

学位論文題名

ESTABLISHMENT OF RETINOBLASTOMA CELL LINES
FROM CLINICAL SPECIMENS : GROWTH PROMOTING
EFFECT OF 2-MERCAPTOETHANOL ON
RETINOBLASTOMA CELLS IN PRIMARY CULTURE

(網膜芽細胞腫細胞株の樹立, 特に2-メルカプトエタノールによる
網膜芽細胞腫の初代培養に於ける増殖促進作用について)

学位論文内容の要旨

癌、特に固形癌に対して有効な抗癌剤を開発する事は癌研究者に課せられた火急の義務ではあるがその目的の達成は非常に困難である。その理由の一つとして、研究の戦略の土台となる可き癌細胞に関する基礎知識がそれほど多くないという事が挙げられる。嘗て1970年初頭頃までは、癌の基礎研究者は無意識の中に「癌細胞とは、癌という全く同じ共通した性質を持った細胞群である。」と考える傾向があった。それで例えば癌細胞の生物学的性質や薬剤感受性等を調べる時に、限られた種類のマウスやラットの移植癌を使って全部の癌細胞を説明しているとする事が多かった。勿論その考え方からも多くの抗癌剤が選択されたが更により優れた抗癌剤を開発する為にはどうしても癌細胞の基礎的性質をより深く知る必要がある。近年、癌細胞の性質は臨床的に人体内に於て(「制御から外れた増殖能及び転移能」といった癌細胞としての性質を別にすれば)その由来した細胞の正常な時の性質を予想以上に保持している事が分かって来ている。即ち、同じ臓器癌同志は似通った生物学的性質ひいては薬剤感受性を示す事が多いのである。又、癌細胞は細胞株としてイン・ヴィトロで培養されてもそれ程体内に於ける性質を失わない事も報告されている。従って同じ臓器由来の癌の一揃いの細胞株群を樹立する事はその癌の生物学的研究或いはその癌に対する抗癌剤を開発する上で非常に有益である。然しながら初代培養はいったん株化した細胞の培養に比べて格段に困難な事が多くこれも同じ型の癌同志で同じ様な栄養要求性

を示すらしいという事が認められているが肺小細胞癌等の一、二の例外を除けば殆ど開発されていない。

本研究では網膜芽細胞腫細胞の初代培養及び株細胞系の樹立の条件が研究された。網膜芽細胞腫はその発症が癌抑制遺伝子の脱落による事が明確に証明された癌であり人体に於ける発癌の機構の研究等の材料に重要な癌である。又この癌は固形癌の中では比較的放射線及び薬剤に対する感受性が高いので、抗癌剤あるいは治療法の開発の良いモデルとなり得る。しかし発生率が低い(約150、000例中1例)等の理由で、研究に利用可能な継代培養細胞株は世界で二例のみと非常に少ない。そこで臨床材料から得られる網膜芽細胞腫細胞の初代培養及び株化を可能にする培養液の作製及びそれを用いて細胞の株化を試みた。

作製した液体培地の組成はHamburger及びSalmonにより樹立された二重軟寒天培地の上層培地の組成を基礎にしている。この培地を用いた彼らのは最も信頼性のある薬剤感受性試験とされているが骨髓腫細胞のデーターを基礎として処方されたものであって手術材料から取り出した網膜芽細胞腫の初代細胞のコロニー形成の成功率(5×10^5 の細胞から30個以上のコロニーを得た試料の割合)は36%(4/11)と低かった。そこでまず網膜芽細胞腫細胞の継代株であるY-79及びWERI-RB1を用いて、軟寒天培地の各成分を検討して改良を試みた。成分の一つであるDEAE-デキストランは細胞に対して毒性を示したので除外した。更に2-メルカプトエタノール、アスパラギンを除外し、牛胎児血清、ピルヴィン酸・ナトリウム、セリン等を加えた。この軟寒天培地中で、Hamburgerらの培地中の場合よりも高い網膜芽細胞腫細胞の継代株のコロニー形成率が得られた。然しながら、(全く予想に反して)手術材料から得られる初代網膜芽細胞腫の細胞はこの軟寒天培地中では、全くコロニーを作らなかった。Hamburger等の軟寒天培地では少ないながらもコロニー形成は見られたという事実は、先に取り除いた2-メルカプトエタノールとアスパラギンが軟寒天中の初代細胞のコロニー形成に何らかの役割を果たしている事を示唆するので2-メルカプトエタノールとアスパラギンを改良した軟寒天培地の成分に加えた。この二番目の軟寒天培地での初代網膜芽細胞腫の細胞コロニー形成の成功率は87%(14/16)と明らかに改良されていた。上記の二つの軟寒天培地と同じ成分で、寒天だけを除いた二種類の液体培地—即ち、他の成分は全て共通で2-メルカプトエタノールとアスパラギンを含む培地(RB⁺⁺培地)と含まない培地(RB⁻⁻培地)—を用いて手術材

料より得られる網膜芽細胞腫の細胞の初代培養と細胞株の樹立を試みた。原発の網膜芽細胞腫の手術材料より得られた細胞に於て、一年以上増殖可能であった症例はRB⁻培地中では12例中1例のみであったが、RB⁺⁺培地中では16例中6例であった。RB⁺⁺培地では再発及び転移症例からの網膜芽細胞腫細胞の初代培養も試みたが、再発例からの材料では2例中2例、転移症例からの材料では3例中3例が1年以上増殖を続けた。

2-メルカプトエタノールとアスパラギンの何れか或いはその両方が網膜芽細胞腫の初代細胞にとって必要であった訳であるが片方ずつを除いた軟寒天培地及び液体培地を用いて調べた所、2-メルカプトエタノールのみが網膜芽細胞腫の初代細胞にとって必要である事が示された。2-メルカプトエタノールの細胞増殖に対する刺激作用はリンパ球、白血球細胞或いは白血病細胞の様な血液系細胞では良く知られているが網膜芽細胞腫細胞に於ては初めての知見である。マウス白血病細胞L1210株に於て2-メルカプトエタノールは培地中のシスチンと混合ジスルフィドを作ってシスチン要求性の細胞のシスチン輸送を助ける事によって増殖を支持している事が証明されている。網膜芽細胞腫細胞の場合も、2-メルカプトエタノールの増殖刺激作用はL1210の場合と同様の機構によって増殖刺激している事が示された。

網膜芽細胞腫細胞の初代培養に適当な液体培地を開発した。この培地は全ての初代網膜芽細胞腫細胞の少なくとも短期の培養を可能にした。又、本研究に於て、全部で原発巣由来の網膜芽細胞腫7株、再発癌由来網膜芽細胞腫2株、転移巣由来の網膜芽細胞腫3株の継代培養細胞株の樹立に成功した。これらの細胞株は人体に於ける発癌機構の分子生物学的研究、並びに網膜芽細胞腫の治療向上の研究に役立つと思われる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 引 地 邦 男
副 査 教 授 戸 倉 清 一
副 査 教 授 吉 田 廸 弘
副 査 教 授 西 村 紳一郎

学 位 論 文 題 名

ESTABLISHMENT OF RETINOBLASTOMA CELL LINES FROM CLINICAL SPECIMENS : GROWTH PROMOTING EFFECT OF 2-MERCAPTOETHANOL ON RETINOBLASTOMA CELLS IN PRIMARY CULTURE

(網膜芽細胞腫細胞株の樹立, 特に2-メルカプトエタノールによる
網膜芽細胞腫の初代培養に於ける増殖促進作用について)

癌、特に固形癌に対して有効な抗癌剤を開発することは癌研究者に課せられた火急の義務であるが、その目的達成は容易なことではない。癌治療の最前線でも1970年代までは“癌細胞とは、癌と言う全く同じあるいは共通した性質を持つ細胞群である”と考え癌細胞の生物学的性質や薬剤感受性を調べる時も、限られた種類のマウスやラットの移植癌細胞を使って研究し、その結果を全ての癌細胞共通の生物学的性質あるいは薬剤感受性として説明する傾向があった。近年、同じ臓器癌は似た様な生物学的性質さらには薬剤感受性を持つことが明らかにされてきた。また癌細胞の初代培養によって同じ臓器由来の癌細胞株群を樹立することは、癌細胞の生理学的研究のうえで非常に有益なことと考えられるようになってきた。

申請者は比較的症状発現が早く切除で治癒する例は多いが、転移を始めると治療が非常に難しい網膜芽細胞腫細胞が癌抑制遺伝子の脱落により発症までの期間が非常に短いことに注目して、この細胞の初代培養と株細胞系樹立の条件について研究した。また、この癌細胞は固形癌の中でも放射線や薬剤への感受性が高いので、発癌機構の研究に加えて化学療法剤開発の上でも有用と考えた。液体培地の組成はHamburgerおよびSalmonにより樹立された二重軟寒天培地の上層培地の組成を基礎にしている。この成功率 (5×10^5 の細胞から30個以上のコロニーを得た試料の割合) は36% (4 /

11)と低かった。次いで網膜芽細胞腫細胞の継代株を用いて、軟寒天培地の各成分を検討し、まず成分の一つであるDEAE-デキストランは細胞毒性を示したので除外した。さらに2-メルカプトエタノール、アスパラギンを除き、牛胎児血清、ピルビン酸ナトリウム、セリン等を加えた軟寒天培地中ではHamburgerらの場合よりも高い網膜芽細胞腫細胞の継代株のコロニー形成率が得られた。しかし、手術材料から得られる初代網膜芽細胞株の細胞はこの軟寒天培地中では、全くコロニーを作らなかった。そこで先に取り除いた2-メルカプトエタノールとアスパラギンを改良した軟寒天培地の成分に加えたところ、初代網膜芽細胞株の細胞コロニー形成の成功率は87% (14/16)と明らかに高くなった。上記の二つの軟寒天培地と同じ成分で、寒天だけを除いた2種類の液体培地—即ち他の成分は全て共通で2-メルカプトエタノールとアスパラギンを含む培地(RB⁺培地)と含まない培地(RB⁻培地)—を用いて手術材料より得られる網膜芽細胞腫の細胞の初代培養と細胞株の樹立を試みた。原発の網膜芽細胞腫の手術材料より得られた細胞において、一年以上増殖可能であった症例はRB⁻培地中では12例中1例のみであったが、RB⁺培地中では16例中6例であった。RB⁺培地では再発および転移症例からの網膜芽細胞腫細胞の初代培養では、再発例からの材料では2例中2例、転移症例では3例中3例が1年以上増殖を続けた。

2-メルカプトエタノールとアスパラギンのいずれか一方ずつを除いた軟寒天培地および液体培地を用いて調べたところ、2-メルカプトエタノールのみが網膜芽細胞腫の初代細胞にとって必要である事が示された。2-メルカプトエタノールの細胞増殖に対する刺激作用は血液系細胞では良く知られているが網膜芽細胞腫細胞においては初めての知見である。マウス白血病細胞L1210株において2-メルカプトエタノールは培地中のシスチンと混合ジスルフィドを作ってシステイン要求性の細胞へのシステイン輸送を促進することによって増殖を刺激している事が証明されている。網膜芽細胞腫細胞の場合も、L1210の場合と同様の機構によって増殖を刺激していることが示された。

本研究で樹立に成功した一連の細胞株は今後発癌機構の分子生物学的研究、並びに網膜芽細胞腫治療の研究上非常に有意義といえる。よって審査員一同は申請者が博士(理学)の学位を得る十分な資格があると認めた。