

Title	キレーターによる胚性腫瘍細胞の分化誘導に関する研究
Author(s)	田中, 徹也
Citation	大阪大学, 1997, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.11501/3128986">https://doi.org/10.11501/3128986</a>
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

Osaka University

氏名	田中徹也
博士の専攻分野の名称	博士(薬学)
学位記番号	第13086号
学位授与年月日	平成9年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 薬学研究科環境生物薬学専攻
学位論文名	キレーターによる胚性腫瘍細胞の分化誘導に関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 田中 慶一  (副査) 教授 那須 正夫 教授 宮本 和久 教授 西原 力

#### 論文内容の要旨

本研究においてF9細胞に分化を誘導する化合物を新たに3種見いだした。一つはトロポロン環を持つヒノキチオールであり、その構造活性相関によりトロポロン環境の $\alpha$ -ケト-ヒドロキシ構造が分化誘導に重要な働きを担っていることが明らかになった。第二の化合物はデフェロキサミンであり、ケトンに隣接する水酸基からなる構造を3つもち、このヘキサデンテート構造が分化誘導に必須であると考えられた。第三の化合物はジチゾンであり、これら3種の共通の化学的性質はキレート能であることからキレーターにF9細胞を分化誘導するものがあることを初めて明らかにした。これら3種のキレーターの分化誘導特性を比較したところ、デフェロキサミンのみが可逆的な分化誘導作用を持つことが明らかになり、お互いに似た化学的特性から分化の引き金を引く作用点は同じだが、最終表現型が異なると推測される。

キレーターによる分化誘導がどのような作用機序によるものかを検討した結果、いずれのキレーターも鉄イオン、特に三価の鉄イオンとの前処理によりその分化誘導活性が阻害された。また、分化誘導にともない増殖抑制がかかり、かつDNA合成が阻害されていることが明らかになった。レーザースキャニングサイトメーター(LSC)による細胞周期解析の結果、キレーターによる分化誘導時にはG1-SインターフェイスからS期での細胞周期の停止が認められ、G2/M期の細胞は激減した。このことからキレーターは生体内のDNA合成系に必須の鉄、もしくは細胞周期のG1/S移行やS期の進行に必須の因子の活性や生合成などに必要な鉄を除去することによりF9細胞の分化を誘導していると考えられる。以上の結果とRRの活性に必要なチロシルラジカルの除去効果をもつヒドロキシウレアもF9細胞の分化誘導活性を示したという本研究で得られた結果、およびデフェロキサミンはRRを阻害して可逆的にS期で細胞周期を停止するという報告から、最も有力なターゲットは、リボヌクレオチドを還元してデオキシリボヌクレオチドに変換しDNAの複製時(S期)の材料を提供する働きをするRRの活性中心にある鉄イオンであると考えられる。また、デフェロキサミンによりヒトTリンパ球を処理するとG1-SからS期で細胞周期が停止し、その時、cdc2やcdk2が減少しており、これらの生合成には鉄が必須であるという報告と今回の細胞周期解析の結果から、これらの因子の生合成に必要な鉄も候補として考えられる。

キレーターによるF9細胞分化誘導時にはアポトーシスも誘導されていることを、DNA断片化率の測定、細胞および核形態の観察、DNAラダーパターン、LSCによるアポトーシス小体の出現など複数の証拠から明らかにした。これまでF9細胞に外的因子でアポトーシスを誘導した例は、レチノイン酸によるものとX線照射によるものしか

かった。また、これまでアポトーシスは分化、発生に重要な役割を果たしているという考え方が大勢を占めていたが、ジチゾンでは分化誘導用量とアポトーシスが顕著に誘導される量とに隔たりがあること、レチノイン酸では分化が誘導される用量ではほとんどアポトーシスが起こらず、高用量で初めてアポトーシスが誘導されること、酪酸ナトリウムでは分化は誘導されるが、アポトーシスは細胞がすべて死んでしまう用量でも誘導されないことなどから、F9細胞の分化誘導とアポトーシスはそれぞれ独立して起こる事象であることが明らかになった。

F9細胞に誘導されるアポトーシスをさらに詳しく検討した結果、F9細胞は多くの細胞でアポトーシスの抑制的制御を担っているBcl-2を分化前後、またアポトーシス前後を通して全く発現していないことが明らかになった。また、キレーターやレチノイン酸処理で誘導されるF9細胞のアポトーシスは、多くの細胞においてアポトーシスの最終段階で重要な働きを担っていると考えられているインターロイキン-1 $\beta$ -変換酵素(ICE)の特異的な不可逆性のペプチドインヒビターであるYVAD処理によって抑えられないこと、ICEは分化前後、アポトーシス前後を通してほとんど発現しておらず、発現量の変化も認められないこと、また、システインプロテアーゼインヒビターであるIAMによってICEファミリーの全てを阻害してもアポトーシスは抑えられなかったことなどから、これまでに知られている経路とは異なる機構で誘導される可能性が示された。今後、抑制因子についてはp35やinhibitor of apoptosis protein (IAP)、促進因子についてはp53やFas-Fas ligand系、最終段階に関与するヌクレアーゼの同定など詳細な検討が行われ、F9細胞のアポトーシスのカスケードの全貌が明らかにされることが期待される。

F9細胞の分化は哺乳類初期胚の分化と非常によく似ているとされ、F9細胞の分化誘導機序が今後さらに明らかにされることは、正常初期発生過程の全貌の解明の一助となるであろう。また、初期胚を形成する細胞の生体外異物に対する応答様式などが明らかにされれば、先天異常の発生機序など毒性学的な面からの意義は大きいと考えられる。さらに近年、癌治療法として増殖抑制をともなった癌細胞の分化誘導療法、アポトーシス誘導療法が注目されている。胎児性の腫瘍細胞という一種の癌細胞であるF9細胞に分化を誘導し、細胞増殖を抑制し、アポトーシスも誘導する化合物は、出生前の癌やそれにともなう新生児癌を含む癌の治療に有効な医薬品開発の一つの方向性を示すものである。

#### 論文審査の結果の要旨

未分化胚性腫瘍F9細胞の増殖を抑制し、分化やアポトーシスを誘導できる化合物を探索することは、がん治療に有効な化合物が見出される可能性があるのみならず、哺乳類の初期発生の機構や初期胚の異物に対する応答機構解明への手がかりを与える。このような観点から本論文では、まず分化誘導活性物質を探索し、ヒノキチオールに強い活性のあることを見出し、その構造活性相関より活性発現にトロポロン環が必須であることを明らかにした。またこれらの構造がキレート作用と関連していると考え検討したところ、種々のキレーターのなかでも特にジチゾンとデフェロキサミンに強いF9細胞分化誘導活性を認めた。これらキレーターによる分化誘導はDNA合成や細胞周期進行に必要な鉄イオンの除去による可能性を示した。さらにキレーターによる分化誘導時にはアポトーシスが誘導されることを明らかにしたが、これは分化誘導には直接的な関係がないこと、および既知のアポトーシス誘導経路を介さないことなどを明らかにした。

以上の成果は種々のキレーターが腫瘍細胞の分化およびアポトーシスを誘導することを示すとともに、新たな医薬品開発の可能性を示すものであり、博士の学位授与に値するものと認める。