芽細胞が発現する因子が細胞の A375 癌細胞の成長を抑制する反面、癌細胞のテネイシン発現を促進するという相反する結果については、今後、他の癌細胞等についても同様な実験検証を行う必要性があると考える。また、抗体の抑制効果については、抗体の濃度や抗体の認識部位などによる効果の違いが予想されるので、これも検証する必要があると考える。

本実験は、線維芽細胞と癌細胞の相互作用にはテネイシンが大いに関与しており、テネイシン抗体はこの関係を阻害し、腫瘍成長を抑制する可能性を示唆するものであった。

6、個人考察

医薬品開発コース 3 班

004-0011 天谷 麻利

本実験は間質細胞と癌細胞の相互作用を標的とし、特にテネイシンという物質について抗テネイシン抗体を入れることで細胞増殖がどうなるか、テネイシンの発現がどうなるか見ようと実験を行ってきた。結果を見るとまず言える事は、A375 の増殖は Feeder と co-culture することにより、細胞増殖が抑制され、テネイシンの発現量は Feeder と co-culture することにより促進された、ということだ。抗体を入れた結果をみると、テネイシンの発現量は減少した。また、細胞の増殖は抗テネイシン抗体によって、テネイシン発現が抑制されたため、増殖も抑制された。

ただ、今回の研究では抗テネイシン抗体が Feeder から出るテネイシンに作用したのか、A375 が出すテネイシンに作用したのかを解明するには至らなかった。それがとても残念に田ヶ原

今回 1 年間にわたり卒業研究を行って、どれだけ自分が研究という仕事に対して考えが甘かったか、どれだけ自分には技術が身についていないかが判った。本実験に必要な Feeder を取り出すのに失敗したときに、ものごとをどれだけ早く正確に行えるかが、実験を成功させる鍵を握っていることを知った。細胞培養でコンタミした時には、無菌室の大掃除をしたことで、どれだけ自分が無菌ということに関して注意をしていなかったが判った。クリーンベンチの中で作業すればすべてが無菌というわけではなかった。一つ一つの作業の中で空気中の菌に汚染されているのだ。クリーンベンチから一度シャーレ等を出してしまったら、アルコールで消毒するということを忘れてはならない。

1 年間、面倒を見てくださった日下部守昭先生には実験に対する態度や意識のしかたなどここでは語りつくせないほどのご指導をしていただきました。先生に教えていただいたことは今後必ず役に立つと思います。ありがとうございました。

最後になりましたが、一年間ほぼ毎日なんだかんだと面倒を見てくださった丸山静香先生にも深く感謝いたします。

医薬品開発コース3班
004-0045 小栗佐知子

本実験では BALB/cA-CSA のマウス胎仔より抽出した線維芽細胞を間質細胞として使用し、癌細胞にはヒト黒色腫細胞株である A375 を用いて目的を達成しようと試みた。しかしながら自分たちで使用する細胞や実験動物は自分で継代・繁殖・維持しなければならないため、結果が出るまでの過程は想像していたよりも大変なものであった。

そして結果として抗体 3-6 は A375 のテネイシン発現量を抑制し、それにより細胞増殖も抑制することがわかったが、一つ検討すべき事が残ってしまったのは大変心残りである。

1年間という長いようで短いこの期間中に多くの場面で失敗し、試行錯誤することで私はとても多くの事を学んだように思える。未熟な培養技術のためにコンタミしたときは基礎的な技術を再確認できたり、汚染を防ぐために班員みんなで無菌室を掃除したときは、大切なのは実験内容だけでなく、まずは実験をより良く行える環境を作りそれを保っていく事がとても重要だと気づいた。そしていかに効率よく、正確に、無駄なく実験するかを常に考えて行動すべきである。

卒業研究を通して日下部先生にご指導頂いた実験技術や知識、研究に対する姿勢は、今後私にとって大きな力となっていくと思う。心から大変感謝致します。また、一年間私たちの卒業研究に日々協力し、支えてくださった丸山静香先生にも大変感謝しております。

医薬品開発コース3班

004-0175 松原 史典

本研究では、胎生14日令の胎仔マウスから線維芽細胞を採取しヒト黒色腫細胞株であるA375と共に培養した時の相互作用に抗テネイシン抗体がどのような効果があるかを研究しました。結果として抗体が線維芽細胞から出る因子を抑制した。また、テネイシンの発現量を抑制すること A375 の増殖も抑制される事が判った。しかし、その詳細な理由を解明するまでには、至らなかった事が残念です。

約1年間行った卒業研究では、非常に多くの事を学んだと同時に自分の力不足を痛感させられた。本研究では、幅広い知識や技術が必要であるが実験自体は、2週間もあれば結果を出すことが出来ました。しかし、単純なミスやアクシデントを何回もして何度もやり直しました。実験で動物を使用するため春休みから続けたマウスの飼育・管理・繁殖では、初めの頃無計画に交配をしたためマウスを増やしすぎてしまい飼育・管理をするのが大変苦労した。細胞培養では、夏休みが終わり、これから本格的に本実験を始めようとした時にコンタミネーションという事態に遭い実験が思うように進まなかった。しかし、班員4人で協力し、もう一度基本的な事を見直したために解決することが出来き、数々の失敗をしても諦めないでやり続ける事の大切さを身をもって感じた。

最後に本研究で技術や知識だけでなく貴重な経験、物事に対する姿勢をご指導いただいた日下部守昭先生、日々の実習をサポートしていただいた丸山静香先生には深く感謝しています。

今後、この研究で行った技術が、癌治療へ応用可能になり多くの人々の役に立つことを期待しています。

医薬品開発コース 3 班

004-0169 藤丸 亮介

現在使用されている抗ガン剤の多くは副作用が強いため、副作用が少ないと考えられている抗テネイシン抗体を用いてガン細胞と線維芽細胞の相互作用について調べることを目的とし実験を行なった。私達の実験では、BALB/cA-CSA の胎生 14 日令胎仔マウスから無菌的に線維芽細胞を取り出し培養し、マイトマイシン処理を行い線維芽細胞の増殖を止めヒト黒色腫細胞株 A-375 と共に培養しテネイシン抗体を用いて細胞増殖とテネイシンの発現量について検証した。

結果、線維芽細胞と A-375 の共培養に抗テネイシン抗体を入れたものは、纖維芽細胞と A-375 のみの共培養と比べ、細胞増殖も低く、テネイシンの発現量が低かった。このことから、この抗体によりテネイシンを抑制することで A-375 の増殖を抑制できたと考えられる。

初めの頃の線維芽細胞や A-375 の培養では技術力不足のためにコンタミネーションしてしまい初心にかぎり培養方法の再確認をした。また、マイトマイシン処理では濃度調整や処理時間の調整がうまくいかず線維芽細胞の増殖が止まらず四苦八苦した。研究とは皆で協力し合い実験をし、1つの結果を出し、また、1つの作業に対しても意味がありその意味を考えながら行い、結果はどんな結果であれ絶対であるということを学んだ。動物の飼育、管理や繁殖では、無駄に交配かけず、系統維持するものや実験で扱うマウスをしっかりと認識することが当たり前だが、改めて大切なことを学んだ。

今後は、1年間を通して行なった卒業研究で学び得た細胞の培養や解凍凍結技術やその他の実験技術、知識を糧に今後に活かしたい。

7、参考文献

- ①実験動物の基礎と技術 1. 総論：鈴木信夫
丸善株式会社 東京・日本橋 1988
P88、P90
- ②ティッシュ・エンジニアリング : 編集者 平川 宗信
発行者 上田 実
財団法人 名古屋大学出版会
1999年10月10日 初版第1刷発行
P14~15、P36
- ③Annual Review 細胞生物学 1993 : 編集者 矢原一郎、御子柴克彦、月田承一郎
発行者 株式会社 中外医学社
1993年6月10日 初版1刷
P307~311
- ④中村敏一編著 Bio Science 用語バイブル 発生・神経
: 編集者 中村 敏一
発行者 葛西 文明
発行所 株式会社 羊土社
1996年2月1日 第1刷発行
P78~79

8、図

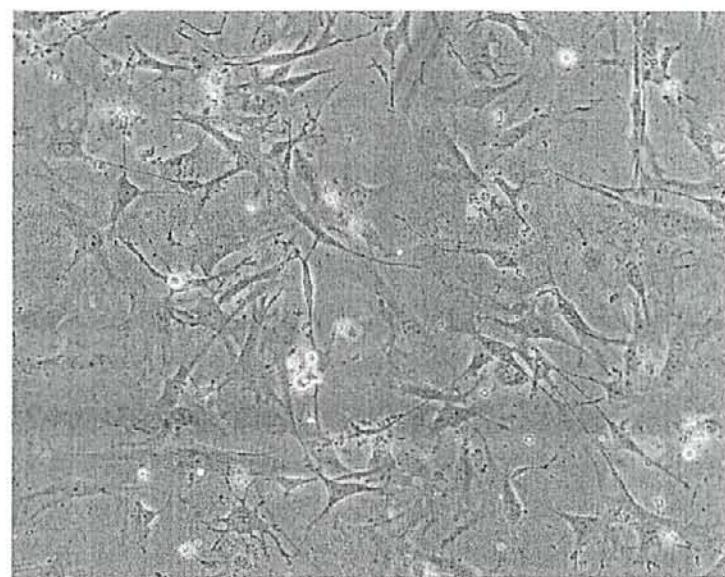


Fig.1 マウス胎仔線維芽細胞の単独培養 (一日目)

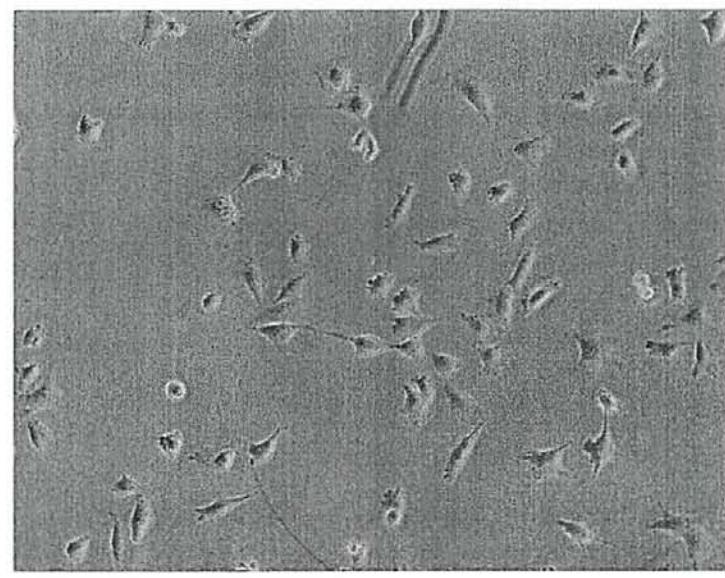


Fig.2 A375 の単独培養 (一日目)

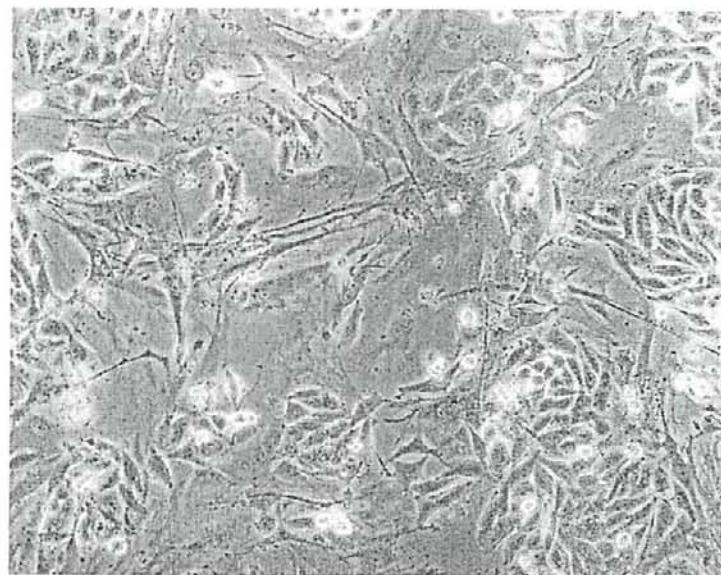


Fig.3 直接接着共培養 3 日目の線維芽細胞と A375

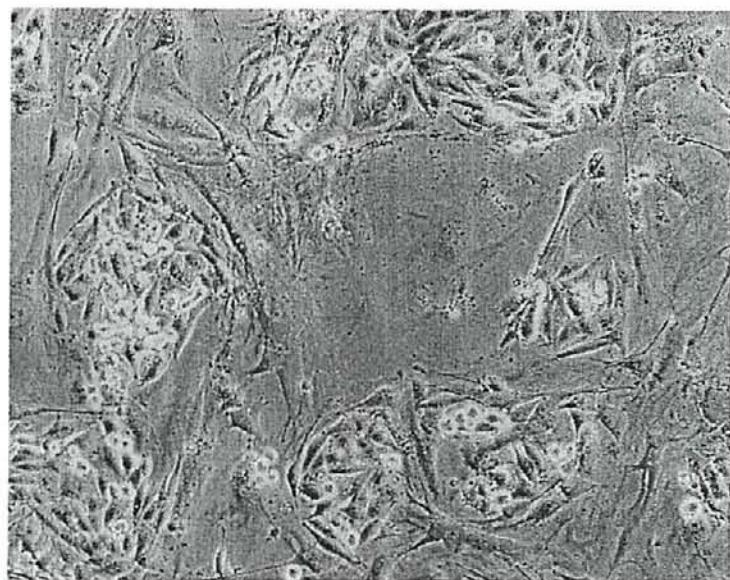


Fig.4 直接接着共培養 3 日目の線維芽細胞と A375 に抗体を添加したもの

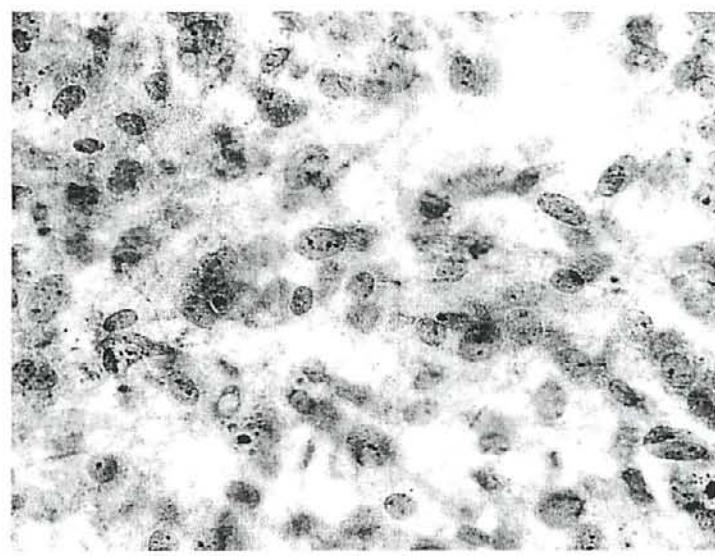


Fig.5 パーミアブルサポート上で3日間培養した線維芽細胞の様子

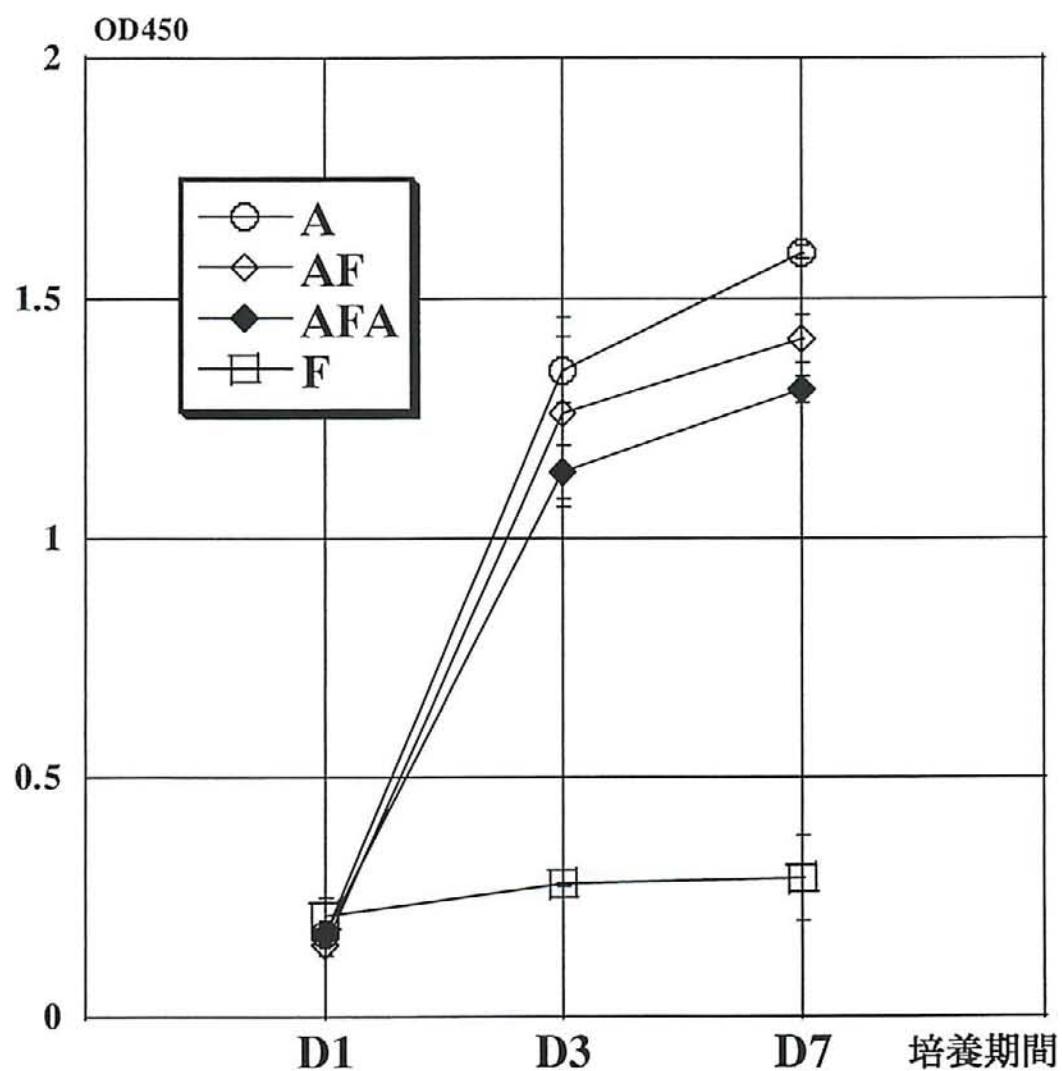


Fig. 6 癌細胞と線維芽細胞の共培養における抗テネイシン抗体と
胎仔線維芽細胞の細胞増殖に対する影響

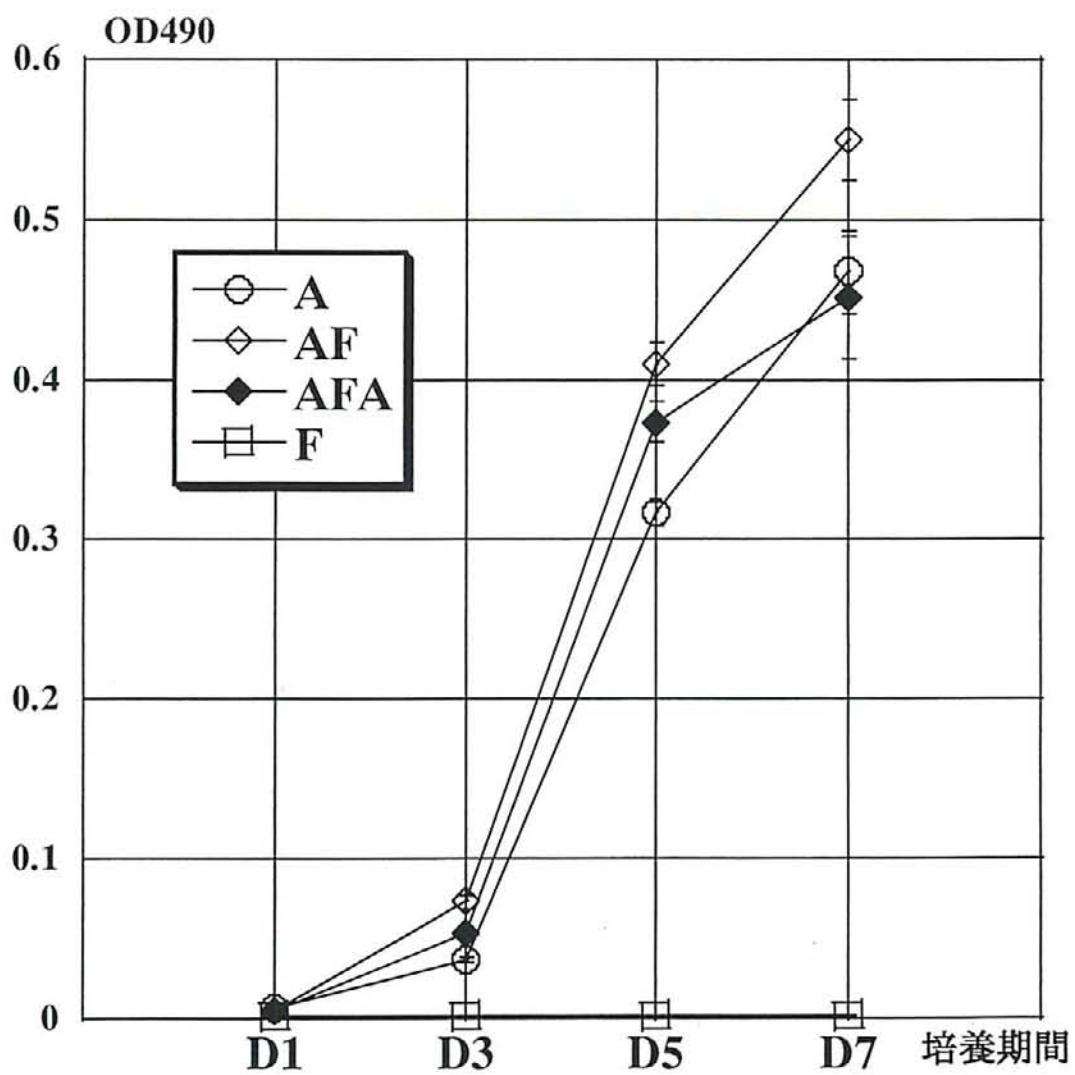


Fig. 7 癌細胞と線維芽細胞の共培養における抗テネイシン抗体
と線維芽細胞のテネイシン発現に対する影響

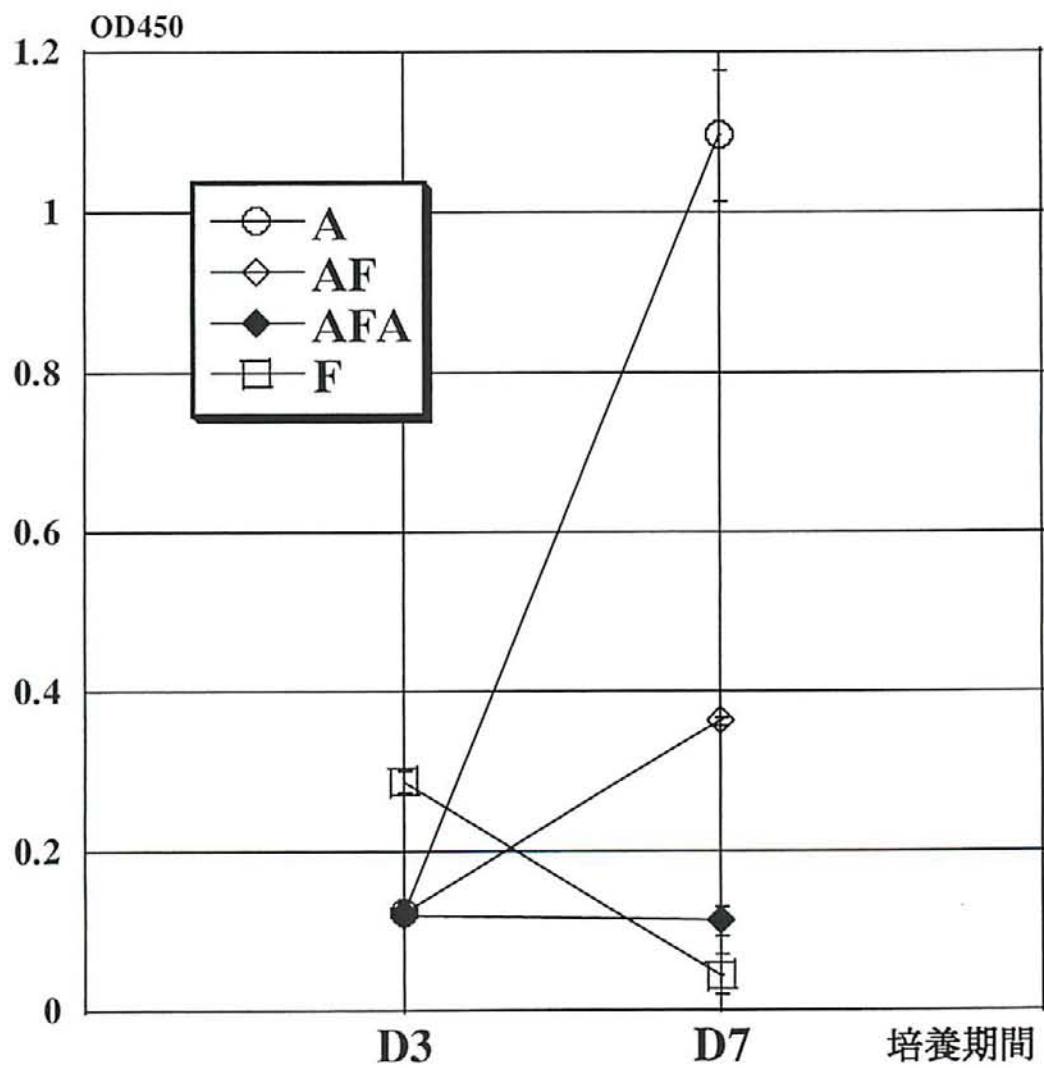


Fig. 8 癌細胞と線維芽細胞の共培養における抗テネイシン抗体と
胎仔線維芽細胞の細胞増殖に対する影響(分離共培養)

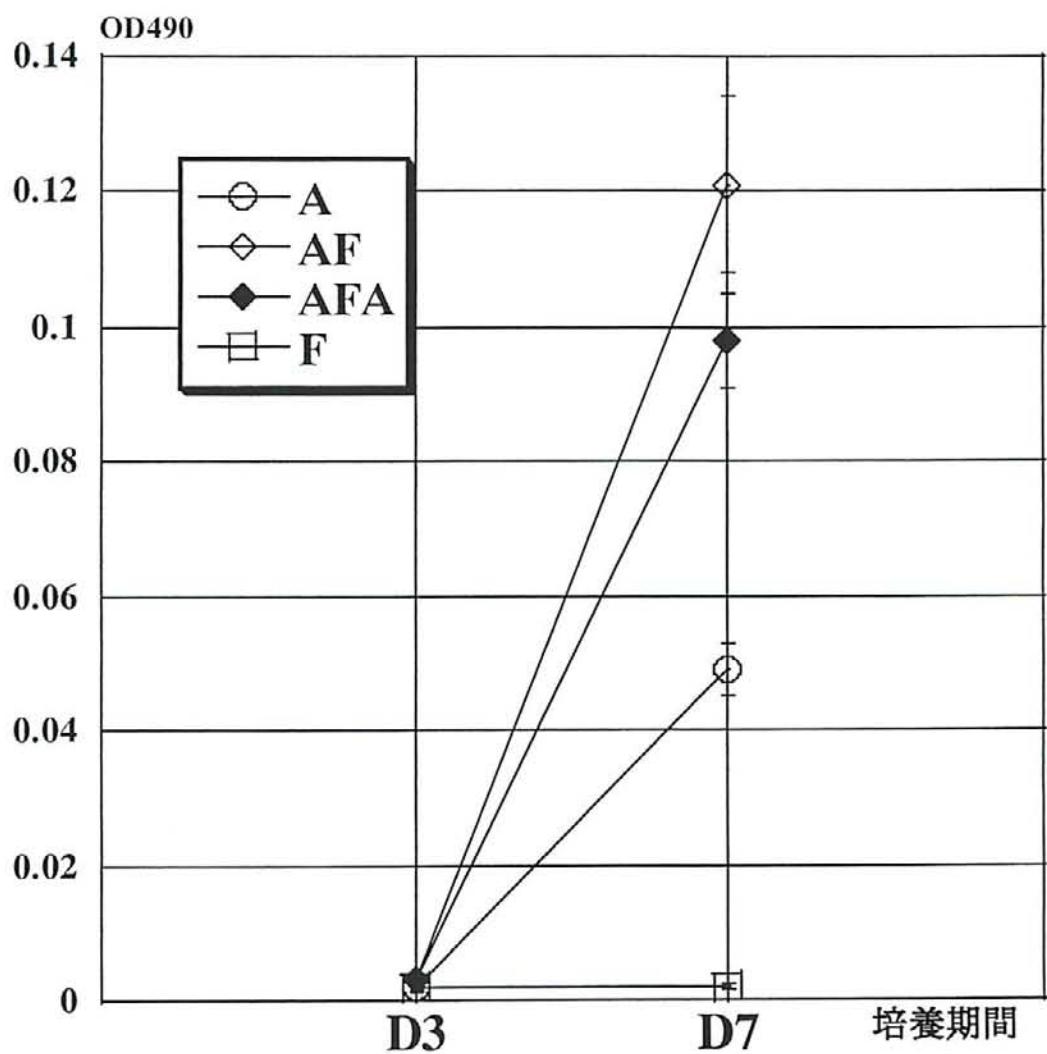


Fig. 9 癌細胞と線維芽細胞の共培養における抗テネイシン抗体と胎仔線維芽細胞のテネイシン発現に対する影響(分離共培養)

9、謝辞

本研究を進めるにあたり、指導教官である日下部守昭先生にご指導頂きました。卒業研究に関するご指導はもちろんのこと、研究に対する姿勢や、時には就職活動に関するアドバイスなどもご指導して頂き、心より深く感謝しております。

また、本研究における ELISA にご協力くださいましたアロカ株式会社 ANB 筑波研究所の皆様にも深くお礼を申し上げます。

最後になりましたが、長期間に及ぶ実験にご協力くださいました丸山静香先生にも感謝いたします。ありがとうございました。