

氏 名 (本籍)	^{かす} 粕	^{かべ} 壁	^{たかし} 隆
学位の種類	薬	学	博 士
学位記番号	薬	第	206 号
学位授与年月日	昭和56年12月9日		
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当		

学位論文題目	グルココルチコイドによるマウス骨髄性 白血病細胞の分化誘導に関する研究
--------	--

(主 査)

論文審査委員	教授 橋 本 嘉 幸	教授 南 原 利 夫
		教授 鶴 藤 丞

論文内容要旨

マウス骨髄性白血病細胞MIはSL系のマウスに自然発生した骨髄性白血病から樹立された培養株細胞である。このMI細胞は骨髄芽球様の性質を示す細胞であり、通常の培養条件下では分化しない。しかし、MI細胞は種々の正常細胞の培養液（conditioned medium, CM）中の蛋白質性分化誘導因子によってマクロファージや顆粒球状に分化し、造腫瘍性も喪失する。蛋白質性分化誘導因子は、CM以外にも種々の癌性腹水液、細菌内毒素（endotoxin）を注射したマウスの血清、ヒトの唾液や尿、および羊水中などにも見い出されている。

しかし、これらの分化誘導因子の精製は困難であり、化学構造の解析は殆ど行われていない。そこで著者は化学構造の既知的物質によるMI細胞の分化誘導効果を検討した結果、グルココルチコイドに分化誘導活性を見出した。次に、このグルココルチコイドによるMI細胞の分化誘導機構を調べた。

MI細胞の分化誘導効果はグルココルチコイド活性のあるステロイドにのみ観察された。Testosteroneやprogesteroneなどのステロイドは高濃度処理でもMI細胞の分化を誘導しなかった。コルチコイドの構造で炭素11 β 位の水酸基は分化誘導活性に特に重要であった。炭素11 β 位に水酸基のないcortisoneはMI細胞の分化誘導活性はないが、炭素11 β 位に水酸基のあるhydrocortisoneは、強力な分化誘導活性があった。このようなMI細胞の分化誘導に必要なステロイドの構造特異性は、ラット肝癌細胞のtyrosine aminotransferaseの誘導やマウスリンパ腫細胞の殺細胞効果などにも同様に認められている。さらに、これら諸細胞の細胞質にはグルココルチコイドに特異的なレセプターが存在することが知られている。

グルココルチコイドの細胞生物学的作用は標的細胞のグルココルチコイドレセプターを介して発現されると考えられている。一方、その後著者らはMI細胞について調べた結果、MI細胞の細胞質中にもグルココルチコイドレセプターが存在することが判った。また、諸種ステロイドのレセプターへの結合能がステロイドによるMI細胞の分化誘導能とよく相関すること、ステロイドとレセプターの複合体が核内に移動することが判った。したがって、グルココルチコイドはMI細胞に遺伝子レベルで作用し、分化に関与する遺伝子情報の発現を促進していると推察される。

グルココルチコイドによるMI細胞の分化誘導に伴って、リゾチーム、酸性プロテアーゼおよび β -グルクロニダーゼ活性が誘導された。特に、リゾチーム活性の誘導は最も顕著であった。リゾチーム活性は無処理のMI細胞には検出できなかった。しかし、リゾチーム活性はdexamethasone添加後2日目から検出され、その後活性は著しく増加した。

グルココルチコイドによるMI細胞のリゾチーム活性誘導作用を調べると各ステロイド間に競合作用のあることが判った。すなわち、11 β -hydroxyprogesteroneや11-deoxycortisolは高濃度

処理しても dexamethasone が誘導するレベルまでにリゾチーム活性を誘導し得なかった。また、cortisone や fluoxymesterone はリゾチーム活性を誘導しなかった。しかし、これらステロイド ($5 \times 10^{-6} M$) を dexamethasone ($5 \times 10^{-8} M$) と同時処理した場合、dexamethasone によるリゾチーム活性の誘導を競合的に抑制した。したがって、特異的なグルココルチコイドレセプターがグルココルチコイドによる MI 細胞のリゾチーム活性の誘導にも関与していると考えられる。

5-bromodeoxyuridine やピュロマイシンは増殖に影響を与えない濃度で、dexamethasone による MI 細胞のリゾチーム活性と MI 細胞の分化の指標である貧食能の誘導を抑制した。しかし、これら薬物による抑制効果の程度はリゾチーム活性と貧食能では異なっていた。したがって、リゾチーム活性と貧食能の誘導は独自に制御されていると考えられる。高濃度の dexamethasone を処理しても分化しない抵抗性細胞ではリゾチーム活性も誘導されなかった。したがって、リゾチーム活性は MI 細胞の分化誘導機構を研究するための好適な生化学的指標であると考えられる。

分化した MI 細胞が産生するリゾチームの性質を検討するために、MI 細胞から自然に分化したマクロファージ様株細胞 Mm-1 からリゾチームを精製した。精製したリゾチームは sodium dodecylsulfate (SDS) -ポリアクリルアミドゲル電気泳動で単一で、分子量が 15,000 と推定された。この Mm-1 細胞リゾチーム活性の至適 pH は 6.6 であった。また、Mm-1 細胞リゾチームは NaCl によって活性化され、0.04 M NaCl で酵素活性は最大値を示した。SDS を含まないポリアクリルアミドゲル (pH 4.5) 電気泳動で Mm-1 細胞リゾチームの移動度は卵白およびヒト尿リゾチームの移動度と異なっていた。

Mm-1 細胞リゾチームに対するウサギ抗血清は正常マウスおよびラットのリゾチーム活性を阻害したが、卵白およびヒト尿リゾチームの活性を阻害しなかった。正常な SL 系マウスの肺からリゾチームを精製して、Mm-1 細胞リゾチームと比較検討した。Mm-1 細胞リゾチームと正常マウスリゾチームは、分子量、荷電至適 pH、トリプシン感受性および抗原性において有意な差は認められなかった。これらの結果から分化した MI 細胞が産生するリゾチームが正常マウスリゾチームと同様な性質を示すことが明らかになった。

マウス皮膚の 2 段階化学発癌実験系における発癌プロモーターが MI 細胞の分化誘導を修飾することが判った。著者は通常 10% 仔牛血清 (CS) 添加培地で MI 細胞を培養している。最も強い発癌プロモーターである 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) はこの CS 添加培地で dexamethasone による MI 細胞の分化誘導を著しく抑制した。Dexamethasone による分化誘導は TPA の濃度に依存して抑制された。TPA による分化誘導抑制効果は dexamethasone の濃度が低い場合に、より顕著であった。発癌プロモーターによる MI 細胞の分化誘導抑制効果とマウス皮膚の発癌プロモーター活性とはよく相関していた。TPA は MI 細胞の増殖率および細胞増殖飽和密度に影響を及ぼさない濃度でも顕著な分化誘導抑制効果を示した。したがって、TPA による MI 細胞

の分化誘導抑制効果は単にTPAの細胞毒性によるものではないと推察される。さらに、TPAによるMI細胞の分化誘導抑制効果は可逆的であった。

グルココルチコイドはマウス皮膚の発癌プロモーターの作用を抑制する効果がある。しかし、発癌プロモーターによるMI細胞の分化誘導抑制効果は、分化誘導物質がグルココルチコイド以外の腹水液中の蛋白質性分化誘導因子を用いた場合にも認められた。

さらに、発癌プロモーターによるMI細胞の分化誘導に対する修飾効果は培地に添加した血清の種類によって著しく異なることが判った。MI細胞を通常使用しているCS添加培地から牛胎児血清(FCS)添加培地へ変えて培養した結果、TPAは逆にMI細胞の分化誘導を促進した。このCSとFCS添加培地におけるTPAの修飾効果の差異は、異なるロットの血清を用いても認められた。発癌プロモーターの作用を修飾させる血清因子は未だ不明である。現在、この血清因子を検討中であるが、この血清因子は非透析性の高分子であった。

MI細胞は持続的にC型ウイルスを培地中に産生する。このC型ウイルス産生とdexamethasoneによるMI細胞の分化誘導との関連性について調べた。MI細胞クローン34Yは、dexamethasone処理によりマクロファージや顆粒球に分化し、貧食能や遊走性を発現した。このクローン34Y細胞の培養液中の逆転写酵素活性はdexamethasone処理および無処理で差異がなかった。ウイルス画分を酵素標品として測定した場合にも同様な結果が得られた。C型ウイルスPNA依存性DNAポリメラーゼに特異的な鋳型poly(rc)・oligo(dG)を用いて逆転写酵素活性を測定した場合にも結果は同様であった。一方、クローンT22細胞はdexamethasone処理によりクローン34Yと同程度に分化したが、dexamethasone処理により逆転写酵素活性は約2倍に増加した。したがって、dexamethasoneによるMI細胞の分化誘導とC型ウイルス産生は関連していないことが判った。

以上、グルココルチコイドにMI細胞の分化誘導能があること、およびグルココルチコイドによるMI細胞の分化誘導機構について述べた。これらの知見に基づき、さらに詳細にMI細胞および他の白血病細胞の分化誘導機構を解明し、白血病細胞の分化誘導による白血病の新しい治療法を開発することが、今後の重要な課題である。

審査結果の要旨

造血腫瘍は対応するstemから分化の途次のある時点で腫瘍化し、腫瘍細胞として増殖したものと考えると、もし再び分化過程に入るような効果をこれらの腫瘍に与えれば腫瘍細胞は分化してその腫瘍としての形質を失うと思われる。実際、ある種の実験腫瘍細胞のなかには各種の刺激で分化し正常化するものがあることが知られているが、その機構は必ずしも明かでない。

本研究ではマウス背髄性白血病MI細胞を用いその分化誘導につき検討を加えた結果、グルコルチコイドにも分化誘導効果があることを見出し、その作用機構を追求した。

その結果、MI細胞の細胞質中にはグルコルチコイドレセプターが存在すること、また、諸種ステロイドのレセプターへの結合能がステロイドによるMI細胞の分化誘導能とよく相関すること、ステロイドとレセプターの複合体が核内に移動することを明かにした。したがって、グルコルチコイドはMI細胞に遺伝子レベルで作用し、分化に関与する遺伝子情報の発現を促進しているものと推察した。

グルコルチコイドによるMI細胞の分化誘導に伴って、リゾチーム、酸性プロテアーゼおよび β -グルクロニダーゼ活性が誘導され、とくに、リゾチーム活性の誘導は最も顕著であることを見出した。

グルコルチコイドによるMI細胞のリゾチーム活性誘導作用を調べた結果各ステロイド間に競合作用のあることが判った。これらステロイドをdexamethasoneと同時処理した場合、dexamethasoneによるリゾチーム活性の誘導を競合的に抑制した。したがって特異的なグルコルチコイドレセプターがグルコルチコイドによるMI細胞のリゾチーム活性の誘導に関与していると考えた。ここで誘導されたリゾチームは正常マウスリゾチームと免疫学的及び生化学的な性質は共通性を示すことも併せて明かにした。

さらに発癌プロモーターとして知られるTPAがグルコルチコイドによるMI細胞の分化誘導を著しく抑制することも見出された。

またMI細胞はC型ウィルスを培地中に放出することが知られているがグルコルチコイドによるMI細胞の分化誘導とC型ウィルス産生との間には関連性のないことも確めた。

以上の研究成果は腫瘍細胞の分化誘導に関し生体内因子であるグルコルチコイドが関係するという新知見を呈供した点、またその作用機作の一部を明かにした点で評価され、博士論文に価すると思われる。