

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	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

論文表題

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—

所属：大阪大学歯学部口腔外科学第二講座

著者：墨 哲郎

緒 言

幹細胞は、自己複製能と機能細胞への分化能を併せ持つ細胞として定義される。この幹細胞が自己複製から如何なる機序によって分化方向への決定 (commitment) が行なわれるかは未だ不明である。生体における幹細胞の存在は、胚細胞、精細胞、造血に関与する骨髓細胞、消化管上皮や皮膚の再生など、極めて多様な組織、器官で推定されている。また、in vitroにおける幹細胞分化の制御機構の研究としては、マウスフレンド白血病細胞¹⁾、ヒト白血病細胞 (K562)²⁾ 等で代表される造血系細胞の分化系が確立されており、赤血球へ向かう各分化段階の特徴を備えた細胞系が樹立され、分子レベルでの解析が進められている。なかでも、胚細胞および生殖細胞は、本質的に分化の全能性を保持した、最も基本的な幹細胞系とみなすことができる。

また、腫瘍細胞は、細胞増殖と細胞分化の調節機構に異常をきたした細胞とみなし得る。

さらに、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おり、胚性癌腫細胞^{3,4,5,6)}、C1300-3 神経芽細胞腫細胞^{7,8)}、骨髄性白血病細胞⁹⁾等が分化することにより in vivoでの腫瘍形成能が抑制されることが報告されている。この様に、腫瘍性増殖と分化は背反する関係にあり、あたかも正常幹細胞の自己増殖と分化との関係と類似し、これらは同時に研究することによって、二つの間に存在する制御機構を明かにすることができると考えられる。その格好な実験系として、自己増殖 および 分化が in vitroで容易に再現できる培養細胞、テラトカルシノーマ(奇形癌)がある。

マウステラトカルシノーマは、初期胚体および生殖細胞に由来するとされ^{10,11)}、胚性癌腫(Embryonal Carcinoma: EC)細胞を幹細胞にもつ。このEC細胞は悪性腫瘍として無限の増殖能を示すと同時に三胚葉性組織(例えば、皮膚、神経、軟骨、骨、筋肉、脂

筋組織、腺上皮等)に分化し、初期胚と同じ様な多分化能を有することから幹細胞および腫瘍の増殖と分化の制御、ならびに初期胚発生の有用な研究モデルとされている。

1974年、Brinsterら⁵⁾は、テラトカルシノーマ幹細胞を正常マウス胞胚に注入し、それを偽妊娠させた仮親の子宮内に移植すると、その胚はテラトカルシノーマ幹細胞を組み込み、正常胚発生を行い、本来の胚細胞と、テラトカルシノーマ由来の細胞からなるキメラマウスを生じることを報告した。また、1975年にMintzら⁶⁾が遺伝的標識を施したテラトカルシノーマ細胞を用いて、この幹細胞はキメラマウスのあらゆる組織に分化し、しかも、その悪性腫瘍としての性質を失うことを示し、さらに、腫瘍形成能をもつ幹細胞と個体発生に関与する細胞が同一のものであることを証明した。すなわち、悪性腫瘍である1個のテラトカルシノーマ幹細胞は、正常胚に組み込まれると正常胚発生のコントロール下に入っ

て分化し腫瘍形成能を失うが、自己増殖可能な条件下では、その分裂増殖過程で適宜、分化細胞を産み出しながら無限に増殖し、様々な分化組織を含む腫瘍を形成し、ついには個体を腫瘍死に至らしめるという性質を持つ。

1970年に Rosenthalら¹²⁾が自然発生した精巣奇形癌から、さらに1978年に Martinら¹³⁾が自然発生した卵巣奇形癌からEC細胞株を樹立して以来、現在までに、多数のEC細胞株が分離されている。その中の1つであるF9細胞は、初期胚の内部細胞塊と同等とみなされ、自発的には分化しないが、in vitro でレチノイン酸により原始内胚葉様細胞に分化誘導され^{14, 15, 16, 17)}、さらに c-AMPで壁側内胚葉に¹⁸⁾、また凝集させることにより臓側内胚葉に分化する¹⁹⁾。

現在まで、前述のように、癌細胞の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、様々な細胞内外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、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、可及的に夾雑性を排除した、in vitro 実験系を確立するには、細胞遺伝学的手法が有用と考えられる。

1983年、Nishimuneら²⁰⁾はF9細胞を用いて、DNA合成阻害が分化を誘導することを示した。このことは、テラトカルシノーマ細胞においては、細胞増殖を細胞周期のS期で阻害することにより、自己複製の周期から細胞分化への切り換えが起こることを示唆している。そこで、腫瘍細胞の腫瘍性増殖から分化決定への制御機構を解明するために、テラトカルシノーマ細胞の増殖に関する温度感受性（temperature-sensitive: ts）変異株を分離し、その中で、非許容温度にて分化形質を発現する変異株を用いて、腫瘍細胞の分化と腫瘍形成能の関係を検討した。

材料と方法

1. 細胞および細胞培養法

マウステラトカルシノーマF9細胞は、1967年にStevensら²¹⁾がマウスの精巣に6日胚を移植することにより得た、移植可能な腫瘍OTT6050から、1973年、Bernstineら²²⁾が樹立した細胞株である。野生株F9細胞およびその ts 変異株はゼラチン(和光純薬、大阪)処理したプラスチックディッシュ(CORNING LABORATORY, U.S.A.)で10%牛胎児血清(FCS: GIBCO LABORATORIES, U.S.A.)、5 mM L-グルタミン(和光純薬、大阪)、1 mM ピルビン酸ナトリウム(和光純薬、大阪)、および重曹添加のEagle MEM培地(MEM: 日水製薬、東京)を用いて、非許容温度(39°C)または、許容温度(32.5°C)に設定された5%炭酸ガス培養器(三洋電機特機、東京)中で培養した。培地は3日毎に交換し、さらに、細胞を、飽和状態になる前に、0.125%トリプシン(阪大微生物病研究会、大阪)と、

0.5mM エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム (EDTA: 和光純薬、大阪) 添加の Ca^{2+} 、 Mg^{2+} を含まないリン酸緩衝生理食塩水 (PBS(-): pH 7.3) で 32.5°C、20分間処理して継代培養を行った。

分化誘導剤であるレチノイン酸 (RA, all trans: SIGMA Chemical Company, U.S.A.) はエタノールに溶解し、 10^{-3}M の溶液とし、 -20°C に遮光保存した。使用に際して、滅菌水で 10^{-5}M に希釈し、これを最終濃度 10^{-7}M となる様に培地に加え、分化誘導に使用した。

2. 温度感受性 (ts) 変異株の分離

DNA 合成阻害による増殖に関する温度感受性変異株の効果的な分離は、Nishimoto ら^{23,24}) の方法に従った (図1)。しかし、分離すべき温度感受性変異株は、非許容温度にて増殖を停止すると共に、分化することが予想され、その分化により増殖が不可逆的変化をきたすことを避けるために、37.5°Cでの選択培養時間を短縮すると同時に、選択回数

を増やすことに留意した。

1) 突然変異の誘発

ゼラチン処理した 60mm プラスチックディッシュに 5×10^4 播種した対数増殖期にある野生株 F9 細胞を用いて、まず培地を除いて、PBS(-)で2度洗った後、無血清 MEM 培地に移し、32.5°C で 24 時間培養した。ここで、10% FCS を含む培地に移し、突然変異誘発剤 N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン (MNNG: 和光純薬、大阪) を最終濃度 1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように培地に加え、16時間、32.5°C で培養した。その後、培地を除き、PBS(-)で2度洗い、通常培地に戻し、2日間、32.5°C で培養し、変異を固定した。

2) 変異細胞の濃縮と特異的選択

MNNG で処理した細胞を 35mm プラスチックディッシュに植えかえ、24時間、32.5°C で培養した。その後、培地を除き、PBS(-)で2度洗浄後、無血清 MEM 培地に移し、32.5°C で培養した。14時間後、同調した細胞を 10

% FCS を含む培地に移しかえ、直ちに、
37.5°C の 5 % 炭酸ガス培養器に移した。

1 ~ 2 時間培養後、5-フロロ-2'-デオキシ
ウリジン (5-FUdR: SIGMA Chemical Company,
U.S.A.) を最終濃度 25 μ g/ml, ウリジン
(SIGMA Chemical Company, U.S.A.) を最
終濃度 125 μ g/ml となるように加え、37.5°C
で 8 ~ 16 時間培養した。その後、FUdR-
Uridine を含む培地を除き、PBS(-) で 3 度洗
浄し、チミジン (TdR: SIGMA Chemical Com-
pany, U.S.A.) を最終濃度 25 μ g/ml を含む 10
% FCS-MEM 培地に移しかえ、32.5°C で 2 ~ 3
日培養後、2 回日の FUdR による選択を行っ
た。以上の FUdR 選択を 10 ~ 15 回繰り返し
た。

3) 温度感受性変異株の分離

FUdR 選択を繰り返した変異細胞を 35mm
プラスチックディッシュに播種し、32.5°C で
コロニーを形成させ、3 回以上、コロニーク
ローニングを行った後、各変異細胞を許容温

度 (32.5°C) と非許容温度 (39.0°C) で培養し、両温度での増殖を比較し、非許容温度での増殖が許容温度での増殖に比べて悪い株を、増殖に関する温度感受性変異株として分離した。

3. 増殖曲線

野生株 F9 細胞と ts 変異細胞を 10% FCS 添加 MEM 培地を用いて、ゼラチン処理した 35mm プラスチックディッシュに 2×10^4 個播種し、許容温度で 12 時間培養し、一部を非許容温度に移した。さらに、増殖阻害の可逆性を調べるために、非許容温度で 1~3 日間培養した細胞を経時的に、許容温度に下げた。細胞数の算定は、培地を除いた後、PBS(-) で 2 度洗浄後、0.125% トリプシンと 0.5mM EDTA 含有の PBS(-) を用い、32.5°C で 20 分間処理し、10% FCS 添加 MEM 培地で細胞浮遊液とし、コールターカウンター (COULTER ELECTRONICS, INC: U.S.A.) にて行った。

4. プラスミノージェンアクチベーター (PA)

の産生

1) ^{125}I -フィブリノーゲン標識

フィブリノーゲン (Bovine, Fraction 1, Type 4 : SIGMA Chemical Company, U.S.A.) を PBS(-) に溶解し、 10mg/ml の溶液 1ml を、遠沈し、その上清を採取した。そのフィブリノーゲン溶液に $^{125}\text{I}-\text{Na}$ を 1mCi 加え、 p -トルエンスルホンクロロアミドナトリウム三水和物 (クロラミン T : 和光純薬、大阪) を 0.3M 磷酸緩衝液 (PB: pH 7.5) で希釈し最終濃度 5mg/ml とし、これをフィブリノーゲン溶液に 0.5ml 加え、 10 分間、氷中で攪拌した。次に、メタ重亜硫酸ナトリウム (ピロ亜硫酸ナトリウム) (和光純薬、大阪) を 0.3M PB で最終濃度 5mg/ml とし、これを 0.5ml 加え、 5 分間、氷中で攪拌した。最後に、グリシル-L-チロシン (和光純薬、大阪) の 0.1M 水溶液を 0.1ml 加え、 5 分間、氷中で攪拌した。この ^{125}I -フィブリノーゲン溶液をセファデックス G100 (SIGMA Chemical Company, U.S.A.) を

充填したカラムに加え、溶出した void 画分の放射活性を測定し、4°Cにて保存した。使用に際して、 ^{125}I -フィブリノーゲン溶液をプラスチックチューブに約100,000cpmとなるように加え、乾燥させた後、実験に供した。

2) ^{125}I -フィブリン法

1×10^5 の細胞を35mmプラスチックディッシュに播種し、32.5°Cで12時間培養後、39.0°Cに移した。各培養日の24時間前に、血清無添加のMEM培地で洗浄し、1mlの0.2%牛血清アルブミン (BSA, fr.5: SIGMA Chemical Company, U.S.A.) 添加のMEM培地を1ml加え、両温度にて培養し、その培養上清 (Conditioned Medium: CM) を採取することにより、培地中に放出されたPAの活性を、Unkelessら²⁵⁾の ^{125}I -フィブリン法に準じて測定した。すなわち、あらかじめ、 ^{125}I -フィブリノーゲン処理したプラスチックチューブを1mlの5%牛血清 (阪大微生物病研究会、大阪) 添加のMEM培地を用いて、37°Cで4時間

処理し、フィブリノーゲンをフィブリンに変えた。次に、培地を除去後、PBS(-)で2度洗浄し、0.3mlのCMと最終濃度 0.05U/ml の牛プラスミノーゲン（第一化学薬品、東京）を加え、22～24時間、37°Cで反応させ、可溶化した ^{125}I -フィブリンを Autogamma Couter (BECKMAN, U.S.A.) で測定し、以下の式よりPA活性を求めた。

$$\text{PA活性}(\%) = 100X$$

可溶化した ^{125}I -フィブリンの放射活性(cpm)

全 ^{125}I -フィブリンの放射活性(cpm)

また、PA活性と同時に、細胞数を算定し、PA活性を培養細胞数あたりの値に補正した。

5. 細胞表面膜抗原 (SSEA-1抗原) の変化

SSEA-1抗原 (Stage Specific Embryonic Antigen-1) は、1978年、Solterら²⁶⁾が作成した、F9細胞に対するモノクローナル抗体により認識される細胞表面膜抗原である。この

SSEA-1抗原は、全てのEC細胞において発現しているが、テラトカルシノーマから分離された多くの分化型細胞株及びレチノイン酸で分化誘導したF9細胞では消失していることから未分化EC細胞のマーカースとされている。そこでSSEA-1抗原の変化を補体依存性細胞障害度テストにて検討した。

各温度で各時間培養した細胞を、 $2 \times 10^5 / \text{ml}$ の細胞浮遊液にし、マイクロタイトレーションプレートの各区画上にHamilton注射器を付けた反復分注器を用い、加温下で $1 \mu\text{l}$ ずつ添加した。さらに、段階希釈した抗SSEA-1モノクローナル抗体を $1 \mu\text{l}$ ずつ添加し、加温器中で、 4°C 、40分間、静置した。次に、補体（モルモット血清）を $1 \mu\text{l}$ ずつ添加し、 37°C で30分間保温した。最後に、40%グリセリン（和光純薬、大阪）水溶液と、1%グルタルアルデヒド（和光純薬、大阪）-PBS溶液を1:1に混合した固定液を $1 \mu\text{l}$ ずつ添加した後、マイクロタイトレーションプレ

トに蓋をのせ、密閉し、位相差顕微鏡にて
検鏡し、死細胞数 / 全細胞数 (%) を算定し、
細胞障害指数を以下の式より求めた²⁷⁾。

細胞障害指数 =

% 死細胞 - 抗体無添加時の % 死細胞

100 - 抗体無添加時の % 死細胞

6. アルカリフォスファターゼ (ALP) 活性

500個の ts 変異細胞を 60mm プラスチック
ディッシュに播種し、32.5°Cにて 24時間培養
した後、39.0°Cに移し各時間培養した。その
後、培地を除去、PBS(-)にて2度洗浄し、
ホルマリン : メタノール = 1:9 の冷却した固
定液にて 2~3分間固定した。次に、遮光下
で、Fast Blue RR Salt (SIGMA Chemical
Company, U.S.A.) を最終濃度 0.05% となる
様に、0.25% Naphtol AS-MX Phosphate
Alkaline Solution (SIGMA Chemical Compa-

ny, U.S.A.)の最終濃度 0.01%水溶液に加え、この染色混合液を30秒以内に濾過し、その濾液を固定した細胞に加え、37°Cで30分間、遮光下にて染色した。そして、染色液を除去後、水洗し、各コロニーの染色性の有無を判定した。

7. 軟寒天培地中でのコロニー形成能

39.0°Cで48時間、96時間、分化誘導した ts 変異細胞と F9細胞を、1.5%寒天 (Difco, U.S.A.)で前処理した60mmプラスチックディッシュに、最終濃度0.45%の寒天を含む10%FCS-MEM培地に播種し、2週間後に8個以上の細胞からなるコロニー数を算定した。

また、同時に、上記前処理時の細胞の生存率を Phillipsら²⁸⁾のエリスロシンBの色素排除法に従って算定した。

8. 腫瘍形成能

変異細胞の分化誘導後の in vivo での腫瘍形成能を検討するために、39.0°Cで48時

間、96時間前処理した細胞を、EDTA-トリプシン処理により採取し、最終濃度 $5 \times 10^6 / \text{ml}$ の細胞浮遊液とした。4~5週齢の129/SV同系雄マウスの剃毛した背部皮内に、上記の各前処理条件の細胞浮遊液を0.1ml接種し、接種後1ヶ月間観察し、触知されうる腫瘍の有無を判定した。

9. 腫瘍形成細胞の温度感受性及び分化形質の発現

マウスに形成された腫瘍が小指頭大に達した時、腫瘍を無菌的に摘出し、PBS(-)の中で2度洗浄後、結合組織を除くとともに腫瘍実質をピンセットにて細分化し、次に、EDTA-トリプシン溶液に浸漬し、 32.5°C で10分間処理した。その後、10% FCS-MEM培地を加え、細胞懸濁液とし、これをナイロンメッシュにて濾過後、濾液を遠沈した。その細胞沈渣に10% FCS-MEM培地を加え細胞浮遊液とした後、60mmプラスチックディッシュに播種し、組織培養に戻した。 32.5°C で3代継代培養後、増

殖の温度感受性および分化形質の発現の有無
を検討した。

結 果

1. マウステラトカルシノーマF9細胞の温度感受性変異株の分離

前述の方法で、約 200 株のクローンを分離し、各クローンにつき許容温度 (32.5°C) と非許容温度 (39.0°C)での増殖を比較し、非許容温度での増殖が許容温度での増殖に比べて悪い 60 株を分離した。

以下、ポリエチレングリコール 1500 (PEG 1500:Boehringer Mannheim GmbH, W.Germany) を用いた細胞融合法による相補性試験にて、異なる相補群に属することが判明した (データは示していない)、2つの ts変異株、B14.231とC11.222について解析を行なった。

2. 増殖曲線

野生株F9細胞の細胞倍加時間は、32.5°Cで18~19時間、39.0°Cでは12~13時間であり (図2)、一方、ts変異株の細胞倍加時間は、32.5°Cで18~19時間であることから、許容温度での ts変異株の増殖率は野生株と同一であ

った（図3、4）。しかし、ts変異株では、39.0°Cでの増殖率は低下し、その増殖の様相は、クローンごとに様々であった。すなわち、B14.231は、約2回、C11.222では約3回分裂したのち、増殖を停止した。次に、39.0°Cで様々な時間培養した後、許容温度に移して増殖の可逆性を検討した。図3、4に示す様に、増殖の回復は遅延し、野生株のレベルには達しなかったが増殖の可逆性を保持していた。すなわち、ts変異株は、39.0°Cにても1~3日間は分裂能を保持し、その可逆性は非許容温度での培養時間に依存することが明らかとなった。

3. 分化形質の発現

1) 細胞形態の変化

位相差顕微鏡で観察すると、野生株F9細胞の形態は、円形で細胞質に乏しく、基質との接着性が弱い。そして、細胞間の接着は強く、緊密なコロニーを形成し、細胞間の境界も不明瞭で敷石状配列を呈する（図5-A）。一

方、F9細胞をレチノイン酸で4日間処理し分化誘導すると細胞間の接着性が低下しコロニーは粗になり、各細胞は基質上に広がり扁平な三角形に変化する(図5-B)。

ts変異株は、32.5°Cでは野生株と同様な形態を示すが(図5-C、E)、39.0°Cにて48時間培養すると、一部の細胞は基質から遊離し、その他はレチノイン酸処理時と同様、細胞形態が不均一になるとともに、経時的に内胚葉様細胞に変化した(図5-D、F)。

2) PAの産生

図6に示す様に、許容温度では、ts変異株B14.231とC11.222は野生株F9細胞と同程度の1~7%の僅かなPAを産生するのみであった。しかし、非許容温度に上げると、F9細胞ではPA活性に有意な変化は認められなかったが、ts変異株では、経時的にPA活性が増加した。しかも、そのPA活性度はts変異株間において僅かに異なっており、非許容温度での培養4日目で、B14.231では30%以上、C11.222で

は20%以上のPA活性を示し、許容温度でのPA活性に比べて顕著な増加を認めた。

3) SSEA-1抗原の変化

抗 SSEA-1 モノクローナル抗体を用いて、SSEA-1抗原の変化を補体依存性細胞障害度試験にて検討すると、野生株 F9細胞は、非許容温度で3～4日培養しても許容温度と同様、障害を受け、培養温度によるSSEA-1抗原の変化は認められなかった。この野生株 F9をレチノイン酸で分化誘導すると、許容温度、非許容温度のF9と比較して細胞障害指数の有意な低下を示した(図7)。一方、ts変異株 B14.231では許容温度で野生株 F9と同様に高い細胞障害指数を示したが、非許容温度で各時間培養すると、培養時間に伴って、細胞障害指数の低下を認め、4日日では許容温度に比べ、抗体8倍希釈で約55%減少していた(図8)。また、C11.222では、同じ抗体希釈度で約43%減少していた(図9)。すなわち、これら ts変異株は非許容温度で

培養すると経時的にSSEA-1抗原が減少し、分化が誘導されたことを示している。

4) アルカリフォスファターゼ (ALP) 染色

ALPの組織化学的染色を施すと、野生株F9細胞の大部分のコロニーは、肉眼的に青紫色 (ALP陽性) を呈するのに対して、F9細胞をレチノイン酸で4日間処理し、分化誘導したコロニーは染色されないか、または淡黄色 (ALP陰性) を示した (図10)。ts 変異株は、許容温度では、野生株と同様、ほぼ全てのコロニーが青紫色を呈したのに対し、非許容温度では、高温での培養時間の延長、すなわち、分化が誘導されると共に、総コロニー数は同一であるにもかかわらず、肉眼的に、ALP活性が陽性を示すコロニー数の著明な減少を認めた (図11)。つまり、B14.231では48時間で約70%、C11.222では約50%のコロニーがALP活性陰性を呈した。しかし、ALP活性陰性のコロニー数は96時間培養しても、それ以上の有意な低下は認められなかった。また、

1つのコロニー内でも中心部は帯青紫色を示し、周辺部の細胞が淡黄色を呈するコロニーも散見された。

4. 軟寒天培地中でのコロニー形成能、およびプラスチックディッシュ上でのコロニー形成能

許容温度、非許容温度で各時間培養し、分化誘導した細胞の生存率は約90%以上であり(表1)、これらの細胞を用いて、以下の実験を行った。

軟寒天培地中でのコロニー形成能、すなわち、基質非依存性増殖能 (anchorage independent growth) は in vitroで腫瘍形成能を反映するとされている。さらに、プラスチックディッシュ上でのコロニー形成能は自己増殖能の指標と考えられる。そこで各時間、非許容温度で培養し、分化誘導した ts変異株の基質非依存性増殖能と自己増殖能を検討した。

各培養温度における自己増殖能の変化を検

討するため、プラスチックディッシュ上でのコロニー数を調べると、非許容温度で培養した時、野生株 F9、ts変異株 B14.231、C11.222 は、全て、著明な変化はなく(図 1 2)、非許容温度で培養しても許容温度の時と同じ自己増殖能を保持していることが明らかとなった。一方、軟寒天培地中でのコロニー数は、非許容温度で培養すると、野生株 F9ではほとんど変化は認められなかった(50%減少)が、ts変異株 B14.231と C11.222では、非許容温度で培養し、分化誘導すると、各々、0.1%、0.016%と著明に低下した。すなわち、分化誘導により、自己増殖能は保持しているにもかかわらず、軟寒天培地中でのコロニー形成能は著明に低下することが明らかとなった。このことは、これらの ts変異株は、非許容温度で培養することにより分化が誘導され、その時、自己増殖能は保持しているにもかかわらず、腫瘍形成能が低下することが示唆された。

5. 腫瘍形成能

非許容温度で各時間培養し、分化誘導した ts 変異株と野生株 F9、および許容温度で培養した各細胞株をマウス皮下に接種し、in vivo における腫瘍形成能を検討した。図 13 に示す様に、野生株 F9 では、非許容温度で培養しても、腫瘍形成率は許容温度での培養時とほとんど変化がなかった。一方、ts 変異株 B14.231 では 48 時間の分化誘導で 10%、96 時間で 80% の腫瘍形成率の低下を認め、C11.222 では、腫瘍形成率が 48 時間の分化誘導で 65% に低下し、96 時間でもそれ以上の変化は認められなかった。

6. 腫瘍形成細胞の性状

形成した腫瘍を無菌的に摘出し、in vitro に戻した細胞の性状を調べると、温度感受性を保持しており、細胞形態も幹細胞様であり、PA の産生も認められなかった。このことから、腫瘍を形成した細胞は未分化な幹細胞としての性質を保持していたことが明らかと

なった。

考 察

発癌過程には、細胞増殖と分化の制御機構の異常が複雑に関与し²⁹⁻³⁶⁾、典型的な腫瘍細胞は低分化で無限の増殖能を示す³⁷⁾。最近、前脂肪幹細胞に発癌のイニシエーターと考えられる紫外線を照射すると、増殖の制御機構には何等影響を及ぼさずに、その細胞分化のみを阻害ことが示された³⁴⁾。また、化学的発癌物質がマウス上皮細胞の最終分化能を消失させる³⁵⁾等の事実から、分化の制御異常が癌化の初期過程に関与し、癌遺伝子の発現を伴う増殖の制御異常が後期過程に関与している可能性が示唆された³⁸⁾。

1967年、Pierceら^{39, 40)}は、腫瘍は細胞増殖そのものよりも、むしろ細胞の分化異常の問題であるという考えを提唱した。そこで、腫瘍性増殖を細胞分化という見地から鑑みると、最終分化に至った細胞は分裂能を失い、癌化傾向に乏しいが、分化過程にある細胞、あるいは脱分化し再び分裂、増殖能を回復し

た細胞では、in vitroで無限に増殖する能力を獲得した（immortalization）細胞株や、さらに in vivoでも増殖する腫瘍形成能（tumorigenicity）を持つ、いわゆる癌細胞を生み出し得る。例えば、有限の増殖能を示す初代培養細胞で、ある種の癌遺伝子の発現を増幅させることによって無限増殖能を獲得できることが示され⁴¹⁻⁴⁶）、白血病においては、骨髓球系、または、赤血球系への分化過程の様々な段階に由来する細胞株が得られている。さらに、網膜芽腫や Wilms腫瘍も分化途上の細胞に由来するものと考えられる³⁷）。これら分化途上にあるか、あるいは脱分化した腫瘍細胞が何等かの方法で最終分化に誘導されれば、その悪性度は消失するものと考えられる。この様な作業仮説の下に、様々なモデル実験が行なわれている。例えば、Honmaら⁴⁷）は、in vitroで顆粒球とマクロファージに分化する骨髓性白血病細胞をマウスに接種後、分化誘導剤を投与す

ると担癌マウスの生存期間が延長することを報告し、また、1980年 Stricklandら⁴⁸⁾はテラトカルシノーマF9細胞を同系の129/Svマウスに皮下接種後、レチノイン酸を経口投与し、また、1982年 Speersら⁴⁹⁾はレチノイン酸を腫瘍実質に注入することにより、共に担癌マウスの生存率の増加、腫瘍増殖の抑制を認めた。そして生化学的および病理学的所見から、レチノイン酸は、in vivoにおいても分化を誘導し、その結果、腫瘍増殖を抑制することを示した^{50, 51)}。さらに、正常細胞と腫瘍細胞との雑種細胞を用いた解析からも、分化によって in vivoでの腫瘍形成が抑制されることが確認されている⁵²⁾。以上のことから、細胞障害性化学療法に代わる分化誘導療法の可能性が示唆されたが、以後、進展はみられていない。

マウステラトカルシノーマは悪性腫瘍であるにもかかわらず、三胚葉性組織に分化し得る分化の全能性を保持した幹細胞であり⁵³⁾、

この分化は腫瘍形成能の消失を伴う³⁹⁾。また、悪性腫瘍細胞が分化し、正常胚発生に参画し得るテラトカルシノーマこそは、癌化と分化に関与する本質的な課題を内包しているものと考えられる。さらに、一般的に、分化は、特定方向への分化の決定と実際に分化形質が発現するという二つの過程が想定されるが、フレンド細胞等、現在、頻用されている

in vitro での分化系は、すでに分化決定された細胞を扱っており、分化形質のスイッチの on-offのみを問題としているものが多い。一方、テラトカルシノーマは胚性の未分化癌細胞を幹細胞としており、全く分化決定されていない幹細胞であることは、キメラマウスの形成実験から明白であり、それ故にこの分化の決定自体を問題とすることができる。

そこで、テラトカルシノーマを用いて、腫瘍性増殖から分化への切り換えの制御機構を体細胞遺伝学的手法によって解明するための

戦略であるが、分化能を有する細胞株を用いて、分化に関する遺伝的変異株を分離するのが遺伝子移入法と相まって、有力な手法となる。しかし、現在に至るまで、テラトカルシノーマの突然変異株では、未分化細胞に特徴的な表面膜抗原 SSEA-1 を欠く変異株^{54, 55, 56)}、分化に関する変異株としては、レチノイン酸耐性株の分離⁵⁷⁻⁶⁰⁾が報告されているのみである。この分化誘導剤であるレチノイン酸耐性株としては、レチノイン酸で分化が誘導されず、その自己増殖能および腫瘍形成能は親株と同一であるもの、また、レチノイン酸で分化が誘導されるが最終分化には至らない変異株が分離されており、細胞質内レチノイン酸結合蛋白質 (Cytoplasmic Retinoic Acid Binding Protein ; cRABP) を介した分化誘導機構が研究されている^{61, 62)}。しかし、分化過程のある段階で停止するものは、正規の分化誘導過程とは別の経路に向かって分化が誘導されている可能性があり、さらに、in

in vitroでレチノイン酸以外の化学薬剤、および、レチノイン酸無添加の他の様々な培養条件によっても、分化が誘導されることを考えれば、in vivoで正常初期胚発生においてレチノイン酸のみが生理的濃度で分化に関与しているとは断定し難く、cRABPを介した分化誘導とは別の、より本質的な分化誘導経路の存在を示唆している。

この様に現実には、分化に関する突然変異株の報告が極めて僅かしかないのは、分化能を持つ変異株の選択に際して、適当な手法がないことと、分化能の表現型が比較的容易に変動することに由来する。もし、有効な分化誘導性の変異株を得ようとするならば、何等かの良い選別方法の開発が必要とされる。

一方、多くの他の腫瘍細胞(63, 64, 65, 66)と同様に、テラトカルシノーマ細胞の分化は細胞周期の遷延と細胞分裂の抑制を伴うことが報告され、細胞周期の阻害と分化誘導とは密接な関連性のあることが示唆されている。

る 20.67)。しかし、実際には、低温で培養し、単に細胞周期を遷延させても 68)、また細胞周期の特異的阻害の内、無血清培地、および、イソロイシン無添加培地で G1 期で停止させても、コルセミドで M 期で停止させても分化は誘導されず、DNA 合成阻害剤で S 期を特異的に阻害した時にのみ分化が誘導される 20)。そこで、まず、DNA 合成阻害による増殖に関する変異株を分離すれば、その中で、分化が誘導されるものが存在するという作業仮説に基づいて、実験を進めた。まず、DNA 合成や細胞分裂のような細胞の生存に不可欠な現象が完全に欠損している変異株はあり得ず、そういった現象を遺伝学的に調べるには、条件致死性 (conditionally lethal) の突然変異株の分離が必要である。温度感受性変異 (ts) はその代表的なもので、許容温度では増殖できるが、親株が増殖可能な非許容温度では増殖できなくなるのが ts 変異株である。そこで、マウステラトカルシノーマ由来の細胞株の中

でも、分化を容易にコントロールでき、以後の解析を明瞭なものとするため、in vivoでも in vitroでも自発的に分化しない (nullipotent) F9細胞株を用いた。この細胞株はレチノイン酸により分化が誘導され、正常初期胚の発生、分化を再現することができる。すなわち未分化内部細胞塊に相当するテラトカルシノーマ F9幹細胞から原始内胚葉、壁側、臓側内胚葉に相当する分化細胞の出現を in vitroで観察することができ、さらに実際に、神経細胞や筋肉細胞などへ分化すると共に、腫瘍形成能を消失⁶⁹⁾することが知られている。そこで、テラトカルシノーマ F9細胞を用いて、まず、増殖に関する ts変異株を分離した。すると当初の作業仮説通り、その中から非許容温度にて分化形質を発現する変異株、すなわち、分化に関する ts変異株を分離することができた。そこで、これら ts変異株の非許容温度での性状に検討を加えた。

まず、この ts変異株の増殖曲線 (図 3, 4)

は、許容温度では野生株 F9 と同様な増殖を示すが、非許容温度では 2 ～ 3 回分裂増殖した後、細胞数の増加が認められなくなった。これは、必ずしも、全ての細胞が分化し、増殖が停止したためではない。詳しくは、分化誘導を逸脱した細胞の増殖、高温処理が細胞障害的に作用したことによる細胞数の減少、および、分化し、さらに増殖し続ける分化細胞の増殖、また、分化が速やかに進行し、増殖の停止した細胞等の全てを反映したものと考えられる。ts 変異株 B14.231 では、非許容温度培養 1 週間で細胞数の減少がみられたが、これは、分化誘導を逸脱した細胞の割合が減少し、細胞周期の延長した分化細胞、および、より分化し、増殖停止後、基質から遊離する細胞の割合が増加したことによるものと考えられる。

また、今回分離したクローンの中には、通常の培養細胞で分離されている様な、非許容温度にすると同時に増殖を停止するタイプの

ts変異株は得られなかった。これは、FUdR選択の時間を短縮したことによるものか、あるいはこのF9細胞にはその様な性質を示す変異株が本来存在し得ない何等かの機構があることによるものか、のどちらかに起因すると考えられる。これらのts変異株は、増殖に関して、可逆性を保持していたが、非許容温度での培養時間と共に、増殖の回復は遅延した。これは、分化へ方向づけされた細胞は、一般的に増殖率が低下するという事実を反映しているものと考えられる(67)。さらに、これらのts変異株は非許容温度での培養により、内胚葉様細胞に形態変化をおこした。すなわち、非許容温度で分化が誘導され、細胞周期が延長し、細胞の増殖率が低下すると共に、細胞間接着が弱くなるため、粗なコロニーを形成し、内胚葉様細胞形態を示したものと考えられる(図5)。また、これらのコロニーはALP染色においても分化型に変化したことを示している。すなわち、1973年、Bernstine

ら 22) は F9 細胞を含む EC 細胞が高いレベルの ALP 活性を示し、分化に伴い、その活性が低下することを報告した。それ以来、ALP 活性は、未分化 EC 細胞のマーカーとされている。この未分化幹細胞のマーカーである ALP 活性陽性を示すコロニー数が非許容温度での 48 時間培養で 50~70% 減少したことは、分化が誘導されたことを示唆する (図 11)。この場合、分化細胞の粗なコロニーは ALP 活性が陰性、未分化な幹細胞の緊密なコロニーは ALP 活性が陽性を示す訳であるが、この ALP 染色の有無が、単にコロニーの粗密に起因する、染色過程での脱色の難易を反映しているにすぎないという可能性は、このようなコロニーをクロニングして、他の分化のマーカーを検討すると、分化形質の発現が確認されることから否定される。さらに、詳しくは、一個のコロニー中でも、経時的に分化が誘導される場合、中央部は ALP 活性が陽性、周辺部は陰性をしめすコロニーが散見されるが、これは、

細胞密度の粗な周辺部が分化誘導を被りやすいためであり、完全なALP活性陰性のコロニーへの変化の中間段階と考えられる。

1976年、Stricklandら⁷⁰⁾が初期胚において、原始内胚葉と壁側内胚葉はPAを産生するが臓側内胚葉は産生しないことを示し、1976年にShermanら⁷¹⁾は、EC細胞は有意量のPAを産生しないが、それが分化した内胚葉細胞はPAを分泌することを報告した。それ以来、PAはEC細胞の内胚葉細胞への分化を示すマーカーとされている。図6に示す様に、許容温度では、ts変異株B14.231とC11.222は野生株F9細胞と同程度(1~7%)の僅かなPAを産生するのみであった。しかし、非許容温度に上げると、F9細胞ではPA活性に有意な変化は認められなかったが、ts変異株では、経時的にPA活性が増加した。野生株F9におけるPA活性は、局所的に細胞が高密度になり、一部の細胞に分化が誘導されたことを反映しているのかも知れない。一方、ts変異株の非許容

温度でのPA活性の増加は、分化により細胞密度が低下し、局所的な分化誘導の要因がないにもかかわらず、ts変異株 B14.231では30%以上、C11.222では20%以上のPA活性の経時的な増加が認められたことは、他ならぬ内胚葉細胞に分化したことを示している。

さらに、SSEA-1抗原も、非許容温度での培養に伴い、経時的に減少し、これらのts変異株は非許容温度でレチノイン酸と同程度、あるいは、それ以上の分化誘導が引き起こされていることを示している（図7、8、9、）。

以上の結果より、これらの分化のマーカーの変化（表2）、すなわち、細胞形態の変化、PA活性の上昇、SSEA-1抗原の減少、そして、ALP活性の消失から、これらのts変異株 B14.231とC11.222は、許容温度では野生株F9と同一の性状を示しながら、非許容温度に上げることにより分化が誘導される、分化に関する温度感受性変異株であることが明らかとなった。そして、この時に誘導される分化は、

野生株 F9 をレチノイン酸で処理した時と同様なものであった。さらに、これらの分化のマーカーの中で、PA と SSEA-1 は分化過程の初期段階の、そして、ALP は後期段階のマーカーとされており⁶⁰⁾、この ts 変異株において非許容温度で誘導される分化は、上述の両段階の分化過程を共に経ていることから、非許容温度における細胞の非特異的な反応ではなく、正規の分化過程に入っていることが示唆される。また、二つの ts 変異株 B14.231 と C11.222 は検討を加えた分化のマーカーの変化からみると、B14.231 の方が C11.222 と比較して、より短時間で、しかも、効率良く分化が誘導されているという相違はあるが、分化形質の発現自体は同一の性状を呈していることから、これらの ts 変異は、分化に関する本質的な制御機構に関与していると考えられる。

そこで、これらの ts 変異株の分化誘導と細胞周期の関係をフローサイトメトリー解析と labelled mitosis にて検討すると、非

許容温度に上げた後、12～24時間で細胞周期のS期に貯留を認めるが、31時間でG2-M期に移行し、また、S期も2～3倍延長していることが判明した（データは示していない）。そして、これらの ts 変異株では、この細胞周期の遷延後に分化形質の発現が認められることから、S期での細胞周期の遷延が細胞分化の結果ではなく、細胞分化を誘導する ts 変異性によるものと考えられる。このような分化に関する ts 変異株は未だ、報告がなく、以後の、遺伝学的解析に耐え得るものである。

この様な性状を示す ts 変異株を用いて、分化誘導と腫瘍形成能との関係を検討すると、野生株 F9 では、非許容温度で培養しても、プラスチックディッシュ上でのコロニー形成能、および、基質非依存性増殖能を反映した軟寒天培地中でのコロニー形成能は、ほとんど変化しないのに対して、ts 変異株ではプラスチックディッシュ上でのコロニー形成能を保持したまま、基質非依存性増殖能は著明に

低下した(図12)。このプラスチックディッシュ上でのコロニー形成能は、ts変異株では、20~34%と僅かに低下したが、これは一般的に、分化した細胞では未分化細胞に比して播種効率(plating efficiency)が低下することを反映したものと考えられる。すなわち、野生株F9をレチノイン酸で分化誘導した後、再播種すると播種効率が約14%に低下するという事実⁶⁰⁾からもこの考えが支持される。従って、非許容温度で分化誘導後の細胞の生存率が約90%以上である(表1)ことを考慮に入れれば、このプラスチックディッシュ上でのコロニー形成能の若干の低下は、自己増殖能が低下したためではなく、自己増殖能を保持した分化細胞を再播種の際に、損失していることを示している。この分化細胞の損失は、分化誘導後に再播種する場合には、常に考慮すべきであるが、前述の分化形質の発現の有無の判定においては、この損失を加味しておらず、実際の分化程度を、むしろ過小評

価しているものと考えられる。一方、単一細胞レベルでの評価である基質非依存性増殖能は、播種効率の影響を被らず、分化誘導後の細胞の生存率が90%以上であるにもかかわらず、軟寒天培地中でのコロニー数の減少は顕著で(図12)、これは真に細胞の基質非依存性増殖能の減少を反映しているものと考えられる。さらに、ts変異株の in vivoでの腫瘍形成能に関しては、許容温度では何等変化しないのに対して、96時間の分化誘導で65~80%の腫瘍形成率の低下を認めた(図13)。この様に、分化誘導後の、軟寒天培地中でのコロニー形成能と腫瘍形成率の低下とは、密接な相関が認められた。このことは基質非依存性増殖能が in vitroでの腫瘍形成能の指標となると共に、細胞分化によって消失する、分化の指標ともなることを示唆しており、これら ts変異株では、分化に伴って腫瘍形成能が低下することが明白となった(表3)。

さらに、96時間の分化誘導をしたにもかかわらず

わらず、腫瘍形成に至った細胞の性状を検討すると、これらの細胞は、温度感受性を保持しており、また、分化形質の発現も認められなかったことから、温度処理の影響を受けず、分化誘導から逸脱したためか、または受けたとしても、その影響が可逆的な段階にとどまったものであるため、腫瘍を形成したものと考えられ、分化誘導と腫瘍形成能の低下とは、図12、13に示した以上に密接な相関があると考えられる。

総 括

テラトカルシノーマ細胞の腫瘍性増殖から分化決定への切り換え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て、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、腫瘍細胞の分化と腫瘍形成能との関係を検討した結果、以下の結論を得た。

1) 分離した約200株の中で、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もの、すなわち、分化に関する ts 変異株は25株であった。

2) 野生株 F9 の細胞倍加時間は、非許容温度で12～13時間、許容温度で18～20時間で非許容温度の方が増殖が盛んであった。一方、ts 変異株は許容温度では F9 と同様の増殖を示すが非許容温度では数分裂した後、増殖が著しく低下すると共に、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、非許容温度での培養により分化が誘

導されることが明らかとなった。

3) 一定時間、非許容温度で培養し分化誘導した後、許容温度に戻した ts 変異株は、細胞の生存は全く障害されず、またプラスチックディッシュ上でのコロニー形成能を有し、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、および、マウス皮下における腫瘍形成能は、非許容温度での処理時間に応じて、すなわち、分化誘導に伴って経時的に、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周期が延長す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、まず、自己増殖能を保持しているにもかかわらず、腫瘍形成能をもたない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腫瘍形成能の消失は、細胞増殖能よりむしろ細胞分化と密接な関係があること

を示唆している。しかも、この ts 変異株における変異は、腫瘍性増殖から分化への切り換えの制御機構を司どる遺伝子と関連しているものと考えられ、この遺伝子をクローニングすれば、この制御機構の一端が解明されるものと考えられる。

稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えて頂き、御指導と御校閲を賜わった、大阪大学歯学部口腔外科学第二講座作田正義教授に謹んで感謝の意を表します。また、本研究課題をあたえられ、終始、御懇篤なる御指導と御校閲を賜わりました大阪大学微生物病研究所西宗義武助教授に深甚なる謝意を表します。最後に、本研究を進めるにあたり、幅広い御助言、御協力を頂いた大阪大学微生物病研究所大学院生仁科行雄君はじめ同研究所大学院生諸兄、並びに、御援助、御協力を頂いた口腔外科学第二講座教室員諸兄に感謝致します。

Relationship between Differentiation and Tumorigenicity in
Temperature-Sensitive Mutants of Teratocarcinoma F9 Cells

Tetsuro SUMI

The Second Department of Oral and Maxillofacial Surgery

Osaka University Faculty of Dentistry

1-8, Yamadaoka, Suita, Osaka 565, Japan

Key words: Teratocarcinoma, Differentiation, Tumorigenicity,
Temperature-sensitive mutant

Murine teratocarcinoma cells offer a unique model system for studying the regulation of tumorigenicity and stem cell differentiation. Embryonal carcinoma (EC) cells, the tumorigenic stem cells of teratocarcinoma, can give rise to differentiated derivatives of all three embryonic germ layers. This differentiation provides an opportunity for investigating cell determination, the process by which stem cells become committed to a particular developmental pathway, as well as for following subsequent differentiation of the committed cells. During differentiation, EC cells lose their malignancy, indicating that these two events are closely linked. Therefore, the regulation of tumorigenicity and stem cell differentiation can be studied

simultaneously in teratocarcinoma cells and this would provide insight into the relationship between these two mechanisms.

In attempting to throw light on the molecular mechanism whereby malignant properties of EC cells are controlled, temperature-sensitive (ts) cell cycle mutants were isolated, based on the observation that the inhibition of DNA synthesis caused EC cell differentiation.

Several ts mutants of cellular differentiation were isolated from the mouse teratocarcinoma cell line ,F9. These ts mutants underwent the stem cell differentiation judging from morphological changes, elevated levels of secretion of plasminogen activator, disappearance of SSEA-1 antigen, and a decreased alkaline phosphatase activity, accompanied with the retardation of cell cycle progression following shift to the non-permissive temperature.

To elucidate the relationship between cellular differentiation and tumorigenicity of these ts mutants, the effect of cultivation at non-permissive temperature on anchorage-independent growth and tumorigenicity was assessed.

The characterization of these ts mutants demonstrated the feasibility of genetically dissecting the differentiation pathway, that is, there is a crucial step during differentiation

in which these ts mutants lose their tumorigenicity in spite of retaining their self-reproductive ability. This approach clarified that the loss of tumorigenicity was not concerned with altered proliferative potential, but, precisely with cellular differentiation per se. The lesion in these ts mutants must involve the gene(s) which play(s) a pivotal role in the regulation of both differentiation and tumorigenicity.

Further study is now in progress to isolate such gene(s).

文 献

- 1) Friend, C.W., Scher, J., Holland, G. and Sato, T. (1971): Hemoglobin synthesis in murine virus-induced leukemic cells in vitro; Stimulation of erythroid differentiation by dimethyl sulfoxide. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 68, 378-382.
- 2) Rutherford, T.R., Clegg, J.B. and Weatherall, D.J. (1979): K562 human leukaemic cells synthesize embryonic haemoglobin in response to haemin. Nature, 280, 164-165.
- 3) Pierce, G.B., Lewis, S.H., Miller, G.J., Moritz, E. and Miller, P. (1979): Tumorigenicity of embryonal carcinoma as an assay to study control of malignancy by the murine blastocyst. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 6649-6651.
- 4) Pierce, G.B., Aguilar, D., Hood, G. and Wells, R.S. (1984): Trophectoderm in control of murine embryonal carcinoma. Cancer Res., 44, 3987-3996.
- 5) Brinster, R.L. (1974): The effect of cells transferred into the mouse blastocyst on subsequent development. J. Exp. Med., 140, 1049-1056.
- 6) Mintz, B. and Illmensee, K. (1975): Normal genetically mosaic mice produced from malignant teratocarcinoma cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72, 3585-3589.
- 7) Haussler, M., Sidell, N., Kelly, M., Donaldson, C., Altman, A. and Mangelsdorf, D. (1983): Specific high-affinity binding and

biologic action of retinoic acid in human neuroblastoma cell lines. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 5525-5529.

8) Podesta, A.E., Mullins, J., Pierce, G.B. and Wells, R.S. (1984): The neurula stage mouse embryo in control of neuroblastoma. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 7608-7611.

9) Gootwine, E., Webb, C.G. and Sachs, L. (1982): Participation of myeloid leukaemic cells injected into embryos in haematopoietic differentiation in adult mice. Nature, 299, 63-65.

10) Stevens, L.C. (1967): Origin of testicular teratomas from primordial germ cells in mice. J. Nat. Cancer Inst., 38, 549-552.

11) Illmensee, K. and Stevens, L.C. (1979): Teratomas and chimeras. Sci. Amer., 240, 120-132.

12) Rosenthal, M.D., Wishnow, R. and Sata, G.H. (1970): In vitro growth and differentiation of clonal populations of multipotential mouse cells derived from a transplantable testicular teratoma. J. Nat. Cancer Inst., 44, 1001-1014.

13) Martin, G.R. (1978): Advantages and limitations of teratocarcinoma stem cells as models of development; in Development in mammals (Johnson, M., ed.). Elsevier North-Holland, Amsterdam, 3, 225-265.

14) Strickland, S. and Mahdavi, V. (1978): The induction of differentiation in teratocarcinoma stem cells by retinoic acid.

Cell, 15, 393-403.

15) Segal, S. and Khoury, G. (1979): Differentiation as a requirement for simian virus 40 gene expression in F9 embryonal carcinoma cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 5611-5615.

16) Kuff, E.L. and Fewell, J.W. (1980): Induction of neural-like cells in cultures of F9 teratocarcinoma treated with retinoic acid and dibutyryl cyclic adenosine monophosphate. Dev. Biol., 77, 103-115.

17) Rizzino, A. and Crowley, C. (1980): Growth and differentiation of embryonal carcinoma cell line F9 in defined media. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 457-461.

18) Strickland, S., Smith, K.K. and Marotti, K.R. (1980): Hormonal induction in teratocarcinoma stem cells; Generation of parietal endoderm by retinoic acid and dibutyryl cAMP. Cell, 21, 347-355.

19) Hogan, B.L.M., Taylor, A. and Adamson, E.D. (1981): Cell interactions modulate embryonal carcinoma cell differentiation into parietal or visceral endoderm. Nature, 291, 235-237.

20) Nishimune, Y., Kume, A., Ogiso, Y. and Matsushiro, A. (1983): Induction of teratocarcinoma cell differentiation; Effect of the inhibitors of DNA synthesis. Exp. Cell Res., 146, 439-444.

21) Stevens, L.C. (1970): The development of transplantable

teratocarcinomas from intratesticular grafts of pre- and post-implantation mouse embryos. *Dev. Biol.*, 21, 364-382.

22) Bernstine, E.G., Hooper, M.L., Grandchamp, S. and Ephrussi, B. (1973): Alkaline phosphatase activity in mouse teratomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 70, 3899-3903.

23) Nishimoto, T. and Basilico, C. (1978): Analysis of a method for selecting temperature-sensitive mutants of BHK cells. *Somatic Cell Genet.*, 4, 323-340.

24) Nishimoto, T., Takahashi, Y. and Basilico, C. (1980): A temperature-sensitive mutation affecting S-phase progression can lead to accumulation of cells with a G2 DNA content. *Somatic Cell Genet.*, 6, 465-476.

25) Unkeless, J.C., Tobia, A., Ossowski, L., Quigley, J.P., Rifkin, D.B. and Reich, E. (1973): An enzymatic function associated with transformation of fibroblasts by oncogenic viruses. *J. Exp. Med.*, 137, 85-111.

26) Solter, D. and Knowles, B.B. (1978): Monoclonal antibody defining a stage specific mouse embryonic antigen (SSEA-1). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75, 5565-5569.

27) Ogiso, Y., Kume, A., Nishimune, Y. and Matsushiro, A. (1982): Reversible and irreversible stages in the transition of cell surface marker during the differentiation of pluripotent

teratocarcinoma cell induced with retinoic acid. *Exp. Cell Res.*, 137, 365-372.

28) Phillips, H.J. and Terryberry, J.E. (1957): Counting actively metabolizing tissue cultured cells. *Exp. Cell Res.*, 13, 341-347.

29) Burgess, A. and Nicola, N. (1983): Growth factors and stem cells. Academic Press., New York, 1-8.

30) Lotem, J. and Sachs, L. (1982): Mechanisms that uncouple growth and differentiation in myeloid leukemia cells; Restriction of requirement for normal growth-inducing protein without restoring induction of differentiation-inducing protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 4347-4351.

31) Mondal, S. and Heidelberger, C. (1976): Transformation of C3H/10T1/2Cl8 mouse embryo fibroblasts by ultraviolet irradiation and a phorbol ester. *Nature*, 260, 710-711.

32) Nakano, S. and Ts'o, P.O.P. (1981): Cellular differentiation and neoplasia; Characterization of subpopulations of cells that have neoplasia-related growth properties in Syrian hamster embryo cell cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 4995-4999.

33) Nakano, S., Ueo, H., Bruse, S.A. and Ts'o, P.O.P. (1985): A contact-insensitive subpopulation in Syrian hamster cell cultures with a greater susceptibility to chemically induced neoplastic transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 5005-5009.

- 34) Scott, R.E. and Maercklein, P.B. (1985): An initiator of carcinogenesis selectively and stably inhibits stem cell differentiation; Support for a concept that the initiation of carcinogenesis involves multiple phases. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 2995-2999.
- 35) Yuspa, S.H. and Morgan, D.L. (1981): Mouse skin cells resistant to terminal differentiation associated with initiation of carcinogenesis. Nature, 293, 72-74.
- 36) Craig, R.W. and Sager, R. (1985): Suppression of tumorigenicity in hybrids of normal and oncogene-transformed CHEF cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 2062-2066.
- 37) Ruth, S. (1986): Genetic suppression of tumor formation; A new frontier in cancer research. Cancer Res., 46, 1573-1580.
- 38) Duesberg, P.H. (1983): Retroviral transforming genes in normal cells? Nature, 304, 219-226.
- 39) Pierce, G.B. (1967): Teratocarcinoma; Model for a developmental concept of cancer. Curr. Top. Dev. Biol., 2, 223-248.
- 40) Pierce, G.B. (1974): The benign cells of malignant tumors; in Developmental aspects of carcinogenesis and immunity (King, T.J., ed.). Academic Press., New York, 3-22.
- 41) Colby, W.W. and Shenk, T. (1982): Fragments of the simian

virus 40 transforming gene facilitate transformation of rat embryo cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 5189-5193.

42) Fischer-Fantuzzi, L. and Vesco, C. (1985): Deletion of 43 amino acids in the NH₂-terminal half of the large tumor antigen virus 40 results in a non-karyophilic protein capable of transforming established cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 1891-1895.

43) Jenkins, J.R., Rudge, K. and Currie, G.A. (1984): Cellular immortalization by a cDNA clone encoding the transformation-associated phosphoprotein p53. Nature, 312, 651-654.

44) Ralston, R. and Bishop, J.M. (1983): The protein products of the myc and myb oncogenes and adenovirus E1a are structurally related. Nature, 306, 803-806.

45) Land, H., Parada, L.F. and Weinberg, R.A. (1983): Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes. Nature, 304, 596-602.

46) Ruley, H.E. (1983): Adenovirus early region 1A enables viral and cellular transforming genes to transform primary cells in culture. Nature, 304, 602-606.

47) Honma, Y., Kasukabe, T. Okabe, J. and Hozumi, M. (1979): Prolongation of survival time of mice inoculated with myeloid leukemia cells by inducers of differentiation. Cancer Res., 39,

3167-3171.

48) Strickland, S. and Sawey, M.J. (1980): Studies on the effect of retinoids on the differentiation of teratocarcinoma stem cells in vitro and in vivo. *Dev. Biol.*, 78, 76-85.

49) Speers, W.C. (1982): Conversion of malignant murine embryonal carcinomas to benign teratomas by chemical induction of differentiation in vivo. *Cancer Res.*, 42, 1843-1849.

50) Speers, W.C. and Altmann, M. (1984): Chemically induced differentiation of murine embryonal carcinoma in vivo; Transplantation of differentiated tumors. *Cancer Res.*, 44, 2129-2135.

51) Speers, W.C. and Altmann, M. (1984): Malignant neoplasms of differentiated cells occurring after retinoic acid treatment of murine embryonal carcinomas in vivo. *Cancer Res.*, 44, 2136-2143.

52) Stanbridge, E.J., Der, C.J., Doersen, C-J., Nishimi, R.Y., Peehl, D.M., Weissman, B.E. and Wilkinson, S.E. (1982): Human cell hybrids; Analysis of transformation and tumorigenicity. *Science*, 215, 252-259.

53) Martin, G.R. (1975): Teratocarcinoma as a model system for the study of embryogenesis and neoplasia. *Cell*, 5, 229-243.

54) Rosenstraus, M.S., Hannis, M. and Kupatt, L. (1982): Isolation of peanut agglutinin-resistant embryonal carcinoma cell

surface variants. *J. Cell Physiol.*, 112, 162-170.

55) Rosenstrauss, M.J. (1983): Isolation and characterization of an embryonal carcinoma lacking SSEA-1. *Dev. Biol.*, 99, 318-323.

56) Buckalew, J.J., Sterman, B. and Rosenstrauss, M. (1985): Variant embryonal carcinoma cells lacking SSEA-1 and Forsmann antigens remain developmentally pluripotent. *Dev. Biol.*, 107, 134-141.

57) Schindler, J., Matthaei, K.I. and Sherman, M.I. (1981): Isolation and characterization of mouse mutant embryonal carcinoma cells which fail to differentiate in response to retinoic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 1077-1080.

58) McCue, P.A., Matthaei, K.I., Taketo, M. and Sherman, M.I. (1983): Differentiation-defective mutants of mouse embryonal carcinoma cells; Response to hexamethylene bisacetamide and retinoic acid. *Dev. Biol.*, 96, 416-426.

59) Wang, S.-Y. and Gudas, L.J. (1984): Selection and characterization of F9 teratocarcinoma stem cell mutants with altered response to retinoic acid. *J. Biol. Chem.*, 259, 5899-5906.

60) Moore, E.E., Moritz, E.A. and Mitra, N.S. (1985): A variant F9 embryonal carcinoma cell line which undergoes incomplete differentiation in retinoic acid. *Cancer Res.*, 45, 4387-4396.

- 61) Jetten, A.M. and Jetten, M.E.R. (1979): Possible role of retinoic acid binding protein in retinoid stimulation of embryonal carcinoma cell differentiation. *Nature*, 278, 180-182.
- 62) Wang, S-Y., LaRosa, G.J. and Gudas, L.J. (1985): Molecular cloning of gene sequences transcriptionally regulated by retinoic acid and dibutyryl cyclic AMP in cultured mouse teratocarcinoma cells. *Dev. Biol.*, 107, 75-86.
- 63) Scott, R.E., Florine, D.L., Wille, J.J., Jr. and Yun, K. (1982): Coupling of growth arrest and differentiation at a distinct state in the G1 phase of the cell cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 845-849.
- 64) Wille, J.J., Jr., Maercklein, P.B. and Scott, R.E. (1982): Neoplastic transformation and defective control of cell proliferation and differentiation. *Cancer Res.*, 42, 5139-5146.
- 65) Marks, P.A., Rifkind, R.A., Gambari, R., Epner, E., Chen, Z. and Banks, J. (1982): Commitment to terminal differentiation and the cell cycle. *Curr. Top. Cell Regul.*, 21, 189-203.
- 66) Wille, J.J. and Scott, R.E. (1986): Suppression of tumorigenicity by the cell-cycle-dependent control of cellular differentiation and proliferation. *Int. J. Cancer*, 37, 875-881.
- 67) Mummery, C., van den Brink, C.E., van der Saag, P.T. and de Laat, S.W. (1984): The cell cycle, cell death, and cell

morphology during retinoic acid-induced differentiation of embryonal carcinoma cells. *Dev. Biol.*, 104, 297-307.

68) Rosenstraus, M.J., Sundell, C.L. and Liskay, R.M. (1982): Cell-cycle characteristics of undifferentiated and differentiating embryonal carcinoma cells. *Dev. Biol.*, 89, 516-520.

69) Martin, G.R. (1980): Teratocarcinomas and mammalian embryogenesis. *Science*, 290, 768-776.

70) Strickland, S. Reich, E. and Sherman, M.I. (1976): Plasminogen activator in early embryogenesis; Enzyme production by trophoblast and parietal endoderm. *Cell*, 9, 231-240.

71) Sherman, M.I., Strickland, S. and Reich, E. (1976): Differentiation of early mouse embryonic and teratocarcinoma cells in vitro; Plasminogen activator production. *Cancer Res.*, 36, 4208-4216.

脚注：

大阪大学歯学部口腔外科学第2講座（主任：作田正義教授）

本論文の要旨は、第7回日本分子生物学会（昭和59年10月、神戸）、第38回日本細胞生物学会（昭和60年11月、広島）、第39回日本細胞生物学会（昭和61年10月、東京）および第45回日本癌学会総会（昭和61年10月、札幌）において一部発表した。

図表の説明

図1 細胞増殖に関する温度感受性変異株の分離

F9細胞を変異誘発剤ニトロソグアニジン(MNNG)で処理し、32.5°Cで培養後、37.5°Cに移しFUdR選択を8~16時間行った。そして、32.5°Cに戻し、増殖させた後、2回目のFUdR選択を行い、この選択を約10~15回繰り返したのち、3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。

図2 野生株F9の増殖曲線

2×10^4 の細胞をシャーレに播種し、約12時間後、一部の細胞を非許容温度に移し、各培養日後、許容温度(32.5°C: ○)と非許容温度(39.0°C: ●)における増殖を比較した。細胞倍加時間は許容温度で18~19時間、非許容温度で12~13時間と、非許容温度の方が増殖が盛んであった。

図3 ts変異株B14.231の増殖曲線

2×10^4 の細胞をシャーレに播種し、約12時間後、一部の細胞を非許容温度に移し、各培養日後、許容温度(32.5°C: ○)と非許容温度(39.0°C: ●)における増殖を比較した。さらに非許容温度で2日(△)、3日(□)培養した細胞を経時的に許容温度に下げ、増殖阻害の可逆性を検討した。細胞倍加時間は許容温度で18~19時間であり、野生株F9と同一であった。しかし、非許容温度に上げると約2回分裂した後、増殖を停止した。また、非許容温度で1~3日培養しても増殖の可逆性を保持していた。

図4 ts変異株C11.222の増殖曲線

2×10^4 の細胞をシャーレに播種し、約12時間後、一部の細胞を非許容温度に移し、各培養日後、許容温度(32.5°C: ○)と非許容温度(39.0°C: ●)における増殖を比較した。さらに非許容温度で2日(△)、3日(□)培養した細胞を経時的に許容温度に下げ、増殖阻害の可逆性を検討した。細胞倍加時間は許容温度で18~19時間であり、野生株F9と同一であった。しかし、非許容温度に上げると約3回分裂した後、増殖を停止した。また、非許容温度で1~3日培養しても増殖の可逆性を保持していた。

図5 非許容温度での細胞形態の変化（倍率200倍）

A：野生株F9

緊密な敷石状配列を呈する。

B：レチノイン酸で4日間処理し分化誘導した野生株F9

細胞間の接着性が低下すると共に、各細胞は基質上に広がり扁平な三角形に変化する。

C：許容温度で4日間培養したts変異株B14.231

野生株F9と同様の形態を呈する。

D：非許容温度で4日間培養したts変異株B14.231

各細胞は基質上に広がり扁平な細胞形態に変化する。

E：許容温度で4日間培養したts変異株C11.222

野生株F9と同様の形態を呈する。

F：非許容温度で4日間培養したts変異株C11.222

一部の細胞は基質から遊離し、付着した細胞は基質上に広がり扁平な細胞形態に変化する。

図6 非許容温度におけるPA活性の変化

許容温度（■）と非許容温度（□）で培養し、各培養日数までに0.2%BSA添加MEM培地中に産出されるPAの活性を¹²⁵I-フィブリン法を用いて測定した。非許容温度で培養すると野生株F9ではPA活性に有意な変化は認められなかったが、ts変異株では経時的にPA活性が増加した。

図7 野生株F9の非許容温度における細胞表面膜抗原（SSEA-1）の変化

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測定した。（……）は許容温度、（——）は非許容温度を、さらに（---）はレチノイン酸で4日間処理した野生株F9を示す。また図中の数字は非許容温度での培養日数を示す。野生株F9では非許容温度で培養しても許容温度と同様に障害をうけたが、レチノイン酸で分化誘導すると細胞障害指数の有意な低下を示した。

図8 ts変異株B14.231の非許容温度における細胞表面膜抗原（SSEA-1）の変化

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測定した。（……）は許容温度、（——）は非許容

温度を、また図中の数字は非許容温度での培養日数を示す。許容温度では野生株F9と同様の高い細胞障害指数を示したが、非許容温度で培養すると細胞障害指数は経時的に低下した。

図9 *ts*変異株C11.222の非許容温度における細胞表面膜抗原 (SSEA-1) の変化

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測定した。(-----)は許容温度、(——)は非許容温度を、また図中の数字は非許容温度での培養日数を示す。許容温度では野生株F9と同様の高い細胞障害指数を示したが、非許容温度で培養すると細胞障害指数は経時的に低下した。

図10 アルカリフォスファターゼ (ALP) 染色

未分化幹細胞のマーカであるALPを組織化学的染色により判定した。左側は未分化幹細胞で緊密なコロニーを形成し、ALP活性が陽性、右側は分化細胞で粗なコロニーを形成し、ALP活性が陰性であることを示す。

図11 非許容温度におけるALP活性の変化

各温度で各時間処理し、分化誘導した細胞を許容温度でコロニー形成させた。このコロニーにALP染色を施し、非許容温度でのALP陽性のコロニー数を許容温度でのALP陽性のコロニー数に対する比(%)で示した。(○)は野生株F9、(△)は*ts*変異株B14.231、(□)は*ts*変異株C11.222を示す。*ts*変異株では非許容温度で培養すると培養時間と共に総コロニー数は同一であるにもかかわらず、ALP活性陽性のコロニー数は顕著に減少した。

図12 分化誘導に伴う、軟寒天培地中でのコロニー形成能とプラスチックディッシュ上でのコロニー形成能の変化

39.0°Cで各時間処理し、分化誘導した 10^3 個の細胞を、0.45%寒天を含む10%FCS含有MEM培地に播種し、2週間後に形成した軟寒天培地中でのコロニー数を算定した。F9(○)、B14.231(△)、C11.222(□)。

同時に、プラスチックディッシュに同数の細胞を播種し、プラスチックディッシュ上でのコロニー形成能を調べた。F9(●)、B14.231

(▲)、C11.222 (■)。

プラスチックディッシュ上でのコロニー形成能は非許容温度で培養しても野生株F9、ts変異株B14.231、C11.222はすべて著明な変化を認めなかった。一方、軟寒天培地中でのコロニー形成能は非許容温度で培養すると、野生株F9ではほとんど減少しないのに対して、ts変異株B14.231、C11.222では、各々0.1%、0.016%と著明に低下した。

図13 分化誘導に伴う腫瘍形成能の変化

各温度で各時間処理し、分化誘導した $5 \times 10^5 / 0.1 \text{ ml}$ 細胞を同系129/Svマウスの剃毛した背部皮下に接種し、2週間後に腫瘍形成の有無を判定した。(○、△、□)は許容温度、(●、▲、■)は非許容温度を、また、(○、●)はF9、(△、▲)はB14.231、(□、■)はC11.222を示す。

野生株F9では非許容温度で培養しても、腫瘍形成率は許容温度の時と同じであったが、ts変異株B14.231、C11.222では65~80%減少した。

表1 非許容温度で分化誘導後の細胞の生存率

各温度で各時間処理し分化誘導した細胞の生存率(%)をエリスロシンBの色素排除法にて算定した。

表2 非許容温度でのts変異株の分化形質の発現

表3 ts変異株における分化誘導の自己増殖能、腫瘍形成能に及ぼす影響

37.5°C

32.5°C

F9細胞 (5x10⁴/ディッシュ)

← MNNG (1.5µg/ml)
16時間

← 継代培養
2日

← 無血清培地
14時間

← 10%FCS培地
1~2時間

← FUdR (25µg/mg)+Uridine (125µg/ml)

FUdR選択
8~16時間

← 10%FCS培地 + TdR (20µg/ml)
2~3日

2回目のFUdR選択

← コロニー形成

コロニークローニング

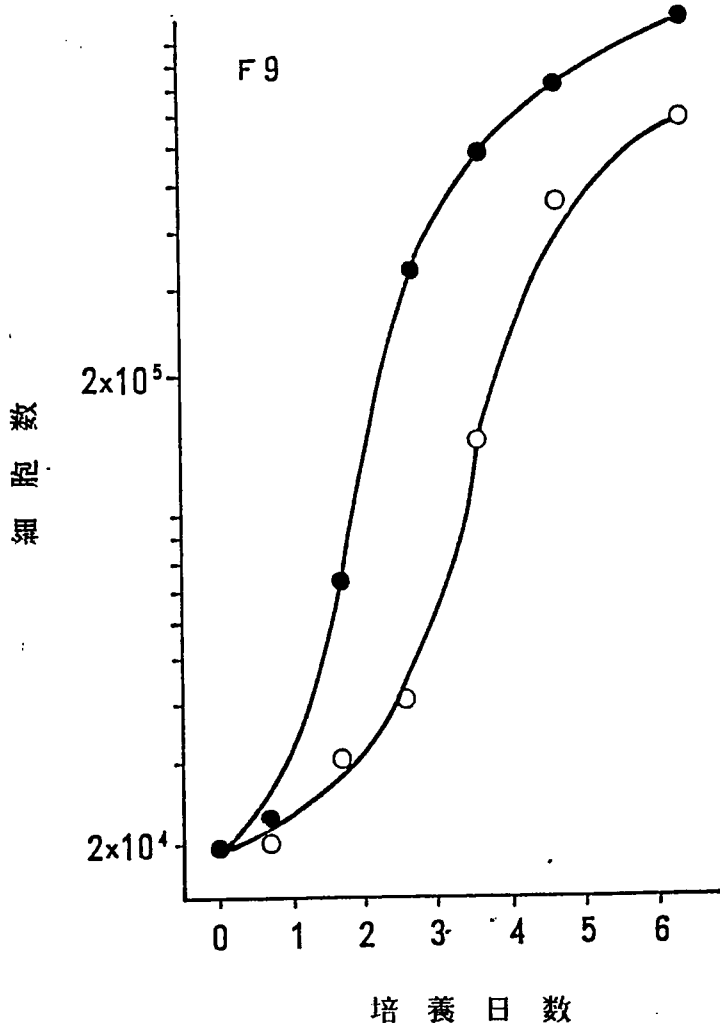


圖 2

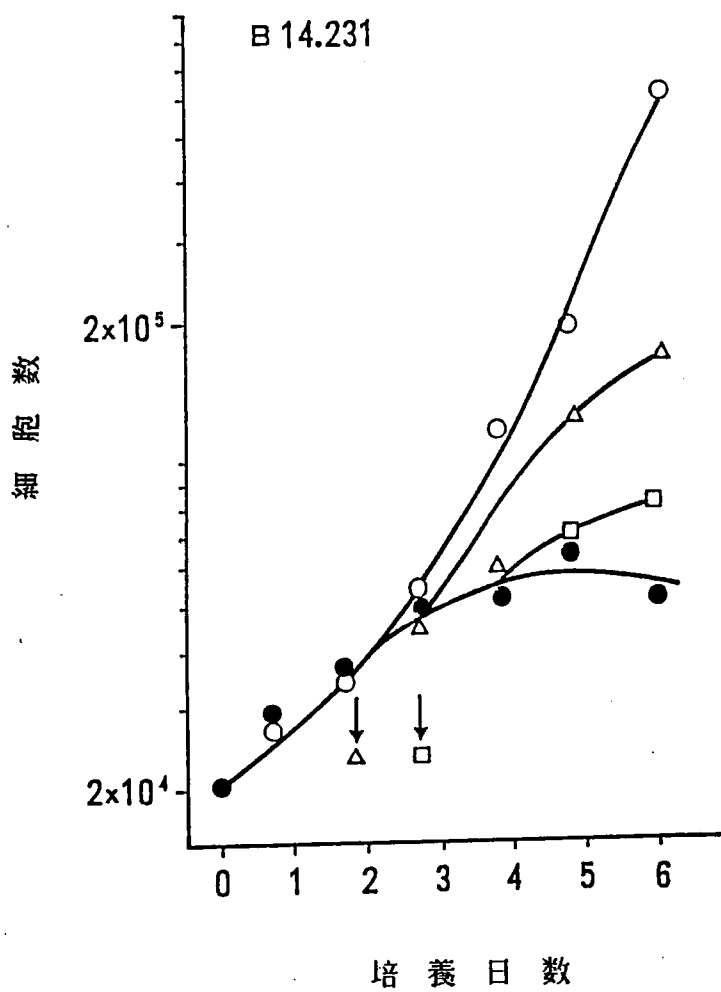


图 3

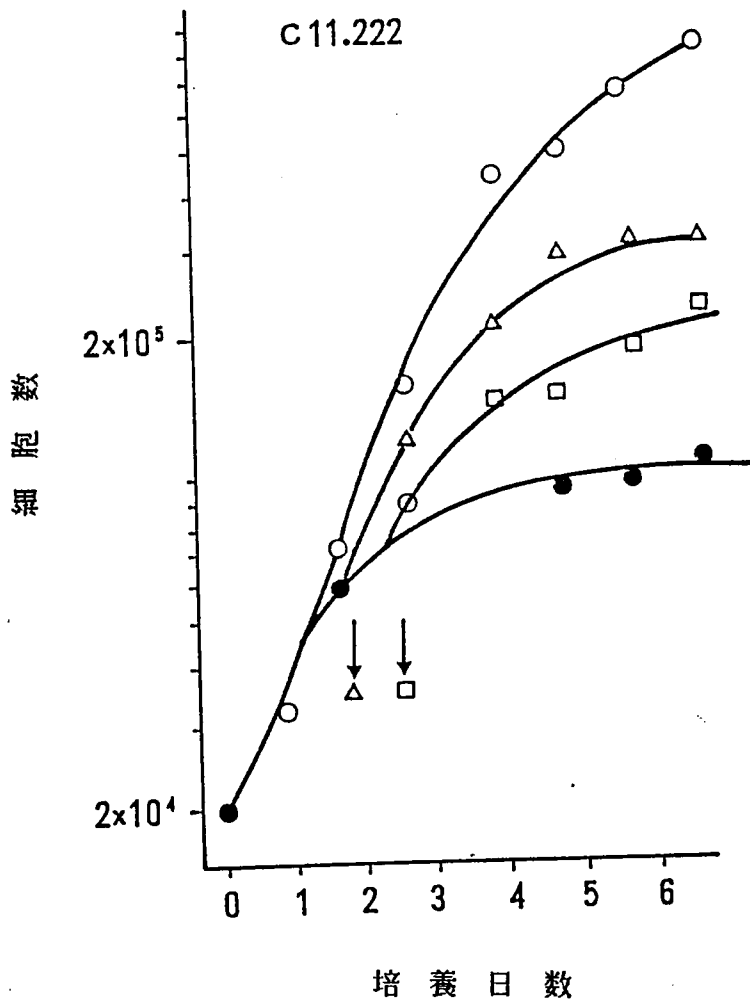
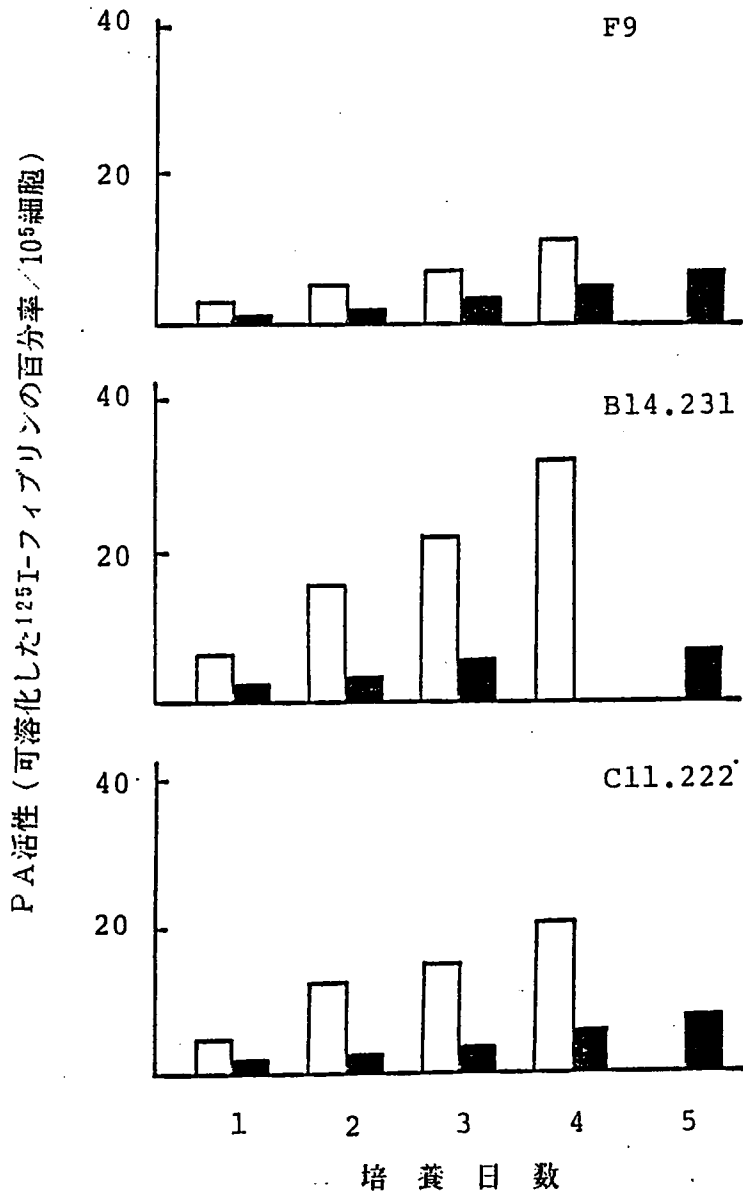
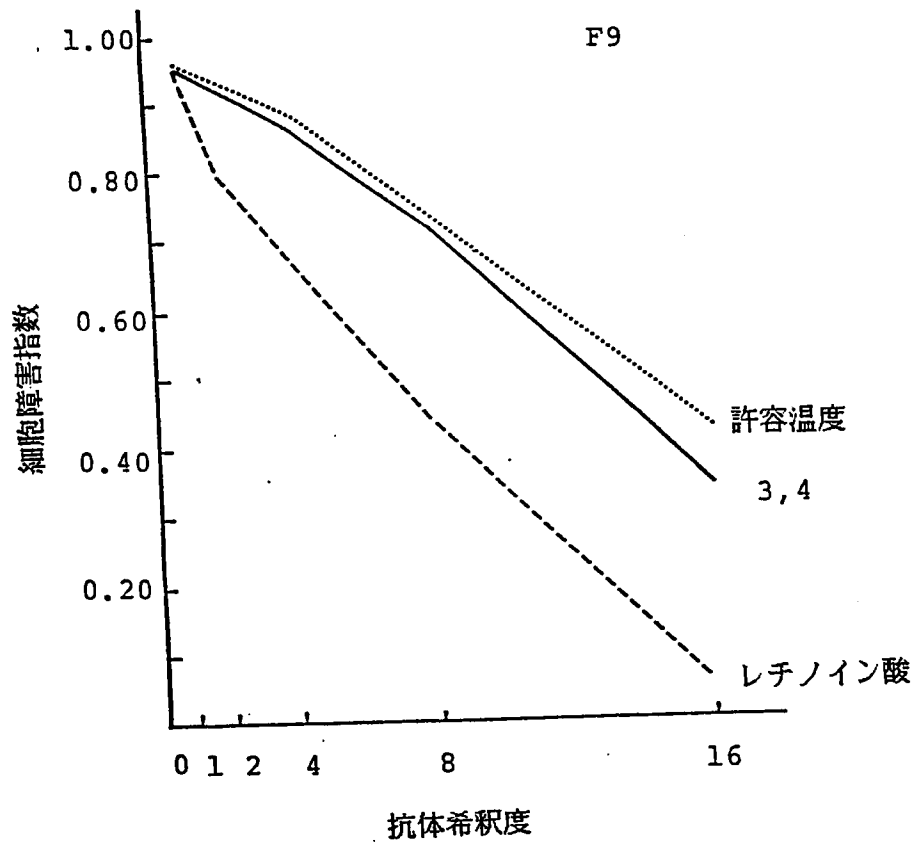
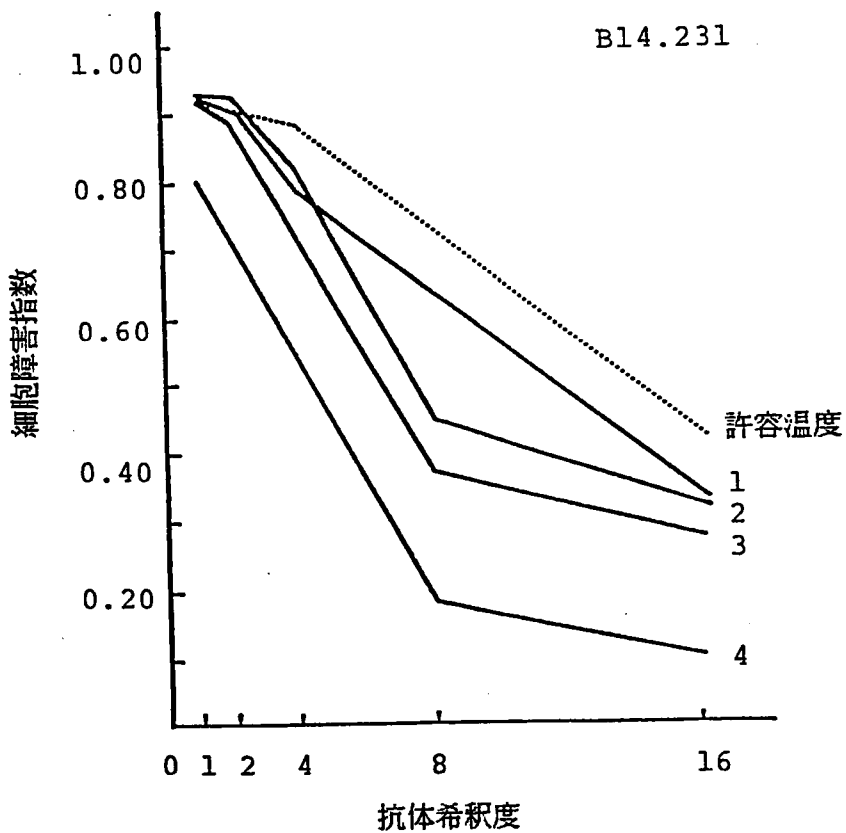
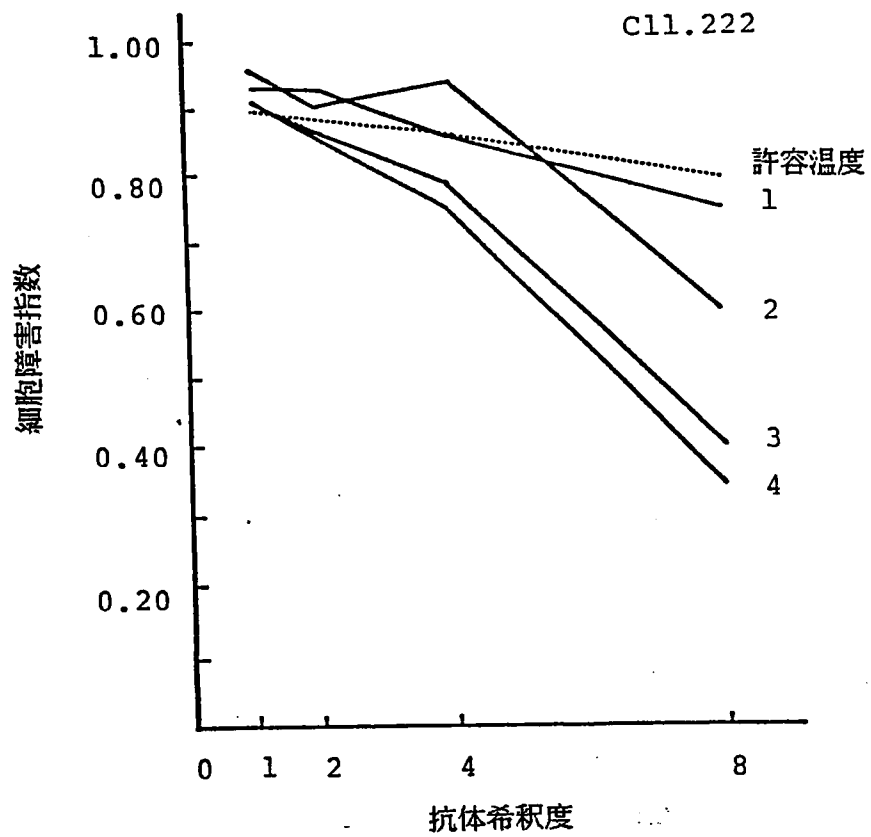


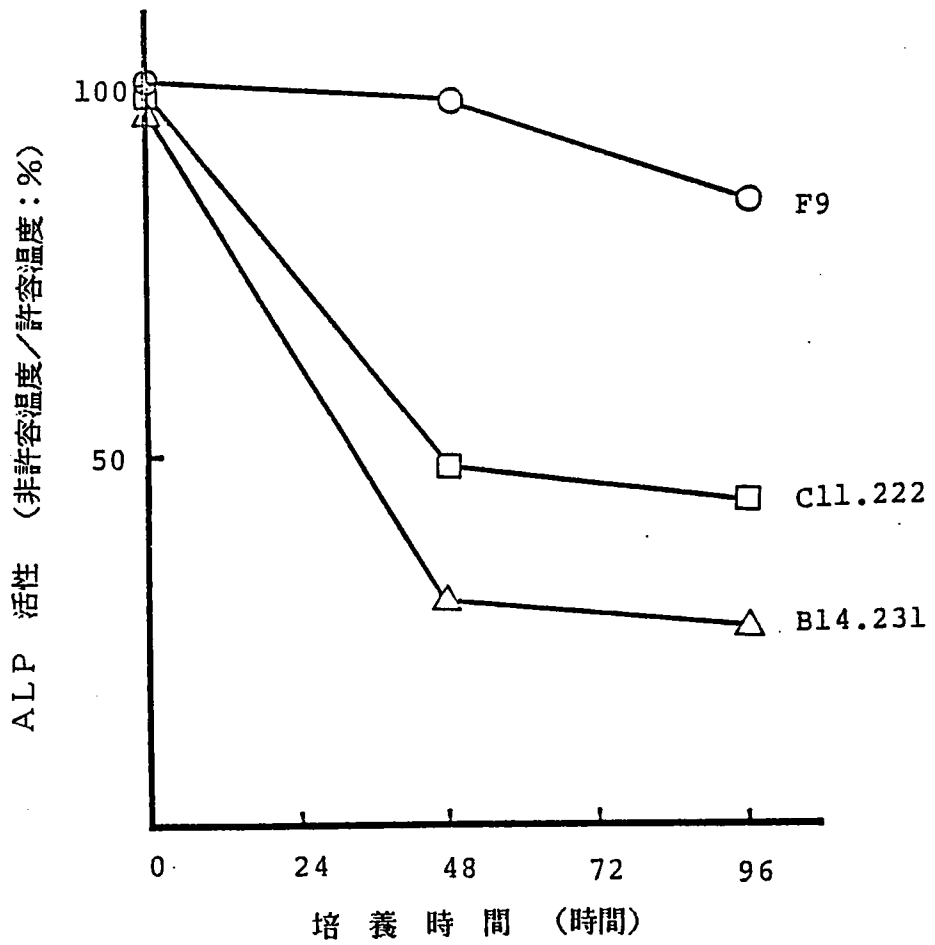
图 4

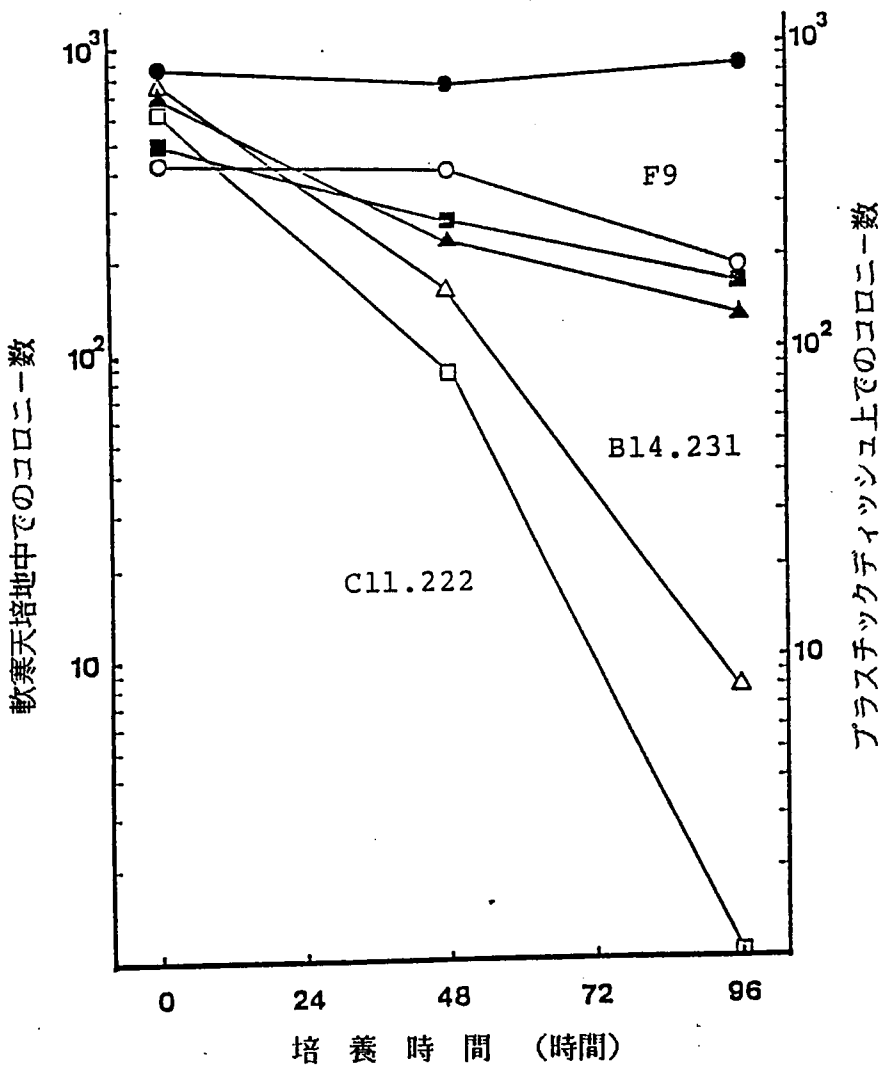












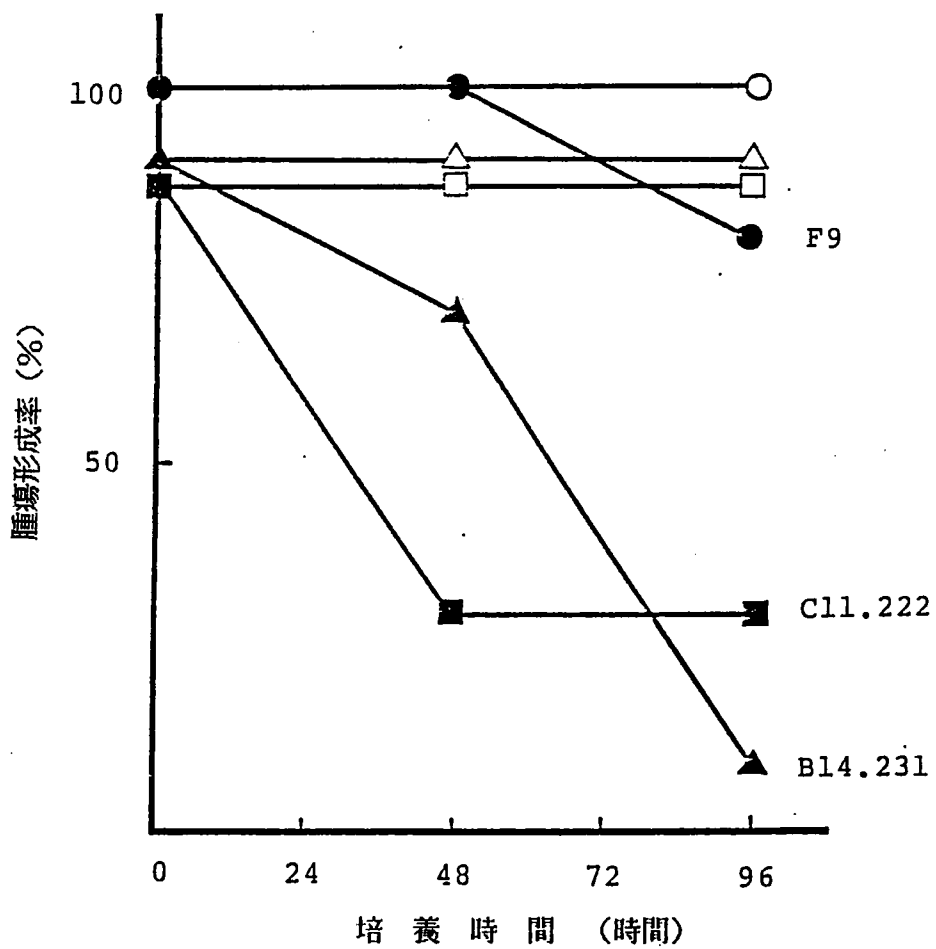


图 13

	32.5°C		99.2 ± 1.4
F9	39.0°C	48 時間	94.5 ± 4.0
		96 時間	94.4 ± 2.0
	32.5°C		97.5 ± 2.8
B14.231	39.0°C	48 時間	95.8 ± 4.2
		96 時間	92.2 ± 2.6
	32.5°C		97.9 ± 2.7
C11.222	39.0°C	48 時間	92.9 ± 2.7
		96 時間	93.9 ± 4.9
	32.5°C		

表 1

マ - カ -	未 分 化	分 化
プラスミノーゲンアクチベーター (PA)	-	+
F 9 抗原 (SSEA-1)	+	-
アルカリフォスファターゼ (ALP)	+	-

表 2

	許 容 温 度	非 許 容 温 度
自 己 增 殖 能	+	+
分 化	-	+
腫 瘍 形 成 能	+	-

表 3

