

学 位 論 文 題 名

ソルコセリルによるヒト肺小細胞癌株PC-6の神経分化誘導

学位論文内容の要旨

I 研究目的

ソルコセリルは幼牛血液から抽出された製剤で組織呼吸賦活作用を有する。ヒト肺小細胞癌株PC-6は多くの癌研究に用いられているが、その細胞はdibutyl cAMPまたはdimethyl sulfoxideによる処理で神経分化誘導される。著者は細胞内ミトコンドリアに取り込まれ細胞の生死判定に有用なRhodamin123を用いて研究を進めていた。そしてミトコンドリアを活性化させる目的でPC-6細胞をソルコセリルで処理したところ、細胞の著しい形態変化が認められ増殖が抑制された。そこでPC-6細胞におけるソルコセリルの細胞増殖に及ぼす影響、分化誘導作用の有無及び癌遺伝子産物ras p21の関与について検討した。

II 方法

1) 細胞株及び細胞培養：ヒト肺小細胞癌株PC-6を用いた。継代培養は25 α^2 組織培養フラスコを使用して、5%CO₂, 37℃の条件下で行った。培養液はRPMI-1640に10%胎仔牛血清及びゲンタマイシンを加えて作製し、ソルコセリルを加えた場合も週2回液交換した。2) 細胞増殖曲線：6wellのマイクロプレートを使用し、5 $\times 10^4$ /wellの細胞を培養した。2日後に各種濃度のソルコセリルを加えた培養液と交換後培養を継続し細胞数を測定して細胞増殖曲線を描いた。3) 細胞形態及び細胞免疫化学染色：5 $\times 10^5$ の細胞を直径60mmの組織培養ディッシュを用いて培養した。2日後に200 μ l/mlの濃度のソルコセリルを加えた培養液と交換し、経時的に細胞形態を観察した。組織培養ディッシュに入れたセルデスクを用いて通常の方法でパパニコロー染色、ニューロフィラメント及びras p21に対する免疫染色を行った(抗体：各々マウス抗ヒトニューロフィラメント抗体2F11, 葛巻らにより作製されたras p21に対するマウスモノクローナル抗体rp-35)。4) フローサイトメトリー：5 $\times 10^5$ の細胞を直径60mmの組織培養ディッシュを用いて2日間培養した後200 μ l/mlの濃度のソルコセリルを加えた培養液で3から10日間培養した。その後以下の測定を行った。

a) Ki-67の発現：培養細胞をトリプシン+EDTAで処理後95%アセトンで-20℃, 30分間固定した。PBSで洗浄後10%ウサギ血清で4℃, 5分間処理しマウスモノクローナル抗体Ki-67を1:50の濃度で4℃, 30分間反応させた。次にFITC標識ウサギ抗マウス免疫グロブリン抗体を1:100の濃度で4℃, 30分間反応させた。その後FACScanで蛍光強度を測定した。b) ニューロフィラメント, アセチルコリンエステラーゼ及びras p21の発現：Ki-67の蛍光染色と同様の手順で行った。総細胞数を2.5 $\times 10^6$ にして70%エタノールで4℃, 30分間固定した。使用した各種モノクローナル抗体の種類, 希釈濃度, 及び反応時間は次の通りである。ニューロフィラメント; マウス抗ヒトニューロフィラメント抗体2F11, 希釈濃度1:100. アセチルコリンエステラーゼ; マウス抗アセチルコリンエステラーゼ抗体, 希釈濃度1:200. ras p21; 葛巻らにより作製されたras p21に対するマウスモノクローナル抗体rp-35, 希釈濃度1:50. 全ての一次抗体及びFITC標識免疫グロブリン抗体は4℃, 30分間反応させた。

Ⅲ 結果

ソルコセリルの細胞増殖に及ぼす影響は、培養液に加えたソルコセリルの濃度が50 μ l/mlでは増殖抑制効果は認められなかったが、100 μ l/ml以上では増殖が抑制され200 μ l/mlでは増殖が停止した。細胞形態はソルコセリルが200 μ l/mlの濃度では胞体が増大し細長い神経細胞様突起が出現した。またソルコセリルで細胞を10日間処理後、ソルコセリルを含まない培養液にもどしてさらに14日間培養したところ、ソルコセリル処理前と同じく類円形の形態を取りコロニー状に細胞増殖を再開した細胞群と増殖を再開せず細長い細胞突起を出し網目状に広がった細胞群の二群を認めた。ニューロフィラメントに対する免疫染色はソルコセリル処理により陰性から弱陽性になったが、ras p21に対する免疫染色はソルコセリル処理前後で同じく弱陽性であった。フローサイトメトリーを用いて蛍光強度を測定した結果、ソルコセリルを加えた場合Ki-67の発現が陰性化し細胞回転が抑制されていた。ニューロフィラメント、アセチルコリンエステラーゼ及びras p21の発現の変化ではいずれにおいてもソルコセリル処理により発現の数倍増加している細胞群が出現した。定量性に乏しい免疫染色では検出されなかったras p21の発現が増加した細胞群の出現が、フローサイトメトリーを用いることによって検出された。

Ⅳ 考察

ソルコセリルの成分分析ではその活性物質は①既知の無機物、アミノ酸などではない②分子量が約1500のニンヒドリン陽性物質③グリコステロイド並びにグリコスフィンゴリピッドの構造を有するグリコリピッドなどの報告がある。しかしPC-6細胞の形態を変化させ増殖を抑制する活性物質がこれらの既に報告されている活性物質と同一であるかは不明である。ソルコセリルのミトコンドリアの呼吸賦活による酸素消費量増加作用は結果的に細胞内のADP、cAMPの増加を引き起こし、dibutyryl cAMP処理による分化誘導の報告と類似の現象を見ている可能性もある。今後ソルコセリルの活性物質に関してさらに明らかにされる必要がある。活性物質の濃度に関しては100 μ l/ml以上で増殖抑制効果が認められており、ソルコセリル中の活性物質濃度が低いことを示唆している。著者は培養液にソルコセリルを加えたが、その濃度が200 μ l/mlでは細胞は増殖を停止し胞体から神経細胞様突起が出現した。またKi-67の発現が陰性化し細胞回転が抑制された。さらにニューロフィラメント、アセチルコリンエステラーゼの発現が増加している細胞群が出現した。即ち、潜在的神経分化能を有している細胞がソルコセリルにより神経分化誘導された結果細胞が形態変化しニューロフィラメント及びアセチルコリンエステラーゼが増加したのであろう。ras遺伝子産物が直接的に神経分化誘導作用を有すること及び神経分化誘導のシグナル伝達に関与していることが報告されている。本研究においてもソルコセリル処理によりras p21発現の増加した細胞群を認めており、ソルコセリルによるPC-6細胞の神経分化誘導効果においてもras遺伝子産物が何らかの形で関与したことが示唆される。但し、ras遺伝子産物が神経分化誘導のシグナル伝達系に直接関与したのか、あるいは分化誘導の結果ras遺伝子産物の発現が増加したのかについては今後の検討を待つ必要がある。

Ⅴ 結語

ソルコセリルを200 μ l/mlの濃度で培養液に加えた場合、次の所見が認められた。

1)細胞の著明な形態変化 2)細胞の増殖停止 3)ニューロフィラメント、アセチルコリンエステラーゼ及びras p21の発現が増加している細胞群の出現。幼牛血液の抽出製剤であるソルコセリルの中に肺小細胞癌株PC-6を神経分化誘導させる物質が含まれている可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 川 上 義 和

副 査 教 授 細 川 真澄男

副 査 教 授 浅 香 正 博

学 位 論 文 題 名

ソルコセリルによるヒト肺小細胞癌株PC-6の神経分化誘導

ソルコセリルは幼牛血液から抽出された製剤で組織呼吸賦活作用を有する。ヒト肺小細胞癌株PC-6は多くの癌研究に用いられているが、PC-6細胞はdibutyl cAMPまたはdimethyl sulfoxideによる処理で神経分化誘導されることが報告されている。私は細胞内ミトコンドリアに取り込まれ細胞の生死判定に有用なRhodamin123を用いた研究を進めていた。そしてミトコンドリアを活性化させる目的でPC-6細胞をソルコセリルで処理したところ、細胞の著しい形態変化が認められ増殖が抑制された。そこでPC-6細胞におけるソルコセリルの細胞増殖に及ぼす影響、分化誘導作用の有無及び癌遺伝子産物ras p21の関与について検討した。ヒト肺小細胞癌株PC-6を用いた。培養液は10%胎仔牛血清加RPMI-1640で5%CO₂、37℃の条件下にて継代培養した。1)細胞増殖曲線：6wellのマイクロプレートを使用して細胞を培養した。2日後に各種濃度のソルコセリルを加えた培養液と交換してさらに培養を継続し細胞数を測定して細胞増殖曲線を描いた。その結果ソルコセリルの濃度が200 μ l/mlで細胞の増殖が停止したため、この濃度で以下の実験を進めた。2)細胞形態及び細胞免疫化学染色：細胞を2日間培養した後ソルコセリルを加えた培養液と交換し、経時的に細胞形態を観察した。組織培養ディッシュに入れたセルデスクを用いて通常の方法でパパニコロー染色、ニューロフィラメント及びras p21に対する免疫染色を行った。3)フローサイトメトリー：細胞を2日間培養した後ソルコセリルを加えた培養液でさらに3から10日間培養した。その後以下の測定を行った。a)Ki-67の発現：培養細胞をトリプシン+EDTAで処理後アセトン固定した後ウサギ血清で処理しマウスモノクローナル抗体Ki-67を反応させた。次にFITC標識ウサギ抗マウス免疫グロブリン抗体を反応させ、FACS canで蛍光強度を測定した。b)ニューロフィラメント、アセチルコリンエステラーゼ及びras p21の発現：Ki-67の蛍光染色と同様の手順で行った。ソルコセリルの細胞増殖に及ぼす影響は、培養液に加えたソルコセリルの濃度が50 μ l/mlでは増殖抑制効果は認められなかったが、100 μ l/ml以上では増殖が抑制され200 μ l/mlでは増殖が停止した。細胞形態はソ

ソルコセリルが200 μ l/mlの濃度では胞体が増大し細長い神経細胞様突起が出現した。またソルコセリルで細胞を10日間処理後、ソルコセリルを含まない培養液にもどしてさらに14日間培養したところ、ソルコセリル処理前と同じく類円形の形態を取りコロニー状に細胞増殖を再開した細胞群と増殖を再開せず細長い突起を出し網目状に広がった細胞群の二群を認めた。ニューロフィラメントに対する免疫染色はソルコセリル処理により陰性から弱陽性になったが、ras p21に対する免疫染色はソルコセリル処理前後で同じく弱陽性であった。フローサイトメトリーを用いて蛍光強度を測定した結果、ソルコセリルを加えた場合Ki-67の発現が陰性化し細胞回転が抑制されていた。ニューロフィラメント、アセチルコリンエステラーゼ及びras p21の発現の変化ではいずれにおいてもソルコセリル処理により発現の数倍増加している細胞群が出現した。定量性に乏しい免疫染色では検出されなかったras p21の発現が増加した細胞群の出現が、フローサイトメトリーを用いることによって検出された。ソルコセリルを200 μ l/mlの濃度で培養液に加えた場合、次の所見が認められた。1) 細胞の著明な形態変化、2) 細胞の増殖停止、3) ニューロフィラメント、アセチルコリンエステラーゼ及びras p21の発現が増加している細胞群の出現。潜在的神経分化能を有している細胞がソルコセリルにより神経分化誘導され形態変化しニューロフィラメント及びアセチルコリンエステラーゼが増加したと考えられた。幼牛血液の抽出製剤であるソルコセリルの中に肺小細胞癌株PC-6を神経分化誘導させる物質が含まれている可能性が示唆された。

審査に当たって、副査細川教授から1) ソルコセリルを除去後に再増殖する細胞群は分化した細胞か、2) ras蛋白と神経分化の関係、3) ソルコセリルの潰瘍に対する有効成分と分化誘導効果における有効成分は同一であるのか、4) 癌の分化誘導剤あるいは癌治療薬としての可能性について質問があった。次いで副査浅香教授から1) ソルコセリルに着目した理由、2) ソルコセリルは細胞に対してcytostaticあるいはcytotoxicに作用するのか、3) neuroendocrine markerとしてNSEの発現について、4) 他の分化誘導剤との比較について質問があった。次いで菅野教授から1) 神経分化誘導の機序、2) 細胞呼吸の変化について質問があった。最後に主査川上教授から1) ソルコセリルのロット間での効果の違い、2) 臨床応用の可能性について質問、コメントがあった。申請者はこれらの質問に対して適切な回答を行った。審査員一同は、本研究をソルコセリルによる肺小細胞癌株の神経分化誘導の可能性を検討した研究として高く評価し、申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。