

Title	Inhibition of Murine Transformed Leydig Cell Proliferation by Leukotrienes in Serum-Free Culture
Author(s)	西井, 一雅
Citation	大阪大学, 1992, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/37716
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、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	にし い かず まさ 西 井 一 雅
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学位記番号	第 1 0 0 8 3 号
学位授与年月日	平成 4 年 3 月 16 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文名	Inhibition of Murine Transformed Leydig Cell Proliferation by Leukotrienes in Serum-Free Culture (無血清培地でロイコトリエンによるマウス辜丸間質細胞腫由来エストロゲン依存性細胞株の増殖抑制)
論文審査委員	(主査) 教授 岸本 忠三 (副査) 教授 北村 幸彦 教授 荻原 俊男

論 文 内 容 の 要 旨

(目 的)

ステロイド依存性癌増殖の分子機構は不明である。この問題を解決するためには種々の人工的修飾因子を最小にしたモデル系が必要であると思われる。我々が樹立したマウス辜丸間質細胞腫由来培養株B-1Fは、無血清培地で、しかも既存の接着因子や増殖因子を加えない条件下で、エストロゲン依存性増殖を示す。一方、5- α -リポキシゲナーゼ阻害剤によっても増殖が促進される。そこでエストロゲン依存性増殖がアラキドン酸代謝を修飾することにより生じる可能性を検討した。

(方 法)

- (1) 細胞増殖：B-1F細胞は無血清培地 (HamF12:MEM (1:1) -0.1% bovine serum albumin (HMB) - 10^{-8} M estradiol (E_2) 中で継代培養した。細胞増殖に対する影響は細胞をプレーティングと同時に種々の物質を加え、通常は48時間毎に培地を交換し、6日目の生細胞数又は、3日目のDNA合成を指標として測定した。ロイコトリエン (LT) の添加実験では、その不安定性を考慮し培地は24時間毎に交換した。
- (2) LT濃度測定：B-1F細胞をプレーティングし、2日間種々の刺激物質存在下で培養後、培地を交換し、各種LT濃度をradio immuno assayにより測定した。
- (3) LTD₄レセプター測定。B-1F細胞の細胞膜分画と0.1~2nM [³H] LTDs を competitor 存在、または非存在下で20°C, 30分インキュベーション、GF/C filter 上に膜分画を吸着させ、そのradio activityを測定した。特異結合をScatchard解析した。
- (4) リポキシゲナーゼ活性測定。B-1F細胞を48時間 10^{-8} ME₂と存在又は非存在下で培養後可溶性分画

を調整した。これを $10\mu\text{M}$ [^3H] アラキドン酸と 30°C 、5分インキュベーションし、抽出操作後、HPLCで分離し、各HETE分画のradio activityを測定した。

- (5) phospholipase A_2 (PLA $_2$) 活性測定：B-1F細胞を 10^{-8}ME_2 と存在又は非存在下で48時間培養した後、 ^3H アラキドン酸と4時間インキュベーションすることにより、B-1F細胞のリン脂質を ^3H アラキドン酸で標識した。培地を変更後、培地中に遊離してくる ^3H アラキドン酸量をPLA $_2$ 活性とした。

(結 果)

- (1) 培地中にアラキドン酸 ($0.2 \sim 1\mu\text{M}$) を添加すると、濃度依存性は細胞増殖が抑制された。アラキドン酸の抑制効果は 10^{-8}ME_2 添加により部分的に阻止された。
- (2) B-1F細胞の増殖はLTC $_4$ 、D $_4$ 、E $_4$ ($10^{-9} \sim 10^{-7}\text{M}$) によっても濃度依存性に抑制された。各種LTによる抑制は同等で、非添加時を100%として表示すると、E $_2$ 存在下では最大効果は70%抑制であった。
- (3) B-1F細胞のLT産生能を検討すると、7時間培養でも培地中にLTは同定され、B-1F細胞はLTを産生することが判明した。B-1F細胞を 10^{-8}ME_2 により刺激することにより、このLTC $_4$ 、D $_4$ 、E $_4$ の産生はコントロール値の25%に抑制された。
- (4) 高親和性のLTD $_4$ 結合部位が、B-1F細胞の細胞膜に存在し、その親和性は $0.91 \pm 0.22\text{nM}$ でBmaxは $14.9\text{fmol/mg protein}$ であった。結合特異性はICI198615 (LTD $_4$ レセプター阻害剤) $\text{LTD}_4 > \text{LTC}_4 > \text{LTE}_4$ であった。
- (5) E $_2$ のLT合成系に対する作用部位の同定を試みた。PLA $_2$ 活性へのE $_2$ の効果を検討すると、培地中に放出されるアラキドン酸量に有意な変化は認められなかった。次に、リポキシゲナーゼ活性の測定を行った。5-リポキシゲナーゼ活性は48時間E $_2$ 処理した細胞では無処理の細胞の $38 \pm 6\%$ に抑制された。一方、同時に測定した12-リポキシゲナーゼ活性はE $_2$ 処理にても抑制されなかった。

(総 括)

B-1F細胞増殖はエストロゲンにより促進された。又、アラキドン酸やLTC $_4$ 、D $_4$ 、E $_4$ により濃度依存性に抑制された。アラキドン酸による抑制はエストロゲンにより部分的に阻止された。一方、エストロゲンはB-1F細胞LT産生を抑制した。B-1F細胞はLTD $_4$ レセプターをもつことも判明した。以上の結果はエストロゲンはLTの合成を抑制することにより細胞増殖を促進することを強く示唆する。エストロゲン依存性増殖のオートクリンループにおいてLTが主な役割を演じていることが判明した。又、このエストロゲンの作用は5-リポキシゲナーゼ活性を阻害することにより生じることも明らかになった。

論文審査の結果の要旨

ステロイドホルモン依存性癌の増殖機構は不明である。

本研究ではエストロゲン依存性増殖を示すマウス睾丸腫由来細胞株をモデルとして、その増殖機構について検討した。この細胞株においては、ロイコトリエンにより細胞増殖が抑制されること、又、自らがロイコトリエンを合成、分泌することを明らかにした。さらに、エストロゲンは5-リポキシゲナーゼ活性を抑制し、ロイコトリエンの産生を抑制することにより、細胞増殖を促進することを示した。

本研究は、エストロゲン依存性癌増殖が、アキラドン酸代謝を修飾することにより生じることを明らかにしたものであり、学位授与に値すると思われる。