

氏 名 (本籍)                    <sup>かど</sup>角                    <sup>じゅん</sup>純                    <sup>こ</sup>子

学 位 の 種 類                    医                    学                    博                    士

学 位 記 番 号                    医                    第                    1 5 4 7                    号

学 位 授 与 年 月 日                    昭 和   5 9   年   2   月   2 2   日

学 位 授 与 の 要 件                    学 位 規 則 第 5 条 第 2 項 該 当

最 終 学 歴                    昭 和 5 0 年 3 月  
日本女子大学家政学部卒業

学 位 論 文 題 目                    マウス骨髓性白血病細胞の分化誘導抑制機構に関する研究

(主 査)

論 文 審 査 委 員   教 授   及   川                    淳                    教 授   松   沢   大   樹

教 授   森                    富

## 論 文 内 容 要 旨

マウス骨髓性白血病細胞 (M1) は、SL系マウスに自然発生した骨髓性白血病から樹立された培養株細胞である。骨髓芽球様の性質を示す細胞で、通常の培養条件下では分化しない。同系マウスに移植すると白血病を誘発する。このM1細胞を分化誘導物質で処理すると、マクロファージや顆粒球様の細胞に分化する。分化したM1細胞は、同系マウスへの移植性を喪失する。また、M1細胞を移植したマウスに分化誘導物質を投与すると、その移植マウスの延命が認められる。したがって、M1細胞は、白血病細胞の分化の調節機構を解明するための優れた実験系として、また分化誘導による白血病の治療法を開発するための実験系として用いられている。

このM1細胞を長期間培養すると分化誘導物質で処理しても分化せずに増殖を続ける耐性M1細胞がある頻度で自然に出現する。一般の化学療法剤に対する耐性細胞の場合と同様に分化誘導による白血病の治療法を開発するためには、この耐性細胞の分化誘導の方法を見出さなければならぬ。そこで、本研究では、この耐性M1細胞を分離し、その性質を調べ、この耐性を克服して分化誘導を行なう方法を開発した。

分化誘導可能な感受性M1細胞から、長期間培養中に分化誘導物質に対して耐性になったM1細胞をクローニングして分離した。この耐性M1細胞は、分化誘導物質 (腹水、デキサメサゾン、あるいはリポポリサッカライド) で処理しても、分化の指標である貪食能、遊走性、リゾチーム活性、マクロファージおよび顆粒球様細胞への形態変化等の誘導は、観察されなかった。また、この耐性細胞をDiffusion chamberに封入し、同系マウスの腹腔に移入して、生体内における耐性細胞の分化誘導能を調べた。その結果、この耐性細胞の分化は認められず、生体内においても耐性を保持していた。さらに、この耐性細胞は感受性M1細胞に比べて、同系マウスに対する移植性が高く、耐性細胞を移植したマウスに分化誘導物質を投与しても延命効果は得られなかった。このように、耐性M1細胞は、*in vitro*においても*in vivo*においても分化誘導できない移植性の高い白血病細胞であることが判った。そこで、この耐性M1細胞を用いて、分化誘導物質に対する耐性の機序を検討した。

その結果、この耐性M1細胞の培養上清や抽出液中に、分化誘導を抑制する因子が存在することを発見した。この分化誘導抑制因子 (Inhibitory factor, I-factor) は、分化誘導可能なM1細胞にはほとんど検出されなかった。耐性M1細胞の培養上清を材料として、I-factorの精製を行った。I-factorの活性はCM-Sepharoseに結合し、0.27 - 0.4 M NaClで溶出された。この溶出画分をSephadex G-200でゲル濾過した結果、I-factorの分子サイズは不均一であった。そこで主なI-factor画分をさらにChromatofocusingで分画した。このI-factorは分子量6 -

8万，等電点8.8－9.0で，トリプシンや熱（75℃，30分）処理で失活したので，塩基性蛋白質と推定される。この I-factor 画分の比活性は，培養上清の約7千倍であった。

次にこの I-factor の産生を阻害する薬剤を検討した。耐性M1細胞を低濃度のアクチノマイシンD（5－10 ng/ml）で2日間処理するとI-factor の産生が阻害されることが判った。DNA合成阻害剤5－フルオロデオキシウリジンをを用いて，アクチノマイシンDと同程度に耐性M1細胞の増殖を阻害してもI-factorは阻害されなかったので，アクチノマイシンDによるI-factorの阻害は，単なる増殖阻害によるものではないと判断した。

アクチノマイシンDで処理し，I-factorの産生が阻害されている耐性細胞を分化誘導できるか否かを調べた。アクチノマイシンDで処理した耐性M1細胞を，分化誘導物質で処理した結果，分化の指標である貪食能，遊走性，マクロファージや顆粒球様細胞への形態変化等が誘導された。さらに，in vivoにおいても，感受性M1細胞と同様に分化した。そこで，耐性M1細胞をアクチノマイシンDで処理すると，I-factor活性が阻害され，さらに分化誘導物質に対する耐性が克服されることが明らかになった。したがって，このI-factorはM1細胞の耐性発現の機序に関与していると考えられる。

本研究では，分化誘導物質に対して耐性の白血病細胞が分化誘導を阻害する因子を産生していることを明らかにした。また，この因子の産生を阻害して，耐性を克服できることを見出した。さらに，耐性細胞の培養液中に検出される因子の主なものは塩基性蛋白質であることを明らかにした。このような分化誘導抑制因子の産生を阻害し，白血病細胞の分化誘導による治療法を開発することが今後の研究課題である。

## 審査結果の要旨

白血病細胞においてはしばしば、種々の薬剤によって形態的および機能的分化が誘導され、同時に増殖性が失われる。殺細胞性薬剤とは異なる原理に基づく治療法として、分化誘導性薬剤の開発が期待される所以である。この際に重大な隘路となる点が本研究の主題である分化誘導に対して抵抗性の細胞の存在である。本研究はこの抵抗性細胞の諸性質及びその原因を分析し、感受性の回復のための条件を検討したものである。

マウス骨髄性白血病細胞M1は宿主を死に至らしめる悪性細胞であり、腹水、デキサメサゾン等により顆粒球様細胞等に分化し増殖を停止する。しかし一部の細胞は分化誘導に抵抗性であり増殖を続ける。本研究ではこの細胞系から分化誘導に抵抗性の亜系M1-Rを分離し、これをモデルとし、貪食能の発現・形態の変化等を分化の指標として上記解析を行なっている。

M1-R細胞は分化誘導物質による誘導に抵抗性であるが、種々のRNA合成、蛋白質合成の阻害剤によって被誘導能を回復することが見出された。アクチノマイシンDは特にすぐれた回復効果を与え、分化誘導物質との併用により培養内の細胞を分化させ得ただけでなく、移植細胞に対しても分化を誘導し、宿主に対しては著しい延命効果を与え得ることを見出した。またM1-R細胞の抵抗性は細胞自身が生産する蛋白質性の因子に基いていてこの物質は分化誘導に対して感受性の細胞の分化をも抑制することを明かにした。

以上の研究結果は、分化誘導をより完全に進行させるための方法探究に指針を与えるものであり、ある種の白血病治療に対して期待されている分化誘導療法の可能性を高めたものといえる。この業績は学位授与に値するものと思料される。