

学位授与番号：乙 3254 号

氏 名：平林 鉄也

学位の種類：博士（医学）

学位授与日付：令和 1 年 6 月 26 日

学位論文名：

**Establishment and characterization of a squamous cell carcinoma cell line,  
designated hZK-1, derived from a metastatic lymph node tumor of the tongue.**

（舌扁平上皮癌のリンパ節転移巣由来細胞株 hZK-1 の樹立とその特徴）

学位論文審査委員長：教授 馬目佳信

学位論文審査委員：教授 岡野ジェームス洋尚 教授 島田貴

# 論文要旨

氏名	平林 鉄也	指導教授名	岡部 正隆
主論文			
Establishment and characterization of a squamous cell carcinoma cell line, designated hZK-1, derived from a metastatic lymph node tumor of the tongue. (舌扁平上皮癌のリンパ節転移巣由来細胞株 hZK-1 の樹立とその特徴)			
Tetsuya Hirabayashi, Haruka Takahashi, Miho Watanabe, Toshiaki Tachibana. Human Cell. 2017; 30: 319-326.			
要旨			
<p>舌扁平上皮癌に罹患した 82 歳日本人女性のリンパ節転移巣から、舌癌由来の培養細胞である hZK-1 細胞株を樹立することに成功した。この腫瘍の病理学的診断は、中分化型から高分化型の扁平上皮癌であった。hZK-1 細胞は多角の上皮様細胞で、癌細胞特有の多形性に富んでいた。隣接する hZK-1 細胞同士は、デスモソームおよびよく発達した微絨毛により結合しており、細胞質内に多数の遊離リボソームが観察された。hZK-1 細胞の倍加時間は、継代 10 代目、20 代目、および 30 代目でそれぞれ約 36 時間、33 時間、および 29 時間であった。hZK-1 細胞株の染色体数は三倍体で、染色体数分布は 75~80 であった。hZK-1 細胞の免疫染色では、CK17、Ki67、および p53 に対し陽性であり、CK13 には陰性であった。hZK-1 細胞は、HPV16 および HPV18 の感染は認められなかった。hZK-1 細胞で HPV が検出されなかったことから、この細胞の不死化はウイルスによる形質移入に起因しなかったことが示された。hZK-1 細胞を SCID マウスの皮下組織に移植したが、生着は認められなかった。hZK-1 細胞(培地 3 ml 中 <math>2 \times 10^6</math> 個)は、3 日間で 2.6 ng/ml の血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) を産生した。hZK-1 細胞内の HIF-1<math>\alpha</math> 発現および VEGF 分泌は、低酸素状態により亢進した。HIF-1<math>\alpha</math> 阻害剤である YC-1 は、低酸素状態により誘導される VEGF 分泌を部分的に阻害した。逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) の結果、hZK-1 細胞では CK17、Ki67、および p53 が高発現していることが確認された。hZK-1 細胞は CDDP、TXT、5-FU、およびこれら 3 種の混合抗癌剤に対し感受性がなかった。hZK-1 細胞は HPV 非依存性 OSCC に対する化学療法や免疫療法の開発に極めて有用な細胞株である可能性がある。</p>			

## 学位論文審査結果の要旨

平林鉄也氏の学位審査論文は主論文 1 編よりなり「Establishment and characterization of a squamous cell carcinoma cell line, designated hZK-1, derived from a metastatic lymph node tumor of the tongue.」と題するもので Human Cell 誌に掲載され、解剖学分野に於いて岡部正隆教授の指導によるものである。

本研究では82歳の日本人女性の中～高分化型の舌癌のリンパ節転移巣から腫瘍細胞を分離し舌癌に特徴的な細胞株を確立してその特徴を調べたもので、特に本細胞株がヒトパピローマウイルスと関係せず臨床でよく用いられる CDDP、TXT、5-FU 等に感受性を持たないことなどを実験的に示したものである。

学位公開審査会は令和元年5月21日、岡野ジェームス洋尚教授、島田貴教授、岡部正隆教授、立花利公教授のご臨席の下、開催された。主論文の概要を中心とした平林氏の発表に続いて口頭試問を行った。席上、審査委員から内容に関する以下のような数多くの質疑があった。

- ・細胞のクローニングは何故行わなかったのか。
- ・継代とともに腫瘍細胞のダブリングタイムが短縮しているのは何故か。
- ・細胞株に複数のクローンが混在している可能性はないか。
- ・腫瘍細胞のセルサイクルのパターンはどうか。
- ・細胞株での各種マーカー発現は原発巣やリンパ節転移巣のものと一致するの  
か。
- ・核型が3倍体であることにどのような意義があるのか。
- ・透過電子顕微鏡像は舌癌の細胞として典型的なものなのか。
- ・電顕像としてこの腫瘍細胞の特徴的な所見は何か。
- ・HPV ウイルスが陰性である意義は何か。
- ・他のウイルス感染による発がんの可能性はないか。
- ・免疫不全マウスに腫瘍を形成させることができなかった理由をどのように考  
えるか。
- ・細胞接着因子の発現はどうだったのか。
- ・発現している VEGF の型は何か。
- ・組織での血管新生因子の発現はどうだったのか。
- ・VEGF に対する受容体の発現は認められたのか。
- ・HIF1- $\alpha$  の誘導はこの細胞でどのように調整されているのか。
- ・p53 タンパクの発現量や局在に問題はないのか。変異はなかったのか。
- ・サイトケラチン 13 と 17 の発現のパターンはどのように説明されるのか。
- ・本研究で用いた抗腫瘍薬感受性試験の原理はどのようなものか。

- ・感受性のある細胞を対照にしていないのは何故か。
- ・感受性を調べている時間はダブリングタイムに比べて短すぎるのではないか。
- ・他の感受性試験の方法との比較はどうだったのか。
- ・何故この腫瘍は抗腫瘍薬 3 種ともに感受性が認められなかったのか。
- ・実際の患者では 3 種の抗腫瘍薬への反応性はどうか。
- ・結局この腫瘍の発がんにはどのような因子が関与しているのか。
- ・他のオンコジーンの前転写や発現はどうか。

等々。

平林氏はこれらの質問に自分のデータや考察を含めて的確に回答した。その後、岡野教授および島田教授と慎重に審議した結果、本研究で新たに作成された hZK-1 細胞株は、舌癌の発生と大きく関わるヒトパピローマウイルス 16 型 18 型の遺伝子を持たずまた臨床でよく用いられる CDDP、TXT、5-FU、およびこれら 3 種の混合抗癌剤に対し感受性を持たないものであるため、HPV 非依存性 OSCC に対する化学療法や免疫療法の開発に極めて有用な細胞株でありこの疾患を治療する上で重要であると考え学位を授与するに意義は十分大きいと判断した。