



Title	Transformation of Type 1 Astrocytes with N-Ethyl-N-Nitrosourea : Establishment of an in Vitro System and the Role of the p53 Gene
Author(s)	平賀, 章壽
Citation	大阪大学, 1995, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/39467">https://hdl.handle.net/11094/39467</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">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	平 賀 章壽
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学 位 記 番 号	第 12001 号
学位授与年月日	平成 7 年 5 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	Transformation of Type I Astrocytes with N-Ethyl-N-Nitrosourea : Establishment of an in Vitro System and the Role of the p53 Gene (N-エチル-N-ニトロソウレアによる1型アストログリアの変異細胞誘発－培養細胞での腫瘍誘発系の確立とp53癌抑制遺伝子の役割－)
論文審査委員	(主査) 教授 早川 徹 (副査) 教授 高井新一郎 教授 青笹 克之

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### 【目的】

グリオーマ発生の機序に関する知見の多くは、標本より得られた所見に基づいて retro-spective に類推したものであり、正常細胞が腫瘍化する過程の段階的变化を prospective に観察した報告は乏しい。また従来より経胎盤的に N-エチル-N-ニトロソウレア (ENU) をラット胎児に投与して誘発されるグリオーマモデルの実験的研究が行われてきたが、本法には腫瘍の局在が一定せず、しかも腫瘍発生までに約6カ月を要するなどの欠点に加えて、アストログリア系の腫瘍発生が少なく、ヒトグリオーマのモデルとしては問題であった。そこでこれらを解決すべく、培養1型アストログリアの ENU による腫瘍発生の過程を検討し、またその腫瘍性変化における p53 の役割に注目して以下の実験を行なった。

#### 【方 法】

胎生 20 日の Wistar ラット胎児の大脳細胞を 10 % FBS 添加の DMEM - HamF10 混合培地で 6~9 日間培養した後、培養フラスコを 24 時間振盪して初代 1 型アストログリアを得た。これを 10~200 μg/mL の濃度で ENU 处理した後、継代培養してその形態学的变化を経時的に観察した。形態の異なる（変異）細胞コロニーを認めた時にはそれをクローニングして株化した。これらの細胞を、抗 GFAP 抗体、抗 vimentin (VM) 抗体、抗 galactocerebroside (GC) 抗体、および 2 種類の抗 p53 抗体 (PAb421 および PAb240) を用いて免疫染色して細胞学的な検討を行なった。なお、両抗 p53 抗体は、免疫染色レベルでは変異型 p53 のみを認識した。また各株細胞の単細胞浮遊液を 70 % エタノールで固定し、NP-40 で処理して上記の各一次抗体と反応させた後、FITC ラベルの 2 次抗体を用いてフローサイトメトリーを行なった。変異細胞の腫瘍原性は、2 % 低血清培地でのコロニー形成能、ならびにヌードマウスへの可移植性にて評価した。マウスに腫瘍が発生した時には、それを形態学的および免疫組織学的に検討した。さらに、p53cDNA をプローブとして p53 の mRNA レベルの発現をノザンプロットで検討した。以上の発癌誘発実験は独立して 3 回行ない、その再現性を確認した。

## 【結 果】

ENU 处理濃度 150~200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の初代アストログリアは、6~7 繼代 (42~57 日後) で変異細胞コロニーを生じた。ENU 处理濃度 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以下および無処理の継代細胞は、90 日以内 (10~12 繼代) に変異コロニーを生じなかつた。3 回の誘発実験で変異細胞 6 株を得たが、いずれも細胞倍化時間は 18.4~23.5 時間と短く、細胞飽和密度も 948~1204/ $60\text{cm}^2$  と高かつた。(対照群の ENU 無処理初代および継代細胞では各々 47.6~51.6 時間および 196~214/ $60\text{cm}^2$ )。免疫組織化学的にはいずれの株細胞も GFAP 陽性、VM 陽性、A2B5 陽性細胞 1% 以下、また GC 陰性で、1 型アストログリアの性質を示した。フローサイトメトリー上の GFAP および VM の発現量は、対照群では各細胞毎に異なつたのに対して ENU 誘発変異細胞では sharp single peak を示し、中間系フィラメントの発現量が一定した細胞の増殖であることが示唆された。p53 は対照群および 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以下の ENU 处理細胞 (変異コロニーなし) では染色陰性であった。これに対し ENU 誘発変異細胞 6 株はすべて p53 陽性であった。第 2 および第 3 回目の腫瘍誘発実験では、ENU 处理後、継代毎に一部をチャンバースライドに播いて、p53 の免疫染色を行なつた。その結果、各々第 6 および第 5 繼代時に単一の p53 陽性細胞が出現し、次の 1~3 繼代でこの陽性細胞が優生増殖して変異細胞コロニーが形成される過程が観察された。ノザンプロットでは、変異細胞で高い p53 mRNA の発現を認めた。ENU 誘発変異細胞は低血清培地で重層細胞よりなるコロニーを形成し、またヌードマウス移植 53~84 日後に腫瘍を形成した。これらの腫瘍は HE 染色上、異形性および細胞密度ともに高く、多数の細胞分裂像を有し、壊死巣を伴つてゐた。いずれの腫瘍も GFAP および VM 陽性、A2B5 および GC 陰性で、1 型アストログリアの性質を保持していた。

## 【総 括】

- ① 培養 1 型アストログリア細胞を単回の ENU 处理により、腫瘍化させることが可能であった。
- ② この培養系で形態学的な腫瘍性変化を経時的に観察した結果、1 型アストログリアの腫瘍化には、p53 癌抑制遺伝子の変異が強く関与していることが示唆された。
- ③ グリオーマの発生を antegrade に、しかも経時的に観察できる本系は、ヒトグリオーマの発生メカニズムの解明に有用な実験モデルになると思われた。

## 論文審査の結果の要旨

本研究は、培養 1 型アストログリアのエチルニトロソウレア (ENU) による腫瘍誘発系を考案し、さらに腫瘍化における癌抑制遺伝子 p53 の役割について検討したものである。その結果、培養 1 型アストログリアは単回の高濃度 ENU 处理にて短期間に変異 (transformed) 細胞コロニーを生じること、ならびにこの変異細胞が変異型 (mutant) p53 を有することが判明した。ENU 处理した細胞の経時的観察から、まず最初に単一の変異型 p53 陽性細胞が出現し、それが優性増殖して変異細胞コロニーを作る過程が明らかにされ、変異型 p53 の出現と細胞の形態変化が密接に関連していることが示された。さらに、変異細胞がヌードマウスに可植性を有したことから、それが悪性腫瘍化細胞であることが示された。ヒトグリオーマには前癌病変がなく、その 30~50% に認められる p53 の変異が、癌化因子であるのか、あるいは悪性化因子であるのか、今まで明瞭でなかった。しかし、本研究によりグリオーマにおける p53 の変異は癌化自体の因子であることが示唆された。このように本系は、ヒトグリオーマの発生過程を研究する上で重要なモデルとなり、グリオーマにおける種々の癌関連因子の解析に寄与するものと思われる。このように本研究はグリオーマの腫瘍発生機構の解明に大きな進歩をもたらすものであり、学位に値するものと評価される。