The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	マウステラトカルシノーマ細胞における腫瘍性増殖と細胞分化に関する研究 : 温度感受性変異株の分化と造腫瘍性の変化
Author(s)	墨, 哲郎
Citation	大阪大学, 1987, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/35334
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【8】

氏名・(本籍)	墨(すみ)　哲(てつ)　郎(ろう)
学位の種類	歯　学　博　士
学位記番号	第　7693　号
学位授与の日付	昭和62年3月26日
学位授与の要件	歯学研究科歯学臨床系専攻 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	**マウステラトカルシノーマ細胞における腫瘍性増殖と細胞分化に関する研究——温度感受性変異株の分化と造腫瘍性の変化——**
論文審査委員	(主査) 教授　作田　正義 (副査) 教授　八木　俊雄　教授　浜田　茂幸　講師　加藤　幸夫

論文内容の要旨

細胞の腫瘍性増殖とその分化機能の発現は逆相関の関係にあると考えられている。マウステラトカルシノーマ細胞は，胚性癌腫（ＥＣ）細胞を幹細胞にもつ悪性腫瘍であるが，初期胚への移植により正常胚発生のコントロール下に組み込まれると分化し，腫瘍形成能を失い，キメラマウスを生ずる。しかし，自己増殖可能な条件下では，様々な分化組織を含む腫瘍を形成しつつ，無限に増殖し，ついには個体を腫瘍死に至らしめる。又，in vitroにおいて，レチノイン酸処理で分化が誘導されると共に，細胞増殖能及び，造腫瘍性が低下することが知られている。この様な細胞を用いて，腫瘍性増殖から分化への切り換えの制御機構を解析すれば腫瘍の異常増殖の制御が可能になると共に，細胞分化機構が解明される。従来より，腫瘍性増殖と分化に関する報告は多数みられるが，いずれも分化誘導に際して，化学薬剤処理等を施しており，様々な細胞内の要因が複雑に関与しているため，以後の解析を困難にしている。そこで，本研究においては，腫瘍性増殖から分化決定への制御機構の解明を目的として，細胞遺伝学的手法を用い，可及的に夾雑性を排除したin vitro実験系を確立すると共に腫瘍細胞の分化と造腫瘍性の関係を検討した。

そこで，テラトカルシノーマＦ９細胞を用いて増殖に関する温度感受性（ｔｓ）変異株を分離した。即ち，32.5℃でＦ９を突然変異誘発剤ニトロソグアニジン（ＭＮＮＧ）で処理後，37.5℃で５－フロロ－２′－デオキシウリジン（ＦＵｄＲ）選択を10～15回繰り返し，変異株を濃縮した。その後，32.5℃にて三回以上コロニークローニングを行い，約200株のクローンを分離した。非許容温度を39.0℃（高温），許容温度を32.5℃（低温）に設定し，低温および高温培養時の増殖を比較すると，高温での増殖が低温に比し悪い，増殖に関するｔｓ変異株は約60株であった。この内，非許容温度において分化形質の発現

が認められたのは25株であった。以下，異なる相補群に属することが判明した増殖および分化に関するｔｓ変異株，B14.231，C11.222について解析を行った。

細胞増殖において野生株Ｆ９の細胞倍加時間は，高温で12〜13時間，低温で18〜20時間で高温の方が増殖が盛んであった。一方，ｔｓ変異株は低温ではＦ９と同様の増殖を示すが高温では数分裂した後，細胞増殖が低下した。さらに，高温培養後，経時的に低温に移し，増殖能の可逆性を検討すると増殖阻害に関して可逆性を保持していた。

次に，高温培養時のｔｓ変異株の性状の変化を検討した。細胞形態は内胚葉細胞に変化し，分化のマーカーであるプラスミノーゲンアクチベーター（ＰＡ）活性を^{125}Ｉ－フィブリン法にて測定するとＰＡ活性の増加を認めた。又，未分化幹細胞のマーカーである細胞表面膜（ＳＳＥＡ－１）抗原の変化を抗ＳＳＥＡ－１モノクローナル抗体を用いて，補体依存性細胞障害試験にて判定すると，ＳＳＥＡ－１抗原が経時的に減少した。さらに，各時間高温で培養した後，低温に戻したｔｓ変異株にコロニーを形成させ，そのコロニーにアルカリフォスファターゼ（ＡＬＰ）染色を施すと，未分化幹細胞のマーカーであるＡＬＰ活性が低下した。この様に，ｔｓ変異株は低温ではＦ９と同様の性状を示すが高温では数分裂した後，細胞増殖が低下すると共に，ＰＡの産生，ＳＳＥＡ－１抗原の消失，ＡＬＰ活性の消失等，分化形質の発現が認められ，高温培養により分化が誘導される分化に関するｔｓ変異株であることが明らかとなった。

このｔｓ変異株を用いて，分化と腫瘍形成能との関係を調べた。各時間高温で培養し分化誘導した後，低温に戻したｔｓ変異株を用いて，プラスチックディッシュ上でコロニーを形成させ，自己増殖能を判定すると共に軟寒天培地中でのコロニー形成能から基質非依存性増殖能を調べた。又，各時間高温で培養し，分化誘導した5×10^5／0.1mlのｔｓ変異株を同系129／Ｓｖマウスの剃毛した背部皮下に接種し，in vivoでの腫瘍形成能を検討した。ｔｓ変異株は高温培養で分化誘導しても生存は全く障害されず，又，プラスチックディッシュ上でのコロニー成形能を有し，自己増殖能を保持し続けていた。それにもかかわらず，軟寒天培地中でのコロニー形成能，及び，マウス皮下における腫瘍形成能は，高温処理時間に応じて，即ち分化誘導と共に経時的に著明な低下を示した。

以上の様に，今回分離したｔｓ変異株は，非許容温度にて細胞増殖が阻害されると共に分化が誘導された。これらのｔｓ変異株の分化誘導過程には最終分化に至る前に，先ず，細胞増殖能を保持しているにもかかわらず，造腫瘍性を消失している段階が存在することが明らかとなった。これらの結果は，テラトカルシノーマ細胞の造腫瘍性の消失は，細胞増殖能よりむしろ細胞分化と密接な関係がある事を示唆している。さらに，このｔｓ変異株は，今後，腫瘍性増殖から分化への切り換えの制御機構を解明する上にも有効な手段となりうる。

論文の審査結果の要旨

本研究はマウステラトカルシノーマ細胞を用い，腫瘍性増殖から分化決定への制御機構の解明を目

的として，細胞遺伝学的手法を用い，腫瘍細胞の分化と造腫瘍性の関係を検討したものである。即ち，まずテラトカルシノーマＦ９細胞を用いて，増殖に関する温度感受性（ｔｓ）変異株を分離した。次いで，これら分離株のうち，非許容温度において分化形質の発現が認められる分化に関するｔｓ変異株を分離し，解析を行なった。

その結果，テラトカルシノーマ細胞の造腫瘍性の消失は，細胞増殖能よりもむしろ細胞分化と密接な関係のあることを示唆する所見を得た。また，このｔｓ変異株は今後の腫瘍性増殖から分化への切り換えの制御機構を解明する上での有益な実験材料となりうるものである。

本研究によって得られた知見は発癌及び分化の制御機構解明の上で価値ある業績であり，歯学博士の学位に十分値するものと認める。