

Title	人由来培養網膜芽細胞腫の分化誘導についての研究
Author(s)	笹部, 哲生
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/33328
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

[13]

氏名・(本籍)	笹部哲生
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 5986 号
学位授与の日付	昭和 58 年 3 月 25 日
学位授与の要件	医学研究科 外科系専攻 学位規則第 5 条第 1 項該当
学位論文題目	人由来培養網膜芽細胞腫の分化誘導についての研究
論文審査委員	(主査) 教授 真鍋 禮三 (副査) 教授 藤田 尚男 教授 近藤 宗平

論 文 内 容 の 要 旨

〔目 的〕

網膜芽細胞腫は、小児眼内悪性腫瘍中最も高頻度に発生する腫瘍である。その保存的治療法として放射線療法、光凝固法等があるが、適応範囲は狭く大部分が現状では眼球摘出を余儀なくされている。一方、網膜芽細胞腫には spontaneous regression が報告されている。しかし、その機構は未だ明らかにされておらず、癌細胞の分化あるいは免疫反応などによるものと考えられている。眼球摘出を避けるために、より効果的な保存的治療法の開発が望まれているが、spontaneous regression の機構の解明が新しい治療法につながるものと考えられる。一般に癌細胞内の cyclic AMP (cAMP) は少ないことが知られており、細胞内 cAMP を増加させると、癌細胞の分化が誘導されると共に細胞増殖が抑制されるという報告もある。

本研究はヒト網膜芽細胞腫の細胞内 cAMP を増加させた時の in vitro に於ける増殖能及び形態学的変化について検討する。

〔方法ならびに成績〕

ヒト由来網膜芽細胞腫培養細胞 (Y-79) を本研究に用いた。細胞は 15% 牛胎児血清を含む alpha-MEM を用い 37°C、5% 炭酸ガス培養器の中で浮遊培養した。Y-79 細胞の細胞内 cAMP を増加させる為には、cAMP の誘導体である 8-bromo cAMP (8 BrcAMP) を培養液中に添加した。対照としては、上記の培養液のみで培養した細胞を用いた。

1) 細胞増殖への影響

培養液中に 8 BrcAMP (0.01 mM—1 mM) を加え、その後の Y-79 細胞の細胞数の変化を対照と比

較した。0.1mM以上の8 BrcAMPを添加すると細胞数の増加が抑制された。次にcAMP分解酵素の阻害剤 (theophylline) の影響を調べると8 BrcAMP添加時と同様に細胞数の増加に抑制が認められた。一方8 BrcAMPと分子構造の類似する8 BrcGMP, AMPについても同様の実験を行ったが、細胞増殖に対する抑制効果は認められなかった。以上により細胞増殖の抑制は細胞内cAMPの増加によるものであることが明らかになった。

2) 細胞周期への影響

Y-79細胞を0.1mM 8 BrcAMPを含む培養液で5日間培養後、培養液より8 BrcAMPを除き³H-thymidine (0.1 μ Ci/ml) を含む培養液で3時間培養した後、オートラジオグラフィーでlabelling indexを求めた。その結果、8 BrcAMPで処理した細胞のlabelling indexは対照に比べて低下していた。これは細胞内cAMPの増加により、細胞のDNA合成が抑制されていることを示している。次にそれらの細胞のDNAをFeulgen染色し、その蛍光量を蛍光測光顕微鏡で測定した。対照では、細胞当りの蛍光量は広い分布を示したが、8 BrcAMPで処理した細胞では細胞当りの蛍光量が少ない部分に集中していた。このことは8 BrcAMP処理細胞がその細胞周期のGI期で停止していることを示唆している。

3) 細胞形態への影響

8 BrcAMPで処理したY-79細胞の比重をPercoll不連続密度勾配遠心分離法を用いて検討した。対照とした未処理細胞はPercoll密度36%の分画に集まったが、8 BrcAMP処理細胞は34%の分画に集まった。

8 BrcAMPで処理したY-79細胞の表面微細構造を走査電子顕微鏡を用いて検討した。対照とした未処理細胞の表面には多数のmicro villiが認められたが、8 BrcAMPでY-79細胞を処理するとこれらのmicro villiが減少し比較的平滑な表面となった。

これらの結果は細胞内cAMPの増加により、細胞内の構造及び細胞膜に変化が生じたことを示している。

4) Glutamic acid decarboxylase (GAD) 活性の増加誘導

0.1mM 8 BrcAMPを含む培養液でそれぞれ3日間および5日間培養したY-79細胞のGAD活性をMoskalらの方法を用いて測定した。処理前と比較してその活性は5日目まで有意に増加していた。このことはGABA合成系の酵素であるGADの活性の増加が8 BrcAMP処理によって誘導されたことを示唆している。

〔総括〕

- 1) ヒト網膜芽細胞腫の細胞内cAMPを増加させることにより、その増殖が抑制され、細胞はGI期で停止することが明らかになった。
- 2) この処理により、細胞の比重は低下し細胞表面からmicro villiが減少した。このことは、細胞内部および細胞膜に変化が生じたことを示している。
- 3) 同様に、GABA合成系酵素であるglutamic acid decarboxylaseの活性の増加が誘導された。
- 4) これらの結果は、網膜芽細胞腫の細胞内cAMPを増加させることにより神経系への細胞分化を誘

導する可能性を示唆している。

論文の審査結果の要旨

網膜芽細胞腫の細胞内cAMPを増加させると、細胞増殖が抑制され、細胞膜が変化し、GABA合成酵素の活性が上昇することが本研究によって明らかとなった。このことは腫瘍細胞が神経系細胞へと分化したことを示唆するもので、網膜芽細胞腫に対する新たな保存的治療法の可能性を示唆している。