

氏 名（本籍） 仙 波 ま り
学位の種類 博 士（医学）
学位記番号 医 第 2378 号
学位授与年月日 平成 4 年 2 月 26 日
学位授与の条件 学位規則第 4 条第 2 項該当
最 終 学 歴 昭和 56 年 3 月 31 日
早稲田大学理工学部応用化学科卒業

学位論文題目 In vitro 2 段階細胞トランスフォーメーション
の機構に関する研究 ー特に抗プロモーターと
ラジカル・スカベンジャーのプロモーション阻
害作用についてー

（主 査）

論文審査委員 教授 渡 辺 民 朗 教授 田 村 眞 理
教授 帯 刀 益 夫

論文内容要旨

発癌過程には、少なくともイニシエーションとプロモーションの2段階が存在することが、マウス皮膚癌実験で、証明されている。*In vitro*の系として培養細胞を用いたトランスフォーメーション実験系は、*in vivo* 2段階発癌実験を再現することができ、また定量性にも優れ、発癌物質のみならず、発癌プロモーターを検出できることから*in vitro*の2段階発癌実験系として有効であると考えられている。代表的なプロモーターであるTPAの生物活性は多岐にわたり報告されているがそのプロモーション作用にどの活性が直接関与しているかはいまだ明らかにされていない。そこで本研究では、BALB/3T3細胞を用いた2段階トランスフォーメーション実験で、TPAのプロモーション作用において、活性酸素の産生、リン脂質代謝の亢進、C-キナーゼの活性化に対するそれぞれ特異的な阻害剤の抗プロモーション作用を検索することによって、プロモーション作用の機構を解析した。また、活性酸素の産生に関しては、ESRスピントラッピング法を用いて、キサンチン-キサンチン酸化酵素反応で O_2^- を、フェントン反応で $\cdot OH$ を産生させ、各阻害剤の活性酸素消去能を検索した。さらにBALB/3T3細胞にTPAを処理することによって生ずる活性酸素を同定した。

トランスフォーメーション実験は、BALB/3T3細胞を $\phi 60\text{mm}$ ディッシュあたり 1×10^4 個播種し、24時間後、イニシエーターである3-methylcholanthrene (3-MC)を $0.5 \mu\text{g/ml}$ に加え、3日間処理した後、4日間新鮮培地で培養し、続いて、TPAあるいは阻害剤、活性化剤を単独に、もしくはTPAと同時に添加し、2週間処理した。細胞播種後6週目に固定、染色し、トランスフォームしたフォーカスを計数した。フォーカスの判定は、Reznikoffらの方法に従い、Ⅲ型のフォーカスのみをトランスフォームしたフォーカスとして計数した。阻害剤のプロモーション阻害効果は、陽性対照群(3-MC+TPA)に対する阻害率で表した。

既知の抗プロモーターであるレチノイン酸の抗プロモーション作用は、濃度依存的に強くなり、 $1 \mu\text{g/ml}$ で完全にTPAのプロモーション作用を抑えた。*in vitro*のトランスフォーメーション実験系においてもその作用が認められたことから、この系で抗プロモーターの検索が有効に行われることが明らかとなった。抗酸化剤およびラジカル・スカベンジャーのプロモーション抑制作用について検討したところ、butylhydroxyanisoleに $0.5 \mu\text{g/ml}$ で、47%の抑制能がみられた。ラジカル・スカベンジャーの中では、 $\cdot OH$ のスカベンジャーであるmannitol (MT)が特に強い抗プロモーション作用を示し、濃度依存性を持って 10mg/ml で71%、SODは、 50U/ml で39%、catalaseは、 100U/ml で、32%まで阻害した。またリン脂質代謝阻害剤とC-キナーゼ阻害剤の抗プロモーション作用を検索した結果、用いたすべての阻害剤にTPAに対する抗プロモーション

ン作用が認められた。また、C-キナーゼ活性化剤である diacylglycerol の *in vitro* におけるプロモーション作用がラジカル・スカベンジャーによって抑えられるという結果も得られた。

次に、抗酸化剤、リン脂質代謝阻害剤、C-キナーゼ阻害剤について、 O_2^- および $\cdot OH$ 消去効果を ESR で直接測定した結果、リポキシゲナーゼ阻害剤に O_2^- 消去効果があり、MT とイソキノリン系 C-キナーゼ阻害剤に $\cdot OH$ 消去効果のあることが確かめられた。また、その効果には濃度依存性もみられた。従って、これらの阻害剤は、酵素活性を抑制するだけでなく、ラジカルを直接トラップすることによって抗プロモーション作用が強くあらわれたと考えられる。37°C、5% CO_2 の条件下で 5×10^6 個になるまで増殖させた BALB/3T3 細胞に各濃度の TPA を 5 分間処理し、ホモジナイズして細胞を破碎した後、細胞破碎液 200 μl に 5,5-dimethyl-1-pyrroline-1-oxide (DMPO) 原液を 15 μl 加え、ESR で測定した。その結果、TPA を BALB/3T3 細胞に処理すると DMPO-OH アダクトのスペクトルが検出され、濃度依存的に強さを増す傾向がみられた。フェントン反応系で $\cdot OH$ 消去能の認められた MT に、他のラジカル・スカベンジャーに比較してより強い抗プロモーション作用が現れたこと、そして BALB/3T3 細胞に TPA を処理すると $\cdot OH$ が産生し、産生量が、濃度依存的に増大することが、ESR 法によって直接確かめられたことから、TPA のプロモーション作用には、リン脂質代謝の亢進や C-キナーゼの活性化だけでなく、それらの活性化に伴う活性酸素の産生、特に $\cdot OH$ が強く関与していることが明らかになった。

審査結果の要旨

化学物質による発癌過程は多段階の細胞の変異を経て進行すると考える。それは、少なくとも、イニシエーションとプロモーション過程に分けられるが、さらに、プロモーションステップにも数段階のあることを皮膚癌発生の実験から推定されている。そして、一般的にはイニシエーション過程では発癌物質と標的細胞の DNA との直接作用により、細胞変異をもたらし、プロモーション過程では変異細胞が分裂増殖を通して、遺伝子の活性化により、癌細胞へと転換するものと考えられている。そこで、*in vivo* の実験系に類似した *in vitro* の細胞トランスフォーメーション系を、2段階の実験系のもとで、定量性をも加味しつつ、種々の実験をした。

in vitro の培養細胞系として、角永の樹立したマウス BALB/3T3 クローン A-31-1-1 細胞を使用した。イニシエーターとして3-メチルコラントレン 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を3日間処理した。続いて代表的なプロモーターである12-テトラデカノイルフォルボール13-アセテート (TPA) を用いた。TPA の後に、阻害剤、または活性化剤を投与したり、または TPA と同時に培地に添加したりして、2週間処理し、プロモーションへの効果を観察している。

実験結果として(1)レチノイン酸の抗プロモーション作用、(2)抗酸化剤であるブチルヒドロキシアニソールは強い阻害効果があり、(3)ラジカルスカベンジャーのスーパーオキシドジスムターゼ、カタラーゼ、マンニトールの抗プロモーションも認められた。次いで(4)リン脂質代謝阻害剤であるフォスホリパーゼ阻害剤のヒドロコチゾンと p-プロモフェナシルプロマイド、リボキシゲナーゼ阻害剤のケルセチン、ノルジヒドロログアイアレオック酸は総て抗プロモーション作用が認められた。また、(5)C キナーゼ阻害剤としてパルミトール-D, L-カルニチン、1-(5-イソチノリンスルフォニル)-2-メチルピペラジン-2-ヒドロクロライド、そしてスタロスポリンは共に抗プロモーション効果を持つが、C キナーゼ活性化剤はそれ程著明な増強効果が認められなかった。

次に電子スピン共鳴 (ESR) スピントラッピング法を用いて、各阻害剤のスーパーオキシドアニオン、ヒドロキシラジカルへの作用を検索した結果、強い抗プロモーション作用を示す阻害剤に、活性酸素の消去作用があることを認めた。また、BALB/3T3 細胞にプロモーター TPA を添加すると、濃度依存的に、ヒドロキシラジカルの産出が増大した。

以上のことから、*in vitro* 系での TPA のプロモーション作用には、リン脂質代謝の亢進や C キナーゼの活性化のみならず、発生する活性酵素、特にヒドロキシラジカルが強く関与していることを証明した。

以上の研究成果についての論文内容は学位授与に値するものと判定する。