The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

| | |
|---|---|
| Title | シスプラチン(CDDP)のテラトカルシノーマF9細胞における作用機序の解析 : 分化誘導能と細胞死 |
| Author(s) | 土居, 敏英 |
| Citation | 大阪大学, 1996, 博士論文 |
| Version Type | |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/39813 |
| 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

【8】

| | |
|---|---|
| 氏　　名 | 土居敏英（どい としひで） |
| 博士の専攻分野の名称 | 博　士（歯　学） |
| 学位記番号 | 第　12437　号 |
| 学位授与年月日 | 平成8年3月25日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第1項該当<br>歯学研究科歯学臨床系専攻 |
| 学位論文名 | **シスプラチン（CDDP）のテラトカルシノーマF9細胞における作用機序の解析　－分化誘導能と細胞死－** |
| 論文審査委員 | （主査）<br>教　授　作田　正義<br>（副査）<br>教　授　栗栖　浩二郎　　助教授　石田　武　　講　師　岩本　資己 |

## 論文内容の要旨

【研究目的】

頭頸部領域を始め幅広い領域で臨床応用されている抗癌剤であるシスプラチン（Cis－diammine dichloropolatinum（Ⅱ），CDDP）は，中心の白金原子に2つの塩素と2つのアンモニアがシス位に配置した水溶性の化合物で，Chromosomal DNAと結合しCross－linkを作ることによってDNA合成を阻害するといわれている。一方，テラトカルシノーマF9細胞は悪性腫瘍であると同時にマウス初期胚の内部細胞塊（inner cell mass：ICM）に相当するとみなされ，*in vitro*の系においてレチノイン酸により原始内胚葉に分化誘導されるなど，腫瘍細胞の増殖，分化ならびにマウス胚発生を*in vitro*で解析するのに適した実験モデルである。またこのF9細胞は，ある種のDNA合成阻害剤により分化誘導されることが報告されている。従って，本研究ではDNA合成阻害剤の1つであるCDDPによるF9細胞の分化形質の発現に及ぼす影響を検討するとともに，細胞周期や最終的に向かう細胞死との関与について解析した。

【方法と結果】

(1)腫瘍形成能及び細胞増殖能

CDDPで24時間処理したF9細胞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。未処理のF9細胞では100％の腫瘍形成率を示したのに対し，CDDPで処理した細胞では全く腫瘍の形成を認めなかった。

また*in vitro*におけるF9細胞の増殖能に対するCDDPの影響を増殖曲線を用いて調べた。CDDPは濃度依存的に細胞増殖を阻害した。その増殖能はCDDP添加後24時間後を境に消失しており，その効果は不可逆的であった。

(2)分化誘導能

①形態変化

位相差顕微鏡で観察すると，CDDPで処理されたF9細胞は典型的な未分化幹細胞から内胚葉細胞に似た形態に変化した。この変化は迅速に行われ，CDDP添加後16時間で明らかになり，添加後24時間でほとんどの細胞において形態変化が認められた。

②分化形質の発現

CDDPによって誘導されるF9細胞の変化をさらに特徴づけるために，各種分化マーカーを用いてCDDPの分化誘導能を調べた。蛋白レベルでは内胚葉細胞分化への指標であるプラスミノーゲンアクチベーター（PA）の産生を

Agar－overlay assay 法にて調べた。CDDP により濃度依存的，かつ処理後24時間まで経時的に PA の産生の増加を認めた。

また Northern Hybridization を用いて mRNA レベルでの分化マーカーの発現を調べたところ CCDP 処理後24時間まで経時的に，また濃度依存的に laminin B 1，t－PA，c－jun の発現が認められた。

(3)細胞周期に及ぼす影響

フローサイトメトリーを用いて CCDP が細胞周期に与える影響について調べた。CCDP 処理後より G 1 期の細胞が減少しはじめ，処理後24時間で S期の細胞が増加した。さらに処理後36時間で G 2 ／M 期での細胞の集積が認められ，G 2 ／M 期の進行に重要と考えられている $p34^{cdc2}$ は減少していた。

(4)アポトーシスの誘導

アポトーシスの特徴である DNA 断片化をアガロースゲル電気泳動法を用いて検出し，CDDP によるアポトーシス誘導の経時的変化を調べた。CDDP 未処理の未分化 F 9 細胞及び CDDP 24時間処理時の分化形質を発現していた接着細胞では DNA の断片化を示さなかったが，その24時間処理後の接着細胞を続いて CDDP 除去下で72時間培養したものからは DNA の断片化が検出された。また，G 1 チェックポイントに関与すると考えられている癌抑制遺伝子 p53 は mRNA レベルでは大きな変化を示さず，CDDP によって誘導されるアポトーシスには関与していないと考えられた。

(5)未分化，及び分化 F 9 細胞における CDDP に対する感受性の相違

既知の分化誘導剤であるレチノイン酸で処理し分化誘導した F 9 細胞と，同じ時間培養した未処理の未分化な F 9 細胞との CDDP に対する感受性を，CDDP 処理後24時間での細胞の増殖率にて検討した。その結果分化誘導された F 9 細胞は未分化 F 9 細胞に比べ CDDP に対して高い感受性を示した。

【総括】

本研究において F 9 細胞は CDDP により処理後24時間で分化誘導が引き起こされ，その12時間後に細胞周期において G 2 ／M 期への集積を示し，アポトーシスへ向かっていた。また，この CDDP によるアポトーシスへの移行において，分化誘導を起こすことにより細胞の CDDP に対する感受性を高め，より F 9 細胞をアポトーシスへ向かわせていることが示唆された。従って，抗癌剤である CDDP の薬効を単に殺細胞効果のみでなく，分化誘導療法の観点から再評価し，制癌効果の増強を計ることができると考えられる。

## 論文審査の結果の要旨

本研究は制ガン剤の１つである CDDP によるテラトカルシノーマ F 9 細胞の分化形質発現に及ぼす影響を検討するとともに，細胞周期や細胞死との関連について解析したものである。

その結果，CDDP の処理により F 9 細胞は細胞増殖能の阻害ばかりでなく，mRNA レベルおよび蛋白レベルで分化形質の発現が認められ，分化誘導の起こったことを明らかにした。さらに F 9 細胞は細胞周期における $G_2$／M 期への集積を示し，アポトーシスに向かうことを示した。また，この CDDP による F 9 細胞のアポトーシスは分化誘導に基づく CDDP に対する感受性の上昇によることが示唆された。

本研究は CDDP による F 9 細胞の殺細胞機序の解明に新たな知見を加え，さらに制ガン療法の新たな展開に興味ある示唆を与えるものである。

従って，本研究者は博士（歯学）の学位を得る資格があるものと認める。