



Ethyl nitrosourea 経胎盤誘発脳腫瘍モデルにおける 12-O-tetradecaoyl-phorbol-13-acetate の発癌促進 効果

穀内, 隆

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1991-01-23

(Date of Publication)

2012-07-13

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙1488

(JaLCD0I)

<https://doi.org/10.11501/3057254>

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2001488>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・(本籍)	こく 穀	ない 内	たかし 隆	(兵庫県)
学位の種類	医学博士			
学位記番号	医博ろ第1206号			
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当			
学位授与の日付	平成3年1月23日			
学位論文題目	Ethylnitrosourea 経胎盤誘発脳腫瘍モデルにおける 12-0-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate の発癌促進効果			
審査委員	主査	教授	松本	悟
		教授	高井	義美
			教授	伊東
				宏

論文内容の要旨

緒言

マウス皮膚発癌モデルにおいて二段階発癌理論が証明されて以来、種々の臓器、培養系等において、各種発癌プロモーターが報告されている。なかでも croton triglium より分離された diterpene alcohol phorbol ester は、最も強力な発癌プロモーターであり、とくに12-0-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate (TPA) は、各種組織に対して発癌促進作用をしめすとされている。一方、脳腫瘍モデルにおいては、発癌プロモーターの作用は、現在まで報告されていない。本論文では、Ethylnitrosourea (ENU) 経胎盤誘発脳腫瘍モデルにおけるTPAの発癌促進効果を、in vivo-in vitro assay 系およびENU誘発後の microtumor 発生過程の両面より検討を加えた。

方法

1, in vivo でのENU処理。

妊娠18日目のSD-JCLラットに対してENUを50mg/kg i.p.を行った。またENUの溶解液のみを投与したラットを対照群とした。ENU投与72時間後に、胎仔脳組織を単離し培養系に移した。

2, 培養系での発癌プロモーター処理。

ENU投与およびENU非投与胎仔脳細胞を以下の6群に分けた。1), 無処理, 2), アセトン (0.01% V/V), 3), TPA (0.1ng/ml), 4), TPA (1.0ng/ml), 5), TPA (10.0ng/ml), および6), TPA (50.0ng/ml) 処理。なおTPAは、アセトン溶解後、培養液で希釈し週2回交換した。

3, in vitro での発癌過程の解析。

1), 形態学的変化。

2), 細胞増殖能の変化。

3), 軟寒天上でのコロニー形成能の変化。

4), 植物凝集素 concanavalin A (Con A) に対する細胞凝集能の変化。

5), in vivo への可移植性の変化。

6), Glial fibrillary acidic protein (GFAP) および S-100蛋白の免疫組織学的解析。

以上の6つの指標を用いて細胞の悪性変化の過程を経時的に解析した。

4, in vivo での microtumor 発生に及ぼす変化。

妊娠18日目のSD-JCLラット24匹に対してENU (50mg/kg i.p.) を投与後、以下の6群に分け各種処理を加えた。1), 無処理群, 2), 0.01%アセトン, 3), TPA 0.1ug/kg, 4), TPA 1.0ug/kg, 5), TPA 10.0ug/kgおよび6), TPA 50.0ug/kg処理群。TPAおよびアセトンの投与は、胎生期は連日、出生後は生後20週まで週2回投与を行った。その後、各群4匹づつ新生仔ラットを、1, 3, 5, 7, 10, 12, 15および20週令に屠殺し摘出脳における microtumor の発生過程を組織学的に検討した。

結果

1, 培養ラット胎仔脳細胞の悪性変化。

1), 形態学的変化。

TPA添加ENU処理群では、培養30日目に典型的な“piled up focus”を示し始めたのに対して、TPA非添加ENU処理群では“piled up focus”の出現は、培養120日目以後に認められた。各群の細胞形態をみると、TPA添加ENU処理群では培養90日目頃より胞体の縮小化と bipolar な細長い突起が認められたが、TPA非添加ENU処理群では、初代培養時の形態を保っていた。なお初代培養時より癌性変化を来した時点まで、GFAPおよび S-100蛋白はTPAの処理の有無にかかわらず陽性所見を維持していた。

2), 細胞増殖能の変化。

培養30日目頃より、TPA添加ENU処理群では、世代交代時間が急速に促進し (23.80 ± 2.90 時間), TPA非添加ENU処理群の 36.20 ± 3.10 時間に比べて有意差を認めた。

3), 軟寒天上でのコロニー形成能の変化。

TPA添加ENU処理群では、培養40日目にコロニー形成能を獲得したが、TPA非添加ENU処理群ではコロニー形成能の獲得は培養150日目に認められた。

4), Con A 凝集能の変化。

Con A 凝集能の亢進は、TPA添加ENU処理群の細胞では培養30日目に、またTPA非添加ENU処理群の細胞では培養90日目に認められた。

5), in vivo への可移植性の変化

TPA添加ENU処理群では、培養60日目ですでに12.5~25.0%の可移植性を獲得したのに対して、TPA非添加ENU処理群では培養150日目に10%の可移植性が認められた。

脳内移植組織の所見では、TPA添加ENU処理群において、高い細胞密度を示し、細胞形態は isomorphic であった。一方TPA非添加ENU処理群では、より疎な細胞配列を示し壊死部および多核巨細胞を多く含み細胞形態は pleomorphic であった。

2, in vivo での microtumor 発生過程に及ぼす変化。

ENU処理群における microtumor の出現は生後10週令で認められたが、TPAとENU処理群では生後3週令より、microtumor の発生を認めた。

microtumor の発生部位をみると、ENU処理群では脳室上衣下と白質に発生しているに対して、TPA処理を加えた群では、皮質にも microtumor の発生を認めた。

考察

正常細胞の悪性変化を解析する指標として、“piled up focus”の出現、軟寒天上でのコロニー形成能の獲得、植物凝集素 Con A に対する凝集能の亢進、contact inhibition の消失、plasminogen activator の誘導、fibronectin 量の減少、in vivo への可移植性の獲得などが報告されている。なかでも軟寒天上でのコロニー形成能及び可移植性の獲得の2点の指標が正常細胞の悪性変化を最も良く反映すると指摘されている。Laerum と Rajewsky は、ENU経胎盤誘発後の胎仔脳細胞の悪性変化の過程を検討し、“piled up focus”は培養40~100日目に出現し、軟寒天上でのコロニー形成能の獲得は培養100~200日目に認められ、可移植性の獲得は培養200日目以降であったと述べている。今回の報告では、ENUを経胎盤的に投与された胎仔脳細胞に対して持続的にTPAを作用させると、培養早期に世代交代時間の短縮を認め、また“piled up focus”の出現は ENU 処理群に比べ約90日早期に認められた。さらに軟寒天上でのコロニー形成能は、ENU処理群に比べ約110日早期に出現し、可移植性の獲得は約90日早期に認められた。以上のごとく、ENUを発癌剤として投与された胎仔脳細胞の悪性変化に対して、TPAが強いプロモーター作用を示した点が明らかとなった。さらに in vivo でのENU経胎盤誘発後の microtumor の発生に対して、TPAが発癌促進効果を示すことが明らかとなった。また phorbol ester の各種マウス臓器への結合親和性に関して、脳組織が他の臓器に比べてより高い結合能（皮膚の7.5倍）を示すといわれており、かつ phorbol ester receptor と発癌促進効果とは相関性があると報告されている。このような観点からも、TPAが脳組織に強い親和性を有しており、実験脳腫瘍モデルにおいて、発癌プロモーターとして作用することは理論的にも推測しうる点と考えられる。

現在までに神経系組織に対するTPAの作用を検討した報告は数少なく、わずかに神経芽細胞腫における neurite の形成をTPAが阻害したとする報告と、胎仔ニワトリ神経節細胞の neurite 成長を誘導する神経成長因子の作用を、TPAが阻害したとする報告にすぎない。このように中枢神経系の発癌モデルにおいて、二段階発癌理論が応用されるという今回の結果は、今後の脳腫瘍の発生増大過程を解明する上で、ひとつの糸口になりうると考えられる。さらに、細胞分化と発癌との関連に関し

てTPAがいかなる作用をはたしているのか、発癌遺伝子との関連も含めて今後の発展が期待しうる。

論文審査の結果の要旨

一般にマウス皮膚発癌モデルにおいては、発癌二段階説が提唱され、その機構が明らかになってきている。以来各種臓器における発癌プロモーターの報告もなされてきたが、脳腫瘍モデルにおいては、いまだなされていない。本申請者は、脳腫瘍モデルにおける発癌プロモーター存在の可能性を考え以下の実験を行なった。

すなわち、Ethylnitrosourea 経胎盤誘発脳腫瘍モデルに対し、皮膚発癌プロモーターの一つである12-0-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate (TPA) の発癌促進効果を *in vivo-in vitro* assay 系で、およびENU誘発 microtumor の発生過程で検討した。まず、妊娠18日目SD-JCLラットに、ENUを腹腔内投与し、その後72時間で胎仔脳組織を単離し、それらをTPAの段階的一定量を添加し培養系に移し、それら培養脳細胞の発癌促進過程を、TPA非添加群と比較して検討した。第2段階としては、ENU投与妊娠ラット群に対し、TPAを連日添加、ついで出生後新生仔に20週令まで定期的に投与し、その間の仔ラット脳内 microtumor を追跡し、TPA非添加群との microtumor の性状を比較した。

結果としては、まず培養ラット胎仔脳細胞の悪性化変化として、TPA添加群では、培養30日目にすでに piled up focus を認めかつ細胞体の縮小化、形態変化を認めたが、対称群では piled up focus に120日間を要し、胞体形状の変化をみなかった。更に、TPA添加群では培養30日頃から世代交代時間が対称群に比し有意に促進した。またTPA群では軟寒天上でコロニー形成能を40日で獲得、Con A 凝集能も30日目で亢進し、可移植性も約60日目で獲得し始めた。これら所見は対称群に比し有意に早期短期間に得られたものであった。また脳内移植組織はTPA群では細胞密度は高く、isomorphic であったが、対称群の疎な細胞密度で heteromorphic な所見と相異していた。さらに *in vivo* での microtumor の出現は、ENU-TPA処理群では早くも生後3週令で脳に広般に認められた。これに対し、TPA非添加群では生後10週令に始まり、しかも脳室上衣下や白質部に限られていた。

以上から明確なことは、ENUを発癌剤として投与された胎仔脳細胞の悪性変化に対し、また *in vivo* でのENU経胎盤誘発後の microtumor の発現に対して、TPAが強いプロモーター作用を示した点である。さらにTPAが脳組織に強い親和性があることから上記発癌促進機能がよく裏付けられるのである。以上TPAは、胎仔脳細胞の発癌機構促進、細胞分化の促進も推測されるが、本申請者は脳腫瘍モデルにおける発癌機構について、そのプロモーションの役割をTPAが果していることを研究したものであるが、従来ほとんど行なわれなかった脳腫瘍発癌の二段階説について重要な知見を得たものとして価値ある集積と認める。

よって本研究者は医学博士の学位を得る資格があると認める。