The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Reversible Effects of Sodium Butyrate on the Differentiation of F 9 Embryonal Carcinoma Cells
Author(s)	小阪, 美津子
Citation	大阪大学, 1992, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/37991
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【25】

氏　　名	小　阪　美津子（こ さか み つ こ）
博士の専攻分野の名称	博　士（医学）
学位記番号	第　10163　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　病理系専攻
学位論文名	**Reversible Effects of Sodium Butyrate on the Differentiation of F9 Embryonal Carcinoma Cells** **（マウス胚性癌細胞の分化とその可逆性に関する研究）**
論文審査委員	（主査） 教　授　西宗　義武 （副査） 教　授　島田　和典　　教　授　北村　幸彦

論文内容の要旨

（目　的）

マウス胚性癌細胞株F9は，初期胚における内部細胞塊に相当しin vitroで内胚葉性細胞への分化が誘導され，細胞分化の研究に有用な手段となるとともに初期胚発生のモデル系になりうる。F9細胞にretinoic acid（RA）を与えると分化が誘導され，細胞形態が変化しStage Specific Embryonal Antigen-1の消失，tissue-type plasminogen activator（t-PA），laminin Bl，endoAなどの種々の分化形質の発現が起こる。この時RA添加後6－24時間以内に分化の決定がなされ，その後RAを培養液中から除いても分化は進行し安定な分化状態を維持することが知られている。しかしながら分化の決定あるいはその後の分化状態の安定性を調節する機構はいまだ充分には解明されていない。自己増殖を繰り返す未分化細胞が分化へ向かう機構，また，その後の分化状態の安定性および可逆性を理解するため以下の実験を行った。

（方法および結果）

1）形態の観察

F9細胞にsodium butyrateを5 mMの濃度で与えると非常に短時間（5－6時間）で細胞の形態が変化し始め24時間後にはほぼ全ての細胞に著明な形態変化がみられた。さらに，その形態は，sodium butyrateが存在するかぎり安定であるが，培養液中からこれを除くと速やかにもとの未分化な細胞の形態に戻った。

2）plasminogen activator（PA）の産出

sodium butyrateによって形態が変化した細胞の性質を知るため内胚葉性細胞の指標となる酵素

PA の産生についてcasein-agar-overlay 法を用いて調べた。未処理のＦ９すなわち未分化な細胞のコロニーはまったく PA 活性を有しないのに対し sodium butyrate で16時間処理するとほぼ100％のコロニーが PA 活性を有していた。また，16時間処理した後，培養液を交換し薬剤を除くと速やかに活性が低下し12時間後には全コロニーがＰＡ活性を失っていた。

3）各種分化形質遺伝子の発現

Ｆ９細胞に対する sodium butyrate の効果をさらに調べるため，分化の指標となりうる各遺伝子の発現について RNA blot 法を用いて解析した。その結果，未処理のＦ９細胞では分化形質遺伝子，t-PA，laminin Bl，endoA の mRNA は全く検出できないが sodium buty-rate 処理８時間目より各々の mRNA が検出され，24-36 時間処理で最高レベルに達した。また，薬剤を除いて６時間後には各々の遺伝子の発現量は速やかに減少し，12時間後には完全に消失した。逆に未分化Ｆ９細胞で強い発現がみられ，細胞増殖と関係していると考えられている c-myc mRNA は，sodium butyrate 処理後減少し24時間後には検出できなくなった。消失した c-myc mRNA は薬剤を除去すると速やかに回復し，12時間後にはもとの未分化なレベルに戻った。

4）sodium butyrate による各遺伝子の変動に対するcycloheximide（CHX），actinomycinD（Act.D）の効果

sodium butyrate によって引き起こされる各遺伝子発現の変動におけるタンパク質合成の関与について RNA blot 法にて解析した。sodium butyrate 処理過程に CHX を共存させると，t-PA mRNA の誘導は抑えられたが，c-myc mRNA 量の減少は同様に起こった。さらに，薬剤を除去して未分化細胞に戻る過程に CHX が共存すると t-PA mRNA の消失および c-myc mRNA の回復が阻止された。また，その過程で Act.D を共存させた新たな mRNA の合成を止めると t-PA mRNA の消失が著しく遅れた。

（総　括）

1．sodium butyrate は非常に速やかにＦ９細胞の分化を誘導し，かつ，その分化は完全に可逆的であることを明らかにした。このように分化誘導能が高くかつ可逆的な作用をもつ薬剤は他に報告がなく，今後，分化の決定に関わる機構，分化状態の安定性を解析する上で極めて有効であると考えられる。

2．CHX，Act.Dを用いた実験結果より，sodium butyrate は新たに合成されるある種のタンパク質を介して分化を誘導していることが示唆された。また，薬剤除去によりもとの未分化細胞へ戻る過程においても新たなタンパク質の合成が必要であり，これらは分化形質遺伝子の発現を特異的に，かつ非常に速やかに停止させる働きを持つことが示唆された。このような分子は細胞内で特定の mRNA の安定性に関与し，安定な分化形質の発現に密接な関わりをもつと考えられる。

論文審査の結果の要旨

マウス胚性癌細胞株Ｆ９は，in vitroで RA を添加することにより分化が誘導される。この RA によ

るＦ９の分化誘導系を用いて現在まで多くの研究がなされてきたが，分化の決定あるいはその後の分化状態の安定性を調節する機構につては依然として解明されていない。本研究では，sodium butyrate の効果について着目し実験を行った結果，sodium butyrate はRA よりも非常に速やかにＦ９細胞の分化を誘導し，かつ，その分化は完全に可逆的で，薬剤を除くと速やかにもとの未分化細胞へ戻ることを明かにした。さらに，未分化細胞へ戻る過程において新たなタンパク質の合成が必要であることを示し，それらの分子は分化形質遺伝子の発現を特異的に短時間で停止させる働きを持つことが示唆された。今回確立した sodium butyrate による可逆的分化誘導系は，引き起こされる変化が非常に速くしかも可逆的であるという点が特徴的で，今後，分化の決定，分化状態の安定性を理解する上で，また，分化に伴って変化する種々の遺伝子の発現調節機構の解析にもきわめて有効な系になりうると期待される。よって，本研究は学位に値するものと判定する。