



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	https://doi.org/10.11501/3128986
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

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

1997 年

田中 徹也

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

1997年

田中 徹也

目次

緒論	1
本論	3
第1章 F9細胞の分化誘導能を有する新規化合物の探索	3
第1節 天然抽出成分のランダムスクリーニング	3
第2節 コルヒチン関連化合物の分化誘導活性と構造活性相関	6
第3節 小括	8
第2章 キレーターによるF9細胞の分化誘導機序に関する検討	10
第1節 キレーターの分化誘導活性	10
第2節 F9細胞の分化誘導に関する金属の検討	13
第3節 リボスクレオチドリダクターゼ阻害剤の分化誘導能の検討	16
第4節 キレーターにより誘導される分化の可逆性の検討	18
第5節 小括	19
第3章 F9細胞の分化誘導とアポトーシス	21
第1節 分化誘導に伴う細胞増殖の抑制	21
第2節 分化誘導剤の細胞毒性	23
第3節 分化誘導剤によるDNA合成阻害	25
第4節 F9細胞分化誘導時のアポトーシス	26
第5節 分化誘導剤によるアポトーシス誘導の割合	28
第6節 小括	31
第4章 F9細胞のアポトーシスの誘導機序	33
第1節 Bcl-2の関与の検討	34
第2節 インターロイキン-1 β 変換酵素(ICE)の関与の検討	35
第3節 ICE以外のICEファミリーメンバーの関与に関する検討	38
第4節 F9細胞のアポトーシスおよび分化誘導と細胞周期の解析	40
第5節 小括	43
総括	44
結論	46
謝辞	47
参考文献	48

緒論

F9 細胞はマウスの胚性腫瘍細胞で、1973 年 Bernstine らによって 129/SV マウスの 6 日胚を精巣内に移植し、発生したテラトカーシノーマ OTT 6050-970 の幹細胞をクローニングすることによって確立されたフィーダー非依存性の細胞株である¹⁾。F9 細胞は、同じくマウスの胚性腫瘍細胞である P19 細胞とは違い核型は正常型を維持していないものの、初期胚の未分化な状態を維持している。このことは未分化細胞特有な表面抗原である stage specific embryonic antigen-1 (SSEA-1) を発現していることからも確認されている²⁾。この F9 細胞は正常な培養条件下で自然に分化することは非常に少ないが、レチノイン酸によって近位内胚葉細胞へと分化し、プラスミノーゲンアクチベータ (PA) 、ラミニン、タイプ IV コラーゲンなどの分化細胞特有の細胞外マトリクスタンパクを発現するようになることが Strickland らによって報告された^{3,4)}。その後、いくつかの分化誘導活性をもつ化合物が報告され、この中には低分子化合物である酪酸ナトリウム^{5,6)}、抗腫瘍薬^{5,7)}、発ガンプロモーター⁸⁾などが含まれている。初期胚の未分化な性質を維持し、人為的に分化を誘導できることから F9 細胞は哺乳類の初期発生の研究材料として適しており^{9,10)}、F9 細胞の分化機構を解明することにより哺乳類正常初期発生の理解が深まると考えられる。

また、近年注目を集めている癌の治療法として分化脱癌療法がある^{11,12)}。この療法は無限増殖能を持つ悪性の癌細胞を分化誘導剤で処理し、特定の成熟細胞系へと分化させ、増殖能を抑えることにより癌を治療するものである。F9 細胞は短い倍加時間をもつ増殖のみにコミットした未分化な細胞系であるため、この細胞を分化させると同時に増殖性を抑えることができる化合物を探索することで分化脱癌療法に有用な新たな化合物を開発できる可能性がある。既知の抗癌剤やその化合物を修飾したものから分化脱癌療法に使用可能な薬剤を開発することはそれらの有する副作用や毒性の面から問題が多い。そこで天然の植物抽出成分などから F9 細胞の分化および増殖抑制活性を持つ化合物を新たに探索するほうが、毒性の弱い、新規なメカニズムを持つ化合物を見つける可能性が高いと考えられる。さらに、最近アポトーシスに関する研究が進むにつれ、アポトーシス誘導療法という考えも生まれてきた。この方法は癌細胞に特異的にアポトーシスを誘導し、炎症などの副作用なしに癌細胞を殺すことで癌を治療しようとするものである。アポトーシスは正常の発生過程でも起こる現象であり¹³⁻¹⁶⁾、分化・発生との関わりが示唆されているが、これまで癌細胞を化合物で処理してアポトーシスを誘導した報告は多いものの、F9 細胞を用いたアポトーシスの誘導例はほとんど報告されていない。

以上のような理由から、本研究ではまず F9 細胞の分化誘導活性を持つ物質を植物性の天然抽出物などを対象にランダムスクリーニングにより探索し、台湾ヒノキからの抽出成分であるヒノキチオールに強い分化誘導活性を認めた。ヒノキチオールはトロポロン環を持つ化合物であり、その基本骨格をなすトロポロンにも同様に分化誘導

活性が認められ、さらにコルヒチン類縁体も含めたその関連化合物の活性比較から、化合物の持つキレート能が分化誘導に重要な役割を果たしていることを明らかにした。これに関連して、各種キレーターの分化誘導活性を検討した結果、ジチゾンとデフェロキサミンにも強い活性を認めた。これらキレーターによる F9 細胞の分化誘導に関しては、これらの化合物が既知の分化誘導物質とは異なる機序で F9 細胞を分化させるという結果を得た。これらキレーターによる F9 細胞の分化誘導活性は三価の鉄イオンとの前処理により完全に阻害されることから、この分化誘導には鉄イオンが重要な働きを持っていることが明らかになった。また、分化時に起こる細胞増殖の抑制がアポトーシスにもよるものであることを発見したので、分化誘導とアポトーシスの関係についても検討を加え、新しい知見を得た。これらキレーターによる新規な機構による分化誘導および外来化合物に対する未分化細胞のアポトーシス応答に関する知見は、哺乳類の初期発生や毒性発現およびその軽減に関する理解を深めるのみならず、癌細胞の分化誘導療法、アポトーシス誘導療法開発にも役立つと考え、本論文として発表する。

本論

第1章 F9 細胞の分化誘導能を有する新規化合物の探索

F9 細胞は未分化状態を維持したマウスの胚性腫瘍細胞であり、通常の培養条件下ではほとんど分化することなく維持される。しかしながら、培養系にレチノイン酸 (10^{-7} M) を加えると遠位内胚葉系細胞に分化し、レチノイン酸とともにジブチリルサイクリック AMP (10^{-3} M) を添加することにより速やかに遠位内胚葉系細胞へと分化して、PA などの細胞外マトリクスタンパクを生産する^{3,17)}。一方、レチノイン酸のみで処理し、細胞塊を形成させることにより 6-7 日で近位内胚様細胞へと分化し、 α -フェトプロテインを産生するようになる^{4,18,19)}。Kuff と Fewell はレチノイン酸とジブチリルサイクリック AMP の同時処理により神経様細胞が生ずると報告している²⁰⁾が、神経への分化の報告は他にはなく、現在のところ F9 細胞は内胚葉系の細胞のみに分化する細胞系であると認識されている。レチノイン酸により分化することが確認された後、酪酸ナトリウム^{3,6)}、DNA 合成阻害作用をもつ抗癌剤^{5,7)}、発ガンプロモーター⁸⁾などにも分化誘導活性があることが報告されている。

近年、癌細胞を正常細胞に分化誘導し、増殖能を失わせることで癌を治療するという分化脱癌療法が注目されている。このためには、現在用いられている副作用の強い抗癌剤とは異なり、毒性の低い選択的な分化誘導物質を探索することが必要となる。そこで新規な分化誘導活性を有する化合物を天然の物質に求めるため、主として植物抽出物を用いてランダムスクリーニングを行った。

第1節 天然抽出成分のランダムスクリーニング

第1項 材料と方法

化合物

Table 1 に示した化合物のうち、トロポロンは東京化成工業より購入した。5-フルオロウラシル、アスコルビン酸 (L(+)-アスコルビン酸ナトリウム)、ブレオマイシン(塩酸塩) および陽性対照の酪酸ナトリウムは和光純薬工業より購入した。 β -シトリル-L-グルタミン酸は神戸学院大学薬学部三宅正治教授より御供与いただいた。その他の植物抽出成分のすべては摂南大学薬学部稻田昭助教授より御供与いただいた。

細胞

本研究で使用した F9 細胞は大阪大学微生物病研究所の西宗義武教授より御供与いただいた。F9 細胞は継代数の少ないものを液体窒素中に保存しておき約 1 ヶ月の継代を重ねたものは廃棄し、新たに保存細胞を融解して使用した。細胞の維持は 10 cm の細胞培養ディッシュ (岩城硝子または Falcon) を用い、5 mM L-グルタミン (ナカラ

Table 1 Chemicals used for screening

Ajmaline	L-Menthol
Amygdalin	1-p-Methoxycinnamic acid
Androsterone	3,3-Methylene-bis-coumarin
Artemisin	L(-)-Mimosine
Betulinic acid	1,2-Naphthoquinone
Brucine	1,4-Naphthoquinone
Calciferol	2-Hydroxy-1,4-naphthoquinone
D-(+)-Catechin	5-Hydroxy-1,4-naphthoquinone
Cholic acid	Ouabain
Curcumin	Paeoniflorin
Cycloarterenol	Podophyllotoxin
Digitoxigenin	5 β -Pregnane
Diosgenin	Pregnenolone
Ellagic acid	Progesterone
(1s)-Endo-(-)-borneol	Purpurogallin
(-)-Epigallocatechin gallate	Quercetin
Ergosterol	Reserpine
Estradiol	Rutecarpine
Estrone	Salicin
Gallicacid	Scopoletin
Gardenoside	Sennoside A
α -Glucosylrutin	Shikonin
Glycyrrhizin	β -Sitosterol
Gossypol	Strychnine
Gramine	Toosendanin
Harmaline	Tropolone
Hinokitiol	Ursolic acid
α -Ionone	Usnic acid
Kaempferol	Vanillin
Kojic acid	Vincamine
Limonin	Yohimbine
Luteolin	β -citryl-L-glutamic acid
Luteolin-7-glucoside	Bleomycins
Magnolol	5-Fluorouracil
D-Mandelonitrileglucoside	L-(+)-Ascorbic acid

イテスク)、1 mM ピルビン酸ナトリウム(ナカライテスク)および10%ウシ胎児血清(Filtron)を添加したEagle's minimum essential medium(MEM、日本製薬)中、37°C、5%CO₂下で行った。継代は培地除去後、0.2%トリプシン(ナカライテスク)および0.02%エチレンジアミン四酢酸(EDTA、ナカライテスク)を含む20 mM phosphate buffered saline(PBS、pH 7.4)で細胞をディッシュ表面より剥がし、PBSで洗浄した後、細胞をまき直すことで行った。継代は2-3日に1回の割合で行った。

分化誘導活性の測定

F9 細胞の分化誘導活性は、PAの産生を指標としたアガーオーバーレイ法により行った^{21,22)}。この方法は分化したF9 細胞のみが PA を産生することを利用した方法であ

る。まず、F9 細胞を 0.1 % ゼラチンでコートした 35 mm の組織培養用ディッシュ (Nunclon) に 1.2×10^2 細胞/1.5 ml MEM/dish で播種し、3.5 日間培養しコロニーを形成させた。その後各濃度の化合物を含む新鮮な培地と交換し、24 時間培養を続けた。各処理群のディッシュのうち 1 枚は PBS で 4 % に希釈したホルマリンで 3-5 分間固定し、0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 4.5) で 0.05 % に溶解したアミドブラックで約 15 分間染色した後、肉眼的に全コロニー数を計測した。各処理群の残りのディッシュは培養液中のウシ血清に含まれる PA inhibitor を除くため 37 °C に温めた PBS で洗浄した後、細胞層にアガーオーバーレイ溶液 1 ml/dish を重層した。アガーオーバーレイ溶液は 0.75 % アガー (ナカライトスク)、2.5 % スキムミルク (Difco)、0.28 unit/ml のプラスミノーゲン (第一化学薬品) および培養時と同濃度のグルタミン酸およびピルビン酸ナトリウムを含みウシ胎児血清を含まない MEM である。重層後、培養を続けると PA を産生するコロニーは乳白色のアガー層中に透明なブラークを 24 時間後までに形成するため、これを計数した。分化誘導率は全コロニーあたりの PA 産生コロニーの割合をパーセンテージで表すことにより示した。

化合物はそれぞれの溶解性により PBS、milliQ 水、エタノールまたはジメチルスルホオキシド (DMSO) に 10 mg/ml の濃度で溶解した原液を調製し、溶媒最終濃度が 1 % 以下となるように MEM で希釈して使用した。なお、1 % 以下の濃度の溶媒および pH 変化は PA の産生に影響を与えないことは確認済みである。

第 2 項 実験結果および考察

Table 1 に活性をスクリーニングした 70 種の化合物を示した。これらのうちトロポロン環を持つヒノキチオール、トロポロン、抗癌剤であるブレオマイシンおよび茶葉からの抽出成分であるフラボノイドのケルセチンに分化誘導活性を認めた。Fig. 1 に示すようにヒノキチオールは 10 µg/ml (60.9 µM) をピークとした分化誘導活性を示した。20 µg/ml では PA 産生コロニーの割合が減少し、さらに用量をあげると形成コロニー数が減少した。同様にトロポロンでは 1 および 10 µg/ml において陽性対照の酪酸ナトリウムとほぼ同等の分化誘導活性が認められたが 100 µg/ml では細胞毒性が強くコロニー数が減少した。しかしトロポロン環を持つヒノキチオールの誘導体であるヒノキチオールメチルエーテルには 100 µg/ml の濃度においても分化誘導活性は全く認められなかった。一方、ブレオマイシンでは 1 および 10 µg/ml で弱い分化誘導活性が認められ、100 µg/ml では細胞毒性が認められた。また、ケルセチンでは 100 µg/ml で分化誘導活性が認められた。しかし、フラボン骨格を持つ茶葉からの他の抽出成分であるケンフェロールやカテキン類には分化誘導活性は認められなかった。

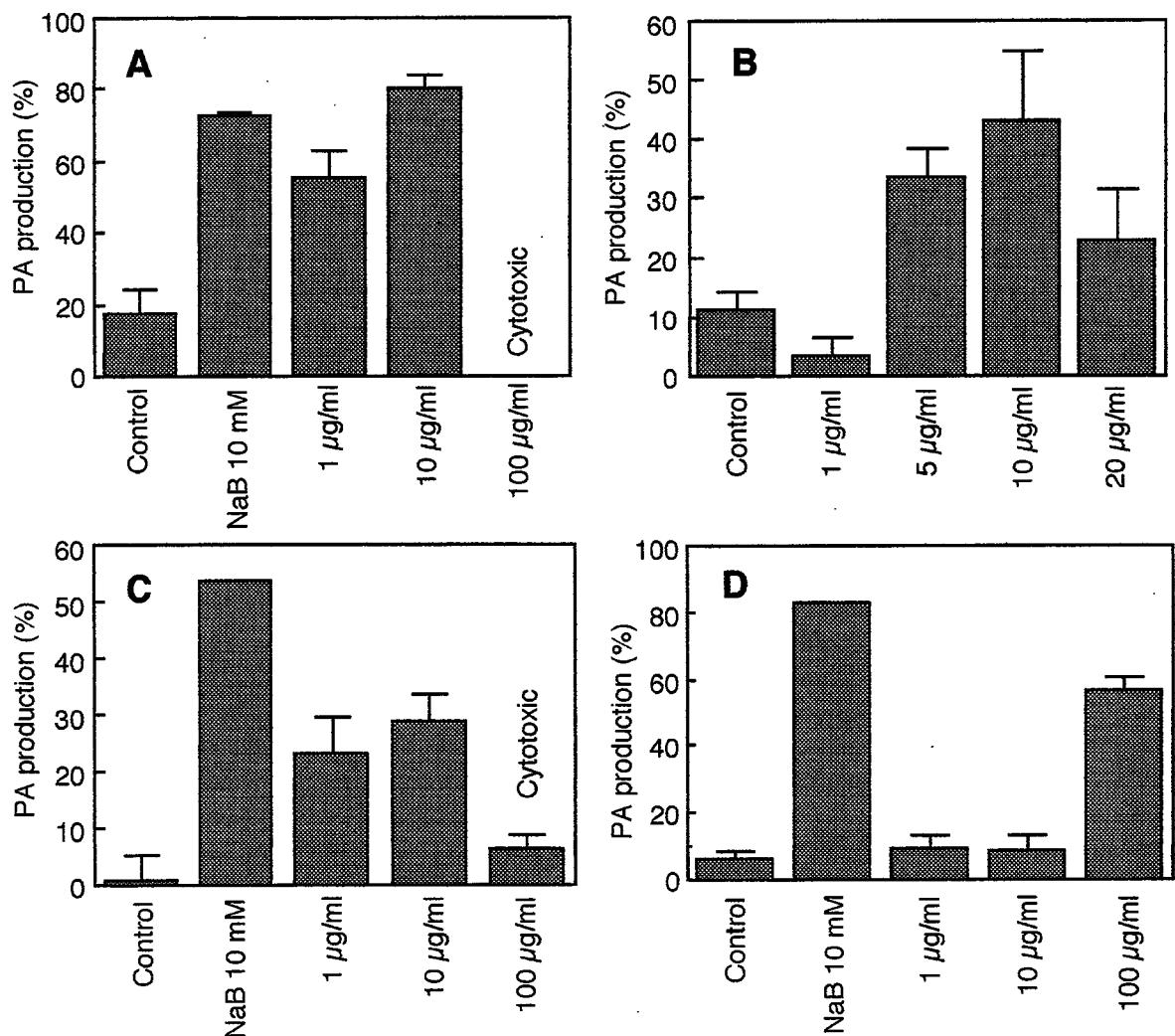


Fig. 1 PA-producing activity of various agents in F9 cells

F9 cells were treated with tropolone (A), hinokitiol (B), bleomycine (C) and quercetin (D) at indicated concentrations for 24 hr. PA production (%) was determined by agar-overlay method. NaB; sodium butyrate. Values are means \pm S.D. of triplicate assays.

第2節 コルヒチン関連化合物の分化誘導活性と構造活性相関

F9 細胞の分化誘導活性の認められたヒノキチオールやトロポロンはいずれもトロポン環からなる分子であるため、トロポン環を分子内に持つコルヒチン類縁体について分化誘導能を検討し、その構造と活性との関連を検討した。

コルヒチンは、*Colchicum autumnale* から抽出されるアルカロイドで、トロポン環を有する化合物である。微小管形成阻害作用を持つことで知られ²³⁾、その作用により細胞周期を M 期で停止させることができるために、染色体研究に応用される他、医薬品としても用いられている²⁴⁻²⁶⁾。このことから、微小管形成阻害作用と F9 細胞の分化誘導作用の関係についても知見を得ることができる。

第1項 材料と方法

化合物

コルヒチンは東京化成工業より、デメコルシン（コルセミド）およびトリメチルコルヒチン酸は Sigma 社より購入した。コルヒセインは摂南大学薬学部稻田昭助教授より御供与いただいた。

分化誘導活性の測定

細胞培養および測定方法は、第1節、第1項に従った。各コルヒチン類縁体の活性比較時は他の化合物のスクリーニングの時と同様に 1、10 および 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で細胞を処理し、陽性対照に同用量のヒノキチオールを用いた。用量活性相関の検討はコルヒセインとトリメチルコルヒチン酸は 1、10、25、50、100 および 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で、コルヒチンとデメコルシンは 1、10 および 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で処理した。

第2項 結果と考察

分化誘導活性はコルヒセインとトリメチルコルヒチン酸にのみ認められ、コルヒチンやデメコルシンには用いた用量範囲で活性は検出されなかった (Fig. 2)。各化合物の用量活性相関は、コルヒセインでは 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (259 μM) をピークとして 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上で分化誘導活性が認められ、一方トリメチルコルヒチン酸では 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$

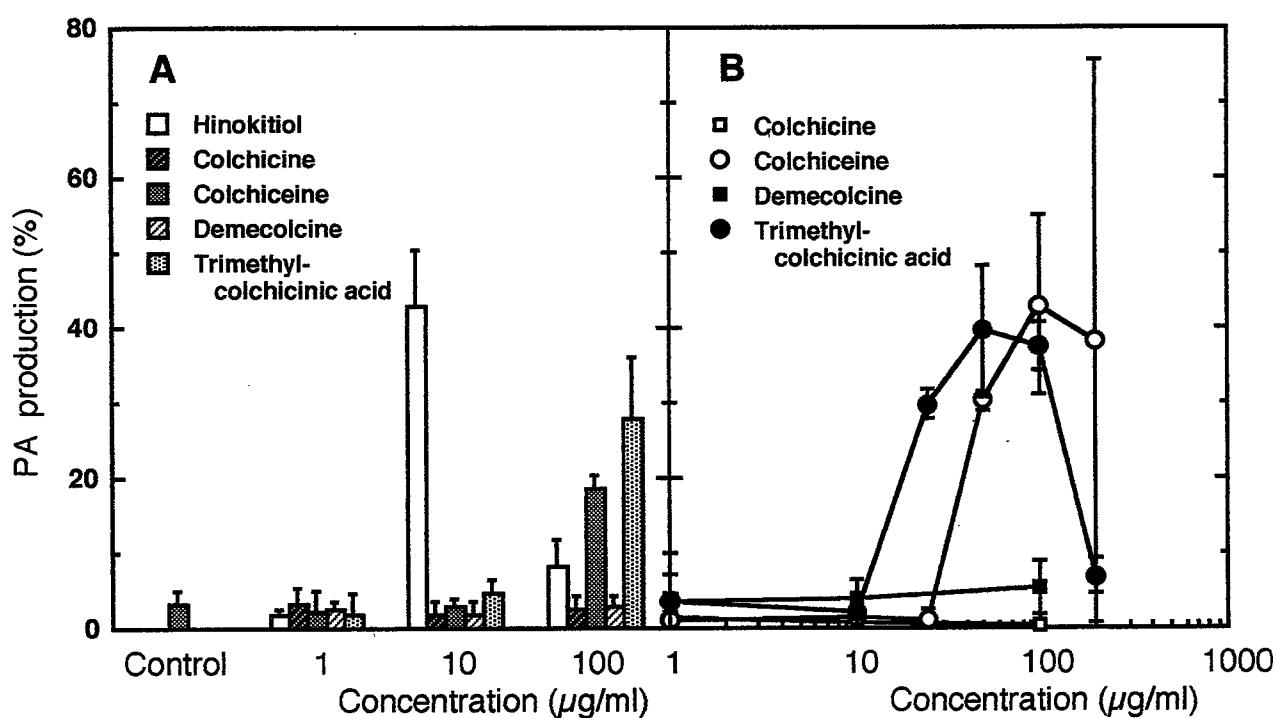


Fig. 2 PA-producing activity of colchicine analogues in F9 cells

A. Comparison of PA-producing activity of colchicine analogues. B. Dose responses of PA-producing activity of colchicine analogues. PA production (%) was determined by agar-overlay method. Values are means \pm S.D. of triplicate assays.

(145.5 μM) をピークとして 25 ~ 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の範囲で活性が認められたが、200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の処理ではコロニー形成阻害は認められずに PA 産生率が減少した。コルヒセインとトリメチルコルヒチン酸の F9 細胞分化誘導活性はヒノキチオールの 1/2 程度であった。

コルヒチンとデメコルシンに分化誘導活性が認められなかったことから、微小管形成阻害作用や細胞周期の M 期での停止は F9 細胞の分化誘導とは関係がないことが明らかになった。

第 3 節 小括

植物からの抽出成分、動物細胞からの抽出成分を中心に、抗癌剤、ビタミンなどの化合物をスクリーニングし、ヒノキチオール、トロポロン、ケルセチン、コルヒセイン、トリメチルコルヒチン酸、ブレオマイシンの 6 種の化合物に F9 細胞の分化誘導活性を認めた。これらのうち、ケルセチンとブレオマイシンを除く 4 化合物には共通してトロポロン環が存在し (Chart 1) 、活性の強さからヒノキチオールやトロポロンは興味のある化合物である。ヒノキチオールは1936 年に野副により、台湾ヒノキから抽出された成分であり、7 員環構造を有する化合物である²⁷⁾。ヒノキチオールにはこれまでにいくつかの生物活性が報告されている。in vitro の系では K562 や HL-60 などの癌細胞に 4-8 μM の低濃度で細胞毒性を示し、抗腫瘍活性を有することが認められているが、癌を誘発させたマウスに対しては抗腫瘍性を示さなかった²⁸⁻³⁰⁾。また、抗菌効果があることも報告され、歯科領域や皮膚科領域では現在応用もされている^{31,32)}。

ヒノキチオールは金属とのキレート作用を持つことが知られていること^{27,33,34)}、環状構造を持つ化合物の α -ヒドロキシケート構造はキレート能と強く関係していること^{35,36)}、ブレオマイシンも金属とのキレート能を持つこと^{37,38)}などから考えると、これらの化合物は金属とのキレート形成能力により F9 細胞を分化させるのではないかと考えられる。しかし、コルヒセインやトリメチルコルヒチン酸にキレート能があるという報告はなく、ケルセチンも α -ヒドロキシケート構造を持っているが、キレート能についての報告はない。また、今回スクリーニングに用いた化合物で分化誘導を示さなかった化合物の中には、トロポロン環を持つフルプロガリンやフラボン骨格に α -ヒドロキシケート構造をもつケンフェロールも含まれているため、 α -ヒドロキシケート構造以外にも分化誘導活性の有無を決定している重要な構造が存在すると考えられる。また、コルヒチンとデメコルシンに分化誘導活性が認められなかったことから、微小管形成阻害や細胞周期の M 期での停止は分化誘導活性と関連がないことが示された。

今回検討を加えたトロpon環を有する化合物で分化誘導活性を示すものは全てトロpon環構造を持つため、その 2 位の水酸基が重要であることが示された。この部分を細胞内で加水分解されやすい置換基に変換することで、これまで in vivo では抗癌活性を示さないとされてきたヒノキチオールに in vivo での活性を持たせることができた。

もしれない。事実、当研究室ではこの位置をアセチル基で修飾したヒノキチオールアセテートに分化誘導活性を認めている。また、腫瘍細胞に特異的に取り込まれる修飾を施すことで、癌細胞の分化誘導療法に応用できるよりよい化合物を開発できる可能性もあると考えられるが、同時にこの化合物のもつ毒性の克服も課題となる。

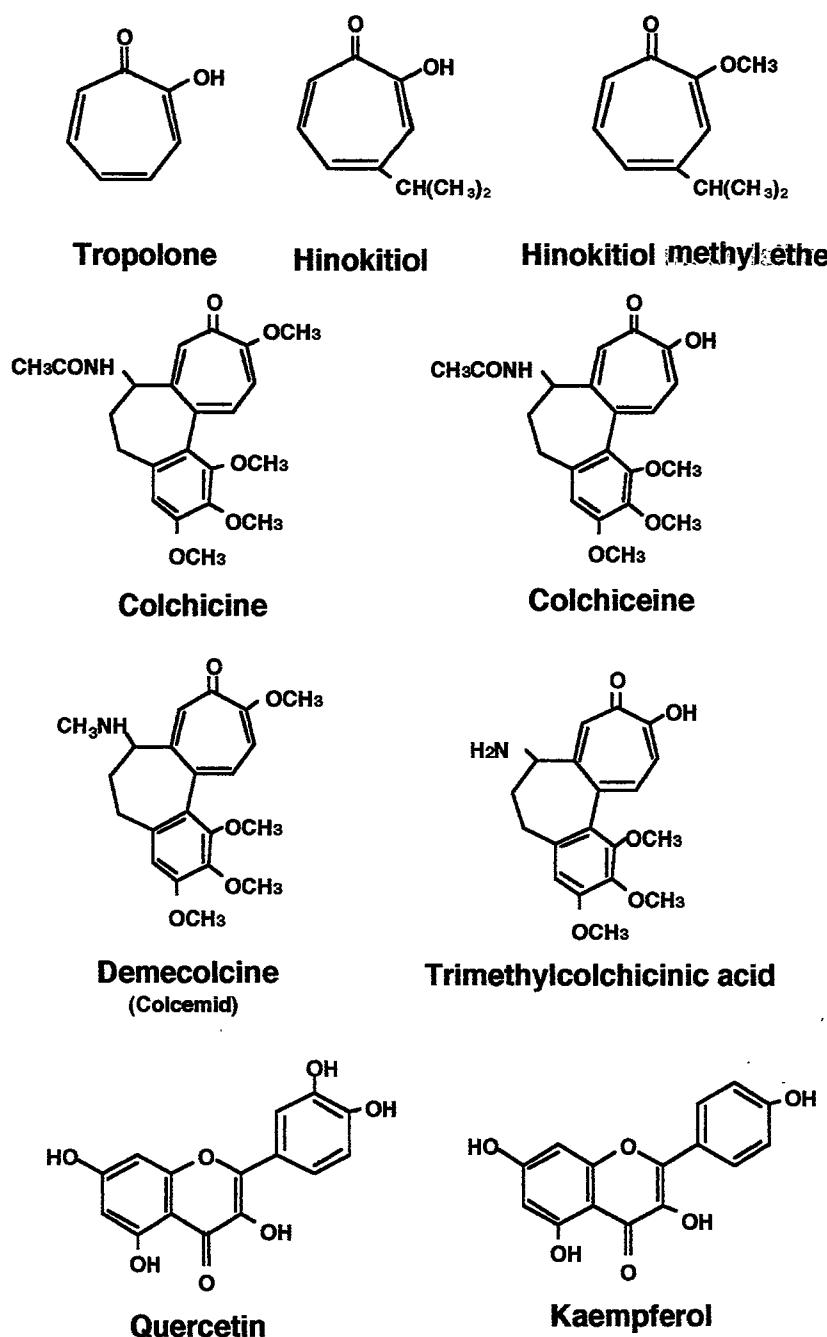


Chart 1 Chemical structures of tropolone, hinokitiol, colchicine analogues and flavonoids

第2章 キレーターによるF9 細胞の分化誘導機序に関する検討

F9 細胞に分化誘導活性を持つ化合物のうち最も研究が進んでいるのはレチノイン酸であり³⁹⁻⁴⁶、さらに分化誘導機序については酪酸ナトリウムについても報告がある^{47,48}。レチノイン酸の場合、細胞内での輸送系が明らかにされており、核内に輸送された後、核内レチノイドレセプター (RAR) を介して転写因子として働き、様々な遺伝子を活性化する^{44-46,49,50}。この遺伝子の活性化作用が F9 細胞の分化誘導に関与していると考えられている。また、酪酸ナトリウムの場合はヒストンの脱アセチル化を阻害し、DNA の複製を止めることにより、細胞増殖を抑えることが分化の引き金となっていると考えられている^{47,48,51}。いずれの化合物処理によっても、分化した F9 細胞では *c-fos* や *c-jun* などの AP-1 を形成する癌遺伝子が高発現していくことが知られている⁵²⁻⁵⁴。しかしながら、これら研究の進んだ化合物に関しても、F9 細胞分化の道筋が解明されているわけではなく、分化に付随して起こる事象を観察しているにすぎない。F9 細胞に分化が誘導される過程は今後さらに多面的に検討されねばならない。

前章においてヒノキチオールを始めとするトロポロン環を持つ化合物がその α -ヒドロキシケート構造により金属とキレートすることにより F9 細胞に分化を誘導するのではないかという可能性を示唆した。脂溶性ビタミンとしてのレチノイン酸や、キレーターとしてのヒノキチオールは同一の経路を介して F9 細胞を分化させているのだろうか。本章ではキレーターによる F9 細胞の分化誘導および分化と金属の関連性を中心に F9 細胞の分化誘導機序に関して検討を加えた。

第1節 キレーターの分化誘導活性

ヒノキチオールなどのトロポロン環を分子内に持つ化合物が、金属とのキレート作用をもとに F9 細胞の分化を誘導しているのならば、他の金属キレーターにも分化誘導活性があると考えられる。そこで α -ヒドロキシケート構造の有無に関わらず広範な金属キレーターについて F9 分化誘導活性を検討した。

第1項 材料と方法

キレーター

検討したキレーターはジエチレントリアミン五酢酸 (DETAPAC)、ニトリロ三酢酸 (NTA)、ジチゾン (以上ナカライトスク)、ジメチルグリオキシム (東京化成工業)、EDTA、パソフェナントロリンジスルホン酸、8-ヒドロキシキノリン-5-スルホン酸、1,2-ジヒドロキシベンゼン-3,5-ジスルホン酸 (Tiron)、2,4,6-トリピリジル-s-トリアジン (TPTZ、以上ナカライトスク)、イミダゾール (Sigma)、3-(2-ピリジル)-5,6-ジフェニル-1,2,4-トリアジン-4,4'-ジスルホン酸 (ナカライトスク)、デフェロキサミン (Sigma) の 12 種である。

分化誘導活性の測定

細胞培養、化合物の溶解、細胞の処理および分化誘導活性の測定方法は第 1 章、第 1 節、第 1 項に従った。

第 2 項 結果および考察

12 種のキレーターの F9 細胞に対する分化誘導能を処理濃度 1、10 および 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で検討した (Table 2)。その結果、ジチゾンとデフェロキサミンに分化誘導活性を認めた。ジチゾンは尿や血清中の金属含量を測定するための試薬として用いられるキレーターであり^{55,56)}、デフェロキサミンはサラセミアや鉄過剰症の治療薬として用いられているキレーターである⁵⁷⁻⁶²⁾。両キレーターの化学構造はいずれもトロポロン類縁体とは異なり、またお互いにも著しく異なっている (Chart 2)。しかしながら、デフェロキサミンは α -ヒドロキシジケト構造によく似たヘキサデンテート構造を有し、この部分を介して金属と 1:1 でキレートすることが知られている⁶³⁻⁶⁵⁾。

Table 2 PA-producing activity of various chelators in F9 cells

Chelator	PA pruduction (%)		
	1 $\mu\text{g}/\text{ml}$	10 $\mu\text{g}/\text{ml}$	100 $\mu\text{g}/\text{ml}$
DETAPAC	14.9	25.7	8.8
NTA	3.8	3.0	2.4
Dithizone	6.4	98.1	_a)
Dimethylglyoxime	2.8	7.1	5.1
EDTA	1.0	1.4	3.1
BPS	1.8	3.0	2.5
8HQ5SA	2.1	2.7	0.5
Tiron	2.5	5.1	4.0
TPTZ	3.1	4.4	2.2
Imidazole	2.7	0.5	2.1
PDT	0.6	0.9	0.9
Deferoxamine	2.1	39.0	88.8

Values are means of triplicate assays. a) : Cytotoxic

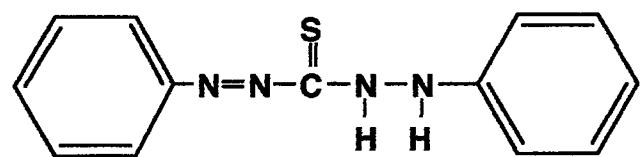
DETAPAC : diethylenetriaminepentaacetic acid, NTA : nitrilotriacetic acid

BPA : bathophenanthrone disulfonic acid, 8HQ5SA : 8-hydroxyquinoline 5-sulfonic acid

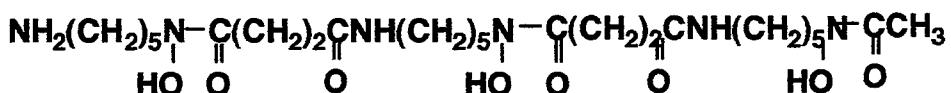
Tiron : 1,2-dihydroxybenzene-3,5-disulfonic acid, TPTZ : 2,4,6-trypyridyl-s-triazine

PDT : 3-(2-pyridyl)-5,6-diphenyl-1,2,4-triazine-4,4'-disulfonic acid

これら 2 種の化合物の F9 細胞に対する分化誘導活性を、用量依存性と時間依存性の面から検討した。Fig. 3 に示すようにジチゾン、デフェロキサミンとともに用量依存性を示し、ジチゾンの分化誘導活性は 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ でほぼプラトーになり、25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で細胞毒性が認められはじめ、50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ では強い細胞毒性のためコロニーがすべて消失したのに対して、デフェロキサミンの分化誘導活性は 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上でプラトーになっ



Dithizone



Deferoxamine

Chart 2 Chemical structures of dithizone and deferoxamine

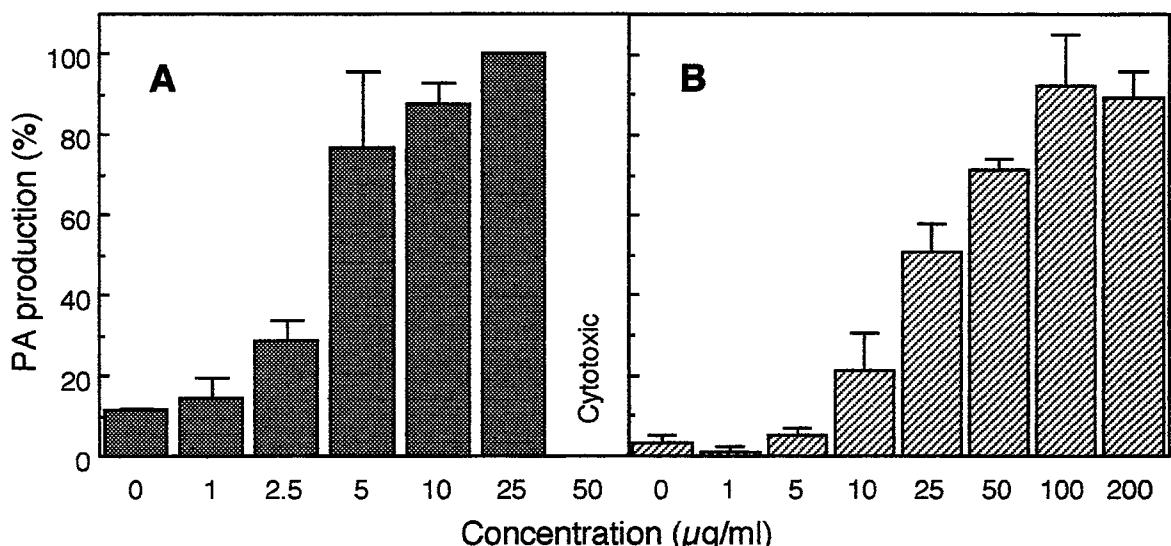


Fig. 3 Dose responses of PA-producing activity of dithizone and deferoxamine in F9 cells

F9 cells were treated with dithizone (A) and deferoxamine (B) at indicated concentrations for 24 hr. PA production (%) was determined by agar-overlay method. Values are means \pm S.D. of triplicate assays.

た。F9 細胞の分化誘導に対する時間依存性は、Fig. 3 の結果から十分な分化誘導活性を示したジチゾンの 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (39 μM) およびデフェロキサミンの 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (152 μM) を用いて 0、4、8、12、16、20、24 時間処理を行い分化誘導活性を測定することで検討した。両キレーターとも処理時間に依存して F9 細胞の分化を誘導した (Fig. 4)。この分化誘導に要する時間はレチノイン酸よりも短かかった^{3,17)}。

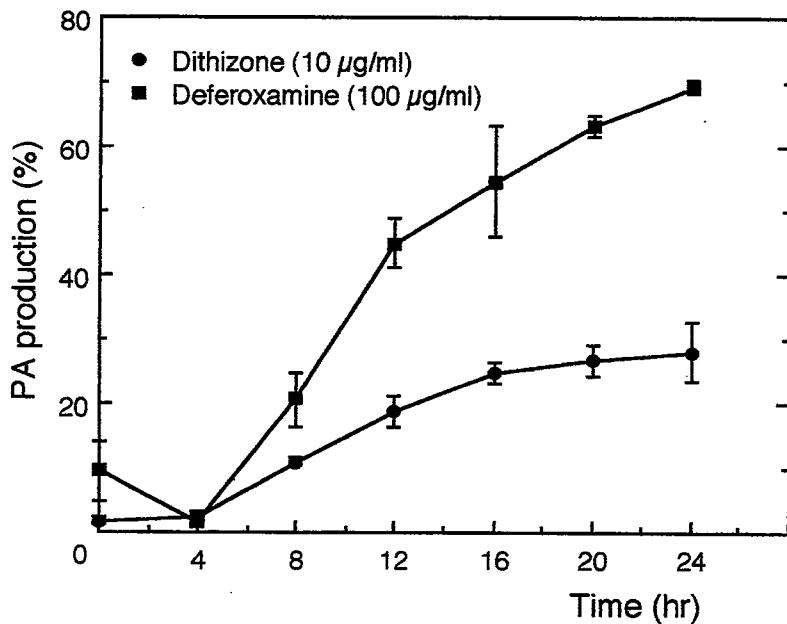


Fig. 4 Time dependency of PA production of F9 cells treated with dithizone and deferoxamine

F9 cells were treated with 10 µg/ml dithizone and 100 µg/ml deferoxamine for indicated time periods. PA production (%) was determined by agar-overlay method. Values are means \pm S.D. of triplicate assays.

第2節 F9細胞の分化誘導に関する金属の検討

F9細胞は各種の金属キレーターにより分化が誘導されることが明らかになったことから、その誘導には細胞内外の金属動態が関与していると考えられる。これまで金属キレーターがF9細胞の分化を誘導するという報告や、分化誘導機序に金属が関与するという報告はない。どのような金属が関与しているかを検討することにより、分化の作用点を知ることができると考え、キレーターによる分化に対する種々の金属イオンの阻害効果を検討した。

第1項 材料と方法

金属イオン

検討した金属イオンは Fe^{3+} 、 Fe^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Cu^+ 、 Zn^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Co^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Mg^{2+} の 11 種であり、すべて塩化物を和光純薬工業およびナカライトスクから購入した。

分化阻害の測定方法

金属イオンの影響はキレーターによる分化誘導（PA 産生誘導）に対する阻害で判定し、PA 産生能の測定方法は第1章、第1節、第1項に従った。金属塩は沈殿を生じないものは PBS で、沈殿を生じるものは milli Q 水で 50 mM の濃度で溶解し、ストック溶液とした。キレーターの処理濃度は F9 細胞に十分な分化を誘導する用量、すなわち、ヒノキチオール、トロポロンおよびジチゾンは 10 µg/ml（それぞれ 60.9 µM、81.9 µM、39.0 µM）、デフェロキサミンは 100 µg/ml（152 µM）とした。キレーターと金属イオンの終濃度がそれぞれ用いる用量となるように MEM 中で希釈、混合し

た後、37 °C、30 分間インキュベートしたものを処理培養液とし、これを用いて細胞コロニーを 24 時間培養した。

第 2 項 結果と考察

まず、ヒノキチオール 10 µg/ml による F9 細胞の分化誘導に対する金属イオンの影響を検討した。11 種の金属イオン 0.5 µM (終濃度) とヒノキチオールを混合した培養液で処理した後の PA 産生率をヒノキチオール単独で処理した場合と比較した結果、三価および二価の鉄イオンによってのみ、その分化誘導活性が有意に阻害された (Table 3)。他の金属イオンでの前処理では PA 産生率は変化しなかった。ヒノキチオールによる F9 細胞の分化誘導に対する鉄イオンの阻害作用をさらに詳細に検討するため、鉄イオンの用量依存性を検討した (Fig. 5)。先の実験で分化誘導阻害活性を示さなかったマンガンイオンは 50 µMまでの用量においてもヒノキチオールによる分化誘導活性を全く阻害しなかったのに対し、二価および三価の鉄イオンは用量依存的にその活性を阻害した。この時、阻害効果は三価の鉄イオンの方が強かった。ヒノキチオールは三価および二価の鉄イオン、銅イオン、亜鉛イオンなどともキレートすることが知られているが^{27,33,34)}、鉄イオンとの前処理でのみ分化誘導活性が阻害されたことから、鉄とのキレート能が分化に重要な役割を果たしていることが推測された。

他の分化誘導活性を示すキレーターもその作用発現に鉄とのキレート形成が重要であるか否かを検討するため、ヒノキチオールを処理したのと同じ用量の三価の鉄イオンによる分化誘導阻害効果を調べた。トロポロン、ジチゾンとともに三価の鉄イオンに

Table 3 Inhibition by metal ions of hinokitiol-induced differentiation of F9 cells

Metal ion	PA production (%)	
	Control	Preincubation
Fe ³⁺	47.0 ± 4.1	13.3 ± 4.3**
Fe ²⁺	53.4 ± 5.1	37.0 ± 1.8*
Cu ²⁺	46.4 ± 10.8	53.9 ± 9.6
Cu ⁺	63.5 ± 11.4	49.8 ± 4.3
Zn ²⁺	60.7 ± 2.8	56.2 ± 9.4
Mn ²⁺	49.4 ± 1.7	54.6 ± 4.4
Co ²⁺	69.8 ± 13.9	80.0 ± 8.6
Ni ²⁺	60.3 ± 8.7	54.7 ± 4.0
Pb ²⁺	60.3 ± 8.7	43.0 ± 8.4
Cd ²⁺	43.2 ± 2.3	45.2 ± 5.0
Mg ²⁺	58.6 ± 10.1	88.0 ± 22.7

Cells were treated with 10 µg/ml hinokitiol preincubated with 0.5 µM of metal ions and PA production (%) was determined by agar-overlay method. Values are means ± S.D. of triplicate assays. Significantly different from control group, * p < 0.05, ** p < 0.01.

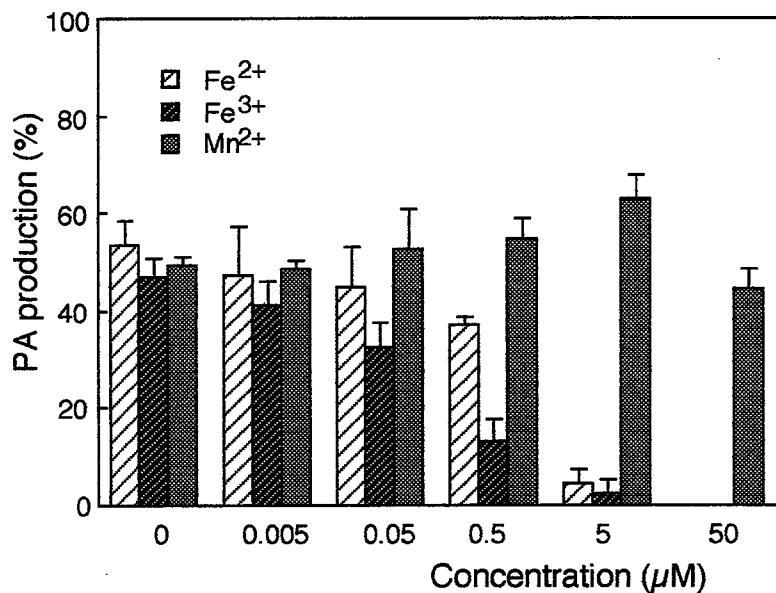


Fig. 5 Dose-dependent inhibition by metal ions of hinokitiol-induced differentiation of F9 cells

Cells were treated with 10 µg/ml hinokitiol preincubated with various concentrations of metal ions. Cytotoxicity was detected at 50 µM of Fe³⁺ and Fe²⁺, and at 5 µM of Fe³⁺. Values are means±S.D. of triplicate assays.

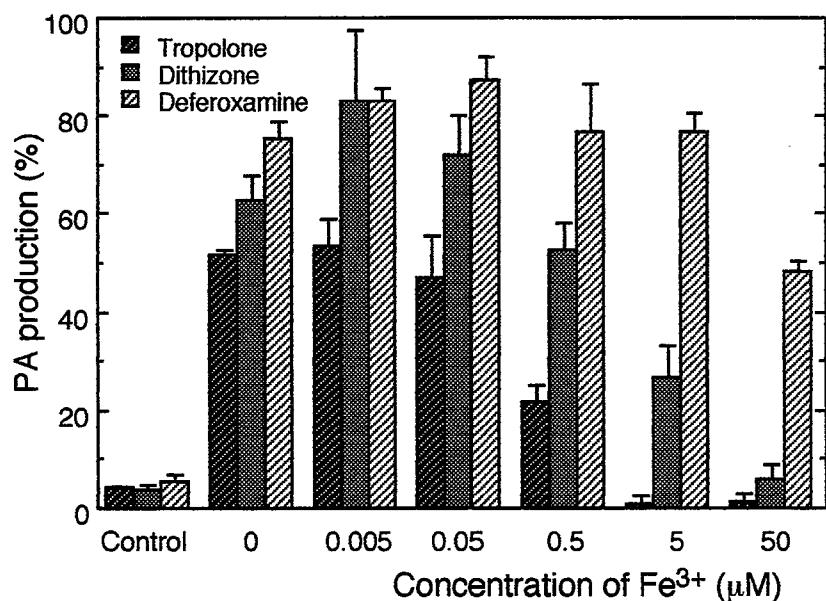


Fig. 6 Inhibition by Fe³⁺ ion of chelator-induced differentiation of F9 cells

Cells were treated with 10 µg/ml tropolone, 10 µg/ml dithizone or 100 µg/ml deferoxamine preincubated with various concentrations of Fe³⁺. Values are means±S.D. of triplicate assays.

より用量依存的にその活性が阻害された (Fig. 6)。デフェロキサミンは分化誘導処理に用いた処理濃度が高いため 50 µM までの鉄イオン濃度では顕著な阻害が認められなかったが、鉄イオン濃度を 100 µM まであげることにより、他のキレーターと同様に用量依存的に分化誘導活性が阻害された (Fig. 7)。以上の結果からキレーターによる分化誘導作用は、細胞内で重要な働きをしている三価の鉄イオンとキレートを形成することに起因していると考えられる。

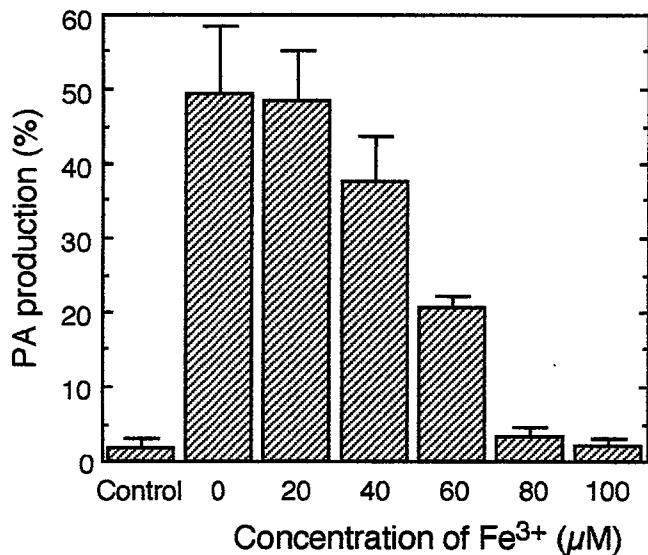


Fig. 7 Inhibition by Fe^{3+} ion of deferoxamine-induced differentiation of F9 cells

Cells were treated with 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ deferoxamine preincubated with various concentrations of Fe^{3+} . Values are means \pm S.D. of triplicate assays.

第3節 リボヌクレオチドリダクターゼ阻害剤の分化誘導能の検討

鉄は生命体にとって欠くことのできない金属であるが、遊離の形で生体内に存在することはほとんどなく、多くはタンパク質と結合した形で存在している。鉄を含有するタンパク質は生体内に 20 数種知られているが、そのほとんどは貯蔵タンパクであるフェリチン、もしくは輸送タンパクであるトランスフェリンと結合した形で存在している^{58,59)}。しかしながらデフェロキサミンには DNA 合成阻害能が報告されているため⁶⁶⁻⁶⁹⁾、DNA 合成に関する鉄含有タンパク質がヒノキチオールなどのキレーターによる F9 細胞の分化誘導に関与していることが予想される。DNA 合成系に関する鉄含有タンパクとしては、リボヌクレオチドリダクターゼ (RR) が知られており、過去にヒノキチオールにより RR が阻害されることが間接的な方法により示唆されている²⁹⁾。

RR はリボヌクレオチドをデオキシリボヌクレオチドに還元する反応を触媒し⁷⁰⁻⁷³⁾、Chart 3 に示すような構造をもつと考えられている。R1 および R2 サブユニット 2 つずつからなる 4 量体タンパク質であり⁷⁴⁻⁷⁶⁾、R1 サブユニットにはその活性を促進する ATP および活性を抑制する dATP、dTTP、dGTP 結合部位をもち、R2 サブユニットは酵素の活性中心にチロシルラジカルと三価の鉄イオンを結合している。このチロシルラジカルまたは三価の鉄イオンが除かれると不活性化される。キレーターはこの活性中心にある三価の鉄イオンを除去する働きにより DNA 合成を阻害し、このことが引き金となって分化の引き金が引かれることが予想される。R1 サブユニットと R2 サブユニットはマグネシウムにより結合しているが、本章の第 2 節で示したとおり、ヒノキチオールをマグネシウムと前処理しても分化誘導活性は阻害されなかったことから、このマグネシウムはヒノキチオールによる分化誘導には関与しないと思われる。

RR は鉄イオンと同様に、チロシルラジカルが除かれた場合にも活性が阻害されるため、既知のチロシルラジカル除去効果を持つ化合物により F9 細胞の分化が誘導されるか否かを検討した。

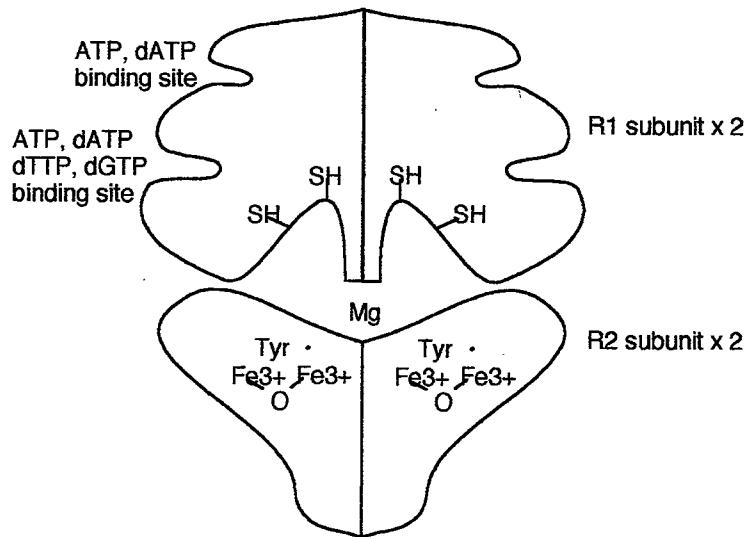


Chart 3 Hypothetic structure of ribonucleotide reductase
(Modified from ref. 76)

第1項 材料と方法

化合物

グアナゾール、ヒドロキシルアミン-Oスルホン酸、ヒドロキシウレアは Sigma 社から購入した。

分化誘導活性の測定方法

第1章、第1節、第1項に従った。

第2項 結果と考察

in vitro で RR のチロシルラジカルを除去することが報告されている⁷⁷⁻⁸⁰⁾ 4 つの化合物の F9 細胞に対する分化誘導活性を検討した結果、ヒドロキシウレアにのみ活性を認めた (Fig. 8)。本章、第1節で検討を行ったキレーターの中で 8-ヒドロキシキ

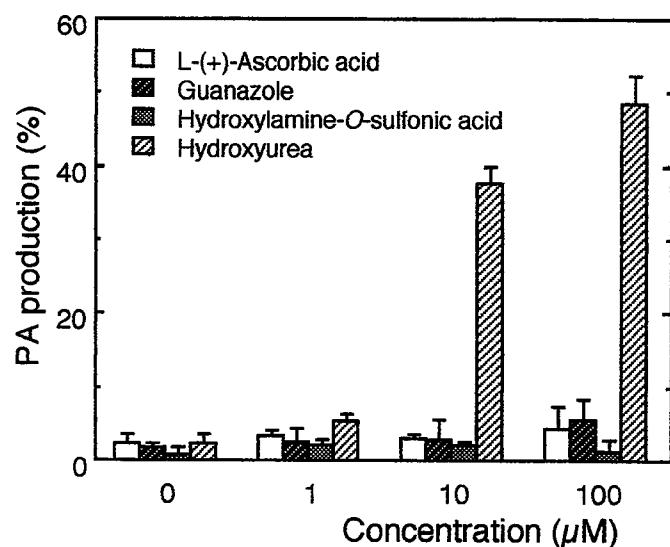


Fig. 8 Induction of F9 cell differentiation by tyrosyl radical scavengers

F9 cells were treated with various scavengers for 24 hr. PA production (%) was determined by agar-overlay method. Values are means \pm S.D. of triplicate assays.

ノリンは *in vitro* で RR の鉄イオンを除去することが知られているが、F9 細胞の分化誘導活性はなかった。従って、*in vitro* で RR の活性を阻害できても、細胞系での阻害能力は細胞内移行性や酵素へのアクセシビリティーなどによっても影響を受けるため、更なる検討が必要である。しかしながら RR の活性中心の別の部分に作用する化合物が、F9 細胞の分化という同じ作用を持つことから考えて、ヒノキチオールなどのキレーターは RR の阻害を介して分化の引き金を引いている可能性は残される。

第 4 節 キレーターにより誘導される分化の可逆性の検討

過去の F9 細胞の分化誘導活性に関する報告の中で、分化誘導後に培養液から化合物を除去すると、脱分化し、未分化状態の細胞に戻るという実験結果が酪酸ナトリウムで報告されている^{47,48)}。一方、レチノイン酸ではこの様な脱分化という現象は起こらない^{81,82)}。本論文で新たに見いだされたヒノキチオール、ジチゾンおよびデフェロキサミンなどのキレーターによる F9 細胞の分化誘導の可逆性があるか否かについて検討を行った。

第 1 項 材料と方法

細胞の処理と分化誘導の測定方法

細胞の処理は、第 1 章、第 1 節、第 1 項で示した方法に準じて以下のように行った。処理濃度はヒノキチオールおよびジチゾンが 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、デフェロキサミンが 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ とし、細胞を 24 時間処理した。化合物を含む培養液を吸引により除き、MEM で 2 回洗浄した後、化合物を含まない MEM 中で一定時間さらに培養を続けた。その後、アガーオーバーレイ法により、分化している細胞コロニーの割合を測定した。

第 2 項 結果と考察

ヒノキチオールとジチゾンでは培養液を化合物を含まないと交換して培養した後でも分化率は減少しなかったが、デフェロキサミンで処理した細胞は化合物を除去してからの培養時間に依存して PA 産生コロニーの割合が減少した (Fig. 9)。酪酸ナトリウムは、これまで報告された F9 細胞分化誘導剤のうち唯一その誘導現象が可逆的であると報告されている化合物であり、脱分化は 4 時間後にはほぼ完了し、8 および 12 時間後の分化率は未処理の未分化細胞と同じく低率である^{47,48)}。これに対し、デフェロキサミンの分化率が対照群と同じレベルに戻るには 18-24 時間が必要であった。酪酸ナトリウムでは、脱分化後の細胞形態は未分化な状態に戻り、細胞増殖能も回復すると言われている。今回のデフェロキサミンでは、顕微鏡観察による限り、そのような様子は認められなかったため、脱分化というよりは単に PA 産生能を失っただけの可能性も考えられる。

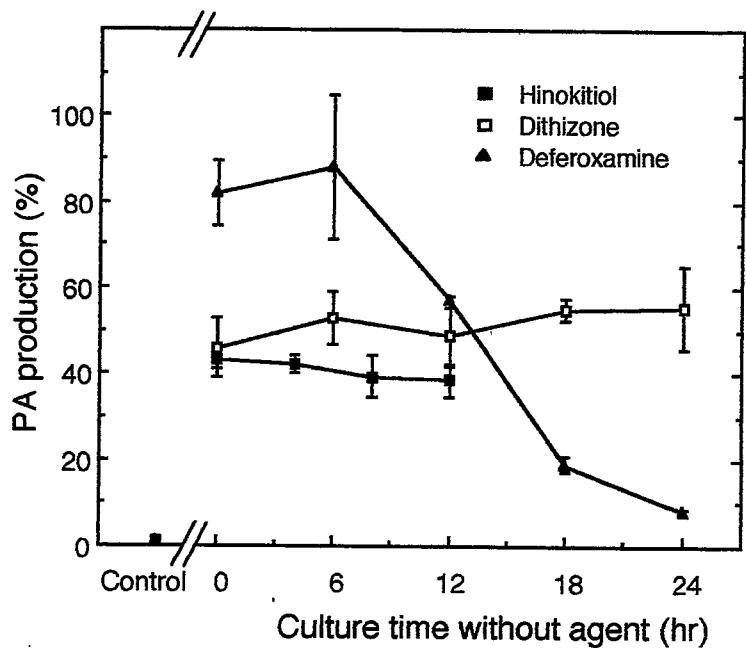


Fig. 9 Reversibility of differentiation induced by hinokitiol, dithizone and deferoxamine

F9 cells were incubated with 10 µg/ml hinokitiol, 10 µg/ml dithizone or 100 µg/ml deferoxamine for 24 hr. After washing, the cells were incubated without agents for indicated times. PA production(%) was determined by agar-overlay method. Values are means±S.D. of triplicate assays.

第5節 小括

ヒノキチオールやトロポロンのみならず金属キレーターであるジチゾンとデフェロキサミンにも F9 細胞分化誘導活性を認めた。また、この分化誘導活性は三価の鉄イオンとの前処理により用量依存的に阻害されることから、三価の鉄イオンとのキレート能が分化に重要な役割を果たしていると考えられる。事実、デフェロキサミンは非常に強い三価の鉄イオンとのキレート能を持ち、安定したキレート体を形成することが知られている^{35,58,59)}。一方、ジチゾンは三価の鉄よりも鉛などの他の金属とのキレート能が強いとされる。また、すべての鉄キレーターが F9 細胞の分化誘導活性を示すわけではないことから、細胞内への移行性を含めた他の要因も関与していると考えられる。

本章の実験からキレーターによる F9 細胞の分化誘導の作用点は、ラジカル産生に関与している鉄ではなく、RR の活性中心に存在している三価の鉄イオンである可能性が高い。デフェロキサミンは RR の活性を阻害することにより細胞周期を S 期で可逆的に阻害することが知られており^{66,83-87)}、細胞周期との関連も検討する必要がある（細胞周期については第 3 章に記述する）。デフェロキサミンは、その強い鉄イオンとのキレート形成能により、サラセミアなどにより生じる鉄過剰症の治療薬として、すでに臨床応用されているとともに^{57,62)}、細胞周期の S 期のプロッカーであるという特性を利用し、細胞増殖抑制による神経芽腫の治療薬としての応用も考えられている⁶⁵⁾。また、デフェロキサミンはヒトの骨髄腫細胞である HL-60 細胞を分化させるという報

告もある⁸⁸⁾。しかしながら、今回分化誘導活性を認めたヒノキチオール、ジチゾンおよびデフェロキサミンの中で、デフェロキサミンによる分化のみが可逆的な様相を示したことから、分化の引き金となる作用点は同一でも、最終的な分化の表現型は異なる可能性が考えられる。

第3章 F9細胞の分化誘導とアポトーシス

現在、細胞の死は異なる二つの経路で起こることがわかっている。一つはネクローシス（壊死）であり、もう一つはアポトーシスである。二つの細胞死の最も大きな違いは、前者が受動的な死であるのに対し、後者は遺伝子に制御された能動的な死であるという点である⁸⁹⁻⁹¹⁾。ネクローシスでは細胞膜は変性し、細胞は膨潤し、核やミトコンドリアなどの細胞内小器官が破壊され最終的に内容物を周囲の環境に放出して死に至る。そのため、ネクローシスは炎症を伴う。一方、アポトーシスでは細胞は圧縮された形に変形し、原形質突出が起こり、DNAはヌクレオソーム単位に切断されるとともに、細胞自体が断片化しアポトーシス小体を形成して死に至る。この時、細胞内小器官は破壊されておらず、炎症を伴わない⁹²⁻⁹⁴⁾。

アポトーシスは正常な生命体内で起こっており、分化・発生時に起こるアポトーシスとしては肢芽形成に伴うもの、神経系の発達に伴うものなどがよく知られている¹³⁻¹⁶⁾。また、先にも述べたがアポトーシスは遺伝子に制御された死であり、最近の研究成果の蓄積から、アポトーシスを促進する遺伝子や、抑制する遺伝子を含め、そのカスケードが明らかにされつつある⁹⁵⁾。また、生体外物質により誘導されるアポトーシスの研究が進むにつれ、癌細胞にアポトーシスを起こさせることが治療につながるのではないかという、アポトーシス誘導療法という考えが注目されてきている。

前章までに、キレーターがF9細胞の分化を誘導することを示したが、この時アポトーシスを伴っていれば、分化・発生時に起こるアポトーシスの役割を解明したり、分化・発生時のアポトーシスの誘導機序を解析することができると考えられる。また、キレーターが癌細胞の分化誘導療法のための候補化合物のみならず、アポトーシス誘導療法への潜在能力も兼ね備えた化合物であることを示すこともできる。

そこで、まずF9細胞の分化誘導時にアポトーシスは起こっているのかどうかを検討し、続いて分化誘導とアポトーシス誘導の関連性について検討した。

第1節 分化誘導に伴う細胞増殖の抑制

癌細胞の分化誘導療法は、分化を誘導するとともに細胞増殖を抑制するという概念に基づいている。そこで、キレーターによるF9細胞の分化誘導時に細胞死や細胞増殖の抑制が起こっているか否かを検討した。

第1項 材料と方法

細胞の処理および化合物

レチノイン酸(all-trans)はSigmaより購入し、その他の化合物は前述のものを用いた。細胞はレチノイン酸1μM、酪酸ナトリウム10mM、ヒノキチオールおよびジチゾン10μg/ml、デフェロキサミン100μg/mlの分化を誘導する濃度を用いてレチ

ノイン酸は 48 時間、その他の化合物は 24 時間処理した。

分化細胞の形態観察

各種分化誘導剤で処理した F9 細胞の形態は倒立顕微鏡によりその分化像を観察した。

細胞増殖に与える影響の検討

F9 細胞を $1 \times 10^5 / 4 \text{ ml MEM}$ の密度で 6 cm dish (岩城硝子) に播種し 48 時間培養後に、化合物を含む培養液に交換（対照群は培養液を交換）し、レチノイン酸と対照群は 48 時間、その他は 24 時間培養した。培養期間中の適当な時間に、浮遊した死細胞を含む培養液を除去し、接着細胞をトリプシン-EDTA で脱着し、適当量の PBS で再懸濁して、細胞計数板を用いて細胞数を計測した。

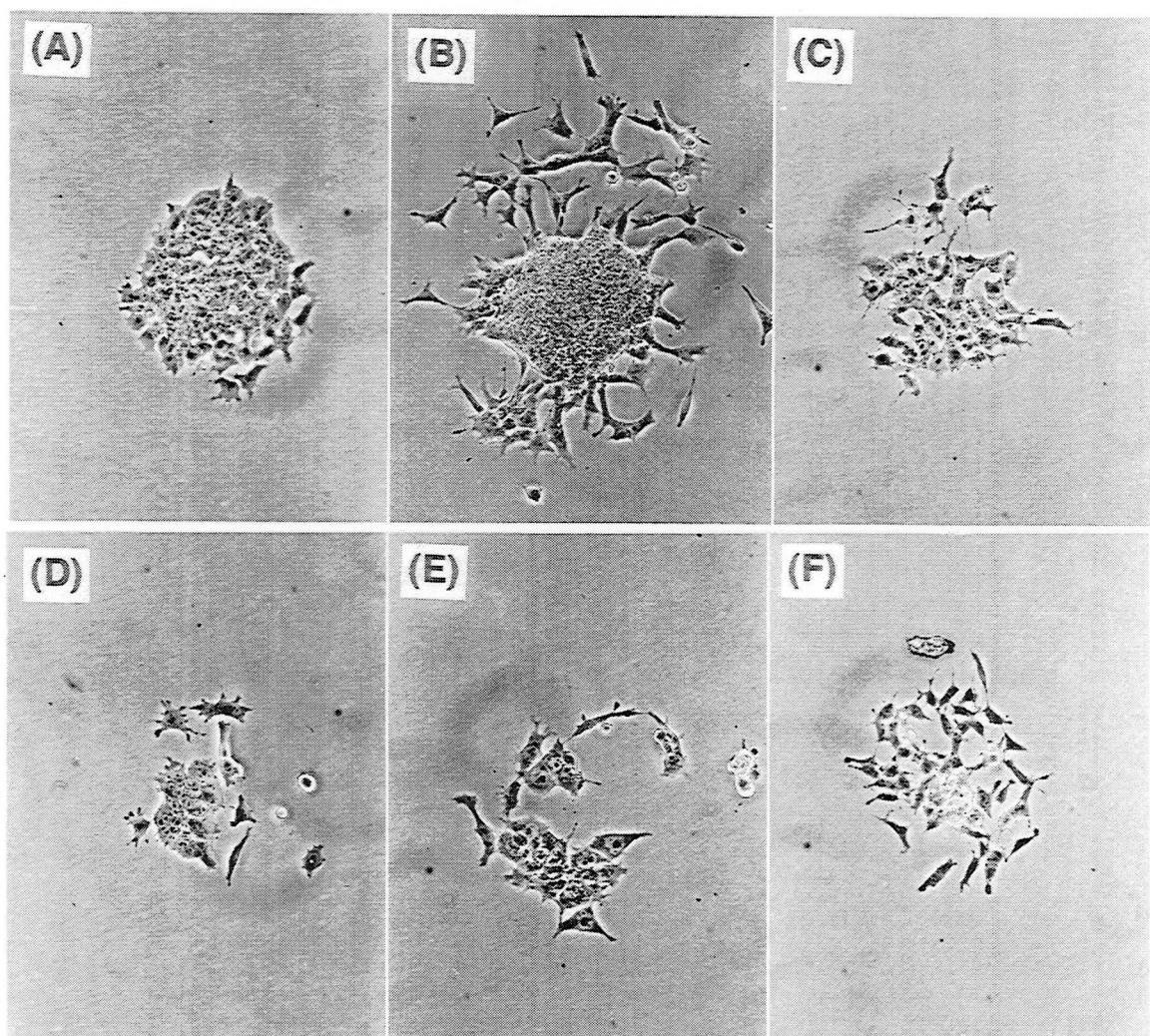


Fig. 10 Morphological features of F9 cells treated with differentiation-inducing agents

Colonized F9 cells were treated with $1 \mu\text{M}$ retinoic acid (B) for 48 hr or $10 \mu\text{g/ml}$ hinokitiol (C), $10 \mu\text{g/ml}$ dithizone (D), $100 \mu\text{g/ml}$ deferoxamine (E) or 10 mM sodium butyrate (F) for 24 hr. (A) is control F9 colony.

第2項 結果と考察

F9 細胞は内胚葉系の細胞へと分化することにより多角形に形態を変化させることができられている²⁻⁸⁾。今回、キレーターおよび酪酸ナトリウムで分化を誘導した細胞は、ほとんどすべての細胞が、分化に特徴的な多角形の細胞へと変化した (Fig. 10)。この時、対照群の細胞と比較して明らかに、コロニー内部の細胞が脱落し、コロニーあたりの細胞数が減少していた (Fig. 10 C-F)。一方、レチノイン酸で分化を誘導した細胞は、コロニーの辺縁部の細胞のみが多角形に変化し、コロニーあたりの細胞数はほとんど変化していないように見えた (Fig. 10 B)。

次に、化合物処理の増殖に与える影響を細胞を計数することにより定量的に検討した。処理前の細胞は播種後 48 時間で約 9.4 倍に増殖した (倍化時間は 14.8 時間)。このことは F9 細胞の増殖は早く、2 日で 8-10 倍に増殖するという報告と一致しており^{9,6,97)}、細胞が正常な増殖能を有していることを示している。この細胞をヒノキチオール、ジチゾンおよびデフェロキサミンのそれぞれの分化誘導濃度で処理すると細胞増殖は著しく阻害された (Fig. 11)。また、酪酸ナトリウム処理によってもキレーターによる処理よりは弱いものの増殖は阻害されたが、レチノイン酸処理では Fig. 10 B から予想されるとおり、処理後 24 時間までは増殖阻害はかかりず、処理 36 時間で細胞数は対照群を下回ったものの増殖は続いていた。このことはレチノイン酸とキレーターによる F9 細胞の分化の機序が異なることを反映していると考えられる。

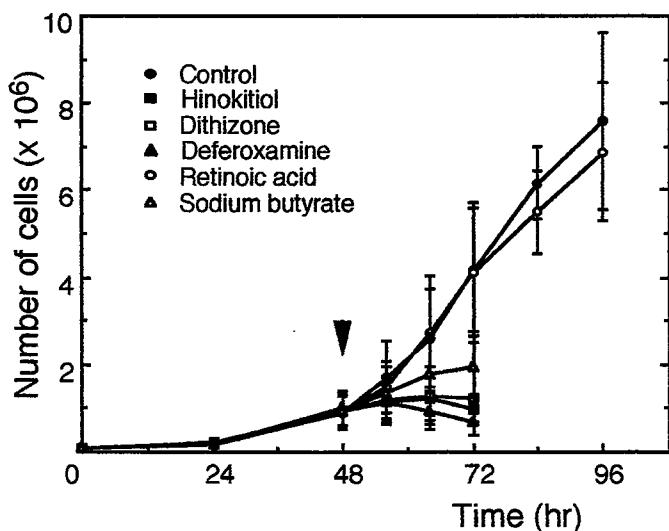


Fig. 11 Proliferation curves of F9 cells cultured with differentiation-inducing agents

F9 cells (1×10^5) were seeded and cultured for 48 hr. Then, the medium was exchanged to fresh one containing each agent. Cell number was counted using a hematocytometer at the indicated times. An arrowhead indicates the time of addition of agents. Values are means \pm S.D. of triplicate assays.

第2節 分化誘導剤の細胞毒性

前節でキレーターによる分化誘導に伴い細胞増殖が抑制されることを示したが、これが化合物の細胞毒性によるものか否かを検討した。

第1項 材料と方法

細胞毒性の測定

細胞障害による細胞数の変化を MTT 法⁹⁸⁾を用いて測定した。すなわち、3-(4,5-dimethylthioazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT、同仁化学) を 5 mg/ml の濃度で PBS に溶解したものを MTT 試薬とした。F9 細胞を 96 穴マイクロカルチャープレート (岩城硝子) に 2×10^4 cells/100 µl MEM/well の密度で播種し (1 用量につき 3 well ずつ)、24 時間培養後、培地を化合物を含む 100 µl の MEM に交換した。24 時間の処理後 MTT 試薬 10 µl/well を加え、さらに 4 時間培養した。培地を除去し、塩酸酸性イソプロピルアルコール 100 µl/well を加え、生細胞中で生成した MTT formazan を室温、暗中で一晩抽出後、595 nm の吸光度をマイクロプレートリーダー (BioRad、モデル 450) で測定した。F9 細胞の細胞数と吸光度の関係は別に検定し、相関関係が成り立つことを確認した。細胞毒性は細胞の生存率より評価し、化合物を含まない条件で同時に培養した細胞数に対する割合を算出した。

処理に用いた化合物濃度は、ヒノキチオールおよびジチゾンは 10 µg/ml (それぞれ 60.9 および 39.0 µM)、デフェロキサミンは 100 µg/ml (152 µM)、レチノイン酸は 1 µM、酪酸ナトリウムは 10 mM の分化誘導に用いる濃度を中心とする数用量を設定した。

第2項 結果と考察

分化誘導剤の細胞障害性の用量相関は Fig. 12 に示すようになった。分化誘導用量における細胞の生存率は 3 種のキレーターでは対照群の 20 % 以下にまで低下した。酪酸ナトリウムでも分化誘導用量においては生存率の低下が認められたが、レチノイン酸の分化誘導用量での生存率はほぼ 100 % であった。この結果は第 1 節で得られた増殖曲線の結果とよく相關していた。

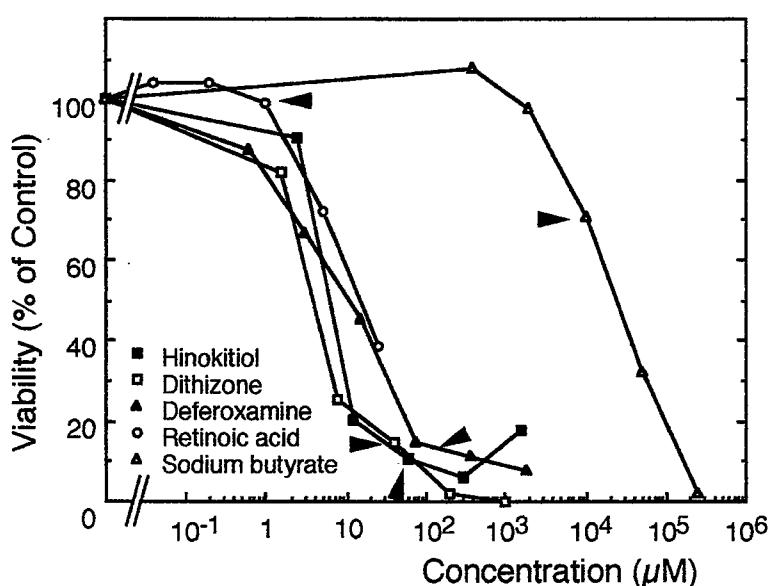


Fig. 12 Effects of differentiation-inducing agents on viability of F9 cells

F9 cells were cultured in 96-well plates for 24 hr. Then, the medium was exchanged to fresh one containing various concentrations of each agent and cultured for further 24 hr. Cell viability was determined by the MTT method. Arrowheads indicate differentiation-inducing concentrations of agents. Each point represents mean of triplicate assays.

第3節 分化誘導剤によるDNA合成阻害

分化誘導剤によりF9細胞に増殖抑制がかかることから、これらの化合物はF9細胞にDNA合成阻害を起こしていると考えられたため、 ^3H -チミジン取り込み実験により、DNA合成阻害効果を検討した。

第1項 材料と方法

細胞培養および化合物

前節と同様に、化合物の処理濃度はヒノキチオールおよびジチゾンが分化誘導用量の10 µg/ml、デフェロキサミンは100 µg/ml、レチノイン酸は1 µM、酪酸ナトリウムは10 mMを中心とした数段階の用量を設定した。

^3H -チミジンの取り込み実験

^3H -チミジン原液はICNから購入した。細胞計数用と ^3H -チミジン取り込み実験用の2枚の24穴プレートに 1×10^5 cells/ml MEM/wellの密度で細胞を播種した(1用量あたり3wellずつ)。24時間の前培養後、培地を化合物を含むMEMと交換し、さらに23時間培養を続けた。10 µl(37 kBq)の ^3H -チミジン溶液を加え、1時間のパルスラベルを行った。細胞をメタノールで固定後、PBSおよび10%トリクロロ酢酸で洗浄し、2Nの過塩素酸でDNAを抽出し、放射活性を液体シンチレーションカウンター(Packard, TRI-CARB 2100TR)で計測した。細胞あたりの ^3H -チミジンの取り込み量を計算し、DNA合成率は未処理の細胞の取り込み量に対する割合(%)で表した。

第2項 結果

各種の分化誘導剤のDNA合成阻害作用はFig. 13に示すようになり、ヒノキチオールとデフェロキサミンは、分化誘導用量でDNA合成をほぼ完全に停止させた。また、

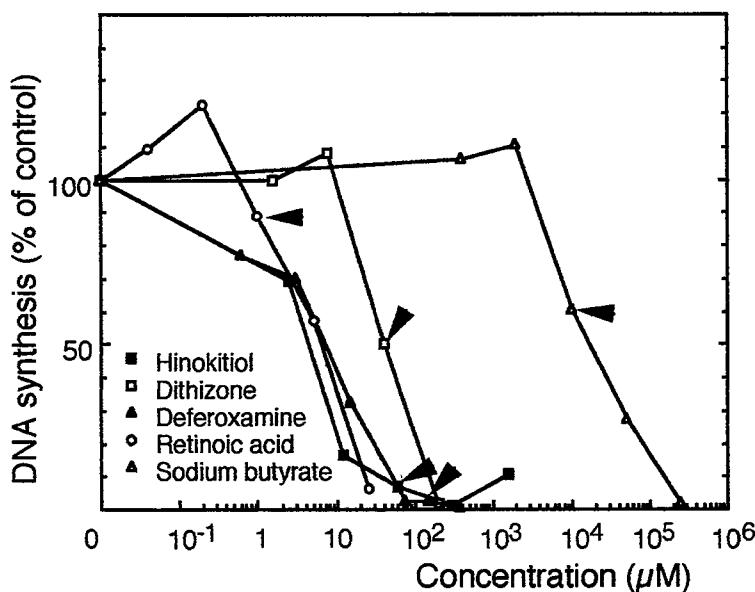


Fig. 13 Inhibitory effect of differentiation-inducing agents on DNA synthesis in F9 cells

F9 cells were seeded in 24-well culture plates and cultured for 24 hr. Then, the medium was exchanged to fresh one containing various concentrations of agents and cultured for further 24 hr. ^3H -Thymidine was pulsed for 1 hr and radioactivity was counted in a liquid scintillation counter. Arrowheads indicate the differentiation-inducing concentrations of agents. Each point represents mean of triplicated assays.

ジチゾンと酪酸ナトリウムの分化誘導用量における DNA 合成率は未処理の細胞の約 50 % であった。これに対し、レチノイン酸は分化誘導用量では未処理の細胞とほぼ同程度の DNA 合成を示した。この結果は細胞毒性を検討した結果とほぼ一致していた。

第 4 節 F9 細胞分化誘導時のアポトーシス

本章の前節まででレチノイン酸を除く分化誘導剤で F9 細胞を分化させた場合、コロニーを形成する細胞集団から細胞が脱落していることを示し、細胞死も分化誘導に重要な関わりをもつことが予想された。レチノイン酸処理では、今回細胞数の大きな減少は確認されなかつたが、Atencia らは F9 細胞を $1 \mu\text{M}$ のレチノイン細胞で 48 時間処理するとアポトーシスが誘導されると報告している⁹⁹⁾。キレーター処理による細胞の脱落にもアポトーシスが関与している可能性が考えられるため、分化誘導時にアポトーシスも誘導されているのかどうかを検討した。アポトーシスが起こっていればその特徴であるヌクレオソーム単位の DNA の断片化がおこり、DNA ladder と呼ばれる電気泳動パターンが確認され、細胞の核形態も変化することが種々の細胞で明らかにされてきている^{89,100)}。

第 1 項 材料と方法

細胞の処理

細胞培養は前節と同様に行い、化合物の処理濃度はすべて本章、第 1 節と同じ濃度とした。

細胞からの total DNA の抽出

適当な密度で F9 細胞を播種し、48 時間後に培地を化合物を含むものと交換し、レチノイン酸は 48 時間、その他の化合物は 24 時間処理した。アポトーシスにより断片化した細胞（アポトーシス小体）は培地中に浮遊しているため、まず培養液を 15 ml の遠心チューブにとり、1,430 g で遠心した。この上清を除去後、さらに 1 mM EDTA でディッシュ表面より脱着した細胞懸濁液を加え、再懸濁し同様に遠心した。PBS で洗浄後 1.5 ml のマイクロチューブに移し、1,430 g で遠心し、その沈渣に溶解用緩衝液 0.3 ml を加えた。溶解用緩衝液の組成は 100 mM NaCl、10 mM Tris-HCl (pH 8.0)、25 mM EDTA、0.5 % ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)、0.1 mg/ml プロテイナーゼ K (和光純薬工業) である。50 °Cで一晩インキュベートした後、等量のフェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール (25:24:1, v/v/v) を加えフェノール抽出をした。10,000 g で 10 分間遠心し、水層を回収し、等量の RNase A (Type I-A, 2 µg/ml, Sigma) を含む 0.1 % SDS を加え、37°Cで 1 時間インキュベートした。再度フェノール抽出した後、1/2 量の 5M NaCl を加えて塩濃度を上げ、2 倍量の氷冷無水エタノールを加えて 10,000 g で 10 分間遠心した。沈渣を無水エタノールで洗浄し、風乾後、トリス-ホウ酸-EDTA 緩衝液 (TBE buffer, pH 8.0、89 mM トリス、89 mM ホウ酸、2

mM EDTA) に溶解した。

アガロース電気泳動

TBE buffer に 2 % となるようにアガロース (宝酒造) を溶解し、ゲルを作製した。DNA 量は 260 nm の吸光度測定により調整し、DNA のサイズマーカーとして 100 bp ラダーマーカー (Pharmacia) を用い、4 V/cm の定電圧で泳動を行った。ゲルは臭化エチジウム (Sigma) により染色し、UV トランスイルミネーター (Vilber Lourmat) で観察した。

核形態の観察

細胞をレチノイン酸では 48 時間、その他の化合物では 24 時間処理した後、アポトーシス小体を含む培養液は 1,430 g で、脱着した細胞を含む懸濁液は 200 g で遠心し、それぞれ 70 % エタノールで固定した。PBS で洗浄した後、PBS に 50 µg/ml の濃度で溶解したヨウ化プロピジウム (PI) を用いて暗中 30 分間染色し、蛍光顕微鏡で観察した。

第 2 項 結果と考察

DNA を 2 % アガロースで電気泳動した結果、キレーターで分化を誘導した F9 細胞から抽出した DNA 試料にのみ、アポトーシスの特徴である約 170-180 bp 単位の断片化が明瞭に観察された (Fig. 14)。つまり、キレーターによる分化の誘導にはアポトーシスが付随して起こることが確認された。一方、レチノイン酸と酪酸ナトリウムでは DNA の断片化を示すラダーは確認されなかった。しかし、今回と同じレチノイン酸処理で F9 細胞にアポトーシスが誘導されるという報告があるため⁹⁹⁾、これについては用量や処理時間など変えればアポトーシスが誘発される可能性もある。

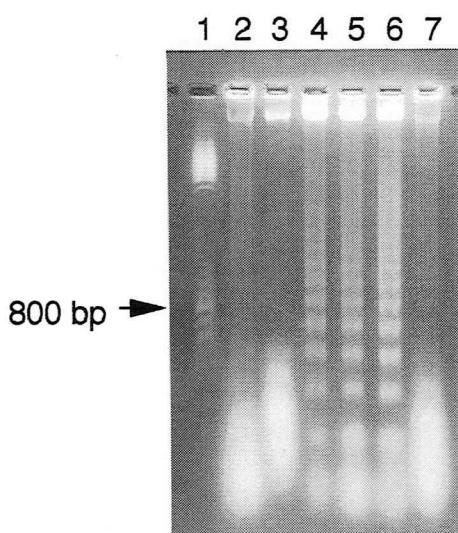


Fig. 14 Detection of DNA fragmentation in differentiated F9 cells

Equal amounts of DNA from F9 cells treated with vehicle (lane 2), retinoic acid (lane 3), hinokitiol (lane 4), dithizone (lane 5), deferoxamine (lane 6) and sodium butyrate (lane 7) were electrophoresed in 2% agarose gel and stained with ethidium bromide. Lane 1 is 100 bp ladder marker.

さらにアポトーシスの他の特徴である、断片化した DNA もしくは凝集したクロマチンをもつアポトーシス小体の出現により形態的にも確認した。無処理細胞および酪酸ナトリウムで処理した細胞群には、ほとんどアポトーシス小体が認められないのに対

し、レチノイン酸処理細胞群には少数のアポトーシス小体が認められ、キレーター処理群の細胞には多くのアポトーシス小体が確認された。特にデフェロキサミン処理群に最も多く観察された (Fig. 15)。これは 2% アガロースゲル上に出現する DNA ラダーの蛍光強度と相関していた。

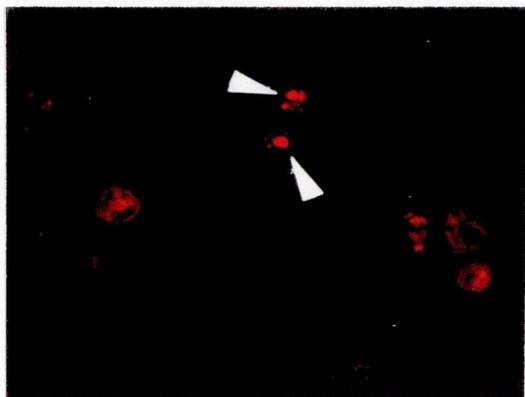


Fig. 15 Nucleus morphology of deferoxamine-treated F9 cells

F9 cells were treated with 100 µg/ml deferoxamine for 24 hr. Cells were collected and stained with propidium iodide (PI). Arrowheads indicate apoptotic bodies including fragmented DNA or condensed chromatin.

第 5 節 分化誘導剤によるアポトーシス誘導の割合

前節でアポトーシス小体の出現数が処理する化合物により異なることを述べた。またラダーの確認されなかったレチノイン酸や酪酸ナトリウムについても条件によってアポトーシスが起こる可能性を示唆した。これらの点をアポトーシスの割合を定量化することにより確認した。

第 1 項 材料と方法

細胞の処理

細胞培養は前節と同様に行い、化合物の処理濃度は、本章、第 4 節と同じ用量で行った。また本実験ではジチゾン 25 µg/ml についても検討した。

DNA の断片化率の測定¹⁰¹⁾

断片化された DNA と切斷されていない DNA を遠心操作で分離し、その DNA 量をジフェニルアミンで発色¹⁰²⁾させて定量した。細胞回収時に接着細胞が、少なくとも 4×10^6 となるように播種し、48 時間培養した。培養液を化合物を含むものと交換し、レチノイン酸は 48 時間、他の化合物は 24 時間処理した。浮遊細胞と接着細胞の両方を回収し、洗浄後 400 µl の溶解緩衝液を加えて氷上で 15 分間細胞を溶解した（時々強く攪拌）。溶解緩衝液の組成は 0.2 % Triton X-100、10mM Tris-HCl (pH 8.0)、1 mM EDTA である。13,000 g、4 °C で 10 分間遠心し、直ちに上清と沈渣を分離した。この上清に断片化した DNA が、沈渣に切斷されていない DNA が含まれている。上清は 200 µl ずつ 2 本のマイクロチューブに分注し、1 つは DNA の断片化率の測定用に以下の操作を施した。

沈渣に 200 μ l の溶解緩衝液を加え、上清には何も加えずにそれぞれ氷上に 15 分間おいた（時々強く攪拌）。それぞれに 200 μ l の 60 % 過塩素酸を加え、時々攪拌して氷上に 30 分間おいた。13,000 g、4 °C で 20 分間遠心した沈渣に過塩素酸 50 μ l を加えて 70 °C で 20 分間加熱した。室温におき温度が下がった後にジフェニルアミン反応試薬を加えて、暗中に一晩放置した。ジフェニルアミン反応試薬は、1.6 % のアセトアルデヒド 1 ml を 50 ml の蒸留水で希釈したものを A 液、ジフェニルアミン 1.5 g を 100 ml の冰酢酸に溶解後 1.5 ml の濃硫酸を加えたものを D 液として、用時にこれらを A:D が 1:200 となるように混合して用いた。反応後、595 nm の吸光度をマイクロプレートリーダーにより測定した。DNA の断片化率（アポトーシスの割合）は全 DNA 量に対する断片化した DNA 量の割合として算出し、最終的に未処理細胞の断片化率に対する比としてアポトーシスの増減を判定した。

残りの上清（200 μ l）についてはラダーによるアポトーシスの確認のために以下の操作を行った。2 μ l の 10 mg/ml RNase A を加え 37 °C で 1 時間インキュベートした。さらに 10 μ l の 20 mg/ml プロテイナーゼ K を加えて 50 °C で 45 分間インキュベートした後、50 μ l の 5 M NaCl を加えて混和した。ここに 260 μ l のイソプロピルアルコールを加えて -30 °C に一晩放置し、遠心により DNA を回収した。先に求めた全 DNA の吸光度から泳動する DNA の量を決め、2 % アガロース電気泳動を行った。その他の条件は、本章、第 4 節に従った。

第 2 項 結果と考察

断片化した DNA を遠心操作により分離し、ジフェニルアミンによる発色で DNA の断片化率を算出した場合、未処理細胞でも 10 % 前後の値が得られた。クロマチンの凝集した細胞やアポトーシス小体の出現数から考えて、この値はこの方法によるバックグラウンド値を示すと考えられた。しかしながら、2 % アガロース電気泳動において未処理の細胞から得た試料に薄いラダーパターンが出現することもあり、未処理の F9 細胞でも、培養胸腺細胞に認められるような、自然のアポトーシスが起こっていると考えられる。そこで、アポトーシス誘導の増減は対照群の断片化率に対する処理群のその增加比として示した。

ヒノキチオールとデフェロキサミンはそれぞれの分化誘導用量である 10 μ g/ml および 100 μ g/ml の濃度でアポトーシスの割合は 1.5 および 2.0 程度にまで上昇した (Fig. 16 A, C)。形態像からはデフェロキサミン処理で最もアポトーシスが誘導されていた。ジチゾンの分化誘導用量 (10 μ g/ml) でのアポトーシス誘導率の増加は顕著なものではなかったが、処理用量を 2.5 倍にするとアポトーシスが顕著に誘導された (Fig. 16 B)。レチノイン酸は分化誘導量の 1 μ M ではアポトーシスは誘導されなかつたが、処理濃度を 25 μ M まで上昇させるとアポトーシスの誘導活性があることが示された (Fig. 16 E)。これらの結果と異なり、酪酸ナトリウムは細胞がすべて死ぬような高用量においてもアポトーシスを誘導しないことが明らかになった (Fig. 16 D)。

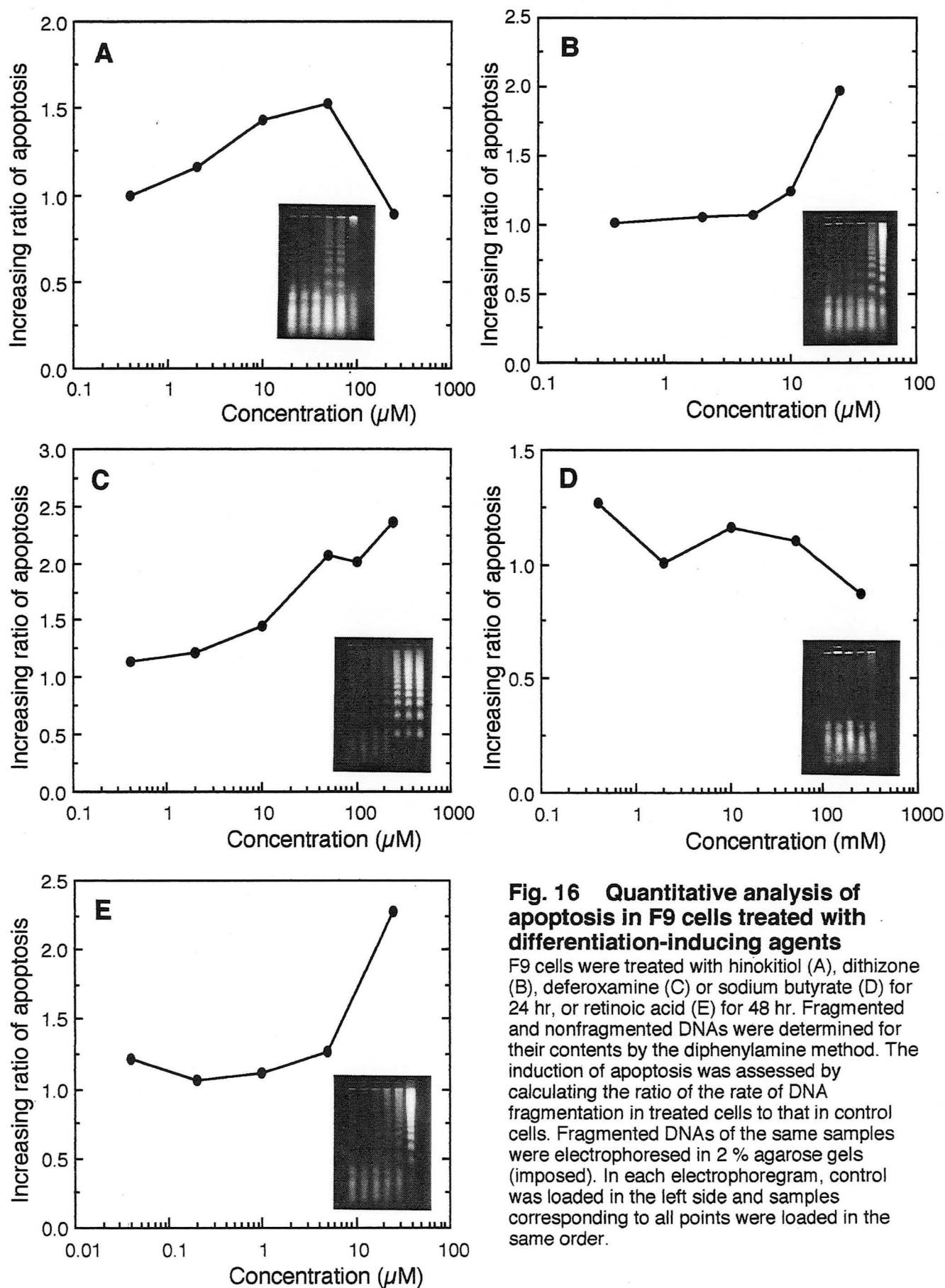


Fig. 16 Quantitative analysis of apoptosis in F9 cells treated with differentiation-inducing agents

F9 cells were treated with hinokitiol (A), dithizone (B), deferoxamine (C) or sodium butyrate (D) for 24 hr, or retinoic acid (E) for 48 hr. Fragmented and nonfragmented DNAs were determined for their contents by the diphenylamine method. The induction of apoptosis was assessed by calculating the ratio of the rate of DNA fragmentation in treated cells to that in control cells. Fragmented DNAs of the same samples were electrophoresed in 2 % agarose gels (imposed). In each electrophoregram, control was loaded in the left side and samples corresponding to all points were loaded in the same order.

また、断片化率測定と同時に採取した断片化 DNA を電気泳動した結果、グラフの形状とラダー強度は明らかな相関を示した (Fig. 16 imposed)。

ヒノキチオールの 250 µg/ml においてのみアポトーシス誘導が用量の増加とは逆に減少するという事象が認められた (Fig. 16 A) が、この理由は明らかではない。アポトーシスは先にも述べたように遺伝子に制御された事象であるため、その強い細胞毒性のため遺伝子制御が不可能になり、ネクローシスで細胞が死んでいると予測される。

第 6 節 小括

F9細胞はヒノキチオール、ジチゾンおよびデフェロキサミンによる分化誘導で DNA 合成が阻害され、細胞増殖が抑制されることが明らかになった。このことは、これらのキレーターは癌細胞の分化誘導療法に必要とされる分化誘導能と細胞増殖抑制能を兼ね備えていることができる。この点においては分化誘導能は持つが細胞増殖抑制能は低いレチノイン酸より有効な化合物であるといえる。また、MTT 法を用いた細胞毒性の検討結果からは、これらキレーターは強い細胞毒性を示すことが明らかになったが、この一部はアポトーシスを起こすことによる能動的な細胞死であり、単に化合物の毒性という言葉で表現できない現象であることも明らかになった。ヒノキチオールとデフェロキサミンは分化に伴い、細胞にアポトーシスも誘導することができ、分化誘導療法に用いるのと同じ用量でアポトーシス誘導療法にも適応できる可能性がある。この点で、全くアポトーシスを誘導することのできない酪酸ナトリウムより有利な面も有していると考えられる。現在、細胞増殖を抑えることから、神経芽腫の治療薬として適用を拡げようとしている⁶⁵⁾鉄過剰症の治療薬であるデフェロキサミンの制癌の機構は、この分化誘導活性とアポトーシス誘導活性に起因している可能性もある。

これまで分化とアポトーシスの関係は明らかにされていないが、肢芽形成時や神経系発達時のアポトーシスの役割や、線虫 *Caenorhabditis elegans* の発生時におけるアポトーシスの重要な役割などの研究から、分化とアポトーシスは関連性の高い事象であると考えられるようになってきている¹⁰³⁻¹⁰⁵⁾。しかしながら、今回の研究結果から、分化は誘導するがアポトーシスは誘導できない酪酸ナトリウムや、分化誘導用量とアポトーシス誘導用量が大きくかけ離れたレチノイン酸のような物質が存在することから、分化とアポトーシスには直接の関連がないことが示唆される。また、ヒノキチオール誘導体であるヒノキチオールメチルエーテルは、分化は誘導しないがアポトーシスは誘導することを見いだしている（未発表）。このことからも分化誘導とアポトーシス誘導は異なる機構を介して起こっていると推測される。

F9 細胞という未分化な発生初期の細胞に起こるアポトーシスは、分化していく発生初期にある細胞の生体外異物に対する自衛反応ではないかと考えられる。なぜなら、発生初期の胚にネクローシスが起こればその内容物の放出により胚自体に大きなダメ

ージが加わる可能性があるが、アポトーシスではそれによって生じたアポトーシス小体は隣接する細胞に直接影響を及ぼすことが少ないと考えられるからである。いずれにせよ F9 細胞のアポトーシスの研究系は、初期胚発生の自発的アポトーシスや、外来異物に対する反応の機構研究のよいモデル系となると期待される。

第4章 F9細胞のアポトーシスの誘導機序

アポトーシスが起こる経路は、最近のめざましい研究により次第に明らかにされつつある⁸⁹⁻⁹⁵⁾。ほとんどすべてのアポトーシスに関与していると考えられる Bcl-2 やインターロイキン-1 β 変換酵素 (ICE) 関連タンパクのような物質も多く見つかってきているが、誘導経路の細部は細胞系により多様であると考えられる。アポトーシスの最終段階で細胞がみせる反応はほぼ同じで、エンドヌクレアーゼの活性化を介して DNA の断片化やアポトーシス小体の放出などがおこるが、そこに収束するまでに細胞内では多くの事象が起こっている^{95,106-110)} (Chart 4)。

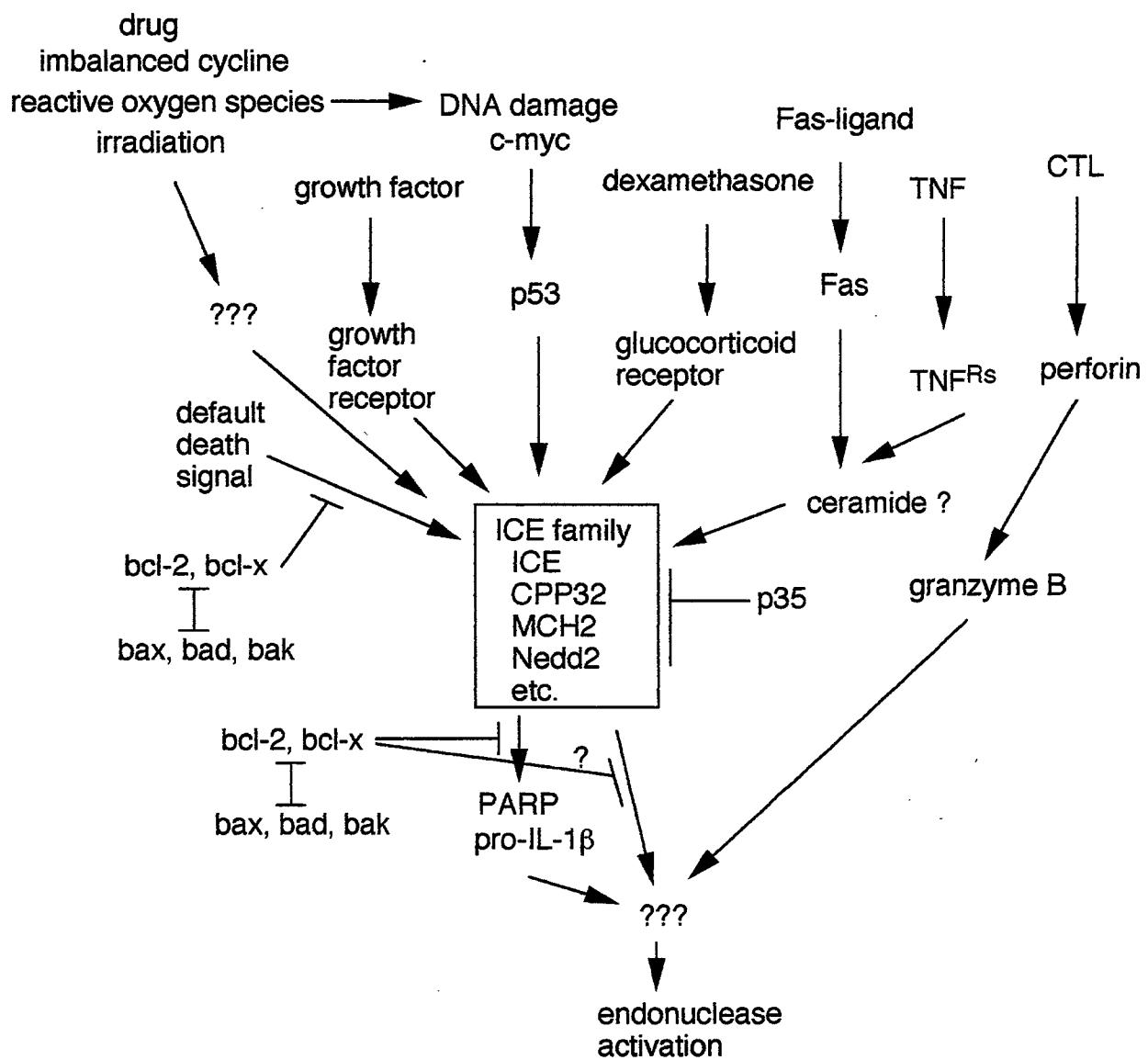


Chart 4 One of the model cascade of apoptosis in mammalian cells
 This model does not include all signals participating in the cascade. Arrows indicate the activation and lines with bar indicate the inhibition. TNF; tumor necrosis factor. TNFRs; TNF receptors. CTL; cytotoxic T lymphocytes. ICE; interleukin-1 β converting enzyme. PARP; poly-(ADP-ribose)-polymerase.
 (Modified from ref. 95)

F9 細胞をヒノキチオール、ジチゾンおよびデフェロキサミンなどのキレーターやレチノイン酸で処理するとアポトーシスが誘導されることを前章で示した。これまで F9 細胞などの胚性腫瘍細胞を用いたアポトーシス研究は少なく^{46,99,111-114)}、キレーターにより F9 細胞にアポトーシスが誘導されるという報告は皆無である。F9 細胞に起これるアポトーシスでは p53 の関与を検討した論文があるものの¹¹⁴⁾、そこに関与している因子の検討はほとんど行われておらず、どのような経路でアポトーシスが誘導、抑制されているのかは明らかではない。そこで、本章では F9 細胞のアポトーシスが、これまでに良く知られている抑制因子の Bcl-2 により制御されているのか否か、ほとんどのアポトーシスの経路が収束すると考えられている ICE ファミリーを介しているのか否かを中心に検討を行った。また、細胞周期解析も行い細胞周期と分化およびアポトーシスの関連についても検討した。

第 1 節 Bcl-2 の関与の検討

アポトーシスという現象を発現していく中で、促進的に働く因子は多く知られているが、抑制効果を持つ因子はあまり知られていない。Bcl-2 は非常に良く知られるアポトーシス抑制因子であり、その遺伝子は濾胞性リンパ腫で高頻度に見られる染色体転座点の近傍に見いだされたものである¹¹⁵⁾。Vaux らが Bcl-2 タンパクのアポトーシス抑制効果を報告¹¹⁶⁾してから研究は急速に進み、現在多くの Bcl-2 ファミリーメンバーが知られている¹¹⁷⁻¹²⁰⁾。それにもかかわらず F9 細胞のアポトーシスに関する研究自体が進んでいないこともあり、F9 細胞における Bcl-2 の発現に関する報告はまだない。そこで、このタンパク質の F9 細胞のアポトーシス前後の発現の変化を検討した。

第 1 項 材料と方法

細胞の処理

F9 細胞の処理濃度および時間は、ヒノキチオールとジチゾンが 10 µg/ml、デフェロキサミンが 100 µg/ml、酪酸ナトリウムが 10 mM でそれぞれ 24 時間、レチノイン酸が 1 µM で 48 時間とした。

抗体

1 次抗体はウサギ抗ヒト Bcl-2 ポリクローナル IgG (N-19、Santa Cruz) を、2 次抗体はペルオキシダーゼ (POD) で標識したヤギ抗ウサギ IgG 抗体を用いた。

Bcl-2 タンパクの検出

1×10^6 個の細胞から抽出したタンパク質および分子量マーカーを 12.5 % SDS-ポリアクリルアミドゲルで電気泳動した。陽性対照として、未分化状態で Bcl-2 タンパクを発現している¹²¹⁾マウス骨髄芽腫細胞である M1 細胞からの抽出液を用いた。泳動終了後、分子量マーカーのレーンは切り放し、クーマジーブリリアントブルーで染色した。ゲルの残りの部分のタンパク質はセミドライ方式のプロッター (BioRad、Trans

Blot) でニトロセルロース膜にプロッティングした。トランスファーバッファーは 48 mM トリス、39 mM グリシン、20 % メタノールを用いた。膜を PBS に溶解した 5 % スキムミルク溶液で 1 時間ブロッキングした後、スキムミルク溶液で希釈した 1 次抗体と 1 時間反応させた。PBS に 0.1 % Tween 20 を加えた溶液 (PBST) で 2 回洗浄した後、スキムミルク溶液で希釈した 2 次抗体と 1 時間反応させた。膜は PBST で洗浄後、50 ml の 0.05 M トリス塩酸バッファー (pH 7.5) に 10 mg の 3-3' ジアミノベンジジンを溶解した溶液中に移し、ここに終濃度で 0.02 % の過酸化水素を加えて発色させた。

第 2 項 結果と考察

未処理のM1 細胞では報告どおり 26 kDa 付近にバンドが認められ、Bcl-2 タンパクが発現していることが確認された。しかしながら同数の F9 細胞から調製した試料には全くバンドが確認されず、分化前後、アポトーシス前後とも Bcl-2 タンパクは発現しないことが明らかになった (Fig. 17)。通常、細胞は Bcl-2 タンパクを発現することによりアポトーシスを抑制しており、アポトーシス発現とともに逆に Bcl-2 の発現が抑制される^{116,122)}。F9 紹胞の *bcl-2* 遺伝子自体が欠失していたり、変異を受けているのか、それとも発現機構に異常が生じているのかは不明である。前章で記述したように無処理状態でも F9 紹胞にアポトーシス様の形態が認められたり、電気泳動で弱いラダーパターンが認められたのは、Bcl-2 タンパクが発現していないことによる可能性が考えられる。F9 紹胞にはアポトーシスを抑制の方向に制御している他の因子が存在するのかもしれない。

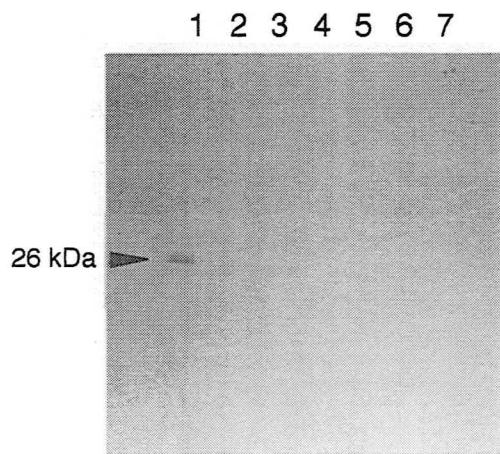


Fig. 17 Western blotting analysis of Bcl-2 protein in F9 cells treated with differentiation-inducing agents

Extracts of F9 cells (1×10^6) treated with vehicle (lane 2), 1 μM retinoic acid (lane 3), 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ hinokitiol (lane 4), 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ dithizone (lane 5), 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ deferoxamine (lane 6) and 10 mM sodium butyrate (lane 7), and extract of non-treated M1 cells (1×10^6 , lane 1) were electrophoresed in 12.5 % SDS-polyacrylamide gel and transferred to nitrocellulose membrane. Bcl-2 protein was detected using anti-Bcl-2 antibody. Molecular weights were determined by the mobilities of marker proteins.

第 2 節 インターロイキン-1 β 変換酵素 (ICE) の関与の検討

ICE は インターロイキン-1 β の前駆体を活性型にする酵素であり、*C. elegans* のアポトーシス誘発遺伝子である *ced 3* 産物とホモロジーの高いタンパク質であることがわ

から¹²³⁾、その研究が急速に進み、現在では哺乳類のアポトーシスのほぼ最終段階に位置する因子である⁹⁵⁾ (Chart 4) と考えられるようになった。ICE とホモロジーが高くアポトーシスに関与している ICE ファミリーのメンバーも次々に見つかり、哺乳類では 7 つのファミリーメンバーが知られている¹²⁴⁾。また、最近その構造および活性中心も明らかにされ¹²⁵⁾、ICE の活性中心に結合し、その活性を特異的に阻害するペプチドインヒビターも開発されている^{125,126)}。そこで、この ICE に特異的な非可逆的ペプチドインヒビターである Ac-Tyr-Val-Ala-Asp-chloromethylketone (YVAD) を用いて、F9 細胞の分化およびアポトーシスへの ICE の関与を検討した。

第 1 項 材料と方法

ペプチドインヒビター

YVAD は宝酒造から購入した。

細胞の処理

F9 細胞のアポトーシス誘導用量は、ヒノキチオールが 10 µg/ml、ジチゾンが 25 µg/ml、デフェロキサミンが 100 µg/ml、レチノイン酸が 25 µM とした。分化誘導用量はヒノキチオールおよびデフェロキサミンはアポトーシス誘導用量と同用量、ジチゾンは 10 µg/ml、レチノイン酸は 1 µM、酪酸ナトリウムは 10 mM とした。YVAD の濃度は過去に報告のある¹²⁵⁻¹²⁹⁾ほとんどの細胞系のアポトーシスの阻害効果を示す 200 µM を最高濃度とし、以下 100 µM と 50 µM を設定した。YVAD 自体には分化誘導活性もアポトーシス誘導活性もないことは確認済みである。

YVAD によるアポトーシス誘導の阻害

細胞を播種し 48 時間培養後、YVAD を含む培地に交換し、2 時間培養した。ここに終濃度が必要な濃度になるようにアポトーシス誘導化合物を添加し、さらに 24 時間培養を続けた。以下の方法は第 3 章、第 5 節、第 1 項に従い、YVAD の阻害効果はアポトーシスの誘導率をもとに判断した。

YVAD による分化誘導の阻害

細胞を播種後 3.5 日間培養後、YVAD を含む培地に交換し、2 時間培養した。分化誘導化合物を添加し、さらに 24 時間培養を続けた。以下の方法は第 1 章、第 1 節、第 1 項に従い、その阻害効果は PA 産生率をもとに判断した。

ICE タンパクの検出

分化誘導条件で処理した細胞 (1×10^6) から抽出したタンパク質を用いて SDS-ポリアクリルアミド電気泳動を行い、PVDF 膜へのウエスタンブロッティングにより ICE タンパクの検出を行った。1 次抗体にはヤギ抗マウス ICE ポリクローナル抗体 (ICE p20、M-19、Santa Cruz) を、2 次抗体には POD で標識したウサギ抗ヤギ IgG 抗体を用いた。その他の方法は本章、第 1 節、第 1 項に準じた。

第 2 項 結果と考察

ヒノキチオール、ジチゾン、デフェロキサミンおよびレチノイン酸で誘導される F9

細胞のアポトーシスは ICE の特異的非可逆的阻害剤である YVAD で阻害されなかった (Fig. 18)。このことは 2 % アガロースゲル電気泳動によるラダーパターンが消失しないことからも確認された (写真は示さない)。また各種分化誘導剤による F9 細胞の分化も YVAD で阻害されなかった (Fig. 19)。これらのこととは今回用いた誘導剤による F9 細胞の分化およびアポトーシスのいずれにも ICE は関与していないことを示している。Bcl-2 タンパクと同様に ICE 自体が発現していないことが考えられたためウエスタンブロッティングによりその発現を検討した結果、対照として用いた M1 細胞では約 30 kDa の位置に ICE と思われるバンドが顕著に認められたが、F9 細胞からのいずれのサンプルにおいてもそのバンドは非常に薄かった。また、化合物による処理前後で発現量は変化していなかった (Fig. 20)。このことから F9 細胞は ICE を介

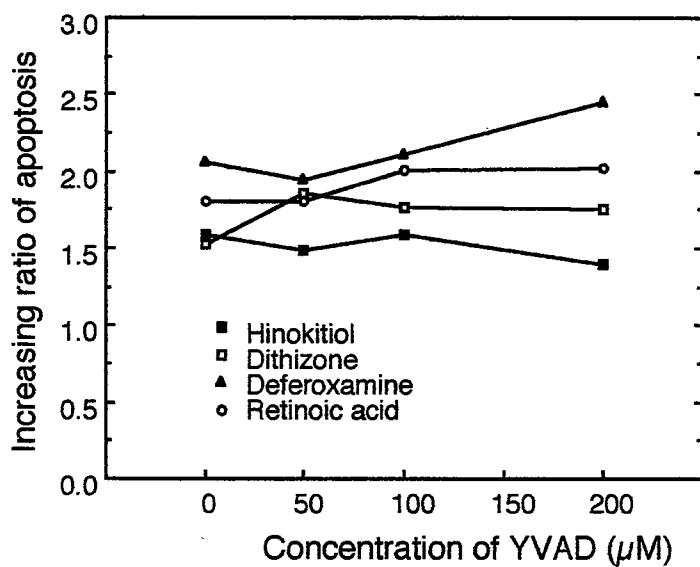


Fig. 18 Effect of ICE inhibitor, YVAD, on apoptosis in F9 cells treated with differentiation-inducing agents

F9 cells were treated with YVAD for 2 hr. Then, hinokitiol (10 μ g/ml), dithizone (25 μ g/ml), deferoxamine (100 μ g/ml) or retinoic acid (25 μ M) was added to the medium, and further cultured for 24 hr (hinokitiol, dithizone and deferoxamine) or 48 hr (retinoic acid). Induction of apoptosis was calculated as the ratio of rate of DNA fragmentation in treated cells to that in control cells.

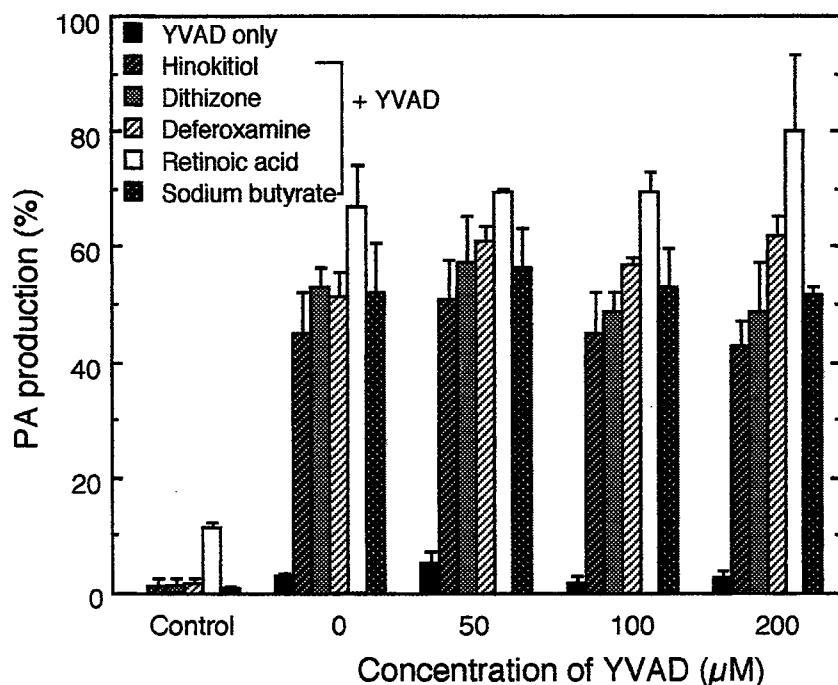


Fig. 19 Effect of ICE inhibitor, YVAD, on PA production in F9 cells treated with differentiation-inducing agents

Cells were treated with hinokitiol (10 μ g/ml), dithizone (10 μ g/ml), deferoxamine (100 μ g/ml), retinoic acid (1 μ M) or sodium butyrate (10 mM) in the presence of indicated concentrations of YVAD. PA production (%) was determined by agar-overlay method. Values are means \pm S.D. of triplicate assays.

さない経路を経由してアポトーシスを起こしていると考えられる。しかしながら、ICEにはファミリーメンバーがあり、特に発生の初期には Nedd2 と呼ばれるメンバーが一過性で強く発現されることが知られるため¹²⁴⁾、他の ICE ファミリーメンバーを介したアポトーシスが起こっていることも考えられる。

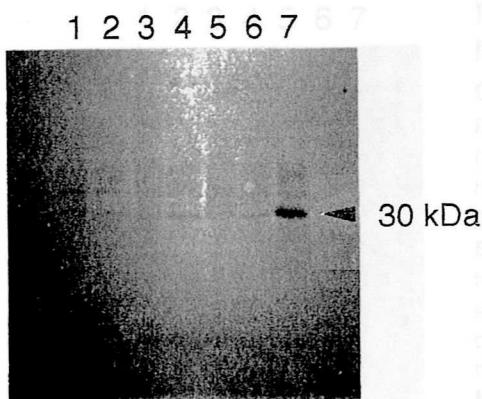


Fig. 20 Western blotting analysis of ICE protein in F9 cells treated with differentiation-inducing agents

Extracts of F9 cells (1×10^6) treated with vehicle (lane 1), 1 μM retinoic acid (lane 2), 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ hinokitiol (lane 3), 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ dithizone (lane 4), 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ deferoxamine (lane 5) and 10 mM sodium butyrate (lane 6), and extract of non-treated M1 cells (1×10^6 , lane 7) were electrophoresed in 12.5 % SDS-polyacrylamide gel and transferred to PVDF membrane. ICE protein was detected using anti-ICE antibody. Molecular weights were determined by the mobilities of marker proteins.

第3節 ICE 以外の ICE ファミリーメンバーの関与に関する検討

前節で F9 細胞に誘導されるアポトーシスは ICE を介さないことを示唆したが、哺乳類の ICE ファミリーには、ICE のほかに ICErel II、ICErel III、Nedd2、CPP32、LAP3、MCH2 の 6 つがあり^{95,124)}、これらのうちのいずれかが F9 細胞のアポトーシスに関与する可能性が考えられる。ICE ファミリーはすべてシステインプロテアーゼであるため^{95,124)}、非特異的なシステインプロテアーゼインヒビター¹³⁰⁾であるヨードアセトアミド (IAM) を用いて、前節と同様の検討を行った。

第1項 材料と方法

細胞の処理

IAM (ナカライトスク) の F9 細胞に対する細胞毒性試験を MTT 法で行い、0.01 $\mu\text{g}/\text{ml}$ から 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ までの用量範囲で検定した。その結果、生存率が 96 % であった 0.01 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、生存率が 86 % であった 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、生存率が 32 % であった 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (5.4 μM) およびそれらの間の 0.03 $\mu\text{g}/\text{ml}$ と 0.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を処理濃度に決定した。また、これらの用量の IAM にアポトーシス誘導活性はないことは確認済みである。各種の分化誘導剤による F9 細胞のアポトーシス誘導および分化誘導に対する IAM の阻害効果は本章、前節の方法に従って判定した。

第2項 結果と考察

ヒノキチオール、ジチゾン、デフェロキサミンおよびレチノイン酸で誘導される F9 細胞のアポトーシスはシステインプロテアーゼインヒビターである IAM によって阻害

されなかった (Fig. 21)。このことは 2 % アガロースゲル電気泳動によるラダーパターンからも確認されたが、ジチゾンの 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ と IAM 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で処理した F9 細胞から抽出した DNA のみラダーが薄くなってしまっており、F9 細胞のアポトーシスが ICE ファミリーを介して起こっている可能性は完全には否定できなかった。一方、分化誘導は阻害されず (Fig. 22)、分化に ICE ファミリーは関与していないことが示された。

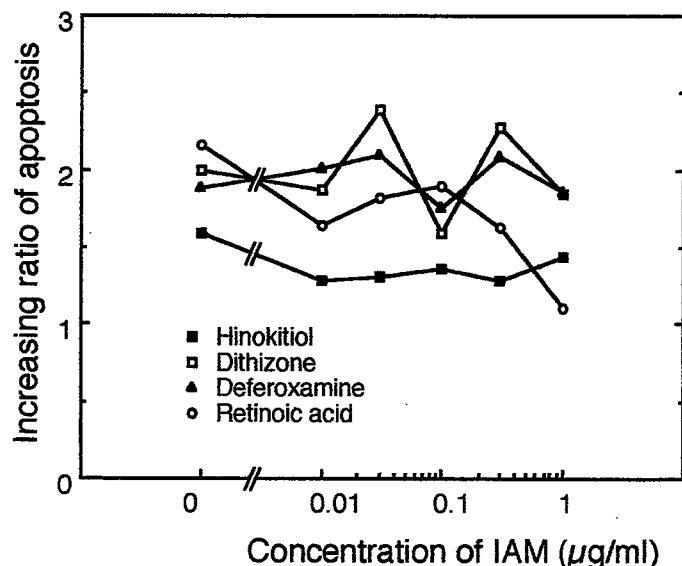


Fig. 21 Effect of iodoacetamide on the apoptosis of F9 cells treated with differentiation-inducing agents

F9 cells were treated hinokitiol (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$), dithizone (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$), deferoxamine (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) or retinoic acid (25 μM) in the presence of indicated concentrations of iodoacetamide (IAM) for 24 hr (hinokitiol, dithizone and deferoxamine) or 48 hr (retinoic acid). Induction of apoptosis was calculated as the ratio of rate of DNA fragmentation in treated cells to that in control cells.

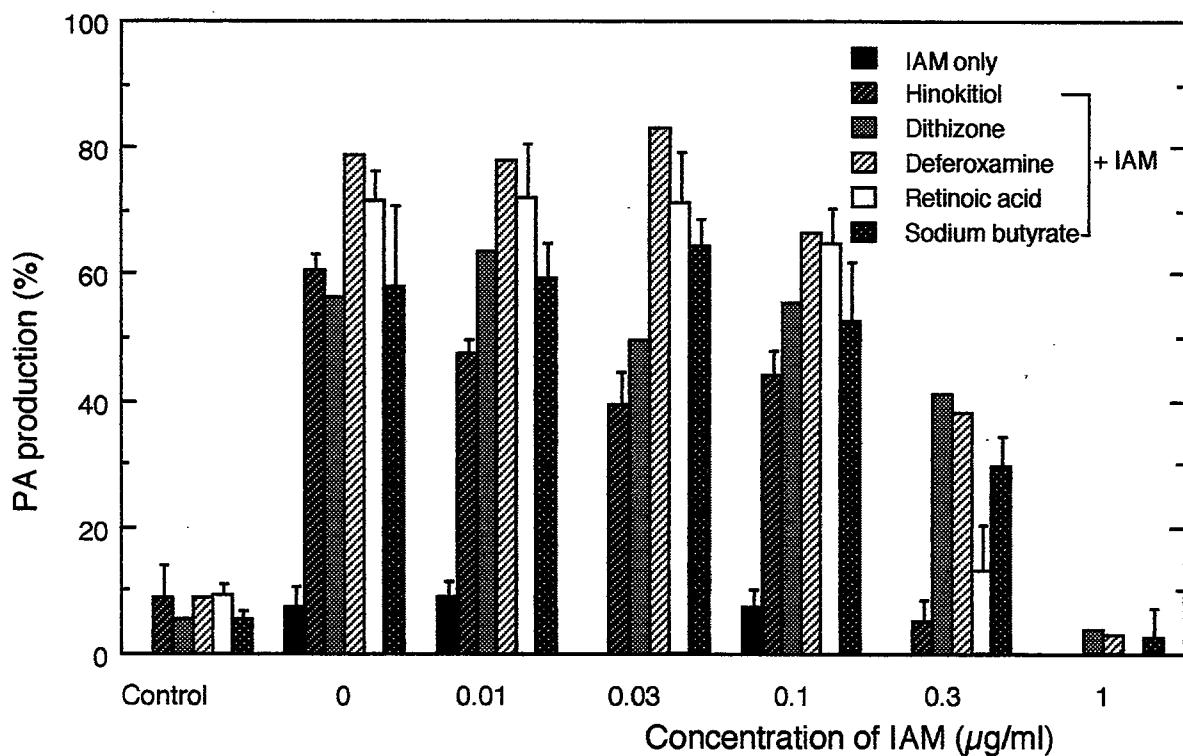


Fig. 22 Effect of iodoacetamide on PA production in F9 cells treated with differentiation-inducing agents

F9 cells were treated with hinokitiol (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$), dithizone (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$), deferoxamine (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$), retinoic acid (1 μM) or sodium butyrate (10 mM) in the presence of indicated concentrations of IAM for 24 hr (hinokitiol, dithizone, deferoxamine and sodium butyrate) or 48 hr (retinoic acid). PA production (%) was determined by agar-overlay method. Values are means \pm S.D. of triplicate assays.

第4節 F9 細胞のアポトーシスおよび分化誘導と細胞周期の解析

第3章、第3節で示したように、ヒノキチオール、ジチゾンおよびデフェロキサミンのキレーターでF9細胞を分化誘導処理するとDNAの合成阻害が起こる。デフェロキサミンはRRを阻害することにより細胞周期をS期で可逆的に停止させることが報告されており^{66,86,87}、他のキレーターによっても細胞周期はS期で停止していることが予想される。また、アポトーシスは細胞周期からの逸脱によっても起こるため^{131,132}、細胞周期の解析を行った。また今回、細胞周期解析に用いたレーザースキャニングサイトメーター(LSC)は、相対DNA量を測定した細胞をすべて記憶しているため細胞周期の解析後に、必要な細胞をリコールして細胞形態を観察することも可能である。そこで細胞周期の解析を行うとともに、断片化したDNAを含む細胞(アポトーシス小体)の割合もゲーティングにより算出し、その形態についても検討を加えた。

第1項 材料と方法

レーザースキャニングサイトメーター(LSC)による解析

分化誘導用量で処理した細胞は第3章、第4節に従って回収、固定しPIで染色した。スライドグラス上に細胞を塗沫し、LSC(オリンパス光学、LSC 101)により解析した。

第2項 結果と考察

未処理のF9細胞のDNA含量ヒストグラムは、細胞増殖が早い細胞系に特徴的な分析パターンを示した(Fig. 23 A)。一方、キレーターで処理した細胞群の共通の特徴は、右肩に出現する4CのDNA含量を持つ細胞集団が減少することと、2C以下のDNA含量を持つ細胞集団が増加することであった(Fig. 23 B-D)。このことは、細胞周期がS期で停止していることと、アポトーシスが起こっている可能性を示している。第3章で示したDNAの断片化率が最も高かったデフェロキサミンでは、2C以下のDNA含量を示す細胞集団が顕著に増加していた(Fig. 23 D)。レチノイン酸処理した細胞では2Cと4Cの中間のDNA含量を持つ細胞集団が減少したが、細胞周期には偏りは認められなかった(Fig. 23 E)。酪酸ナトリウムでもレチノイン酸と類似したパターンを示したが、2C以下のDNA含量を持つ細胞が増加しないという違いがあった(Fig. 23 E)。

このDNA含量ヒストグラムにゲーティングを施し、各細胞周期にある細胞の割合を算出した。細胞周期を逸脱していると考えられる2C以下および4C以上の細胞を除外して算出すると(Table 4の括弧内)ヒノキチオールで処理した細胞では細胞周期がS期で停止し、G2/M期の細胞の割合が大幅に減少していた。ジチゾンおよびデフェロキサミンで処理した細胞群でもG2/M期の細胞群が大幅に減少していたが、こちらはG1期で細胞周期が停止しているようであった。レチノイン酸で処理した細胞群では、G2/M期の割合は対照群と差がなかったが、G1期の細胞集団が増加し、S期の細胞群

が減少していた。酪酸ナトリウムで処理した細胞群では S 期の細胞集団はやや減少したが、ほとんど未処理の細胞と変わらなかった。

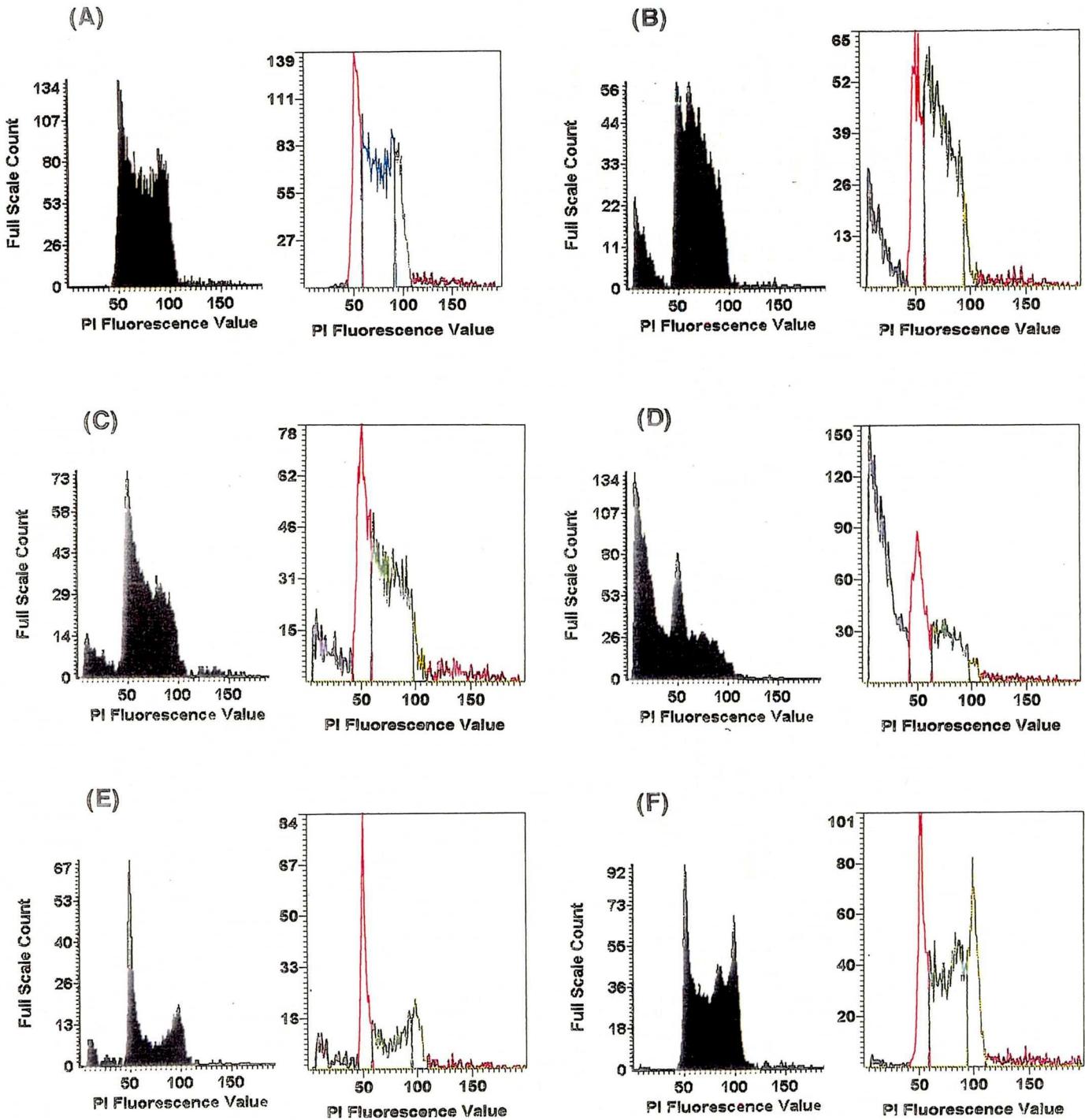


Fig. 23 Histograms of DNA content and computer-gating patterns of F9 cells treated with differentiation-inducing agents

Control cells (A) and hinokitiol- (B), dithizone- (C), deferoxamin- (D), retinoic acid- (E) and sodium butyrate- (F) treated F9 cells were analysed using LSC. Figures in left side are histograms of DNA contents and figures in right side are computer-gating patterns. Cells in apoptotic body phase (blue), G1 phase (red), S phase (green) G2/M phase (yellow) and other phases (purple) are imaged in right side figure.

Table 4 Effect of differentiation-inducing agents on cell cycle of F9 cells

	Control	Hinokitiol	Dithizone	Deferoxamine	Retinoic acid	Sodium butyrate
% apoptotic bodies	0	13	12	53	13	1
% G1	24 (26)	23 (29)	31 (39)	22 (52)	35 (44)	24 (27)
% S	56 (56)	54 (66)	46 (57)	18 (43)	30 (38)	44 (49)
% G2/M	16 (18)	4 (5)	3 (4)	2 (5)	13 (18)	22 (24)
% other	4	3	6	3	6	6

Percentages without apoptotic bodies and cells in other phases are in parentheses.

アポトーシス小体と考えられる 2C 以下の細胞集団の割合はデフェロキサミン処理群で激増しており、ヒノキチオール、ジチゾン、レチノイン酸処理群でも増加していた。しかし、アポトーシスが起こらないことを第 3 章で示した酪酸ナトリウム処理細胞群では、その増加は認められなかった (Table 4)。このアポトーシス細胞と考えられる集団に属する細胞の核形態をリコールして観察すると、いずれの相対 DNA 量を持つ集団も明らかにアポトーシス小体からなっていることが確認された (Fig. 24)。

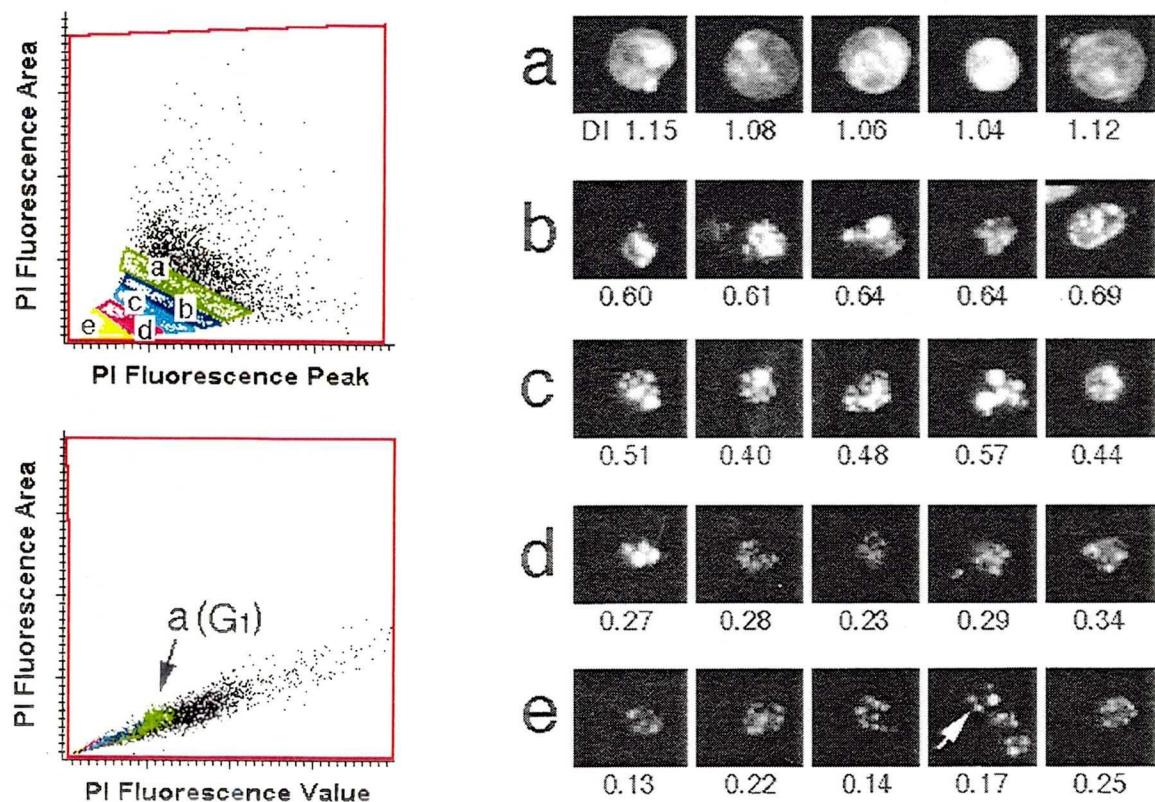


Fig. 24 Nucleus morphology of low-DNA content cells treated with deferoxamine
Cells were recalled according to their relative DNA contents by an LSC-101 computer system and their morphological images were depicted. An arrow indicates an example of appearance of fragmented DNA.

これらの結果から、細胞周期の停止や細胞周期からの逸脱が、細胞分化やアポトーシスに関与していることが示された。しかしながら、細胞周期に大きな変化が認められない酪酸ナトリウムにも分化誘導能があることから、酪酸ナトリウム処理による分化誘導機序は他の分化誘導剤による機序とは大きく異なっていることが予想された。

第5節 小括

本章では、主として分化誘導剤による F9 細胞のアポトーシス誘導機序を検討した。その結果、F9 細胞のアポトーシスは、免疫系^{95,133,134)}や神経系^{95,135,136)}の細胞、また、分化の進んだ段階にある腫瘍細胞^{95,124,137)}とは違った経路で制御されている可能性が示唆された。その理由の第一は、多くの細胞系でアポトーシスを抑制するのに働いている Bcl-2 が発現していないことがあげられる。Bcl-2 以外のものに制御されているアポトーシスの報告もあり^{138,139)}、必ずしも F9 細胞に特有の現象とはいえないが、Bcl-2 によるアポトーシス抑制系が存在しないとすると、p35 など^{95,140,141)}他の抑制系により制御されているのかもしれない。

これまでによく知られたアポトーシス経路とは異なる経路の存在を示唆するもう一つの理由は、F9 細胞が ICE ファミリーを介したアポトーシスを起こしているという証拠が得られなかったことである。ICE 自体はほとんど発見しておらず、また ICE 特異的な阻害剤である YVAD でもアポトーシスが抑制されなかつたことから、ICE は F9 細胞のアポトーシス誘導に関与していないと結論される。システインプロテアーゼ阻害剤を用いても顕著な阻害は認められなかつたが、より ICE ファミリーに特異的で、すべての ICE ファミリーメンバーによるアポトーシスを阻害する p35 による阻害^{95,140,141)}を検討することも必要である。これらのことから F9 細胞における分化誘導剤によるアポトーシス誘導は未知の経路を介していることが示唆され、今後のさらなる研究が必要である。

細胞周期の関与については、ヒノキチオールは S 期のブロッカーであり、デフェロキサミンは G1-S インターフェイスで細胞周期を停止させていることが確認された。これらにジチゾンを加えたキレーターはいずれも G2/M 期の細胞集団の割合が大きく下がることから、S 期から細胞周期が先に進まなくなることを示している。このことは第 2 章で述べた RR の阻害が関与している可能性を強く支持する結果である。細胞周期を S 期で停止させる、鉄の関与する事象として、この期の細胞周期の進行に関与する cdc2 および cdk2 の生合成に鉄が必要であるという報告^{142,143)}もあるため、今後はこれらも含めて検討を行うべきであろう。また、アポトーシス小体が 3 種のキレーターおよびレチノイン酸処理群の細胞集団中では増加していることが、その割合および核形態からも明らかになった。細胞周期の停止や細胞周期からの逸脱がどのようにして分化の誘導やアポトーシスの誘導の引き金を引いているのかを明らかにすることが今後の課題である。

総括

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の α -ヒドロキシケート構造^{35,36,144)}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⁶³⁻⁶⁵⁾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。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 期での細胞周期停止が認められ、G2/M 期の細胞は激減した。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^{66,86,87)}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要であるという報告^{142,143)}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なかった^{99,111,112)}。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¹⁰³⁻¹⁰⁵⁾、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*^{95,116,124)}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 ICE の特異的な不可逆性のインヒビターである YVAD 処理によって抑えられること、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つたことなどから、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^{95,140,141)}や inhibitor of apoptosis protein (IAP)⁹⁵⁾、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^{9,10)}、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には、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^{13-46,145,146)}。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。

結論

未分化胚性腫瘍 F9 細胞の分化誘導活性物質を探索し、以下の結果を得た。

1. ヒノキチオールがマウス胚性腫瘍 F9 細胞の分化を誘導することを見いだし、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。さらに、ヒノキチオール以外の 2 種のキレーター、ジチゾンとデフェロキサミンにも強い F9 細胞分化誘導活性を認めた。
2. 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を除去することにより起こることを示し、その主要な作用部位がリボヌクレオチドリダクターゼの活性中心にある 3 値の鉄イオンである可能性を示唆した。
3. キレーターによる分化誘導時にアポトーシスが誘導されることを明らかにした。しかし、分化誘導とアポトーシス誘導には直接的な関連はなく、さらにキレーターにより誘導されるアポトーシスは既知のアポトーシス誘導経路を介さないものであった。

以上、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明らかにし、新たな医薬品開発の方向性を提示した。

謝辞

本研究の遂行にあたり、終始暖かい御指導ならびに御鞭撻を賜りました恩師、大阪大学薬学部教授田中慶一先生に吏心より深甚なる謝意を表します。

また、終始御指導ならびに御助言をいただきました大阪大学薬学部助教授武藤徳男先生、実験を行うにあたり御助言をいただきました大阪大学薬学部助手伊藤徳夫先生に深謝いたします。

また、常に私の研究への取り組みに影響を与える多くの御指導、御助言ををいただきました愛知県コロニー発達障害研究所の米澤敏博士に心より感謝いたします。

さらに、本研究で使用いたしました多くの化合物を御供与いただき、また種々の御助言をいただきました摂南大学薬学部教授中西勤先生ならびに助教授稻田昭先生、神戸学院大学薬学部教授三宅正治教授、細胞を御供与いただきました大阪大学微生物病研究所教授西宗義武先生に心より感謝いたします。また、細胞周期解析に貴重な時間を割いて御協力をしていただきましたオリンパス光学染色体研究センターの佐藤卓朋氏に心より感謝いたします。

また、実験に熱心に御協力をいただきました興梠順也修士、井戸優子学士、小野沢佳子学士、本稿をまとめるにあたり協力していただきました戎谷力修士、大阪大学薬学部環境毒性学講座の皆様に感謝いたします。

また、公益信託森安大学院生奨学基金を御給付賜りました、故森安女史に深謝致します。

最後に、私を育て、常に自由を与え続けてくれた両親に感謝の意を表します。

参考文献

- 1) Bernstein, E. G., Hooper, M. L., Grandchamp, S. and Ephrussi, B. (1973) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 70: 3899-3903
- 2) Solter, D. and Knowles, B. B. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75: 5565-5569
- 3) Strickland, S., Smith, K. K. and Marotti, K. R. (1980) Cell, 21: 347-355
- 4) Hogan, B. L. M., Taylor, A. and Adamson, E. (1981) Nature, 291: 235-237
- 5) Nishimune, Y., Kume, A., Ogiso, Y. and Matsushiro, A. (1983) Exp. Cell Res., 146: 439-444
- 6) McCue, P. A., Gubler, M. L., Sherman, M. I. and Cohen, B. N. (1984) J. Cell Biol., 98: 602-608
- 7) Doi, T., Sumi, T., Nishina, Y., Kosaka, M., Iwai, S. A., Sakuda, M. and Nishimune, Y. (1995) Cancer Res., 88: 81-86
- 8) Nishina, Y., Sumi, T., Iwai, S. A. and Nishimune, Y. (1995) Exp. Cell Res., 217: 288-293
- 9) Hogan, B. L. M., Barlow, D. P. and Tilly, R. (1983) Cancer Surveys, 2: 116-140
- 10) Hulme, L. M., Reeves, H. L. and Clothier, R. H. (1987) Mol. Toxicol., 1: 589-596
- 11) Wieman, M., Alexander, P. and Calabresi, P. (1988) in The Status of Differentiation Therapy (eds. Waxman, S., Rossi, G. B. and Takaku, F.), Ravan Press, New York: pp. 299-314
- 12) Parkinson, D. R., Smith, M. A., Cheson, B. D., Stevenson, H. C. and Friedman, M. A. (1992) Semin. Oncol., 19: 734-741
- 13) Saunders, J. W. Jr. (1966) Science, 154: 604-612.
- 14) Frank, A. A., Kazacos, E. A., Hullinger, R. L. and Thompson, D. J. (1989) Teratology, 40: 495-504.
- 15) Wood, K. A., Dipasquale, B., Youle, R. J. (1993) Neuron, 11: 621-632.
- 16) Vogel, K. S. (1993) Mol. Neurobiol., 7: 363-382.
- 17) Sherman, M. I., Strickland, S. and Reich, E. (1976) Cancer Res., 36: 4208-4216
- 18) Strickland, S. and Mahdavi, V. (1978) Cell, 15: 393-403
- 19) Hogan, B. L. M. and Tayler, A. (1981) Nature, 291: 235-237
- 20) Kuff, E. L. and Fewell, J. W. (1980) Dev. Biol., 77: 103-106
- 21) Jones, P., Benedict, W., Strickland, S. and Reich, E. (1975) Cell, 5: 325-329
- 22) Kosaka, M., Nishina, Y., Takeda, M., Matsumoto, K. and Nishimune, Y. (1991) Exp. Cell Res., 192: 46-51
- 23) Salmon, E. D., McKeel, M. and Hays, T. (1984) J. Cell Biol., 99: 1066-1075
- 24) Kathryn, L. C. and Darrell, H. C. (1981) Cell, 23: 61-71
- 25) Rajan, K. T. (1966) Nature, 210: 959

- 26) Zemer, D., Pras, M., Sohar, E., Modan, M., Cabili, S. and Gafni, J. (1986) New Engl. J. Med., 314: 1001-1005
- 27) Nozoe, T. (1936) Bull. Chem. Soc. Jap., 11: 295-298
- 28) Yamato, M., Hashigaki, K., Kokubo, N., Tsuruo, T. and Tashiro, T. (1984) J. Med. Chem., 27: 1749-1753
- 29) Yamato, M., Ando, J., Sakaki, K., Hashigaki, K., Wataya, Y., Tsukagoshi, S., Tashiro, T. and Tsuruo, T. (1992) J. Med. Chem., 35: 267-273
- 30) Inamori, Y., Tsujibo, H., Ohishi, H., Ishii, F., Mizugaki, F., Aso, H. and Ishida, N. (1993) Biol. Pharm. Bull., 16: 521-523
- 31) Saeki, Y., Ito, Y., Shibata, M., Sato, Y., Okuda, K. and Takazoe, I. (1989) Bull. Tokyo Dent. Coll., 30: 129-135
- 32) Osawa, K., Matsumoto, T., Maruyama, T., Takiguchi, T., Okuda, K. and Takazoe, I. (1990) Bull. Tokyo Dent. Coll., 31: 17-21
- 33) Iinuma, H. (1943) J. Chem. Soc. Jap., 64: 742-746
- 34) Nozoe, T. and Katsura, S. (1944) YAKUGAKU ZASSHI, 64: 181-185
- 35) Kontoghioghes, G. J. (1986) Biochem. J., 233: 299-302
- 36) Kulp, K. S. and Vulliet, P. R. (1996) Toxicol. Appl. Pharmacol., 139: 356-364
- 37) Krohn, K. A., Meyers, J. M., DeNardo, G. L. and DeNardo, S. J. (1977) J. Nucl. Med., 18: 276-281
- 38) Wensel, T. G., Chang, C. H. and Mearos, C. F. (1985) Biochemistry, 24: 3060-3069
- 39) Wang, S. Y., LaRosa, G. J. and Gudas, L. J. (1985) Devel. Biol., 107: 75-86
- 40) Sleigh, M. J. (1989) Biochem. Soc. Symp., 55: 1-12
- 41) Weigel, R. J., Devoto, S. H. and Nevins, J. R. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 9878-9882
- 42) Burdsal, C. A., Lotz, M. M., Miller, J. and McClay, D. R. (1994) Dev. Dynamics, 201: 344-353
- 43) Ross, S. A., Ahrens, R. A. and Luca, L. M. (1994) J. Cell. Physiol., 159: 263-273
- 44) Kitabayashi, I., Chiu, R., Umesono, K., Evans, R. M., Gachelin, G. and Yokoyama, K. (1994) In Vitro Cell. Dev. Biol., 30A: 761-768
- 45) Roy, B., Taneja, R. and Chambon, P. (1995) Mol. Cell. Biol., 15: 6481-6487
- 46) Clifford, J., Chiba, H., Sobieszczuk, D., Metzger, D. and Chambon, P. (1996) EMBO J., 15: 4142-4155
- 47) Kosaka, M., Nishina, Y., Takeda, M., Matsumoto, K. and Nishimune, Y. (1991) Exp. Cell Res., 192: 46-51
- 48) Nishina, Y., Sumi, T., Iwai, S. A., Kosaka, M. and Nishimune, Y. (1993) Exp. Cell Res., 208: 492-497
- 49) Evans, R. M. (1988) Science, 240: 889-890

- 50) Hashimoto, Y. (1991) *Cell Struct. Funct.*, 16: 113-118
- 51) Yeivin, A., Levine, A. and Razin, A. (1996) *FEBS Lett.*, 395: 11-16
- 52) Muller, R. and Wagner, E. F. (1984) *Nature*, 311: 438-442
- 53) Yamaguchi-Iwai, Y., Satake, M., Murakami, Y., Sakai, M., Muramatsu, M. and Ito, Y. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 87: 8670-8674
- 54) Iwai, S., Kosaka, M., Nishina, Y., Sumi, T., Sakuda, M. and Nishimune, T. (1993) *Exp. Cell Res.*, 205: 39-43
- 55) Pehr, F. (1975) *Clin. Chem.*, 21: 1609-1611
- 56) Song, M. K., Adham, N F. and Rinderkucht, H. (1976) *Am. J. Clin. Pathol.*, 65: 229-233
- 57) Jackson, T. W., Ling, L. J. and Washington, V. (1995) *J. Toxicol. Clin. Toxicol.*, 33: 325-329
- 58) Kontoghiorghes, G. J. (1995) *Toxicol. Lett.*, 80: 1-18
- 59) Kontoghiorghes, G. J. and Weinberg, E. D. (1995) *Blood*, 9: 33-45
- 60) Muntane, J., Puig-Parellada, P. and Mitjavila, M. T. (1995) *J. Lab. Clin. Med.*, 126: 435-443
- 61) Olivereri, N. F., Britteman, G. M., Matsui, D., Berkovitch, M., Blendis, L. M., Cameron, R. G., McCleiland, R. A., Liu, P. P., Templeton, D. M. and Koren, G. K. (1995) *New Engl. J. Med.*, 332: 918-922
- 62) Nathan, D. G. (1995) *New Engl. J. Med.*, 332: 953-954
- 63) Goodwin, J. F. and Whitten, C. F. (1965) *Nature*, 205: 281-283
- 64) Peters, G., Keberle, H., Schmid, K. and Brunner, H. (1966) *Biochem. Pharmacol.*, 15: 93-109
- 65) Donfrancesco, A., Deb, G., DeSio, L., Cozza, R. and Castellano, A. (1996) *Acta Haematol.*, 95: 66-69
- 66) Lederman, H. M., Cohen, A., Lee, J. W. W., Freedman, M. H. and Gelfand, E. W. (1984) *Blood*, 64: 748-753
- 67) Komtogiorghes, G. J., Piga, A. and Hoffbrand, A. V (1996) *Hematol. Oncol.*, 4: 195-204
- 68) Barankiewicz, J. and Cohen, A. (1987) *Biochem. Pharmacol.*, 36: 2343-2347
- 69) Renton, F. J. and Jeitmer, T. M. (1996) *Biochem. Pharmacol.*, 51: 1553-1561
- 70) Moor, C. (1967) *Methods Enzymol.*, 12A: 155-164
- 71) Thelander, L. (1973) *J. Biol. Chem.*, 248: 4591-4601
- 72) Holmgren, A. (1979) *J. Biol. Chem.*, 254: 3664-3671
- 73) Stubbe, J. (1990) *Adv. Enzymol.*, 63: 349-419
- 74) Moor, E. C. (1977) *Adv. Enzyme Regul.*, 15: 101-114
- 75) Thelander, L. and Reichard, P. (1979) *Ann. Rev. Biochem.*, 48: 133-158
- 76) Fontecave, M., Nordloud, P., Eklund, H. and Reichard, P. (1992) *Adv.*

- Enzymol., 65: 148-183
- 77) Larsson, A. (1969) Eur. J. Biochem., 11: 113-121
- 78) Atkin, C. L., Thelander, L. and Reichard, P. (1973) J. Biol. Chem., 248: 7469-7472
- 79) Nocentini, G., Federici, F., Franchetti, P. and Barzi, A. (1993) Cancer Res., 53: 19-26
- 80) Reichard, P. (1993) Science, 260: 1773-1777
- 81) Rayner, M. J. and Graham, C. F. (1982) J. Cell. Sci., 58: 331-344
- 82) Rodorigues, M., Balicki, D., Newrock, K. M. and Mukherjee, B. B. (1985) Exp. Cell. Res., 156: 22-30
- 83) Furukawa, T., naito, Y., Kohno, H., Tokunaga, R. and Takatani, S. (1992) Life Sci., 50: 2059-2065
- 84) Hoyes, K. P., Hider, R. C. and Porter, J. B. (1992) Cancer Res., 52: 4591-4599
- 85) Nyholm, S., Mann, G. J., Johansson, A. G., Bergeron, R., Grasloud, A. and Thelander, L. (1993) J. Biol. Chem., 268: 26200-26205
- 86) Bergeron, R. J. and Ingino, M. J. (1987) Cancer Res., 47: 6010-6016
- 87) Fukuchi, K., Tomoyasu, S., Watanabe, K., Watanabe, H., Takagi, Y., Tsuruoka, N. and Gomi, K. (1993) Biochem. Mol. Biol. Int., 30: 403-409
- 88) Kaplinski, C., Estrov, Z., Freedman, M. H., Gelfand, E. W. and Cohen, A. (1987) Leukemia, 1: 437-441
- 89) Arends, M. J. and Wyllie, A. H. (1991) Int. Rev. Exp. Pathol., 32: 223-254
- 90) Williams, G. T. and Smith, C. A. (1993) Cell, 74: 777-779
- 91) Thompson, C. B. (1995) Science, 267: 1456-1462
- 92) Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H. and Currie, A. R. (1972) Br. J. Cancer, 26: 239-254
- 93) Williams, G. T., Smith, C. A., McCarthy, N. J. and Grimes, E. A. (1992) Trends Cell Biol., 2: 263-267
- 94) Zakeri, Z., Bursch, W., Tenniswood, M. and Lockshin, R. A. (1995) Cell Death Differentiation, 2: 87-96
- 95) Vaux, D. L. and Strasser, A. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93: 2239-2244
- 96) Rosenstrauss, M. J., Sundell, C. L. and Liskay, R. M. (1982) Devel. Biol., 89: 516-520
- 97) Darrow, A. L., Rickles, R. J. and Sirickland, S. (1990) Methods Enzymol., 190: 110-117
- 98) Mosmann, T. (1983) J. Immunol. Methods, 65: 55-63
- 99) Atencia, R., Garcia-Sanz, M., Unda, F. and Arechaga, J. (1994) Exp. Cell Res., 214: 663-667
- 100) Darzynkiewicz, Z., Li, X. and Gong, C. (1994) Methods Cell Biol., 41: 1-38
- 101) Illera, V. A., Perandones, C. E., Stunz, L L., Mower, D. A. Jr. and Ashman, R. F. (1993) J. Immunol., 151: 1965-2973

- 102) Burton, K. (1968) *Methods Enzymol.*, 12B: 163-166
- 103) Ellis, R. E., Yuan, J. and Horvitz, H. R. (1991) *Annu. Rev. Cell Biol.*, 7: 663-698
- 104) Fairbairn, L. J., Cowling, G. J., Reipert, B. M. and Dexter, T. M. (1993) *Cell*, 74: 823-832
- 105) White, E. (1993) *Genes Devel.*, 7: 2277-2284
- 106) Martin, S. J. and Green, D. R. (1995) *Cell*, 82: 349-352
- 107) Walker, P. R., Pandey, S. and Shikorska, M. (1995) *Cell Death Differentiation*, 2: 97-104
- 108) Green, D. R., McGahan, A. and Martin, S. J. (1996) *J. Cell. Biochem.*, 60: 33-38
- 109) Van Antwerp, D. J., Martin, S. J., Kafri, T., Green, D. R. and Verma, I. M. (1996) *Science*, 274: 787-789
- 110) Yuan, Z. M., Huang, Y., Whang, Y., Sawyers, C., Weichselbaum, R., Kharbanda, S. and Kufe, D. (1996) *Nature*, 382: 272-274
- 111) Langley, R. E., Palayoor, S. T. m Coleman, C. N. and Bump, E. A. (1994) *Int. J. Radiat. Biol.*, 65: 605-610
- 112) Langley, R. E., Quartuccio, S. G., Kennealey, P. T., Coleman, C. N. and Bump, E. A. (1995) *Radiat. Res.*, 144: 90-96
- 113) Kudoh, T., Ishidate, T., Nakamura, T., Toyoshima, K. and Akiyama, T. (1996) *Oncogene*, 13: 1431-1439
- 114) Lutzker, S. G. and Levine, A. J. (1996) *Nature Med.*, 2: 804-810
- 115) Tsujimoto, Y., Finger, L. R., Yunis, J., Nowell, P. C. and Croce, C. M. (1984) *Science*, 226: 1097-1099
- 116) Vaux, D. L., Cory, S. and Adams, J. M. (1988) *Nature*, 335: 440-442
- 117) Yang, E., Zha, J., Jockel, J., Boise, L. H., Thompson, C. B. and Korsmeyer, S. J. (1995) *Cell*, 80: 285-291
- 118) Farrow, S. N., White, J. H., Martinou, I., Ravan, T., Pun, K. T., Grinham, C. J., Martinou, J. C. and Brown, R. (1995) *Nature*, 374: 731-733
- 119) Chittenden, T., Harrington, E. A., O'Connor, R., Fleigton, C., Lutz, R. J., Evan, G. I. and Guild, B. C. (1995) *Nature*, 374: 733-736
- 120) Kiefer, M. C., Braner, M. J., Powers, V. C., Wu, I. I., Umanski, S. R., Tomei, C. D. and Barr, P. J. (1995) *Nature*, 374: 736-739
- 121) Lotem, J. and Sachs, L. (1995) *Cell Growth Differentiation*, 6: 647-653
- 122) Fairbairn, L. J., Cowling, G. J., Reipert, B. M. and Dexter, T. M. (1993) *Cell*, 74: 823-832
- 123) Miura, M., Zhu, H., Rotello, R. and Yuan, J. (1993) *Cell*, 75: 653-660
- 124) Kumar, S. and Lavin, M. F. (1996) *Cell Death Differentiation*, 3: 255-267
- 125) Wilson, K. P., Black, J. F., Thomson, J. A., Kim, E. E., Griffith, J. P., Navia, M. A., Murcko, M. A., Chambers, S. P., Aldape, R. A., Raybuck, S. A. and

- Livingston, D. J. (1994) *Nature*, 370: 270-275
- 126) Milligan, C. E., Prevette, D., Yaginuma, H., Homma, S., Cardwell, C., Frits, L. C., Tomaselli, K. J., Oppenheim, R. W. and Schwartz, L. M. (1995) *Neuron*, 15: 385-393
- 127) Enari, M., Hug, H. and Nagata, S. (1995) *Nature*, 375: 78-81
- 128) Hasegawa, J., Kamada, S., Kamiike, S., Shimizu, S., Imazu, T., Matsuda, H. and Tsujimoto, Y. (1996) *Cancer Res.*, 56: 1713-1718
- 129) Rouquet, N., Pages, J. C., Molina, T., Briand, P. and Joulin, V. (1996) *Curr. Biol.*, 6: 1192-1195
- 130) Gunther, C., Rollinghoff, M. and Beuscher, H. U. (1991) *J. Immunol.*, 146: 3025-3031
- 131) Rubin, L. L., Philpott, K. L. and Brooks, S. F. (1993) *Curr. Biol.*, 3: 391-394
- 132) Evan, G. I., Brown, L., Whyte, M. and Harrington, E. (1995) *Curr. Opin. Cell Biol.*, 7: 825-834
- 133) Greenberg, A. H. (1996) *Cell Death Differentiation*, 3: 269-274
- 134) Peterson, A. J., Brown, R. D., Gibson, J., Pope, B., Luo, X. F., Schutz, L., Wiley, J. S. and Joshua, D. E. (1996) *Eur. J. Haematol.*, 56: 213-220
- 135) Garcia, I., Martinou, Y., Tsujimoto, Y. and Martinou, J. C. (1992) *Science*, 258: 302-304
- 136) Allosopp, T. E., Wyatt, S., Paterson, H. F. and Davies, A. M. (1993) *Cell*, 73: 295-307
- 137) Friedlander, R. M., Gagliardini, V., Rotello, R. J. and Yuan, J. (1996) *J. Exp. Med.*, 184: 717-724
- 138) Boise, L. H., Gonzalez-Garcia, M., Postema, C. E., Ding, L., Lindsten, T., Turka, L. A., Mao, X., Nunez, G. and Thompson, C. B. (1993) *Cell*, 74: 597-608
- 139) Haq, R. U., Wereley, J. and Chitambar, C. R. (1995) *Exp. Hematol.*, 23: 428-432
- 140) Hay, B. A., Wolff, T. and Rubin, G. M. (1994) *Development*, 120: 2121-2129
- 141) Sugimoto, A., Friesen, P. D. and Rothman, J. H. (1994) *EMBO J.*, 13: 2023-2028
- 142) Terada, N., Or, R., Szepesi, A., Lucas, J. J. and Gelfand, E. W. (1993) *Exp. Cell Res.*, 204: 260-267
- 143) Lucas, J. J., Szepesi, A., Domenico, J., Takase, K., Tordai, A., Terada, N. and Gelfand, E. W. (1995) *Blood*, 86: 2268-2280
- 144) Bryant, B. E., Fernelius, W. C. and Douglas, B. E. (1953) *J. Am. Chem. Sci.*, 75: 3784-3786
- 145) Lotan, R. (1995) *J. Natl. Cancer Inst.*, 87: 1655-1657
- 146) Tompson, C. B. (1995) *Science*, 267: 1456-1462

