The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	ヒト無色素性黒色腫のレトロウイルスによる初代ヒト培養細胞のトランスフォーメーションと，このウイルスの水平伝播に関する研究
Author(s)	梁川，哲雄
Citation	大阪大学，1980，博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/32511
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【13】

氏名・(本籍)	梁川哲雄（やながわてつお）
学位の種類	歯学博士
学位記番号	第 4846 号
学位授与の日付	昭和55年3月15日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
学位論文題目	**ヒト無色素性黒色腫のレトロウイルスによる初代ヒト培養細胞のトランスフォーメーションと，このウイルスの水平伝播に関する研究**
論文審査委員	(主査) 教授 宮崎 正 (副査) 教授 八木 俊雄　教授 作田 正義　助教授 岩山 幸雄 講師 杉中 秀寿

論文内容の要旨

逆転写酵素を保有する内因性レトロウイルスはヒト発癌過程においても関与していることが強く示唆されている。しかし現在まで，発癌因子を保有するヒト・レトロウイルスを分離同定したという報告は少ない。ただ，横紋筋肉腫，転移性腺癌ならびに白血病細胞から悪性変換能を有するレトロウイルスを分離したとする報告を散見するのみである。

一方，ヒト悪性黒色腫の生検組織およびその株化細胞には，レトロウイルスの著明な発現を認めると報告されている。

そこで，著者はヒト無色素性黒色腫由来の株化細胞（以下Melanoma細胞と略す）を超微形態学的ならびにウイルス学的に検索した結果，この細胞に著明なレトロウイルスの発現を認めた。よって，このレトロウイルスの生物学的特性，特にヒト線維芽細胞への感染性および悪性変換能について解析した。

Melanoma細胞はイーグルの最少必須培地に仔牛血清を10％の割合に含むように調整した増殖培養液を用いて，炭酸ガス培養器中で37℃にて培養した。このMelanoma単層培養細胞をマッソン染色すると，全体の細胞集団の2％の細胞にメラニン顆粒の存在が認められた。また，この細胞を電子顕微鏡にて観察すると，細胞質にプレメラノソームおよびメラノソームが存在し，メラノサイトと同様の構造を示した。この実験結果より，Melanoma細胞はメラノサイト由来の細胞であることを明らかにした。このMelanoma細胞は増殖培養液に寒天を0.3％の割合に含む軟寒天培地中で37℃にて培養すると，約85％の細胞はコロニーを形成した。また，ヌードマウス皮下にMelanoma細胞（10^7個）を移植すると腫瘍を形成した。故に，このMelanoma細胞は悪性変換した細胞であることが明らかにされ

た。すでに，悪性変換したマウス黒色腫由来の細胞を5-bromodeoxyuridine（BUdR）で処理すると悪性変換能が抑制されると報告されている。そこで，Melanoma細胞をBUdR処理して，軟寒天培地中でのコロニー形成能ならびに細胞増殖能に対する影響を検索した。その結果，Melanoma細胞はBUdR処理により，コロニー形成率は1.7%に低下し，また細胞増殖能も強く抑制された。

悪性変換したMelanoma細胞を超微構造学的に観察すると，内因性A，BおよびC型ウイルス粒子の発現を認めた。また，Melanoma細胞は培養上清中に，逆転写酵素活性を保有するレトロウイルス粒子を産生し，この粒子密度は蔗糖密度にして1.17g/cm^{3}であった。

そこで，Melanoma細胞の産生するレトロウイルスの悪性変換能につき検索を行った。すなわち，Melanomaレトロウイルスを含むMelanoma細胞抽出濾液ならびに培養上清を初代ヒト線維芽細胞に接種し，継代培養を行った。3代継代培養を行い，約50日間培養すると，悪性変換した細胞の集落であるフォーカスが出現した。また，フォーカスを形成した単層培養細胞は軟寒天培地中でコロニーを形成したので，Melanomaレトロウイルスは悪性変換能を保有していることが示唆された。Melanomaレトロウイルスの内因性逆転写酵素反応により合成されたＤＮＡは宿主細胞の染色体ＤＮＡとの間に相補性が認められた。この実験結果より，MelanomaレトロウイルスはプロウイルスＤＮＡとして宿主細胞染色体ＤＮＡに組み込まれていることが明らかになった。そこで，MelanomaレトロウイルスのプロウイルスＤＮＡが組み込まれているMelanoma細胞染色体DNAで初代ヒト線維芽細胞を処理したところ，フォーカスが形成された。また，フォーカスを形成した細胞集落の一部にメラニン顆粒の存在が認められた。この実験結果は，Melanomaレトロウイルスの悪性変換能を発現する遺伝子もまた，ＤＮＡに逆転写され，宿主細胞染色体ＤＮＡに組み込まれていることを強く示唆している。

次に，このMelanomaレトロウイルス遺伝子の水平伝播の可能性を検索するため，Melanoma細胞に非腫瘍原性RNAウイルスである風疹ウイルスを感染させ，風疹ウイルス持続感染Melanoma細胞（以下Melanoma（M-33）と略記する）を確立し，産生された感染性ウイルスの生物学的特性につき解析を行った。Melanoma（M-33）細胞には，間接蛍光抗体法により風疹ウイルスの特異抗原を細胞質に認めた。また，Melanoma（M-33）細胞は抗原性において，風疹ウイルス野生株とMelanomaレトロウイルスの合いの子ウイルスを産生していることを，ウイルスのプラック形成能に対する抗血清による中和試験にて明らかにした。そこで，この合いの子ウイルスの悪性変換能を検討するために，初代ヒト線維芽細胞に感染させ，フォーカス形成の有無を検索したところ，この合いの子ウイルスは，初代ヒト線維芽細胞を悪性変換させることは出来なかった。しかし，Melanoma（M-33）細胞では，非感染Melanoma細胞と比較して，レトロウイルスの産生が増強された。

論文の審査結果の要旨

本研究は，ヒト無色素性黒色腫由来の株化細胞の産生するレトロウイルスの生物学的特性を多角的に解析したものである。この研究で，初めて明らかにされた事実は次のとおりである。　1）ヒト無

色素性黒色腫由来のtransformした株化細胞(Melanoma)はレトロウイルスを産生し，このレトロウイルスは初代ヒト培養細胞をtransformさせる。2）Melanoma細胞染色体DNAで初代ヒト培養細胞にtransfectionが成立し，transformした細胞の集落であるフォーカスが形成される。 3）non-oncogenic RNAウイルスである風疹ウイルスの持続感染したMelanoma細胞〔Melanoma (M-33)〕は，抗原性において風疹ウイルスとレトロウイルスとの合の子ウイルスを産生している。但し，この合の子ウイルスは逆転写酵素並びにtransform能を保有していない。しかし，4）Melanoma(M-33)細胞においては親株細胞であるMelanoma細胞と比較して，レトロウイルスの産生がより活性化されている。

本論文で述べられた以上の知見は，ヒト悪性黒色腫の発現機序を明らかにする上で，大きな意義を持つ。またレトロウイルスとnon-oncogenic RNAウイルスとの遺伝子相互作用が生物学的観点から深く解析されている。したがって梁川哲雄君の業績は，発展性に富んだ優れた研究であり，歯学博士の学位を得る資格があると認める。