

Title	Effect of retinoic acid on proliferation of estrogen-responsive transformed murine Leydig cells in serum-free culture
Author(s)	弘世, 貴久
Citation	大阪大学, 1992, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/37967">https://hdl.handle.net/11094/37967</a>
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">＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"&gt;https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> >大阪大学の博士論文について</a>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

氏 名	ひろ せ たか ひさ 弘 世 貴 久
博士の専攻分野の名称	博 士 ( 医 学 )
学位記番号	第 1 0 1 8 9 号
学位授与年月日	平成 4 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学研究科 内科系専攻
学位論文名	<b>Effect of retinoic acid on proliferation of estrogen-responsive transformed murine Leydig cells in serum-free culture</b> (エストロゲン応答性癌細胞の増殖におけるレチノイン酸の役割) ——— 無血清培地における検討 ———
論文審査委員	(主査) 教 授 岸 本 忠 三 (副査) 教 授 北 村 幸 彦    教 授 宮 井 潔

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### (目 的)

Retinoic acid (RA) は抗腫瘍効果をもち上皮細胞の分化に大きな役割をもつ脂溶性ビタミンである。そのレセプター (RAR) は遺伝子の一次構造の解析により steroid-thyroid hormone receptor superfamily の一員であることが明らかとなった。これ以来 RAR による遺伝子の活性化能や分化誘導能が注目されている。又, steroid receptor (特にエストロゲンレセプター (ER)) が認識する標的遺伝子に存在する hormone responsive element の塩基配列は RAR のそれと類似するとの報告がある。しかし, ER と RAR による転写制御における相互作用機構は不明である。又 RA による癌細胞増殖制御に関しては未だ充分な知見が得られていない。そこでエストロゲン応答性細胞であるマウス睾丸間質細胞腫樹立株 (B-1 F), ヒト乳癌細胞 (MCF 7) の増殖と遺伝子発現に対する RA の効果を無血清培地で比較検討した。

#### (方 法)

B-1 F 細胞は 0.1 % BSA を含んだ Ham F12/MEM 1 : 1 (V/V) (HMB) で継代した。MCF 7 細胞は 10% 牛胎児血清を含む DMEM で継代した。細胞増殖への影響は両細胞共 35 mm 径 dish に  $2 \times 10^4$  cell を plating し翌日両細胞共 drug を含む HMB と交換, 所定の期間の後細胞数を測定することにより評価した。ER は whole cell binding assay にて, RAR はヒト RAR- $\alpha$ , - $\beta$ , - $\gamma$  を probe として Northern blot hybridization により検索した。遺伝子発現への影響は両細胞に reporter plasmid を electroporation 法を用いて transfection し, ホルモン刺激後 CAT assay を行うことにより評価した。reporter plasmid には synthetic の estrogen responsive element (ERE) を 2 個含む ERE<sub>2</sub>-tk-

CATを用いた。

#### (成 績)

RAは $10^{-8}$ MでB-1F細胞のdoubling timeをホルモン無添加時の94時間から43時間に短縮した。RA単独で細胞増殖促進をみる細胞系の報告は本例が初めてである。MCF 7細胞では従来の報告と同様RAにより細胞増殖は抑制された。B-1F細胞の $E_2$ 依存性増殖に対してRAはadditiveな効果を示さなかった。またこのRA依存性増殖は抗エストロゲン剤により阻害された。これらの現象は $E_2$ とRAの作用に何らかのcommon pathwayが存在する可能性を示唆した。

Northern blot analysisによりB-1F細胞にはRAR  $\alpha$ が認められた。一方MCF 7細胞ではRAR  $\alpha$ および $\gamma$ が認められた。 $^3H-E_2$ を用いたB-1F細胞のwhole cell binding assayで $E_2$ は $^3H-E_2$ のbindingを抑制したがRAは阻害せず、これよりB-1F細胞にはERが存在すること、このERにはRAは結合しないことがわかった。更にRAのanalogueであるretinal, retinol, retinol acetateのB-1F細胞の増殖に対する作用はその生物活性に一致していたことよりRAの細胞増殖促進作用がRAR  $\alpha$ を介していることが推察された。

次に遺伝子上でのRARとERのinteractionの有無を検討するためtwo tandemのEREにthymidine kinase promoterおよびchloramphenicol acetyltransferaseを連結したERE<sub>2</sub>-tk-CATのreporter plasmidをB-1F, MCF 7細胞に導入し遺伝子発現に対する $E_2$ , RAの作用をみた。B-1F細胞では $E_2$ のみならずRAによっても生理的濃度の $10^{-7}$ MでCAT活性の上昇が認められた。この現象は細胞増殖に対する作用と一致していた。MCF 7細胞では $E_2$ によりCAT活性の上昇が認められたがRAではこれを誘導し得なかった。B-1F細胞で認められたRAによるCAT活性の上昇は抗エストロゲン剤により阻害された。

#### (総 括)

無血清培地下においてRA単独投与で細胞増殖促進を認める細胞系を報告した。しかもこのRAの作用には $E_2$ 依存性増殖に対しadditivityがなく、抗エストロゲン剤により阻害された。

一方、EREをもつreporter plasmidを導入しRAで刺激するとこの細胞系では遺伝子活性化が観察され、やはりこれは抗エストロゲン剤により阻害された。以上の結果よりB-1F細胞においてRAはRARと結合しEREを活性化すること、この活性化にはERがmodulatorとして働くことが考えられた。またこの機構が細胞増殖に関与するものと考えられた。現在、RAの作用の多様性を説明するのに細胞特異的転写因子や多様なRA responsive elementの存在が注目されておりこの細胞系はこの分野の検討に有用であると思われる。

### 論文審査の結果の要旨

本研究は、上皮細胞の分化増殖に重要な役割を果たしているレチノイドの活性誘導体、レチノイン酸(RA)のエストロゲン反応性腫瘍細胞系の増殖に対する影響を検討したものである。その細胞系のう

ちマウス睪丸間質細胞腫樹立株 (B-1 F) は無血清培地下で RA の単独投与により増殖が促進された。更にこの細胞に導入した estrogen responsive element が RA により活性化された。これらの現象は抗エストロゲン剤により阻害された。以上の結果よりこの細胞のエストロゲンレセプターと RA レセプターの間には蛋白レベルでの interaction のある可能性が示唆された。係る現象を示す細胞系は現在迄全く報告はなくステロイドホルモンの相互作用、ステロイド依存性腫瘍の増殖機構、レチノイドによる分化増殖の作用機構などの研究に良い系となると考えられる。よって、学位論文に相当すると考える。