

氏名(本籍) かわ 川 村 秀 樹

学位の種類 薬学博士

学位記番号 薬博第 109 号

学位授与年月日 昭和56年 3月25日

学位授与の要件 学位規則第5条第1項該当

研究科専門課程 東北大学大学院薬学研究科
(博士課程) 薬学専攻

学位論文題目 ラット変異膀胱上皮細胞並びに膀胱癌細胞
の in vitro 培養による角化測定法の開発
とその応用

(主査)

論文審査委員 教授 橋本嘉幸 教授 鶴藤丞

教授 曳野宏

論文内容要旨

上皮細胞の一つである扁平上皮細胞はその機能の一つとして角化する性質をもっている。角化とは細胞質にケラチンといわれる角化蛋白質を生じ、最後には核をはじめ、すべての細胞小器官を失ってケラチン蛋白質で満たされるようになり死滅する変化を呼称する。角化現象は表皮をはじめとする正常扁平上皮や上皮性の癌細胞にみられる。現在角化機構に関しては不明な点が多く、また角化現象を調べる培養方法も器官培養が多く用いられ、細胞レベルではあまり行なわれていない。

膀胱上皮はもともと角化しない移行上皮であるが、ときとして扁平上皮化生をおこし角化する。たとえば、膀胱上皮より発生した癌では顕著な角化がみられる場合がある。橋本等は nitrosamine と尿素の存在下で ACI/N ラット膀胱上皮細胞を培養することにより、その悪性化に成功したが、培養系として確立された膀胱上皮細胞は角化する性質を示し、戻し移植でも角化傾向の強い扁平上皮癌を形成する。また *in vivo* で nitrosamine により誘発された同ラットの膀胱癌由来の培養系の細胞も角化を示す。そこで著者はこれらの細胞を用い、角化現象を細胞レベルで検討する上で簡便なシステムを確立し、それを用いて角化指数を検討するとともに角化機構について考察し、更に種々の薬剤や培地条件の角化に対する影響を調べ、また細胞内 retinol 結合蛋白と角化との関連性を検討することを目的として実験を行なった。

1) 培養系膀胱上皮細胞の角化

直径 6 cm のシャーレ内に直径 15 mm の円型カバースリップを置き、細胞浮遊液 (1.5×10^5 個/ml) 5 ml を加えて 24 時間培養し、カバースリップ上に細胞を附着させた後、カバースリップを別のシャーレ (直径 3 cm) に移し、標準培地 (Eagle MEM + 10% fetal calf serum (FCS)) を加えて培養した。培養中は位相差顕微鏡で細胞変化を観察し、一定期間培養後、細胞に Papanicolaou 染色を施した。薬剤及び種々の組成の試験培地は新しいシャーレに移す段階で添加した。使用した細胞は N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine (BBN) を飲料水に溶かして投与することによって誘発した ACI/N ラットの膀胱癌に由来する培養系の細胞 (BC 系) 数種及び *in vitro* で BBN や N-butyl-N-(3-carboxypropyl) nitrosamine (BCPN) により確立された ACI/N ラットの膀胱上皮細胞の培養系 (BES 系) 数種である。

細胞の生育区域をカバースリップ上に限定すると細胞は飽和状態に達した後接触阻害を示し、角化する。カバースリップ上で飽和状態に達してから約 2 日で部分的に角化がはじまる。培養日数が経過するにつれて、しだいに角化部分が拡がって最後には細胞の大部分が角化する。BC 系 7 系、BES 系 6 系について標準培地中での角化を調べたところ、全ての系で角化がみられたがその速度や程度には差がみられた。一般的に BES 系の細胞が良好な角化を示した。培養膀胱上

皮細胞に Papanicolaon 染色を施すと角化していない細胞の細胞質は淡青緑色に染色され、また角化細胞は角化の程度により桃色から橙色に染色される。染色標本について自記分光光度計を用いて連続的に吸光度を測定すると橙色及び青緑色に由来する2つの吸収極大が得られる。両者の吸光度の比をもって角化指数とした。角化していない場合は角化指数が1以下になり、角化の程度により角化指数は大きくなる。角化指数により角化の程度をより客観的にかつ定量的にあらわすことができる。

良好な角化を示すBES系の細胞を使って、retinol及びその誘導体の角化に及ぼす影響を調べた。試験した3系のうち、2系においてretinolは強力な角化抑制作用を示した。すなわち、1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の濃度で完全に角化が抑制された。しかし、1系では使用した濃度(10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)による角化抑制は非常に軽度であった。細胞系により、retinolに対する感受性に差があることが判明した。また、試験したvitamin A類の中ではretinoic acidが最も強力な角化抑制作用を示した。角化抑制を示す濃度のretinolは増殖抑制を示すことはなく、retinolが増殖抑制により角化を遅らせている可能性は否定できる。Retinolを培地から除去すると角化がはじまってくることから、retinolの角化抑制作用は可逆的であり、また一定期間培養後にretinolを添加した場合角化は抑制されず、retinolは角化過程の早期に作用していることが示唆された。他の種々の薬剤、すなわち試験したvitamin, hormone, cyclic AMP, anti-oxidant, polyamineなどには角化に対する顕著な効果はみられなかった。しかし、5-halogenated deoxyuridineは強力な角化抑制作用を示した(後述)。

角化実験に使用する細胞は通常10%FCS-MEMで継代維持されている。角化実験をFCSのかわりに1% bovine serum albumin(BSA)あるいは10% newborn calf serum(NCS)を加えて行なったところ角化は10%FCS-MEMの場合と同程度に認められた。しかし、30日間以上10%NCS-MEMで継代培養した後に10%NCS-MEMで角化実験を行なうと角化の進行はきわめて遅い。10%NCS-MEMで培養し、10%FCS-MEMで角化実験を行なった場合角化は十分認められる。しかも、細胞の増殖率はFCS, NCSとも差はなく、増殖の変化により、角化の進行が促進あるいは抑制されているのではない。FCSには角化を誘導する何らかの物質が含まれていることが考えられ、10%FCS-MEMで継代後NCS, BSAに変えても角化がみられるのはFCSの効力が細胞内に残っているためであろうと思われる。

角化細胞と角化していない細胞のアミノ酸組成を比較したが両者には大きな差はみられなかった。

2) Retinolによりその角化が抑制される細胞系と抑制されない細胞系があることから、近年vitamin Aの細胞内mediatorと考えられている細胞内retinol結合蛋白(CRBP)が関連していることを予想して、検討した。腫瘍組織、正常肝、腎及び培養膀胱上皮細胞の細胞上清を ^3H -retinolとインキュベート後、ショ糖密度勾配遠心法により分画してCRBPの有無を調べた。

分画後、各画分の放射活性を測定すると沈降係数2と3.7以上の2つの部位に放射活性ピークがみられる。2Sのピークは過剰の非放射性retinolにより消失することから、このピークは ^3H -retinolの特異的結合によるものであり、2S部分の成分はCRBPであると思われる。2Sのピークはまた、retinyl acetateとも拮抗するがretinoic acidやretinyl palmitateによつては消失しない。一方、3.7S以上のピークは過剰のretinolにより影響を受けず、このピークは細胞上清調製時に混入する血清アルブミンと思われ、事実ラット血清と ^3H -retinolの反応後にも同様のピークが得られた。

正常肝、腎組織及び全ての細胞系の膀胱癌組織に多量のCRBPが検出された。培養系の細胞においては、BES 20B細胞にだけCRBPが検出されたが他の培養系の細胞には検出されなかった。In vivoの腫瘍には多量のCRBPが存在しているにもかかわらず、試験した培養系の細胞にはBES 20B細胞以外CRBPは検出されない。In vivoとin vitroの環境の違いによりCRBPの量に変化することも考えられる。CRBPが確認できるBES 20B細胞はretinolにより角化が抑制されたが、CRBPが検出されない他の細胞系はretinolに対する感受性をほとんど示さなかった。また、in vivoで多量のCRBPを検出するBC 47腫瘍をin vitroに移した直後の細胞はその角化がretinolにより抑制された。以上のことから、CRBPがretinolの角化抑制作用のmediatorとして作用していることが示唆された。

3) 5-Halogenated-2'-deoxyuridineの角化に及ぼす影響

Thymidineの誘導体である5-halogenated-2'-deoxyuridineは様々な系における分化を抑制することが知られている。BES 20B細胞を用いて角化に及ぼす影響について検討した。5-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU)は $3\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の濃度で強力な角化抑制作用を示し、5-Iodo-2'-deoxyuridine (IdU)も同様の作用を呈した。5-Fluoro-2'-deoxyuridine (FdU)は $0.01\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の濃度では細胞毒性を示し、細胞の生活力を保持する最大濃度である $0.05\ \mu\text{g}/\text{ml}$ では対照と比較すると角化指数は小さいがかなりの程度の角化がみられた。

BrdU添加培地で培養した後、培地からBrdUを除去すると約2週間で角化が進んでくることから、BrdUの角化抑制作用は可逆的であり、角化抑制状態からの回復の速度はBrdUの濃度に依存していて、BrdUでの処理時間には関係しないと思われる。培養開始1日後(growth phase)に培地にBrdUを添加した場合は、9時間後に加えた場合と同様に角化抑制がみられた。しかし、4日後(saturation phase)に加えた場合BrdUによる角化抑制はみられない。BrdUは角化過程の早期に作用していることも考えられる。カバースリップ上の細胞増殖に対して $3\ \mu\text{g}/\text{ml}$ のBrdUは抑制作用を示さないが、 $5\ \mu\text{g}/\text{ml}$ のBrdUは増殖を対照の半分に抑制した。細胞の飽和密度を下げることは角化抑制に好都合であるが、 $3\ \mu\text{g}/\text{ml}$ のBrdUでは増殖抑制がみられないことや増殖抑制を示す他の薬物では角化抑制を示さないことから、飽和密度を半分に下げるこ

とが角化抑制の本質的原因になっているとは考えられない。また、 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ の retinol では増殖に対する影響はみられない。 $5\mu\text{g}/\text{ml}$ の BrdU 添加培地から BrdU を除去すると、対照と同程度にカバースリップ上の細胞飽和密度が回復した。ここでも BrdU の可逆性がみられた。 $5\mu\text{g}/\text{ml}$ の BrdU は DNA 合成を対照に比べ培養 1 日目で半分に抑制した。Retinol は培養 3 日以後において、対照、BrdU 添加培地に比べて高い DNA 合成を維持した。 $5\mu\text{g}/\text{ml}$ の BrdU は RNA 合成についても 3 日目までは対照に比べ抑制を示すが 5 日以降は対照より高い RNA 合成を示し、一定した値を維持した。Retinol は対照に比べて高い RNA 合成を示した。

BrdU とともに過剰の thymidine を加えると BrdU の角化抑制作用は消失した。しかし、deoxycytidine, deoxyuridine は BrdU に対して拮抗作用を示さなかった。BrdU が DNA 内に取り込まれることにより作用を発現していることも考えられる。また、retinol の角化抑制作用は thymidine により影響を受けなかった。Retinol の他に BrdU が培養膀胱上皮細胞の角化を抑制することが明らかになった。BrdU も retinol の場合と同様に角化過程の早期に作用していると思われ、その作用は可逆的であり、しかも retinol と同様に DNA が関与するメカニズムで作用を発現していることが示唆された。

審査結果の要旨

角化は扁平上皮に固有の細胞分化、成熟の過程であり、皮膚その他の上皮組織の表面構造維持に役立っている。角化の病的発現としては皮膚の角化症、膀胱上皮などの leukoplakia などがあるが、いわゆる扁平上皮癌においても、角化はその特徴的な組織学的変化として観察される。

これらの疾病の治療法の確立には角化の機構を知り、また治療薬のスクリーニング系を確立することが必要である。

本研究では *in vitro* で変異したラット膀胱上皮細胞が *in vivo* 及び *in vitro* でよく角化することに着目し、まずこの細胞を用いての角化の定量的な解析方法の追求が行われた。細胞を円形カバーガラス上に播き、多量の培地中で数日間培養すると角化がおこる。細胞をパパニコロ染色した後に吸収スペクトルを取り、角化細胞、生細胞にそれぞれ由来する吸収極大における吸収度の比から角化の程度を定量化することに成功した。

第2にこの方法を用い10数種の薬物について、角化への効果が検討された。その結果、ビタミンA及びその誘導体並びに類似体が効率よく角化を抑制することが確認された。現在までのところ、その他の化合物で角化に影響を及ぼす化合物は発見されていない。

第3にビタミンAの角化抑制を媒介すると考えている細胞中のビタミンA受容体の定量的検討が行われた結果、移植膀胱癌細胞では受容体量が多く、培養系では少いか、または検出されないものもあること、並びにビタミンAは標的細胞にビタミンA受容体が存在する場合のみ角化抑制を示すことなどが明かにされた。

第4に角化も細胞の分化現象の一つと考えられると、分化抑制作用を示す薬物はまだ角化抑制作用も有する可能性に基づき、代表的な分化抑制剤であるブロムデオキシウリジン (BrdU) の作用を検討した。予想した如く BrdU は効率よく角化を抑制し、またその類似体であるヨードデオキシウリジンも角化抑制作用を示した。これらの薬物の角化抑制における作用機構が追求された結果、DNA への作用がその原因であることが明かにされた。

以上の研究は角化の機構の解明及び角化の抑制剤、または促進剤のスクリーニングに寄与するものであり、博士論文に値するものと考えられる。